

平成27年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 34

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、加工等に関する研究又は調査に優れた業績が認められる研究者の表彰
- (4) 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)

年度	研究調査助成			伊藤記念財団賞授賞
昭和57年度	第1回	48件	60,000千円	
58	2	52	54,400	
59	3	60	49,800	
60	4	62	48,000	
61	5	70	53,000	
62	6	79	58,900	
63	7	95	70,500	
平成元年度	8	86	74,250	
2	9	79	60,000	
3	10	70	50,000	
4	11	86	60,000	
5	12	81	60,000	
6	13	81	60,000	
7	14	82	65,000	
8	15	81	69,100	
9	16	78	59,000	
10	17	82	60,000	
11	18	67	47,000	
12	19	57	41,000	
13	20	53	37,000	
14	21	58	40,000	
15	22	55	41,000	
16	23	55	48,000	
17	24	56	48,000	
18	25	11	10,000	
19	26	12	10,000	
20	27	15	16,900	
21	28	11	10,000	
22	29	11	10,400	
23	30	12	12,000	
24	31	13	13,000	
25	32	38	37,000	
26	33	58	54,800	
27	34	69	66,000	第1回 4名 (8,000千円)

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35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の中に浸透いたし、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34回（平成27年度）助成事業における69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とともに、第1回となります伊藤記念財団賞授賞事業の授賞者とその業績概要をとりまとめたものであります。以上を目的にしたがって、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28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.34 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. 2016
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



研究助成事業

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（その2） 増 田 俊 哉（大阪市立大学大学院生活科学研究科）.....	3
ZnPP 形成能を有する微生物の探索と応用 若 松 純 一（北海道大学北方生物圏フィールド科学センター）.....	12
筋タンパク質の死後分解に与えるオートファジーの影響：プロテオーム解析を用いたアプローチ 仲西 友紀・河原 聡（宮崎大学農学部応用生物科学科）.....	17
乳業用乳酸菌カルチャーを接種した発酵乾燥食肉製品の加工技術と特徴に関する研究 根 岸 晴 夫（中部大学応用生物学部）.....	23
ミオシンの水溶化現象に関連する尾部領域の特定 早 川 徹（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）.....	29
廃食肉中のタンパク質を用いた貴金属リサイクル技術の開発 丸 山 達 生（神戸大学大学院工学研究科）.....	34
食肉製品の塩漬熟成に伴う呈味性発現に関する研究（Ⅱ）－ヒポキサンチンによる呈味性発現機構－ 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）.....	41
鶏肉フライの加熱・保存過程におけるテクスチャーの決定要因と変化機構の解明 杉山 寿美・野村 知未* （県立広島大学人間文化学部健康科学科, *広島女学院大学人間生活学部）.....	49
デジタル PCR 法を用いた食肉加工品中におけるリステリア菌の迅速定量法の開発 高 橋 肇（東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門）.....	55
メタボロミクス解析結果に基づく黒毛和種牛肉の美味しさに関わる指標の検証 鈴木 啓一 ¹ ・加藤 和雄 ¹ ・紅 玉 ¹ ・鈴木 裕 ¹ ・盧 尚建 ¹ ・飯田 文子 ² ・小松 智彦 ³ （ ¹ 東北大学大学院農学研究科, ² 日本女子大学, ³ 山形県総合農業センター）.....	61
野生動物肉の加工利用のための技術開発：加工適性に及ぼす血紋りと塩漬法の効果 坂田 亮一・時田 昇臣*・押田 敏雄 （麻布大学獣医学部, *日本獣医生命科学大学動物科学科）.....	67
ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その2） 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）.....	72
畜産物由来ペプチドの肝障害改善の効果について 實 安 隆 興（神戸大学大学院農学研究科）.....	81

肥満に伴う認知症の発症予防における豚肉摂取の効果 後藤 孔郎・加隈 哲也・柴田 洋孝 (大分大学医学部内分泌代謝膠原病腎臓内科学講座)	85
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)	91
新規な発酵食肉製品の機能性について 六車 三治男・川越 聖人・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)	96
豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす影響 岡 本 芳 晴 (鳥取大学農学部)	104
機能性食肉の開発を目指した「身体に効く成分」の分析 加治屋 勝子 (鹿児島大学農学部)	108
血中トリプトファン濃度とうつ状態との関連：双極性と単極性の鑑別を目指して 堀 宏治・富岡 大・葉梨 喬広・高尾 哲也* 清水 史子*・高田 明和** (昭和大学横浜市北部病院メンタルケアセンター, *昭和女子大学生生活科学部, **NPO法人 食と健康Project)	113
食肉および家畜の微生物制御に資する乳酸菌由来抗菌ペプチドの探索 善 藤 威 史 (九州大学大学院農学研究院)	117
成長期女子スポーツ選手の食事摂取状況と畜産物由来ヘム鉄摂取の有効性についての検討 ～特に貧血予防とメンタルヘルスに及ぼすヘム鉄の影響に着目して～ 吉川 豊・坂元 美子 (神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)	123
豚増体量に及ぼす暑熱ストレス耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子を探る 山 田 宜 永 (新潟大学農学部)	130
揮発性脂肪酸が牛筋肉内脂肪細胞分化に及ぼす影響 溝口 康・松野 泉 (明治大学農学部, 明治大学大学院農学研究科)	137
ブランド豚肉生産用原種豚の遺伝的多様性の維持に関する研究 古川 力・野村 こう・高橋 幸水 (東京農業大学農学部)	142
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・柴田 愛梨・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, *公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所)	148
黒毛和種牛のルーメン絨毛組織の発達関連遺伝子の網羅的解析に関する研究 盧 尚 建 (東北大学大学院農学研究科)	156

牛 CHFR および RB1 遺伝子プロモーター流域の DNA メチル化多型と 肉質形質との関係に関する分子遺伝的研究	須田 義人 (宮城大学食産業学部)	160
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・保地 眞一 (信州大学繊維学部)	165
乳牛における炎症性子宮疾患の迅速診断を目指した子宮の炎症度スコアの確立	清水 隆 (帯広畜産大学畜産衛生学研究部門)	170
異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定	坂口 実・菊池 元宏・三浦 弘 (北里大学獣医学部)	175
氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した豚卵巣および精液の過冷却保存	星野 由美 (広島大学大学院生物圏科学研究科)	181
赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討	岡山 毅・佐藤 晴香・小針 大助 (茨城大学農学部)	186
ミトコンドリア機能解析に基づく家畜優良胚選別法の開発	阿部 宏之 (山形大学大学院理工学研究科)	191
牛伸長胚の生育に関わる子宮内膜細胞因子の探索	細江 実佐 (農業生物資源研究所動物発生分化研究ユニット)	197
<i>Rhizopus oryzae</i> 水抽出物の肝障害抑制効果を応用した牛受精卵生産技術の向上	鈴木 武人 ¹ ・堀 登 ² ・林 みち子 ² ・内尾 陽子 ² ・牛越 設男 ³ (¹ 麻布大学獣医学部, ² 石川県農林総合研究センター畜産試験場, ³ ㈱牛越生理学研究所)	202
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	佐々木 羊介・上松 瑞穂*・北原 豪**・大澤 健司** (宮崎大学テニュアトラック推進機構, *NOSAIみやざき, **宮崎大学農学部)	209
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	ツェンコヴァ ルミアナ・窪田 陽介・古川 茜・ジア アシフ (神戸大学農学研究科生体計測工学研究室)	214
種雄牛の受胎性評価に資する精子メチル化可変部位の解明	武田 久美子・小林 栄治 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)	220
肥育前の和牛雌子牛の摘出卵巣からの胚生産に関する研究	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研究部門)	225
牛白血病ウイルス高感染牛の予後の評価	目 堅 博 久 (宮崎大学テニュアトラック推進機構)	231
鶏糞由来バイオセラミックによるウイルスの伝播抑制	竹原 一 明 (東京農工大学大学院農学研究)	237

シカ肉に寄生する住肉胞子虫の形態学的・分子生物学的同定ならびに腸管毒性評価 松田 一哉・平田 晴之・臼井 優 (酪農学園大学獣医学群獣医学類)	242
肉用鶏における <i>Salmonella Agona</i> の emerging とその発生要因の解析 鳥居 恭司・村上 覚史・横山 栄二* (東京農業大学農学部畜産学科, *千葉県衛生研究所)	248
マダニの酸化ストレス制御分子を標的とした抗マダニワクチンの開発 田仲 哲也・草木迫 浩大・宮田 健* (鹿児島大学共同獣医学部, *鹿児島大学農学部)	253
食肉からの感染源となるトキソプラズマの休眠型虫体に関する研究 加藤 健太郎 (帯広畜産大学原虫病研究センター)	258
鶏肉の生産性向上を目指した安全な原虫防除法の開発 松林 誠・谷 浩行 (大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)	262
豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚と一般ランドレース豚との 自然免疫関連分子および腸内環境比較 佐久間 晶子・吉野 淳良・高橋 伸和・野地 智法* 須田 義人**・麻生 久* (宮城県畜産試験場, *東北大学大学院農学研究科, **宮城大学食産業学部)	266
磁気ビーズルシフェラーゼ免疫沈降法による抗豚流行性下痢ウイルス抗体検出系の開発 堀 江 真 行 (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)	272
豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究 鈴木 亨・大橋 誠一 (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)	278
国際競争に勝つ『サルモネラ-ゼロ』モデル養豚場の作出 末 吉 益 雄 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)	283
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)	288
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 久米 新一・谷口 紗耶 (京都大学大学院農学研究科)	293
飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の検証 一内分泌攪乱作用の有無と繁殖性に与える影響の解明 高木 光博・宇野 誠一*・國師 恵美子* (山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座, *鹿児島大学)	298
非侵襲的生体電気インピーダンス法による牛枝肉脂肪交雑の推定 橋元 大介・福田 修* (長崎県農林技術開発センター, *佐賀大学大学院工学系研究科)	303

食肉特性の向上を目指して：ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成誘導 ……………辰巳 隆一・水野谷 航・宮原 秀雄・岡本 慎平・赤星 真理子 鈴木 貴弘・ド マイコイ・大坪 秀明・小宮 祐介 チャハラ モクラン・中村 真子・池内 義秀 (九州大学大学院農学研究科) ……………	309
リンゴジュース粕の機能性を生かした高付加価値豚肉生産技術の開発 ……………房 家 琛(弘前大学農学生命科学部) ……………	315
「乳質の良さ」が注目されるブラウンスイス種乳牛の栄養・繁殖特性の解明 ……………遠藤 なつ美・田中 知己(東京農工大学農学部) ……………	321
黒毛和種における <i>RBP4</i> 多型と枝肉形質の関連解析 ……………平野 貴・原 ひろみ・半澤 恵(東京農業大学農学部) ……………	326
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) ……………	332
粳米の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術の開発 ……………有賀 小百合・佐藤 衆介(帝京科学大学生命環境学部) ……………	338
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 ……………高 橋 秀 之(九州大学農学部附属農場) ……………	343
放牧養豚用アニマルウェルフェア評価法の開発 ……………瀬 尾 哲 也(帯広畜産大学畜産学部) ……………	347
効率的な家畜生産に資する生殖中枢メカニズムの解明 ……………上野山 賀久(名古屋大学大学院生命農学研究科) ……………	351
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・石川 潤一* (東海大学農学部バイオサイエンス学科, *宮城大学大学院食産業学研究科) ……………	354
黒毛和種子牛における呼吸器病の血清亜鉛濃度および亜鉛投与による臨床的な症状改善効果の検討 ……………乙丸 孝之介・窪田 力・米重 隆一*・時森 麻紀子* (鹿児島大学共同獣医学部, *北薩農業共済組合) ……………	363
難培養性乳酸菌を用いた第3世代サイレージ添加剤の開発 ……………西 野 直 樹(岡山大学大学院環境生命科学研究科) ……………	367
食肉由来病原体に対する腸管免疫に関与する血清アミロイド A の機能解析 ……………猪 島 康 雄(岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科) ……………	372
牛肉の各部位に含まれる機能性成分に与える品種の影響について ……………平 山 琢 二(滋賀県立大学環境科学部) ……………	377
同腹産仔間で成長が異なる仔豚の代謝特性比較 ……………塚 原 隆 充(京都府立大学大学院生命環境科学研究科) ……………	383

CONTENTS

Studies on fresh color preservation of meats by use of the potent reducing activity of polyphenols, part II	
Toshiya Masuda (Graduate School of Human Life Science, Osaka City University)	3
Searching for microorganisms with a high ZnPP-forming ability and its application to meat products	
Jun-ichi Wakamatsu (Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)	12
Effects of autophagy on postmortem proteolysis in skeletal muscle: An approach using proteomic analysis	
Tomonori Nakanishi and Satoshi Kawahara (Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	17
Study on processing technology and characteristics of fermented meat products produced using lactic acid bacteria cultures for dairy products	
Haruo Negishi (College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)	23
The identification of myosin rod region involved in the solubilization under the low ionic strength condition	
Toru Hayakawa (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Animal and Food Hygiene)	29
Recycle of precious metal ions using proteins derived from waste meat	
Tatsuo Maruyama (Graduate school of engineering, Kobe University)	34
Studies on the formation of specific meat taste in cured meat products (II)	
- Specific meat taste induced by hypoxanthine -	
Sayaka Ichimura, Yukinobu Nakamura, Yuka Yoshida and Akihito Hattori (Japan Meat Science and Technology Institute)	41

Elucidation of the determining factor of the textural properties in the heating and storage process of fried chicken	
Sumi Sugiyama and Satomi Nomura*	
(Faculty of Human Culture and Science, Prefectural University of Hiroshima, *Faculty of Human Life Science, Hiroshima Jogakuin University)	49
Establishment of the rapid enumeration method for <i>Listeria monocytogenes</i> by using the Digital PCR	
Hajime Takahashi	
(Laboratory of food microbiology, Department of Food Science and Technology, Tokyo University of Marine Science and Technology)	55
Verification of index related to delicious of Japanese Black Cattle Beef meat based on metabolomics analytical result	
Keiichi Suzuki ¹ , Kazuo Katoh ¹ , Hong Yu ¹ , Yutaka Suzuki ¹ , Sanggun Roh ¹ , Fumiko Iida ² and Tomohiko Komatsu ³	
(¹ Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, ² Japan Women's University, ³ Livestock Experiment Station of Yamagata Integrated Agricultural Research Center)	61
Technology for game meat utilization and effects of pre-salting and curing on meat processing	
Ryoichi Sakata, Norio Tokita* and Toshio Oshida	
(Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University, *Department of Animal Science, Nippon Veterinary and Life Science University)	67
Studies on clarification of the compounds involved in “koku attributes” of pork sausages (Part 2)	
Toshihide Nishimura and Ai Egusa	
(Department of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University)	72
Effect of dietary animal peptides on hepatic injury	
Takaoki Saneyasu	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)	81
Effect of the pork intake on the prevention of dementia related with obesity	
Koro Gotoh, Tetsuya Kakuma and Hirotaka Shibata	
(Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology and Nephrology, Faculty of Medicine, Oita University)	85
Basic study of the development of an innovative hypocholesterolemic food materials using cattle heart peptides	
Satoshi Nagaoka	
(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	91

Functional properties of novel fermented meat products

Michio Muguruma, Masato Kawagoe, Saki Kimoto, Kumiko Kawakita and Shinichi Takenoyama.
(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) 96

Effects of porcine liver powder on intestinal environment and lipid metabolism

Yoshiharu Okamoto
(Faculty of Agriculture, Tottori University) 104

Analysis of the “ingredients that have effects on the body” in order to develop potential meat-based functional foods

Katsuko Kajiya
(Faculty of Agriculture, Kagoshima University) 108

Relationship between plasma tryptophan concentration and depression : for discrimination bipolar and monopolar depression

Koji Hori, Hiroi Tomioka, Takahiro Hanashi, Tetuya Takao*, Fusako Shimizu* and Akikazu Takada**
(Showa University Northern Yokohama Hospital, *Department of Human Health and Design, Showa Women's University, **International Projects on Food and Health (NPO)) 113

Screening and characterization of antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria for microbial control of meat and livestock

Takeshi Zendo
(Faculty of Agriculture, Kyushu University) 117

The study of dietary intake status and effectiveness of heme iron intake derived from animal products with growing girls sports player

Yutaka Yoshikawa and Yoshiko Sakamoto
(Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University) 123

Exploration of genes involved in genetic variation in heat stress tolerance for growth rate of finishing pig

Takahisa Yamada
(Faculty of Agriculture, Niigata University) 130

Effect of volatile fatty acid on bovine intramuscular adipocyte differentiation

Yasushi Mizoguchi and Izumi Matsuno
(School of Agriculture, Meiji University) 137

Sustainability of genetic diversity in original pig strains used for branding pork

Tsutomu Furukawa, Koh Nomura and Yukimizu Takahashi
(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture) 142

Prediction of genomic breeding values for meat color defined by myoglobin content in longissimus muscle of Japanese Black cattle	
Mizuho Yamasaki, Eri Shibata, Sachio Kouno, Toshio Watanabe* and Yoshikazu Sugimoto* (Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Research Center, *Shirakawa Institute of Animal Genetics)	148
Study on the global analysis of genes related with development of rumen papillae in Japanese Black cattle	
Sang-gun Roh (Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)	156
Molecular research for relationship between DNA methylation in bovine CHFR or RB1 gene's promoter region and meat quality	
Yoshihito Suda (School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)	160
Development of porcine/bovine germline stem cell technology using novel growth factor	
Seiji Takashima and Sinichi Hochi (Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University)	165
Establishment of the scoring of uterine inflammation in dairy cows for a rapid diagnosis	
Takashi Shimizu (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Animal and Food Hygiene)	170
Novel standard for artificial insemination timing based on different estrous detection criteria in cattle	
Minoru Sakaguchi, Motohiro Kikuchi and Hiroshi Miura (School of Veterinary Medicine, Kitasato University)	175
Supercooling preservation of pig ovaries and the semen by using an amino acid that effectively inhibits ice crystal formation	
Yumi Hoshino (Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)	181
Development of prediction technique of parturition by an IR depth sensor in beef cattle	
Tsuyoshi Okayama, Haruka Sato and Daisuke Kohari (College of Agriculture, Ibaraki University)	186
Development of novel system for quality evaluation of bovine embryos by analysis of mitochondrial function	
Hiroyuki Abe (Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University)	191

Screening of endometrium cell-derived factors involved in bovine elongated embryo survival	
Misa Hosoe	
(National Institute of Agrobiological Sciences, Animal Development and Differentiation Research Unit)	
.....	197
Improvement of the fertilized ovum production technique using liver damage suppressant effect of <i>Rhizopus oryzae</i> aqueous extract in cattle	
Takehito Suzuki ¹ , Noboru Hori ² , Michiko Hayashi ² , Yoko Uchio ² and Setsuo Ushikoshi ³	
(¹ School of Veterinary Medicine, Azabu University, ² Ishikawa Prefectural Agriculture And Forestry Research Center Livestock Experimental Station, ³ Ushikoshi Research Institute for Physiology Co., Ltd.)	
.....	202
Standard operation procedures for Japanese Black cattle related to reproductive performance	
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)	
.....	209
Development of rapid and non-destructive diagnostic system for cow's estrus and pregnancy	
Roumiana Tsenkova, Yosuke Kubota, Akane Furukawa and Zia Asif Iqbal	
(Biomeasurement Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)	
.....	214
Identification of differentially methylated sites in sperm DNA and their contribution to the evaluation of bull fertility	
Kumiko Takeda and Eiji Kobayashi	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	
.....	220
Studies of <i>in vitro</i> embryo production using growing oocytes collected from the ovaries removed from Japanese beef calves before fattening	
Satoko Matoba, Yuji Hirao and Kumiko Takeda	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	
.....	225
Prognosis evaluation of high-viral-load BLV-infected cattle	
Hirohisa Mekata	
(Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki)	
.....	231
Inhibition of transmission of viruses using bioceramic derived from chicken feces	
Kazuaki Takehara	
(Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)	
.....	237
Morphological and molecular identification, and evaluation of enterotoxicity of <i>Sarcocystis</i> spp. isolated from muscular tissue of sika deer	
Kazuya Matsuda, Haruyuki Hirata and Masaru Usui	
(Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)	
.....	242

Emergency and analysis of the causes of *Salmonella* Agona in broiler chicken

Yasushi Torii, Satoshi Murakami and Eiji Yokoyama*

(Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,

*Chiba Prefectural Institute of Public Health) 248

The development of anti-tick vaccine as a target against regulating molecule for oxidant stress

Tetsuya Tanaka, Kodai Kusakisako and Takeshi Miyata*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, *Faculty of Agriculture, Kagoshima

University) 253

Studies on *Toxoplasma* dormant parasite as a source of food-borne disease

Kentaro Kato

(National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary

Medicine) 258

Construction of protective system against protozoan diseases for productivity improvement in poultry industry

Makoto Matsubayashi and Hiroyuki Tani

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University) 262

Comparison of innate immune related molecules and an entrail environment between landrace pigs that have been selected for genetic resistance to mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) and normal landrace pigs

Akiko Sakuma, Jyunryo Yoshino, Nobukazu Takahashi, Tomonori Nochi*, Yoshihito Suda** and Hisashi Aso*

(Miyagi Livestock Experimental Station, Miyagi, Japan, *Graduate School of Agricultural Science,

Tohoku University, **Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University) 266

Development of a luciferase immunoprecipitation assay for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea viruses

Masayuki Horie

(Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima

University) 272

Experimental infection with porcine deltacoronavirus in pigs

Tohru Suzuki and Seiichi Ohashi

(National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

..... 278

Construction of the “Salmonella-free” model pig farm to be able to win international competition

Masuo Sueyoshi

(The Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki) 283

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) 288

Effects of functional components in grass on enhancing immunoglobulin in colostrum

Shinichi Kume and Saya Taniguchi

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University) 293

Monitoring of naturally contaminated mycotoxin concentrations in feeding environment of cattle—Effects as endocrine disruptors and reproductive efficacy

Mitsuhiro Takagi, Seiichi Uno* and Emiko Kokushi*

(Department of Clinical Veterinary Science, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, *Kagoshima University) 298

Estimation of beef marbling standard number based on non-invasive bioelectrical impedance analysis

Daisuke Hashimoto and Osamu Fukuda*

(Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center, *Graduate School of Science and Engineering, University of Saga) 303

Slow-myofiber generation induced by dietary polyphenol feeding, toward enhancing meat quality

Ryuichi Tatsumi, Wataru Mizunoya, Hideo Miyahara, Shinpei Okamoto, Mariko Akahoshi, Takahiro Suzuki, Mai-Khoi Q. Do, Hideaki Ohtsubo, Yusuke Komiya, Mulan Qahar, Mako Nakamura and Yoshihide Ikeuchi

(Graduate School of Agriculture, Kyushu University) 309

Development of high value-added pork production technology using functionality of apple pomace

Jiachen Fang

(Faculty of Agriculture and life Science, Hirosaki University) 315

Characteristics of nutrition and reproductive physiology of the high-quality milk producer of Brown Swiss dairy cattle

Natsumi Endo and Tomomi Tanaka

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) 321

Association analysis between *RBP4* gene polymorphisms and carcass traits in Japanese black cattle

Takashi Hirano, Hiromi Hara and Kei Hanzawa

(Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture) 326

Establishment of bovine and swine derived hepatocytes for the lipid metabolism and infection study	
Tomokazu Fukuda (Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science)	332
Development of animal welfare friendly broiler production system by unhusked rice feeding in Japan	
Sayuri Ariga and Shusuke Sato (Teikyo University of Science, Faculty of Life and Environmental Sciences)	338
Effect of myostatin control during early growth period on meat quality of Japanese Black cattle	
Hideyuki Takahashi (Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University)	343
Development of on-farm pastured pig welfare assessment protocol	
Tetsuya Seo (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)	347
Elucidation of central mechanism controlling reproduction to improve production efficiency of livestock	
Yoshihisa Uenoyama (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)	351
Bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria using lactic acid bacteria and development of functional domestic animal fodder	
Hideki Kinoshita and Junichi Ishikawa* (Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, *Graduate School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)	354
Serum zinc value of respiratory disease calves in Japanese Black and effect of supplemental zinc in Japanese Black calves against clinical respiratory diseases	
Konosuke Otomaru, Chikara Kubota, Ryuichi Yonesige* and Makiko Tokimori* (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, *Hokusatsu Agricultural Mutual Aid Associations)	363
Development of third-generation silage inoculant using difficult-to-culture lactic acid bacteria	
Naoki Nishino (Graduate School of Life and Environmental Science, Okayama University)	367
Biological characterization of serum amyloid A in intestinal immunity against edible meat-borne pathogens	
Yasuo Inoshima (Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	372

Effect of bleed on the functionality composition of beef

Takuji Hirayama

(School of Environmental Science, University of the Shiga Prefecture) 377

Analysis on the metabolic profiles between healthy and mal-development piglets in same littermates

Takamitsu Tsukahara

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University) 383

伊藤記念財団賞

目 次

- 尾 嶋 孝 一**（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門畜産物研究領域 上級研究員）
骨格筋細胞における筋原線維の形成とその構成タンパク質分解に関する分子細胞生物学的研究
..... 397
- 山 内 啓太郎**（東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授）
骨格筋前駆細胞群の分化制御機構解明を通じた高付加価値食肉生産のための知的基盤の確立 ... 398
- 盧 尚 建**（東北大学大学院農学研究科 准教授）
高品質牛肉の産肉性を特徴づける脂肪細胞由来の新規調節因子の解明に関する研究 399
- 若 松 純 一**（北海道大学北方生物圏フィールド科学センター 准教授）
食肉製品中の新規赤色素の形成機構および食肉の体熱産生機構に関する研究 400

研究助成事業

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（その2）

Studies on fresh color preservation of meats by use of the potent reducing activity of polyphenols, part II

増田 俊 哉

(大阪市立大学大学院生活科学研究科)

Toshiya Masuda

(Graduate School of Human Life Science, Osaka City University)

During our project for meat color preservation by polyphenols, we have found that cysteine can support polyphenol's reducing activity from metmyoglobin (MetMb) to oxymyoglobin (MbO₂). In this report, we present development of new cysteine-polyphenol reagents for the meat color preservation. Preparation of the reagents was carried out by peroxidase-catalyzed oxidation of polyphenols in the presence of cysteine. Cysteinyl polyphenols were prepared from catechin, chlorogenic acid, dihydrocaffeic acid, hydroxytyrosol, nordihydroguaiaretic acid, and rosmarinic acid. These cysteinyl polyphenols showed a concentration-dependent reducing activity for MetMb to MbO₂ for initial one hour. However, after one hour, some of them decreased the amount of MbO₂ produced. The effect of the number of cysteinyl sulfur substitutions in polyphenols on both MetMb reduction and MbO₂ maintenance was examined using hydroxytyrosols with different numbers of cysteine substitutions; these hydroxytyrosols were synthesized from hydroxytyrosol and *N*-acetylcysteine methyl ester. The hydroxytyrosol derivative that substituted with two *N*-acetylcysteine esters exhibited the most effective reducing activity without any effect on MbO₂.

1. 目 的

食肉の鮮やかな赤色はその新鮮さの指標とされる。食肉の鮮赤色は、食肉加工時のブルーミング過程において酸素分子がヘムタンパク質であるミオグロビン (Mb) と反応して生成するオキシミオグロビン (MbO₂) に由来する。なおこのMbO₂ はそれほど安定ではなく、徐々に茶色のメトミオグロビン (MetMb) へと変化する (MbO₂の酸化

的変色)。この褐変化現象は消費者による食肉の新鮮さのイメージを低下させ¹⁾、その市場価値に影響するため、その鮮赤色を保持することは食肉流通上重要な課題とされてきた²⁾。

ところで、ポリフェノールは、植物および植物由来の食品に特徴的に存在する機能性成分である。ポリフェノールにはこれまで様々な機能が見出されてきているが、物質本来の性質としては、生体成分の酸化を抑制する抗酸化能やそれに関連

した強い還元性があげられる。我々はMbO₂の酸化的褐変を防止するために、このポリフェノールの利用の可能性を検討してきた。その過程で、強力な抗酸化性を有するポリフェノールがむしろMbO₂の酸化を加速させることを発見した³⁾。また別のアプローチとして、ポリフェノールの高い還元力を利用して、MetMbを還元し鮮赤色のMbO₂に変換することを試みた。その結果、ケルセチンおよびケンフェロールなどのフラボノール型ポリフェノールに、MetMbを還元しMbO₂とする能力を初めて見出し、昨年度の本財団助成研究報告書において報告した⁴⁾。しかしながらフラボノールのMetMbからMbO₂への変換効率はそれほど高くなく、その実用性に問題が残された。なおケルセチンを用いて、MetMbからMbO₂への変換反応機構を解析したところ、ケルセチンがMetMbを還元する段階で生じるキノン性物質が、せっかく生じたMbO₂の酸化を促進していることが示唆された。すなわち、MbO₂から生じてくる褐色のMetMbを効率的に鮮赤色のMbO₂に戻し、それを維持するには、還元性の強いポリフェノールを用い、その還元反応で生じるプロオキシダント性のキノン物質をいかに速く消去するかが鍵となると考えられた。そこで、ポリフェノールによるMetMb還元反応系に、求核性の高いチオール基を有するシステインを添加したところ、非常に効率的にMbO₂化が可能なることを見出した⁵⁾。さらに研究を進めると、システインのチオール基の効果は、ポリフェノール由来のキノン物質の消去のみならず、置換反応によるポリフェノールの還元性自体への影響も考えられたため、その効果を詳細に解明し、実用化可能な食肉新鮮色維持に繋がるポリフェノール系物質の開発に貢献すべく、今回の助成研究を進めることにした。

2. 方法

2.1 MetMbの調製

MetMb溶液はMbO₂溶液にヘキサシアノ鉄(Ⅲ)カリウムを添加して調製した。MbO₂ (120 μmol/l)のストックリン酸緩衝溶液 (pH7.4, 3 ml) にヘキサシアノ鉄(Ⅲ)カリウム (2 mg) を加え、23℃、5分間穏やかに攪拌した後、溶液をAmicon Ultra-0.5限外濾過膜を用いて、4℃、6分間、14,000 gの遠心操作で脱塩を行った。残存溶液を緩衝液で希釈しMetMbの溶液 (120 μmol/l) 3 mLを得た。MetMb液の純度と濃度はUV/VIS分光光度計を用いて確認した。

2.2 ポリフェノール-システイン複合体の調製

各ポリフェノールの水溶液 (18 mmol/l, 1 ml) をシステイン水溶液 (18 mmol/l, 1 ml) に混合し、その溶液にペルオキシダーゼ (60 μmol/L, 20 μL), およびH₂O₂ (400 mmol/l, 30 μl) を添加し、溶液を水で4 mlにした。溶液を8分間25℃でインキュベートし、酸化ポリフェノール溶液 (使用ポリフェノール濃度に基づき、4.5 mmol/l) を得た。対照サンプル溶液は、システインを添加せずに同様の手順で調製した。

2.3 MetMb還元によるMbO₂化率の測定

リン酸緩衝液 (pH7.4, 250 μl), MetMb (120 μmol/l, 150 μl), DMSO 10 μl, 試料溶液 (4.5 mmol/l, 40 μl) を順に96ウェルマイクロプレートに加え、マイクロプレートリーダー中で1時間、37℃でインキュベートし、その後、吸光度を500 nmおよび582 nmで測定した。MbO₂の生成量は、 $MbO_2 (\mu mol/l) = (89.7 \times A_{582}) - (32.9 \times A_{500})$ 式を用いて計算し、MetMbからMbO₂への還元的換効率として表した。

2.4 システニルポリフェノールの調製と構造の同定

各種システニルポリフェノール調製法の一例としてシステニルカテキンの調製および精製法を示した。カテキン (50 mg) のメタノール (4 ml) - 水 (12 ml) 溶液に, システイン (42 mg) を添加し, ペルオキシダーゼ (4.6 mg) と H_2O_2 (0.4 mol/l, 360 μ l) を加えた。室温で攪拌し, 数分後に溶液中のメタノールを減圧下で除去し, 得られた溶液を分取HPLCにて精製した。[column : Cosmosil 5C18-AR-II (250 mm x 20 mm i.d.) ; solvent : CH_3CN : 0.1% trifluoroacetic acid aq. = 5 : 95 (v/v) ; flow rate (ml/min) : 11 ; peak retention time (min) 48 and 57] 2'-S-cysteinylcatechin (1) および5'-S-cysteinylcatechin (2) を16%および22%の収率で得た。以下同様に各種システニルポリフェノール (3-12) を得て, 下記の分析データより化学構造を確定した。

2'-S-Cysteinylcatechin (1). HR-ESI-MS (m/z) [$M-H$]⁻ calcd for $C_{18}H_{18}NO_8S$, 408.0753 ; found, 408.0742. ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 5.54 (1H, d, $J=9.0$ Hz, H2), 4.11 (1H, dt, $J=9.0$ and 5.2 Hz, H3), 2.59 (1H, dd, $J=16.0$ and 5.2 Hz, H4a), 2.98 (1H, dd, $J=16.0$ and 9.0 Hz, H4b), 5.95 (1H, s, H6), 5.80 (1H, brs, H8), 6.92 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5' or H6'), 6.94 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5' and H6'), 3.67 (1H, dd, $J=14.8$ and 4.0 Hz, H2'' a), 3.12 (1H, dd, $J=14.8$ and 9.6 Hz, H2'' b), 3.94 (1H, dd, $J=4.0$ and 9.6 Hz, H3'') ; ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 80.4 (C2), 69.1 (C3), 30.2 (C4), 158.1 (C5 or C7), 96 (C6, very weak peak), 157.8 (C5 or C7), 95 (C8, very weak peak), 157.4 (C9), 101.4 (C10), 135.1 (C1'), 119.6 (C2'), 148.4 (C3'), 146.8 (C4'), 117.6 (C5'), 120.8 (C6'), 36.4 (C2''), 54.0 (C3''), 170.9 (C4''). **5'-S-Cysteinylcatechin (2).** HR-ESI-MS (m/z) [$M-H$]⁻ calcd for

$C_{18}H_{18}NO_8S$, 408.0753 ; found, 408.0745 ; ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 4.47 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H2), 3.91 (1H, ddd, $J=8.8, 7.6$ and 5.6 Hz, H2), 2.88 (1H, dd, $J=16.2$ and 5.6 Hz, H4a), 2.46 (1H, dd, $J=16.2$ and 8.8 Hz, H4b), 5.90 (1H, s, H6), 5.80 (1H, brs, H8), 6.88 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H2'), 7.00 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H6'), 3.49 (1H, dd, $J=14.6$ and 4.0 Hz, H2'' a), 3.15 (1H, dd, $J=14.6$ and 8.8 Hz, H2'' b), 3.86 (1H, dd, $J=8.8$ and 4.0 Hz, H3'') ; ¹³C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 82.9 (C2), 69.2 (C3), 29.4 (C4), 158.1 (C5 or C7), 96 (C6, very weak peak), 157.8 (C7 or C5), 95 (C8, very weak peak), 157.0 (C9), 101.1 (C10), 132.8 (C1'), 116.7 (C2'), 147.0 (C3'), 147.8 (C4'), 118.7 (C5'), 126.3 (C6'), 36.4 (C2''), 54.1 (C3''), 171.2 (C4''). **2''-S-Cysteinylchlorogenic acid (3).** HR-ESI-MS (m/z) [$M-H$]⁻ calcd for $C_{19}H_{22}NO_{11}S$: 472.0914, Found : 472.0893 ; ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 6.34 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H2'), 8.36 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H3'), 6.87 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5''), 7.23 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H6''), 5.33 (1H, m, H3), 3.71 (1H, brd, $J=7.6$ Hz, H4), 4.14 (1H, m, H5), 1.98-2.19 (4H, overlapped m, H2 and H6), 3.30 (2H, overlapped with solvent signals, H2'''), 3.93 (1H, br, H3'''). **2',5' (or 5',6')-Bis(S-cysteinyl) dihydrocaffeic acid (4)** : HR-ESI-MS (m/z) [$M-H$]⁻ calcd for $C_{15}H_{19}N_2O_8S_2$: 419.0583, Found : 419.0572 ; ¹H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.00-3.20 (2H, complexed m, H2, NOE from H6'), 2.59 (2H, m, H3, NOE from H6'), 7.01 (1H, s, H6'), 3.25-3.35 (3H, overlapped with solvent signals, H2'' and H2'''b), 3.89 (1H, dd, $J=6.4$ and 5.9 Hz, H3''), 3.42 (1H, dd, $J=16.0$ and 4.0 Hz, H2''a), 3.59 (1H, dd, $J=7.2$ and 4.0 Hz, H3'''). **5'-S-Cysteinyl dihydrocaffeic acid (5)** : HR-ESI-MS (m/z) [$M-H$]⁻ calcd for $C_{12}H_{14}NO_6S$:

300.0542, Found : 300.0527 ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.76 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H2), 2.54 (2H, t, $J=7.6$ Hz, H3), 6.72 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H2'), 6.84 (1H, d, $J=2.4$ Hz, H6'), 3.48 (1H, dd, $J=14.4$ and 4.0 Hz, H2''a), 3.16 (1H, dd, $J=14.4$ and 9.2 Hz, H2''b), 3.91 (1H, dd, $J=9.2$ and 4.0 Hz, H3''). 2',5' (or 5',6')-Bis(S-cysteinyl) hydroxytyrosol (6) : HR-ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_7\text{S}_2$: 391.0634, Found : 391.0633 ; ^1H NMR (400MHz, D_2O) δ 3.83-3.70 (4H, complex, H1, H3'', and H3'''), 7.03 (1H, s, H6'), 3.42 (2H, brd, $J=14.0$ Hz, H2''a and H2'''a), 3.28-3.15 (2H, complex, H2'' band H2'''b), 3.02 (2H, m, H2). 5'-S-Cysteinylhydroxytyrosol (7), HR-ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{14}\text{NO}_5\text{S}$: 272.0593, Found : 272.0591 ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.69 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H1), 2.66 (2H, t, $J=7.0$ Hz, H2), 6.70 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H2'), 6.85 (1H, d, $J=1.8$ Hz, H6'), 3.52-3.45 (2H, complex, H2''a and H3'), 2.96 (1H, dd, $J=15.6$ and 11.6 Hz, H2''b). 5'-S-Cysteinylordihydroguaiaretic acid (1 : 1 mixture of diastereomers) (8), HR-ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_6\text{S}$: 420.1481, Found : 420.1474 ; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 2.20 (2H, m, H1a and H4a), 2.65 (2H, m, H1b and H4b), 1.70 (2H, m, H2 and H3), 0.82 (6H, d, $J=5.2$ Hz, 2- CH_3 and 3- CH_3), 6.76 (1H, d, $J=1.2$ Hz, H2'), 6.65 (1H, overlapped with H5' signal, H6'), 6.58 (1H, brs, H2''), 6.66 (1H, d, $J=7.6$ Hz, H5''), 6.46 (1H, dd, $J=7.6$ and 1.8 Hz, H6''), 3.49 (1H, dd, $J=12.8$ and 4.8 Hz, H1'''a) [3.46 (1H, dd, $J=12.8$ and 4.8 Hz)], 3.17 (1H, dd, $J=12.8$ and 4.4 Hz, H1'''b) [3.14 (1H, dd, $J=12.8$ and 4.4 Hz)], 3.93 (1H, dd, $J=4.8$ and 4.4 Hz, H2''') [3.91 (dd, $J=4.8$ and 4.4 Hz)]. 2'''-S-Cysteinylrosmarinic acid (5 : 4 mixture of diastereomers) (9) : HR-

ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{NO}_{10}\text{S}$: 478.0808, Found : 478.0794 ; ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 5.21 (1H, dd, $J=9.2$ and 4.0 Hz, H2) [5.24 (1H, dd, $J=9.2$ and 4.0 Hz, H2)], 3.11-3.18 (1H, m, H3a), 2.98-3.05 (1H, m, H3b), 6.84 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H2') [6.86 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H2')], 6.76 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5') [6.78 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5')], 6.69 (1H, dd, $J=8.4$ and 1.6 Hz, H6') [6.70 (1H, dd, $J=8.4$ and 1.6 Hz, H6')], 6.35 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H2'') [6.38 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H2)], 8.41 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H3'') [8.31 (1H, d, $J=16.0$ Hz, H3'')], 6.99 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H5'''), 7.35 (1H, d, $J=8.4$ Hz, H6'''), 3.36 (1H, dd, $J=14.2$ and 8.0 Hz, H2'''a) [3.71 (1H, brd, $J=14.2$ Hz, H2'''a)], 3.43 (1H, dd, $J=14.2$ and 3.6 Hz, H2'''b) [3.50 (1H, dd, $J=14.2$ and 10.4 Hz, H2'''b)], 4.21 (1H, m, H3''') [4.76 (1H, brd, $J=10.4$ Hz, H3''')] 10. HR-ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{18}\text{NO}_6\text{S}$: 328.0855, Found : 328.0847 ; ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 3.62-3.72 (2H, m H1), 2.64 (2H, m, H2), 6.71 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H2'), 6.80 (1H, d, $J=1.6$ Hz, H6'), 3.25 (1H, dd, $J=13.9$ and 5.2 Hz, H2''a), 3.14 (1H, dd, $J=13.9$ and 7.6 Hz, H2''b), 4.61 (1H, m, H3''), 7.52 (1H, d, $J=6.0$ Hz, NH), 1.92 (3H, s, COCH_3), 3.58 (3H, s, OCH_3), 7.70 (1H, brs, OH), 8.00 (1H, brs, OH). 11. HR-ESI-MS (m/z) [$\text{M}-\text{H}$] $^-$ calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_9\text{S}_2$: 503.1158, Found : 503.1151 ; ^1H NMR (400 MHz, acetone- d_6) δ 3.71 (2H, m, H1, NOE observed from H6'), 3.00 (2H, m, H2, NOE observed from H6'), 6.93 (1H, s, H6), 3.32 (1H, dd, $J=14.0$ and 5.2 Hz, H2''a, NOE observed from H6'), 3.18-3.24 (1H, complex, H2''b), 4.63 (1H, m, H3''), 7.56 (1H, d, $J=8.0$ Hz, 3''-NH), 3.10-3.24 (2H, complex, H2'''), 4.59 (1H, m, H3'''), 7.63 (1H, d, $J=7.6$ Hz, 3'''-NH), 1.91 (3H, s, COCH_3), 1.93 (3H,

s, COCH₃), 3.59 (6H, s, OCH₃ x 2). **12.** HR-ESI-MS (*m/z*) [M-H]⁻ calcd for C₂₆H₃₆N₃O₁₂S₃: 678.1461, Found: 678.1479; ¹H NMR (400 MHz, acetone-d₆) δ 3.13-3.36 (10H, complex, H1, H2, H2''', H2''', and H2'''), 4.53-4.63 (3H, complex, H3'', H3''', and H3'''), 7.58 (1H, d, *J*=8.0 Hz, NH), 7.62 (1H, d, *J*=8.0 Hz, NH), 7.65 (1H, d, *J*=8.0 Hz, NH), 1.94 (3H, s, COCH₃), 1.95 (6H, s, COCH₃ x 2), 3.55 (3H, s, OCH₃), 3.59 (3H, s, OCH₃), 3.62 (3H, s, OCH₃).

3. 結果と考察

3.1 ポリフェノール-システイン反応生成物のメトミオグロビン還元活性

システインとポリフェノールの複合物質調製は、種々検討の結果、ペルオキシダーゼ-過酸化水素による酸化カップリング法を用いることにした。本法は触媒量の酵素を使用するのみであり、操作が簡便で応用性が高く、またそのまま反応溶

液の機能を検討できる利点を有する。ポリフェノールおよびシステイン等モルから調製した反応溶液の40 μlのMetMb還元MbO₂化活性を測定した結果をFig. 1に示した。また比較対象として、システインを用いない酸化反応溶液のデータも同時に示している。Fig. 1のデータからシステインなしのペルオキシダーゼ酸化ポリフェノールはケンフェロールとモリンからの生成物を除いて高い活性を示さなかったのに対し、ほとんどのシステイン存在下での反応生成物は顕著なMetMb還元活性を示した。検討したポリフェノールの中では、ヒドロキシチロゾール、カテキン、およびカフェ酸は高い効率を示し、ケンフェロール、モリン、タキシフォリン、ロスマリン酸、ノルジヒドログアイアレチン酸がそれに続く活性を示した。これまでの研究により、高活性ポリフェノールは、システインの存在下で高いMetMb還元MbO₂化能を示すことを明らかにしているが、今回の酸化反応により生成したシステニルポリフェノールが、

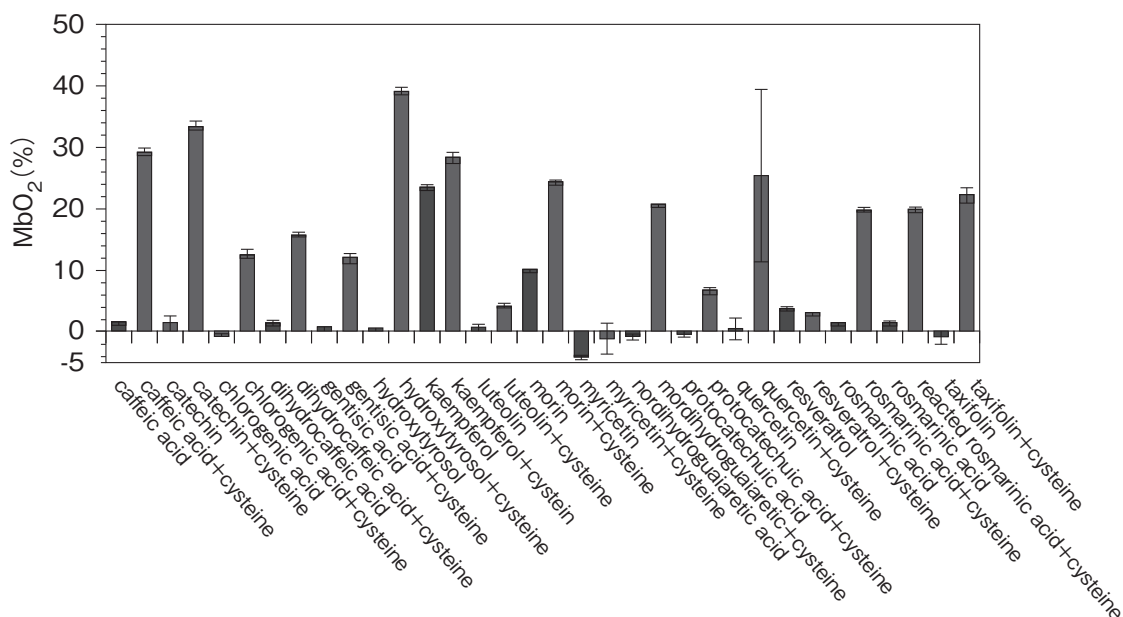


Fig. 1 Effects of the products (600 μmol/l based on starting polyphenols) from polyphenols in peroxidase-catalyzed oxidation in the presence or absence of cysteine on MetMb reduction. Results are expressed as mean ± standard deviation (SD) (n=3).

MetMbの還元MbO₂化の原因物質である可能性が示唆された。

3.2 システニルポリフェノールの単離と構造同定

Fig. 2 に示した各種システニルポリフェノールは、分取HPLCにて精製、単離の後、高分解能ESI-MS法により分子式を確定し、1D-NMRおよび2D-NMR法により、システイン（アセチルシステインを含む）の置換位置を含めて、その化学構造を決定した。

3.3 システニルポリフェノール (1-9) のMetMb還元MbO₂化活性の測定 各種調製システニルポリフェノールの600-

60 μmol/lにおけるMetMb (60 μmol/l) の還元反応で生成したMbO₂の経時的生成比率をFig. 3 に示した。Fig. 3 より、すべてのシステニルポリフェノールは、最初の1時間に顕著にかつ濃度依存的にMetMbの還元活性を示した。その一方で、システインポリフェノール5, 7, 8, および9においては、その後、明らかにMbO₂の減少が観察された。8と9すなわち、システニルノルジヒドロゲアイアレチン酸およびシステニルロスマリン酸は、二つのカテコール構造を有し、そのうちの一つはそのままの形で残っている物質である。我々はこれまでの研究で、カテコール構造を有する抗酸化性の強いポリフェノールは、同時に

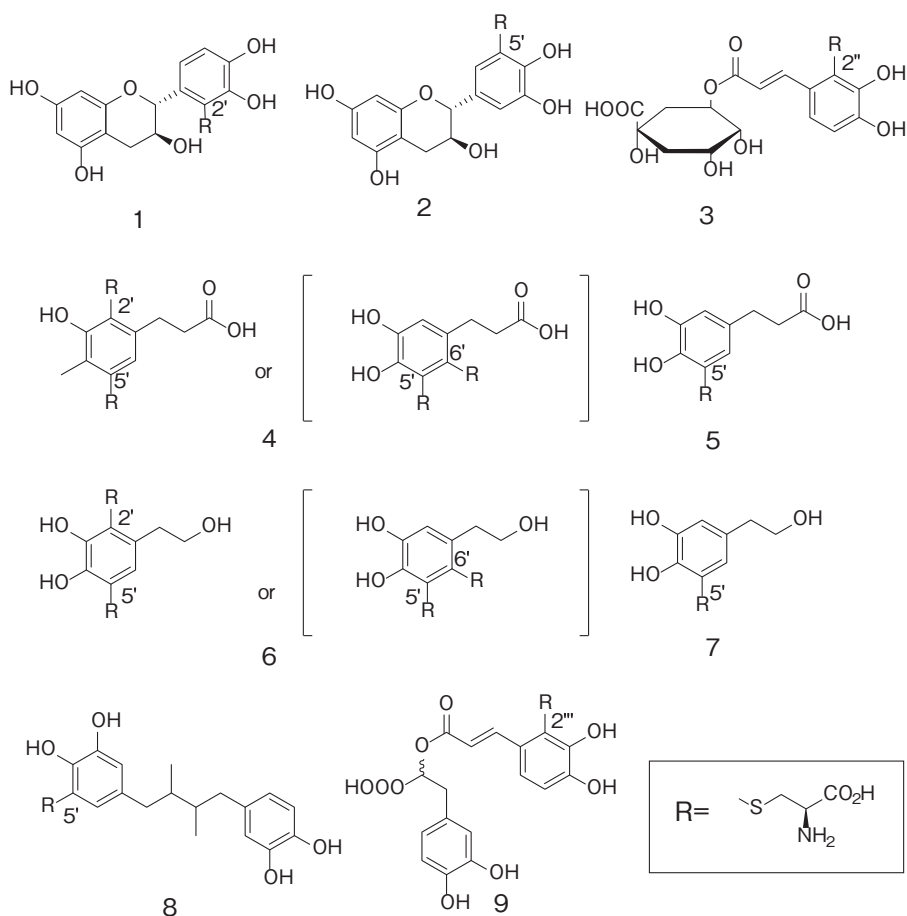


Fig. 2 Chemical structures of the prepared cysteinyl polyphenols

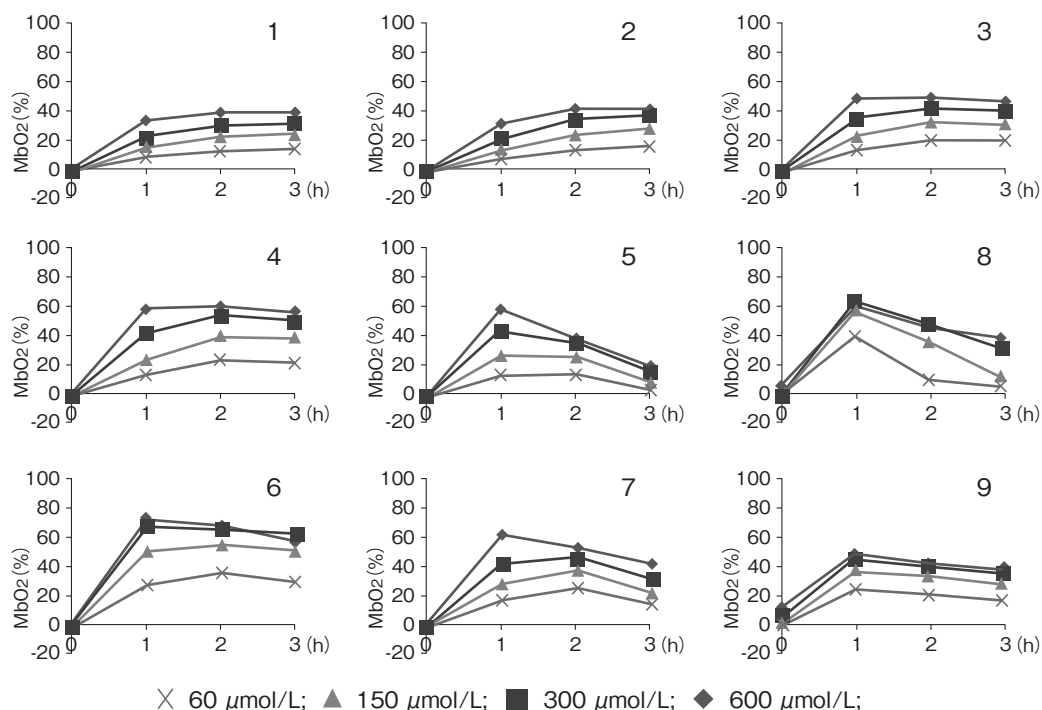


Fig. 3 Effects of cysteinyl polyphenols (1-9) on MetMb reduction. All analytical experiments were performed in triplicate and the data were expressed as means (SDs were smaller than symbols). Compounds 1, 2'-S-cysteinylcatechin; 2, 5'-S-cysteinylcatechin; 3, 2''-S-cysteinylchlorogenic acid; 4, 2',5' (or 5',6')-bis(S-cysteinyl) dihydrocaffeic acid; 5, 5'-S-cysteinyl dihydrocaffeic acid; 6, 2',5' (or 5',6')-bis(S-cysteinyl) hydroxytyrosol; 7, 5'-S-cysteinyl hydroxytyrosol; 8, 5'-S-cysteinyl nordihydroguaiaretic acid; 9, 2''-S-cysteinyl rosmarinic acid.

有するプロオキシダント性に起因するMbO₂の酸化促進性を報告している³⁾。したがって、8および9に残存したカテコール構造が最初に生成したMbO₂の酸化を促進したと考えられた。また、システイニルポリフェノール5および7は非常に類似した構造を有する。これまでの研究から、モノチオール置換は、反応性の高いポリフェノールのプロオキシダント性を減少させることが判明しているが、これらのモノシステイン置換化合物にはまだプロオキシダント性が認められたことになる。その理由として、これらのポリフェノールには抗酸化性およびプロオキシダント性の両方を減少させる共役電子吸引性の官能基はなく、システインチオール1個の置換では、MbO₂の酸化を抑えられないと考えられた。

3.4 MbO₂の生成・維持に対するチオール置換数の影響

我々が以前行ったポリフェノールの抗酸化性増強作用の研究において、システイニルジヒドロカフェ酸の抗酸化性はチオール置換数によって異なり、またその置換は三つまで可能なことを報告した⁶⁾。このような効果がシステイニルポリフェノールのMetMbの還元能と生成MbO₂維持能に影響を与えるか、ヒドロキシチロゾルを用いて検討した。なお、ヒドロキシチロゾルはオリーブ由来の強力な抗酸化剤として知られている。なお、トリシステイン置換ヒドロキシチロゾルの調製は、システインチオール部分の速い酸化により、ペルオキシターゼ酸化法では困難であったため、 α -アミノおよびカルボキシル基が保護され

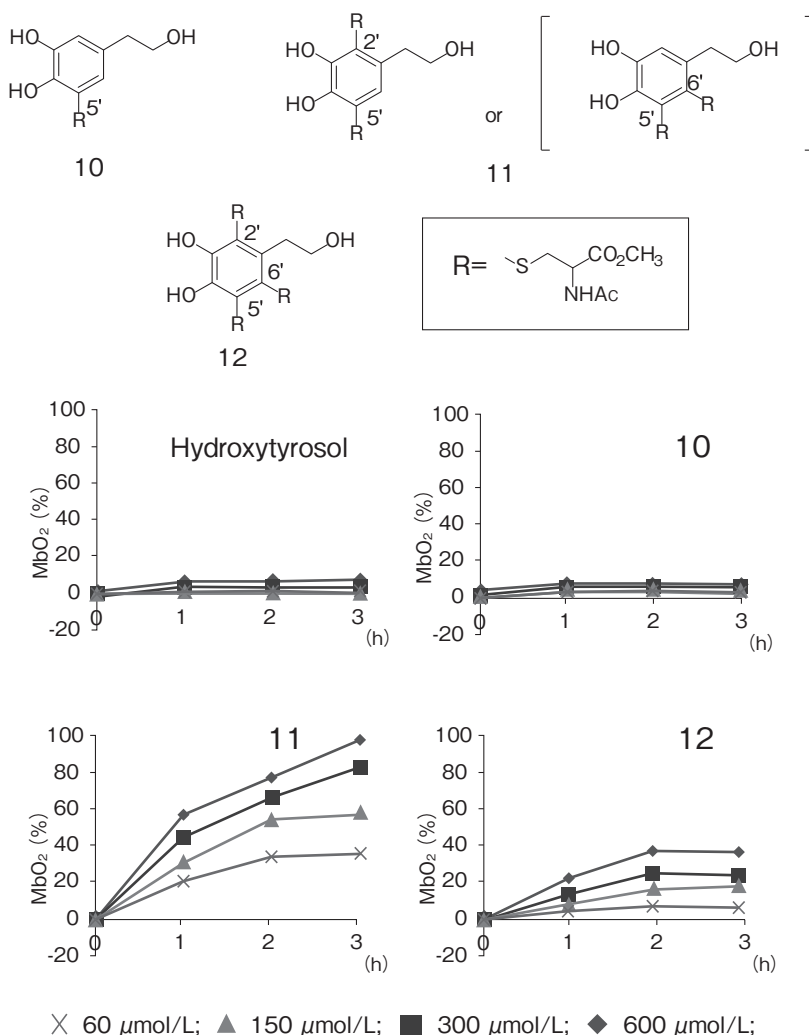


Fig. 4 Structures and Effects of (*N*-acetyl-*O*-methyl)cysteiny hydroxytyrosols (10-12) and hydroxytyrosol on MetMb reduction. All analytical experiments were performed in triplicate and the data were expressed as mean \pm standard deviation (most SDs were smaller than symbols).

ていることによりチオール部分の酸化を極めて遅くできる*N*-アセチルシステインメチルエステル (NAC-OCH₃) を用いて行った⁷⁾。酸化試薬として、DPPH (2,2-ジフェニル-1-ピクリルヒドラジル) を使用し、等モルのNAC-OCH₃の存在下で21%および15%の収率でモノ置換ヒドロキシチロゾール (10) およびジ置換ヒドロキシチロゾール (11) を得た。さらに11をNAC-OCH₃存在下で、再度DPPH酸化によりトリ置換ヒドロキシチロ

ゾール (12) も調製した (Fig. 4)。得られた10, 11, および12のMetMb還元活性を測定したデータをFig. 4に示した。11と12は強い濃度依存性還元活性を示したのに対し、10は無置換のヒドロキシチロゾール同様にMetMb還元活性を持たないことが判明した。また、ジチオール置換化合物11が最も高いMetMb還元能を示すこともわかった。このジ置換ヒドロキシチロゾールの還元効率、MetMb (60 μmol/l) に対して600 μmol/l

1の濃度でほぼ100%に達し、これまでにない高効率であった。今後の食肉自体への応用研究に11またはそれに類するジシステイン置換ポリフェノールに大いに期待が持たれる結果を得た。

4. 要 約

食肉の新鮮色に密接に関係のあるミオグロビンの鮮赤色の発現に、システイン等のチオールを導入したポリフェノールが有効であることを示した。特に、オリーブ由来の抗酸化物質として入手の容易なヒドロキシチロゾールに、食品添加物でもあるアセチルシステインを二置換したものは、非常に効率的な機能を示すことが判明した。実際の食肉における効果を今後、検討していくことにより、ポリフェノールから実用可能な食肉新鮮色維持物質の開発が期待できる⁸⁾。

文 献

1) Issanchu, S. : Consumer expectations and perceptions of meat and meat product quality, *Meat Sci.*, 43, S5-S19, 1999.

- 2) Mancini, R. A., Hunt, M. C. : Current research in meat color, *Meat Sci.*, 71, 100~121, 2005.
- 3) Masuda, T., Inai, M., Miura, Y., Masuda, A., Yamauchi, S. : Effect of polyphenols on oxymyoglobin oxidation: Prooxidant activity of polyphenols in vitro and inhibition by amino acid, *J. Agric. Food Chem.*, 61, 1097~1104, 2013.
- 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 cysteine, *J. Agric. Food Chem.*, 62, 9472~9478, 2014.
- 6) Fujimoto, A., Inai, M., Masuda, T. : Chemical evidence for the synergistic effect of a cysteinyl thiol on the antioxidant activity of caffeic and dihydrocaffeic esters, *Food Chem.*, 138, 1483 ~ 1492, 2013.
- 7) Miura, Y., Honda, S., Masuda, A., Masuda, T. : Antioxidant activities of cysteine derivatives against lipid oxidation in anhydrous media, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 78, 1452~1455, 2014.
- 8) Honda, S., Miura, Y., Masuda, T., Masuda, A. : Effective conversion of metmyoglobin to oxymyoglobin by cysteine-substituted polyphenols, *J. Agric. Food Chem.*, 64, 806~811, 2016.

ZnPP形成能を有する微生物の探索と応用

Searching for microorganisms with a high ZnPP-forming ability and its application to meat products

若松 純一

(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)

Jun-ichi Wakamatsu

(Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)

In order to improve the color of meat products, we searched for microorganisms that have a high ability to form ZnPP. Two bacteria with high ZnPP-forming ability were found from bacteria that were separated from pork homogenate incubated under an anaerobic condition. Moreover, it was shown that four bacterial strains derived from food have a high ZnPP-forming ability. By the addition of *L. plantarum* and *S. proteamaculans* related species, the formation of ZnPP was significantly facilitated and the color of minced pork was reddened. These results suggested that the color of meat products can be improved by using microbes with high ZnPP-forming ability.

1. 目 的

北イタリアで生産されるパルマハムは豚肉および海塩のみを原料とする長期熟成型の乾塩漬生ハムであるが、発色剤だけでなく砂糖や香辛料の使用は一切認められていない。しかしながら、発色剤を添加しないにもかかわらず、その色調は鮮やかな赤色を呈している。Wakamatsuら¹⁾は、この赤色色素がプロトポルフィリンIX (PPIX) に亜鉛が配位した亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP) であることを明らかにした。ZnPPは安定で鮮やかな赤色色素²⁾であり、ZnPPを利用することによって、発色剤無添加であっても好ましい色調を呈する食肉製品の開発に役立てられるのではないかと考えられている。

豚骨格筋にはZnPPがほとんど存在しないため、

パルマハム中のZnPPはその製造中に形成されて蓄積されたものである。生体の骨格肉内部は無菌状態であり、肉塊を原料とするパルマハムにおいてはその内部に存在する微生物も少ないこと³⁾から、ZnPP形成には豚肉の内在酵素が関与していると考えられている。しかし、当時ZnPPの存在は確認していなかったものの、Moritaら²⁾はパルマハムから単離した*Staphylococci*がパルマハム中に形成される新規ミオグロビン誘導体、すなわちZnPPの形成に関与していることを報告した。また、豚肉ホモジネートを用いたモデル実験系においても抗生物質を添加しないと、ZnPPの形成量が増加することも示されている⁴⁾。このように、ZnPP形成は食肉の内在酵素による反応に加えて、微生物による関与も十分に考えられることから、微生物を利用したZnPP形成の促進によって、発

色剤を添加しない食肉製品の色調改善に役立てられるかもしれない。欧米では、発酵ソーセージが広く一般的に製造されており、品質の改善ならびに安定化、有害微生物の生育阻止を目的としてスターターカルチャーを添加することが多いことから、ZnPP形成を促進する微生物を添加することで、好ましい色調も付与することが期待できる。しかしながら、どのような微生物がZnPP形成を高めるのかについては明らかにされていない。

そこで本研究では、ZnPP形成能の高い微生物を探索するために、豚肉ホモジネートから微生物の分離を行い、各微生物がZnPP形成に及ぼす影響を検討した。さらに、食経験がありZnPP形成能の高い微生物を探索して、食肉製品に応用することにより、発色剤を用いなくても色調の望ましい食肉製品の製造法の開発に関する基礎的データを得ることを目的とした。

2. 方 法

2.1 豚肉ホモジネートからZnPP形成能を有する微生物の分離・同定

細切した豚肉に1.5倍量の純水を加えてホモジナイズし、塩酸溶液を用いてpH 5.5に調整した後、豚肉含量が終濃度10%となるように純水を加えて、25℃の暗所で嫌氣的に5日間インキュベートした。その後、一部を生理食塩水で希釈して標準寒天培地に塗抹し、残りは75%アセトン抽出法でZnPPを抽出して、蛍光強度を測定した。ZnPP形成量の多かった豚肉ホモジネートから、形成された単一のコロニーを釣菌し、酵母エキス、トリプトンおよびグルコースからなる液体培地に移して25℃の暗所で嫌氣培養し、再度標準寒天培地に塗抹し、25℃で嫌氣的にインキュベートして単一コロニーであることを確認した。分離したコロニーからDNAを抽出後、真正細菌16S rRNA遺伝子の全長配列を標的とするプライマーとして10Fと

1500R⁵⁾を用いてPCRを行った。DNAシーケンス解析は外部委託し、相同性検索プログラムBLASTNを用いて相同性の高い配列を検索した。さらに、分離同定した微生物は、無菌的に調製した豚肉ホモジネートに菌数を揃えて播種後、同様に嫌氣的にインキュベートして、75%アセトン抽出法でZnPPを抽出し、蛍光強度 (Ex/Em : 420/590 nm) を測定した。

2.2 食品由来微生物のZnPP形成能と色調改善効果

無菌的に調製した豚肉ホモジネートに食塩を終濃度3%となるように加え、独立行政法人製品評価技術基盤機構より入手した細菌株(7株)と、本研究で分離した細菌1株を、菌数を揃えて播種し、嫌氣的に25℃で14日間インキュベートした後、75%アセトン抽出法でZnPPを抽出し、蛍光強度 (Ex/Em : 420/590 nm) を測定した。

無菌的に調製した豚ひき肉に食塩を終濃度3%となるように加え、菌数を揃えて上記微生物を混合して真空包装した後、18℃で14日間インキュベートした。微生物を接種していないものと亜硝酸ナトリウムを200 ppmとなるように添加したものを対照区とした。インキュベート後に、色彩色差計による赤色度 (a*値) と、表面自家蛍光 (Ex/Em : 420/590 nm) を測定した。

3. 結果と考察

3.1 豚肉ホモジネートからZnPP形成能を有する微生物の分離・同定

インキュベート後にZnPPが多く形成した豚肉ホモジネートから30株を分離し、16S rRNA遺伝子の全長配列から、1つの乳酸桿菌と3つの腸内細菌科の計4細菌を同定した (Table 1)。これらの4種の細菌を無菌的に調製した豚肉ホモジネートに接種してインキュベートすると、*C. divergens*近縁種区と*S. proteamaculans*近縁種区

Table 1 Microorganisms separated and identified from pork homogenate after incubation

Microorganisms	Homology
<i>Carnobacterium divergens</i> related species	1471/1475 (99.7%)
<i>Enterobacteriaceae bacterium</i> related species	1467/1472 (99.7%)
<i>Enterobacter amnigenus</i> related species	1466/1467 (99.9%)
<i>Serratia proteamaculans</i> related species	1459/1471 (99.2%)

が無添加区と比べて有意に高いZnPP形成量を示した (Fig. 1)。なお、無添加区は抗生物質添加区と差がなかったことから、豚肉ホモジネートが無菌的に調製されていると考えられる。以上のことから、ZnPP形成能の高い微生物の存在が明らかになった。

3.2 食品由来微生物のZnPP形成能と色調改善効果

見出した2細菌は食経験が少ないことから、食品由来の細菌を用いて検証する必要がある。また、食肉製品への応用のためには、食塩耐性も重要である。そこで、無菌的に調製し、3%食塩を含む豚肉ホモジネートを用いて、食品由来細菌のZnPP形成能を評価した。インキュベートを25℃で14日間行ったところ、分離同定した*S. proteamaculans*近縁種だけでなく、4細菌株 (*L. plantarum*, *P. acidilactici*, *P. pentosaseus*, *L. rhamnosus*) も高いZnPP形成能を示した (Fig. 2)。一方、*S. xylosus*のようにZnPP形成能を示さない微生物も存在した。

次に、より製品に近い実験系でZnPP形成能とそれに伴う色調改善効果について検討した。食塩を3%含む豚肉ミンチを無菌的に調製し、同様に食品由来細菌を接種して真空包装した後、18℃で14日間インキュベートした。ZnPP形成を示す自家蛍光強度は、*L. plantarum*と*S. proteamaculans*近縁種添加区で有意に高く、豚肉ホモジネートの結果と同じ傾向を示した (Fig. 3)。一方、亜硝酸塩添加区では無添加区と比べて有意に低く、亜

硝酸塩はZnPP形成を阻害することが明らかにされており⁶⁾、この報告と合致する。赤色度 (a*値) については、亜硝酸塩添加区が最も高いが、*L. plantarum*と*S. proteamaculans*近縁種添加区でも無添加区と比べて有意に高かった。実際の色調についても、*L. plantarum*と*S. proteamaculans*近縁種添加区は他の試験区と比べて赤く見えたことから (データ示さず)、高いZnPP形成能を有する微生物を用いることにより、食肉製品の色調を改善できることが示唆された。今後は、より活性の高い微生物の探索や形成促進条件などの検討が必要であろう。

4. 要 約

発色剤を用いなくても色調の望ましい食肉製品の製造法を開発するために、ZnPP形成能の高い微生物を探索して、ZnPP形成に及ぼす影響を検討した。豚肉ホモジネートから分離して同定した4細菌から有意に高いZnPP形成能を有する細菌2株を見出した。食品由来の細菌7株についても、豚肉ホモジネートを用いてZnPP形成能を評価したところ、4株が有意に高いZnPP形成能を示した。豚肉ミンチを用いて評価したところ、*L. plantarum*と*S. proteamaculans*近縁種添加区は他の試験区と比べてZnPPが有意に多く形成され、色調も赤くなった。以上の結果から、高いZnPP形成能を有する微生物を用いることにより、食肉製品の色調を改善できることが示唆された。

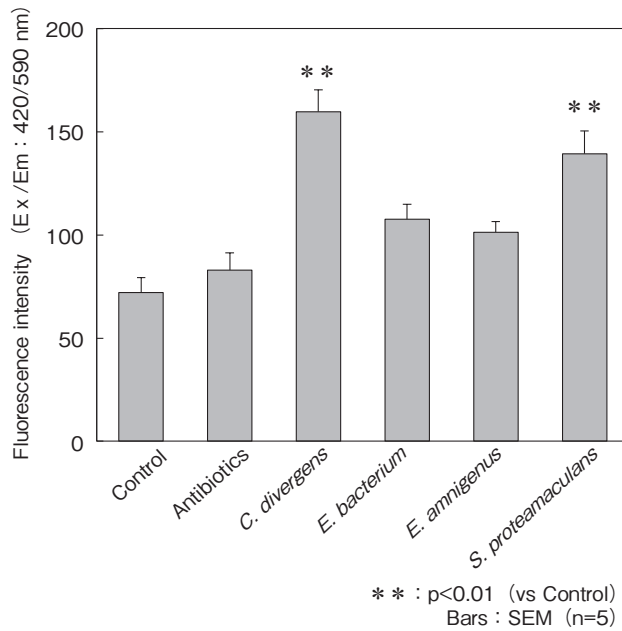


Fig. 1 Effects of microorganisms separated from pork homogenate incubated anaerobically on the formation of ZnPP in pork homogenate

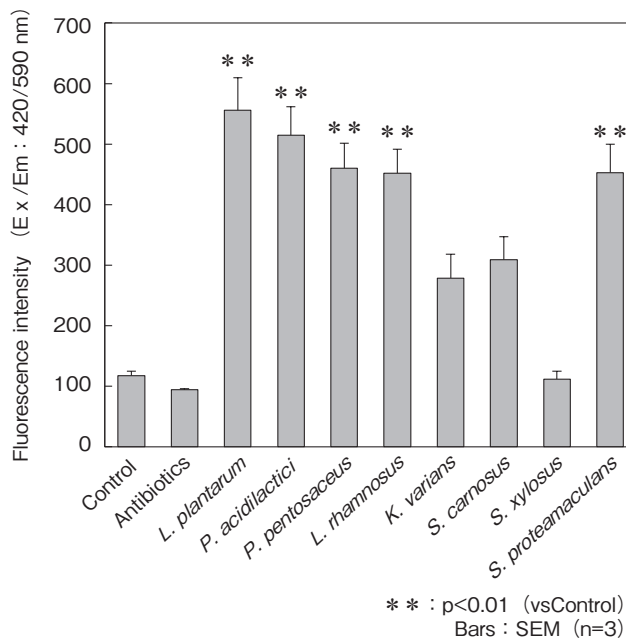


Fig. 2 Effects of food-derived microorganisms on the formation of ZnPP in pork homogenate

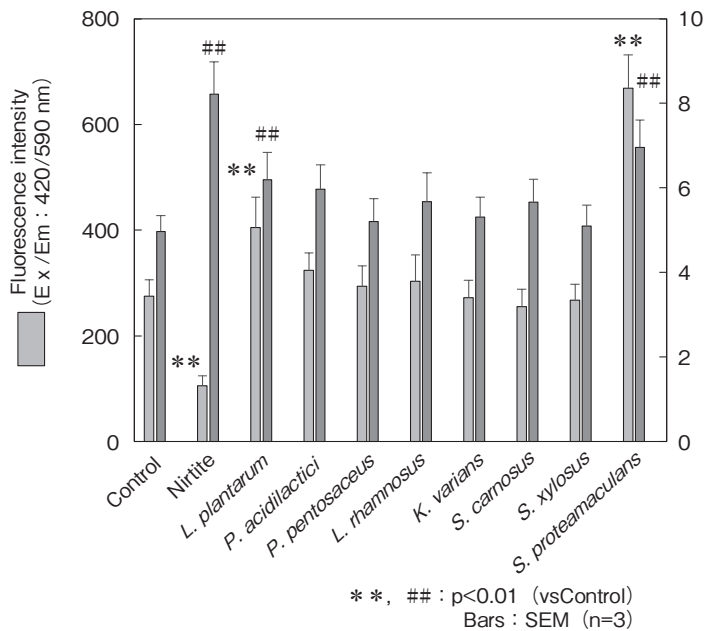


Fig. 3 Effects of food-derived microorganisms on the formation of ZnPP and redness of minced meat

文 献

- 1) Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : A Zn-porphyrin complex contributes to bright red color in Parma ham, *Meat Sci.*, 67 (1), 95~100, 2004.
- 2) Morita, H., Niu, J., Sakata, R., Nagata, Y. : Red pigment of Parma ham and bacterial influence on its formation, *J Food Sci.*, 61 (5), 1021~1023, 1996.
- 3) Toldra, F. : Proteolysis and lipolysis in flavour development of dry-cured meat products, *Meat Sci.*, 49S1, S101-10, 1998.
- 4) Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A. : Establishment of a model experiment system to elucidate the mechanism by which Zn-protoporphyrin IX is formed in nitrite-free dry-cured ham, *Meat Sci.*, 68 (2), 313~317, 2004.
- 5) 厚生労働省 : 遺伝子解析による微生物の迅速同定方, 第十六改正日本薬局方, 2029~2031, 2011.
- 6) Wakamatsu, J., Hayashi, N., Nishimura, T., Hattori, A. : Nitric oxide inhibits the formation of zinc protoporphyrin IX and protoporphyrin IX, *Meat Sci.*, 84 (1), 125~128, 2010.

筋タンパク質の死後分解に与えるオートファジーの影響：プロテオーム解析を用いたアプローチ

Effects of autophagy on postmortem proteolysis in skeletal muscle
: An approach using proteomic analysis

仲 西 友 紀・河 原 聡
(宮崎大学農学部応用生物科学科)

Tomonori Nakanishi and Satoshi Kawahara
(Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The aging process, in which the fresh carcass or meat is kept at low temperature for a certain period of time, is essential for the conversion of skeletal muscle into edible meat. Proteolysis plays a key role in metabolic, physical and structural alterations and affects meat quality such as tenderness and flavor. A number of studies have addressed the mechanism of proteolytic events during the aging process; however, its precise mechanism is not fully understood. Autophagy is the bulk degradation process for intracellular proteins in eukaryotic cells. In this study, we performed experiments to investigate the effects of autophagy on postmortem proteolysis in mouse skeletal muscle using a proteome-based analysis. Mice were fasted to induce autophagy, and intraperitoneally administered with or without the autophagy inhibitor wortmannin, whereas control mice were given free access to diet. Mice were sacrificed 14 h after the start of fasting and administration of wortmannin, and skeletal muscles collected from the femoral area were stored at 4°C. The skeletal muscle proteins were extracted 48 h after sacrifice of mice. The skeletal muscle proteins labeled with IC5-Osu were mixed with internal standard proteins labeled with IC3-Osu, and subjected to two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) analysis. The differentially expressed proteins among groups were analyzed by matrix-assisted laser-desorption/ionization time-of-flight mass spectroscopy (MALDI-TOF MS). Results on 2D-DIGE showed that mice starved before sacrifice exhibited decreased expression of 21 proteins compared to control mice. In addition, administration of wortmannin canceled starvation-induced proteolysis on more than half of these proteins. The molecular identification by MALDI-TOF MS analysis revealed that these included proteins such as phosphoglucomutase 1 and lactate dehydrogenase A, which have been reported to be associated with meat quality. These findings suggest that autophagy is a mediator of postmortem proteolysis in skeletal muscle and could affect meat quality.

1. 目 的

食肉は熟成させることで、と畜直後の生肉には

ない、特有のテクスチャーや風味を獲得する。食肉の熟成は筋タンパク質分解を伴う反応であり、カテプシンおよびカルパイン等の筋肉内在性プロ

テアーゼが熟成に関与することが広く知られている^{1,2)}。また、カルシウムイオンが直接的に筋原線維構造を脆弱させることも報告されている³⁾。しかしながら、熟成過程における肉質の変化は極めて複雑な化学的・生物学的反応によって制御されており、メカニズムの詳細には未解明な点が多く残されている。

オートファジーは酵母から哺乳類までよく保存されたタンパク質分解機構であり、オートファゴソームに取り込んだ細胞質成分をリソソームに運び分解する。オートファジーにはシャペロン介在性オートファジー、マイクロオートファジー、マクロオートファジーの3種類の経路が知られているが、マクロオートファジーに関する研究が最も進展している。そのため、通常単にオートファジーと表記した場合はマクロオートファジーを指すことが多く、本報告においてもその表記に従う。オートファジーで分解されるタンパク質量はユビキチン-プロテアソーム系に匹敵すると考えられているが、細胞内タンパク質を非特異的に分解できる点でユビキチン-プロテアソーム系とは性質が異なる。

オートファジーの存在自体は1950年代後半から知られているが、ここ10年間で飛躍的に研究が進み、その分子機構や生理的意義が明らかにされてきた。現在では、栄養飢餓時のアミノ酸供給や、異常タンパク質の分解を介して、オートファジーが生体の恒常性維持に深く関与していることが知られている。骨格筋においても、オートファジーの重要性が明らかとなっており、オートファジー異常と筋疾患の関連性が指摘されている⁴⁾。また、オートファジー関連遺伝子の一つである*ATG7*を欠損させたマウスでは筋委縮や筋力低下が生じることも報告されている⁵⁾。一方で、食肉の大部分は家畜・家禽の骨格筋に由来するにも関わらず、オートファジーに関する知見を食肉生産に応

用させた研究例は少ない。特に、食肉の熟成機構におけるオートファジーの役割については不明な点が多い。

そこで本研究では、食肉の熟成機構の解明を目指した基礎的研究として、筋タンパク質の死後分解に与えるオートファジーの影響を調査した。具体的には、栄養学的・薬理的処置でオートファジーを促進もしくは阻害したマウスから骨格筋を採取し、それぞれの骨格筋におけるタンパク質の死後変化をプロテオーム解析の手法で解析した。

2. 方法

2.1 実験動物と処置

雌性C57BL/6マウスを試験に供した。マウスを無作為に3群 ($n = 3$) に割り付け、そのうち2群にはオートファジーを誘導するために絶食の処置を施した。さらに、絶食処置を施した2群のうち、片方の群には生理食塩水を、もう片方の群には0.2 mM wortmannin含有生理食塩水を、それぞれ500 μ L腹腔内投与した。対照群には絶食処置を施さず、生理食塩水を500 μ L腹腔内投与した。絶食開始および腹腔内投与から14時間後にマウスをと殺し、大腿部より骨格筋サンプルを採取した後、4°Cで保存した。なお、本研究は宮崎大学動物実験委員会の承認を得たうえで実施した(承認番号: 2014-001)。

2.2 筋タンパク質の抽出およびプロテオーム解析

4°Cで48時間保存した骨格筋サンプルから70 mg程度を切り出した。これを1 mLのプロテアーゼ阻害剤 (Roche社製) 含有水中でホモジナイズし、9,400 rpmで15分間遠心分離した後の上清を水溶性タンパク質溶液として得た。得られたタンパク質はインドシアニン化合物 (IC-Dye) を用いた蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動 (2D-DIGE) により解析した。実際の解析は榊原

らの方法⁶⁾に従い、内部標準法を用いることで複数のサンプル間における比較定量を可能とした。すなわち、それぞれのサンプルを個別にIC5-OSu (同仁化学社製)で標識し、内部標準サンプルはIC3-OSu (同仁化学社製)で標識した。標識したサンプルと内部標準サンプルを混合し、IPGストリップゲル (Bio-Rad社製)を用いて二次元電気泳動を行った。内部標準サンプルにはすべてのサンプルを混合したものを使用した。それぞれの蛍光色素に適したゲルイメージを取得し、解析ソフトProdigy SameSpotsを用いた解析を行った。この時、内部標準サンプルのIC3-Osuゲルイメージを補正に用いることで、各群の比較定量を行った。CBB染色後、各群間で発現に増減が認められるタンパク質スポットを切り出して、トリプシンによるゲル内消化処理を施した。トリプシン処理後のペプチド混合物はMALDI-TOF型質量分析装置 (Autoflex III, Bruker社製)にて解析し、マススペクトルを取得した。取得した情報を既存マスリスト情報と照合し、Mascot検索することでタンパク質の同定を行った。

3. 結果と考察

本研究では、オートファジーを制御する手法として、栄養学および薬理学的処置をマウスに施した。事前の検討で、オートファジーの指標として microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-IIの発現を評価したところ、と殺前14時間の絶食により骨格筋のLC-II発現が有意に増加すること、またこの変化はwortmanninの腹腔内投与により50%程度抑制されることを確認している。そこで、本研究では同様の処置を施したマウスの骨格筋を48時間4℃で保存した後に、水溶性タンパク質を抽出しプロテオーム解析に供した。

2D-DIGE解析における典型的ゲル画像をFig. 1 (A)に示す。Fig. 1 (A)はIC5-Osu (green: 被験サンプル)とIC3-Osu (red: 内部標準サンプル)の検出画像を重ね合わせた結果であり、白黒画像では見づらいが、緑のスポットは被験サンプルで発現量が多いスポット、赤のスポットは発現量が少ないスポットとして表される。ゲルごとに内部標準サンプルとの蛍光強度比を算出し、各スポットの定量解析を行った結果、群間で発現量が増減する37スポットが検出された。37スポット

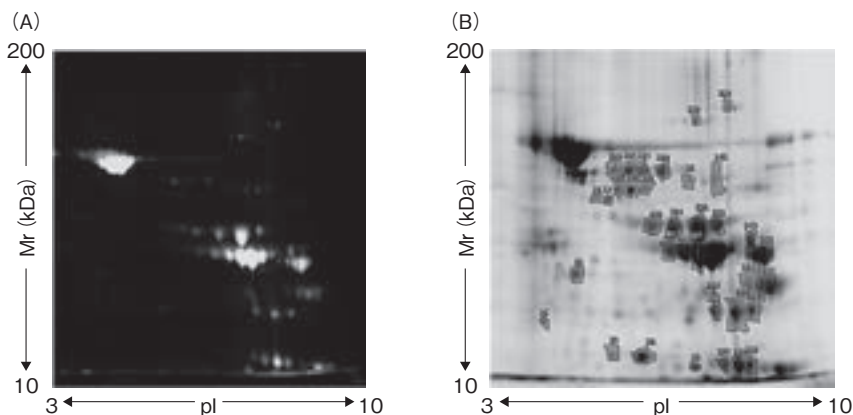


Fig. 1 Representative images of 2D-DIGE and CBB stained 2D gels. (A) The skeletal muscle proteins were labeled with IC3-Osu (internal standard) and IC5-Osu (test sample), mixed and subjected to 2D-DIGE analysis. (B) The 2D gels were also stained by CBB. The differentially expressed proteins among groups are indicated in the gel.

を、CBB染色後に撮影したゲル画像上に示したのがFig. 1 (B)になる。これらのスポットのうち21スポットは、非絶食群に比べて絶食によりオートファジーを誘導した群で発現が減少する傾向が認められた。また興味深いことに、絶食によって減少するこれらスポットのうち、半数以上はwortmanninの腹腔内投与によってその減少が抑制されることが明らかとなった。そこでこれらのスポットを切り出して、トリプシンによるゲル内消化処理を施し、MALDI-TOF型質量分析装置を用いた解析でタンパク質の同定を試みた。その結果、phosphoglucosyltransferase 1 (PGM1) や lactate dehydrogenase A (LDHA) などの同定に成功した。各群におけるPGM1とLDHAの発現の差異をFig. 2およびFig. 3に示す。いずれのタンパク質もと殺前14時間の絶食により発現が減少し、その作用はwortmanninの腹腔内投与で抑制されることが分かる。

PGM1は糖代謝に関与する酵素であり、グルコース-1-リン酸とグルコース-6-リン酸の相互変換を触媒する。数種のアイソザイムの存在が知られているが、PGM1がPGM1活性の大部分を担う。これまでの研究でPGM1と食肉の肉質の関連が指摘されており、PSE豚肉のような異常肉の滲出液中にPGM1が多く存在することが明らかになっている。また、PGM1量が食肉のpHと負の相関を示す一方で、明度やドリップロス量とは正相関することが報告されている⁷⁾。LDHAもまた糖代謝に関与する酵素であり、NADH (NAD⁺) を補酵素としてピルビン酸と乳酸の相互変換を触媒する。生体内においてLDHはAもしくはBのサブユニットからなる4量体として存在するが、骨格筋ではLDHAが主要構成因子となる。牛肉を用いた過去の研究では、LDHによるNADH産生がミトコンドリアにおける酸化消費の増大を介して肉質に影響を与えることが示されている⁸⁾。また、豚

肉中のLDH量とpHや明度の関係性を指摘した報告もなされている⁹⁾。

本研究においてオートファジーがPGM1やLDHAの死後分解を加速する要因であることが示されたが、このことはオートファジーが食肉の肉質に影響を与えることを強く示唆している。本研究ではマウス骨格筋を用いた検討を行ったが、今後、畜肉を用いた検討で再現性を確認し、さらに実際の肉質評価等を実施することでオートファジーが食肉の肉質に与える影響をより明確化する必要があると考えられる。

4. 要 約

食肉の熟成は筋タンパク質分解を伴う反応であるが、その機構には未解明な点が残されている。オートファジーは細胞内タンパク質のバルク分解経路であり、近年の研究で、骨格筋の成長や機能におけるオートファジーの重要性が明らかになりつつある。一方で、食肉の熟成過程におけるオートファジーの役割は未解明のままである。そこで本研究では、マウス骨格筋を用いて、筋タンパク質の死後分解に与えるオートファジーの影響をプロテオーム解析の手法で調査した。雌C57BL/6マウスを試験に供し、群1：非絶食、群2：14時間絶食、群3：オートファジー阻害剤wortmanninを腹腔内投与し14時間絶食、の3群を設定した。絶食および腹腔内投与処置から14時間後にマウスをと殺し、大腿部より骨格筋を採取した。骨格筋は48時間4℃で保存し、その後筋タンパク質を抽出した。各群の筋タンパク質はIC5-Osuで標識し、IC3-Osuで標識した内部標準サンプルと混合した後に、蛍光標識二次元ディファレンスゲル電気泳動(2D-DIGE)解析に供した。さらに、群間で発現に増減が認められるスポットをMALDI-TOF型質量分析装置で解析し、タンパク質の同定を行った。群1に比べて群2では、21のタンパ

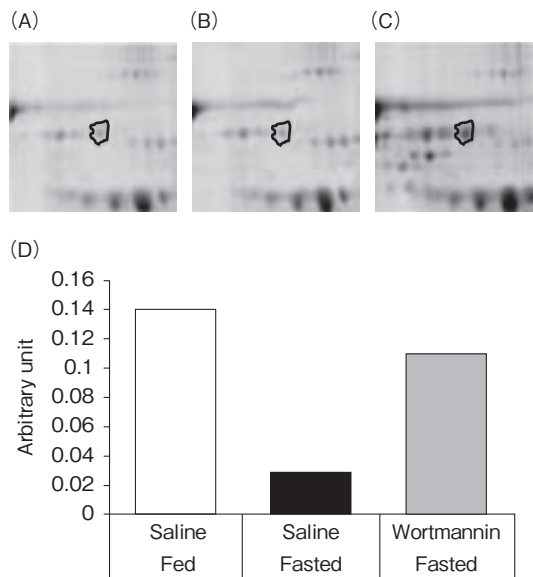


Fig. 2 Effect of starvation and administration of wortmannin on phosphoglucumutase 1 expression in mouse skeletal muscle. The skeletal muscle proteins were extracted 48 h after sacrifice and equal amounts of proteins were resolved by 2D-DIGE followed by CBB staining and MALDI-TOF analysis. (A-C) Representative spot patterns of each experimental group (A: Saline/Fed group, B: Saline/Fasted group, C: Wortmannin/Fasted group). (D) Difference in relative spot intensities among groups.

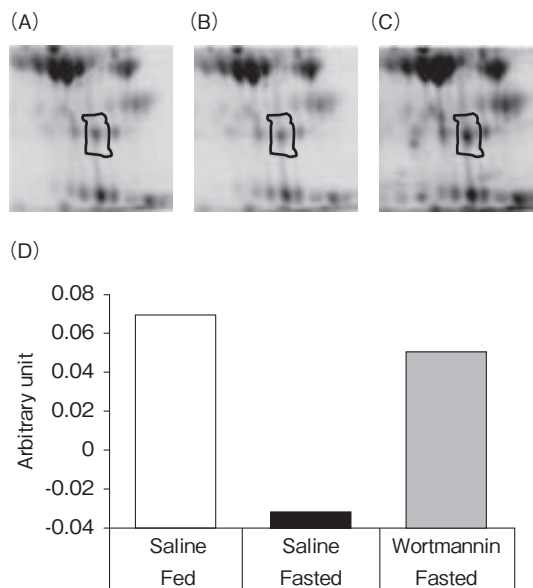


Fig. 3 Effect of starvation and administration of wortmannin on lactate dehydrogenase A expression in mouse skeletal muscle. The skeletal muscle proteins were extracted 48 h after sacrifice and equal amounts of proteins were resolved by 2D-DIGE followed by CBB staining and MALDI-TOF analysis. (A-C) Representative spot patterns of each experimental group (A: Saline/Fed group, B: Saline/Fasted group, C: Wortmannin/Fasted group). (D) Difference in relative spot intensities among groups.

ク質スポットが減少していた。また、21のタンパク質のうち半数以上における変化は、群3で抑制されることも明らかになった。さらに、これらタンパク質をMALDI-TOF型質量分析装置を用いて解析した結果、phosphoglucosylase 1や lactate dehydrogenase Aなど、食肉の肉質に関与するタンパク質群の同定に成功した。これらの結果は、オートファジーがタンパク質死後分解の一翼を担うことを示しており、オートファジーの程度が食肉の肉質に影響を与える可能性を示唆している。

文 献

- 1) Koohmaraie, M., Geesink, G.H. : *Meat Science*, **74**, 34~43, 2006.
- 2) Kitamura, S., Kudo, K., Chikuni, K., Watanabe, T., Nishimura, T. : *Animal Science Journal*, **81**, 501~505, 2010.
- 3) Takahashi, K. : *Meat Science*, **43**, 67~80, 1996.
- 4) Malicdan, M.C., Noguchi, S., Nonaka, I., Saftig, P., Nishino, I. : *Neuromuscular Disorders*, **18**, 521~529, 2008.
- 5) Masiero, E., Agatea, L., Mammucari, C., Blaauw, B., Loro, E., Komatsu, M., Metzger, D., Reggiani, C., Schiaffino, S., Suddri, M. : *Cell Metabolism*, **10**, 507~515, 2009.
- 6) 榊原陽一, 中原幸太, 森永浩通, 山崎正夫, 西山和夫, 水光正仁 : 生物工学会誌, **89**, 593~596, 2011.
- 7) Zelechowska, E., Przybylski, W., Jaworska, D., Sante-Lhoutellier, V. : *European Food Research and Technology*, **234**, 883~894, 2012.
- 8) Ramanathan, R., Mancini, R.A., Konda, M.R. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **57**, 1550~1555, 2009.
- 9) D'Alessandro, A., Marroco, C., Zolla, V., D'Andrea, M., Zolla, L. : *Journal of Proteomics*, **75**, 610~627, 2011.

乳業用乳酸菌カルチャーを接種した発酵乾燥食肉製品の加工技術と特徴に関する研究

Study on processing technology and characteristics of fermented meat products produced using lactic acid bacteria cultures for dairy products

根 岸 晴 夫
(中部大学応用生物学部)

Haruo Negishi
(College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

While numerous lactic acid bacteria (LAB) are used in the manufacture of various fermented dairy products, the application of LAB in meat products is rare, except for dry-fermented sausages. Therefore we have studied a dry-fermented meat product, fermented pork jerky, using the mixed cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) and *Streptococcus thermophilus* (*Stc. thermophilus*) often used as starter cultures in the processing of yogurts.

This study was performed to evaluate microbiological and physico-chemical properties of unheated minced pork jerky fermented with LAB starter cultures. The growth of coliform bacteria in the jerky was inhibited by fermentation incubating for >4 h at 43°C after adding 10-20% LAB starter culture concentrates (LAB-C). In the pork jerky made after addition of 10% LAB-C, the shear force value was 1.54 ± 0.52 kg at $\text{pH} 4.73 \pm 0.04$ with a 0.766 ± 0.004 water activity. Exopolysaccharides from the bacteria were found in the LAB starter culture. The shear force of the jerky fermented with the LAB-C was lower than the control without the LAB-C or in commercial minced jerky. SDS-PAGE indicated the myofibrillar proteins from the minced pork were partly degraded to polypeptides during fermentation with the LAB-C. The viable cells of LAB at 10^7 to 10^8 cfu/g survived in the jerky. The developed products demonstrate pork jerky may provide a technology to produce a novel probiotic dry meat product.

1. 目 的

近年、乳酸菌の機能性に関する研究は活発で、整腸、腫瘍抑制、アレルギー症状の緩和、および免疫賦活など優れた生体調節作用が報告されている¹⁾。食品への乳酸菌利用はヨーグルトなど乳製品を中心に発展し、プロバイオティクス食品など

の機能性食品の開発が進んでいる。食肉製品への乳酸菌の利用は発酵ソーセージが知られているが、わが国では十分に普及せず新たな食肉製品への乳酸菌の利用技術の開発が望まれる。一般に発酵ソーセージでは、乳酸菌スターターの特性として耐塩性・耐亜硝酸性を有することが要求されるため、使用できる菌種が制限される。そこで亜硝

酸塩などの添加物を使用せずに乳酸菌を接種して発酵させ、そのバイオプリザベーション作用で有害微生物を抑制する新規な発酵食肉製品として、発酵ジャーキーの加工技術を検討している。本技術では発酵乳などに使用される多種の乳酸菌が利用できる可能性が示唆された²⁾。

また超高齢社会の下、高齢者の低栄養・低タンパク質状態の慢性化に伴うサルコペニアの進行、腸内フローラの乱れなどによる生活機能障害のリスク拡大が懸念されている。目標とする発酵ジャーキーは、良質な動物性タンパク質と乳酸菌とを手軽に摂取できる特徴を併せもち、高齢者が食べやすいように軟らかな食感を有するテクスチャーとした。すでに豚スライス肉を用いて、ヨーグルトに汎用される *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*)/*Streptococcus thermophilus* (*Stc. thermophilus*) 混合菌を接種し、生育至適温度でpH4.2付近まで発酵させ、20℃で低温乾燥して発酵ジャーキーを調製した。発酵ジャーキーは、大腸菌群、*E. coli*とも陰性となり、乳酸菌が $10^6 \sim 10^7$ cfu/gレベル生残した³⁾。

本研究では、スライス肉を利用したジャーキーの加工技術をさらに発展させるために、スライス肉よりも成形加工が容易な方法として、再構成肉発酵ジャーキーの加工技術について検討したので報告する。

2. 方法

2.1 豚肉試料

原料肉は冷凍豚もも肉(国産:愛知県田原市)を使用し、3℃、3日間解凍後、脂肪層・筋膜を可及的に除去した。得られた赤身肉から挽き肉(径3.2mm)を調製し、ナイロンポリ製フィルム(ON15 μ m/PE60 μ m)の袋で真空包装、使用時まで-35℃に保管した。使用時には3℃で解凍した。

2.2 市販ジャーキー

市場から12種の製品を購入し試料とした。原料肉の種類・形態としては、豚スライス肉2種類、豚再構成肉1種類、牛スライス肉6種類、および牛再構成肉3種類であった。

2.3 濃縮乳酸菌カルチャー

Lb. bulgaricus/*Stc. thermophilus* 混合乳酸菌末(DVS YC-380; Christian Hansen Horsholm, Denmark)を、10%ホエイと0.5% D-グルコースから構成される培養基に1.5u/Lの割合で直接添加し、43℃でpH4.6に達するまで培養した。これを10,000 \times gで遠心分離して濃縮乳酸菌カルチャーの沈殿物を得た。

2.4 再構成の発酵ポークジャーキーの試作方法

発酵ポークジャーキーの試作は次の手順で行った。すなわち豚挽き肉に乳酸菌カルチャーをそれぞれ0~20%の割合で混合して ϕ 50 mmのファイブラスケーシングに充填し約3~5 mmのシート状に伸展した。次に43℃で6時間培養して発酵後、発酵肉を調味液とともにポリエチレン製の袋に入れて密封し5℃で12時間調味した。調味液の組成は醤油50%、みりん50%とした。調味後の発酵肉をステンレス製の網に載せスモークハウス(Maurer TITAN, Germany)を使用し、庫内温度20℃、水分活性(a_w)0.87未満になるまで乾燥した。

2.5 pH, a_w

pHは液体試料では原液のまま、固体試料では試料5 gに蒸留水45mlを加えホモジナイズ処理した懸濁液を用いて測定した。乾燥豚肉の a_w は、 a_w 計(AquaLab LITE; Decagon Devices, Washington, USA)を使用し25℃で測定した。

2.6 SDS-電気泳動(SDS-PAGE)、せん断力価(SFV)

電気泳動用の筋原線維はOlsonらの方法⁴⁾で調

製した。SDS-PAGEはLaemmli法⁵⁾に従って行った。SFVはWARNER BRATZLERせん断力計を用いて測定した。

2.7 乳酸菌カルチャー中の菌体外多糖 (EPS) 定量

Lb. bulgaricus/*Stc. thermophilus* を添加した10%ホエイカルチャー中のEPSを西村らの方法⁶⁾に従って抽出し、フェノール硫酸法によりグルコースを標準糖として定量した。

2.8 微生物検査

乳酸菌数の測定にはBCP加プレートカウントアガールを使用した。大腸菌群にはデゾキシコレート培地を使用した。以上の微生物検査、pH、 a_w 、SDS-PAGE、およびSFVの分析は既報³⁾に従って行った。

2.9 食味性

発酵ジャーキーの食味性を非専門パネル100名で7点尺度法により評価した。評価項目は、外観色調、味、食感、軟らかさ、および総合評価とした。

3. 結果と考察

3.1 再構成肉発酵中のpH、乳酸菌数、および大腸菌群

乳酸菌濃縮物を5、10、20%添加した再構成肉を43℃、6時間発酵させた。乳酸菌濃縮物無添加の再構成肉をコントロール（無添加）として、同様に処理を行った。Table 1に示すように、発酵時間の経過に伴い再構成肉のpHは低下し、その速度は乳酸菌濃縮物の添加割合が増すにつれ速まり、20%添加では発酵2時間後にpH4.6付近まで

Table 1 pH, LAB, and coliform bacteria counts in the minced pork during fermentation after addition of LAB starter cultures concentrates (LAB-C)

	Fermentation time (h)			
	0	2	4	6
pH				
Control ¹	5.85 ± 0.07	5.84 ± 0.06	5.83 ± 0.07	5.82 ± 0.07
5 % LAB-C ²	5.70 ± 0.06	5.51 ± 0.09	5.24 ± 0.09	5.15 ± 0.05
10% LAB-C ³	5.61 ± 0.08	5.13 ± 0.11	4.76 ± 0.07	4.58 ± 0.06
20% LAB-C ⁴	5.49 ± 0.04	4.63 ± 0.05	4.46 ± 0.03	4.42 ± 0.04
LAB count (log cfu/g)				
Control	4.68 ± 0.14	4.96 ± 0.21	5.24 ± 0.20	5.22 ± 0.27
5 % LAB-C ²	6.68 ± 0.12	6.87 ± 0.09	6.97 ± 0.10	8.38 ± 0.12
10% LAB-C ³	7.83 ± 0.08	7.99 ± 0.05	8.26 ± 0.13	8.73 ± 0.12
20% LAB-C ⁴	7.89 ± 0.03	8.38 ± 0.21	8.57 ± 0.18	9.05 ± 0.06
Coliform count (log cfu/g)				
Control	3.45 ± 0.57	3.88 ± 0.36	4.64 ± 0.28	5.43 ± 0.35
5 % LAB-C ²	3.32 ± 0.49	3.11 ± 0.42	2.72 ± 0.25	ND ⁵
10% LAB-C ³	3.29 ± 0.48	3.04 ± 0.28	ND	ND
20% LAB-C ⁴	2.99 ± 0.18	2.78 ± 0.28	ND	ND

¹ Control indicates minced pork of no addition of LAB-C.

^{2, 3, 4} 5 % LAB-C, 10 % LAB-C, and 20 % LAB-C indicate the minced pork added 5, 10, and 20% of the LAB-C, respectively.

⁵ ND is not detected.

All values represent the mean and standard deviation from 3 measurements.

低下した。発酵豚肉のpHが4.6付近に降下すると乳酸菌数は $10^8 \sim 10^9$ cfu/gに達した。再構成肉中の大腸菌群は、乳酸菌濃縮物5%添加、4時間発酵の条件を除き、発酵4~6時間で陰性となった。コントロールは同条件で貯蔵中、pH降下は観察されず、大腸菌群の増殖が認められた。再構成肉中の有害菌を抑制するための条件として、乳酸菌濃縮物の添加量は10~20%、発酵時間は4時間以上が好ましいと考えられた。

3.2 再構成肉発酵ジャーキーのpH、水分、 a_w に及ぼす乾燥時間の影響

3.1と同様の条件で乳酸菌濃縮物を添加した再構成肉を6時間発酵後、20℃、8時間乾燥中のジャーキーのpH、水分、 a_w をFig. 1に示した。乾燥中のpHは、いずれの条件においても発酵終了時のpHと同じで変動はみられなかった。乾燥中

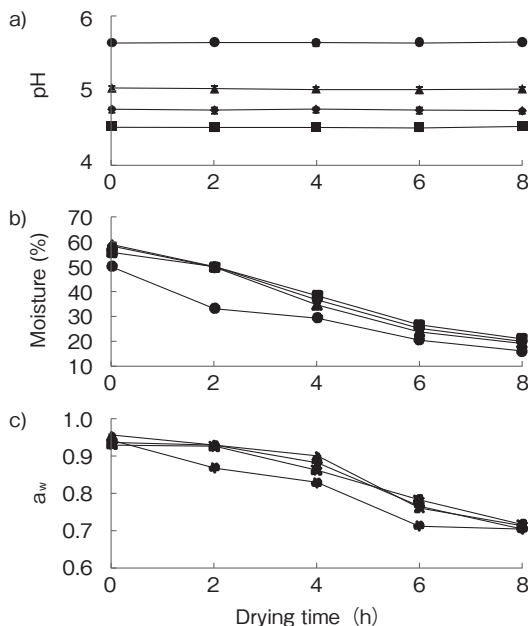


Fig. 1 pH (a), moisture (b) and a_w (c) during drying for 8 h at 20 °C in the minced pork jerky fermented at 43°C after addition of 0, 5, 10, and 20% of the LAB-C : 0% (no addition, control) (●), 5% (▲), 10% (◆), and 20% (■).

Each symbol represents mean and standard deviation from 3 measurements.

の再構成肉の水分損失は、コントロールが最も速く、乳酸菌濃縮物の添加量が増えるに伴って損失速度はやや遅くなる傾向を示した。 a_w も水分と同様、乾燥に伴って低下したが水分の損失速度よりも緩やかであった。こうした現象は乳酸菌濃縮物の添加と発酵の進行によって、ジャーキーの水和性が増したことが影響していると考えられた。

3.3 再構成発酵ジャーキーと市販ジャーキーのSFV、pHおよび a_w の比較

乳酸菌濃縮物を10%添加した発酵ジャーキーと市販ジャーキー12種類のSFV、pH、 a_w を分析し比較した。発酵ジャーキーはpH 4.73 ± 0.04 と市販品のpH $5.62 \sim 6.31$ よりも低い酸性領域にあった。 a_w は 0.766 ± 0.004 で市販品とおおむね同じであった。次に発酵ジャーキーの硬さを市販の再構成肉と比較すると、発酵ジャーキーのSFVが 1.54 ± 0.52 kgに対して市販品は $3.38 \sim 7.05$ kgと大きく、発酵ジャーキーの肉質の軟化に対する乳酸菌による発酵効果が期待された。

3.4 再構成発酵ジャーキーのSFVに及ぼす a_w と水分の影響

発酵ジャーキーのSFVと水分量、 a_w との関係をFig. 2, 3に示した。発酵ジャーキーのSFVは水分量や a_w と負の相関を示し、水分量や a_w の低下に伴いSFVは増加した。乳酸菌濃縮物を10%添加した発酵ジャーキーのSFVはコントロール（無添加）と比較して低くなる傾向にあることが分かった。その理由として、発酵中、乳酸菌により産生されるEPSあるいは乳酸菌濃縮物に含まれるホエイタンパク質の存在によって、ジャーキー内部の水和性が高まったことによると推定された。発酵ジャーキーのSFVの低下は水分量や a_w と関係し、水分25~40%の中間水分食品であることが軟らかさの一因と考えられた。

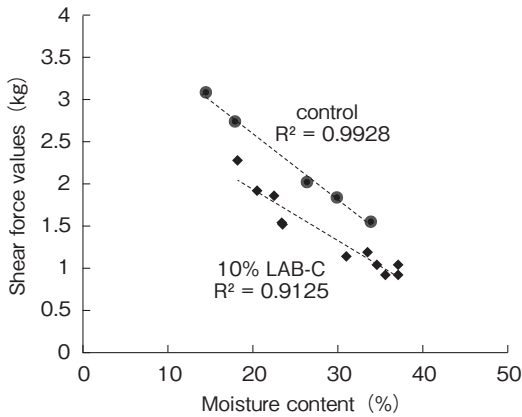


Fig. 2 The correlation between moisture and SFV in the experimental minced pork jerky made by addition of 10% LAB-C (◆) or in control (without addition) (●) : regression line (⋯), correlation coefficient (r). Each jerky was dried for 4-8 h at 20°C.

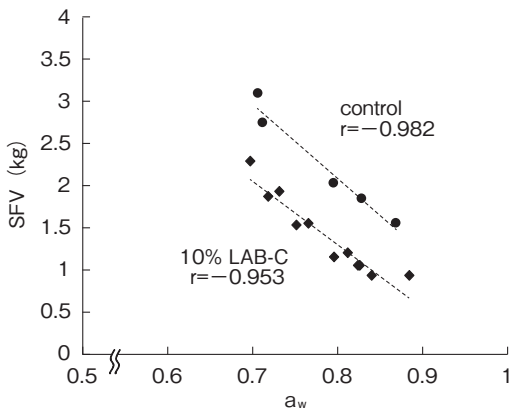


Fig. 3 The correlation between a_w and SFV in the experimental minced pork jerky made by addition of 10% LAB-C (◆) or in control (without addition) (●) : regression line (⋯), correlation coefficient (r). Each jerky was dried for 4-8h at 20°C.

3.5 再構成肉発酵中の筋原線維タンパク質のプロテオリシス

乳酸菌濃縮物を10%添加した再構成肉とコントロール（無添加）を0～6時間培養した時の再構成豚肉の筋原線維のSDS-PAGEパターンをFig. 4に示した。培養肉から調製した筋原線維の泳動バンドはコントロールに比べ加水分解の現象が目立った。再構成肉を乳酸菌で発酵中、筋原線維タ

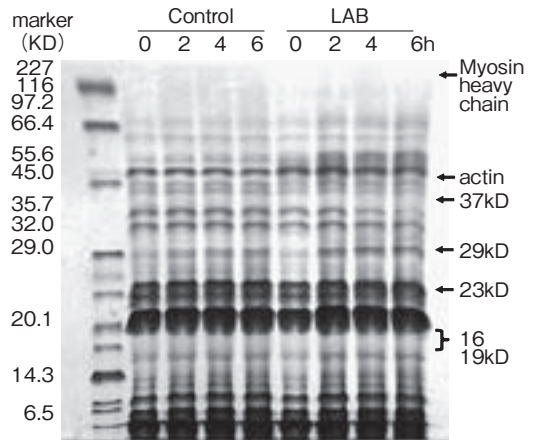


Fig. 4 SDS-12.5% polyacrylamide gel electrophoretic pattern of myofibrillar proteins prepared from the minced pork during fermentation for 0, 2, 4, and 6 h at 43°C. Control shows no addition of the LAB, and LAB the fermented-minced pork after addition of 10% LAB-C.

ンパク質のプロテオリシスが起きていることが確認された⁷⁾。このプロテオリシスもジャーキーの軟化現象に影響を与えている可能性が考えられた。

3.6 乳酸菌が産生するEPS総量

供試乳酸菌の10%ホエイカルチャーには粘性（データ略）があり、乳酸菌を墨汁染色で観察すると菌体周囲に多糖の存在が観察された（データ略）。乳酸菌カルチャーの発酵前後のEPS量は、発酵前 $28.3 \pm 5.2 \mu\text{g}/\text{mg}$ に対して、発酵後 $133.0 \pm 7.1 \mu\text{g}/\text{mg}$ と高値を示した。再構成肉発酵中の乳酸菌によるEPS産生によって、発酵ジャーキーの水和性が増し、後述の食味試験で軟らかさの評価を高めた一因と考えられた。EPSが発酵ジャーキーのテクスチャーに与える影響についてさらに検討中である。

3.7 再構成ジャーキーの食味性

発酵ポークジャーキーの食味性を100名の非専門パネルで7点尺度法により評価した。外観色調、味、食感、軟らかさの各評価は、それぞれスコア5.04～5.61の範囲にあり、やや良い以上であった。特に軟らかさの評価スコアは5.61と高く、総

合評価スコアは 5.27 ± 1.08 で好まれた。このように、試作した再構成発酵ジャーキーの食味性は良好であった。

4. 要 約

本研究は豚挽肉に乳酸菌スターターを添加した非加熱の再構成発酵ジャーキーの加工技術を開発することを目的とした。濃縮乳酸菌カルチャーとして、10%ホエイを含む乳酸菌カルチャーの遠心分離後の沈殿物を使用した。ジャーキー中の大腸菌群の生育は、乳酸菌カルチャー濃縮物を挽肉に10-20%添加後、43℃で4時間以上発酵することによって抑制された。発酵後、20℃、8時間乾燥して発酵ジャーキーを作製した。発酵ジャーキーの性状はSFV 1.54 ± 0.52 kg, pH 4.73 ± 0.04 , a_w 0.766 ± 0.004 , 乳酸菌数 $10^7 \sim 10^8$ cfu/gとなった。発酵処理肉の筋原線維タンパク質のSDS-PAGE分析の結果、200kDa付近のバンドが薄くなり、45kDa付近に新たなバンドが認められた。発酵中の筋原線維のプロテオリシスがジャーキーの軟化現象に影響を与えている可能性が示唆された。乳

酸菌カルチャーは粘性を呈しEPSの存在が確認され、ジャーキーのソフト化への影響が予想された。食味試験から、発酵ジャーキーの色調、味、食感および総合評価は良好で、特に軟らかさで高い評価が得られた。本研究で開発した発酵ポークジャーキーの加工技術は、プロバイオティクス乳酸菌などの利用により新規な食肉加工技術として期待される。

文 献

- 1) 飯野久和, 信田幸大: 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 第1版, 495~551, 京都大学学術出版会, 京都, 2010.
- 2) 大橋勝太郎, 根岸晴夫: 日本畜産学会報, 82, 53~60, 2011.
- 3) 大橋勝太郎, 根岸晴夫, 日本食品科学工学会誌, 59, 447~455, 2012.
- 4) Olson, D.G., Parrish, F.C.Jr., Stromer, M.H.: *J. Food Sci.*, 41, 1036~1041, 1976.
- 5) Laemmli, U. K.: *Nature*, 227, 680~685, 1970.
- 6) Nishimura, J., Kawai, Y., Aritomo, R., Ito, Y., Makino, S., Ikegami, S. *et al.*: *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 32, 23~32, 2012.
- 7) Ohashi, K., Negishi, H.: *Food Science and Technology Research*, 20, 679~685, 2014.

ミオシンの水溶化現象に関連する尾部領域の特定

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

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

Meat is rich in high quality protein containing all essential amino acids for human. However, almost of meat proteins are insoluble for water or low salt concentrated solution because high concentration of salt is needed for solubilization of them. If meat protein could be solubilized in water or low salt concentrated solution, meat and its proteins would be used in various ways such as liquid diet. Although myosin, one of the major proteins of meat, is also insoluble for water, we demonstrated myosin could be solubilized in low salt concentrated solution containing L-histidine. The objective of this study is to identify the detail region of myosin rod involving the solubilization in low salt concentrated solution in order to understand the mechanism of solubilization. The hydrophobicity of LMM and C-terminus region in high salt concentrated solution were increased compared to those in low salt concentrated solutions. However, in the cases of 56 amino acids residues fragments of C-terminus region, there was no difference between salt concentrated conditions and the presence of L-histidine. For Native-PAGE analysis, in the cases of 2 fragments of 56 amino acids residue fragments, these mobilities in solubilized condition (1 mM KCl, 5 mM L-histidine) were differed from those in the other conditions. These results suggested that the surface charges in rod region of 1756-1868 amino acids residues were shifted although the structural changes were not occurred.

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り、我々の健康な食生活には欠くことのできない食品である。しかし、食肉を摂取する際には、衛生上、加熱調理が必須であり、また調理によっても形態はほとんど変化させることはできず、高齢者などの咀嚼や嚥下に困難のある人にとっては摂取しづらい食品でもある。そこ

で、食肉を液状にすることでタンパク質の摂取を促進させることも考えられるが、食肉のタンパク質の大半は水や低塩濃度溶液には溶解しない性質を持つため、食品として扱いづらいものとなる。もし、食肉のタンパク質を水もしくは低塩濃度溶液に溶解すること（以下、水溶化）ができれば、食肉タンパク質の利用性を拡大し、さらに新たな食肉加工品の開発も期待できる。

これまで、鶏胸筋を水および低塩濃度溶液

(25-150mM) を用いた洗浄を繰り返すことで90%以上の筋原線維タンパク質を水溶化できたとの報告¹⁾や、さらに超音波処理を施すことで鶏胸筋筋原線維タンパク質を水溶化することができたとの報告^{2,3)}がある。しかし、これらの報告は再現性が乏しかったり、あるいは操作が煩雑であったりと実用化には至っていないものの、筋原線維タンパク質の溶解度を向上させるため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が示された。そこで、ミオシンの水溶化特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低塩濃度溶液 (1 mM) に水溶化することがわかった^{4,5)}。

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。筋肉組織において、多数のミオシンが会合し、“太いフィラメント”と呼ばれる重合体を形成し、存在している。この状態でミオシンは、ATPの分解と同じ食肉タンパク質であるアクチンとの相互作用を繰り返し、筋肉を収縮させている。この“太いフィラメント”の形成機構は未解明な部分が多いが、非筋細胞ミオシンの重合体形成については、その尾部領域が大きく関与しているとされている⁶⁾。本研究では、ミオシンの水溶化現象においてもミオシンの尾部領域が関与しているとの仮説を立て、水溶化現象に関与している尾部領域を特定することを目的とした。

2. 方法

2.1 フラグメントの作製

フラグメントの作製には、Profinity eXact™ Protein Purification System (Bio-Rad) を用いた (Fig. 1, Table 1)。フラグメントは、鶏骨格筋ミオシン重鎖 1 C (NM_001113709) をもとに、LMM全領域 (アミノ酸残基1284-1941)、C末端領域 (アミノ酸残基1700-1941)、およびC末端領

域を56残基ずつ四つに分割したような短いフラグメント (アミノ酸残基1700-1755, 1756-1811, 1813-1868, 1869-1924) を作製した。精製したフラグメントは、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、高塩濃度条件下のフラグメントとした。このフラグメントを、1 mM KCl, 5 mMヒスチジン, pH 7.2からなる透析外液に対して透析し、これを水溶化フラグメントとした。また、低塩濃度条件下のフラグメントとして、1 mM KCl, 5 mMリン酸緩衝液, pH 7.2の透析外液に対して透析したものをを用いた。

2.2 SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製した各フラグメントをSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) に供し、その分子量を確認した。SDS-PAGEはSchäggerの方法⁷⁾に従い、泳動ゲルは16%ポリアクリルアミドゲル (ビス比=49.5:3) を、濃縮ゲルは4%ポリアクリルアミドゲル (ビス比:同上) を用いた。

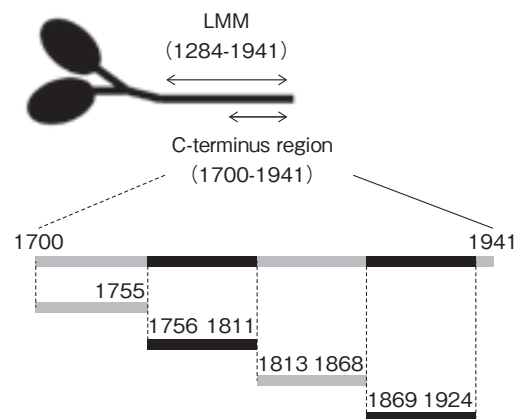


Fig. 1 Diagram of myosin heavy chain constructs. These constructs were expressed in *E. coli*. Construct 1700-1755 was expressed with promoters #759 and #815, 1756-1811 was expressed with primers #761 and #816, 1813-1868 was expressed with primers #763 and #940, and 1869-1924 was expressed with primers #765 and #818. As controls in this study, construct 1700-1941 (C-terminus region) and construct 1285-1941 (LMM) were expressed with primers #636 and #815, primers #636 and #855, respectively.

Table 1 List of PCR primers used in this study

	Primer Sequence	Restriction enzyme
# 636	5'-tttgaattctcactcttctctctctcttc-3'	EcoRI, STOP
# 759	5'-tttgaattcctaattgcggcttctctgg-3'	EcoRI, STOP
# 761	5'-tttgaattcctactctcagggcagctgc-3'	EcoRI, STOP
# 763	5'-tttgaattcctatctaagaatgttcttgagatc-3'	EcoRI, STOP
# 765	5'-tttgaattcctactgttgacctgtgactctgc-3'	EcoRI, STOP
# 815	5'-ttaaagctttgacagagcgtcgagaaaag-3'	HindIII
# 816	5'-ttaaagctttgactgaagagaagccaagaag-3'	HindIII
# 818	5'-ttaaagctttgctccagatctggtggac-3'	HindIII
# 855	5'-ttaaagctttgctgcagacagaagcaggtgaata-3'	HindIII
# 940	5'-ttaaagctttgacaagtggaagaagcaaattcag-3'	HindIII

2.3 表面疎水性の測定

各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⁸⁾。フラグメント溶液(50 $\mu\text{g/ml}$)に10分の1量の3.2 mMアニリノナフタレンスルホン酸(ANS)溶液を添加し、よく混ぜた。室温で10分間静置後、励起波長380 nm、蛍光波長420-560 nmの蛍光スペクトルを、分光蛍光光度計(FP-6200, 日本分光)で測定し、そのピーク値を表面疎水性とした。

2.4 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=49.5:3)を用いた。泳動後のゲルは40%メタノールおよび10%酢酸からなる溶液に30分間浸しタンパク質を固定した後、銀染色法によって染色した。銀染色にはSilver Stain KANTO III(関東化学)を用いた。

3. 結果と考察

食肉は良質なタンパク質源でありながら、その形状やタンパク質の溶解性のために幅広い食品形態への利用はなされていなかった。これまでに、食肉タンパク質の大半を占める筋原線維タンパク質を水もしくは低塩濃度溶液に溶解させようと試みられ、ヒスチジンを含む低塩濃度溶液での洗い

と超音波処理によって鶏胸筋の筋原線維タンパク質を溶解させることに成功した^{2,3)}。このとき、筋原線維タンパク質の低塩濃度溶液への溶解度はミオシンの溶解度に大きく依存することがわかった。そこで、ミオシンの低塩濃度溶液への溶解特性について検討したところ、ミオシン単独の場合には、超音波処理の必要はなく、ヒスチジンを含む低塩濃度溶液に対して透析することで、80%以上のミオシンが溶解することがわかった⁴⁾。また、水溶化したミオシンではその尾部が長く伸びていたことから、水溶化に伴い尾部の構造変化が生じていることが示唆された。本研究では、ミオシンの重合体形成にも関与していると考えられている尾部C末端領域に焦点を当て、水溶化に伴う構造変化を指標に水溶化に関与している領域を特定することを目的とした。

大腸菌を用いて作出し精製したフラグメントの電気泳動像をFig. 2に示す。各フラグメントはおおよそ推定値どおりの分子量付近にバンドが確認され、設計どおりにタンパク質が発現し、それを回収できた。よって、これらのフラグメントを以降の実験に供することとした。

ミオシンの尾部領域は2本の α -ヘリックス鎖が絡まったコイルドコイル構造をとる。このコイ

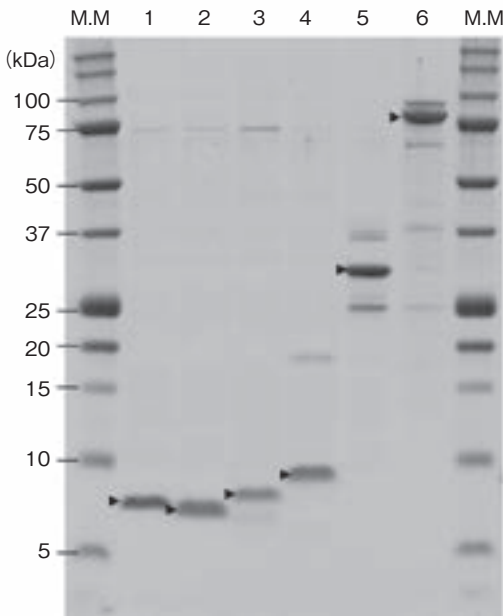


Fig. 2 SDS-PAGE pattern of purified constructs. Lane 1 : construct 1700-1755 ; lane 2 : construct 1755-1811 ; lane 3 : construct 1813-1868 ; lane 4 : construct 1869-1924 ; lane 5 : construct 1700-1941 (C-terminus region) ; lane 6 : construct 1285-1941 (LMM). M.M. lanes were loaded with molecular weight marker.

ルドコイルを形成する、すなわち二量体化するためには、 α -ヘリックス間の疎水性アミノ酸残基による疎水結合が主な要因であると考えられている。そこで、各条件下のフラグメントの疎水性を測定することで構造変化を捉えることができると考え、疎水性環境下で蛍光強度が変化する蛍光標識であるANSを用いて、各フラグメントの表面疎水性を測定した。その結果、LMM領域フラグメント（アミノ酸残基1284-1941）およびC末端領域フラグメント（アミノ酸残基1700-1941）では、高塩濃度条件下において水溶化条件および低塩濃度条件に比べ強い蛍光強度が見られたが、水溶化条件および低塩濃度条件との間に差は見られなかった。また、他の短いフラグメント（アミノ酸残基1700-1755, 1756-1811, 1813-1868, 1869-1924）では、条件間の蛍光強度に差は見ら

れなかった。LMM領域フラグメントおよびC末端領域フラグメントには、ミオシン尾部領域のC末端である非ヘリックス領域（non-helical tailpiece）を含むことから、この領域が塩濃度の作用を受け、表面疎水性に変化が生じたと考えられる。しかし、水溶化条件と低塩濃度条件では表面疎水性に差が見られなかったことから、ヒスチジンの存在による尾部領域の構造変化は生じていないことがわかった。

続いて、これらのフラグメントが水溶化に関与しているのかどうかについて、水溶化による表面電荷の変化を確認することとした。タンパク質の重合および脱重合には、タンパク質表面の電荷が大きく影響しており、ミオシンの重合体形成にも尾部領域の部分的な電荷の集まりが関与しているとの報告もある⁶⁾。そこで、ミオシン尾部領域の部分的な電荷の変化を捉えるために、各フラグメントをネイティブ-PAGEに供した。ネイティブ-PAGEはタンパク質を未変性のまま、SDSを含まないポリアクリルアミドゲル内で泳動させる方法であるため、タンパク質の移動度は自身の持つ電荷に依存する。LMM領域フラグメントおよびC末端領域フラグメントでは、高塩濃度条件下に比べ、水溶化条件下および低塩濃度条件下において、より陽極側に濃いスポットが確認された。しかし、水溶化条件下および低塩濃度条件下ではその移動度に差は見られなかった。また、短いフラグメントにおいても、N末端側およびC末端側のフラグメント（アミノ酸残基1700-1755, 1869-1924）では塩濃度条件による移動度の違いは見られたが、水溶化条件下と低塩濃度条件下では違いは見られなかった。中央部に位置する2つのフラグメント（アミノ酸配列1756-1811, 1813-1868）では、水溶化条件下では低塩濃度条件下に比べ、より陽極側に濃いスポットが確認された。すなわち、この領域において水溶化に伴い

表面電荷が変化していることを示している。

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。ミオシン尾部のアミノ酸残基1756-1868領域において、水溶化条件下における構造変化は見られなかったが、表面電荷が変化しており、この領域が水溶化現象と関連している可能性が示唆された。今後は、この領域における表面電荷の変化がミオシンの水溶化現象にどのように関与しているのか追究する。

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) Ito, Y., Toki, S., Omori, T., Ide, H., Tatsumi, R., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, **75**, 59~65, 2004.
- 4) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **82**, 151~154, 2009.
- 5) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **84**, 742~746, 2010.
- 6) Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A., Yazawa, M. : *Biochemistry*, **44**, 174~183, 2005.
- 7) Schägger, H. : *Nature Protocols*, **1**, 16~22, 2006.
- 8) Guerrieri, N., Alberti, E., Lavelli, V., Cerletti, P. : *Cereal Chemistry*, **73**, 368~374, 1996.

廃食肉中のタンパク質を用いた貴金属リサイクル技術の開発

Recycle of precious metal ions using proteins derived from waste meat

丸山達生

(神戸大学大学院工学研究科)

Tatsuo Maruyama

(Graduate school of engineering, Kobe University)

Recycling of precious metals from waste is now carried out in industry. However, environment-friendly recycling techniques with high selectivity and high yield are still required. Of the techniques employed, adsorption of metal ions is still one of the most cost-efficient and effective approaches for recycling precious metal ions in hydrometallurgy. We previously proposed the potential that proteins are able to adsorb precious metal ions, because of the strong and specific interactions between precious metal ions and proteins. Waste from food and agricultural industries contains high amounts of protein. This study investigated the adsorption of precious metal ions to protein-rich food-waste and proteins. Eleven kinds of protein-rich food-waste, including ground chicken, were selected and used as adsorbents, because their protein contents were as high as 90 wt%. All of them, including ground chicken, adsorbed gold and palladium ions selectively from a mixture of various kinds of metal ions in acidic solutions. In particular, egg-shell membrane exhibited the highest adsorption ability to gold, palladium and platinum ions. Precious metal ions were also selectively recycled from industrial waste water using egg-shell membrane. Investigations on the adsorption mechanism indicated that there were several adsorption mechanisms, which led to the high adsorption ability of proteins. For example, a certain amino acid sequence of polypeptides can act as an adsorption site for gold and palladium ions. And the reducing ability of proteins and of polysaccharide displayed on proteins produced nanoparticles of precious metal ions, which were also adsorbed on proteins. In summary, the present study demonstrated that protein-rich food-waste can adsorb large amounts of precious metal ions and that it can be used for recycling of precious metal ions from industrial waste water.

1. 目的

生物無機化学の発展とともに、金属イオンが様々な生体分子と相互作用し、また複合体を形成して、生命活動に深く関わっていることが明らかになってきている。特に、酵素の触媒活性や、必

須金属イオンの生体への取り込みおよび体内輸送、さらには神経等のシグナル伝達に、金属イオンと生体分子の相互作用は極めて重要な役割を演じている。なかでもペプチドやタンパク質は、アミノ酸残基に金属と結合する官能基を有し、金属配位子となりうるということがいくつかの研究から明ら

かになっている¹⁻³⁾。このことは、タンパク質がある種の金属に対して吸着剤として機能することを示唆している。

一方で、我が国の金属資源に対する極度の輸入依存と地政学的なリスクから、金属資源の安定的確保および使用済み金属のリサイクルが重要な国家戦略の一つとなっている。我々の最近の研究結果から、タンパク質がパラジウムや白金等の貴金属を選択的に吸着可能であることが明らかになってきた⁴⁻⁸⁾。しかしながら、生化学研究用に高度に精製されたタンパク質は非常に高価(10万円以上/kg)であり、そのままでは産業レベルの金属リサイクルに利用できない。食品産業および家庭においては、恒常的に食品廃棄物が生じ、これら廃棄物にタンパク質が多く含まれることが多々ある。そこで本研究では、廃食肉に代表される安価なタンパク質高含有廃食品を用いて金(Au)、パラジウム(Pd)および白金(Pt)を選択的にリサイクルするシステムの開発を目的としながら、タンパク質/貴金属イオン間の相互作用解明も試みた。さらに、タンパク質高含有廃食品を吸着剤として用い、使用済み製品から貴金属を浸出させた実在金属溶液、メッキ廃液等の工業廃液から、金、パラジウムおよび白金を選択的に吸着回収することを試みた。

2. 方法

2.1 タンパク質高含有廃食品による金属イオンの吸着

鶏挽肉、卵殻膜、羽毛、魚卵皮(明太子皮)、牛皮、羊腸、大豆タンパク、卵黄、トウモロコシタンパク、つみれ、鰹節をタンパク質高含有廃食品として用いた。鶏挽肉、つみれ、鰹節に関しては煮出した後、凍結乾燥して実験に用いた。卵殻膜はマヨネーズ製造における副産物である。今回用いたタンパク質高含有廃食品は水に不溶なた

め、吸着操作後ろ紙を用い、ろ液をICP発光分光光度計により分析した。

2.2 タンパク質高含有廃食品を用いた実在廃液からの貴金属吸着

実在廃液として、金属精錬および金属リサイクル企業からいただいた金属廃液を用いた。実在廃液10mlに卵殻膜を10mgあるいは50mg添加し24時間攪拌した。濾過した後、ろ液中の金属イオン濃度をICP分光発光装置で測定し、回収率を求めた。

2.3 ペプチド合成による金イオン吸着サイトの探索

タンパク質とAuイオンおよびPdイオンの吸着サイトを同定するために、合成ペプチドに対するAuイオンおよびPdイオンの吸着を検討した。モデルペプチドをFmoc法により樹脂上に固相合成し、このモデルペプチドのアミノ末端を無水酢酸でアセチル化(N-Ac化)した。合成したモデルペプチド(N-Ac-X-Gly-Leu-resin)は樹脂のまま、金属イオン吸着を検討した。乾燥したペプチド樹脂2.5mg(ペプチド約1.4mol分)に10ppmの金属イオン水溶液(pH4.0)5mlを加え、2時間攪拌した。遠心分離後、上澄みの金属イオン濃度を測定した。

2.4 精製タンパク質を用いた金イオン吸着メカニズムの検討

精製タンパク質として、牛肉にも含まれる牛血清アルブミン、鶏卵由来オボアルブミン、西洋ワサビ由来ベルオキシダーゼを用いた。糖鎖切断酵素にはEndo- α -N-acetylgalactosaminidaseを用いた。pHを調整した200ppmの金属イオン水溶液5mlにタンパク質を所定量添加した後、1時間振とうした。この溶液を限外ろ過膜でろ過し、ろ液を原子吸光光度計で測定した。

2.5 ペプチドマッピングによる金イオン吸着サイトの同定

牛由来リボヌクレアーゼA(RNase A)を、過

ギ酸酸化による酸化反応によってその分子内S-S結合を切断した。この酸化RNase Aに、トリプシンのトリプシン溶液を加え、37℃で4時間振とうした。凍結乾燥後、RNase A分解物を得た。これをODSカラムのHPLCにより分析・分取した。

3. 結果および考察

3.1 タンパク質高含有廃食品のタンパク質含量および硫黄含量

用いた各種廃食品のタンパク質含量および硫黄の含量を元素分析により求めた。その結果、今回用いた廃食品はつみれと羽毛以外（それぞれ44%，74%），非常に高いタンパク質含量（約90%）であることが分かった（Table 1）。また硫黄は卵殻膜および魚卵皮に比較的多く含まれていることが分かった。

3.2 タンパク質高含有廃食品による競争吸着
過去の検討結果より、生化学研究用に高度に精製された一部のタンパク質がAu³⁺イオンとPd²⁺イオンを吸着可能であることが示されている。こ

こでは、前述のタンパク質高含有廃食品を用いて金属イオン混合溶液（Zn, Cu, Pd, Pt, Au, それぞれ10ppm）からAu, Pd, Ptイオン等の金属イオンを吸着可能であるか、および吸着に選択性があるのかを検討した。Fig. 1に示すように、用いたすべての廃食品はある程度の貴金属イオン吸着能を示した。さらに、すべての廃食品もAuとPdイオンを吸着する傾向が強かった。鶏挽肉、卵殻膜、明太子皮および鰹節はPtイオンも吸着し、銅（Cu）や亜鉛（Zn）イオンをあまり吸着しなかった。Ptイオンの吸着は、精製タンパク質では観察されなかった挙動であり、興味深い。従来、卵殻膜には硫黄が多く含まれていることが金属吸着能に関与していると言われてきたが、硫黄含量の低い鰹節も高いPt吸着能を示し、硫黄含量の高いゼインはあまり顕著なPt吸着能を示さなかった。これらの結果から、卵殻膜、鶏挽肉、鰹節はAu, Pd, Ptイオンの効果的な吸着剤として機能することが示唆された。

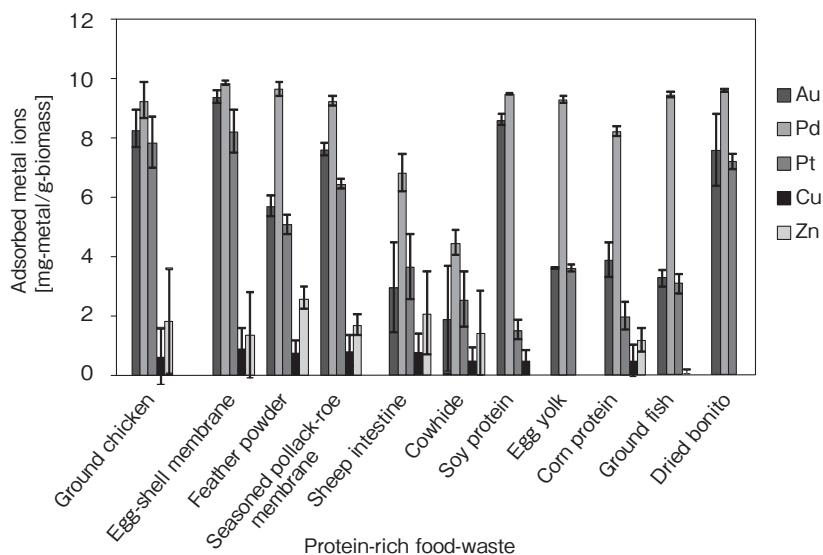


Fig. 1 Competitive adsorption of metal ions to protein-rich food-wastes. Metal ion concentration was 10 ppm. The food-waste (10mg) was added to an aqueous solution (10ml) containing 5 kinds of metal ions and 0.1 M HCl. Adsorption experiments were carried out at 25℃ for 24 h.

3.3 単独吸着におけるタンパク質廃食品の吸着能力の比較

前述の検討では比較的薄い金属イオン濃度かつ金属イオン混合溶液からの選択的吸着を検討した。ここでは、各種廃食品のAu, Pd, Ptイオンそれぞれに対する吸着能力を検討した。比較的高濃度の金属イオン水溶液（金属混合物ではない）を調製し、廃食品を添加、24時間吸着させ、金属イオンの減少量を測定した（Fig. 2）。競争吸着と同様単独吸着においても、どの廃食品もAuイオ

ンに対して高い吸着能力を示すことが分かった。例えば、鶏挽肉 1 g は、金（Au）イオンを約75 mg, パラジウム（Pd）イオンを約50mg, 白金（Pt）イオンを約40mg吸着した。

検討した廃食品のなかで、卵殻膜が最も高い吸着能力を示し、次に鰹節、大豆たんぱく、鶏挽肉という順で吸着能が高かった。Auイオンの吸着能が高い廃食品が、PdやPtイオンに対しても高い吸着能を示すことが分かった。今回用いた廃食品に含まれるタンパク質成分の違いおよび構造の

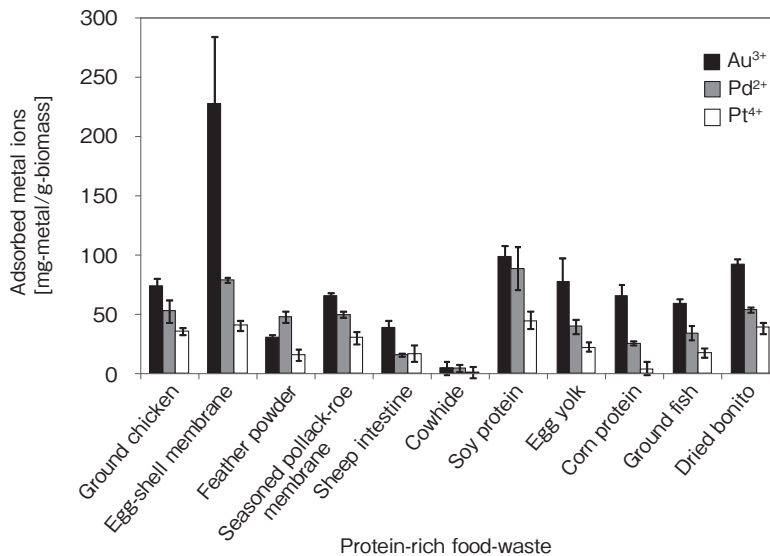


Fig. 2 Single adsorption of metal ions to protein-rich food-waste in the presence of an excessive amount of metal ions. Metal ion concentration was 200 ppm. The food-waste (4mg) was added to a metal-ions solution (10ml) containing 0.1 M HCl. Adsorption experiments were carried out at 25°C for 24 h.

Table 1 Recovery of precious metal ions from industrial waste solutions using egg-shell membrane

Waste solution	Food-waste [g/l]	pH	Target	Initial concn. [g/l]	Adsorption ratio [g-metal/kg -Waste-food]	Recovery [%]
A	1	< 1	Au	0.063	31.3	50
			Pd	0.0048	2.2	45
			Cu	0.922	30.9	3
B	5	< 1	Au	0.049	14.0	>99
			Cu	1.700	0.1	0
C	1	< 1	Au	0.029	0.2	1
	1	< 1	Pt	0.279	7.9	3
D	1	< 1	Au	0.831	16.5	2
E	1	< 1	Au	0.024	16.5	68

違いのために、金属イオン種間で吸着挙動に差が出たものと思われる。

3.4 タンパク質高含有廃食品を用いた実在廃液からの貴金属回収

ここでは、上述検討で最も高い吸着能を示した卵殻膜を用いて実在廃液から貴金属の回収が可能かどうかを検討した (Table 1)。今回用いた金属廃液は主に電子材料の金属基板からの酸浸出液である。金 (Au)、銅 (Cu)、パラジウム (Pd) あるいは白金 (Pt) が含まれている。電子基板浸出液 I (Table 1, 廃液 A) は Cu を高い濃度で含んでおり、その約15分の1程度のやや低い濃度の Au およびさらに低い濃度の Pd を含んでいる。吸着操作後は、三種すべての金属イオンが吸着され、溶液から減少していることが分かるが、吸着後の廃食品には原液に比して Au と Pd の割合 (v.s. Cu) が増えている。一般の工業廃液やリサイクル原液には、様々な濃度で多種の金属イオンが含まれており、一度の吸着操作だけでは存在量の多い金属イオンがどうしても回収されてしまう。そのため、複数回吸着溶解の操作を繰り返す、あるいは吸着操作後の廃食品を酸でよく洗浄し、Cu などの易溶性金属イオンを廃食品から脱着させ、吸着物質中の目的金属の純度を上げる必要があると考えられる。

一方、電子基板浸出液 II (廃液 B) では Cu が 30 倍ほど Au に比べて濃いが、一連の吸着回収操作後では、廃食品中の Au 存在量が飛躍的に高まっていることが分かった。ここでは Au のみを選択的にほぼ全量回収することに成功した。また蒸着原料溶出液、電子基板浸出液 III (廃液 C) では含まれている Au および Pt はあまり効率よく回収されなかった。この低回収・低吸着に関しては、廃液の液性や共存イオンによる影響が考えられる。

3.5 合成ペプチドによる金イオン吸着サイトの同定

タンパク質はポリペプチド鎖からなっており、タンパク質とある物質の相互作用は多くの場合ペプチドのアミノ酸配列とアミノ酸側鎖が大きく関与している。そこで、ここではペプチドを、樹脂ビーズの上に合成し、このペプチドと金属イオンの相互作用を検討した。既報より、トリペプチド Gly-Gly-His 中の His 残基側鎖を有する N 原子が金 (Au) イオンとパラジウム (Pd) イオンに配位することにより錯体を形成することが判明している²⁾。これは、タンパク質による Au および Pd イオンの吸着において、His 残基が吸着サイトとして作用していることを示している。前述の検討でリゾチームは、タンパク質一分子あたりの Au イオン吸着量が 3 程度と少なかった。リゾチームのアミノ酸組成を見てみると、His (ヒスチジン) は一つだけ含まれており、既報と合わせると、リゾチーム中の His を含むアミノ酸配列が Au イオンの吸着サイトとして機能している可能性が示唆される。そこで、モデルペプチドを固相上 (樹脂ビーズ上) に合成し、金イオンの吸着サイトの同定を試みた。ペプチド配列はリゾチームに含まれている His-Gly-Leu をモデル配列とした。数種の X-Gly-Leu 樹脂による吸着実験を行い、アミノ酸の違いによる金イオン吸着への影響を評価した。その結果、His および Lys が Au イオンに対して高い吸着能を示した。これは、これらのアミノ酸側鎖にある N 原子が Au イオンに配位することによるものだと考えられる。しかしながら、His だけではリゾチームに吸着した 3 つの Au イオンは説明できない。また Pd イオンの吸着量は Au イオンよりはるかに多い。His を含むペプチド配列を構成している N 原子による配位結合が Au イオンと Pd イオンの吸着に関わっていることは確からしいが、これ以外にも多数の吸着サイトがあるもの

と推察される。

3.6 タンパク質高含有廃食品による金属イオンの還元

タンパク質による貴金属イオン吸着メカニズムについては未解明な部分が多い。吸着メカニズムの一つの可能性として考えられるのが、タンパク質による貴金属イオンの還元、および生じるナノ粒子の吸着である。そこで吸着操作後の卵殻膜上で金属の還元が生じているかどうかを電子顕微鏡により観察した。また、精製タンパク質により貴金属イオンの還元が起こりうるかを検討した。卵殻膜によるAu, Pd, Ptイオンの吸着操作後、どの金属においても金属が還元したと思われるナノレベルの結晶が観察された。精製タンパク質（牛血清アルブミン）を用いた同様の検討においても、貴金属イオンの還元・結晶成長が確認された。これらの結果から、多くのタンパク質でAu, PdおよびPtイオンを還元可能であることが示唆され、このことが一つの吸着メカニズムであると考えられる。

3.7 ペプチドマッピングによる金イオン吸着サイトの探索

ここでは牛由来のタンパク質であるリボヌクレアーゼA (RNase A) を、タンパク質分解酵素（トリプシン）により部分的に分解し、断片化させた多種ペプチドのどこに金イオンが吸着しているかを調べた。RNase Aのトリプシン分解物（Au³⁺を吸着後）のHPLCクロマトグラムをFig. 3に示す。このHPLCで観測された各ピークフラクション（ペプチド断片）に含まれるAu³⁺含量を調べた結果、ペプチド鎖中にシステインまたはヒスチジンを2つ以上含むペプチド（ピーク番号13, 14, 15）の吸着量が高かった。この結果は、上記のペプチド合成による検討結果を支持している。

3.8 精製タンパク質上の糖鎖が金イオン吸着に及ぼす影響

一部のタンパク質は糖タンパク質と呼ばれ、タンパク質表面上に結合した糖鎖を有する。この糖鎖にも生理的な機能が次々と見つかってきており、この糖鎖が金属吸着に関与している可能性も考えられる。ここでは、糖鎖切断酵素によりタンパク質表面上の糖鎖を切断し、金属イオン吸着に対する糖鎖有無の影響を調べた。オボアルブミンおよび西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼの糖鎖は、今回用いたEndo-*α*-*N*-acetylgalactosaminidase

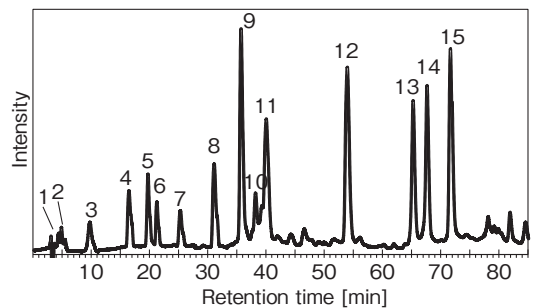


Fig. 3 HPLC chromatogram of Au³⁺/peptides complex produced by trypsin-hydrolyzed RNaseA.

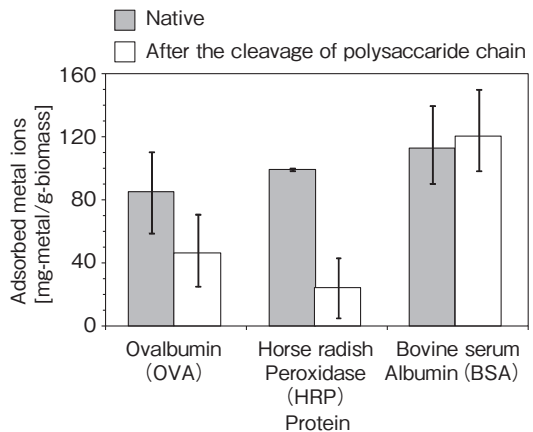


Fig. 4 Effect of the enzymatic cleavage of polysaccharide chains in glycoproteins and non-glycoprotein on the adsorption of Au³⁺. The adsorption experiments were carried out by mixing a protein solution (0.15g/L, 10ml) with Au³⁺ solution (1000ppm, 5ml) and followed by stirring for 24 h at 25°C.

で切断可能である。また牛血清アルブミンは糖鎖を有していない。Fig. 4より、糖鎖切断により、タンパク質の Au^{3+} 吸着が減少することが明らかになった。このことから、タンパク質による Au^{3+} 吸着には、タンパク質表面上の糖鎖も関与していることが示された。

4. 要 約

本研究では、タンパク質と金 (Au^{3+})、パラジウム (Pd^{2+})、白金 (Pt^{4+}) イオンとの相互作用に着目し、貴金属リサイクルにおける吸着剤としてタンパク質高含有廃食品が利用可能であるかどうかの検討を行った。鶏挽肉を含む11種のタンパク質高含有廃食品を用いた結果、どの廃食品も金 (Au^{3+})、パラジウム (Pd^{2+}) イオンを比較的選択的に吸着した。なかでも、卵殻膜が最も吸着能に優れ、 Au^{3+} 、 Pd^{2+} 、 Pt^{4+} イオンを相当量吸着可能であることが判明した。特に、実在金属廃液や電子基板の酸浸出液からも、貴金属イオンを吸着回収可能であることを実証した。一方、吸着メカニズムの検討からは、タンパク質と貴金属イオンとの相互作用は複数の吸着機構が存在し、高い吸着容量を発揮していることが示唆された。具体

的には、タンパク質ポリペプチド鎖の一次構造のアミノ酸配列、タンパク質表面の糖鎖、タンパク質の有する金属還元能が、これら金属イオンの吸着に関わっている可能性が示唆された。以上より、タンパク質高含有廃食品が貴金属イオンに対して選択性と高吸着容量を有する吸着剤として機能し、実際の工業用実廃液等からも貴金属を回収可能であることを実証した。

文 献

- 1) Terashima, M., Oka, N., Sei, T., Yoshida, H. : *Biotechnol. Prog.*, **18**, 1318~1323, 2002.
- 2) Best, S. L., Chattopadhyay, T. K., Djuran, M. L., Palmer, R. A., Sadler, P. J., Sóvágó I., Varnagy, K. : *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, **15**, 2587~2596, 1997.
- 3) Isab, A. A., Sadler, P. J. : *Biochim. Biophys. Acta*, **492**, 322~330, 1977.
- 4) 丸山達生 : バイオサイエンスとインダストリー, **66**, 20~21, 2008.
- 5) Maruyama, T., Matsushita, H., Shimada, Y., Kamata, I., Hanaki, M., Sonokawa, S., Kamiya, N., Goto, M. : *Environ. Sci. Technol.*, **41**, 1359~1364, 2007.
- 6) Maruyama, T., Sonokawa, S., Matsushita, H., Goto, M. : *J. Inorg. Biochem.*, **101**, 180~186, 2007.
- 7) 丸山達生, 後藤雅宏 : 同仁ニュース, **117**, 12, 2006.
- 8) Kiyoyama, S., Maruyama, T., Kamiya, N., Goto, M. : *Ind. Eng. Chem. Res.*, **47**, 1527~1532, 2008.

食肉製品の塩漬熟成に伴う呈味性発現に関する研究（Ⅱ） —ヒポキサンチンによる呈味性発現機構—

Studies on the formation of specific meat taste in cured meat products (II)
—Specific meat taste induced by hypoxanthine—

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 have already reported that hypoxanthine (Hx) is essential for the enhancement of the cured meat taste during maturation. In this study, we focused on bitter taste inherent to Hx, in order to clarify the role of Hx on the enhancement of the cured meat taste. The effects of bitter substances (Hx, caffeine and quinine sulfate) on the cured meat taste were examined using pork soups prepared from the heat-stable sarcoplasmic fraction and evaluated by the strength of five basic tastes (sweet, salty, sour, bitter and umami) and kokumi tastes (mouthfulness, thickness, complexity and continuity) of the soups.

The strength of umami and kokumi tastes of the pork soups were enhanced by the addition of all kind of bitter substances. However, when the concentration of Hx was increased, resulting in the stronger bitter taste of the soup, the enhancement of umami and kokumi tastes were seemed to weaken.

The involvement of Hx on the improvement of the meat taste during postmortem aging was preliminarily examined using the aged beef. Consequently, the beef containing higher concentration of Hx showed the higher strength of umami and kokumi tastes.

Because the bitter threshold of Hx is much lower than that of other bitter substances such as leucine and arginine in meat or meat products, Hx may be a key substance of bitter taste in the enhancement of the cured meat taste during maturing and the improvement of the meat taste during postmortem aging.

1. 目 的

塩漬は、食肉製品の製造工程の一つである。食肉を塩漬することにより、食感および保存性が向上し、さらに塩漬フレーバーと称される塩漬肉特有の好ましい風味が付与される。塩漬フレーバーの発現には、塩漬剤に含まれる亜硝酸塩が必須で

あり¹⁻³⁾、低温での熟成（塩漬熟成）に伴い増強されるが、その詳細は明らかにされていない。また、塩漬肉特有の味に関する研究はほとんどなく、塩漬熟成した食肉のみに存在するような呈味性成分の特定には至っていない。

食品の味は、甘味、塩味、酸味、苦味および旨味の五つの基本味と、基本となる味わいにまろや

かさや持続性、厚みなどが加わるコク味で表現される⁴⁾。食肉の味は、と畜後に一定期間熟成することにより旨味やコク味が増強され、その主要因は熟成に伴う食肉中の水溶性成分の増加であると考えられている⁵⁾。西村ら^{6,7)}は、食肉の熟成に伴う味の改善に食肉中の遊離アミノ酸および低分子ペプチドの増加が関与すると報告している。それゆえ、塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の増強にも遊離アミノ酸、低分子ペプチドおよび核酸関連物質といった食肉中の筋漿画分が関与することが考えられる。塩漬熟成に伴う味の増強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となり、さらには、と畜後の熟成に伴う食肉自体の味の改善機構の解明の手がかりともなり得ると考えられる。

本研究の目的は、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。我々は、これまでに、塩漬熟成に伴う筋漿画分中の含窒素成分の変化に着目して特有の味の増強に関与する因子を探索した。その結果、核酸関連物質の一つであるヒポキサンチン (Hx) を特定してきた⁸⁾。Hxは食品中の旨味成分として広く認知されるイノシン酸 (IMP) の分解物であり、これまでに食肉の味に関与する成分としては否定されてきた^{6,9)}。一方で、長期間塩漬して塩漬フレーバーが増強された食肉製品では、IMPの濃度が低下すると同時にHxが蓄積しており^{10,11)}、食肉製品の味へのHxの関与が強く示唆される。

Hxは苦味を呈する物質であり、その苦味閾値は $0.73 \mu\text{mol/ml}$ である¹²⁾。Huberら¹³⁾はチーズやタンパク質の加水分解物の中には苦味を呈するペプチドが含まれており、特有の味の発現に寄与すると報告している。また、Michikawaら¹⁴⁾はホタテ貝には苦味を呈するアミノ酸であるアルギニンが閾値 ($50\text{mg}/100\text{ml}$) を大きく越える濃度 ($323\text{mg}/100\text{ml}$) で含まれるのにもかかわらず、苦味

を感じずにホタテの味の持続性、複雑さ、コク味などを増加させ、その結果、嗜好性を向上させる役割を担うと報告している。それゆえ、Hxの持つ苦味が、塩漬熟成した食肉製品特有の旨味およびコク味の増強に寄与している可能性が考えられる。

そこで、本研究では、Hxの特性の一つである苦味に着目し、塩漬肉特有の味の増強に対する苦味の影響を官能評価によって調べることにより、Hxによって惹起される塩漬肉特有の味の増強機構について検討する。

さらに、食肉製品に限らず、と畜後の食肉を一定期間熟成させた場合にもIMPが分解してHxが蓄積されていくことから、と畜後の熟成に伴う食肉自体の味の改善に関しても、核酸関連物質においてはIMPよりもHxの関与の方が大きいとの可能性も否定できない。それゆえ、と畜後の食肉それ自体の熟成に伴う味の改善に対するHxの関与についても解明するため、予備的な試験として長期熟成した牛肉中のIMPおよびHx含量と官能評価の関係を調べたので、合わせて報告する。

2. 方 法

2.1 豚の耐熱性筋漿画分の調製

と畜後一週間経過したチルド豚ロース2本 (LWD種) から胸最長筋を切り出し、フードカッターで細切後に袋 (S-WRAP, Star Plastic Industry Inc.) に入れて沸騰水中で20分間加熱した後、冷却した。生じたドリップを $3,000 \times \text{g}$ 、 4°C で10分間遠心分離して得られた上清を耐熱性筋漿画分とし、官能試験用スープの調製に供した。

2.2 官能試験用スープの調製

食感の影響を受けずに味のみを評価するため、耐熱性筋漿画分に亜硝酸ナトリウムを添加した官能試験用のスープを調製した。

豚の耐熱性筋漿画分 40ml にNaClおよび亜硝酸

ナトリウムをそれぞれ0.5, 0.005%になるように加え、蒸留水で全量を100mlとした後、70℃で20分間加熱し、氷水で冷却したものを官能試験用の基準スープとした。

試験区として、Hxの濃度が0.7, 3.5および7.0 $\mu\text{mol/ml}$ になるように添加したスープ、カフェインの濃度が1.03 $\mu\text{mol/ml}$ になるように添加したスープおよび硫酸キニーネの濃度が0.0051 $\mu\text{mol/ml}$ になるように添加したスープを調製し、それぞれを基準スープと同様に加熱および冷却処理したものを試験用スープとした。

すべてのスープは、官能試験に供する前に室温に戻してから、1回の試験につき5mlずつパネルに提供した。

2.3 官能試験方法

基準スープの各味の強さを0点とした時の試験用スープの基本五味（甘味、塩味、酸味、苦味、旨味）およびコク味（厚み、持続性、広がり）の強さを10段階（-5点～+5点）で評価した。コク味の評価項目については、事前にパネル間でJAS熟成に格付されたロースハムとJAS標準に格付されたロースハムを比較し、熟成に伴う味の増強を評価するのに適した官能評価項目を選抜し、また、その程度のすり合わせを行った。パネルは当研究所に所属する食肉製品の官能技術に熟練した官能検査員7名とし、ノーズクリップを用いて鼻腔を閉じて香りの影響を排除した。

2.4 耐熱性筋漿画分および基準スープの理化学的成分分析

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）。

核酸関連物質濃度は、北田らの方法¹⁵⁾で測定した。

遊離アミノ酸濃度は、試料に蒸留水および10%スルホサリチル酸溶液を加えてホモジナイズ後に遠心分離し、得られた上清をヘキサソール洗淨したも

のを高速アミノ酸分析計（L-8900, (株)日立ハイテクサイエンス社製）で測定した。

2.5 統計処理

すべての官能評価は平均値±標準誤差で算出し、統計学的有意差検定はT検定を用いて行い、有意水準は5%とした。

2.6 熟成後の牛肉の肉質評価

3頭の交雑種牛のロースの片側を無包装、0—1℃の条件で4週間ドライエイジング、一方の側を真空包装し同様の条件でウェットエイジングした後、胸最長筋を切り出し、官能試験および理化学試験に供した。

官能試験では、ロースから切り出した胸最長筋をさらに厚さ5cm、縦5cm、長さ10cm角に切り出し、真空包装後に75℃の水浴中で50分間加熱し、厚さ5mmにスライスして試験に供した。評価方法は、ウェットエイジング試料を0点とした場合のドライエイジング試料の旨味、コク味（厚み、持続性および広がり）を総合的に評価）および味のバランスの強さを7段階（-3～+3）で評価した。

理化学試験では、切り出した胸最長筋をさらにフードカッターで細切し、核酸関連物質および遊離アミノ酸含量測定に供した。

3. 結果と考察

3.1 理化学成分分析

豚ロース肉から調製した官能試験用基準スープのpH, NaCl濃度、窒素濃度、核酸関連物質濃度および遊離アミノ酸濃度をTable 1に示した。核酸関連物質含量に関しては、含量が最も高いのはIMPで2.6 $\mu\text{mol/g}$ であるのに対し、Hx含量は低く0.3 $\mu\text{mol/g}$ と閾値未満であった。遊離アミノ酸含量に関しては、甘味を呈すアミノ酸であるアラニンが最も多く、旨味を呈すグルタミン酸、苦味を呈すロイシンと続いた。ロイシンの苦味閾値は190mg/100gであり¹⁶⁾、基準スープ中のロイシン

Table 1 Profile of the standard soup

		standard soup
pH		5.95
NaCl (%)		0.5
nitrogen (mg/100 g)		284.2
ATP-related compounds (μ mol/g)	ATP	0.0
	ADP	0.1
	AMP	0.1
	IMP	2.6
	INO	1.5
	Hx	0.3
free amino acids (mg/100 g)	Asp	1.0
	Thr	3.3
	Ser	4.3
	Glu	8.1
	Gly	5.7
	Ala	13.6
	Val	3.6
	Cys	0.1
	Met	2.8
	Ile	3.1
	Leu	5.6
	Tyr	3.2
	Phe	3.3
	Trp	0.4
	Lys	4.1
His	1.6	
Arg	3.8	
Pro	2.2	

standard soup ; 40% heat-stable sarcoplasmic fraction with 0.5% NaCl and 0.005% NaNO₂ was heated at 70°C for 20min.

の量は閾値よりもはるかに低い濃度であった。また、その他の苦味を呈すアミノ酸も閾値未満の濃度であった。

3.2 五味およびコク味の増強に対するHxの添加効果

我々は、平成26年度の本助成研究において、原料肉の塩づけに伴う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関与する必須因子としてHxを特定した^{8, 17)}。すなわち、スライスした豚ロース肉を様々な濃度のHxを含むピクルで塩漬したモデル試料を作製して官能評価した結果、モデル試料中のHxの濃度に依存して塩漬肉特有の味が増強することが明らかに

なった。

そこで、より単純な実験系で特有の味の強さのみを評価するべく、原料肉から不溶性の食肉成分の影響を排除し、食感の影響を受けないスープ状の試料において、Hxが基本五味およびコク味の増強に関与するか否かを確認した。

最初に、基準スープとして用いたHx無添加のスープを官能試験に供した結果、このスープは豚肉らしい旨味およびコク味を持つことが確認された。続いて、様々な濃度のHxを添加したスープを官能試験に供し、Hxの添加効果を調べた (Fig. 1)。Hxの濃度は、苦味の閾値濃度である0.7 μ mol/ml、豚肉中のATP関連物質の総量に相当する7.0 μ mol/mlおよびその半量の3.5 μ mol/mlとした。

この結果、Hxの添加により、基準スープ自体の持つ旨味、広がり、厚みおよび複雑さが増強し、3.5 μ mol/mlになるように添加した場合が最も強い結果となった ($p < 0.05$)。0.7 μ mol/mlになるように添加した場合は、ヒトがわずかに苦味を感じるような薄い濃度にもかかわらず、広がり、厚みおよび複雑さが有意に強まった ($p < 0.05$)。一方、7.0 μ mol/mlになるように添加した場合は、3.5 μ mol/mlと比較して旨味が弱まり、またコク味はすべて同等となった。つまり、旨味やコク味はHxの濃度に依存して増強するのではなく、Hxの濃度が高くなった場合には一定のレベルで維持されるか、あるいは減少するものと考えられた。

Hx添加は、甘味、塩味および酸味に影響がないが、3.5および7.0 μ mol/mlになるように添加した場合に有意に苦味が強まったため ($p < 0.05$)、苦味が強まることで旨味およびコク味の増強を惹起することが示唆された。また、Hxの添加によるpH変化はなかったため、旨味およびコク味の増強はpHの影響によるものではないことが確認された。

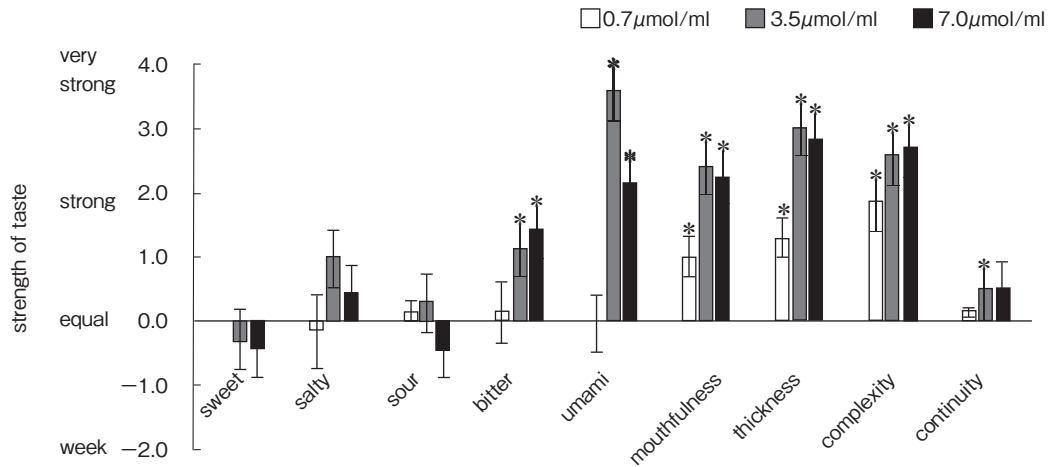


Fig. 1 Effect of hypoxanthine on the taste of soups
soups : 40% heat-stable sarcoplasmic fraction with 0.5% NaCl, 0.005% NaNO₂ and several concentrations of Hx was heated at 70°C for 20min.

The strength of taste of the soups with Hx was compared with that of the standard soup. The values with asterisks are significantly different ($p < 0.05$). Histograms show mean values \pm standard errors.

3.3 五味およびコク味の増強に対するカフェインおよび硫酸キニーネの添加効果

Hxの添加が、耐熱性筋漿画分の旨味およびコク味を増強することが確認された。Hxは苦味を呈する成分であることから、Hxが呈する苦味が塩漬熟成に伴う食肉製品の味の増強に寄与している可能性が考えられる。そこで、官能パネリストの訓練の際に苦味識別の指標として用いられるカフェインおよび硫酸キニーネをHxと同様に基準スープへ添加し、苦味が塩漬肉特有の味の増強へ与える影響を調べた。

苦味の識別テストに用いられる濃度に調製したカフェインあるいは硫酸キニーネを添加したスープを官能試験に供し、カフェインおよび硫酸キニーネの添加効果を調べた (Fig. 2)。カフェインを1.03 μmol/ml添加したスープは、無添加の基準スープと比較して基準スープ自体の持つ旨味およびコク味が増強する傾向にあり、持続性については有意に強まった。硫酸キニーネを0.0051 μmol/ml添加したスープは無添加の基準スープと

比較して基準スープ自体の持つ旨味およびコク味が増強する傾向にあり、旨味、厚みおよび複雑さは有意に強まった。また、カフェインおよび硫酸キニーネのいずれを添加した場合も甘味、塩味および酸味への影響はほとんどないが、苦味が強まった。本試験では、カフェインおよび硫酸キニーネの添加濃度を同等の苦味として感知する濃度に設定したにもかかわらず、カフェイン添加区においては硫酸キニーネ添加区と比べて苦味が強く、旨味およびコク味の増強効果が弱かった。食肉中には様々な呈味物質が含まれており、苦味や酸味をマスキングするような緩衝作用が働いたため、苦味物質の食肉の味への作用は不明な点が多い。今後、食肉の味のモデル系を用いた苦味物質のオMISSIONテストや、ロイシンやアルギニンといった食肉由来の苦味物質が旨味およびコク味へ与える影響について、検討する必要があるだろう。

以上の結果から、基準スープに苦味物質を添加すると、添加した物質の種類に関係なく、基準

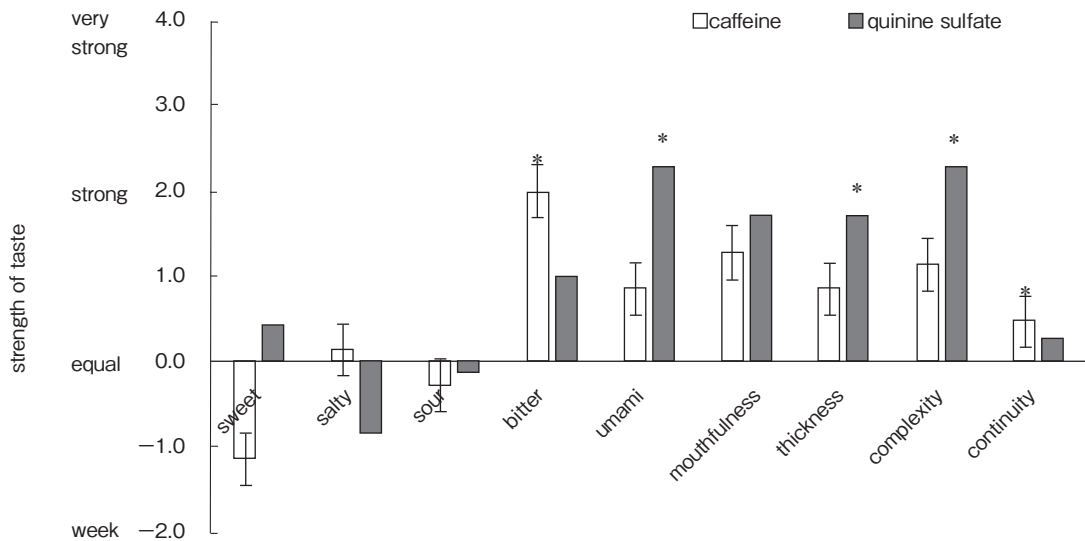


Fig. 2 Effect of caffeine and quinine sulfate on the taste of soups

soups : 40% heat-stable sarcoplasmic fraction with 0.5% NaCl, 0.005% NaNO₂ and 1.03 μmol/ml of caffeine or 0.0051 μmol/ml of quinine sulfate was heated at 70°C for 20min.

The strength of taste of the soups with caffeine or quinine sulfate was compared with that of the standard soup. The values with asterisks are significantly different ($p < 0.05$). Histograms show mean values \pm standard errors.

スープ自体の持つ旨味やコク味が増強されることが明らかになった。また、苦味が一定のレベルを超えると、旨味やコク味の増強効果が弱まると考えられた。

実際にHxが蓄積した状態の食肉製品中には、塩漬熟成に伴って増加した遊離アミノ酸や低分子ペプチド、有機酸、ミネラル等の複数の呈味物質が同様に蓄積しており、これらが相互作用して塩漬熟成特有の味を形成すると考えられる。しかし、本結果から、食肉製品の旨味およびコク味の増強にはHxの持つ苦味が不可欠であると推定された。

3.4 と畜後の熟成に伴う食肉の味の改善におけるHxの関与

これまでに、塩漬熟成に伴う食肉製品の旨味やコク味の増強にHxの呈する苦味が必須であることを明らかにしてきた。一方、食肉自体のと畜後の熟成に伴う味の改善については熟成に伴う遊離アミノ酸や低分子ペプチド等の増加が関与してい

ると考えられるが、未だ定説はない。食肉中には苦味を呈する成分が複数存在し、熟成に伴いロイシン、イソロイシン、バリンといった苦味を呈するアミノ酸やペプチドが蓄積する。熟成に伴う豚肉のスープ中の遊離アミノ酸含量の変化を調べた西村らの結果⁶⁾によると、苦味を呈するアミノ酸の中で最も増加するのがロイシンであり、と畜後6日には約1 μmol/gとなった。しかし、この値はロイシンの苦味閾値である14.7 μmol/gよりはるかに低いので、ロイシンが味の改善へどこまで寄与しているか不明である。一方で、Hxの苦味閾値は0.73 μmol/mlであり、と畜後の熟成に伴い閾値の数倍量食肉中に蓄積することから、食肉の苦味の鍵となる物質であると考えられる。すなわち、死後の熟成に伴う食肉自体の味の改善に関しても、Hxの関与が大きいと推定される。そこで、異なる方法で熟成した交雑牛肉を官能試験に供し、Hx含量との関係を調べた。

まず、ドライエイジングあるいはウエットエイ

Table 2 Concentration of ATP-related compounds and free amino acids of aged beef

		wet-aged	dry-aged
ATP-related compounds ($\mu\text{mol/g}$)	IMP	3.2	0.9
	Hx	1.3	2.8
free amino acids ($\text{mg}/100\text{g}$)	Total	573.2	687.2
	Glu	4.8	13.5
	Ala	25.0	38.8

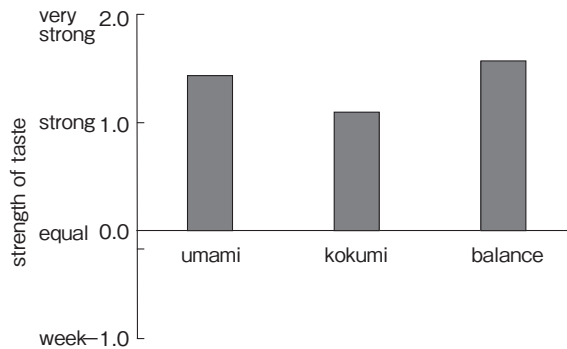


Fig. 3 Strength of taste of dry-aged beef

The strength of taste of dry-aged beef was compared with that of wet-aged beef.

ジングした牛胸最長筋の遊離アミノ酸および核酸関連物質含量をTable 2に示した。遊離アミノ酸総量, グルタミン酸量およびHx量は, いずれもドライエイジングの方が高かった。この結果から, ドライエイジングの方がウエットエイジングよりも熟成状態が進んでいるものと判断された。

続いて, ウエットエイジングした試料の旨味およびコク味を0点としてドライエイジングした試料を75°C, 50分間加熱したものを官能試験に供した (Fig. 3)。ドライエイジング試料は, ウエットエイジング試料と比較して旨味およびコク味が強く, さらにバランスが良い結果となり, Hxが蓄積した状態の食肉の嗜好性が高いものと推定された。この結果は, と畜後の熟成に伴う味の改善においても, Hxの関与が大きいことを示唆しており, 今後, この点からの研究を進展させたい。

4. 要 約

本研究では, 塩漬熟成に伴う塩漬肉特有の味の増強に關与する因子であるHxの作用機序について, 官能試験を用いて検討した。Hxの性質の一つである苦味に着目し, 特有の味の増強に対する苦味の影響を, 豚肉の筋漿画分から調製したスープ状の試料を用いて調べた。その結果, 添加する苦味物質の種類に關係なく, 苦味が一定程度加わることでスープの旨味およびコク味が増強されることが明らかになった。また, 苦味が一定のレベルを超えると, 旨味やコク味の増強の程度が弱まると考えられた。さらに, と畜後の熟成に伴う食肉自体の味の改善におけるHxの関与についても, 長期熟成した牛肉を用いて予備的に調べた結果, Hx含量が多い食肉の官能的嗜好性が高い結果となった。Hxは食肉中の呈味成分の中でも苦味閾値が低い物質であることから, 塩漬熟成およびと

畜後の熟成に伴う味の変化において鍵となる物質
であると考えられた。

文 献

- 1) Cho, I. C., Bratzler, L. J. : *Journal of Food Science*, **35**, 668~670, 1970.
- 2) Brown, C. L., Hedrick, H. B., Bailey, M. E. : *Journal of Food Science*, **39**, 977~979, 1974.
- 3) Macdonald, B., Gray, J. I., Stanley, D. W., Osborne, W. R. : *Journal of Food Science*, **45**, 885~904, 1980.
- 4) Uchida, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R., Kimizuka, A. : *Agricultural and Biological Chemistry*, **54**, 163~169, 1990.
- 5) Okitani, A., Matsuishi, A., Nishimura, T. : 調理科学, **25**(4), 314~326, 1992.
- 6) Nishimura, T., Kato, H. : *Food Reviews International*, **4**, 175~194, 1988.
- 7) Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., Kato, H. : *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 2323~2330, 1988.
- 8) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, DOI : 10. 1111/asj. 12625.
- 9) Hayashi, T., Yamaguchi, K., Konosu, S. : *Journal of Food Science*, **46**, 479~483, 1981.
- 10) Escudero, E., Mora, L., Aristoy, M., Toldrá, F. : *Meat Science*, **89**, 536~539, 2011.
- 11) Shibata, K., Yoshida, Y., Matsunaga, T., Nakashima, M., Inoguchi, Y., Shinmura, H., Hattori, A. : 食肉の科学, **54**(2), 165~174, 2013.
- 12) Konosu, S. : Food taste chemistry, ACS Symposium series, No.115, 185~203, American Chemical Society, Washington, DC, 1979.
- 13) Huber, L., Klostermeyer, H. : *Milchwissenschaften*, **29**, 449~455, 1974.
- 14) Michikawa, K. : *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42**(12), 982~988, 1995.
- 15) 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.
- 16) Ninomiya, K. : 調理科学, **1**, No.4, 185~197, 1968.
- 17) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, vol.33, 23~29, 2015.

鶏肉フライの加熱・保存過程におけるテクスチャーの 決定要因と変化機構の解明

Elucidation of the determining factor of the textural properties in the
heating and storage process of fried chicken

杉山 寿美・野村 知未*

(県立広島大学人間文化学部健康科学科, *広島女学院大学人間生活学部)

Sumi Sugiyama and Satomi Nomura*

(Faculty of Human Culture and Science, Prefectural University of Hiroshima, *Faculty of Human Life Science, Hiroshima Jogakuin University)

The crispy texture of the crust of battered, fried foods contributes to their distinctive flavor and palatability. In the present study, we prepared battered chicken tenderloins and thighs using three kinds of batter mixtures with a similar degree of adhesion to the ingredients (pick-up) : A) flour and water (1 : 2.5) ; B) flour, eggs, and water (1 : 1 : 2) ; and C) flour, potato starch, and water (0.7 : 0.3 : 2), and examined the effects of “freezing before cooking” and “storing after cooking” on the textural properties of the crust of the fried products to explore factors affecting them. Freezing was performed at -20°C for 2 nights, and post-cooking storage at 4°C for one night, followed by 65°C for 2 hr.

Fried tenderloins and thighs prepared with the egg-containing batter (B) had a brittle crust, as compared with those coated with batter A, and the texture and volume of the crust were maintained after the storage process. The crust from batter B had higher moisture and fat contents. This was probably due to it containing egg white, which possibly functioned to retain water during heating, and egg yolk, which could generate porous structures that facilitate oil absorption during frying, suggesting that the structural components of the batter coating formed during heating may affect the post-storage textural characteristics of the crust. Storage resulted in increased hardness of the crust of fried tenderloins and increased tenderness of that of fried thighs, irrespective of the kinds of batter.

These results demonstrate that variations in the composition of batter mixtures and the fat content of ingredients affect the structural and, thereby, textural properties of the crust of fried foods.

1. 目 的

フライなどの揚げ物は、食材を覆う衣のサクサクしたテクスチャーが特有の美味しさを生みだしている。衣は揚げ油と食材の中間層となり、揚げ

加熱時には発生する水蒸気による高い圧力に耐えつつ、ゾルから多孔質ゲルへの構造変化を生じ、揚げ物のテクスチャーを決定、嗜好特性に著しく影響している。一方、揚げ物調理の外部化は著しく、家庭内で揚げ物調理を行うことは少なくなっ

ている。このことは、これまでは考慮する必要性が低かった「加熱前の冷凍過程」や「加熱後の保存過程」が揚げ物の性状、特に衣のサクサクしたテクスチャーに及ぼす影響を明らかにする必要性を生じさせている。しかし、この調理環境・工程の変化に対応した研究は十分でなく、市販品においてはサクサクしたテクスチャーの消失要因である食材から衣表面への水分移行を遅らせるために硬く厚いバター層を有する衣とすることや、食肉に油脂を添加することで衣を内部からも揚げ加熱とすること等で対応がなされている。さらに、これまでの揚げ物の衣のテクスチャーや油脂量に関する研究は、ナゲットやイカリングを試料としたものに限られ、HPMCの添加が吸油量を抑制すること、グルテンの添加が弾力性を有するテクスチャーとすること、架橋澱粉の添加が衣を多孔質とすることなど対処法的な検討に限られ、揚げ物の衣に関する基礎的報告は少ない¹⁻⁴⁾。そこで、本研究では、鶏肉フライを配合の異なるバターで調製し、「加熱前の冷凍過程」や「加熱後の保存過程」の衣のテクスチャー変化とその決定要因・変化機構を解明することを目的として実験を行った。

2. 方法

2.1 バターおよびフライの調製

バターは、ふるった小麦粉に10℃の水を加えて、均一になるまで攪拌、ストレーナーに通して調製した。バター配合は、pick up量がほぼ同じとなるように水の配合量を検討した3種類(A:小麦粉:水=1:2.5, B:小麦粉:卵:水=1:1:2, C:小麦粉:片栗粉:水=0.7:0.3:2)とした。鶏肉はささみ肉およびもも肉を使用し、20g(4cm×3cm×1.5cm)に成形、バターへの浸漬とパン粉の付着を2回繰り返した。また、衣づけした試料の一部は、-20℃で2晩冷

凍した。衣づけした試料は、ハロゲンヒーターを用いて、キャノーラ油500mlを入れたビーカー内で1個ずつ180℃で加熱した。揚げ加熱時間は、予備実験で試料の中心温度が75℃となり、嗜好的にも好ましい状態と考えられる時間として3分(冷凍試料は4分)に決定した。揚げ加熱後、25℃で30分放冷したものを加熱後試料(コントロール)とし、加熱後、4℃で1晩冷蔵し、その後ホットワゴンを用いて65℃に2時間置いたものを保存試料とした。すなわち、ささみ肉およびもも肉のフライをバター3種で調製し、さらにそれぞれに冷凍の有無および加熱後保存の有無の違いによる4種の試料を実験に用いた(2×3×4=24種)。

2.2 バターの動的粘弾性測定

調製したバターの動的粘弾性測定は、RS6000(Therme HAAKE)で、ダブルコーンセンサー(φ60mm)を用いて行った。応力依存性測定によって、線形領域を確認後、周波数依存性測定、温度依存性測定を行った。なお、測定に用いたバターは小麦粉、片栗粉の均一性を確保するため、50℃まで加温して用いた。

2.3 嗜好特性(衣のテクスチャー、色調測定)

鶏肉フライの硬さ(N)、破断歪み(mm)を、テクスチャーアナライザーEZ Test(島津)で、錘状治具(φ5mm)を用いて行った。各試料に対してストロークスピード50mm/minで70%の圧縮で測定した。なお、最大試験力(N)を硬さ、破断点(mm)を破断歪みと定義した。衣の色調は、色彩色差計(CR-400)で測定した。

2.4 フライの体積測定と走査電子顕微鏡観察

鶏肉フライの体積は菜種法により測定した。あらかじめ菜種の体積から検量線を作成し、さらに、測定中に損失した菜種の補正を行い、1試料を3回測定することで測定誤差が少なくなるよう配慮した。

衣と食材の接触面および衣の断面の観察は、走査電子顕微鏡JCM6000（日本電子）を用いて行った。衣を約5mm角にかみそり刃で切りとり、エタノールに一晩浸した後、t-ブチルアルコールで脱水処理した。デシケーター内で乾燥後、試料をカーボンテープと導体液を用いてステージに固定し、加速電圧15kV、50～1000倍で、低真空条件下で観察した。なお、観察は試料数の関係から、バターBを中心に行った。

2.5 試料重量および衣の水分量、脂肪量の測定

バターおよびパン粉の付着量（pick up量）は、食材に衣をつけた重量から、食材重量を差し引くことで算出した。また、加熱前後、保存後の試料重量は1つずつ測定した。

衣の水分量は、衣を試料から1つずつ剥がしとり、フードプロセッサーで粉碎後、ただちに天秤式水分計MA-150（Sartorius）を用いて130℃で測定した。

衣からの脂肪抽出は、水分量の測定と同様に、衣を試料から1つずつ剥がしとって行った。フードプロセッサーで粉碎した衣はBligh-Dyer法で脂質抽出を行い、内部標準物質としてトリペンタデカノイン（Sigma, USA）を抽出脂質の一部に加え、5%塩酸メタノール（東京化成）を用いてメチル化した。脂肪酸分析はキャピラリーカラムDB-WAX（60m × φ 0.253mm, J&W Scientific）を用いて、ガスクロマトグラフィーGC-2010（島津）で行った。なお、脂肪量は、保存によって変化しないと考えられるため、保存後試料では行わなかった。

3. 結果と考察

3.1 バターの動的粘弾性特性とフライの嗜好特性

Fig. 1に、バターの動的粘弾性測定（応力、

周波数測定）の結果を示した。予備実験においてバターのpick up量が一定になるよう、配合を決定しており、周波数依存性は類似していた。一方、応力依存性は著しく異なり、線形領域はバターAおよび卵を含むバターBで広く、澱粉を含むバターCで狭かった。また、バターBのG'は著しく高く、バター中に含まれる卵白の影響と考えられた。

Fig. 2に、鶏肉フライの衣の硬さと破断歪みの結果を示した。ささみ肉では、衣の硬さはバターAよりも、バターB、Cで小さく、破断歪みはいずれのバターも同程度であり、バターに卵や澱粉を混合することで衣が脆くなることが確認された。また、加熱後の保存（冷蔵・温め）によって、ささみ肉では衣が硬く、もも肉では脆くなり、食材が衣の硬さの変化に影響を及ぼすことが示された。なお、冷凍過程を有する試料では、保存（冷蔵・温め）によって、ささみ肉、もも肉ともに脆くなった。官能評価においても、バターAよりも、バターB、Cで脆く、ささみ肉よりももも肉で脆いことが確認され、加えて、加熱直後の試料では冷凍の有無に関わらずバター間の差は小さいが、保存後ではバターBよりもバターA、Cで、ささみ肉よりももも肉で、ひき（ガム性）が強いことが確認された。なお、バターの色調については、卵を含むバターBの衣のL*値が低く、a*値が高かった。また、加熱後の保存によりL*値、a*値、b*値が低くなることが確認された。

3.2 フライの体積と衣の多孔質構造（走査電子顕微鏡観察）

鶏肉フライの体積は、揚げ加熱後ではバターの種類に関わらず同程度であったが、加熱後に保存（冷蔵・温め）すると体積が減少し、この体積減少はバターBで小さい傾向にあった。これはバターBに含まれる卵白の熱凝固性により衣の

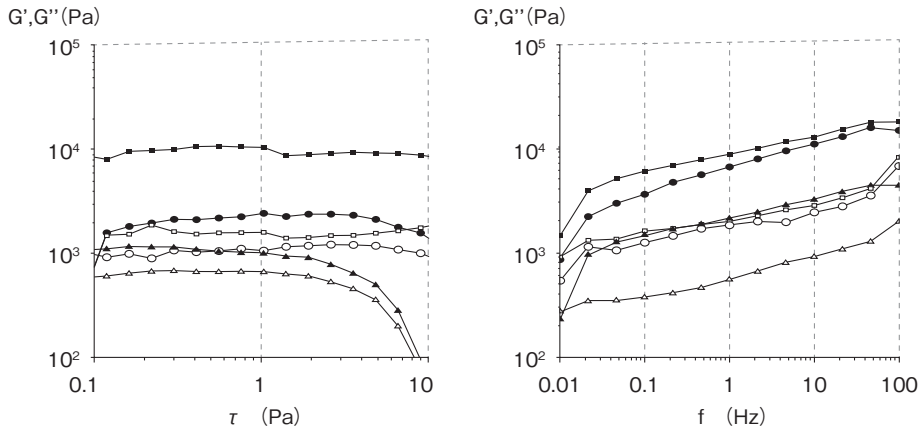


Fig. 1 Amplitude and Frequency dependences of batter. (G' : closed symbol, G'' : open symbol, ●, ○: batter A, ■, □: batter B, ▲, △: batter C)

Amplitude dependence test was performed at 1Hz and 20°C. Frequency dependence test was performed at at 5Pa and 20°C.

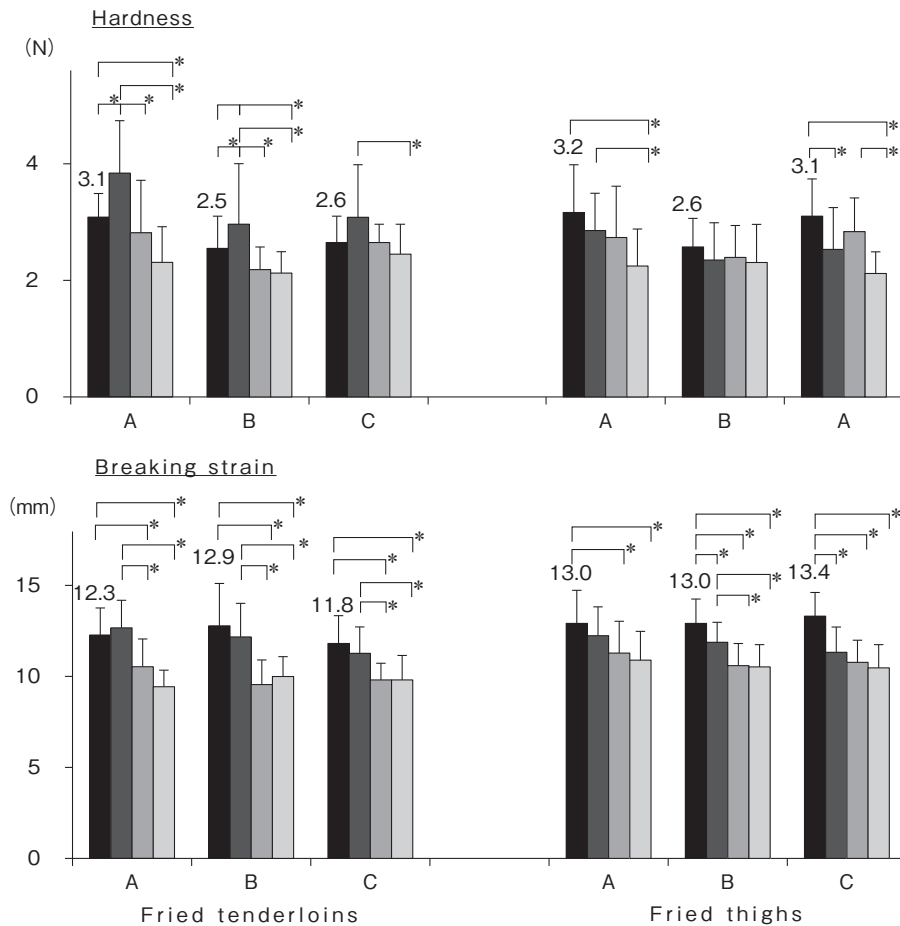


Fig. 2 Texture properties of fried chicken crust. (■: control, ■: storing after cooking, ■: freezing before cooking, □: freezing and storing)

Columns and bars represent the median and standard deviation of 9 samples. * $p < 0.05$

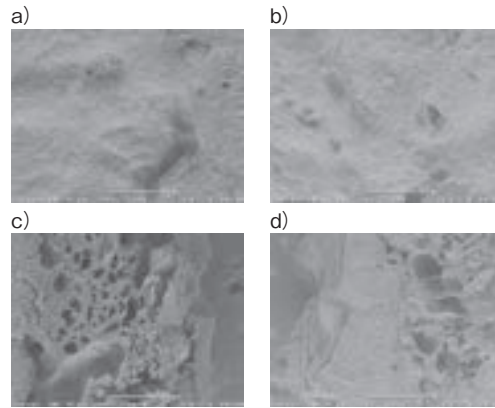


Fig. 3 The scanning electron micrographs of fried chicken crust (50×). (a, c : batter A, b, d : batter B, a, b : inner surface, c, d : cross-section).

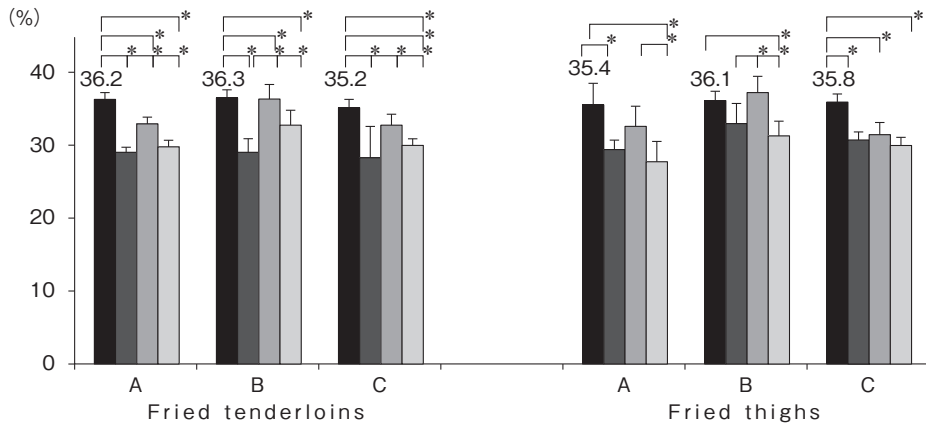


Fig. 4 Moisture contents of fried chicken crust. (■ : control, ▣ : storing after cooking, ▨ : freezing before cooking, □ : freezing and storing)

Columns and bars represent the median and standard deviation of 6 samples. * $p < 0.05$

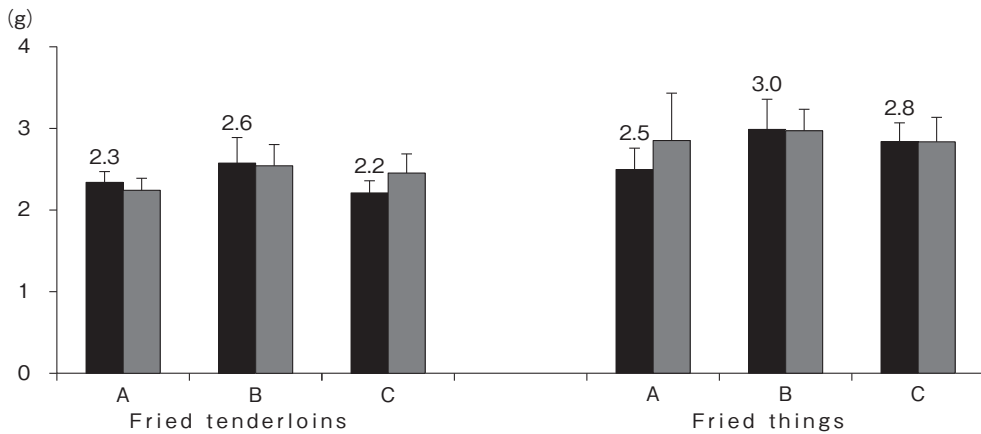


Fig. 5 Fat contents of fried chicken crust. (■ : control, □ : freezing and storing)

Columns and bars represent the median and standard deviation of 6 samples. Significant differences were not observed ($p > 0.05$).

形状が維持されたためと推察された。また、もも肉は、冷凍過程を有すると加熱後の体積が大きくなり、もも肉に含まれる脂肪がバターへの膨張に影響していると考えられた。

Fig. 3に加熱後の衣の断面と内側の走査電子顕微鏡観察画像を示した。衣の内側では、バターA、Bで著しい差異は認められなかったが、衣の断面では、バターBの表面部分の空隙が大きく、かつ、不均一であることが観察できた。バターに含まれる卵黄は加熱中に揚げ油へ溶出することから、卵黄の溶出に伴う空隙の形成と考えられた。

3.3 フライの重量変化と衣の水分量、脂肪量

Fig. 4にフライの衣の水分量を示した。加熱により衣の水分量は、ささみ肉、もも肉のいずれも35%程度となり、保存（冷蔵・温め）により衣の水分は減少した。しかし、バターBでは特に冷凍過程を有した時に、A、Cよりも水分量が高く、冷凍過程を有さない場合と水分量はほぼ同値であった。これは、バターBに含まれる卵白が水分を保持したためと推察された。

Fig. 5に衣の脂肪量をフライ1個あたりの値で示した。衣の脂肪量は、もも肉でささみ肉よりも多く、もも肉に含まれる脂肪に由来すると考えられた。この衣への脂肪の付着・浸透が、加熱過程において衣を高温とし、前述のようにフライの体積を大きく、衣を脆いものとし、さらに保存（冷蔵・温め）後の衣をひき（ガム性）のあるものにするためと推察された。また、バターBでバターA、Cよりも脂肪量が多かったが、卵に由来する脂肪量は0.1g程度であることから、この脂肪は揚げ油に由来すると考えられ、バターBが多孔質構造であるために、空隙に揚げ油が入り込んだものと推察された。

なお、加熱過程での重量変化は、バターの水分の保持、揚げ油の吸着によって決定されるが、バターAよりもバターB、Cで重量減少が小さかった。また、いずれのバターでも保存によって重量は90%程度となったが、冷凍過程を有する試料では重量変化は小さくなり、冷凍過程でバターが水分を保持するためと考えられた。

4. 要 約

本研究は、鶏肉フライを配合の異なるバターで調製し、「加熱前の冷凍過程」や「加熱後の保存過程」の衣のテクスチャー変化とその決定要因・変化機構を解明することを目的として実験を行った。

鶏肉フライにおいて、バターAと比較して、卵を含むバターBは衣の水分量、脂肪量が多く、加熱時において、卵黄の溶出による空隙の形成、卵白による水分の保持によるものと考えられ、このことが、バターBの衣が脆く、加熱保存後もテクスチャーや体積の維持をもたらしたと考えられた。また、保存による硬さは、ささみ肉では高くなった一方、もも肉では低くなり、食材の脂肪量が保存時の衣のテクスチャーに影響を及ぼすことが示された。以上のことから、バター配合や食材の脂肪量の違いが、フライの衣の構造に影響し、テクスチャー変化をもたらしていることが示された。

文 献

- 1) Altunakar, B., et al. : *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 318~322, 2004.
- 2) Salvador, A., et al. : *Food Hydrocolloids*, **19**, 703~708, 2005.
- 3) Martin, C. : *Food Hydrocolloids*, **28**, 53~58, 2012.
- 4) Lalam, S., et al. : *LWT-Food Sci. Technol.*, **50**, 110~119, 2013.

デジタルPCR法を用いた食肉加工品中における リステリア菌の迅速定量法の開発

Establishment of the rapid enumeration method for *Listeria monocytogenes*
by using the Digital PCR

高 橋 肇

(東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門)

Hajime Takahashi

(Laboratory of food microbiology, Department of Food Science and Technology,
Tokyo University of Marine Science and Technology)

Listeria monocytogenes is a causative bacteria of listeriosis. The bacteria has isolated from vegetables, milk products, seafood, and meat products. The mortality rate of the listeriosis is higher than other foodborne pathogen disease, therefore EU, U.S. and Japan have a regulation for this pathogen in ready-to-eat food. EU and Japan has established an action level of *L. monocytogenes* for 100 cfu/g. The cultural method and real-time PCR method are generally used for quantification of *L. monocytogenes*. However, the cultural method takes a lot of work and time. Additionally, real-time PCR method can not estimate a low number of bacteria. Recently, the digital PCR technology has attracted attention. In the dPCR, samples are separated into tens of thousands of wells and PCR is performed in each well. Positive/negative wells are counted and the number of the pathogens are determined at the end of the PCR. In this study, a new method was developed for the quantification for *L. monocytogenes* by using dPCR.

Firstly, highly specific primer and probe sequences suitable for dPCR were designed. Secondly, the PCR-inhibition effect of food residues in a variety of dilutions rate were investigated. The results of this experiment showed that there was no negative effect on the PCR at low dilution rates. Finally, the developed method was evaluated using a ham sample in which *L. monocytogenes* was inoculated. The method could quantify *L. monocytogenes* in meat products. The developed method could enumerate the number of *L. monocytogenes* even when the contamination level was lower than 100 cfu/g.

The dPCR technology is highly sensitive and highly precise for quantification. In addition, the method can determine the number of pathogens without the need for plotting a standard curve. Therefore, the developed method will be considerably useful in the food industry.

1. 目 的

*Listeria monocytogenes*はリステリア症の原因

菌で、生ハムなどの食肉加工品、ナチュラルチーズなどの乳製品、スモークサーモン、ネギトロ、魚卵などの水産加工品、サラダ類などから検出さ

れている。*L. monocytogenes*に汚染されたこれらの食品を喫食した場合、人によりリステリア症を発症することが知られている。リステリア症の主症状は髄膜炎や敗血症であり、妊婦が発症した場合には流産を引き起こす。また、新生児や幼児、高齢者が発症した場合には症状が重篤化し、死亡する場合もある。発症した場合のリステリア症の致死率は28.4%と他の食中毒菌と比較して非常に高いため、本菌が問題となるような食品を生産している食品会社において問題視されている。

リステリア症による健康被害を防止するため、世界各国では食品中の*L. monocytogenes*菌数に対して規制を敷いている。たとえば、コーデックス基準では本菌の菌数を、増殖が起きるRTE食品中では不検出/25 g、増殖が起きないRTE食品中では100cfu/g以下と定めている。また日本では非加熱食肉製品およびナチュラルチーズ中の*L. monocytogenes*の菌数を100cfu/g以下と定めている¹⁾。EUや日本において、食品中の*L. monocytogenes*は、ISOの定めた手法を用いて検査されている。この手法は*L. monocytogenes*が特異的に生育可能である選択培地と鑑別培地を用いた培養法である。そのため、結果が出るまでに3日以上を要し、これに代わる迅速な検査法の開発が求められている。

食中毒菌の迅速検査法として、Realtime PCRを用いた手法が数多く開発されている。しかし、これまでに開発された*L. monocytogenes*を対象としたRealtime PCR法の定量範囲は、*L. monocytogenes*の規制値である100cfu/gを上回り²⁾、また、Realtime PCRは食品残渣などによるPCR阻害効果の影響を受けて、Ct値が変動しやすいため、菌数が少ない場合には正確に定量できないことが報告されている³⁾。

そこで、本研究では、近年開発されたDigital PCR (dPCR) に着目した。dPCRとは、サンプルを微

小液滴に分配してPCRを行い、各液滴内での対象遺伝子の増幅の有無を検出し、増幅が検出された液滴数から定量する絶対定量法である。dPCRは、検量線が不要であり、サンプルを微小液滴に分配するために残渣によるPCR阻害が起こりにくいことが知られている⁴⁾。本研究では、食品中の*L. monocytogenes*をdPCRにより定量する技術の開発を行った。また、食肉加工品をはじめとする*L. monocytogenes*食中毒の原因になりうると考えられている食品に本菌を接種し、開発した手法を用いてその菌数を定量することで、手法の評価を行った。

2. 方法

2.1 Digital PCRを用いた*L. monocytogenes*定量法の開発

はじめに、*L. monocytogenes*に特異的な遺伝子である*inlA*を標的遺伝子として、プライマーおよびプローブを設計した。設計したプライマーは本研究室に保存されていた*L. monocytogenes* 36株と、*L. monocytogenes*以外の*Listeria*属の菌株および*Listeria*属以外の標準菌株29株を用いてその特異性を確認した。

次に、 $10^0 \sim 10^5$ cfu/mlになるように調整した*L. monocytogenes* CIP103575 (Scott A) の希釈液各1 mlを遠心分離してペレットを得た。ペレットから、NucleoSpin® Food kitを用いて、添付のプロトコルに従って、DNAを抽出した。ただし、DNAは抽出液50 μ lに抽出した。

dPCRの反応にはQuantstudio™ 3D Digital master (Life Technologies) を使用し、QuantStudio™ 3D digital PCR chipに反応液をロードした。PCR増幅後、DNAの増幅の有無をQuantStudio™ 3D digital PCR System (Life Technologies) を用いて解析した。

dPCRによって得られた測定菌数と培養法に

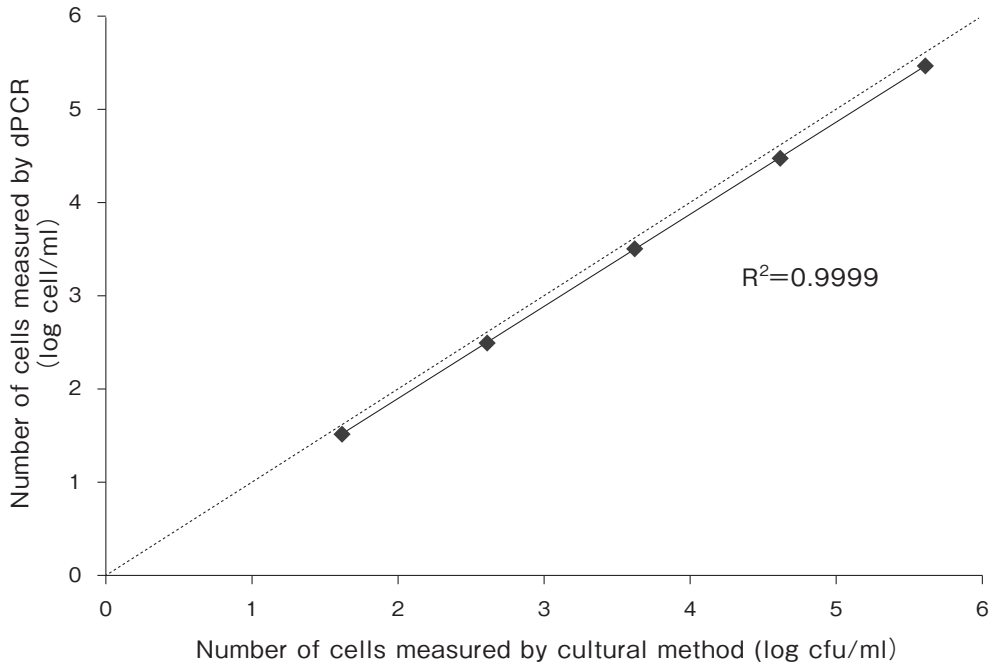


Fig. 1 Relation of the numbers of *L. monocytogenes* measured by dPCR and cultural method

よって測定された*L. monocytogenes*の菌数から検量線を作成して、dPCRの精度を確認した。

2.2 食品中の*L. monocytogenes*濃縮法の確立

次に、食品中の*L. monocytogenes*の濃縮法を検討した。*L. monocytogenes* CIP103575 (Scott A) を、終濃度が 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 , 10^6 cfu/gとなるようにエビ25 gに接種し、生理食塩水をそれぞれ25, 100, 225ml加えた後、ストマッカーを用いて30秒間処理した。この食品乳剤10mlを遠心分離し、上清を除去してペレットを得た。また、各食品乳剤1 mlを遠心分離したペレットも用意した。集菌した各ペレットは、STET (Toris 20mM, EDTA 2mM, Triton 1 %, リゾチーム20 mg/ml) で前処理した後、NucleoSpin®Foodを用い、添付のプロトコールに従って、DNAを抽出した。ただし、DNAは抽出液50 μ lに溶出した。抽出したDNAサンプルは、開発したプライマーおよびプローブを用いたRealtime PCRに供し、得られたCt値を食品への接種菌数と比較して検

量線を作成し、相関係数を算出した。

2.3 Digital PCRを用いた食品中の*L. monocytogenes*の定量

L. monocytogenes CIP103575 (Scott A) を、市販されている生ハム25 gに、終濃度が 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 cfu/gとなるように接種した。接種後、倍量の生理食塩水を加えてストマッカーで30秒間混和したものを食品乳剤とした。食品乳剤10mlを遠心分離し、得られたペレットから前述したようにDNA抽出を行った。得られたDNAは、Digital PCRに供して菌数を測定し、測定結果を接種菌数と比較した。

3. 結果と考察

はじめに、*L. monocytogenes*に特異的なプライマーを設計し、36株の*L. monocytogenes*購入株と29株の非*L. monocytogenes*菌株を用いてその特異性を確認した。その結果、設計したプライマーは*L. monocytogenes*にのみ特異的に反応することが

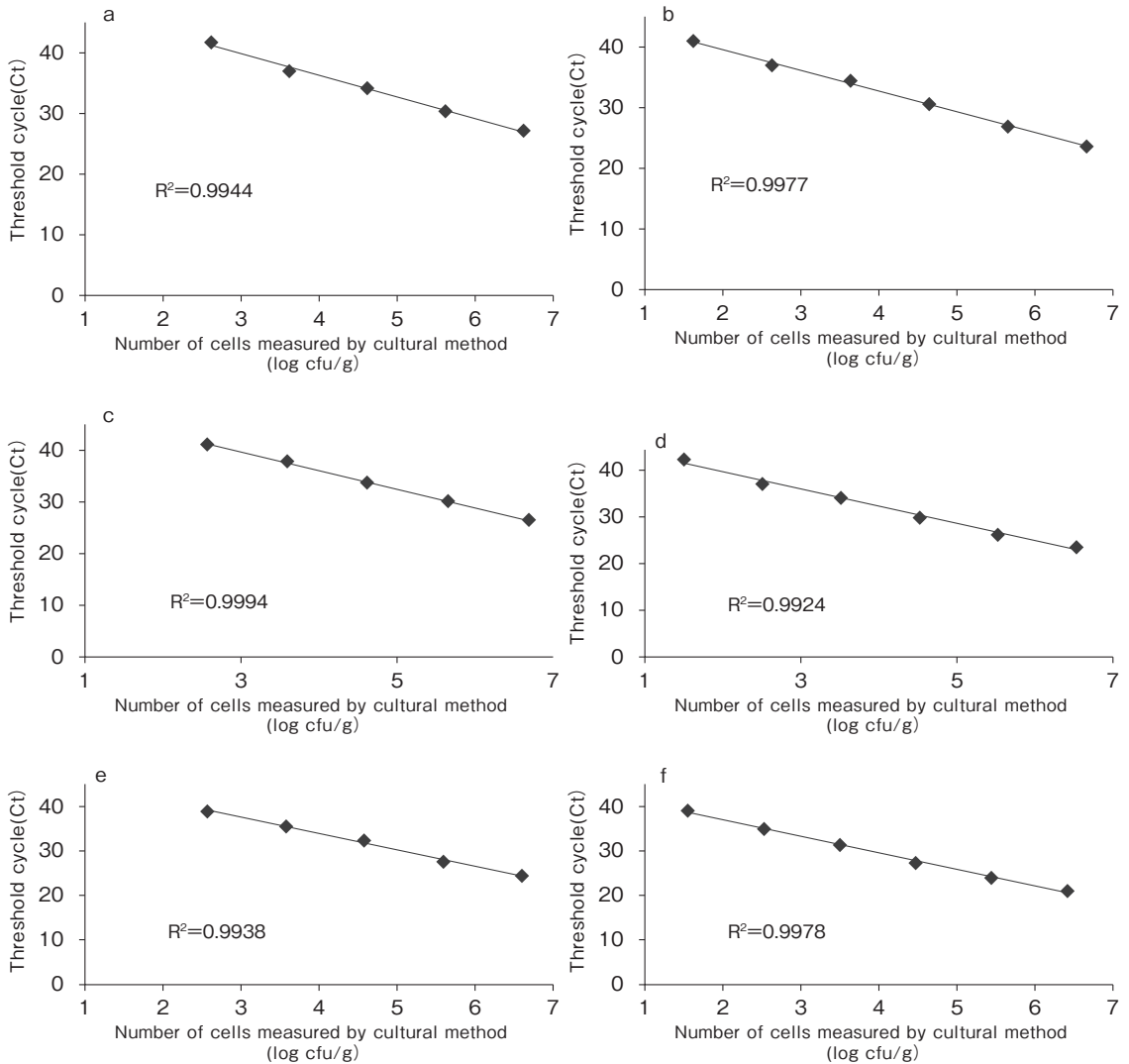


Fig. 2 Evaluation results of the PCR inhibition effect at different dilution factor
 a 10-fold dilution · 1ml harvest, b 10-fold dilution · 10ml harvest,
 c 5-fold dilution · 1ml harvest, d 5-fold dilution · 10ml harvest,
 e 2-fold dilution · 1ml harvest, f 2-fold dilution · 10ml harvest

示された。

設計したプライマーとプローブを用いて、dPCR法によって得られた菌数と培養法によって測定された菌数の相関を確認した (Fig. 1)。dPCRによる測定菌数は培養法によって求められる実際の菌数よりもやや少なくなったが、菌数が $10^1 \sim 10^5$ cfu/mlの範囲での相関係数 (R^2) は0.9999となり、dPCRによる測定菌数と培養法で

求められた菌数に高い相関性があることが確認された。このことから、設計したプライマーおよびプローブによるdPCRは、 $10^1 \sim 10^5$ cfu/mlの範囲で精度の高い定量が可能なが示された。一方、菌数が 10^0 cfu/mlと非常に少ない場合、dPCRによる測定菌数は培養法での測定菌数よりも大きな値となり、正確な定量は行えなかった。

次に、食品中の*L. monocytogenes*の濃縮法を検

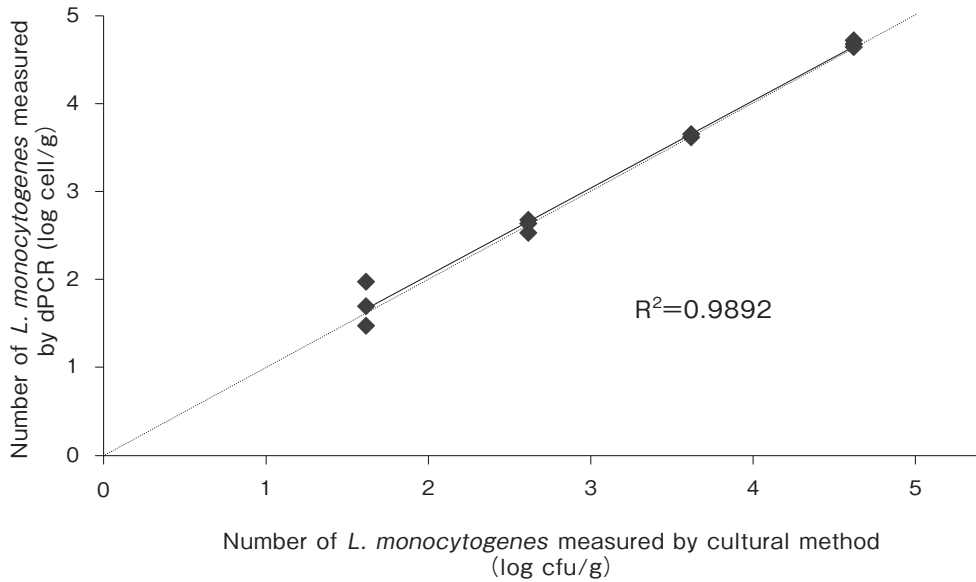


Fig. 3 Relation of the number of *L. monocytogenes* measured by dPCR and cultural method in Ham
The dashed line represents the $y=x$.

討した。2, 5, 10倍に希釈した*L. monocytogenes* 接種食品検体を1 mlもしくは10ml集菌して Realtime PCRに供し, Realtime PCRで得られた Ct値と食品への*L. monocytogenes*の接種菌数から検量線を作成した (Fig. 2)。その結果, 食品乳剤1 mlを集菌した時は, *L. monocytogenes*の接種菌数が $10^2 \sim 10^6$ cfu/gの場合に定量が可能であり, 10^1 cfu/gの場合には定量値が得られなかった。食品乳剤10mlを集菌した場合には, 検出感度が10倍高くなり, 接種菌数が $10^1 \sim 10^6$ cfu/gの範囲で定量が可能であった。各希釈倍率, 集菌量のときの検量線から相関係数を算出したところ (Fig. 2), どの条件においても相関係数の値に大きな差は見られなかったことから, 希釈倍率, 集菌量の違いにおける食品残渣の阻害効果がないことが確認された。これまで, 食品中の*L. monocytogenes*数について検査を行う場合には, 食品を10倍希釈した食品乳剤を用意することが多かった。食品の希釈倍率が高い場合, 希釈倍率が低い場合と比較して, 食品から回収できる菌数が

減少し, 逆に, 食品の希釈倍率が低い場合には, 食品成分の持ち込み量が多くなり, その影響によりPCR効率が低下するなどの懸念事項があった。本実験系においては, 異なる希釈倍率の場合でも, Ct値と食品に接種した*L. monocytogenes*の菌数との相関係数がほぼ変わらなかったことから, 希釈倍率によって, PCRの増幅効率とはほとんど変わらないことが示された。

最後に, *L. monocytogenes*を接種した生ハムを用いて, dPCRによる定量値と, 培養法によって求められた接種菌数を比較した。その結果, dPCRによる定量値は接種菌数に非常に近い値を示し (Fig. 3), $10^1 \sim 10^4$ cfu/gの範囲において測定菌数が相関した。両者の相関係数 (R^2) を求めた結果, 0.9892と求められ, 食品残渣によるPCRの阻害はほとんどないものと判断された。このことから, 開発した濃縮法とdPCRによる*L. monocytogenes*の定量法は食肉加工品において有用な手法であることが確認された。

4. 要 約

本研究では、*L. monocytogenes*に特異的なプライマーを設計し、dPCRを用いた定量法を開発した。本法を、同時に開発した濃縮法と併用することで、食品中に 10^1 cfu/mlレベルで存在する*L. monocytogenes*を高感度に定量することが可能であった。一般的に、食品における*L. monocytogenes*の汚染菌数は少なく、また、国際的な本菌の規制値が100cfu/gであることから、本菌の検査には、検出感度、精度がともに高い定量法が必要である。本法は特に、低い菌数レベルにおいても正確

に菌数を算出することが可能であり、本菌の検査に有効であることが示された。今後、食品会社などへ導入され、自主衛生検査法として普及することが望まれる。

文 献

- 1) 食品安全委員会：リステリア・モノサイトゲネスの検査について、平成26年11月28日付け食安発1128第3号，2014年
- 2) Auvolat, A., Besse, N. G. : *Food Microbiology*, **53**, 135~149, 2016.
- 3) Wolffs, P., Norling, B., Hoorfar, J., Griffiths, M., Rådström, P. : *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 5759~5764, 2005.
- 4) Cao, Y., Raith, M. R., Griffith, J. F. : *Water Research*, **70**, 337~349, 2015.

メタボロミクス解析結果に基づく黒毛和種牛肉の 美味しさに関わる指標の検証

Verification of index related to delicious of Japanese Black Cattle Beef
meat based on metabolomics analytical result

鈴木 啓一¹・加藤 和雄¹・紅 玉¹・鈴木 裕¹・盧 尚建¹・飯田 文子²・小松 智彦³

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

Keiichi Suzuki¹, Kazuo Katoh¹, Hong Yu¹, Yutaka Suzuki¹, Sanggun Roh¹, Fumiko Iida²
and Tomohiko Komatsu³

(¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, ²Japan Women's University,
³Livestock Experiment Station of Yamagata Integrated Agricultural Research Center)

The relations between the panel test item and glutathione concentration were examined using 31 Japanese black cattle beef. Negative significant correlations between “Tenderness of meat” and the total glutathione concentration, GSH concentration were detected. Moreover, the correlation of “Strength of aroma” and the GSSG concentration, GSSGP/GSHP showed a significantly negative. These results suggest GSSG has the effect of decreasing “Strength of aroma”. The partial correlation that considered the measurement days, fattening prefecture and sex as fixed effect, showed negative significant correlation between “Tenderness of meat” and the total glutathione concentration. Moreover, relatively high negative correlations between GSSG concentration or GSSGP/GSHP and the “Strength of aroma” were estimated as -0.526 and -0.508 , respectively. These results suggested that the GSSG lowered the “Strength of aroma”. In contrast, GSHP have positive correlation (0.364 , $p < 0.10$) with “Strength of aroma”, and causing a desirable effect for “Strength of aroma”.

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¹⁾。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た。

申請者らは、これまで35頭の黒毛和種銘柄牛肉を使った官能テストで美味しい牛肉の指標探索のため6つの黒毛和種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「うま味の強さ」に関しては銘柄間の差が認められ、この項目と生肉および焼肉のイノシン酸など核酸関連物質、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²⁾。さらに、「うま味の強さ」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。その結果、統計的有差が得られた化合物が5つ検出され、「うま味の強さ」の低い方が高い方よりもOctanoylcarnitine, Spermidine, Glutathione (GSSG)_divalent, Phosphorylcholine, γ -Glu-Cysの化合物が高く、これらが「うま味の強さ」を下げる効果のある可能性が示唆された³⁾。特にGlutathione (GSSG)_divalentと γ -Glu-CysはGlutathione代謝に係わる物質である。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Glutathione (GSH) と酸化型Glutathione (GSSG) 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⁴⁾。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、コク味機能を有する物質としてGlutathioneが知られている⁵⁾。そこで、本研究では、ランダムに黒毛和種牛肉を購入して官能テストを行い、これまで牛肉の「うま味の強さ」との関連でメタボロミクス解析の結果、検出された酸化型Glutathione (GSSG) と還元型Glutathione (GSH) 含量を調べ、官能テスト項目との関連を検証することを目的とした。

2. 方 法

本研究では、沖縄県石垣島、福島県、宮城県および山形県で肥育された黒毛和種牛肉31頭分を用いた。食肉市場で食肉卸業者により取引された黒毛和種牛肉のリブロースあるいはリブロースに近いサーロイン約1.5kgを合計31頭分、流通業者から購入した。肥育産地は福島県、宮城県、山形県、沖縄県の4県であり、雌が18頭、去勢が13頭である。肉質等級は、3等級から5等級とし、2週間程度の熟成後凍結保存したものとした。入手後、

凍結のまま、約1kgと500gに分割して真空パッキング後1kgを官能テスト用、残りから約100gをGSSG、GSH濃度測定用として凍結保存した。

2.1 官能テスト

原則として3つの牛肉を3点比較法により、あらかじめ訓練された9人のパネルにより銘柄牛肉についてそれぞれ官能テストを行った。官能テスト項目は、「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」、「甘い牛の香」、「悪い牛くささ」、「総合的な香り」、「風味の強さ」、「うま味の強さ」、「総合評価」の11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ことを示す。

2.2 酸化型 Glutathione (GSSG) と還元型 Glutathione (GSH) 濃度の測定

市販の分析キットを使い酸化型Glutathione (GSSH) と還元型Glutathione (GSH) 濃度を測定した。はじめに下記の方法で試料の前処理を行った。凍結牛肉サンプルから約200mgを1.5mlのチューブに採材し、5%の5-スルホサリサリチル酸 (SSA) を1ml加えてホモジナイズした後、8,000×gで10分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、純水にてSSA濃度が0.5~1%になるように希釈したものを測定試料とした。次に、測定キットに付属のSubstrate working solution, Enzyme working solution, Coenzyme working solution, GSH standard solution, GSSG standard solution, Masking solutionをあらかじめ調整し、GSSG/GSHの分別測定を行った。

測定試料は同一のものを2つ (200 μ l × 2) 準備し、GSSH測定用として測定試料200 μ lにMasking solutionを4 μ l加え、攪拌した (Sample A)。総グルタチオン測定用試料200 μ lをSample Bとした。次に、GSSG standard solutionを段階希釈し標準液 (25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0.78, 0 μ M/l) とした。同様にGSH standard solution

Table 1 Means and standard deviation of the traits of glutathione and panel test item

Traits ¹	N	Mean	sd	Minimum	Maximum
Total glutathione $\mu\text{M/l}$	31	8.56	2.23	4.60	13.70
GSSGC $\mu\text{M/l}$	31	0.86	0.42	0.00	1.63
GSSGP %	31	10.66	5.92	0.00	25.53
GSHC $\mu\text{M/l}$	31	7.70	2.21	4.15	12.52
GSHP %	31	89.34	5.91	74.47	100.00
GSSGC/GSHC %	31	12.42	7.79	0.00	34.29
GSSGP/GSHP %	31	1.00	0.53	0.00	2.19
Tenderness (First bite)	31	5.68	0.48	4.56	6.61
Tenderness (Chewing)	31	5.72	0.48	4.50	6.67
Fibrous feeling	31	5.42	0.48	4.38	6.39
Juiciness	31	5.79	0.41	4.38	6.50
Total texture	31	5.63	0.44	4.25	6.61
Sweet scent	31	5.55	0.39	4.44	6.22
Off flavor	31	5.43	0.41	4.44	6.33
Overall flavor	31	5.47	0.40	4.38	6.17
Strength of aroma	31	5.52	0.30	4.81	6.28
Umami intensity	31	5.62	0.36	4.73	6.19
Overall evaluation	31	5.70	0.47	4.25	6.44

¹ Total glutathione : GSSG+GSH, GSSGC : Oxidized glutathione (GSSG) concentration, GSSGP : GSSGC/Total glutathione, GSHC : Reduced glutathione (GSH) concentration, GSHP : GSHC/Total glutathione.

を段階希釈し標準液 (50.0, 25.0, 12.5, 6.25, 3.13, 1.57, 0 $\mu\text{M/l}$) を調整した。405nmのフィルターを使い、マイクロプレートリーダーにより吸光度を測定した。その後、GSSG検量線よりGSSG濃度を、GSH検量線より総グルタチオン濃度を求めた。総グルタチオン (GSH+GSSG) 濃度とGSSG濃度より、下式によりGSH濃度を算出した。

$$\text{GSH濃度} = \text{総グルタチオン濃度} + \{\text{GSSG} \times 2\}$$

なお、測定は1サンプルについて3回繰り返し、全サンプルを三日間に分けて行った。

2.3 統計処理

総Glutathione濃度、酸化型Glutathione (GSSG) 濃度と総Glutathioneに対するGSSGの割合、還元型Glutathione (GSH) 濃度と総Glutathioneに対するGSHの割合、官能テスト11項目について、SASプログラムのproc correlationにより単相関を計算し、次に、測定日、牛肉肥育県、去勢と雌の性を要因とした分散分析をproc GLMを使い行った。そして、測定日、肥育県、性を考慮して形質間の偏相関を計算した。

3. 結果と考察

31頭の牛肉について、総Glutathione濃度、酸化型Glutathione (GSSG) 濃度 (GSSGC) と総Glutathioneに対するGSSGの割合 (GSSGP)、還元型Glutathione (GSH) 濃度 (GSHC) と総Glutathioneに対するGSHの割合 (GSHP)、官能テスト11項目についての平均値と標準偏差、最小値と最大値を**Table 1**に示した。ここでGSSGとGSHの濃度を合計したものが総Glutathione濃度である。また、Glutathioneと官能テスト項目間の単相関係数を**Table 2**に示した。総Glutathione濃度、GSHCが肉のTenderness, Totaltextureと負の有意な相関を示した。また、Overall flavor, Overall evaluationとも負の相関を示した。総Glutathioneの大部分はGSHなので両者の相関は0.982と高く (表には示さず)、総Glutathioneと高い相関を示した感応テスト項目がGSH濃度とも同様の有意な相関を示したことは当然と思われるが、なぜ、GSH濃度が高いと硬い肉と感じるのか

Table 2 Simple correlations between glutathione and panel test items

df = 31	Total glutathione	GSSGC	GSSGP	GSHC	GSHP	GSSGC/GSHC	GSSGP/GSHP
Tenderness (First bite)	-0.376	-0.004	0.227	-0.377	-0.227	0.237	0.032
Tenderness (Chewing)	-0.378	0.084	0.300	-0.396	-0.300	0.307	0.118
Fibrous feeling	-0.187	0.076	0.210	-0.203	-0.210	0.209	0.091
Juiciness	-0.227	-0.006	0.152	-0.227	-0.153	0.164	0.025
Total texture	-0.425	-0.009	0.240	-0.426	-0.240	0.248	0.030
Sweet scent	-0.299	-0.043	0.126	-0.292	-0.126	0.126	-0.021
Off flavor	-0.243	-0.056	0.101	-0.234	-0.101	0.125	-0.015
Overall flavor	-0.332	-0.174	-0.005	-0.301	0.005	-0.001	-0.151
Strength of aroma	-0.227	-0.406	-0.281	-0.151	0.281	-0.280	-0.403
Umami intensity	-0.086	-0.153	-0.149	-0.058	0.149	-0.150	-0.158
Overall evaluation	-0.367	-0.131	0.046	-0.345	-0.046	0.046	-0.111

¹ Total glutathione : GSSG + GSH, GSSGC : Oxidized glutathione (GSSG) concentration, GSSGP : GSSGC/Total glutathione, GSHC : Reduced glutathione (GSH) concentration, GSHP : GSHC/Total glutathione.

Bold character and bold oblique bold character show the statistical significant level at 5 and 10%, respectively.

Table 3 Effect of the measurement day, fattening prefecture and sex on the total glutathione concentration, GSSG, GSH and panel test item

Source	df	Total glutathione	GSSGC	GSSGP	GSHC	GSHP	GSSGC/GSHC	GSSGP/GSHP	Tenderness (First bite)	Tenderness (Chewing)
Day	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Place	3	**	ns	†	**	†	*	ns	*	**
Sex	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Source	df	Fibrous feeling	Juiciness	Total texture	Sweet scent	Off flavor	Overall flavor	Strength of aroma	Umami intensity	Overall evaluation
Day	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
Place	3	†	ns	*	ns	†	ns	ns	ns	*
Sex	1	*	†	*	ns	ns	ns	ns	ns	*

Day : glutathione measurement day, place: fattening prefecture, sex: heifer and castrate.

¹ Total glutathione : GSSG + GSH, GSSGC : Oxidized glutathione (GSSG) concentration, GSSGP : GSSGC/Total glutathione, GSHC : Reduced glutathione (GSH) concentration, GSHP : GSHC/Total glutathione.

は不明である。本研究で調査した牛肉の熟成の厳密な期間は不明のため断定できないが、還元型 Glutathione (GSH) 濃度の高い牛肉の熟成期間が短いと仮定すると妥当な値と考えられる。一方、Strength of aromaと酸化型 Glutathione濃度 (GSSGC), GSSGP/GSHPとの相関がそれぞれ -0.406と -0.403の値を示したことは、酸化型 glutathioneであるGSSGが香りの強さを低減する効果があると考えられる。

Glutathione濃度形質と官能テスト項目について、

測定日、肥育県、性を要因とした分散分析結果を**Table 3**に示した。測定日はGlutathione諸形質、官能テストのすべての形質に対して影響しないが、肥育県はGlutathione濃度、官能テスト項目に有意に影響していた。また、性についても線維感、総合的食感、全体評価に影響することが明らかとなった。そこで、これらの要因を考慮した偏相関を算出し、**Table 4**に示した。その結果、総glutathioneはTenderness, Total textureと負の相関を示し、香りの強さとも負の有意な相関を示

Table 4 Partial correlation considering measurement day, fattening prefecture and sex

df = 24	Total glutathione	GSSGC	GSSGP	GSHC	GSHP	GSSGC/GSHC	GSSGP/GSHP
Tenderness (First bite)	-0.370	-0.322	-0.108	-0.307	0.108	-0.089	-0.293
Tenderness (Chewing)	-0.326	-0.234	-0.038	-0.282	0.038	-0.015	-0.203
Fibrous feeling	-0.152	-0.158	0.003	-0.121	-0.003	0.023	-0.132
Juiciness	-0.329	-0.180	0.013	-0.297	-0.014	0.037	-0.142
Total texture	-0.424	-0.298	-0.061	-0.368	0.060	-0.039	-0.262
Sweet scent	-0.253	-0.167	-0.044	-0.222	0.044	-0.037	-0.150
Off flavor	-0.333	-0.236	-0.031	-0.289	0.031	0.027	-0.169
Overall flavor	-0.365	-0.328	-0.171	-0.301	0.172	-0.157	-0.300
Strength of aroma	-0.397	-0.526	-0.364	-0.287	0.364	-0.352	-0.508
Umami intensity	-0.067	-0.235	-0.252	-0.014	0.252	-0.234	-0.226
Overall evaluation	-0.383	-0.386	-0.252	-0.306	0.252	-0.247	-0.372

¹ Total glutathione : GSSG + GSH, GSSGC : Oxidized glutathione (GSSG) concentration, GSSGP : GSSGC/Total glutathione, GSHC : Reduced glutathione (GSH) concentration, GSHP : GSHC/Total glutathione.

Bold character and bold oblique bold character show the statistical significant level at 5 and 10%, respectively.

した。そして、酸化型GlutathioneであるGSSG濃度、GSSGP/GSHPとStrength of aromaはいずれも-0.526と-0.508の比較的高い相関を示し、酸化型GSSGが香りの強さを低める効果のあることが明らかとなった。対照的にGSHPはStrength of aromaと0.364の正の相関 ($p < 0.10$) を示し、GSHが香りの強さに好ましい効果を及ぼすことが示唆された。

本研究では、これまでの報告からGlutathioneがうま味、塩味、辛味、五味、苦味などの五味の他に味の深みを増す成分として考えていた。しかし、今回の官能テストでUmami intensityとの間の相関はいずれも有意ではなかった。また、還元型Glutathione (GSH) は有意ではないがUmami intensityと正の相関 (0.252) を示し、さらに、Strength of aromaとも正の相関 (0.364, $P < 0.10$) を示したことからGSHの割合が高いことが味や風味に良い効果をもたらすことが示唆された。本研究では、サンプル数が31頭と少ないが、今後サンプル数を増やして官能テストとGlutathione濃度との関連を調査する必要があると考える。

Uedaら (1997)⁵⁾ は、食品中のGSHの風味に及

ぼす影響について検討しGSHは基本味には影響しないが、“こく味”および“牛肉らしさ”を有意に強め、GSHが牛肉の風味を構成する成分の一つであると報告している。さらに、各種食品にGSHを添加した場合の効果を調べたところ、予測通りGSHは畜肉を使用した食品において“こく味”や“畜肉らしさ”を強め、嗜好性を高めたと報告している。ところで、Glutathioneはグルタミン酸 (Glu)、システイン (Cys)、グリシン (Gly) の三つのアミノ酸が結合したペプチドだが、Kurodaら (2015)⁶⁾ は、アミノ酸とペプチドの認知に関する研究の結果、GSHがカルシウム感知受容体 (CaSR) のアゴニストの1つであること、CaSRがこく味物質の認知にかかわることを明らかにし、 γ グルタミルペプチドのCaSR活動とこく味強度の間に正の相関が存在することを報告している。そして、glutathioneのCysをバリン (Val) に変えたグルタミルバリングリシン (γ -Glu-Val-Gly) が強力なこく味ペプチドであり、2014年8月に厚生労働省により食品添加物として認可されている。この「グルタミルバリングリシン」は、「グルタチオン」よりも強くカルシウム受容体と反応し、こく味は「グルタチオン」の約

10倍とされている。

本研究では、GSHの効果は明確ではないが、むしろGSSGが味の強さや香りの強さを低める効果を示唆する結果が得られた。これまで実際の官能テストによる風味や味の深さ（こく味）などと化学的成分との関連の研究報告は少ない。本研究では、サンプル数が31頭と少ないが、今後サンプル数をさらに増やして官能テストとGlutathione濃度との関連を調査する必要があると考える。

4. 要 約

31頭の黒毛和種牛肉を使い、牛肉の「うま味の強さ」と関連することが示唆されたGlutathione形質と官能テストの関連を検討した結果、総Glutathione濃度、GSH濃度が肉の「Tenderness」と負の有意な相関を示した。また、「Strength of aroma」とGSSG濃度、GSSGP/GSHPとの相関が負の有意な値を示し、GSSGの香りの強さを低減する効果が示唆された。測定日、肥育県、性を考慮した偏相関では、総glutathioneがTenderness、Total textureと負の相関を示し、「Strength of aroma」とも負の有意な相関を示した。酸化型GlutathioneであるGSSG濃度、GSSGP/GSHPと「Strength of aroma」はいずれも -0.526 と -0.508

の比較的高い相関を示し、酸化型GSSGが香りの強さを低める効果のあることが明らかとなった。対照的にGSHPは「Strength of aroma」と 0.364 の正の相関 ($p < 0.10$) を示し、GSHが香りの強さに好ましい効果を及ぼすことが示唆された。

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、家畜改良センター、<http://www.nlbc.go.jp/pdf/data/trend26s.pdf>, 2015.
- 2) Suzuki, K., Hioura, H., Yokota, S., Katoh, K., Roh, S., Iida, F., Komatsu, T., Syoji, N., Sakuma, H., Yamada, S. : Search for an index for the taste of Japanese Black cattle beef by panel testing and chemical composition analysis, *Animal Science Journal*, In press, 2016.
- 3) 鈴木啓一, 飯田文子, 小松智彦, 庄司則章, 加藤和雄：メタボロミクス解析による黒毛和種牛肉の美味しさに係わる指標の探索, 平成26年度食肉関する助成研究調査成果報告書, 33, 73~78, 2015.
- 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.
- 5) Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M., Miyajima, R. : Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs, *Biosci. Biotech. Biochem.*, 61, 1977~1980, 1997.
- 6) Kuroda, M., Miyamura, N. : Mechanism of the perception of "kokumi" substances and the sensory characteristics of the "kokumi" peptide, γ -Glu-Val-Gly, *Flavour*, 2015, 4 : 11.

野生動物肉の加工利用のための技術開発 ：加工適性に及ぼす血紋りと塩漬法の効果

Technology for game meat utilization and effects of pre-salting and curing
on meat processing

坂田 亮一・時田 昇臣*・押田 敏雄

(麻布大学獣医学部, *日本獣医生命科学大学動物科学科)

Ryoichi Sakata, Norio Tokita* and Toshio Oshida

(Faculty of Veterinary Medicine, Azabu University, *Department of Animal Science,
Nippon Veterinary and Life Science University)

The effects of pre-salting and curing on meat processing were investigated for deer and wild boar meat samples. Total heme of deer meat was found not to be effected by pre-salting, though anti-oxidative effects were evident by this process. The taste of deer bacon was found to be lessened by pre-salting. Possibly the constituents responsible for taste were removed by washing with water, subsequent to pre-salting. Sausage sample prepared from a mixture of deer and wild boar meat showed enhanced consumption quality according to the assessment of taste judges. Some of the judges, however, considered meat color to be unacceptably dark, especially in the case of game meat. The color of dried meat, jerky to which nitrite had been added was considered satisfactory, though there was no improvement in aroma and taste.

1. 目 的

現在、野生動物による農作物の食害や接触事故などが増加の一途をたどり、農水省の統計では有害鳥獣による農業被害額は近年200億円前後で推移している¹⁾。そのため、個体数の調整を含め、貴重な自然資源であるシカやイノシシをジビエとして有効利用する試みが全国で行われ、地方創生を目指している²⁾。

シカ肉は牛肉や豚肉に比べ高タンパク質かつ低カロリーで高栄養価であり、現代人に不足しているとされる鉄分の含有量も非常に高い。しかし、シカ肉の特性については未だ不明な点も多い。しかも、シカ肉は狩猟後の取り扱いの不備等により

残血による濃い肉色と臭いが問題となりうる。そのため、加工技術の中で血紋りによるシカ肉やイノシシ肉の品質向上のために、それらジビエと言われる肉素材を用いた食肉加工品を作成し、野生動物肉の食肉利用の可能性について、まず検討した。

また、これらの肉は凍結されて流通するものが多いが、ピクル解凍により最終収量が増加するという論文³⁾を参考に最終収量を測定し、この解凍塩漬法の野生動物肉への適応について調べた。

*血紋り：肉を調理加工する前に塩漬剤で処理することで、血液除去を促進し血生臭さを抑える方法

2. 方 法

2.1 シカの肉質および加工適性に及ぼす血絞りの効果

シカ肉（長野県，神奈川県で採取）を血絞りをしたものを血絞りに区，血絞りにしていないものを無処理区とし，血絞りに区には重量比1%のNaClと0.1%の塩漬剤（ニュー硝素，千代田化成）を用い，これらを乾塩漬方式でシカ肉表面に擦り込み，重石をして一晩置いた。それを流水で数分洗い，キッチンタオルで肉表面の水気を除いた後，生肉の状態ですべて全ヘム色素量の測定⁴⁾を行った。また，pH値およびクッキングロス（加熱肉失率：75℃で20分間加熱し，肉重量に対し加熱で生じる肉汁量の割合）を測定した。

次にシカ肉を解凍後，血絞りに区と無処理区で湿塩漬にてベーコンを作成した。方法は7日間塩漬し，55℃で温燻煙後（東京晃線TKG-SG40，スモークチップは渡辺林産工業サクラ100% C-Cを使用），最終的に肉の中心温度が72℃まで加熱した。試作したベーコンの重量を測定後，官能検査を評点法で実施し，最も好ましいものを3，最も好ましくないものを-3とし，7段階で評価した。評価項目は色，香り，味，歯応えの4項目とし，パネルは麻布大学で食品科学を専攻する20~21歳の男女学生21人を対象にした。

また，シカ肉を用いてシカ肉・イノシシ肉（伊豆市より）混合ソーセージを常法で作成し（シカ肉：イノシシ肉の重量比3：1），アンケートにより野生動物肉製品の消費者受容性を調べた。項目は色，香り，味，歯応えおよび総合評価の5項目で行った。また，ソーセージに動物脂でなく植物油を用い，シカ肉の味を損なわないようにした。

2.2 ベーコンの品質に及ぼす凍結-解凍法と血絞りによる影響

-20℃で凍結貯蔵のイノシシおよびシカのモモ

肉150±30gを解凍し，それぞれ血絞り無し乾塩漬（乾塩漬区），血絞りに有る乾塩漬（血絞りに区），湿塩漬（湿塩漬区），およびピクルス解凍区とし，ベーコンを作成した。解凍は塩漬の前日に冷蔵庫（4℃）で一晩行った。血絞りと塩漬の後に流水で塩抜きを5分間行った後，燻煙加熱処理を行い，作成した試料に関してクッキングロス，最終収量，pH，色調（L*，a*，b*値），発色率⁴⁾および残存亜硝酸塩量⁵⁾を測定した。

2.3 シカ肉の脂質酸化に及ぼす血絞りの効果

神奈川県丹沢湖周辺で捕獲されたシカ肉（モモ部分）を用い，血絞りをしたものを血絞りに区，血絞りにしていないものを無処理区とし，それぞれで冷蔵（0℃）または凍結（-20℃）保存を行った。

シカ肉試料の冷蔵は0，15，30日，凍結では0，15，3，45ヶ月の各保存期間において，脂質酸化の指標としてTBARS値（試料kg当たりのマロンジアルデヒドmg）を水蒸気蒸留法⁶⁾で測定した。また血絞りをしたシカ肉でベーコンを作成した。方法は上記2.1の湿塩漬法で行い，出来上がった製品を-20℃で凍結保存した。

2.4 シカ肉ジャーキーにおける発色剤の効果

神奈川県秦野市ヤビツ峠周辺で捕獲されたシカのモモ肉を冷蔵庫（2℃）で7日間熟成させたものを解体し，残血を取り除くため食塩を加えた水で浸透圧を利用しながら15分~20分間洗い，さらに水洗いをした。その後，シカ肉発色剤無添加区と発色剤添加区（NaNO₂を100ppm添加）のジャーキーを調製し，官能検査を行った。官能検査の方法には評点法を用い，色調，香り，味，食感の4項目について5段階評価で最も好ましいものを5，最も好ましくないものを1とした。パネルは食品科学を専攻する20~22歳の麻布大学男女学生19人を対象とした。

ジャーキーの製造では，シカ肉を漬け込み液（赤ワインと醤油ベース，食塩2%）に24時間浸

漬し、その後流水で10分間洗浄した。次に燻煙機内に敷いた網の上に置き、乾燥（庫内温度20℃、50分）、燻煙（庫内温度20℃、180分、室内温度40℃、90分）、加熱（庫内温度80℃、蒸煮無し）の順に工程を実施し、シカ肉の中心温度が70℃に達した後、30分以上保持した。さらに燻煙室内で風乾（室温16.3℃、湿度50.7%、24時間）した後、真空包装し冷蔵条件（10℃以下）で保存した。

3. 結果と考察

3.1 シカの肉質と加工適性に及ぼす血絞りの効果

全ヘム色素抽出後の吸光度（A_{383nm}）を血絞り区と無処理区を比較した場合、血絞り区が1.975、無処理区が1.905の値を示し、血絞りによる影響は確認できなかった。加工特性においてクッキングロス、pH値は血絞り区が5.68、無処理区が5.65を示し、シカ肉の加工特性における血絞りの影響は特に認められなかった。

シカ肉ベーコンの官能検査（Table 1）で、色は血絞り区が1.00、無処理区が0.65、香りは血絞り区が0.70、無処理区が0.85でそれぞれの項目で血絞りによる影響は確認できなかった。味は血絞り区が0.35、無処理区が1.45で無処理区の方が有意に高い値を示し、血絞りにより味が低下する傾向が見られた。また、ベーコンの最終収量は両方とも約90%であった。

本来、血絞りは肉の品質向上に使われる技術⁷⁾であり、このような結果が出た原因として今回使用したシカ肉の放血状態が良かったことが考えられる。おそらく今回の狩猟者のスキルが優れていて、シカの心臓を射抜いたと想像される。その場合、血絞りで残血を取り除く必要性はなく、その水洗工程でうまみ成分が流出したと考えられる。菌応えは血絞り区が0.60、無処理区が1.00で血絞

Table 1 Results of sensory evaluation for deer meat bacon

Item	Control	Pre-salting
Color	0.65	1.00
Aroma	0.85	0.70
Taste	1.45 ^{a*}	0.35 ^b
Texture	1.00	0.60

*Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

Table 2 Results of sensory evaluation for sausage prepared from a mixture of deer and wild boar meat

Item	Desirable	Undesirable
Color	18	9
Aroma	26	1
Taste	27	0
Texture	24	3
Overall desirability	27	0

りによる影響は確認できなかった。

シカ肉・イノシシ肉混合ソーセージのアンケート（Table 2）で色に対して好ましいが18人、好ましくないが9人で、3人に1人は赤い色を好まない傾向が見られた。香りは好ましいが26人、好ましくないが1人、味は好ましいが27人、好ましくないが0人、菌応えは好ましいが24人、好ましくないが3人で、それぞれの項目でこのソーセージに対して高い消費者受容性が確認できた。総合評価でも好ましいが27人、好ましくないが0人で高い消費者受容性であった。

3.2 ベーコンの品質に及ぼす凍結-解凍法と血絞りの影響

最終収量はイノシシ肉ではピクル解凍区が最も高く、次いで湿塩漬区、血絞り区、乾塩漬区となったのに対し、シカ肉では最も高かったのは湿塩漬区で、次いでピクル解凍区、乾塩漬区、血絞り区となった。乾塩漬は塩漬によってほとんど重量に変化は見られないが、湿塩漬は塩漬期間中に重量が増している。塩漬期間に重量が増えるほど、クッキングロスも大きくなるという傾向が見られた。

発色率はイノシシとシカの両方に共通して、乾塩漬では血絞り無しの乾塩漬区の発色率が血絞り有りよりもやや高くなった。湿塩漬では、イノシシはピクル解凍区が高いのに対し、シカでは湿塩漬区が高くなる結果が出た (Fig. 1 と Fig. 2)。

残存亜硝酸塩量は、イノシシでは血絞り区が血絞り無しの乾塩漬区よりやや低い値を示したが、シカではその逆の傾向を示し、血絞りが残存亜硝酸塩 (NO_2^-) 量に影響を与えるとは言えなかった。一方、湿塩漬ではイノシシとシカに共通して、ピクル解凍区が湿塩漬区よりも低い NO_2^- 値を示した。

血絞りによって発色率は下がり、TBARS値は上がった (図表省略)。血絞りには発色剤を用いるが、血絞り後に水洗によって塩抜きも行うため、これが発色率を下げる要因になった可能性が

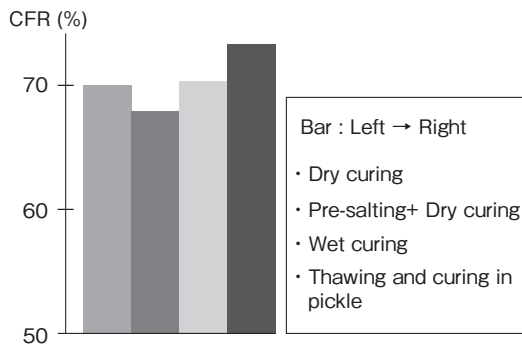


Fig. 1 Color forming ratio (CFR) of wild boar meat bacon

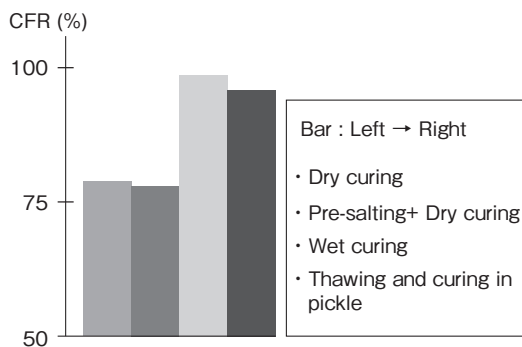


Fig. 2 Color forming ratio (CFR) of deer meat bacon

Table 3 Results of sensory evaluation for deer meat jerky

Item	Control	Nitrite addition
Color	2.68 ^{a*}	3.74 ^b
Aroma	3.37	3.26
Taste	3.79	3.72
Texture	3.53 ^b	2.68 ^a

*Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$).

ある。またピクル解凍により残存亜硝酸塩量が対照の湿塩漬区と比較して大幅に低下した。ピクル解凍によって最終収量はイノシシでは増加したが、シカでは低下した。参考にした論文³⁾では豚ロースでの実験だったため、豚に近いイノシシでは同様の結果が得られたが、シカでは異なる結果が出た可能性が考えられる。今回、血絞りやピクル解凍の影響はイノシシとシカで異なる結果となったが、対象とした肉試料数が限られたため、これらの項目を再度調べる必要がある。

3.3 シカ肉の脂質酸化に及ぼす血絞りの効果

TBARS値は、生肉冷蔵区で無処理区が0日目に0.211から保存30日目で0.222、血絞り区は0日目に0.096から30日目に0.152になったが、無処理区と比べ血絞り区で有意に低い値となった ($P < 0.05$)。生肉凍結区では無処理区が0日で0.211から保存4.5ヵ月で0.297に、血絞り区は0日で0.096から4.5ヵ月で0.112となった。

またベーコン凍結区では、無処理区と血絞り区間に有意な差は見られなかったが、これは塩漬によって血絞りと同様の効果をもたらされたと考えられる。生肉と製品を比較すると、製品の方が有意に低い結果が得られた ($P < 0.05$) ため、塩漬を行う方が血絞りを行う以上に脂質の酸化が抑えられる結果が本実験で示された。

3.4 シカ肉ジャーキーにおける発色剤の効果

シカ肉ジャーキーの官能評価から (Table 3)、色調において発色剤無添加区より発色剤添加区の方が有意に高く、食感において発色剤無添加区よ

り発色剤添加区で有意に低い結果となった ($P < 0.05$)。ジャーキーでは食塩を添加することに加えて乾燥をよく行うので、保存に関して発色剤の添加が必須でないと考えられるが、色調に関しては発色剤を添加した方が好ましい結果が得られた。一方で香りや味に有意差が認められず、食感では無添加区の評価が高かったことから、官能的特性として発色剤を添加する利点は一般の食肉製品より低いと思われる。

4. 要 約

シカ肉の全ヘム色素量において血紋りによる影響は認められなかったが、脂質酸化に対し血紋り自体は有効であった。シカ肉ベーコンの嗜好性で、血紋りによって味にマイナスの影響があった。その理由として血紋りの工程で塩漬剤を水で洗い流す際に、うまみ成分まで流れてしまったことが考えられる。一方で、シカ肉・イノシシ肉混合ソーセージは高い消費者受容性を示し、味や香りに関してはほとんどのパネルが好ましいと評価した。色に関して好ましくないという意見があり、シカ肉およびイノシシ肉の特有の濃い肉色が消費者に好まれない印象を与えることも今回のア

ンケートで示された。

官能評価の結果として、発色剤添加ジャーキーの軟らかさは評価されなかったものの、色調において良い評価が得られ、好ましい食感と感じるパネルが多いことが分かった。

文 献

- 1) 農林水産省：鳥獣被害の現状と対策，http://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/pdf/h2803_meguji_zentai2.pdf, 2016.
- 2) 押田敏雄，坂田亮一：「第2回ジビエサミット」に参加して伝統食から外食産業へ—有害捕獲から地域・産業資源としての捕獲への転換—，畜産の研究，70, 311～320, 2016.
- 3) 宮原昭義，赤尾まこと，桜井英敏，金山喜一，村上直哉：塩漬解凍法によるロースハムの品質と歩留まり，日本食品科学工学会誌，58(2), 62～66, 2011.
- 4) 坂田亮一：食肉・食肉製品の分析技術／第2章食肉・食肉製品の品質評価法／色調およびヘム色素，食肉の科学，40, 221～224, 1999.
- 5) Mirna, A., Schütz, G.: Verfahren zur gleichzeitigen Bestimmung des Pokelfarbstoffes sowie von Nitrit und Nitrat in Fleischherzeugnissen, *Fleischwirtsch.*, 52, 1337～1338, 1972.
- 6) 山内 清，安藤則秀：亜硝酸塩が存在する場合の肉のTBA number測定，日本畜産学会報，44, 155～158, 1973.
- 7) 坂田亮一，押田敏雄：最近の食肉加工技術について：野生動物肉の研究例など，畜産技術，5月号，34～39, 2016.

ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明 (その2)

Studies on clarification of the compounds involved in “*koku* attributes” of
pork sausages (Part 2)

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), mouthfulness and lingering (continuity) in terms of taste, aroma, and texture of foods. In the previous research, the sensory characteristics in taste, aroma and texture of pork sausage were clarified by sensory evaluation. Umami compounds were also shown to play an important role in “*koku* attribute” of pork sausage. So, this research was carried on to clarify the role of umami compounds in the sensation of “*koku* attributes” and the aroma compounds contributing to the characteristic aroma in pork sausages.

First, the sensation contributing to “*koku* attributes” of pork sausages containing the different amount of umami compounds was examined by sensory evaluation. Sensory analyses showed that umami compounds enhanced the strength of retronasal aroma sensation, richness of flavor, lingering of taste as well as the strength of umami. This result indicated that umami compounds seemed to be the enhancer of “*koku* attribute” in pork sausages as well as model chicken soup.

Next, the aroma compounds contributing to the characteristic aroma of pork sausages were examined by GC/MS and GC-O. GC-O and GC/MS analyses have shown that the characteristic aroma compounds of pork sausages in this research were identified to be caryophyllene, 2-methoxy phenol, cresol, methyl eugenol and 2,6-diethoxy phenol.

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¹⁾。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、Mottram²⁾やRamarathnamら³⁾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⁴⁾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口中香を増強させる働きがあることを解明した⁵⁾。また、食べ物のコクを定義するため、以下のような概念を提案している。すなわち、食べ物のコクは、味、香り、食感に関する多くの刺激で複雑さが感じられ、それらが広がり、持続することによりもたらされる感覚であると提案している。

昨年の助成による研究では、ポークソーセージの官能的特徴とコクに寄与する成分の解明を試み、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付ける用語としてあげられた。また、コク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、これら香気成分がコクの発現において、少なからず影響していると推察された。さらに、上位ランクのソーセージには、うま味物質が十分に含まれており、この風味増強作用がコク付与の1つの要因であると推察された。

本申請課題では、昨年の成果を受けて、ポークソーセージのコクに寄与する成分と考えられる「うま味物質」が、ソーセージの風味に及ぼす影響を調べた。また、ポークソーセージの特徴をもたらず香りに寄与する香気成分の同定を、GC/O並びにGC/MSで行った。

2. 方法

2.1 供試材料

うま味物質添加量の異なる4種類のソーセージ（通常濃度（対照）、1/2 MSG濃度、1/10 MSG濃度、無添加）を調製した。冷凍保存したものを、冷蔵庫（0℃）で一晩保存して解凍し、官能評価用試料の調製に用いた。

2.2 官能評価用の試料の調製方法

ステンレス製鍋（24 cm φ × 12 cm）に水を張り、さらに350 mlの水を入れた500 ml容のビーカーを4つ入れ加温した。沸騰したところで、各ビーカーにソーセージを5本ずつ投入し、80℃で3分間加熱した。この際、中心温度は50℃付近であることを確認した。加熱が終了したソーセージは、アルミホイルで包装し、官能評価用の検体として提供した。なお、口渇ぎ用の水は、ソーセージの脂並びに香辛料を口中から速やかに取り

除くため、約60℃に温めたものを保温容器（ステンレス製マグボトル）に入れて提供した。

2.3 官能評価

パネリストには、基本五味の識別、ならびに各味の濃度識別ができ、2カ月以上の訓練を行った者を選定した⁶⁾。パネリスト1名あたり、対照を2本と、うま味濃度の異なるソーセージ3種類を各種類1本ずつの、計5本を提供した。

評価方法は評点法を用い、各評価項目に対して、対照を基準としたときの各検体の強さを、点数で評価した。評価の点数は、-3（非常に弱い）から+3（非常に強い）の範囲内で選択してもらった（別紙）。

官能評価結果の検定には、*t*検定を用いた。

2.4 コク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）

ブレンダーで細切した5gのソーセージに対し、20mlの冷たい蒸留水を添加後、10000rpm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。

IMPの分析には、Asahipac-GS320 column（サイズ排除カラム、昭和電工）を用い、10mMリン酸ナトリウム溶液（pH 5.8）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。

2.5 ポークソーセージの香気成分分析

a：エーテル抽出ならびにSAFE蒸留による香気成分の捕集

細切した5gのソーセージに20mlのジエチルエーテルを添加し、2℃で一晩保存して、香気成分を抽出した。また、エーテル抽出した試料をSAFE蒸留し、香気成分の濃縮試料を調製した。

b：ポークソーセージの特徴的な風味に寄与の

大きい香気成分の特定

aで調製した試料をGC-Oに供し、臭い嗅ぎを実施して、ソーセージの香りに寄与の大きい成分を特定した。分析は、GC（GC-2014, (株)島津製作所）で、CP-wax 52 CB（30 m x 0.25 mm i.d., 0.25 μm film thickness）（ジーエルサイエンス（株））カラムを用いた。分析条件は、40℃（5 min）→（10℃/min）→240℃（10 min）の昇温プログラムを用いた。検出器にはFID（260℃）を使用した。臭い嗅ぎ装置は、Sniffer 9000 System（アルファ・モス・ジャパン（株））を用いた。ソーセージの香りに寄与の大きい成分の特定には、AEDA（Aroma extract dilution analysis）を用い、ジエチルエーテルで抽出した香気成分試料を、段階的に希釈したものを臭い嗅ぎに供した。最大希釈2048倍で検出できた香気成分を最も寄与度の大きい香気成分とした。

c：GC/MSによる香気成分の同定

aで調製した試料をGC/MS（Agilent7890A GC-System, Agilent 7693 Auto-sampler, Agilent Technologies 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector）に供し、香気成分を同定した。分析条件は、GC-Oの場合と同じで、検出器にはMSを使用した。

3. 実験結果と考察

3.1 うま味物質含量の違いが、ソーセージの風味に及ぼす影響

1：試作ソーセージ中のうま味物質含量

肉製品を製造する際に、調味料としてグルタミン酸ナトリウムやイノシン酸ナトリウムを添加することはよく知られている。最近、うま味物質は、食べ物の口中香を増強し、味わい全体を強めていることが明らかとなった。そこで、ポークソーセージの味わい、特に風味の感じ方に関して、うま味物質がどのような影響を与えているかを調べ

<別紙>

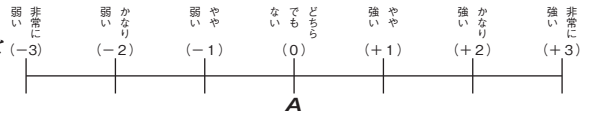
ソーセージ官能評価

名前 _____

(1) ソーセージを10回以上咀嚼し、項目①から順に評価して下さい。

下記のスケールを参考にAを基準の0点として

B, C, Dを(-3, -2, -1, 0, +1, +2, +3)の中で点数を付けて下さい。口渇ぎを必ず行ってください。



<記入例>		(-3)	(-2)	(-1)	(0)	(+1)	(+2)	(+3)
		B	D			C		
①	香りの強さ							
②	香りの広がり							
③	うま味							
④	<u>味わいの複雑さ</u>							
⑤	<u>風味の広がり</u>							
⑥	<u>味の持続</u>							
⑦	<u>香りの持続</u>							

た。

うま味物質であるグルタミン酸の含有量を、市販の半分（1/2添加品）、10分の1（1/10添加品）ならびに、無添加（無添加品）とした製品を試作

し、市販品を対照として評価した。

それぞれの製品のうま味物質の測定値を、Table 1に示した。グルタミン酸は、無添加品にも若干含まれていた。熟成した豚肉には、約1

Table 1 市販品ならびに、うま味物質含量の異なる試作品のうま味物質含量

	グルタミン酸含量		イノシン酸含量	
	%	mM	%	mM
対照 (市販品)	0.288	19.6	0.120	3.5
うま味物質 1/2添加品	0.145	9.8	0.096	2.8
うま味物質 1/10添加品	0.032	2.2	0.085	2.4
うま味物質 無添加品	0.011	0.8	0.071	2.0

mMのグルタミン酸が含まれていると報告されていることから、これは、原料となる豚肉由来のものであると推察された。また、市販品ならびに、各添加品には、19.6 mM (0.288%)、9.8 mM (0.145%) ならびに、2.2 mM (0.032%) のグルタミン酸が含まれていることが明らかとなった。一方、イノシン酸は、肉由来のものに若干の添加物由来のものがあると推定された。

グルタミン酸ナトリウムの閾値は0.03%であり、これにイノシン酸ナトリウムが共存すると、うま味の相乗効果により、閾値が数倍以上に低下し、うま味をより強く感じられるようになると報告されている⁷⁾。このことから、いずれの製品もうま味物質による風味の増強効果は認められていると推定された。

2：うま味物質含量の異なるソーセージの食味性の違い

うま味物質含量の異なる4種類の試作品の食味性の違いを調べた。官能評価項目に関しては、昨年度の本事業において、市販ソーセージの食味性を調べた結果に基づいて、コクに関連する「香りの強さ」、「香りの広がり」、「香りの持続性」、「うま味強度」、「風味の複雑さ」、「風味の広がり」、ならびに、「味の持続性」の7項目とした。官能評価は、市販品の点数を基準として、評価した。

官能評価の結果をFig. 1に示した。Fig. 1では、市販品の評価を1点とし、1/2添加品、1/10添加品ならびに、無添加品の評価点数をプロットした。

うま味物質は、すべての評価項目に影響を与えることが明らかとなった。これらの中で、特に「香りの強さ」、「風味の複雑さ」、ならびに「味の持続性」で有意な差異が認められ、うま味物質含量が多くなると、ソーセージの口中香が強く感じられると同時に、風味の複雑さを感じ、味の持続性が強くなることが判明した。うま味物質の添加が、口中香を高める効果に関して、モデルチキンスープでの報告⁵⁾はあるが、肉製品での報告は初めてである。また、「風味の複雑さ」や「味の持続性」は、コクの要因であることから、ポークソーセージにおいて、うま味物質がコク付与物質であると推察された。

3.2 ポークソーセージの特徴的な風味に寄与の大きい香気成分の特定

コクの形成には香りは不可欠な要因であることはよく知られている。特に、香りはコクの形成において、ベースの部分になると考えられる。そこで、ポークソーセージの特徴的な風味に寄与する香気成分を特定することとした。

1：異なる香気抽出方法で得られた香気成分の比較

香気成分の抽出方法として、エーテル抽出方法を用いた。さらに、この抽出物をSAFE蒸留し、より濃縮された香気分析試料を調製し、GC/MSで香気成分を分析し、結果をFig. 2に示した。

Fig. 2の上段図が、エーテル抽出したもの、下段図がSAFE蒸留したものをGC/MSで分析した

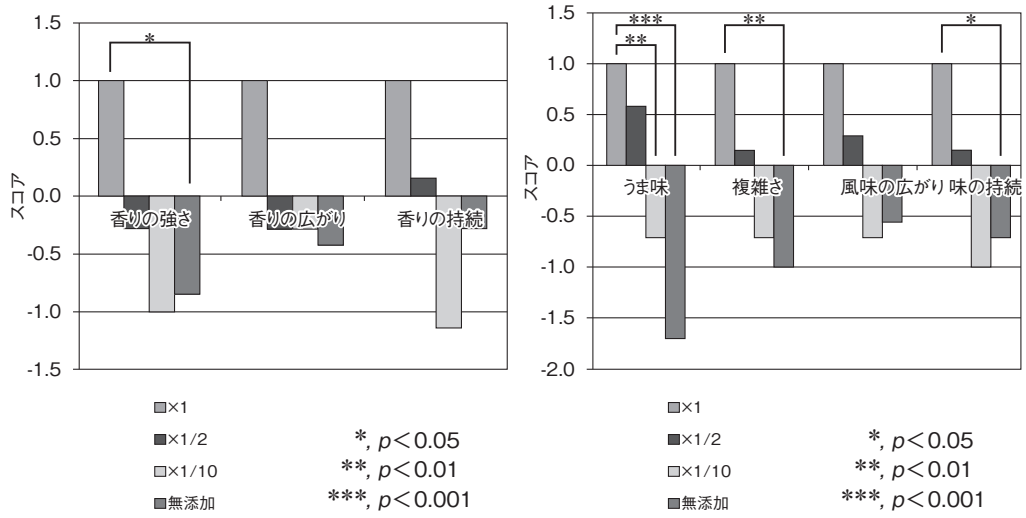


Fig. 1 Effect of umami compounds on the flavor of pork sausages

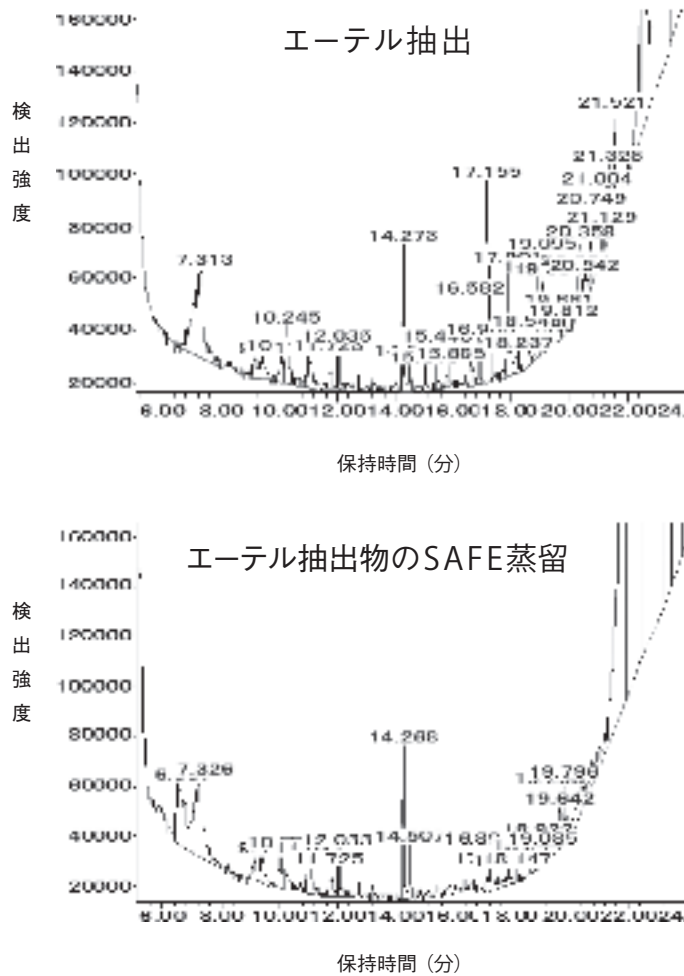


Fig. 2 Comparison of aroma compounds in the ether extract and the SAFE distillation of ether extract

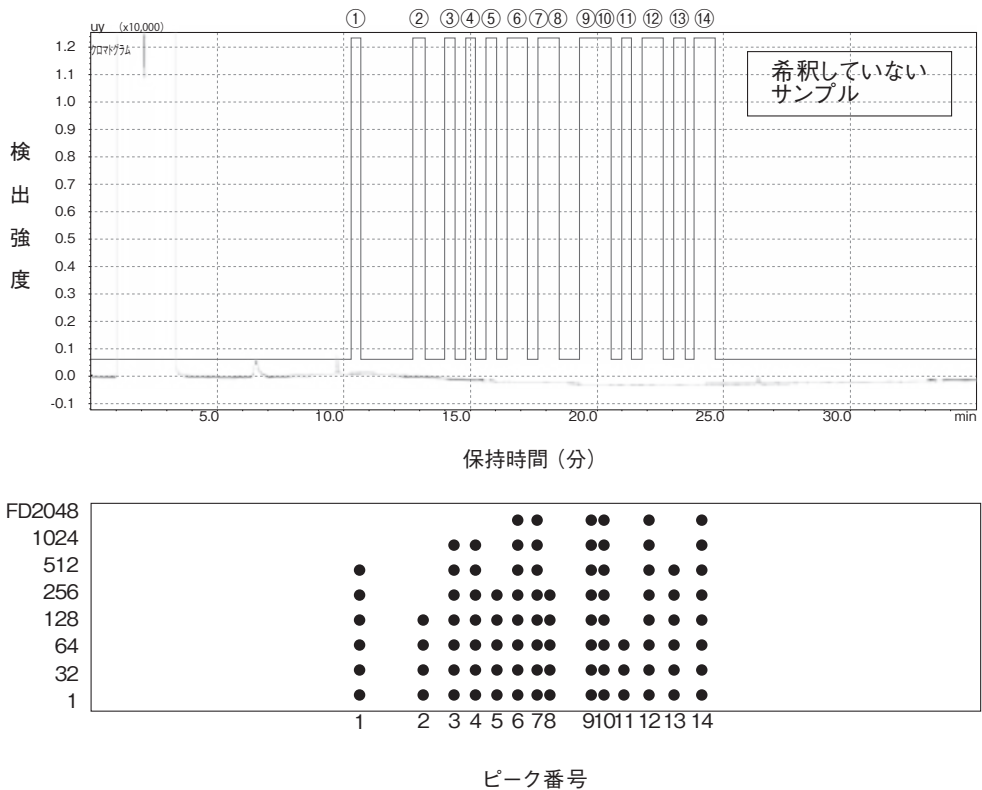


Fig. 3 GC-O chromatogram (top), and aromagram of pork sausages by AEDA method (bottom) (The peak numbers (①~⑭) in top indicate the position in which aroma was detected.)

クロマトグラムである。クロマトグラムの15分までの低沸点香気成分の検出量は、両者において大きな違いは認められなかったが、SAFE蒸留した試料のクロマトグラムでは、高沸点の香気成分があまり検出されることが明らかとなった。また、エーテル抽出物とSAFE蒸留試料の香りを比較した結果、エーテル抽出物からは、強いポークソーセージの香りが感じられたが、SAFE蒸留試料からは、その香りが弱かった。この理由に関しては、今後検討する必要がある。

2：特徴的な風味に寄与の大きい香気成分の特定と同定

そこで、エーテル抽出試料を用いて、GC-O装置を用いて、GCで検出された香気成分の臭い嗅ぎを行い、ポークソーセージの特徴的な風味に寄

与の大きい香気成分の特定を試みた。

エーテル抽出した試料を段階的に希釈し、GC-Oを実施し、寄与度の大きい香気成分を特定するAEDA法を実施した。Fig. 3に示すように、希釈していないサンプルでは、14か所で臭いが検出された。(Fig. 3上段) さらに、段階希釈を行い、2048倍希釈サンプルでは⑥、⑦、⑨、⑩、⑫、⑭の6か所まで絞り込むことができた (Fig. 3下段)。

したがって、これら6成分が、本研究で用いた市販ポークソーセージの香りの特徴に大きく寄与している成分であると特定された。

GC-Oで検知されたこれら香気成分の特徴は、⑥が「キノコ、草、カメムシ」、⑦が「キャラメル、焦げ、スモーク」、⑨が「脂、片栗粉、プラスチック」

Table 2 ポークソーセージからエーテルで抽出された香気成分質と候補物質

番号	香りの質（記述）	候補物質
①	キノコ, 酸っぱい, ワックス	D-limonene
②	ワックス, プラスチック, 粉	該当なし
③	酸っぱい, 青臭い	acetic acid
④	酸っぱい, チーズ	butanoic acid
⑤	湿っぽい, 足の裏	propanoic acid
⑥	キノコ, 草, カメムシ	該当なし
⑦	カラメル, 薬, 焦げ, 樟脳, スモーク	caryophyllene
⑧	カラメル, 木, 土, 野菜, 小豆	該当なし
⑨	脂, 片栗粉, プラスチック	2-methoxy phenol
⑩	醤油, 柑橘, 脂, スモーク	cresol
⑪	スモーク	該当なし
⑫	焦げ, カラメル, 醤油, ハーブ	methyl eugenol
⑬	薬, スモーク, 脂	eugenol
⑭	スモーク, 煙	2,6-dimethoxy phenol

ク], ⑩が「醤油, 脂, スモーク」, ⑫が「焦げ, カラメル, 醤油, ハーブ」, ⑭が「スモーク, 煙」を連想させることが明らかとなった。これらは、燻煙したポークソーセージに特徴的な香りに寄与していると推定された (Table 2)。

次に、エーテル抽出物のGC-Oで検出された14成分の物質同定をするため、GC/MSに供した。その結果、Table 2に示すように、⑦がcaryophyllene、⑨が2-methoxy phenol、⑩がcresol、⑫がmethyl eugenol、⑭が2,6-dimethoxy phenolであると推定された。

このように、複数の香気成分がポークソーセージの特徴的な香気に寄与する成分として同定できたので、今後は、これらの標品を用いて再構成し、ポークソーセージの香りを再現できるか否かを調べる計画である。

4. 要 約

本課題では、昨年の本事業での成果を受けて、ポークソーセージのコク付与に寄与する成分と考えられるうま味物質が、ソーセージの風味に及ぼ

す影響を調べた。また、ポークソーセージの特徴をもたらす香りに寄与する香気成分の同定をGC/Oならびに、GC/MSで行った。

その結果、うま味物質は、ポークソーセージの口中香を強く感じさせると同時に、風味の複雑さや味の持続性を強く感じさせることが判明した。この効果は、コクの要因であることから、ポークソーセージにおいて、うま味物質はコク付与物質であると推察された。また、ポークソーセージからエーテルで抽出した香気成分をGC-OとGC/MSで解析した結果、caryophyllene (クローブ精油)、2-methoxy phenol (脂, 片栗粉, プラスチック)、cresol (醤油, 脂, スモーク)、methyl eugenol (焦げ, カラメル, 醤油, ハーブ)、ならびに2,6-dimethoxy phenol (スモーク, 煙)が特徴的な臭いに寄与する候補成分として特定ならびに、同定された。

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) Nishimura, T., Goto, S., Miura, K., Takakura, Y., Egusa, S. A., Wakabayashi, H. : Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups, *Food Chemistry*, **196**, 577~583, 2016.
- 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.
- 7) Yamaguchi, S. : Synergistic taste effect of monosodium glutamate and disodium 5'-inosinate, *J. Food Sci.*, **32**, 473~478, 1967.

畜産物由来ペプチドの肝障害改善の効果について

Effect of dietary animal peptides on hepatic injury

實 安 隆 興

(神戸大学大学院農学研究科)

Takaoki Saneyasu

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

Not only edible meat products but also by-products are valuable sources of essential nutrients such as protein, minerals, and vitamins. For example, liver contains an abundance of protein and vitamins. Nevertheless, there is little attention to the biological functions of these products, and consequently they have been wasted. In the present study, we investigated the effects of peptides from pig liver (liver peptide) on mouse liver after carbon tetrachloride-induced injury. Dietary liver peptide does not significantly affect the body weight, tissue weight, and plasma component (concentrations of glucose, triglyceride, and non-esterified fatty acids; activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase) in mice. In contrast, the mRNA levels of collagen $\alpha 1$ (V) and $\alpha 1$ (I) chain were decreased by dietary liver peptide ($P < 0.05$, $P = 0.07$, respectively). It is therefore likely that dietary liver peptide inhibits collagen production in mouse liver without inducing side effects.

1. 目 的

世界人口の恒常的な増加や農産物生産量の低下、さらには穀物のバイオエタノール生産への利用など、世界の食糧事情は今後もさらに厳しくなることが予想される。ここで、我が国は、家畜の飼料原料のほとんどを輸入に依存していることから、畜産物は可能な限り無駄なく利用するべきであるが、食用に適さない内臓や血液等などの畜産副生物は、その高い栄養価にもかかわらず廃棄されている。このことは、食物の有効利用の面に加え、環境および廃棄コストの面からも解決するべき課題となっているが、未だ、十分な成果はあがっていない。

レバーは、タンパク質とビタミンを豊富に含む食材であるが、嗜好性が悪く、ヒトの食材としては十分に活用されていない。しかしながら、古くから、肝臓ペプチドを主成分とする肝水解物は肝疾患用の薬として用いられており、最近では、健康ドリンク用の食品素材としても利用されつつある。しかしながら、意外にもその肝機能改善作用機構の詳細は明らかにされていない。それゆえ、肝臓ペプチドの肝機能改善機構の詳細を明らかにすることができれば、機能性食品素材としての需要をさらに増加させることにより、廃棄食材の量の減少に寄与できると判断される。

肝疾患に関しては、近年、ウイルス性肝障害のインターフェロン治療や抗ウイルス剤による治療

法が確立されたが、食生活の乱れが原因となるアルコール性肝障害、および非アルコール性肝障害は未だ解決すべき課題となっている。しかしながら、これらの肝障害の治療はもっぱら食生活の改善を主体とするものであり、本人の強い意志による生活習慣の改善がほとんど唯一の根本的治療法となるが、患者への動機づけは容易ではない。したがって、畜産ペプチドの肝機能改善効果が明らかにできれば、それを用いて生活習慣を大きく変える必要のない、患者のQOLを考えた新規の肝障害の改善策を提案できる可能性があると考えられる。

本研究では、畜産物の有効利用のための一環として、畜産物由来ペプチドの新規機能性開発を目的として、豚肝臓ペプチドの給与がマウスにおける四塩化炭素誘発性の肝障害に及ぼす影響について調べた。

2. 方 法

カゼインをタンパク質源とする対照試料、あるいはタンパク質換算で対照飼料中のカゼインの1/3量を豚肝臓ペプチドに置換した試験飼料 (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週間給与した後、25mg/kg体重の四塩化炭素を腹腔内に投与した¹⁾。24時間後に体重を測定し、麻酔下で腹部大静脈より採血後、安楽死させ、肝臓、腓腹筋、精巣上体周囲脂

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。血中アラニアミノトランスフェラーゼ (ALT) 活性は市販キット (BioVision, Inc., CA) を用いて測定した。また、肝臓からセパゾール RNA I (ナカライテスク株式会社) を用いて総RNAを抽出し、コラーゲンの遺伝子発現量をABI 7300 Real 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SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) (タカラバイオ株式会社) 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	Liver peptide
Casein	20	13.3
Peptides from pig liver	0	8.7
L-Cystein	0.3	0.3
Corn starch	53	53
Sucrose	10	10
Soybean oil	7	7
Cellulose	5	5
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1
tert-Butylhydroquinone	0.0014	0.0014
Choline-tartrate	0.25	0.25

1) AIN-93G Mineral mixture (Japan SLC, INC., Shizuoka, Japan)

2) AIN-93G Vitamin mixture (Japan SLC, INC., Shizuoka, Japan)

Table 2 Primer sequences used for real-time PCR analysis

Gene name		
Collagen I A1	Forward primer	5'-ggg cga gtg ctg tgc ttt-3'
	Reverse primer	5'-ggt ccc tcg act cct aca tct tc-3'
Collagen III A1	Forward primer	5'-ctg taa cat gga aac tgg gga aa-3'
	Reverse primer	5'-cca tag ctg aac tga aaa cca cc-3'
Collagen V A1	Forward primer	5'-gag gac cac aca ggg aag c-3'
	Reverse primer	5'-ctt gta gac act gag agc aat tcg-3'
Ribosomal protein S17	Forward primer	5'-ccg ggt cat cat cga gaa gt-3'
	Reverse primer	5'-gcg ctt gtt ggt gtg gaa gt-3'

Table 3 Effects of peptides from pig liver on body weights, tissue weights, and plasma alanine aminotransferase activity in mice

	Control		Liver peptide		Two-way ANOVA		
	Saline	CCl ₄	Saline	CCl ₄	Diet	CCl ₄	Interaction
Body weight (g)	45.5±2.8	43.6±1.7	43.3±1.2	42.3±1.1	0.96	0.63	0.07
Liver weight (g)	2.18±0.13	1.87±0.10	2.11±0.06	2.07±0.06	0.48	0.07	0.18
Epididymal adipose tissue weight (g)	1.99±0.42	1.57±0.17	1.62±0.17	1.46±0.21	0.37	0.29	0.65
Perirenal adipose tissue weight (g)	0.58±0.13	0.59±0.09	0.56±0.04	0.46±0.07	0.71	0.24	0.53
Plasma alanine aminotransferase activity (U/l)	5.71±0.73	11.30±3.34	5.31±1.33	11.66±3.77	0.99	0.04	0.89

Values are means ± SEM of five mice in each group.

3. 結果

豚肝臓ペプチドの給与および四塩化炭素の投与はマウスの体重、肝臓重量、精巢上体周囲脂肪重量、および腎周囲脂肪重量に有意な影響は及ぼさなかった (Table 3)。肝臓重量は四塩化炭素投与により減少する傾向を示し (Table 3, $P=0.07$)、血中ALT活性は四塩化炭素投与により有意に増加した (Table 3, $P<0.05$)。また、肝臓ペプチド給与により、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL1A1) の遺伝子発現量は減少する傾向を示し (Fig.1, $P=0.07$)、V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL5A1) の遺伝子発現量は有意に減少した (Fig.1, $P<0.05$)。一方、III型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖 (COL3A1) の遺伝子発現量には、肝臓ペプチド給与および四塩化炭素投与による有意な影響は認められなかった。

4. 考察

本実験において、豚肝臓ペプチドの給与はマウスの体重、および組織重量に有意な影響を及ぼさなかった (Table 3)。また、血糖値、血中トリグリセリド濃度、血中遊離脂肪酸濃度、血中ALT活性 (Table 3)、および血中アスパラギン酸トランスフェラーゼ活性にも肝臓ペプチドの給与による有意な影響は認められなかった (data not shown)。これらのことから、本実験で設定した添加量の豚肝臓ペプチドの給与はマウスの一般性

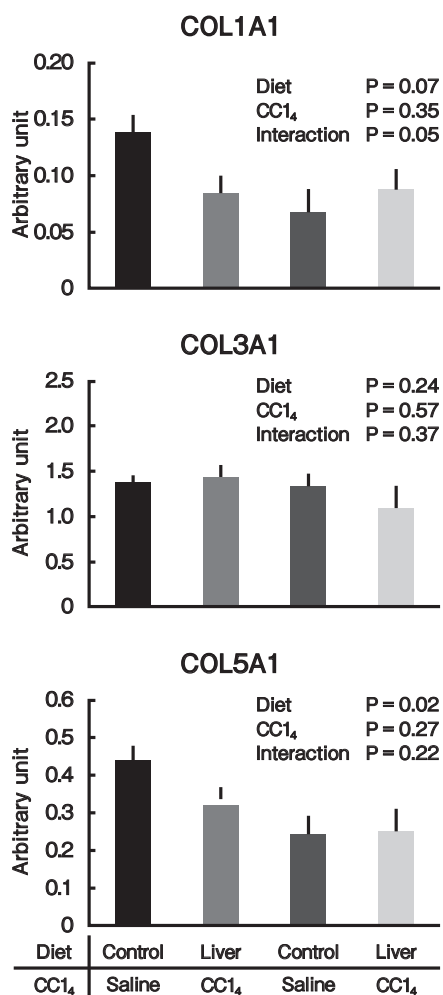


Fig. 1 Effects of peptides from pig liver on collagen mRNA levels in mice liver.

Data are means ± SEM of five mice in each group.

状に影響を及ぼさない可能性が示された。

四塩化炭素は主としてCYP2E1によりトリクロロメチルフリーラジカルに代謝され、それが引き

金となって肝障害を引き起こすことが知られている^{2,3)}。本実験において、四塩化炭素の投与により血中ALT活性は増加したが、豚肝臓ペプチドの給与による有意な影響は認められなかった(**Table 3**)。これらのことから、豚肝臓ペプチドの給与は、CYP2E1の活性やトリクロロメチルフリーラジカルの産生に影響を及ぼさないものと推察された。

コラーゲンは脊椎動物の体内に最も多く存在し、組織や臓器の構造維持に必須の細胞外マトリックスタンパク質である⁴⁾。また、組織損傷後の治癒過程において、コラーゲンは活性化した線維芽細胞により産生・分泌され、損傷部の修復に重要な役割を果たしている。その一方で、障害が慢性化すると線維芽細胞の活性化が持続し、その結果、主としてコラーゲンからなる細胞外マトリックスが過剰蓄積した状態(線維症)になる。したがって、組織損傷後の治癒過程においては、過剰のコラーゲン産生を抑制する必要があると考えられる。本研究において、豚肝臓ペプチドの給与によりCOL1A1のmRNA量は減少する傾向を示し(**Fig.1**, $P=0.07$)、COL5A1のmRNA量は有意に減少した(**Fig.1**, $P<0.05$)。これらのことから、豚肝臓ペプチドは組織損傷後のコラーゲンの過剰産生を抑制し、線維症への進行を阻害する可能性が考えられる。今後、豚肝臓ペプチドの給与

が四塩化炭素誘発性の肝障害後の治癒過程に及ぼす影響を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、豚肝臓ペプチドの給与がマウスの四塩化炭素誘発性の肝障害に及ぼす影響を調べた。豚肝臓ペプチドの給与は、体重、肝臓重量、および血中ALT活性に有意な影響を及ぼさなかったが、I型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の遺伝子発現量を減少させる傾向を示し($P=0.07$)、V型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖の遺伝子発現量を有意に減少させた($P<0.05$)。これらの結果から、豚肝臓ペプチドの給与は、マウスの一般性状や肝臓における四塩化炭素の代謝に影響を及ぼさないが、肝臓のコラーゲン産生を抑制することが示唆された。

文 献

- 1) A nutrient mixture suppresses carbon tetrachloride-induced acute hepatic toxicity in ICR mice, *Hum Exp Toxicol*, **27**, 559~566, 2008.
- 2) 加藤隆一, 鎌滝哲也編: 薬物代謝学第2版, 株式会社東京化学同人, 東京, 169~211, 2000.
- 3) Wong, F. W., Chan, W. Y., Lee, S. S.: Resistance to carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression, *Toxicol Appl Pharmacol.*, **153**, 109~118, 1998.
- 4) Mander, L. N., Liu, H. W.: *Comprehensive natural products II: chemistry and biology*, 469~530, Elsevier, Oxford, 2010.

肥満に伴う認知症の発症予防における豚肉摂取の効果

Effect of the pork intake on the prevention of dementia related with obesity

後藤孔郎・加隈哲也・柴田洋孝

(大分大学医学部内分泌代謝膠原病腎臓内科学講座)

Koro Gotoh, Tetsuya Kakuma and Hiroataka Shibata

(Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology and Nephrology, Faculty of Medicine, Oita University)

Obesity induces systemic low-grade chronic inflammation. Alzheimer's disease is deeply related with amyloid deposition although the mechanism is uncertain. The development of Alzheimer's disease is also associated with chronic inflammation by the activation of microglia cells, and reduction of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression in the brain. BDNF is an important factor to prevent neuronal death which occurs in Alzheimer's disease. The aim of this study is to clarify that the intake of carnosine included a lot in pork suppresses obesity-induced inflammation in the brain. Male rats were divided into four groups and kept for 2 months as follows, standard diet (Standard ; 20% fat)-fed group, high-fat diet (HF ; 60% fat)-fed group, standard-fed plus carnosine (250mg/kg body weight) group, and HF-fed plus carnosine group for 2 months. During this examination, they were centrally administered with amyloid ($A\beta$; 0.001mg/day) for a month. We evaluated 1) tumor-necrotizing factor- α (TNF- α) which is an inflammatory cytokine, interleukin-10 (IL-10) which is an anti-inflammatory cytokine, and BDNF expression in brain, 2) the activation of microglia cells (MG) and A deposits in the brain with immuno-histochemistry. Carnosine treatment inhibited HF-induced increase of TNF- α /IL-10 ratio in the brain, indicating that carnosine promotes anti-inflammatory response. Moreover, carnosine also suppressed HF-induced MG activation in the brain. In addition, carnosine treatment recovered HF-induced reduction of BDNF expression in the brain. There was no difference among all groups in A deposits in the brain. We clarified that carnosine suppresses obesity-induced inflammatory responses by inactivating MG as well as promotes BDNF expression in the brain, although it does not affect A deposition. Thus it is suggested that carnosine intake might be effective to protect neurons from cell death by anti-inflammatory responses and elevation of BDNF expression in the brain, preventing the development of Alzheimer's disease.

1. 目的

肥満およびそれに関連した糖尿病などのメタボ

リックシンドロームの増加は世界的な問題となっている。肥満は、全身性炎症性疾患と位置付けられており、肝臓や内臓脂肪のみならず脳内におい

でも炎症性変化がみられるとされている。アルツハイマー型認知症においては、かつては危険因子として体重減少に関心が寄せられていた。しかしながら、最近の研究では、むしろ肥満がアルツハイマー型認知症の危険因子であるというエビデンスが集積されてきた。特に、中年期の肥満はアルツハイマー型認知症発症の重大な危険因子であることが明らかにされてきた。さらにさかのぼって小児期からの肥満の管理・予防が動脈硬化性心血管疾患のみならず、アルツハイマー型認知症の発症予防にもきわめて重要であると考えられている。アルツハイマー型認知症のメカニズムの詳細は不明であるが、神経細胞外のアミロイド β の沈着のみならず、ミクログリア細胞の活性化とそれに伴う慢性炎症がアルツハイマー型認知症の病態生理に大きく関わるとされている。一方、脳由来神経栄養因子 (Brain-derived neurotrophic factor ; BDNF) は神経細胞の発生や成長、維持、修復など重要な働きをするタンパク質であるが、近年、このBDNFの発現量がうつ病やアルツハイマー病患者の脳で減少していることが確認されている。

最近、豚肉に多く含まれる“カルノシン”は脳神経細胞を保護し、認知症発症を予防する効果があることが知られている。ラットの実験において、カルノシンは、脳重量減少の抑制効果があることが明らかになり、これにはカルノシンの強い抗酸化作用が関連していることが示唆されている。このようなカルノシンの抗酸化作用には、脳内における炎症性変化も抑制することが推測される。

今回、食餌誘導性肥満モデル動物を用いて、肥満由来の脳内炎症性変化、BDNF発現やアルツハイマー型認知症関連タンパクの沈着の変化が、カルノシンの摂取によって改善するかについて検討する。以上より本研究の目的は、「豚肉に含まれ

るカルノシンを摂取すると、ミクログリア細胞を中心とした脳内炎症が抑制され、さらにアルツハイマー型認知症の発症および進展予防に有効である」という仮説を証明することにある。

2. 方 法

雄ラットに通常食 (Standard ; St) または高脂肪食 (餌中の60%が脂肪成分, High fat ; HF) を摂取させ、通常食群と高脂肪食群に分ける。さらに、各群をカルノシン添加群 (carnosine ; carno, 250mg/kg体重) と添加しないコントロール群に分ける。したがって、通常食+コントロール群 (St), 通常食+カルノシン添加群 (St+ carno), 高脂肪食+コントロール群 (HF), 高脂肪食+カルノシン添加群 (HF+ carno) の4群を作成し、2ヶ月飼育する。ただし、最初の1ヶ月間は浸透圧ミニポンプを用いて、各群にA β (0.001mg/日) の持続中枢投与を行う。

a) 炎症性サイトカインである tumor-necrotizing factor (TNF)- α 、抗炎症性サイトカインである interleukin (IL)-10の含有量を測定する。

b) ミクログリア細胞の活性化について、免疫組織学的検討を行う。

c) 脳内BDNF発現を定量する。

d) アミロイド β (1-42) (A β 1-42) の脳内沈着について、免疫組織学のおよび定量的に評価する。

3. 結果と考察

3.1 高脂肪負荷に伴う脳内炎症性変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって脳内の炎症性サイトカインであるTNF- α 、抗炎症性サイトカインであるIL-10ともに増加するが、カルノシンを経口投与するとTNF- α およびIL-10の増加が抑制される

(Fig. 1 A, B)。ここで、炎症性変化の指標としてよく用いられるTNF- α /IL-10を検討したところ、高脂肪負荷によりTNF- α /IL-10が増加するが、その増加はカルノシンの投与によって抑制された (Fig. 1 C)。TNF- α /IL-10が高値であるほど炎症性変化が強いと考えられることから、高脂肪負荷によって脳内のTNF- α とIL-10がともに増加するが最終的には炎症性変化をもたらしていると評価される。さらに、カルノシンを投与するとTNF- α /IL-10が低下したことから、高脂肪負荷による炎症性変化が抑制されたことが示唆される。

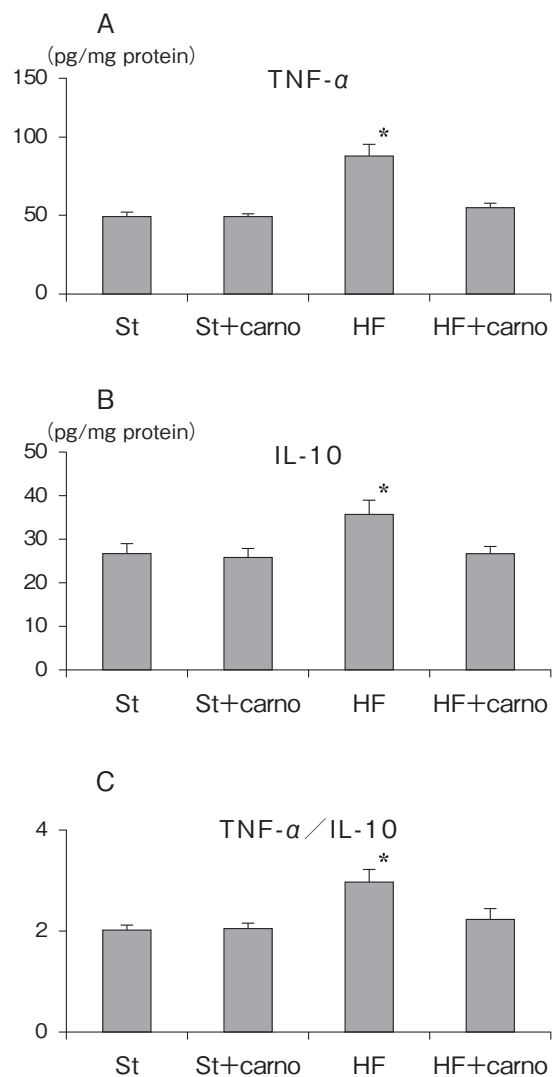
さらに脳内の主要な炎症制御細胞であるミクログリア細胞の活性について評価を行った。高脂肪負荷によってミクログリア細胞の活性化を示す細胞体の肥大を認めたが、カルノシンを投与するとその活性化は軽減された (Fig. 2 A-D)。

3.2 高脂肪負荷に伴う脳内BDNFおよびA β 1-42の変化に対するカルノシンの効果

脳内BDNF発現について検討したところ、高脂肪負荷によりBDNF発現が低下したが、その低下はカルノシン投与によって抑制された (Fig. 3)。A β 1-42の脳内沈着について、組織学的 (Fig. 4 A-D) および定量的 (Fig. 5) に検討したが、高脂肪負荷やカルノシン投与により変化はみられなかった。

カルノシンは β アラニンとヒスチジンのジペプチドで β アラニン・ヒスチジンであり、特に豚や牛の筋肉中に高濃度に存在する。これらは、ヒスチジンの構成要素であるイミダゾールからイミダゾールペプチドと呼ばれ、内因性抗酸化物質としての役割を果たしている^{1, 2)}。カルノシンを摂取したラットでは筋肉中のカルノシン含有量が増加するとともに筋肉脂質の過酸化やタンパクの酸化が抑制されることが知られている。また近年、カルノシンは加齢と深く関連のあるタンパク変性を

伴う疾患、特にアルツハイマー型認知症や糖尿病合併症の予防に有効であると報告が散見される。事実、カルノシンは、アミロイドタンパクの活性を抑制していると考えられている^{3, 4)}。本研究では、高脂肪食負荷に伴う脳内炎症性変化に対して、カルノシンは抑制的な作用をもたらすことを認めた。アルツハイマー型認知症の発症にはA β の沈着が最重要因子であるが、その沈着には炎症性変化とも密接に関連していると考えられている



* $p < 0.05$ vs. St

Fig. 1

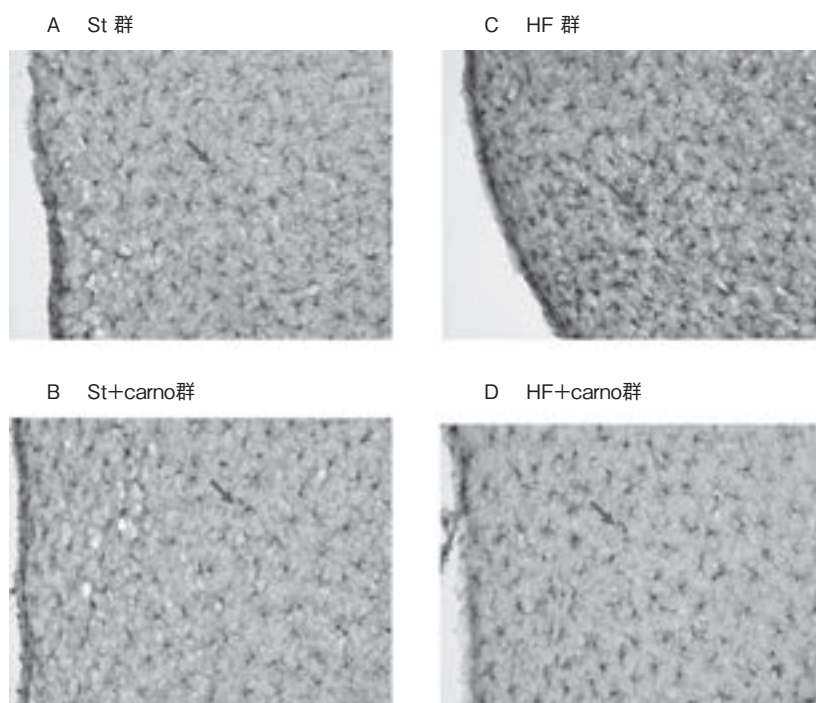


Fig. 2

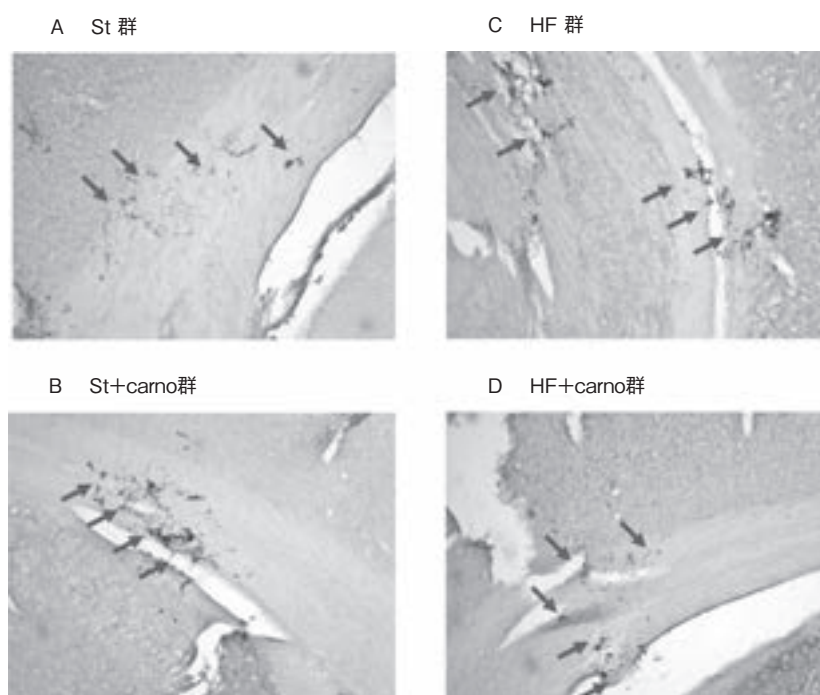
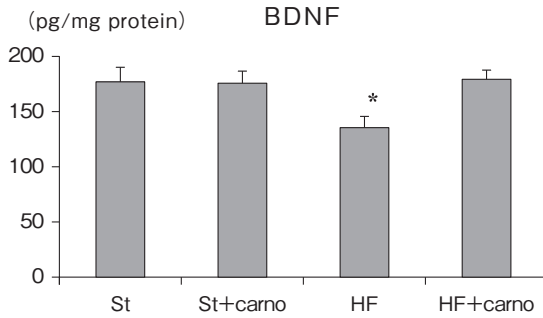


Fig. 4



* $p < 0.05$ vs. St

Fig. 3

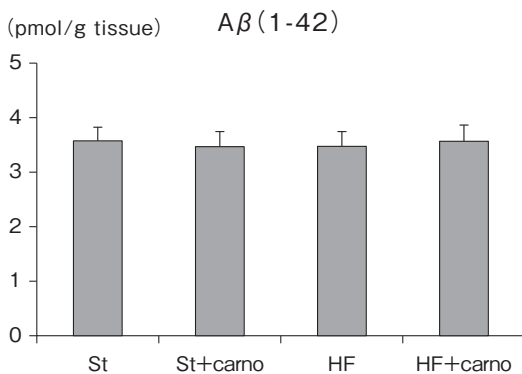


Fig. 5

る。Aβを慢性投与した場合、カルノシンによって脳内Aβ沈着に変化がみられなかった。しかし、炎症反応を惹起させる高脂肪負荷の場合においても脳内Aβ沈着に変化がなかったことを考慮すると、今後、Aβの投与量について検討する必要があると考えられる。いずれにしても、カルノシンは、炎症性変化による脳内のAβ合成を抑制することが期待される。さらに本研究で、高脂肪負荷による脳内BDNF発現の低下が、カルノシンにより改善することが認められた。BDNFは神経細胞の維持をもたらす因子であることから、カルノシンはAβの沈着とは独立してBDNFによる神経保護作用が発揮されることが推測される。また、加齢とともにカルノシンの組織中濃度が低下するため、カルノシンを多く含む豚肉の摂取がアルツハ

イマー型認知症の発症予防に有効であることが示唆される⁵⁻⁷⁾。今後、カルノシンがどのようなメカニズムで炎症性変化を抑制したり、BDNF発現を亢進させたりするのかを解析する必要がある。興味深いことにカルノシンのホモログであるホモカルノシンは髄液中に存在するが、カルノシン自体はほとんど存在しない^{8,9)}。したがって、カルノシンの一連の作用は、脳以外の部位から間接的にもたらされている可能性が高い。その間接的作用の候補として、カルノシンによる小腸での抗酸化作用に伴う腸内環境の改善、さらには小腸から分泌されるglucagon-like peptide-1 (GLP-1)の分泌促進によるものがあげられると、我々は推測している。これまで我々は、小腸から分泌されるGLP-1が門脈を経由して肝臓内のGLP-1受容体に作用し、さらに肝臓からの求心性神経を介して脳内BDNF発現を高める、ということを明らかにしている^{10, 11)}。今後、以上のような視点からさらなる解析が必要である。

4. 要 約

肥満は、全身性炎症性疾患と位置付けられており、またアルツハイマー型認知症の危険因子であるとされている。アルツハイマー型認知症のメカニズムの詳細は不明であるが、神経細胞外のアミロイドβの沈着のみならず、慢性的炎症がアルツハイマー型認知症の病態生理に大きく関わりとされている。一方、神経細胞の維持に必要なBDNFの発現量がうつ病やアルツハイマー型認知症患者の脳で減少している。最近、豚肉に多く含まれる“カルノシン”は脳神経細胞を保護し、認知症発症を予防する効果があることが知られている。本研究では、「豚肉に多く含まれるカルノシンを摂取すると、脳内炎症が抑制され、アルツハイマー型認知症の発症および進展予防に有効である」ということを明らかにする。カルノシンは、肥満に

よる脳内での炎症反応を抑制させ、BDNF発現の低下を回復させた。以上より、カルノシンを多くする豚肉の摂取は、アルツハイマー型認知症の発症もしくは進展予防に有効であることが示唆される。

文 献

- 1) Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., Ames, B. N. : Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain, *Proc Natl Acad Sci USA*, **85**, 3175~3159, 1988.
- 2) Calabrese, V., Colombrita, C., Guagliano, E., Sapienza, M., Ravagna, A., Cardile, V., Scapagnini, G., Santoro, A. M., Mangiameli, A., Butterfield, D. A., Giuffrida Stella, A. M., Rizzarelli, E. : Protective effect of carnosine during nitrosative stress in astroglial cell cultures, *Neurochem Res*, **30**, 797~807, 2005.
- 3) Preston, J. E., Hipkiss, A. R., Himsworth, D. T., Romero, I. A., Abbott, J. N. : Toxic effects of beta-amyloid (25-35) on immortalised rat brain endothelial cell : protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine, *Neurosci Lett*, **242**, 105~108, 1998.
- 4) Fu, Q., Dai, H., Hu, W., Fan, Y., Shen, Y., Zhang, W., Chen, Z. : Carnosine protects against Aβ₄₂-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells, *Cell Mol Neurobiol*, **28**, 307~316, 2008.
- 5) Hipkiss, A. R. : Carnosine, a protective, anti-ageing peptide? *Int J Biochem Cell Biol*, **30**, 863~868, 1998.
- 6) Boldyrev, A. A., Gallant, S. C., Sukhich, G. T. : Carnosine, the protective, anti-ageing peptide. *Biosci Rep*, **19**, 581~587, 1999.
- 7) Hipkiss, A.R. : On the enigma of carnosine's anti-ageing actions, *Exp Gerontol*, **44**, 237~242, 2009.
- 8) Huang, Y., Duan, J., Jiang, X., Chen, H., Chen, G. : Separation and determination of enkephalin-related peptides using capillary electrophoresis, *J Sep Sci*, **28**, 2534~2539, 2005.
- 9) Jansen, E. E., Gibson, K. M., Shigematsu, Y., Jakobs, C., Verhoeven, N. M. : A novel, quantitative assay for homocarnosine in cerebrospinal fluid using stable-isotope dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **830**, 196~200, 2006.
- 10) Fujiwara, K., Gotoh, K., Chiba, S., Masaki, T., Katsuragi, I., Kakuma, T., Yoshimatsu, H. : Intraportal administration of DPP-IV inhibitor regulates insulin secretion and food intake mediated by the hepatic vagal afferent nerve in rats, *J Neurochem*, **121**, 66~76, 2012.
- 11) Gotoh, K., Masaki, T., Chiba, S., Ando, H., Fujiwara, K., Shimasaki, T., Mitsutomi, K., Katsuragi, I., Kakuma, T., Sakata, T., Yoshimatsu, H. : Hypothalamic brain-derived neurotrophic factor regulates glucagon secretion mediated by pancreatic efferent nerves, *J Neuroendocrinol*, **25**, 302~311, 2013.

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 hypocholesterolemic 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 or HRHUgf3-RPIB (purified by a gel filtration and a reverse phase chromatography) -group compared to CTH-group. Micellar solubility of cholesterol was significantly decreased by HRHUgf3-RPIB2 (purified by a gel filtration and a reverse phase chromatography and a reverse phase chromatography) -group compared to CTH-group. Most active fraction, 62% of HRHUgf3-RPIB2 containing peptides is a molecular weight 75~200. 33% of HRHUgf3-RPIB2 containing peptides is a molecular weight 200~700.

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¹⁾。しかし、現在活発に行われている有効成分の検討により^{2~10)}、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^{2,3)}。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⁶⁾。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⁷⁾。

さらに、我々の既報⁸⁻¹⁰⁾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¹¹⁾。

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い、活性ペプチドの特定を試みた。

2. 方法

実験1

これまでの実験で得られたgf3-RPIを逆相クロマトグラフィー (RPC) により6分画 (分画物IA~IF) し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。RPCによる分画は、AKTA purifier 10 plus (GE Healthcare) により、SOURCE 5 RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare) を用いて行った。

実験2

AKTA purifierを用い、RPIの分画物 (RPIA~RPIF) で最もコレステロールミセル溶解性低下

作用を有する画分 (IB) を4分画し、それぞれIB1~IB4とした。それらをSOURCE 5 RPC ST 4.6/150 (GE Healthcare) カラムを用いた、逆相クロマトグラフィーで152回分画した。さらに、得られた4画分の*in vitro*でのコレステロールミセル溶解性試験を行った。

実験3

AKTA avant 25で、上記〈実験2〉で得られた最もコレステロールミセル溶解性低下作用を有する画分 (IB2) を、Superdex Peptide 10/300 GL (Amersham) カラムを用いた、ゲル濾過クロマトグラフィーで分画した。そして、IB2の分画と同じ装置およびカラムを用いて、基準ペプチド (IIAEKK, IIAE, IIA, IA, G) を分画した。得られたピークの保留時間および基準ペプチドの分子量から分子量の検量線を作成した。この検量線から、IB2に含まれるペプチドの分子量を推定した。

なお、実験結果の統計的分析には、Tukey's-testを用いた。

3. 結果と考察

実験1

Fig. 1に、HPHUのRPCによる溶出パターンを示した。

CHOLミセル溶解性はCTHと比較して、HRHUのGFC-RPC分画物I, IA, IB, IC, IDおよびIEでは有意に低下した。IBで最大のCHOLミセル溶解性の低下を示した (Table 1)。

実験2

Fig. 2に、HRHUGf3-RPIBの逆相クロマトグラフィーによる溶出パターンを示した。

HPHUの逆相クロマトグラフィーによる分画物であるHRHUGf3-RPIB2はCTHやHPHUと比較して、コレステロールミセル溶解性が顕著に有意に低下した (Table 2)。

実験3

Fig. 3 (IB2ゲル濾過溶出図) より, IB2に含まれるペプチドはFig. 4の検量線から, 分子量75~200が全体の62%, 分子量200~700が33%であった。

今後は, 最大活性を発揮したIB2の活性ペプチドをTOF/MS分析で特定し, 動物実験を実施する計画である。

4. 要 約

私たちは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。

そこで, 本研究では, ペプチド混合物である

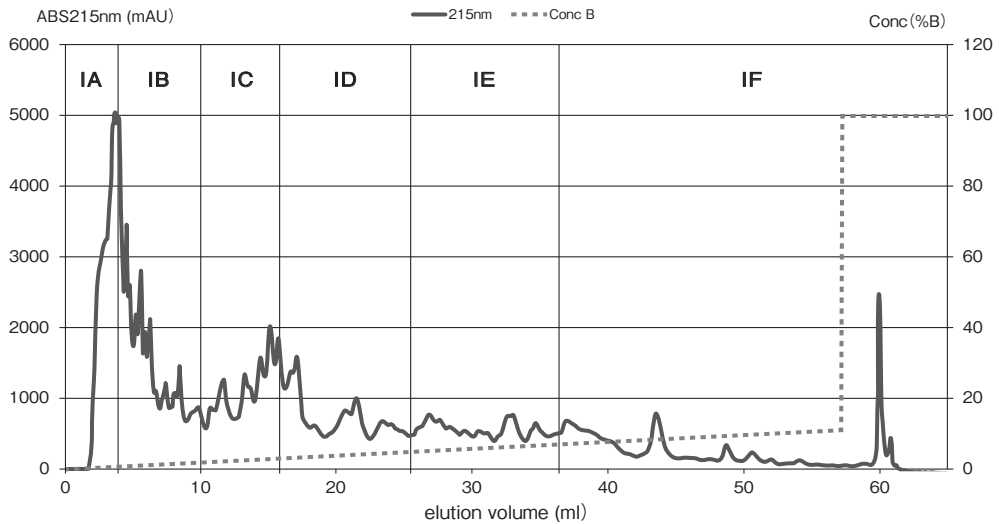


Fig. 1

Table 1 Effects of samples (5mg/ml) on micellar solubility of cholesterol.

sample	concentration	micellar solubility of cholesterol (%)
CTH	5 mg/ml	101.1 ± 3.5 g
HRHU	5 mg/ml	89.1 ± 1.7 def
HRHUGf3-RPI	5 mg/ml	76.2 ± 1.4 bc
HRHUGf3-RPIA	5 mg/ml	72.3 ± 2.3 ab
HRHUGf3-RPIB	5 mg/ml	66.8 ± 2.6 a
HRHUGf3-RPIC	5 mg/ml	86.7 ± 2.8 cdef
HRHUGf3-RPID	5 mg/ml	75.2 ± 1.3 b
HRHUGf3-RPIE	5 mg/ml	82.4 ± 2.1 bcd
HRHUGf3-RPIF	5 mg/ml	94.5 ± 1.9 efg

1. The data are Means ± SEM of 4 samples per group.

2. Means with different letters are significantly ($P < 0.05$) by Tukey's test.

CTH : Casein Tryptic Hydrolysate

HRHU : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate

HRHUGf3RPI : Cattle Heart Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtration Fraction 3 Reverse Phase Chromatography Fraction I

HRHUGf3-RPIA~IF : Cattle Heart Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtration Fraction 3 Reverse Phase Chromatography Fraction IA~IF

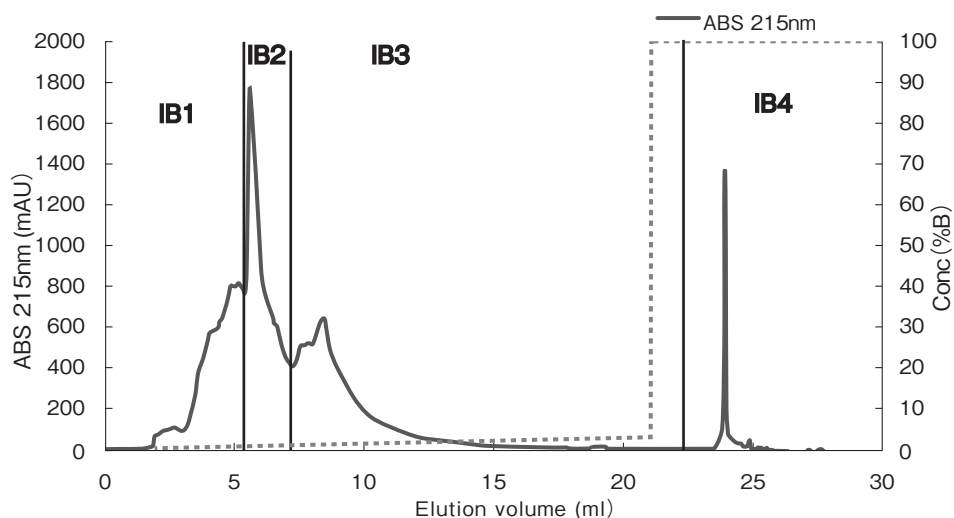


Fig. 2

Table 2 Effects of samples (5mg/ml) on micellar solubility of cholesterol.

sample	concentration	micellar solubility of cholesterol (%)
CTH	5 mg/ml	105.9 ± 10.9 c
HRHU	5 mg/ml	90.0 ± 3.0 bc
HRHUGf3-RPIB	5 mg/ml	78.4 ± 0.6 b
HRHUGf3-RPIB1	5 mg/ml	86.9 ± 4.6 bc
HRHUGf3-RPIB2	5 mg/ml	49.5 ± 2.9 a
HRHUGf3-RPIB3	5 mg/ml	93.7 ± 3.9 bc

1. The data are Means ± SEM of 4 samples per group.

2. Means with different letters are significantly different ($P < 0.05$) by Tukey's test.

CTH : Casein Tryptic Hydrolysate

HRHU : Cattle Heart Protein Hydrolysate Ultrafiltrate

HRHUGf3RPIB : Cattle Heart Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtration Fraction 3 Reverse Phase Chromatography Fraction IB

HRHUGf3-RPIB1~B3 : Cattle Heart Hydrolysate Ultrafiltrate Gel Filtration Fraction 3 Reverse Phase Chromatography Fraction IB1~IB3

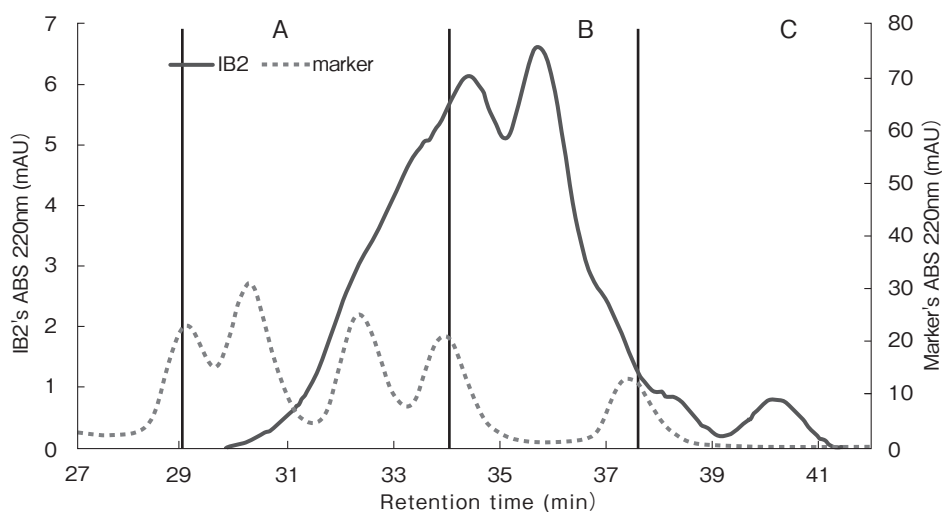


Fig. 3

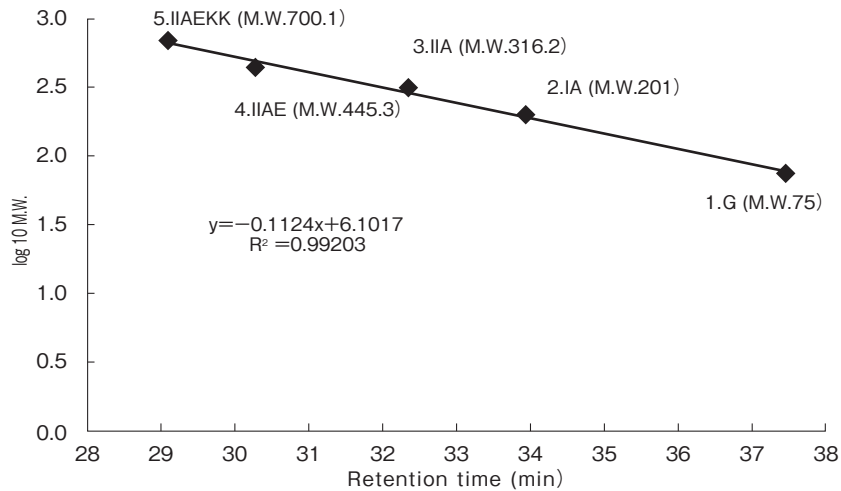


Fig. 4

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。

具体的には、RPCによるHPHU分画物であるgf3-RPIについて、活性ペプチドの特定のために、gf3-RPIをRPCにより6分画（分画物IA～IF）し、CHOLミセル溶解性に対する影響を評価した。IA～IFで最大活性のIBを特定した。さらに、IBのRPC分画物（IB1～4）の中で最もコレステロールミセル溶解性低下作用を有する画分は、IB2であることを明らかにした。IB2に含まれるペプチドは、分子量75～200のものが全体の62%を示した。

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., 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., Ahhmed, A. M., Muguruma, M., Numata, M., Nagaoka, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 607, 2009.

新規な発酵食肉製品の機能性について

Functional properties of novel fermented meat products

六車 三治男・川越 聖人・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, Masato Kawagoe, Saki Kimoto, Kumiko Kawakita and Shinichi Takenoyama.

(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University)

This research aimed to study and search the biological and functional properties as well as physiological effects of hydrolysates of dry fermented ham splayed with dried bonito bacteria (*Eurotium herbariorum*). The fermentation of cured ham was carried out at 20°C and with humidity with 85% for 10 days. After fermenting, the surface of samples was covered by blue mold. The drying and ripening of fermented ham were carried out at 18°C and with humidity with 65% until the yield of each samples reduced to 70% (14 days storage), 60% (32 days storage) and 50% (84 days storage). The final pH of these dry fermented hams were about 6. The water activities in Experiment 1 (70% yield), 2 (60% yield) and 3 (50% yield) were 0.878, 0.869 and 0.802, respectively. All samples separately hydrolyzed with pepsin and trypsin. 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. Hydrolysates of dry fermented hams showed the high ACE inhibitory activity and high DPPH inhibition activity. Free amino acids increased during ripening. Glutamic acid (Glu), alanine (Ala), valine (Val), leucine (Leu) and isoleucine (Ile) increased especially. This high level of Glu seemed to be related to Umami of fermented ham. Val, Leu and Ile were related to a sports nutrition.

Based on their remarkable ACE inhibitory activity and antioxidant activity, we suggest that the hydrolysates from dry fermented pork ham may have potential applications as functional food. These dry fermented hams inoculated with dried bonito bacteria showed the acceptable sensory quality characteristic.

1. 目 的

ライフスタイルの変化に伴い、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。このような国民の健康志向に合わせて、現在、多くの機能性食品が開発されている。特に、乳を

用いた発酵乳製品が多く開発されているが、食肉を用いた食品に関しては機能性を有する製品があまり開発されていないのが現状である。しかし、食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり健康や長寿には不可欠な食品であり、近年、食肉にも健康に寄与する生体調節機能が存在することが明らか

かになってきた^{1,2)}。我々も、食肉に含まれるペプチドにACE阻害活性があり、動物実験において血圧降下作用、抗酸化作用やⅡ型糖尿病予防作用を示す結果を得ている^{3~11)}。さらに、欧州の発酵ソーセージ類から乳酸菌の選別を試み、食塩・亜硝酸耐性を有する菌株を見出し、それらの菌株を同定し、高い食肉タンパク質分解能を持つ乳酸菌株を用いて、発酵食肉製品の製造を試みた。その結果、血圧上昇抑制効果や抗酸化活性を持ち、嗜好性を高めた製品の開発が可能であることを明らかにした¹²⁾。これからの高齢化社会に向けて、健康維持に寄与する機能性を強化した高品質・高機能発酵食肉製品を開発することは重要である。また、高齢者のみならず健常者にとっても、健康維持に寄与する高い機能性を有し、日本人の食味性にも合う発酵食肉製品を開発することは極めて重要である。

生ハムにはヨーロッパで自然に着生した酵母やカビで発酵し熟成するもの（発酵型）と燻煙するもの（非発酵型）とがある。なお、日本産の生ハムは非発酵型である。日本の伝統的発酵食品は麹や糠を利用したものが多い。鯉節菌を利用した鯉節もカビ菌による発酵食品である。周知のように、鯉節菌による発酵により、鯉節の中に核酸系旨味成分（イノシシ酸）が産生し、代表的な旨味調味料としても利用されている。これを応用すれば、生ハム中にもうまみ成分が産生され、熟成由来のアミノ酸やペプチドの呈味成分と相乗効果を生じて濃厚な旨味を付与できることが予想される。

そこで、日本独自の有用菌株であり、日本鯉節協会の鯉節優良カビ菌「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」(和名：カワキコウジカビ)を利用して塩漬した豚肉を発酵させ、さらに乾燥・熟成させることで、凝縮された濃厚な旨味が付与された生ハムを作製することが本研究の目的である。

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。市販の新鮮な国産豚肩ロース肉を購入し、発酵生ハムの原料肉として用いた。

2.2 発酵ハムの製造

新鮮な肩ロース肉700 gを原料とし、これに食塩42 g、グルコース42 g、アスコルビン酸ナトリウム1.4 gと酵母エキス0.4 gとを乾塩法にて肉表面に塗布した。その後、温度4℃で7日間塩漬し内部に浸透させた。冷蔵庫から取り出し、日本独自の有用菌株であり、日本鯉節協会の鯉節優良カビ菌である「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」(和名：カワキコウジカビ)を利用して、この鯉節菌液を塩漬肉の全面に噴霧した。なお、原料の温度や衛生面には十分に注意を払い作業した。

次いで、カビ菌を噴霧した塩漬肉を温度20℃、湿度85%に調整した恒湿恒温乾燥機（カビ室）中に吊り下げ、カビを発生させた。カビ室では、毎日1回の割合で、外気を取り入れて空気循環をよくし、酸素の供給を行ってカビの発育を促進させた。4日後に灰緑色したカビが塩漬肉の表面に発育し、10日後にその全面に増殖するようになった。

それから、温度18℃、湿度65%に調整した恒湿恒温器中で歩留り70%（試験区1）、60%（試験区2）、50%（試験区3）になるまで熟成、乾燥させた。

2.3 水分含量および水分活性の測定

水分含量は、赤外線加熱乾燥法の原理に基づいた加熱乾燥式水分計（ANDエー・アンド・ディ（株）、MF-50）により測定した。一方、水分活性（Aw）はポータブル水分活性測定装置

(AxAir社, Novasina-msl-aw, Switzerland) を用いて測定した。

2.4 発酵ハムの消化酵素処理

発酵ハムに2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサ (Panasonic MK-K61) を用いて30秒間、2回ホモジナイズした。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) をタンパク質量に対して1/1000倍量添加し、攪拌しながら37℃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℃まで低下させた。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℃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発酵ハム由来ペプチドとした。

2.5 タンパク質の定量

タンパク質の定量はBiuret法¹³⁾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 Spectrophotometer 1240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¹⁴⁾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。

2.6 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¹⁵⁾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。このHHLを塩化ナトリウム (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 μ lに60unit/mlのACE溶液20 μ lおよび7.6mM HHL溶液50 μ lを添加し37℃で30分間反応させた。反応は0.1NHCl (和光純薬工業) 554 μ 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、2,500rpm, 15分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1ml分取し、100℃, 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1MのNaCl溶液を1ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸を吸光度228nmで測定した。

阻害率は肝臓水解物の吸光度をS, 肝臓水解物の代わりに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。

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

2.7 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¹⁶⁾。すなわち、400 μ M DPPH, MES (2-morpholino-ethanesulphonic 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 μ lとサンプルを60 μ 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に調整したものを使用した。

2.8 遊離アミノ酸含量の測定

発酵ハムの遊離アミノ酸の分析は、分析試料の重量に対し3倍量のスルフォサリチル酸を加え、ホモジェネート後、冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を変性・沈殿させた。その後、3,500xgで15分間遠心分離を行った。上清を0.45 μ mメンブレンフィルターでろ過し、分析試料とした。これをアミノ酸自動分析機JIC-500/V（日本電子株式会社、東京）にて測定した。

3. 結果と考察

本研究は、鯉節菌による発酵により、核酸系旨味成分を産生させ、さらに濃厚な旨味を付与することを目指して実施した。そのためには、最適な鯉節菌のカビの発育条件を検討する必要がある。そこで、まず、国産豚肉の肩ロース部位を原料として塩漬し、恒湿恒温器を用いて、温度と湿度をコントロールして、カビの最適発育条件を検討した。これらの製造は、食品衛生法・製造基準に準拠して行った。

3.1 生ハムの発酵過程でのカビの発生と歩留り変化

温度4℃で7日間塩漬した肩ロース肉を、温度20℃、湿度85%に調整した恒湿恒温乾燥機（カビ室）中に吊り下げ、ユーロティウム ハーバリオラム（*Eurotium herbariorum*）¹を利用して、この鯉節菌液を塩漬肉の全面に噴霧し、カビを発生させた。カビ室では、毎日1回の割合で、外気を取り入れて空気循環をよくし、酸素の供給を行ってカビの発育を促進させた。4日後に灰緑色したカビが塩漬肉表面に発育し、10日後に全面を覆うように増殖した。カビの発育した生ハムを、恒湿恒温器を用いて乾燥および熟成を進行させ、生ハムのみならず、さらに乾燥状態が進行したドライハムやイタリア特産のコッパ風製品の製造も試みる目的で、製品の歩留りが70%、60%および50%

の3種類の製品を作製した。それから、温度18℃、湿度65%に調整した恒湿恒温器中で歩留り70%（試験区1）、60%（試験区2）、50%（試験区3）になるまで熟成、乾燥させた。

まず、発酵生ハムの製造過程の歩留りの変化について測定した結果をFig. 1に示した。カビを噴霧していない対照区は4日で歩留りが80%に、8日で70%に低下した。さらに、25日で60%に低下し、65日経過して歩留りが50%にまで低下した。この歩留り50%の最終標品を、カビを噴霧していない対照区（Control）とした。

カビを噴霧した試験区の歩留りは4日で歩留りが90%に低下し、14日間で歩留りが70%にまで低下した。この製品の水分含量を維持するために真空包装を施し、低温熟成を進めて機能性ペプチドの発現を促すために、通気性のケーシングにて真空包装して60日間冷蔵保存したものを試験区1（Fermented 70%）とした。次に、試験区2は、32日間熟成、乾燥させることによって歩留りが60%に低下した。この標品を、先ほどと同様にケーシングにて真空包装し冷蔵保存したものを試験区2（Fermented 60%）とした。また、カビが塩漬肉の全面に発生後、84日間の熟成、乾燥を行うことにより歩留りは50%に低下し、この標品を試験区3（Fermented 50%）として機能性発現等に関する実験に供した。

3.2 カビ発酵生ハムの水分含量および水分活性の変化

水分含量の変化は、Fig. 2-aに示したようにコントロールが25.73%、試験区1が53.66%、試験区2が48.63%、試験区3が34.90%を示した。一方、いずれの製品もpHは約6位で、水分活性（ A_w ）は、コントロールが0.687、試験区1が0.874、試験区2が0.869、試験区3が0.802を示した（Fig. 2-b）。各試料の水分含量および水分活性の減少状態は、お互いに似たような傾向を示し

た。食肉製品の規格基準に当てはめると¹⁷⁾、これら製品の水分活性値は、非加熱食肉製品の成分規格の水分活性 (0.95未満) よりも低い値であり、コントロールおよび試験区3の水分活性値は、乾燥食肉製品の成分規格の水分活性値 (0.87未満) よりもはるかに低値を示した。また、いずれの製品も食肉製品の衛生規格、保存基準に適合する製品となった。コントロールと発酵製品50%の歩留りはともに50%であったが、水分含量および水分活性ともに発酵製品が少し高い値を示した。破断強度を測定した結果からも、カビを噴霧して発酵させた標品はコントロールと比較して柔軟性に富

んだ軟らかい製品となり (データ未掲載)、食感に富んだ発酵食肉製品として評価できると考えられた。なお、歩留りの変化、水分含量や水分活性にデータから試験区1と試験区2は生ハム、試験区3はドライハム類に相当する製品に分類されると考えられた。

3.4 カビ発酵生ハムのACE阻害活性の評価

著者らは、高い食肉タンパク質分解能を持つ乳酸菌を用いて高機能食肉製品の開発を試みた。その結果、乳酸菌による筋原線維タンパク質の分解に伴う機能性ペプチドや遊離アミノ酸の増加、高い血圧上昇抑制活性と抗酸化作用も有し、しかも

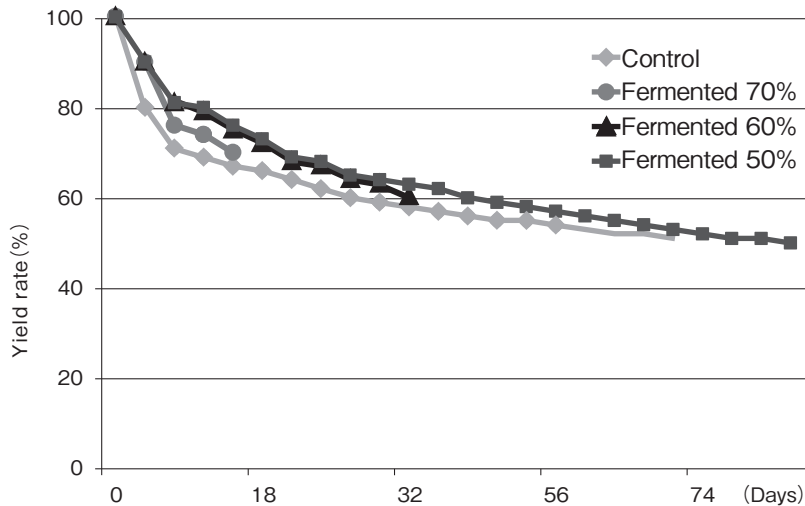


Fig. 1 Yield rate curves of control and each fermented meat products.

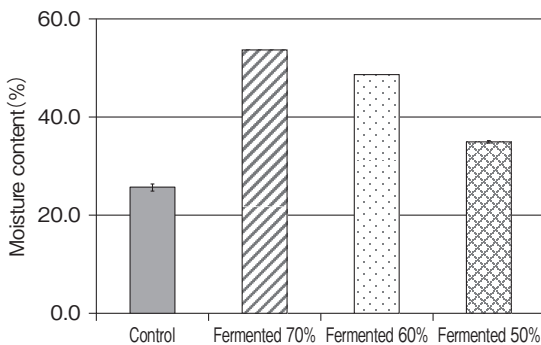


Fig. 2-a Moisture contents in control and each fermented meat products.

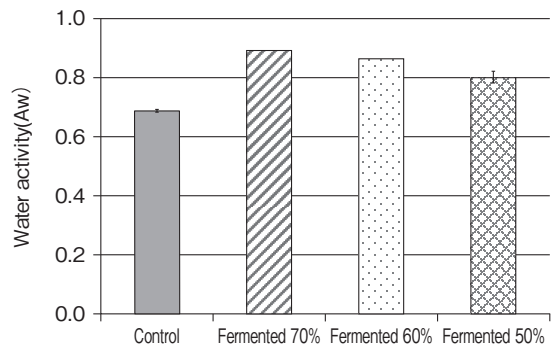


Fig. 2-b Water activities in control and fermented meat products.

官能評価でも高い評価を受ける製品を開発できた¹²⁾。

本研究でも、カビ発酵生ハムを、ヒトが食して消化したことを前提に、前回の報告に準じて酵素消化しACE阻害活性の比較を行った (Fig. 3)。その結果、いずれの製品も高いACE阻害活性を示したが、コントロールと比較すると、カビを噴霧して発酵させた製品がさらに高いACE阻害活性を示し、生ハムからドライハム様の製品になるにつれ、さらにACE阻害活性が高まる傾向が認

められた。これらの結果は、我々が、昨年報告した、調理加工食肉・食肉製品のおよびその発現に関する研究から得られた結果とほぼ同様の値であった¹⁸⁾。カビ発酵食肉製品の酵素消化物のタンパク質成分の分子種や分子量を、SDS-PAGEやHPLC分析により観察した結果、食肉を構成している筋原線維タンパク質の分解に伴い出現した、分子量6,000~1,000Da間の成分の増加が観察された (データ未掲載)。

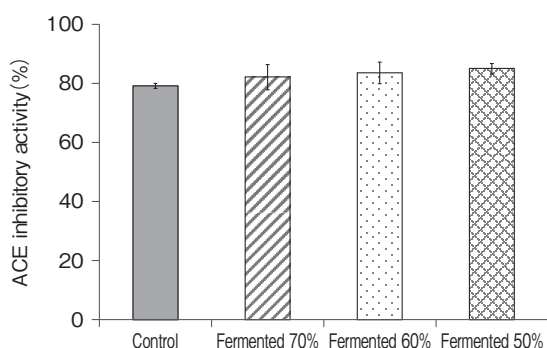


Fig. 3 ACE inhibitory activity of control and each fermented meat products.

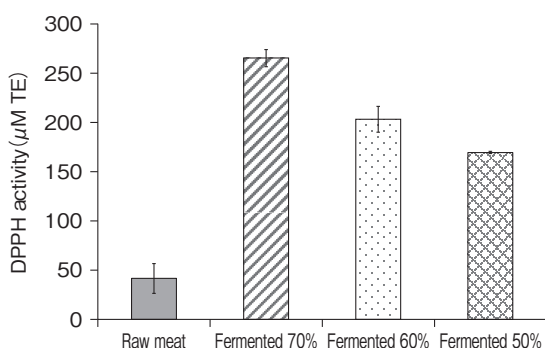


Fig. 4 DPPH radical scavenging activity of raw meat and each fermented meat products.
TE : Trolox equivalent.

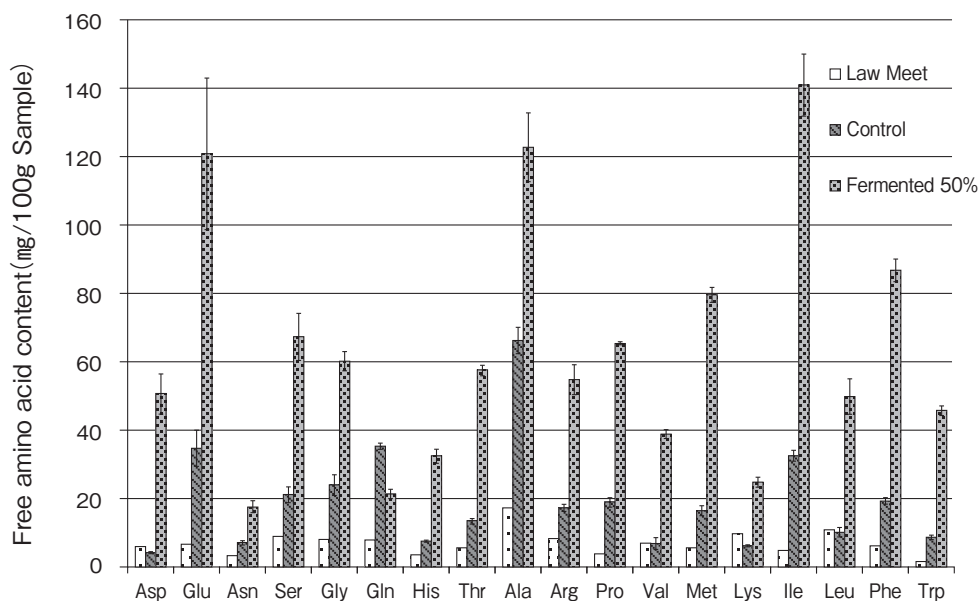


Fig. 5 Free amino acid contents in raw meat, control sample and fermented meat products (50%).

3.5 カビ発酵生ハムの抗酸化活性の評価

Fig. 4に、生の肩ロース肉および3種類のカビ発酵食肉製品から得られた酵素消化物の抗酸化活性をDPPHラジカル消去法により測定した結果を示した。生肉に比較して発酵製品の試験区1は約6倍、試験区2は約4倍、試験区3は約3.5倍近い非常に高い抗酸化活性を示した。生肩ロース肉の値は以前の畜種別差異を比較検討した数値とほぼ同等の数値を示した¹⁹⁾。一方、発酵食肉製品の試験区1~3は、調理加工食肉・食肉製品の機能性発現の研究で測定した生ハムの値とほぼ同等かそれ以上の高い活性であった¹⁸⁾。

このように、カビ発酵させた製品からは、高い抗酸化活性が発現することが明らかになった。

3.6 カビ発酵生ハムの遊離アミノ酸分析

生肩ロース肉と、歩留り50%のカビを噴霧していないコントロールと歩留り50%の発酵生ハムの試験区3に含まれる遊離アミノ酸量を測定した(Fig. 5)。その結果、生肉に比較してカビを噴霧していない乾燥肉も各種遊離アミノ酸は増加し、なかでもAlaの増加が著しかった。しかし、さらにカビ発酵させることによって、17種類の遊離アミノ酸量の顕著な増加が認められた。発酵ハム100g当たり、Ileが140mgと最も多く、次いでAlaとGluが約120mgと高い値を示した。このように発酵ハム100g当たりでみると、同じ歩留りのコントロールに比較して、2~5倍と大きく増加した。しかし、一方ではGlnのように増加しないアミノ酸もあった。カビ発酵に伴い、Val, LeuおよびIleの筋肉で代謝される分岐鎖アミノ酸や、同じく筋肉で代謝されるAlaの有意な増加が認められ、スポーツ栄養の分野にも貢献できる可能性が示唆された。また、旨味に貢献するGluは、カビ発酵に伴って約3.2倍に増加したことから、発酵ハムはコントロールに比較して旨味の顕著な増加が推測された。さらに、今回製造した製品の官能

評価では、熟成風味発現と弾力性で高評価を受けた²⁰⁾。

鰹節製造におけるカビの役割は、水分の除去、脂肪の分解や香りの付与等の効果もあることや、4番カビまでカビ付けの操作を行うと本枯節と呼ばれる最終製品となることが報告されている²¹⁾。今回の実験では、カビ付けは1番カビのみであったが、今後の課題としては、発酵ハムを製造する際に2番カビ、3番カビまで繰り返してカビ付けをし、必要以上の乾燥を制御しながら、その効果をさらに向上するような試みを行いたい。さらに、発酵ソーセージの製造にもカビ付け効果を適用して発酵食肉製品の開発研究を行うことにより、食肉の消費拡大に貢献したい。

以上、日本独自の有用菌株である鰹節優良カビ菌「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」を利用して、塩漬した豚肉を発酵させ、さらに乾燥・熟成させることで、機能性ペプチドや遊離アミノ酸の増加、高い血圧上昇抑制活性と抗酸化作用も有し、しかも凝縮された濃厚な旨味が付与された発酵生ハムを作製できることが明らかになった。

4. 要 約

本研究は、日本独自の有用菌株の鰹節カビ菌である「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」を利用して、生ハムを発酵させ、生理活性機能と旨味が付与された、市場にはまだ存在しない新規な発酵食肉製品を開発する目的で行った。

豚肩ロース肉を塩漬後、鰹節菌を噴霧し、20℃、湿度85%の条件下でカビを発生させた。さらに18℃、湿度65%の条件下で歩留り70%、60%、50%になるまで熟成、乾燥させた。それらのpH、水分含量、水分活性、ACE阻害活性、抗酸化活性および遊離アミノ酸分析等を行った。鰹

節菌の噴霧後4日でカビの発生が認められ、10日で全面がカビで被覆された。歩留りが70%、60%および50%になるまでに、それぞれ14日間、32日間および84日間に要した。いずれの製品もpHは約6位で水分活性は0.89以下を示した。いずれのカビ発酵生ハムにも、製品の発酵・乾燥に伴う熟成過程で産生される高い血圧上昇抑制効果や抗酸化活性などの生理活性機能が認められた。また、カビ発酵に伴い、Val, LeuおよびIleの筋肉で代謝される分岐鎖アミノ酸や、同じく筋肉で代謝されるAlaの有意な増加が認められ、スポーツ栄養の分野にも貢献できる可能性が示唆された。また、旨味に貢献するGluがカビ発酵に伴って顕著に増加し、旨味成分の凝縮された発酵ハムが製造された。

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, 東京, 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) 六車三治男: 高機能発酵食肉製品の開発, 科学研究費助成事業研究成果報告書, 2013.
- 13) 岡田雅人, 宮崎崎: タンパク質実験ノート抽出と分離精製, 羊土社, 東京, 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) 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, 東京, 146~152, 2007.
- 18) 六車三治男, 木本早紀, 川北久美子, 竹之山愼一: 平成26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, 33, 30~38, 2015.
- 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.
- 20) 六車三治男, 木本早紀, 川越聖人, 川北久美子, 竹之山愼一, 中村豊郎: 鯉節菌によるカビ発酵ハムの熟成風味発現について, 日本畜産学会第121回大会講演要旨集, p258, 2016.
- 21) 藤井建夫: 魚の発酵食品, 成山堂書店, 東京, 126~129, 2005.

豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす影響

Effects of porcine liver powder on intestinal environment and lipid metabolism

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[®]) 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[®] on animals with high serum total cholesterol. In gene analysis, it was found that Liver Hi[®] decreased monoacylglycerol acyltransferase and diacylglycerol acyltransferase genes which are related to synthesis of triglyceride. In 6 of 8 cases with serum total cholesterol, the levels of serum total cholesterol were decreased when Liver Hi[®] was administered. These data suggest that Liver Hi[®] has a potency as a new functional food.

1. 目 的

厚生労働省の平成25年「国民健康・栄養調査」によると、男性で28.6%、女性20.3%が肥満という結果である。男性の場合、40代では34.9%と実に3人に1人が肥満という結果である¹⁾。肥満は高血圧、脂質異常症、高血糖等の生活習慣病を引き起こすことがよく知られている²⁾。そのため肥満を改善することは、健康な生活を送るうえで極めて重要であり、国にとっても医療費削減の大きな要因の一つととらえられている。

肥満を改善するには、食事、運動、喫煙等の生活習慣の改善の他、医薬品の投与による内科的治療もあるが、軽度の場合には、日常の食生活に機能性を付加することで余分な中性脂質を効率よく

調節できる機能性食品（ヘルスフード）の摂取も注目すべき改善方法として重要であると考えられる。さらには近年、犬・猫等のペットにおいても、その飼育頭数の増加に伴い肥満は増加しており、人間同様に機能性食品素材への関心・ニーズが高まっている。

筆者らは、過去2年間において、肥満に関する機能性食品として、「豚レバーパウダー」を研究してきた。その結果、豚レバーパウダーを摂取することにより、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という結果を得た³⁾。このことより、同パウダーは脂質代謝改善効果を有する有望な機能性食品素材となる可能性が高まった。また、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³⁾。すなわち、中性脂肪値の改善効果を有する可能性が示された。さらにHepG2ヒト肝癌細胞を用いた遺伝子解析の結果、豚レバーパウダーは肝細胞のLDLレセプターの発現を亢進させることが明らかとなった⁴⁾。LDLレセプターの発現の亢進は、肝臓におけるLDLの吸収を増加させることを意味し、これまでの*in vivo*試験結果を裏付けるものとなった。

本研究では、豚レバーパウダーの生体への影響をより詳細に検討するため、*in vitro*実験下でのHepG2細胞の中性脂肪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証した。さらに自然発症の脂質代謝異常を有する犬猫に対して豚レバーパウダーを投与し、その効果を検証した。

2. 方 法

2.1 *in vitro*実験（遺伝子発現解析）

HepG2細胞（ 2.5×10^5 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（未処理区）および、本培地に0.75mMオレイン酸（オレイン酸区）、オレイン酸+豚レバーパウダー

（レバーHi、最終濃度2.0mg/ml）、レバーHi区に交換し、さらに2日間培養を続けた。総RNAはTotal QuickGene RNA cultured cell kit S（富士フイルム株式会社）を用いて回収し、鋳型cDNA合成はPrimeScript 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は常法に従って行った。目的遺伝子の発現量は、GAPDHに対する相対発現量で表し、未処理の区を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、コレステロール値（T-Cho）が高値であった8例を対象とした。8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に中性脂肪合成系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ではほとんど変化がなかった。いっぽう、オレイン酸+レバーHi群では、モノグリセリドをジグリセリドに変換する合成酵素であるMGAT-1、MGAT-2、MGAT-3

Table 1 Summary of case

Case	Breed	Age (year)	Sex	Body weight (kg)	Dose (/day)
1	Papillon	14	Female	6.0	1.0
2	L Retriever	12	Female	31.6	3.0
3	Chihuahua	10	Female	4.5	0.5
4	Papillon	12	Female	1.5	0.5
5	T Poodle	2	Female	2.0	0.5
6	Chihuahua	8	Male	5.5	0.5
7	M Schnauzer	12	Male	7.5	2.0
8	Bernese Mountain Dog	7	Male	28.0	1.5

Table 2 Expression of each gene

Gene	Un-treated	oleic acid	oleic acid + Liver-Hi
monoglyceride→diglyceride			
MGAT-1	100.0 ± 4.8	111.0 ± 12.3	69.7 ± 5.2
MGAT-2	100.0 ± 11.9	98.7 ± 8.9	52.4 ± 1.9
MGAT-3	100.0 ± 9.8	88.7 ± 12.9	100.9 ± 2.6
diglyceride→triglyceride			
DGAT-1	100.0 ± 5.4	93.3 ± 2.0	40.9 ± 2.0
DGAT-2	100.0 ± 12.5	93.2 ± 18.6	37.1 ± 1.5

MGAT, monoacylglycerol acyltransferase ; DGAT, diacylglycerol acyltransferase

のうち、MGAT-1、MGAT-2の発現はそれぞれ未処理群を100.0%として69.7および52.4%と有意に低下していた。MGAT-3については変化はなかった。

またジグリセリドをトリグリセリドに変換する合成酵素であるDGAT-1、DGAT-2の発現はそれぞれ未処理群を100.0%として40.9および37.1%と有意に低下していた。

以上より、レバーHiは中性脂肪合成系遺伝子であるMGAT-1、MGAT-2、DGAT-1、DGAT-2の発現を抑制することで、中性脂肪の合成を抑制することが判明した。中性脂肪の減少はHDL-Cの増加を誘発させることが知られている。HDL-Cの増加はLDL-Cの減少の誘因となる。つまり、本結果はこれまでに明らかとなっているレバーHiによるLDL-C減少の作用メカニズムの一つとして、肝臓でのトリグリセリドへの変換抑制も関与していることを示唆している。

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T-cho濃度をTable 3, Fig. 1に示した。その結果、血中T-cho値は8例中6例で減少した。残りの2例は上昇がみられた。上昇がみられた2例はいずれも原疾患として肝疾患を有していた。特にT-cho値の上昇とともに肝酵素の上昇も確認された。したがって、肝臓でのHMG-CoA還元酵素の活性がより上昇したた

Table 3 Result of T-cho level

Case	Pre	Post
1	274	212
2	229	301
3	160	173
4	164	144
5	387	274
6	450	428
7	419	410
8	313	286

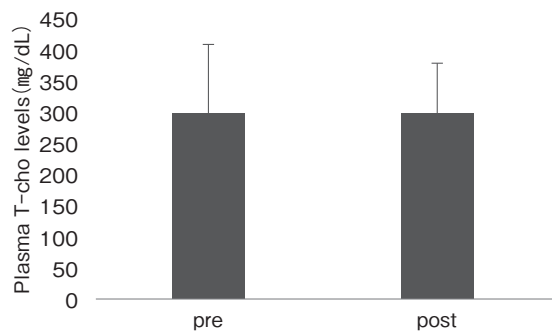


Fig. 1 Results of the plasma T-cho levels
Date are presented mean ± SD

め、T-cho値も上昇した可能性が考えられる。T-cho値が減少した6例ではコレステロール上昇が胆泥症に関連するとみられるもの3例、原因不明3例であった。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を摂取することによ

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・脂肪変性の減少を確認している³⁾。今回の結果から、レバーHiは自然発症の高コレステロール血症に対しても有効であることが示唆された。

以上、本研究の結果は、実際の脂質異常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、中性脂肪合成系遺伝子

であるMGAT-1, MGAT-2, DGAT-1, DGAT-2の発現が低下することが判明した。また、実際の脂質異常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7割において脂質異常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。

参考文献

- 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) 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.
- 4) 岡本芳晴:平成26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, 33, 97~100, 2015.

機能性食肉の開発を目指した「身体に効く成分」 の分析

Analysis of the “ingredients that have effects on the body” in order to
develop potential meat-based functional foods

加治屋 勝 子
(鹿児島大学農学部)

Katsuko Kajiya
(Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

In addition to the westernization of our diet and the decrease in opportunities to exercise, we are steadily becoming a truly aging society, and the number of people who have contracted vascular disease, as well as the ones who are susceptible to it, is increasing. Thus, prevention of vascular diseases is an urgent issue in terms of national health. On the other hand, in the prefecture of Kagoshima that boasts of the 2nd largest production of green tea in the country, it is expected to take a more proactive stance to consume green tea more effectively. To develop functional meat products, we used green tea, which is effective in the prevention of cardiovascular diseases. Research done so far suggests that the ingredients of green tea that remain inside the meat may exhibit various physiological effects inside the bodies of people who have ingested the meat. In addition, due to the acceleration in the metabolism of animals that have ingested green tea, an improvement can be expected in the quality of meat even during the summertime when their appetite declines. It is necessary to solve the problem of disposing the large amount of tea dregs expelled during the processing of tea. This will lead to proactive use of food industry waste. With the goal of developing functional meat in mind, we were able to obtain results beyond what was projected in this research by analyzing the “ingredients that have effects on the body”, but since this includes some unpublished data, we would like to request you to understand that we cannot reveal part of the results. From here on, we look forward to an industry involving the use of the new ingredients, the creation of products, their commercialization, and the revitalization of the region.

1. 目 的

高血圧や動脈硬化などの循環器疾患の悪化は、我が国死因の上位を占める脳梗塞や心筋梗塞を引き起こす¹⁾。食の欧米化や運動機会の減少に加え、本格的な高齢化社会に突入し、循環器疾患の罹患

者および予備群の人口は増加の一途をたどっており「いかに予防するか」が国民衛生上の緊急課題である。我々は、病気になった後にしか処方されない医薬品ではなく、病気になる前から摂取可能な食品成分こそが健康長寿社会を支えと考え、長年、循環器疾患を対象とした機能性予防成分の

探索や作用機構の解明を行ってきた。これまでに、突発する血管異常収縮（血管攣縮）の予防成分として魚油由来のエICOSAペンタエン酸を発見し、高付加価値化した機能性食品として上市したほか、血管弛緩作用を有するペプチドおよび血管弛緩剤に関する特許を出願するなど、多数の成果をあげてきた²⁻¹⁰⁾。

他方、個々の食材に含まれている機能性成分を探索・同定し、これらを抽出して作製した機能性食品よりも、高機能性の自然食材を摂取する機会を増やすことこそが、より豊かな食生活を創造し食意識を高める、という考えに至った。しかしながら、一食材だけでは総摂取量を増やすことが困難であるため、高機能成分を含む新たな自然食材の構築に挑み、日々の料理、加工品、惣菜に使うことで「食事として」の機能性成分の総摂取量増加を目指すことが理想的である。これまでに、日本人向けに新たな栄養基準を設定した血圧改善食として、食物繊維やミネラルを多く摂取するメニューを開発し、ヒト介入試験において、血圧の改善作用に加えて、体重減少や血糖値の低下、メタボリックシンドロームの改善にも繋がる成果を報告している¹¹⁾。

我々の研究グループでは、機能性成分を含む食肉の開発を目指しており、産業動物を用いて機能性成分の体内分布解析を行っている。本研究で

は、機能性成分としてカテキン含量の多い鹿児島県産緑茶品種「べにふうき」(Fig. 1 a)を用いて、体内吸収量を明らかにすることを目的とする。緑茶には、抗酸化性、抗菌性、抗ウイルス性、血糖上昇抑制効果、血圧上昇抑制効果、整腸作用、消臭効果、ガン予防効果等をはじめ、循環器疾患に対する高い予防効果が報告されている。そのため、食肉中に残存した緑茶成分が、食肉を摂取したヒトの体内で多彩な生理機能を発揮する可能性が高い。特に、一般的な緑茶品種「やぶきた」には含まれず、「べにふうき」に高濃度で含まれるメチル化カテキン類は、抗アレルギー効果等の機能性が報告されており、緑茶を摂取する動物本体の代謝を促進することで、食欲が衰える夏場でも肉質の向上が期待できる。産業動物としては、鹿児島県で飼養頭数が多い豚の産業化を念頭におき、実験動物としてミニ豚 (Fig. 1 b) を利用する。本研究では、新たな機能性食肉を創出するための基礎データを蓄積し、新たな食材の活用、製品化、商品化に関する産業ならびに地域の活性化へ貢献することを最終目標としている。

2. 方法と結果

我々の研究グループでは、長年にわたり緑茶カテキン類の生理活性利用に関する研究を行っており、緑茶カテキン類の生理活性機構解明を目的と

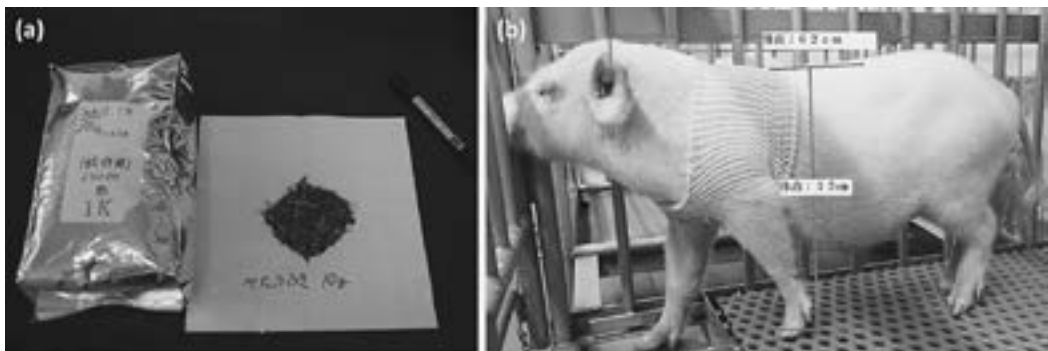


Fig. 1 The photos of the green tea, Benifuki, (a) and the miniature swine (b).

して、物理化学的手法によりカテキン類の細胞膜中における存在量や存在位置、配向性などを世界で初めて明らかにした^{12, 13)}。その成果は、論文賞の受賞や、構造生物学・動的構造学の最新研究が特集されるSpectroscopy NOWにおいて最も注目すべき論文として掲載されたことから当該分野の関心の高さがうかがえる。一方、豚冠状動脈を用いて、突然死の主要原因である血管異常収縮の病的経路を遮断する成分を天然物から突き止め、学術新聞「メディカル・トリビューン誌」に掲載され、日本生理学会誌の表紙でも特別解説されており、循環器疾患を対象とした予防成分の探索・同定においても多数の成果をあげている^{2~11)}。本研究においても、これまでの研究手法を応用し、体内吸収量を明らかにするための成分分析を実施した。

2.1 特殊飼料の作成

緑茶に含まれるカテキン類は酸化されやすいため、摂取直前に緑茶葉と一般飼料を混合し、特殊飼料とした。なお、緑茶葉に対するミニ豚の嗜好性を確認したところ、豚は雑食性であるため餌に緑茶葉を混合しても、一般飼料のみの食餌量と差異はなかった。ただし、一般飼料に占める緑茶葉量が多くなり過ぎると下痢を起こすことから、豚の嗜好性と体調を重視して緑茶葉の摂取量を設定した。

2.2 採血カテーテル挿入および管理

本研究では、クラウン系ミニ豚、5ヵ月齢、15kgを用い、実験期間中のミニ豚の身体状況、下痢・便秘、食餌摂取量変動等について管理した。また、長期にわたり定期的な採血が必要となるため、ミニ豚の頸静脈に採血カテーテルを挿入留置した。カテーテルの挿入は、ミニ豚搬入後に環境適応期間を設け、一定期間飼育した後に実施した。

2.3 採血

緑茶摂取前に3日間連続して採血し、コント

ロールとした。緑茶摂取開始1日目は、摂取後1, 3, 5時間後に採血し、その後は2, 3, 4, 5, 8, 15日目に採血した。緑茶摂取終了後は、体内残存率を調べるため、緑茶摂取終了1, 7日目に採血した。なお、鹿児島県産緑茶品種「べにふうき」の対照実験として、一般的な緑茶品種「やぶきた」摂取群も設定し、同様に採血した。

2.4 成分分析

緑茶葉に含まれる栄養素ならびに機能性成分について、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて定量した (Fig. 2)。また、ミニ豚から採血した血液は質量分析計付きHPLC (LC/MS) により分析し、体内動態評価を行った。さらに、一般的な血液生化学検査 (白血球: WBC, ヘモグロビン: Hb, 血小板: Plt, 腎機能: Cre, 肝機能: AST, ALT) についても実施し、コントロール群 (pre) と特殊飼料群 (1st, 2nd) の比較を行った (投与実験1回目の結果抜粋, Fig. 3)。

3. 考 察

本研究では、一般に知られている栄養素だけではなく、機能性成分として注目されているカテキン類やカフェイン等についても網羅的に分析を行い、緑茶中に含まれるこれらの成分の体内吸収量を明らかにすることができた。また、ミニ豚は、ヒトに近い代謝系を持つ動物であり、形態学的、生理学的な類似性から医学、生物学、免疫学、薬理学、再生医療等の分野において広く利用されている。近年、ミニ豚は飼育管理や遺伝的コントロールの容易さから、産業動物の発生や代謝の分野においても活用されている。ミニ豚と一般的に知られている食用豚との違いはサイズだけであり、性周期、寿命などの生理的な特徴はほとんど違いがない。そのため、ミニ豚を用いた体内代謝に関する情報は、機能性食肉の開発に貢献でき、さらに、機能性食肉を摂取することでヒトの循環

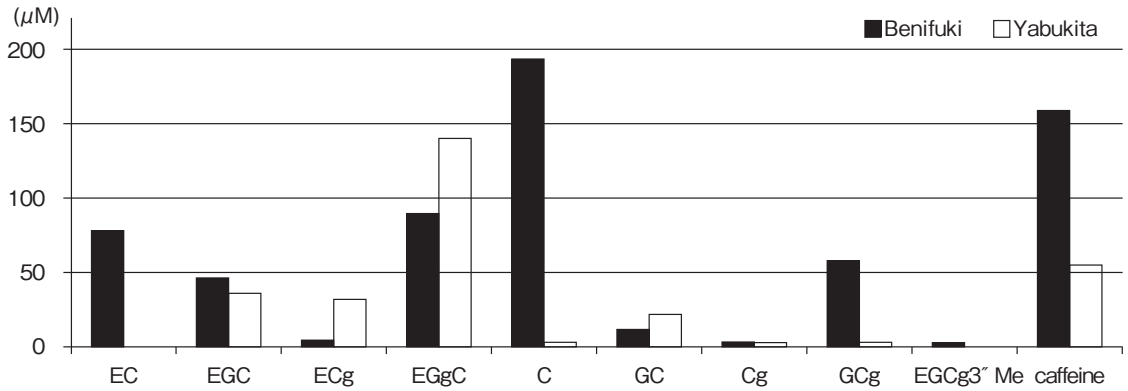


Fig. 2

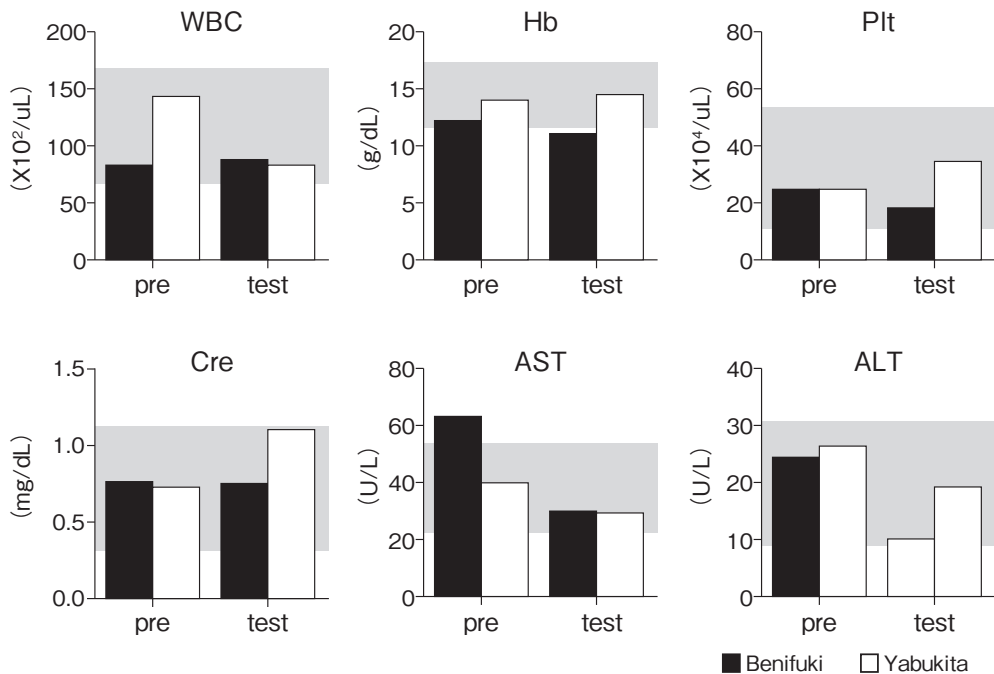


Fig. 3

器疾患の予防に活用することが期待できる。加えて、食肉そのものの香りや色が向上する可能性が期待され、食肉の販売促進に繋がる。

4. 要 約

食の欧米化や運動機会の減少に加え、本格的な高齢化社会に突入し、循環器疾患の罹患者および予備群の人口は増加の一途をたどっており、いか

に予防するかが国民衛生上の緊急課題である。一方、緑茶生産量全国2位を誇る鹿児島県では、緑茶の消費向上に繋がる積極的な活用が期待されている。我々は、循環器疾患予防効果を持つ緑茶を用いた機能性食肉の開発を最終目的としている。これまでの研究により、食肉中に残存した緑茶成分が、食肉を摂取したヒトの体内で多彩な生理機能を発揮する可能性があるだけでなく、緑茶を摂

取る動物個体の代謝を促進することで食欲が衰える夏場でも肉質の向上が期待できることを明らかにしてきた。本研究では、機能性食肉の開発を目指した「身体に効く成分」の分析を行うことで、幸いにも本研究では予想以上の成果が得られたが、未発表データを含んでいるため一部は公表できないことをご了承いただきたい。今後、新たな食材の活用、製品化、商品化に関する産業ならびに地域の活性化に期待したい。

文 献

- 1) 厚生労働省人口動態調査 (平成26年確定数)
- 2) Xu, D., Kishi, H., Kawamichi, H., Kajiya, K., Takada, Y., Kobayashi, S. : *FEBS Letters*, **581**, 5227~5233, 2007.
- 3) Kishi, H., Kawamichi, H., Kajiya, K., Kobayashi, S. : *Folia Pharmacologica Japonica.*, **129**, 245~251, 2007.
- 4) Takada, Y., Tokumori, D., Kishi, H., Kawamichi, H., Kajiya, K., Guo, F., Xu, D., Wang, C., Matsuo, S., Ookouchi, M., Kobayashi, S. : *The Journal of Physiological Science*, **58**, S212, 2008.
- 5) 加治屋勝子, 岸博子, 川道穂津美, 小林誠 : 血管医学, メディカルレビュー社, **43**, 25~32, 2008.
- 6) Kajiya, K., Kishi, H., Kobayashi, S. : *Experimental and Clinical Cardiology*, **14**, 24, 2009.
- 7) 加治屋勝子 : フードリサーチ (食品研究社), **661**, 36~38, 2010.
- 8) Xu, D., Kishi, H., Kawamichi, H., Kajiya, K., Takada, Y., Kobayashi, S. : *Cellular Signaling*, **24**, 282~289, 2012.
- 9) Kajiya, K., Kishi, H., Takada, Y., Zhang, Y., Kimura, T., Miyanari, K., Hagihara, H., Kobayashi, S. : *Food and Food Ingredients Journal of Japan*, **217**, 284~288, 2012.
- 10) 加治屋勝子 : 化学と生物, **50**, 269~276, 2012.
- 11) Kawamura, A., Kajiya, K., Kishi, H., Inagaki, J., Mitarai, M., Oda, H., Umemoto, S., Kobayashi, S. : *Hypertension Research*, **39**, 1~9, 2016.
- 12) Kajiya, K., Kumazawa, S., Nakayama, T. : *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, **65**, 2638~2643, 2001.
- 13) Kajiya, K., Kumazawa, S., Naito, A., Nakayama, T. : *Magnetic Resonance in Chemistry*, **46**, 174~177, 2008.

血中トリプトファン濃度とうつ状態との関連 ：双極性と単極性の鑑別を目指して

Relationship between plasma tryptophan concentration and depression :
for discrimination bipolar and monopolar depression

堀 宏治・富岡 大・葉梨 喬広・高尾 哲也*・清水 史子*・高田 明和**
(昭和大学横浜市北部病院メンタルケアセンター, *昭和女子大学生活科学部, **NPO法人 食と健康Project)

Koji Hori, Hiroi Tomioka, Takahiro Hanashi, Tetuya Takao*, Fusako Shimizu*
and Akikazu Takada**

(Showa University Northern Yokohama Hospital, *Department of Human Health and Design, Showa Women's University,
**International Projects on Food and Health (NPO))

We measured plasma tryptophan (Trp) and their metabolites in 7 depressive patients with bipolarity. Plasma Trp level in patients was lower than that in controls and the ratio of kynurenine (K)/Trp were higher. In addition, the level of plasma serotonin (5-HT) plasma was not detected in 5 cases, but 5-HT was detected in two cases among 7 patients. From these results we considered that K system that is related to pro-inflammation system were enhanced in depressive state, and it was thought that degradation of 5-HT by this was related to depressive state. However, because the cases that metabolism to 5-HT were kept in some cases, administration of antidepressant agent mainly SSRI caused enhancement of 5-HT for these cases adversely. We consider that determination of plasma 5-HT was thought to predict the patients who were lead to the manic state or instability of diseases by antidepressant agent.

1. 目 的

本研究は、トリプトファン (Trp) ないしその代謝産物の測定が抗うつ薬治療によるうつ状態の症例の躁転ないしうつ状態の遷延化を予測できるか否かを調べることである。また、可能ならどの因子が躁転ないしうつ状態の遷延化と関連するかを調べることである。

2. 方 法

対象は“うつ状態”を呈して、昭和大学横浜市

北部病院メンタルケアセンター（当院当科）を受診した、または通院中の7症例である。7症例につき、性、教育歴、発症時年齢、検査時年齢、うつ状態の重症度、bipolarityの有無、検査時の治療の有無を調べた。また、一か月以内の摂取カロリー量などの食事量を推測するために、食事票を記入してもらったが、これは現在計算中であり、今回の解析には間に合わなかった。

うつ状態の重症度については、自己評価式のうつ状態評価法であるSAS (Self Assessment for Depression) を用いた。本評価法は計20項目につ

き、症状の重症度を0～4にわたり採点し、合計得点でうつ状態の重症度を評価するものである。当院当科ではうつ症状を呈する症例に対してSASを施行しており、診断および薬剤効果の目安にしている。本検査に当たっては当院当科で著作権料を支払っている。

Bipolarityとは直接双極性障害（躁うつ病）や躁状態と関連した症状ではないが、躁うつ病に準じた治療をすべきとされる、いわば“躁うつ病傾向”ともいべき症状である。過去の報告から、躁うつ病との関連が深い、生来の気質（循環気質ないし発揚気質）ないしは躁うつ病やうつ病の遺伝歴をもってbipolarityありとしている。最近、認知症における行動心理学的症候（問題行動のこと。BPSD, behavioral and psychological symptoms of dementia）とbipolarityが関係すると言われている。我々もBPSDとbipolarityが関係していることを報告した¹⁾。このため、認知症であり、BPSDが認められた患者を家族歴にもつ症例についても遺伝歴があるbipolarityとした。

また、全症例につき検査時に肝機能、腎機能などの臨床検査とあわせて、血漿検体を2 ml余分にいただき、Trpおよびその代謝産物の測定を行った。当院当科では初診時および抗精神病薬の投薬後、投薬の良否を検討する一環として採血、心電図を施行しているが、採血の負担を考慮し、これらの採血時に研究用採血を行った。Trpおよびその代謝産物の測定は島津製作所に依頼し、同社で高速液化クロマトグラフィー法にて施行した。

7症例のTrpおよびその代謝産物の比較を以前我々が報告した若年正常女性群および中高年正常男性群（コントロール群）との比較を行った。今回は症例数が少ないために対象群との統計比較は行わず、主観的に検査結果の解釈を行った。

本研究は昭和大学横浜市北部病院の倫理委員会の承認を受けた。また、研究対象者には研究の目

的主旨、匿名性の維持、研究に伴う不利益を十分説明したうえで文書による同意を得た。その後、採血測定項目を追加したため、追加申請を受け、口頭での再同意を得た。

3. 結果と考察

コントロール群と比較し、全7症例においては血漿Trp濃度およびキヌレニン (K)/Trpの比率は低下していた。また、全7症例の中2例にのみセロトニン (5-HT) を血漿中に検出し、他の5症例は5-HTが検出しえなかった。本2症例の血漿Trp濃度は他の5症例のそれと比較し、低下していた。また、本2症例はいずれも若年の女性症例である。

今回の研究から2点が明らかになった。

まず、第一に全7症例のTrp濃度およびK/Trp比率はコントロール群と比較し、高値であった。最近、うつ状態ないしはうつ病に関してTrp代謝と関連した炎症系の賦活化がその原因ではないかと示唆されている²⁾。具体的には食物より摂取したTrpが脳内に移行し、移行したTrpが5-HTに代謝され、この5-HTが神経細胞の伝達物質として作用しているが、この5-HTが減少することがうつ状態、うつ病の症状出現の原因となっているとする考え方である。うつ病のモノアミン減少仮説は古くからあり、この仮説から脳内の5-HTを枯渇させるレセルピンによりうつ病が誘発されること、現在の抗うつ薬の多くが5-HTなどのモノアミンの再取り込み阻害薬ないしは代謝酵素の阻害薬であることである。この5-HTが減少する原因としてTrpが炎症系であるK系のほうにより多く代謝されるためであるとされるようになり、このために、5-HTが減少すると考えられるようになった。つまり、うつ状態ないしはうつ病は5-HT系と関係した炎症系の亢進がその病態であり、主に5-HTを増加させる5-HT選択性再取り込

み阻害薬（SSRI）などの抗うつ薬がその病態である5-HTの低下を改善させ、シナプス間隙内の5-HTを増加させることによりうつ状態を改善させるとする考え方である。今回の結果はこれを支持する形となった。

一方、K/Trp比率の向上により、より低下していると考えられる5-HT値は全7症例の平均値は低下しており、このこともTrp代謝と関連した炎症系の賦活化が関係していると示唆されている。このために、Trpの血中濃度は低下していると考えられる。実際、全7症例中5症例においては、血漿中に5-HT値は検出されなかった。逆に、全7症例中2症例で測定しえた。つまり、本2症例においては5-HTを増加させる抗うつ薬を投与することは逆にシナプス内の5-HTを必要以上に増加させてしまう可能性があるということである。最近、抗うつ薬の投与がactivation syndrome、自殺企図の増加など衝動性の亢進を引き起こす可能性が示唆され、特に、SSRIなどの抗うつ薬を投与すべきでないと考えられるようになった。また、基盤にbipolarityの存在する症例については抗うつ薬の投与がかえってうつ状態を遷延化させ、躁転させてしまうことが指摘されるようになった。このことから、うつ状態のみを呈する単極性うつ病とうつ状態と躁状態の2症状を交互に、あるいは同時に存在する双極性うつ病を明確に鑑別すべきと考えられるようになった。今回の我々の研究からうつ状態を呈しながら、5-HTが検出される症例の存在が認められ、かつこの2症例の5-HT濃度は低下しているものの、5-HT系への経路もTrpの供給が比較的保たれ、それによりさらにTrp濃度がより低下していることが予想される。したがって、こうしたことが単極性うつ病と双極性うつ病を鑑別する可能性があることを示す研究と考えた。

また、今回の2症例はいずれも若年の女性症例

である。このことは若年の女性症例に関しては安易に抗うつ薬を投与すべきでないことを示しているのかもしれない。実際、bipolarityや双極性障害のうつ状態は若年発症や躁うつ混合状態と関係しているとする報告が認められている^{3,4)}。今回の結果は、若年発症のうつ病ないしはうつ状態は双極性障害のうつ状態である可能性が高いことを示しており、若年発症のうつ状態の症例に関しては安易に抗うつ薬、特に5-HTを選択的に高めるSSRIを投与すべきでないことを示しているのかもしれない。

最後に、食物摂取の観点から考察する。最近、正常若年健常者に高Trp食を摂取させると抑うつや不安が軽快するとの報告があった⁵⁾。今回の我々の報告もこの報告を支持しているものと考えた。つまり、今回の2症例を除く5症例においては、5-HTを作成する材料であるTrpが低下しているために5-HTの産出が低下していることが予想される。こうしたことから、血漿5-HTが検出されない症例についてはTrpが多く含まれる食品を摂取することは望まれるものと考察した。また、血漿の5-HTを測定することが効率よく高Trp食の効果を引き出させるためにも必要であると考察した。

4 要 約

うつ状態で当院を受診した症例のTrpおよびその代謝産物の血漿中の濃度を測定した。若年女性ないし中高年男性のコントロール群と比較し、今回の症例においては5-HT/Kの比率は低下していた。このことはTrpが炎症系であるK系のほうにより多く代謝されるため、5-HTが減少することを示すものであると考えた。また、全7症例中2症例において5-HTが検出された。このことは、本2症例は抗うつ薬を投与することは逆にシナプス内の5-HTを必要以上に増加させてしまう可能

性があるということである。以上のことから、血漿の5-HTを測定することは躁転や activation syndromeを引き起こしうる症例の鑑別に適していると考えた。

文 献

- 1) Tanaka, H., *et al.* : *Brain Disord Ther*, 3 : 5, 2014.
- 2) Ogawa, S., *et al.* : *J Clin Psychaitry*, 28 ; e906-e915, 2013.
- 3) Takeshima, M., *et al.* : *J Affect Disord*, 147 ; 150-155, 2013.
- 4) Nishi, A., *et al.* : *Indian J Psychiatry*, 57 ; 392-396, 2015.
- 5) Lindseth, G., *et al.* : *Arch Psychiatric Nur*, 29, 102-107, 2015.

<http://dx.doi.org/10.4172/2168-975X.1000144>

食肉および家畜の微生物制御に資する乳酸菌由来抗菌ペプチドの探索

Screening and characterization of antimicrobial peptides produced by lactic acid bacteria for microbial control of meat and livestock

善 藤 威 史

(九州大学大学院農学研究院)

Takeshi Zendo

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

Safe antimicrobial agents are being required for various purposes such as food preservation. Lactic acid bacteria (LAB), which are generally considered as safe microorganisms, contribute to preservation of fermentation foods and have been found to produce various antimicrobial substances including antimicrobial peptides, bacteriocins as well as organic acids such as lactic acid. This study aimed to obtain effective LAB bacteriocins to control undesirable microorganisms in meat and livestock. First various isolation sources including healthy cow were screened for bacteriocin-producing LAB, and 10 isolates were found to show bacteriocin-like antimicrobial activity. Out of the isolates, strain MC1, showing the highest bacteriocin activity, was selected for further characterization. A bacteriocin was purified from the culture supernatant of strain MC1 by some chromatographic steps. Analyses of the purified peptide by ESI-TOF MS and Edman degradation determined the molecular mass to be 5220 and identified the N-terminal sequence with 20 residues to be almost identical to enterocin L50A. In addition, PCR-sequencing analysis using various primer sets for reported enterocins indicated that strain MC1 possesses structural genes of enterocins L50A, L50B and P and produces them. These bacteriocins show antibacterial activity against *Listeria* and some Gram-positive bacteria, indicating that they are effective on microbial control of meat and livestock. In further work, in addition to the enterocins produced by strain MC1, bacteriocins produced by the other isolates will be characterized for their structures and antimicrobial activity to evaluate their effectiveness for microbial control of meat and livestock.

1. 目 的

食品の保存にはさまざまな保存料が用いられているが、従来用いられてきた合成保存料には健康への影響が懸念されており、生物由来の天然の保存料の利用が広がっている。中でも、乳酸菌が生

産する抗菌ペプチドであるバクテリオシンは、ヒトに対する毒性がなく、体内や環境中において分解されやすく、耐性菌が出現しにくいといった特性から、人体そして環境に優しく安心して使用できる抗菌物質として注目され、安全な食品保存料として期待されている。

乳酸菌が生産するバクテリオシンは、一般のタンパク質と同様にしてリボソーム上で合成されるペプチドである。その構造・特性は多様で、ボツリヌス菌やセレウス菌、黄色ブドウ球菌、リステリア菌などの食中毒菌・病原菌に対して強い抗菌作用を示すものもある。一般に標的細菌に瞬時に作用し、体内および環境中で容易に分解されるペプチドであり、かつ安全性の高い乳酸菌によって生産されることから、乳酸菌バクテリオシンは非常に高い安全性を有している。この安全性を基盤として、乳酸菌バクテリオシンは食品保存料のみならず、殺菌消毒剤や口腔ケア剤などへの応用も試みられ、医療や畜水産分野など、安全な抗菌剤が求められるあらゆる分野に広がってきている^{1, 2)}。

実際に、乳酸菌*Lactococcus lactis*の一部の株が生産するナイシンAは世界50ヶ国以上で食品保存料として実用されており、日本においても2009年に食品添加物の指定を受け、食品保存料としての利用が広まりつつある。ナイシンAは広い抗菌スペクトルと強力な抗菌活性を有する優れたバクテリオシンであり、きわめて汎用性が高い。しかし、一方では、ある種の微生物に対してはナイシンAよりも優れた効果を発揮する乳酸菌バクテリオシンも報告されている³⁾。したがって、特性の異なるさまざまなバクテリオシンの中から、目的とする食品や微生物によって最適な特性をもつものを選択し利用することで、より効果的な微生物制御の実現が期待される。そこで本研究は、食肉および家畜の微生物制御に有効な新奇乳酸菌バクテリオシンを探索し、その特性を明らかにすることを目的とした。バクテリオシンの利用対象から有効なバクテリオシン生産乳酸菌が分離される例が多いことから、とくに健康な家畜等を分離源としてバクテリオシン生産乳酸菌の分離を試みた。

2. 方 法

2.1 乳酸菌の分離

牛などの家畜の糞便、野菜・果実等の植物、土壌、サイレージなど、計37の試料を分離源として乳酸菌の分離を試みた。まず、乳酸菌用の培地であるMRS培地もしくはM17培地に分離源を添加し、30℃もしくは37℃で2日間静置し、集積培養を行った。次に、集積培養後の培養液を0.5%の炭酸カルシウムおよび1.5%の寒天を添加した炭酸カルシウム含有MRS寒天プレートに塗布し、集積培養時と同じ30℃もしくは37℃で2日間培養した。乳酸などの酸生産によって周辺の炭酸カルシウムを溶解しているコロニーをMRS液体培地に釣菌し、分離株とした。得られた分離株について、カタラーゼ活性試験、バクテリオシン活性試験を行った。以降の実験でバクテリオシン生産が認められた分離株については、16S rRNA遺伝子の配列解析を行い、菌種を同定した。

2.2 バクテリオシン活性試験

バクテリオシンによる抗菌活性は、Direct法およびSpot-on-lawn法にて試験した。Direct法では、MRS寒天プレート上に分離株を穿刺して一晚培養し、分離株のコロニーを形成させた後、検定菌を混釈したLactobacilli Agar AOAC培地(LAA培地)を重層してさらに一晚培養し、分離株コロニー周辺での生育阻止円の形成を観察した。Spot-on-lawn法では、MRS寒天プレートに検定菌を混釈したLAA培地を重層したものに、分離株のMRS培養液上清を滴下して一晚培養し、生育阻止円の形成を観察した。Spot-on-lawn法は、バクテリオシンの精製や特性の解析時の抗菌活性試験にも用いた。必要に応じて、精製試料等を滅菌水で2倍ずつに段階希釈したものを試験し、抗菌活性の強度を評価した。検定菌には、これまでの研究で乳酸菌バクテリオシン高感受性菌

として選抜された種々のグラム陽性菌を用いた。

2.3 バクテリオシンの精製

前培養したバクテリオシン生産乳酸菌を1 LのMRS培地に接種し、16時間静置培養した。遠心分離によって得た培養液上清中のバクテリオシンを疎水性吸着剤であるAmberlite XAD-16（シグマ）に吸着させ、活性画分として回収した。さらに、陽イオン交換クロマトグラフィー、Resource RPC逆相カラム（GEヘルスケア）を用いた高速液体クロマトグラフィー（HPLC）により、バクテリオシンを活性画分として精製した。

2.4 バクテリオシンの構造解析

エレクトロスプレーイオン化飛行時間型質量分析計（ESI-TOF MS）を用いて、精製されたバクテリオシンの分子量を測定した。また、プロテインシーケンサーを用いて、エドマン分解によって、N末端アミノ酸配列を解析した。得られた情報から、類似のアミノ酸配列を有すると予想される既知のバクテリオシン構造遺伝子に特異的なプライマーを構築し、PCRによってバクテリオシン構造遺伝子を取得した。得られた増幅断片のシーケンス解析を行い、バクテリオシン構造遺伝子の塩基配列情報から、バクテリオシンの全アミノ酸配列の決定を試みた。

3. 結果と考察

3.1 バクテリオシン生産乳酸菌の分離

家畜の糞便をはじめとするさまざまな分離源から、集積培養を経て、269株の酸生産菌を得ることができた。それらについて、Direct法で抗菌活性試験を行ったところ、48株にバクテリオシン様の抗菌活性が認められた。さらにSpot-on-lawn法によって、この48株の抗菌活性試験を行ったところ、牛の糞便より分離された10株に強いバクテリオシン様の抗菌活性が確認された。これら10株はいずれも他の乳酸菌と同じくカタラーゼ陰性で

あった。

これら10株の中から、最も強い抗菌活性を示したMC1株を選択し、以降の解析を行うこととした。MC1株のMRS培養液上清は、用いたグラム陽性の検定菌に広く抗菌活性を示した（Table 1）。16S rRNA遺伝子配列解析の結果、MC1株は乳酸菌の一種である*Enterococcus faecium*に分類されることが明らかとなった。

3.2 バクテリオシンの精製・構造解析

MC1株のMRS培養液上清から、種々の液体クロマトグラフィーを用いて、バクテリオシンを精製した。最終的に、逆相HPLCによって抗菌活性を示す精製バクテリオシンを得ることができた（Fig. 1）。この精製画分をESI-TOF MSで分析したところ、本バクテリオシンの分子量は5220であった（Fig. 2）。さらに、エドマン分解によってN末端アミノ酸配列を解析したところ、全体的にやや信頼度が低かったものの20残基の配列が得られ、その配列はエンテロシンL50Aのものと完全に一致した（Fig. 3）⁴⁾。エンテロシンL50Aの分子量は5218であることから^{4,5)}、MC1株が生産するバクテリオシンはエンテロシンL50Aと同一と推察された。

これまでに報告のあるエンテロシンL50A生産株は、同時に類似の配列をもつエンテロシンL50B（Fig. 3）やエンテロシンPなどを同時に生産することが知られている^{5,6)}。そこで、エンテロシンL50A、L50B、P、およびさらに14種の*Enterococcus*属由来バクテリオシンに特異的なプライマーを構築し、MC1株から抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCRを行ったところ、エンテロシンL50A、L50B、Pの3種にのみ、増幅が確認された。各増幅断片を精製し、DNA配列解析を行ったところ、エンテロシンL50A、L50B、Pの構造遺伝子である*entL50A*、*entL50B*、*entP*の配列と完全に一致した。

Table 1 Antimicrobial spectrum of the culture supernatant of *Enterococcus faecium* MC1

Indicator strain	Antimicrobial activity
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	+++
<i>Micrococcus luteus</i> NBRC 12708	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	+
<i>Pediococcus pentosaceus</i> JCM 5885	+
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	+
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> ATCC 19435 ^T	++
<i>Lactobacillus sakei</i> ssp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	+

More + indicates higher activity ; - indicates no activity.

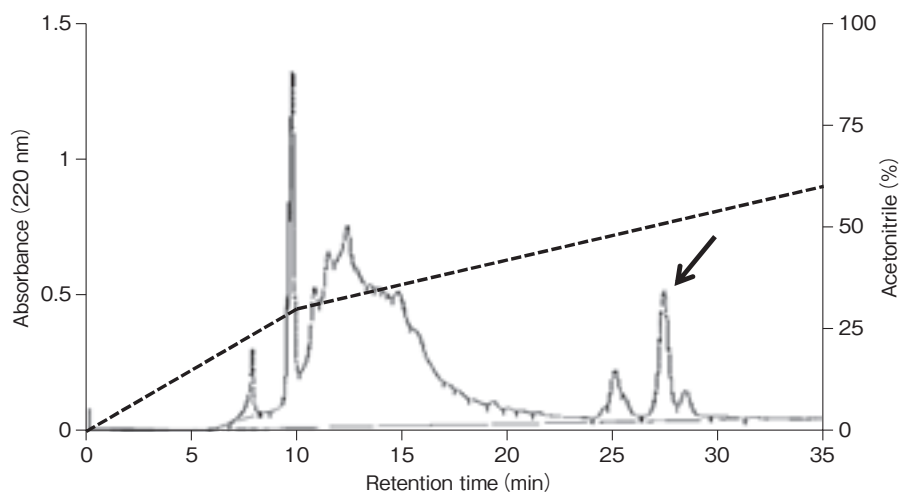


Fig. 1 Reverse phase chromatography profile of a bacteriocin produced by *E. faecium* MC1. Dotted lines indicate the gradient of acetonitrile. An arrow indicates the peak showing bacteriocin activity.

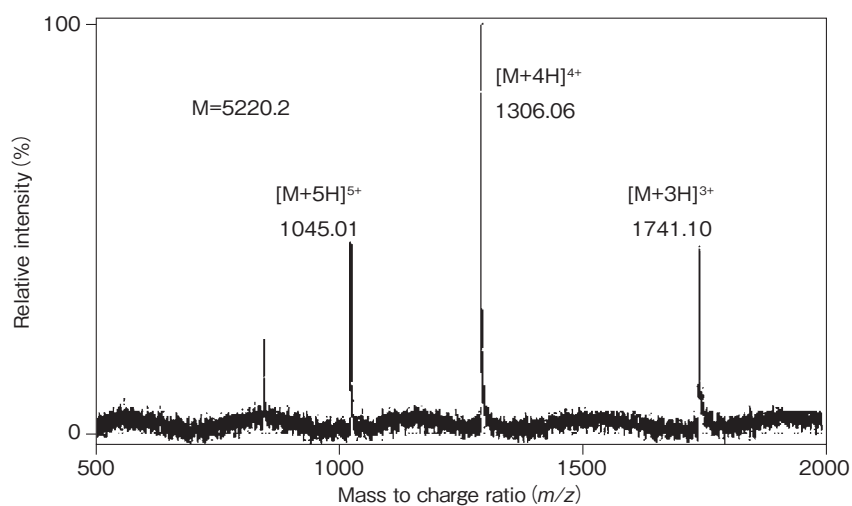


Fig. 2 Electrospray ionization time-of-flight mass spectrum of a purified bacteriocin from *E. faecium* MC1. Multiple charged ions detected are indicated.

	1	10	20																	
MC1	M	G	A	I	A	K	L	V	A	K	F	G	X	P	I	V	X	K	Y	Y
enterocin L50A	M	G	A	I	A	K	L	V	A	K	F	G	W	P	I	V	K	K	Y	Y
enterocin L50B	M	G	A	I	A	K	L	V	T	K	F	G	W	P	L	I	K	K	F	Y

Fig. 3 Alignment of N-terminal amino acid sequences of a bacteriocin from *E. faecium* MC1 and enterocins L50A and L50B. Twenty N-terminal amino acid residues were obtained by Edman degradation of a purified bacteriocin from *E. faecium* MC1. X of MC1 bacteriocin indicates residues that were not identified by Edman degradation. Identical residues in more than two bacteriocins are shaded.

以上より、MC1株はエンテロシンL50Aを生産することが明らかとなった。さらに、エンテロシンL50BおよびPの遺伝子を有しており、これらも同時に生産している可能性が示唆された。MC1株からのエンテロシンL50Aの精製時に得られた活性ピークの前後のピークにも微弱な抗菌活性が認められており、それらがエンテロシンL50BおよびPに由来する可能性もある。

3.3 エンテロシンL50A, L50B, Pの特性

エンテロシンL50AとL50Bは類似した一次構造を有しており、その抗菌スペクトルも類似している⁴⁾。グラム陽性菌全般に広い抗菌スペクトルを示し、Table 1の結果にも示したように、肉製品の汚染菌となる*Listeria*属細菌にも抗菌活性を示す。また、エンテロシンL50AとL50Bは相乗的に作用し、さらに強力な抗菌活性を示すことが知られている。一方、エンテロシンPは、エンテロシンL50AやL50Bよりも狭い抗菌スペクトルをもち、*Enterococcus*属細菌などに限定的な抗菌活性を示す⁵⁾。エンテロシンL50A, L50B, P生産株はサイレージからの分離例もあり⁶⁾、サイレージの雑菌汚染を防いで保存性を高めつつ、サイレージを摂取する牛の健康への寄与も考えられる。

このように、MC1株による生産あるいは生産の可能性が認められた3種のバクテリオシンは、新奇の構造をもつものではなかったものの、食肉や肉製品の汚染菌の一部に対して抗菌活性を示すものであった。MC1株の培養液上清には、グラ

ム陰性菌にも抗菌活性を示す乳酸も多く含まれると考えられ、これらの相乗的・相加的な作用によって、食肉や家畜の汚染微生物を効果的に制御できる可能性がある。

4. 要 約

近年、食品の保存をはじめとするさまざまな分野に安全な抗菌物質が求められている。安全性の高い微生物である乳酸菌は種々の発酵食品の保存性の向上に寄与しており、乳酸等の有機酸をはじめ、抗菌ペプチドであるバクテリオシンなど、さまざまな抗菌物質を生産することが知られている。そこで、食肉や家畜の微生物制御に有効な乳酸菌由来バクテリオシンを探索することとし、まずさまざまな分離源からバクテリオシン生産乳酸菌の探索を行った。とくに健康な牛などを分離源として分離を試みたところ、10株のバクテリオシン様抗菌物質生産株が得られ、その中で最も強い抗菌活性を示した*E. faecium* MC1を選抜し、バクテリオシンの精製・構造解析を行った。種々の液体クロマトグラフィーによって精製バクテリオシンが得られ、その分子量は5220で、エンテロシンL50Aと同じN-末端アミノ酸配列を有することが明らかとなった。さらにバクテリオシン構造遺伝子のPCR・シーケンス解析によって、MC1株はエンテロシンL50A, L50B, Pの3種のバクテリオシンを生産していることが示唆された。これらのバクテリオシンは、*Listeria*属細菌等に抗菌

活性を有することから、食肉や家畜の微生物制御に有効と考えられた。今後、他の分離株が生産するバクテリオシンも併せて、構造や抗菌作用の解析を進め、食肉や家畜の微生物制御への有効性を検証したい。

文 献

- 1) 善藤威史, 石橋直樹, 園元謙二 : 乳酸菌学会誌, **25**, 24~33, 2014.
- 2) Perez, R.H., Zendo, T., Sonomoto, K. : *Microbial Cell Factory*, **13**, S3, 2014.
- 3) Zendo, T. : *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, **77**, 893~899, 2013.
- 4) Cintas, L.M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P.E., Nes, I.F., Håvarstein, L.S. : *Journal of Bacteriology*, **180**, 1988~1994, 1998.
- 5) Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Håvarstein, L.S., Holo, H., Hernández, P.E., Nes, I.F. : *Journal of Bacteriology*, **182**, 6806~6814, 2000.
- 6) Izquierdo, E., Bednarczyk, A., Schaeffer, C., Cai, Y., Marchioni, E., Van Dorsselaer, A., Ennahar, S. : *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **52**, 1917~1923, 2008.

成長期女子スポーツ選手の食事摂取状況と畜産物由来 ヘム鉄摂取の有効性についての検討 ～特に貧血予防とメンタルヘルスに及ぼすヘム鉄の 影響に着目して～

The study of dietary intake status and effectiveness of heme iron intake
derived from animal products with growing girls sports player

吉川 豊・坂元 美子

(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)

Yutaka Yoshikawa and Yoshiko Sakamoto

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

We measured the blood hemoglobin estimate and the body composition of girls football players with endurance. Moreover, we used heme-iron supplement derived from animal production for girls football players and measured the body composition, effects on nutrient intake, and effects on spirits by using Profile of Mood States (POMS) test. Consequently, when we administrated the heme-iron supplement derived from animal production for the anemia girls football players, they improved the anemia states. However, only intake of the heme-iron supplement derived from animal production did not change the body composition or spirits. Intake of supplement corresponding to the nutrition intakes will be capital importance.

1. 目 的

心身ともに発育期である高校生にとって、健全な精神と肉体を育てるための手段としてスポーツを行うことは重要である。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にも、ビタミンや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。適切な食事量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、鉄欠乏性貧血など様々な障害の要因になる。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、頭痛、めまい、耳鳴りなどがあげられる¹⁾。赤血球の寿命は通常約4か月であり、骨髓幹細胞で新しく作られることにより常に一定に保たれている。しかし、壊れてしまう赤血球の数が新しく作られる数を上回ると、血液中の赤血球数が減少し、貧血が引き起こされることとなる。

運動時における鉄の役割は、ヘモグロビンによる酸素運搬だけではなく、筋肉中のミオグロビン

による細胞内への酸素の取り込みや、ヘム鉄として含有されているシトクロム電子伝達系におけるATP産生への影響、スーパーオキシドジスムターゼを代表とする活性酸素分解タンパク質の構成要素としての働きが特に重要であり、スポーツ選手の貧血は貧血の症状と同時に、競技能力の低下をもたらすことが問題視されている。特に持久系の運動の場合、エネルギーを作り出すために、グルコースを燃焼させ、その後、脂肪や筋肉中のグリコーゲンがエネルギー源として利用される。このエネルギーの産生には酸素が必要であり、このとき全身に酸素を運ぶことがヘモグロビンの役割でもある²⁾。つまり、貧血状態になり、ヘモグロビン量が低下すると、運搬される酸素量も減少することになり、持久力の低下を引き起こし、試合の終盤で取り返しのつかない判断ミスを引き起こすことにつながりかねないといわれている。

スポーツ貧血が起こる原因として、鉄やたんぱく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の破壊による赤血球膜構造の可塑性の低下、発汗や尿・便などによる損失が報告されている³⁾。特に成長期の女子選手では、月経による失血が加わって貧血を増長し、スポーツ貧血やエストロゲンの低下による月経障害も問題視されている。通常では貧血の指標（ヘモグロビン値、ヘマトクリット値、血清鉄、総鉄結合能、血清フェリチン値など）が正常値であっても、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、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る。また、貧血予防や改善を食品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のみであり、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に頼らざるを得ない。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、本研究では、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推定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を行い、それと同時に心理テスト（POMS心理テスト）による心理状態、特に疲労感との関係性を調査し、貧血予防やスポーツ選手の理想的な体組成と栄養摂取状況、心理的状況との関連を検討することを目的とした。さらに、発育期女子スポーツ選手の畜産物由来ヘム鉄摂取の必要性を検討するため、3か月間のヘム鉄サプリメント（IIS(株)より供与）の摂取を行い、その効果と心理状態の間関係性を検討することもあわせて実施した。

2. 方 法

本研究の調査対象は、兵庫県の高校サッカー部に所属し、すべての測定を行うことができた女子部員20名。対象チームは、全国大会での優勝経験を持つ高いレベルのチームである。

栄養摂取状況調査：対象者に、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した。エネルギー・栄養素摂取量は栄養計算ソフトエクセル栄養君Ver.7（健帛社）を用いて算出した。エネルギー摂取量の基準値は日本人の食事摂取基準2015年版⁴⁾の身体活動レベル3とし、たんぱく質（P）、脂質（F）、炭水化物（C）はPFC比率15：25：60で算出した。ビタミン、ミネラルについては、推奨量が設定されている栄養素（ビタミンA、B₁、B₂、ナイアシン、ビタミンB₆、B₁₂、葉酸、ビタミンC、カルシウム、マグネシウム、リン、鉄、亜鉛、銅、セレン）は

推奨量を、それ以外の栄養素（ビタミンD, E, K）は目安量とした。

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推定値を測定した。

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。

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。

気分プロフィール検査（POMS心理テスト）：緊張（Tension-Anxiety）・抑うつ（Depression-dejection）・怒り（Anger-Hostility）・活気（Vigor）・疲労（Fatigue）・混乱（Confusion）の6因子が同時に測定できる心理テストPOMS（Profile of Mood State）⁵⁾により、栄養摂取状況調査と同時期の心理状況を調査した。

調査方法：試合数が増加し始める7月に、研究の目的と内容を説明し、同意を得たうえで、食事調査を行い、食事調査と同じ日の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。同時に対象選手の身体計測、ヘモグロビン推定値測定、POMS心理テストによる心理状況調査を行った。また、上記調査の後、7月から畜産物由来ヘム鉄サプリメント3.5 mg/日（2%鉄分含有ヘム鉄使用）を、3か月間摂取させた後、同様の調査を行った。

統計処理：結果は平均値±標準偏差で示した。2群間の検定には対応のないt検定を、4群間の検定には一元配置分散分析を用いて多重比較検定を行った。解析にはIBM SPSS（ver.19）を用い、 $p < 0.05$ を統計学的に有意とした。

本研究は、神戸女子大学人間を対象とする研究倫理委員会（承認番号H27-7）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別体組成の変化とエネルギー・栄養素摂取量の比較

サプリメント非摂取群を1群、摂取群を2群としてヘモグロビン推定値と身長、体重、体組成の3か月後の変化をTable 1に、エネルギー消費量とエネルギー、栄養素摂取量をTable 2に示す。ヘモグロビン推定値、身長、体重、体組成に群間での有意差は見られなかったが、体重で、サプリメント摂取群が増加傾向にあった。筋肉量は摂取群よりも非摂取群の方が減少しており、脂肪量は非摂取群の方が多く増加していた。鉄の摂取量については、サプリメント摂取群はサプリメント摂取量を差し引くと食事からの摂取量として2群とも同じ程度摂取量が増加していた。どちらの群も、3000キロカロリーを大幅に超えるエネルギーを消費しているにもかかわらず、摂取エネルギーは2400キロカロリー前後と少なく、特にたんぱく質と炭水化物は摂取量が減少しているうえに基準値を下回っている。このことから、サプリメントを摂取することによって鉄の摂取量は基準値を満たすことができている、スポーツ選手の体組成を正常に維持、増加させるためには、必要な量のエネルギー摂取と、理想的なPFCバランスの食事を摂ることが必要であることが示唆された。

3.2 サプリメント摂取と心理テストによる気分の変化

POMS心理テストは、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

Table 1 The blood hemoglobin (Hb) concentration and physical situation of the target persons

	Age (years)		Hb (g/dl)		Height (cm)		Body weight (kg)		Intracellular concent (l)								
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post							
group1 (n = 11)	15.9±0.9	12.6±1.0	12.9±1.2	0.2±0.7	NS	158.2±4.2	158.7±4.0	0.5±0.6	NS	55.0±4.1	55.0±4.0	-0.1±0.8	NS	20.5±1.6	20.0±1.4	-0.6±0.7	NS
group2 (n = 9)	15.9±0.8	12.4±0.8	12.8±1.2	0.4±1.1	NS	156.1±3.1	156.6±3.2	0.5±0.7	NS	49.0±3.2	49.6±2.8	0.7±1.0	NS	18.8±1.1	18.7±1.1	-0.1±0.3	NS
	Extracellular water concent (l)		Skeletal muscle mass (kg)		Amount of body fat (kg)		BMI		Body fat percentage (%)								
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post							
group1 (n = 9)	12.0±0.8	11.7±0.7	-0.3±0.3	NS	24.8±2.1	24.0±1.9	-0.7±0.9	NS	10.3±2.6	11.5±2.6	1.2±1.4	NS	18.6±4.1	20.8±3.9	2.2±2.5	NS	
group2 (n = 9)	11.0±0.6	10.8±0.5	-0.1±0.3	NS	22.6±1.5	22.4±1.4	-0.2±0.5	NS	8.8±1.5	9.0±2.0	0.1±2.9	NS	16.1±3.4	18.0±3.6	2.0±1.6	NS	

Values are represented as mean ± SD.
NS : not significant

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

	Energy consumption (Cal)		Energy intake (Cal)		Protein (g)		Fat (g)		Carbohydrate (g)		Potassium (mg)		Calcium (mg)		Magnesium (mg)		Phosphorus (mg)		Iron (mg)		Zinc (mg)		Copper (mg)	
	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post	pre	post
group1 (n = 11)	3437±352	3092±404	2337±639	2341±469	84.2±20.2	82.6±13.1	62.6±24.3	79.6±22.4	350.6±98.0	310.7±69.0	2871±840	2733±741	662±281	564±188	274±86.0	256±61	1202±323	1209±208	8.0±2.6	10.1±2.9	10±2	11±2	1.2±0.4	1.3±0.3
group2 (n = 9)	-345±807	3409±353	3±563	2450±376	-1.6±20.9	93.1±10.5	16.9±13.5	72.8±15.5	-40.0±109.5	346.0±61.6	-148±97.5	3461±392	835±209	322±45	322±45	1371±127	6±273	1371±127	2.1±2.4	96±2.3	11±1	11±1	0.0±0.5	1.3±0.3
Reference	14±479	3423±252	66±556	2515±552	-2.3±19.1	90.8±16.3	16.0±20.9	88.8±23.7	-20.6±100.4	325.4±72.9	-1545±989	1916±1243	813±187	276±70	276±70	1378±224	8±263	1378±224	5.5±3.4	15.1±2.6	1±3	1±3	0.0±0.4	1.3±0.3
	2550	2550	2550	2550	95.6	95.6	70.8	70.8	382.5	382.5	2100	2100	650	650	310	310	900	900	10.5	10.5	8	8	0.8	0.8
	Selenium (mg)		Vitamin A (μgRAE)		Vitamin D (μg)		Vitamin E (mg)		Vitamin K (μg)		Vitamin B1 (mg)		Vitamin B2 (mg)		Niacin (mg)		Vitamin B6 (μg)		Vitamin B12 (μg)		Folic acid (μg)		Vitamin C (mg)	
group1 (n = 11)	79±26	79±21	713±304	3552±2416	2.9±2.4	3.6±3.6	6.0±1.9	6.7±2.8	300±225	214±112	1.3±0.5	1.3±0.3	1.4±0.4	1.7±0.4	33±7	32±6	1.6±0.4	1.5±0.5	5.5±4.2	13.2±6.2	372±131	601±264	181±121	165±131
group2 (n = 9)	95±22	90±16	939±91	4864±1626	3.0±1.0	3.0±1.0	6.9±1.4	6.9±1.4	357±118	357±118	1.6±0.4	1.6±0.4	1.7±0.3	2.1±0.3	-2±11	-2±11	-0.1±0.7	-0.1±0.7	7.7±8.2	7.7±8.2	229±192	453±95	227±84	161±71
Reference	-5±22	-5±22	3925±1675	3925±1675	-0.3±1.4	-0.3±1.4	-0.1±1.9	-0.1±1.9	-110±137	-110±137	-0.3±0.5	-0.3±0.5	0.4±0.4	0.4±0.4	-1±9	-1±9	-0.1±0.6	-0.1±0.6	12.0±5.8	12.0±5.8	257±245	257±245	-66±117	100

Values are represented as mean ± SD.
**p<0.01 vs control group (Student's unpaired t-test).

Table 3 Effect of heme iron supplement on the 'Profile of Mood States (POMS)'

	group1 (n = 11)			group2 (n = 9)			P
	pre	post	Δ	pre	post	Δ	
Tension-Anxiety	46±7	44±7	-2±6	46±9	48±10	2±4	NS
Depression-Dejection	49±9	48±7	-1±7	47±8	49±13	2±7	NS
Anger-Hostility	51±10	51±7	1±6	51±8	50±12	-1±8	NS
Vigor	51±11	49±9	-3±9	57±11	51±13	-6±8	NS
Fatigue	50±9	49±8	0±4	44±8	44±9	0±3	NS
Confusion	48±9	46±7	-2±7	51±13	48±12	-3±8	NS

Values are represented as mean ± SD.

NS : not significant

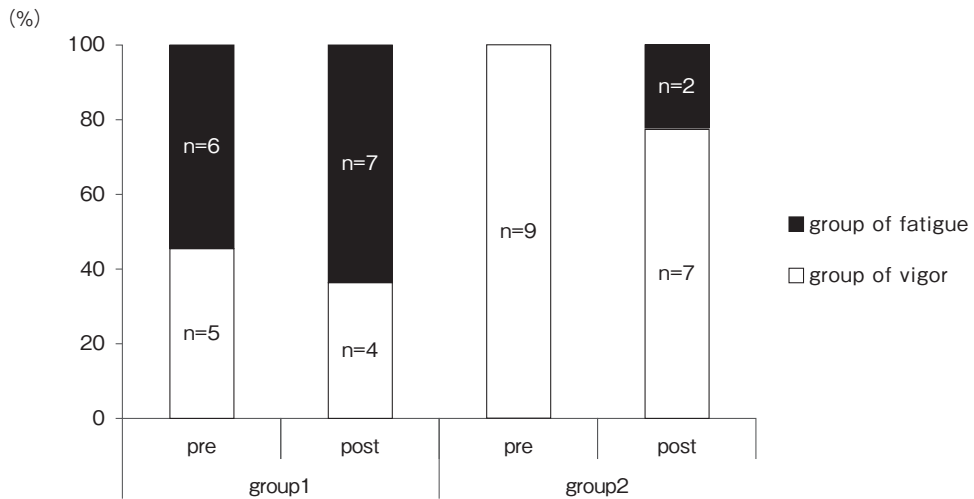


Fig. 1 Effect of heme iron supplement on the 'Profile of Mood States (POMS)'

ツ現場で利用されている⁵⁾。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⁶⁾ことから、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われている。サプリメント非摂取群を1群、サプリメント摂取群を2群としてPOMS心理テストの気分の変化をTable 3に、6つの気分尺度のうち、活気尺度 (Vigor) よりも疲労尺度 (Fatigue) の方が低い群を活気群 (Vigor)、疲労尺度よりも活気尺度の方が低い群を疲労群 (Fatigue) として各群の人数をFig. 1に示す。群間では有意な差は見られなかったが、2群でサプリメント摂取後の活気の尺度が最も大

きく低下した。さらに、活気群と疲労群での検討では、1群、2群ともに3か月後に活気群の減少が見られた。今回の調査では、気候の変化や全国大会に向けての試合数の増加などの要因が、サプリメント摂取による気分の変化よりも心理状態に大きく影響を及ぼしていることが考えられ、サプリメント摂取による気分の変化の考察にはいたらなかった。しかしながら、サプリメントの介入の時期や期間を再考し調査を行うと気分尺度への影響も現われてくることが予想されるため、引き続き調査・検討が必要である。

Table 4 The blood hemoglobin (Hb) concentration, energy consumption, energy intake, and nutritional intake of the target persons

		Hb	Energy consumption	Energy intake	Protein	Fat	Carbohydrate	Iron	
		(g/dl)	(Cal)	(Cal)	(g)	(g)	(g)	(mg)	
group1	A	pre	11.5	3632	2209	82.9	50.3	340.3	6.3
		post	11.2	2810	2444	80.5	63.7	328.8	5.8
		Δ	-0.3	-822	235	-2.4	13.4	-11.5	-0.5
	B	pre	11.2	3203	1412	47.1	42.4	199.6	4.9
		post	11.6	3330	2473	93.3	70.4	355.8	9.2
		Δ	0.4	127	1061	46.2	28	156.2	4.3
group2	C	pre	11.8	3793	2751	94.7	71.6	423.2	10.3
		post	11.5	3694	3204	111.9	129.9	388.4	18.7
		Δ	-0.3	-99	452	17.2	58.2	-34.8	8.4
	D	pre	11.5	3105	2272	95.6	58.8	332.9	8.2
		post	12.3	3076	2199	79.6	73.4	295.7	12.9
		Δ	0.8	-29	-73	-16.1	14.6	-37.2	4.7
	E	pre	11.2	3605	2740	95.7	106.2	317.3	7.7
		post	12.2	3509	3659	122.3	124.6	477.9	15.7
		Δ	1.0	-96	919	26.6	18.4	160.6	8
Reference			2500	2500	95.6	70.8	382.5	10.5	

3.3 貧血と推定される選手のエネルギー充足と栄養素摂取量

介入前の測定において貧血と推定されるヘモグロビン推定値である12 g/dl未満の選手は5名であった。それぞれの選手のヘモグロビン推定値とエネルギー消費量、エネルギー摂取量、栄養素摂取量をTable 4に示す。3か月後にヘモグロビン推定値が貧血の推定値から改善された選手はサプリメント摂取群の2名であった。改善が認められなかったTable 4中のCの選手はサプリメント摂取前から鉄の摂取量が多いが、ヘモグロビン推定値が低いことから、ヘム鉄サプリメントで鉄の摂取量を増加させても、効果的に吸収されていないか体内で利用されていないことが考えられる。一方、サプリメント非摂取群の選手は、鉄の摂取量をはじめ、スポーツ選手として必要なエネルギー、栄養素摂取量を満たすことができず、貧血の改善にはつながらなかった。以上のことから、貧血と推定される選手が、ヘム鉄サプリメントを摂取することで、鉄の摂取量の基準値を

満たし、貧血が改善されることが期待できることが示唆された。

4. 要 約

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推定値と体組成を測定した。さらに、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を検討するための栄養調査、発育期女子スポーツ選手の畜産物由来ヘム鉄摂取の必要性を検討するための3か月間のヘム鉄サプリメントの摂取を行い、体組成の変化とエネルギー・栄養素摂取量への影響、ならびにPOMS心理テストを行うことにより、気分尺度への影響を調査した。その結果、サプリメントの摂取のみでは、スポーツ選手の体組成を正常に維持、増加させることは難しいことが分かり、気分の変化に対する影響も認められなかった。一方、貧血と推定される選手が、ヘム鉄サプリメントを摂取することで、鉄の摂取量の基準値を満たし、貧血が改善されるデータも得られており、栄養素

摂取量に応じたサプリメントの摂取が最も有効であることが示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 坂本静男：貧血，臨床スポーツ医学，26(一)，148～152，2009.
- 4) 厚生労働省策定：日本人の食事摂取基準〔2015年版〕の概要，<http://www.mhlw.go.jp/file/04-Houdouhappyou.../0000041955.pdf>，閲覧日2015/4/10
- 5) 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.
- 6) 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.

豚増体量に及ぼす暑熱ストレス耐性の遺伝的ばらつき の原因遺伝子を探る

Exploration of genes involved in genetic variation in heat stress tolerance
for growth rate of finishing pig

山田 宜永
(新潟大学農学部)

Takahisa Yamada
(Faculty of Agriculture, Niigata University)

Microarrays were used to investigate differences in skeletal muscle gene expression profiles among two finishing pig groups (high-tolerant and low-tolerant) with divergent heat stress tolerance for growth rate under heat stress conditions and control finishing pig group under non-heat stress conditions, in order to explore genes involved in genetic variation in heat stress tolerance for growth rate of finishing pig. A total of 1163 genes exhibited expression differences between control group and high-tolerant or low-tolerant groups and also between high-tolerant and low-tolerant groups, and 583 were upregulated and 580 downregulated in low-tolerant group as compared to high-tolerant group. Among these genes, we showed that a set of genes involved in oxidative phosphorylation pathway, for which the upregulated genes were over-represented, were coordinately upregulated in only low-tolerant group among the three pig groups. Further, we showed that *peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha (PPARGC1A)* and *fibroblast growth factor 21 (FGF21)* genes, which have been reported to have a role in the induction of expression of the genes involved in oxidative phosphorylation and the *PPARGC1A* gene, respectively, exhibited differential expression profile similar to the gene set. These results suggested that enhanced expression of the *FGF21* in response to heat stress in low-tolerant group might affect low heat stress tolerance for growth rate, as a trigger for heat stress-responsive activation of the *PPARGC1A*-regulated oxidative phosphorylation pathway. We thus identified the *FGF21* as a candidate for the gene responsible for genetic variation in heat stress tolerance for growth rate of finishing pig.

1. 目 的

近年の地球温暖化に伴い、豚においては、暑熱ストレスによる増体量の低下が深刻な問題となっている。そのために、暑熱ストレスによる増体量低下を抑制することが養豚業界の大きな課題と

なっている。これまでの肥育豚を用いた統計遺伝学的研究から、増体量に及ぼす暑熱ストレス耐性（暑熱耐性：暑熱環境下の増体量—適温環境下の増体量を指標とする）には個体間差がみられ、このような暑熱耐性のばらつきには遺伝的要因が関わるということが知られている¹⁾。このことから、

豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきの原因となるDNA変異やその近傍のDNA多型を、当耐性と関連する分子マーカーとして取り入れたDNA育種技術を確立し、高い暑熱耐性へ向けた遺伝的改良を行うことにより、暑熱ストレスによる増体量低下を永続的かつ経済的に抑制することができると考えられている。しかし、これまでの研究では、豚暑熱耐性と関連する分子マーカーは同定されておらず、このような分子マーカーの同定に必須な当耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子についての知見もえられていない。そこで、本研究では、肥育豚の最長筋を用いた発現プロファイリングにより、豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきと関連する暑熱ストレス応答性発現協調変動を示す分子パスウェイ（遺伝子セット）を同定し、このような分子パスウェイの上流に位置する（トリガーとなりえる）発現協調変動遺伝子を当耐性についての原因遺伝子の候補として同定することを目的とした。

2. 方法

2.1 サンプル

（ランドレース種×ラージホワイト種）×デュロック種の三元交雑種の平成26年4月上旬出生の雌豚を用いて、暑熱環境下での暑熱耐性にばらつきがみられ始める時点（平成26年8月上旬）での選抜により、当耐性が極端に高い個体5頭を高暑熱耐性群として、それが極端に低い個体5頭を低暑熱耐性群として作出した。暑熱耐性は暑熱環境下の増体量と適温環境下の増体量の差により評価した。また、三元交雑種の平成26年1月中旬出生の雌豚5頭を対照群として作出した。なお、3個体群の作出にあたって、血縁関係のない個体を用いた。さらに、選抜群については選抜時に、対照群については選抜群と同齢になる平成26年5月中旬に、最長筋を採取した。

2.2 マイクロアレイによる発現プロファイリング

採取した15個（3個体群×5個体）の最長筋サンプルからそれぞれトータルRNAを抽出した。抽出したRNAとT7 promoter付加オリゴdTプライマーを用いた逆転写により、二本鎖cDNAを合成した。合成した二本鎖cDNA、T7 RNA polymeraseおよびCy3-CTPを用いて、Cy3標識のアンチセンスcRNAを合成し、精製によりプローブを作製した。作製したプローブの定量、品質確認の後、プローブの断片化および豚マイクロアレイ（Agilent）へのハイブリダイゼーションを行った。スキャンニングによるハイブリダイゼーション画像データの読み取りおよびシグナルの数値化の後、GeneSpring GXプログラムを用いて、15個のアレイの間のばらつきを補正した各個体の遺伝子発現量を解析した。シグナル品質のフィルタリングをパスした補正遺伝子発現量に基づき、対照群と高暑熱耐性群の間または対照群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもち、かつ高暑熱耐性群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもつ遺伝子（豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきと関連する暑熱ストレス応答性発現変動を示す遺伝子）を検出した。

このような発現変動遺伝子について、Gene Cluster 3.0プログラムを用いた階層的クラスタ解析を行い、3個体群において発現が協調変動している遺伝子を選出した。このような発現協調変動遺伝子に相当するアレイ貼付の60mer塩基配列を用いた豚ゲノムデータベース、RefSeq RNAデータベースのBLAST検索、えられた遺伝子座名を用いたOrthoデータベースの検索により、ヒトオースログ遺伝子を同定した。同定したヒト遺伝子のアノテーション情報を用いて、発現協調変動遺伝子が集中する機能カテゴリーおよび分子パスウェイ（豚増体暑熱耐性の遺伝的ばらつきと関

連する暑熱ストレス応答性発現協調変動を示す機能カテゴリーおよび分子パスウェイ)を同定した。さらに、このような分子パスウェイの上流遺伝子を検索した。

2.3 リアルタイムPCRによる発現プロファイリング

このような上流遺伝子のゲノム配列情報に基づき、プライマーを設計した。また、上記の15個の最長筋サンプルから抽出したトータルRNAの逆転写によりcDNAを合成した。このようなプライマーおよびcDNAを用いたリアルタイムPCRにより、3個体群における上流遺伝子の発現パターンを解析した。リアルタイムPCRでは、EvaGreenをインターカレーションダイとしたトリプリケートでの解析を行い、内部標準として*GAPDH*遺伝子の発現レベルを用いた。さらに、合成cDNAの希釈系列を用いて上流遺伝子および*GAPDH*のそれぞれのPCR増幅効率を測定し、これらの増幅効率を利用した $\Delta\Delta Ct$ 法により各個体の上流遺伝子の発現量を解析した。このような解析により、上記で同定した分子パスウェイと同様な発現協調変動を示す上流遺伝子を同定した。

3. 結果と考察

マイクロアレイ解析により、3507個の遺伝子は、対照群と高暑熱耐性群の間または対照群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもっていた (Fig. 1)。こうして、これらの遺伝子は暑熱ストレス応答性発現変動を示す遺伝子に相当すると考えられた。また、1702個の遺伝子は、高暑熱耐性群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもっていた (Fig. 1)。1702個のうち533個の遺伝子は、対照群と高暑熱耐性群の間で発現変動をもつが、対照群と低暑熱耐性群の間では発現変動をもっていなかった (Fig. 1)。それらのうち570個の遺伝子は、対照群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもつが、対照

群と高暑熱耐性群の間では発現変動をもっていなかった (Fig. 1)。それらのうち60個の遺伝子は、対照群と高暑熱耐性群の間かつ対照群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもっていた (Fig. 1)。これらの結果から、計1163個 (533+570+60) の遺伝子は、豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきと関連する暑熱ストレス応答性発現変動を示す遺伝子に相当すると考えられた。1163個のうち583個の遺伝子は、高暑熱耐性群に比べ低暑熱耐性群で発現が増加しており、残りの580個の遺伝子は高暑熱耐性群に比べ低暑熱耐性群で発現が減少していた (Fig. 2)。

このような1163個の遺伝子のヒトアノテーション情報を用いて、発現が増加 (583個) または減少 (580個) する遺伝子が集中する機能カテゴリーを解析したところ、発現増加を示す遺伝子は、酸化的リン酸化のカテゴリーに集中していた。また、発現減少を示す遺伝子は、細胞増殖のカテゴリーに集中していた。酸化的リン酸化に関わる発現増加遺伝子のほとんどは、対照群と高暑熱耐性群の間で発現変動をもっていないが、それらの遺伝子のすべてが対照群に比べ低暑熱耐性群で発現が増加していた (Table 1)。つまり、酸化的リン酸化パスウェイに関わる遺伝子セットは、3個体群において低暑熱耐性群のみで協調的な発

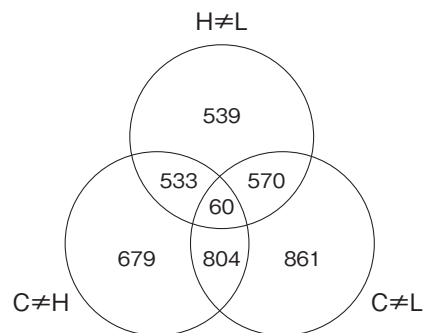


Fig. 1 Venn diagram of differentially expressed genes among three pig groups : C ; control, H ; high-tolerant and L ; low-tolerant

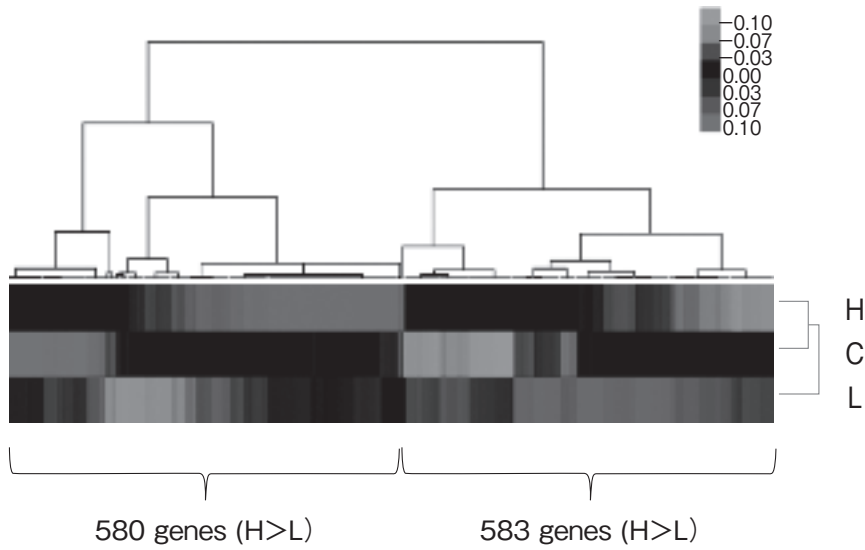


Fig. 2 Cluster analysis of the 1163 genes showing expression differences between control group and high-tolerant or low-tolerant groups and also between high-tolerant and low-tolerant groups : C ; control, H ; high-tolerant and L ; low-tolerant

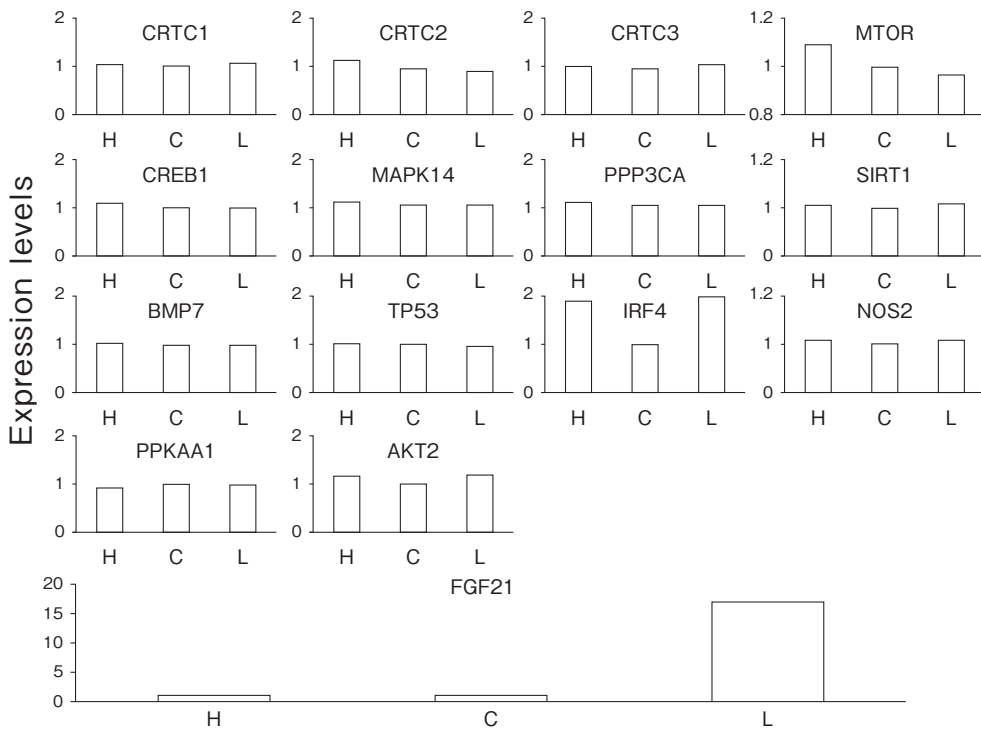


Fig. 3 Expression profile of upstream genes which have been known to have a role in the regulation of expression of the *PPARGC1A* gene : C ; control, H ; high-tolerant and L ; low-tolerant

Table 1 List of the genes involved in oxidative phosphorylation upregulated in low-tolerant group as compared to high-tolerant group

Gene symbol	Gene name	Fold change in expression in low-tolerant relative to high-tolerant	Fold change in expression in high-tolerant relative to control ^a	Fold change in expression in low-tolerant relative to control
<i>ATP5B</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, beta polypeptide	3.67	2.43	8.92
<i>ATP5C1</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial F1 complex, gamma polypeptide 1	2.04	1.12	2.29
<i>ATP5G1</i>	ATP synthase, H+ transporting, mitochondrial Fo complex, subunit C1 (subunit 9)	2.28	1.37	3.12
<i>COX8B</i>	cytochrome c oxidase subunit VIII-H (heart/muscle)	2.32	1.20	2.77
<i>NDUFA3</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 3, 9kDa	3.21	-1.59	2.02
<i>NDUFA6</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 6, 14kDa	2.86	1.70	4.84
<i>NDUFA11</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 alpha subcomplex, 11, 14.7kDa	2.51	1.29	3.24
<i>NDUFB6</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6, 17kDa	3.49	-1.71	2.05
<i>NDUFB8</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 8, 19kDa	2.74	2.12	5.79
<i>NDUFC1</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 1, 6kDa	3.21	-1.04	3.10
<i>NDUFC2</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1, subcomplex unknown, 2, 14.5kDa	2.78	1.19	3.30
<i>NDUFS4</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 4, 18kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	2.00	1.54	3.09
<i>NDUFS7</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)	3.12	1.33	4.15
<i>NDUFB3</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 3, 10kDa	2.04	1.31	2.66
<i>SDHA</i>	succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein (Fp)	4.12	-1.26	3.27
<i>SDHD</i>	succinate dehydrogenase complex, subunit D, integral membrane protein	2.09	1.20	2.50
<i>PPARGCIA</i>	peroxisome proliferator-activated receptor gamma, coactivator 1 alpha	2.39	1.09	2.60

^a The values with minus sign represent fold change in expression in control relative to high-tolerant

現増加を示した。さらに、酸化リン酸化パスウェイの活性化は増体量の低下と関連するということが報告されている²⁾。これらのことから、低暑熱耐性群では、酸化リン酸化パスウェイが低暑熱耐性と関連する暑熱ストレス応答性活性化を示すと示唆された。

PPARGC1A 遺伝子は、酸化リン酸化パスウェイに関わる遺伝子セットの発現を誘導することが知られている³⁾。そこで、*PPARGC1A* の3個体群における発現パターンをマイクロアレイにより解析したところ、酸化リン酸化パスウェイに関わる遺伝子セットと同様な発現プロファイル（低暑熱耐性群のみで協調的な発現増加）を示した（Table 1 と Fig. 3）。このような発現プロファイルはリアルタイムPCRにより確認された。暑熱ストレスは、ヒト培養筋衛生細胞およびマウスC2C12細胞において*PPARGC1A* の発現を増加させるということが報告されている⁴⁾。また、*PPARGC1A* のマウスでの過剰発現は、増体量の低下につながるということが報告されている⁵⁾。これらのことから、低暑熱耐性群では、*PPARGC1A* の暑熱ストレス応答性発現増加が、酸化リン酸化パスウェイの活性化に関与し、暑熱耐性の低下に影響すると示唆された。

PPARGC1A の発現を制御する上流遺伝子、*AKT2*, *BMP7*, *CREB1*, *CRTC1*, *CRTC2*,

CRTC3, *FGF21*, *IRF4*, *MAPK14*, *MTOR*, *NOS2*, *PPP3CA*, *PRKAA1*, *SIRT1*, *TP53* の3個体群における発現パターンをマイクロアレイにより解析したところ、*FGF21* 遺伝子⁶⁾ が、唯一3個体群間で発現変動を示し、*PPARGC1A* や酸化リン酸化パスウェイに関わる遺伝子セットと同様な発現プロファイル（低暑熱耐性群のみで協調的な発現増加）を示した（Fig. 3）。このような発現プロファイルはリアルタイムPCRにより確認された（Fig. 4）。暑熱ストレスは、ヒトにおいて*FGF21* の発現を増加させるということが報告されている⁷⁾。また、*FGF21* のマウスでの過剰発現は増体量を低下させるということが報告されている⁸⁾。したがって、低暑熱耐性群でみられる*FGF21* の暑熱ストレス応答性発現増加が、*PPARGC1A* を介した酸化リン酸化パスウェイ活性化のトリガーとなり、暑熱耐性の低下に影響すると示唆された。これらのことから、*FGF21* を、豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子の候補として同定した。*FGF21* と同じ*FGF*ファミリーに属する*FGF4* 遺伝子は、ホルスタイン種牛の泌乳量に及ぼす暑熱ストレス耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子の候補になるということが報告されている⁹⁾。この報告は、原因遺伝子の有力候補としての*FGF21* の同定を支持した。

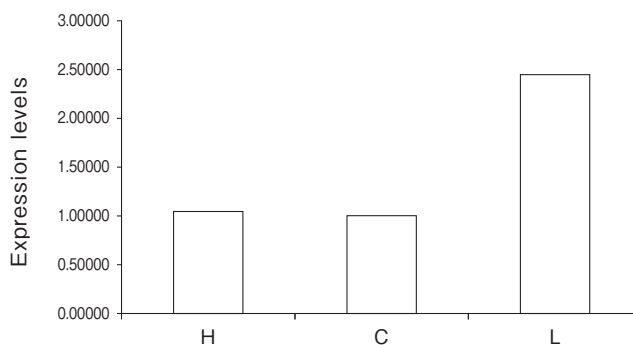


Fig. 4 Expression profile of the *FGF21* gene obtained by real-time PCR analysis : C ; control, H ; high-tolerant and L ; low-tolerant

4. 要 約

本研究では、豚増体量に及ぼす暑熱ストレス耐性（暑熱耐性）の遺伝的ばらつきの原因遺伝子を探索した。そのために、三元交雑種の肥育雌豚を用いて、暑熱環境下において暑熱耐性が極端に異なる選抜群（高低暑熱耐性群）、適温環境下の対照群を作出し、これら3個体群の最長筋について発現プロファイリングを行った。1163個の遺伝子が、対照群と高暑熱耐性群の間または対照群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもち、かつ高暑熱耐性群と低暑熱耐性群の間で発現変動をもつ遺伝子として同定された。1163個のうち583個の遺伝子は、高暑熱耐性群に比べ低暑熱耐性群で発現が増加しており、残りの580個の遺伝子は高暑熱耐性群に比べ低暑熱耐性群で発現が減少していた。このような遺伝子のうち、発現増加遺伝子が集中する酸化的リン酸化パスウェイに関わる遺伝子セットは、3個体群において低暑熱耐性群のみで協調的な発現増加を示した。さらに、このような遺伝子セットの発現を誘導するPPARGCIA遺伝子およびPPARGCIAの発現を誘導するFGF2I遺伝子も同様に、低暑熱耐性群のみで発現増加を示した。これらの結果から、低暑熱耐性群でみられるFGF2Iの暑熱ストレス応答性発現増加が、PPARGCIAを介した酸化的リン酸化パスウェイ

活性化のトリガーとなり、暑熱耐性の低下に影響すると示唆され、FGF2Iを、豚暑熱耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子の候補として同定した。

文 献

- 1) Zumbach, B., Misztal, I., Tsuruta, S., Sanchez, J. P., Azain, M., Herring, W., Holl, J., Long, T., Culbertson, M. : *Journal of Animal Science*, **86**, 2076~2081, 2008.
- 2) Sudre, K., Cassar-Malek, I., Lustrat, A., Ueda, Y., Leroux, C., Jurie, C., Auffray, C., Renand, G., Martin, P., Hocquette, J. F. : *Meat Science*, **70**, 267~277, 2005.
- 3) Mootha, V.K., Lindgren, C.M., Eriksson, K. F., Subramanian, A., Sihag, S., Lehar, J., Puigserver, P., Carlsson, E., Ridderstrale, M., Laurila, E., Houstis, N., Daly, M. J., Patterson, N., Mesirov, J. P., Golub, T. R., Tamayo, P., Spiegelman, B., Lander, E. S., Hirschhorn, J. N., Altshuler, D., Groop, L. C. : *Nature Genetics*, **34**, 267~273, 2003.
- 4) Yamaguchi, T., Suzuki, T., Arai, H., Tanabe, S., Atomi, Y. : *American Journal of Physiology. Cell Physiology*, **298**, C140~148, 2010.
- 5) Miura, S., Tomitsuka, E., Kamei, Y., Yamazaki, T., Kai, Y., Tamura, M., Kita, K., Nishino, I., Ezaki, O. : *American Journal of Pathology*, **169**, 1129~1139, 2006.
- 6) Potthoff, M. J., Inagaki, T., Satapati, S., Ding, X., He, T., Goetz, R., Mohammadi, M., Finck, B. N., Mangelsdorf, D. J., Kliewer, S. A., Burgess, S. C. : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **106**, 10853~10858, 2009.
- 7) Lee, J. B., Kim, T. W. : *Journal of Thermal Biology*, **45**, 163~167, 2014.
- 8) Goetz, R. : *Nature Reviews. Endocrinology*, **9**, 506~508, 2013.
- 9) Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J., Savin, K., van Tassell, C. P., Sonstegard, T. S., Goddard, M. E. : *PLoS One*, **4**, e6676, 2009.

揮発性脂肪酸が牛筋肉内脂肪細胞分化に及ぼす影響

Effect of volatile fatty acid on bovine intramuscular adipocyte differentiation

溝口 康・松野 泉

(明治大学農学部, 明治大学大学院農学研究科)

Yasushi Mizoguchi and Izumi Matsuno

(School of Agriculture, Meiji University)

In this study, to clarify the regulatory mechanism of bovine intramuscular adipogenesis, we examined the effect of acetic acid (one of volatile fatty acids) and insulin on the differentiation of adipocyte (triglyceride (TG) content and glucose uptake) and the gene expression levels of glucose transporter (GLUT) 1 and GLUT4 using a clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) cell line. The BIP cells were harvested at six day after adipogenic stimulation. The gene expression levels were validated by quantitative real-time PCR. Lipids were extracted as TG according to the Bligh and Dyer method, and the amount of TG was measured by enzyme method. The amount of glucose uptake in adipocyte measured with a fluorescent 2-NBDG. Treatment of the BIP cells with 10 μ g/ml Insulin plus 100 mM acetic acid significantly increased TG content and glucose uptake amount in adipocyte, compared to non-treatment. Both insulin and acetic acid was increased GLUT4 gene expression level, on the other hand, decreased GLUT1 gene expression level. These results indicate that acetic acid and insulin are necessary for TG synthesis in bovine intramuscular adipogenesis.

1. 目 的

日本の在来種である黒毛和種は、筋肉内に脂肪が沈着する「霜降り」形質に長けており、経済的にも価値がある。近年、より付加価値の高い牛肉生産を実現するために、美味しさに関連する因子の探索が精力的に行われている。これまでの官能試験結果より、オレイン酸などの一価不飽和脂肪酸割合が高いほど、牛肉の風味の強さに影響しており、さらに「霜降り」割合が高いほど、食感が良くなるとの報告がある¹⁾。すなわち、牛肉の美

味しさは筋肉内の脂肪細胞に含まれる脂肪の質と量に大きく影響することが考えられる。

牛の飼料に含まれる炭水化物(糖質・食物繊維)は、第1胃に生息している微生物によって酢酸・プロピオン酸・酪酸などの揮発性脂肪酸が産生される。その生産割合は、酢酸55~70%、プロピオン酸20~30%、酪酸10~20%の範囲であると報告されている²⁾。牛の脂肪組織における脂肪酸合成の主な基質は酢酸であると考えられており³⁾、酢酸はアセチルCoAを経て脂肪酸合成経路に入り、脂肪酸合成酵素(Fatty Acid Synthase:

FASN) や脂肪酸不飽和化酵素 (Stearoyl-CoA Desaturase : SCD) などの作用により様々な脂肪酸が合成される³⁾。

反芻動物において揮発性脂肪酸は、インスリン分泌を刺激することが知られている⁴⁾。インスリンは、グルコースを細胞内に取り込ませることにより血糖値を減少させ、脂肪細胞においては脂肪蓄積を促進することによりその役割を担っている。インスリンは細胞膜に存在するインスリン受容体に結合すると、細胞質に存在するインスリン受容体基質をリン酸化することにより活性化させる。その後、PI3KやAktを介したシグナル伝達によりグルコース取り込みや脂肪酸合成酵素などの発現を促進させる^{5, 6)}。FASNやSCDなどの酵素以外にも、脂肪酸合成にはステロール応答結合タンパク質などの調節因子も関与している³⁾。FASNはアセチルCoAからパルミチン酸合成に関与しており、SCDは飽和脂肪酸に炭素の二重結合を付与することにより不飽和脂肪酸に変換させる。黒毛和種において、これらの遺伝子多型が不飽和脂肪酸割合などに影響を及ぼすことが明らかとなっている⁷⁻⁹⁾。以上のことから揮発性脂肪酸は、牛における脂肪細胞分化に直接的・間接的に深く関与していることが考えられる。

牛筋肉内脂肪細胞においてグルコースも重要な基質であることも報告されている³⁾。グルコースは細胞膜においてグルコース輸送体により細胞内に取り込まれる。グルコース輸送体は、多くのアイソフォームが存在しており、それぞれ組織特異的に発現している¹⁰⁾。グルコース輸送体4は骨格筋や脂肪組織などで発現している。グルコース輸送体4の特徴の一つとしてインスリン依存性がある。通常グルコース輸送体4は細胞内小胞に存在しており、インスリン刺激により細胞膜上へとトランスロケーションし、細胞内にグルコースの取り込みを促進させる^{5, 6)}。この他に脂肪組織で発

現しているのがグルコース輸送体1であり、これはほとんどすべての組織で発現し、グルコース輸送体4とは異なる調節機構で制御されている⁶⁾。揮発性脂肪酸の一種である酢酸とインスリンおよびグルコース輸送体が、牛筋肉内脂肪細胞において脂肪蓄積やグルコースの取り込みに影響しているかは不明である。

そこで本研究では、麻生らによって樹立された黒毛和種由来の筋肉内脂肪前駆細胞株 (Bovine Intramuscular Pre-adipocyte : BIP)¹¹⁾ の分化誘導系を「霜降り」形成のモデルと捉え、「酢酸」と「インスリン」の脂肪蓄積と細胞内へのグルコースの取り込みおよびグルコース輸送体遺伝子発現動態への影響について、解析することとした。

2. 方 法

2.1 細胞培養および分化

BIPは、10%牛胎児血清、ペニシリンとストレプトマイシンを含むDulbecco's modified Eagle's 培地で37℃・5%CO₂条件下で培養を行った。本細胞株は、東北大学大学院農学研究科 麻生久教授に提供していただいた。常法に従い¹¹⁾、増殖および分化誘導 (インスリン、デキサメタゾン、オクタン酸、酢酸添加) を行った。インスリンおよび酢酸濃度は、実験条件に従い添加した。分化誘導は6日間行い1日おきに分化誘導培地の交換を行った。

2.2 RNA抽出

RNA抽出は、ReliaPrep™ RNA Cell Miniprep System (Promega) を用いて添付プロトコールに従い実施した。Total RNA量は、吸光度 (260nm) を測定し濃度を決定した。Total RNAは、電気泳動を行い28S rRNAと18S rRNAのバンドを目視することにより、RNAが分解していないことを確認した。

2.3 cDNA合成

cDNAはTotal RNAを鋳型としてReverTra Ace[®] (TOYOBO) 逆転写酵素による逆転写反応によって合成した。

2.4 Real-time PCR

解析対象遺伝子は、グルコース輸送体1およびグルコース輸送体4とした。cDNAを用いて、定量的 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) により遺伝子発現解析を行った。RT-PCRは7300 standard Real time PCR system (Applied Biosystems) を用いた。増幅反応試薬は、THUNDERBIRD[™] Probe qPCR Mix (TOYOBO) を用いた。解析方法はTaq Manプローブを用い、 $\Delta\Delta\text{ct}$ 法により数値化した。定量で使用する内在性のコントロールには、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水酵素 (GAPDH) を用いた。

2.5 トリグリセリドの抽出と測定

トリグリセリド抽出はBligh and Dyer法¹²⁾に従って行った。トリグリセリドの定量は、triglyceride E-test kit (Wako) を用いた酵素法により決定した。

2.6 グルコースの取り込み

細胞内へのグルコース取り込み量の解析は、Glucose Uptake Cell-Based Assay Kit (Cayman chemical) を用いて、添付プロトコールに従った。グルコース取り込み量は、励起光/蛍光=485/535nm条件のもと、マルチモードプレートリーダー (Enspire, Perkin Elmer Japan) を用いて測定した。

2.7 統計解析

分散分析後、Tukey法を用いて5%水準で有意差の有無を解析した。

3. 結果と考察

分化誘導後6日目においてトリグリセリド蓄積量は、50ng/mlインスリン・10mM酢酸群は対照

群 (0 ng/mlインスリン・0 mM酢酸) と比較して有意に増加した。さらに、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン・100mM酢酸群は50ng/mlインスリン・10mM酢酸群と比べて有意に増加した。グルコースの取り込み量は、0 ng/mlインスリン・10mM酢酸群、50ng/mlインスリン・0 mM酢酸群、50ng/mlインスリン・10mM酢酸群は、対照群と比較して変化はなかった。10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン・100mM酢酸群は、他群と比較して有意に増加した。以上のことから、酢酸とインスリンは相乗してトリグリセリド蓄積とグルコースの取り込み量を促す可能性を示唆した。

10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン・100mM酢酸群におけるグルコース輸送体4遺伝子発現量は、50ng/mlインスリン・10mM酢酸群と比較して有意に増加した。一方、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ インスリン・100mM酢酸群におけるグルコース輸送体1遺伝子発現量は、50ng/mlインスリン・10mM酢酸群と比較して減少傾向を示した。酢酸は濃度依存的にグルコース輸送体4遺伝子の発現量を増加させること¹³⁾、グルコース輸送体4はインスリンに応答して発現量が増加するという知見¹⁴⁾から、インスリンと酢酸の相乗効果によりグルコース輸送体4遺伝子発現量を増加させたと考察した。

本研究で実施したトリグリセリド蓄積量、グルコースの取り込み量、グルコース輸送体1およびグルコース輸送体4遺伝子発現量の解析より、牛筋肉内脂肪細胞においてグルコース輸送体1ではなくグルコース輸送体4がインスリンと酢酸濃度依存的に増加し、グルコースの取り込み量を増加させることで、その過剰なエネルギーをトリグリセリドにおける脂肪滴に蓄積した可能性を示唆した。反芻動物の脂肪組織や筋肉におけるグルコース輸送体4遺伝子・タンパク質発現やインスリンに誘導されるグルコース輸送体4トランスロケーションは、ヒトやげっ歯類と比較するとその能力

が低いと報告されている⁵⁾。このことから、グルコースの取り込み量が単胃動物と比較して少ないことが考えられる。本研究において、単胃動物との比較は行っていないが、牛筋肉内脂肪細胞におけるグルコースの取り込みは、インスリンだけではなく酢酸が加わることによって促進されることを示した。よって、インスリン伝達経路内で酢酸がどのプロセスに作用しているかを明らかにしていく必要があると考察した。本研究における分子生物学的手法により、栄養素(揮発性脂肪酸・グルコース)とホルモン(インスリン)の調節が、「霜降り」牛肉生産の向上に重要であることを示唆した。今後は、より明確な指標を示すことができるよう、さらなる研究を推進していく予定である。

4. 要 約

本研究は、牛筋肉内脂肪細胞分化において揮発性脂肪酸の一種である酢酸とインスリンがどのような影響を与えるかを、トリグリセリド蓄積、グルコースの取り込み量およびグルコース輸送体遺伝子発現より検討した。牛筋肉内脂肪前駆細胞株を用いて、酢酸濃度およびインスリン濃度を変化させた群を作成し、分化誘導後6日後にサンプリングを行った。グルコース輸送体1およびグルコース輸送体4遺伝子の発現解析をReal Time-PCRによって実施した。トリグリセリドはBligh and Dyer法を用いて抽出した。トリグリセリド含量は酵素法により測定した。グルコース取り込み量は蛍光標識した2-NBDGを用いて測定した。トリグリセリド蓄積量・グルコースの取り込み量・グルコース輸送体4遺伝子発現量は、酢酸とインスリンによって相乗的に増加した。一方、グルコース輸送体1遺伝子発現量は、グルコース輸送体4遺伝子発現量と逆の効果を示した。以上のことから、牛筋肉内脂肪細胞におけるトリグリセ

リド蓄積には酢酸とインスリンの両方が重要であると考察した。

文 献

- 1) 農文協編：最新農業技術，畜産，vol.8，農山漁村文化協会，東京，235～243，2015.
- 2) 農文協編：肉牛大事典，農山漁村文化協会，東京，153～165，2013.
- 3) 肉用牛研究会：肉用牛の科学，養賢堂，東京，295～298，2015.
- 4) 佐野宏明：反芻動物における揮発性脂肪酸によるインスリン分泌および作用の調節，日本畜産学会報，68，993～1002，2002.
- 5) Sasaki, S.: Mechanism of insulin action on glucose metabolism in ruminants, *Animal Science Journal*, 73, 423～433, 2002.
- 6) Madina, R. A., Owen, G. I.: Glucose transporters: expression, regulation and cancer, *Biological Research*, 35, 9～26, 2002.
- 7) Taniguchi, M., Utsugi, T., Oyama, K., Mannen, H., Kobayashi, M., Tanabe, Y., Ogino, A., Tsuji, S.: Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle, *Mammalian Genome*, 15, 142～148, 2004.
- 8) Hoashi, S., Ashida, N., Ohsaki, H., Utsugi, T., Sasazaki, S., Taniguchi, M., Oyama, K., Mukai, F., Mannen, H.: Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle, *Mammalian Genome*, 18, 880～886, 2007.
- 9) Abe, T., Saburi, J., Hasebe, H., Nakagawa, T., Misumi, S., Nade, T., Nakajima, H., Shoji, N., Kobayashi, M., Kobayashi, E.: Novel mutations of the FASN gene and their effect on fatty acid composition in Japanese Black beef, *Biochemical Genetics*, 47, 397～411, 2009.
- 10) Mueckler, M., Thorens, B.: The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters, *Molecular Aspects of Medicine*, 121～138, 2013.
- 11) Aso, H., Abe, H., Nakajima, I., Ozutsumi, K., Yamaguchi, T., Takamori, Y., Kodama, A., Hoshino, F. B., Takano, S.: A preadipocyte clonal line from bovine intramuscular adipose tissue: nonexpression of GLUT-4 protein during adipocyte differentiation, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 213, 369～375, 1995.
- 12) Iverson, S. J., Lang, S. L. C., Cooper, M. H.: Comparison of the Bligh and Dyer and Folch Methods for Total Lipid Determination in a Broad Range of Marine Tissue, *Lipids*, 36, 1283～1287, 2001.
- 13) 溝口康：牛肉の質に関連する新たな脂肪酸合成経路の探索とバイオマーカーの同定，公益財団法人伊

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**, 84~89, 2014.

- 14) Suzuki, K., Kono, T. : Evidence that insulin causes
translocation of glucose transport activity to the

plasma membrane from an intracellular storage
site, *Proceedings of the National Academy of Sciences
of the United States of America*, **77**, 2542~2545, 1980.

ブランド豚肉生産用原種豚の遺伝的多様性の維持に関する研究

Sustainability of genetic diversity in original pig strains used for branding pork

古川 力・野村 こう・高橋 幸水
(東京農業大学農学部)

Tsutomu Furukawa, Koh Nomura and Yukimizu Takahashi
(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture)

Tokyo X was developed using Berkshire, Duroc, and Beijing black pig in 1997 as the first synthetic pig strain in Japan and has been maintained for 17 years. Consequently, this strain may contain less genetic diversity. In this study, a pedigree analysis was conducted to calculate the observed inbreeding coefficient (F), expected inbreeding coefficient under random mating (f), the observed relationship coefficient (R), and genetic contribution rate (GCR). Further, estimation of the inbreeding depression of reproductive traits was conducted using a general regression model. The data analyzed were the pedigree records from 1990 to 2014 and the reproductive records from 1997 to 2014. The reproductive traits analyzed were the total number of piglets born including mummification (TNB), number of piglets born alive (NBA), number of piglets born dead (NBD), and number of piglets weaned (NW). In 1997, the mean F , f , and R values were 6.9%, 9.3%, and 20.0%, respectively. In 2014, the mean F , f , and R values reached 11.8%, 14.7%, and 26.6%, respectively. GCR in male founders began to change in 2000 but has plateaued since 2004. In 2014, GCR differed widely depending on the individuals. A similar result was shown in female founders. The effects of F in dams, sires, and litters were not significant for all traits ($P>0.05$). The effects of F in dams tended to decrease reproductive traits. In particular, TNB tended to decrease 0.88 piglets as F increased by 10%. The estimates of heritability for TNB, NBA, NW, and NBD were 0.11, 0.07, 0.05, and 0.03, respectively. This result indicates that the reproductive traits of Tokyo X can be improved. The 30 microsatellite markers indicated large genetic diversity of Tokyo X and these markers would be used to evaluate relationship among individuals. It was recommended that the genetic structure using markers should be analyzed to maintain genetic diversity of Tokyo X.

1. 目 的

国産豚肉の高付加価値化としてブランド豚肉が生産されている。ローズポーク、ハマユウポーク、

TOKYO Xなどのブランド豚肉には系統豚が利用されている。ここで、TOKYO Xは北京黒豚、パークシャー種、デュロック種の3品種を基礎豚とする日本初の合成系統であるトウキョウX¹⁾のブラ

ンド豚肉である。

系統豚は50頭程度の小集団で選抜育種され、維持されているため、維持年数が経過するに伴い血縁のあるもの同士の交配が避けられない。そのため、近交度の上昇に伴う遺伝的多様性の減少や繁殖能力の低下が危惧されている。一般に、系統豚では、近交度の上昇を避けるために、血統の管理を厳密に行うとともに、種豚間の血縁係数を算出して血縁の遠いもの同士の交配を行うなどの対策がとられているが、繁殖能力に対する近交の影響は明らかにされていない。

従来の血統情報に基づく近交度の評価では、同じ血統情報を持つ個体は同祖的遺伝子をホモで持つ確率は等しくなり、同じ近交係数が算出される。しかし、ホモ化の確率は同じであっても、両親の相同遺伝子のどちらを受け取るかは個体によって異なる。そこで、個体の遺伝子が両親の相同遺伝子のどちらに由来するかを評価するために、多型性の高いDNAマーカーを指標に用いることが考えられ、マイクロサテライトなどのホモ化の程度から近交度を評価する試みがなされている²⁾。

ここでは、血統が詳細に判明している系統豚トウキョウXについて、まず、血統情報から個体の近交係数や個体間の血縁係数などを算出し、集団の遺伝的多様性の推移を評価した。次に、系統豚維持群の繁殖成績から、近交度の上昇が繁殖能力に及ぼす影響を検討した。さらに、現有集団のDNAマーカーの遺伝子型を分析して、マーカー情報に基づく遺伝的多様性を評価した。

2. 方 法

2.1 材料

トウキョウXについて、1991年の造成開始から2014年までの血統情報、1997年の維持開始から2014年までの繁殖記録、2014年繁殖集団72頭の血

液サンプルを東京都農林水産振興財団青梅畜産センターから入手した。血統情報は個体ごとに個体番号、父番号、母番号、性および生年月日より構成されていた。繁殖記録は母豚番号、交配雄番号、産歴、分娩年月日、総産子数 (TNB)、分娩総数、生産頭数 (NBA)、死産頭数 (NBD)、黒子数、哺乳開始頭数、哺乳中死亡頭数、離乳頭数 (NW)、耳刻入頭数から構成されていた。

2.2 統計解析

先に開発した近交係数および遺伝的寄与率計算シート coan と GRC³⁾ を用いて、系統造成開始以降について年ごとの集団の近交係数 (F)、共祖係数 (f)、血縁係数 (R)、遺伝的寄与率 (GCR) を計算し、年ごとの遺伝的多様性の推移を求めた。

次のモデルを用いて繁殖能力に影響する非遺伝的要因の効果、すなわち、年次、月、産次の主効果と母豚、父豚、子豚の近交係数の効果を求めた。

$$x_{ijkl} = \mu + y_i + m_j + p_k + b_1 F_d + b_2 F_s + b_3 F_o + \varepsilon_{ijkl}$$

ここで、 x_{ijkl} は各繁殖形質の測定値、 μ は全平均、 y_i 、 m_j 、 p_k は年次 i 、月 j 、産次 k の母数効果、 F_d 、 F_s 、 F_o は母豚、父豚、産子の近交係数、 b_1 、 b_2 、 b_3 は母豚、父豚、産子の近交係数に対する偏回帰係数、 ε_{ijkl} は残差である。解析には統計解析ソフトウェア R⁴⁾ の aov 関数を用いた。

繁殖形質の遺伝率、永続的環境分散が表型分散に占める割合 (以下永続的環境係数、 p_e^2)、表型相関および遺伝相関はプログラム VCE 6.0⁵⁾ を用いた多形質反復率アニマルモデルにより推定した。母数効果は年次 (1997年から2014年)、産次 (初産から10産) とし、変量効果は母豚の相加的遺伝効果、母豚に対する永続的環境効果とした。解析形質は TNB、NBA、NBD および NW とし、分析に用いた統計モデルは以下のとおりである。

$$x_{ijklm} = \mu + y_i + p_j + a_k + p_{el} + \varepsilon_{ijklm}$$

ここで、 x_{ijklm} は各繁殖形質の測定値、 μ は全平均、 y_i 、 p_j は年次 i 、産次 j の母数効果、 a_k 、 p_{el}

は母豚 k の相加的遺伝効果および母豚 k に対する永続的環境効果 1 の変量効果, ε_{ijklm} は残差である。

2.3 マイクロサテライト多型解析

2014年繁殖個体のDNAは、血液サンプルからフェノール・クロロホルム法にて抽出した。抽出したDNAは国際動物遺伝学会議および国際連合食糧農業機関において推奨されているマイクロサテライトマーカー30座位を用いてPCRにより目的領域の増幅後、シークエンサーを用いてフラグメント解析を行った。フラグメント解析により決定した遺伝子型をもとに、プログラムPopGene ver1.3を用いて平均対立遺伝子数 (N_A)、有効対立遺伝子数 (N_E)、ヘテロ接合度の期待値 (H_E) および観測値 (H_O)、多型情報含有値 (PIC)、F統計量 (F_{IS}) を算出した。また、METAPOPを用いてマーカー近交度 (F_{MS})、マーカー共祖係数 (f_{MS}) を求めた。

3. 結果と考察

3.1 血統情報に基づく遺伝的多様性の推移

血統記録は、造成群は雄雌合計293頭、系統認定を受けたのは雄10頭、雌32頭であり、維持群は雄110頭、雌202頭により構成されたが、繁殖に寄与したのは雄72頭、雌101頭であった。

F , f および R はFig. 1のとおりであり、維持開始時においてそれぞれ6.9%, 9.3%, 20.0%であったが、2014年にはそれぞれ11.8%, 14.7%, 26.6%に増加した。期間を通して年あたりの上昇率はそれぞれ0.28%, 0.29%, 0.40%であったが、 F は2002年、 R は2005年を境に上昇率の鈍化がみられた。年次あたりの上昇量で比較するとトウキョウXは従来の系統豚維持群^{6,7)}よりも小さく、近交の抑制が効果的であったといえる。

認定豚の GCR は、雄集団では10頭で維持を開始しており、2000年付近から偏りが生じ始めた

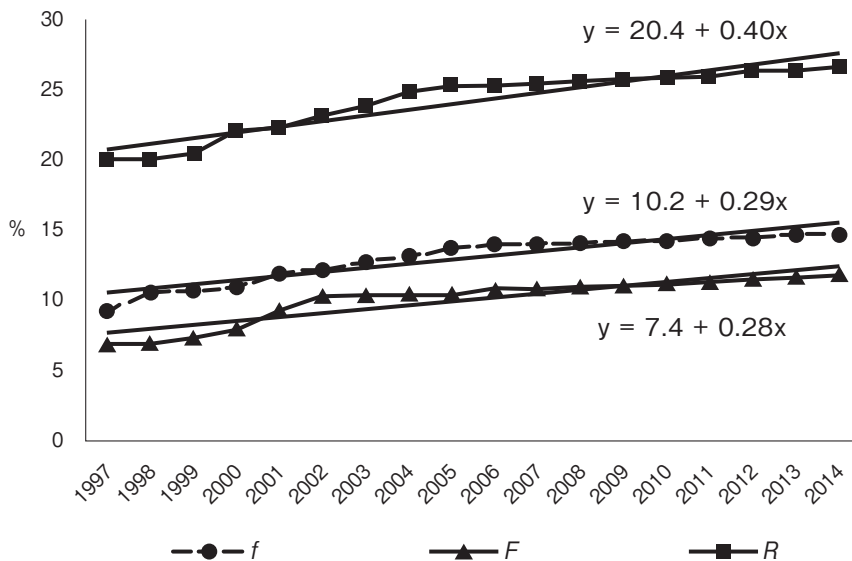


Fig. 1 Annual changes in the observed relationship coefficient (R), observed inbreeding coefficient (F), and expected inbreeding coefficient under random mating (f)

が、2004年以降はおおむね横ばいになり、2014年時点では認定豚2頭の寄与率が0となっていた。認定豚の雌のGCRは、雄の場合と同様に、2000年付近から変化し始め、2004年以降はおおむね横ばいになり、寄与率を持っている個体数は認定時の32頭から2014年において22頭にまで減少した。雄、雌とも、寄与率の推移は個体により大きく異なっていた。

3.2 繁殖形質における近交退化の評価

繁殖形質に及ぼす要因において、産次の効果はすべての形質で有意性を示し、年次の効果は7形質で有意であったが、月の効果はほとんど有意でなかった。母豚、父豚、産子の各近交係数の効果はすべての形質において5%水準では有意性を示さなかったが、母豚の近交係数はTNBに対して10%水準の影響がみられ、近交係数10%上昇あたり0.88頭減少する傾向がみられた。これはランドレース種維持集団における傾向とほぼ同程度のものであり⁸⁾、今後も計画的な交配により近交係数を抑制することが可能と考えられた。

主な繁殖形質における遺伝的パラメータを

Table 1 に示した。遺伝率はTNBで0.11、NBAで0.07、NWで0.05、NBDで0.03であった。遺伝相関では、TNBとNBA、NW、NBD間およびNBAとNW間で0.80以上の非常に高い相関を示した。NBDとNBA、NW間の遺伝相関は0.6程度であったが、標準誤差が大きかった。表型相関ではTNB、NBA、NW間は0.6以上の相関であったが、NBDとNBA、NWとの間には負の低い相関がみられた。永続的環境係数はTNBの0.15からNBDの0.06の範囲であった。繁殖形質の遺伝パラメータ推定値はこれまでの報告とおおむね一致し⁹⁾、遺伝率は低いが遺伝的改良の余地はあると考えられた。

3.3 DNAマーカーに基づく遺伝的多様性

マイクロサテライトマーカーにおける多様性指標の30座位平均はTable 2 のとおりであり、 N_A は4.3、 N_E は2.77、 PIC は0.54と多型性とみ、ヘテロ接合性は H_O が0.61、 H_E が0.60と観測値と期待値に差はなかった。 F と F_{MS} との相関は0.09と低かったが、 f と F_{MS} との相関は0.48と有意であり(Fig. 2)、血縁関係の評価にはマイクロサテライ

Table 1 Estimates of genetic parameters for major reproductive traits

	TNB	NBA	NW	NBD
TNB	0.11	0.96	0.88	0.80
NBA	0.76	0.07	0.95	0.62
NW	0.61	0.85	0.05	0.54
NBD	0.33	-0.32	-0.33	0.03
p_e^2	0.15	0.10	0.12	0.06

Estimates of heritability (diagonal), genetic correlation (above diagonal), phenotypic correlation (below diagonal), and permanent environmental coefficient ($p_e^2 = \sigma_p^2 / \sigma_p^2$). TNB : total number of born, NBA : number of born alive, NW : number of weaning, NBD : number of piglets born dead.

Table 2 Estimates of genetic diversity based on 30 microsatellite markers

	N_A	N_E	H_E	H_O	PIC	F_{IS}
Mean	4.30	2.77	0.603	0.610	0.544	-0.019
SD	1.86	0.86	0.139	0.152	0.175	

N_A : total number of alleles, N_E : effective number of alleles, H_O : observed heterozygosity, H_E : expected heterozygosity under Hardy-Weinberg equilibrium, PIC : polymorphic information contents, F_{IS} : F-statistics.

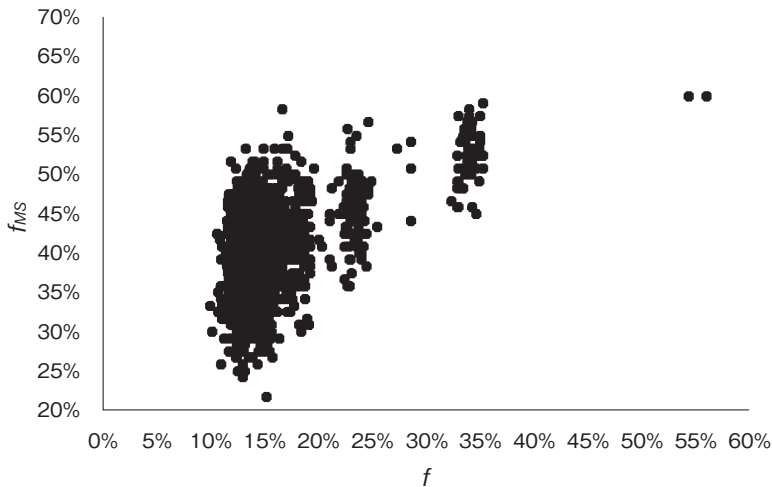


Fig. 2 The correlation between coancestry estimated using pedigree records (f) and that using MS markers (f_{MS})

トが有効であることが示された。小林ら¹⁾は F と f_{MS} との間に高い相関を見いだしたが、トウキョウXは交配が計画的に管理されているため、血統に基づく近交係数はきわめて均質となり、相関が低くなったと考えられた。

以上のことから、トウキョウXの遺伝的多様性を維持するためには、マーカー情報をもとに遺伝的構造を解析し、マーカー情報を用いた交配計画を検討する必要がある。

4. 要 約

トウキョウXはパークシャー種、デュロック種、北京黒豚を基礎品種に1997年に系統認定された日本初の合成系統豚である。トウキョウXは系統認定後17年を経過しており、近交度の蓄積による近交退化が危惧されている。そこで血統情報から実際の平均近交係数 (F)、任意交配時の平均近交係数 (f)、平均血縁係数 (R) および遺伝的寄与率 (GCR) を算出し、遺伝的多様性を評価した。総産子数 (TNB)、生産頭数 (NBA)、死産頭数 (NBD) および離乳頭数 (NW) に対する母豚、父豚、産子の近交度の影響を分析すると

ともに遺伝率を推定した。解析データはトウキョウXの血統記録 (1990年～2014年) および分娩記録 (1997年～2014年) であった。 F 、 f および R は1997年ではそれぞれ6.9%、9.3% および20.0% であったが、2014年にはそれぞれ11.8%、14.7% および26.6% まで上昇した。認定豚の雄の GCR は2000年頃から偏りが生じ始め、2004年以降はおおむね横ばいであった。寄与率の推移は個体により大きく異なり、雌の GCR でも類似した結果を示した。繁殖形質に対する各近交度の効果は全形質において5%水準では有意性を示さなかったが、母豚の近交度の上昇に伴い繁殖性が低下する傾向がみられ、TNBでは近交係数10%上昇あたり0.88頭減少する傾向がみられた。遺伝率はTNB、NBA、NBD およびNWでそれぞれ0.11、0.07、0.03 および0.05と推定され、繁殖形質の改良効率は高くないが、育種改良の余地があることが示された。マイクロサテライトにもとづく遺伝的多様性は高く、血縁度の評価には有効であることが示唆された。トウキョウXの遺伝的多様性を維持するためには、マーカー情報をもとに遺伝的構造を解析し、マーカー情報を用いた交配計画を検討する

ことが求められた。

謝 辞

本研究にあたり東京都農林水産振興財団青梅畜産センターよりトウキョウXの血統、繁殖成績、血液を提供いただいた。心より謝意を表す。

文 献

- 1) 小嶋禎夫, 兵頭勲, 内田哲二, 渡辺彬: 東京畜試研報, **27**, 18~25, 2004.
- 2) 小林栄治, 西尾元秀, 古川力: 日豚会誌, **51**, 143~151, 2014.
- 3) 永井健一, 高橋幸水, 野村こう, 古川力: 日豚会誌, **52**, 29, 36, 2015.
- 4) Groeneveld, E., Kovac, M., Mielenz, N.: ftp://ftp.tzv.fal.de/pub/latest_vce/doc/vce6-manual-3.1-A4.pdf, 2010.
- 5) R Core Team: <http://www.R-project.org/>, 2013.
- 6) 中村真弓, 小池達也, 野沢久夫, 阿部泰男, 塚原均, 川野辺章夫, 本沢延介, 高橋一郎, 大久保彰夫, 中島芳郎, 上野昌司: 栃木畜試研報, **18**, 1~8, 2002.
- 7) 森直樹, 新居雅宏, 柏岡静: 徳島畜研報, **6**, 18~21, 2006.
- 8) 古川力, 吉田力, 村田亀松, 日當信夫, 北条貢, 落合昭吾: 日豚研誌, **23**, 199, 1986.
- 9) Rothchild, M. F., Bidanel, J. P.: The Genetics of the Pig, 313-343, CAB International, Wallingford, 1998.

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・柴田 愛梨・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, *公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所)

Mizuho Yamasaki, Eri Shibata, Sachio Kouno, Toshio Watanabe* and Yoshikazu Sugimoto*

(Hiroshima Prefectural Technology Research Institute, Livestock Research Center, *Shirakawa Institute of Animal Genetics)

We previously reported that myoglobin (Mb) contents in the fat-free dry matter served as a novel indicator for genomic improvement of Japanese cattle beef color trait. In the present study, genomic breeding values of the Mb contents were estimated. In this report, we attempted to improve the evaluation accuracy of the genomic breeding values by collecting more data on SNP and Mb contents. The genomic breeding values estimated with SNP data from 1,197 steers were strongly correlated with breeding values with pedigree information ($r=0.92$), demonstrating improved evaluation accuracy, as compared with that of previously reported (739steers, $r=0.86$).

In Japanese Black cattle, light-colored meat is highly rated. However, such color improvement may cause deteriorating of Fe contents in the meat and blood, because Mb is a Fe-binding protein. In the present study, we demonstrated that deteriorating of Mb contents were likely to cause deteriorating of Fe contents in meat. Several studies have reported that Fe contents in the meat influence beef palatability traits. Therefore, it is necessary to examine the effects of meat color on the taste. On the other hand, Mb contents were not correlated with Fe contents in the blood, suggesting that low Mb contents are unlikely to affect cattle health (e.g., anemia).

1. 目 的

黒毛和種牛牛肉(黒毛和牛)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。我々が広島県内の小売業者に実施した意向調査では、黒毛和牛は淡い色の方が好まれることが明らかになった。調査した11社中8社が淡い肉色への改良を要望し、「牛肉は色の淡いものから売れていく」、「淡い色の牛肉は変

色が少なく扱いやすい」等の回答があった(2013, 未発表)。しかし、黒毛和種において肉色の育種改良は進んでいない。この理由として、適切な育種改良指標が存在しないことがある。現在、枝肉購買時の評価指標には、「BCS No. (Beef Color Standard Number)」(日本食肉格付協会)があるが、目視による主観的評価であり、特に脂肪交雑の程度に影響されやすいこと、黒毛和種の大部分が3区分に格付けされ評価範囲が狭いこと

から、育種改良指標には適さないと考えられる。

一方、黒毛和種雄牛の遺伝的能力評価には、血統情報に基づく「育種価」が広く利用されている。しかし「育種価」は、個体の正確な評価値を得るためには多数の後代データが必要であり、評価に多くの時間と費用を必要とする。また、メンデルアンサンプリングを考慮できないため、全きょうだいの能力差を評価できない等の課題もある。近年、高密度な SNP (Single Nucleotide Polymorphism) 情報を安価で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」の活用が進んでいる。「ゲノム育種価」では、全きょうだいの能力差を評価できるうえ、後代のいない若齢牛の段階で評価できるなど、改良速度の向上に利点がある。欧米では乳牛において、精度の高いゲノム育種価評価が実現しており、種雄牛だけでなく泌乳牛の遺伝的能力評価にも活用されている。しかし、黒毛和種においては、いくつかの研究報告があるものの実用化には至っていない。

本研究では、より高付加価値な和牛肉の生産を目指し、肉色の新たな育種改良指標として肉の色素の主要成分である「ミオグロビン (Mb) 含量」を用い、ゲノム育種価による能力評価を試みた。平成26年度は、Mb含量が肉色の新たな育種改良指標となりうることを報告した^{1,2)}。Mb含量はBCS No.と相関があり、遺伝による影響が大きい(遺伝率0.43)ことが分かった。一方、ゲノム育種価による評価は、Mb含量情報を持つ肥育牛数が少ないために、十分な評価精度を得ることができなかった。平成27年度は、肥育牛数を拡大することで評価精度の向上を図った。また、Mb含量を指標とした育種改良の実用化を想定した時、肉色を淡く、Mb含量を低下させる方向への改良を行えば、Mbはヘム鉄を構成するため、肉およ

び血液中の「鉄」含量も低下する懸念があった。したがって今回、Mb含量と肉中铁含量の関係を調査した。さらに血液中鉄含量の低下は貧血等、健康に影響を与える可能性もあることから、各種血液成分値との関係も調査した。

2. 方法

2.1 ミオグロビン含量の測定

平成15～27年にと畜された広島県産黒毛和牛(肥育牛、去勢)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、交雑脂肪を除いた赤身部分のみに存在するMbを正確に評価するため脂肪含量および水分含量を除いた無脂肪乾物中Mb含量を求めた。具体的には、Boccardら³⁾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た(以下、「Mb含量」と記述したものは「無脂肪乾物中Mb含量」を示す)。

2.2 後代育種価の算出

広島県内に後代牛情報のある種雄牛27頭について、1,523頭の後代肥育牛との血縁関係から計算された相加的血縁行列を用いて、アニマルモデルBLUP法により、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(枝肉重量、ロース芯面積、ばらの厚さ、皮下脂肪厚、歩留基準値、脂肪交雑)についても、同様に平成3～27年にと畜された41,426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1,197頭の肉片、種雄牛27頭の精液から、フェノール・クロロホルム法によりDNAを抽出した。肥育牛については、Illumina BovineLDもしくはGeneSeekSuperLD v1, v2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 $P < 0.0001$, マイナーアリル頻度<0.01のSNPを除き, ソフトウェアBEAGLE3.3.2 (BrowningとBrowning2008) により, 欠損値の補完および高密度SNPデータへのデータ補完を行った。最終的に1,197頭の常染色体上33,580SNPを以降の解析に利用した。種雄牛については, Illumina BovineHDによりSNP情報を得た。

2.4 SNP効果推定, ゲノム育種価算出

SNP効果推定はベイズB法を用い, 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: 100,000, サンプルング: 10回ごと, Metropolis-Hasting反復回数: 50)。

ゲノム育種価の推定は, 肥育牛のSNP型から計算されるゲノム関係行列を用いるG-BLUP法を用いた。ゲノム関係行列は, VanRaden (2008) の方法による。母数効果・共変量は, と畜年次 (平成15~27年), 市場 (3市場) および月齢 (1次および2次) を取り上げた。分散成分推定はAI-REML法により行った。広島県内に後代牛情報のある種雄牛27頭について, Mb含量のゲノム育種価を算出した。枝肉6形質についても同様に算出した。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。

2.5 肉中铁含量測定

2.1に示した広島県産黒毛和牛 (肥育牛, 去勢) のうち412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, ICP発光分光分析法により, 無脂肪乾物中铁含量を算出した (以下, 「肉中铁含量」と記載したものは「無脂肪乾物中铁含量」を示す)。

2.6 血液成分測定

広島県産黒毛和牛 (肥育牛, 去勢) 455頭について, と畜2日前に採血を実施し, 一般血液成分 (総コレステロール, 遊離脂肪酸, 尿素窒素), お

よび鉄代謝関連成分 (ヘモグロビン量, 血漿中铁含量, 総鉄結合能, 赤血球数, ヘマトクリット値) を測定した。なお, この肥育牛個体は2.5に示した個体とは異なる。

3. 結果と考察

3.1 分散成分の推定

SNP情報を取得した肥育牛1,197頭のMb含量の平均値±標準偏差は 24.75 ± 5.34 mg/g, 最大値は48.97mg/g, 最小値は7.99mg/gであった。ゲノム関係行列および相加的血縁行列によるMb含量の遺伝率はそれぞれ0.33および0.37と近い値であった (Table 1)。枝肉6形質については, ゲノム関係行列による遺伝率が相加的血縁行列より低くなる傾向が認められた。この理由は不明であるが, 用いた肥育牛の頭数やと畜年次が異なるためと推測される。

3.2 SNP効果推定

最も高い効果が推定されたSNPは5番染色体80.7Mb付近に存在した (Fig. 1)。このSNPは, 脂肪酸の分解に関与するFAR2遺伝子上に存在する。しかし, アリル置換効果は+0.052, SNPが説明する分散は0.0046, 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) 0.00082と非常に小さい効果であった。今回の結果からは, Mb含量は小さな効果を持つポリジーンによる影響を受けているものと推測された。したがって, メジャージーンによるQTLマーカーを用いた育種改良よりも, ゲノム育種価による育種改良が適すると考えられる。

3.3 ゲノム育種価算出

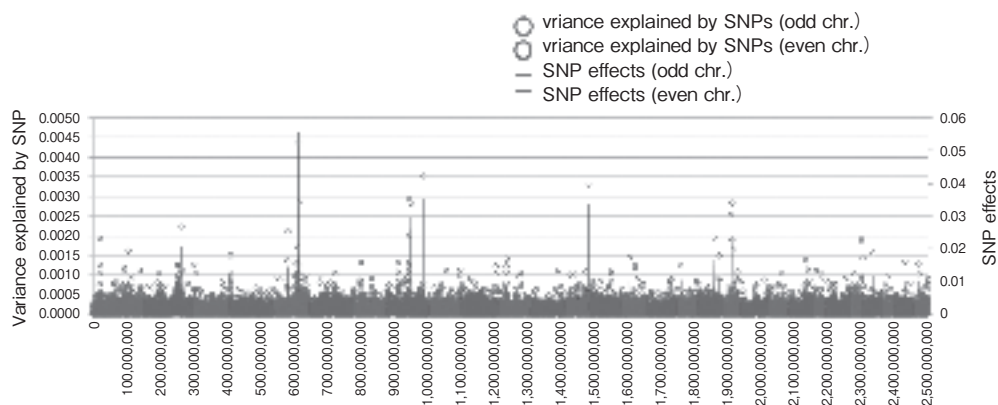
相加的血縁行列により種雄牛27頭の育種価を算出した場合の平均正確度は, Mb含量において0.82となった。枝肉6形質では, いずれの形質でも0.97以上の値を示した。ゲノム関係行列により種雄牛27頭の育種価を算出した場合の平均正確度は,

Table 1

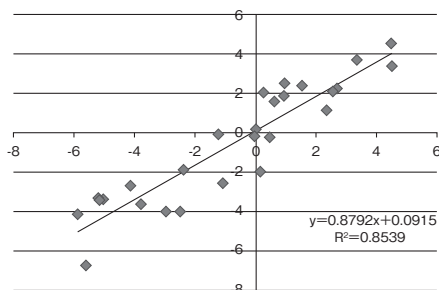
The mean and standard deviation of Mb content, carcass weight (CW), longissimus muscle areas (LMA), rib thickness (RT), subcutaneous fat thickness (SFT), yield estimates (YE), and beef marbling scores (BMS No.) Genetic (V_g) and residual (V_e) variance and heritability \pm standard deviation (h^2) estimated for each trait using G-BLUP and BLUP

Trait	G-BLUP					BLUP				
	Mean \pm SD	n	V_g	V_e	$h^2 \pm SE$	Mean \pm SD	n	V_g	V_e	$h^2 \pm SE$
Mb content (mg/g)	24.75 \pm 5.34	1,197	5.66	11.34	0.33 \pm 0.06	23.57 \pm 5.40	1,523	7.14	12.36	0.37 \pm 0.09
CW (kg)	481.57 \pm 54.50	1,197	1271.53	1247.09	0.50 \pm 0.06	442.39 \pm 58.49	41,426	996.82	1403.57	0.42 \pm 0.02
LMA (cm ²)	57.27 \pm 8.18	1,197	20.35	40.59	0.33 \pm 0.06	54.12 \pm 8.31	41,426	31.11	34.45	0.48 \pm 0.02
RT (cm)	7.11 \pm 0.82	1,197	0.20	0.37	0.35 \pm 0.06	7.24 \pm 0.95	41,426	0.25	0.55	0.31 \pm 0.02
SFT (cm)	2.59 \pm 0.88	1,197	0.27	0.47	0.37 \pm 0.06	2.57 \pm 0.82	41,426	0.37	0.35	0.52 \pm 0.02
YE	73.30 \pm 1.46	1,197	0.71	1.11	0.39 \pm 0.06	73.44 \pm 1.40	41,426	1.11	0.90	0.55 \pm 0.02
BMS No	1.19 \pm 0.60	1,197	0.07	0.18	0.29 \pm 0.06	1.37 \pm 0.47	41,426	0.23	0.26	0.47 \pm 0.02

(A)



(B)

**Fig. 1**

(A) Effects of SNP substitutions and variance explained by SNP for Mb content estimated by the BayesB method
 (B) 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 27 Japanese Black bulls.

Mb含量において、種雄牛27頭平均で0.86となり、平成26年度に報告した739頭の肥育牛集団を用いて同じ種雄牛を算出した場合の平均0.87と同程度であった (Table 2)。

相加的血縁行列による育種価を「遺伝的能力値の正解」とみなし、ゲノム育種価との相関係数を求めた。この結果、Mb含量において0.92と非常に高い相関を示した (Fig. 1)。平成26年度、739頭の肥育牛集団を用いた際の相関係数は0.86であり、分析個体を追加したことで推定精度が向上したものと考えられる。枝肉6形質においても同様に、相加的血縁行列による育種価とゲノム育種価の相関係数を求めると、枝肉重量0.94、ロース芯面積0.37、バラ厚0.76、皮下脂肪厚0.76、歩留基準値0.54、BMS基準値0.41と形質によってバラツキがあった。しかし、いずれの形質においても平成26年度よりも高い値となり、推定精度が向上したものと考えられる (Table 2)。

3.4 肉中铁含量と肉中ミオグロビン含量の関係

肥育牛412頭の鉄含量の平均値±標準偏差は11.84±2.21mg/100g、最大値は19.08mg/100g、最小値は6.08mg/100gであった。Mb含量と肉中铁含量には、正の相関があった ($r=0.48$)。予想どおり、肉色を淡く、Mb含量を低下させる方向

への改良は、肉中の鉄含量も低下させる可能性が高いことが明らかになった (Fig. 2, Table 3)。

3.5 血液成分と肉中ミオグロビン含量の関係

血液成分のうち、一般血液成分である総コレステロール、遊離脂肪酸、尿素窒素については、455頭すべてがおおむね正常範囲内であった⁴⁾。また、Mb含量との相関は総コレステロール $r=0.06$ 、遊離脂肪酸 $r=0.01$ 、尿素窒素 $r=-0.02$ と認められなかった (Table 3)。

血液中の鉄の大部分はミオグロビンと同じくヘム鉄を構成する「ヘモグロビン」として赤血球中に含まれ、血漿中にもわずかに存在する⁵⁾。ヘモグロビン量は平均値±標準偏差13.66±1.65g/dL、血清中铁含量は149.20±49.09μg/dLであった。Mb含量との相関は、ヘモグロビン量で認められなかった ($r=0.10$)。一方、血清中铁含量では $r=0.20$ となり、ごく弱い正の相関がある可能性も考えられる (Fig. 2)。その他、貧血の指標である各項目については、総鉄結合能 $r=-0.04$ 、赤血球数 $r=-0.06$ 、ヘマトクリット値 $r=0.10$ と相関は認められなかった (Table 3)。

本研究では、黒毛和牛の新たな付加価値・差別化要素となることを期待して、肉色のゲノム育種価による評価を試みた。この結果、Mb含量が黒

Table 2

(A) Accuracy of genomic breeding values and true breeding values

(B) Correlation coefficient (r) between genomic breeding values and true breeding values

Trait	G-BLUP		G-BLUP		BLUP		Trait	(B)	
	n	accuracy (mean)	n	accuracy (mean)	n	accuracy (mean)		n = 1,197	n = 739
							r	r	
Mb content	739	0.87	1,197	0.86	1,523	0.82	Mb content	0.92	0.86
CW	739	0.91	1,197	0.90	41,426	0.98	CW	0.94	0.86
LMA	739	0.87	1,197	0.86	41,426	0.98	LMA	0.37	0.10
RT	739	0.85	1,197	0.87	41,426	0.97	RT	0.76	0.68
SFT	739	0.86	1,197	0.87	41,426	0.98	SFT	0.76	0.37
YE	739	0.88	1,197	0.88	41,426	0.98	YE	0.54	0.33
BMS No.	739	0.82	1,197	0.85	41,426	0.98	BMS No.	0.41	0.12

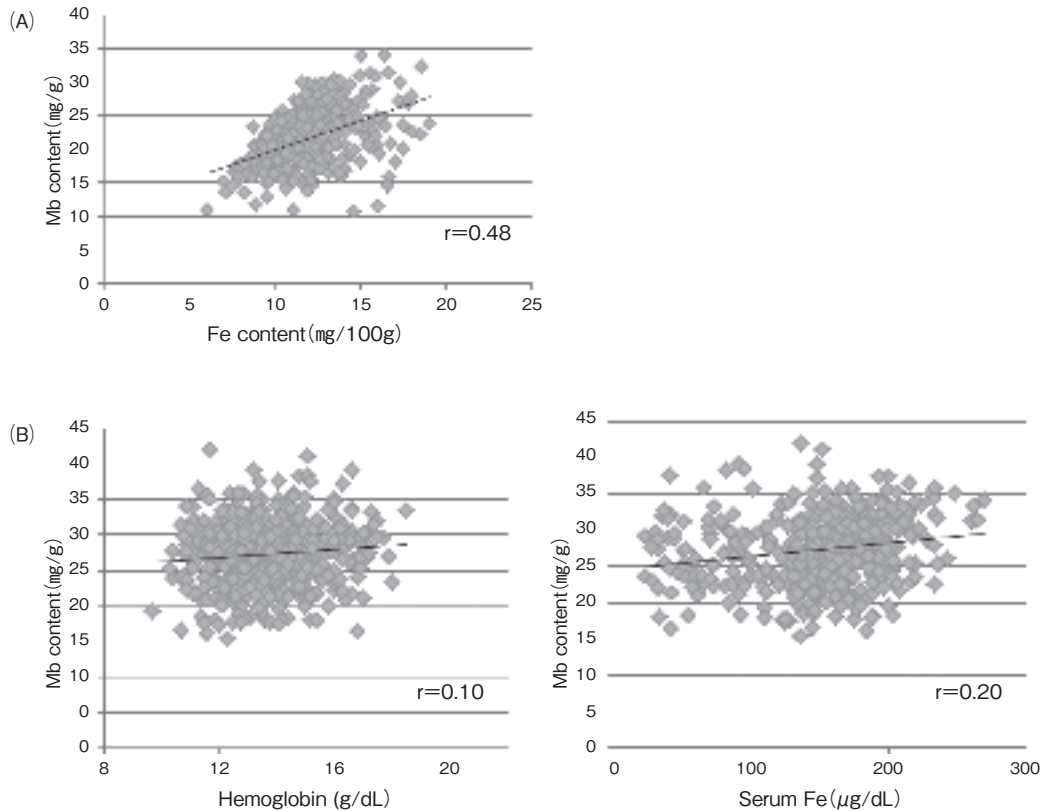


Fig. 2

(A) Relationship between Mb content and Fe content in the fat-free dry matter of longissimus muscles
 (B) Relationship between Mb content and each blood component (Hemoglobin and Serum Fe)

Table 3

The maximum value, minimum value, mean and standard deviation of Total cholesterol, Non-esterified fatty acid, Blood urea nitrogen, Hemoglobin, Serum Fe, Total iron-binding capacity, Number of red cell, Hematocrit

Correlation coefficient (r) between the Mb contents and each blood component

Trait		Mean \pm SD	Max.	Min.	Mb content
					r
Total cholesterol	(mg/dL)	143.22 \pm 29.14	236.00	53.00	0.06
Non-esterified fatty acid	(mEq/l)	0.27 \pm 0.19	1.06	0.06	0.01
Blood urea nitrogen	(mg/dL)	15.70 \pm 3.46	26.10	6.60	-0.02
Hemoglobin		13.66 \pm 1.65	18.50	9.70	0.10
Serum Fe	($\mu\text{g/dL}$)	149.20 \pm 49.09	270.00	22.00	0.20
Total iron-binding capacity	($\mu\text{g/dL}$)	433.69 \pm 48.39	595.00	323.00	-0.04
Number of red cell	($\times 10^4/\mu\text{l}$)	824.13 \pm 99.82	1129.00	567.00	-0.06
Hematocrit	(%)	40.06 \pm 4.88	55.30	27.50	0.10

毛和種において肉色の新たな育種改良指標となり、さらにゲノム育種価による能力評価が可能であることが明らかになった。今回、SNP情報を持つ肥育牛集団を千数百頭まで拡大することで、利用した33,580SNPは遺伝分散をよく捉えており、推定精度が大きく向上した。今後は、この能力評価システムを実際の改良現場でどのように活用するか検討が必要である。現在、黒毛和種において若齢の種雄牛候補を選抜する際には「後代育種価」が得られないため、評価精度の劣る「両親の後代育種価の平均」を用いるしかない。渡邊らは、SNP情報を持つ肥育牛集団から評価対象牛の後代を除いてゲノム育種価を算出することで、この状況を再現している⁶⁾。この結果、枝肉6形質においては、「両親の後代育種価の平均」よりも、約6,000頭の肥育集団から得た「ゲノム育種価」の方が評価精度は高く、実際の種雄牛選抜におけるゲノム育種価の有用性を示した。今後は、このような手法も用いながら、肉色のゲノム育種価評価の有用性を示し、現場での活用を促す必要がある。また、本報告では述べていないが、Mb含量には性差があり、雌の方が含量は高い。これまでSNP情報を持つ肥育牛集団には去勢牛のみを用いてきたが、性染色体の持つ効果についても検討が必要と考える。

また今回、Mb含量と肉中铁含量の関係を調査した。Mb含量と肉中铁含量には正の相関があり、肉色を淡くする改良により肉中の鉄含量も低下することが明らかになった。Mateescuらは、官能検査により、牛肉中の鉄含量が「牛肉らしい風味」に影響を与えると報告している⁷⁾。今後は、和牛肉の肉色が「食味」に与える影響についても詳細に調査する必要がある。一方、Mb含量とヘモグロビン量および血清中铁含量に関連は認められず、Mb含量の低下により血液中的鉄含量は低下しないと考えられる。懸念した貧血との関連も

認められなかった。Garryらが、Mbノックアウトマウスにおいて健康上の問題がほとんど生じなかったと報告していることから⁸⁾、Mb含量の低減が牛の健康を害する可能性は低いと考える。

4. 要 約

本研究では平成26年度、黒毛和種において、肉中のミオグロビン (Mb) 含量 (無脂肪乾物中) が肉色の新たな育種改良指標となることを明らかにし、ゲノム育種価による能力評価を試みた。平成27年度は、Mb含量情報を持つ肥育牛を拡大することで、評価精度の向上を目指した。肥育牛1197頭のSNP情報を用いたゲノム育種価は、後代育種価と高い相関 (0.92) を示し、平成26年度の739頭のSNP情報を用いた場合 (0.86) から評価精度が向上した。

また、黒毛和牛の肉色は淡いほど評価が高いが、Mb含量を低下させる改良を行えば、Mbはヘム鉄を構成するため、肉および血液中的鉄含量も低下する懸念があった。今回、Mb含量の低下により肉中铁含量も低下する可能性が高いことが明らかになった。鉄含量の多少が牛肉らしい風味に影響するとの報告もあることから、肉色の改良が食味に与える影響についても検討する必要がある。一方、血液中鉄含量の低下は認められず、Mb含量の低下が、貧血等で牛の健康に影響を与える可能性は低いと考えられる。

文 献

- 1) 山崎瑞穂, 戸水一志, 河野幸雄, 渡邊敏夫, 杉本喜憲: 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書Vol.33, 308~313, 2014.
- 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) Bocard, 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) Adachi, K., Kawano, H., Tsuno, K., Nomura, Y., Katsura, N., Arikawa, A., Tsuji, A., Onimaru T. : *The Journal of Veterinary Medical Science*, **59**, 873~877, 1997.
- 5) Fairbanks, V. F., Fahey, J. L., Beulter, E. : *Clinical Disorders of Iron Metabolism*, 2nd Ed., Grune and Strhratton, New York, 1971.
- 6) 渡邊敏夫 : *The Journal of Animal Genetics*, **44**, 3~10, 2016.
- 7) 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. : *Journal of Animal Science*, **91**, 1067~1075, 2013.
- 8) Daniel, J., Garry, George, A., Ordway, John, N., Lorenz, Nina, B., Radford, Eva, R., Chin, Robert, W., Grange, Rhonda, Bassel-Duby & R. : *Nature*, **395**, 905~908, 1998.

黒毛和種牛のルーメン絨毛組織の発達関連遺伝子の網羅的解析に関する研究

Study on the global analysis of genes related with development of rumen papillae in Japanese Black cattle

盧 尚 建

(東北大学大学院農学研究科)

Sang-gun Roh

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

The comprehensive transcriptome analysis using RNA-seq method was performed to investigate the profiles of gene expression profiling in the rumen epithelial tissue of the Japanese Black cattle during weaning. Rumen papillae samples gathered from 10 Japanese Black cattle (pre-weaning group (n=5), 5 weeks old; weaned group (n=5), 15 weeks old) were used for RNA extraction. RNA samples were applied to RNA-seq using Illumina's HiSeq 2500, and the resulting data of sequencing were used for Ingenuity Pathway Analysis (IPA) in order to analyze the canonical pathway, upstream regulators, gene network and so on. 871 differentially expressed genes were screened by IPA, and fold changes of 466 genes were increased after weaning, and those of 405 genes were decreased. As the result of pathway analysis, PPAR- α was identified as one of the most related with rumen development. In conclusion, functions of these genes may be related to energy production and harmonization of intraruminal conditions. In addition, it will be important to further assay the new candidate genes found in this work that showed changes in the rumen of Japanese Black calves between pre- and post-weaning.

1. 目 的

反芻動物のルーメンは、ヒトやマウスなどの単胃動物と異なり、飼料の発酵に重要な役割を果たしている器官である。特に、仔牛の離乳前後における適切な栄養・飼養管理によるルーメン発達を促すことは重要であり、丈夫なルーメンづくりとは、その容積とともに筋肉層と上皮層（第一胃乳頭・絨毛）の両方を発育させることである。筋肉層は物性（硬めの粗飼料等の給与）、上皮層は

VFA（揮発性脂肪酸（粗飼料と濃厚飼料等の給与））で発育すると知られている。絨毛は形も大きく数も密で、それだけ表面積が広く、結果としてVFAの吸収能力に優れている。しかし、現在、肉牛一貫経営や酪農経営など集約経営の場合、超早期母子分離による人工哺乳が増加し、主流となっている。黒毛和種牛の早期離乳は子牛には離乳によるストレス（栄養性ストレス）を与え、ルーメンの未成熟と未発達を引き起こし、哺乳期から育成期に移行が不完全となって、育成期と肥

育期の成長に大きな被害と障害を生じる。しかしながら、哺乳期と離乳後にルーメン絨毛（上皮層）の分化・形成のプロセスに関する詳細な機構は明らかにされてない。Rohら（2007）は第1, 2, 3, 4胃の遺伝子発現量の網羅的解析により第1胃で高い発現量を示す遺伝子を報告した¹⁾。また、ルーメン絨毛組織においてSREBP2 and LXR/RXRの転写因子は濃厚飼料多給によって発現量が誘導されることを報告している²⁾。しかし、反芻動物のルーメン（特にルーメン上皮組織）発達に関わる関連遺伝子の解析や外因的な因子による制御機構については詳細に明らかにされてない。そこで、本研究は次世代シーケンサーを用いて黒毛和種牛の離乳前後のルーメン絨毛組織の遺伝子頻度を比較し、ルーメン発達に関連する分子機構を解析した。

2. 方法

2.1 供試動物と組織サンプリング

離乳前の黒毛和種の仔ウシ雄5頭（51.5±1.8 kg, 3週齢）と離乳後の仔ウシ雄5頭（126.3±8.3 kg, 15週齢）を用い、麻酔および放血と殺後、採取したルーメン組織を適当な大きさに切除し、液体窒素に浸して凍結させた。その後、RNA抽出まで-80℃で保存した。

2.2 ルーメン組織からのRNA抽出

各サンプルチューブにRNAiso Plus300 μ lを注ぎ急速冷凍させた。その後、各チューブに冷やしたメタルビーズおよび凍結サンプルを少量入れた。マルチビーズショッカー（安井器械）を用いて17,000rpm, 20sec, 1回で組織を破碎し、各サンプルチューブにRNAiso plus200 μ lを入れて引き続き融解させた。融けてきたものは室温で10分ほど融かし、粉碎し切れていないものは、もう一度マルチビーズショッカーで10秒弱だけ粉碎した。すべて融けきった後にRNAisoを1.5mlチューブ

に回収した。回収したRNAisoにクロロホルム100 μ lを入れて、ボルテックス（10sec）後室温にて3分静置し、12,000×g, 15min, 4℃で遠心した。その後、上清のみを回収し、ほぼ等量の70%EtOHを加え、3～4回転倒混和した。混合液をNucleoSpin RNA Columnにいれ、11,000×g, 30secで遠心した。その後回収した液を350 μ lのMDB（Membrane Desalting Buffer）と混合し、Silica membraneを用いて11,000×g, 1minで遠心し脱塩した。その後Silica membraneに95 μ lのDNase reaction mixtureを加え、室温で15分放置した。Silica membraneを洗浄、乾燥するためBuffer RAW2を200 μ l加えNucleoSpin RNA Columnを用いて、11,000×g, 30secで遠心した。次にBuffer RA3を600 μ l加え、11,000×g, 30secで遠心した。その後、Buffer RA3を250 μ l加え、11,000×g, 2minで遠心した。最後にRNase-free H₂Oを60 μ l加え、11,000×g, 1minで遠心しRNAを回収した。

2.3 次世代シーケンサーを用いたRNA-Seqによる遺伝子発現頻度の解析

イルミナ社のTruSeq RNA Sample Prep Kit v2を用いて調整したcDNAライブラリはアジレント社バイオアナライザのAgilent DNA1000キットでクオリティチェックが行われ、日本ジェネティクス社のKAPA Library Quantification Kitを使って10nMに希釈され、さらに、NaOHで変性させて最終的には10pMの濃度でシーケンサー（HiSeq2500）にかけられた。

得られたシーケンサデータはシーケンスの際に使用するアダプター配列やサンプルごとの区別に使用するインデックス配列、クオリティの低い配列等を取り除いたあと、牛のゲノム配列（UMD3）にマッピングが行われた。これらの作業にはCLC Genomics work benchというソフトが使用された。発現量の補正のため、log変換、ノーマライズ処理、RPKM補正が行われた。2群

間の発現量比の検定にはEDGE testという検定が行われ、多重検定の補正にはFDRという方法が用いられた。CLCで計算した各遺伝子の発現量から算出した発現量比とp-value, q-valueの値をIPAのプログラムに入力し、IPAでの解析を行った。

3. 結果と考察

次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析の結果、離乳前後のルーメン組織で遺伝子発現に変化が見られたものは全部で871個であった。そのうちの466個の遺伝子発現が離乳後に上昇しており、405個が減少していた (Fig. 1)。パスウェイ解析の結果、PPAR α が離乳後に活性化しているレギュレーターとして同定され (Fig. 2), その標的遺伝子群の中に離乳前後におけるルーメン発達関連遺伝子が存在する可能性が示唆された。ケトン体生成に関与する遺伝子の発現が離乳後に上昇することから、ルーメン発達のマーカーとしてこれらの遺伝子は利用できる可能性が示唆された。

4. 要 約

黒毛和種牛ルーメンの離乳前後における絨毛組織の形態的および機能的発達に関連する遺伝子を同定することを目的とした。離乳前後の絨毛組織に関して次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析を行い、離乳前後のルーメン絨毛組織における遺伝子発現の変動を比較、検討した。離乳前区 (n=5, 3週齢) および離乳後区 (n=5, 15週齢) の去勢黒毛和種牛より採取したルーメン絨毛組織からRNAを抽出し、RNA-Seqによりライブラリ作製およびシーケンス解析を行った。得られたシーケンス情報を用いて、解析ソフトのCLCにより離乳前後における遺伝子発現量の比較を行い、発現量に差があったものについてパスウェイ解析を行った。離乳前後で遺伝子発現に変化が見られたものは871個の遺伝子であり、その内466個の発現が離乳後に上昇、405個が減少していた。パスウェイ解析の結果、PPAR α が離乳後に活性化しているレギュレーターとして同定され、その標的遺伝子群の中に離乳前後における

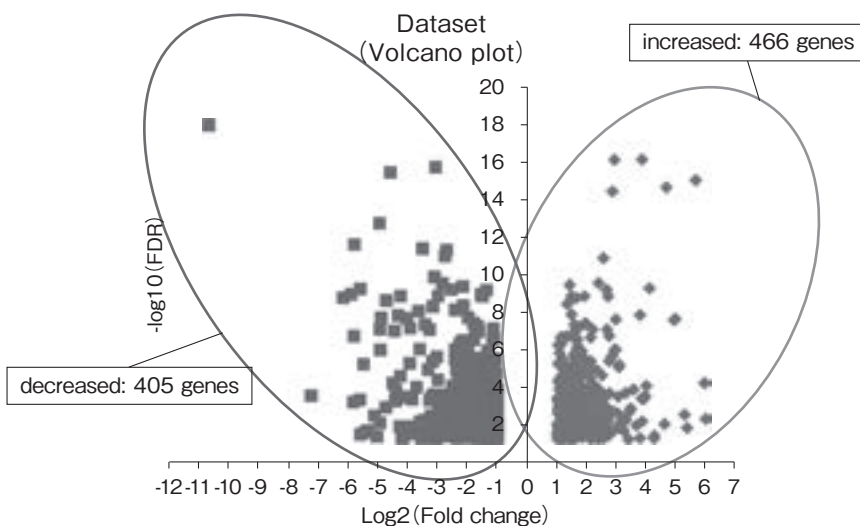


Fig. 1 Volcano plot showing the Bonferroni cut-off and the two-fold change. Comparisons of RNA expression between pre- and post-weaning young cattle

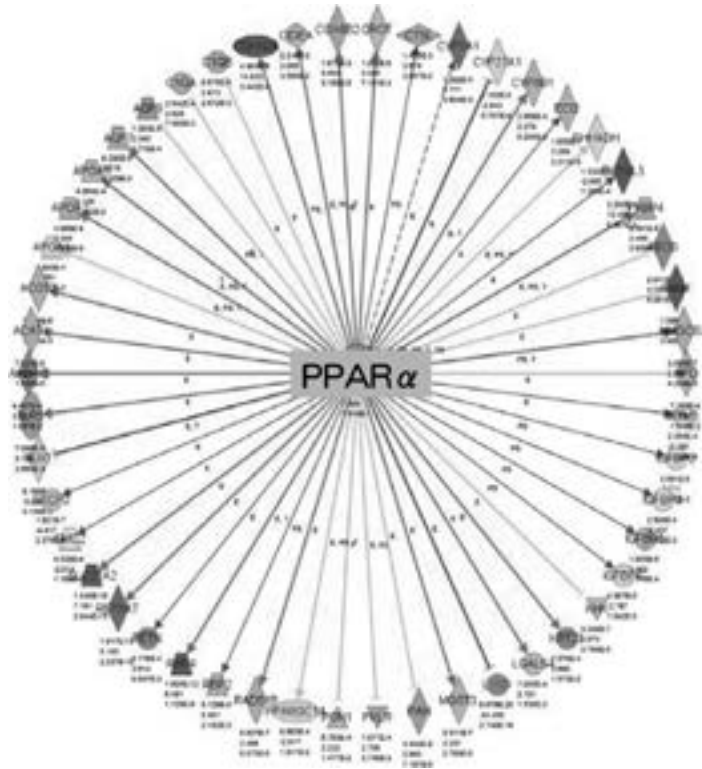


Fig. 2 Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析により判明したPPAR- α によって調節される遺伝子

ルーメン発達関連遺伝子が存在する可能性が示唆された。また、ケトン体生成に関与する遺伝子の発現が離乳後に上昇することから、ルーメン発達のマーカーとしてこれらの遺伝子は利用できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) Roh, S. G., Kuno, M., Hishikawa, D., Hong, Y.H., Katoh, K., Obara, Y., Hidari, H., Sasaki, S. : Identification of differentially expressed transcripts in bovine rumen and abomasum using a differential display method, *Journal of Animal Science*, 85, 395~403, 2007.
- 2) Steele, M. A., Vandervoort, G., AlZahal, O., Hook, S. E., James, C., Matthews, J. C., McBride, B.W. : Rumen epithelial adaptation to high-grain diets involves the coordinated regulation of genes involved in cholesterol homeostasis, *Physiol Genomics*, 43, 308~316, 2011.

牛CHFRおよびRB1遺伝子プロモーター流域の DNAメチル化多型と肉質形質との関係に関する 分子遺伝的研究

Molecular research for relationship between DNA methylation in bovine
CHFR or RB1 gene's promoter region and meat quality

須田 義人
(宮城大学食産業学部)

Yoshihito Suda
(School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

Since we think that quantitative traits of Japanese Black cattle (JB) has been controlled by genetic effects and environmental effects, molecular markers reflected environmental effects are required to develop meat quality efficiently. Recently, we know that DNA methylation to CG rich regions in the upstream region of 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. 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 of promoter regions in CHFR and RB1 genes from loin eye's meat and the quality. Genomic DNA samples were extracted from loin eye's meats in 10 heads of A5 and 7 head of A3 ranks. 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 two genes, CHFR from less than A3 rank and RB1 from A5 rank were very high DNA methylation level. Correlation between BMS and DMP in CHFR was negative, and between in RB1 was negative at 5% significance level. Because DMPs in their two genes were recognized in the specific locus, we thought that DMPs in their genes might be effective markers to develop meat quality.

1. 目 的

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、量的形質である多くの経済形質にはおびただしい数の遺伝子が関与して

いると考えられ、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、特に黒毛和種の枝肉ロース芯部に見られるいわゆる霜降り形質という特性は、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現段階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¹⁾。昨年度に本財団より助成を受けて、ヒトゲノムにおけるエピジェネティック情報をもとに開発されたDNAメチル化解析システムを用いて、そのシステムでターゲットにする遺伝子のすべてにおける相同性が牛のそれらと比較し80%以上で高いことを明らかにし、特に枝肉成績と関連性が高いと考えられた2つの遺伝子、CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) と RB1 (retinoblastoma 1) に絞り込んだ²⁾。これらはいずれもヒトにおいては癌抑制遺伝子であることが知られており、異常メチル化によってmRNA発現が過剰に抑制されることで必要な細胞増殖が阻害されて機能が低下することが考えられる³⁻⁵⁾。そこで本研究では、これら2遺伝子のプロモーター領域のメチル化状況をさらに調査し、特に肉質などの枝肉成績との関係が高い分子マーカーの特定を目的とした。

2. 方法

2.1 供試サンプルとゲノミックDNAの抽出について

約28カ月齢で出荷された黒毛和種枝肉のうち、公益社団法人日本食肉格付協会によってA5ランクおよびA3ランク以下と格付けされたロース芯部組織をそれぞれ10および7サンプル準備し、それぞれ約20mgを用いて抽出を行った。抽出にはQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN社) を用いす

べての操作は専用プロトコールに従った。抽出後に、Nano Drop Spectrophotometer ND-1000 (エル・エム・エス社) を用いてDNA溶液の濃度および純度を測定し、純度が260nm/280nmOD比1.9以上のものを以後の実験に供した。

2.2 ゲノムDNAのメチル化度の解析について
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した。条件はAMPL30%で35秒とした。EpiXplore™ Methylated DNA Enrichment Kit (タカラバイオ社) を用いてメチル化DNAの濃縮を行い、以後の手順は専用プロトコールに従った。濃縮したメチル化DNAを精製するためにエタノール沈殿法で行い、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供した。メチル化度の解析にはEpiScope® Promoter qPCR Array (Human) およびSYBR® Premix Ex Taq™ GC (Perfect Real Time) (タカラバイオ社) を用いて行った。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。

2.3 CHFR遺伝子およびRB1遺伝子上流域(プロモーター)のメチル化解析について
ゲノミックDNAのバイサルファイト反応は、CpGenome™ Universal DNA Modification Kit (Millipore社) を用いて行った。以後の操作は専用プロトコールに従った。上流域のPCR増幅のために用いたプライマーはTable 1に示した。これらの設計には、CHFR遺伝子にはGenBankのJ062517.1を、RB1についてはGenBankのGJ062071.1をそれぞれ参照した。PCR産物のシーケンス解析にはABI3130型ジェネティックアナライザーを用いた。以下、CHFR遺伝子の上流域をCHFR、RB1遺伝子の上流域をRB1とする。

Table 1 Primer information

Region	Sense primer	Antisense promoter	Product (bp)
CHFR ¹⁾	GGCATTTCTGTCCTTTTCAC	ATGGTCCACTCCCCTTTTC	1,118
RB1 ²⁾	TCGTCCCATACTTGGTCTCC	TCGTCCCATACTTGGTCTCC	1,116

1) GenBank: GJ062517.1

2) GenBank: GJ062071.1

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プロシージャを用いた。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) の肉質などを含む格付け間 (A5およびA3ランク以下) での2群比較、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

昨年度の成果を元に、特に枝肉成績と関連性が高いと考えられたCHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) とRB1 (retinoblastoma 1) 各遺伝子の上流域に絞り込んで検討した結果、A3ランク以下ではCHFRが、A5ランクではBR1がそれぞれ有意に高くメチル化を受けていることが明らかとなった ($p < 0.05$)。これらの遺伝子は、人においては癌抑制遺伝子であることが知られており、高度にメチル化を受けることによってmRNA発現が過剰に抑制されることで正常な細胞増殖様式が制御不能になる。牛においては、CHFRがA3以下ではメチル化度が高く、A5においてはメチル化度が低いことで脂肪細胞や骨格筋細胞の増殖や分化がしやすい状態にあることが推察された。また、RB1がA3以下ではメチル化度が低く、A5ではメチル化度が高かった。RB1の発現が抑制されることで、細胞周期の回転を高めCHFRを支持して共役的に機能していると推察された (Fig. 1, Fig. 2)。

CHFRおよびRB1のメチル化度と肉質などの枝肉成績との相関性をTable 2に示した。CHFRは脂肪交雑と有意な負の相関 ($p < 0.05$) が、皮下脂肪厚とは高度に有意な正の相関があった ($p < 0.01$)。また、RB1においては、脂肪交雑や枝肉重量とは有意な正の相関が見られた ($p < 0.05$)。これらのことは前述の結果と整合性があり、細胞周期に関連する遺伝子の発現動態が肉質などに影響すると考えられた。

CHFRおよびRB1のCGリッチ領域におけるシトシンのメチル化パターンの多型 (以下、メチル化多型) が見られる座位をFig. 3およびFig. 4に示した。いずれの領域においてもCGリッチ領域が存在するものの散らばりがあった。そして、複数ではあるものの特定座位において多型が確認された。これらの座位におけるメチル化パターンをマーカーとし肉質改良の効率化が期待できる。

4. 要 約

特に黒毛和種の量的形質の多くは、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。昨年度に本財団より助成を受けて、ヒトゲノムにおけるエピジェネティック情報をもとに開発されたDNAメチル化解析システムを用いて、そのシステムでターゲットにする遺伝子のすべてにおける相動性が牛のそれ

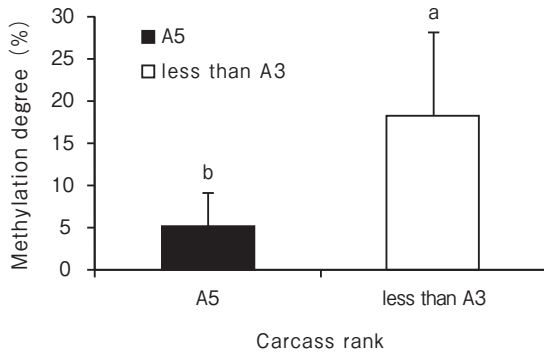


Fig. 1 Comparison between the methylation degrees in upstream region of bovine CHFR gene by carcass ranks

a, b ; The difference between menas with different superscripts was significant at 5% level.

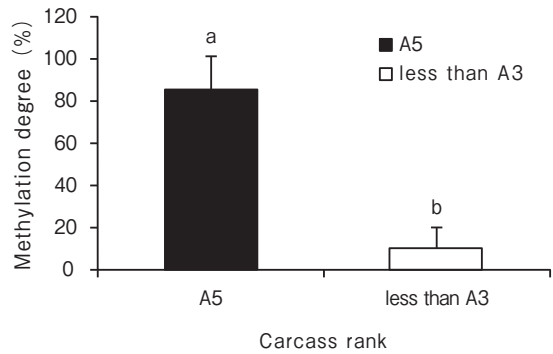


Fig. 2 Comparison between the methylation degrees in upstream region of bovine RB1 gene by carcass ranks

a, b ; The difference between menas with different superscripts was significant at 5% level.

Table 2 Correlation between methylation degree of bovine CHFR and RB1's upstream region (CpG) and carcass traits

Gene	BMS	Carcass weight	Loin eye's area	Rib's thickness	Subcutaneous thickness
CHFR	-0.38*	-0.26	0.1	0.05	0.78**
RB1	0.65*	0.34*	0.2	0.03	0.34

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

```

CTCCCAGGGTACTATCAACTTTCCGATCGCCAGAAAAATGGCCTTGGGAAATTTCAACTTGCATT
TACCTCGTCAGATGTAAGGCAGACCGTCGCTTCGCACTTCTAAACGCCATCTGCACTTCCAACG
CAGCTTTGGGAGTTTGCTTAGGTG[CCC]AATGCTCGTTACTCTGA[CCCC]TTTGC GCGGACTTAAC
ATGTGGCTGACCTCACCTACTTCCGAGATCCGGGAACACCAAGTTGT[CC]GGCCAACATCAAAG
ATGGCGTCCAAG[CCG]GCAACCTATCCTCTGCGCAGCTCCGCTAGCCTCCACGTGTCCACTCTC
GATG[CCC]GT[CCCC]AGGTTCCACTCTAGCCGCCGCTTCAAGTTGTTGCCACCG[CCC]GCCAATC
GCAGGGCAAGGACGCTGTGGG[CCCC]G[CCC]AGCGGATCAGCTGAGGGATCTGCGATGTCTGTTG
ACAGCAGCGGTGGCTGCGCGGCCGGTTCCGGTTTCGGCGCGGGGCGGGGGGTAAGCTGGCGA
CGGGCGCGGGCGTCCGGCGGGACGCTGGGGAGGCTCGCGGGCGGGGCCGAGCGGTGGGGC
GCGGGCGCCGAGGACCAGCGGCAGGCCGAGCCTCTG[CCC]TTGCGGTCCGGGTCTCACCCGA
CGTTTCCGGGTCTCGTCAGATG

```

□ : Cytosine detected methylation polymorphism

Fig. 3 Cytosine detected methylation polymorphism in Bovine CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domains) gene's upstream region

らと比較し80%以上で高いことを明らかにし、特に枝肉成績と関連性が高いと考えられた2つの遺伝子、CHFR (checkpoint with forkhead and

ring finger domains) とRB1 (retinoblastoma 1) に絞り込んだ。そこで本研究では、これら2遺伝子のプロモーター領域のメチル化状況をさらに調

```

AGCTTAACGGATTGAGCGGGAGGAGCGCGGGCGAGCGGGAGGGTGCCGCCACGGAAGAGAG
GGGCGTG[CCC]G[CCCC]GGGTGCGCTCG[CCC]GATACT[CCCC]GGCGGGGGCCTCGGCTGCAGTCC
CGGATCCA[CCC]GGCTATAGCGAGGGAGCCCGCGGTACCCACCGGGCCGGGCAGCG[CCC]TTAC
TCGGCCACCCACGCCCGCAGGGGCGAGTTTCGAGAAGAGGCAGGCTGAGGCGGCGGCAGCGG
CTGCTGCCTCCGGGCGGCCGCTGGGTTGCCGGCCCGGGACT[CCCC]GCCCG[CCC]GGCCCCGCG
CCTCGCCTCGCCGGGCCTCGCCTAGCCAGCA[CCCC]GGTGCCCTCCCGACGCCGGCGGGCCCCG
GGAGCCTCGCGGACGTGACGCCGCGGGCGGAAGTGACGTTTTCCCG

```

□ : Cytosine detected methylation polymorphism

Fig. 4 Cytosine detected methylation polymorphism in Bovine RB1 (retinoblastoma 1) gene's upstream region

査し、特に肉質などの枝肉成績との関係が高い分子マーカーの特定を目的とした。A3ランク以下ではCHFRが、A5ランクではBR1がそれぞれ有意に高くメチル化を受けていることが明らかとなった。またRB1がA3以下ではメチル化度が低く、A5ではメチル化度が高かった。CHFRは脂肪交雑と有意な負の相関 ($p < 0.05$) が、皮下脂肪厚とは高度に有意な正の相関があった ($p < 0.01$)。また、RB1においては、脂肪交雑、キメ・しまり、そして枝肉重量とは有意な正の相関が見られた ($p < 0.05$)。これらのことから細胞周期に関連する遺伝子の発現動態が肉質などに影響すると考えられた。CHFRおよびRB1のメチル化多型について、複数ではあるものの特定座位において確認された。これらの座位におけるメチル化パターンをマーカーとし肉質改良の効率化が期待できる。

文 献

- 1) 豊田実, 鈴木拓, 今井浩三, 篠村恭久: 癌のエピジェネティクス異常, 蛋白質核酸酵素, 51, 2043~2048, 2006.
- 2) 須田義人: 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, 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.33, 173~178, 2015.
- 3) 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.
- 4) 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 AcadSci USA*, 102(30), 10604~10609, 2005.
- 5) 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 Sep7, 2012.

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・保地 眞一

(信州大学繊維学部)

Seiji Takashima and Sinichi Hochi

(Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University)

Spermatogonial stem cells are foundation for male reproductive system. In 2003, Shinohara and colleagues established spermatogonial stem cell line termed germline stem (GS) cells. GS cells are derived from mouse testis and can be expanded under the stimulation with glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). In addition, GS cells can colonize the infertile testis, resume spermatogenesis, produce sperm, and restore fertility. Moreover, GS cells can be applicable for gene modification including gene trap mutagenesis, gene transfection, gene targeting technology, and CRISPR/Cas9 system. These properties led us to seek establishing GS cells from economic animals.

In the previous fiscal year, we reported the protocol for the isolation of pig seminiferous tubule. Based on this protocol, in this report, we tried to establish GS cells from pig testis. Although testis somatic cells proliferated progressively when culture medium containing 1% fetal bovine serum, low serum condition suppressed the somatic cell proliferation. In this condition, non-spreading, round shaped cells were expanded instead of somatic cells depending on the stimulation with fibroblast growth factor 2 (FGF2). We also tried to find the genetic marker to distinguish the FGF2 dependent spermatogonial stem cells from other spermatogonia to improve the efficiency of GS cell establishment. By comparing the expression of spermatogonia-related genes of FGF2-dependent spermatogonia with GDNF-dependent spermatogonia, we identified genes differentially expressed between these cells.

1. 目的

研究代表者の研究対象である精子幹細胞は、精巣中で個体の生涯にわたり精子を作り続ける源となる細胞である。この細胞の試験管内培養技術は、2003年、京都大の篠原により確立された。マイトマイシンC処理済みマウス胎児線維芽細胞で作成

したフィーダー、あるいはラミニンコートされたディッシュ上に幼若マウス精巣細胞（体細胞、生殖細胞を含む）を播種、自己複製促進因子Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) およびFibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加し培養すると、ぶどうの房状の増殖コロニーが出現する。この細胞を不妊マウス精巣へ移植する

と生着し精子形成を再開，子孫を得られることから，培養精子幹細胞（Germline Stem Cell: GS細胞）と命名された¹⁾。この細胞は試験管内で個体の寿命を超えて培養できるだけでなく，遺伝子導入や相同組み替えが可能である^{2~4)}。また，横浜市立大の小川らは精巣の器官培養により試験管内で精子形成を誘導する技術を確立しており，GS細胞を移植された精巣の器官培養によりGS細胞の試験管内精子形成も達成している^{5,6)}。これらの技術はマウスで達成されたものであるが，理論上はより大型の経済家畜でも可能であると考えられる。

現行の繁殖工学技術は卵子を対象としたものである。この技術はすでに経済動物の繁殖制御に活用されているが，卵子が増殖しない細胞であることから，今後の技術の発展の余地は大きくない。研究代表者は，経済動物繁殖工学のプラットフォームを，『増殖しない卵子』から『試験管内で半永久的に増殖する精子幹細胞』に転換することで，繁殖技術をさらに発展させたいと考えている。

精子幹細胞技術は『純化』『試験管内培養』『ゲノム編集』『試験管内精子形成』の4つの技術で成立する。マウスではこれらの技術が確立されているが，残念ながら経済家畜では成功した例は報告されていない。マウスの場合精巣から精子幹細胞を純化することなく培養樹立が可能であるが，それはマウスの精巣体細胞の増殖力が弱いためである。一方経済動物である牛や豚の場合，体細胞の増殖力が高く精子幹細胞を淘汰してしまうことが，GS細胞樹立を阻む主要因となっている。また，マウスの場合GS細胞の増殖因子としてGDNFが用いられてきたが，牛・豚では異なる可能性もある。

研究代表者はマウス精子幹細胞自己複製メカニズム解析の過程で，GDNF非存在下，FGF2に依

存して増殖する細胞集団を見いだした。不妊マウス精巣へ移植すると生着し精子形成を再開，子孫も作成できたことから，上記の細胞集団は精子幹細胞であることが判明した⁷⁾。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。

こうした背景から研究代表者は，自身が発見した自己複製因子FGF2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，研究を進めてきた。今回の報告では，GDNF-free培養法による豚精巣細胞培養の検討と，新しい精子幹細胞マーカー探索の結果について報告する。

2. 方 法

2.1 精巣材料の入手

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。豚はDuroc種の8週齢のものを使用した。譲渡された検体は，常温で研究室まで運搬し，PBS（-）で血液などを洗浄した後培養に供した。

2.2 豚精巣細胞の単離と培養

精巣組織は鋭利なはさみで3mm角程度の大きさに細切し，5mlの2mg/mlのCollagenase type IIで37℃，15分手で振盪しながら酵素反応を行った。反応後，HBSS（-）バッファーを加えて全量を50mlにし静置，精細管を沈殿させ，浮いている間質細胞をピペットで除去した。さらにHBSS（-）バッファーで全量を50mlにし同様の作業を行うことで，間質細胞を除去した。得られた精細管をさらに0.25%トリプシン・1mMEDTAで消化することで精細管をシングルセルにした。トリプシンの反応は最終濃度10%となるようFBSを添加することで停止させた。

2.3 豚精巣細胞の培養

得られた細胞は、24well plate (IWAKI) に播種し37℃ 5 %CO₂条件で培養した。基礎培地はStemPro 34¹⁾を基本とした培地、およびIMDM培地にKnockout Serum Replacement (Invitrogen ; KSR) を添加したIscove培地の二種類を使用した⁸⁾。得られた細胞は、ゼラチンコートした6well tissue culture plate (IWAKI) に5×10⁵ cells/well で播種し37℃ 5 %CO₂条件で24時間培養の後、浮遊細胞をさらにラミニンまたはフィブロネクチンをコートした24well tissue culture plate (IWAKI) に移し培養を続けた。

2.4 マウス精子幹細胞の培養と real-time PCR

マウス精子幹細胞の培養については、2015年に発表した文献に従い行い、RNAを抽出し、real-time PCRで遺伝子発現を比較した⁷⁾。使用したプライマーはTable 1 に示す。

3. 結果

3.1 豚精巣細胞の培養

8週齢Duroc種より得た精細管構成細胞（セトリ細胞、精原細胞を含む）を、種々の条件で試験管内培養し、観察を行った。まず、接着条件としてマウス同様ラミニンコートした培養皿で培養

を行ったが、ラミニンコートディッシュには体細胞以外の細胞は接着しないことを目視で確認した。そこで次に、ファイブロネクチンをコートしたディッシュ上での培養を行ったところ、体細胞とは異なる円形の細胞が接着しているのを見いだし、培養を継続した。培地の条件は、5, 10, 20%終濃度でKSRを添加したIscove培地およびStemPro34培地に10ng/mlでFGF2を添加したものを基本培地とし、1%, 0.1%での血清添加、あるいは1 μM PD0325901の添加を検討した。

ファイブロネクチン上で培養した場合、血清を1%から0.1%に下げることによって体細胞の増殖を抑制することができたが、血清を入れない場合はいずれの細胞も接着しなかった。一方、PD0325901を添加すると血清存在下でも体細胞の生存・増殖を協力的に抑制できたが、生殖細胞様細胞の増殖も認められなかった。Stem Pro34培地に血清を1%添加し培養した場合、一ヶ月後に進展せずに丸い形態を保った接着細胞が徐々に増殖することが確認できた。しかしこの条件では体細胞も増殖し、この細胞を淘汰しつつあった。この条件で血清を0.1%に減らすと体細胞の増殖は抑制されたが、生殖細胞様の細胞も減少した。一方Iscove培地に20% KSR, 0.1% FBSを添加した条件ではStemPro培地よりも体細胞の増殖が抑制され、生

Table 1 Primers for real-time PCR

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Dazl</i>	AAGGCAAAATCATGCCAAAC	TTCTGCACATCCACGTCATT
<i>Hprt</i>	GCTGGTGAAAAGGACCTCT	CACAGGACTAGAACACCTGC
<i>Kit</i>	GGGCTAGCCAGAGACATCAG	AGGAGAAGAGCTCCCAGAGG
<i>Neurog3</i>	AGCAGAGAGGCTCAGCTATCC	AACTGAGCACTTCGTGGTCC
<i>Rarg</i>	AGGTCACCAGAAATCGATGC	CTGGCAGAGTGAGGGAAAAG
<i>Sall4</i>	TTCGTGTGTAACATATGCGG	GTGTACTGGTTCCAGGAGGC
<i>Sohlh1</i>	ATGGAGCACCTTTCTGATG	ACAGCTCCCCAGCAAATAA
<i>Sohlh2</i>	TCTCAGCCACATCACAGAGG	TCATGGGGAGAGACAGTTCC
<i>Sox3</i>	CGTAACTGTGGGGTTTGT	AACCTAGGAATCCGGGAAGA
<i>Stra8</i>	GACTGACTCGTCAGGGCTTC	CATCATCACTGGGTTGGTTG
<i>T</i>	GCCAAAGAAAGAAACGACCA	TGACCGGTGGTTCTTAGAG
<i>Uchl1</i>	GATTAACCCGAGATGCTGA	CCTGTCCCTCAGTTCCTCA

殖細胞様の細胞はプレートから脱離しやすくなっていたものの、増殖は維持されていた (Fig. 1)。

3.2 新しい精子幹細胞マーカーの探索

マウスの精子幹細胞はGDNFあるいはFGF2刺激により増殖させることができたが、豚の場合GDNFでは増殖させることができない可能性がある。そこで豚精巣からGDNF非依存性、つまりFGF2に反応して増える精子幹細胞を精製するためのマーカー探索を行った。マウス精巣由来のGDNF依存性精子幹細胞とFGF2依存性精子幹細胞よりRNAを回収、real-time PCRによりマーカー候補遺伝子の発現比較を行った (Fig. 2)。

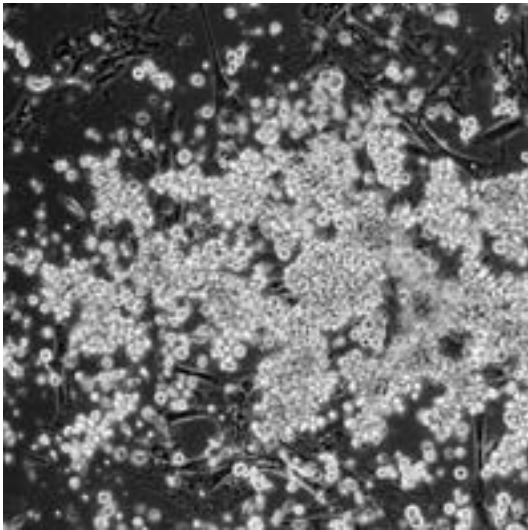


Fig. 1 Cultured cell from 8 weeks old pig testis under low serum condition. Cells were seeded onto fibronectin-coated dish and cultured with Iscove medium containing 20% KSR, 0.1% fetal bovine serum, and 10 ng/ml FGF2.

候補遺伝子として精原細胞に発現するとされている16遺伝子を解析し、うち15遺伝子が差次的発現を示した。15遺伝子のうちGDNF依存性に発現する遺伝子は *T* のみであり、残り14遺伝子はすべてFGF2依存性精子幹細胞で高発現を示していた。細胞表面タンパクをコードする遺伝子は *Kit* のみであり、FGF2依存性精子幹細胞で高発現を示していた。残りはDNAまたはRNAに結合し遺伝子機能を制御・修飾するものをコードする遺伝子であった。差次的発現を示さない遺伝子は *Sox2* であり、元々精子幹細胞での発現は低いことがRNAおよびタンパクレベルで示されているものであった。

4. 考 察

前年度に確立した豚精巣シングルセル調製法により間質細胞混入の少ない生殖細胞集団を得て、培養を行った。結果として体細胞とは形態の異なる集団を培養することに成功しているが、現在のところこの細胞が生殖細胞かどうかは確定していない。

これまでは豚精巣細胞を培養すると体細胞の過増殖により生殖細胞が淘汰されてしまっていた。今年度はこの点を克服するための対策として『PD0325901の添加』『無血清/低血清培養』について検討を行った。前者については効果的に体細胞の増殖を抑制したが、生殖細胞様の細胞コロニーも認められなかった。無血清培養の場合も同様であった。一方、血清濃度を0.1%に減じるこ

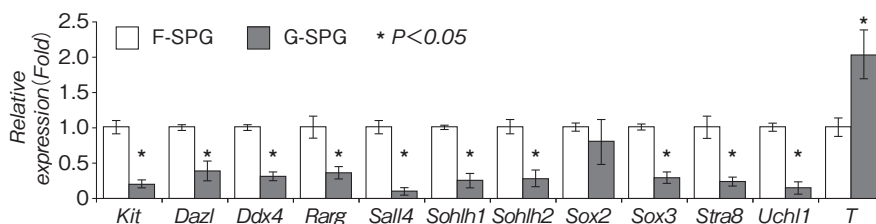


Fig. 2 Spermatogonial marker expression in FGF2-/GDNF-cultured spermatogonia (F-/G-SPG) *in vitro*.

とで体細胞とは異なり丸い形態を保ちつつ徐々に増殖する細胞集団が現れた。この細胞が生殖細胞マーカーを発現していれば、精子幹細胞である可能性が高い。この細胞の出現に関する再現性をとるとともに、遺伝子発現解析等により確認をとりたい。

加えて、試験管内で培養可能な豚精子幹細胞を精巣から効率よく抽出・評価するためのマーカー候補を探索した。マウスでは精子幹細胞の自己複製にはGDNF依存性、FGF2依存性の2つの様式があることが分かっていた。一方、牛・豚精子幹細胞は培養が成功していない。この原因の一つとして、牛・豚精子幹細胞がGDNF依存性ではない可能性があげられる。そこで、FGF2依存性に増殖する精子幹細胞特異的なマーカーを用いた純化法により、試験管内培養が可能な牛・豚精子幹細胞が純化できる可能性があると考え、この実験を行った。結果としてKITがFGF2依存性精子幹細胞の細胞表面マーカーとなりうること、FGF2依存性/GDNF依存性に増殖する精子幹細胞で発現が高い遺伝子マーカーを同定することができた。これらを指標に牛・豚精子幹細胞を純化すること

で、試験管内培養の成功率を改善できる可能性がある。

5. 要 約

今年度の研究では、豚精巣由来細胞を低血清下、FGF2刺激を加えて培養することで、精巣体細胞の増殖を抑えられること、および体細胞とは異なる円形の盛り上がった細胞が増殖してくることを見いだした。加えて、FGF2依存性に増殖する精子幹細胞を純化するためのマーカー遺伝子を複数同定した。今後、これらの知見を活かし牛・豚精子幹細胞培養法の確立を目指す。

引用文献

- 1) Shinohara, K. *et al.* : *Biol. Reprod.*, **69**, 612~616, 2003.
- 2) Shinohara, K. *et al.* : *Development*, **132**, 4155~63, 2005.
- 3) Shinohara, K. *et al.* : *Biol. Reprod.*, **72**, 236~240, 2005.
- 4) Shinohara, K. *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8018~8023, 2006.
- 5) Sato *et al.* : *Nature*, **471**, 504~507, 2011.
- 6) Sato *et al.* : *Nature Commun.*, **2**, 472, 2011.
- 7) Takashima *et al.* : *Stem Cell Reports*, **4**, 489~502, 2015.
- 8) Shinohara, K. *et al.* : *Biol. Reprod.*, **91**, 88, 2014.

乳牛における炎症性子宮疾患の迅速診断を目指した 子宮の炎症度スコアの確立

Establishment of the scoring of uterine inflammation in dairy cows for a
rapid diagnosis

清水 隆

(帯広畜産大学畜産衛生学研究部門)

Takashi Shimizu

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

Inflammatory uterine diseases that are developed by infection of gram-negative bacteria affect ovarian function in dairy cows. However, relationship between inflammation score of uterus and ovarian function is unknown yet. In the present study, we examined effect of uterine inflammation score (Score 0-3) on concentration of lipopolysaccharide (LPS) and malondialdehyde (MDA, oxidation stress marker) in ovarian follicular fluid by using uterus and ovaries that were collected from slaughterhouse. *Escherichia coli*, β -*streptococcus group G*, *Acinetobacter loffii*, *Pasteurella sp*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter sp*, *Klebsiella sp*, and *Pseudomonas fluorescens* were isolated from uterus which caused inflammation. Pathogenic bacteria were detected in uterus that have uterine fluid and Score more than 2. There were no significant differences between concentration of LPS in follicular fluid and uterine inflammation score. The same tendency was also observed in concentration of MDA in follicular fluid. The results from the present study suggest that degree of uterine inflammation may be not associated with ovarian follicular functions in dairy cows. We are not able to know the days after calving because we used the samples that were collected from slaughterhouse. Therefore, to examine in detail, we have to use ovaries and uterus that are collected from cows that develop uterine inflammatory disease. It is very important to examine the relationship between degree of uterine inflammation and ovarian function for improvement of reproduction of dairy cows.

1. 目 的

本研究課題では、1) 子宮の炎症度合の基準化(スコア化)を行うとともに、2) 子宮内貯留液中のリポポリサッカライド(LPS)濃度と卵胞内のマロンジアルデヒド(MDA)濃度やLPS濃度とが炎症スコアと関連するのかを検証することに

より、子宮の炎症スコアと子宮の性状性や卵巣機能との相互関連を明確化することを目的とした。

2. 方 法

研究課題1. 子宮の炎症のスコア化と子宮内貯留液のLPS濃度との相互関連の検証

炎症を起こした子宮には様々な炎症状態が認め

られる。子宮の炎症度合について子宮内膜層の充血度合を指標とした分類（スコア化）はこれまでにされていない。また、その時の子宮内貯留液中の細菌種やLPS濃度を詳細に検証した報告はない。

そこで本研究課題では、食肉処理場由来の乳牛の生殖器を利用し、子宮内膜層の充血度合により炎症の状態をスコア0（正常）、スコア1（軽度）、スコア2（中度）、スコア3（重度）の4段階に分類するとともに、子宮内貯留液を採取する。採取した子宮内貯留液は、LPS測定キット（Endospecky ES-24S kit, Seikagaku Biobusiness）を用いて測定すると同時に細菌検査を行った。

研究課題2. 子宮炎症のスコアと卵巣内卵胞のLPS濃度およびMDA濃度との関連解析

申請者は、これまでに卵巣内卵胞にLPSが存在すること、またLPS濃度の高い卵胞と低い卵胞が存在することを明らかにした。また、LPS濃度の高い卵胞では、ステロイドホルモンの産生能が低下していることも発見した。そこで、本研究課題では、子宮の炎症度合（スコア）と卵胞内LPS濃度との関係性を検証するとともに、卵胞内の酸化ストレス状態を同時に測定することによって、子宮の炎症度合と卵胞の生理学的状態との関係性を詳細に調べた。研究課題1と同様に、子宮の炎症スコアの分類時に、その子宮に付随している卵巣内の大卵胞から卵胞液を採取する。採取した卵胞液は、LPS測定キットを用いたLPS濃度の測定に供した。さらに、酸化ストレスの指標であるマロンジアルデヒド（MDA）キット（Japan Institute for the Control of Aging, Shizuoka, Japan）を用いて卵胞液中のMDA濃度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 子宮の炎症のスコア化と子宮内貯留液のLPS濃度との相互関連の検証について
子宮内膜の充血度をもとにスコア0からスコア

3に分類した（Fig. 1）。スコアリングは、子宮内膜の充血がないものをスコア0、子宮内膜全体の50%以下の部分が赤味を帯びているものをスコア1、子宮内膜全体の50%以上の部分が赤味を帯びているものをスコア2、子宮内膜全体が爛れているものをスコア3とした。

本研究において、子宮内膜の充血度から炎症性子宮疾患へのアプローチを試みた。子宮内貯留液が存在していた子宮に膿片を含む貯留液や膿粘性の貯留液を確認した。さらに貯留液の存在する子宮で子宮疾患を引き起こす可能性のある病原性細菌を検出した（Fig. 2）。子宮から検出された細菌は、*Escherichia coli*（大腸菌）、*β-streptococcus group G*, *Acinetobacter loffii*, *Pasteurella sp.*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Enterobacter sp.*, *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas fluorescens*であった。スコア0およびスコア1における病原性細菌と日和見細菌の検出率についてみると、いずれのスコアにおいても病原性細菌の検出率と日和見細菌の検出率との間に有意な差は認められなかった。スコア1で子宮内貯留液が認められた場合には、病原性細菌の検出率が日和見細菌の検出率に比べ高い傾向が認められた（Fig. 3）。スコア2以上で子宮内貯留液が認められた子宮では、病原性細菌のみ観察された。

子宮から膣への滲出液に存在する膿の割合をスコア化し、子宮内の病原性細菌との関連性を調べた過去の研究では¹⁾、膣滲出液のスコアと病原性細菌の検出との間に有意な正の相関が認められることが報告された。また、超音波画像診断を用いて子宮内貯留液の蓄積量を分類した研究では、貯留液の蓄積量が多い子宮は子宮内細菌の増殖や病原性細菌の高い検出が認められた²⁾。これらのことから、子宮内に膿を含む貯留液が存在することは、炎症性子宮疾患を引き起こす病原性細菌が感染している可能性のあることが推察される。した

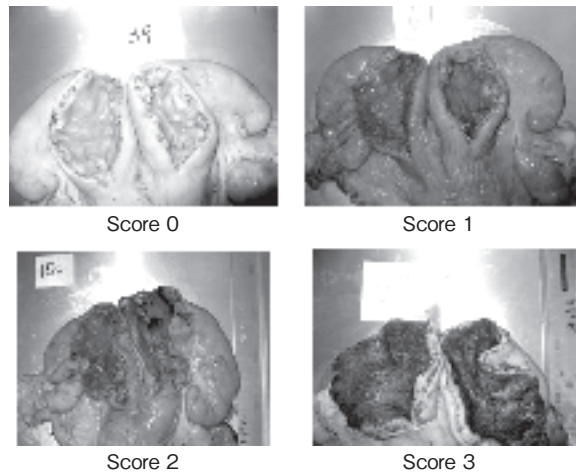


Fig. 1 Photos and score of uterine endometrium

Score0, no hyperemia ; Score1, hyperemia at <50% of the endometrial surface ; Score2, hyperemia at <50% of the endometrial surface ; Score3, brown and grey colored endometrial surface.

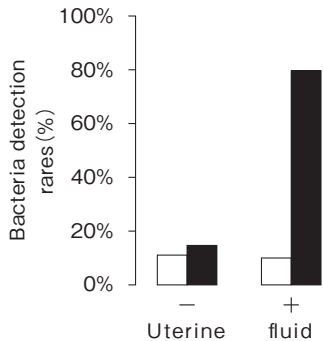


Fig. 2 Bacteria detection rates from bovine uterus

Opportunist bacteria (white bar) and pathogenic bacteria (black bar) isolated from uterus of bovine (n=37). Uterine fluid negative : n=27, Uterine fluid positive : n=10. Values are shown as percent (%). a-b, P<0.01

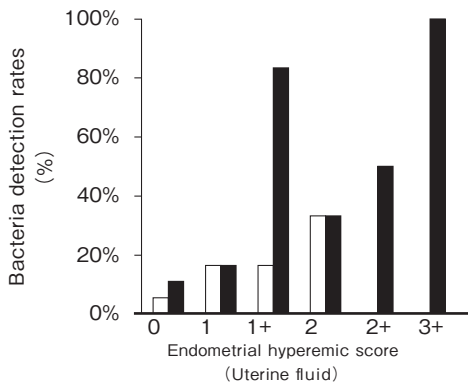


Fig. 3 Bacteria detection rates from bovine uterus

Opportunist bacteria (white bar) and pathogenic bacteria (black bar) isolated from bovine uterus (n=37). Score0 (n=18), Score1 (n=6), Score1+ (n=6), Score2 (n=3), Score2+ (n=2), Score3+ (n=2). + : Uterus include uterine fluid.

がって、本研究の結果から、牛子宮内に貯留液が溜まっており充血が認められる子宮は炎症性子宮疾患に罹患している可能性が高いことが示唆された。

3.2 子宮炎症のスコアと卵巣内卵胞のLPS濃度およびMDA濃度との関連解析について

子宮内膜充血度スコアと卵胞液中のLPS濃度およびMDA濃度との関係性を検証した結果、いずれにおいても子宮内膜充血度スコアとの関連性が認められなかった (Fig. 4, Fig. 5)。

子宮内に存在した病原性細菌から放出されるLPSが、血中に移行するの否かは不明である。しかしながら、本研究室の過去の研究では、炎症性子宮疾患を患った乳牛の血中にはLPSが高濃度に存在することが確認されていることから、卵巣内卵胞に認められたLPSが子宮由来である可能性は否定できない。本研究成果において、子宮内細菌の有無に関係なく卵胞液中には一定量のLPSが検出された。このことは、子宮の炎症が回復した後も卵胞内にLPSが留まる可能性を示唆している。事実、臨床の現場では、子宮の炎症が認められない乳牛に人工授精を施行しても受胎しない

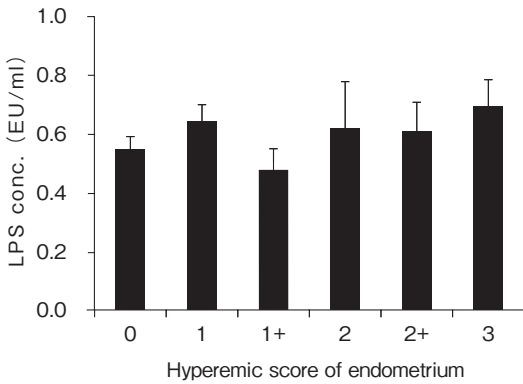


Fig. 4 LPS concentration in follicular fluid of large follicle from bovine ovary and hyperemic score of endometrium

Score0 : n = 23, Score1 : n = 8, Score1+ : n = 8, Score2 : n = 3, Score2+ : n = 3, Score3+ : n = 3. '+' means presence of uterine fluid. All values are shown as mean ± SEM.

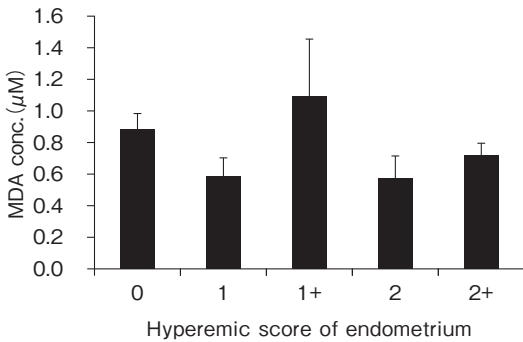


Fig. 5 MDA concentration in follicular fluid of large follicle from bovine ovary and hyperemic score of endometrium

Score0 : n = 22, Score1 : n = 8, Score1+ : n = 6, Score2 : n = 3, Score2+ : n = 3. '+' means presence of uterine fluid. All values are shown as mean ± SEM.

ケースが見受けられる。このようなことから、卵胞内に長期間留まっているLPSが卵胞発育や卵子の質に影響している可能性が推察される。

また、子宮内細菌および子宮内貯留液と卵胞液中のMDA濃度との間に関連性は認められなかった。細菌感染によって引き起こされる疾患に乳房炎がある。乳房炎に罹患した乳牛の血中MDAを調べた研究では、血中MDA濃度が健康牛に比べて乳房炎牛で増加することが報告されている³⁾。本研究に用いた炎症性子宮疾患牛の卵巣は、食肉

処理場由来のものであり、その個体の血中MDA濃度がどの程度であったかは解析することができない。細菌感染によって生体内が酸化ストレス状態になりやすいことを考慮すると、本研究に用いた子宮内膜充血度スコアが高い乳牛の生体内では酸化ストレス状態になっていることが予測できるが、卵胞液中MDA濃度には反映されていない。

4. 要 約

本研究課題では、子宮の炎症スコアと子宮の性状的や卵巣機能との相互関連を明確化することを目的とし、食肉処理場由来の卵巣および子宮を用いて検証した。子宮内膜充血度スコア、貯留液の有無と卵胞液中LPS濃度および酸化ストレス状態の間には明確な関連性は認められなかった。しかしながら、子宮内膜充血度スコアと検出細菌との関係性においては、充血度スコア2および3では病原性細菌の検出割合が高いことが示された。このことは、病原性細菌が子宮内の炎症を誘発している可能性を示唆している。

本研究課題の成果から、炎症性子宮疾患による細菌感染や酸化ストレス状態は卵巣機能に直接的には影響しない可能性が推察された。前述したとおり本研究に用いた乳牛の子宮および卵巣は食肉処理場由来のものであり、研究に用いた乳牛の分娩後の経過日数が不明である。酪農現場で簡易に判断できる炎症スコアを確立するために、今後は分娩後の日数を考慮し継続的に観察することが可能な炎症性子宮疾患の罹患牛を用い、子宮内膜の充血度、細菌および貯留液の有無と卵胞液中LPS濃度および酸化ストレス状態との関連性をより詳細に解析することが必要であると考えられる。このような対策を行うことにより、乳牛の生産性向上を目指した取り組みが可能になる。

文 献

- 1) Dohmen, M. J. W., Lohuis, A. C. M., Huszenicza, G.y., Nagy, P., Gacs, M. : *Theriogenology*, **43**, 1379~1388, 1995.
- 2) Mateus, L., Lopes da Costa, L., Bernardo, F., Robalo Silva, J. : *Domest. Anim.*, **37**, 31~35, 2002.
- 3) Jhambh, R., Dimri, U., Gupta, V. K., Rathore, R. : *Veterinary World*, **6**, 271~273, 2013.

異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定

Novel standard for artificial insemination timing based on different estrous detection criteria in cattle

坂口 実・菊池 元宏・三浦 弘

(北里大学獣医学部)

Minoru Sakaguchi, Motohiro Kikuchi and Hiroshi Miura

(School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

Detection of estrus is prerequisite for optimal timing of insemination. Recently, however, it is becoming difficult to detect standing estrus, which is the primary sign of true estrus. In this study we tried to evaluate other estrus-related behaviors and increased activity as estrus signs for the purposes of determining more optimal timing of insemination. Visual or continuous observation using a video system and activity monitoring using an automated pedometry system were performed in Japanese beef cows and the frequency and duration of estrous behaviors of these cows were analyzed. The intervals from the onset or the end of estrus confirmed by the different detection methods to ovulation were significantly variable. These variance must be taken into consideration when using the different methods for determining optimal timing of insemination. In this study, because estrus was synchronized and 2 or more cows were in estrus simultaneously, it was easy to find the standing and mounting activities, and other two behavior (chin resting and sniffing vagina) will be supplemental methods to increase sensitivity to predict optimal timing of insemination. In addition, it was preliminary confirmed that social order of the cows may affect the expression of estrous behavior. To apply these information for increasing sensitivity of the prediction methods for optimal timing of insemination, further investigation is needed to clarify the effects of number of cows in estrus on the estrus length and estrous sign in relation to the social order of cows.

1. 目 的

酪農および肉牛繁殖経営において、繁殖効率は収益性を左右する重要な要因である。我が国では、乳用牛のみならず肉用牛のほぼすべてが人工授精によって繁殖されており、経営者が望む時期に、確実に受胎させることが必要である。牛における人工授精の適期は、従来スタンディング

(ST) 発情をゴールドスタンダードとして設定されてきたが、これに代わる指標が求められている。その理由として、乳牛では高泌乳化に伴う発情行動、特にST行動の微弱化と持続期間短縮、肉牛では多頭化等による発情見逃しの増加があげられる^{1, 2)}。また両者に共通して、発情発見スキルの低下も問題視されている。客観的な手法として、行動量(歩数)の変化による発情の自動検出

システムが開発され、急速に普及しつつあるが、発情から排卵までの時間的關係は、どの基準で発情と判定するかにより異なる³⁾。また、ST行動以外の発情関連行動の発現時期や頻度と、排卵時間との関係についてはこれまでほとんど検討されていない。さらに牛群内には通常、一定の序列(順位)が存在し行動に影響するため、発情関連行動を個体間の相互作用として捉えることにより、より柔軟かつ実用的な授精適期の設定が可能になると考えた。

国外ではEU諸国を中心に、発情行動そのものに焦点をあてた研究が、2000年代に入り目立つようになってきている⁴⁾。こうした研究では、行動量の自動計測(歩数計、加速度計)を組み合わせた研究も多く、ホルモン剤を用いた繁殖性向上技術に対する、消費者の拒否感を背景にしていると考えられる⁵⁾。発情観察の必要がないオブシンクに代表される、ホルモン剤使用プログラムが広く普及してきた米国でも、2010年代に入り、ホルモンプログラム単独での繁殖管理の限界を認識し始めた研究グループにより、行動量計測をホルモンプログラムと組み合わせて、繁殖性向上をはかる研究が見られるようになった⁶⁾。

欧米諸国におけるこうした研究は乳牛中心に取り組まれており、肉牛に関する報告は極めて少ない。これに対し、我が国では、高泌乳牛の繁殖性低下の問題については共通であるが、黒毛和種を主体とした肉牛では、素牛価格がはるかに高価であり、ほぼ100%が人工授精あるいは胚移植により素牛生産が維持されている。肉用牛の受胎性についても乳牛同様に低下しているといわれており、乳牛と同様の発情行動に関する詳細な再検討と、これらに基づいた授精適期の再定義が求められている。

そこで本研究では、行動観察と歩数計による行動量計測を組み合わせることによる、発情観察の

省力化および発見率の向上を第一の目的とし、それらの結果から、これまで適期と考えられていた授精時期について再検討することにより、低受胎率牛群の受胎率向上対策策定の一助とすることを最終的な目的とした。

2. 方法

北里大学(青森県十和田市)にて飼養されていた肉用繁殖牛14頭を供試し、前肢に発情検出用の無線送信歩数計(牛歩, コムテック(株))を装着した。供試牛の発情行動を目視(2.1)あるいはビデオカメラ(RD-4402, (株)アルコム)によって記録した(2.2, 2.3)。

2.1 目視による発情関連行動記録と排卵時刻の関係

予備的な検討として、14頭中6頭の未経産牛を対象に発情同期化処置後、3時間ごとに30分間目視観察し、Van Eerdenburgら⁷⁾による発情スコア表に基づいて記録し、2回の連続した観察時に、スコアが50点を越えた時点を発情開始とした⁷⁾。スコアが50以下となった時点から3時間ごとに排卵確認を実施し、排卵時刻(卵胞消滅の1.5時間前)を推定し、基準とする発情行動が、発情開始から排卵までの時間にどのように影響するか解析した。歩数上昇による発情判定は、過去10日間の平均値から、2倍以上へ2時間連続して上昇することを条件とした。また6時間ごとに採血し、血漿中エストラジオール-17 β (E₂)濃度を測定した。

2.2 連続観察による発情行動解析と排卵時刻の関係

経産牛13頭を供試し、プロスタグランディンF2 α 投与による発情同期化処置後、3台のビデオカメラにより、のべ24回の発情行動を記録し、投与2日後から、1日4回の給餌時に排卵確認を実施し排卵時刻を推定(卵胞消滅の3時間前)し

た。前出の発情スコア表に記載された行動に加えて他の個体を舐める行動も解析対象とし、排卵60時間前からの記録映像より各行動の開始と終了および頻度を抽出し、30分ごとの発情スコアを算出した。スコア合計が100点を上回った時点を発情開始と判定し、下回った時点を終了とした。歩数上昇は、過去7日間の平均からの1.6倍以上への上昇を基準とした。

2.3 牛群内順位と発情行動の関係

近藤らの提示した餌槽優先法⁸⁾を一部改変し、牛群内の順位付けを実施、発情行動とその後の排卵時刻への影響を解析した。2.2で得られた行動データのうち、順位を確定できなかった1頭の2発情を除いた、12頭の22発情について、上位6頭、下位6頭に分けて発情行動の頻度を比較した。

3. 結果と考察

3.1 目視で確認した発情行動発現と排卵時刻の関係

発情スコアを基準とした平均発情持続時間(±SD)は17.8±7.2時間であり、最大30時間、最小6時間であった。排卵は、発情開始から平均32.9±5.5時間で、発情終了から平均12.2±5.4時間で観察された。陰部嗅ぎ、顎のせ、およびマウンティング(MT)行動はすべての発情期間で観察されたが、フレーメン、頭側からのMT、乗駕される

が逃げる、STの4項目については、観察されないこともあった。各発情関連行動の開始から排卵までの平均時間を、発情検出率とともにTable 1に示した。排卵までの平均時間は、陰部嗅ぎ、顎のせ行動、発情スコアおよび歩数上昇と比べて、ST行動で有意に短かった($p < 0.05$)。供試牛の血漿中E₂濃度がピークに達した6時間後に発情スコアのピークが見られ、陰部嗅ぎおよび顎のせ行動とE₂濃度最高値との間に正の相関($p < 0.01$)を認めた。

これらの結果から、ST行動か歩数上昇を基準とした場合は、発情を見逃すことがあることが分かった。また、発情行動としては陰部嗅ぎが最も早く発現し、これが発情スコアに反映されていることも示された。発情開始から排卵までの時間間隔については、ST行動を基準とした場合が最も短く、歩数上昇および陰部嗅ぎとの時間差は7~8時間あることが分かり、これら異なる指標に基づく人工授精適期の見極めには注意が必要であると考えられた。

3.2 連続観察による異なる発情判定基準の比較

次にビデオ記録による連続観察の結果をTable 2に示す。MT、顎のせ、陰部嗅ぎの各行動および発情スコアによる方法では、すべての発情を検出できたが、歩数上昇も含めたその他の行動では、

Table 1 Estrous detection rates and intervals between the onset of different estrous-related behaviors and subsequent ovulation of cows observed in 3-hour interval

Estrous-related behavior	Detected estrus per 11 estrous events (%)	Interval between the onset of behavior and ovulation (hour, Mean ± SD)
Standing heat	10 (91)	25.9 ± 7.4 ^a
Mounting other cows	11 (100)	30.1 ± 6.1 ^{ab}
Resting with chin on other cows	11 (100)	30.1 ± 5.8 ^{ab}
Sniffing vagina of other cows	11 (100)	33.1 ± 5.3 ^b
Increased activity	10 (91)	33.7 ± 7.8 ^b
Total estrous score	11 (100)	32.9 ± 5.5 ^b

^{ab}Values with different superscript significantly differ ($p < 0.05$).

Table 2 Estrous detection rates and intervals between the onset and the end of different estrous-related behaviors of cows observed continuously and subsequent ovulation observed 6-hour interval

Estrous-related behavior	Detected estrus per 24 estrous events (%)	Intervals to ovulation (hours, Mean \pm SD)		Estrous persistence (A-B hours, Mean \pm SD)
		From the onset (A)	From the end (B)	
Standing heat	23 (96)	32.8 \pm 7.7 ^a	19.0 \pm 7.1 ^b	13.9 \pm 5.4 ^a
Mounting other cows	24 (100)	37.8 \pm 7.7 ^{ab}	18.7 \pm 8.8 ^b	19.1 \pm 7.1 ^{ab}
Resting with chin on other cows	24 (100)	39.6 \pm 8.2 ^{ab}	16.4 \pm 8.6 ^{ab}	23.1 \pm 8.0 ^{ab}
Sniffing vagina of other cows	24 (100)	43.3 \pm 9.1 ^b	14.3 \pm 8.4 ^{ab}	29.0 \pm 13.9 ^b
Licking other cows	18 (75)	38.4 \pm 16.4 ^{ab}	14.7 \pm 11.1 ^{ab}	23.6 \pm 19.0 ^{ab}
Increased activity	22 (92)	35.9 \pm 13.0 ^{ab}	7.7 \pm 9.2 ^a	28.2 \pm 15.5 ^b
Total estrous score	24 (100)	35.8 \pm 7.5 ^{ab}	19.5 \pm 8.2 ^b	16.3 \pm 7.4 ^a

^{ab}Values with different superscript significantly differ ($p < 0.05$).

発情を検出できない場合もあることが示された。排卵を起点とした各行動の開始は2.2同様、陰部嗅ぎで最も早く、ST行動では最も遅く平均で10時間余りの差を認めた。終了から排卵までの時間は、約8時間であった歩数上昇を除き、14~20時間の範囲にあった。開始から終了までの持続時間については、ST行動が最も短く、最も長かった歩数上昇との間に、14時間余りの差を認めた。

ST行動を指標とした、一般的な牛の発情開始および終了から排卵までの平均時間(範囲)は、それぞれ28(24~34)時間および12(10~15)時間で、持続時間は15(12~18)時間とされている⁹⁾。今回の解析では、発情を同期化したため、すべての発情発現時に他の発情牛が存在していた。このため、開始時間で一般的な範囲にあったのはST行動のみであり、終了時間では、陰部嗅ぎ、舐め行動のみであった。また、持続時間につ

いても一般的な範囲にあったのはST行動と発情スコアによる判定のみであった。したがって、ST行動を確認した場合を除き、他の発情行動により授精適期を決定する際には、このような時間的なずれを考慮すべきであると考えられた。

6種類の発情行動の頻度をTable 3に示す。同時発情の条件下ではMT行動の頻度が最も高いことが分かった。また、発情期間中の1時間あたりの行動回数で見ると、舐め行動が1回以下と低頻度であるのに対し、ST、MT、顎のせの各行動は2.4回以上と高頻度で発現しており、陰部嗅ぎはそれらの中間であった。

これらの結果と時間的な解析をあわせると、少なくとも同時発情の条件下では、STおよびMT行動は見つかりやすく、顎のせと陰部嗅ぎ行動を参考にすることで発情発見および授精適期推定精度を向上できるものと考えられた。ただし、授精適

Table 3 Frequency of estrous-related behaviors of cows observed continuously

Estrous-related behavior	Number of estrous periods	Frequency		
		Total	Per one estrous period	Per hour during estrus
Standing heat	23	1015	44.1	3.1 ± 1.9 ^{bc}
Mounting other cows	24	1480	61.7	3.3 ± 1.8 ^c
Resting with chin on other cows	24	1315	54.8	2.4 ± 1.7 ^{bc}
Sniffing vagina of other cows	24	1121	46.7	1.9 ± 1.5 ^{ab}
Licking other cows	18	349	19.2	0.9 ± 1.0 ^a

^{abc}Values with different superscript significantly differ ($p < 0.05$).

Table 4 Comparison of the frequencies of estrous-related behaviors between dominant and non-dominant cows observed continuously

Estrous-related behavior	Total frequency (No. of cows)		Per hour during estrus	
	Dominant	Non-dominant	Dominant	Non-dominant
Standing heat	628 (10)	361 (9)	3.4 ± 2.2	2.8 ± 1.8
Mounting other cows	878 (12)	546 (10)	3.9 ± 2.1	2.9 ± 1.5
Resting with chin on other cows	742 (12)	527 (10)	2.4 ± 1.7	2.6 ± 1.7
Sniffing vagina of other cows	601 (12)	456 (10)	2.2 ± 1.2	1.6 ± 1.9
Licking other cows	230 (9)	96 (7)	1.3 ± 1.2	0.4 ± 0.5

期推定には各行動と排卵までの時間的關係に注意が必要である。さらに今回示していないが、単独発情では、行動開始の遅延および持続時間の短縮が見られ、各行動の頻度も下がることを予備的な検討で確認していることから、ビデオ映像による同様の解析を単独発情でも実施し、同時発情での結果と比較することが、現場応用には必須と思われる。

3.3 牛群内順位と発情行動発現との関係

牛群内順位と発情行動発現頻度との関係を

Table 4 に示す。発情期間中のそれぞれの行動の総回数は、いずれも上位牛で多く観察された。一時間あたりの平均回数で比較すると、顎のせ行動を除いて上位牛で多かったが、いずれの行動についても、有意な差を認めなかった。個体間の行動頻度のばらつきが大きいことが、有意差を検出できなかった原因の一つと推測された。したがって、こうした情報を授精適期推定の精度向上に利用するためには、同時発情牛との社会的関係（順位の違い）や、発情行動開始のタイミングとの関

係をより詳細に調べることが必要である。

今後はこうした社会的関係も含め、単独発情でも同様の観察実験を実施し、同時発情での結果と比較することにより、生産現場でのより正確な授精適期推定に結びつけていく予定である。

4. 要 約

目視観察の予備的検討結果から、陰部嗅ぎ行動が最も早く発現し、ST行動か歩数上昇を基準とした場合、発情を見逃す可能性のあることが分かった。発情開始から排卵までの時間間隔はST行動を基準とした場合が最も短く、歩数上昇および陰部嗅ぎとの時間差は7～8時間あり、用いる指標によって人工授精適期が異なることが示された。ビデオによる連続観察では、開始時間が一般的な範囲にあったのはST行動のみであり、終了時間では、陰部嗅ぎ、舐め行動のみであった。持続時間で一般的な範囲にあったのはST行動と発情スコアのみであった。したがって、ST行動を確認した場合を除き、他の発情行動により授精適期を決定する際には、こうした時間的なずれを考慮する必要がある。今回の同時発情条件下では、STおよびMT行動は容易に発現し、顎のせと陰部嗅ぎ行動を発情発見および授精適期推定精度の向

上に使えることが分かった。個体間の社会的関係に関する情報を授精適期推定の精度向上に利用するためには、相手牛の順位や、発情行動開始のタイミングとの関係についてもより詳細に調べる必要がある。単独発情では、行動の開始および持続時間は短縮し、頻度も下がると予測されるため、同様の観察実験を単独発情についても実施し同時発情の結果と比較することで、より応用範囲の広い情報が得られると考えた。

文 献

- 1) 坂口実：畜産の研究, 61, 75～80, 2007.
- 2) 坂口実：農業技術体系, 畜産編 (追録26号), 第2巻, 乳牛①, 基礎編, 乳牛の生理, 繁殖生理pp.基126の8～15, 農山漁村文化協会, 2007.
- 3) Sakaguchi, M., *et al.* : *J. Reprod. Dev.*, 53, 819～828, 2007.
- 4) Kerbrat, S., Disenhaus, C. : *Appl. Anim Behav. Sci.*, 87, 223～238, 2004.
- 5) Refsdal, A. O. : *Anim. Reprod. Sci.*, 60-61, 109～119, 2000.
- 6) Fricke, P. M., *et al.* : *J. Dairy Sci.*, 97, 2771～2781, 2014.
- 7) Van Eerdenburg, F. J. C. M., *et al.* : *Vet. Quart.*, 18, 52-54, 1996.
- 8) 近藤誠司：北海道大学農学部紀要, 15, 192-233, 1987.
- 9) 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二編：獣医繁殖学, 第4版, 1～545, 文永堂出版, 東京, 2012.

氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した豚卵巢 および精液の過冷却保存

Supercooling preservation of pig ovaries and the semen by using an amino acid that effectively inhibits ice crystal formation

星野由美

(広島大学大学院生物圏科学研究科)

Yumi Hoshino

(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

Cryopreservation is extensively used for the preservation of reproductive cells (oocytes and sperm). This method offers a major advantage as the frozen material can be preserved almost permanently in liquid nitrogen. However, DMSO and ethylene glycol used in the preservation solution are known to be cytotoxic, and cellular damage by freezing injury is responsible for the low fertilization and development rate. Efforts have been made in recent years for ovary and oocyte preservation such that the ovary function is maintained. However, the success rate of ovary cryopreservation is very low owing to the complicated structure of ovaries. Therefore, novel technologies need to be explored for ovary preservation. In this study, the validity of a non-cryopreserve compound and an amino acid that is expected to have a supercooling-promoting effect were inspected with the aim of developing a non-freeze preservation technology for the preservation of ovaries and semen. The coffee extracts caffeine, hypoxanthine, and uric acid were used as supercooling-accelerating substances. Based on the structural properties of amino acids, threonine, serine, and tyrosine were chosen and peptides of each amino acid were synthesized and the supercooling-promoting effect was observed to elucidate as to which amino acid exhibited anti-ice nucleation activity. A supercooling-promoting effect was observed with all the compounds and peptides tested. However, a collapse in the organizational structure of the ovaries was observed in ovaries treated with all compounds other than those treated with the coffee extract. This was attributed to the influence of chilling injury. It was hypothesized that the polyphenols in the coffee extract exhibited anti-oxidant activity and protected the ovaries from damage at low temperatures. Chilling injury could be reduced by combining a non-freezing protein, an antioxidant, and a supercooling-accelerating substance. In this study, supercooling preservation of ovaries was achieved by using supercooling-accelerating substances and an amino acid. When the appropriate condition can be built, non-cryopreserve of an ovary would become possible.

1. 目 的

生殖細胞の保存には、ガラス化法や緩慢凍結法などの超低温保存法が広く用いられている。凍結を伴う保存は、液体窒素中で半永久的に保存できるメリットがあるが、保存液に含まれる凍害保護物質の細胞毒性や凍結させることで生じる凍結障害による細胞へのダメージが大きく、受精率や発生率を低下させる原因となっている¹⁾。例えば、保存液に添加されることの多いエチレングリコール (EG) やジメチルスルホキシド (DMSO) はDNA・染色体の構造変化やDNAのメチル化に影響を及ぼしていると報告されている^{2,3)}。このような中、医学分野においては臓器移植のための臓器保存の研究も進められている。2014年にはハーバード大学の研究チームによって、ラットの肝臓を過冷却保存し、移植後に肝臓機能を回復させることに成功したとの報告がなされた⁴⁾。このことは、凍結しなくとも過冷却状態を維持させることで、組織や臓器を保存できることを示している。

卵巣は、卵子を作る器官であるが、同時にエストロゲン (卵巣ホルモン) やプロゲステロン (黄体ホルモン) を分泌する役割も担っており、排卵や妊娠維持に重要な臓器である。これまで、卵子の保存は個々の細胞の保存を目的に行われてきたが、卵巣保存が可能になれば、卵巣内に含まれる多様なステージの卵子を保存でき、また卵巣機能も維持させることができることから、そのメリットは大きい。一方、雄の生殖細胞である精子は、家畜の場合、人工授精用にストローで保存されている。牛の凍結精液は広く利用されているが、豚の精子は温度感受性が高いことから低温保存は難しく、一般的な技術には至っていない。今後、豚の育種改良や繁殖増産を展開していくためには、安定した人工授精の実現が不可欠である。そのためには、液状精液を安定的に長期間保存するため

の技術の確立が必要である。

研究代表者らのこれまでの研究で、食品廃棄物に含まれる植物由来の抽出液が、卵子の過冷却保存に有効であることを明らかにした (投稿準備中)。研究分担者である関西大学の河原秀久教授のグループは、植物由来抽出物の氷晶形成抑制効果について研究を進め、氷晶形成の抑制効果はアミノ酸組成に大きく依存することを突き止めている (未発表データ)。すなわち、食品廃棄物を使用せずとも、そこに含まれるアミノ酸を特定できれば、簡便で安定した保存法を確立できるものと期待される。そこで本研究では、氷晶形成抑制効果をもつ食品廃棄物に共通するアミノ酸を同定するとともに、精製したアミノ酸のペプチドを用いて卵巣および精液の過冷却保存の有効性を検証することとした。

2. 方 法

卵巣における過冷却保存の条件を検討するため、サイズが小さく、入手が容易なマウスを用いて予備実験を重ねた。卵巣の過冷却保存の流れは以下のとおりであった。卵巣はPMSG投与46時間後の3週齢ICR雌マウスから摘出し、200ulの臓器保存液 (UW液) に卵巣1個を浸漬した。温度制御と過冷却維持には超低温アルミブロック恒温槽 (サイニクス社、クライオポーター) を使用し、20℃から段階的 (0.1℃/分) に温度を下げ、-6~-10℃の温度下で24時間以上の保存を行った。温度の回復には、段階的 (0.1℃/分) に温度を上げ、4℃または20℃で卵巣を回収した。温度制御については、Berendsenらの方法に準じて設定を行った⁴⁾。過冷却促進効果が報告されているカフェインの構造を指標にして、カフェイン、テオフィリン、テオブロミン、尿酸、グアニン、キサンチン、ヒポキサンチン、アデニンの抗氷核活性を比較し、候補化合物を選定した。抗氷核活

性を期待できるアミノ酸の候補を選定し、併せて重合度による影響も解析した。コントロールとして、研究代表者らによる研究で卵子の過冷却保存への有効性が実証されているコーヒー粕抽出液を添加した区を設けた。過冷却促進効果を検証するため、化合物とアミノ酸およびそのペプチドはUW液に0, 0.5, 1.0mg/mlの濃度で添加した。過冷却保存後、卵巣の健全性を評価するために卵巣はホルマリンで固定し、ヘマトキシリン・エオシン (HE) 染色による組織学的解析を行った。また、保存後の卵巣から卵胞を切り出し、アルギン酸ゲルで卵胞をコーティングした後、DMEM培地で24時間、37°C、5%CO₂の条件下で培養した。培養後、卵胞はアルギン酸ゲルから外してホルマリン固定を行い、組織学的解析に供した。精液用の保存液は、卵巣保存に用いた液と同様であった。保存液のスケールアップによる保存性および安定性への影響を解析した。

3. 結果と考察

化合物の抗氷核活性値を測定したところ、それぞれの活性値は、カフェイン (1.3°C)、テオフィリン (2.0°C)、テオプロミン (1.2°C)、尿酸 (1.8°C)、グアニン (1.0°C)、キサンチン (0.1°C)、ヒポキサンチン (2.1°C)、アデニン (4.8°C) で

あった。いずれも抗氷核活性は高いことが確認できたが、本実験では入手と取り扱いが容易な、カフェイン、ヒポキサンチン、尿酸を候補物質として選定した。また、抗氷核活性の期待できるアミノ酸には、スレオニン、セリン、チロシンを選定し、それぞれ重合度の異なるペプチド (2量体、3量体、4量体) を作製した。それぞれを0.5または1.0mg/mlの濃度になるようUW液に添加し、過冷却促進効果を検証したところ、いずれの化合物・ペプチドを添加した場合でも、-6~-10°Cの温度条件では過冷却状態を維持できることを確認した。24時間保存後の卵巣を組織解析に供試したところ、卵胞膜の硬化と卵胞構造の崩れが認められた (Fig. 1)。一方、カフェインを含むコーヒー粕由来抽出液添加区では、保存後の卵巣形態は未処理の卵巣と遜色なく維持されていた。過冷却保存後の卵巣を卵胞培養に供試して卵胞構造を評価したところ、ヒポキサンチン添加区は卵胞内の細胞間に多くの間隙が認められ、卵胞構造が崩れている様子が観察された。コーヒー粕由来抽出液添加区では、その構造は維持されていた (Fig. 2)。保存液のスケールアップによる影響を解析したところ、10mlまでは安定して保存できることを確認した。過冷却状態を安定して維持するためには、保存容器の材質や形状も重要な要素である。

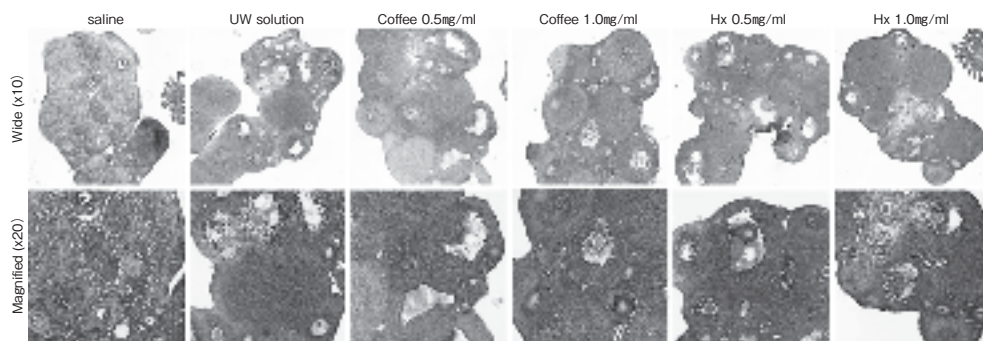


Fig. 1 Morphological evaluation of hematoxylin and eosin (HE)-stained histological sections of the ovaries after supercooling preservation. The ovaries treated with saline, UW solution, coffee extract, or hypoxanthine (Hx) for 24 hours at -6°C.

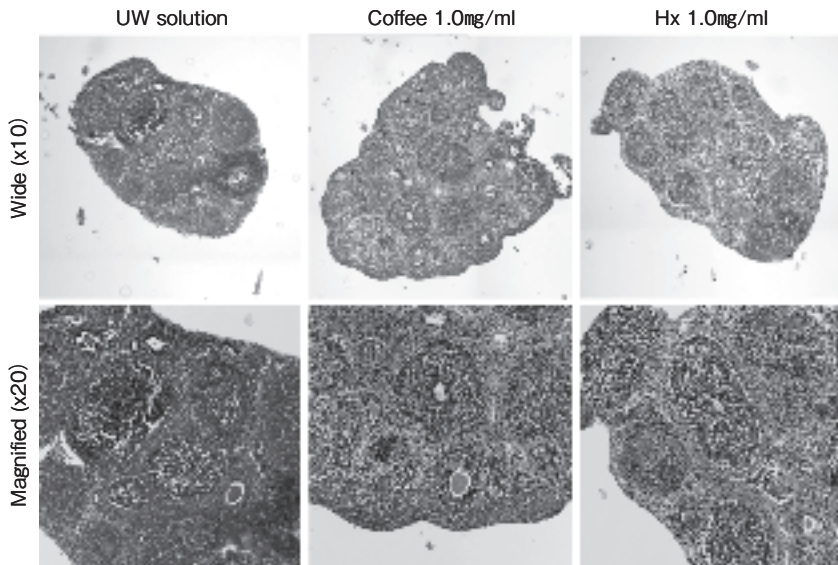


Fig. 2 Morphological evaluation after follicle culture of supercooling-preserved ovaries. The ovaries treated with UW solution, coffee extract, or hypoxanthine (Hx) for 24 hours at -6°C . Histological sections were stained with HE.

豚の卵巣を保存する場合には、十分な液量で卵巣を浸漬できるように、保存に適した容器を開発することが必要である。

一般的に生殖細胞の体外操作では、酸化ストレスが生じやすく、それによって生殖細胞はダメージを受ける⁵⁾。コーヒー粕由来の抽出液には、ポリフェノールやクロロゲン酸などが含まれており、これらの物質が過冷却促進物質であるカフェインと相乗して、卵巣保存に機能したと考えられる。また、今回検討した化合物やアミノ酸（ペプチド）には過冷却促進効果が認められたことから、不凍タンパク質や抗酸化物質と組み合わせることによって、低温障害を軽減できるものと考えられる。本研究では、化合物やアミノ酸の構造特性を利用して過冷却状態を維持できることを示した。適切な条件を構築できれば、過冷却状態を維持しながら細胞・組織の低温障害を軽減できる可能性があり、卵巣の過冷却保存の実現も期待される。

4. 要 約

生殖細胞の保存には凍結保存法が広く用いられているが、細胞へのダメージは避けることはできず、融解後の受精や発生に影響を及ぼしている。現状の問題点としては、①凍結することにより生じる細胞膜の損傷、②保存液に含まれる凍害保護物質による細胞毒性、である。この問題を解決するために、研究代表者らは、未凍結での保存の可能性を追求し、これまでに植物由来の過冷却促進物質を利用して、卵子の未凍結保存（過冷却保存）が可能であることを示してきた。近年では卵巣機能を温存させることを目的に、卵巣保存も注目されている。しかしながら、卵巣は複雑な構造で維持されているため、凍結保存は極めて困難であり、卵巣保存に向けての新たな保存技術の開発が必要となっている。そこで本研究では、過冷却促進作用のある化合物とアミノ酸（ペプチド）を利用した、卵巣の過冷却保存の可能性を検討した。過冷却促進作用が確認されているカフェイン

の構造に基づいて、構造特性の類似したヒポキサンチンと尿酸を候補物質として選定した。また、抗氷核活性の高いアミノ酸としては、スレオニン、セリン、チロシン、フェニルアラニンを選定し、それぞれ重合度の異なるペプチド（2量体、3量体、4量体）で検討した。その結果、いずれの化合物ならびにペプチドを添加した場合でも過冷却状態を維持できたが、組織解析の結果からは、過冷却促進物質単独の添加では、低温障害を回避できないことが明らかになった。一方、コーヒー粕抽出液添加区では、保存後の卵巣構造は維持されていた。このことは、コーヒー粕抽出液に含まれるポリフェノールやクロロゲン酸が過冷却促進物質であるカフェインと相乗して、卵巣保存に機能したものと考えられる。今回検討した化合物やアミノ酸（ペプチド）には過冷却促進効果が認められたことから、不凍タンパク質や抗酸化物質と組み合わせることによって、低温障害を軽減できる可能性がある。適切な条件を構築できれ

ば、臓器の新しい保存法の開発に繋がるものと期待される。

文 献

- 1) Kopeika, J., Thornhill, A., Khalaf, Y. : The effect of cryopreservation on the genome of gametes and embryos : principles of cryobiology and critical appraisal of the evidence, *Human reproduction update*, **21** (2), 209~227, 2015.
- 2) Schwartz, A. M., Fasman, G. D. : Thermal denaturation of chromatin and lysine copolymer-DNA complexes. Effects of ethylene glycol, *Biopolymers*, **18** (5), 1045~1063, 1979.
- 3) Nelson, R. G., Johnson, W. C. Jr. : Conformation of DNA in ethylene glycol, *Biochemical and biophysical research communications*, **41** (1), 211~216, 1970.
- 4) Berendsen, T. A., Bruinsma, B. G., Puts, C. F., Saeidi, N., Usta, O. B., Uygun, B. E., Izamis, M. L., Toner, M., Yarmush, M. L., Uygun, K. : Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation, *Nature medicine*, **20** (7), 790~793, 2014.
- 5) Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. : The effects of oxidative stress on female reproduction : a review. *Reproductive biology and endocrinology* : RB&E, **10**, 49, 2012.

赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討

Development of prediction technique of parturition by an IR depth sensor
in beef cattle

岡 山 毅・佐 藤 晴 香・小 針 大 助

(茨城大学農学部)

Tsuyoshi Okayama, Haruka Sato and Daisuke Kohari

(College of Agriculture, Ibaraki University)

Recently, computer-based image analysis has gained popularity in analyses of animal behavior. Various devices to observe or record the behavior of animals have been developed. However, most of the devices were designed to analyze behaviors in two dimensions, while almost animals behave in three dimensions (3D). Therefore, in order to conduct precise behavioral analysis, it is necessary to collect 3D data regarding animal behaviors. IR depth-sensor camera systems have recently become commercially available at reasonable cost. In this study, we used an IR depth camera for assessing the pre-parturition behavior of breeding cattle and tried to develop an automatic behavior analysis system of posture change (standing, lying down) and position of body part (the neck, the body, the tail, etc.). An IR depth-sensor camera was placed at the calving pen in the Field Science Center of Ibaraki University, and depth images were collected every 5 seconds. Data were analyzed using software (Python ver. 2.7 and OpenCV library ver. 2.4.8). As results, the cow could be extracted from the background clearly, and the concordance rates between manual and automatic classification of posture change (standing, lying down) was over 90%. Body parts of cattle could be detected in most data. However, in some data, the depth data was missing in some region because of sunlight coming from the skylight window or postures of the cow. Detection of tail lifting was also difficult, because precision of detecting body parts was poor. In future study, image processing algorithms should be improved and uses multiple IR depth-sensor cameras for a more robust automatic behavior analysis system.

1. 目 的

肉牛生産を取り巻く状況が年々厳しくなる中、我が国ではそれぞれ特徴のある肉牛系統の性質を熟知した個々の農家のきめ細やかな管理により、工業的リーンプーフ生産とは一線を画す、高品質

牛肉（プライムビーフ）の作出を試みてきた。その結果、日本の和牛は「WAGYU（わぎゅう）」としてブランド化され、世界に広く認知されるようになってきている。一方で、TPP・EPAなどによる農産物の市場開放の世界的な動向は、近い将来、オーストラリアやアメリカなどから大量に

入ってくると予想される超格安輸入牛肉とのテールミート競争に対抗していくために、農家に対してこれまで以上に効率的な生産を求めることとなり、我が国の肉牛農家は、現在の品質を維持しつつ、新たな管理対策にせまられている。

家畜の効率的管理のためには、従来必要な動物の情報をなるべく単純化し、平均化した特性に合わせて管理システムを構築することが一般的な対策とされてきた。しかし、近年は異なる飼育環境においても複雑な現象をそのまま複雑なものとして捉え、個々の動物の特性を生かし、遺伝的能力を最大限発揮させるオーダーメイド型管理が注目されている。特に、和牛生産の基盤となる繁殖牛管理の様々な場面では、個々の農家の努力による、まさに後者によるところが大きく、この負担をいかに軽減化していくのかということが、和牛生産の効率化対策のポイントとなると考えられる。

我々は、昨年から赤外線深度センサーカメラ（IR depth sensor camera）という3次元情報の計測が可能なセンサーカメラを用いて、繁殖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試みてきた。本深度センサーは、対象の3次元的な形態変化を数値データ化し、直接扱うことができることから、動物の複雑な行動変化であってもすべて情報化することが可能である。これは、従来繁殖農家の大きな負担となっていた分娩予定日前後の監視業務を補助する「目」とすることが可能となることを意味する。牛の分娩前には、いくつかの特徴的な行動変化が見られることが知られているが、昨年は、本研究助成を受け、それら行動のうち、分娩前の繁殖牛の姿勢変化や尾挙げ行動¹⁾が、有用な分娩予測指標となることを明らかにするとともに、本センサーによる分娩房内での姿勢変化や旋回行動の検知精度の高さについても明らかにしてきた。一方で、姿勢や尾の状態を目視で判断していたので、行動の量

的变化をより精密に捉えるには、自動判別法の開発が必要である。そこで本研究では、牛の行動を自動的に判別する手法の開発を試みた。

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き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（以下深度カメラ）はASUS社製のXtion PROLIVEである。撮影対象である分娩房の床面全体が撮影範囲に収まるように、深度カメラを床から高さ4.0mの位置に設置した。深度カメラは制御・データ記録用にノートパソコン（U24A-PX3210R, ASUS社製）に接続した。距離情報を持つ深度画像（320×240画素）は5秒ごとに撮影した。解析に用いたデータは分娩から遡って24時間とした。

2.3 画像処理方法

深度画像の処理には、Python2.7.9とOpenCV2.4.8を用いた。

2.3.1 背景除去

初めに解析対象である牛のみを得られた深度画像から抽出するために、柵、壁、餌槽、床面、敷料等の背景の除去を行った。2次元画像の場合、通常はカラー情報の違いから背景と対象物の識別を行う²⁾が、この場合は対象物と背景が類似したカラー情報を持つ場合、識別が困難である。一方で深度情報がある場合は空間情報を利用することができるので、事前に背景とみなす物体の空間情報を取得しておけば、容易に背景から牛を抽出す

ることが可能である。具体的には、牛が存在しない分娩房の深度画像から、柵、餌槽、壁面の位置情報を取得し、その情報を解析すべき深度画像と比較し、背景と同じ位置に存在する物体を除去することで牛が抽出できる。ただし、この方法では位置や形状が頻繁に変化する敷料への対応が困難であったので、敷料が存在すると思われる床面から高さ40cm未満の物体はすべて背景として除去した。

2.3.2 ノイズ除去と牛の抽出

得られた牛のみの深度画像には、センサーの特性によるノイズや、除去しきれなかった背景の一部が入り込んでいるので、これをオープニング処理で除去した。オープニング処理とは画像を収縮することで微細な部位を消去し、再び元の大きさに戻す処理である。収縮・膨張させる範囲（カーネルと呼ぶ）の大きさを指定することで除去する程度を調節可能である。ノイズの除去ではカーネルのサイズを5画素とした。それでも除去しきれない大きなノイズが残ることがあったので、残った物体の各画素数を計算し、最も大きい画素数のものを牛とした。

2.3.3 抽出された牛の深度画像の評価

抽出された牛の深度画像を用いて、首の位置、胴体（背中）の位置および方向、尾挙げ行動の有無を検出するために以下の処理を行った。

全体画像に先ほどノイズの除去に利用したオープニング処理を用いカーネルのサイズを調節することで、尾を除去した深度画像（カーネルサイズを10画素）（以下尾無画像）、首を除去した深度画像（カーネルサイズを27画素）（以下胴体画像）を得ることができる。それぞれの画像に矩形を当てはめることで長辺と短辺長さで形状を評価することができる。また胴体画像に楕円を当てはめることで、胴体が向いている角度と首元部と尾部の候補を得る。この2点と全体画像と胴体画像を比

較して、首が除去されている方を首元とし、その反対を尾元とした。首先と尾先の検出については、尾無画像と胴体画像の差分をとることで、首の画像を取得し、その首画像の中で首元から最も遠い点を首先、また全体画像から尾無画像の差分をとることで、尾の画像を得、その尾画像の中で尾元から最も遠い点を尾先とした。

全体画像と尾無画像の矩形長辺方向の長さ比較すると、尾挙げが検出されていない場合はその領域に差は生じないが、尾挙げ行動が認識される場合は、尾の部分だけ全体画像のほうが長くなる。この差を利用して尾挙げ行動の認識を試みた。

3. 結果と考察

3.1 データの収集状況について

得られた深度データの深度の解像度は、牛の背中が写るセンサーからの距離250cm（床面から150cm）では、約2.0cmであった。

全体的には深度カメラからの深度画像は全体的に安定的に撮影することができていた。ただし、撮影に用いた分娩房には天窓があり、そこから日光が入射する午前の時間帯には、深度画像にデータが欠損している部分、つまり深度を計測できていない部分があった。また敷料交換のために分娩房のシャッターを開けた際には、外部から入射する強い光も深度データの計測を妨げた。シャッターが閉まっており、天窓からの直射日光がない、午後から夜間にかけては安定してデータを取得することができていた。

今回用いた深度カメラ（Xtion PROLIVE）の画角が狭いことも問題となった。センサーを地上から高さ4.0mの高所に設置したが、奥行き4.0m、幅3.0mの分娩房をカバーするのが精一杯であり、牛が首を柵外へ出した場合には、撮影範囲外となった。

3.2 部位の検出について

部位を検出した画像の一例をFig. 1に示す。楕円は牛の胴体と合致しており、牛の方向、中心付近の位置が明確に認識されている。まずはややずれているものの、ほぼ認識することができている。次に尾挙げ行動を示している牛の深度画像をFig. 2に示す。画像処理によって尾挙げが認識されていることがわかる。これら検出された特徴点の3次座標を評価することで、従来の2次元画像では得ることができなかった情報を得ることが期待できる。以上の2つは画像処理がうまく機能した例であり、うまく機能しなかった例も少なからずあった。その原因のひとつは、牛の柔軟性である。

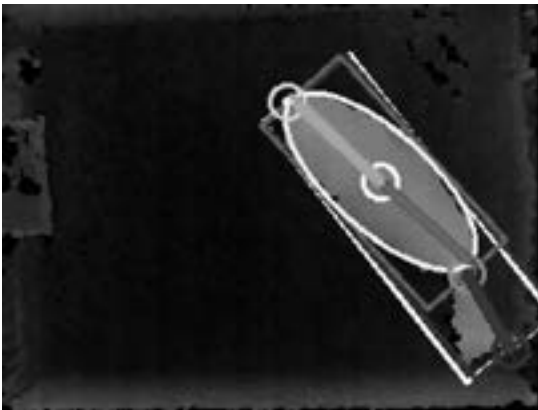


Fig. 1 An example of a processed depth image.

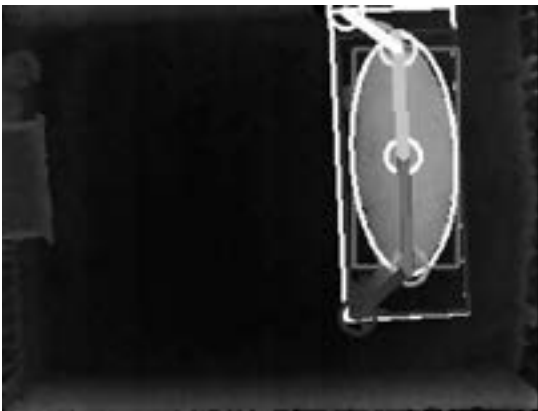


Fig. 2 An example of a processed depth image of a tail-lifted cow.

牛は出産間際になると腹部を気にかける首振り行動の頻度が上昇する。この時の首部が胴体から離れている場合は、オープニング処理で首を除去する画像処理が機能するが、首が胴体と密着している場合は首の検出ができなかった。これが原因で、首先位置の検出ができなかったり、牛の前後方向を誤認識する場合があった。

3.3 立位と座位の判別について

抽出した牛の深度情報から牛の平均高さを計算し、その値を用いて立位と座位の識別を実施した。この識別と目視による識別と比較した結果、分娩前の24時間では一致率は約90.5%であった。識別に失敗したデータでは、先ほど述べた天窓から太陽光が入りデータ欠損が生じた場合や、敷料交換のためにシャッターを開けて作業中のもので深度データに欠損がある場合が多かった。それらの撮影条件が悪いデータを除いた11:00以降のデータでは、一致率は95.3%であった。

3.4 尾挙げ行動の検出

尾挙げ行動は誤認識が多く、尾挙げ行動のみを検出することは困難であった。この主な原因は首が認識されなかったことによる矩形の長さが変化したことで、尾挙げ行動が見られない場合でも、尾挙げ行動をしていると認識される場合があった。尾挙げ行動をしている牛のほとんどの画像では、尾が認識されていたことから、尾挙げ行動を検出するアルゴリズムを改良することで、尾挙げ行動の検出が可能であると考えられる。

おおむね、牛の重心、首元、尾元、首先および尾先の検出は可能であり、それらの3次元的な計測が可能であることから、2次元画像では検出が困難であった行動の検出が可能である。しかしながら、それらの精度が低い場合も見受けられ、その精度の低さが尾挙げ行動の検出精度の低さにもつながった。その主な原因は深度データの欠損である。外部から太陽光の照射が原因でデータが欠

損することもあったが、牛の姿勢によっては部分的に深度データが取得できない領域も存在し、その欠損領域が画像処理の精度に影響を与えた。今後の課題としては、このデータが欠損する領域を補完する方法の開発が必要である。また、今回は深度カメラを1台で観察したが、撮影範囲の拡張およびカメラの死角の減少という点で複数台の深度カメラを同時に利用することも有効であると考えられる。その場合には、深度画像から点群（3次元情報を持つ点の集まり）に変換し位置合わせを行う必要がある。今回は3次元情報を持つ深度画像を利用したものの、処理自体は2次元画像用のライブラリを利用した。今後は点群を直接処理することで、牛の分娩前の体型変化などを計測可能なシステムを構築する予定である。

4. 要 約

本研究では、赤外線深度センサーカメラを利用した和牛の非侵襲的分娩予測技術の開発を目的と

して、取得した深度画像から牛の行動を自動判別するシステムの開発を試みた。その結果、座位と立位の判別は目視の判断と比較して90%以上の一致率であった。また、部位（首先、首元、胴体の中心、尾元、尾先）の検出を試みたところ、ほとんどの場合で検出可能であった。しかし、尾挙げ行動の検出では、さきほどの部位検出の精度が低いこともあり、誤認識率が高く課題が残った。今後の課題としては、検出アルゴリズムの改良とともに、計測範囲の拡大と死角の減少のために複数台の赤外線深度センサーカメラの利用等があげられる。

文 献

- 1) 小迫孝実, 井村毅, 河野道治, 野田博士: 日本草地学会, 37, 311~312, 1991.
- 2) Cangar, O., Leroy, T., Guarino, M., Vranken, E., Fallon, R., Lenehan, J., Mee, J., Berckmans, D.: *COMPUTERS AND ELECTRONICS IN AGRICULTURE*, 64, 53~60, 2008.

ミトコンドリア機能解析に基づく家畜優良胚選別法の開発

Development of novel system for quality evaluation of bovine embryos by analysis of mitochondrial function

阿部宏之

(山形大学大学院理工学研究科)

Hiroyuki Abe

(Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University)

Respiration is useful parameter for evaluating embryo quality as it provides important information about metabolic activity. In this study, we have examined a scanning electrochemical microscopy (SECM) technique that is a non-invasive and sensitive method for measuring oxygen consumption by individual bovine embryos. SECM is a technique in which the tip of a microelectrode is used to scan and monitor the local distribution of electro-active species near the sample surface. We have developed a SECM measuring system, to establish the accurate method for embryo quality evaluation. With this system, oxygen consumption of single, identical bovine embryos at different developmental stages has been monitored. Oxygen consumption rates (F) of the single embryos were low from 2-cell to 8-cell stages. The increase of oxygen consumption rate was found at the morula stage and blastocysts showed large oxygen consumption rate. Ultrastructural study demonstrated that most of the mitochondria in the embryos up to the 8-cell stage were of an immature form such as spherical and ovoid shape. Changes in mitochondrial ultrastructure were observed in bovine embryos at morula stage. Many elongated mitochondria were found in morulae and even more in blastocysts. Staining with JC-10 revealed the increase of mitochondrial membrane potential in morulae and blastocysts. Development of mitochondria corresponds to the increase of oxygen consumption rates during the development of bovine embryos. The morulae with higher oxygen consumption have strong potentiality for further development into good quality embryos such as expanded and hatched blastocysts. These results suggest that the SECM technique is able to non-invasively assess the respiration rate of individual bovine embryos and the embryo quality. The SECM procedure may contribute to improvements in reproductive technologies in domestic animals.

1. 目的

体外受精技術は牛の品種改良や増産を可能とする基盤技術として広く普及しているが、移植胚の

受胎率は伸び悩んでいる。この原因の一つとして、移植する胚の選別法の精度に問題があると考えられている。現在、移植に供する牛受精卵は割球などの形態学的特徴を指標に品質判定されてい

るが、受精卵は発生過程においてリアルタイムで形態が変化するために、ワンポイントでの形態学的評価のみでは厳密な胚の品質評価はできない。そのため、形態観察のみによる評価法では本来移植に適さない胚を移植胚として選別している可能性が高い。

これまで我々は、牛胚の品質とミトコンドリアの呼吸機能が密接に関連していることを明らかにしてきた^{1,2)}。ミトコンドリアは酸化リン酸化(呼吸)により細胞活動に必須のエネルギーであるアデノシン三リン酸(ATP)を産生し、胚の発生等に深く関与していることから、精度の高い細胞呼吸測定技術は受精卵の品質評価や細胞の呼吸機能診断に極めて有効な技術となる。本研究では、ミトコンドリア呼吸機能を指標とする精度の高い受精卵品質評価法の開発を目的とした。具体的には、電気化学計測技術の基盤となる走査型電気化学顕微鏡をベースに、単一の牛受精卵の酸素消費量(呼吸)を無侵襲的に測定できるシステムを開発し、受精卵の培養実験やミトコンドリア呼吸機能の生物学的解析により、この測定システムの有効性と安全を評価した。本研究の最終目標は、ミトコンドリア呼吸という客観的基準に基づ

く新しい家畜優良胚選別法の開発である。

2. 方法

2.1 高感度細胞呼吸測定システムの開発

電気化学計測の基盤である走査型電気化学顕微鏡(scanning electrochemical microscopy; SECM)は、局所領域における生体反応を高感度・非侵襲的にモニタできる装置である。これまでに、酸素還元電流を検出できる微小電極をプローブとするSECMを用いて単一受精卵の呼吸活性測定に成功し、SECMを応用した細胞呼吸測定の基盤技術を開発している^{3~5)}。本研究では、SECMをベースとする牛胚の呼吸活性測定に特化した細胞呼吸測定システムの開発を目的とした。具体的には、(1)単一牛受精卵の酸素消費量を測定するための高感度センサープローブ電極、(2)受精卵のミトコンドリア機能と計測感度影響しない呼吸測定液の開発を行った。これらの要素技術と、すでに開発済の多検体測定プレートおよび呼吸解析ソフトをシステム化した「細胞呼吸測定システム」を構築した(Fig. 1)。

2.2 牛受精卵の培養

2.1で構築した細胞呼吸測定システムの性能を

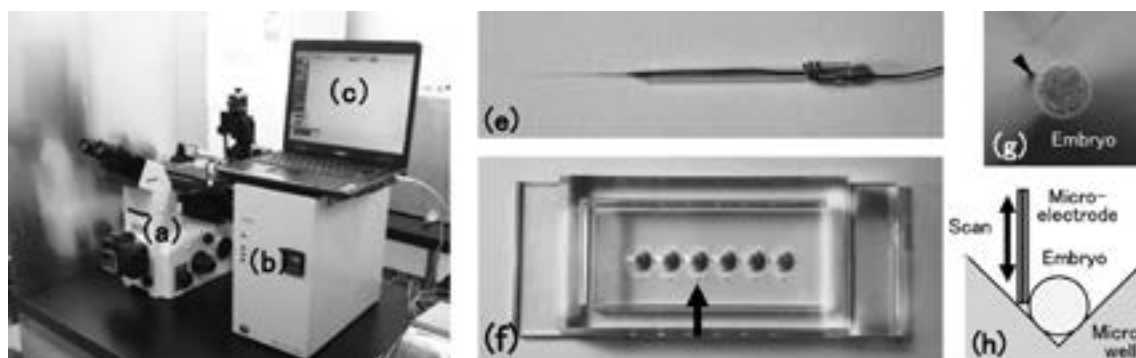


Fig. 1 A modified scanning electrochemical microscopy (SECM) measuring system. SECM system includes a measuring instrument on the inverted optical microscope stage (a), potentiostat (b), notebook computer (c), a microelectrode (e), and a plate (f) for measuring respiration activity of embryos. The plate has six cone-shaped microwells (arrow in b). Individual bovine embryos are transferred into a microwell filled with medium. The embryo sinks down to the bottom of the well, remaining at the lowest point (g). Microelectrode (arrowhead in g) is scanned along the z-axis from the side point of embryo (h).

評価するために、牛体外受精胚の酸素消費量測定を行った。牛卵巣から回収した卵丘細胞-卵子複合体 (COC) を無血清培地IVMD101 (機能性ペプチド研究所) で成熟培養を行い、体外受精により受精卵を得た。受精卵は無血清培地IVD101培地 (機能性ペプチド研究所) を用いて培養し、2細胞期胚から胚盤胞のステージの胚を回収し種々の実験に用いた。

2.3 ミトコンドリア呼吸機能の細胞生物学的解析

高感度ミトコンドリア膜電位アッセイキットであるJC-10 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide derivative) を用いて、各発生ステージの牛胚を染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いてミトコンドリア膜電位を検出した。JC-10は、ミトコンドリアの脂質二重膜に取り込まれ、膜電位を有するミトコンドリアでは凝集して赤色蛍光 ($\text{high } \Delta \Psi \text{m}$) を発し、Mt膜電位が消失すると緑色蛍光 ($\text{low } \Delta \Psi \text{m}$) を発する。相対膜電位 ($\text{high } \Delta \Psi \text{m}/\text{low } \Delta \Psi \text{m}$) および色蛍光の強度を測定することで、ミトコンドリア電子伝達系呼吸鎖複合体の活性を解析した。

ミトコンドリアの微細構造を観察するために、各発生ステージの牛胚を2.5%グルタルアルデヒドおよび1%オスミック酸で固定した。エタノールで脱水後エポキシ樹脂に包埋し、超薄切片を透過型電子顕微鏡で観察した。

3. 結果と考察

3.1 高感度細胞呼吸測定システムの性能評価

マイクロ電極の感度を向上させるために、白金電極の電解エッチング法、白金電極をガラスキャピラリーに封入するための熱封止および封止後の電極研磨のそれぞれの工程を改良した結果、酸素還元条件下 (-0.6 V 荷電下) において還元電流

-1.0 nA 以下の感度を有するディスク型マイクロ電極を作製することができた。電極サイズが酸素消費量計測に及ぼす影響について検討した結果、単一牛胚の呼吸量計測に適した電極サイズは、白金先端径が2~5 μm であることが分かった。

電気化学計測では感度が向上するにつれて、溶液中の電解質組成やタンパク質が計測感度に影響を及ぼす可能性がある。そこで、成分組成が異なる数種類の培養液中での計測感度を解析した。その結果、TCM199, DMEM, RPMI1940など一般に細胞培養に用いられている培養液を測定に用いた場合、測定開始直後に還元電流が急速に低下し、測定開始約30分後には測定が不可能になった。一方、受精卵の培養に用いられ、比較的単純な組成であるHTF (human tubal fluid) 培地やヒト胚の培養に用いられているHFF99培地 (扶桑薬品工業) を測定液として用いた場合、長時間にわたって安定した還元電流を計測することができた。これらの結果から、本研究ではHTF培地を基本とする呼吸測定液を牛胚の呼吸測定に用いることにした。

以上、新たに開発した高感度マイクロ電極と呼吸測定液をSECMに組み入れた細胞呼吸測定システムを用いることで、単一牛胚の酸素消費量の安定した測定が可能となった。

3.2 呼吸測定による牛胚の品質評価

呼吸測定液を用いて牛胚の呼吸量を測定し、受精卵に対する侵襲性の有無を調べた。呼吸測定後の受精卵を追加培養し発生率の変化を調べた結果、対照区 (呼吸測定を行わなかった受精卵) と比べて胚の発生率の低下は起こらず、電子顕微鏡観察によっても細胞膜や細胞小器官などに損傷は認められなかった。これらの結果から、HTF培地をベースに製作した測定液は胚に対して非侵襲的であり、高感度の電気化学呼吸測定に有効であることが示された。

細胞呼吸測定システムを用いた受精卵品質評価法の有用性を検証するために、体外受精により作製した牛受精卵の呼吸量を測定した。受精後の発生過程における呼吸量変化を調べた結果、桑実胚から胚盤胞のステージにおいて有意に呼吸量が上昇し、孵化胚盤胞において最大になった (Table 1)。呼吸活性の変化とミトコンドリア呼吸機能との関係を調べるために、ミトコンドリアの膜電位と微細構造変化を解析した。その結果、呼吸量が増加する桑実胚期から胚盤胞期にかけてクリステの伸張などミトコンドリアの顕著な形態変化が観察され、呼吸量の増加とミトコンドリアの発達が一致することが明らかになった (Fig. 2)。また、呼吸量が増加する桑実胚期から胚盤胞期にかけてミトコンドリアの膜電位活性の上昇が観察された (Table 2)。

次に、呼吸活性を指標とする受精卵品質評価システムの有効性を検証するために、「受精卵呼吸測定装置」により呼吸測定した牛受精卵の発生能を調べた。受精6日目の桑実胚の呼吸量を測定した後、IVD101培地を用いて5%CO₂/5%O₂/90%N₂、38.5℃の条件で3日間個別に追加培養を行い、胚盤胞数および孵化胚盤胞数を調べた。その結果、呼吸量が1.0×10¹⁴/mol・s⁻¹以上の胚では胚盤胞発生率(89.3%)および孵化胚盤胞率(62.5%)が最も高く、呼吸量が低下するに従い胚盤胞発生率および孵化胚盤胞率が低下することが明らかになった (Table 3)。以上の結果から、本研究で開発した「細胞呼吸測定システム」は、単一受精卵レベルでミトコンドリア呼吸機能の変化を高精度で検出することが可能であることが分かった。さらに、呼吸能を基準に牛胚の発生能を評価できる

Table 1 Oxygen consumption rates of bovine embryos cultured in a serum-free medium (IVD101) at various developmental stages

Embryonic stage	No. of embryos measured	Oxygen consumption rate (F×10 ⁻¹⁴ /mol s ⁻¹)
2 cell	15	0.46 ± 0.05 ^a
4 cell	17	0.45 ± 0.03 ^a
8 cell	18	0.46 ± 0.02 ^a
Morula	48	1.03 ± 0.05 ^b
Blastocyst	55	1.86 ± 0.07 ^c
Hatched blastocyst	24	3.01 ± 0.07 ^d

Values with different superscripts in each column are significantly different ($P < 0.05$).

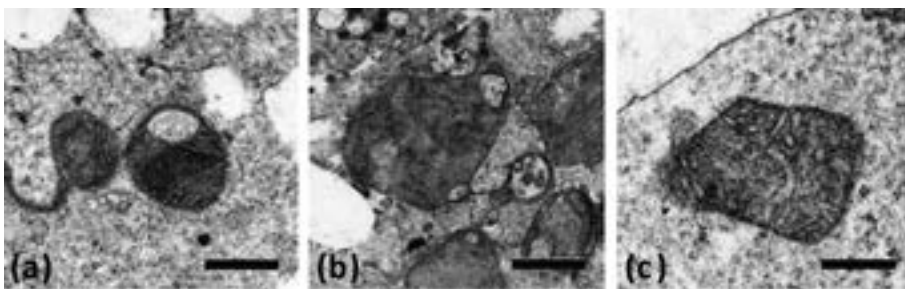


Fig. 2 Electron micrographs of bovine embryos derived from in vitro-matured and in vitro-fertilized oocytes at 2-cell (a), morula (b), and blastocyst (c) stages. a : Note immature mitochondria showing ovoid structures with a hooded appearance and a dark electron-dense matrix. b, c : Note presence of elongated mitochondria with transverse cristae. Bars = 0.5 μm.

Table 2 Relative membrane potential of mitochondria in bovine embryos cultured in a serum-free medium (IVD101) at various developmental stages

Embryonic stage	No. of embryos measured	Relative membrane potential (high $\Delta\Psi_m$ /low $\Delta\Psi_m$)
2 cell	16	0.416 \pm 0.020 ^a
4 cell	13	0.393 \pm 0.012 ^a
8 cell	18	0.596 \pm 0.029 ^b
Morula	16	0.826 \pm 0.033 ^c
Blastocyst	20	0.774 \pm 0.030 ^c
Hatched blastocyst	27	0.849 \pm 0.034 ^c

Values with different superscripts in each column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 3 Relationship between oxygen consumption and developmental potential of morulae cultured in serum-free IVD101 medium

Oxygen consumption rate ($F \times 10^{-14}$ /mol s ⁻¹)	No. of embryos measured*	No. of embryos developed to blastocyst after 96 h (%)	No. of blastocysts expanded or hatched after 96 h (%)
$F \geq 1.0$	56	50 (89.3)	35 (62.5)
$0.8 \leq F < 1.0$	44	30 (77.3)	20 (50.0)
$F < 0.8$	107	49 (45.8)	28 (26.2)

* Bovine embryos at the morula stage were selected at day 6 after *in vitro* fertilization. After measurement by modified SECM, embryos were incubated in IVD101 medium for 4 days in a humidified atmosphere of 5% CO₂/5% O₂/90% N₂ at 38.5°C.

ことが示唆された。

電気化学計測技術を基盤とする細胞呼吸測定法は、真核細胞に存在するミトコンドリアの呼吸を検出することからほとんどの動物細胞に応用できる。また、この測定技術は非侵襲的であることから、医療分野における応用も期待できる。すでに我々は、SECMを用いたヒト余剰胚の呼吸測定に成功し、初期胚や凍結保存胚の品質評価に対する有用性を報告している^{6,7)}。今後は、牛や豚など家畜全体に応用範囲を広げ、家畜受精卵移植分野での実用化を目指す。また、現在有効な品質評価法が開発されていない卵母細胞の品質評価や種々の幹細胞の機能診断などへの応用が期待される。

4. 要 約

本研究では、ミトコンドリア呼吸機能を指標とする精度の高い牛胚品質評価法の開発を行った。

牛胚の呼吸測定に特化した高感度マイクロ電極と非侵襲測定液を開発し、SECMをベースにこれら要素技術をシステム化した細胞呼吸測定システムを構築することができた。この測定システムを用いて単一牛胚の酸素消費量を測定した結果、牛胚は桑実胚から胚盤胞にかけて呼吸量が増加し、これに伴いミトコンドリアの形態的な発達と膜電位活性の上昇が起こることが明らかになった。さらに、呼吸測定した受精卵の培養実験により、受精卵の品質とミトコンドリア呼吸機能が密接な関係にあることが示された。以上、本研究で開発した細胞呼吸測定システムは、ミトコンドリア呼吸機能を高精度で検出し、ミトコンドリア機能に基づく新しい胚品質評価法の基盤技術となることが示された。今後は、呼吸測定した胚の移植試験、電子伝達系呼吸鎖複合体の細胞生物学的および分子生物学的解析を行い、ミトコンドリア機能解析に

基づく牛胚品質評価技術の有用性と安全性を科学的に実証する予定である。

文 献

- 1) Abe, H., Yamashita, S., Satoh, T., Hoshi, H. : *Molecular Reproduction and Development*, **61**, 57~66, 2002.
- 2) Abe, H., Matsuzaki, S., Hoshi, H. : *Theriogenology*, **57**, 1273~1283, 2002.
- 3) Shiku, H., Shiraishi, T., Ohya, H., Matsue, T., Abe, H., Hoshi, H., Kobayashi, M. : *Analytical Chemistry*, **73**, 3751~3758, 2001.
- 4) Shiku, H., Shiraishi, T., Aoyagi, S., Utsumi, Y., Matsudaira, M., Abe, H., Hoshi, H., Kasai, S., Ohya, H., Matsue, T. : *Analytica Chimica Acta*, **522**, 51~58, 2004.
- 5) Shiku, H., Torisawa, Y., Takagi, A., Aoyagi, S., Abe, H., Hoshi, H., Matsue, T. : *Sensors and Actuators B*, **108**, 597~602, 2005.
- 6) Goto, K., Koike, M., Kumasako, Y., Utsunomiya, T., Araki, Y., Abe, H. : *Journal of Fertilization and Implantation*, **27**, 53~58, 2010.
- 7) Yamanaka, M., Hashimoto, S., Amo, A., Ito-Sasaki, T., Abe, H., Morimoto, Y. : *Human Reproduction*, **26**, 3366~3371, 2011.

牛伸長胚の生育に関わる子宮内膜細胞因子の探索

Screening of endometrium cell-derived factors involved in bovine
elongated embryo survival

細 江 実 佐

(農業生物資源研究所動物発生分化研究ユニット)

Misa Hosoe

(National Institute of Agrobiological Sciences, Animal Development and Differentiation Research Unit)

In cattle, hatched blastocyst remains free-floating for 3 weeks, and the elongation of the trophoblast during this period provides maternal-embryo communication that are essential for survival of the conceptus. To identify the endometrium-derived factors involved in the early development of embryo, we established the embryo-endometrium coculture system. Day 6 IVF embryos were transferred to a recipient cow once, and after 3 days, Day 9 embryos were collected by non surgical uterine flushing. Recovered embryos were cultured on endometrium monolayer cells, and after 24 and 48hrs, total RNAs were purified from endometrium cells and subjected to RNA-seq analysis. We also examined gene expression profiles of endometrium cells without embryos and exposed to IFN τ to identify the genes whose expression levels were varied by the presence of embryos and/or IFN τ . Total 24,551 annotated genes were screened, and 377 genes were identified as being upregulated with a more than 2-fold difference in cocultured endometrium cells at 24hrs, and 140 of these genes kept high expression levels at 48hrs. Of these genes, 120 genes (85.7%) showed a more than 2-fold upregulated in IFN τ -stimulated cells. Among 97 genes were expressed only detectable in cocultured endometrium cells at both 24 and 48hrs, 57 genes (58.8%) were expressed correspondingly in IFN τ -stimulated endometrium cells. These results suggest that IFN τ secreted from trophoblast has great influence on the transcriptome profile of endometrium cells. As expected, known to IFN τ stimulating genes, such as ISG15, MX1 and MX2 were found to be upregulated genes, and these elevations in expression were confirmed by qRT-PCR. In this study, 24 upregulated transcripts that could be closely related to the maternal-embryo communications, such as adhesion molecules, cell surface molecules and extracellular matrices were identified, and also found 59 genes that upregulated in cocultured endometrium cells regardless of IFN τ stimulation.

1. 目 的

牛や豚などの家畜の胚は、受精後およそ3週

間、着床することなく子宮内を浮遊しながら伸長する、独特の発生形態をとる。牛の場合、胚の伸長は受精後10日目ごろから顕著になるが、これは

主に胎盤の構成組織となる栄養膜細胞の増殖によるものである。この時期、将来胎子へ発生する胚体外胚葉においても、内部に生じた腔が開裂して胚表面で平板化した胚盤となり、さらに羊膜腔が形成されるなど、大きな形態変化が起きる。通常受精卵を移植する場合、受精7日目前後で移植に十分な胚盤胞にまで発生するため、これまで伸長胚が繁殖技術研究の対象になることはなかった。しかし最近、14日目前後の伸長胚（長さ0.5～15mm）を子宮から回収し、その一部を切り取って（バイオプシー）性別などの診断をした後に再び子宮に戻して産子を得る技術が開発された¹⁾。従来より胚盤胞でも診断は可能であったが、目にみえる大きさの伸長胚を利用できるようになったことで、現場での迅速な診断が可能となった。また、伸長胚バイオプシーは多くの診断用細胞を提供できるため、ゲノム育種等の遺伝子診断にも最適な方法である。この技術をさらに発展させ、体外受精胚から直接移植可能な伸長胚を作成することができれば、より効率的な遺伝子診断が可能となり、家畜改良にかかる期間とコストの削減につながる画期的な育種繁殖技術となる。そこで本課題では、胎子への生育能力のある伸長胚を体外で作製するため、特に牛伸長胚と子宮内膜細胞の相互作用に注目し、伸長胚の発生・分化を維持・促進する子宮内膜細胞由来の物質の同定することを目的とする。

2. 方法

2.1 供試材料およびRNA抽出

発情周期15日目の黒毛和種雌牛から子宮内膜上皮細胞を採取し、5%牛胎子血清添加DMEM培地、38℃、5%O₂、95%airの条件下で培養、増殖させて継代した。一方、常法で作成した²⁾体外発生胚を媒精後6日目に発情同期化した雌牛2頭の黄体側子宮に各50個移植し、3日目に子宮から非侵襲的に回収してあらかじめ培養していた子宮内膜上皮細胞とともに48時間共培養した。また、胚が分泌しているインターフェロントウ（IFN τ ）が子宮内膜上皮細胞に及ぼす影響とそれ以外の要因を切り分けるため、胚がこの時期に分泌するIFN τ の活性を当研究室で樹立したI型IFN活性を測定するバイオアッセイ系によって調べ、ほぼ等量のIFN τ （24hr：0.5ng/ml、48hr：2.0ng/ml）を子宮内膜上皮細胞の培地に添加した。対照として非共培養区を設定し、共培養区、IFN τ 添加区の3区について、子宮内膜上皮細胞を24時間おきに2日間採取した（Fig. 1）。これらの細胞から、RNAを抽出（RNeasy Micro Kit, QIAGEN）してRNA-seq解析および定量的RT-PCR解析に供した。

2.2 RNA-Seq解析

マクロジェン・ジャパン社に依頼し、Illumina HiSeq2000による次世代シーケンシング解析用ライブラリ調製およびその配列解読を行った。解読した配列データをTopHat³⁾を用いて牛のゲノム

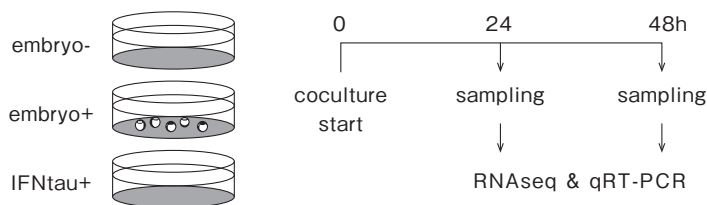


Fig. 1 Schematic protocol for screening of endometrium cell-derived factors using the coculture system.

上にマッピングし、Cufflinks⁴⁾によりマッピング結果をもとにそれぞれの遺伝子領域に何個のシーケンスリードがマッピングされたかをカウントすることにより遺伝子発現量を推定した。各区で発現パターンが異なる遺伝子をスクリーニングするために、Cuffdiffにより胚もしくはIFNtau添加区と非添加区における子宮内膜上皮細胞の遺伝子発現量を比較して、5%の棄却率で同一であることが矛盾すると推定される遺伝子群を抽出した。抽出した遺伝子群について、細胞接着分子、細胞外マトリクス、細胞表面タンパクなど伸長胚の発生・分化に関連しており培地に添加できる可能性のあるものや着床に関与すると考えられるサイトカイン、転写因子についてgene ontology (GO)に基づき遺伝子を抽出した。

2.3 定量的RT-PCR

定量的RT-PCRは既報に準じて行った⁵⁾。GAPDH発現量を内部標準として、IFNtau関連遺伝子であるISG15, MX1, MX2の各遺伝子の相対発現量を算出した。

3. 結果と考察

2頭の受胎牛に媒精後6日目の胚を50個移植し、3日後に回収したところ、18個の生存胚が得られ、そのうち9個を24時間共培養区、9個を48時間共培養区に用いた (Fig. 2)。牛ゲノム上の28,005個の遺伝子のうち、アノテーションが可能であった24,551個の遺伝子を各区で比較解析したところ、胚と子宮内膜細胞との共培養区における子宮内膜細胞の遺伝子発現が、非共培養区のものよりも2倍以上高かった遺伝子は、培養後24時間で377個、48時間で453個あり、そのうち共通する遺伝子は140個であった (Fig. 3A)。このうち、IFNtau添加区でも同様に高かった遺伝子は120個 (85.7%)、GO解析で選別された細胞接着分子は12個、細胞外マトリクスは1個、細胞表面タンパクは3個、サイトカインは2個、転写因子は1個であった。また、非共培養区ではまったく発現がみられなかったが、共培養区で発現がみられるようになった遺伝子は、培養後24時間で616個、48時間で487個あり、そのうち共通する遺伝子は97

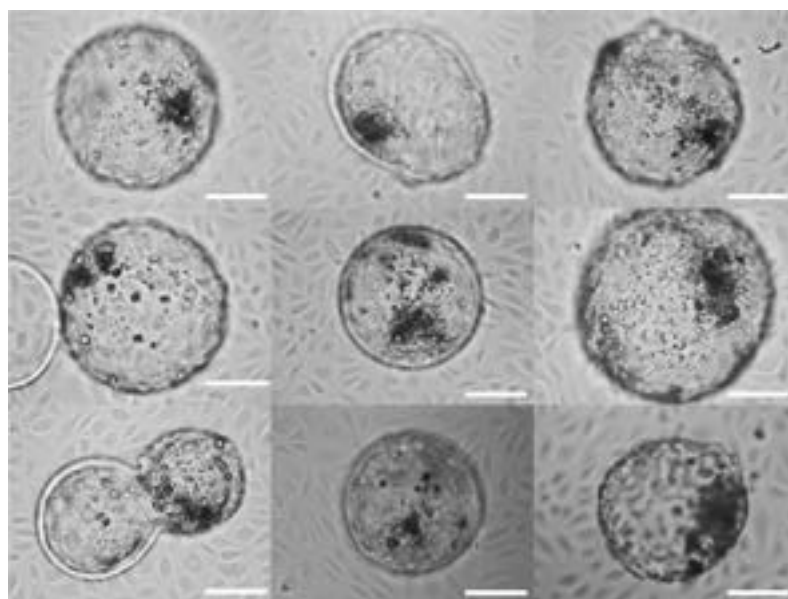


Fig. 2 Day 11 embryos in coculture with endometrium cell monolayers at 48 hours. Scale bar indicates 100 μ m.

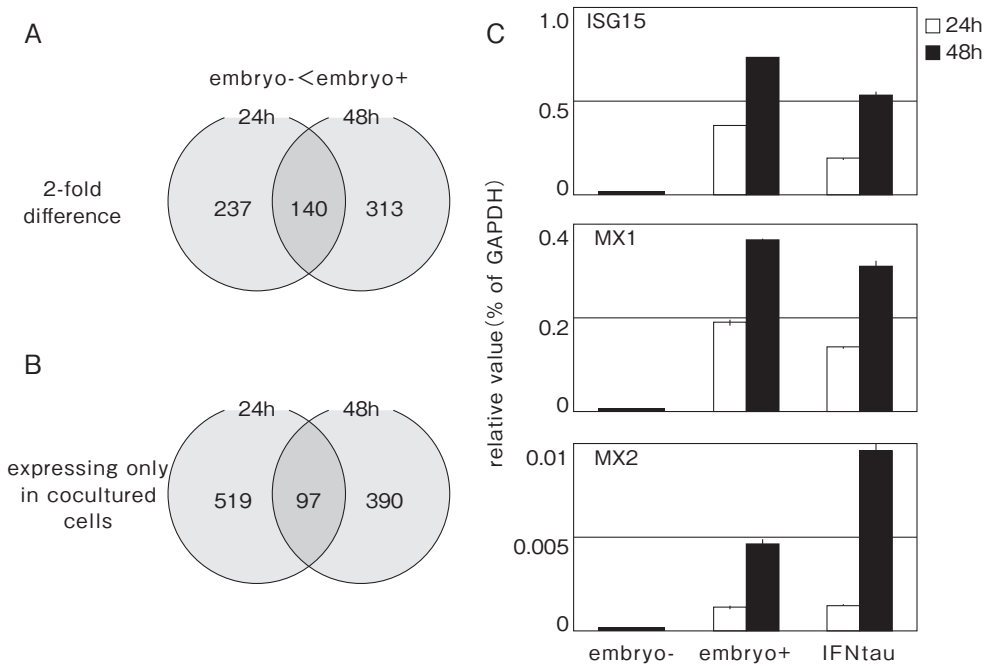


Fig. 3 Venn diagram of differentially expressed genes in endometrial cells cocultured with day 9-10 embryos. (A) Number of upregulated genes with 2-fold difference and (B) expressing only in cocultured endometrium cells at 24 and 48 hours. (C) Quantitative RT-PCR analysis of known IFN-induced genes in cocultured endometrium cells.

個であった (**Fig. 3B**)。このうち、IFNtau添加区でも同様に高かった遺伝子は57個 (58.8%) であり、細胞接着分子は4個、細胞外マトリクスは2個、細胞表面タンパクは2個であり、サイトカイン、転写因子はなかった。RNA-seq解析において共培養区で発現が高かった遺伝子のうち、ISG15, MX1, MX2について定量的RT-PCRで検証を行った結果、RNA-Seq解析の結果と同様、胚との共培養区およびIFNtau添加区における発現量は、非添加区の発現量より高かった (**Fig. 3C**)。本解析の結果から、D9の胚の存在下で子宮内膜細胞の多くの遺伝子発現が変動しており、そのなかでもIFNtauに関連する遺伝子の割合が大きいことが明らかになった。また、本解析によって胚存在下で変動する細胞接着分子、細胞外マトリクス、細胞表面タンパク等が明らかとなり、今後、伸長胚培養系の改良への寄与が期待される添加物質が同定された。

4. 要 約

胎子への生育能力のある伸長胚を体外で作製するため、特に牛伸長胚と子宮内膜細胞の相互作用に注目し、伸長胚の発生・分化を維持・促進する子宮内膜細胞由来の物質のスクリーニングを試みた。24および48時間培養した子宮内膜上皮細胞、媒精後9日目の胚と共培養したものおよびIFNtauを培地に添加したものの3区について、RNA-Seq解析および定量的RT-PCR解析を行い発現の違いを抽出した。胚と子宮内膜細胞との共培養区で非共培養区よりも2倍以上高かった遺伝子のうち、培養後24時間と48時間で共通するものは140個、このうちIFNtau添加区でも同様に高かった遺伝子は120個 (85.7%) であった。また、共培養区のみで発現が確認された遺伝子のうち、培養後24時間と48時間で共通するものは97個、このうちIFNtau添加区でも同様に高かった遺伝子

は57個（58.8%）であった。本研究において、細胞表面分子、細胞外マトリクスのような母体-胚間のコミュニケーションに関わる分子のうち、胚の存在下で発現が亢進する24個の遺伝子が同定され、また、IFN τ 以外の胚からの刺激によって発現が亢進すると思われる59個の遺伝子が同定された。

文 献

- 1) Kimura, K., Matsuyama, S. : *J Reprod Dev*, **60**, 210~215, 2014.
- 2) Hosoe, M., Shioya, Y. : *Zygote*, **5**, 371~376, 1997.
- 3) Trapnell, C., Pachter, J., Salzberg, S. L. : *Bioinformatics*, **25**, 1105~1111, 2009.
- 4) Trapnell, C. : *Nat Biotechnol*, **28**, 511~515, 2010.
- 5) Furusawa, T., Ohkoshi, K., Kimura, K., Matsuyama, S., Akagi, S., Kaneda, M., Ikeda, M., Hosoe, M., Kizaki, K., Tokunaga, T. : *Biol Reprod*, **89**, 1~12, 2013.

*Rhizopus oryzae*水抽出物の肝障害抑制効果を応用した牛受精卵生産技術の向上

Improvement of the fertilized ovum production technique using liver damage suppressant effect of *Rhizopus oryzae* aqueous extract in cattle

鈴木 武人¹・堀 登²・林 みち子²・内尾 陽子²・牛越 設男³

(¹麻布大学獣医学部, ²石川県農林総合研究センター畜産試験場, ³㈱牛越生理学研究所)

Takehito Suzuki¹, Noboru Hori², Michiko Hayashi², Yoko Uchio² and Setsuo Ushikoshi³

(¹School of Veterinary Medicine, Azabu University, ²Ishikawa Prefectural Agriculture And Forestry Research Center Livestock Experimental Station, ³Ushikoshi Research Institute for Physiology Co., Ltd.)

Performance improvement effect of embryo production from donors of Japanese black cattle when *R. oryzae* U-1 aqueous extract was showed protective effect on liver injury was evaluated in this study. The embryos or oocytes were provided from a donor by three consecutive collections at an interval for 90 days of each ovum collections, and the donors were treated ROU-ae from 30 days before each ovum collection. In the embryo production by superovulation and artificial insemination, ratio of normal embryos and transferable embryos were significantly improved in the ROU-ae treated group. Meanwhile, in the embryo production by OPU-IVF, performance improvement of ovum collection was not superficially confirmed, but significantly increase of serum IGF-1 level and increasing tendency of serum DHEA level were detected by the ROU-ae treatment. IGF-1 secretion from liver is indispensable for the follicle growth with the ovary, and excessive androgen which is one of the causes of the ovulation disorder is inactivated by the metabolism in the liver. ROU-ae treatment induced IGF-1 secretion and improvement of metabolic homeostasis of the steroid hormone in the liver, and it was thought that these effects caused the improvement of the ovarian function secondarily.

1. 目 的

農水省公表の牛受精卵移植実施状況によると、胚移植 (ET) による産子数は5千頭程度だった平成元年から年々右肩上がりに増加し、ここ数年は2万頭前後で推移している。胚移植に用いる胚は、過剰排卵処理とそれに続く人工授精によって得られた受精卵を子宮灌流により採取することで行われる。したがって、優秀な雌牛に多数の卵を

排卵させ、優秀な雄牛の精子を受精させることで得られた胚を受胎牛に移植することで、優秀な資質を受け継いだ子牛を多数生産することが可能となる。また、牛は単胎動物で約1年に1産しかしないことから、優良牛の効率的な生産にはETが欠かせない方法の1つとなっている。しかし、ETによる受胎率は、全国平均で新鮮1個胚移植51%、凍結1個胚移植46%と、肉牛の人工授精受胎率56%には及ばない。ETに用いる胚は、過剰

排卵処理に続く人工授精後に子宮灌流によって採卵する方法や、と畜後の卵巣から採取した卵に体外受精を施す方法などにより生産されている。過剰排卵処理により採取される卵の数や質は供卵牛の個体差が大きく、ETによる子牛生産効率向上の方策の1つとして、高グレードの胚を多数得る方法の確立が望まれる。

一方、肝臓廃棄となるような肝臓に障害のある牛では卵巣内の卵の品質が低いと報告されている¹⁾。肝臓から分泌されるインスリン様成長因子(IGF-1)は卵胞の発育に重要な因子のひとつで、肝障害により分泌量が低下すると正常な卵巣周期が阻害され、繁殖障害の原因となることから²⁾、卵の高品質化には肝機能の改善が欠かせない。そこで本研究では、我々がラットおよび乳牛で肝障害抑制効果を報告している*Rhizopus oryzae*水抽出物^{3,4)}を和牛に給与し、採卵成績の向上を目指すことを目的とした。具体的には、和牛における2回の連続した過剰排卵処理(SOV)による採卵前にそれぞれ30日間給与し、非給与群に対する採卵成績(採卵数、正常胚数、移植可能胚数など)の改善効果を評価した。同様の実験を経膣採卵一体外受精(OPU-IVF)法でも行い、過剰排卵処理による採卵成績と比較した。

2. 方 法

2.1 供卵牛への*Rhizopus oryzae*水抽出物の給与試験

①SOVと人工授精による受精卵生産

試験には石川県農林総合センター畜産試験場能登畜産センターで飼育されている前産時採卵歴のある黒毛和種供卵牛24頭を用いた。これらの牛は日本飼養標準の採卵牛、妊娠末期、授乳期(分娩舎・1号舎)、通常期の5ステージに分け、それぞれの栄養要求量をベースに、充足率がTDN110~130%、CP70~100%となるよう飼料を給与した。

採卵は、膣内留置型プロジェステロン製剤(P)を留置し、エストラジオール(E₂)による卵胞波初期化後、卵胞刺激ホルモン(FSH)およびプロスタグランジン(PG)投与およびPの抜去、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)投与によるSOVに続けて人工授精後に子宮内灌流法により行った。これを90日間隔で2回連続して行い、24頭のうちランダムに選択した12頭にはそれぞれの採卵予定日30日前から採卵日まで*R. oryzae*水抽出物(*R. oryzae* U-1 aqueous extract; ROU-ae, (株)牛越生理学研究所)を20g/頭/日の用量で給与した。

②OPU-IVF法による受精卵生産

試験には石川県農林総合センター畜産試験場で飼育されている前産時採卵歴のある黒毛和種供卵牛6頭を用いた。これらの牛は日本飼養標準の採卵牛と通常期の2ステージに分け、それぞれの栄養要求量をベースに、充足率がTDN100~110%、CP90~100%となるよう飼料を給与した。

卵子の採取は、的場らの報告⁵⁾に準じて、Pを留置し、優勢卵胞除去による卵胞波初期化後、FSHおよびPG投与およびPの抜去、GnRH投与によるSOVに続けてOPUにより行い、当場のIVF法により受精卵を作出した。これを90日間隔で2回連続して行い、6頭のうちランダムに選択した3頭にはそれぞれの採卵予定日30日前から採卵日までROU-aeを20g/頭/日の用量で給与した。

これらの動物実験は麻布大学動物実験委員会の承認を受け、本委員会の規則に則り実施した。

2.2 受精卵生産におけるROU-ae給与効果の評価

ROU-ae給与の効果は以下の各項目を測定することで評価した。

①採卵成績(SOVと人工授精:推定横体数、採卵総数、正常卵数(率)、供給可能卵数(率)、正常卵に対する供給可能卵の割合、OPU-IVF:

卵胞数, 回収卵子数 (率), 卵子品質, 分割卵数 (率), 胚盤胞数 (率), 凍結可能胚盤胞数 (率)

②血中の生化学指標

血液生化学検査 (TP, ALB, BUN, GOT, γ -GTP, グルコース, T-CHO, Ca, IP, LDH, CPK, NEFA, β -ヒドロキシ酪酸) は自動分析装置を用いて測定した。

③各種ホルモンの血中濃度

インスリン様成長因子 (IGF-1), 抗ミュラー管ホルモン (AMH), アンドロゲン, デヒドロエピアンドロステロン (DHEA), ビタミン D (V.D) はELISA法, 黄体形成ホルモン (LH) は時間分解蛍光法によりそれぞれ測定した。AMHは卵胞数の指標となることを分担者・堀のグループやVernunftらが報告している^{6, 7)}。DHEAとV.Dはヒトで卵子数と関係があるとの報告^{8~10)}があり, 牛での測定を試みた。

2.3 統計処理

得られた各データの統計処理は, 一元配置の分散分析あるいは多重比較検定をEZR ver.1.3.2により行った¹¹⁾。

3. 結果と考察

3.1 SOVと人工授精による受精卵生産におけるROU-aeの給与効果

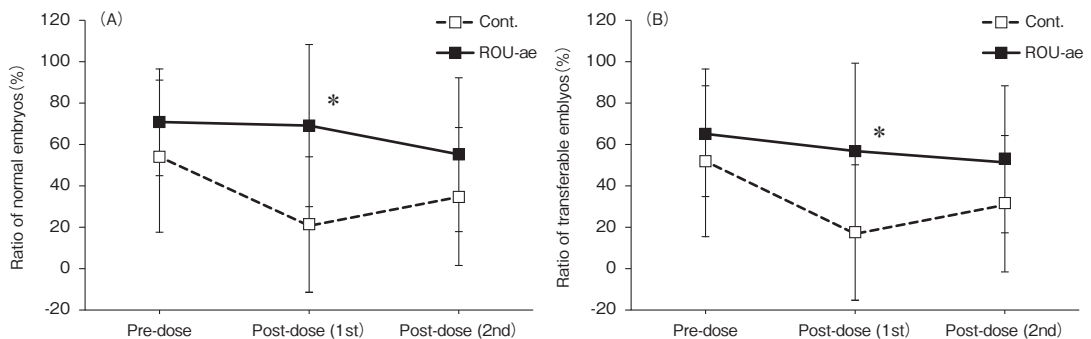


Fig. 1 Summary of embryo collection after superovulation and artificial insemination in control and ROU-ae treated donors. (A) Ratio of normal embryos. (B) Ratio of transferable embryos. Data represent the means \pm SEM.

*P<0.05 vs Control group.

ROU-ae給与前のROU-ae給与区と対照区の正常卵数の比較で, 給与区が有意に多い (P<0.05) 結果が得られたため, 正常卵率および供給可能卵率により採卵成績を評価した。ROU-ae給与前の正常卵率, 供給可能卵率は両区とも50~70%の範囲にあったが, 給与開始後1回目の採卵では, 対照区正常卵率21.1 \pm 32.8%, 供給可能卵率17.3 \pm 26.8%に対して, 給与区はそれぞれ69.1 \pm 39.2%, 56.7 \pm 43.0%とほぼ低下せず, 対照区に対して有意に高い値を示した (P<0.05; Fig. 1)。給与後2回目の採卵では, 対照区正常卵率34.6 \pm 33.9%, 供給可能卵率31.4 \pm 33.9%に対して, 給与区はそれぞれ55.1 \pm 37.0%, 52.9 \pm 35.6%と有意な差はないものの, 卵質は維持される傾向にあった (Fig. 1)。各種ホルモンの血中動態では, 各測定項目とも両区で試験期間中にほぼ差はなかったが, ROU-ae給与2回目の採卵時の発情時にIGF-1濃度が有意に上昇 (P<0.05) した (Fig. 2)。血液生化学検査値は試験期間を通じて正常範囲内を維持しており, ROU-ae給与が要因と思われるような変化も認められなかった。

3.2 OPU-IVF法による受精卵生産におけるROU-aeの給与効果

受精卵生産の成績に関して, 試験前のROU-ae給与区と対照区の間にはほぼ差はなかったが, 給与

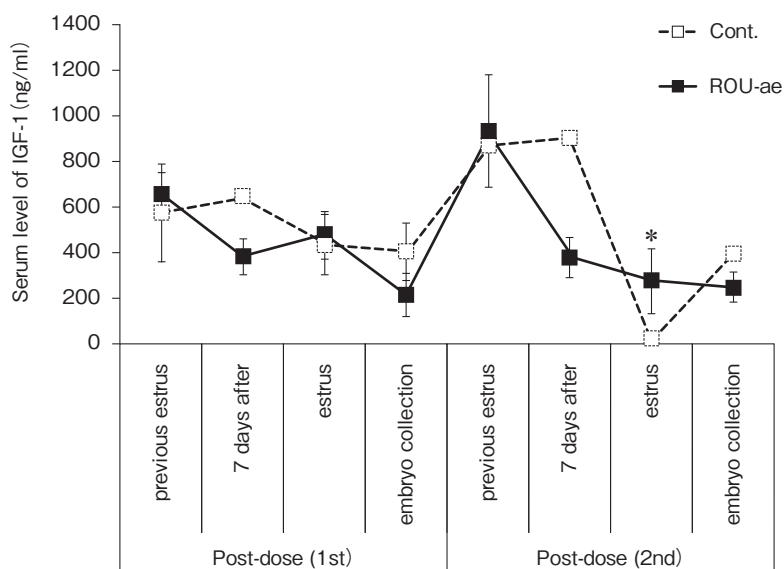


Fig. 2 Change of serum IGF-1 level in consecutive embryo collection in control and ROU-ae treated donors. Previous estrus shows estrus before one month of the embryo collection. Data represent the means \pm SEM.

* $P < 0.05$ vs Control group.

Table 1 Summary of oocyte and embryo results after OPU-IVF in control and ROU-ae treated donors. Data represent the means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs Control group.

		Number and size of follicle				Total oocyte retrieved
		Large	Medium	small	total	
Cont	pre	6.7 \pm 9.0	6.0 \pm 6.6	12.3 \pm 9.1	25.0 \pm 6.2	27.7 \pm 16.2
	post (1st)	14.3 \pm 23.1	3.7 \pm 2.1	20.3 \pm 14.8	38.3 \pm 8.7	19.3 \pm 13.1
	post (2nd)	15.0 \pm 22.5	2.0 \pm 1.7	18.0 \pm 15.1	35.0 \pm 9.2	18.0 \pm 10.8
ROU-ae	pre	13.0 \pm 9.8	5.0 \pm 1.0	8.7 \pm 13.3	26.7 \pm 3.5	20.0 \pm 1.0
	post (1st)	8.7 \pm 8.1	5.3 \pm 3.2	16.7 \pm 24.7	30.7 \pm 21.1	15.7 \pm 7.4
	post (2nd)	15.3 \pm 12.1	2.7 \pm 1.5	9.3 \pm 13.7	27.3 \pm 8.1	16.0 \pm 21.7
		COCs cultured	Cleavage rate, %	Blastocyst rate, %	Embryos produced rate, %	
Cont	pre	21.3 \pm 12.7	79.1 \pm 15.3	26.2 \pm 23.7	18.9 \pm 16.5	
	post (1st)	17.0 \pm 10.8	85.2 \pm 12.8	50.6 \pm 1.0	43.5 \pm 7.2	
	post (2nd)	16.0 \pm 11.0	89.6 \pm 18.0	47.2 \pm 20.5	30.6 \pm 25.1	
ROU-ae	pre	11.7 \pm 5.5	86.6 \pm 12.1	59.3 \pm 7.0	57.4 \pm 9.8	
	post (1st)	13.7 \pm 4.0	4.4 \pm 4.0*	4.4 \pm 4.0*	4.4 \pm 4.0*	
	post (2nd)	14.0 \pm 18.2	69.4 \pm 20.8	36.5 \pm 33.8	23.5 \pm 20.4	

後1回目の卵割率、胚盤胞率、凍結可能胚盤胞率においてROU-ae給与区が有意に低い値を示した ($P < 0.05$; Table 1)。一方、給与後2回目の成績

では両区の差はなかった。各種ホルモンの血中動態では、IGF-1およびDHEAにおいて給与区が対照区よりも常に高い平均値を示し、特にIGF-1は

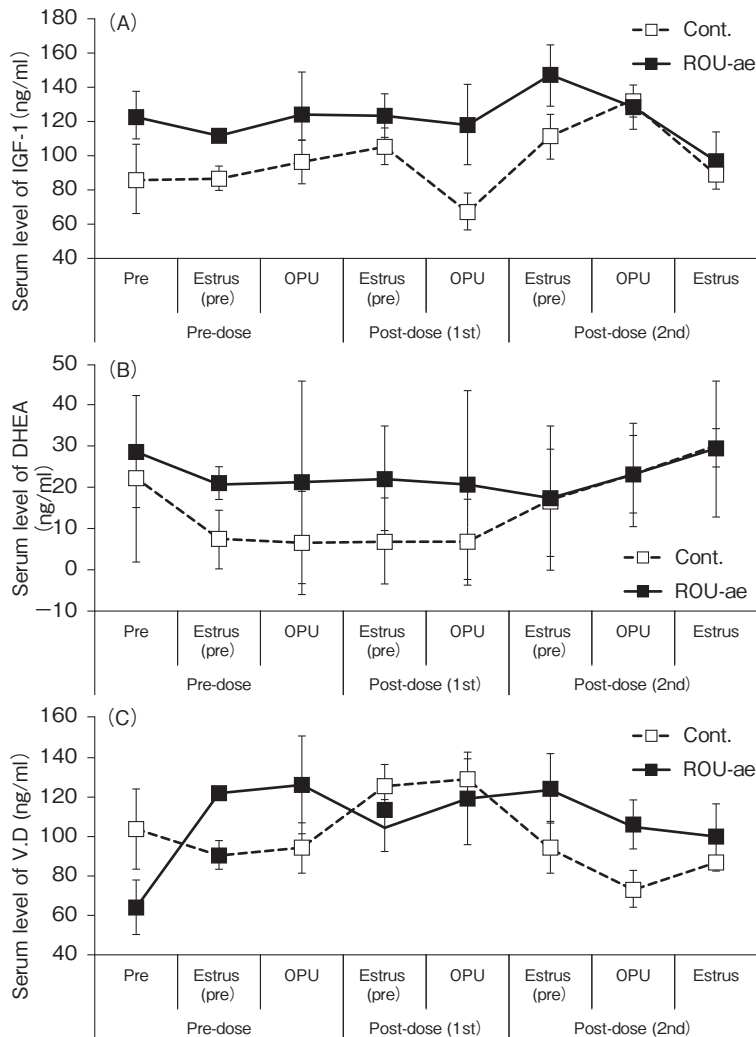


Fig. 3 Change of serum hormone levels in consecutive ovum pick-up in control and ROU-ae treated donors. (A : IGF-1, B : dehydroepiandrosterone, C : Vitamin D). Estrus (pre) shows estrus just prior to ovum collection. Data represent the means \pm SEM. A dose effect of ROU-ae was significantly accepted for change of serum IGF-1 level.

ROU-ae 給与効果の有意性が認められ ($P < 0.05$), V.D も高値を示す傾向にあった (Fig. 3)。また, 2 回目の OPU 実施前の γ -GTP 値も, 対照区 22.7 ± 1.2 U/L に対し, 給与区は 19.3 ± 1.5 U/L と有意に低下していた。

卵胞の莢膜細胞では黄体形成ホルモン (LH) の作用によりコレステロールからアンドロゲンを産生し, 顆粒膜細胞はアンドロゲンからエストラジオールを産生する。そのため成熟卵胞内には多

量のアンドロゲンが一時的に存在している。採卵のための SOV によって多数の成熟卵胞が形成されると, 排卵時には多量の LH が分泌される。過剰な LH は卵胞でのアンドロゲン産生を促進するとともに, 過剰なアンドロゲンは排卵障害を引き起こすことが報告されている¹²⁾。アンドロゲンは肝臓で代謝されて不活化されるが, 肝機能低下時に頻回の SOV を行うと, 上記機序により採卵成績が低下する確率が高まると考えられる。

ROU-aeは肝障害モデルラットで肝再生を促進し、分娩直後の乳牛における肝機能低下による血中NEFA濃度の上昇を抑制するなど、肝機能を改善する働きが認められている^{3,4)}。本研究でもSOVと人工授精による受精卵生産のROU-ae給与区では、連続した採卵にもかかわらず卵質が低下せず、一時的ではあるが有意な血中IGF-1濃度の上昇も認められていた。OPU-IVFでも血中IGF-1濃度の上昇にROU-aeの給与効果が認められており、 γ -GTP値も正常範囲内の変動ではあるが給与によって有意に低下していた。これらの変化はいずれもROU-aeの肝機能改善効果から予想される反応に合致しており、肝機能改善によるIGF-1分泌やステロイドホルモンの代謝恒常性の改善とそれに伴う卵巣機能の向上に対するROU-aeの有効性が示唆され、優良な遺伝資源の有効利用に利用することが期待できる。一方で、OPU-IVFでは給与後1回目の採卵で明らかに成績が低下していたが、採卵数に影響する中・小卵胞数は差がなかった。採取した卵子は卵丘細胞の付着状態による形態的特徴によりA~Fの6つにランク分けしているが、各ランクの卵子数にも給与による差はなかった。卵胞発育を誘起させるホルモン剤により卵子の発育ステージ(核相)と卵胞発育が必ずしも一致しないことが報告されており^{13,14)}、ステージの違いは後のIVFの胚成長にも大きな影響を与える。ROU-ae給与はIGF-1分泌を促進して卵胞の発育を促す可能性が高いことから、卵子の発育ステージも対照区と異なる可能性がある。今後は卵子の核相検査による発育ステージの確認や、今回測定できなかった性ホルモンやインスリンなど卵胞の発育・排卵に関与するホルモンのより詳細な動態解析を行い、ROU-aeの受精卵生産における効果メカニズムを明らかにすれば、より

効果的な利用方法が確立でき、利用価値が高まるものと考えられる。

4. 要 約

本研究は供卵牛からの連続的な受精卵生産の成績向上を目的とし、肝障害改善効果が報告されているROU-aeの給与効果を検討した。90日間隔で2回連続した採卵のそれぞれ30日前からROU-aeを給与した結果、過剰排卵処理と人工授精による受精卵生産では正常卵率、供給可能卵率の有意な上昇が認められ、OPU-IVF法では受精卵生産の成績向上は認められなかったものの血中IGF-1濃度上昇における有意な給与効果と血中DHEA濃度の増加傾向が認められた。ROU-aeの肝機能改善機能がIGF-1分泌やステロイドホルモンの代謝恒常性を改善し、卵巣機能を向上させたと考えられた。

文 献

- 1) 田中裕志, 芝野健一, 増田恵, 岩田尚孝, 桑山岳人, 門司恭典: ウシ肝臓の状態と卵子形成および卵子の発育能力について, 日本胚移植学雑誌, 31, 61, 2009.
- 2) Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C. A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Schams, D., Miyamoto, A.: Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows, *Reproduction*, 133, 155~163, 2007.
- 3) 北田菜津美, 北満夫, 林みち子, 坂口政信, 牛越設男, 滝沢達也, 福岡秀雄, 鈴木武人: Rhizopusoryzae水抽出物投与によるウシ血中IGF-Iおよび性ホルモン濃度の変化が繁殖成績に与える影響, 第155回日本獣医学会学術集会(2013年3月)
- 4) Suzuki, T., Fukuoka, H., Ushikoshi, S., Satho, R., Morita, H., Takizawa, T.: Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats, *AnimSci J*, 86, 532~540, 2015.
- 5) Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Hshiyada, Y., Seta, T., Nakagawa, K., Lonergan, P., Imai, K.: Optimizing production of in vivo-matured oocytes from superstimulated Holstein cows for in vitro

- production of embryos using X-sorted sperm, *J. Dairy Sci.*, **97**, 743~753, 2014.
- 6) 河合愛美, 堀登, 上地正英: 黒毛和種供卵牛の血中抗ミューラー管ホルモン濃度と採卵成績の関係, 北信越畜産学会報, **107**, 17, 2013.
- 7) Vernunft, A., Schwerhoff, M., Viergutz, T., Diederich, M., Kuwer, A.: Anti-Muellerian hormone levels in plasma of Holstein-Friesian heifers as a predictive parameter for ovum pick-up and embryo production outcomes, *J Reprod Dev*, **61**, 74~79, 2015.
- 8) 大塩達弥: 加齢女性生殖機能低下に対する dehydro-epiandrosterone 併用による不妊治療, *J Reprod Engineer*, **14**, 1~5, 2011.
- 9) Zhang, J., Qiu, X., Gui, Y., Xu, Y., Li, D., Wang, L.: Dehydroepiandrosterone improves the ovarian reserve of women with diminished ovarian reserve and is a potential regulator of the immune response in the ovaries, *Biosci Trends*, **9**, 350~359, 2015.
- 10) Merhi, Z. O., Seifer, D. B., Weedon, J., Adeyemi, O., Holman, S., Anastos, K., Golub, E. T., Young, M., Karim, R., Greenblatt, R., Minkoff, H.: Circulating vitamin D correlates with serum antimüllerian hormone levels in late-reproductive-aged women: Women's Interagency HIV Study, *Fertil Steril*, **98**, 228~234, 2012.
- 11) Kanda, Y.: Investigation of the freely-available easy-to-use software "EZ R" (Easy R) for medical statistics, *Bone Marrow Transplant*, **48**, 452~458, 2013.
- 12) Walters, K. A.: Role of androgens in normal and pathological ovarian function, *Reproduction*, **149**, 193~218, 2015.
- 13) Blondin, P., Coenen, K., Guilbault, L. A., Sirard, M. A.: Superovulation can reduce the developmental competence of bovine embryos, *Theriogenology*, **46**, 1191~1203, 1996.
- 14) Blondin, P., Coenen, K., Sirard, M. A.: The time interval between FSH-P administration and slaughter can influence the developmental competence of beef heifer oocytes, *Theriogenology*, **48**, 803~813, 1997.

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)

The Japanese Black is the most common breed of beef cattle in Japan. To declare the relationship between standard operation procedures and reproductive performance in Japanese Black cattle, we investigated the production system and management procedures and examined the association with production performance. In addition, the relationship between management to reduce cold stress and stillbirth rate was examined. 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 331 farms were participated in the present study. The 331 farms were categorized into three groups based on the average cow inventory : small (1 to 10 cows ; n=148), middle (11 to 50 cows ; n=90) and large (more than 51 cows ; n=93). The results of questionnaire survey showed small farms had higher proportions of farms remaining cows in the calving room after service than large farms ($P<0.05$). 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 ($P<0.05$). In addition, days when estrus detection performs for cows after calving was shorter in large farms compared to small farms ($P<0.05$; 41.3 vs. 47.9 days). Proportions of farms having heater for management to reduce cold stress in large farms was higher than small farms ($P<0.05$; 67% vs. 43%). Consequently, cows in farms having heater for management to reduce cold stress had a lower probability of having stillbirth than those in farms not having heater (0.89% vs. 1.71% ; $0.05<P<0.10$). Additionally, cows in farms having windshield for management to reduce cold stress had a lower probability of having stillbirth than those in farms not having windshield (1.54% vs. 3.11% ; $P<0.05$). Based on these results, it is recommended improving standard operating procedures to enhance production efficiency in beef cattle production.

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数経営へと推移してきている¹⁾。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²⁾。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³⁾。

このような背景から、筆者らは昨年度に宮崎県内の黒毛和種牛繁殖農場を対象として、繁殖疫学的手法を用いた黒毛和種牛農場の飼養形態の実態調査を大規模に行った。繁殖疫学とは動物を「群」として認識し、各個体から得られる莫大なデータを活用して飼養形態や環境要因が繁殖成績に与えるリスクを抽出する手法である。昨年度の調査には189農場の黒毛和種牛繁殖農場が聞き取り調査に協力し、飼養に関わる因子として、6つの飼養管理（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）を調査した。

昨年度の調査から、AI以降の母牛の飼養形態や発情管理の方法など、繁殖成績に影響を及ぼす複数の因子を明らかにすることができた⁴⁾。しかし、昨年度の調査では臨床獣医師が定期巡回している農場を中心としてデータを収集したため、限られた農場を対象とした調査となった。調査から得られた因子を考慮した適切な飼養管理方法を構築するためには、さらなる農場数の増加が必要である。また、昨年度の調査より、寒冷期における飼養管理が繁殖成績と関連していたことから、黒毛和種牛で問題となっている冬季の死産および難

産の発生^{5,6)}に対するこれらの飼養管理の影響も定量する必要がある。そこで、本研究では、黒毛和種牛農場の飼養形態のさらなる実態調査の実施と、寒冷期の飼養管理が死産率および難産率に及ぼす影響の調査を目的とした。

2. 方 法

2.1 調査対象とした集団

本研究の調査では、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、宮崎県営農支援課やNOSAIみやざきが主催する黒毛和種牛繁殖農場を対象とした勉強会または集会において実施し、参加した生産者に各々の農場の飼養形態や飼養管理について回答を依頼した。勉強会および集会は県内の地域単位（宮崎・東諸、児湯・西都、南那珂、都城）で複数回開催された。

2.2 調査に用いた質問票

アンケート調査に使用した質問票は、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昨年度調査した質問票をもとに作成した。昨年度に使用した質問票に関して、聞き取り調査を実施した臨床獣医師から提供された改善点を反映させ、昨年度の調査よりも詳細かつ実用的な質問票を本調査に用いた。質問票は、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・寒冷対策の実施の5つのセクションで構築した。各々のセクションに関する質問項目を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元に、各農場における繁殖成績を算出

Table 1 The questionnaire items in each section

Section	Questionnaire items
<i>Farm basic information</i>	Average cow inventory Average calf inventory Type of barn at calving Type of barn at insemination Number of calving barn Distance from house to farm
<i>Management for cows in calving</i>	How to predict the timing of calving of cows Days when cows move from calving barn Weaning age Bedding materials
<i>Management for cows during estrus</i>	Days when estrus detection performs Methods for estrus detection Days when pregnancy diagnosis performs Methods for pregnancy diagnosis
<i>Feeding program</i>	Feed amount of roughages per day Feed amount of concentrate feeds per day Feed ingredients of roughages Feed ingredients of concentrate
<i>Management to reduce heat stress and cold stress</i>	Management to reduce heat stress for cows Management to reduce heat stress for calves Management to reduce cold stress for cows Management to reduce cold stress for calves

した。また、各個体の分娩時の分娩状態について調査を行い、それぞれの分娩状態を正常産、死産、難産に分類した。飼養規模に関して、各農場における飼養頭数をもとに、農場を3つのグループに分類した。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、11~20頭の農場を中規模農場、21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 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いた。調査した飼養形態および飼養管理に関して、地域(宮崎・東諸、児湯・西都、南那珂、都城)や飼養規模との関連性を分析した。分析に関して、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、寒冷対策と死産率および難産率の関連性はa mixed-effects logistic regression modelを用いて検定した。

3. 結果と考察

本調査に協力した農場は339農場であった。このうち、8農場において、飼養頭数が0頭であったことより、これらの農場の記録は分析より除外し、331農場の記録を分析に使用した。331農場の平均飼養母牛頭数は21頭であった。飼養規模別の農場数は、小規模農場が148農場、中規模農場が90農場、大規模農場が93農場であった。

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、分娩房で母牛を飼育していた農場の割合が多かった。一方、AI前後の時期では、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51%であったが、小規模農場では7%であり、大規模農場が有意に高かった ($P < 0.05$)。一方、小規模農場や中規模農場では、AI前後の時期につなぎで飼育している農場が大規模農場よりも多かった ($P < 0.05$; 57%, 66% vs. 38%)。

分娩に関する飼養管理として、母牛の分娩時期の予測方法は、目視による行動観察や乳房の張りを実施して予測している農場が6割以上存在した。一方、牛温恵などの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2割程度であったが、小規模農場では5%であった。床敷の種類は、おがくず、もみがら、稲わらが主流な材料であった。大規模農場では8割以上の農場がおがくずを使用していたが、小規模農場ではおがくずを使用していた農場は5割程度であった。一方、稲わらを使用していた農場割合は大規模農場では2割程度であったが、小規模農場では5割程度であった。分娩後の離乳日齢は、平均が約99日であり、飼養規模による有意な差はみられなかった。

種付けに関する飼養管理として、未經産牛に対して発情確認を開始するタイミングは11.4ヶ月齢であり、飼養規模と関連がみられなかった。一方、経産牛に対して発情確認を開始するタイミングは分娩後44.7日であり、大規模農場が小規模農場よりも早い傾向にあった (41.3日 vs. 47.9日)。発情確認の手法は、粘液の確認が約8割、牛の鳴き声が約6割、行動確認が約7割であった。牛歩計を使用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 ($P < 0.05$; 10% vs. 1%)。

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、エンバクが使用されていた。また、粗飼料の成分には地域差がみられ、特にトウモロコシの使用割合は地域によって75%から11%までバラツキがみられた。

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。一方寒冷紗の使用割合は約2割程度であった。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 ($P < 0.05$; 67% vs. 43%)。

飼養管理と死産および難産の発生率との関連性に関して、寒冷対策との関連性について調査を行った。母牛に対する寒冷対策に関して、ヒーターを設置している農場は、設置していない農場と比較して、死産率が低い傾向があった (0.89% vs. 1.71%; $0.05 < P < 0.10$)。同様に、風よけを設置している農場は、設置していない農場と比較して、死産率が低かった (1.54% vs. 3.11%; $P < 0.05$)。

本研究では、昨年度の調査からさらなる農場数を対象として調査を実施した。昨年度と同様に、本研究においても小規模農場では発情確認の手法、発情確認のタイミング、発情確認期間中における飼養形態が大規模農場と異なっていた。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。特に、小規模農場ではAI前後の時期に発情確認が難しい飼養形態で母牛を飼育している農場が多いため、発情発見の精度を高めるためにもこれらのICT機器の活用が必要となると考えられる。また、経産牛に対する発情確認のタイミングが遅いことも明らかになった。早期の発情確認を実施することにより、分娩後の発情回帰を早期に発見することができるため、発情確認を適切な時期に開始する必要がある。

また、本研究では寒冷期における飼養管理と死産率との関連性を調査した。調査の結果、寒冷対

策を施している農場において死産率が有意に低くなり、これは黒毛和種牛で問題となっている冬季の死産および難産の発生^{5, 6)}が寒冷対策と関連している可能性を示唆している。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⁵⁾、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⁶⁾。本研究の結果より、寒冷ストレスに対する対策を施すことにより、死産率を低減できる可能性が示唆された。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を調査する必要がある。

本研究では、給餌に関する飼養管理において、粗飼料の成分に大きな地域差がみられた。これは各地域における粗飼料の飼養環境や栽培条件の違いを反映していると考えられる。しかしながら、粗飼料の成分が異なることにより、母牛が給餌する栄養価にバラツキが生じる可能性があることより、各給餌プログラムにおける母牛を対象として、栄養状態を調査する必要があると考えられる。特に、昨年度の調査や本研究において、冬季における繁殖成績の低下や死産率の増加がみられていることより、熟生産の代謝が活発になる寒冷期における給餌プログラムと栄養状態の評価を追跡調査することが生産性向上のために必要となる。

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。本研究により、飼養管理は飼養規模によって大きく異なり、この差が繁殖成績の差に繋がっていると考えられる。これらの知見を基に、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。また、冬季における寒冷対策を施している農場では死産率が低かった。寒冷期における死産率の上昇は繁殖農家の経営に大きな損失を与えることより、適切な寒冷対策を施す必要がある。

文 献

- 1) 農林水産省：畜産統計調査, 2015. <http://www.e-stat.go.jp/SG1/estat/Xlsdl.do?sinfid=000031316429>
- 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) 佐々木半介, 上松瑞穂, 北原豪, 大澤健司, 末吉益雄：宮崎県内における黒毛和牛繁殖農家の飼養管理と飼養規模との関連性, 第119回大会日本畜産学会大会講演要旨, 2015.
- 5) Uematsu, M., Sasaki, Y., Kitahara, G., Sameshima, H., Osawa, T. : Risk factors for stillbirth and dystocia in Japanese Black cattle, *Vet. J.*, **198**, 212~216, 2013.
- 6) 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.

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・ジア アシフ
(神戸大学農学研究科生体計測工学研究室)

Roumiana Tsenkova, Yosuke Kubota, Akane Furukawa and Zia Asif Iqbal
(Biomeasurement Laboratory, Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

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 vein and udder of dairy cow can be used to diagnose estrus which caused by sexual hormone (progesterone).

6 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 vein and udder, the wavelength ranges of water which showed the identifiability of the estrus cows and the control cows were investigated. In the future, with knowledge acquired, we will try to construct small, cheap NIR sensor for easy and fast estrus detection.

1. 目 的

近年、乳牛の繁殖成績は低下の一途をたどり、酪農業では多大な損害が生じている。乳牛の繁殖には発情診断が重要であるが、行動観察などに代表される従来の診断手法は曖昧であり、時間や労力面において課題を有している。また、EIA法に

代表される発情に関係する体液中性ホルモン濃度変化を測定する手法についても、同様に多大な時間や労力、薬品を要する。そこで、本研究では新たな発情診断手法として迅速、簡便に測定可能な近赤外分光法と水分子情報を基とする分析手法（アクアフォトミクス）に着目した¹⁾。アクアフォトミクスは、生体液内のホルモン等、水溶液中の

溶質の種類やそれらの濃度変化がもたらす水の物理化学的構造変化を水の近赤外吸収スペクトルの変化から読み取るものである。この方法であらゆる生体液中の溶質の変化を水鏡に映し出されたように、水の近赤外吸収スペクトルの変化から推測することができる。アクアフォトミクスを用いた先行研究としては、生乳中の成分分析²⁾、乳牛における乳房炎診断³⁻⁵⁾があり、近年では、ジャイアントバンダ⁶⁾およびオランウータン⁷⁾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、近赤外分光法によるアクアフォトミクスを用いて、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ゲステロン（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⁸⁾。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ため、本研究では発情時期を含む一定期間、供試牛の体表面（乳房および静脈）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℃で30分間インキュベートを行った後に0℃、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、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8頭を供試牛とした。8頭の内、6頭はホルモン製剤によって発情同期された発情同期牛群（発情同期牛 a - f）とし、残りの2頭（コントロール牛 a - b）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。供試牛の体表面における測定部位は、乳房の側面6点、臀部4点の計10点とし、静脈については5点を設定した（Fig. 1）。各測定部位において、近赤外分光器Micro NIR（JDSU社）を用いて、3回連続照射によるスペクトル測定を行った（Fig. 2）。測定日数は8日間とし、1日目午後から8日目午前まで、午前と午後1回ずつのスペクトル測定を行った。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、血

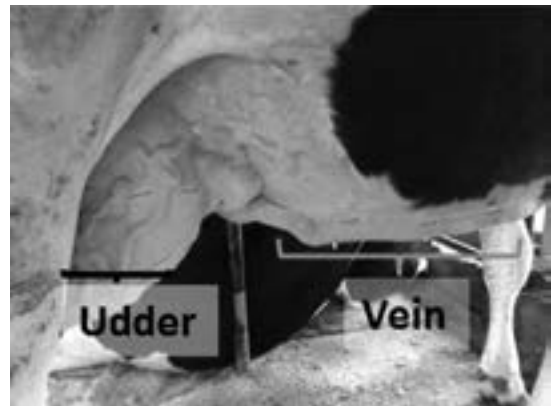


Fig. 1 Spectral measuring point (udder and vein)



Fig. 2 Micro NIR

中P₄濃度をKinoshitaら⁶⁾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) により測定した。スペクトル解析については、乳房および静脈のスペクトル測定日1～3日目 (発情前段階)、4～5日目 (発情)、6～8日目 (発情後段階) に分類し、SIMCA (Soft Independent Modeling of Class Analogy) 法により識別精度を算出した。また、発情段階にP₄濃度の高低期の分類を加え、発情前段階かつ高P₄濃度期1日目、2日目の乳房および静脈の平均スペクトルと発情かつ低P₄濃度期4日目、5日目の平均スペクトルを用いて、アクアグラムを作成し、発情同期牛とコントロール牛の識別の可能性を検討した。

本年度の研究成果として、「乳房」、「静脈」のスペクトル解析による結果を報告する。

3. 結果および考察

3.1 EIA法による血中P₄濃度測定

牛の性周期は約21日間であり、その中で卵巢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P₄期) と黄体が退行して低い値を保つ時期 (以下、低P₄期) があり、高P₄期と低P₄期の境界では、P₄濃度の急低下が観察される。発情は、血中P₄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P₄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P₄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P₄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、膣内留置型ホルモン製剤の除去前後でP₄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P₄

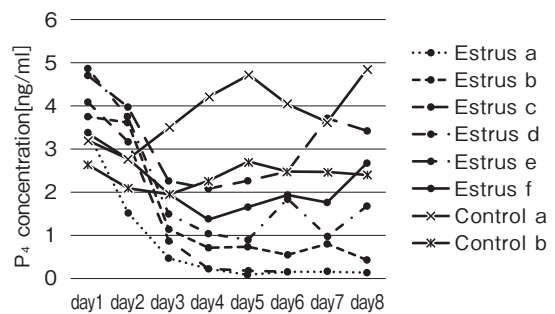


Fig. 3 Concentration of serum samples measured by EIA

濃度の操作は成功していたことが確認された (Fig. 3)。

3.2. 乳房および静脈におけるスペクトル解析

3.2.1. SIMCA法によるスペクトル解析

近赤外分光器Micro NIRにより3回連続で測定した乳房および静脈スペクトルに対して、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、発情同期牛6頭およびコントロール牛2頭に対して、測定日1日目のスペクトルから測定日2～7日目の各スペクトルの差を算出し、各牛群の平均スペクトルを差スペクトルとして算出し、SIMCA法により、識別精度 (式1) を算出した。また、スペクトル解析には、945～1645nmおよび1300～1600nmの水の第一倍音領域を解析波長とし、牛の組み合わせは、コントロール牛 a・b の2頭と発情同期牛2頭の組み合わせは、発情同期牛 a・b, c・d, e・f の3パターンを選定した。

識別精度 [%] =

$$\frac{\text{正しくクラス分けされたサンプル数}}{\text{全サンプル数}} \times 100 \quad (1)$$

SIMCA法による発情同期牛とコントロール牛の識別精度を検証した結果、乳房スペクトルにおいて1300～1600nmの波長領域では、発情前段階の1～3日目においては、80%以上の識別精度が

保たれていたが、発情（4～5日目）において識別精度の低下が確認された（Fig. 4）。これに対し、同波長領域における静脈スペクトルでは、発情前段階から90%以上の識別精度を有し、発情および発情後段階においても識別精度に顕著な低下が確認されなかった（Fig. 5）。この結果から、1300～1600nmの波長領域における静脈スペクト

ルが、牛の発情診断に有用であることが示された。

3.2.2. アクアグラムによる発情同期牛とコントロール牛の識別

本解析では、アクアフォトミクスを基とし、水構造システムと関係が深い12波長（1342, 1360, 1373, 1385, 1410, 1428, 1441, 1453, 1459, 1478, 1484, 1509nm）を選定し、アクアグラム

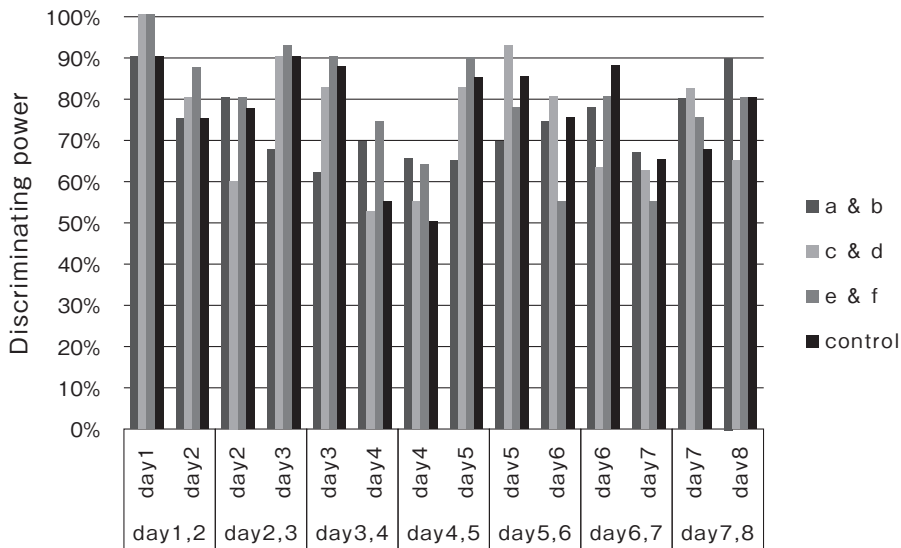


Fig. 4 Discriminating power of udder (1300-1600nm)

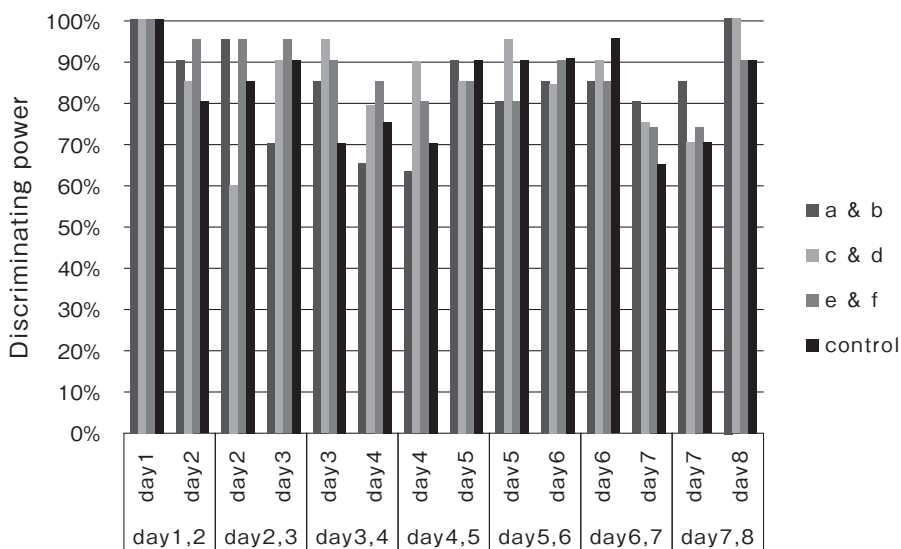


Fig. 5 Discriminating power of vein (1300-1600nm)

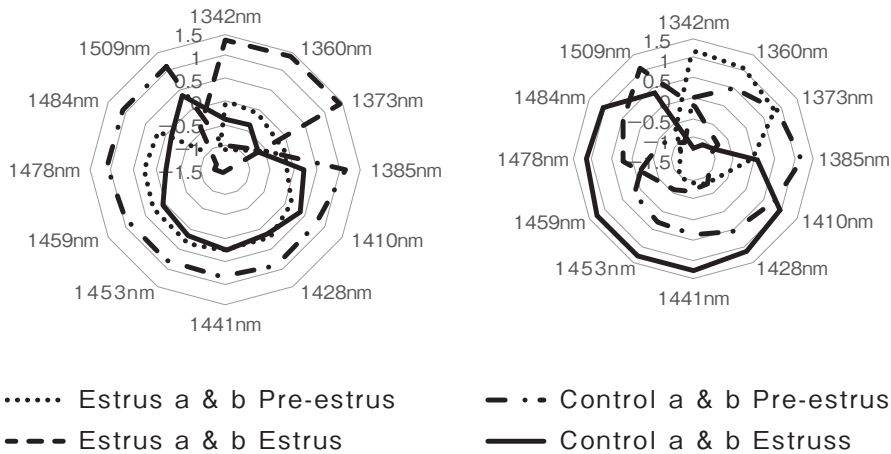


Fig. 6 Aquagrams of udder (left) and vein (right)

を作成した。アクアグラムとは、次式(2)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。これにより、発情同期牛とコントロール牛を視覚的に比較することが可能となる。

$$Aqg_{\lambda} = \frac{x_{\lambda} - \bar{x}_{\lambda}}{\sigma_{\lambda}} \quad (2)$$

Aqg_{λ} : 波長 λ のアクアグラム値

x_{λ} : サンプルの λ における吸光度

\bar{x}_{λ} : λ における全サンプルの吸光度の平均

σ_{λ} : λ における全サンプルの吸光度の標準偏差

アクアグラムにより、発情前段階と発情期における発情同期牛とコントロール牛の識別を行った結果、静脈スペクトルを用いたアクアグラムにおいては、発情同期牛、コントロール牛において高波長領域でアクアグラム値の上昇が観察された。また、同アクアグラムにおいて発情同期牛とコントロール牛を比較した場合、1342nm, 1509nmでは発情同期牛が、1385, 1410, 1428, 1441, 1453, 1459nmではコントロール牛のアクアグラム値が特徴的に現れている。全体としてコントロール牛も発情同期牛も発情前段階と発情を比較

した際、低波長側から高波長側にアクアグラムが移動していていることより、日を追うに従って水素結合の数が増えていった可能性が考えられる。

乳房スペクトルを用いたアクアグラムにおいては、発情期のアクアグラム値に注目して発情同期牛とコントロール牛とを比較した際、発情同期牛は1342, 1360, 1373nmで発情同期牛とコントロール牛に大きな差が確認された(Fig. 6)。

以上の結果から発情同期牛とコントロール牛の間にアクアグラム値の差が見られたことから近赤外分光法およびアクアフォトミクスを用いて牛の発情診断ができる可能性が示唆された。

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。本研究では牛の体表面(乳房および静脈)の近赤外スペクトルから、SIMCA法、アクアグラムにより、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法によって、ホルモン製剤によって発情を同期した6頭およびコントロール牛2頭の P_4 濃度の変化を測定し、高 P_4 期と低 P_4 期を把握し、発情前後および発情期を分類したうえで乳房および静脈の近赤外スペクトルを解析した結果、発情同期牛とコントロール牛の識別の可能であることが分かり、近赤外分光法およびアクアフォトミクスを用いて牛の発情診断ができる可能性が示唆された。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, 37, 57, 酪農総合研究所, 札幌市, 2000.

種雄牛の受胎性評価に資する精子メチル化可変部位の 解明

Identification of differentially methylated sites in sperm DNA and their contribution to the evaluation of bull fertility

武田 久美子・小林 栄治

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)

Kumiko Takeda and Eiji Kobayashi

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

The aim of this study was to detect differentially methylated CpG sites on sperm DNA and their contribution to bull fertility. It is known that the methylation profile of sperm DNA is different in each individual bull. However, the relationship between bull fertility and the methylation status is not elucidated. In this study, genome-wide methylated DNA modifications of bull spermatozoa were analyzed using a human DNA methylation microarray. Frozen semen were obtained from a bull at different ages and two other bulls with different IVF results, and used for analysis. Approximately 50,000 CpG sites were expected to be useful for analyzing the bovine genome. Differentially methylated profiles were found among the samples. The differentially methylated CpG sites were selected among samples with different ages, the bovine sequences were determined and the methylation levels were verified by combined bisulfate restriction analysis (COBRA). One CpG site could reflect age-related change of methylation levels. Differentially methylated CpG sites were found among the samples with different IVF results. Different methylation levels were also observed in some CpG sites by COBRA. In conclusion, we identified differentially methylated genes in sperm DNA which involved in bull fertility, using human microarray combined with COBRA. This method will be beneficial for the evaluation of breeding bulls in the future.

1. 目的

わが国における牛の交配はほぼ凍結精液を用いた人工授精で行われているが、人工授精による受胎率はここ15年間低下し続けている（家畜改良事業団資料より）。人工授精における受胎率低下には雌雄双方の要因が関与しており、雄側からの要因解明の取り組みも必要である¹⁾。優秀な遺伝形質を持つと期待され選ばれた種雄牛候補の一部

には、精液性状が正常であるにもかかわらず人工授精に使用してみると受胎性の著しく低い精液が存在している。これら低受胎を示す精液は、精子活力や生存率、精子濃度など精液性状に基づく検査では発見することは困難であるため、ある程度の規模で人工授精が行われた後に低い受胎率が発覚した時には大きな経済的損失が発生することとなる。近年、遺伝的要因以外であるエピジェネティクス異常が男性不妊の要因のひとつとして注

目されている。ヒトでは男性不妊患者における精子のインプリント遺伝子のメチル化異常²⁾や、老化に伴って精子のメチル化が変化することが報告されている³⁾。エピジェネティクスの要因のひとつであるDNAメチル化修飾は、組織ごとに特異的なDNAメチル化プロファイルをもち、形質発現に重要な影響を及ぼしている。DNAメチル化の動態は生殖系列細胞において大きく変化しており⁴⁾、精子形成過程においてDNAメチル化修飾に異常が発生しうる。生殖系列細胞のDNAメチル化はすでに胎子期の環境に影響を受けることが知られており、種雄牛によって精子核DNAの全体的なメチル化状態やメチル化パターンに個体差があることが知られている^{5,6)}。しかし、現在まで牛では遺伝子情報を伴ったメチル化プロファイルはほとんど解明されていない。個々の遺伝子をターゲットとした、Combined Bisulfate Restriction Analysis (COBRA) 法やバイサルファイトシーケンス法によるメチル化可変部位のスクリーニングには限界がある。我々は現在まで低受胎とされる牛凍結精液について個々の遺伝子のメチル化可変部位についてスクリーニングを行ったが、メチル化異常は検出できなかった⁷⁾。そこで、飛躍的に効率良くかつ低コストでDNAメチル化プロファイルの評価および目的遺伝子の探索をする方法として、ヒトDNAメチル化解析用アレイチップを利用するのが有効ではないかと考えた。ヒトでは高密度なDNAメチル化解析用チップの開発により、48万箇所のCpGサイトのメチル化の状態を解析することが可能となっており⁸⁾、精子の解析においても不妊に関連するメチル化状態の可変部位が明らかにされている⁹⁾。そこで我々は、牛ゲノムDNAについてヒト用DNAメチル化解析用チップによる解析を評価したところ、約5万箇所のメチル化サイトが利用可能との結果を得た¹⁰⁾。メチル化異常を指標とした新たな評価を加えるこ

とで、人工授精に用いる受胎性の低い凍結精液を前もって排除できれば経済的な効果は非常に高い。そこで本研究では、牛凍結精液の受胎性評価に資するため、ヒト用メチル化解析用チップを用いて種雄牛の受胎性に影響しうる精子メチル化可変部位を特定することを目的とした。

2. 方法

2.1 牛凍結精液およびDNA抽出

本研究で使用した牛凍結精液は、農研機構畜産草地研究所で飼養している雄牛より採取した。精液の凍結は希釈液 (20%卵黄, 0.13M Tris, 0.05 Mクエン酸, 0.04Mラクトース, 0.04Mラフィノース, 0.5mg/mlゲンタマイシン, 600IU/mlペニシリンGカリウム) で1次希釈し、一晚冷蔵後、7%グリセロールによる2次希釈後、0.5mlストローに封入、液体窒素上のラックに並べた後、液体窒素中に浸漬し凍結した。

比較1. 精液性状、体外受精後の胚発生率に差があることが判明している雄牛から採取した精液 (黒毛和種雄牛2頭, A, B) を用いた (Table 1)。

比較2. 同一個体でありながら精液性状の異なる精液の解析として、ホルスタイン種雄牛の性成熟期 (H1, 44週齢, H2, 46週齢) から繁殖供用期 (H3, 67週齢, H4, 111週齢) に採取した凍結精液を用いた (Table 2)。

凍結精液は38℃の温湯に15秒浸すことにより融解した。融解した精液はD-PBS (-) にて2回洗浄した。1 mlの精子浮遊液を1.5ml遠心チューブに移し、2,300 gで精子を沈殿させた。精子ペレットよりDNA抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, キアゲン社) を用いてDNAを精製した。DTTを添加することで懸濁液は完全に溶解

Table 1 Results of sperm parameters of the frozen semen from two bulls (A, B).

Bull	Age (years)	Motility (%)	Concentration (/ml)	IVF blastocyst (%)
A	13	73 ^a	1.2X10 ⁹	22.8 ^a
B	6	45 ^b	1.0X10 ⁹	8.9 ^b

^{a, b} Different superscript indicate significant difference within the column ($P < 0.05$).

Table 2 Results of sperm parameters for single ejaculates of the frozen bull semen collected at different ages (H1-4).

Semen	Age (weeks)	Motility (%)	Concentration (/ml)	IVF blastocyst (%)
H1	44	3	1.1X10 ⁸	0.0
H2	46	5	2.4X10 ⁸	0.0
H3	67	80	5.2X10 ⁸	29.5
H4	111	70	2.7X10 ⁸	42.9

した。精製したDNAはヒト用メチル化解析用チップ (Human Methylation450 Bead Chip, イルミナ社) による解析を依頼した。解析結果については、信頼性の指標であるP-val値および総蛍光強度により有効と判断したCpGサイトについて試料間の比較解析を行い、メチル化可変部位を抽出しリストアップした¹⁰⁾。

2.2 牛精子のメチル化可変部位の特定と検証

2.1でリストアップしたメチル化可変部位についてヒトプローブの牛ゲノム配列に対するBLAST検索によりヒト-牛間の塩基配列の相同性を確認し、遺伝子名およびCpG部位の位置を特定した。次に抽出した牛の塩基配列からターゲットCpG部位に制限酵素認識部位を持つ配列を選択し、同CpG部位を含む領域をターゲットとしたプライマーをMethPrimer¹¹⁾ ソフトにより設計した。2.1で精製したDNAは、COBRA法に供するため、キット (Methyl Easy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification Kit, Human Genetic Signatures社) を用いてバイサルファイト処理を

行った。バイサルファイト処理したDNAを鋳型にバイサルファイト処理DNA断片をPCR増幅し、CpG部位をターゲットとする制限酵素処理を行った。DNA断片を3%アガロースゲルによって電気泳動を行い、切断の程度によってメチル化可変部位が検出できるかどうかの確認を行った。

3. 結果と考察

3.1 牛精子の網羅的なメチル化状態の解明と可変部位の検出

網羅的なメチル化パターンを比較するため、各CpG部位のメチル化度をヒートマップで示したところ、精子は他の臓器と明らかにメチル化状態が異なっており、また性成熟期のH1-2と繁殖共用期と同等の精液性状を示したH3-4の精子との間にメチル化状態の差異が検出された (Fig. 1)。

3.2 牛精子のメチル化可変部位の特定と検証

性成熟期 (H1-2) と繁殖共用期 (H3-4) との間でメチル化度の異なるCpG部位を107個抽出し、牛のゲノム配列とのホモロジー検索の結果36領域がヒットした。その中で制限酵素部位のあるCpG部位は12箇所であった。COBRA法による差異検出を試みたところ、1箇所のCpG部位でメチル化度の違いが検出できた (Fig. 2 a)。さらに、IVF胚発生率の良好なH4、Aと低いBとの間で抽出したCpG部位についても同様にCOBRA法によってメチル化度の違いが検出可能であった (Fig. 2 b)。しかし、同じくIVF胚発生率の異なるH1-2とH3-4の間でメチル化度の違いは反映されず、個体間で検出したCpG部位のメチル化度の差は、発育に伴って変化したものではなく、個体差であると示唆された。

ヒト用DNAメチル化解析用チップのメチル化度の結果とCOBRA法による電気泳動像を比較した結果、これらのCpG部位においては牛凍結精液間のメチル化状態の違いをおおむね反映している

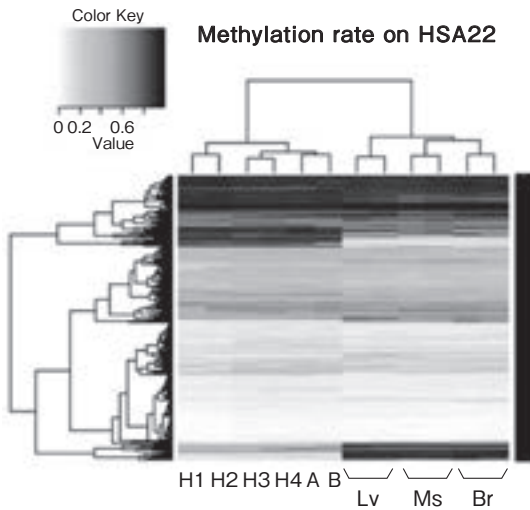


Fig. 1 Cluster heat map for methylation profiles of all CpG sites with detection p -value=0 on human chromosome 22 ($n=757$). Sperm DNA (H1-4, A, and B) showed different methylation profiles compared with other organs, such as, liver (Lv), muscle (Ms), and brain (Br). Black indicates hypermethylated, whereas white indicates hypomethylated.

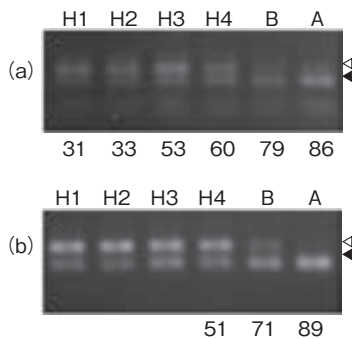


Fig. 2 Methylation level differences analyzed by COBRA. Target CpG sites were selected from the results of human methylation beadchip array. The methylation level analyzed by array is indicated below each lane.

ことが確認できた。

以上の結果から、ヒト用DNAメチル化解析チップを利用することで、牛精子DNAメチル化可変部位の検出が可能となった。今後は、バイサルファイトシーケンスによってこれらターゲット

CpG部位およびCpG部位を含む領域としてのメチル化度の差異を明らかにし、メチル化可変領域であるかどうかを確認する必要がある。また、実際に人工授精後の受胎率の明らかな凍結精液に適用し、凍結精液の受胎性評価の指標に資するか否かの検討を進める必要がある。

4. 要 約

本研究の目的は、種雄牛の受胎性に影響する精子核DNAメチル化可変部位を特定し、凍結精液の評価に資することである。種雄牛によって精子核DNAのメチル化状態に個体差のあることが知られている。本研究では、ヒト用DNAメチル化解析チップを利用することで、より安価に簡便な方法で牛精子DNAメチル化可変部位を特定する。同一個体で性成熟期から繁殖共用期の精液性状が大きく変化する時期に採取した凍結精液間、体外受精後の胚発生率の異なる凍結精液間のメチル化度の違いを検討した。その結果、雄牛ごと、また採取時期の異なる同一個体においてもメチル化状態の差異が検出可能なことを明らかにした。ヒト用DNAメチル化解析用チップの解析結果より抽出したメチル化可変部位について、COBRA法によるメチル化状態の差異検出を試みたところ、発育に伴って変化するCpG部位のうち1箇所COBRA法によるメチル化度の違いが検出可能であった。同領域は雄牛ごとにメチル化度が異なっており、個体間においてもメチル化可変部位であることが明らかとなった。また、IVF発生率の異なる雄牛から採取した凍結精液間でメチル化度に差異のあるCpG部位についても同様にCOBRA法によってメチル化度の差異が検出できた。今後、メチル化度の差異を指標とした凍結精液の受胎性評価へ資すると期待される。

文 献

- 1) 渡辺伸也, 武田久美子: 種雄牛が有する繁殖能力の把握に向けて: 精子の受精能力を多面的に評価するための新しい視点, 日本胚移植学雑誌, 60 (3), 135~140, 2014.
- 2) Sato, A., Hiura, H., Okae, H., Miyauchi, N., Abe, Y., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., Arima, T.: Assessing loss of imprint methylation in sperm from subfertile men using novel methylation polymerase chain reaction Luminex analysis, *Fertil Steril*, 95, 129~134, 134 e121~124, 2011.
- 3) Jenkins, T. G., Aston, K. I., Pflueger, C., Cairns, B. R., Carrell, D. T.: Age-associated sperm DNA methylation alterations: possible implications in offspring disease susceptibility, *PLoS Genet*, 10, e1004458, 2014.
- 4) 白根健次郎, 佐々木裕之: 生殖系列におけるエピゲノムサイクルとその制御, 実験医学, 32 (6), 847~852, 2014.
- 5) 岸本学, 甲田俊夫, 加藤博巳, 三谷匡, 松本和也, 佐伯和弘, 細井美彦, 入谷明: ウシ精子頭部DNAの全体的なメチル化状態の検討方法の開発, *Memoirs of Institute of Advanced Technology, Kinki University*, 12, 43~50, 2007.
- 6) Carvalho, J. O., Michalczewski-Lacerda, V. A., Sartori, R., Rodrigues, F. C., Bravim, O., Franco, M. M., Dode, M. A.: The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting, *Mol Reprod Dev*, 79, 77~84, 2012.
- 7) 金田正弘: エピジェネティクスと牛精子DNAのメチル化: 獲得形質の遺伝は存在するか?, *Japanese Journal of Embryo Transfer*, 36 (3), 141~148, 2014.
- 8) Sandoval, J., Heyn, H., Moran, S., Serra-Musach, J., Pujana, M. A., Bibikova, M., Esteller, M.: Validation of a DNA methylation microarray for 450,000 CpG sites in the human genome, *Epigenetics*, 6, 692~702, 2011.
- 9) Krausz, C., Sandoval, J., Sayols, S., Chianese, C., Giachini, C., Heyn, H., Esteller, M.: Novel insights into DNA methylation features in spermatozoa: stability and peculiarities, *PLoS One*, 7, e44479, 2012.
- 10) Kobayashi, E., Takeda, K.: A data driven approach to utilizing Human Methylation arrays in genome-wide study for bovine DNA methylation, *J. Anim. Genet.*, in printing.
- 11) Li, L. C., Dahiya, R.: MethPrimer: designing primers for methylation PCRs, *Bioinformatics*, 18, 1427~1431, 2002.

肥育前の和牛雌子牛の摘出卵巣からの胚生産に関する研究

Studies of *in vitro* embryo production using growing oocytes collected from the ovaries removed from Japanese beef 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研究部門)

Satoko Matoba, Yuji Hirao and Kumiko Takeda
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

The production of embryos using growing oocytes collected from the ovaries of calves just before fattening (approximately 9.5-month-old) is beneficial for the rescue of genetic resources. Although last year we established embryo production by *in vitro* maturation, fertilization and culture (IVM-IVF-IVC) using both fully grown immature (IM, 120 μm in diameter) and *in vitro* grown (IVG) oocytes collected at the growing stage (100 μm in diameter) obtained from the same ovaries, percentage of embryo production were not stable. Oocyte developmental competence might be influenced by puberty. The aim of this study was to investigate the correlation between the developmental potential of both IM and IVG oocytes and the presence or absence of the corpus luteum (CL+ or CL-), an indicator of puberty. IM oocytes were subjected to IVM-IVF-IVC. IVG oocytes were subjected to IVM-IVF-IVC after IVG culture for 14 days. In both groups, each presumptive zygote was cultured in an individual isolated microwell in culture dishes. Embryo production in *in vitro* was observed in both types of oocytes either with CL+ or CL-. In IM oocytes, higher blastocyst formation rates were derived with CL+ than with CL-. Mitochondrial DNA copy numbers were similar between IM and IVG oocytes irrespective of the presence/ absence of CL and the maturity of the donor (calf vs. cow). In both the IM and IVG groups, conception was achieved after the transfer resultant embryos into the recipient cows. In conclusion, we demonstrated the possibility of embryo production after IVM-IVF using both fully grown and growing stage oocytes collected from the same ovary from calves either presence or absence of CL before fattening. Although puberty can affect the developmental competence of IM oocytes, it may not strongly affect it in IVG oocytes. Further study is required to confirm the production of calves following embryo transfer to the recipient cows.

1. 目 的

黒毛和種雌牛の肥育において、子牛の段階で肥育前に去勢（卵巣を摘出）され、廃棄されている

卵巣を利用できれば、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く¹⁾、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²⁾。我々は、少数の卵子においても、体外発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³⁾。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に、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 μm)と合わせて雌子牛1頭から数多くの卵子を活用できる。我々は、成牛から採取した直径約100 μm 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⁴⁾、発育途上の卵母細胞由来の子牛生産を可能としている⁵⁾。

昨年度の本助成では、肥育前雌子牛の卵巣から通常サイズの卵子だけでなく、発育途上の中型卵母細胞も14日間の体外発育培養ののち、体外成熟・受精・発生培養により卵子の一部は胚盤胞期胚への発生が可能であることを明らかとした。卵子に数多く含まれているミトコンドリアDNA(mtDNA)により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⁶⁾と考えられ、新培養液を用いて体外発育培養した発育途上の卵母細胞が、体内発育卵子と同等となることも見出した。しかし、発育途上卵母細胞だけでなく、通常サイズの卵子においても胚の発生率が安定していなかった。その理由として、卵巣摘出した肥育前雌子牛が性成熟前か後かによって、採取卵子の発生能が異なるのではないかと推察され、その検討が課題として残った。さらに、生産胚が受胎牛へ移植可能な品質であり、移

植後に受胎性を有するかの検証も必要であると考えられた。

そこで、本研究では、肥育前雌子牛を性成熟前か後かに分けて、通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞を採取して胚生産を検討した。また、性成熟前および後から採取した卵子および体外発育卵子について、体外成熟後にmtDNAコピー数を計測し、体内で発育した成雌牛の卵子と同等であるか否かを検証した。さらに、生産胚のうち移植可能な品質の胚を受胎牛へ移植して、その受胎性についても検証した。

2. 方法

2.1 黄体の存在別の若齢雌子牛由来卵子、卵母細胞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肥育前若齢雌子牛(平均9.5か月齢)を性成熟前後の時期別に分け、それらの摘出卵巣から採取した卵子の発生能を検討した。性成熟に達したかどうかの判断基準には卵巣に黄体が存在するかどうかを指標となるため、黄体の有無別に各個体の卵巣を分類して現地から実験室まで約5時間輸送後、直径2~6mmの卵胞から吸引採取した直径約120 μm の未成熟卵子(通常サイズの卵子)を採取し、体外成熟培養を輸送後から約1時間後に開始した。体外成熟、体外受精および体外発生培養は、既報⁷⁾に従って実施した。発生培養には、個別識別培養皿⁸⁾を用い、卵巣に存在する黄体の有無別に、卵子の発生能の検証と胚の生産性について、媒精後48時間の初期卵割および7~9日目の胚盤胞期胚への発生成績により検討した(IM oocytes, CL+; 黄体あり, n=132, IM oocytes, CL-; 黄体なし, n=41)。

通常サイズの卵子採取終了後に、直径0.5~0.8mmの卵胞から発育途上卵母細胞(直径約100 μm)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⁴⁾に従った。すなわち、卵巣表面の皮質を薄く切り出し、得られた卵胞を切開して直径約100 μm の発育途上卵母細胞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た。培養液には平成26年度の本助成で開発した添加剤を、基本培養液に添加して用い、体外発育培養は、この培養液を入れたセルカルチャーインサート上で、38.5°C、5% CO_2 、5% O_2 および90% N_2 の加湿気相下で14日間行った。体外発育培養後の卵子の体外成熟は、200 μM アスコルビン酸2-グルコシド、1 mMピルビン酸ナトリウム、0.55 mMシステイン、100 ng/ml FSH、500 ng/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・発生培養は、通常サイズの卵子と同様とした。これらの発育途上の卵母細胞について、体外発育培養による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胚の生産性を、黄体の存在の有無別に検討した (IVG oocytes, CL+ ; 黄体あり, $n=29$, IVG oocytes, CL- ; 黄体なし, $n=32$)。

2.2 個体別の胚の生産性の検討

素性が明らかな後継牛を生産するためには、本研究で生産した胚の由来となる個体を明らかにする必要がある。そこで、一部の卵巣には個体別に発育途上卵母細胞を採取し、個体別の胚の生産性を検討した。

2.3 移植後の胚の受胎性の検討

生産した胚盤胞期胚の一部は、体外受精日と同日の発情が確認された受胎牛の黄体側卵巣の子宮角に移植し、通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞から生産された胚の受胎性を検証した。

2.4 生産された卵子・胚の正常性の検証

卵巣摘出子牛の黄体の存在別に採取された卵子

および体外発育した卵母細胞について、分子レベルの正常性を比較検証した。卵巣の黄体の有無別に採取した通常サイズの卵子から体外成熟培養した一部の卵子 (IM oocytes, CL+ ; 黄体あり, $n=3$, IM oocytes, CL- ; 黄体なし, $n=3$) から卵丘細胞を除去後、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。卵子1個あたりのmtDNAのコピー数の計測は、Cytochrome c oxidase I (COXI) 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⁶⁾に従って行った。対照区には、黒毛和種成雌牛2頭から採取した生体卵子吸引によって採取した卵子 (OPU) を用いた ($n=4$)。直径約100 μm の卵母細胞を2週間体外培養し、これらから発育した成熟卵子 (IVG oocytes) の一部 ($n=3$) より、通常サイズの卵子の場合と同様にDNAを抽出し、卵子1個あたりのmtDNAコピー数の計測を行った。対照区には、食肉処理場から採取した成牛卵巣由来体外成熟卵子 (IVM oocytes) を用いた ($n=4$)。

3. 結果と考察

黄体の存在した個体は平均9.8か月齢、存在しなかった個体は平均8.8か月齢であった。

通常サイズの卵子において、黄体あり、黄体なしの両区の初期卵割率に有意な差はなく、一般的な発生率であった (Fig. 1 A)。黄体あり区は成牛と同等の一般的な胚盤胞期胚発生率であったが、黄体なし区は黄体あり区に比べて低かった ($P<0.05$)。黄体なし区の卵子数や胚盤胞期胚への発生率は、黄体あり区に比較して実験回次によりバラツキが大きかった。Mullaartら²⁾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%、1頭あたりの生産胚数が1回あたり平均

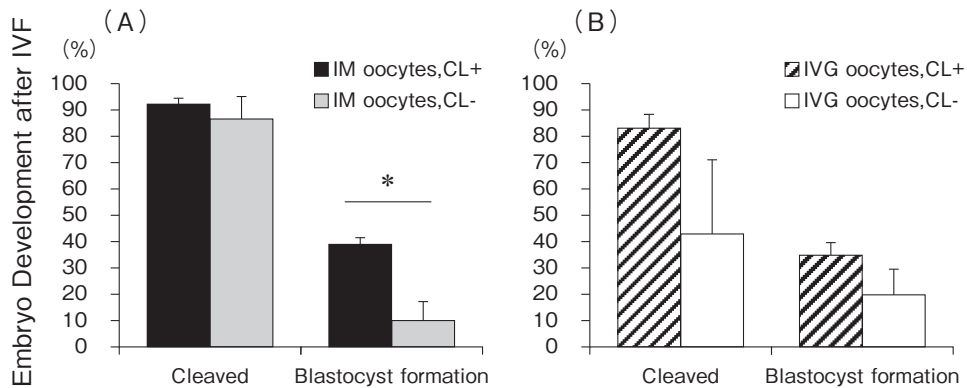


Fig. 1 The effect of the presence or absence of the corpus luteum on development of bovine calf embryos *in vitro*. *In vitro* fertilized embryos were derived from fully grown immature oocytes of approximately 120 μm in diameter (IM oocytes) after aspiration (A) or from growing stage oocytes (approximately 100 μm in diameter at the time of collection) after *in vitro* growth culture and *in vitro* maturation (IM oocytes) isolated from the same ovary from calves with (CL+) or without corpus luteum (CL-), respectively (B). Note that Day 0=*in vitro* fertilization (IVF), Day 2=cleaved and Day 7-9=blastocyst formation. *: Significant difference ($P < 0.05$, *t*-test).

約1個であることを示している。本研究において、性成熟前の個体はMullaartらの報告²⁾と同等であったが、性成熟後の個体は胚の発生率および1頭あたりの生産胚数が1回あたり平均約2個であり、大幅に向上することが明らかとなった。これらのことから、直径約120 μm 卵子は、性成熟に達することにより、性成熟前に比べ、正常な発育が安定的に促されて卵子の発生能が向上する可能性が示された。

発育途上卵母細胞において、黄体あり、黄体なしの両区の初期卵割率および胚盤胞期胚発生率に有意差は認められなかった (Fig. 1 B)。それぞれの区の1頭あたりの生産胚数は1回あたり平均0.5個および1.7個であったが、有意差は認められなかった。これらのことから、発育途上卵母細胞は、通常サイズまで発育した卵子が受けた性成熟による影響を受ける前の時期に採取されたと考えられる。黄体なし区の成績は、実験回次により、成績が大きくばらついたが、実験回数が十分ではなく、その検証については課題が残った。

平均9.5か月齢の6頭のうち3頭は個体別の卵巣から、残りの3頭の卵巣からはまとめて直径約

100 μm の発育途上卵母細胞を採取した。両区とも体外発育培養が可能であり、初期卵割率および胚盤胞期胚への発生率は食肉処理場由来の成牛卵巣の卵胞から採取した卵子と同等であり、個体別の胚生産は可能であることが示された。しかし、操作には5時間の卵巣輸送後に追加して通常卵子の採取後の開始となること、個体別の操作には長時間を有することから、一度に多頭数の処理を行う場合の卵子の生存性の低下に対する検討が必要であると考えられる。

通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞から生産された胚盤胞期胚の一部を卵巣摘出農場に新鮮な状態で5時間輸送したのち、受胎牛へ移植し、それぞれ2頭、計4頭の受胎が得られた。このことから、肥育前子牛から生産された胚は、成牛から生産された胚と同様に受胎性に問題のないことが示唆された。今後は、受胎胚からの子牛への生産性の検証や卵子の由来となる卵巣摘出子牛を特定するための親子鑑定による検証が必要であると考えられる。

黄体の存在の有無別に分けた若齢雌牛卵巣由来卵子 (IM oocytes, CL+ ; 黄体あり, IM oocytes,

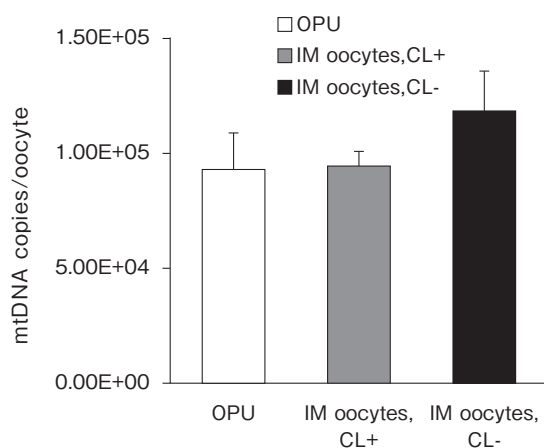


Fig. 2 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in *in vitro* matured oocyte analyzed by *COXI* gene. The experimental groups were derived from fully grown immature oocytes of approximately 120 μm in diameter after aspiration of calf ovaries with or without corpus luteum (IM oocytes either CL+ or CL-), respectively. The OPU group represents *in vitro* matured oocytes from cow ovaries obtained from transvaginal ovum pick-up. No significant difference was found among groups ($P > 0.05$, *t*-test).

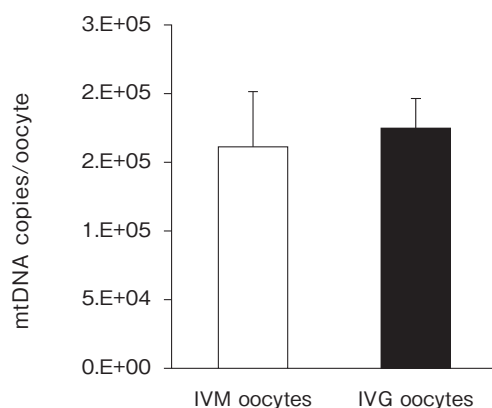


Fig. 3 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy number in growing stage oocyte (approximately 100 μm in diameter at the time of collection) after *in vitro* growth culture and *in vitro* maturation (IVG oocytes) analyzed by *COXI* gene. The IVM group represents *in vitro* matured oocytes collected from cow ovaries obtained from a local abattoir (IVM oocytes). No significant difference was found between the groups ($P > 0.05$, *t*-test).

CL-：黄体なし)間でmtDNAコピー数に有意な差は認められず、またOPU卵子とも遜色なかった ($P > 0.05$, Fig. 2)。さらに、発育途上卵母細胞を体外発育培養後に体外成熟した卵子のmtDNAコピー数は通常の体外成熟卵子と遜色なかった ($P > 0.05$, Fig. 3)。これらの結果から、若齢雌子牛由来の通常サイズの卵子は、黄体の存在にかかわらず、成牛と同等の正常なmtDNAコピー数を有しており、発育途上の卵母細胞においても、食肉処理場由来の成牛と差のない正常なmtDNAコピー数の増幅が検証された。

4. 要 約

約9.5か月齢の肥育前若齢雌子牛は性成熟前後にかかわらず、通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞から胚生産が可能であるが、通常サイズの卵子は性成熟により、胚の発生能に影響を受け

る可能性が示唆された。一方、発育途上卵母細胞はその影響を強く受けていない可能性が示唆された。mtDNAコピー数は、性成熟の影響なく、通常サイズの卵子、体外発育培養を経た発育途上の卵母細胞ともに成牛と差が認められず正常であった。生産胚の一部を受胎牛に移植し、受胎例が得られた。今後は、これらの生産胚の子牛への生産性の検証および親子鑑定の検討を実施する必要があると考えられる。

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.

牛白血病ウイルス高感染牛の予後の評価

Prognosis evaluation of high-viral-load BLV-infected cattle

目 堅 博 久

(宮崎大学テニュアトラック推進機構)

Hirohisa Mekata

(Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki)

Bovine leukemia virus (BLV) infection is widespread in the Japanese livestock industry. A part of BLV infection progress to fatal lymphosarcoma, named enzootic bovine leukosis (EBL). One third of BLV-infected cattle with high proviral load cause abnormal immune function. Therefore, the preventive measure against EBL and BLV-related disorder are required. The purpose of this study was to clarify the accident risk of BLV-infected cattle and to establish a proviral load criteria of high risk cattle identification. It would help farmers or veterinarians to decide which cattle should be slaughtered as priority and reduce the incidence of EBL or economical loss by BLV infection. To clarify the relationship between BLV proviral load and prognosis of infected cattle, quantitative polymerase chain reaction method and online traceability system were used. We classified BLV-infected cattle into “Breeding”, “Slaughter” and “Accidental death”, and investigated a correlation between each proviral load and prognosis of classified cattle. The mean proviral load for “Accidental death” was 1109.1 copies/10 ng which was significantly higher than that for both “Breeding” and “Slaughtered”. The occurrence of accidental death increased depending on BLV proviral load. We established the criteria of high risk and extremely high risk at 735.2 and 1009 copies/10 ng which specificity and sensitivity were 90 and 53.8% and 95 and 38.4%, respectively. The diagnostic outcomes of accidental death with high proviral load were not only EBL but also other diseases such as gastroenteritis and mastitis. This might be attributed to immune dysfunction caused by BLV infection, constituting a large part of BLV-related losses. Therefore, early slaughter of high risk animals based on the criteria would effectively reduce loss by BLV infection in a farm.

1. 目 的

牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus : 以下, BLV) はレトロウイルス科デルタレトロウイルス属に分類され, 届出伝染病である地方病性牛白血病 (以下, 牛白血病) の原因ウイルスであ

る¹⁾。BLVは北米, 南米, アジアなど世界各国で流行が確認されている²⁻⁸⁾。いっぽう, 西ヨーロッパ諸国やオセアニア地域では感染牛の摘発淘汰によって国もしくは地域単位でのBLV清浄化が達成されている^{9, 10)}。日本では全国規模の調査によって, 抗体陽性率が約35%であることや牛白血

病届出数の増加傾向が報告されているが^{11~13)}、農場や地域単位での自主的な対策の実施にとどまっているのが現状である。

多くのBLV感染牛は臨床症状をまったく示さない無症候性キャリアである。約3割の感染牛は外見上は臨床症状を伴わないものの、恒常的なリンパ球数の増加を主徴とする持続性リンパ球増多症となる^{14, 15)}。約1-5%の感染牛は感染から数年後に牛白血病を発症する。牛白血病は致死的であるうえに、と畜場法によって由来産物の食品への利用が禁止されている。そのため、牛白血病の発症は農家および畜産業に多大な損害をもたらす。また、BLV感染症による損失は牛白血病の発症だけに限らない。これまで、未発症BLV感染牛では経済的な損失はないと考えられてきたが、近年になって複数の報告により持続性リンパ球増多症や感染ウイルス量の多い牛で免疫細胞の疲弊化や機能低下が明らかになってきた^{16~20)}。BLV感染症は1度の感染が生涯持続するうえに、牛白血病発症やBLV感染を防ぐワクチンはない。そのため、畜産現場ではBLVへの感染と牛白血病の発症に対する実用的な対策法が求められている。

BLV感染症による損失を最小限に抑えるためには、感染牛の事故リスクを把握し、高リスク牛の更新順序を早めることが有効である。本研究の目的は、高リスクBLV感染牛を決定する判断基準を確立し、農場における牛白血病を含めたBLV感染症による損失を未然に防ぐことである。同じデルタレトロウイルス属であるヒトの成人T細胞白血病ウイルス (human T-cell lymphotropic virus type 1: 以下、HTLV-1) 感染症では、高プロウイルス量が成人T細胞白血病発症のバイオマーカーであることが知られている^{21~23)}。本研究では、BLV感染ウイルス量と感染牛の予後との相関から更新の判断基準を確立する。

2. 方 法

2.1 農場におけるBLV感染ウイルス量の変動

1 農場計30頭の牛を18ヶ月間調査した。第2, 3回目の測定は初回の測定から6, 18ヶ月後に行い、0ヶ月測定時との相対比で感染ウイルス量の変動を表した。

2.2 BLV感染牛のスクリーニングと感染ウイルス量の測定

2013年6月から2015年5月までにBLV感染症診断のために宮崎大学産業動物防疫りサーチセンターに提出された血液検体を用いた。すべての血液検体は遠心後 (1,500 g, 5分) に血漿分離を行い、製品の指示書に従ってenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法によるBLV感染診断を行った (JNC社, 東京)。抗BLV抗体陽性であった計925検体からWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega社, Fitchburg, 米国) を用いて製品の指示書に従いゲノムDNAの抽出を行った。抽出したDNAの濃度および純度は分光光度計 (NanoDrop8000, Thermo Fisher Scientific社, Waltham, 米国) を用いて測定した。リアルタイムPCR法による感染ウイルス量の測定はLight Cycler 96 システム (Roche life science社, Mannheim, ドイツ) を使用した。遺伝子増幅反応は2x CycleavePCR Reaction Mix を5 μ l, Probe/Primer Mix for BLVを0.2 μ l (タカラバイオ社, 大津), 抽出したゲノムDNAを20ngに超純水を加えて全量10 μ lで行った。検量線は増幅対象遺伝子を組み込んだ既知濃度のプラスミドを10倍段階希釈して作成した。すべての反応は重複して行い、10ngゲノムDNA中のBLVコピー数で感染ウイルス量を表した。

2.3 BLV感染牛の状態

2015年12月~2016年1月, 牛の個体識別番号および個体識別情報検索サービス (<https://www.>

id.nlbc.go.jp/top.html) を用いて感染ウイルス量を測定した牛の状態を特定し、牛を“飼養中”，“と畜”，“死亡”に分類した。“飼養中”は検索時に農場で飼養中の牛を，“と畜”は検索時にすでにと畜された牛を，“死亡”は検索時にすでに農場で死亡した牛を意味する。個体識別情報検索サービスから使用する情報は最小限にとどめ、特に農家の個人情報については一切使用しなかった。

2.4 統計解析

一元配置分散分析法，Turkey法，Dunnett法および受信者動作 (ROC) 曲線はGraphPad Prismソフト (バージョン6.0) を用いて解析および作成した。 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

3. 結果と考察

感染実験においてBLV感染ウイルス量は急性期に増加後，減少し，慢性期では安定することが報告されている²⁴⁾。そこで本研究では，はじめに農場における感染ウイルス量の変動を確かめた。第1回目の測定から6ヶ月後，66.6% (20/30)の牛の感染ウイルス量の変動幅が2倍以内，83.3% (25/30)が4倍以内であった (Table 1)。第1回目の測定から18ヶ月後，43.3% (13/30)の牛の感染ウイルス量の変動幅が2倍以内，80.0% (24/30)が4倍以内であった。以上から，80%以上の牛の感染ウイルス量の変動幅がフィールドにおいて18ヶ月間経過しても4倍以内に収まることが明らかになった。また，4頭の感染ウイ

ルス量が4倍以上減少した。これは，最初の測定が急性期であったと想定される。このことから，感染ウイルス量の決定は半年から1年の間隔をあけた2度の測定が必要であることが示唆される。

次いで，感染ウイルス量と予後との相関を解析した。計925頭のBLV感染牛のうち，573頭は“飼養中”であり，305頭は“と畜”，26頭は“死亡”であった。また，21頭は個体識別番号が未登録で

Table 1 Kinetics of BLV proviral load during 18 months study

Proviral load kinetics	6 months	18 months
within 2-fold	66.6% (20/30)	43.3% (13/30)
2 to 4-fold	16.6% (5/30)	36.6% (11/30)
Decreased more than 4-fold	13.3% (4/30)	13.3% (4/30)
Increased more than 4-fold	3.3% (1/30)	6.6% (2/30)

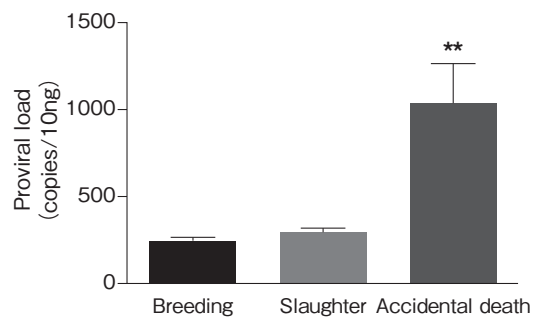


Fig. 1 Average proviral load of the group of breeding, slaughter, and accidental death.

Average proviral load of the group of breeding, slaughter, and accidental death were 247.4, 295.4, and 1109.1 copies/10ng. The error bars indicate standard error of the mean. Double asterisks indicate that p-value between breeding vs. accidental death and slaughter vs. accidental death were less than 0.01.

Table 2 Detail information about BLV-infected cattle

	Breeding	Slaughter	Accidental death
Number of cattle	573	305	26
Average proviral load (copies/10ng)	247.4	295.4	1109.1
Maximum proviral load (copies/10ng)	5774.0	1752.6	5122.2
Proportion of less than 4.0 copies/10ng (%)	33.8	11.8	11.5
Age (month)	78.8*	80.8	66.0
Age of BLV inspection (month)	62.0	71.8	61.0

*The age when confirmation of breeding using online traceability system

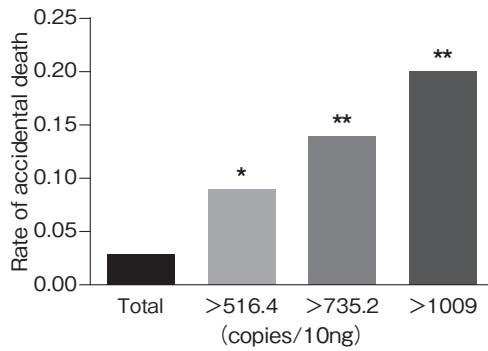


Fig. 2 The correlation between proviral load and rate of accidental death.

Accidental death rate of total, more than 516.4, 735.2, and 1009 copies/10ng were 2.8, 8.9, 13.9, and 20.0%. Single and double asterisks indicate that p-value between the group of total were less than 0.05 and 0.01.

あったために解析から除外した。“飼養中”，“と畜”，“死亡”の感染ウイルス量はそれぞれ247.4, 295.4, 1109.1copies/10ngであり，“死亡”ではそれ以外と比べて有意に高い値であった (Fig. 1, Table 2)。飼育中の牛の中には明らかに感染ウイルス量が多い個体が存在していた。今後，こういった牛がと畜まで順調に飼育を続けられるのか注視する必要がある。感染ウイルス量と死亡率との相関を解析したところ，感染ウイルス量の増加に伴い，死亡率の増加が認められた。更新する牛の選択に用いる基準値を作成するため，死亡群とそれ以外の群との間でROC曲線を作成した。特異度を80, 90, 95%に設定すると，感度はそれぞれ65.3, 53.8, 38.4%であり，基準値は516.4, 735.2, 1009copies/10ngとなった。また，それぞれの死亡率は8.9, 13.9, 20.0%であった (Fig.2)。

これは，高リスク群 (735.2copies/10ng) および超高リスク群 (1009copies/10ng) の優先的な更新によって，効率的に事故死を防ぐことができる可能性を示している。

死亡群のうち，診断名が明らかになった18頭の診断結果をTable 3に記載した。高ウイルス感染牛における死因は牛白血病が最も多かったが，胃腸炎や乳房炎など他の診断結果も含まれていた。この結果は，一部の牛白血病は他の疾病によって見逃されているか，考えられているより牛白血病が多様な病態を示す可能性を示している。

以前に報告された論文では食肉衛生検査所において，牛白血病の65.6%，BLV感染未発症牛の10.8%の末梢血中で感染ウイルス量が1000copies/10ngを超えていたことが報告されている²⁵⁾。この報告は，735.2もしくは1009copies/10ngが農場における高リスクの境界値であるという本研究の結果を支持するものである。発がんウイルスでは感染期間が重要な発症のリスク因子であることが分かっている^{21, 22, 26~29)}。HTLV-1やHIVなどのヒトの感染症では，感染者の行動の振り返りによって感染時期を特定することが可能である。しかし，BLV感染症では感染経路が多岐にわたること，感染牛による振り返りが不可能なことから，感染時期を特定することは難しい。

本研究では，735.2もしくは1009BLV copies/10ngがBLV感染症において，死亡リスクの基準となること，基準値以上の感染ウイルス量を持つ牛を優先的に更新することが，牛白血病とBLV

Table 3 Diagnosed disorder list of accidental death in this study

Proviral load	Risk classification	Diagnosed disorder (number)
>1009	Extremely high-risk	EBL (3), rumen impaction, gastroenteritis, mastitis (1)
735.2-1009	High-risk	EBL, gastroenteritis, heart failure (1)
516.4-735.2	Slightly high-risk	EBL, mastitis, gastroenteritis (1)
<516.4	Low-risk	EBL, acute inflammatory response, gastroenteritis, puerperal fever, heart failure (1)

関連疾患による損失を減らすことにつながることを明らかにした。著者らは感染ウイルス量の多い牛が農場における水平および垂直伝播の感染源となることをすでに報告している³⁰⁻³²⁾。そのため、感染ウイルス量の多い牛の優先的な更新が農場での事故および感染を防ぐことが分かった。

4. 要 約

日本では、近年、牛白血病ウイルスの感染が急速に拡大している。一部の感染牛は地方病性牛白血病と呼ばれる致死的なリンパ肉腫を発症する。約3分の1を占める高ウイルス感染牛は免疫機能の低下を伴うことが示唆されている。そのため、牛白血病の発症および牛白血病ウイルス感染対策の確立が求められている。本研究の目的は牛白血病ウイルス感染牛の事故リスクを明らかにし、高リスク群を判断する基準値を設けることである。これによって、農家や臨床獣医師がどの感染牛を優先的に淘汰更新すべきかの判断材料となり、牛白血病やBLV感染症による経済的損失の減少につながる。本研究では、感染ウイルス量とBLV感染牛の予後を明らかにするため、リアルタイムPCR法および個体識別番号による検索システムを利用した。感染ウイルス量を測定した牛を“飼養中”、“と畜”、“死亡”に分類し、感染ウイルス量との相関を解析した。“飼養中”、“と畜”、“死亡”の平均感染ウイルス量はそれぞれ247.4, 295.4, 1109.1copies/10ngであり、“死亡”はそれ以外と比較して有意に高い値であった。また、感染ウイルス量の増加に伴い、死亡率が増加するため、高リスク群を判断する基準値を設けた。735.2および1009copies/10ngに基準値を設けると、特異度はそれぞれ90%, 95%であり、感度は53.8%, 38.4%であった。感染ウイルス量の多い牛の死因を調べると、牛白血病だけでなく、乳房炎や胃腸炎も認められた。これは、牛白血病ウイルス感染

症による免疫機能の低下が無視できるものでないこと、BLV感染症による損失は牛白血病に限らない可能性を示唆している。著者らはこれまでに感染ウイルス量の多い牛が農場における感染源となることを報告している。それゆえ、本研究で定めた基準値を使った感染牛の早期更新が牛白血病ウイルス感染症に伴う損失と感染の効率的な制御につながると考える。

文 献

- 1) Barez, P. Y., *et al.* : *Viruses*, **7**, 6080~6088, 2015.
- 2) Trono, K. G., *et al.* : *Vet. Microbiol.*, **83**, 235~248, 2001.
- 3) Gutiérrez, G., *et al.* : *Vet. Microbiol.*, **151**, 255~263, 2011.
- 4) Erskine, R. J., *et al.* : *J. Dairy Sci.*, **95**, 727~734, 2012.
- 5) Bartlett, P. C., *et al.* : *J. Dairy Sci.*, **96**, 1591~1597, 2013.
- 6) Nekouei, O., *et al.* : *Prev. Vet. Med.*, **119**, 105~113, 2015.
- 7) Lee, E., *et al.* : *Virology*, **12**, 64, 2015.
- 8) Yang, Y., *et al.* : *J. Dairy Sci.*, *in press*.
- 9) Nuotio, L., *et al.* : *Prev. Vet. Med.*, **59**, 43~49, 2003.
- 10) Maresca, C., *et al.* : *Prev. Vet. Med.*, **119**, 222~226, 2015.
- 11) Murakami, K., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123~1126, 2013.
- 12) Murakami, K., *et al.* : *Vet. Microbiol.*, **148**, 84~88, 2011.
- 13) 農林水産省ホームページ、届出伝染病発生状況の累年比較、http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/pdf/h27_todokede_ruinen.pdf
- 14) Gillet, N., *et al.* : *Retrovirology*, **4**, 18, 2007.
- 15) Lairmore, M. D. : *Annu. Rev. Anim. Biosci.*, **2**, 189~208, 2014.
- 16) Ikebuchi, R., *et al.* : *Vet. Res.*, **42**, 103, 2011.
- 17) Libera Della, A. M., *et al.* : *Vet. Res.*, **46**, 2, 2015.
- 18) Frie, M. C., Coussens, P. M. : *Vet. Immunol. Immunopathol.* **163**, 1~12, 2014.
- 19) Okagawa, T., *et al.* : *Vet. Res.*, **43**, 45, 2012.
- 20) Suzuki, S., *et al.* : *Microbiol. Immunol.*, **57**, 600~604, 2013.
- 21) Iwanaga, M., *et al.* : *Blood*, **116**, 1211~1219, 2010.
- 22) Kira, J., *et al.* : *Ann. Neurol.*, **29**, 194~201, 1991.
- 23) Paiva, A., Casseb, J. : *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **47**, 265~274, 2014.
- 24) Gillet, N. A., *et al.* : *PLoS Pathog.*, **9**, e1003687, 2013.

-
- 25) Somura, Y., *et al.* : *Arch. Virol.*, **159**, 2693~2697, 2014.
- 26) Mellors, J. W., *et al.* : *Ann. Intern. Med.*, **126**, 946~954, 1997.
- 27) Rodriguez, B., *et al.* : *JAMA*, **296**, 1498~1506, 2006.
- 28) Ogg, G. S., *et al.* : *Science*, **279**, 2103~2106, 1998.
- 29) O'Brien, T. R., *et al.* : *JAMA*, **276**, 105~110, 1996.
- 30) Mekata, H., *et al.* : *Vet. Rec.*, **176**, 254~254, 2015.
- 31) Mekata, H., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **77**, 1115~1120, 2015.
- 32) 目堅博久：公益法人伊藤記念財団平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **33**, 179~183, 2015.

鶏糞由来バイオセラミックによるウイルスの伝播抑制

Inhibition of transmission of viruses using bioceramic derived from chicken feces

竹原 一 明

(東京農工大学大学院農学研究)

Kazuaki Takehara

(Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Bioceramic derived from chicken feces (BCX) is a material produced by sintering process, purposed for using in animal farms, in order to control livestock infectious diseases. BCX had been shown to have virucidal activities toward avian influenza virus (AIV) and avian adenovirus (AAV). It could also inactivate infectious bursal disease virus (IBDV) within 3 min and could inhibit transmission of IBDV to the sentinel chicks.

In the present study, BCX at pH 13 was evaluated for the durability of its virucidal activity in simulated field conditions. First it was shown that BCX had the activity toward Newcastle disease virus (NDV), IBDV and goose parvovirus (GPV) within 3 min, while toward AIV within 1 hr. BCX was further tested by keeping it under simulated harsh environmental conditions with sunlight for several weeks, as well as by soaking it with water and drying under sunlight repeatedly many times. After sampling every 2 consecutive weeks and 2 consecutive resuspensions, BCX was evaluated for its efficacy against AIV. Evaluation under the harsh conditions illustrated that BCX could retain its satisfactory efficacy toward AIV throughout 7 weeks or 9 resuspensions. It is hence concluded that BCX is an excellent material for applying in livestock farming as trapping disinfectant due to its efficacy to inactivate various viruses, and that this efficacy prolongs under harsh environmental conditions.

Further, BCX was applied to bedding materials for chicks to completely inhibit transmission of IBDV, however, it could not completely inhibit transmission of IBDV to the cage mates. When bedding materials contaminated with IBDV in feces, long exposure period (6 hr) after mix with BCX and the bedding materials was required for inactivation of IBDV.

1. 目 的

サルモネラや病原性大腸菌O157等による食中毒の発生、口蹄疫 (FMD)・高病原性鳥インフルエンザ (HPAI)、豚流行性下痢 (PED) 等による家畜感染症の発生など、食の安全性確保と感染

症の防除が重要となってきた。また、環太平洋戦略的経済連携協定 (TPP) や欧州農業生産工程管理 (Global G.A.P.) など、国際化の進展とも相まって、食品の生産現場における安全性と品質の確保、さらに生産性の向上は、わが国畜産にとって必須である。農林水産省は、2009年に「畜

産現場における飼養衛生管理向上の取組（農場 HACCP）認証基準」を公表し、2018年までに500戸の農場に農場HACCP認証を取得させる目標を立てた¹⁾。一方、近年の家畜の能力の限界を超えた発育と生産から、乳房炎や日和見感染症等、様々な病気が「生産病」として出現しており、罹患率を低減化させる必要があるが、畜産の現場では、搾乳牛の潜在性乳房炎の罹患率は50%にも達し、対応に苦慮している。さらに、上に掲げたこれらの感染症はワクチンでの予防が困難な病原体を原因としており、ワクチン以外による防御戦略が必要とされている。現状では、前述の農場HACCPにおいても、具体的な消毒剤や消毒のやり方は細かく規定されておらず、バイオセキュリティの強化については具体的な手法が示されていない。

本研究は、鶏糞を還元焼結処理して得られるバイオセラミック（BCX）の3つの特徴、すなわち、a) 短期間（3分以内）に病原体を元の量の1000分の1以下に殺滅できる殺微生物効果²⁾、b) 餌として家畜・家禽に給与できる³⁾、c) 敷料に混合して家畜や家禽を飼養できる性状^{2,3)}、を利用して、1) 農場内への病原体の侵入を阻止、2) 農場内の病原体の伝播・まん延防止、の2点に関する実験室内での基礎研究を行い、BCXの家畜農場での応用に寄与することを目的としている。

これまでの多くの消毒薬は、有機物存在下で効果が著しく減弱⁴⁾し、家畜に投与した場合、一定期間の畜産物の出荷が制限されることから、採卵鶏や乳牛においては、使用に制限があった。今回のBCXは、有機物存在下で効果が維持され、さらに、「ひなの成長試験」で体重に影響が認められなかった³⁾ことから、農林水産省からも「飼料」（家保衛飼538号）として認可されており、使用にあたり、通常の消毒薬とは異なり出荷制限期間を設ける必要はなく、畜産現場での利用が大きい

に期待される。

2. 方法

2.1 各種ウイルスに対する不活化効果

BCXは、NMG環境開発株式会社（東京都）がバイオセラミック製造装置を用いて、製造した。粉体の10%上清は、pH13.0だった。まず、様々なウイルス性家さん病原体に対するBCXの殺ウイルス効果を調べた。エンベロープを有するウイルスとして、鳥インフルエンザウイルス（AIV H7N1）⁵⁾ およびニューカッスル病ウイルス（NDV-Sato, NDV-Ishii）⁶⁾、エンベロープを持たず、比較的消毒薬に対して抵抗性である伝染性ファブリキウス囊病ウイルス（IBDV-D78：ワクチン株<株式会社インターベツト>）、同様にエンベロープを持たず、非常に消毒薬や理化学的処理に抵抗性を示すガチョウパルボウイルス（GPV-IHC）⁷⁾を用いた。各ウイルスとBCXとを混合後、室温（25℃）で3分間あるいは1時間感作させ、維持培地で残存ウイルスを抽出し、遠心後、上清を10倍階段希釈し、適宜、感受性細胞であるMDCK細胞（AIV）や鶏胚線維芽細胞（NDV, IBDV）において、50%組織培養感染量（TCID₅₀/ml）としてウイルス力価測定を行った。

2.2 BCXの待ち受け消毒としての持続性

畜産農場での待ち受け消毒を考慮し、直射日光下にBCXを曝し、あるいは、雨を想定して水で濡らして乾燥させ、定期的にBCXを回収して、殺ウイルス効果の持続性を調べた。通常の農場での散布（約500 g/m²）を想定し、90mmプラスチックシャーレに3.0 gのBCXを入れ、ふたをせずに、日中のみ屋外に設置した。なお、雨天の場合は屋外には出さず、日付のカウントを行わなかった。雨天を模倣した実験では、90mmプラスチックシャーレに3.0 gのBCXを入れ、水道水を10ml加えた後、直射日光下で乾燥させた。

Table 1 Inactivation efficacy of BCX towards poultry viruses at 3 min of incubation period (Mean \pm SD).

Viruses	Virus titer ($\text{Log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$)		RF
	Treated	Control	
NDV-Sato	$\leq 2.5 \pm 0.00$	8.50 ± 0.25	$\geq 6.00 \pm 0.25$
NDV-Ishii	$\leq 2.5 \pm 0.00$	7.92 ± 0.52	$\geq 5.42 \pm 0.52$
IBDV-D78	$\leq 2.5 \pm 0.00$	6.83 ± 0.14	$\geq 4.33 \pm 0.14$
GPV-IHC	$\leq 2.5 \pm 0.00$	6.92 ± 0.38	$\geq 4.42 \pm 0.38$
AIVH7N1	8.58 ± 0.14	8.58 ± 0.14	0.00

Viruses were incubated with BCX for 3 min, and the remaining virus titers were shown as $\text{log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$ (Mean \pm SD). Detection limits of viruses were $2.5\text{log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$.

Untreated viruses kept at room temperature for 3 min were titrated as controls.

RF: Reduction factor.

When incubation period for AIV was extended to 1 hr, the titer became under detection limit ($2.5\text{log}_{10}\text{TCID}_{50}/\text{ml}$) and the RF was calculated as $\geq 6.08 \pm 0.14$.

2.3 BCXを用いたIBDVの伝播抑制試験

さらに、鶏飼育用の敷料にBCXを混合し、IBDV感染鶏ひなと未感染ひなを同居させ、ウイルスの伝播を逆転写-PCR (RT-PCR) 法と血清のウイルス中和試験を用いて調べた。

3. 結果と考察

3.1 各種ウイルスとBCXとを混合3分後に維持培地で回収し、力価測定した。結果をTable 1に示す。NDV, IBDVおよびGPVは、3分間の感作により、ウイルスは検出限界未満となり、未処理対照ウイルスの力価と処理ウイルスの力価の比(減少指数: RF)は、いずれも殺ウイルス効果を示す3.0よりも大きかった。しかし、AIVは、3分間感作では力価の低下は認められなかった。感作時間を1時間に延長したところ、検出限界未満となり、RFは3よりも大きかった。通常、GPVやIBDVは、消毒薬や理化学的な処理に対しては、著しい抵抗性を示すが、強アルカリに対しては、弱いことが明らかとなった。それに対し、一般的な消毒薬で容易に不活化されるAIVは、アルカリには抵抗性を示し、3分間の感作では、なんら力価は低下しなかった。同様の結果は、鶏卵卵殻由来焼成カルシウム (Egg-CaO) を用いた強アル

カリ環境下でも得られており、AIVの不活化には、強アルカリの下、1時間の感作を要した¹⁾。

3.2 そこで、待ち受け消毒用のBCXの殺ウイルス効果の持続性の判定には、AIVを用いることとした。

直射日光下に置いた1週間後から毎週のBCXのAIV不活化効果は、Fig. 1に示した。直射日光下に曝した3週間後では、1週間処理と比較してRF値は有意に低下したが、実験終了の7週間まで殺ウイルス効果が有効であるRF=3.0以上を示した。

雨天を模倣した試験では、Fig. 2に示すように、水濡れと乾燥を9回繰り返しても、RFの低下は認められず、4.0以上を維持した。なお、各乾燥後のpHをFig. 3に示す。BCXのpHは、5回後で11.5と低下し、6回後以降は11.0にまで下がったが、RFの低下は認められなかった。高pHが不活化能に直接結びついているのではないことが推察された。

3.3 IBDVの伝播抑制試験

SPF鶏ひなに、IBDVを感染させたのち、未感染ひな(おとりひな)を1週間同居させたところ、各群3羽のおとり中、1羽はRT-PCRで陽性、中和抗体も陽性となり、完全な伝播抑制はできなかった。3.1で、IBDVが3分間感作で不活化さ

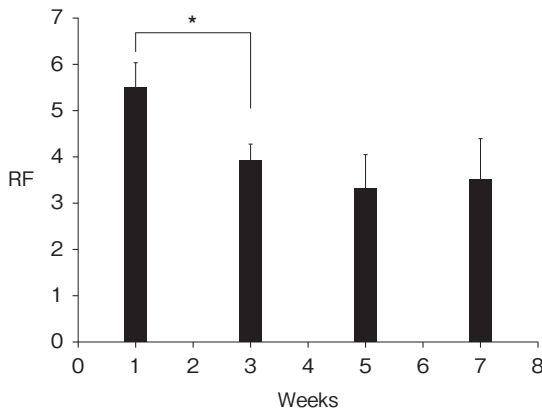


Fig. 1 Reduction factor (RF) against AIV of BCX kept under sunlight (mean ±SD). Three gram of BCX was measured in a 90 mm petri dish for 3 dishes. Sampling was carried out every 2 consecutive weeks, altogether 7 weeks, from each dish, separately. The evaluation was carried out using 100 mg of the collected BCX samples mixed with 50 μ l of AIV by incubating at room temperature for 1 hr. RF illustrated higher than 3 from 1-7 weeks. The RF reduced significantly from 1st and 3rd weeks ($P < 0.05$).

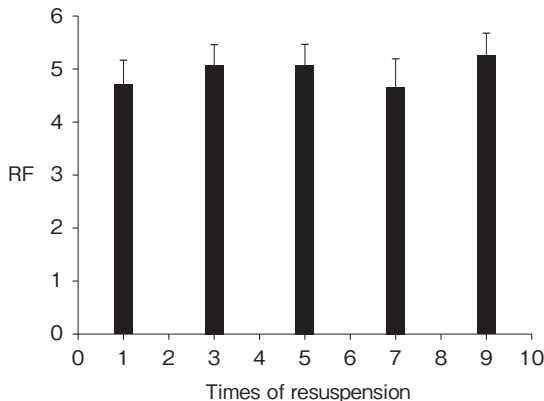


Fig. 2 Reduction factor (RF) against AIV of BCX collected after resuspension with tap water (mean ±SD). Three gram of BCX was measured in a 90 mm petri dish for 3 dishes. The dishes were subjected for making suspension with 10 ml of tap water, and dried under sunlight. Sampling was carried out every 2 consecutive resuspensions, altogether 9 resuspensions, from each dish, separately. The evaluation was carried out using 100 mg of the collected BCX samples mixed with 50 μ l of AIV by incubating at room temperature for 1 hr. RF illustrated higher than 3 throughout the experimental period.

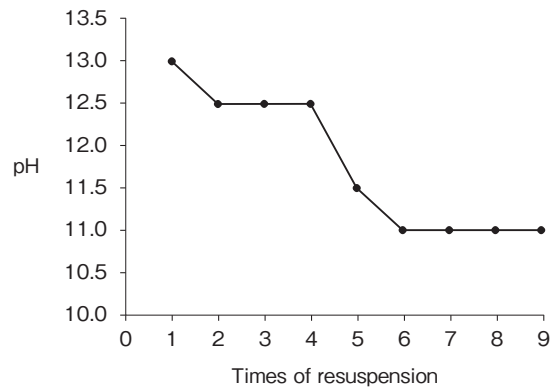


Fig. 3 pH of BCX collected after resuspension with tap water for 9 times. Initial pH was 13 at first resuspension, and then decreased to be 12.5 at 2-4 resuspensions. The pH decreased steeply down to 11 on the 6th suspension, and retained this level during all further resuspensions.

れていることは明らかだが (Table 1), 糞便中のIBDVの不活化を試みたところ, 6時間を要することが明らかとなった。この値は, 以前, *in vivo* で得られたIBDV汚染鶏糞ケージの不活化に要した時間²⁾と同じだった。すなわち, 大量の有機物存在下では, 殺ウイルス効果を発揮するまでに, 時間を要することが分かった。

BCXは, これまで調べられてきたように, 有機物存在下においても殺ウイルス効果を発揮し, 野外散布後, 比較的長期間, 殺ウイルスを保つことが明らかとなった。これは, 待ち受け消毒資材として, 適すと考えられた。なお, 動物飼養下での利用の場合, 糞便など大量の有機物が存在することから, 殺ウイルス効果は短時間では発揮が困難で, 完全な伝播抑制は難しいことが懸念された。しかし, 時間の経過とともにウイルスは不活化されており, 長期にわたり使用することで, 畜産農場内の病原体を徐々に低減できると期待された。

なお, 本研究での成果の一部は, 「Virucidal properties of bioceramic derived from chicken feces pH 13 and its stability in harsh

environments」]として、Avian Diseasesにアクセプトされた⁸⁾。

4. 要 約

鶏糞を還元焼結処理して得られるBCX (pH13.0)は、NDVのみならず、消毒薬に対して比較的抵抗性を示すウイルス (IBDVおよびGPV) に対しても、3分間という短時間で殺ウイルス効果を発揮した。AIVの不活化に際しては、1時間の感作が必要だった。また、屋外環境下でもその殺ウイルス効果の持続性から、BCXは畜産農場での畜舎・鶏舎周辺での待ち受け消毒として利用できると考えられた。なお、敷料への応用では、ある程度効果が認められるが、糞便などの有機物が大量に存在する場合、ウイルスの不活化には時間がかかることから、完全な伝播抑制よりは、BCXを用いることで、徐々に、農場内の病原体が低減していくことが期待された。

文 献

- 1) Ota, M., Toyofuku, C., Thammakarn, C., Sangsriratanakul, N., Yamada, M., Nakajima, K., Kitazawa, M., Hakim, H., Alam, M. S., Shoham, D., Takehara, K. : *JVet Med Sci*, **78**, 831~836, 2016.
- 2) Thammakarn, C., Ishida, Y., Suguro, A., Hakim, H., Nakajima, K., Kitazawa, M., Takehara, K. : *Virus Res*, **204**, 6~12, 2015.
- 3) Takehara, K., Chinen, O., Jahangir, A., Miyoshi, Y., Ueno, Y., Ueda, S., Takada, Y., Ruenphet, S., Mutoh, K., Okamura, M., Nakamura, M. : *Avian Dis*, **53**, 34~38, 2009.
- 4) Hakim, H., Thammakarn, C., Suguro, A., Ishida, Y., Kawamura, A., Tamura, M., Satoh, K., Tsujimura, M., Hasegawa, T., Takehara, K. : *J. Vet. Med. Sci.*, **77**, 211~215, 2015.
- 5) Jahangir, A., Ruenphet, S., Shoham, D., Okamura, M., Nakamura, M., Takehara, K. : *Virus Genes*, **40**, 94~105, 2010.
- 6) Takehara, K., Shinomiya, T., Kobayashi, H., Azuma, Y., Yamagami, T., Yoshimura, M. : *Avian Dis*, **31**, 125~129, 1987.
- 7) Takehara, K., Hyakutake, K., Imamura, T., Mutoh, K., Yoshimura, M. : *Avian Dis*, **38**, 810~815, 1994.
- 8) Thammakarn, C., Sangsriratanakul, N., Ishida, Y., Suguro, A., Yamada, M., Toyofuku, C., Nakajima, K., Kitazawa, M., Ota, M., Hakim, H., Alam, M. S., Shoham, D., Takehara, K. : *Avian Dis*, in press, 2016.

シカ肉に寄生する住肉胞子虫の形態学的・分子生物学的 同定ならびに腸管毒性評価

Morphological and molecular identification, and evaluation of
enterotoxicity of *Sarcocystis* spp. isolated from muscular tissue of sika deer

松田一哉・平田晴之・臼井 優

(酪農学園大学獣医学群獣医学類)

Kazuya Matsuda, Haruyuki Hirata and Masaru Usui

(Department of Veterinary Medicine, School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

Deer meat has become popular food with an increase in the number of hunted animals as the number of wild sika deer increased and their habitat range expanded. Sika deer (*Cervus nippon*) is known to be infected by *Sarcocystis* sp. with a high probability and *Sarcocystis* sp. in the sika deer is considered to have diarrheal toxin similar to those in *Sarcocystis fayeri* in horse meat. For the progression of study on *Sarcocystis* sp. and their toxin from sika deer, the species identification of the *Sarcocystis* sp. is absolutely necessary. In this study, we purposed the species identification of *Sarcocystis* sp. by uniting the morphological characteristics and genetic information. By the morphological examinations using light, transmission and scanning electron microscopes, morphological characteristics of three species of *Sarcocystis* sp. were clarified. Sarcocyst type A was large ellipsoid cysts with thick cyst wall composed of thick finger-like protrusions which had broad base and slightly curved distal segment with jagged surface and electron-dense granules. Sarcocyst type B was slender spindle-shaped cysts with thick cyst wall composed of tightly-packed, thin, finger-like protrusions. Sarcocyst type C was slender spindle-shaped cysts with thin cyst wall composed of filamentous, thread-like protrusions which were compressed by the cytoplasm of the host cells. These results revealed the morphological resemblance to those in red deer (*Cervus elaphus*). It is necessary that we push forward with the molecular research, exactly identify the species of *Sarcocystis* sp. in sika deer by combining morphological and molecular data, and evaluate the toxicity of each species.

1. 目 的

近年、ニホンジカの生息頭数増加と生息域拡大によって、農作物や森林の食害による経済的損失、生態系への影響、交通事故発生などの深刻な問題が起きている。こうした状況に対して、生息

頭数を適正に保つための個体数調整が進められ、同時に、シカ肉を食肉資源として有効活用する動きが進められている。かつて野生鳥獣はジビエと称されて高級食材とされていたが、食肉利用を目的とした捕獲頭数増加に伴い、より一般的な食材として消費が拡大する社会的動向がある。

住肉胞子虫 (*Sarcocystis*) は草食獣を中間宿主、肉食獣を終宿主とする生活環をとるコクシジウム属の原虫であり、現在までに200近い種が報告されている。シカは中間宿主として感染し、筋組織内にシストが形成されるが、ニホンジカにおける住肉胞子虫の感染率は牛や馬などの他の家畜と比較して極めて高いことが知られている。さらに、一定量の筋組織に存在する住肉胞子虫シストの数は、ニホンジカでは牛や豚、羊に比べて著しく多いことも報告されている。ニホンジカの筋組織に寄生する住肉胞子虫について、日本国内の研究グループによって計5種の寄生が報告されているが、形態学的特徴と遺伝子情報とが統合的に解析されていないために、種の同定が不確定な状況である。また、シカ寄生種のヒトへの感染の可能性は不明であるが、現在、住肉胞子虫は食中毒の原因として重要視されている。馬刺し（生食用馬肉）の摂食による食中毒の原因調査の結果、馬寄生種 *Sarcocystis fayeri* の約15kDの構造タンパクが下痢原性毒素として同定され、同じタンパクがシカ寄生種にも存在することが示されており、生食による食中毒が危惧されている。

このように、シカ肉の食材としての利用が広く進められる一方、シカ肉には食中毒の原因として指摘される住肉胞子虫が極めて高率に感染している。これらの状況を受け、本研究ではニホンジカに寄生する住肉胞子虫について形態学的特徴と遺伝子情報を統合的に解析することにより種を同定すること、さらに、各種についての腸管毒性を評価することを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 シカ肉に寄生する住肉胞子虫の形態学的観察

エゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) はニホンジカ (*Cervus nippon*) の北海道亜種であり、エ

ゾシカ肉は国内で最もシカ肉としての利用が進んでいる。本研究はエゾシカ肉を使用して実施した。

2.1.1 住肉胞子虫シストの光学顕微鏡による観察

食肉利用のために解体処理されたエゾシカから採取した食道筋層の冷蔵保存サンプルもしくは凍結保存後解凍したサンプルを用いた。筋組織から実体顕微鏡下でシストを摘出し、光学顕微鏡で観察した。

2.1.2 住肉胞子虫シストの走査型顕微鏡による観察

実体顕微鏡下において、エゾシカ食道筋層から住肉胞子虫シストを摘出し、表面に付着する筋繊維を丁寧に除去した。2.5%グルタルアルデヒド溶液および1%オスミウム酸溶液で固定後、1%タンニン酸溶液による導電染色を実施した。凍結乾燥ならびに白金蒸着の後、走査型電子顕微鏡で観察した。

2.1.3 住肉胞子虫シストの透過型顕微鏡による観察

エゾシカ食道筋層組織からシストを含む組織片を切り出し、2.5%グルタルアルデヒド溶液による前固定ならびに1%オスミウム酸溶液による後固定を行った。次に、組織片を樹脂ブロック中に包埋した。超薄切片を作製後、EMステイナーおよびクエン酸鉛による電子染色を実施し、透過型電子顕微鏡で観察した。

2.1.4 住肉胞子虫シストの組織学的観察

エゾシカ食道筋組織を切り出した後、4%ホルムアルデヒド溶液で固定し、パラフィン包埋ブロックを作製した。組織切片を作製後、ヘマトキシリン・エオジン染色を実施し、光学顕微鏡で観察した。

2.2 シカ肉に寄生する住肉胞子虫の分子生物学的検索

実体顕微鏡下でエゾシカ食道筋組織から住肉胞

子虫シストを摘出し、 -30°C で保存して凍結サンプルとした。凍結サンプルを融解後、DNAを抽出し住肉胞子虫の18s rRNAをコードする領域のPCRを実施した。PCRに用いたプライマーならびに条件はDahlgren and Gjerde¹⁾ならびにPrittら²⁾の方法を参考に設定した。次に、得られたPCR産物のダイレクトシーケンスを実施した。

3. 結果と考察

3.1 シカ肉に寄生する住肉胞子虫シストの形態学的特徴

食道筋層組織の組織学的検索の結果、形態学的に識別される4種類の住肉胞子虫のシストが確認された。以下、シストA～Dとしてその形態学的特徴を示す。シストAは組織学的に大型のシスト

であり、シスト壁は厚く、太指状の表面突起が認められた (Fig. 1 A)。摘出したシストは大型で太く、先端がやや鈍な形態であることが確認された (長さ $1176\sim 2799\ \mu\text{m}$, 太さ $219\sim 558\ \mu\text{m}$) (Fig. 1 B)。透過型電子顕微鏡による観察により、シスト壁の表面突起はシスト表面から直立し、基部側は幅広く (約 $4\ \mu\text{m}$)、先端にかけて軽度の湾曲が認められ、先端部は粗造で内部に電子密度の高い粒子状物が観察された (Fig. 1 C)。走査型電子顕微鏡による観察で、表面突起はシスト全周に密に存在することが明らかとなった (Fig. 1 D)。

シストBは組織学的に筋線維3, 4本程度の太さのシストであり、シスト壁は厚く、細指状の表面突起が認められた (Fig. 2 A)。摘出したシストは細長く、先端が鋭な形態であることが確認された

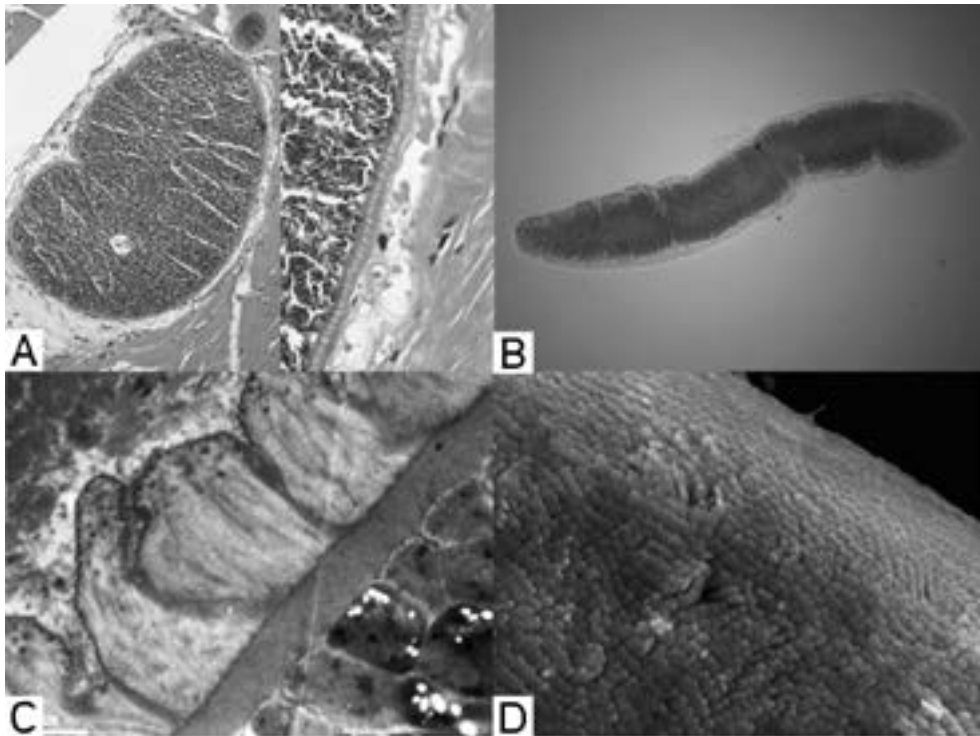


Fig. 1 Morphology of the *Sarcocyst* type A from Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). A. A large sarcocyst in the muscular layer of the esophagus. The cyst wall is thick with thick finger-like protrusions. Histological sections stained with hematoxylin and eosin. B. A large ellipsoid cyst. Light microscopy. C. The protrusions have broad base and slightly curved distal segment with jagged surface and electron-dense granules. Transmission electron microscopy. D. The cyst surface is diffusely covered with the protrusions. Scanning electron microscopy.

(長さ705~1272 μm , 太さ73~165 μm) (Fig. 2B)。透過型電子顕微鏡による観察により, シスト壁の表面突起はシスト表面から直立し, 幅が均等で(約1 μm), 細長い(長さ約5~7 μm)構造であることが明らかとなった (Fig. 2C)。走査型電子顕微鏡による観察で, 表面突起はシスト全周に密に存在していることが確認された (Fig. 2D)。

シストCは組織学的にシストBと同様の太さであり, シスト壁は薄く, 明らかな表面突起が認められない (Fig. 3A)。摘出したシストは細長く, 先端が鋭な形態であることが確認され(長さ726~1202 μm , 太さ58~100 μm), 微毛状の表面突起が認められた (Fig. 3B)。透過型電子顕微鏡による観察により, 幅約0.2 μm の表面突起は周囲を囲む宿主筋線維の細胞質に圧排されている様子が

確認された (Fig. 3C)。走査型電子顕微鏡による観察では細長いフィラメント状の表面突起が認められ, 特定の方向性を持たずに分布していることが明らかとなった (Fig. 3D)。

シストDは組織学的に大型のシストであり, 明瞭なシスト壁構造を欠き, 結合組織性の被膜に包まれていた。

18S rRNA遺伝子を標的としたPCRを実施した結果, Primer 1L/Primer 3H, S5/S4, ERIB1/Primer B¹⁾ならびに18S1F/18S11R²⁾のプライマーの組み合わせで目的とする分子量の増幅産物を確認した。PCR産物のダイレクトシーケンスについて, 試料調整方法の条件を検討中である。

本研究によって, ニホンジカ (*Cervus nippon*) の北海道亜種であるエゾシカ (*Cervus nippon*

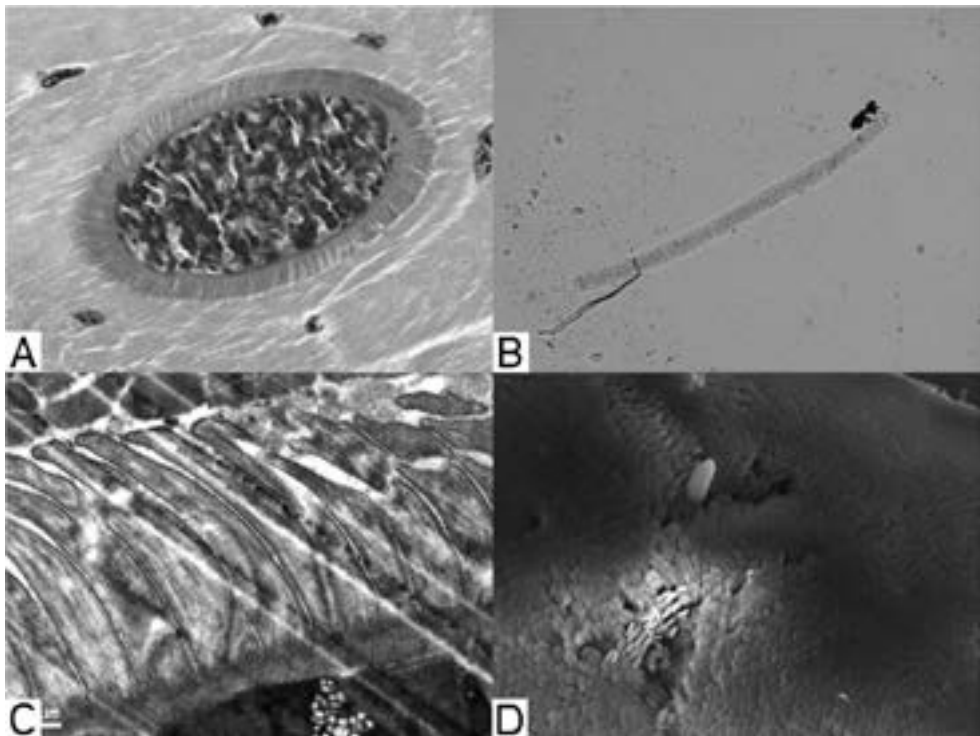


Fig. 2 Morphology of the *Sarcocyst* type B from Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). A. A small sarcocyst with thick cyst wall composed of thin finger-like protrusions. Histological sections stained with hematoxylin and eosin. B. A slender spindle-shaped cyst. Light microscopy. C. The cyst wall is composed of tightly packed, thin, finger-like protrusions. Transmission electron microscopy. D. The cyst surface is diffusely covered with the tightly packed protrusions. Scanning electron microscopy.

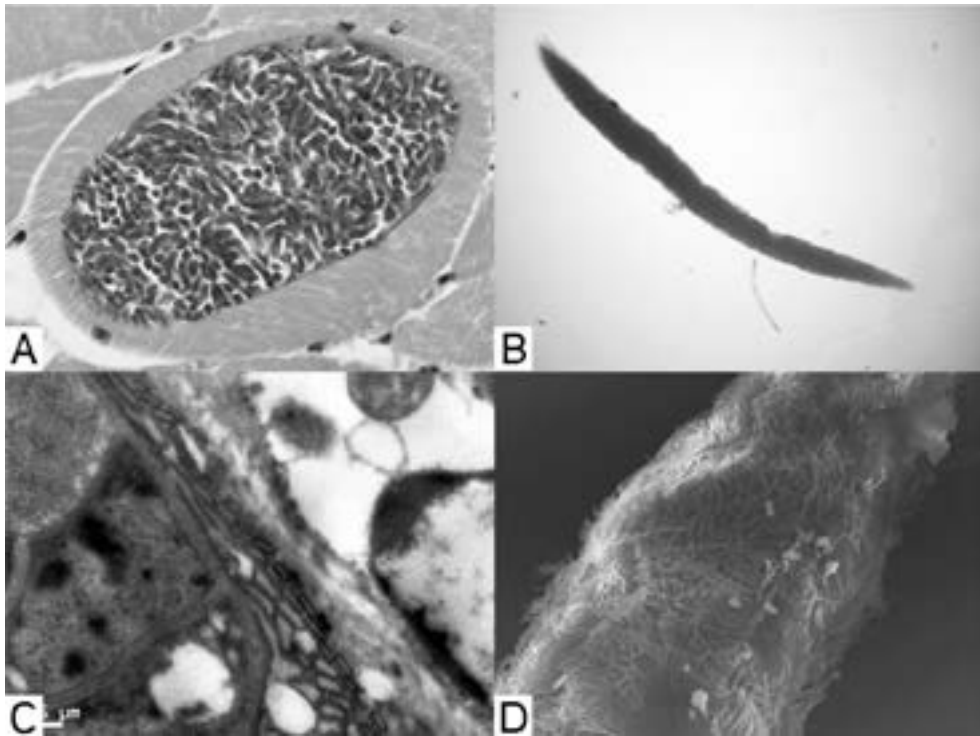


Fig. 3 Morphology of the *Sarcocyst* type C from Hokkaido sika deer (*Cervus nippon yesoensis*). A. A small sarcocyst with thin cyst wall without conspicuous protrusions. Histological sections stained with hematoxylin and eosin. B. A slender spindle-shaped cyst. Light microscopy. C. The cyst wall has thin protrusions which are compressed by the cytoplasm of the host cell. Transmission electron microscopy. D. The cyst surface is covered with filamentous, thread-like protrusions. Scanning electron microscopy.

yesoensis) の筋組織に寄生する住肉胞子虫シストの形態学的特徴を明らかにすることができた。シカ科 (*Cervidae*) 動物にはニホンジカやトナカイ、ヘラジカなどが含まれ、17~19属に分類されている。ニホンジカはシカ属 (*Cervus*) に属し、同じシカ属にはヨーロッパや北南米、オーストラリアなどに生息するアカシカ (*Cervus elaphus*) が属しており、アカシカに寄生する住肉胞子虫についてはGjerdeらのグループによって詳細な研究が実施されている^{3, 4)}。Gjerdeらは形態学的特徴ならびに18S rRNA遺伝子の分子系統解析から、5種 (*Sarcocystis hjorti*, *S. hardangeri*, *S. ovalis*, *S. rangiferi*, *S. tarandi*) を同定しており³⁾、その後、ミトコンドリアCOX1遺伝子の分子系統解析を加えることにより、*S. rangiferi*を*S. truncata*, *S.*

*tarandi*を*S. elongata*と再分類している⁴⁾。今回我々が認めたシストAは*S. truncata* (*S. rangiferi*) のシストと類似していたが、シストAは大きさがより大きくなる傾向が認められ、また、周囲から連続する隔壁が内部を区画する点が異なっていた。シストBは*S. elongata* (*S. tarandi*) のシストと非常に類似していた。また、斉藤らがホンシュウジカから得た住肉胞子虫シストとも類似しており、彼らは本種が*S. sybillensis*と形態学的に類似していることを指摘している⁵⁾。シストCはGjerdeらの報告した*S. hjorti*と非常に類似していることが確認された。住肉胞子虫は1つの動物種に複数種の住肉胞子虫が寄生し、また、1種の住肉胞子虫が複数の動物種に寄生することが知られている。今回得られた結果から、同じ*Cervus*属

に属するニホンジカとアカシカに寄生する住肉胞子虫が形態学的に非常に類似していることが確認され、このことから、ニホンジカとアカシカに分かれる以前の共通の祖先動物の時代から住肉胞子虫と共生している可能性が考えられ、非常に興味深い知見であると考えられた。住肉胞子虫の種の同定にはこれまでに得た形態学的特徴に加え、現在検索中である遺伝子情報を含めた解析が不可欠であり、住肉胞子虫の食中毒原因物質としての毒性評価を行うために、種の同定を完遂する必要がある。

4. 要 約

ニホンジカの生息頭数増加と生息域拡大に対する個体数調整に伴って、シカ肉を食肉として活用する動きが進んでいる。ニホンジカには住肉胞子虫が高率に感染していることが知られており、さらに、馬寄生種*Sarcocystis fayeri*に含まれる下痢原性毒素がシカ寄生種にも含まれると指摘されている。シカに寄生する住肉胞子虫とその毒素に関する研究を進めるにあたり、ニホンジカに寄生する住肉胞子虫の種の同定が不可欠である。本研究では形態学的ならびに分子生物学的検索を統合的に解析して種を同定することを目的とした。形態

学的解析の結果、ニホンジカに寄生する3種の形態学的特徴が同じ*Cervus*属に属するアカシカの寄生種と非常に類似していることが明らかとなった。引き続き分子生物学的検索を進め、形態学的特徴と合わせた種の同定を完遂させ、それらの各種の腸管毒性を評価する必要がある。

文 献

- 1) Dahlgren, S. S., Gjerde, B. : Genetic characterisation of six *Sarcocystis* species from reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Norway based on the small subunit rRNA gene, *Vet. Parasitol.*, **146**, 204~213, 2007.
- 2) Pritt, B., Trainer, T., Simmons-Arnold, L., Evans, M., Dunams, D., Rosenthal, B. M. : Detection of *Sarcocystis* parasites in retail beef : a regional survey combining histological and genetic detection methods, *J. Food Protec.*, **71**, 2144~2147.
- 3) Dahlgren, S. S., Gjerde, B. : Molecular characterization of five *Sarcocystis* species in red deer (*Cervus elaphus*), including *Sarcocystis hjorti* n. sp., reveals that these species are not intermediate host specific, *Parasitology*, **137**, 815~840.
- 4) Gjerde, B. : *Sarcocystis* species in red deer revisited : with a re-description of two known species as *Sarcocystis elongata* n. sp. and *Sarcocystis truncata* n. sp. based on mitochondrial *cox1* sequences, *Parasitology*, **141**, 441~452.
- 5) Saito, M., Itagaki, T., Shibata, Y., Itagaki, H. : Morphology and experimental definitive hosts of *Sarcocystis* sp. from sika deer, *Cervus nippon centralis*, in Japan, *Jpn. J. Parasitol.*, **44**, 218~221.

肉用鶏における *Salmonella* Agona の emerging と その発生要因の解析

Emergency and analysis of the causes of *Salmonella* Agona in broiler
chicken

鳥居 恭司・村上 覚史・横山 栄二*

(東京農業大学農学部畜産学科, *千葉県衛生研究所)

Yasushi Torii, Satoshi Murakami and Eiji Yokoyama*

(Department of Animal Science, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture,

*Chiba Prefectural Institute of Public Health)

We have investigated *Salmonella* sp. strains in broiler chicken at a slaughter center. *S. Infantis* strains had been isolated from many broiler chickens until 2012. However, *S. Infantis* strains were not detected, and *S. Agona* strains were isolated from many chickens in 2014. The breeder of broiler chickens are introduced from some broiler breeder centers. We can not consider that this case was emerging of *S. Agona* in a limited zone. The strains have a risk of outbreak of food poison from chicken. We investigated molecular epidemiological and pathogenicity studies of the strains from chickens and humans.

In molecular epidemiological study, strains' genomes from chickens were same PFGE patterns. Phylogenetic tree was made by NGS analysis, and strains from chickens were separated three groups. Strains from human were included into these groups. Pathogenic of *Salmonella* was evaluated by invasion of HeLa cells. Invasion efficacy of two groups with the strains from chickens were 0.35 and 0.53%. *S. Infantis* which is low pathogenicity was 0.31%, and *S. Typhimurium* which high pathogenicity was 1.24%. Invasion efficacies of the strains were equal to that of *S. Infantis*, and the results indicated that the strains were low pathogenicity.

1. 目 的

ヒトにおけるサルモネラ食中毒は鶏肉や鶏卵食品を介して発生するが、わが国では主に *Salmonella* Enteritidis は鶏卵、*S. Infantis* では鶏肉がその汚染源として重要である¹⁾。これまでの調査により、平成23 (2011) 年度のある県の一食鳥処理場におけるサルモネラ調査で、複数の農場の肉用鶏から *S. Infantis* が分離されていたが、平成26 (2014)

年度の同一食鳥処理場における調査では *S. Infantis* はほとんど分離されず、代わって *S. Agona* が多数分離された。現在、肉用鶏農場が導入するコマーシャル鶏は複数の種鶏場から導入されており、今回調査した農場も同様である。このことを考慮すると一地域に限定された *S. Agona* の新興とは考えにくい。*S. Agona* は1970~80年代にヒトの食中毒事例から検出されていたが、その後検出数が激減していた。今回の肉用鶏における本血清型の

新興により鶏肉を介したヒトのサルモネラ感染症のリスクが高まる可能性は否定できない。そこで本研究では、我々が肉用鶏から分離した株、国内でヒトから分離された株、さらに市販鶏肉から分離された株の分子疫学的解析を実施し、今回の肉用鶏における*S. Agona*の新興状況を確認した。さらにその発生要因を解析するため、*S. Agona*の感染性および病原性を調査するとともに、次世代シーケンサー（NGS）による全ゲノム解析を実施し、肉用鶏分離株とヒト分離株との関連を解明してその情報を生産者サイドへ提供することで、*S. Agona*の養鶏場およびヒトへの蔓延防止に生かしていくことを目的とした。

2. 方法

2.1 分子疫学的解析および全ゲノム解析

肉用鶏における*S. Agona*の新興状況を把握するために、2014～2015年に肉用鶏から分離した菌株（87菌株）、2013～2014年にヒトから分離された菌株（5菌株）のDNAをパルスフィールド電気泳動（PFGE）を既報に準じて行った²⁾。制限酵素はXbaIおよびBlnIを用いた。また、対照として千葉県衛生研究所に保存されている菌株（63菌株、1993～2008年に分離）も同様にPFGEを行った。PFGEデータはBio Numerics（Applied Maths）によりクラスター解析してデンドログラムを作成した。さらに、Minimum spanning tree（MPT）解析を行って、各菌株の類似度により被験菌株をgeno-groupに分けた。

それぞれのgeno-groupから任意に65菌株を選び出し、NGSによる全ゲノム解析を既報に準じて行った³⁾。得られた全ゲノム・データから*S. Agona*の進化系統を解明するのに必要な変異を抽出し、被験菌株を進化系統グループに分類した。

2.2 in vitroにおける*S. Agona*の病原性に関する調査

サルモネラ菌の病原性の指標である細胞侵入性を調べるため、Gentamycin Protection Assay⁴⁾を次のとおりに行った。供試菌株は、全ゲノム解析で分類したそれぞれの進化系統グループから任意に8株を選択し、対照として市販鶏肉から得られた*S. Infantis*, *S. Typhimurium*, *S. Manhattan*, *S. Schwarzengrund*を使用した。細胞侵入性を評価する細胞はヒト子宮癌由来細胞HeLa細胞を使用した。HeLa細胞をDulbecco's Modified Eagle's Medium（DMEM）-10% Fetal calf serum（FCS）培地を用いて24ウェルプレートで37℃、5%CO₂環境で1晩培養した。サルモネラ菌はLB培地で37℃ OD630が0.5になるまで振盪培養した。HeLa細胞にMultiplicity of Infection 100でサルモネラ菌を添加し、37℃、5%CO₂環境下で10分間静置後、PBSで3回洗浄し、さらに20分感染させた。リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で1回洗浄後、培地を200 μg/ml Gentamycin含有DMEM-10% FCS培地に交換して細胞内に侵入していない菌を殺菌した。細胞をPBSで洗浄後0.5% TritonX-100含有PBSを500 μl添加して細胞を溶解した。細胞溶解液を生理食塩液により10倍段階希釈し、各希釈液をLB寒天培地に50 μlずつ塗布して37℃で1晩培養した。培地に生育したコロニー数をカウントし、HeLa細胞内部に侵入したサルモネラ菌を計測し、細胞内への侵入効率を算出した。

2.3 肉用鶏生産業者に対する講習会の開催

平成28年3月16日に*S. Agona*が分離された肉用鶏生産業者および県食肉衛生研究所の担当者を交えた講習会を実施した。

3. 結果と考察

3.1 分子疫学的解析および全ゲノム解析

肉用鶏から分離した菌株のPFGE解析の結果、Xba Iのデンドログラムは類似度90%以上で1つ

の集団となり、Bln Iのデンドログラムは類似度90%以上では3つの集団に分かれ、類似度85%以上で1つの集団となった。肉用鶏からの分離株とヒト分離株のPFGE解析のバンドパターンは大変酷似していた。対照の千葉県衛生研究所保存株を合わせたXba Iのデンドログラムでは類似度90%

以上で12の集団に分かれており、Bln Iのデンドログラムでは90%以上で15の集団に分かれた。肉用鶏およびヒト分離株は千葉県衛生研究所保存株との間で類似度は低かった。すべてのPFGEデータをMST解析し、geno-typeをclonal complex (CC) によりグループ分けを行ったところ、Xba

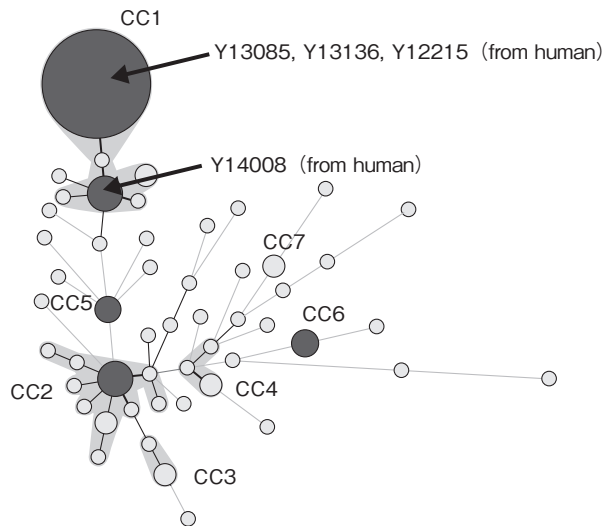


Fig. 1 Minimum spanning tree constructed using the PFGE-Xba I patterns of *S. Agona* strains from chickens and human in 2014

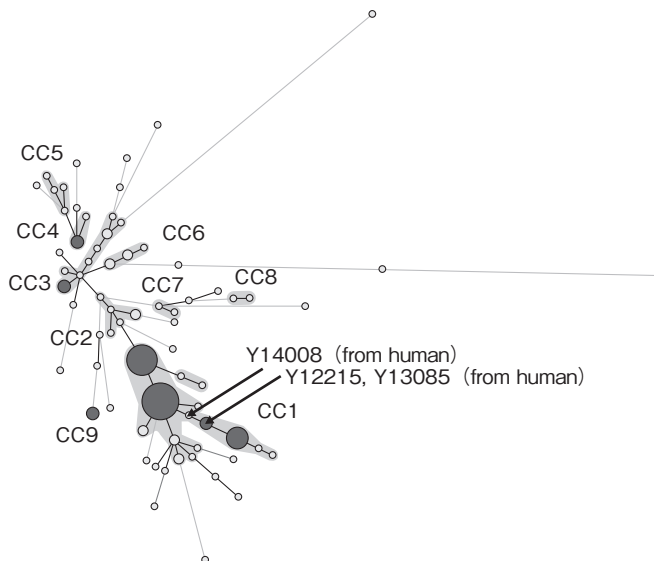


Fig. 2 Minimum spanning tree constructed using the PFGE-Bln I patterns of *S. Agona* strains from chickens and human in 2014

Iでは7つ、Bln Iでは9つのCCが形成された。肉用鶏由来株は両制限酵素において、1つの大きな集団(CC1)を形成し、ヒト分離株はXba Iでは5株中4株、Bln Iでは3株がCC 1に分類された(Fig. 1, 2)。

各CCから任意に選択した菌株のNGS解析の結果を進化系統グループに大別したところ、肉用鶏からの分離株は3つのグループに分かれた。多くの菌株は2つのグループに含まれており、ヒト分離株の5株のうち4株もそれに含まれた(Fig. 3)。

PFGEおよびNGS解析の結果、ヒト分離株の5株のうち4株は肉用鶏からの分離株と同一クローンである可能性が非常に高いことが示された。これにより、肉用鶏からヒトへの感染があった可能性が示唆された。今回の*S. Agona*が分離された

ヒトと肉用鶏との因果関係は不明であるが、なんらかの繋がりがあったものと考えられた。また、NGS解析において、多くの菌株が含まれた2つのグループのうちの1つのグループは、Referenceで使用したSL483株(アメリカ ワオミング州分離株)が含まれており、海外からなんらかの経路で入ってきた菌株である可能性が考えられた。

3.2 in vitroにおける*S. Agona*の病原性に関する調査

サルモネラ菌の病原性は宿主細胞への侵入が病原性発揮の発端となると考え、全ゲノム解析で分類したそれぞれの進化系統グループおよび*S. Agona*以外の血清型の菌株の病原性について検討した。*S. Agona*のHeLa細胞への侵入性については、細胞侵入効率が0.3~1.1%であった(Table 1)。

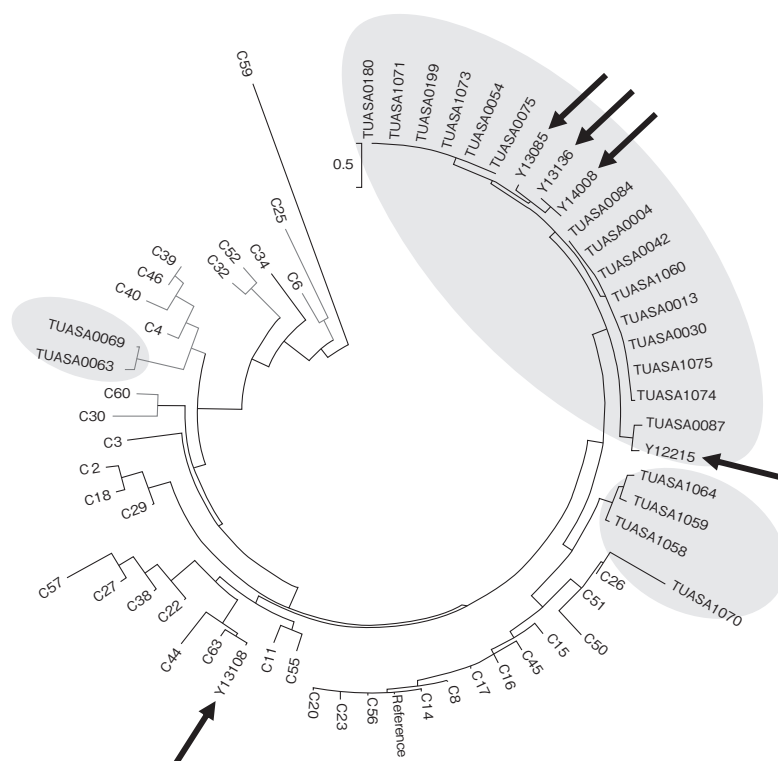


Fig. 3 Phylogenetic tree of *S. Agona* strains from chickens and human in 2014 (gray zone: Strains from chickens, ↑ : Strains from food poisoning case in human)

Strains derived from chickens were separated into three groups. Four-fives of strains from human included in same group.

Table 1 Invasion efficacies of *S. Agona* into HeLa cells

Strains	Invasion efficacies (%)
TUASA0004 (from chicken in 2014)	0.35
TUASA1064 (from chicken in 2014)	0.53
C25 (control strain from Chiba)	0.30
C40 (control strain from Chiba)	0.68
C57 (control strain from Chiba)	1.10
<i>S. Infantis</i>	0.31
<i>S. Manhattan</i>	0.91
<i>S. Typhimurium</i>	1.24
<i>S. Schwarzengrund</i>	0.53

肉用鶏からの分離株が多く含まれた2つのグループの細胞侵入効率は0.35および0.53%であった。他の血清型においては、*S. Infantis* 0.31%、*S. Typhimurium* 1.24%、*S. Manhattan* 0.91%および*S. Schwarzengrund* 0.53%であった。高病原性で知られる*S. Typhimurium*は他の血清型の菌株よりも高い細胞侵入性を示した。肉用鶏が多く含まれた分離株の細胞侵入性は*S. Infantis*と同等であり、病原性は低いことが示唆された。ただし、*S. Agona*でも他のグループに含まれていた菌株では*S. Typhimurium*に近い細胞侵入性が確認されたため、菌株によっては病原性が高いものも存在していることが示唆された。

3.3 肉用鶏生産業者に対する講習会の開催

講習会においては、本研究結果の情報に提供し、生産現場での衛生管理について議論を行った。生産現場の担当者からは、今回の*S. Agona*が生産現場に侵入した経路および汚染が広がった経路については不明であった。今回の講習会を行ったことで、生産現場の担当者から今後食中毒菌への意識を高め、生産現場の衛生管理の徹底を行ってほしいとの感想をいただいた。

4. 要 約

我々はある県の一食鳥処理場において継続的に

サルモネラ調査を行ってきた。今までの調査では肉用鶏から*S. Infantis*が分離されていたが、平成26年度の調査では*S. Agona*が多数分離された。肉用鶏の種鶏は複数の種鶏場から導入されており、一地域に限定された*S. Agona*の新興とは考えにくい。今回の肉用鶏における本血清型の新興により鶏肉を介したヒトのサルモネラ感染症のリスクが高まる可能性は否定できない。このため、本研究では肉用鶏およびヒトから分離された株の分子疫学的解析および病原性の解析を実施した。

分子疫学的解析において、PFGE解析の結果、肉用鶏から分離された菌株の遺伝子は非常に類似していることが示され、同一クローン由来である可能性が示された。NGS解析の結果を進化系統グループに大別したところ、肉用鶏からの分離株は3つのグループに分かれた。多くの菌株は2つのグループに含まれており、ヒト分離株の5株のうち4株もそれに含まれた。

サルモネラ菌の病原性はHeLa細胞への侵入を指標に評価した。肉用鶏からの分離株が多く含まれた2つのグループの細胞侵入効率は0.35および0.53%であった。他の血清型においては、病原性が低い*S. Infantis*は0.31%、病原性が高い*S. Typhimurium*は1.24%であった。肉用鶏が多く含まれた分離株の細胞侵入性は*S. Infantis*と同等であり、病原性は低いことが示唆された。

文 献

- 1) National Institute of Infectious Disease, *Infect. Agent Serv. Rep.*, **30**, 203~204, 2009.
- 2) Center for Disease Control and Prevention (CDC) Pathogens and Protocols/Pulse Net PFGE Protocols.
- 3) Yokoyama, E., Ando, N., Ohta, T., Kanada, A., Shiwa, Y., Ishige, T., Murakami, K., Kikuchi, T., Murakami, S.: *Vet. Microbiol.*, **175**, 312~318, 2015.
- 4) Steele-Mortimer, O.: *Methods Mol. Biol.*, **431**, 201~211, 2008.

マダニの酸化ストレス制御分子を標的とした 抗マダニワクチンの開発

The development of anti-tick vaccine as a target against regulating molecule for oxidant stress

田 仲 哲 也・草木迫 浩 大・宮 田 健*

(鹿児島大学共同獣医学部, *鹿児島大学農学部)

Tetsuya Tanaka, Kodai Kusakisako and Takeshi Miyata*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, *Faculty of Agriculture, Kagoshima University)

The objective of this research was to evaluate the efficacy of tick peroxiredoxin as antigen candidate for vaccine. When the rabbits were vaccinated with a recombinant tick peroxiredoxin (rHlPrx2) expressed through *Escherichia coli* system, high antibody titer against the recombinant protein can be induced. Moreover, the effect of specific antibody against rHlPrx2 in the rabbit was also evaluated by tick infestation. Although the rHlPrx2 vaccination to rabbit did not significantly affect ticks' engorgement, engorged body weight, egg weight, and hatching rate after tick infestation, the rHlPrx2 vaccination without adjuvant slightly depress the ticks' engorged body weight and egg weight. Therefore, there is a possibility that the rHlPrx2 vaccination without adjuvant can be useful in vaccination against tick infestation, although rHlPrx2 vaccination showed no significant effects on tick infestation. On the other hand, the peroxiredoxins were also considered as an inducer of Th2 immune response of host in other parasites, like helminths and protozoans. For this reason, we consider that further studies are needed for assess the viability of tick peroxiredoxin as a vaccine candidate.

1. 目 的

ワクチネーションによってマダニを駆除しようという抗マダニワクチンのアイデアはかなり古くからあったが、1994年に市販されたオウシマダニ防除を目的としたマダニ中腸膜タンパク質Bm86ベースの抗マダニワクチンを唯一の例外として、今日に至るまで実用化されたワクチンは皆無である¹⁾。理想的な抗マダニワクチンとは、(1) 人獣加害性のすべてのマダニに対して有効であるとともに、(2) 卵、幼ダニ、若ダニ、成ダニのす

べての発育期に有効性を発揮し、(3) 付与した免疫能が長期間継続し、(4) 媒介疾病の感染を阻止するとともに、(5) ワクチン抵抗性の獲得がなく、(6) 低価格であるなどの特徴を備えているべきであると考えられるが、上記のBm86ワクチンを含めて、これらの条件をすべて満足させるものは存在しないのが現状である。したがって、Bm86のような膜タンパク質ではなくフェリチンやペルオキシレドキシンのような分泌タンパク質を標的とした有用な新規抗マダニワクチンの開発が必要とされている。

本研究では、酸化ストレスに対する防御に重要な役割を担っているマダニフェリチン^{2~4)}やマダニペルオキシレドキシシン⁵⁾に着目し、これらの活性阻害によって、吸血プロセスの破綻を起こし、マダニを駆除できるのではないかと考えた。我々は、組換えペルオキシレドキシシンを作製し、これらを宿主に免疫することによって、抗マダニ効果を調べ、新規抗マダニワクチンの開発の基盤を確立することを本研究の主目的とした。

2. 方 法

2.1 ワクチン抗原としての組換えペルオキシレドキシシンの精製

RT-PCR法によって増幅したペルオキシレドキシシンのcDNAを大腸菌発現ベクター (pRSET) に組み込んだ後、大腸菌BL21 (DE3) にトランスフォーメーションし、組換えペルオキシレドキシシンを発現する大腸菌を得た。ワクチン抗原として十分な量を確保するために、大腸菌の大量培養を行い、得られた組換え体についてはHis-tagカラムを用いたクロマトグラフィによって精製を行った。

2.2 組換えペルオキシレドキシシンの免疫

日本白色ウサギ1羽あたり、同量のフロイント不完全アジュバント (IFA) と混合した100 μg の組換えペルオキシレドキシシンまたは100 μg の組換えペルオキシレドキシシンのみをそれぞれ皮下に2週間間隔で3回免疫を行った。コントロール群にはIFAと混合したリン酸緩衝液 (PBS) またはPBSのみを投与した。各群1羽のウサギを実験に供した。ELISAによって抗原特異的抗体応答を確認するために、それぞれの群の抗血清を免疫0, 1, 3, 5週間後に回収した。一次抗体は、得られた抗血清を50倍希釈から156,250倍希釈の5倍階段希釈列として用いた。二次抗体は、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたヤギ

由来抗マウスイムノグロブリン (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) を2,000倍希釈で用いた。その後TMB溶液 (SurModics, Eden Prairie, MN, USA) を用いて発色を行い、マイクロプレートリーダー (BioRad, Hercules, CA, USA) で450nmの吸光を測定した。得られた結果は、450nmの吸光度が0.5以下となる抗血清の希釈倍率を抗体価とし、 \log_{10} の値を用いてグラフを作製した。

2.3 マダニの吸血、産卵、孵化率に及ぼす組換えワクチンの影響

3回目の免疫から2週間後にウサギへ32匹の雌成ダニを吸血させ、飽血率、飽血後の成ダニ体重、産下された卵重量、幼ダニの孵化率について調べた。また、マダニ吸血後のウサギ血清を回収し、2.2と同様にELISAを用いて、抗原特異的抗体価を測定した。

2.4 統計解析

飽血後の成ダニ体重、産下された卵重量については、ウェルチの *t* 検定を用いた。飽血率ならびに産下された卵の幼ダニへの孵化率については、 χ^2 乗検定を用いた。すべての検定において $P < 0.05$ で有意差ありとした。

3. 結果と考察

3.1 ワクチン抗原としての組換えペルオキシレドキシシンの精製

ワクチン抗原として十分な量を確保するために、大腸菌の大量培養を行い、得られた組換え体についてはHis-tagカラムを用いたクロマトグラフィによって精製を行った後、SDS-PAGEで確認を行った (Fig. 1)。その結果、His-tagタンパク質の約3 kDaを含めた約27kDaの分子量付近に組換えペルオキシレドキシシン (rHlPrx2) が認められた (矢印)。

組換えペルオキシレドキシシンは、大腸菌を用いた大量培養を行ったところ、可溶性画分に検出さ

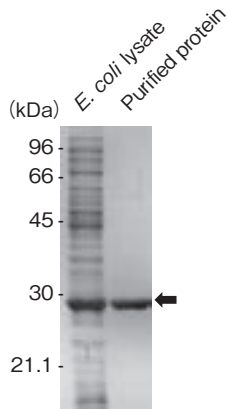


Fig. 1 Purification of recombinant *Haemaphysalis longicornis* 2-Cys Peroxiredoxin (rHlPrx2). rHlPrx2 was expressed in *E. coli* and the purified by FPLC. The *E. coli* lysate and purified rHlPrx2 were analyzed by SDS-PAGE and CBB stain. Molecular weight is shown on left side of the figure.

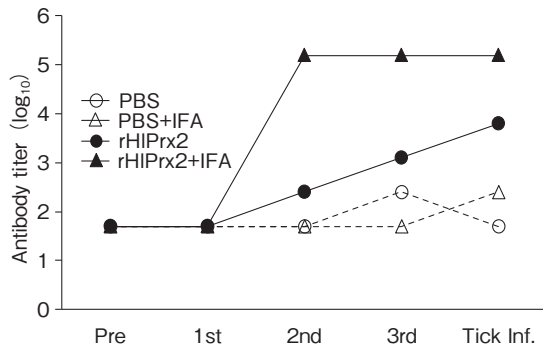


Fig. 2 Antibody titer (\log_{10}) in a vaccinated rabbit serum. Antibody titers were defined as the dilution rate (\log_{10}) under $0.5 < OD_{450nm}$. Pre, Pre-vaccination (0 week); 1st, 1st vaccination after 1 week (1 week); 2nd, 2nd vaccination after 1 week (3 weeks); 3rd, 3rd vaccination after 1 week (5 weeks); Tick Inf., after Tick infestation.

れたため、正しい巻き戻しが行われていることが考えられた。

また、組換え体のHis-tagカラムを用いたクロマトグラフィによる精製により、大腸菌由来タンパク質を十分に排除でき、免疫に使用可能な濃度を確保することに成功した。

3.2 組換えペルオキシレドキシンのワクチン

免疫の宿主に対する効果およびマダニの吸血、産卵、孵化率に及ぼすワクチンの影響

コントロール群 (PBS, PBS + IFA) ではほとんど組換えペルオキシレドキシンの対する特異的抗体価の上昇が観察されなかった (Fig. 2)。組換えペルオキシレドキシンのみおよび組換えペルオキシレドキシ + IFAを免疫した群 (rHlPrx2, rHlPrx2 + IFA) において、組換えペルオキシレドキシに対する顕著な抗体価の増加が認められ、IFAとともに免疫した群において2回目免疫以降の抗血清では、抗体価が一定となった (Fig. 2)。しかし、組換えペルオキシレドキシンのみの免疫でも特異的抗体価の増加が確認され、アジュバントなしでも宿主免疫を誘導できることが明らかとなった (Fig. 2)。また、3回目免疫後のウサギで雌成ダニを吸血させたところ、組換えペルオキシレドキシンのみを免疫した群において特異的抗体価の増加が観察され、組換えペルオキシレドキシに対する抗体は、組換えペルオキシレドキシのみならず雌成ダニの内在型のペルオキシレドキシに反応を示すことが推察された (Fig. 2)。

肝臓において、宿主への感染後、宿主体内中にペルオキシレドキシを分泌し、獲得免疫を司るTh2免疫経路を活性化し、Th1免疫経路を主とする宿主の非特異的な自然免疫から免れている可能性が示唆されている⁶⁾。また、リウマチ原虫の組換えペルオキシレドキシをマウスに免疫するとTh2免疫経路が活性化されることも示されている⁷⁾。これらのことから、マダニにおいても宿主体内へペルオキシレドキシを放出することで、宿主のTh2免疫経路を活性化し、マクロファージ、樹状細胞、そして好中球の遊走などにつながるTh1免疫経路活性化を抑制し、吸血をより成功しやすくしている可能性が考えられた。

免疫宿主で吸血させた雌成ダニでは、飽血率、

飽血体重、卵重量、孵化率において有意な差は認められなかった (Fig. 3 A and B, Table 1)。ところが、組換えペルオキシレドキシンのみ免疫ウサギ

で吸血させた雌成ダニにおいて、飽血体重および卵重量の減少傾向が認められた (Fig. 3 A and B)。

以上のことから、ウサギにおいて、組換えペルオキシレドキシンのみ免疫はマダニの吸血および産卵への顕著な影響は及ぼさないが、マダニの吸血および産卵を抑制する可能性が示唆された。さらに、組換えペルオキシレドキシンのみ免疫によりマダニの飽血体重および卵重量で減少傾向を示したことから、アジュバントなし免疫への応用の可能性が十分に考えられた。この組換えペルオキシレドキシンのみ免疫に宿主へ免疫を付与することは、ペルオキシレドキシンの10量体という高分子を形成することに起因すると考えられる⁵⁾。しかし、ペルオキシレドキシンの上述のようなTh1/Th2免疫経路への作用がある可能性がマダニにおいても十分に想定されるため、免疫経路に関する詳細な検討が必要であると考えられる。

4. 要 約

今回、我々は、マダニ由来ペルオキシレドキシンのみを用いたマダニワクチンの検討を行った。大腸菌を用いて作製した組換えマダニペルオキシレドキシンのみでも十分な抗体価を誘導でき、さらに、ウサギ体内にできた特異的抗体が、マダニ吸血に対し反応を示した。実際に免疫ウサギで雌成ダニを吸血させたところ、飽血率、飽血体重、卵重量、孵化率において有意な差は認めら

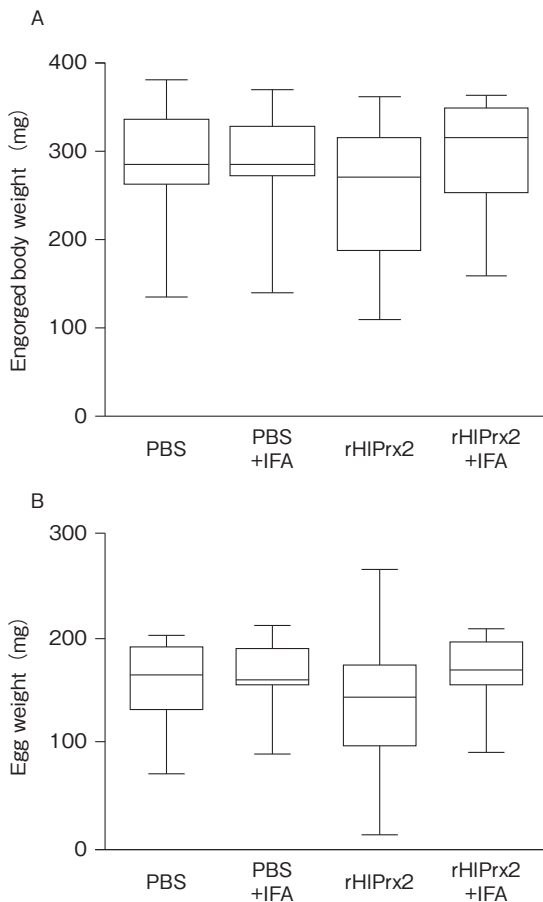


Fig. 3 Effects of rHIPrx2 vaccination to adult female ticks. Thirty four ticks were infested to each rabbit. (A) Engorged body weight of adult female ticks. (B) Weight of eggs laid by engorged adult female ticks. The bars in each box plot indicate the median of each group.

Table 1 Effects of rHIPrx2 vaccination to female ticks in rabbit

Antigen	Engorged rate (%)	Engorged body weight (mg)	Egg weight (mg)	Hatching rate (%)
PBS	91.3	273.2 ± 56.8	159 ± 32	100
PBS + IFA	82.6	278.5 ± 53.4	167 ± 27	100
rHIPrx2	95.7	242.8 ± 79.9	138 ± 57	90.5
rHIPrx2 + IFA	100	286.9 ± 54.9	170 ± 28	100

PBS, Phosphate Buffered Saline ; IFA, Incomplete Freund's Adjuvant ; rHIPrx2, recombinant *Haemaphysalis longicornis* 2-Cys Perxiredoxin.

れなかったが、組換えペルオキシレドキシンのみ免疫群において飽血体重と卵重量の抑制効果が観察された。以上の結果から、組換えマダニペルオキシレドキシンの免疫は雌成ダニの吸血に大きな影響を及ぼさないが、アジュバントなし免疫への応用の可能性が十分に考えられた。しかし、他の寄生虫では免疫応答経路特異的な作用も考えられるため、より詳細な検討が必要であると考えられる。

文 献

- 1) Willadsen, P., Bird, P., Cobon, G.S., Hungerford, J. : Commercialisation of recombinant vaccine against *Boophilus microplus*, *Parasitol.*, **110**, 43~50, 1995.
- 2) Galay, R.L., Aung, K.M., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Matsuo, T., Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Suzuki, H., Xuan, X., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. : Multiple ferritins are vital to successful blood feeding and reproduction of the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, *J. Exp. Biol.*, **216**, 1905~1915, 2013.
- 3) Galay, R. L., Umemiya-Shirafuji, R., Bacolod, E.T., Maeda, H., Kusakisako, K., Koyama, J., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. : Two kinds of ferritin protect ixodid ticks from iron overload and consequent oxidative stress, *PLoS ONE*, **9**, e90661, 2014.
- 4) Galay, R.L., Miyata, T., Umemiya-Shirafuji, R., Maeda, H., Kusakisako, K., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. : Evaluation and comparison of the potential of two ferritins as anti-tick vaccines against *Haemaphysalis longicornis*, *Parasit Vectors*, **7**, 482, 2014.
- 5) Kusakisako, K., Masatani, T., Miyata, T., Galay, R.L., Maeda, H., Talactac, M.R., Tsuji, N., Mochizuki, M., Fujisaki, K., Tanaka, T. : Functional analysis of recombinant 2-Cys peroxiredoxin from the hard tick *Haemaphysalis longicornis*, *Insect Mol Biol.*, **25**, 16~23, 2016.
- 6) Donnelly, S., Stack, C.M., O'Neill, S.M., Sayed, A.A., Williams, D.L., Dalton, J.P. : Helminth 2-Cys peroxiredoxin drives Th2 responses through a mechanism involving alternatively activated macrophages, *FASEB J.*, **22**, 4022~4032, 2008.
- 7) Daifalla, N.S., Bayih, A.G., Gedamu, L. : Immunogenicity of *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase B1 and peroxiredoxin 4 in BALB/c mice : the contribution of Toll-like receptor agonists as adjuvant, *Exp Parasitol.*, **129**, 292~298, 2011.

食肉からの感染源となるトキソプラズマの休眠型虫体に関する研究

Studies on *Toxoplasma* dormant parasite as a source of food-borne disease

加藤 健太郎

(帯広畜産大学原虫病研究センター)

Kentaro Kato

(National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

The parasite could not be eliminated completely in farm animal because actual anti-Toxoplasma drug induces the transfer from active form to dormant form of *Toxoplasma gondii*. Therefore, the strategy to eliminate the dormant parasite which might become reservoir of *Toxoplasma* in meat for eating should be established. The aim of this research is to detect the drug seed which eliminate the dormant parasite in meat and analyze the mechanism for *Toxoplasma gondii* to transfer to dormant form, reservoir of *Toxoplasma* in meat for eating. To accelerate the investigation of bradyzoite differentiation mechanisms, we constructed reporter parasite for high throughput assay. Actually the drug screening to inhibit the tachyzoite growth has been performed using the national compound library. Next the toxicologic test to the host cells have been performed using the compounds selected at the above screening. The inhibition tests for the transfer to dormant parasite have been performed. Finally we have succeeded in obtaining 2 compounds.

1. 目的

トキソプラズマ原虫は、マラリア原虫等と同じくアピコンプレックス門に属する原虫であり、猫科動物を終宿主とする人獣共通感染症である。世界中で発症が見られ、ヒトでも高い感染率を示している。妊婦が感染すると、流産や胎児の脳症、痙攣、水頭症、頭蓋内石灰化等を起こす。健康な成人では通常無症状であるが、胎児・幼児、臓器移植やエイズの患者など、免疫抑制状態にある場合には重症化して死に至ることもあり、重篤な日和見感染症である。重症化した場合には、脳炎や神経系疾患を起こしたり、肺・心臓・肝臓・眼球

などの臓器を破壊する。予防するためのワクチンはない。2012年9月23日に先天性トキソプラズマ & サイトメガロウイルス感染症患者会（トーチの会）が設立され、NHKでもその被害が取り上げられた。三井記念病院の小島俊行医師らの報告では、ユッケやレバ刺しの食用等の近年の食習慣の変化に伴い、先天性トキソプラズマ症が拡大し、思春期に症状が出ることもあることから無自覚のものも含めると我が国の新生児において年数百件の被害があると推定されている。このような状況の中、研究代表者はトキソプラズマ原虫の急性感染虫体の増殖と潜伏感染への移行をともに阻止する薬剤のスクリーニング系を開発した（特願

2014-109262)¹⁾。本研究では、このスクリーニング系を用いて同定した薬剤を使って潜伏感染誘導機構について解析を行う。

トキソプラズマ原虫は他の原虫と同様に、独特で複雑なライフサイクル（感染環）を持ち、基本的には栄養型（タキゾイト）、休眠型（シスト：数千に及ぶブラディゾイトが充填）、虫卵（オーシスト）の3つの形態をとる。ヒトを含めてほぼすべての哺乳類、鳥類に感染する可能性があることから、食肉は種類によらず感染源になりうる。感染動物由来の食肉を生食したり、加熱が不十分である場合、あるいは終宿主であるネコの糞中のトキソプラズマのオーシストが口の中に入ることによって、ヒトを含め、様々な動物がトキソプラズマに感染し、感染した動物の組織内でシストを形成する。本研究では、食肉由来感染症のトキソプラズマについてこの感染阻止を目指して、実際の感染源となる休眠型虫体の性状解析を行う。

我が国において近年問題となっている妊婦の初感染による胎児へのトキソプラズマの垂直感染の大きなリスク因子は肉の生食習慣にあることが、2012年に報告された²⁾。食肉用の生産家畜に対する有効なワクチンは我が国では認可されていない。また、薬剤による治療は急性トキソプラズマ症を阻止することはできるものの、感染源となる潜伏感染虫体を排除できないため、トキソプラズマ症と判断されない食肉が市場に出回る原因となっている。トキソプラズマ研究においては、フラスコ内で容易に実験が可能な急性感染期（栄養型）に関するものが多いが、一方、宿主体内における潜伏感染期（休眠型）への移行の仕組みや潜伏感染を司る機構については未解明の部分が多い。そこで、我々はこれまでに潜伏感染への移行の鍵となるシグナル因子の機構解析や抗原虫薬の開発を行ってきた^{3~6)}。

現在のところ、畜産動物に対するトキソプラズ

マ薬はサルファ剤を基本とした古典的なものであり、また病態を引き起こす急性感染虫体（栄養型）を潜伏感染虫体（休眠型）へと移行させるだけで根本的な駆虫に至らないものである。したがって、トキソプラズマの感染源となる食肉中の潜伏感染虫体の性状解析を行うことで潜伏感染虫体を防除できる方策を確立する必要がある。本研究の目的は、食肉がトキソプラズマの感染源となる原因である潜伏感染が起こる仕組みの解明を行うことである。

2. 方法

2.1 栄養型虫体の虫体を抑える薬剤のスクリーニング

我々は潜伏感染特異的に発現する遺伝子のプロモータの下流にレポーター遺伝子（ホタルルシフェラーゼ）を組入れたトキソプラズマ原虫株を作成した。また、同時に当原虫株は恒常的に発現する遺伝子のプロモータの下流に別のレポーター遺伝子（ウミシイタケルシフェラーゼ）を組入れたことで、潜伏感染状態、および原虫の増殖を同時に、高感度で多検体を評価できる系の確立に成功した（特願2014-109262；Fig. 1）¹⁾。本研究では、まずこのトキソプラズマ原虫株と東京大学の創薬オープンイノベーションセンターの約3000種

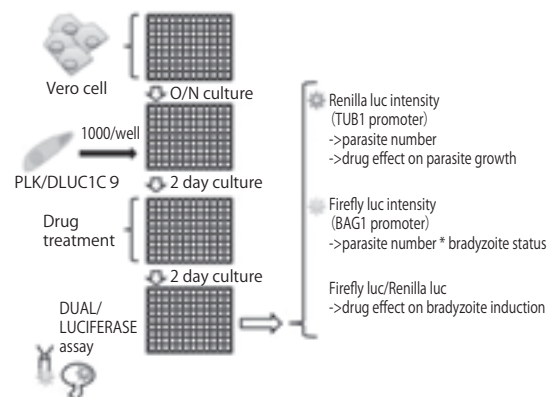


Fig. 1 Overview of drug screening.

類の公的化合物ライブラリを用いて、栄養型虫体の増殖を抑える薬剤（薬剤濃度：10 μ M）のスクリーニングを行った。

2.2 宿主細胞への毒性試験

2.1で得られた化合物について、宿主細胞への毒性試験を行った。つまり、将来的に薬剤として使用することを考え、ヒトを含めた宿主動物への副作用（毒性）のある化合物を除外することを目的とした解析である。また、本実験は被検化合物自体が宿主細胞を死滅させることの影響から一見原虫自体が死滅しているように見えているケースを除外するためでもある。本実験ではCell titer Glo (Promega) を用いて、宿主細胞のATP活性測定することで、細胞の生死判定を行った。

2.3 栄養型虫体から休眠型虫体への移行を抑制する薬剤のスクリーニング

2.2で得られた化合物について、我々の開発したトキソプラズマ株（特願2014-109262）を用いて潜伏感染への移行を反映するルシフェラーゼ活性を測定することで潜伏活性の阻止効果の評価を行った。結果として、栄養型虫体の増殖と抑制し、宿主への毒性も低く、休眠型虫体への移行も抑制する薬剤シーズをスクリーニングすることができる。

3. 結果と考察

栄養型虫体の増殖阻害率の解析を行った。解析を行った約3000種類の化合物について、解析のブレの度合いが統計的な有意値の閾値（Z値が0.5以上）の中に収まったものは、1148種類であった。当初の予想より解析のブレが大きく、ブレが大きいものは再度解析をやり直し、一回目の結果と合わせて、最終的な解析結果を得た。原虫の増殖を阻止する薬剤の陽性対照としてピリメタミンを用いた。増殖阻害活性が100%以上のもの（ピリメタミンより高いもの）は、85化合物得られた。ま

た、90-100%のものは、28化合物であった。100%以上を示した化合物の中で既知の薬剤の内訳は、抗生物質、抗真菌薬、抗マラリア薬、抗精神病薬、抗癌薬等であった。

上記のスクリーニングで絞り込まれた85化合物について宿主細胞への毒性試験（薬剤濃度：10 μ M）を行った結果、宿主細胞生存率が60%以上のものについて細胞毒性が低いと評価した。その結果、細胞毒性が低いとされる32化合物を絞り込んだ。これらの既知化合物の内訳は、抗精神病薬8化合物、イオンチャネル作用薬5化合物、抗生物質5化合物、キナーゼ阻害薬2化合物、微小管形成阻害薬2化合物、抗腫瘍薬2化合物、HDAC1阻害薬2化合物、その他6化合物である。

次に、ここまで絞り込まれた32化合物について、潜伏感染への移行に抑制的に働く薬剤のスクリーニングを行った。その結果、2化合物について潜伏感染への移行が陰性コントロールの薬剤と比較して有意に抑制した。

我々が開発したトキソプラズマの薬剤スクリーニング系について実際に薬剤ライブラリを用いることで、薬剤スクリーニングが可能であることを明らかにした。さらに薬剤スクリーニングと宿主細胞への毒性試験、休眠型虫体への移行抑制試験の結果、被検化合物数1148個中、栄養型虫体および休眠型虫体の両方の増殖、移行抑制に効果のある薬剤候補化合物として2化合物を得ることに成功した。

従来までのトキソプラズマ研究は、栄養型のタキゾイドによる活性化期の研究が盛んに行われてきたが、休眠型のブラディゾイトを内包するシストによる潜伏期に関する研究はほとんど行われていないことから、本研究は独創的な研究成果である。潜伏感染へ誘導せずに虫体を根治できる、あるいは休眠型虫体の特異的に破壊する理想的な抗トキソプラズマ薬の開発に直接つながる意義があ

る。

4. 要 約

畜産動物に対するトキソプラズマ薬では病態を引き起こす急性感染虫体を潜伏感染虫体へと移行させるだけで根本的な駆虫に至らないため、トキソプラズマの感染源となる食肉中の潜伏感染虫体を防除できる方策を確立する必要がある。本研究の目標は、トキソプラズマの感染源となる潜伏感染を阻害できる薬剤の同定を行うことで、食肉がトキソプラズマの感染源となる原因である潜伏感染が起こる仕組みを解明することである。多検体で高感度に原虫の潜伏感染状態と増殖を評価できる系を確立し、公的化合物ライブラリを用いて栄養型虫体の増殖を抑える薬剤のスクリーニングに成功した。次に、得られた薬剤について宿主細胞への毒性試験も行った。さらに、ここまで絞り込まれた薬剤シーズについて潜伏感染への移行抑制試験を行い、2化合物を得ることに成功した。

文 献

- 1) Sugi, T., Masatani, T., Murakoshi, F., Kawazu, S., Kato, K. : Microplate assay for screening *Toxoplasma gondii* bradyzoite differentiation with DUAL luciferase assay, *Anal Biochem*, **464C**, 9~11, 2014.
- 2) Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., Nakata, M., Yasuda, T., Ikenoue, T., Kojima, T. : Anti-*Toxoplasma* antibody prevalence, primary infection rate, and risk factors in a study of toxoplasmosis in 4,466 pregnant women in Japan, *Clin Vaccine Immunol*, **19**, 365~367, 2012.
- 3) Sugi, T., Kawazu, S., Horimoto, T., Kato, K. : A single mutation in the gatekeeper residue in TgMAPKL-1 restores the effect of bumped kinase inhibitor on cytokinesis arrest, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **5**, 18, 2015.
- 4) Sugi, T., Kobayashi, K., Gong, H., Takemae, H., Ishiwa, A., Iwanaga, T., Horimoto, T., Akashi, H., Kato, K. : Identification of mutations in TgMAPK1 of *Toxoplasma gondii* conferring the resistance to 1NM-PP1, *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, **3**, 93101, 2013.
- 5) Kato, K., Ishiwa, A. : Roles of carbohydrates in the infection strategies of enteric pathogens, *Trop Med Health*, **43**, 41~52, 2015.
- 6) Kato, K., Murata, Y., Horiuchi, N., Inomata, A., Terkawi, M. A., Ishiwa, A., Ogawa, Y., Fukumoto, S., Matsuhisa, F., Koyama, K. : Dextran sulfate inhibits acute *Toxoplasma gondii* infection in pigs, *Parasit Vectors*, **9**, 134, 2016.

鶏肉の生産性向上を目指した安全な原虫防除法の開発

Construction of protective system against protozoan diseases for
productivity improvement in poultry industry

松 林 誠・谷 浩 行

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

Makoto Matsubayashi and Hiroyuki Tani

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

Chicken coccidiosis is caused by protozoan parasites, *Eimeria* spp., which are members of the phylum Apicomplexa. The disease is characterized as watery or bloody diarrhea in chickens, resulting in death, and thus, this possesses high impact in the poultry industry worldwide. After ingestion of the oocysts by the host, *Eimeria tenella* generates a complex life cycle including several asexual reproductions followed by sexual reproduction in the caeca. In this process, the second-generation schizonts grow extremely huge including many merozoites in the lamina propria, and consequently destroy the tissues. In the present study, we constructed *E. tenella* specific DNA microarray using EST sequences registered in database, and analyzed by cDNAs during the development of the schizonts to identify the vaccine candidates against the disease. As results, the up-regulated genes in an early development of the schizonts were found to be involved in cytoskeletal genes or some peptidases, and while, some proteases or mitochondrial related genes were up-regulated at latter development. Now, we try to construct the oral immune system using nonpathogenic *Escherichia coli*, on which surface membrane target proteins are expressed. These data are useful for screening the key genes for the developments of the schizonts, and the molecules could be targets to produce mucosal immunity for controlling the chicken coccidiosis.

1. 目 的

鶏コクシジウム症は、*Eimeria*属原虫によって引き起こされる感染症である。感染した鶏は下痢や血便を呈し、重篤化した場合は死亡する。成鶏では一般に無症状で耐過することも多い。しかし、採卵鶏では産卵率の低下をまねき、また幼雛では感受性が高く、感染鶏が致死しない場合でも、肥育効率の著しい低下をきたす。2007年に行

われた生産現場における*Eimeria*属原虫の全国調査では、肉用鶏農家で7割、採卵鶏農家で5割の陽性率であり、本原虫は我が国で広く存在し、常在化していることが示されている¹⁾。

鶏に寄生する*Eimeria*属原虫の生活環は、以下のとおりである。感染鶏の糞便とともに排泄されたオーシスト（虫卵のようなもの）は、鶏の体外でその内部にスポロゾイトと呼ばれる虫体を形成する。このオーシストは強固な殻に包まれてお

り、外界環境下で長期間生存でき、かつ農家で一般に使用される薬剤に対して強い抵抗性を有する。そのため、いったん、農場がオーシストにより汚染されると、清浄化は極めて困難となる。感染は、このオーシストを鶏が経口的に摂取することによる。摂取されたオーシストは腸管内で脱囊し、つまりオーシストからスポロゾイトが遊離し、腸管粘膜に侵入する。その後、粘膜内で数回の無性生殖、そして有性生殖を行い、新たなオーシストが産出される。この増殖の過程において、腸管粘膜は損傷し、感染鶏は下痢および血便症状を生じることとなる。

鶏コクシジウム症の予防としては、抗コクシジウム作用を有する飼料添加物が使用されている。しかし、鶏畜産物への残留問題や副作用等から、鶏には低用量で使用されるため、原虫の感染を完全に阻止できない。そのため、発症は予防できても、消化管内で増殖した原虫は糞便とともに排泄される。また、採卵鶏では使用は認められておらず、肉用鶏では出荷前には投薬ができない等、使用には厳しい制限がある。そのため、原虫の感染を完全に阻止できる防除法の開発が強く希求されている。

本研究課題では、*Eimeria*属原虫の中でも、最も病原性が高いとされる盲腸寄生性の*Eimeria tenella*について、以下の解析を行った。これまでに我々は、*E. tenella*の病態発現は、第2代目の無性生殖に大きく依存することを確認している²⁾。つまり、3代あるうちの第2代目の無性生殖期のみ、シゾンとよばれる分裂体(繁殖体)は腸管粘膜深層に寄生し、また大きく発育し、組織を著しく破壊する。この点に着目し、第2代シゾンの形成を阻止すれば、病態は発現せず、かつ*E. tenella*の生活環を遮断できると考えた。本研究では、薬剤を使用しない新規防除法を提案すべく、新たなワクチン抗原となる標的分子を探索す

るため、シゾン形成に必須となる遺伝子の同定を試みた。

2. 方法

2.1 感染盲腸の採取

2週齢の幼雛に*E. tenella*孢子形成オーシストを 2×10^4 個投与し、経時的に寄生部位である盲腸を採取した。盲腸は、滅菌PBSで洗浄後、ティシュー・テックO.C.T.コンパウンド(サクラファインテックジャパン)に包埋し、使用まで -80°C で保管した(動物実験承認番号 第12-072号)。

2.2 第2代無性生殖期虫体の採取

包埋した感染盲腸は、凍結状態のままクリオスタット(Leica Microsystems)により薄切し、トルジンブルーで染色した。顕微鏡下で第2代シゾンを鑑別し、形態的に4つのステージ(1:虫体の直径 $15\mu\text{m}$ 以下の発育初期未成熟シゾン、2: $15\sim 30\mu\text{m}$ の発育中期未成熟シゾン、3: $30\mu\text{m}$ 以上の発育後期未成熟シゾン、4: $30\mu\text{m}$ 以上のメロゾイト包含成熟シゾン)に分類し、それぞれの虫体をレーザーマイクロダイセクションシステム(LMD6000 MPP, Leica Microsystems)により採取した。採取した原虫のtotal RNAはRNeasy Mini Kit(Qiagen)で抽出後、Takara RNA PCR Kit(AMV) Ver3.0(Takara Bio)によりcDNAを合成した。

2.3 マイクロアレイの構築とデータ解析

NCBIおよびTGI databaseに登録されているEST情報を基に、約3,000の遺伝子について特異プローブを設計し、カスタムマイクロアレイ(Agilent Technologies)を作製した。プローブとした遺伝子情報の最適化は、CLC Genomics Workbenchを用いて再BLAST検索を行い、最新のアノテーション付けを行った。合成した各発育ステージのcDNAとハイブリダイゼーションを行い、Array-Pro Analyzerにより蛍光強度値の定

量を行った。シゾントの形成過程において、強発現する遺伝子を選別した。

2.4 選定遺伝子の発現解析

マイクロアレイ解析により発現の変動が認められた遺伝子について、いくつかを抽出し、同上的方法によりcDNAを合成し、リアルタイムPCR (PCR LightCycler[®] 1.5, Roche Diagnostics) を行い、比較Ct法により発現解析を行った。

3. 結果と考察

マイクロアレイ解析のプロープとしたEST遺伝子情報について、再BLASTによる最適化を行ったところ、遺伝子情報が不明であった435遺伝子について、新たにアノテーションを付加することができた。マイクロアレイの結果の集計は、各ステージにおいて2倍以上発現が変動している遺伝子を抽出した。その結果、シゾントの内部における細胞分裂期と考えられるステージ1から2、および2から3では、それぞれ412、523の遺伝子(細胞骨格関連遺伝子やペプチダーゼ等)の発現が上昇していた。この時期において、シゾント内部では核分裂とそれに続く細胞質の分裂が行われていると考えられ、これらの遺伝子は虫体の分裂期に関与することが示唆された。ステージ3から4では、システインプロテアーゼやミトコンドリア関連遺伝子等、190の遺伝子が発現上昇し

ていた。ステージ3から4では、シゾント内部において多数のメロゾイトが形成され、成熟した後、これらのメロゾイトは遊離する。その後、メロゾイトは再度、腸管粘膜に侵入し、第3代目の無性生殖を行う。したがって、ステージ3から4は、次世代の侵入型の虫体の分化期と位置づけられ、これらの遺伝子はメロゾイトの成熟に必須の遺伝子が含まれている可能性があると考えられた。

第2代無性生殖期の虫体の発育に伴って、発現上昇が認められたいくつかの遺伝子について、リアルタイムPCRにより、発現変動を確認した。その結果の1部をFig. 1に示す。Toxomepsinは*E. tenella*と極めて近縁な原虫であるトキシプラズマ原虫が産生するaspartic proteaseの1種であり³⁾、Cathepsin C3はlysosomal cysteine proteaseの1種⁴⁾、Microneme protein 3は、*Eimeria*原虫の宿主細胞への侵入に関与すると考えられている⁵⁾。その結果、抽出した遺伝子において、リアルタイムPCRとマイクロアレイの結果との整合性を得ることができた。

現在、我々は、非病原性大腸菌の表層に標的分子を発現させ、死菌として鶏に経口的に摂取させ、粘膜免疫を惹き起させるシステムの開発に取り組んでいる。マイクロアレイの結果については、現在、さらに詳細にデータ解析を進めている段階ではあるが、これらのシゾント形成に関与する遺

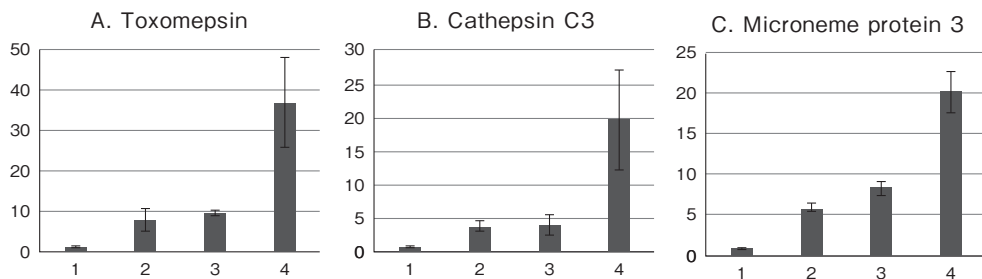


Fig. 1 mRNA expression levels of some genes in four types for developmental stages of *E. tenella* (1, <10 μ m early stage; 2, 10-25 μ m small immature schizonts; 3, 25-30 μ m large immature schizonts; 4, >30 μ m mature schizonts). The vertical axes show the fold of relative mRNA expression levels compared with those of No. 1. A : Toxomepsin, B : Cathepsin C3, C : Microneme protein 3.

伝子は、その有効なワクチン抗原となると期待される。

4. 要 約

本研究課題では、養鶏現場において多大な損害をもたらす鶏コクシジウム症について、現行の抗コクシジウム剤に代わる新規防除法を開発するために、以下の解析を行った。高病原性である*E. tenella*について、鶏体内での増殖を遮断するため、その分化・増殖に必須となる遺伝子の同定を試みた。*E. tenella*では、鶏盲腸粘膜内での第2代目の無性生殖期において、鶏が致死する等の病態が発現する。このため、*E. tenella*に特異的なマイクロアレイを構築し、第2代無性生殖期における網羅的発現解析を行った。その結果、シズントの内部における細胞分裂期と考えられるステージでは、細胞骨格関連遺伝子やペプチダーゼ等、約500の遺伝子の発現が上昇していた。また、シ

ズントの内部で次世代の侵入型の虫体を形成する分化・成熟期では、システインプロテアーゼやミトコンドリア関連遺伝子等、190の遺伝子が発現上昇していた。これらの遺伝子には、虫体の分化・増殖に必須の遺伝子が含まれていると考えられた。

文 献

- 1) Nakamura, Y., Kanehira, K., Isobe, T., Kamio, T. : *Bull Natl Inst Anim Health*, **117**, 1~10, 2010.
- 2) Matsubayashi, M., Hatta, T., Miyoshi, T., Anisuzzaman Alim, M. A., Yamaji, K., Shimura, K., Isobe, T., Tsuji, N. : *Parasitology*, **139**, 1553 ~ 1561, 2012.
- 3) Zhao, G., Zhou, A., Lu, G., Meng, M., Sun, M., Bai, Y., Han, Y., Wang, L., Zhou, H., Cong, H., Zhao, Q., Zhu, X. Q., He, S. : *Parasit Vectors*, **6**, 175, 2013.
- 4) Turk, B., Turk, D., Turk, V. : *Biochim Biophys Acta*, **1477**, 98~111, 2000.
- 5) Labbé, M., de Venevelles, P., Girard-Misguich, F., Bourdieu, C., Guillaume, A., Péry, P. : *Mol Biochem Parasitol*, **140**, 43~53, 2005.

豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚と一般ランドレース豚との自然免疫関連分子および腸内環境比較

Comparison of innate immune related molecules and an entral environment between landrace pigs that have been selected for genetic resistance to mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) and normal landrace pigs

佐久間 晶子・吉野 淳良・高橋 伸和・野地 智法*・須田 義人**・麻生 久*

(宮城県畜産試験場, *東北大学大学院農学研究科, **宮城大学食産業学部)

Akiko Sakuma, Jyunryo Yoshino, Nobukazu Takahashi, Tomonori Nochi*, Yoshihito Suda** and Hisashi Aso*

(Miyagi Livestock Experimental Station, Miyagi, Japan, *Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,

**Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University)

Chronic respiratory infectious disease of swine poses a huge economic threat to the swine industry. The over-use of antibiotics could result in drug resistant bacteria, while antibiotics are commonly used to avoid these infectious diseases. We developed the landrace pig breed to be genetically resistant to Mycoplasmal pneumoniae of swine (MPS) caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* (M.hp). In this study, we fed the MPS resistant landrace pig breed (LA) and the general landrace pig breed (Cont.) without a vaccination for MPS and compared between the MPS resistant landrace pig breed (LA) and the general landrace pig breed (Cont.) pathologically and immunologically. We also compared intestinal flora between them. LA has less macroscopic and microscopic lung lesions than Cont. and has more OTU area of *Clostridium* cluster IV. The quantity of TLR2, IL-12p40, TNF- α , and IFN- γ in LA have a less tendency than Cont. The histological lung lesion scores in LA have a positive correlation with the quantity of TLR2 and IFN- γ , and they also has a negative correlation with the quantity IL-12p40 in spite of the histological lung lesion score in LB having a negative correlation with the quantity TLR2 and IFN- γ . Also, the histological lung lesion scores have a negative correlation with the OTU area of *Clostridium* cluster IV in all samples. In conclusion, these findings suggest that LA has a MPS resistance without having a vaccination for MPS, and it also suggests that LA has a different immunological mechanism than Cont. Additionally, *Clostridium* species in intestinal flora might play a role in lung lesions occurring in pigs.

1. 目 的

豚マイコプラズマ性肺炎 (MPS) は、豚の慢性呼吸器感染症の一つとして知られ、*Mycoplasma*

hyopneumoniae (M.hp) により引き起こされる¹⁻³⁾。

また、MPSは豚呼吸器複合感染症の一つの原因として考えられており、養豚業界に多大な経済的損失を生んでいる⁴⁾。M.hpが宿主の肺に感染し、

MPSが発症すると、肺は肉眼的に赤色から暗赤色調を呈し、触診では肝臓のような充実性の組織に変化する。この病変は、肺の赤色肝変化病変と言われ、MPSの肉眼的特徴病変として知られており、と畜時の内臓検査で多く認められる肉眼病変である^{1~3, 5)}。

このような感染症の制御方法として、ワクチン接種、抗菌性物質投与、SPF豚の利用などがあるが、養豚農家の経済負担は大きく、さらに豚への抗菌性物質の過剰使用は、ヒトの医療現場でも問題である薬剤耐性菌出現の可能性を増大させる⁶⁾。

近年、豚の感染症防御策の一つとして、抗病的育種が注目され、宮城県畜産試験場では、MPS肉眼的特徴病変「両側性赤色肝変化病変」の面積を少なくする方向に改良を重ね、MPS病変面積育種価が低いランドレース種系統豚「ミヤギノL2」(LA)の造成に成功した^{7, 8)}。

MPS病変は、M.hpへの宿主免疫の過剰反応により起こり、豚の肺のMPS病変形成には、自然免疫に関与するパターン認識受容体(TLR)のTLR2およびTLR6が、強く関与していることが示唆されている⁹⁾。また近年、腸内細菌叢は、生体免疫に大きな影響を及ぼし、感染防御や様々な内科的疾患に大きく関与していることが示唆され、ヒトの医療現場だけでなく、畜産業界でも注目されている¹⁰⁾。

今回、MPSワクチン未接種のLAと一般ランドレース純粋種(Cont.)を同一環境下で飼育し、肺の肉眼および組織学的病変を調査し、M.hp抗原量、TLR2・TLR6 mRNA量を比較した。さらに、腸内細菌叢調査し、病変との比較を行なった。

2. 方 法

2.1 供試豚および血清学的調査

豚繁殖・呼吸障害症候群陰性養豚場から、103.2日齢のLA(6頭)とControl(6頭)を、同

じ一般飼育豚舎にて、抗菌性物質無添加飼料を飽食させ、飼養し、171.2日齢にて、と畜をした。全供試豚に対し、試験開始前までに豚胸膜性肺炎、豚丹毒、豚サーコウイルス関連疾病のワクチンを接種し、MPSワクチンのみ接種しなかった。飼養後、採血・採糞し、血清生化学的に、TP, Alb, A/G, Tchol, Glu, AST, GT, BUN, CRPを測定し、Porcine Chemokine/Cytokine Panel 9plex Kit (affymetrix, Austria)を用いて、IFN- α , IFN- γ , IL-1 β , L-10, IL-12p40, IL-4, L-6, IL-8, TNF- α をマルチプレックスアッセイ法(Bio-Plex MAGPIX system (BIO-RAD, USA))により測定した。

2.2 肺病変調査およびM.hp抗原量測定

供試豚から、と畜時の内臓検査の際に肺を採取し、検体ごとに肉眼的にMPS肺変化病変面積を測定した¹¹⁾。また、1検体ごとに肺左側前葉後部の右側中葉辺縁部の2カ所を採取し、一部をマイルドホルム(Wako, Japan)にて固定後、パラフィンブロックを作成し、もう一部は、5×5mm以下に加工後、Allprotect tissue reagent (QIAGEN, Germany)にて固定し、RNA抽出時まで-80℃にて保管した。パラフィン切片をHE染色し、組織学的病変スコアを測定した¹²⁾。組織学的に観察された病変4項目、肺胞壁の肥厚(Alveolar Septal Infiltration)、肺胞腔への炎症細胞浸潤(Alveolar Exudate)、気管支周囲リンパ組織の発達(Peribronchiolar Lymphoid Hyperplasia)、気管支粘膜への炎症細胞浸潤(Inflammation of Lamina Propria)について、その程度と、出現度に応じてスコアリングし(0:病変なし, 1:軽度・散在, 2:軽度・びまん性, 3:中程度・散在, 4:中程度・びまん性, 5:高度・散在, 6:高度・びまん性)、さらに、各項目スコアを合計した組織合計スコア(Total Microscopic Lesion Score)についても、調査対象とした¹²⁾。また、

M.hpに対する免疫組織化学染色も行い、抗原陽性度合いに応じて、M.hp抗原量を測定した（0：陰性，1：+，2：++，3：+++）。

2.3 mRNA相対定量

保存肺生材料から、Total RNAを抽出し、cDNAを作成後、Thermal Cycler Dice® Real Time System Lite (Takara, Japan)を用いて、TLR2, TLR6, IL12-p40, TNF- α , IFN- γ のmRNAを相対定量した（H遺伝子： β actin）。

2.4 腸内細菌叢調査

糞便からDNAを抽出し、T-RFLP法を用いて調査した（テクノスルガ・ラボ，Japan）。

2.5 統計解析

全統計量は、LAとCont.間の比較のため、F検定後、T検定を行い、定性結果については、Fisher's exact検定を行った。また、肉眼および組織学的病変スコアと各定量結果について、Pearson相関解析を行った。

3. 結果と考察

出荷時血清生化学的検査結果をTable 1に記載した。いずれも、正常値範囲内であり、LAはCont.と比較して、Alb, A/G, Gluが有意に高かった（ $p < 0.05$ ）。また、マルチプレックスアッセイでは、IL-12p40のみが検出され、Cont., LA間に差はなかった（Table 1）。

出荷時の肺の、内臓検査、肉眼および組織学的病変調査結果、ならびに、免疫組織化学染色結果について、Table 2に記載した。と畜時の肉眼的内臓検査により、定性的にMPSと判定された個体数について、LA, Cont.で差はなかったが、豚胸膜性肺炎と診断された個体数はCont.で有意に多かった（ $p < 0.1$ ）。また、Cont.では6頭中2頭で、免疫組織化学的にM.hp陽性と判断された。肉眼的肺肝変化病変面積は、Cont. 8.3%, LA 2.8%となり、LAで有意に少なかった（ $p < 0.1$ ）。また、

病理組織学的には、LAはCont.と比較して、組織合計スコアが少なく、内訳として肺胞壁肥厚スコア、肺胞腔内の炎症細胞浸潤スコア、気管支粘膜固有層への炎症細胞浸潤スコアで、有意に少なかった（ $p < 0.05$ ）。これらのことから、MPSワクチン未接種でも、LAはCont.よりも、MPS関連病変が有意に少なく、MPS抗病性を示すことが示唆された。

免疫関連分子mRNA定量結果を、Table 3に記載した。上述のように、LAとCont.で病変スコアに差がみられたが、肺内のTLR2, IL-12p40, TNF- α , IFN- γ 量は、Cont.でやや多く発現していたが、有意な差はなかった。TLR6量は、いずれの個体も検出限界以下だった。

出荷時の腸内細菌叢（T-RFLP法）結果は、Table 4に記載した。LAは、Cont.と比較して、*Clostridium cluster IV*のOTU面積が有意に大きく（ $p < 0.05$ ）、*Clostridium subcluster XIVa*のOTUは、LAのみに確認された（ $p < 0.05$ ）。また、*Clostridium cluster IV*・Spirochaetes門のOTU面積は、LAで、有意に小さかった（ $p < 0.1$ ）。

今回得られた、各病変スコアや抗原量の結果と、血液生化学、mRNA量、腸内細菌叢結果とで相関解析を行った（Table 5）。すべての検体を用いた解析で、正相関が γ GT-肺胞壁肥厚スコア（ $p = 0.06$ ）、*Clostridium cluster IV*・Spirochaetes門OTU面積-M.hp抗原量（ $p = 0.07$ ）でみられ、負の相関が、A/G-肉眼病変面積（ $p = 0.03$ ）、Glu-肉眼病変面積（ $p = 0.03$ ）、Bacteroides目-M.hp抗原量（ $p = 0.06$ ）、*Clostridium cluster IV*（肺胞腔内炎症細胞浸潤スコア： $p = 0.10$ 、気管支粘膜固有層への炎症細胞浸潤スコア： $p < 0.01$ 、組織合計スコア： $p = 0.03$ ）、*Clostridium cluster IV*-気管支粘膜固有層への炎症細胞浸潤スコア（ $p = 0.10$ ）、で認められた。

LA, Cont.をそれぞれに解析したところ、LAで

Table 1 Results of blood serum biochemical analysis

		Cont.	LA
		Average ± SD	Average ± SD
TP	g/dl	6.93 ± 0.2	6.93 ± 0.3
Alb	g/dl	4.55 ± 0.1	4.87 ± 0.3*
A/G	g/dl	1.93 ± 0.2	2.37 ± 0.3*
AST	g/dl	22.83 ± 9.0	34.50 ± 17.9
γGT	g/dl	47.33 ± 14.8	35.33 ± 7.2
BUN	g/dl	12.50 ± 3.5	10.78 ± 1.4
Tchol	g/dl	94.83 ± 5.8	98.83 ± 4.9
Glu	g/dl	79.00 ± 3.4	85.17 ± 5.0*
CRP	g/dl	0.08 ± 0.0	0.12 ± 0.1
IL-12p40	Obs. Conc.	131.5717 ± 155.3	111.01 ± 92.5

* : p<0.05

Table 2 Qualitative and Quantitative results of macroscopic, microscopic lesion and immunohistochemistry (IHC) of M.hp in this study

Qualitative analysis results		Cont. n=6	LA n=6
the slaughtering inspections results	Mycoplasmal Pneumoniae of Swine	6/6	5/6
	Porcine Pleuropneumonia	4/6	0/6†
IHC of M.hp		2/6	0/6
Quantitative analysis results		Cont. n=6	LA n=6
		Average ± SD	Average ± SD
Macroscopic MPS lesion area in lungs (%)		8.3 ± 5.4	2.8 ± 1.6†
Microscopic Lung Lesion score	Total Micscopic Lesion score	7.1 ± 2.7	2.1 ± 1.8*
	Alveolar Septal Infiltration	2.9 ± 1.4	0.6 ± 0.8*
	Alveolar Exudate	0.5 ± 0.3	0.0 ± 0.0*
	Peribronchiolar Lymphoid Hyperplasia	1.4 ± 1.4	0.8 ± 0.7
	Inflammation of Lamina Propria	2.3 ± 0.8	0.7 ± 0.8*
IHC of M.hp		0.6 ± 1.0	0.0 ± 0.0

† : p<0.1

* : p<0.05

Table 3 Results of Relative Quantitation of real time PCR

		Cont.	LA
		Average ± SD	Average ± SD
Targets			
TLR2	1.7E-01 ± 2.6E-01	1.4E-01 ± 2.4E-01	
IL-12p40	2.3E-05 ± 1.7E-05	1.8E-05 ± 8.3E-06	
TNF α	1.1E-03 ± 8.3E-04	8.2E-04 ± 3.8E-04	
IFN-γ	2.5E-05 ± 5.2E-05	1.8E-05 ± 3.4E-05	

Table 4 The result of T-RFLP

Presumed Bacterial Groups	Samples area ratio of OTU (%)						Average area ratio of OTU (%)							
	Cont.1	Cont.2	Cont.3	Cont.4	Cont.5	Cont.6	LA1	LA2	LA3	LA4	LA5	LA6	Cont	LA
<i>Streptococcus</i>	6.4	2.1	3.1	3.4	2.8	2.6	1.3	2.5	2.7	1.2	2.0	4.1	3.4	2.3
<i>Actinobacteria</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Bacteroides</i>	18.0	31.3	36.5	17.4	47.1	36.9	44.0	46.3	18.2	57.5	28.6	34.5	31.2	38.2
<i>Clostridium</i> cluster IV	2.3	4.4	2.6	3.0	4.1	2.3	8.3	5.4	10.6	4.0	3.8	7.7	3.1	6.6*
<i>Clostridium</i> cluster IX	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Clostridium</i> subcluster XIVa	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.9	0.0	0.6	0.9	0.0	2.5	0.0	1.0*
<i>Clostridium</i> cluster	4.4	9.8	7.0	9.7	19.0	5.3	12.5	12.0	12.5	11.7	7.4	19.3	9.2	12.6
<i>Clostridium</i> cluster IV, <i>Spirochaetes</i>	32.4	15.7	20.8	25.6	1.8	20.2	4.4	5.2	13.6	2.2	23.4	6.1	19.4	9.1†
<i>Clostridium</i> cluster IV, <i>Bacteroides</i>	31.1	27.5	24.9	34.7	19.3	27.4	24.5	21.3	38.5	15.3	29.5	18.9	27.5	24.7
<i>Lactobacillales</i> , <i>Clostridium</i> cluster IV	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Firmicutes</i>	0.0	1.6	0.0	0.0	1.0	0.5	0.0	0.8	0.0	1.1	0.0	1.6	0.5	0.6
<i>Lactobacillales</i> , <i>Clostridium</i> subcluster XIVa	3.4	1.7	2.6	3.3	3.1	1.8	1.0	3.0	1.1	2.5	1.8	3.5	2.6	2.1
<i>Deitaproteobacteria</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Betaproteobacteria</i>	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2
None	1.9	5.9	2.6	2.9	1.9	3.0	2.0	2.1	2.2	3.6	3.7	1.8	3.0	2.6
	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1000	1000

Each DNA samples from feces were cut by *Bst*I restriction enzyme. † : p<0.1 ; * : p<0.05

Table 5 The results of correlation analysis (correlation coefficients)

Long-term trends	All samples (n=12)												Civet (n=8)												SA (n=8)											
	Microscopic BC scores				Microscopic BC scores				Microscopic BC scores				Microscopic BC scores				Microscopic BC scores				Microscopic BC scores				Microscopic BC scores											
	J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS		J-SERS			
	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)	Microscopic quantity of MPM (Mg/kg wet area)					
Beef loose particles	SP	0.13	0.08	0.27	-0.24	-0.11	-0.28	0.22	0.04	-0.33	0.24	-0.08	0.26	0.32	0.17	0.04	0.19	-0.23	0.29	0.20	0.25	0.25	0.31	0.17	0.19	0.19	0.15	0.01	0.30	0.28	0.24	0.20	0.24	0.24		
	A ₁ C	-0.03	-0.11	-0.44	-0.27	-0.08	-0.45	0.12	0.16	-0.18	0.12	-0.22	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	
	A ₂ C	-0.03	-0.14	-0.44	-0.27	-0.08	-0.45	0.12	0.16	-0.18	0.12	-0.22	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12	0.12
	T ₁ O	0.13	-0.18	0.26	0.25	0.01	-0.27	0.21	-0.17	-0.53	-0.22	0.29	-0.38	-0.42	-0.27	-0.49	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	RM	0.08	-0.08	0.28	0.22	-0.10	0.08	0.26	-0.29	-0.23	-0.73	0.13	-0.85	-0.29	-0.45	0.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Total	-0.28	-0.18	-0.11	-0.24	0.15	-0.20	-0.09	0.08	-0.34	0.19	-0.11	0.18	-0.28	-0.28	-0.50	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	On	-0.03	-0.08	-0.35	-0.23	-0.30	-0.18	-0.20	-0.11	-0.35	0.18	0.19	-0.39	0.05	0.09	0.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	CP	0.19	0.11	0.26	0.12	0.23	0.28	0.24	0.28	0.24	0.28	0.24	0.28	0.24	0.28	0.24	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	U ₁ U ₂	-0.18	0.14	0.01	-0.06	0.17	0.13	0.11	0.18	-0.41	0.06	0.24	-0.73	0.12	0.17	0.15	0.23	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	U ₂ U ₃	-0.23	0.08	0.18	-0.25	0.41	0.41	-0.42	0.48	0.13	-0.31	0.15	0.44	0.44	0.44	0.44	0.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
FM ₁	-0.04	-0.01	-0.02	-0.09	-0.17	0.17	-0.21	-0.13	-0.34	-0.47	-0.43	-0.34	-0.25	-0.45	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
FM ₂	-0.28	0.17	0.02	-0.18	-0.06	0.22	0.08	-0.43	0.18	-0.38	-0.21	-0.78	0.21	-0.47	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
Beef loose particles to lipid	Regression	0.61	0.43	0.19	0.29	0.16	0.22	-0.34	0.36	-0.12	-0.18	0.42	0.22	-0.27	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Residuals	-0.08	-0.18	-0.46	-0.01	-0.19	0.04	0.27	-0.03	-0.29	0.34	-0.02	-0.11	-0.08	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
	Cholesterol (total) III ₁	-0.29	-0.33	-0.63	-0.40	-0.68	-0.46	-0.15	0.65	-0.24	-0.14	0.27	0.25	-0.28	-0.37	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Cholesterol (total) III ₂	-0.34	-0.34	-0.57	-0.33	-0.66	-0.16	-0.47	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Cholesterol (total) IV ₁ (Sphingolipid)	0.22	-0.24	-0.25	0.09	-0.14	-0.22	-0.39	0.31	-0.13	0.09	0.47	0.15	-0.38	-0.19	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Cholesterol (total) IV ₂ (Bile acid)	0.02	0.10	0.20	0.10	0.21	0.28	0.28	-0.63	0.04	0.13	-0.27	-0.25	0.31	0.20	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Ferulic acid	0.06	0.07	0.04	-0.06	0.26	0.11	0.22	-0.45	0.31	-0.34	0.21	0.14	0.31	0.21	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Ferulic acid	-0.04	-0.06	-0.30	-0.09	-0.04	-0.27	-0.29	0.18	-0.24	-0.28	-0.13	0.00	-0.04	-0.08	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Saccharides, Cholesterol (total) III ₁	0.19	0.43	0.24	0.28	0.44	0.15	0.38	0.38	0.61	0.40	0.32	-0.08	0.37	-0.15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	Saccharides	-0.27	-0.13	-0.26	-0.34	-0.23	-0.04	-0.37	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
None	0.08	-0.34	0.06	-0.03	0.06	0.27	-0.31	-0.19	-0.24	-0.23	0.22	-0.20	-0.18	0.37	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

は、TLR2とIFN- γ で組織病変と正の相関があり(気管支周囲リンパ組織の発達スコア: $p=0.03$, 気管支粘膜固有層への炎症細胞浸潤スコア: $p=0.02$), IL-12 p40と肺胞壁肥厚スコアで負の相関があった($p=0.01$)。一方、Cont.では、組織学的病変と、TLR2, IFN- γ で負相関が認められた(肺胞腔への炎症細胞浸潤スコア: $p=0.07$)。また、LAのみ観察された*Clostridium* subcluster XIVaのOTU面積は、LAの肺胞壁肥厚スコアと正相関があった($r=0.80$, $p=0.06$)。

これらの相関解析結果から、病変が少ないLAで多くみられた*Clostridium* cluster IVに分類される腸内細菌を多く保有している豚ほど、組織学的病変が少ない可能性が示唆された。腸内細菌の中で*Clostridium*属菌は、免疫抑制に関与する制御性T細胞(Treg)産生を誘導することが知られている¹³⁾。今回、Tregが産生するIL-10のmRNA量の調査は行っていないが、LAの肺内の各サイトカイン量は、Cont.よりも、全体的に少ない傾向にあったことから、腸内*Clostridium*属菌が誘導したTregにより、病原体に対する免疫応答が抑制され、肺病変形成が軽度化した可能性も示唆された。

4. 要 約

豚慢性呼吸器感染症は、養豚業に多大な経済的損失を生んでおり、感染症制御策として用いられる抗菌性物質は、薬剤耐性菌出現の可能性が懸念されている。今回、MPSの肉眼病変面積を少なくする方向に抗病性育種を行ったLAとCont.を、MPSワクチン未接種下で飼養し、肺の病理学的検索を行い、さらに、MPS感染関連免疫関連分子(Toll like receptor (TLR) 2・TLR6・IL-12p40・TNF- α ・IFN- γ) mRNA量や、直腸内細菌叢を比較し、病理学的検索結果との相関解析を行った。結果、LAはMPSワクチンの接種に関わらず、

MPS抗病性が発揮されており、LAとCont.で病変形成に関わる免疫機構が異なる可能性が示唆された。さらに、肺の病変形成にも、腸内*Clostridium*属菌の関与が示唆された。

文 献

- 1) Jubb, K. J. F. *et al.*, ed.: The respiratory system. In, *Pathology of Domestic Animals*, 5th ed. Vol.2, 579~594, Saunders Ltd, 2007.
- 2) 久保正法, 石川弘道, 共著: 豚病診断カラーアトラス—同一症例に迫る臨床と病理—, 初版, 40~44, 有限会社ベネット, 2009.
- 3) 日本獣医病理学会編: 動物病理カラーアトラス, 1版, 73, 文永堂出版株式会社, 2007.
- 4) Yamamoto, K.: Porcine Respiratory Disease Complex, *Por. Jpn. Pig. Vet. Soc.*, 43, 7~8, 2003.
- 5) 宮城県食肉衛生検査所: 平成26年度事業概要, 2015.
- 6) Tamura, Y.: Trends in Antimicrobial agents for Veterinary Use and Control Measures of Antimicrobial Resistance, *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 56, 685~691, 2003.
- 7) Kadowaki, H., *et al.*: Selection for resistance to swine mycoplasma pneumonia over 5 generations in Landrace pigs, *Livestock Science*, 147, 20~26, 2012.
- 8) Katayama, M., *et al.*: Immunophenotype Characterization for Swine Selected Line, Which is Resistant for the Mycoplasma Pneumonia, *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 24, 889~897, 2011.
- 9) Muneta, Y., *et al.*: Porcine TLR2 and TLR6: identification and their involvement in Mycoplasma hyopneumoniae infection, *J. Interferon. Cytokine. Res.*, 23, 583~90, 2003.
- 10) Biedermann, L., *et al.*: The intestinal microbiota: its role in health and disease, *Eur J Pediatr.*, 174, 151~67, 2015.
- 11) Goodwin, R. F., *et al.*: Enzootic pneumonia of pigs: immunization attempts inoculating Mycoplasma suis pneumoniae antigen by various routes and with different adjuvants, *Br. Vet. J.*, 129, 456~64, 1973.
- 12) Opriessnig, T., *et al.*: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs by dual infection with Mycoplasma hyopneumoniae and porcine circovirus type 2, *Vet Pathol.*, 41, 624~40, 2004.
- 13) Atarashi, K., *et al.*: Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species, *Science*, 21, 337~41, 2011.

磁気ビーズルシフェラーゼ免疫沈降法による 抗豚流行性下痢ウイルス抗体検出系の開発

Development of a luciferase immunoprecipitation assay for detection of antibodies against porcine epidemic diarrhea viruses

堀江 真行

(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)

Masayuki Horie

(Transboundary Animal Diseases Research Center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) is the causative agent of PED that is a highly contagious enteric disease in pigs. In Japan, big PED outbreaks started in 2013, which have caused serious economic losses in the swine industry. Serological assay is widely used for surveillance of PEDV invasion in swine herds. Currently, neutralization test (NT) is used for detection of anti-PEDV antibodies in Japan. However, NT is time-consuming and laborious, and needs special equipment such as a biosafety cabinet because infectious virus is used for the assay. Thus, easier antibody detection methods are warranted. *Gaussia* luciferase immunoprecipitation (GLIP) assay is an antibody-detection system that utilizes *Gaussia* luciferase-fused target antigens. GLIP is high-throughput and have been reported to be applied to detection of antibodies against several pathogens. Thus, in this study, I tried to develop a GLIP to detect anti-PEDV antibodies (PEDV-GLIP). I constructed a plasmid vector pGLIP2-PEDV N, which expresses Gluc-fused PEDV N protein. First, I tested a GLIP using PEDV N (PEDV N-GLIP) using 2 pig sera negative for NT and an anti-PEDV N mouse monoclonal antibody, revealing that the PEDV N-GLIP can specifically detect anti-PEDV antibodies. I further performed the PEDV N-GLIP using several pig sera. Some serum samples showed inconsistent results in NT and PEDV N-GLIP. This might be due to a non-specific anti-PEDV inhibitor(s) in NT, or non-specific antibodies in PEDV N-GLIP. Alternatively, the sera contains different types of antibodies. Further studies are needed to assess the possibilities. On the other hand, the constructed plasmid vectors are applicable for other pathogens, and thus they would be useful to develop novel antibody detection systems.

1. 目 的

豚流行性下痢ウイルス (PEDV) は豚に感染し、嘔吐・下痢を主症状とするPEDを引き起こす。PEDは特に新生仔豚で被害が甚大であり、死亡率が100%に達することもある。日本におい

て長年、PEDは散発的にしか見られていなかったが、2013年末より全国において爆発的流行が起こり、これまでに約50万頭もの新生仔豚がPEDによって死亡した (2016年4月18日現在)。PEDは現在も日本国内において流行しており、PEDVは常在化したと考えられる。

豚群におけるPEDVの浸潤状況の調査にはウイルス核酸を検出するPCR法に加え、抗体検出法が広く用いられている。近年、農林水産省の主導のもとに、中和抗体検出法による抗PEDV抗体保有状況が全国において調査された。しかし、中和抗体検査は適切な細胞数の培養細胞の準備、血清とウイルスの混合、ウイルス感染および観察など非常に手間と時間がかかる。代替法として免疫蛍光抗体法が存在するが、抗原としてウイルス感染細胞を用い、顕微鏡下での観察を必要とするため中和抗体検査と同じく手間と時間がかかる。さらに両検出法ともウイルスの感染が必要となるため、バイオセーフティレベル2の施設が必要となる。そのため、より簡便なPEDV抗体検出法の開発が望まれている。

ルシフェラーゼ免疫沈降法 (luciferase immunoprecipitation system : LIPS) は培養細胞において発現させたウイルスタンパク質-ルシフェラーゼの融合タンパク質を抗原とし、免疫沈降とルシフェラーゼによる発光を利用した抗体検出法 (Fig. 1) である¹⁾。LIPSは他の検出法と比較してより迅速・簡便で、ウイルスそのものを使用しないため、抗PEDV抗体検査に極めて適した系である。本研究ではLIPSを利用した抗PEDV抗体検出系の開発を行う。さらに効率のよい検出を目指し従来のRenillaルシフェラーゼの代わりに、より活性が高く安定なGaussiaルシフェラーゼ (Gluc) を用いたLIPS (GLIP) を開発する。さら

に免疫沈降に磁気ビーズを使用することによる省力化を試みる。

2. 材料と方法

2.1 血清サンプルと抗体

血清サンプルは大分県家畜保健衛生所より分与いただいた。これらの血清に関して、PEDVのNK94P6株を用いた中和試験が大分県家畜保健衛生所にて行われた。陽性コントロールとして抗PEDV S 3F12マウスモノクローナル抗体 (Median Diagnostics) を用いた。なお、抗PEDV Sマウスモノクローナル抗体は実際にはPEDV Nタンパク質を特異的に認識したため、本稿では抗PEDV N抗体と記す。

2.2 GLIP抗原発現プラスミドベクター

本研究ではGLIP抗原発現プラスミドベクターとしてpGLIP2 (Fig. 2 a) およびpGLIP3 (Fig. 2 b) を構築した。本稿ではプラスミド構築に関する詳細を省略する。

PEDV N-GLIP抗原発現プラスミドは以下のように構築した。なお本稿では遺伝子クローニングなどの詳細は省略する。PEDVの生ワクチン (日生研PED生ワクチン; 日生研) あるいは野外株よりRNAを抽出し、逆転写PCRによってN遺伝子を増幅し、pGLIP2ベクターに挿入した。得られたプラスミドをpGLIP2-PEDV-Nと名付けた。

PEDV M-GLIP発現プラスミドとして、N遺伝子と同様にPCRにより増幅したM遺伝子全長を

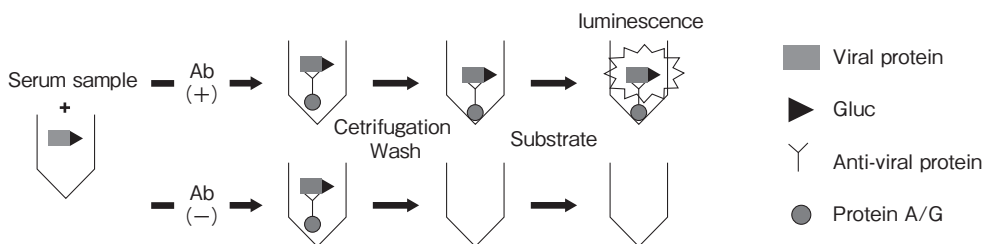


Fig. 1 A schematic figure of LIPS. The theory of LIPS is shown. Ab, antibodies.

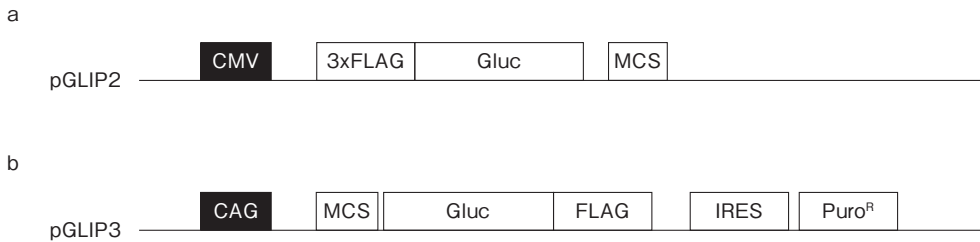


Fig. 2 pGLIP2 and pGLIP3 vector plasmids. Schematic figures of pGLIP2 (a) and pGLIP3 (b) are shown. Promoters are indicated by black boxes and white letters. Gluc, Gaussia luciferase ; MCS, multi cloning site ; IRES, internal ribosome entry site ; Puro^R, puromycin resistant gene.

pGLIP3ベクターへ、M遺伝子の細胞質内領域をpGLIP2ベクターへと挿入した。これらのプラスミドをpGLIP3-PEDV-MおよびpGLIP2-PEDV-M_{cyto}と名付けた。

PEDV S-GLIP抗原発現プラスミドとして、同様にPEDV SのS2領域をpGLIP3へクローニングした。得られたプラスミドをpGLIP3-PEDV-S2と名付けた。

2.3 PEDV-GLIP抗原の作成

6ウェルプレートに 7.5×10^5 293T細胞を播種し、翌日にLipofectamine 2000を用いてGLIP抗原発現プラスミドのトランスフェクションを行った。トランスフェクションには2 μ gのプラスミドと4 μ LのLipofectamine 2000 reagentを用いた。48時間後に500 μ LのRenilla lysis buffer (Promega) により細胞を溶解し、遠心 (20,600 \times g, 10min, 4 $^{\circ}$ C) にて細胞残渣を除いたものをGLIP抗原として使用した。

2.4 ウェスタンブロット

定法に従ってSDS-PAGEを行い、PVDFメンブレンに転写した後、ブロッキングワン (ナカライ) にて室温1時間のブロッキングを行った。一次抗体は2000倍希釈の抗FLAGマウスモノクローナル抗体M2 (SIGMA) あるいは1000倍希釈のAnti-DDDDK-tag ウサギポリクローナル抗体 (MBL) を用いた。二次抗体にはそれぞれ2000倍希釈のAnti-Mouse Immunoglobulins/HRPある

いはAnti-Rabbit Immunoglobulins/HRP (Dako) を用いた。シグナルの検出にはECL prime (GEヘルスケア) を用いた。

2.5 GLIPアッセイ

1検体当たり 1×10^7 のGLIP抗原を用いてGLIPアッセイを行った。GLIP抗原および血清検体はBuffer A (50mM Tris pH7.5, 100mM NaCl, 5mM MgCl₂, 1% Triton-X100) を用いて希釈した。100 μ LのGLIP抗原液と100 μ Lの血清希釈液を混合し、ローテーターを用いて室温1時間反応させた。免疫沈降には1検体当たり20 μ LのSureBeads Protein G (Bio-Rad) を添付の説明書に従って加えた。ローテーターにて室温30分反応させた後、500 μ LのBuffer Aを用いて4回洗浄を行った後、Renilla Luciferase Assay System (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。

3. 結果と考察

3.1 新規GLIP発現プラスミドベクターの構築
本研究ではPEDVのスパイクタンパク質 (S)、メンブレンタンパク質 (M) およびヌクレオカプシドタンパク質 (N) をGLIPに用いる抗原として選択した。これらのタンパク質はPEDV構造タンパク質の中で抗原性が高く、過去の抗体検出系でも抗原として用いられている。また、MおよびNタンパク質はウイルス株間でよく保存されているため、広範な抗PEDV抗体検出が可能であると

考えられた。

著者は過去にGLIP発現プラスミドベクター pGLIPを作成した²⁾が、さらなる利便性を追求し新規GLIP発現プラスミドベクターを構築した。pGLIP2ベクターはpGLIPベクターよりGlucのシグナルペプチド領域を削除した (Fig. 2 a)。pGLIP3ベクターはpMN1Purベクター³⁾をバックボーンとする。pMN1PurベクターはCAGプロモーターを持つため、CMVプロモーター依存性のpGLIP2より強力な発現が期待される。またpMN1Purベクターの特徴として安定発現株を容易に作成することができることがあげられる³⁾。本研究ではpMN1PurのMCSにGlucとFLAGタグ

をコードする配列を挿入した (Fig. 2 b)。これらのプラスミドにPEDVの各遺伝子をpGLIP2あるいはpGLIP3に挿入した (材料と方法参照)。

3.2 PEDV-GLIP抗原の発現

はじめに、それぞれのプラスミドを293T細胞に導入し、細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を測定した。すべてのプラスミド導入細胞において、非導入細胞と比べて高いルシフェラーゼ活性が確認された (Fig. 3 a)。pGLIP2-PEDV-Nでは非常に高いルシフェラーゼ活性が得られたが、pGLIP3-PEDV-S2ではやや活性が低く、pGLIP3-PEDV-M、pGLIP2-PEDV-M_{cyto}に関してはかなり活性が低かった。

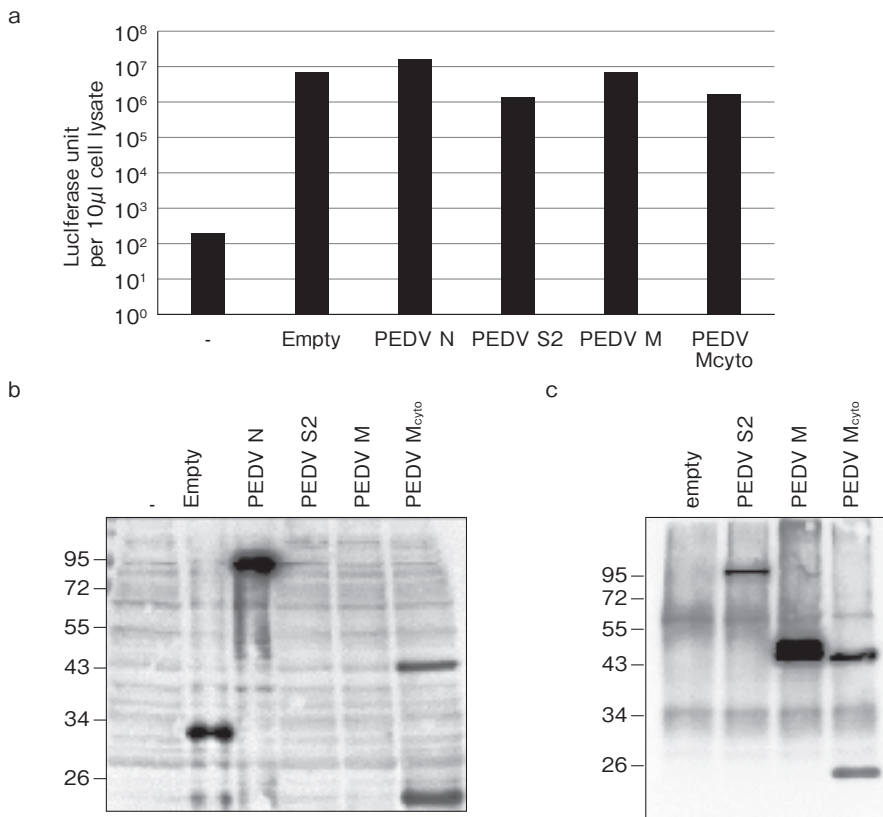


Fig. 3 Expression of GLIP antigens. Expression of GLIP antigens were confirmed by luciferase assay (a) and western blotting (b and c). (a) Transfected cells were lysed and measured the luciferase activity. Empty, pGLIP2 plasmid. (b and c) Western blotting analysis using anti-FLAG antibody. (b) Cells were lysed and directly used as antigens. (c) Cell lysate were immunoprecipitated with anti-FLAG antibodies, and used as antigens. Numbers indicate molecular weight (kDa).

次にFLAG抗体を用いたウエスタンブロット法により目的の抗原タンパク質の発現を確認した (Fig. 3b)。その結果, pGLIP2-PEDV-NとpGLIP2-M_{cyto}では目的の分子量のバンドが得られた。一方, pGLIP3-PEDV-S2, pGLIP3-PEDV-Mでは目的のバンドは観察されなかった。そのため抗FLAG抗体による免疫沈降後にウエスタンブロットを行ったところ, すべてのPEDV GLIP抗原の発現が確認された (Fig. 3c)。このことから, pGLIP3-PEDV-S2, pGLIP3-PEDV-M, pGLIP2-PEDV-M_{cyto}導入細胞では目的抗原が発現しているものの, その発現量が少ないことが示された。

GLIP抗原の発現量が低かったS2およびMについて, これらのGLIP抗原の安定発現細胞株の作成を試みた。ピューロマイシンを用いた選択によって安定発現細胞株を得, 2週間の培養後再びルシフェラーゼ活性を測定したところ, ルシフェラーゼ活性は一過性発現と同程度であった (data not shown)。今後, 発現量の高い安定発現細胞のクローニングや, ヒト細胞用に塩基配列を最適化することが必要である。

3.4 PEDV N-GLIPアッセイの検討

GLIPアッセイに十分なルシフェラーゼ活性が得られた抗原はPEDV Nのみであったため,

PEDV N-GLIPについて検討を行った。

最初にPEDV中和抗体陰性の血清2検体 (#25, #26) を陰性コントロール, 抗PEDV Nマウスモノクローナル抗体を陽性コントロールとして用い, GLIPアッセイを行った (Fig. 4a)。抗PEDV中和抗体陰性血清に関しては, 最適な希釈倍率を決定するために10倍および100倍希釈にて行った。抗PEDV N抗体ではそれぞれ 4.08×10^5 LUが観察された。一方, 抗PEDV中和抗体陰性血清では $9.96 \times 10^2 \sim 6.71 \times 10^3$ LUと, 血清非含有検体とほぼ同等のシグナルが観察された。これらのことから, PEDV N-GLIPは抗PEDV N特異的抗体を検出できることが示された。

次に7検体の中和抗体陰性血清と9検体の中和抗体陽性血清 (中和抗体価128倍以上) を用いてPEDV N GLIPアッセイを行った (Fig. 4b)。上記の条件検討において陰性血清では希釈倍率にかかわらずほぼ同じルシフェラーゼ活性を示したため, 10倍希釈血清を用いた。中和抗体陰性血清では6検体で低いルシフェラーゼ活性が観察されたが, 1検体において 7.72×10^4 LUと非常に高い活性が見られた。中和抗体陽性血清では9検体中7検体において高いルシフェラーゼ活性が観察された。しかし, 2検体では比較的低いシグナルが得

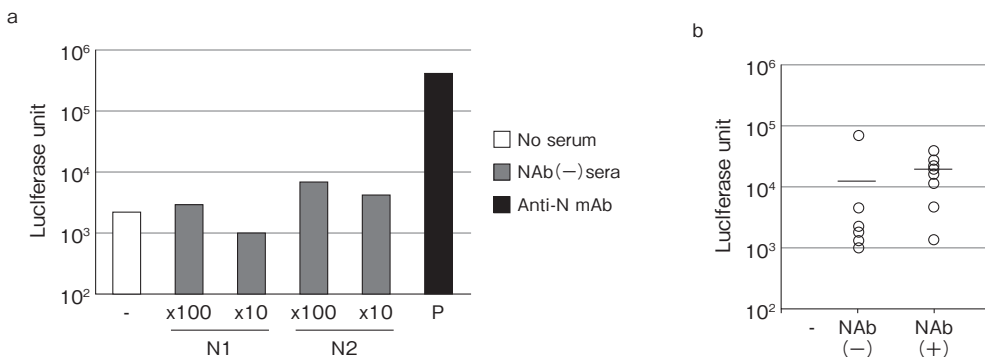


Fig. 4 PEDV N-GLIP assay. Results of PEDV N-GLIP assays are shown. (a) PEDV N-GLIP assay was conducted using 2 pig sera negative for neutralizing test (N1 and N2) and anti-PEDV N monoclonal antibody (P). (b) PEDV N-GLIP assays were performed with 7 and 9 pig sera that are negative and positive for neutralization test, respectively. NAb, neutralizing antibodies. Bars indicate advantages.

られたのみであった。これらのことから中和試験とPEDV N-GLIPの結果は一致しないことが示された。

中和試験と本研究におけるGLIPの結果が一致しなかった理由について、以下の3つの可能性が考えられる。1つ目に、血清に含まれる抗体の種類が異なる可能性がある。抗N抗体はウイルスの中和には関与しないため、中和抗体の有無と抗N抗体の有無は必ずしも一致しない。この場合は中和試験とGLIP法の結果は一致しない。2つ目に、血清が抗体以外の抗PEDV阻害物質を含む可能性である。この場合、中和試験で陽性であってもGLIP法では陰性になる。3つ目に、血清中にPEDV N-GLIP抗原に非特異的に結合する抗体が存在する可能性である。この場合、中和試験で陰性であってもGLIP法では陽性となる。これらの可能性を検討するために、他の手法において抗体の存在を検討する必要があるが、これまでに信頼性のある抗PEDV抗体検出法は存在しない。現在、抗PEDV抗体を検出できるウエスタンブロット法や蛍光抗体法を検討している。

4. 要 約

豚流行性下痢ウイルス (PEDV) は新生仔豚において致死的な下痢を引き起こすPEDの原因ウイルスである。PEDVの浸潤状況の調査には核酸検出法と抗体検出法が用いられる。現在、抗PEDV抗体検出には中和試験が用いられているが、中和試験は操作が煩雑で時間がかかるうえ、感染性ウイルスを用いるため相応の施設が必要となる。ルシフェラーゼ免疫沈降法 (LIPS) は目的抗原とルシフェラーゼ融合タンパク質を用いた抗体検出系であり、ウイルスそのものを使わず、抗原の準備が比較的容易であることから、様々な感染症に対するハイスループット抗体検出法として近年注目を集めている。本研究はLIPSによる

抗PEDV抗体検出法の開発を目的として行った。

本研究ではルシフェラーゼとしてガウシアルルシフェラーゼ (Gluc) を使用するGLIP法の開発を試みた。ウイルス抗原としては抗原性が高くGlucとの融合タンパク質の発現量が多かったPEDV Nタンパク質を用いた。少数の中和試験陰性血清と抗PEDV Nマウスモノクローナル抗体を用いてNタンパク質のGLIPアッセイ (PEDV N-GLIP) を検討したところ、PEDV N-GLIPは抗PEDV N抗体を特異的に検出できることが示された。しかし、検体数を増やして中和試験陰性血清と陽性血清を用いてPEDV N-GLIPを行ったところ、GLIPの結果と中和試験の結果が一致しない検体が散見された。必ずしも中和試験の結果が抗PEDV抗体の有無を反映しているわけではないため、今後、他の検出系において抗PEDV抗体の有無を検討する必要がある。一方、本研究にて作成したプラスミドベクターは容易に外来遺伝子を容易に挿入可能であり、安定発現細胞株の作成も容易であることから、本研究にて作成したツールは様々な動物感染症の抗体検出系に応用可能である。

文 献

- 1) Burbelo, P.D., Goldman, R., Mattson, T.L. : A simplified immunoprecipitation method for quantitatively measuring antibody responses in clinical sera samples by using mammalian-produced Renilla luciferase-antigen fusion proteins, *BMC Biotechnol.* **5**, 22, 2005.
- 2) Matsuu, A., Hobo, S., Ando, K., Sanekata, T., Sato, F., Endo, Y., Amaya, T., Osaki, T., Horie, M., Masatani, T., Ozawa, M., Tsukiyama-Kohara, K. : Genetic and serological surveillance for non-primate hepatitis C virus in horses in Japan, *Vet Microbiol.* **179**, 219~227, 2015.
- 3) Iha, M., Watanabe, M., Kihara, Y., Sugawara, S., Saito, K., Soma, M., Sato, S., Mori, Y., Kasuga, K., Kojima, I., Sasamura, R., Murata, J., Kobayashi, M. : Effect of ectopic expression of homeoprotein EGAM1C on the cell morphology, growth, and differentiation in a mouse embryonic stem cell line, MG1.19 cells, *Reproduction*, **143**, 477~489, 2012.

豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究

Experimental infection with porcine deltacoronavirus in pigs

鈴木 亨・大橋 誠 一

(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)

Tohru Suzuki and Seiichi Ohashi

(National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization (NARO))

Deltacoronaviruses were first detected in rectal swabs from birds and pigs collected in Hong Kong in 2009. Detection of porcine deltacoronaviruses (PDCoVs), which are genetically similar to the Chinese PDCoVs, was reported in United States for the first time in 2014. PDCoV could be infected into pigs alone and induced diarrheas, although PDCoV co-infections with other enteric viruses were more common. Thus, PDCoV is currently one of common enteric viral pathogen in pigs. In Japan, we identified recently multiple PDCoVs from fecal samples with PEDV-specific RT-PCR negative and TGEV-specific RT-PCR negative. In the whole-genome analysis of those viruses using next generation sequencer, we discovered that Japanese PDCoVs were genetically distinctive from US PDCoVs. In the present study, we compared and analyzed symptoms, viral shedding and distribution in gnotobiotic piglets (3 days old) orally inoculated with two PDCoV isolates (US PDCoV : MI/8977/2014, Japanese PDCoV : YMG/JPN/2014) maintained in ST cell culture respectively, in order to understand their pathogenesis and pathogenicity. The piglets inoculated with both PDCoV developed moderate to severe diarrhea, but all survived. The PDCoV-inoculated piglets shed increasing amount of virus in feces and sera especially from 2 to 8 days post inoculation. The piglets inoculated with US and Japanese PDCoV observed microscopic lesions in small and large intestines with viral antigen confirmed by immunohistochemistry staining at 4 days post inoculation, but there were differences in virus distribution and propagation between them. This study experimentally confirmed pathogenesis of PDCoV and demonstrated characteristic pathogenicity of two PDCoVs in neonatal piglets.

1. 目 的

2013年後半から我が国では豚流行性下痢 (PED) が流行しているが、PEDウイルスによらない下痢も同時に発生している。近年、アルファ、ベータ、ガンマコロナウイルス属に次ぐ4番目の新しい属 (デルタコロナウイルス属) に分類され

る新型コロナウイルスが様々な鳥種やレパードで検出された。Wooらの研究グループは2009年に香港で採取した豚糞便から新たに豚デルタコロナウイルスを検出した¹⁾。米国でも、豚流行性下痢 (PED) が流行している最中、2014年に下痢を呈した個体から豚デルタコロナウイルスが検出された²⁾。その後の調査から、豚デルタコロナウイル

スは比較的高い割合で下痢と関連しており、また他の豚消化器ウイルスとの混合感染のみならず、単独感染でも下痢を引き起こすことが明らかとなってきた^{3,4)}。さらに、Thachilらは豚デルタコロナウイルス特異抗体検出のためのELISA法を開発し、近年の米国における浸潤状況調査を実施した⁵⁾。その結果、豚デルタコロナウイルスはPEDウイルスとは時を画し、2010年にはすでに米国に侵入していたことが明らかとなった。

米国での豚デルタコロナウイルスの発見を受けて、2014年我が国でもPEDの発生が続いている最中、当所において、主に豚伝染性胃腸炎(TGE)ウイルス陰性かつPEDウイルス陰性であり下痢が発生した農場の検体を対象に、豚デルタコロナウイルスの浸潤状況調査を実施した。その結果、我が国では少なくとも2014年2月の時点で豚デルタコロナウイルスが国内に侵入していたことが明らかとなった。また用途別の陽性数は哺乳豚が最も高いものの、肥育豚や繁殖豚などの年齢が進んだ成豚でも比較的高い割合で陽性個体が検出されることが明らかとなった。

米国ではすでに2つの研究グループによって、子豚を用いた感染実験が実施されているが^{6,7)}、使用しているウイルス株や豚の日齢が異なるために、少なくとも子豚に対して下痢を引き起こすことは明らかであるものの、両者の結果はあまり一致していない。そのため、豚デルタコロナウイルスの臨床的特徴や感染動態は未だに把握できないままである。また、各生育ステージの豚における豚デルタコロナウイルスの感染動態を明らかにすることは、PEDやTGEとの類症鑑別上不可欠である。

そこで申請者は、当所において同一条件で増殖・管理し、かつ遺伝学的相違が明確である国内および国外豚デルタコロナウイルス2株を用いて、子宮摘出初乳未摂取豚に対する感染実験を実

施し、それら豚デルタコロナウイルス株に特徴的な臨床症状や感染動態を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 ウイルスと細胞

国外株には2014年に米国で分離された豚デルタコロナウイルス株(MI/8977/2014:APHISより導入、導入時に豚精巢(ST)株化細胞で10回継代)を使用した。国内株には山形県で発生した豚デルタコロナウイルス病を発症した豚の小腸内容10%乳剤から分離したもの(YMG/JPN/2014)を使用した。それぞれのウイルス株を同一培養条件下でST細胞(ATCCより入手)において4回継代し、ほぼ同一の感染価(10^6 TCID₅₀/ml)を示すことを確認した上で、感染実験に供した。なお、用いた両株の各遺伝子の配列を比較・解析した結果、特にS遺伝子やNS7遺伝子に関して両株間で配列に相違があることが明らかである。

2.2 豚への感染実験

当所動物施設において、動物実験実施要領を遵守しながら、子宮摘出初乳未摂取豚(母豚2頭分:計15頭)を得た。得られた子豚は2群に分け(国内株投与群8頭、国外株投与群7頭)、それぞれの投与群に対して3日齢時で該当ウイルス株を2mlずつ経口投与し、投与後28日目(4週間)まで臨床症状を観察した。ウイルス投与後から8日間、糞便は毎日、血液は2日おきに各個体から採取した。8日目以降は、糞便、血液ともに3-4日間隔で経時的に採取した。また、各ウイルス株の体内分布を調べるために、投与後4日目と7日目で、各群3頭ずつを解剖し、残りの個体は観察終了時に解剖した。解剖時には、主要臓器、消化器官(胃、小腸、大腸)ならびに免疫器官(腸管リンパ節、扁桃)を採取し、ウイルス学的解析ならびに病理学的解析に供した。

2.3 ウイルス学的解析

採取した糞便はリン酸緩衝液で希釈して20%乳剤を作成し、遠心分離 (3000×g, 10分) により夾雑物を取り除いた上で、上清をRNA抽出に供した。また、採取した血液は遠心分離 (3000×g, 10分) を行い、血清のみを使用した。解剖時に採取した各種臓器はホモジナイザーにより粉碎した後、リン酸緩衝液で希釈して10%乳剤を作成し、遠心分離 (3000×g, 10分) により夾雑物を取り除いた上で、上清をRNA抽出に供した。ウイルスRNAは市販のキット (QIAmp viral RNA mini kit) を用いて、手順書に従って抽出した。抽出したウイルスRNAは豚デルタコロナウイルスのM遺伝子をターゲットとしたプライマー・プローブセットならびにスタンダードを用いてリアルタイムRT-PCRで定量・解析した。

2.4 病理学的解析

解剖時に採取した各種臓器は10%ホルマリン溶液に浸漬固定した後、パラフィン包埋を行い、ミクロトームで切片を作製した。作製した切片のうち、一枚はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色を施し、もう一枚は当所で作製した豚デルタコロナウイルスに特異的な家兔免疫血清を用いて免疫組織化学染色を施し、両群間で組織傷害性、抗原の分布や量について、光学顕微鏡で観察・比較した。抗原の分布や量については、陽性シグナル数に準じて半定量的に評価・解析した。

3. 結果と考察

3.1 臨床症状

豚デルタコロナウイルス投与群はいずれも個体間で程度に差はあるが、投与後2日目より元気消失、食欲不振ならびに激しい下痢を呈した。下痢は10日前後続いたが、投与後8日目から個体は徐々に元気を取り戻し、観察期間を通じて死亡する個体は観察されなかった。また、両群間で臨床

症状に大きな相違は認められなかった。本結果はこれまでの報告を支持する結果であり^{6,7)}、豚デルタコロナウイルスは単独感染においても下痢を発症することが明らかとなった。

3.2 糞便中および血中におけるウイルス排泄量
各投与群における糞便中および血中に排泄されるウイルス量の経時的变化をFig. 1に示した。糞便中に排泄されるウイルス量は両群ともに投与後1日目から急激に上昇し、投与後2日目から8日目にかけて高コピー数のウイルスを排泄し続けることが明らかとなった。また、両群間でピーク時のウイルス排泄量に相違はなく、いずれも糞便1gあたり 10^{10} - 10^{11} コピー数のウイルスを排泄した。投与後8日目以降は徐々に排泄量は低下し、観察終了時には糞便1gあたり 10^5 コピー数以下となった。以前の報告では感染初期においてウイルス排泄量が高いことが認められているが^{6,7)}、本結果はそれらの結果を支持する結果となった。

血中に排泄されるウイルスの排泄期間ならびに量に関して、両群間で顕著な相違は認められなかった。投与後2日目から血中のウイルス量は急激に上昇し、投与後2日目から8日目にかけて高いウイルス排泄を持続するが、投与後14日目には検出限界以下となった。糞便中に排泄されるウイルス量と比べて、血中に排泄されるウイルス量 (糞便1gあたり 10^5 - 10^6 コピー数) は少なく、また排泄期間も短いことが明らかとなった。さらに、本結果より豚デルタコロナウイルス病を発症した子豚はウイルス血症を示すことが明らかとなった^{6,7)}。

3.3 豚デルタコロナウイルスの体内分布

それぞれの投与群に関して、解剖時に採取した各種臓器におけるウイルス量を定量・解析するとともに、HE染色や免疫組織化学染色を施した切片について、組織傷害性やウイルス抗原の半定量解析を実施し、両群間で比較・解析した。リアル

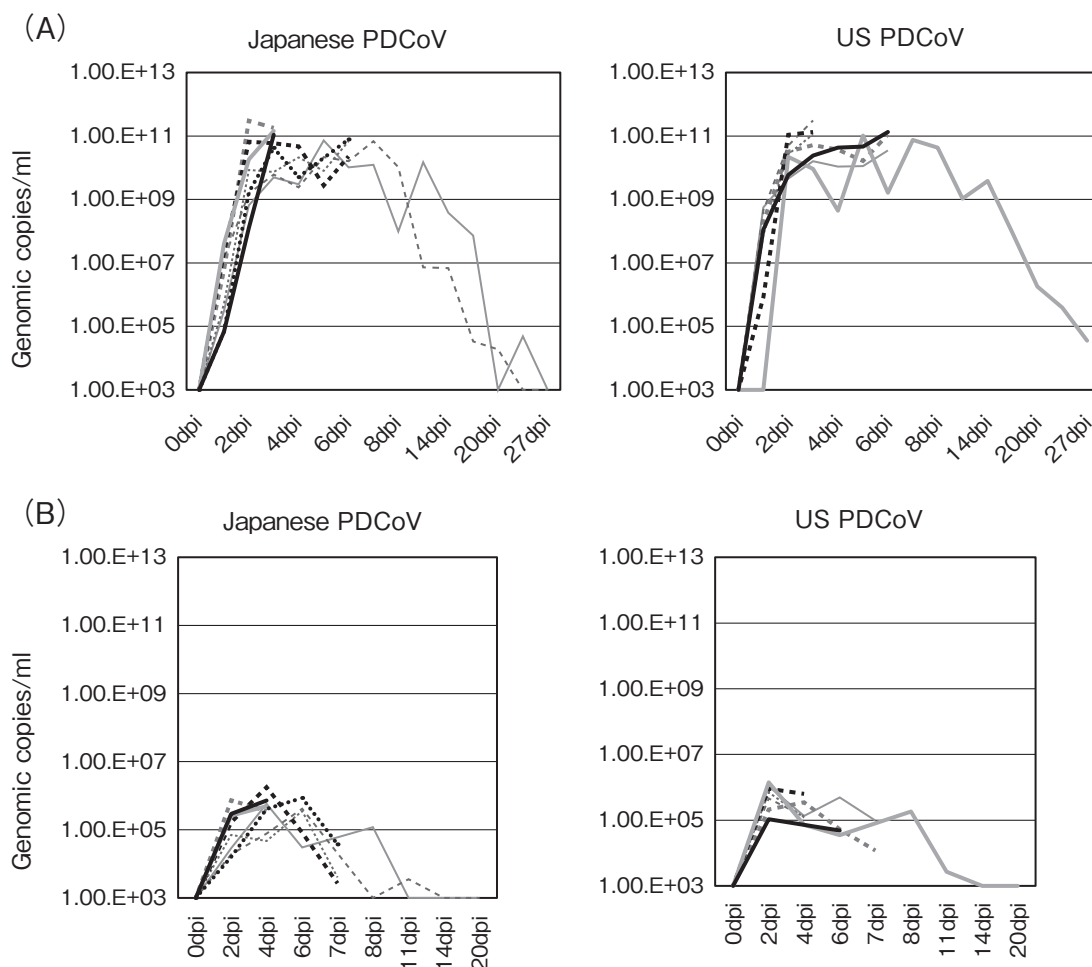


Fig. 1 Virus shedding in feces (A) and sera (B) of piglets inoculated with Japanese porcine deltacoronavirus (YMG/JPN/2014) and US porcine deltacoronavirus (MI/8977/2014).

Individual virus shedding (shown in different colors) was detected by a quantitative PDCoV M specific realtime RT-PCR at each time point.

タイムRT-PCRを用いたウイルス学的解析では、投与後4日目および7日目ともに両群間で顕著な相違は認められなかった。投与後4日目では、両群ともにウイルスは主に空腸から大腸にかけて広くかつ多数存在することが明らかとなった。また投与後7日目では、両群ともにそれぞれの臓器において4日目と比べてウイルス量は減り、特に回腸から大腸にかけてウイルスが顕著に検出されることが明らかとなった。さらに観察終了時では、両群ともにほとんどすべての臓器において、検出

限界以下であることが明らかとなった。

病理学的解析では、投与後4日目に解剖した個体の小腸および大腸において、両群間で特に小腸で抗原の分布や量に相違が認められることが示唆された。また、両群間で相違が認められた小腸および大腸においては組織傷害性（絨毛の萎縮や脱落など）についても相違が認められる可能性が示唆された。投与後7日目に解剖した国外株投与群（N = 3）では1個体を除き、各種臓器においてウイルス抗原は検出されなかったが、国内投与群

(N = 3) ではいずれの個体も結腸でわずかなウイルス抗原が検出された。これらの結果は現在も精査・解析中であるため、具体的なデータを示すことはできないが、少なくとも病理学的解析では、両群間でウイルスの体内分布や増殖性に相違があることが示唆された。

リアルタイムRT-PCRは感染性や増殖性を問わず、感度よく遺伝子断片を検出する手法である。一方、免疫組織化学染色はウイルス抗原、すなわち当該臓器でのウイルスの増殖を検出する手法である⁷⁾。これまでも多くの研究において、両手法を用いた解析が行われているが、結果を解釈する際には上記のような注意が必要である。したがって、今回の解析から、少なくとも豚デルタコロナウイルス国内分離株と国外分離株とでは子豚の消化器官におけるウイルスの局在性と増殖性に差がある可能性が示唆された。今後はS遺伝子あるいはNS7遺伝子における相違との関連性を考慮・精査しながら、それらの相違に関わる責任遺伝子(あるいは責任遺伝子領域)を特定するつもりである。また、子豚以外の異なる生育ステージの豚を用いた感染実験を実施し、今回の結果が再現されるかどうか合わせて検討するつもりである。

4. 要 約

遺伝的背景が異なる2種類の豚デルタコロナウイルス分離株を子宮摘出初乳未摂取豚に経口投与し、本ウイルス特有の子豚における臨床症状を明らかにするとともに、それらの株に特徴的な体内動態や病原性を明らかにすることを試みた。本研究では3日齢の子豚を用いたが、これまでの研究と同様に、本ウイルスは単独で激しい下痢を引き起こすことが明らかとなった。加えて、投与後10日前後は顕著な臨床症状を示すものの、その後元気を回復し、観察期間を通じて生存することも明らかとなった。さらに、他の豚消化管ウイルスと

同様に、短期間ではあるが、ウイルス血症を示すことも明らかとなった。糞便中および血中のウイルス排泄期間と量に関して、国内分離株と国外分離株との間で相違は認められなかったが、子豚の消化器官内におけるウイルスの分布と増殖性に相違が認められた。今後は生育ステージが異なる豚を対象に、同様の感染実験を実施し、それら豚における本ウイルス特有の臨床症状や感染動態を明らかにし、他の豚消化器病との類症鑑別や防除技術の開発に役立てていきたい。

文 献

- 1) Woo, P., Lau, S., Lam, C., Lau, C., Tsang, A., Lau, J., Bai, R., Teng, J., Tsang, C., Wang, M., Zheng, B., Chan, K., Yuen, K. : Discovery of seven novel mammalian and avian coronaviruses in the genus deltacoronavirus supports bat coronaviruses as the gene source of alphacoronavirus and betacoronavirus and avian coronaviruses as the gene source of gammacoronavirus and deltacoronavirus, *J Virol*, **86**, 3995~4008, 2012.
- 2) Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y. : Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014, *Emerg Infect Dis*, **20**, 1227~1230, 2014.
- 3) Marthaler, D., Raymond, L., Jiang, Y., Collins, J., Rossow, K., Rovira, A. : Rapid detection, complete genome sequencing, and phylogenetic analysis of porcine deltacoronavirus, *Emerg Infect Dis*, **20**, 1347~1350, 2014.
- 4) Ma, Y., Zhang, Y., Liang, X., Lou, F., Oglesbee, M., Krakowka, S., Li, J. : Origin, evolution, and virulence of porcine deltacoronaviruses in the United States, *mBio*, **6**, q00064-15, 2015.
- 5) Thachil, A., Gerber, P. F., Xiao, C., Huang, Y., Opriessnig, T. : Development and application of an ELISA for the detection of porcine deltacoronavirus IgG antibodies, *PLoS One*, **10**, e0124363, 2015.
- 6) Jung, K., Hu, H., Eyerly, B., Lu, Z., Chepngeno, J., Saif, L. J. : Pathogenicity of 2 porcine deltacoronavirus strains in gnotobiotic pigs, *Emerg Infect Dis*, **21**, 650~654, 2015.
- 7) Chen, Q., Guger, P., Stafne, M., Thomas, J., Arruda, P., Burrough, E., Madson, D., Brodie, J., Magstadt, D., Derscheid, R., Welch, M., Zhang, J. : Pathogenicity and pathogenesis of a United States porcine deltacoronavirus cell culture isolate in 5-day-old neonatal piglets, *Virology*, **482**, 51~59, 2015.

国際競争に勝つ『サルモネラ-ゼロ』モデル養豚場の作出

Construction of the “Salmonella-free” model pig farm to be able to win international competition

末 吉 益 雄

(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

Masuo Sueyoshi

(The Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

The presence of salmonellosis occurrence and the *Salmonella* carriage in the pig farm results in a bad influence in the productivity of pigs and the health for human. The clearance of the breeding environment of the pig is the most basic as *Salmonella* sanitization measures. In other words, we must perform a washing/disinfection of the farm environment appropriately. We performed this study in the pig farm where salmonellosis was exposed. We compared the antiseptic effect with the foaming and fog. It was aimed for that we contributed to clearance of *Salmonella* and clean maintenance. As disinfection, we performed it in each combination of the compound hypochlorous acid, peroxide and aldehyde preparation by foaming and the fog disinfection. We performed a washing/disinfection by three different processes. We wiped off the floors of the pigpen before and after a washing/disinfection and examined it. Other than *Salmonella*, we examined it for the environmental bacteria, coliform, *Clostridium perfringens*. We chose effective washing/disinfection technique and, for approximately one year, performed environmental wiping test before and after a washing/disinfection and the examination for anti-*Salmonella* antibodies of pigs. As a result, after a washing/disinfection, 90.79% of coliform had decrease in the environmental bacteria more than an average of 99.99%. The antibody positive rate of *Salmonella* was observed in the range of 88.9% from 0%. In this study, *Salmonella* was not detected before the disinfection either. However, the risk of the salmonellosis occurrence is present because the antibody was detected. We prevented salmonellosis by fixing a washing/disinfection technique chosen in this study, and a farm was suggested in the future that it was possible for *Salmonella*-free.

1. 目 的

サルモネラに感染した豚は、下痢や敗血症など重篤な症状を引き起こす場合と、症状がみられない場合がある。症状が観察された場合、抗菌剤による治療が行われている。しかし、最近、多剤耐

性サルモネラが出現してきていることから抗菌剤は適切な使用が求められている。一方で、ヒトの食中毒に深く関係するのは、臨床症状が認められないサルモネラ保菌豚である。生体検査では、無症状のため、健常豚として、食肉処理場で処理され、市場に流通する危険性がある。本研究の目的

は、食中毒の原因菌であり、家畜の監視伝染病の原因菌でもあるサルモネラの抜本的対策として、サルモネラ「ゼロ」農場を作出し、食の「安全性」を生産現場で確立し、消費者の信頼を得ることである。

2. 材料および方法

洗浄・消毒法

2.1 供試消毒剤・殺虫剤

消毒剤として、複合次亜塩素酸系消毒剤（アンテックビルコンS，バイエル），過酸化剤（ハイペロックス，バイエル），アルデヒド製剤（グルタZ，ゼノアック）を供試した。殺虫剤として、ピレスロイド系ハエ成虫駆除剤（バイオフィライ，バイエル）と（ゴキラート，住友化学），およびカーバメート系殺虫剤（ボルホ，バイエル）を供試した。

洗浄・消毒工程として，A，BおよびC法を実施した（Fig. 1）。

2.2 供試材料

養豚場内に入る際にはシャワーを浴び作業着，マスク，ゴム手袋，長靴，帽子を着用した。採材はふきふきチェックII（栄研化学株式会社）を用いた。肥育豚舎の飼槽周辺の床面3か所とビニルダクトまたは壁面1か所について，豚導入直前，豚搬出直後に5cm×5cmの箇所を採材した。

2.3 細菌検査法

(1) 供試培地

サルモネラについては，ノボビオシン（SIGMA CHEMICAL.CO）0.02g/l加DHL寒天培地（ニッスイ），X-SAL寒天培地（ニッスイ），ノボビオシン含有ESサルモネラ寒天培地II（栄研）を用い，好気条件下で37℃，24～72時間培養した。また，EEMブイヨン（ニッスイ），セレナイト・シスチン基礎培地（ニッスイ）を用い，37℃，20時間，震盪増菌培養し，菌数測定用培地に塗布した。

さらに，ノボビオシン加DHL寒天培地で無色または黒色，X-SAL寒天培地で緑色または黒色，ノボビオシン含有ESサルモネラ寒天培地IIで桃色であった集落に対して各々Mullre Hinton Agar（MHA；OXOID LTD.）を用いて継代し，37℃，18～24時間，培養した。一般生菌については普通寒天培地（ニッスイ）を用い，好気条件下で37℃，24時間培養した。大腸菌群についてはデソキシコレート寒天培地（ニッスイ）を用い，好気条件下で37℃，24時間培養した。ウェルシュ菌については卵黄エマルジョン50%（無菌）（Merk）添加硫酸カナマイシン（0.2g/60g）含有CW寒天基礎培地（ニッスイ）を用い，嫌気条件下で37℃，24～48時間培養した。乳光反応がみられた集落についてPCR法を用いて α 毒素産生遺伝子の検出を行った。

(2) 菌数測定

採材した菌液を 10^{-1} とし 10^{-8} まで10段階希釈後，各段階の希釈液を上記の培地に20 μ L直接滴下し，コンラージを用いて均一に塗布・培養し，発育集落を測定し各菌数を算出した。

2.4 洗浄・消毒のモニタリング（1年間）

毎月オールイン・オールアウト時に肥育豚舎の飼槽周辺の床面3か所と壁面1か所について5cm×5cmを採材した。

2.5 血清学的検査

当該農場の出荷豚（総計725頭）の血清を採材し，SALMOTYPE[®]Pig Screen（Labor Diagnostik Leipzig）を用いて，サルモネラ抗体を測定した。

3. 結果と考察

3.1 消毒法A（Table 1）

洗浄・消毒前，サルモネラとウェルシュ菌はいずれの検体からも検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 8.18 ± 0.55 (\log_{10} cfu/25cm²)，ビニルダクトで 6.57 (\log_{10} cfu/25cm²)だった。大腸菌

A法（ビルコン発泡消毒とグルタ煙霧消毒）

一日目		二日目		三日目	
午前	午後	午前	午後	午前	午後
豚搬出, 殺虫剤噴霧 (バイオフライ)	予備水洗, バイオソルブ 発泡	仕上げ水洗	水洗チェック 再水洗	乾燥	乾燥

四日目		五日目		六日目		七日目		八日目
午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前
ビルコン発泡	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	グルタ煙霧	密閉	殺虫剤 (ゴキラート)	豚搬入

B法（ビルコン発泡消毒とハイペロックス煙霧消毒）

一日目		二日目		三日目	
午前	午後	午前	午後	午前	午後
豚搬出, 殺虫剤噴霧 (バイオフライ)	予備水洗, バイオソルブ 発泡	仕上げ水洗	水洗チェック 再水洗	乾燥	乾燥

四日目		五日目		六日目		七日目		八日目
午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前
ビルコン発泡	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	ハイペロックス 煙霧	密閉	殺虫剤 (ボルホ)	豚搬入

C法（グルタ発泡消毒とグルタ煙霧消毒）

一日目		二日目		三日目	
午前	午後	午前	午後	午前	午後
豚搬出, 殺虫剤噴霧 (ゴキラート)	予備水洗, αフォーム 発泡	仕上げ水洗	水洗チェック 再水洗	乾燥	乾燥

四日目		五日目		六日目		七日目		八日目
午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前	午後	午前
グルタ発泡	乾燥	乾燥	乾燥	乾燥	グルタ煙霧	密閉	殺虫剤	豚搬入

Fig. 1 Process of a washing/disinfection method

群数は床面3か所で 4.13 ± 1.73 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), ビニルダクトからは検出されなかった。洗浄・消毒後, サルモネラとウェルシュ菌は検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 3.28 ± 1.18 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。大腸菌群数は床面1か所で 2.10 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 床2か所からは検出

されなかった。

3.2 消毒法B

洗浄・消毒前, サルモネラは検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 7.75 ± 0.20 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。大腸菌群数は床面3か所で 3.78 ± 0.43 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。ウェルシュ菌は床

面1か所で3.88 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 床2か所からは検出されなかった。洗浄・消毒後, サルモネラは検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 4.54 ± 0.16 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。大腸菌群数は床面1か所で2.57 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 床2か所からは検出されなかった。ウェルシュ菌はいずれの検体からも検出されなかった。

3.3 消毒法C

洗浄・消毒前, サルモネラは検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 8.67 ± 0.42 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 壁面1か所で3.78 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。大腸菌群数は床面3か所で 4.53 ± 0.49 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 壁面からは検出されなかった。ウェルシュ菌数は床面1か所で2.40 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 床2か所, 壁面からは検出されなかった。洗浄・消毒後, サルモネラは検出されなかった。一般生菌数は床面3か所で 4.10 ± 0.60 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 壁面1か所で3.27 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$) だった。大腸菌群数は床面1か所で4.54 ($\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$), 床2か所, 壁面からは検出されなかった。ウェルシュ菌はいずれの検体からも検出されなかった。

以上, サルモネラ症が時折発生する養豚場であったが, 検査期間中にその発生はなく, また, すべてのサンプルから増菌法を含めてサルモネラは検出されなかった。しかし, その他の細菌と比較すると, 消毒法Aが最も減少率が大きかったことから, 本法を日常実施することにした。

3.4 洗浄・消毒のモニタリング (1年間)

当該期間もサルモネラは検出されなかった。一般生菌数は, 毎回洗浄・消毒後安定して, 大幅に減少していた (平均: 床面99.42%, 壁面99.97%減少)。大腸菌群とウェルシュ菌については, 6月と7月を除いて, 洗浄・消毒後には検出されず, 検出されてもそれぞれ洗浄・消毒前よりも大幅に減少していた (大腸菌群数: 99.61%, ウェルシュ菌数: 98.33%減少)。餌槽周辺の床に残存する傾向があった。

3.5 血清学的検査 (Table 2)

サルモネラ抗体陽性率が8月で88.9%。9月で75%と高い数値を示した。当該出荷豚のサルモネラ感染履歴が明らかとなった。環境中の拭き取り検査から, サルモネラは検出されなかったことか

Table 1 The results of washing/disinfection method A

採材場所	一般生菌数*	大腸菌群数*	ウェルシュ菌数*	サルモネラ*
洗浄前				
床1	8.01	5.18	0	0
床2	7.81	4.81	0	0
床3	8.73	2.40	0	0
ダクト	6.57	0	0	0
洗浄後				
床1	4.05	2.10	0	0
床2	2.10	0	0	0
床3	3.68	0	0	0
ダクト	0	0	0	0

* $\log_{10}\text{cfu}/25\text{cm}^2$

Table 2 The anti-Salmonella antibody positive rate

	7月	8月	9月	10月	11月	12月	1月	2月	3月	4月
平均陽性率	11.4	88.9	75.0	27.8	22.9	44.4	2.8	41.7	17.6	5.6

ら、サルモネラ感染や排菌は証明されなかったが、サルモネラ保菌豚が潜在しているリスクを念頭に環境の洗浄・消毒を徹底させる必要がある。

4. 要 約

養豚場におけるサルモネラ症発生およびサルモネラ保菌の存在は豚の生産性の低下およびその肉の摂食したヒトの健康保持に悪影響をもたらす。サルモネラ除菌対策として飼育環境の清浄化維持は最も基本的手段である。農場内環境の洗浄・消毒を適切に行わなければならない。本研究では、サルモネラ症が摘発されている養豚場を選定し、当該豚舎の発泡・煙霧消毒効果を比較検討し、サルモネラの清浄化および清浄維持の一助とすることを目的とした。

消毒法として、発泡消毒と煙霧消毒法による複合次亜塩素酸系消毒剤、過酸化剤およびアルデヒド製剤の各組み合わせで実施し、3つの異なる工

程で洗浄・消毒を行い、オールアウト後（洗浄・消毒前）およびオールイン前（洗浄・消毒後）の豚舎床などを拭き取り検体とし、比較試験を行った。サルモネラの他、一般生菌、大腸菌群、ウェルシュ菌についても分離・培養・検出を行い、菌数測定した。次に、効果的な洗浄・消毒方法を選定し、約1年間洗浄・消毒前後の環境拭き取りと肥育豚のサルモネラ抗体検査を実施した。その結果、洗浄・消毒後、一般生菌は平均99.99%以上、大腸菌群は90.79%減少がみられた。サルモネラの月ごとの抗体検査では、2.8%から88.9%の範囲で抗体陽性が認められた。本研究期間中サルモネラ本菌は検出されなかったが、その抗体が検出されたことから、サルモネラ症発生のリスクは存在しており、本試験で有効と判断された洗浄・消毒法を、当該農場に定着させることで、サルモネラ症を予防し、将来的に農場をサルモネラフリーにできると示唆された。

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 (~27 kb), single-stranded, positive-sense RNA genome. Coronaviruses have been identified in mice, chickens, pigs, dogs, cats, and humans. Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV), which belongs to the family *Coronaviridae*, is a highly pathogenic alphacoronavirus. PEDV cause between 80 and 100% mortality in suckling piglets and rapidly transmitted between animals and farms.

Reverse genetic system is very powerful tool in Virology filed. We employed Bacterial Artificial Chromosome (BAC) system to generate PEDV infectious cDNA. Using this reverse genetic system, we replaced open reading frame 3 (ORF3) with a green fluorescent protein (GFP) gene to generate recombinant PEDV carrying GFP (pBAC PEDV-GFP). This pBAC PEDV-GFP DNA was transfected into Huh-7 cells. Following transfection with the cDNA clone, infectious virus was rescued in Vero cells. We confirmed the expression of GFP and induction of syncytium formation in both transfected and infected cells. Our recombinant PEDV carrying GFP is useful to understand the replication and pathogenesis of PEDV.

1. 目 的

コロナウイルスは、ヒトおよび動物に様々な病気を引き起こすことが知られている。ヒトにおいては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や2012年度から中東地域を中心に発生している中東呼吸器症候群コロナウイルスが重篤な肺炎を引き起こすことで知られている。

一方、獣医領域においてもコロナウイルスは重要なウイルス感染症の一つである。特に、最近、養豚業界において重大な被害をもたらした豚流行性下痢の原因ウイルスである豚流行性下痢ウイル

ス (Porcine Epidemic Diarrhea Virus : PEDウイルス) は、迅速な感染症対策と基礎ウイルス学による病原性解明の必要な病原体である。

コロナウイルスのウイルス学的特徴は、RNAウイルスの中で最長のゲノムを持つエンベロープウイルスである。コロナウイルスの基礎ウイルス学研究は、そのウイルスゲノムが最長であるため、現在の基礎ウイルス学分野において必須の技術である遺伝子操作系の確立が難しく限られた研究グループのみで成功しているのが現状である^{1,2)}。このため、PEDウイルスなどの動物由来コロナウイルスの基礎研究においても遺伝子操作系を扱

えるのはごく限られた研究グループである^{3,4)}。特に、基礎ウイルス学におけるウイルスに任意の変異を導入できる遺伝子操作系は、個々のウイルスタンパク質の病原性の解明や病原性発現機序の解明、さらには、ワクチンの開発や抗ウイルス薬の開発を進めるうえで重要な基礎技術である。

本研究課題では、今まで困難であったコロナウイルスの遺伝子操作系を Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いて完全長のcDNAクローンを作製する。BACのシステムは、大腸菌の中でそのコピー数が1コピーと少なく、そのためコロナウイルスのような長いウイルスゲノム由来のcDNAを保持するのに優れている。実際に、申請者は、SARSコロナウイルスの遺伝子操作系にこのBACシステムを用いることで、組換えウイルスの作製に成功している。さらに、昨年度においてPEDウイルスの完全長のcDNAをBACに挿入するのに成功している。

そこで、本研究課題では、昨年度より行っている「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」の研究課題を継続・発展させることで、豚流行性下痢ウイルスの遺伝子操作系を確立し、その方法を用いて野外流行株とのキメラウイルスを作製し、野外流行株のウイルス学的性状を明らかにするための基盤の構築を行った。今後は、上述の遺伝子操作技術を用いて個々のウイルスタンパク質の解析を行い、新規のワクチン開発および抗ウイルス薬の開発につながる。

さらに、今後は、この遺伝子操作系により作製した組換えPEDウイルスを用いることで、野外流行株のウイルス学的性状を明らかにして、PEDウイルスの感染防御の開発のための基盤技術の作出を目指す。

2. 方法

2.1 細胞

Vero細胞 (CCL-81) は、the American Tissues Culture Collection (ATCC) より入手した。ヒト肝癌由来細胞株Huh-7細胞は、大阪大学微生物病研究所・分子ウイルス分野・松浦善治教授より分与された。すべての細胞は10%牛胎児血清を含むダルベッコ変法最小必須培地 (DMEM, ナカライ) で培養した。

2.2 コンストラクト

Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いたPEDウイルスの感染性cDNAは、昨年度の方法に従い作製した。以下に簡単に方法を記す。PEDウイルス (CV777株) を感染させた培養上清から、TRIzolを用いてウイルスRNAの抽出を行い、逆転写酵素によりウイルスcDNA合成を行った。PEDウイルス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PEDウイルス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し、完全長のPEDウイルスcDNAを保持するBACクローン (pBAC-PEDV-FL) を作製した。

さらに、感染の指標を容易にするために、レポーター遺伝子であるGFPを上述のRed/ETによる相同組換え方を用いて、PEDウイルスの遺伝子上のORF3をGFPに置き換えた (pBAC PEDV-GFP)。

2.3 大腸菌へのBACの形質転換

BACのDNAを大腸菌へ形質転換するときは、エレクトロポレーション法により行った。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。その後、FastGene Xpress Plasmid PLUS kit (FastGene) を用いて、pBAC PEDV-GFP の DNA を精製した。

2.4 Red/ETによる相同組換え

完全長のcDNAへの変異の導入にはRed/ET Recombination System (GENE BRIDGES) を用いて行った。プロトコルに従い、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。つぎに、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。

2.5 感染性PEDVウイルスの作製

各種培養細胞を 1.5×10^5 cell / well になるように、12well培養プレートに播種した。細胞へのpBAC PEDV-GFPの導入には、4 ugのpBAC PEDV-GFPと12ulのFuGENE6を用いて、FuGENE6のプロトコルに従いトランスフェクションを行い、24時間後に培地交換を行った。トランスフェクション3日後、トリプシン処理するために培地を無血清培地で4回洗浄し、各種濃度のトリプシン添加無血清培地で6時間から18時間培養を行った。

その後、培養細胞をPBS (-) で洗浄し回収し、凍結融解を三回行うことで、細胞内のPEDVウイルスを回収した。回収したPEDVウイルスをVero細胞へトリプシン添加無血清培地にて加えた。ウ

イルス添加後、感染の有無をGFPの蛍光シグナルを指標に継時的に観察した。

3. 結果と考察

今回、Bacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いて、豚流行性下痢ウイルス (PEDウイルス) のCV777株を元に、GFPを保持した感染性クローンの構築を試みた。感染の有無の指標を容易にするために、PEDウイルスのウイルスゲノム上へのGFP遺伝子の挿入を行った。GFPはPEDウイルス (CV777株) のORF3遺伝子領域に相当する24789番目から25416番目の塩基をGFP遺伝子に置き換えた。ORF3遺伝子は、S遺伝子とE遺伝子の間に存在する675塩基からなるウイルス複製に必須でないウイルス遺伝子である。そこで、ORF3をGFP遺伝子に置き換えることで、GFPをウイルスゲノムに保持するPEDウイルスの感染性cDNAクローン (pBAC PEDV GFP) を作出した (Fig. 1)。

pBAC PEDV GFPをVero細胞およびHuh-7細胞にFuGENE6を用いて導入したところ、Huh-7細胞においては、2日後からGFP陽性の細胞が観察された (Fig. 2 A and B)。さらに、3日後に、無血清培地にて洗浄し、トリプシン添加無血清培地で培養したところ、GFP陽性細胞数が増加することが確かめられた。また、トリプシン添加により隣接する細胞同士が融合する細胞融合 (シンシチウム形成) が認められた (Fig. 2 C)。

一方、PEDウイルスに感受性を示すVero細胞

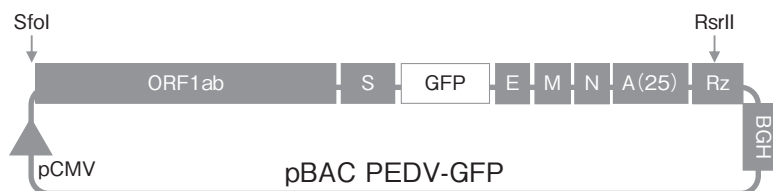


Fig. 1 Schematic representation of the recombinant PEDV genome carrying GFP gene
The ORF3 was substituted by GFP. CMV promoter (pCMV), HDV ribozyme (Rz), BGH termination and polyadenylation sequence (BGH) are shown.

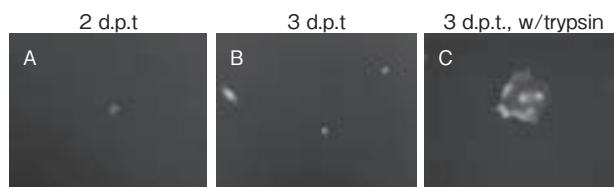


Fig. 2 Expression of GFP in Huh-7 cells transfected with pBAC PEDV-GFP

Huh-7 cells were transfected with pBAC PEDV-GFP. The GFP expression were analyzed at the indicated time points by microscopy assay.

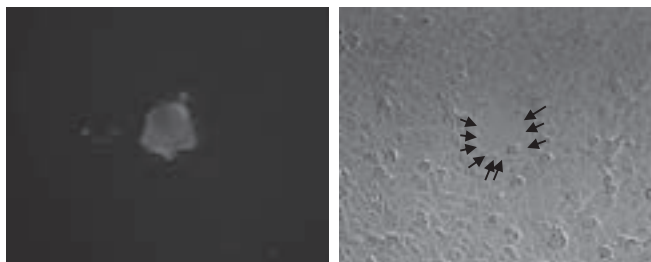


Fig. 3 Identification of the virus recovered from cDNA clone

Vero cells were infected with the rPEDV-GFP rescued in Huh cells. The GFP expression and induction of syncytium formation were analyzed 2 d.p.i by microscopy assay. The arrow represented the syncytium.

では、GFP陽性細胞はほとんど検出されなかった。これは、Vero細胞におけるトランスフェクション効率が悪いためであると思われる。

今回の結果から、ヒト由来肝臓細胞であるHuh-7細胞において、導入したpBAC PEDV-GFPからRNAへの転写が行われ、ウイルスタンパク質が産生され、レポータータンパク質であるGFPを検出できたと考えられる。PEDウイルスは豚に感染性を示すコロナウイルスであるが、培養細胞を用いた実験からヒト由来の細胞でも感染できることが報告されている⁵⁾。また、Huh-7細胞は一般的にトランスフェクション効率もよいことから、PEDウイルスの組換えウイルスを産生する細胞として優れていると思われる。

次に、Huh-7細胞から感染性粒子が産生されているか否かを検討するために、上述の方法により、Huh-7細胞にpBAC PEDV-GFPをトランスフェクションし、3日後に細胞を回収し、凍結融解を3回行い、デブリスを遠心操作にて取り除

き、細胞内の感染性粒子の回収を行った。その後、トリプシン添加無血清培地に交換したVero細胞へ回収したウイルス液を添加した。継時的にGFPのシグナルを蛍光顕微鏡にて観察を行った結果、2日後にGFP陽性細胞を確認できた (**Fig. 3**)。この結果から、PEDVの遺伝子をBACに組み込んだcDNAから感染性を持つウイルス粒子の産生に成功したと考えられる。

4. 要 約

RNAウイルスをウイルスゲノムとして持つコロナウイルスは、ヒトを含む様々な動物に感染する。特に、豚におけるコロナウイルス感染症の中でも、豚流行性下痢ウイルス感染は哺乳豚に下痢を引き起こし、養豚産業に大きな被害をもたらす。このPEDウイルスのウイルス学的性状を解析するためには、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が必須である。しかしながら、コロナウイルスの場合、その長いウイルスゲ

ノムRNAのため遺伝子操作系が煩雑で困難である。我々は、長鎖核酸の保持に優れたBacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いてコロナウイルスの遺伝子操作系の確立に取り組んでいる。

昨年度に完成したPEDウイルスのCV777株ベースのBACクローンを用いて、レポーター遺伝子であるGFPをPEDウイルスのORF3遺伝子と置き換えることにより導入した。GFPのシグナルは、トランスフェクション後2日から観察でき、3日後にトリプシンを添加することでシンシチウムを観察できた。さらに、シンシチウム形成後の細胞からウイルス粒子を回収し、Vero細胞に感染させることにより、2日後にVero細胞でGFPのシグナルとシンシチウムの形成を認めた。このことから、我々が用いたpBAC PEDV-GFPの感染性cDNAからPEDウイルスの感染性粒子を回収することに成功した。

今後、より高力価の組換えウイルス産生のため

に改良は必要であるが、今回の方法は、PEDウイルスの抗ウイルス薬のスクリーニングやワクチン開発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, M. R., Geisbert, T. W., Baric, R. S. : *Proc Natl AcadSci 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 Virol*, 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 (8), e6997, 2013.
- 4) Beall, A., Yount, B., Lin, C. M., Hou, Y., Wang, Q., Saif, L., Baric, R. : Characterization of a Pathogenic Full-Length cDNA Clone and Transmission Model for Porcine Epidemic Diarrhea Virus Strain PC22A, *MBio*, 5 ; 7 (1), e01451-15, 2016.
- 5) Liu, C., Tang, J., Ma, Y., Liang, X., Yang, Y., Peng, G., Qi, Q., Jiang, S., Li, J., Du, L., Li, F. : Receptor usage and cell entry of porcine epidemic diarrhea coronavirus, *J Virol*, 89 (11), 6121-5, 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・谷口紗耶

(京都大学大学院農学研究科)

Shinichi Kume 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. The first study was conducted to clarify the relationships among Immunoglobulin (Ig) M, IgG, IgA, β -carotene, vitamin A and α -tocopherol contents in colostrum of 24 Japanese Black multiparous cows in order to evaluate the role of IgM on colostral IgG and IgA production. Compared with colostral IgG, colostral IgM and IgA were very low but varied widely. There was positive correlation between colostral IgM and IgG, but colostral IgM was not related with colostral IgA. There was no relationship between colostral IgM and age of cows, although colostral IgG was increased with aging. There were positive correlations among colostral β -carotene, vitamin A and α -tocopherol and these vitamins were positively correlated with colostral IgM or IgG. The second study was conducted to clarify the effects of dry carrots feeding on colostral Ig contents in 11 Japanese Black cows fed grass silage based diet. Experimental diets were control diet and control plus dry carrots (138 mg β -carotene/day) diet, and dry carrots were offered from 3 weeks before the expecting calving day to parturition. Plasma β -carotene contents in the control and dry carrot groups at parturition were 378 and 475 $\mu\text{g}/\text{dL}$, but feeding dry carrots had no effects on β -carotene, IgG, IgA and IgM contents in plasma and colostrum of cows.

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、初乳中の免疫グロブリン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 β -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 β -カロテンによる新生子牛の下痢予防効果を見いだした¹⁾。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 β -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²⁾。

そこで、平成25-26年度には牧草サイレージ主体で飼養した黒毛和種繁殖牛19頭から初乳を採取し、初乳中IgG、IgAと脂溶性ビタミンの関係を調べたところ、初乳中の β -カロテン、ビタミンAおよび α -トコフェロール含量間に正の相関が認められただけでなく、初乳中の脂溶性ビタミン含量が増加すると初乳中IgG含量が増加した³⁾。さらに、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よく推定できたため、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。一方、初乳中のIgGとIgAは免疫グロブリンM (IgM) のクラススイッチによって生成するため、初乳中IgMと脂溶性ビタミンの関係を調べること、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、本研究では初乳中のIgGとIgA産生におけるIgMの役割を明らかにするために、黒毛和種経産牛24頭の初乳中IgG、IgA、IgM、 β -カロテン、ビタミンAと α -トコフェロールの関係を調べた。次に、 β -カロテン

を多量に含有した乾燥ニンジン黒毛和種繁殖牛に給与し、繁殖牛の初乳と血漿中免疫グロブリン含量に及ぼす乾燥ニンジン給与の影響を調べた。

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24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2kg/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、 β -カロテン、ビタミンAおよび α -トコフェロール含量を高速液体クロマトグラフ法で測定し、初乳中の脂溶性ビタミンと免疫グロブリンの相関関係などを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 黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンに及ぼす乾燥ニンジン給与の影響

牧草サイレージ主体で飼養した黒毛和種繁殖牛11頭を対照区 (n = 5) および乾燥ニンジン区 (n = 6) に割り当てて、対照区ではフスマ2kg/日、配合飼料0.5kg/日およびイタリアンライグラスサイレージを給与した。乾燥ニンジン区では対照区の飼料に加えて、分娩予定日の3週間前から分娩日まで乾燥ニンジンを300g/日 (β -カロテンとして138mg/日) 給与した。分娩予定日の10日前に繁殖牛の体重を測定し、血液サンプルを10時に採取した。分娩後に繁殖牛と子牛の体重を測定し、繁殖牛の初乳および血液サンプルは分娩後1~6時間内に採取した。初乳と血漿中のIgG、IgAおよびIgM含量をELISA法で、初乳、血漿と飼料中の β -カロテン含量を高速液体クロ

マトグラフ法で測定した。

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⁴⁾

黒毛和種繁殖牛の初乳中の平均IgG含量（範囲）は139mg/mL（65～208mg/mL）と高い値であったが、初乳中の平均IgA含量とIgM含量（範囲）はそれぞれ7.5mg/mL（1.0～34.6mg/mL）と9.3mg/mL（1.2～22.0mg/mL）とともに低い値であった（Table 1）。初乳中IgG含量は加齢に伴って増加した（ $P<0.001$ ）が、初乳中のIgM含量には加齢による影響は認められなかった。初乳中ビタミンA含量と β -カロテン含量間（ $P<0.001$ ）、初乳中ビタミンA含量と α -トコフェロール含量間（ $P<0.001$ ）と初乳中 β -カロテン含量と α -トコフェロール含量間（ $P<0.01$ ）に正の相関が認められ、また初乳中脂溶性ビタミン含量とIgG含量間、初乳中脂溶性ビタミン含量とIgM含量間と初乳中IgG含量とIgM含量間にも正の相関が認められた（Table 1）。

以上の結果から、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の増加に伴って初乳中IgG含量とIgM含量が増加

することが認められた。したがって、高品質サイレージを分娩前の黒毛和種繁殖牛に給与すると初乳中IgG含量とIgM含量の増加に貢献することが期待された。また、動物の免疫反応の初期にはIgMが産生され、その後抗原刺激に対応してIgMがIgGとIgAにクラススイッチするが、初乳中IgG含量とIgM含量間に正の相関が認められたことから、初乳中IgMは初乳中IgGの増加に関与していることが推察された。

3.2 黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンに及ぼす乾燥ニンジン給与の影響⁵⁾

乾燥ニンジン区での分娩直後の血漿 β -カロテン含量は475 μ g/dLと対照区の378 μ g/dLよりやや高い値であったが、繁殖牛の血漿および初乳中 β -カロテン含量には乾燥ニンジン給与による影響は認められなかった。この結果は、サイレージ由来の β -カロテン摂取量がサイレージの β -カロテン含量（乾物当たりで12.0～62.3mg/kg）から60～312mg/日と推定され、乾燥ニンジン由来の β -カロテン摂取量（138mg/日）より多い事例もみられたことが影響しているが、初乳と血漿中のIgG、IgAおよびIgM含量にも乾燥ニンジン給与の影響は認められなかった（Table 2）。一方、繁殖牛の血漿IgM含量と初乳IgM含量間（ $P<0.05$ ）に正

Table 1 Correlation between IgM, IgG, IgA and fat-soluble vitamins in colostrum of Japanese Black multiparous cows (n=24).

	Mean	SD	Min.	Max.	r	
					IgM	IgG
Age, months	69.6	22.4	34.0	118.3	0.06	0.65***
Gestation length, days	287.3	4.8	277.0	296.0	0.19	0.14
Colostrum						
β -carotene, μ g/dl	112.0	54.4	40.0	221.0	0.53**	0.41*
Vitamin A, μ g/dl	474.8	251.9	69.0	1096.0	0.44*	0.69***
α -tocopherol, μ g/dl	936.5	520.1	117.0	2606.0	0.56**	0.58**
IgA, mg/ml	7.5	8.9	1.0	34.6	0.35	0.32
IgG, mg/ml	138.5	32.6	65.0	208.0	0.44*	—
IgM, mg/ml	9.3	4.9	1.2	22.0	—	—

*** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$.

Table 2 Immunoglobulin in plasma and colostrum and β -carotene in colostrum of the control and carrot groups in Japanese Black cows at parturition (Mean \pm SE).

	Control	Carrot	<i>P</i>
Number of cows	5	6	
Parity	4.6 \pm 0.6	5.8 \pm 0.5	NS
Age, months	66.9 \pm 7.6	81.4 \pm 6.9	NS
Gestation length, days	292 \pm 2	289 \pm 2	NS
Calf birth weight, kg	33.1 \pm 2.6	34.8 \pm 2.4	NS
Plasma			
IgG, mg/mL	16.5 \pm 1.2	16.4 \pm 1.1	NS
IgA, mg/mL	0.20 \pm 0.07	0.17 \pm 0.06	NS
IgM, mg/mL	1.8 \pm 0.2	1.5 \pm 0.2	NS
Colostrum			
IgG, mg/mL	97.1 \pm 13.3	78.9 \pm 12.1	NS
IgA, mg/mL	7.0 \pm 1.7	4.9 \pm 1.5	NS
IgM, mg/mL	7.1 \pm 1.7	5.1 \pm 1.6	NS
β -carotene, μ g/dL	138 \pm 34	124 \pm 31	NS

NS, not significant.

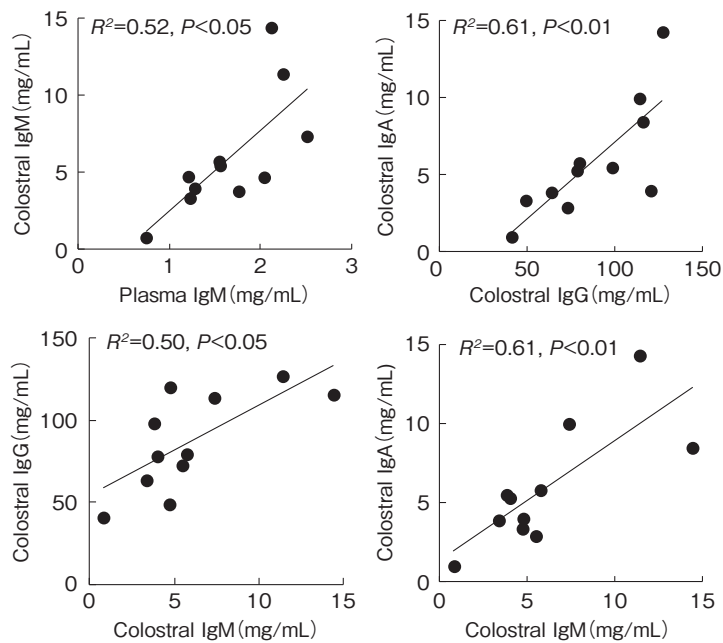


Fig. 1 Relationship between plasma IgM and colostral IgM, relationship between colostral IgG and colostral IgA, and relationships between colostral IgM and colostral IgG or colostral IgA of Japanese Black cows ($n=11$) at parturition.

の相関が認められ、初乳IgM含量と初乳IgG含量間 ($P<0.05$)、初乳IgM含量と初乳IgA含量間 ($P<0.01$) および初乳IgG含量と初乳IgA含量間 ($P<0.01$) にも正の相関が認められた (Fig. 1) こ

とから、初乳中のIgGとIgAの産生にIgMの関与していることが示唆された。

以上の結果から、 β -カロテンの栄養状態が良好な黒毛和種繁殖牛では β -カロテンを多量に含

有した乾燥ニンジンを与えても初乳中の免疫グロブリンが改善されないことが推察された。しかし、分娩前の黒毛和種繁殖牛には低品質の粗飼料を与えている事例も多いことから、今後は β -カロテンの不足している黒毛和種繁殖牛に乾燥ニンジンを与えて、初乳中の免疫グロブリンなどに及ぼす効果を調べる必要がある。

4. 要 約

初乳中のIgGとIgA産生におけるIgMの役割を明らかにするために、黒毛和種経産牛24頭の初乳中IgG, IgA, IgM, β -カロテン, ビタミンAと α -トコフェロールの関係を調べた。初乳中IgG含量と比較すると、初乳中IgM含量とIgA含量は非常に低い値であり、また変動が大きかった。初乳中IgM含量は初乳中IgG含量と正の相関が認められたが、初乳中IgA含量とは相関関係が認められなかった。初乳中IgG含量は加齢に伴って増加したが、初乳中IgM含量には加齢による影響は認められなかった。初乳中ビタミンA含量、 β -カロテン含量と α -トコフェロール含量間に正の相関が認められ、また初乳中脂溶性ビタミン含量と初乳中IgM含量、IgG含量間にも正の相関が認められた。次に、牧草サイレージ主体で飼養した黒

毛和種繁殖牛に分娩予定日の3週間前から分娩日まで β -カロテンを多量に含有した乾燥ニンジンを300 g/日 (β -カロテンとして138mg/日) 給与し、繁殖牛の初乳と血漿中免疫グロブリン含量に及ぼす乾燥ニンジン給与の影響を調べた。その結果、乾燥ニンジン区の分娩直後の血漿 β -カロテン含量は475 μ g/dLと対照区の378 μ g/dLよりやや高い値であったが、繁殖牛の初乳と血漿中の β -カロテン、IgG, IgAおよびIgMには乾燥ニンジン給与の影響は認められなかった。

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.
- 4) Taniguchi, S., Wang, M., Ikeda, S., Yoshioka, H., Nagase, H., Kitamura, S., Itoyama, E., Murakami, H., Sugimoto, M., Kume, S. : *Animal Science Journal*, **87**, 536~540, 2016.
- 5) 谷口紗耶, 王蒙東, 池田俊太郎, 吉岡秀貢, 長瀬祐士, 北村祥子, 糸山恵理奈, 村上弘明, 小草啓輔, 佐藤健史, 杉本実紀, 久米新一: 日本畜産学会報, **86**, 473~479, 2015.

飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の検証 —内分泌攪乱作用の有無と繁殖性に与える影響の解明

Monitoring of naturally contaminated mycotoxin concentrations in feeding environment of cattle

—Effects as endocrine disruptors and reproductive efficacy

高木 光博・宇野 誠一*・國師 恵美子*

(山口大学共同獣医学部臨床獣医学講座, *鹿児島大学)

Mitsuhiro Takagi, Seiichi Uno* and Emiko Kokushi*

(Department of Clinical Veterinary Science, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, *Kagoshima University)

We investigated the effects of *in vivo* exposure to low zearalenone levels on the anti-Müllerian hormone endocrine levels and the reproductive performance of cattle. Urine and blood samples and reproductive records were collected from two Japanese Black breeding female cattle herds with dietary zearalenone contamination below the threshold levels (< 1 ppm) at 30 d after calving. Urinary zearalenone, α -zearalenol, and β -zearalenol concentrations were measured by chromatography tandem mass spectrometry, and serum anti-Müllerian hormone concentrations were determined along with serum biochemical parameters. Urinary concentrations of α -zearalenol were significantly higher ($p < 0.05$) in cattle in Herd 1 than in cattle in Herd 2, reflecting the different amounts of zearalenone in the diet of the two herds. Although the number of 5-mm and 10-mm follicles of the herds and their fertility after artificial insemination were similar, the serum anti-Müllerian hormone concentrations in Herds 1 and 2 were 438.9 ± 48.6 pg/ml and 618.9 ± 80.0 pg/ml, respectively, with a trend toward a significant difference ($p = 0.053$), which may indicate differences in the antral follicle populations between herds. Thus, zearalenone intake from dietary feed, even when below the threshold zearalenone contamination level permitted in Japan, may affect the ovarian antral follicle populations, but not the fertility, of postpartum cows.

1. 目 的

申請者らはこれまでに、*Fusarium*属真菌由来マイコトキシン (MT) で、エストロゲン類似作用を持つことから家畜に繁殖障害などを引き起こす可能性が示唆されるゼアラレノン (ZEN) に着目し、1) 尿中ZEN濃度を指標とした飼養環境下の牛群におけるMTモニタリングシステム

の構築とその有用性¹⁾、2) モニタリング結果を基にした我が国の暫定基準値を超えるZEN自然汚染稲ワラ給与を原因とするMT汚染牛群の初摘発例²⁾、および3) 尿中ZEN濃度を指標としたMT吸着剤添加効果の客観的評価法の確立³⁾などを報告しており、生体由来サンプルである尿を用いたMTモニタリングシステムを確立するとともに、飼養環境下の家畜 (牛および豚) における

MT浸潤動態の検証およびデータベースの蓄積を進めている。

近年、ZEN暴露が雌性動物に与える要因の1つとして、卵胞内の顆粒膜細胞 (GC) に対するアポトーシス誘導とそれに続く卵胞発育の閉鎖、退行が報告されている。一方、組織の成長や分化に関わる糖タンパクである抗ミュラー管ホルモン (AMH) は、雌性動物の胞状卵胞のGCから分泌され、牛では卵巣内にプールされたゴナドトロピン反応性の胞状卵胞数をモニターするためのバイオマーカーとなることが報告されている⁴⁾。したがって、ZEN汚染飼料が給与された雌牛群においては、ZEN暴露によるGCのアポトーシス誘導で胞状卵胞が閉鎖し、結果として血中AMH濃度の低下が予想される。飼養環境下の牛群におけるMT浸潤動態と血中AMH動態との関連性の有無を検証することは、ZENが持つ内分泌攪乱作用を生体レベルで明らかにするために重要なアプローチである。

以上のことから、本申請課題においては、黒毛和種繁殖雌牛群においてZEN浸潤 (あるいはZENを含む複数のMT浸潤) と血中AMH濃度に関するデータベースを蓄積するとともに、各牛群の繁殖成績 (空胎日数など) と併せて、飼養環境下の繁殖雌牛群におけるMT浸潤動態—血中AMH動態—牛群の繁殖成績の間の関連性の有無を検証することを目的とするものである。

2. 方法

2.1 黒毛和種牛群の概要とサンプリング法

黒毛和種繁殖雌の2牛群 (Herd 1 およびHerd 2) を本実験に供した。両牛群ともに自家産粗飼料と購入濃厚飼料が給与されており、試験開始前にLC/MS/MS法による飼料中ZEN濃度分析を行った。分娩後30日目の牛を無作為に試験牛として尿および血液の採取を行うとともに、超音波エ

コー (US) を用いた生殖器の観察を行った。

2.2 飼料中ZEN濃度測定

Fushimiら (2014)³⁾ の報告に従い、LC/MS/MS法による公定法を用いて測定を行った。

2.3 尿中ZEN濃度測定

尿サンプルの調整は我々の既報¹⁾ に従い、 β -Glucuronidase/arylsulfatase添加による前処理を行った尿サンプルを固相抽出後にLC/MS/MS測定に供した。結果はZENとその代謝物 α -および β -ゼアラレノール (α -ZOLおよび β -ZOL) 濃度を測定した。

2.4 血清AMH濃度測定

血清AMH濃度の測定は、AMH Gen II ELISA kit (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA) を用い、Ricoら (2011)⁴⁾ の方法に準じて血清サンプル50 μ lを用いて行った。本測定系の測定感度は15pg/mlであった。

2.5 血清生化学検査

両試験牛群の栄養状態をモニターするために、我々の既報に従って血清生化学検査を行った (使用器械: Labospect 7180 autoanalyzer, Hitachi)⁵⁾。測定項目はエネルギー代謝: グルコース, 遊離脂肪酸 (FFA), 総コレステロール (TC); タンパク質代謝: 総タンパク (TP), 血清アルブミン (Alb), アルブミン/グロブリン比 (A:G), 血中尿素窒素 (BUN); 肝機能: AST,GGT; ミネラル: カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), 無機リン (iP), 肝臓代謝: IGF 1, の各項目の測定を行った。

2.6 繁殖検診成績

各試験対象牛の分娩後30日目に繁殖検診を行った。直腸検査およびUSを用いて各牛の子宮の回復状況 (両子宮角サイズ, 内腔の貯留卵巣内卵胞および黄体の有無), 卵胞 (>5 mm) や黄体 (>5 mm) の長径およびそれらの個数を観察, 記録した。併せて, サンプリング終了時に対象牛の繁殖

履歴を確認して、分娩後初回人工授精 (AI) 日、受胎に至るまでのAI回数と分娩後の空胎日数を確認した。

2.7 各成績の取りまとめ

尿中ZEN, α -ZOL, β -ZOLおよびそれらの合計 (Σ ZEN) 濃度, 血中AMH濃度, 各血清生化学検査項目濃度, 各繁殖成績項目は平均SEMで算出した。各項目についてHerd 1とHerd 2の2群間での比較検討を行った。

3. 結果と考察

本試験では2牛群Herd 1 (n = 17) とHerd 2 (n = 13) からデータを得た。2牛群間で試験牛の年齢に有意な差が見られ, Herd 1が全体として若い牛群であった。両牛群の飼料中ZEN濃度は, 我国のZEN暫定基準値である1.0ppm以下であった。尿中ZEN, α -ZOLおよび Σ ZENにおいてHerd 1がHerd 2よりも有意に高い値となり, それらは2牛群間の飼料中ZEN濃度の差を反映するものと思われた。一方, 血中AMH濃度はHerd 2においてHerd 1よりも有意に高い傾向 (P = 0.053) が得られた。分娩30日後の卵巣内の卵胞および黄体の数は両群間で有意差は見られなかった。両群間の繁殖成績では, 分娩後初回AI日と空胎日数においてHerd 1がHerd 2よりも有意に短くなる傾向が得られた (Table 1)。

一方, 血清生化学検査項目では, BUNとTC濃度において2群間に有意差が見られたが, その他の項目においては有意な差は認められなかった (Table 2)。

近年の体外培養系実験結果から, ZEN暴露が雌性動物の繁殖性に影響を与える要因の1つとして, 卵胞内の顆粒膜細胞に対するアポトーシス誘導とそれに続く卵胞発育の閉鎖, 退行が報告されている^{6,7)}。したがって, 顆粒膜細胞の生存性や活力を反映する内分泌バイオマーカーを測定する

Table 1 Mean concentrations of (1) urinary ZEN (\pm SEM) and its metabolites and (2) serum anti-Müllerian hormone (AMH) related to the reproductive performance of the two Japanese Black breeding cattle herds examined.

	Herd 1	Herd 2
No. Cattle Examined (mean age \pm SEM)	n = 17 (5.4 \pm 0.7) ^a	n = 13 (8.0 \pm 1.0) ^b
ZEN concentration in dietary feeds (ppm)	Fescue < 0.01, oats hay 0.1, concentrates < 0.01	Orchard grass 0.01, WCS < 0.01, concentrates 0.05
ZEN (pg/mg creatinine)	235.3 \pm 103.2 ^c	45.6 \pm 14.2 ^d
α -ZOL (pg/mg creatinine)	133.2 \pm 39.9 ^a	16.5 \pm 5.6 ^b
β -ZOL (pg/mg creatinine)	341.2 \pm 84.9	220.2 \pm 60.4
Σ ZEN (pg/mg creatinine)	709.7 \pm 224.0 ^c	282.3 \pm 63.0 ^d
AMH (pg/ml)	438.9 \pm 48.6 ^c	618.9 \pm 80.0 ^d
No. follicles	5mm, 4.1 \pm 0.9; 10mm, 0.8 \pm 0.1	5mm, 3.0 \pm 0.5; 10mm, 0.7 \pm 0.2
Cattle with CL	11 (64.7%)	7 (53.8%)
Day of first AI	50.2 \pm 4.0 ^c	77.1 \pm 12.3 (n = 10) ^{d*}
No. of AIs	1.9 \pm 0.4	2.4 \pm 0.4 (n = 10) [*]
Day-open period	82.2 \pm 16.1 ^c	128.3 \pm 17.5 (n = 10) ^{d*}

* : Only 10 animals in Herd 2 were examined because three animals were excluded before their first AI.

^{a, b} : Significant difference ($p < 0.05$) between columns.

^{c, d} : Trend toward significant difference ($0.05 < p < 0.1$) between columns.

ことができれば, ZEN暴露あるいはZENを含む複数のMT暴露が家畜の繁殖性に与える影響を生体レベルで客観的に評価することが可能になると思われる。飼養環境下の牛群におけるMT浸潤動態と血中AMH動態との関連性の有無を検証することは, ZENが持つ内分泌攪乱作用を生体レベルで明らかにするために重要かつ極めて斬新なアプローチであると思われる。我々はこれまでに摘発したZEN浸潤牛群の血液サンプルを用いた予備試験として, 血中AMH濃度測定を行い, ZEN浸潤群においてはAMH濃度の低下傾向が認められることを報告している³⁾。本試験においては, 我々の予備試験結果と同様, 上述した仮説を裏付ける結果が得られた。抗ミューラー管ホルモンは, 組織の成長や分化に関わるTGF- β スーパー

Table 2 Results of serum biochemical analyses (mean SEM) of the two Japanese Black breeding cattle herds examined.

	Herd 1	Herd 2
No. Cattle Examined	n = 17	n = 13
Energy metabolism		
Blood glucose (mg/dL)	45.1 ± 2.9	46.5 ± 3.4
Free fatty acids (μEq/L)	107.0 ± 12.0	101.3 ± 9.4
Total cholesterol (mg/dL)	119.9 ± 4.7 ^a	89.0 ± 3.3 ^b
Protein metabolism		
Total protein (g/dL)	6.4 ± 0.1	6.6 ± 0.1
Serum albumin (g/dL)	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.1
A : G ratio	0.94 ± 0.04	0.89 ± 0.04
BUN (mg/dL)	8.0 ± 0.3 ^a	10.3 ± 0.7 ^b
Liver function		
AST (IU/L)	63.0 ± 2.2	63.6 ± 3.0
GGT (IU/L)	14.3 ± 1.4	24.9 ± 8.5
Minerals		
Ca (mg/dL)	9.1 ± 0.1	9.0 ± 0.1
Mg (mg/dL)	1.94 ± 0.04	1.91 ± 0.04
iP (mg/dL)	5.6 ± 0.2	5.2 ± 0.3
Liver metabolism		
IGF1 (ng/ml)	64.6 ± 4.1	72.3 ± 7.6

^{a, b}: Significant difference ($p < 0.01$) between columns.

ファミリーに属する糖タンパクであり、雌性動物の胞状卵胞の顆粒膜細胞から分泌され、牛では卵巣内にプールされたゴナドトロピン反応性の胞状卵胞数をモニターするためのバイオマーカーとなることが報告されている。つまり、ZENあるいはZENを含む複数のMTに汚染された飼料を給与された雌牛群においては、ZEN暴露により顆粒膜細胞のアポトーシスが誘導されて胞状卵胞が閉鎖し、結果として血中AMH濃度が低下することが予想された。一般的に血液中AMH濃度は年齢とともに低下することが示唆されており、本試験においては、Herd 1の平均年齢がHerd 2よりも有意に低かったにもかかわらず、血中AMH濃度が低い値を示したことも、上述の仮説を支持するものと思われた。

一方、本試験では2つの試験牛群間で尿中ZEN濃度に有意差が認められ、Herd 1においてHerd 2よりも高い尿中濃度であったにもかかわらず、

牛群の分娩後繁殖成績においては、初回AI日数および空胎日数においてHerd 1が有意に短くなった。一方で、血液生化学検査から、Herd 1においてエネルギー代謝の指標となる総コレステロール濃度がHerd 2よりも有意に高い結果が得られた。さらに、分娩後30日におけるUS観察による長径5 mm以上の卵胞数に両群間に差が認められなかったことから、いわゆる我が国の暫定基準を下回るような程度(1 ppm以下)のZENの飼料汚染では、特に反芻動物である牛への内分泌攪乱作用は極めて低く、むしろ各牛群の飼養管理状況が分娩後の繁殖成績に大きく影響を及ぼす可能性が示唆された。今後、飼養環境下の牛群の例数をさらに増やしてデータベースの拡充をはかり、飼料中ZEN浸潤状況と牛群の繁殖性についてさらに詳細な検討が必要であると思われた。

4. 要 約

黒毛和種繁殖雌牛群における尿中ZEN濃度と繁殖成績との関連性を検証するとともに、血清中AMH濃度の測定を行って、ZEN浸潤による内分泌攪乱作用の有無、および牛群の繁殖性に与える影響の一端を明らかにすることを目的とした。黒毛和種繁殖牛群2群を選定し、分娩後30日に尿および血液のサンプリングを行うとともに、超音波診断装置を用いた生殖器の詳細な観察を行った。尿サンプルはLC/MS/MS法により尿中ZEN、 α -ZOLおよび β -ZOL濃度の測定を行った。さらに血中AMH濃度を測定し、2群間での比較検討を行った。その結果、尿中ZEN濃度が有意に高い牛群において、AMH濃度は有意に低い結果となり、ZEN浸潤動態と血清中AMH濃度との関連性が示唆された。一方、繁殖成績ではZEN濃度が高い牛群において分娩後空胎日数が有意に短い結果となり、低レベルZEN浸潤は繁殖性に直接的な影響を及ぼすものではないことが示唆された。

文 献

- 1) Takagi, M., Uno, S., Kokushi, E., Shiga, S., Mukai, S., Kuriyagawa, T., Takagaki, K., Hasunuma, H., Matsumoto, D., Okamoto, K., Shahada, F., Chenga, T., Deguchi, E., Fink-Gremmels, J. J. : *AnimSci*, **89**, 287~296, 2011.
- 2) Hasunuma, H., Takagi, M., Kawamura, O., Taniguchi, C., Nakamura, M., Chuma, T., Uno, S., Kokushi, E., Matsumoto, D., Tshering, C., Deguchi, E., Fink-Gremmels, J. : *Anim Sci*, **90**, 1610~1616, 2012.
- 3) Fushimi, Y., Takagi, M., Hasunuma, H., Uno, S., Kokushi, E., Watanabe, U., Liu, J., Marey, M., Miyamoto, A., Otoi, T., Deguchi, E., Fink-Gremmels, J. : *World Mycotoxin J*, **7**, 367~378, 2014.
- 4) Rico, C., Medigue, C., Fabre, A., Jarrier, P., Bontoux, M., Clement, F., Monniaux, D. : Regulation of anti-Müllerian hormone production in the cow : a multiscale study at endocrine, ovarian, follicular, and granulose cell level, *Bio lReprod*, **84**, 560~571, 2011.
- 5) Watanabe, U., Takagi, M., Yamato, O., Otoi, T., Tshering, C., Okamoto, K. : Metabolic profile of Japanese Black breeding cattle herds : usefulness in selection for nutritional supplementation to enhance reproductive performance and regional differences, *J Vet Med Sci*, **75**, 481~487, 2013.
- 6) Minervini, F., Giannocaro, A., Fornelli, F., Dell'Aquila, M. E., Minoia, P., Visconti, A. : Influence of mycotoxin zearalenone and its derivatives (alpha and beta zearalenol) on apoptosis and proliferation of cultured granulose cells from equine ovaries, *Reprod Biol Endocrinol*, **4**, 62, 2006.
- 7) Zhu, L., Yuan, H., Guo, C., Lu, Y., Deng, S., Yang, Y., Wei, Q., Wen, H. : Zearalenone induce apoptosis and necrosis in porcine granulose cells via a caspase-3 and caspase-9-dependent mitochondrial signaling pathway, *J cell Physiol*, **227**, 1814~1820, 2012.

非侵襲的生体電気インピーダンス法による牛枝肉 脂肪交雑の推定

Estimation of beef marbling standard number based on non-invasive
bioelectrical impedance analysis

橋元大介・福田修*

(長崎県農林技術開発センター, *佐賀大学大学院工学系研究科)

Daisuke Hashimoto and Osamu Fukuda*

(Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center,

*Graduate School of Science and Engineering, University of Saga)

To investigate relationship between non-invasive bioelectrical impedance values and Beef Marbling Standard (BMS) numbers measured from the surface of the sirloin part in live fattening cattle within one month before slaughter, the extracellular resistance values (R_{ex}), the intracellular resistance values (R_{in}) and the cellular membrane capacitance (C_m) were calculated using the measurement values in bioelectrical impedance analysis (BIA). The measurement was conducted with 33 beef cattle one month before slaughter treatment. The electrode pads were on the surface of a body to the four points : 100, 125, 225, 250[mm] in a line from the last lumbar vertebra. As the result, a significant correlation was observed among R_{in} , and BMS values. The results suggested that the non-invasive BIA could be useful to estimate the BMS number in live fattening cattle.

1. 目 的

わが国の肉用牛生産において高品質な牛肉生産を行う場合、脂肪交雑（以下、BMS No.）が重視され、BMS No.が牛枝肉単価の決定に大きく影響を及ぼしている。特に黒毛和種肥育牛生産は約20ヵ月間を要し、長い肥育期間中の飼養管理などの問題点を把握するには、と畜後の枝肉からのみである。そのため肥育生体時にBMS No.を高精度で推定する技術が求められている。また、推定技術を用いて肥育中のBMS No.の経時的变化を明らかにすることができれば、肥育中に出荷後の肉質、品質を予測できる可能性があり、飼養管理の

改善や適切な出荷時期の判断に応用できる。

これまでに超音波や生体バイオプシーを用いたBMS No.推定に関する報告^{1~3)}がある。しかし、超音波装置は、非常に高価であり、生産農家が購入し活用することは困難である。また、生体バイオプシーは、侵襲的であるため牛体への負担が大きく、麻酔等を実施する観点からも生産農家は取り組み難い。

著者らはこれまでに、生体インピーダンス法（Bioelectrical Impedance Analysis：以下、BIA）に着目し、BIAを用いたBMS No.推定について検討した。その結果、出荷1ヵ月前の肥育牛最後位胸椎位の胸最長筋（以下、サーロイン）のBIA測

定から得られる細胞内抵抗値 (以下, R_{in}) によってBMS No.および枝肉のリブロースの粗脂肪含量を推定する可能性が示唆され, BIA法は肉用牛生体時における脂肪交雑推定法の1つになり得ることを明らかにした⁴⁾。しかし, そのBIAは, 牛体サーロイン内部に電極を差し込み測定する侵襲的手法であり, 牛への負担があることが課題である。そのため, 肥育牛の体表からBIA測定を可能とする, 非侵襲的BIAによるBMS No.推定手法を検討する必要がある。

本研究では, BIAを用いた非侵襲的肥育牛生体時BMS No.の推定法を確立するため, 肥育牛生体時のサーロイン部位体表でBIAを行い, その電気的特性とBMS No.の関係を明らかにすることを目的とする。

2. 方 法

供試牛には, 長崎県農林技術開発センターで飼養され, 2010年12月から2014年5月に長崎県の佐世保食肉センター株式会社に出荷された黒毛和種肥育去勢牛21頭 (平均月齢 \pm 標準偏差: 28.4 ± 1.5 ヵ月齢, 平均体重 \pm 標準偏差: 840.5 ± 81.7 kg) ならびにホルスタイン種肥育去勢牛11頭 (平均月齢 \pm 標準偏差: 22.1 ± 0.3 ヵ月齢, 平均体重 \pm 標準偏差: 814.7 ± 33.0 kg) を用いた。枝肉格付成績は, (公社) 日本食肉格付協会による評価⁵⁾ を用いた。供試牛のBMS No.は2~11の範囲であり, その平均値は6.0, 標準偏差は3.2であった。なお, 本研究で供した黒毛和種には, BMS No.2または3である個体が含まれておらず, BMS No.が低い個体としてホルスタイン種 (BMS No.2の8頭およびBMS No.3の3頭の計11頭) を加えた。リブロースについては, 屠場で枝肉の第6-7肋骨間切開面頭側を約50 mmの厚さにカットした。その胸最長筋のみをフードプロセッサでミンチにし, 牛肉の品質評価のための理化学分析マニユア

ルVer.2⁶⁾に基づいて, 粗脂肪含量を測定した。

出荷1ヵ月前に非侵襲的BIAを実施した。実施方法は, 供試牛を保定枠に入れて鎮静シ (セラクター2%注射液1 ml, バイエル薬品株式会社, 大阪), 牛体左側の第1腰椎位から頭方へ (縦200 mm \times 幅300 mm) 剃毛した。その後, 非侵襲的BIAのため最後位腰椎より腹側約100 mmから頭方へ25,100および25 mm間隔で同一線上の4ヵ所に心電図用ペースト (カルジオクリーム, 日本光電工業株式会社, 東京) を塗布した電極パッド (アクセルガード50 \times 90 mm, 伊藤超短波株式会社, 東京) を体表に貼付した。電極パッドは, 外側を電流印可用電極, 内側を電圧計測用電極とし測定した (Fig. 1)。インピーダンス測定には, ケミカルインピーダンスメーター (3532-80, 日置電機株式会社, 長野) を用い, 周波数1 k~1000 k [Hz] (1.00 k, 1.15 k, 1.33 k, 1.53 k, 1.76 k, 2.02 k, 2.33 k, 2.68 k, 3.09 k, 3.56 k, 4.10 k, 4.72 k, 5.43 k, 6.25 k, 7.20 k, 8.29 k, 9.54 k, 10.99 k, 12.65 k, 14.56 k, 16.77 k, 19.31 k, 22.23 k, 25.60 k, 29.47 k, 33.93 k, 39.07 k, 44.98 k, 51.79 k, 59.64 k, 68.66 k, 79.06 k, 91.03 k, 104.80 k, 120.70 k, 138.90 k, 160.00 k, 184.20 k, 212.10 k, 244.20 k, 281.20 k, 323.70 k, 372.80 k, 429.20 k, 494.20 k, 596.00 k, 655.10 k, 754.30 k, 868.50 k および1000.00 kの50点) に変化させながら電気的特性を連続測定し, その測定時間は30秒であった。測定項目はそれぞれの周波数 (単位: Hz, 表記: f) に対するインピーダンス値 (単位: Ω , 表記: Z), 純抵抗値 (単位: Ω , 表記: R) およびリアクタンス値 (単位: Ω , 表記: X) とした。得られたインピーダンス値を用い, 細胞外抵抗 (単位: Ω , 表記: R_{ex}), 細胞内抵抗 (単位: Ω , 表記: R_{in}) および細胞膜容量 (単位: F, 表記: C_m) を算出した⁷⁻¹¹⁾。 R_{ex} , R_{in} または C_m とBMS No.およびリブロースの粗脂肪含量と

Chemical Impedance Meter (HIOKI E.E.CORPORATION)

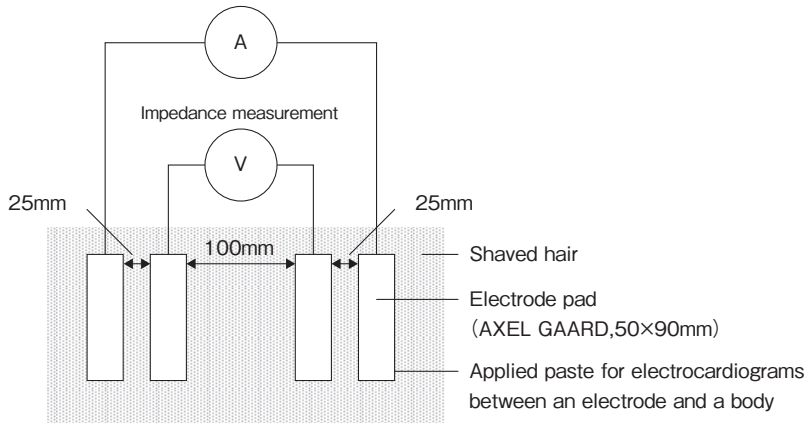
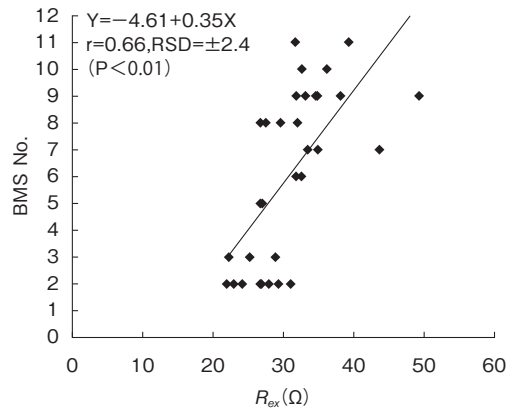


Fig. 1 Measuring setup for Non-invasive BIA

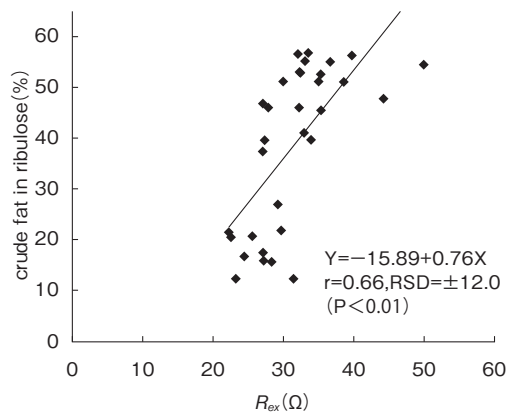
の関係について単回帰分析を行い、単回帰における分散分析から相関係数 (r) と残差標準偏差 (RSD) を算出し、各回帰式の推定精度を比較検討した¹²⁾。

3. 結果と考察

非侵襲的BIAによる肥育牛の生体時におけるサーロインの R_{ex} と枝肉のBMS No.およびリブローズ粗脂肪含量との関係をFig. 2に示した。サーロイン体表の R_{ex} (X) とBMS No. (Y) およびリブローズ粗脂肪含量 (Y) との間には、それぞれ $Y = -4.61 + 0.35X$ (ただし、 $21.9 \leq X \leq 49.3$ かつ $2 \leq Y \leq 11$) および $Y = -15.89 + 0.76X$ (ただし、 $21.9 \leq X \leq 49.3$ かつ $12.4 \leq Y \leq 56.8$) で示される有意な回帰式が得られた (それぞれ、 $r = 0.66$, $RSD = \pm 2.4$, $P < 0.01$ および $r = 0.66$, $RSD = \pm 12.0$, $P < 0.01$)。枝肉において、BMS No.と R_{ex} との間には、有意な正の相関が認められていない¹³⁾。また、侵襲的BIAによる橋元らの報告⁴⁾で R_{ex} とBMS No.およびリブローズ粗脂肪含量との間には、相関が認められておらずこれまでの報告と矛盾する結果となった。非侵襲的BIAでは、侵襲的BIAの場合と電流の流れる経路が大きく異なり、筋肉外組織、皮下脂肪組織、表皮など



(a) BMS No. (n=32)



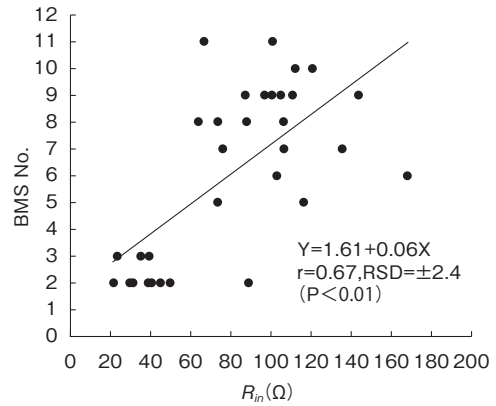
(b) Crude fat in ribulose (n=32)

Fig. 2 Simple correlation coefficients between Non-invasive extracellular resistance (R_{ex}) and BMS No. or crude fat in ribulose of live fattening cattle.

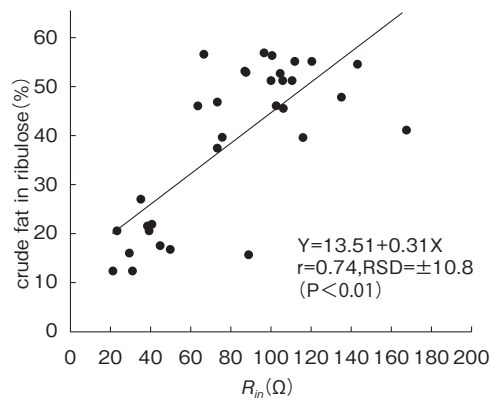
のサーロイン筋肉組織以外の情報も計測される。このことが、 R_{ex} の計測値に何らかの影響を与えたと考えられる。前述のように、侵襲的BIAの場合は生検針が筋内に到達しており、 R_{ex} の細胞情報は、主に筋細胞外電解質の濃度変化および電解質物質の変性とされる¹³⁾。これに対して、非侵襲的BIAの場合は、筋細胞に加えて、サーロイン筋肉組織以外の電解質の影響が大きく計測されたと考えられる。しかし、まだ明確な考察が得られないため、今後も計測データの蓄積を行い、解析を進める必要がある。

非侵襲的BIAによる肥育牛の生体時におけるサーロインの R_{in} と枝肉のBMS No.およびリブローズ粗脂肪含量との関係をFig. 3に示した。サーロインの R_{in} (X) とBMS No. (Y) およびリブローズ粗脂肪含量 (Y) との間には、それぞれ $Y = 1.61 + 0.06X$ (ただし、 $21.5 \leq X \leq 168.4$ かつ $2 \leq Y \leq 11$) および $Y = 13.51 + 0.31X$ (ただし、 $21.5 \leq X \leq 168.4$ かつ $12.4 \leq Y \leq 56.8$) で示される有意な回帰式が得られた (それぞれ、 $r = 0.67$, $RSD = \pm 2.4$, $P < 0.01$ および $r = 0.74$, $RSD = \pm 10.8$, $P < 0.01$)。これは、前述した侵襲的BIAによるサーロインの R_{in} とBMS No.およびリブローズの粗脂肪含量との間の相関、谷原ら¹⁴⁾の報告および橋元らの報告⁴⁾より若干弱い相関であるものの、正の相関が得られたことから、非侵襲的BIAによる肥育牛サーロインBIAによって得られる R_{in} によりBMS No.および枝肉リブローズの粗脂肪含量を推定できることが示唆された。

非侵襲的BIAによる肥育牛の生体時におけるサーロインの C_m と枝肉のBMS No.およびリブローズの粗脂肪含量との関係をFig. 4に示した。サーロインの C_m (X) とBMS No. (Y) およびリブローズ粗脂肪含量 (Y) との間には、いずれも有意な相関は認められなかった (それぞれ、 $r = 0.07$, $P > 0.1$ および $r = 0.14$, $P > 0.1$)。谷原ら¹³⁾



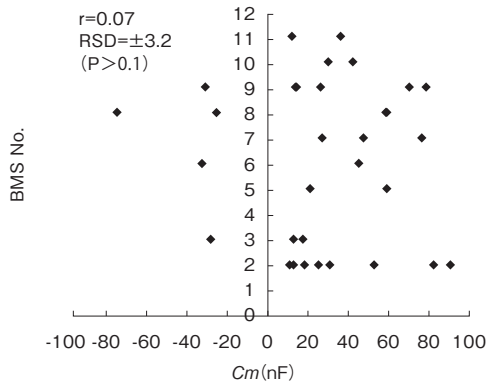
(a) BMS No. (n=32)



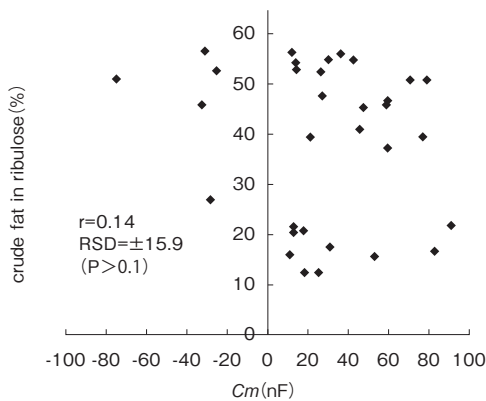
(b) Crude fat in ribulose (n=32)

Fig. 3 Simple correlation coefficients between Non-invasive intracellular resistance (R_{in}) and BMS No. or crude fat in ribulose of live fattening cattle.

によると、枝肉の C_m とBMS No.との間には、高い相関 ($r = -0.938 \sim -0.975$) がみられたとされている。また、前述した C_m とBMS No.およびリブローズの粗脂肪含量との相関や橋元らの報告⁴⁾での結果と矛盾する。Hayden modelパラメータで検出されると考えられる C_m の情報は、細胞膜の機械的損傷や膜組成の変化などとされている。非侵襲的BIAでは、表皮と電極間に大きな容量結合が存在し、体毛の処理や導電性ゲルの塗布状況によっても、その状況が大きく変動する可能性がある。このため本論文で使用したHayden



(a) BMS No. (n=32)



(b) Crude fat in ribulose (n=32)

Fig. 4 Simple correlation coefficients between Non-invasive Cellular membrane capacitance (C_m) and BMS No. or crude fat in ribulose of live fattening cattle.

modelでのパラメータ推定において、 C_m の推定に大きな誤差を発生したと考えている。

本研究で提案した非侵襲的BIAは、侵襲的BIAに比べ、牛体への負担が少なく、最終的なユーザーとなる生産者が容易に利用できることが予想される。特に、測定の準備に関して、侵襲的BIAが鎮静剤等の獣医師の指示を要するのに対し、非侵襲的BIAでは体表に電極パッドを貼り付けることから、鎮静剤等を要しない。実際に本研究でも、非侵襲的BIAの測定時に供試牛が不快感を示すような行動はみられなかった。

一方、非侵襲的BIAと橋元らによる侵襲的BIA

のBMS No.推定能を比較すると、両手法ともに R_{in} とBMS No.との間の相関が高いものの、その相関係数を比較すると、侵襲的BIAの方が高い。これは、非侵襲的BIAが皮膚、皮下脂肪およびサーロインのすべてを測定しているのに対し、侵襲的BIAは測定標的であるサーロイン内部に電極が存在し、かつ皮下脂肪への通電を留置針により遮っているため、サーロインのみの情報を的確に測定できていることに起因すると考えられる。また本研究で供試した個体では、皮下脂肪の厚さが1.0~5.0 cmとそのばらつきは大きい。このことが、 R_{in} のばらつきを大きくしている可能性がある。本研究では、超音波装置もしくは生検針を用いて皮下脂肪の厚さを計測している。今後は、非侵襲的BIAにおいて、皮下脂肪の厚さを同時に測定し、 R_{in} に与える影響を除外する手法を明らかにすることが課題となる。

推定機器開発には、ヒトでの体脂肪率測定機器が参考となるが、その測定では、身長、体重、年齢などのパラメータを入力し、測定能を高めている¹⁵⁾。牛における非侵襲的BIAでは、電極間の距離が一定であるが、皮下脂肪の厚さやサーロインの断面積は個体で異なる。そのため、より精度の高いBIAを測定するためには、皮下脂肪の厚さやサーロイン面積をパラメータとして用いることが望ましい。皮下脂肪については、前述したようにBIAと同時にその厚さを計測する手法を検討する必要がある。サーロイン面積は、超音波肉質診断装置を用いなければ難しいことから、肥育牛の体格を表わす体重、体高などの体尺測定値や個体の肉質能力を示す育種価などが、推定精度を高める補正用パラメータとなり得るかの検討が必要である。

さらに、ヒトの体脂肪計測定用に一般家庭用に販売されている機器は、一人で簡便に測定することが可能であり、価格面でも安価に手に入れるこ

とができる¹⁵⁾。本研究における非侵襲的BIAは、牛体が動いたときに電極パッドがずれることが散見されることから、牛体に密着させやすく、かつ一人で簡便に測定できるパッケージングが必要となる。また、1 k~1000 k [Hz] の幅広い周波数を測定している。ヒトの体脂肪計の多くは定電流源として、50 kHzで500 μ Aの電流を人体に流す^{16~18)}ことで測定を単純化し、製造コストを抑えていると思われる。今後は、肉用牛の脂肪交雑推定に適切な定電流源を明らかにするとともに、定電流源を設置した安価な測定機器の開発が必要であると考える。

以上から、出荷1ヵ月前の肥育牛サーロインの非侵襲的BIA測定から得られる R_{im} によってBMS No.および枝肉のリブローズの粗脂肪含量を推定する可能性が示唆され、本法は肉用牛生体時における非侵襲的BIAによるBMS No.推定法の1つになり得るものと考えられた。

4. 要 約

BIAを用いた非侵襲的肥育牛生体時BMS No.の推定法を確立するため、肥育牛のサーロインの非侵襲的BIA、BMS No.およびリブローズ粗脂肪含量の相互関係を検討した。出荷約1ヵ月前の黒毛和種肥育牛去勢21頭ならびにホルスタイン種肥育去勢牛11頭に対し、牛体左側の最後位腰椎より腹側約100 mmから頭方へ25,100および25 mm間隔で同一線上の4ヵ所に心電図用ペーストを塗布した電極パッドを体表に貼付し、外側を電流印可、内側を電圧計測とし、インピーダンスメーターによりBIA値を測定した。そのBIA値から R_{ex} 、 R_{im} および C_m を算出した。その結果、 R_{im} とBMS No.およびリブローズ粗脂肪含量の間に、それぞれ有意な

単回帰式が得られ ($r = 0.67$, $RSD = \pm 2.4$, $P < 0.01$ および $r = 0.74$, $RSD = \pm 10.8$, $P < 0.01$)、非侵襲的BIAによって牛枝肉脂肪交雑を生体時に推定する可能性が示唆された。

文 献

- 1) 宮嶋恒晴：西日本畜産学会報，44，35~42，2001.
- 2) 橋元大介，福田修，鍋岡奈津子，中西良孝：日本畜産学会報，85-1，51~60，2014.
- 3) 橋元大介，岩元禎，早田剛，中西良孝：日本暖地畜産学会報，57-2，141~146，2014.
- 4) 橋元大介，福田修，早田剛：計測自動学会論文集，52-3，印刷中，2016.
- 5) (社)日本食肉格付協会：牛・豚・枝肉・部分肉取引規格解説書，6~29，(社)日本食肉格付協会，東京，2010.
- 6) (社)畜産技術協会：牛肉の品質評価のための理化学分析マニュアル，Ver.2，3~21，(社)畜産技術協会，東京，2003.
- 7) 逢坂哲彌，小山昇，大坂武男：電気化学法・基礎測定マニュアル，157~182，講談社サイエンティフィック，東京，1998.
- 8) 逢坂哲彌，小山昇：電気化学法・応用測定マニュアル，193~196，講談社サイエンティフィック，東京，1999.
- 9) 中村隆夫，山本尚武：岡山大学医学部保健学科紀要，10-1，15~22，1999.
- 10) 藤嶋昭，相澤益男，井上徹：電気化学測定法・上，209~222，技報道出版株式会社，東京，2000.
- 11) 大堺利行，加納健司，桑畑進：ベーシック電気化学，130~136，化学同人，京都，2001.
- 12) 応用統計ハンドブック編集委員会（代表者奥野忠一）編：応用統計ハンドブック，91~120，養賢堂，東京，1989.
- 13) 谷原礼論，豊田浄彦，口田圭吾，橋本和博，渡邊朋子，中嶋哲治，十川政典，岡昌秀，日浦千尋，岡田栄一，新居康生，斉藤武司，田淵賢治：香川県畜産試験場研究報告，38，10~28，2003.
- 14) 谷原礼論：養牛の友，360，34~40，2006.
- 15) 佐藤哲也，大島秀武：計測技術，32，10~13，2004.
- 16) 竹原克：計測技術，32-8，14~20，2004.
- 17) 石黒憲子，角田直也：THE Annual Reports of Health, Physical Education and Sport Science，25，63~39，2006.
- 18) 水野増彦，村松愛梨奈，石井隆士，井川正治：日本体育大学スポーツ科学研究，1，22~27，2012.

食肉特性の向上を目指して ：ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成誘導

Slow-myofiber generation induced by dietary polyphenol feeding, toward enhancing meat quality

辰巳 隆一・水野谷 航・宮原 秀雄・岡本 慎平・赤星 眞理子・鈴木 貴弘・
ド マイコイ・大坪 秀明・小宮 祐介・チャハラ モクラン・中村 真子・池内 義秀

(九州大学大学院農学研究院)

Ryuichi Tatsumi, Wataru Mizunoya, Hideo Miyahara, Shinpei Okamoto, Mariko Akahoshi, Takahiro Suzuki, Mai-Khoi Q. Do, Hideaki Ohtsubo, Yusuke Komiya, Mulan Qahar, Mako Nakamura and Yoshihide Ikeuchi

(Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Muscle fiber type proportions are responsible for a variety of properties of skeletal muscle, including contractile, metabolic, and sensory (differential tasting-component contents and fat deposition); therefore mechanisms that regulate these properties, and their manipulation are hot targets of research for meat-animal production and human sports and health. We very recently found that resident myogenic stem satellite cells produce and secrete semaphorin 3A (Sema3A) protein exclusively to impact the formation of slow-twitch fibers through a cell-membrane receptor/myogenin/MEF2D/slow-myosin signaling pathway. Here we report that an 8-week intake of apple polyphenol (APP ; prepared from unripe apples) in the diet, may stimulate the Sema3A ligand-dependent pathway concerned. Results demonstrated significant improvement of lower hind-limb muscle endurance based on increased proportions of fatigue-resistant myofibers (types IIx, IIa, and I) by the APP-feeding to young-adult rats ($P < 0.05$). There was no significant difference in the animal body-phenotypes or locomotor activity shown as total moving distance in light and dark periods, indicating that the shift in myosin heavy chain (MyHC) isoforms from fast-to-slow did not include a bias due to greater exercise behavior by the treated rats. Notably, a subsequent in vitro study showed that supplementation of APP (500 ng/ml) or the major component chlorogenic acid (10 ng/ml) also up-regulated the expression of slow MyHC and the up-stream signaling molecules, myogenin and MEF2D, in primary cultures of differentiating myoblasts ($P < 0.05$). Other major polyphenols found in APP (procyanidin B1, B2, phloridzin, and catechin) in a range of 10-1000 ng/ml did not induce these effects. Therefore, the present study highlights a promising contribution of dietary APP intake to increasing intermediate/slow fibers and may help in developing a novel strategy for application in meat production technologies and human sports and age-related health sciences.

1. 目 的

骨格筋の主体である筋細胞（細長く巨大な細胞

なので“筋線維”と呼ばれる）はその収縮特性やエネルギー代謝特性の違いから「遅筋型」と「速筋型」に分類される。遅筋型筋線維は速筋型に比

べて直径が小さく（“キメ”が細かく軟らかい）、脂肪が沈着しやすい他、旨味成分やヘム鉄・タウリン・カルニチンなどの機能的栄養成分の含量が高いことが知られている。また遅筋型筋線維の収縮タンパク質である遅筋型ミオシンは速筋型ミオシンに比べ加熱ゲル強度や保水性も高い。したがって、筋線維型は食肉および加熱食肉製品の品質および栄養機能性を決める重要な要素であり、これを制御している分子機構を明らかにする意義は極めて大きいと言える。

申請者は、筋肥大・再生に関わる筋幹細胞（衛星細胞）が活性化・増殖し分化・融合期に至ると、多機能性細胞制御因子 semaphorin 3A (Sema3A) を合成・分泌し遅筋型筋線維の形成を誘導することを見出した^{1~6)}。このことは Sema3A の細胞膜受容体のアゴニストにより遅筋型筋線維の形成を促進できることを示唆している。リンゴ果皮（未利用食品資源）から調製したポリフェノール画分を 5% (w/w) 添加した飼料を成熟ラットに 8 週間給餌すると筋持久力が有意に向上することが Nakazato ら⁷⁾ により報告されているので、このリンゴポリフェノール (APP と略記) に上記のアゴニスト成分が含まれているのではないかと予想した。このような特性を持つ食品成分はこれまでに報告がない。

本研究は、上述の APP を給餌すると遅筋型筋線維の割合が増加するかどうかを明らかにするとともに、APP に含まれると期待される Sema3A 受容体のアゴニスト成分（遅筋型筋線維の形成誘導成分）を同定しその作用機構を検証することを目的として実施した。これは、先の「筋幹細胞の分泌因子 Sema3A による遅筋型筋線維の形成誘導」の生理学的重要性と新規性を傍証する意味でも重要である。成熟ラットに対する APP 給餌実験および衛星細胞初代培養系への添加実験の結果を報告する。

2. 方法

2.1 摂餌実験

実験動物として、9 週齢の雄性 Fischer F344 系ラット (KBT オリエントアル社) を供試した。搬入後約 2 週間の馴致飼育の後 (室温 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 10\%$ 、12:12 明暗サイクル)、AIN-93 G 準拠食に APP (アサヒビール社製) を 5% (w/w) 添加した飼料を 8 週間、pair-feeding 法により制限給餌した ($n = 9$ 匹)。初期体重、総摂食量および体重増加量が対照群 (APP 非給餌群, $n = 9$ 匹) と同じになるように調整した。また同様に、0.5% APP 給餌実験には 12 週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラットを用い、自由摂食飲水条件にて 8 週間飼育した。この場合も、初期体重、総摂食量および体重増加量はいずれも対照群と有意な差がないことを確認した。

Iwata ら⁸⁾ の方法を一部改変し、筋持久力を測定した。すなわち、麻酔下で脛骨神経の電気刺激 (電圧 60V、パルス幅 1 ms、250 Hz) により後肢下腿部後方筋 (ふくらはぎの筋) の最大発揮張力を測定し、その経時的減衰曲線から APP 給餌群と対照群の筋持久力を比較した。また、Mizunoya ら⁹⁾ の高分解能 SDS-PAGE 法により、後肢下腿部筋のミオシン重鎖 (MyHC) アイソフォーム発現量を解析し、筋線維型組成の変化を調べた。また、ミオグロビンの発現変化はアクチンを内部標準とした ECL-Western blotting 法により解析した。これらの動物実験はすべて、日本学術会議が定める動物実験実施ガイドラインに従い九州大学動物実験審査委員会の承認のもと実施した。

2.2 衛星細胞初代培養系への添加実験

Sprague-Dawley 系雄性ラットの背部および後肢大腿部の骨格筋より、Allen ら¹⁰⁾ の方法に従い衛星細胞を調製した。パーコール密度勾配遠心分

離法により衛星細胞を単離した後、poly-L-lysine・fibronectin・lamininで3重コートした培養用プレートに 1×10^4 個/cm²の細胞密度で衛星細胞を播種した。10%正常ウマ血清(HS)を含む α MEM培地で2日間前培養した後、2%HS-OptiMEM分化誘導培地で4日間培養し、遅筋型MyHCアイソフォーム(MyHC I)・myogenin・MEF2Dの発現をリアルタイムRT-qPCRにより調べた(TaqMan Probe法；内部標準はHPRT)。上記の分化誘導培地には、リンゴポリフェノールおよびポリフェノール精製標品(クロロゲン酸、フロリジン、プロシアニジンB1、プロシアニジンB2、エピカテキン)を種々の濃度で添加した。

3. 結果と考察

3.1 APP摂取が筋線維型組成に及ぼす影響

成熟ラットにAPPを5%含む通常食を8週間給餌すると、脛骨神経の電気刺激により発生する後肢下腿部筋の最大発揮張力の経時的減衰が有意に抑制された(Fig. 1)。0.5%APP摂餌実験でも同様の傾向が見られたことから($F(98, 1372) = 1.246, P = 0.0574$)、APP摂取により筋持久力が向上することが確認された。後肢下腿部筋を高分解能SDS-PAGEで解析したところ(0.5%APP給餌区)、速筋型筋線維が優勢な足底筋およびEDL筋のミオシン重鎖アイソフォーム組成が遅筋型方向へ有意にシフトしていることが分かった(Fig. 2)。具体的には、IIb型の減少とIIx・IIa・

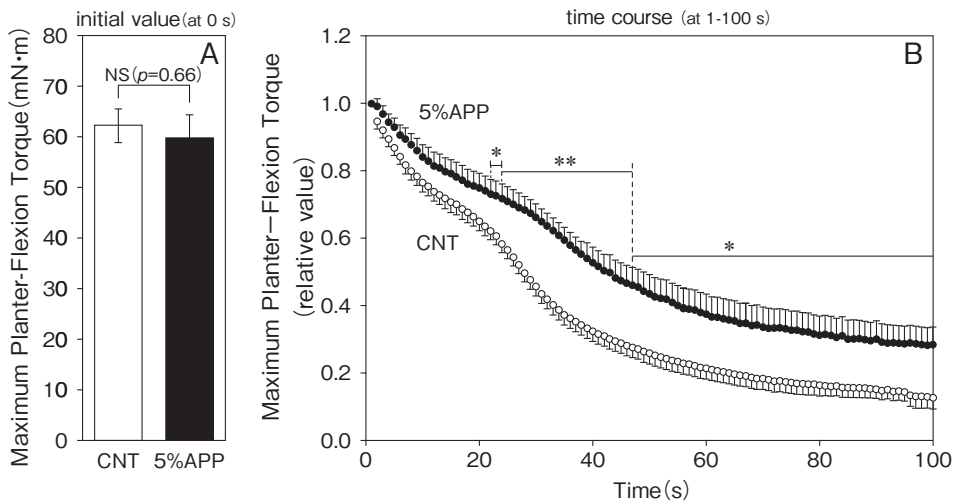


Fig. 1

Improvement of muscle endurance by 5% APP feeding. Maximum isometric planter-flexion force torque was measured under anesthesia after 8-wk feeding of the control or 5%-APP diet. A hook-shaped electrode connected to an electronic-stimulator module generated a stimulus train (60 V, 250 Hz : pulse width 1 ms, duration 160 ms with intervals of 3 ms) delivered to the right tibial nerve branch that innervates calf muscles of the lower hind limb, including plantaris, soleus, and gastrocnemius muscles. Maximum-contraction forces measured were converted to torque (mN·m) by multiplying by the length between the medial malleolus and the head of the first metatarsal bone ; the initial value at the first stimulation (at 0-s) and the time-course change in response to 100-s successive stimulation (expressed relative to the initial value) are shown in panels A and B, respectively. Data points and bars depict the mean \pm SE for nine rats in each group fed with control (open circle and bar) or the 5%-APP diet (closed circle and bar) and significant differences from control at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by (*) and (**), respectively. NS, no significant difference.

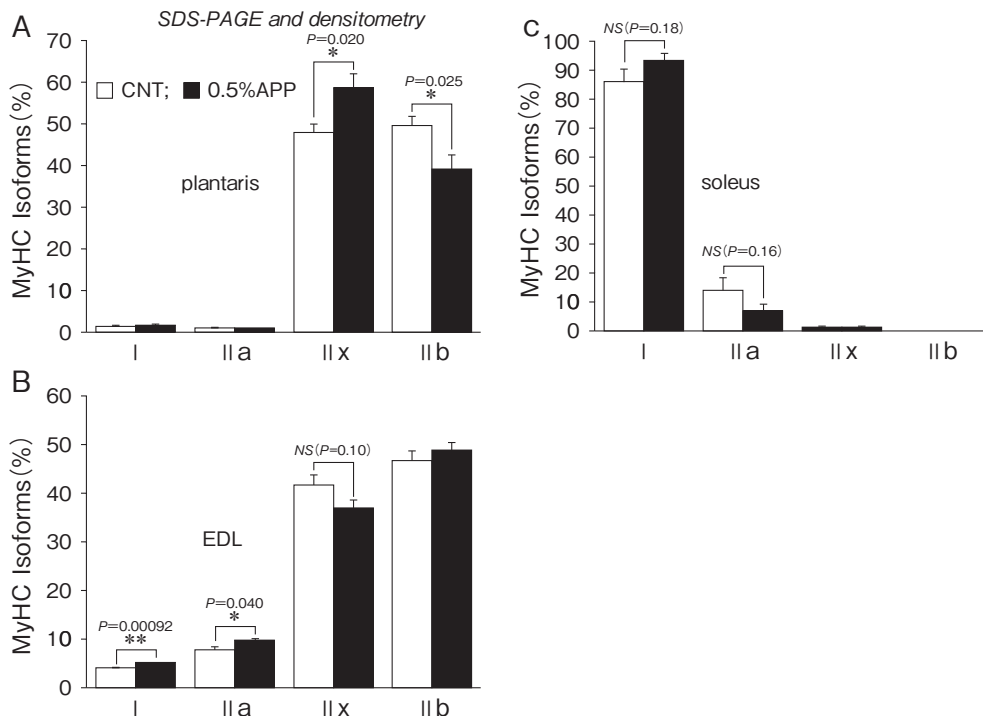


Fig. 2

Fast-to-slower type shift of MyHC isoform composition by 0.5% APP feeding. Plantaris (panel A), EDL (B), and soleus (C) muscles from control and 0.5%-APP diet groups (after 8-wk feeding) were analyzed for each the ratio of each MyHC isoform (%) relative to total MyHC, by combination of SDS-PAGE system and the subsequent densitometry. Data bars depict the mean \pm SE for nine rats per group fed with control (open bars) or an 0.5% -APP diet (closed bars) and significant differences from control means at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by (*) and (**), respectively. NS, no significant difference.

I型の増加であり、また、遅筋型筋線維に多く含まれるミオグロビンの含量も有意に増加した (data not shown)。0.5% APP給餌によってラットの明期・暗期の自発運動量に有意な差は認められなかったことから、上記の遅筋型方向へのシフトは運動による2次の効果ではないと考えられた (data not shown)。これらの結果より、APP摂取により筋線維型組成が持久性に富む遅筋型方向へシフトすることが明らかになった。

3.2 ポリフェノール添加による遅筋型MyHCの発現増加

前項の筋線維型組成シフトを担う分子機構を追究するため、衛星細胞が分化・融合し筋管 (幼若な筋線維) を形成する時期にAPPを種々の濃度

で添加し (最終濃度10-10000 ng/ml)、遅筋型MyHC (MyHC I) の発現に及ぼす影響を調べた (Fig. 3A)。MyHC IのmRNA発現は有意に増加し、その効果は500 ng/mlで最大となった。MyHC I発現量の増加はWestern blotting (総MyHC量で標準化) でも確認された (data not shown)。また、Sema3A依存的なMyHC I発現誘導シグナリング軸を構成するmyogeninおよびMEF2Dの発現もAPP添加により大きく増加し、その効果も500 ng/mlで最大となった (Fig. 3B)。Sema3Aの発現はAPP添加によりほとんど変化しないことから、上記のmyogenin・MEF2D・MyHC Iの発現増加がSema3A発現増加によるものではなく、APP成分による直接的な効果であ

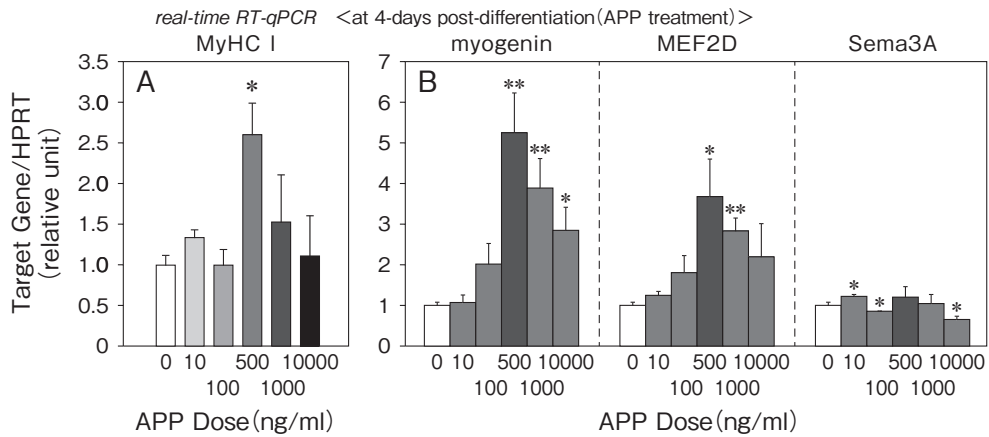


Fig. 3

Up-regulation of MyHC I (slow MyHC), myogenin, and MEF2D expression by APP supplementation to differentiation cultures of myoblasts. Primary cultures of rat satellite cells were maintained for 4 days in differentiation media additionally containing 10-10000 ng/ml APP and evaluated for MyHC I, myogenin, MEF2D, and Sema3A expression by RT-qPCR (TaqMan Probe assay) standardized with HPRT. Data bars depict the mean \pm SE for three cultures per group and significant differences from control means (white bars) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by (*) and (**), respectively.

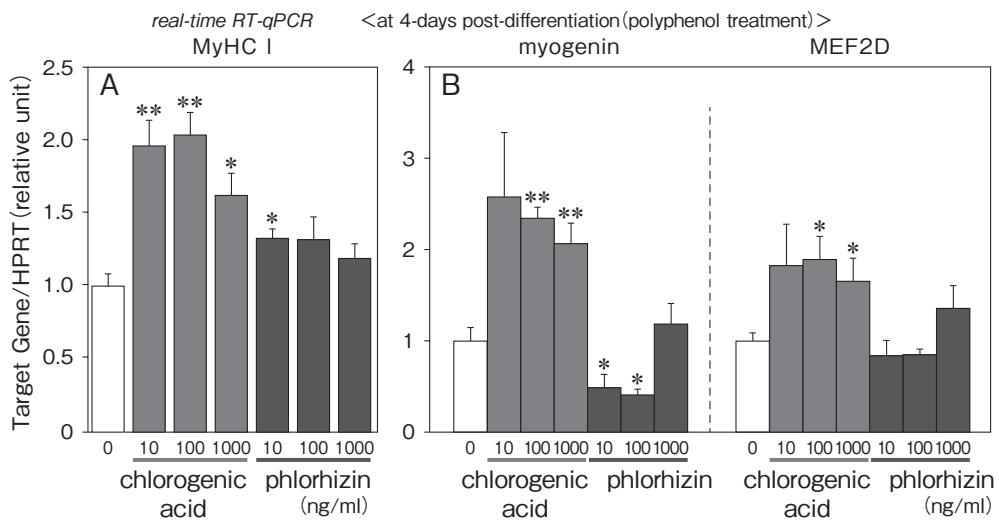


Fig. 4

Up-regulation of MyHC I (slow MyHC), myogenin, and MEF2D expression by chlorogenic acid supplementation to differentiation cultures of myoblasts. Primary cultures of rat satellite cells were maintained for 4 days in differentiation media additionally containing 10-1000 ng/ml chlorogenic acid (red bars) or phlorhizin (blue bars) and evaluated for MyHC I, myogenin, and MEF2D expression by RT-qPCR (TaqMan Probe assay) standardized with HPRT. Data bars depict the mean \pm SE for three cultures per group and significant differences from control means (white bars) at $P < 0.05$ and $P < 0.01$ are indicated by (*) and (**), respectively.

ると考えられた。

次に、APPに含まれる主要なポリフェノール成分 (クロロゲン酸・フロリジン・プロシアニジ

B 1, B 2・エピカテキン) の精製標品に対して先と同様の添加実験を行った (最終濃度10-1000 ng/ml)。Fig. 4 Aに示すように、クロロゲン酸に

強力なMyHC I発現効果が認められ、その効果は10 ng/mlで最大となった。フロリジン (10 ng/ml) にも有意な効果が認められたが、その程度はクロロゲン酸に比べ小さいものであった。また、Fig. 4 Bに示すように、myogeninおよびMEF2Dの発現も10 ng/mlクロロゲン酸添加により有意に増加した。一方、フロリジンを添加するとmyogeninの発現が減少したことから、先のAPP添加実験ではクロロゲン酸 (促進因子) とフロリジン (抑制因子) が拮抗的に作用していると推察され、これがAPPの濃度依存性がベル型となる要因であると考察された。

以上の結果から、APPに含まれるクロロゲン酸が活性成分であり、MyHC I・myogenin・MEF2Dの発現を誘導する因子であることが明らかになった。したがって、クロロゲン酸がSema3A細胞膜受容体に結合すると前述の細胞膜受容体/myogenin/MEF2Dからなるシグナリング軸が活性化されMyHC Iの発現誘導、すなわち、遅筋型筋線維の形成が促進されると考えられた。

4. 要 約

リンゴポリフェノール (種々のポリフェノール成分の混合物) を成熟ラットに8週間給餌すると、後肢下腿部筋のミオシン重鎖アイソフォーム組成が遅筋型方向へシフトし筋持久力が有意に向上することが確認された。また、リンゴポリフェノールに含まれるクロロゲン酸がSema3A細胞膜受容体のアゴニストになりうると考えられた。Sema3A-myogenin/MEF2D-遅筋型ミオシンのシグナリング軸は遅筋型筋線維の形成を誘導することから、クロロゲン酸の給餌によって遅筋型筋線維の形成を促進できると期待された。今後、衛星細胞特異的Sema3A-cKOマウス (Pax7CreER^{T2}-Sema3A^{fllox}) にクロロゲン酸を給餌する実験を行い、クロロゲン酸のアゴニスト活性を証明する必

要がある。また、成長期のマウスに対して同様にクロロゲン酸を給餌すると遅筋型筋線維の割合が増加するかどうかを調べる予定である。

研究成果は前述の食肉生産科学の他、加齢筋医学・健康科学・スポーツ科学への食品機能学的貢献が強く期待される。すなわち、本研究は加齢や不活動 (寝たきりや無重力環境暴露) に伴う筋持久力の低下を抑制することやアスリートの持久運動能力の向上も指向しており、また、脂肪酸をβ酸化しエネルギー源として代謝する遅筋型筋線維の増加は体脂肪を減少させ、生活習慣病の予防ひいては健康寿命の延長やQOLの改善に寄与すると考えられる。

文 献

- 1) Tatsumi, R., Sankoda, Y., Anderson, J. E., Sato, Y., Mizunoya, W., Shimizu, N., Suzuki, T., Yamada, M., Rhoads, R. P. Jr., Ikeuchi, Y., Allen, R. E. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **297** : C238-C252, 2009.
- 2) Do, M.-K. Q., Sato, Y., Shimizu, N., Suzuki, T., Shono, J., Mizunoya, W., Nakamura, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **301** : C1270-C1279, 2011.
- 3) Do, M.-K. Q., Suzuki, T., Gerelt, B., Sato, Y., Mizunoya, W., Nakamura, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, **83** : 712-717, 2012.
- 4) Sato, Y., Do, M.-K. Q., Suzuki, T., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, **84** : 185-189, 2013.
- 5) Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Sato, Y., Ojima, K., Hara, M., Mizunoya, W., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **45** : 476-482, 2013.
- 6) Suzuki, T., Ojima, K., Do, M.-K. Q., Hara, M., Mizunoya, W., Nakamura, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : In abstract of the EMBO Workshop on Semaphorin Function and Mechanism in Action, Cemay-la-Ville, France, 2013.
- 7) Nakazato, K., Song, H., Waga, T. : *Med. Sci. Sports Exerc.*, **39** : 934-940, 2007.
- 8) Iwata, A., Fuchioka, S., Hiraoka, K., Masuhara, M., Kami, K. : *Muscle Nerve*, **41** : 694-701, 2010.
- 9) Mizunoya, W., Wakamatsu, J.-I., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y. : *Anal. Biochem.*, **377** : 111-113, 2008.
- 10) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. M. : *Methods in Cell Biol.*, **52** : 155-176, 1997.

リンゴジュース粕の機能性を生かした高付加価値豚肉 生産技術の開発

Development of high value-added pork production technology using
functionality of apple pomace

房 家 琛

(弘前大学農学生命科学部)

Jiachen Fang

(Faculty of Agriculture and life Science, Hirosaki University)

This study determined the effects of fresh apple pomace on the growth and meat quality of pigs. Experimental feed was prepared using formula feed (control) and fresh apple pomace. The experimental treatments consisted of a control, 2%, 4%, 6%, and 8% apple pomace in mixed feed dry matter (DM) (AP2%, AP4%, AP6%, and AP8%, respectively). The moisture contents of these mixed feeds were adjusted to 40% and the feeds were sealed for 21 days to allow fermentation. Then, pigs weighing 70-110kg were fed these feeds to determine the effects of the amount of apple pomace on growth and meat quality. In addition, AP2% feed was fed to pigs weighing 30, 50, and 70kg to determine the effects of the timing of feeding. All of the mixed feeds were thoroughly fermented and the generation of acetic acid, lactic acid, and ethanol changed with the proportion of pomace. The growth performance and feed conversion ratio improved significantly with the AP2% treatment, while the feed conversion ratio deteriorated with the AP4%, AP6%, and AP8% treatments although the growth was similar to the control treatment. In addition, the growth of pigs weighing 30 kg that were fed AP2% was similar to the control treatment. Regarding meat quality, apple pomace ingestion affected the drip loss and cooking loss of meat and fatty acid composition of back fat, especially the AP2% treatment. These results indicate that the proportion of fermented apple pomace affect the feed efficiency and meat quality of pigs, and that the proportion of pomace in feed should be less than 2% of the DM.

1. 目 的

リンゴは世界的に人気で消費量の高い果物であり、抗がん、整腸、活性酸素抑制や血液浄化などの様々な健康効果が注目されている。リンゴは生食の他、ジュースなど果汁素材としても用いられており、リンゴジュース製造副産物となるリンゴ

ジュース粕（以下リンゴ粕）にも健康成分が多く含まれている。青森県は全国で随一のリンゴ産地であり、リンゴ粕も年間約1.5万トンが産出される。生リンゴ粕は家畜の嗜好性に優れ、乾物当たり栄養分含量の高い副産物飼料資源であり、産出後フレコンバッグで貯蔵・流通する際、自然にアルコールが2-4%、乳酸が1-2%程度生成され

る。アルコールは中枢神経機能に対し抑制的に作用して、密飼いや長時間の繋留によるストレスの緩和効果があり、継続的摂取が肉質改善に寄与しているものと推察される。

近年、食品残さは発酵TMR技術やリキッドフィーディング養豚システムの導入拡大に伴い飼料利用が広がっている。さらに、機能的成分を含む食品残さ飼料を給与することで、畜産物の機能的成分を増加させ、ブランド畜産物として確立させる事例が増加している。このような機能的を持つ食品残さの利用によるブランド畜産物の生産体制の確立は、環境保全、飼料自給率向上や地域活性化に大きな意義をもっている。

一方、リンゴ粕はまだ有効活用されておらず、堆肥化、焼却されている現状であり、飼料利用の研究による実例実証もまだ少ないため、飼料利用を推進するうえで、家畜への給与試験は重要である。

そこで、本研究では、生リンゴ粕を用いて、配合飼料へのリンゴ粕の添加量および給与期間の違いが肥育豚の発育、枝肉形質および肉質に及ぼす影響を検討した。

2. 方 法

2.1 給与量試験

対照区には市販の肥育後期飼料を用いた。試験区飼料は対照区飼料に生リンゴ粕を乾物当たり2% (AP2%区)、4% (AP4%区)、6% (AP6%区) および8% (AP8%区) 添加し水分を40%に調整した。原料を十分に混合してから、200Lドラム缶に詰め込んで踏圧により脱気密封し、屋外で3週間貯蔵した (9.7–20.1℃)。

供試豚のLWD三元交雑種去勢15頭は対照区および試験区に各3頭ずつ配分した。給与試験は(株)木村牧場肥育豚舎にて単飼ケージに豚を1頭ずつ収容し、平均体重110kgまで肥育した。供

試豚は不断給餌、自由飲水により飼養管理を行った。体重は毎週1回測定し、日平均増体量、日平均飼料摂取量および飼料要求率を算出した。

供試豚の平均体重が110kgに到達した時点で飼育試験を終了とし、と畜解体を行い、翌日に枝肉調査とサンプル採取を行った。冷屠体の左半丸を対象として枝肉重量と背脂肪厚を測定後、第4、5胸椎間から約15cmのロース芯を取り出し、一般成分、pH、保水性、加熱損失、硬さ、コレステロール含量および脂肪酸組成の分析用サンプルとした。

2.2 給与期間試験

対照区には市販の肥育前期および後期飼料を用いた。各試験区の飼料は対照区の飼料にリンゴ粕を乾物当たり2%添加し、水分を40%に調整した。原料を十分に混合してから、200Lドラム缶に詰め込んで踏圧により脱気密封し、屋外で3週間貯蔵した (7.6–18.8℃)。

供試豚はLWD三元交雑種の去勢豚計16頭を用いた。供試豚は市販飼料を肥育全期間給与する対照区と生体重がそれぞれ30kg、50kgおよび70kgに達した時点で試験飼料を給与開始する30kg区、50kg区および70kg区に各4頭ずつ配分した。肥育試験は(株)木村牧場肥育豚舎にて単飼ケージに豚を1頭ずつ収容し、平均体重110kgまで肥育した。供試豚は不断給餌、自由飲水により飼養管理を行った。

供試豚の体重が110kgに到達した時点で飼育試験を終了とし、と畜解体を行い、翌日に枝肉調査とサンプル採取を行った。冷屠体の左半丸を対象として枝肉重量と背脂肪厚を測定後、第4、5胸椎間から約15cmのロース芯を取り出し、一般成分、pH、保水性、加熱損失、硬さ、コレステロール含量および脂肪酸組成分析用サンプルとした。

3. 結果と考察

供試飼料の化学成分および発酵品質をTable 1

に示した。飼料中においてリンゴ粕の混合割合の増加に従い粗タンパク質が低くなったが、粗脂肪含量に顕著な変化はなかった。リンゴ粕を添加した4種類の発酵飼料における乳酸含量は新鮮物中0.25–1.08%であり、リンゴ粕の混合割合の高いほど低かった。アルコール含量が0.37–2.34%であり、AP6%においてアルコール含量が最も高かった。pHは4.5–4.9とやや高かったが、乳酸とアルコール生成量から総合的に判断すると発酵品質は良好であった。

肥育後期豚へ上記の各種発酵飼料を給与した発育成績と枝肉形質の結果をTable 2に示した。対照区に比べAP2%区が終了時体重、日増体量、飼料要求率がそれぞれ改善された。リンゴ粕を4%以上添加した各試験区は対照区に比べ終了時

体重および日増体量において大きな変化がなかったが、日平均飼料摂取量の大幅増加により飼料要求率が有意に高くなった。枝肉重量と背脂肪厚はAP2%区ではそれぞれ74.2kgと2.3cmと最も高かったが、他の試験区間に差はみられなかった。

肥育後期豚へ上記の各種発酵飼料を給与したときの肉質の理化学特性をTable 3に示した。リンゴ粕割合の増加に従いロース肉のドリップロス、加熱損失率、保水力などの調理物性が対照区に比べ様々な変化があったが、AP2%区において変化が最も顕著であった。健康や味の観点から注目されている背脂肪中オレイン酸含量はAP2%区が最も低く、他の試験区間に差はみられなかった。

上記の肥育試験で、リンゴ粕を2%添加した混

Table 1 Chemical composition and fermentation quality of experimental feed

Item	Control	AP2%	AP4%	AP6%	AP8%
Chemical composition					
Crude Protein (%DM)	17.9	17.7	17.5	17.2	17.0
Ether Extract (%DM)	4.4	4.4	4.4	4.5	4.5
Fermentation quality					
pH	—	4.5	4.5	4.8	4.9
Lactic acid (%FM)	—	1.08	0.69	0.38	0.25
Acetic acid (%FM)	—	0.11	0.23	0.33	0.26
Ethanol (%FM)	—	0.37	1.48	2.34	1.98

AP2%, AP4%, AP6% and AP8%, mixed feed containing 2%, 4%, 6% and 8% of apple pomace on DM basis, respectively; DM, dry matter; FM, fresh matter.

Table 2 Growth performance and carcass characteristics of pig fed mixed feed containing various proportion of apple pomace

Item	Treatment					SEM	P-value
	Control	AP2%	AP4%	AP6%	AP8%		
Initial body weight (kg)	70.3	70.6	71.3	72.3	71.6	0.355	0.295
Finished body weight (kg)	109.6	116.6	109.0	112.6	109.3	1.456	0.084
Dairy gain (g)	771.2	901.9	738.5	790.8	738.5	30.136	0.117
Dairy feed intake (kg of DM)	2.6 ^B	2.8 ^{AB}	2.8 ^{AB}	2.9 ^A	2.7 ^{AB}	0.082	0.037
Feed conversion ratio	3.2 ^{BC}	3.1 ^C	3.8 ^A	3.7 ^A	3.6 ^{AB}	0.146	0.001
Carcass weight (kg)	72.3	74.2	70.0	71.5	69.8	0.919	0.113
Back fat thickness (cm)	1.9	2.3	1.8	1.7	1.8	0.729	0.517

AP2%, AP4%, AP6% and AP8%, mixed feed containing 2%, 4%, 6% and 8% of apple pomace on DM basis, respectively. DM, dry matter; SEM, standard error of the mean, n=3.

Means within a row with different letters differ ($P<0.05$).

合飼料が最もよい増体や飼料効率を得たため、市販の肥育前期および後期飼料にリンゴ粕を2%添加した発酵飼料を体重30kg, 50kgおよび70kgの去勢豚に給与した。発育成績および枝肉形質をTable 4に示した。枝肉重量および背脂肪厚において各試験区間に差はみられなかった。ロース肉の理化学特性をTable 5に示した。ドリップロース、加熱損失率はリンゴ粕の添加により高くなる傾向を示した。背脂肪中オレイン酸含量は30kg区において最も低い値であったが、他の試験区間において差がみられなかった。

リンゴ粕の肥育豚利用については乾燥リンゴ粕を利用した研究が多く、また成分特徴は高繊維、

低タンパク質であるため、肥育豚の発育成績が低下した報告が多かった¹⁾。本研究では、生リンゴ粕を飼料に4-8%添加した結果、飼料要求率が高まったが、発育成績と枝肉形質に影響がみられなかった。また、2%添加したAP2%区では発育成績と要求率が著しく改善されたことは意外な結果であった。このことについて肥育豚へ発酵した生リンゴ粕を給与した場合、既往の乾燥リンゴ粕給与した発育パターンとの違いを要因としてあげるなら、発酵過程に生成されたアルコールや乳酸などによる可能性があり^{2, 3)}、非常に興味深い。また、背脂肪中オレイン酸において、AP2%区が他の試験区より低いこともアルコール摂取に起

Table 3 Meat quality of pigs fed mixed feed containing various proportion of apple pomace

Item	Treatment					SEM	P-value
	Control	AP2%	AP4%	AP6%	AP8%		
pH	5.4	5.4	5.3	5.5	5.4	0.090	0.054
Moisture (%)	73.3	73.5	72.7	72.2	72.2	0.275	0.367
Crude protein (%)	22.7	23.4	23.6	23.5	23.3	0.154	0.357
Ether extract (%)	2.5	1.9	2.3	3.1	3.2	0.244	0.549
Drip loss (%)	2.3 ^{AB}	3.8 ^A	2.7 ^{AB}	1.9 ^B	3.6 ^{AB}	0.376	0.033
Cooking loss (%)	28.7 ^A	29.1 ^A	27.5 ^A	25.0 ^{AB}	22.7 ^B	1.214	0.004
Water holding capacity (%)	78.1	78.6	79.2	79.2	79.8	0.276	0.105
Marbling score	1.7	1.7	1.5	2.3	2.7	0.226	0.080
Pork color standard	2.2 ^{AB}	1.5 ^B	1.5 ^B	2.5 ^A	1.5 ^B	0.211	0.017
Back fat color standard	1.3	1.8	1.7	1.0	1.5	0.143	0.162
Back fat melting point (°C)	41.9	45.2	42.9	42.8	42.6	0.561	0.078
Cholesterol (mg/100g)	47.0	46.6	38.6	31.6	44.0	2.891	0.281
Oleic acid (%)	43.4 ^A	40.4 ^B	42.8 ^{AB}	42.2 ^{AB}	43.0 ^{AB}	0.401	0.018
Linoleic acid (%)	8.1 ^B	8.4 ^{AB}	8.3 ^B	8.9 ^{AB}	9.5 ^A	0.170	0.046

AP2%, AP4%, AP6% and AP8%, mixed feed containing 2%, 4%, 6% and 8% of apple pomace on DM basis, respectively. SEM, standard error of the mean, n=3.

Means within a row with different letters differ ($P<0.05$).

Table 4 Growth performance and carcass characteristics of pig fed mixed feed containing apple pomace for various periods

Item	Control	Initial bodyweight			SEM	P-value
		30kg	50kg	70kg		
Initial body weight (kg)	30.3	30.6	51.3	72.3	—	—
Finished body weight (kg)	109.7	110.7	109.0	111.0	0.458	0.916
Carcass weight (kg)	72.5	71.9	71.4	72.3	0.213	0.944
Back fat thickness (cm)	2.3	2.3	2.0	2.1	0.072	0.784

DM, dry matter; SEM, standard error of the mean, n=4.

Table 5 Meat quality of pig fed mixed feed containing apple pomace for various periods

Item	Control	Initial bodyweight			SEM	P-value
		30kg	50kg	70kg		
pH	5.6	5.6	5.6	5.5	0.016	0.219
Moisture (%)	72.8	72.6	73.5	74.0	0.318	0.071
Crude protein (%)	23.2	23.5	23.1	23.1	0.095	0.643
Ether extract (%)	2.0	1.9	2.0	1.9	0.165	0.754
Drip loss (%)	2.8	3.2	3.3	3.8	0.162	0.438
Cooking loss (%)	26.9	27.2	29.9	28.3	0.659	0.191
Water holding capacity (%)	78.7	80.6	77.2	77.3	0.783	0.354
Marbling score	1.5	1.7	1.7	1.8	0.068	0.487
Pork color standard	3.0	3.0	3.2	3.3	0.079	0.219
Back fat color standard	1.0	1.0	1.2	1.0	0.042	0.441
Cholesterol (mg/100g)	44.0	33.3	31.6	38.6	2.793	0.566
Back fat melting point (°C)	43.3	43.0	46.3	43.0	0.801	0.413
Oleic acid (%)	43.4	41.1	42.8	42.2	0.795	0.060
Linoleic acid (%)	8.2	7.5	8.3	7.9	0.175	0.103

SEM, standard error of the mean, n = 4.

因する可能性があり^{4,5)}、今後発育・肉質と発酵過程で生成されたアルコールや乳酸との関連について深く検討する必要がある。さらにリンゴ粕を2%とより低い割合で添加した場合、肥育豚体重30kgから給与しても発育や枝肉形質に問題がなく、長期給与できることが示唆された。押田ら⁶⁾はリンゴ粕から抽出したアップルファイバーの給与が、肥育豚ロース肉のコレステロール含量を低減したことを報告した。本研究も同様に期待したが、結果のパラツキが大きく、差がみられなかった。肉質の理化学特性においても、ドリップロースと加熱損失率以外の項目は多岐な傾向を示し、今後試験頭数を増やして検討する必要がある。

4. 要 約

本研究はリンゴ粕の肉豚飼料利用を目的に、リンゴ粕2-8%を慣行飼料に添加し発酵飼料を調製した。化学成分および発酵品質を調査するとともに、リンゴ粕添加量の違いが肥育後期豚の発育成績および肉質に及ぼす影響について検討した。また、リンゴ粕を2%添加した混合飼料を去勢豚へ体重30kg、50kgおよび70kgからそれぞれ給与開

始し、リンゴ粕給与期間の違いが発育成績および肉質に及ぼす影響も検討した。その結果、リンゴ粕は飼料に2%添加すれば、発育成績および飼料要求率が顕著に改善されたが、4%以上の添加は発育に影響がなく、飼料要求率が高くなった。肉質においてはリンゴ粕添加によりドリップロース、加熱損失率が高くなり、AP2%区において最も著しかった。またリンゴ粕を飼料に2%添加した場合、肥育豚体重30kgからより長期間給与しても、発育と枝肉形質に影響がみられなかった。ドリップロースと加熱損失率以外の肉質項目ではリンゴ粕給与量および給与期間の違いによる影響がほぼみられなかった。以上の結果より、肉豚飼料への発酵した生リンゴ粕の添加において、給与量の違いが、飼料効率および肉質に影響することが示された。

文 献

- 1) Bowden, D., Berry, J.: *Canadian Journal of Animal Science*, 39, 26~33, 1958.
- 2) アルコール飼料化推進委員会：日本畜産学会報, 62, 781~805, 1991.
- 3) Canibe, N., Jensen, B.: *Journal of Animal Science*, 81, 2019~2031, 2003.

- 4) Baraona, E., Lieber, C. : *Journal of Lipid Research*, **20**, 289~315, 1979.
- 5) Lieber, C., Schmid, R. : *The Journal of clinical investigation*, **40**, 394~399, 1961.
- 6) 押田敏雄, 坂田亮一, 山田静香, 堀口恵子, 伊東正吾, 松村浩明, 神田智正 : 家畜衛生研究会報, **27** (2), 78~83, 2002.

「乳質の良さ」が注目されるブラウンスイス種乳牛の 栄養・繁殖特性の解明

Characteristics of nutrition and reproductive physiology of the high-
quality milk producer of Brown Swiss dairy cattle

遠藤 なつ美・田中 知己

(東京農工大学農学部)

Natsumi Endo and Tomomi Tanaka

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

We investigated the productive and reproductive characteristics of Brown Swiss (B) cows by comparing those of Holstein (H) cows that were housed in the same barn. Reproductive performance of nulliparous heifers (number of artificial insemination per pregnancy, age of first service, and age of pregnancy) were not different significantly between the breeds. B cows has lower 305-d milk yields and peak milk yield, higher milk fat rate than H cows, but milk protein rate were not different between the breeds. Resumption of ovarian activity and nutrition status after parturition were investigated for B cows (n=5, 1 primi- and 4 multiparous cows) and H cows (n = 11, 3 primi- and 8 multiparous cows). The proportion of cows that resumed ovarian activity within 45 days after parturition tended to be different between B and H cows (5/5 [100%] and 5/11 [45.5%], $P = 0.06$), suggesting that resumption of ovarian activity in B cows occurs earlier than H cows. Expression of estrus behavior in B cows appeared to be less clear than H cows. In particular, mounting behavior did not observed during the investigation period, although the reason should be clarified in future.

1. 目 的

ホルスタイン種乳牛（H牛）の泌乳能力は格段に上昇したが、泌乳量増加に伴う生理的負担はますます過大となり、疾病の増加や繁殖成績の低下が深刻な課題となっている。そうした現状の中、「牛乳本来のおいしさ、乳質の良さ」を有するブラウンスイス種乳牛（B牛）に注目が集まっている。B牛は、スイス原産のスイス・ブラウン種がアメリカで乳用種として改良された品種である。近年、本品種特有の濃厚な乳質がチーズなどの加工品に適していること、暑熱ストレスへの抵抗性

がホルスタイン種乳牛よりも強いこと¹⁾、粗飼料の利用効率が良く低コストでの乳肉生産が可能であることなどの魅力が再評価されており、独自ブランドの乳製品を製造する酪農家を中心にブラウンスイス種の導入が増えつつある。

しかし、その一方で、B牛は過肥になりやすく安定した産乳量を得るための飼育管理が難しい、発情が分かりにくく繁殖成績がH牛に比べて劣るといった声も聞かれる。こうした繁殖の諸問題に対処するためには、十分な現状の調査を行うとともに栄養学的・内分泌学的な背景を踏まえてその機序の解明に取り組むことが必要である。そこで

本研究では、東京郊外でB牛とH牛を混合飼育している酪農家において調査を行い、B牛の泌乳・栄養代謝機能、卵巢機能、発情の発現状況に焦点を当て、同一環境で飼育されるH牛と比較検討することにより、本品種の飼養・繁殖特性を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

2.1 供試動物

東京都郊外の1戸の酪農家において飼育されているB牛とH牛を調査対象とした。この牧場ではB牛とH牛の他にジャージー種乳牛も飼育しており、合計40～50頭の牛がフリーバーン式牛舎で混合飼育されていた。搾乳牛の餌は、乾草、配合飼料、ビール粕等を主体とした完全混合飼料(TMR)を自由採食させるとともに、乳量に応じた量の配合飼料を自動給餌機より追加給与していた。搾乳は1日2回(7:00～9:00と18:00～20:00)行われていた。

2.2 未経産牛の繁殖成績

2011年2月～2016年3月に人工授精を行い、受胎を確認したB種8頭とH種23頭の未経産牛について、初回人工授精時の月齢および受胎率、受胎月齢、受胎に要した授精回数を調査した。また、調査期間中に分娩に至ったB種5頭とH種17頭については、妊娠期間の比較も行った。

2.3 泌乳量および乳成分

調査牧場におけるB牛とH牛の泌乳水準を比較するため、2011年～2016年の牛群検定成績結果から、1乳期(305日)の乳量および最高乳量、乳成分(1乳期の平均乳脂率、蛋白質率、無脂固形分率)をB群とH群で比較した。

2.4 分娩後の卵巢機能の回復状況と栄養状態

2015年6月～2016年2月に分娩した牛を調査対象とし、分娩後30～45日に直腸検査および超音波画像検査を実施した。分娩後45日までに機能性黄

体が確認された場合はそれ以前に初回排卵が起こり卵巢機能の回復ありと判断し、黄体が確認されなかった場合は2～3週間隔で黄体が確認されるまで調査を継続した。黄体が確認された後は、発情や人工授精の実施状況の聞き取り調査に加え、必要に応じて直腸検査を実施し、発情周期が正常に回帰していることを確認した。また、卵巢機能の回復時の栄養状態を調べるため、ボディコンディションスコア(BCS)をFergusonらの方法²⁾に従って1～5の5段階で評価した。また調査期間中の乳中尿素窒素(MUN)濃度は、牛群検定において月に1度計測した値を用いてB牛とH牛を比較した。

2.5 発情行動の発現状況

調査を行った牧場では、繁殖業務の担当者1～2名が朝夕の搾乳時に発情観察を行い、他の牛の乗駕を許容するスタンディング行動に加えて、他の牛へ乗駕する行動、落ち着きなく歩き回る、咆哮するなどの発情徴候が認められた牛に対して人工授精を実施していた。本研究では、2015年7月～2016年3月にB牛に実施した人工授精について聞き取り調査を行い、B牛の発情の発現状況を調べた。

2.6 データの解析

データはすべて平均±標準偏差(SD)で示した。調査項目の解析は基本的にB牛とH牛の2群間の比較を行った。平均値の比較にはStudentのt検定を用い、受胎率などの比率の比較にはFisherの正確確立検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差あり、 $P < 0.1$ を有意な傾向ありとした。

3. 結果と考察

3.1 未経産牛の繁殖成績

未経産のB牛($n = 8$)とH牛($n = 23$)の初回授精月齢(16.1 ± 1.2 vs. 15.2 ± 1.8 ヶ月齢)、受胎月齢(19.9 ± 5.0 vs. 17.1 ± 2.9 ヶ月齢)、初回授

精時の受胎率 (25% vs. 23.3%), 受胎に要した授精回数 (2.4 ± 1.1 vs. 2.3 ± 1.3 回) に有意な差はみられなかった。また, これらの牛の中で調査期間中に分娩に至ったB牛5頭とH牛17頭の妊娠期間は, 286.1 ± 2.1 と 281.4 ± 8.0 日であり, 有意な差はみられなかった ($P > 0.1$)。未経産H牛の初回授精時期は, 15ヶ月前後で体高125~130cm, 体重350~400kgが必要である³⁾。今回の調査では, 体重や体高に関するデータを得られなかったが, 本牧場では両品種とも適切な時期に初回授精が行われていることが示唆された。しかしながら, 初回授精時の受胎率は, 平成20年の調査⁴⁾による全国平均の60%よりも低く, 授精回数も全国平均の1.6回に比べて多い傾向にあった。

3.2 乳量および乳成分

両品種の乳量および乳成分を産次数別 (初産 vs. 2産以上の経産牛) に比較した結果をTable 1に示した。B牛の305日乳量は, 初産牛, 経産牛ともにH牛と有意な差が認められ ($P < 0.05$), ピーク乳量についても経産のH牛は平均 46.1 ± 2.5 kg/dであったのに対しB牛では平均 35.8 ± 1.5 kg/dで両品種間で有意な差が認められた ($P < 0.05$)。乳成分については, B牛は乳脂肪分率および乳タンパク質率がH牛に比べて高く, チーズ作りに適した乳質であると言われているが, 本調査では, 乳脂肪分率 (3.7 ± 0.3 vs. 3.4 ± 0.5 %), 無脂乳固形分率 (8.9 ± 0.3 vs. 9.1 ± 0.3 %) にB牛とH牛で有意な差が認められたが, 乳タンパク質

Table 1 Milk yield and its composition of Brown Swiss (B, 4 primi-and 14 multiparous cows) and Holstein (H, 11 primi-and 17 multiparous cows) cows

Item	Parity	Breed	
		B cows	H cows
Total milk yield (kg/305 d)	Primiparous	$6,352 \pm 438^*$	$7,989 \pm 948$
	Multiparous	$8,247 \pm 1,612^*$	$10,280 \pm 2,062$
Peak milk yield (kg/d)	Primiparous	$28.3 \pm 4.045^\dagger$	33.3 ± 4.7
	Multiparous	$35.8 \pm 1.5^*$	46.1 ± 2.5
Milk fat (%)	All	$3.7 \pm 0.3^*$	3.4 ± 0.5
Milk protein (%)	All	3.4 ± 0.3	3.5 ± 0.3
Non-fat milk solids (%)	All	$8.9 \pm 0.3^*$	9.1 ± 0.3

Data are mean \pm SD.

*Different significantly ($P < 0.05$) as compared with H cows.

†Tend to be different ($P < 0.1$) as compared with H cows.

Table 2 Resumption of ovarian activity in postpartum Brown Swiss (B) and Holstein (H) cows

Item		Breed	
		B cows	H cows
Proportion of cows with resumption of ovarian activity	< 45 d ¹	5/5 (100%) [†]	5/11 (45.5%)
	< 75 d	0/5 (0%)	5/11 (45.5%)
	< 105 d	0/5 (0%)	1/11 (9.1%)
Incidence of follicular cyst		0/5 (0%)	2/11 (18.2%)
BCS at the resumption of ovarian activity		$3.60 \pm 0.34^\dagger$	3.16 ± 0.45

Data are mean \pm SD. Body condition scores (BCS) were measured according to the method of Ferguson et al. (1994)²⁾

¹Days postpartum.

†Tend to be different ($P < 0.1$) as compared with H cows.

率には有意な差が認められなかった。

3.3 分娩後の卵巣機能の回復と栄養状態

2015年7月～2016年3月までの9ヶ月間に週1回の繁殖検診を実施し、B牛5頭（初産1頭、2産以上4頭）とH牛11頭（初産3頭、2産以上8頭）について分娩後の卵巣機能の回復状況を調査した（Table 2）。分娩後45日以内に黄体が確認されたのはB牛では5/5頭（100%）であったのに対し、H牛では5/11頭（45.5%）と低い傾向が認められた（ $P = 0.06$ ）。また、H牛では分娩後45日以内の検査で2/11頭で卵胞嚢腫の発生を認めたが、B牛では観察された牛はいなかった。黄体が確認された日に計測したBCSは、B牛の方がH牛よりも高い傾向が認められた（ $P = 0.07$ ）。分娩後の泌乳量増加に伴う負のエネルギーバランスの増大は、黄体形成ホルモンのパルス状分泌を抑制する結果、卵胞の発育が遅延し、分娩後の初回排卵および卵巣機能の回復に大きく影響することが知られている⁵⁾。B牛の泌乳量はH牛に比べて少なく、粗飼料の利用効率が良いという特性を有しており、今回の調査でもB牛の305日乳量およびピーク乳量はH牛に比べて少ないことが明らかとなった。したがって、B牛では分娩後のエネルギーバランスが負となる期間と程度がH牛よりも短く少なく、その結果として分娩後の卵巣機能の回復がH牛よりも早期に認められたと考えられる。その一方で、B牛は元々肉用種の系統が乳用種として改良されているため、過肥になりやすいことが知られている。今後の研究では、過肥がB牛の繁殖機能にどのように影響するかを明らかにするため、分娩後日数の経過に伴うBCSの推移をH牛と比較調査する予定である。

調査期間中の平均MUN濃度は、B牛とH牛でそれぞれ 12.0 ± 4.3 と 11.0 ± 3.6 mg/dlで有意な差はなく、適正値の範囲内（10～14mg/dl）で推移していた。MUNの上昇は、卵子の受精能力、胚生

存率や黄体機能といった繁殖性に大きく影響することが知られている。一方、MUNの低下は給与飼料のエネルギー不足を示唆しており、飼料設計の見直しが必要とされるが、今回の調査では、MUNや乳成分の値から繁殖性低下につながる明らかな要因は認められなかった。

3.4 発情行動の発現状況と繁殖成績

調査牧場の管理者への聞き取り調査では、B牛の発情行動はH牛に比べて不明瞭で発見しにくいとのことだった。そこで2頭のB牛にプロジェステロン徐放剤を用いた発情同期化処置を行った結果、スタンディング発情と落ち着きなく歩き回る行動上の変化が2頭とも明瞭に観察された。また、調査期間中に未経産のB牛2頭の自然発情を観察する機会があったが、乗駕行動やスタンディング行動は認められないものの、落ち着きなく歩き回り人に盛んに近寄ってくる行動上の変化が2頭とも明瞭に認められた。しかしながら、乗駕行動については調査した4頭の牛で観察されず、人工授精を実施したB牛についての聞き取り調査においても乗駕行動が明瞭に認められた牛はいなかった。乗駕行動は発情前期から発情期に認められる発情行動の1つであり、スタンディング発情が観察されない場合でも、乗駕行動の観察により発情を検出し、人工授精を実施することが可能である。これまでにB牛の発情行動の特徴に関する研究報告はなく、この点についてはより詳細な観察や発情行動の発現に関わるエストロゲンなどの繁殖ホルモンの血中動態と合わせて解明する必要があるが、B牛では乗駕行動を示す牛が少ないことが、B牛の発情発見を困難にしている可能性が考えられた。

4. 要 約

本研究では、ブラウンスイス種乳牛（B牛）とホルスタイン種乳牛（H牛）を混合飼育している

酪農家において調査を行い、B牛の泌乳・栄養状態、分娩後の卵巣機能の回復、発情の発現状況および繁殖成績についてH牛と比較して調べた。未経産牛の繁殖成績は両品種で明確な差がみられなかった。乳量および乳成分については、B牛の305日乳量・ピーク乳量はH牛よりも少なく、B牛の乳脂肪分率はH牛よりも高かったが、乳タンパク質率には有意な差が認められなかった。分娩後の卵巣機能の回復と栄養状態をB牛5頭（初産1頭、2産以上4頭）とH牛11頭（初産3頭、2産以上8頭）について調査した結果、分娩後29～45日の検査で黄体が確認されたのはB牛では5/5頭（100%）であったのに対し、H牛では5/11頭（45.5%）と低い傾向が認められ（ $P = 0.06$ ）、分娩後の卵巣機能の回復はH牛よりも早いことが示

唆された。B牛の発情行動の発現状況については、H牛に比べて不明瞭で発見しにくく、乗駕行動の発現が明瞭でないことが推測されたが、今後の調査でより詳細な観察をもとに検討していく必要がある。

文 献

- 1) Correa-Calderon, A., Armstrong, D., Ray, D., DeNise, S., Enns, M., Howison, C. : *Int J Biometeorol*, 48, 142~148, 2003.
- 2) Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomsen, N. : *J Dairy Sci*, 77, 2695~2703, 1994.
- 3) 相原光夫：今日も明日も牛群検定が約束するあなたの酪農経営, P.78, (株)デーリィ・ジャパン社, 東京, 2013.
- 4) 家畜人工授精師協会：牛受胎率改善対策事業に係る受胎率調査（平成20年）
- 5) Butler, W. R., Smith, R. D. : *J Dairy Sci*, 72, 767~783, 1989.

黒毛和種における*RBP4*多型と枝肉形質の関連解析

Association analysis between *RBP4* gene polymorphisms and carcass traits 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)

Marbling is most characteristic feature in Japanese black cattle, and it is known that the vitamin A restriction improves marbling significantly. In addition, it is known that vitamin A (VA) has many physiological functions. *RBP4* transports retinol, which is a converted VA in liver, to the target tissues (cells) from liver. Therefore, it was suggested that polymorphisms on *RBP4* gene affects to marbling and other carcass traits. We had tried to search polymorphisms on *RBP4* with the population composed of died calves before 20 days old, and detected c.237C>G, c.355+26C>T and c.*50A>G. In this study, we performed an association analysis between these SNPs and major carcass traits in Japanese black cattle, using population composed of normally fattened steers. Furthermore, it was examined whether the 3 SNPs associated with the calf death by comparing genotype frequencies in calf death and fattened population. It was detected that c.355+26C>T associated with carcass weight marginally ($P < 0.1$). The analysis using *RBP4* genotype indicated by the 3 SNPs suggested that *RBP4* significantly associated with carcass weight ($P < 0.05$). In addition, there was no significant difference in frequency of each genotype between these two populations, and it was suggested that the 3 SNPs were not related to a calf death.

1. 目的

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種であり、これまで、特定種雄牛の肥育産子200頭以上からなる父方半きょうだの家系によるQTL (Quantitative trait locus) 解析が15頭の種雄牛に対して実施され、脂肪交雑と関連する染色体領域が検出されている¹⁾。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²⁻⁴⁾。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 (VA) を低レベルにして行われてきたと考えられている^{5,6)}。実際に、黒毛和種去勢牛における血中VA濃度と脂肪交雑に

有意な負の相関があることや、肥育牛に由来する脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化をVAが抑制することが示されている^{7, 8)}。

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 γ (PPAR γ)は脂肪細胞分化の主要な制御因子であり、レチノイドX受容体 (RXR) と二量体を形成する^{9, 10)}。VA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、PPAR γ 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と二量体を形成するため、PPAR γ と競合する。その結果、PPAR γ 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⁸⁾。すなわち、VAは筋肉内脂肪前駆細胞の分化を抑制しているが、VAの給与制限はその分化抑制を解除し、脂肪交雑形成が高まると考えられている。また、VAの生理作用は視覚維持、成長作用、生殖作用、上皮組織の維持、味覚機能、細胞増殖・分化、免疫機構、転写調節、抗がん作用など多岐にわたることが知られている。

VA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血管を通して各臓器へ輸送される。Retinol-binding protein (RBP) 4は、この肝臓からの輸送を担うタンパクである^{11, 12)}。この*RBP4*遺伝子の多型は脂肪交雑をはじめとする枝肉形質に影響すると考え、我々は黒毛和種における*RBP4*多型を探索し、c.237C>G (同義置換：エキソン3)、c.355+26C>T (イントロン4) およびc.*50A>G (3'UTR：エキソン6)の3 SNPsを検出した¹³⁾。

そこで、本研究は、これら3 SNPsと脂肪交雑を含む各種枝肉形質の関連解析、および各SNPの多型性再確認を目的とした。

2. 材料および方法

2.1 共試个体

*RBP4*多型を確認するために、2009~2010年の期間に耳片組織が収集された生後20日以内に死亡した黒毛和種490頭から同一種雄牛の産子が2頭を超えないように選抜した69頭のゲノムDNAを用いた。また、*RBP4*多型と主要な枝肉形質 (枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、皮下脂肪厚、推定歩留、BMS) の関連を調べるために、2003~2008年の期間に東京都中央卸売市場食肉市場および大阪市中央卸売市場南港市場で腎周囲脂肪組織と各種枝肉形質データが収集され、月齢が23~39ヶ月、枝肉重量が300~700kgの範囲である肥育去勢牛20,493頭から同一種雄牛の産子が3頭を超えないように選抜した1,234頭のゲノムDNAのうち、2003年サンプルから同一種雄牛の産子を含まないように選抜した176頭を共試した (Table 1)。

2.2 型判定

RBP4 c.237C>G, c.355+26C>Tおよびc.*50A>G (Fig. 1) を型判定するために3種のプライマーセットを使用した (Table 2)。PCRは、プレ熱変性 (94℃ : 2分) を行った後、熱変性 (94℃ : 1分)、アニーリング (60℃ : 1分)、伸長反応 (72℃ : 1分) を35サイクル繰り返し、最終伸長反応 (72℃ : 10分) を行った。得られた増幅産物を鋳型としてシーケンス反応を行った。CleanSEQ (Beckman Coulter) で処理したシーケンス反応産物を用いて、Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems) と Sequencing Analysis version 5.2 (Applied Biosystems) で塩基配列を決定した。決定した塩基配列に基づいて、各SNPの型判定を行った。

2.3 統計解析

多型確認用集団と関連解析用集団におけるジェノタイプ頻度の差を χ^2 検定で解析した。また、

Table 1 Phenotypes in the population (n = 176)

	Mean	SE	Minimum	Maximum
CW (kg)	462.32	3.40	347.60	584.00
REA (cm ²)	53.32	0.64	33.00	95.00
RT (cm)	7.53	0.06	5.10	9.70
SFT (cm)	2.57	0.06	1.00	4.50
YEP (%)	73.29	0.11	69.80	78.90
BMS	4.94	0.12	2.00	10.00

CW : Carcass weight REA : Area of rib eye
 RT : Rib thickness SFT : Subcutaneous fat thickness
 YEP : Yield estimated percentage
 BMS : Beef marbling standard

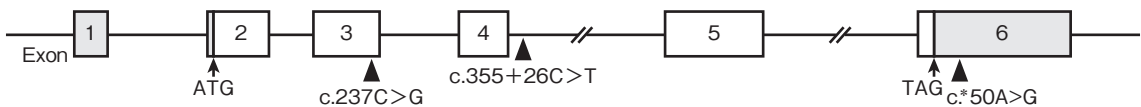


Fig. 1 *RBP4* gene and SNP position. Boxes indicate exons, and filled triangles indicate each SNP position. ATG is initiation codon, and TAG is stop codon.

Table 2 Primers for each SNPs

SNP	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
c.237C>G	F GAGAACTTCGACAAGGCTCG R ACACACGTCGCCAGTACTGC	438
c.355+26C>T	F TCCGTCTCTTAAAGTCAGTGC R AGTTCTGGCTACTTACACACG	407
c.*50A>G	F TTACAAGTACATCTAGCTGTCC R GCTAGAACAGACCGAAGGTC	590

関連解析用集団における各ジェノタイプ間の枝肉形質平均値差を統計ソフトRのaov関数を用いて分散分析を行った。

3. 結果と考察

RBP4 c.237C>G, c.355+26C>Tとc.*50A>Gの多型性を確認するために多型確認用集団69頭の型判定と、これらSNPsと各種枝肉形質の関連を調べるために関連解析用集団176頭の型判定を行った (Table 3)。

同義置換であるc.237C>Gのジェノタイプは、多型確認用集団の65頭と関連解析用集団の176頭について決定できた。多型確認用集団と関連解析用集団における各ジェノタイプ頻度は、それぞれ

C/C型：0.277と0.324, C/G型：0.508と0.489, G/G型：0.215と0.188であり、各アレル頻度はCアレル：0.531と0.568, Gアレル：0.469と0.432であった。両集団ともに、Hardy-Weinberg平衡 (HWE) に従っていた。また、多型確認用集団と関連解析用集団間のジェノタイプ頻度の差を χ^2 検定で解析したが有意な差は見られなかった (Table 3)。さらに、関連解析用集団の176頭をジェノタイプに従ってグループ分けし、各枝肉形質の平均値差を分散分析で解析したが、有意差は見られなかった (Table 4)。

イントロン4に位置するc.355+26C>Tの多型確認用集団 (69頭) と関連解析用集団 (174頭) における各ジェノタイプ頻度は、C/C型：0.159

Table 3 Genotype and allele frequency of RBP4 SNPs

SNP	Population	n*	Genotype frequency (n)			P (χ^2 (df=2))	Allele frequency	
			W/W	W/M	M/M		W	M
c.237C>G (synonymous)	Varidation	65	0.277 (18)	0.508 (33)	0.215 (14)	0.560	0.531	0.469
	Association	176	0.324 (57)	0.489 (86)	0.188 (33)	>0.7	0.568	0.432
c.355+26C>T (intron 4)	Varidation	69	0.159 (11)	0.536 (37)	0.304 (21)	0.926	0.428	0.572
	Association	174	0.155 (27)	0.477 (83)	0.368 (64)	>0.5	0.394	0.606
c.*50A>G (3'UTR)	Varidation	69	0.275 (19)	0.507 (35)	0.217 (15)	0.645	0.529	0.471
	Association	174	0.322 (56)	0.494 (86)	0.184 (32)	>0.7	0.569	0.431

W : Reference type allele
M : Substitute type allele
* : Successfully genotyped

Table 4 Association analysis between RBP4 and carcass traits

	genotype	n	CW (kg)	REA (cm ²)	RT (cm)	SFT (cm)	YEP (%)	BMS
c.237C>G	C/C	57	468.21 ± 5.72	52.89 ± 0.99	7.54 ± 0.11	2.66 ± 0.10	73.08 ± 0.18	4.95 ± 0.23
	C/G	86	461.20 ± 5.07	52.83 ± 0.86	7.56 ± 0.09	2.52 ± 0.09	73.30 ± 0.16	4.90 ± 0.16
	G/G	33	455.05 ± 7.58	55.36 ± 1.95	7.42 ± 0.16	2.54 ± 0.13	73.60 ± 0.29	5.03 ± 0.31
	P		0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1
c.355+26C>T	C/C	27	477.41 ± 6.86	52.81 ± 1.27	7.77 ± 0.14	2.63 ± 0.11	73.14 ± 0.26	4.74 ± 0.37
	C/T	83	462.94 ± 4.64	53.47 ± 0.96	7.55 ± 0.10	2.49 ± 0.09	73.38 ± 0.17	4.83 ± 0.16
	T/T	64	454.99 ± 6.33	53.36 ± 1.14	7.39 ± 0.11	2.63 ± 0.11	73.25 ± 0.19	5.20 ± 0.21
	P		0.05 < P < 0.1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1
c.*50A>G	A/A	56	468.50 ± 5.81	52.98 ± 1.01	7.54 ± 0.11	2.67 ± 0.10	73.08 ± 0.19	4.96 ± 0.24
	A/G	86	461.19 ± 5.07	52.85 ± 0.86	7.56 ± 0.09	2.51 ± 0.09	73.32 ± 0.16	4.92 ± 0.16
	G/G	32	455.99 ± 7.76	55.38 ± 2.01	7.44 ± 0.16	2.52 ± 0.14	73.62 ± 0.30	5.00 ± 0.32
	P		0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1
3SNPs Homozygous	C-C-A/C-C-A	12	474.77 ± 10.67	51.00 ± 1.96	7.79 ± 0.23	2.68 ± 0.13	72.91 ± 0.42	4.58 ± 0.51
	C-T-A/C-T-A	14	478.71 ± 12.75	56.14 ± 2.32	7.66 ± 0.20	2.94 ± 0.22	73.21 ± 0.40	5.43 ± 0.54
	G-T-G/G-T-G	19	443.96 ± 9.73	55.21 ± 2.79	7.18 ± 0.21	2.49 ± 0.18	73.60 ± 0.43	5.26 ± 0.42
	P		0.01 < P < 0.05	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1	0.1 < P < 1

と0.155, C/T型:0.536と0.477, T/T型:0.304と0.368であり, 各アレル頻度はCアレル:0.428と0.394, Tアレル:0.572と0.606であった。これら頻度はHWEに従い, また, 両集団間のジェノタイプ頻度に有意差はなかった (Table 3)。さらに, 関連解析用集団を同様にジェノタイプに従ってグループ分けし, 各枝肉形質の平均値差を解析したところ, 枝肉重量で有意傾向 (0.05 < P < 0.1) が見られた (Table 4)。枝肉重量176頭の平均値 (462.32 ± 3.40kg) に比べ, Cアレルホモは高く (477.41 ± 6.86), Tアレルホモは低く (454.99 ± 6.33), ヘテロは同等 (462.94 ± 4.64) であり, C

アレルに増加効果, Tアレルに低下効果が示唆された (Table 1, 4)。

3'UTRに位置するc.*50A>Gの多型確認用集団 (69頭) と関連解析用集団 (174頭) における各ジェノタイプ頻度は, A/A型:0.275と0.322, A/G型:0.507と0.494, G/G型:0.217と0.184であった。また, 各アレル頻度はAアレル:0.529と0.569, Gアレル:0.471と0.431であった。これらはHWEに従い, また, 両集団間のジェノタイプ頻度に有意差はなかった (Table 3)。さらに, 関連解析用集団における各ジェノタイプの各枝肉形質平均値に有意差は見られなかった (Table 4)。

さらに、3 SNPsによる*RBP4*遺伝子型 (c.237C>G-c.355+26C>T-c.*50A>G) と各枝肉形質の関連を調べるために、3 SNPsすべてがホモ接合である個体を探索したところ、C-C-Aホモ (12頭)、C-T-Aホモ (14頭) とG-T-Gホモ (19頭) が検出された。これら遺伝子型間の枝肉重量に有意差 ($P<0.05$) が見られ、C-C-A型に増加効果、全SNPsが置換型アレルのG-T-G型に低下効果が見られた (Table 4)。また、チューキー法で各群間に有意差は検出されなかったが、c.355+26C>Tの低下効果が示唆されたTアレルを含むC-T-A型の平均値 (478.71 ± 12.75 kg) は、C-C-A型 (474.77 ± 10.67 kg) と同等であり、C-T-A型に低下効果は見られなかった。

これらのことから、*RBP4*遺伝子が枝肉重量と関連する可能性が示された。しかし、c.355+26C>Tの低下効果を示すTアレルを含む遺伝子型のC-T-A型に低下効果が見られなかったこと、c.355+26C>Tはイントロンに位置することから (Fig. 1)、検出された効果はこのSNPによるものではなく、多型探索していない遺伝子上流やシーケンシングが困難なため十分な頭数で多型探索されていないエクソン1および2に位置する多型が影響している可能性があるため¹³⁾、これら領域の多型探索を同規模で行う必要がある。また、*RBP4*遺伝子型と各種枝肉形質の関連は各遺伝子型ホモ個体を用いたが、各グループの頭数が少ないため、解析頭数を増やして解析する必要がある。最後に、多型確認用集団 (死亡子牛集団) と関連解析用集団 (正常肥育去勢牛集団) の各ジェノタイプ頻度に差がなかったことから、これら塩基置換は子牛死亡に関連しないことが示唆された。

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VA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。また、VAは様々な生理作用を持つことが知られている。*RBP4*は肝臓でレチノールに変換されたVAを標的臓器 (細胞) に輸送するタンパクである。このことから、*RBP4*遺伝子の多型は脂肪交雑をはじめとする枝肉形質に影響すると考え、これまでに子牛死亡集団を多型探索用集団として、黒毛和種に存在する*RBP4*多型を探索してc.237C>G, c.355+26C>Tおよびc.*50A>Gの3 SNPsを検出した。そこで、これらSNPsと脂肪交雑をはじめとする枝肉形質との関連を、食肉市場で採取した関連解析用集団を用いて解析した。また、両集団におけるジェノタイプ頻度を比較することで、これらSNPsが子牛死亡と関連するかを検討した。その結果、c.355+26C>Tと枝肉重量の関連が示された。また、3 SNPsによる*RBP4*遺伝子型での解析によって、*RBP4*遺伝子が枝肉重量と関連する可能性が示されが、これはc.355+26C>Tによるものではないことが示唆されたため、遺伝子上流を含む領域の解析が必要と思われる。また、多型探索用集団と関連解析用集団における各SNPのジェノタイプ頻度に差がなかったことから、これらSNPsは子牛死亡と関連しないことが示唆された。

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 γ 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, 原ひろみ, 半澤恵：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, 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 33, 210~215, 2015.

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
(Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science)

The liver is the most important organ for the metabolism of lipid and glucose. The growth speed of the livestock is largely affected by the function of the liver. Furthermore, the liver is the target organ of various types of infectious diseases, including hepatitis E virus. The establishment of the in vitro cell culture system is essential to investigate the detailed function of the liver in the livestock. However, as far as we know, the successful establishment of cattle or pig liver derived cell has been not reported yet.

We successfully obtained primary cattle derived liver cells with special medium, including various growth factors. From its cell morphology, the established cell would be expected to be derived from hepatocyte itself, or hepatic endothelial cells. To induce the infinite cell division of obtained cells, we constructed genetic cassette which encodes the mutant CDK4, Cyclin D, EGFP with polycistronic fashion. The recombinant retrovirus which contains above mentioned three genes showed efficient introduction ratio around 50%. The expression of above-mentioned three genes did not show major morphological change of the introduced cells, suggesting that our applied immortalized method keeps original nature of the cells. As the next step of this study, we are planning to characterize the biological feature of the obtained cells.

1. 研究の目的および背景

肝臓はヒトや動物の体内で最大のサイズと重量を持つ臓器である。特に産業用家畜、牛や豚においては、飼料を消化した後に生育のためのエネルギーを産生するための主たる臓器である。肝臓の機能によって動物の生育は大きく影響されるといっても過言ではない。肝臓における糖・エネルギー・脂質の代謝能力が家畜の発育に大きく影響

している可能性が高く、畜産産業の効率化には家畜の肝臓細胞の機能の解析が重要である。

さらに肝臓は多くの感染症の原因となる臓器である。最もよく知られるものでは、E型肝炎ウイルスがある。E型肝炎ウイルスは人畜共通感染症であり、そのことが主要因として豚の生食が制限されている。E型肝炎は食肉の安全性を確保するうえで大きなリスク要因である。しかしこれらの感染症の研究を進めるためには、試験管内の実験

系が必須である。E型肝炎ウイルスを含む感染症に関する研究を行ううえで、動物への感染実験では大きなリスクを伴う。試験管内にて効率よく増殖する肝臓由来の培養細胞が存在すれば、E型肝炎ウイルスに関する研究が大きく進展すると考えられる。

ヒト由来の肝臓癌由来の培養細胞はHepG2細胞を含めて、全世界で様々な研究に汎用されている¹⁾。しかし、これらの肝臓癌由来の細胞は、癌化する過程でゲノムの不安定性を引き起こしており、元の肝臓細胞の性質の一部を失っている²⁾。また、食肉の安全を確保するうえでは家畜由来の肝臓細胞が必要とされるが、現在までに牛、豚由来の肝臓細胞の樹立は報告されていない。我々は今までサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、サイクリンD、テロメララーゼ由来酵素サブユニット (TERT) のたった3種の遺伝子を入れることで、豚および牛由来の線維芽細胞を無限分裂へ導くことができることを明らかにした³⁾。またこれらの細胞は元のゲノム状態や細胞の性質を保持しており、従来の癌遺伝子を用いた無限分裂細胞の誘導とは異なることを示した³⁾。驚くべきことに、我々はこの無限分裂誘導技術はヒトやサル、牛、豚といった幅広い動物種を超えて適用可能であることを明らかにした^{3~5)}。CDK4、サイクリンD、TERTといった遺伝子群は酵母からヒトに至るまで、遺伝子における配列が高く保存されていることが知られている。この高い保存性のために、幅広い動物種で無限分裂細胞の誘導が可能になると考えられる。我々はこの無限分裂細胞誘導技術を牛肝臓由来初代培養細胞に適用すれば、元の正常な機能をできる限り損なうことなく、自由に増殖させることが可能となる新たな細胞株を作成することができると思われた。

加えて、我々は新たに高グルコースDMEM/F12に100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin,

10% FBS, 10 nM Insulin, EGF (Epidermal Growth factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) を添加した培地を用いて、牛由来初代肝臓細胞を培養することに成功した (未発表データ, 昨年度財団報告書)。我々の樹立した細胞は島状の上皮由来の形態を示し、肝実質もしくは類洞上皮細胞由来であることが推測された。本研究では、まず細胞分裂に伴って蓄積する老化タンパク質であるp16の負の制御を乗り越えるために、p16の結合部位であるCDK4の24番目のアミノ酸を置換した変異型遺伝子、加えてサイクリンDを導入し、無限分裂化を試みた。

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週齢の個体を使用した。動物を用いた実験内容に関しては東北大学動物実験委員会へ実験内容を申請した。動物へ鎮静剤を注入し、その後頸動脈にカニューレを挿入し放血による安楽死を施した。肝臓組織約100–150 gを得た後に、組織内の血管へカニューレを挿入し、コラゲナーゼを含む消化溶液にて灌流した。十分な量の酵素液で組織を分解した後に、肝臓組織由来の細胞液を得た。

2.2 肝臓組織の培養

肝臓細胞の培養には新たに我々が開発した培地条件を用いた。高グルコースDMEM/F12に100U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin, 10% FBS, 10 nM 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ィルスの作成

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ィルスを使用した。細胞を無限分裂へ導くために、変異型CDK4, サイクリンD, TERTを発現するレンチウィルス3種 (CSII-CMV-CDK4R24C, CSII-CMV-CyclinD, CSII-CMV-TERT) を作成し、混合溶液とした。また別の方法として、変異型CDK4, サイクリンD, EGFP (オワンクラゲの蛍光タンパク質) の遺伝子を自己消化性2Aペプチドで連結した遺伝子を化学合成した。化学合成にあたっては遺伝子からのタンパク質の翻訳効率を上げるために、牛の遺伝子としてコドン最適化を行った。最適化した2Aペプチドによって連結した遺伝子は、シャトルベクターであるpUC57より制限酵素で切断、アガロースゲルにて電気泳動後、インサートをゲルから回収した。回収したインサートをレトロウィルスベクターであるQCXINのマルチクロニングサイトへサブクロニングを行った。組み換えウィ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。レンチウィルスの場合、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を骨格とする発現プラスミドを導入した。パッケージングプラスミドおよびCSIIを骨格とするレンチウィルスプラスミドは理化学研究所、バイオリソースセンターの三好浩之チームリーダーより提供を受けた。レトロウィルスの場合、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pCL-gag polおよびpCMV-VSV-G-RSV-RevとQCXINを骨格とするレトロウィルスプラスミドを導入した。パッケージングプラスミドの

一部は国立がんセンター、がん予防研究部の清野透部長より提供を受けた。リポフェクションによる導入後48時間目に10 μ 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、0.45 μ mのフィルターにて濾過を行った。さらに30mlの濾過細胞上清ウィルス液に10mlのポリエチレングリコール6000を主成分とするウィルス濃縮溶液を加えた。4 $^{\circ}$ C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ィルスペレットを1.5mlの培養液にてサスペンドし感染用ウィルス液とした。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。

2.4 肝臓細胞における遺伝子導入の検出

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 \times 10⁵細胞播種した。翌日、遠心分離およびポリエチレングリコールによって濃縮された組み換えウィルス溶液を暴露した。感染は細胞の様子を観察しながら行い、最大で48時間行ったが、細胞の形態から生存率の低下が認められた場合、その時点で感染を終了した。遺伝子導入後48時間目にキーエンス社のボックス型蛍光顕微鏡、BZ9000によってEGFPの蛍光を通じて遺伝子発現をモニタリングした。

3. 結果および考察

我々は高グルコースDMEM/F12に100U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin, 10% FBS, 10 nM Insulin, EGF (Epidermal Growth factor), HGF (Hepatocyte Growth Factor) を添加した培地を用いて、再現よく肝臓上皮細胞由来と考えられる初代培養細胞を得た。細胞増殖は島状になり、またその円形の核を持つ細胞形態から、肝実質もしくは類洞上皮細胞由来と考えられた。また重要なことはアキュターゼのようなコラーゲンを

主成分とした酵素溶液によって細胞の剥離と継代が可能であった。

この細胞を材料に、レンチウイルスを用いて変異型CDK4、サイクリンD、TERT遺伝子の導入を行った(図1A)。我々の過去の牛の線維芽細胞の研究結果から、これらの3種の遺伝子を多重に導入された細胞が優先的に細胞増殖することが判明している³⁻⁵⁾。しかしEGFPのみを発現するレンチウイルスを感染させた結果、驚くべきことに遺伝子導入効率が10%以下と低かった。このことは多重感染を行った場合でも、3つの遺伝子を同時に導入した細胞を得ることはかなり困難であることを示している。

これらの遺伝子導入効率の低さを補うために、我々は自己消化性2Aペプチドを利用した単一レトロウイルスによる複数遺伝子の導入を試みた(図1B)。自己消化性ペプチドは翻訳後に迅速に細胞の内在性プロテアーゼによって複数のタンパク質に切断される⁶⁾。このため、複数の遺伝子産

物を1つのオープンリーディングフレームで導入が可能である。我々は変異型CDK4、サイクリンD、EGFPを2Aペプチドで連結したレトロウイルスベクターを作成した⁷⁾。このベクターの利点は、一度の感染で変異型CDK4およびサイクリンDの両方の遺伝子を同時に導入できること、また遺伝子導入の効率を遺伝子構築の一番後ろのEGFPの蛍光によって検出が可能となる点である。

感染後、48時間後に細胞の蛍光を検出した結果を図2に示す。低倍率で観察されるように、およそ50-60%の細胞に遺伝子導入が可能であった。導入された細胞において、細胞形態に大きな差はなく、我々の従来報告と同様に、変異型CDK4、サイクリンDの導入は元の細胞の性質を損なうことなく無限分裂に至った結果と一致した。これらの導入した細胞における導入遺伝子の発現を特異的抗体を用いたウェスタンブロットおよびゲノムDNA由来のPCRを用いて検出する予定である。さらに得られた細胞が無限分裂するこ

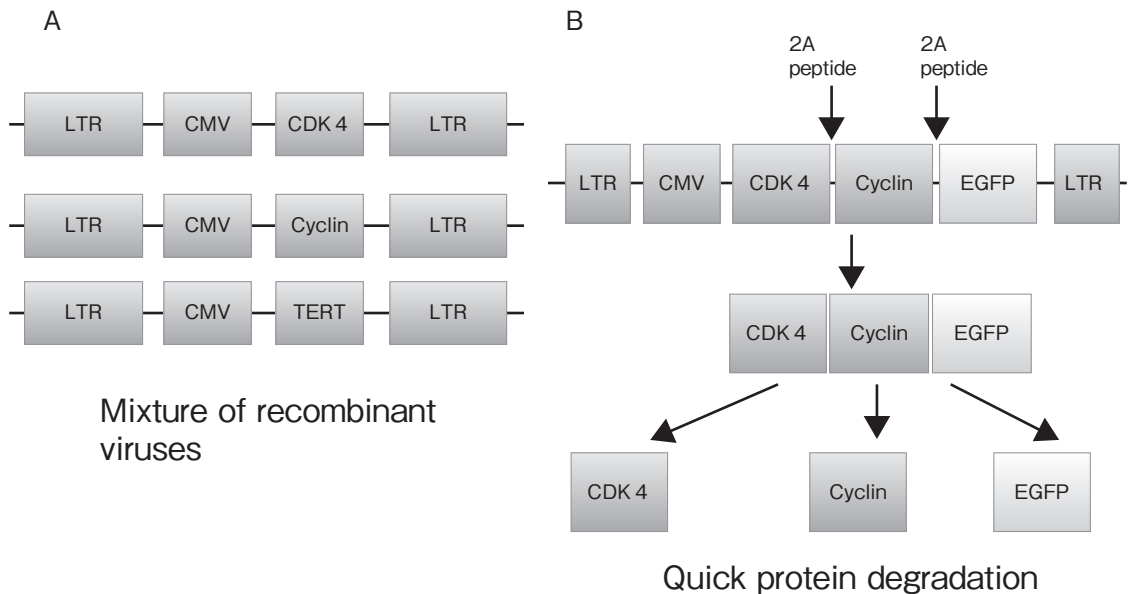


図1 導入したCDK4, Cyclin D, TERTの遺伝子構造

A: CDK4, Cyclin D, TERTを発現するレンチウイルスを混合し、重感染を行った。B: CDK4, Cyclin D, EGFPの3種のタンパク質を同時に発現するレトロウイルスの構造。自己消化性2Aペプチドの存在によって、迅速にタンパク質が3種に分かれる。

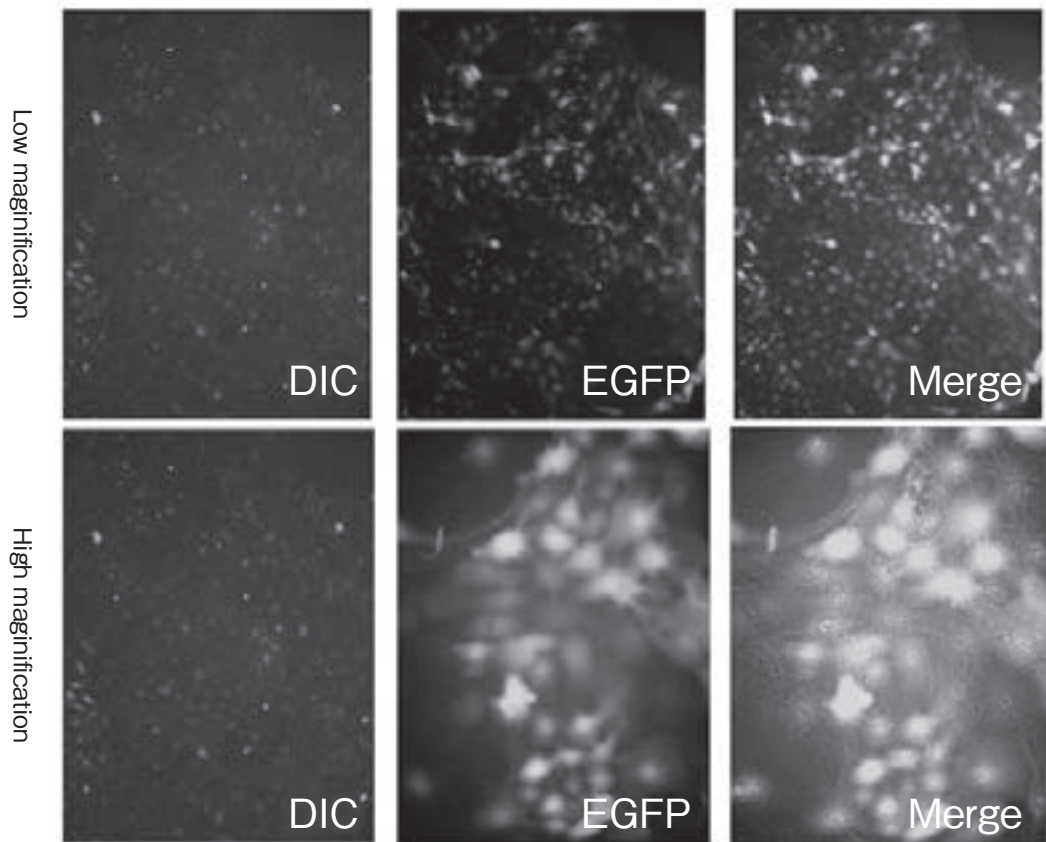


図2 CDK4, Cyclin D, EGFPを一括して導入された牛由来肝臓細胞の形態

上段は低倍率 (X4対物レンズ), 下段は高倍率 (X20対物レンズ) を示す。おおよそ50%程度の割合の細胞へ遺伝子が導入されたことが検出された。

とを連続的な連続継代によって検出する予定である。

本研究によって牛肝臓由来の細胞株を無限分裂へ誘導できる可能性が示された。本細胞は畜産業にとって大きな懸念である人畜共通感染症の試験管内における感染実験系を構築できる可能性がある。

4. 要 約

肝臓は糖・脂質を代謝において最も重要な臓器である。家畜の生育は肝臓の代謝機能に大きく影響される。さらにE型肝炎を代表する様々な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実験が

必須であるが、いまだ牛、豚の肝臓由来の樹立の報告はない。

我々は独自に工夫した特殊培地を用いて、島状に増殖する牛肝臓由来初代培養細胞を作成した。それらの細胞は細胞形態から、肝実質細胞もしくは類洞上皮細胞由来と推測された。さらにこの初代培養細胞を無限分裂化させるために、変異型CDK4およびサイクリンD、EGFPを発現する発現カセットをレトロウイルスを介して導入した。導入効率はおおよそ50%程度であった。導入された細胞は元の初代肝臓細胞と大きな形態学的な変化は認められず、本手法による無限分裂化は元の細胞の性質を保持していると考えられた。今後、得られた細胞の性質を明らかにする予定である。

参考文献

- 1) 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.
- 2) Darlington, G. J., Kelly, J. H., Buffone, G. J. : Growth and hepatospecific gene expression of human hepatoma cells in a defined medium, *In Vitro Cell Dev Biol*, **23**, 349~354, 1987.
- 3) Donai, K., Inagaki, A., So, K. H., Kuroda, K., Sone, H., Kobayashi, M., Nishimori, K., Fukuda, T. : Low-molecular-weight inhibitors of cell differentiation enable efficient growth of mouse iPS cells under feeder-free conditions, *Cytotechnology*, **67**, 191~197, 2015.
- 4) 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.
- 5) Kuroda, K., Kiyono, T., Isogai, E., Masuda, M., Narita, M., Okuno, K., Koyanagi, Y., Fukuda, T. : Immortalization of fetal bovine colon epithelial cells by expression of human cyclin D1, mutant cyclin dependent kinase 4, and telomerase reverse transcriptase : An in vitro model for bacterial infection, *PLoS One*, **10** : e0143473, 2015.
- 6) Kim, J. H., Lee, S. R., Li, L. H., Park, H. J., Park, J. H., Lee, K. Y., Kim, M. K., Shin, B. A., Choi, S. Y. : High cleavage efficiency of a 2A peptide derived from porcine teschovirus-1 in human cell lines, zebrafish and mice, *PLoS One*, **6** : e18556, 2011.
- 7) Fukuda, T., Iino, Y., Onuma, M., Gen, B., Inoue-Murayama, M., Kiyono, T. : Expression of human cell cycle regulators in the primary cell line of the African savannah elephant (*loxodonta africana*) increases proliferation until senescence, but does not induce immortalization, *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, **52**, 20~26, 2015.

粳米の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術の開発

Development of animal welfare friendly broiler production system by unhusked rice feeding in Japan

有賀 小百合・佐藤 衆介

(帝京科学大学生命環境学部)

Sayuri Ariga and Shusuke Sato

(Teikyo University of Science, Faculty of Life and Environmental Sciences)

Broilers being fed on rations containing 30% of unhusked rice spent more time preening and moving, and their chronic stress decreased than on conventional rations mainly consisting of corn (Ohara, 2015). We suggested that feeding on unhusked rice has behavioural and psychological calming effect on broiler chickens. This study aimed to investigate the factor of this effect by observing precisely feeding behaviour on unhusked rice. 15 male broilers reared individually in a wire cage (34 * 31cm/broiler) were equally allocated into three treatments : 100% unhusked rice feed (UR), 98% corn feed (CO), and ration containing 30% of unhusked rice (RC) for 10 min, respectively. The pecking success on rations and appetitive behaviour such as pulling rations toward by bill and sorting out rations by a bill for the first 1 min soon after feeding were observed. (1) The success rate (%) of pecking on rations was 70.1 ± 14.8 in the UR which was less than in the CO ($89.5 \pm 5.6; P < 0.1$) and the RC ($85.5 \pm 4.0; P < 0.1$). (2) The number of sorting out rations by a bill was more in the UR than in the other treatment (UR : 1.9 ± 1.6 ; CO : 0.2 ± 0.3 ; RC : 0.9 ± 1.0 ; $P = 0.066$). (3) Bill-wiping behaviour was performed only by the UR broilers.

In conclusion, it is difficult for broilers to get successfully the unhusked rice, and broilers are needed appetitive behaviour for getting the unhusked rice. These behavioural changes by the partial unhusked rice feeding may have the behavioural and psychological calming effect on the broiler chicken.

Keyword : Appetitive behaviour; Broiler; Calming; Foraging behaviour; Unhusked rice feed

1. 目的

OIE（世界動物保健機構）は、2004年以来、陸生動物健康規約に動物福祉の章を追記し、2013年には「家畜福祉とブロイラー生産システム」とい

う飼育管理の家畜福祉世界基準を作成した。日本の畜産も国際情勢との整合性を取ることが求められる。また、畜産の輸出産業化においては、世界に通用する高福祉畜産の構築が不可欠である。

我が国では、近年、飼料の自給率向上を目的と

し、肉用鶏への飼料用米粉の給与に関する研究が盛んに行われている。我々¹⁾は、鶏の福祉改善の一方策として米粉給与に着目し、肉用鶏に全飼料中重量比30%の米粉配合飼料を給与した結果、慣行的なコーン主体配合飼料を給与した鶏と比較して、活動量や慰安行動である身繕い行動が増加し、慢性ストレス指標である偽好酸球/リンパ球(H/L)比率が低下したことを報告し、鶏の慢性ストレスを改善させると示唆した。また、米粉30%配合飼料を給与した鶏では、摂食時のつきつき速度(回/分)が増加し、米粉は嗜好性が高いことも明らかにした。そして、米粉の給与は、肉用鶏に行動的・心理的安寧をもたらす、福祉性を改善させると示唆した¹⁾。

摂食行動は、動物において最も強く動機づけられている行動である。飼育動物における異常行動や問題行動は、不適切または不十分な採食や摂食行動が原因となっていることが多く、採食・摂食行動の発現状況は、動物の行動的・心理的健康性に大きな影響を与える。このことから、米粉配合飼料による行動的・心理的安寧化効果は、飼料への米粉添加により、摂食行動パターンに何らかの変化が生じたことに起因すると考えた。そこで本研究では、米粉摂食時の行動パターンをより詳細に解明することで、米粉配合飼料の給与による行動的・心理的安寧化効果の要因を明らかにすることを目的とした。

2. 方法

2.1 飼養方法

東京農業大学(神奈川県厚木市)の実験用無窓畜舎にて、2015年9月30日から11月12日にかけて、肉用鶏チャンキー種オス16羽(株式会社松本鶏園)を供試した。導入鶏の内、15羽を実験の試験に使用し、1羽は予備個体として飼育した。全羽を導入直後から、奥行180×横90cmのペンで平

飼いした。敷料には籾殻を使用し、約10cmの厚さで敷き詰めた。導入直後から10日齢までは、プラスチック製容器(直径35cm、深さ2.5cm)にてスターターを、ステンレス製容器(縦横34.5cm、深さ2.5cm)にて米粉を不断給餌した。11日齢から23日齢までは、プラスチック製給餌器(直径43cm、深さ8cm)にて、自家配合した重量比30%米粉配合の前期飼料を不断給餌した。24日齢から43日齢(出荷)まで、単飼ケージ(奥行34×横31×高さ45cm)で1羽ずつ飼養した。そこでは、プラスチック製容器(奥行13.8×横20.3×深さ5.2cm/羽)にて、自家配合した重量比30%米粉配合の後期飼料を不断給餌した。いずれの期間も不断給水した。

2.2 試験方法

米粉、コーン、米粉30%配合飼料のそれぞれの摂食行動パターンを明らかにするため、供試鶏に各飼料を10分間提示し、摂食行動を観察した。試験の日程(日齢)は、10月28日(29)、10月30日(31)、11月2日(34)、11月4日(36)、11月6日(38)、11月9日(41)であった。

24日齢以降、供試鶏を5羽ずつランダムに米粉区、コーン区、通常区に配分した。米粉区では米粉100%飼料を、コーン区では二種混合飼料(コーン98%、魚粉2%)を、通常区では通常飼料(米粉30%配合後期飼料)を特定飼料として定義し、日々の飼養管理で用いていたプラスチック製容器と同型の別容器(奥行13.8×横20.3×深さ5.2cm)に各々20gを入れ、10分間提示した。各試験日の朝09:00から、以下の工程で試験を実施した:①全区における30分間の絶食、②全区への10分間の通常飼料の提示(以下、通常第1期)、③各区への米粉、コーンまたは通常飼料の10分間の提示(以下、特定飼料期)、④全区への10分間の通常飼料の提示(以下、通常第2期)。通常第1期、特定飼料期、通常第2期の行動を高速度ビ

デオカメラ (AX200v, AX100v, ソニーマーケティング株式会社, 東京) により記録した。飼料容器の入れ替え作業やカメラ設置に対する馴致は、10月25日、26日、27日に実施した。

2.3 行動観察

各試験日において、各区の特定飼料期の特定飼料摂食量 (g) を記録した。試験日のうち特定飼料摂食量が多かった上位3日間 (11月2日, 4日, 9日) のビデオ映像にて行動観察を行った。通常第1期, 特定飼料期, 通常第2期のそれぞれにおいて、最も活発に摂食行動が発現していた最初の1分間の映像を分析に供試した。パソコン用無料動画再生ソフトGOM Playerにより、0.2倍速でビデオを再生し、連続観察法により行動観察を行った。行動観察項目はTable 1に示したとおりである。摂食成功回数, 摂食失敗回数, 全つつき回数, 摂食成功率を、通常第1期, 特定飼料期, 通常第2期において観測した。摂食に対する欲求行動の発現回数は、特定飼料期においてのみ観測した。各行動観察項目において、Kruskal-Wallis testを用いて区間および期間の差の有無を分析し、有意差が認められた場合、事後検定としてBonferroni testを行った。

3. 結果と考察

3.1 摂食成功率

コーン区では、5羽中2羽が行動観察中に摂食行動を発現しなかったため、摂食成功率が算出できなかった。そこで、摂食成功率の分析においては、当2羽のデータは除外し、残りの3羽から得られたデータを分析に供試した。

粳米区 (n = 5) において、特定飼料期の摂食成功率 (%) は 70.1 ± 14.8 で、通常第1期の 86.8 ± 3.1 および第2期の 85.1 ± 2.6 と比較して低かった (各期間で $p < 0.05$)。コーン区および通常区では、期間に差はなかった。特定飼料期において粳米区の摂食成功率 (%) は 70.1 ± 14.8 (n = 5) で、コーン区の 89.5 ± 5.6 (n = 3) および通常区の 85.5 ± 4.0 (n = 5) と比較して、低い傾向があった (Kruskal-Wallis, $P < 0.05$; Bonferroni, それぞれ $p < 0.1$)。これらの結果から、粳米100%飼料は、コーン飼料や粳米30%配合飼料と比較して、飼料摂取の成功がより困難であることが明らかとなった。

環境エンリッチメントとは、飼育環境の改変により自然な行動発現を促進させること、およびその技術を指し、動物園動物を中心に開発が進められている。環境エンリッチメントの一手法とし

Table 1 Behavioural category

行動観察項目		定 義
摂食行動	摂食成功回数	飼料をつついた後、嘴を数度にわたり閉閉し、飲み込み動作が確認できた場合、摂食成功とした。一つつきを1回とした。
	摂食失敗回数	飼料をつついた後、嘴の開閉、飲み込み動作が確認できなかった場合、摂食失敗とした。一つつきを1回とした。
	全つつき回数	摂食成功回数および失敗回数の合計値。
	摂食成功率	摂食成功回数 / 全つつき回数 $\times 100\%$
摂食に対する欲求行動	引き寄せ回数	嘴を使い飼料を引き寄せる行動。鶏から見て、給餌器の奥から手前へ、餌箱を引っ掻くように嘴を動かす。一引き寄せを1回とした。
	選り分け回数	嘴を左右に動かし、飼料を左右に飛び散らかす行動。一方向への一振りりを1回とした。
	頭振り回数	飼料を嘴で掴みながら頭を振る行動。一振りりを1回とした。
	嘴ぬぐい回数	嘴を給餌器やケージに擦り付ける行動。一擦りを1回とした。

て、採食エンリッチメントがあり、飼料の提示方法の複雑化、飼料の獲得の困難化、飼料内容の多様化などの方法がある²⁾。飼料の獲得の困難化は、霊長類や馬において問題行動や攻撃行動の減少、探査行動や移動行動の促進効果があることが明らかとなっている²⁾。本研究から、我々¹⁾が確認した粗米配合飼料による活動性の向上や慰安行動の増加、慢性ストレスの軽減は、粗米による摂食行動の成功の困難化が一要因である可能性が示唆された。

3.2 摂食に対する欲求行動の発現回数

特定飼料期における選り分け行動回数(回/分)では、区間に有意差がある傾向が認められ(粗米区: 1.93 ± 1.59 , コーン区: 0.20 ± 0.30 , 通常区: 0.93 ± 1.01 , それぞれ $n = 5$; Kruskal-Wallis, $p = 0.066$), 粗米区にて他区より多く発現していた。有意差はなかったが、嘴ぬぐい行動(回/分)は粗米区でのみ発現した(粗米区: 0.07 ± 0.15 , コーン区: 0.00 ± 0.00 , 通常区: 0.00 ± 0.00)。引き寄せ行動(粗米区: 1.20 ± 2.68 , コーン区: 1.53 ± 2.88 , 通常区: 0.53 ± 0.40)と頭振り行動(粗米区: 0.87 ± 0.93 , コーン区: 0.53 ± 0.51 , 通常区: 0.40 ± 0.44)は、有意差がなかった。

正常な摂食行動の発現パターンは、欲求行動(飼料の探査, 加工)と完了行動(飼料の摂取)とで構成されており、動物は完了行動だけでなく、欲求行動に対しても生得的に強く動機づけられている³⁾。欲求行動の発現が可能な環境は、正常行動の発現や慢性ストレスの軽減などの効果があり²⁾、行動における福祉性の改善において、非常に重要である⁴⁾。選り分け行動は、鶏の摂食に対する欲求行動であるとされている⁴⁾。また、嘴ぬぐい行動は、嘴の清潔性や摂食に適した嘴の形状を維持する働きがあり⁵⁾、鶏にとって必要不可欠な正常行動の一つである³⁾。粗米飼料は、摂食に対する欲求行動や正常行動の発現を促進させる

効果がある可能性が考えられ、それは、我々¹⁾が観察した行動的・心理的安寧化効果の一要因となる可能性が考えられた。

3.3 総括

我々は先行研究¹⁾において、粗米30%配合飼料は、慣行的なコーン主体飼料と比較し、行動的・心理的安寧をもたらす効果があることを示唆した。本研究において粗米30%配合飼料によるこの効果は、通常飼料への粗米の一部添加により、摂食行動の成功がやや困難となり、摂食に関連する欲求行動や正常行動の発現が促進し、それに伴い、行動的満足感が増したことが一要因であると示唆された。

4. 要約

我々は先行研究¹⁾において、肉用鶏に重量比30%の粗米配合飼料を給与することで、活動量や慰安行動の増加、慢性ストレス軽減などの福祉性改善効果を報告し、飼料用米の新たな機能性を示唆した。本研究では、粗米摂食時の行動パターンをより詳細に解明することで、粗米配合飼料の給与による行動的・心理的安寧化効果の要因を明らかにすることを目的とした。

供試鶏はチャンキー種オス15羽であり、5羽ずつ粗米区、コーン区、通常区に配分した。粗米区では粗米100%飼料を、コーン区では二種混合飼料(コーン98%, 魚粉2%)を、通常区では通常飼料(粗米30%配合飼料)を各20g, 10分間提示し、摂食行動を高速度ビデオカメラにて記録した。初めの1分間の摂食成功率および摂食関連行動回数を連続観察により計測した。

粗米区の摂食成功率(%)は 70.1 ± 14.8 ($n = 5$)で、コーン区の 89.5 ± 5.6 ($n = 3$)および通常区の 85.5 ± 4.0 ($n = 5$)より低かった(それぞれ $p < 0.1$)。粗米区の選り分け行動回数(回/分)は 1.9 ± 1.6 で、コーン区の 0.2 ± 0.3 や通常区の $0.9 \pm$

1.0よりも多い傾向にあった ($P = 0.066$)。嘴ぬぐい行動 (回/分) は粳米区でのみ発現した。以上より、我々が示唆した粳米30%配合飼料による肉用鶏の行動的・心理的安寧化効果は、粳米飼料の摂食成功率の低下、ならびに摂食に対する欲求行動の発現に伴う正常行動の適切な発現が要因であると示唆された。

文 献

- 1) 小原愛：日本のブロイラー生産における福祉的飼育法の提案，東北大学大学院農学研究科博士論文，<http://hdl.handle.net/10097/61423>, 2015.
- 2) 村田浩一，楠田哲士：動物園学，第8章環境エンリッチメント，264～275，文永堂出版，東京，2011.
- 3) Duncan, I. J. H. : Behavior and behavioral needs, *Poultry Science*, **77**, 1766～1772, 1998.
- 4) Appleby, M. C., Mench, J. A., Hughes, B. O. : *Poultry Behaviour and Welfare*, 48～51, CABI Publishing, Wallingford, 2004.
- 5) Cuthill, I., Witter, M., Clarke, L. : The function of bill-wiping, *Animal Behaviour*, **43**, 103～115, 1992.

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 (male : n=4, female : n=2) were nursed with 500 g (4 L/day) milk replacer until 107 days of age and were then weaned. In the experimental group (male : n=4, female : n=2), calves were nursed with 1,800 g (9 L/day) milk replacer until 107 days and were then weaned. From weaning to 7 months of age, both groups were fed concentrate (1.5% of body weight [BW]) and hay (ad libitum). Body weight was significantly higher in the experimental group than in the control group at 107 days and 5 months of age. However, there was no difference at 7 months of age. Plasma concentrations of growth hormone (GH) and Insulin like growth factor-1 (IGF-1) were no difference between the two groups. Expression of myostatin mRNA were also no difference in the *M. longissimus thoracis* between the two groups. These results suggested that the IGF-1 secretion of the initial growth phase according high plane of nutrition during early post-natal life may influence not only intake of milk replacer but also the ingestion of colostrum.

1. 目 的

高齢者人口の増加，健康志向の高まりにより消費者の食肉嗜好は多様化してきているため，国内での牛肉生産においても，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。

ミオスタチンは産肉量と脂肪量を制御する主要な因子であり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¹⁾。近年，初期成長期の栄養とそれによる成長促進は，産肉性や肉質に多大な影響を及ぼし²⁾，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。黒毛和牛において，高脂肪ミルクの多給与は筋肉・脂肪細胞増殖を増加させるインスリン様成長因子-1 (IGF-1) 濃度および筋タンパク合成を促し脂肪

分解を促進する成長ホルモン (GH) 濃度を増加させる³⁾。離乳後はIGF-1濃度の増加が維持され、ミオスタチン発現は発現量の緩やかな減少が起こる³⁾。したがって、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を強く示唆するが詳細は明らかとなっていない。マウスにおいてミオスタチン発現はGH投与により抑制される (Janny et al, 2009) が、過去の報告では離乳後のGH濃度は高脂肪ミルクの多給与による明確な差は見られなかった。そこで、本研究では初期成長期の栄養素により離乳後のGH分泌およびミオスタチン発現を制御することを目的とし、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、12頭の黒毛和種子牛を用いて、強化区 (雄4頭、雌2頭) および対照区 (雄4頭、雌2頭) の2区を設定した。両区の供試牛は、生後3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。強化区は、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107日齢時まで給与し、107日齢以降は体重比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、対照区は、強化区と同様の代用乳を哺乳ロボットにより500g/dayの条件で107日齢時まで給与し、107日齢以降は強化区と同様の飼養管理方法を施した。本研究での対照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。

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2,000×g, 20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-80℃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8cmの組織を採取した。採取した組織サンプルは、ただちに液体窒素内で凍結させ、解析を行うまで-80℃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 μgのtotal RNAより合成した。合成したcDNA 1 μL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

104日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、強化区が有意に多かった ($P < 0.05$, $P < 0.05$, respectively)。

体重の変化は、離乳時の107日齢時から5ヵ月齢時にかけて、強化区が対照区と比較し有意に高かった ($P < 0.05$)。一方で、7ヵ月齢時には強化区と対照区を比較し差が見られなかった。

哺乳期間終了時である107日齢時では、強化区の体重が対照区に比べ有意に高かったことから、哺乳量および代用乳からの栄養摂取量が多かったため代用乳由来のタンパクや脂肪の吸収および代謝が促されたことが増体に繋がったものと考えられる。一方で、離乳後の採食量は両区の間で差がなかったにも関わらず体重は離乳後の5ヵ月齢時から差が小さくなり7ヵ月齢時には有意な差が認められなかった。黒毛和牛において哺乳期の代用乳の多給与はルーメン発達が遅延すること

が示唆されており²⁾、離乳後に摂取した飼料の利用が滞った可能性が考えられる。今後は、代用乳の効果を維持しながらルーメン発達を促す飼養管理技術の開発が必要であると考えられる。

血液成分は、血漿GHおよびIGF-1濃度は哺乳期間中および離乳後ともに両区の間には差は見られなかった。過去の報告では試験に供試した子牛は17日齢で母子分離され代用乳を給与されたが、本試験では3日齢で母子分離を行い4日齢から子牛に代用乳が給与された。したがって、母牛からの初乳摂取が十分に行われなかった可能性が推察される。GHやIGF-1は初乳に含まれ子牛に移行する⁴⁾。また、初乳構成成分は子牛の発達に影響を及ぼしその後の体質や生理機能を変化させることが報告されている⁵⁾。したがって、初乳によるIGF-1の十分な摂取と強化哺乳の組み合わせることで、離乳後の高いIGF-1濃度を維持できる可能性が示唆された。一方で、過去の報告と本試験結果よりGHは哺乳期の代用乳多給与だけでは離乳後の維持は難しい可能性が示唆された。GHは放牧飼育により増加する⁶⁾。このことから、今後は哺乳期の強化哺乳と離乳後の放牧を組み合わせることにより、高いGH濃度の維持が可能になると推察される。

ミオスタチン発現については哺乳期間中および離乳後ともに両区の間には差は見られなかった。過去の報告では3ヵ月間の強化哺乳を行った子牛のミオスタチン発現は、5ヵ月齢時において対照区と比較して発現量の減少傾向が見られた³⁾が、7ヵ月齢時には両区の間には差は見られなかった。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を制御することは可能であると推察されるが、初期成長期の代用乳多給によるGH分泌とミオスタチン発現が連動しないことから単胃動物で報告されているようなGHとミオスタチンの関係性が黒毛和牛では少ない可能性が示

唆された。今後はGH投与や放牧を行いGH分泌とミオスタチン発現の関係を詳細に検討する必要がある。さらに初乳中にミオスタチン抑制物質が存在する可能性も考えられることから、初乳のメタボローム解析等を行いミオスタチン抑制物質の探索を行う必要がある。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な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。

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。高脂肪ミルクの多給与は筋肉・脂肪細胞増殖を増加させるIGF-1濃度および筋タンパク合成を促し脂肪分解を促進する成長ホルモンGH濃度を増加させ、離乳後はIGF-1濃度の増加とミオスタチン発現の緩やかな減少が起こる。そこで本研究では、初期成長期の栄養素により離乳後のGH分泌およびミオスタチン発現を制御することを目的とし、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。

体重は離乳時の107日齢時から5ヵ月齢時にか

けて、強化区が対照区と比較し有意に重かった ($P < 0.05$) が、7ヵ月齢時においては両区間に差が見られなかった。血漿GHおよびIGF-1濃度は哺乳期間中および離乳後ともに両区間に差は見られなかった。また、LTにおけるミオスタチン発現についても哺乳期間中および離乳後ともに両区間に差は見られなかった。以上より、初期成長期の栄養素によるIGF-1分泌は哺乳量だけではなく初乳の摂取に影響され制御される可能性が示唆された。今後、離乳後のGH分泌およびミオスタチン発現制御機構を検討する必要がある。

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) Matsubara, A., Takahashi, H., Saito, A., Nomura, A., Khounsaknalath, S., Christopher, D. M., Fujino, R., Shiotsuka, Y., Etoh, T., Furuse, M., Gotoh, T. : *Anim Sci J*, In press, 2015.
- 3) 高橋秀之：平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，公益財団法人伊藤記念財団，**33**，160~163，2015.
- 4) Oda, S., Satoh, H., Sugawara, T., Matsunaga, N., Kuhara, T., Katoh, K., Shoji, Y., Nihei, A., Ohta, M., Sasaki, Y. : *Comp Biochem and Phys, A*, **94**, 805~808, 1989.
- 5) Bartol, F. F., Wiley, A. A., Bagnell, C. A. : *Reprod Domest Anim*, **43**, 273~279, 2008.
- 6) Barton, R. K., Krysl, L. J., Judkins, M. B., Holcombe, D. W., Broesder, J. T., Gunter, S. A., Beam, S. W. : *J Anim Sci*, **70**, 547~558, 1992.

放牧養豚用アニマルウェルフェア評価法の開発

Development of on-farm pastured pig welfare assessment protocol

瀬尾 哲也

(帯広畜産大学畜産学部)

Tetsuya Seo

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

In recent years, concern related to farm animal welfare has increased worldwide. Although the concern expressed by Japanese consumers and producers remains low. We prepared animal welfare assessment protocol for pastured pig in fattening period. The assessment method we prepared consists of three bases of animal, facility and management, includes 29 parameters in all. We assessed the welfare level in four outdoor swine farm. The welfare levels in animal base were higher, however the level of facility base was lower. Further research is needed to refine this protocol in the view of animal diseases.

1. 目的

近年の国際情勢からみると、日本においてもアニマルウェルフェア（家畜福祉）に対応せざる得ない状況にきている。EUでは採卵鶏のバタリテージが禁止され、妊娠豚の受胎後4週間から分娩1週間前までの期間のストール飼育禁止などの法整備が進められている。OIE（国際獣疫事務局）では、動物の健康とウェルフェアの間には強い関連性があるということから、輸送、食用のためと畜などに関する規約を作成し、2012年にアニマルウェルフェアと肉用牛生産システム、2013年にアニマルウェルフェアとブロイラー生産システムに関する規約、2015年にはアニマルウェルフェアと乳用牛生産システムに関する規約が制定された。ISO（国際標準化機構）でもアニマルウェルフェアの技術仕様書の作成に関する検討を始めるなど、国際機関においてアニマルウェルフェアに

関する検討が積極的に進められている。

しかし日本ではまだその整備が遅れており、平成22年度に各家畜の飼養管理指針¹⁾が作成された程度で、アニマルウェルフェアを実際に評価して商品化することはできていない。アニマルウェルフェアという概念を生産者や消費者に目に見える形にするためには、アニマルウェルフェアの基準を明確化し、それを満たしているかを判定できる評価法が必要である。

日本でいくつかの農場が「アニマルウェルフェア商品」と畜産物に記載し販売しているが、客観的評価がない自己判断であり、単に販売戦略として使われていく可能性が懸念される。

申請者はこれまで全国の酪農家を訪問して乳牛のアニマルウェルフェア評価法を開発し、酪農家の飼育管理を評価してきた²⁾。そして、その基準を満たした農場からの生乳を使った牛乳の商品化が行われている。しかしながら、養豚に関しては

これまで評価が行われていない。

本研究の目的は、これまでの研究知見と現場での試験的評価から、日本型のアニマルウェルフェア評価法を作成し、放牧養豚でそれを適用し評価することである。

2. 方 法

2.1 肥育豚アニマルウェルフェア評価法の作成

肥育豚の大規模で放牧養豚を行っている北海道のある養豚場において、畜産技術協会が発表している豚のアニマルウェルフェア評価法³⁾により、アニマルウェルフェア調査を試行的に行い、基準が曖昧で評価を行いにくい項目や、不明確であった測定方法などを明らかにした。次に、それにより見直す必要があると考えられた項目に関して、海外のアニマルウェルフェア評価法などからの基準の引用や、研究知見を参考にして評価法の基準を検討し、養豚場での追調査も実施した。それらの調査により評価法を完成させた。これを、これ以後「肥育豚アニマルウェルフェア評価法」とする。

本評価法は動物の状態を調査する動物ベース、施設や設備を調査する施設ベース、管理方法を調査する管理ベースに分けられており、それぞれの項目で基準を満たしていれば「○」、基準を満たしていなければ「×」をつける。各ベースにおいて全項目中に占める○の割合で得点率(%)を計算する。アニマルウェルフェア認証をするためには各ベースすべてで80%を上回ることを条件と仮定した。

2.2 肥育豚アニマルウェルフェア評価法による評価

肥育豚を放牧飼養している北海道3農場および関東1農場の合計4農場で行った。各農場の総飼養頭数は、892、24、26および108頭であった。

2015年から2016年の冬季に上記の農場を訪問し作成した肥育豚アニマルウェルフェア評価法を用いて評価を行った。はじめに管理者に対し管理方法などを聞き取る15分ほどのアンケート調査を行い、その後、調査者のみで動物の状態や施設、設備を評価する測定調査を行った。

3. 結果と考察

3.1 肥育豚アニマルウェルフェア評価法

作成した評価法の項目一覧をTable 1に示す。動物ベース：9、施設ベース：12、管理ベース：8項目で合計29項目となっている。すべての項目に評価基準とチェック方法(評価者の測定の仕方や調査頭数など)を別途作成している。

3.2 評価結果

動物ベースの得点率は3農場が100%であったが、1農場は9項目中1項目のみの基準を満たしておらず、88.9%であった。このように動物ベースは基準を満たしやすいことが認められたが、本研究で評価した農場はすべて放牧飼養であるため、今後は一般的な豚舎での評価も必要である。

施設ベースの得点率は、一番低い農場が58.3%、一番高い農場が83.3%となった。施設ベースの得点率の低い項目を順に列挙する(基準を満たしていない農場数)と、シェルター(4農場)、給水器(3農場)、給餌器(2農場)、照度(1農場)、防疫設備(1農場)、施設の不良(1農場)であった。全農場で満たしていなかった項目は「シェルター」で、シェルターの面積が不足していた。2番目に基準を満たせなかった項目は「給水器の数」である。冬季には気温が低いため夏季のように水分を豚は必要とせず、放牧地では水たまりや湧水、雪などから水の摂取が可能であると飼育者は考えており、放牧地での給水については重要視してないようであった。

管理ベースの得点率は、一番低い農場が

Table 1 Measures in animal welfare assessment for fattening pigs

	Hunger and Thirst	Discomfort	Pain, Injury or Disease	Normal Behaviour	Fear and Distress
Animal base	BCS	Panting Shivering Huddling Cleanliness of body	Wounds on body lameness	Environmental enrichment on behaviour	Flight response
Facility base	Feeder Drinker	Shelter Wallowing Illumination Air quality	Slatted floor Hygiene facilities Housing for animals under treatment Failure of facilities	Space allowance Providing environmental enrichment	
Management base	Inspection and maintenance of feeder Inspection and maintenance of drinker	Inspection and maintenance of air and heating facilities	Health check Teeth clipping Tail docking Castration		Handling

62.5%、一番高い農場が87.5%となった。管理ベースの得点率の低い項目を順に列挙する（基準を満たしていない農場）と、順に健康状態の点検・記録（3農場）、歯切り（2農場）、断尾（1農場）であった。最も満たせていなかった項目は「健康状態の点検・記録」の基準であった。どの農場も毎日豚の健康状態は確認しているものの、記録を行っておらず、また、掲示板や記録簿などを利用して飼育者間で情報の共有をしていなかった。健康状態を毎日記録することは豚の健康管理を行ううえで重要であるため、飼育者にこれを推奨したい。2番目に満たされにくかった項目は「歯切り」である。1農場は歯切りを行っている子豚を導入しているため、基準を満たすことができなかった。自農場で歯切りを行っている1農場は、歯切りは、飼養管理上で問題が起こった場合のみしか行っていないが、歯切りを行う際に根元からニッパーで切断するということがあった。基準は歯切りを行う際は「歯の先端のみ」の切断しか許容されていないため、結果は基準を満たせていないということになった。「豚の飼養実態調査アンケート報告書」⁴⁾によると、歯切りを行っている農場において、ニッパーを使用している割合は約95%であり、ほとんどの農場でニッパーを使用し

ていた。ニッパーを使用する場合は、根元から歯を切断する。アンケートの結果から、歯の根元からの切断が日本では主流であり、「歯の先端のみ」の切除を基準にすると、現実的ではない可能性がある。EU、米国、オーストラリアでは歯の先端のみを切除することが基準となっているが、今後はどのような方法が正しく、豚にとってよい方法であるのかをより検討する必要がある。

認証基準の目安としたすべてのベースで80%以上とした場合、評価結果は1農場のみが認証できるという結果となった。2農場はそれぞれ施設ベースが、1農場は管理ベースがそれを下回ったため、認証できないという結果となった。本評価法による認証はかなり高いレベルの基準と言えるであろう。

本評価法には豚体の傷に関する評価項目を設定しているが、疾病自体を評価する項目は設定していない。EUで開発されたWelfare Quality⁵⁾では疾病の項目が10項目あり、この点については今後獣医師と協力して研究を進める必要がある。

4. 要 約

世界的にアニマルウェルフェアに対する関心は急速に高まりつつある。豚のアニマルウェルフェ

ア評価法は2011年に畜産技術協会が文献をもとに作成したが養豚現場で評価したことはなく、実際に評価を試行してみると豚の多様な飼養管理に即しておらず、また認証のための評価法として用いることは難しいと考えられた。よって、本研究は畜産技術協会の肥育豚のアニマルウェルフェア評価法をもとに評価法を作成し、実際の放牧養豚場で評価することを目的とした。評価する養豚場は将来的なアニマルウェルフェア認証を見据え、放牧養豚場を対象とした。

作成した評価法の評価項目数は動物ベース8項目、施設ベース12項目、管理ベース8項目の全29項目となった。評価方法は基準を満たしているものには○、そうでないものには×をつけ、認証のためには各ベースで得点率が8割以上であることを条件とした。

その評価法により冬季に4戸の放牧養豚場で調査した。その結果、4農場のうち、1農場のみがすべてのベースで8割を上回っていた。2農場は施設ベースが、1農場は管理ベースが8割を下回っていた。もしこの基準を認証基準とした場合、1農場しか認証できないという結果となり、本評価法はかなり高いレベルの認証基準と言える

であろう。本評価法は動物、施設、管理の3つのベースから多面的な評価が可能である。また、本評価法は基準に○か×を付ける2項分類であるため、改善点がどこであるかを容易に見つけることができ、認証に使うことだけの利用ではなく、農場におけるアニマルウェルフェアの改善点を明らかにすることができる。しかしながら、本評価法の今後の課題としては、疾病を評価する基準も作成していくことがあげられる。

文 献

- 1) 公益社団法人畜産技術協会：アニマルウェルフェアの考え方に対応した豚の飼養管理指針、<http://jlta.lin.gr.jp/report/animalwelfare/shishin/pig.pdf>, 2011.
- 2) Seo, T. : On-Farm Assessment of Animal Welfare in Japanese Dairy Cattle, *Journal of Integrated Field Science*, 8, 35~40, 2011.
- 3) 小針大助：アニマルウェルフェア評価法報告書豚のAW評価法, 102~125, 公益社団法人畜産技術協会, 東京, 2011.
- 4) 公益社団法人畜産技術協会：豚の飼養管理実態調査 http://jlta.lin.gr.jp/report/animalwelfare/H26/factual_investigation_pig_h26.pdf, 2015.
- 5) Welfare Quality[®], Welfare Quality[®] Assessment protocol for Pigs (growing and finishing pigs), In : Dalmau, A., Velarde, A., Scott, K., Edwards, S., Veissier, I., Keeling, L., Butterworth A (eds), Welfare Quality[®] Consortium, Lelystad, the Netherlands, 2009.

効率的な家畜生産に資する生殖中枢メカニズムの解明

Elucidation of central mechanism controlling reproduction to improve
production efficiency of livestock

上野山 賀久

(名古屋大学大学院生命農学研究所)

Yoshihisa Uenoyama

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Kisspeptin encoded by *Kiss1* gene is now considered to be a master regulator of reproduction in mammals. To understand the mechanism regulating *Kiss1*/kisspeptin expression is a promising strategy for the improvement of the production efficiency of livestock in order to meet an ever-increasing demand. The present study tried to generate targeted-gene-floxed rats in order to uncover the mechanisms controlling *Kiss1*/kisspeptin expression by using CRISPR/Cas9 gene editing. Expression vectors carrying Cas9 nuclease and a guide RNA were microinjected into a pronucleus of the zygotes obtained from superovulated female rats. The zygotes were cultured overnight and then transferred into the oviductal ampulla of pseudopregnant rats. The genome editing in the targeted gene locus was successfully detected at the morula stage. The generation of targeted-gene-floxed animals is currently underway by using the validated expression vectors in combination with targeting vectors including the 34-bp loxP sequence.

1. 目 的

畜産物の需要は、開発途上国の人口の増加と富裕化により、世界中で今後ますます増加すると予測されている¹⁾。この需要の増加に見合う畜産物の供給を可能とする動物生産を実現するためには、家畜をより一層効率的に繁殖させる必要がある。現実には、たとえば、乳用牛の初回受胎率が50%以下と低く、近年の繁殖成績の低下傾向が大きな問題となっている²⁾。

家畜を含むほ乳類の生殖機能は、脳により制御されている。とりわけ、視床下部に局在するキス

ペプチンニューロンは、性腺刺激ホルモン放出ホルモン(gonadotropin-releasing hormone, GnRH)分泌を制御するマスターレギュレーターと考えられている³⁾。これまでの研究から、性成熟期のGnRH分泌の高進や、泌乳期におけるGnRH分泌の停止は、キスペプチンをコードする*Kiss1*遺伝子の発現制御やキスペプチンの分泌制御を介して調節されていることが示唆されている^{4~6)}。

そこで本研究では、キスペプチンニューロンにおける*Kiss1*発現やキスペプチン分泌を制御するメカニズムを解明するために、キスペプチンニューロンに発現するGタンパク質共役受容体の

探索結果をもとにCRISPR/Cas9法により各受容体遺伝子のfloxedラットの作製を試みた。

2. 方法

CRISPR/Cas9法により、キスペプチンニューロンに発現するGタンパク質共役受容体をコードする遺伝子のfloxedラットを作成するため、候補となるひとつのGタンパク質共役受容体遺伝子の5'上流および3'下流に存在するProto-spacer adjacent motif (PAM) ドメイン (5'-NGG-3') を含む23bpのDNA配列それぞれ20個を選択した。各DNA配列について、3塩基以内のミスマッチを含むラットゲノム配列の数をGGGenome (<https://gggenome.dbcls.jp/ja/>, last accessed March 2016) により解析した後、ミスマッチ数の少ないDNA配列をオフターゲット効果が少ないことが期待できる標的候補配列として5'上流および3'下流にそれぞれふたつずつ選抜した (Fig. 1)。標的候補配列のいずれかひとつを含むguide RNAとCas9 nucleaseを共発現するベクター (Cas9発現ベクター) をそれぞれ作製した。

Wistar-Imamichi系統の雌ラットを用い、膣スミアにより発情周期を確認し、発情休止期第1日の午前11時に、ウマ絨毛性性腺刺激ホルモン (150IU/kg) を、その48時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (human chorionic gonadotropin, hCG; 75 IU/kg) を腹腔内投与し、過剰排卵を誘起した。hCG投与後、同系統の雄ラットと同居させ、翌日、膣栓の有無により交配の成否を確認し

た。

交配が成功した雌ラットを同日午後にと殺し、卵管灌流により受精卵を回収した。ヒアルロニダーゼを含むM2培地においてピペッティングにより卵丘細胞を除去した後、顕微鏡下において、受精卵の前核にCas9発現ベクターをマイクロインジェクションした。インジェクション後、卵子をM16培地に移し、炭酸ガス培養装置で1晩培養した。翌日、卵子の発生状況を確認した後、偽妊娠雌ラットの卵管膨大部に移植した。

5'上流域の標的候補配列であるseq1, seq2を含む2種類のCas9発現ベクターをマイクロインジェクションした卵子を、移植3日後、卵管灌流により回収し、桑実期胚に発生した卵子の数を調べた後に、各桑実期胚のゲノムDNAを鋳型としてPCRおよびDNA多型検出法により遺伝子型を解析し、Cas9 nucleaseによるゲノム編集の効率を検討した。3'下流域の標的候補配列であるseq3, seq4を含む2種類のCas9発現ベクターをマイクロインジェクションした卵子についても、同様の方法によりCas9 nucleaseによるゲノム編集の効率を検討した。

3. 結果と考察

5'上流域の標的候補配列であるseq1, seq2を含む2種類のCas9ベクターを54個の受精卵にマイクロインジェクションして、1晩培養した後、15個の2細胞期胚と、14個の健全な1細胞期胚を得た。それらを1匹の偽妊娠ラットに移植し

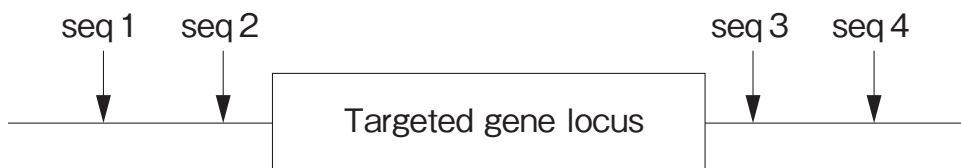


Fig. 1 Schematic illustration of the locations of four guide RNA candidates (arrows) in a targeted gene locus in order to generate the targeted-gene-floxed animals.

た3日後に、13個の健全な桑実期胚を回収した。各桑実期胚のゲノムDNAを鋳型として、PCRおよびDNA多型検出法により遺伝子型を解析した結果、3個の桑実期胚において、seq 1 およびseq 2 のふたつの標的候補配列の両方でゲノム編集が生じ、その間の約230bpのDNA配列の欠損を認めた。標的候補配列のいずれか一方においてのみゲノム編集が生じた桑実期胚は認められなかった。この結果から、5'上流域のふたつの標的候補配列は20%強の確率でゲノム編集が生じることが示された。

3'下流域の標的候補配であるseq 3, seq 4 を含む2種類のCas 9 ベクターを184個の受精卵にマイクロインジェクションして、1晩培養した後に、114個の2細胞期胚と、24個の健全な1細胞期胚を得た。それらを2匹の偽妊娠ラットに移植した3日後に8個の健全な桑実期胚を回収した。PCRおよびDNA多型検出法により遺伝子型を解析した結果、1個の桑実期胚においてseq 3 近傍で、別の1個の桑実胚においてseq 3 およびseq 4 の両方の近傍でゲノム編集を認めた。この結果から、効率は低いものの、3'下流域のふたつの標的候補配列においてもゲノム編集が生じることが示された。

上記の結果をもとに、5'上流域の標的候補配列であるseq 2 を含むCas 9 発現ベクター、3'下流域の標的候補配列であるseq 4 を含むCas 9 発現ベクター、loxP配列と標的候補配列seq 2 あるいはseq 4 の近傍と相同なホモロジーアームを有する1本鎖DNAであるターゲッティングベクターを、受精卵にマイクロインジェクションし、キスペプチンニューロンに発現するGタンパク質共役受容体の遺伝子座の5'上流域および3'下流域に、loxP配列を挿入したfloxedラットの作製を現在継続中である。

4. 要 約

ほ乳類の生殖中枢であるキスペプチンニューロンに発現するGタンパク質共役受容体のノックアウトラットの作製をCRISPR/Cas 9法により試みた。桑実期胚において、標的遺伝子座におけるゲノム編集の成否を確認することに成功した。標的遺伝子座にloxP配列を挿入したfloxedラットの作製を現在継続中である。

文 献

- 1) FAO : World Livestock 2011-Livestock in food security. Rome, FAO, 2011.
- 2) Butler, W. R. : Review : effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle, *J Dairy Sci*, **81**, 2533~2539, 1998.
- 3) Uenoyama, Y., Nakamura, S., Hayakawa, Y., Ikegami, K., Watanabe, Y., Deura, C., Minabe, S., Tomikawa, J., Goto, T., Ieda, N., Inoue, N., Sanbo, M., Tamura, C., Hirabayashi, M., Maeda, K. I., Tsukamura, H. : Lack of pulse and surge modes and glutamatergic stimulation of LH release in Kiss1 knockout rats, *J Neuroendocrinol*, **27**, 187~197, 2015.
- 4) Yamada, S., Uenoyama, Y., Deura, C., Minabe, S., Naniwa, Y., Iwata, K., Kawata, M., Maeda, K. I., Tsukamura, H. : Oestrogen-Dependent Suppression of Pulsatile Luteinizing Hormone Secretion and Kiss1 mRNA Expression in the Arcuate Nucleus During Late Lactation in Rats, *J Neuroendocrinol*, **24**, 1234~1242, 2012.
- 5) Takase, K., Uenoyama, Y., Inoue, N., Matsui, H., Yamada, S., Shimizu, M., Homma, T., Tomikawa, J., Kanda, S., Matsumoto, H., Oka, Y., Tsukamura, H., Maeda, K. I. : Possible role of oestrogen in pubertal increase of Kiss1/kisspeptin expression in discrete hypothalamic areas of female rats, *J Neuroendocrinol*, **21**, 527~537, 2009.
- 6) Yamada, S., Uenoyama, Y., Kinoshita, M., Iwata, K., Takase, K., Matsui, H., Adachi, S., Inoue, K., Maeda, K. I., Tsukamura, H. : Inhibition of Metastin (Kisspeptin-54)-GPR 54 Signaling in the Arcuate Nucleus-Median Eminence Region during Lactation in Rats, *Endocrinology*, **148**, 2226~2232, 2007.

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・石川潤一*

(東海大学農学部バイオサイエンス学科, *宮城大学大学院食産業学研究科)

Hideki Kinoshita and Junichi Ishikawa*

(Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University, *Graduate School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

Recently, it has emerged a number of multi-drug resistance bacteria through the use of inappropriate antibiotics, which have been feared the spread of infection to humans. On the other hand, lactic acid bacteria (LAB) are known as useful microorganisms. Especially, LAB are found in traditional fermented foods, and have been widely applied to food industry. Bacteriocins from LAB, for example, nisin A is known to be antimicrobial by forming pores in the cell membrane of Gram-positive bacteria. In this study, we examined whether the bacteriocins produced by LAB can suppress drug resistance bacteria effectively.

Lactobacillus delbrueckii subsp. *bulgaricus* JCM1002^T and 13 strains of drug resistance bacteria were used as the indicator bacteria for anti-bacterial assay. The culture supernatants containing antibacterial substance from 27 LAB strains that selected from 944 of LAB strains were used as samples for antibacterial assay. Characterization of samples were investigated after pH adjustment at 6.2, protease treatment at 37°C for 18 h, and heat treatment at 121°C for 15 min. The antibacterial activities were tested against 13 strains having potential drug resistance, and heat-map dendrogram was constructed. SDS-PAGE and *in situ* anti-bacterial assay were performed after crude purification using reverse-phase chromatography.

In the pH-neutralization and heat treatments, the antimicrobial activity of each supernatant was grouped by pH-dependence and heat resistance. Many samples showed anti-bacterial activities against multi-drug resistance bacteria. Especially, the culture supernatant of *Lactococcus lactis* MBR916 showed higher protease stability and anti-bacterial activity against all multi-drug resistance bacteria without *Bacillus* sp. R11. The antimicrobial spectrum of the MBR916 bacteriocin suggests *Lc. lactis* MBR916 produces a nisin-like bacteriocin. The molecular weight of MBR916 bacteriocin, however, was speculated at 3.7 kDa by SDS-PAGE and *in situ* anti-bacterial assay that was different from the nisin A standard. This suggests that this bacteriocin may be novel.

1. 目 的

現在、病院での抗菌薬の過度の処方および家畜餌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^{1, 2)}。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³⁾。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。我々は、昨年までの研究で900菌株以上の乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし、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。そこで本研究ではこれまでに分離した多剤耐性菌を指標菌として用い、バクテリオシンによる殺菌効果を検討するとともに、新奇性が期待されるバクテリオシンについての特徴付けを行った。

2. 方 法

2.1 使用菌株と培養条件

バクテリオシン産生株は、宮城県産業技術総合センター保有の乳酸菌944菌株から選抜した27菌株を用いた。コントロールとしてナイシンA産生株である*Lactococcus lactis* NBRC12007（以下NBRC12007株）およびガセリシンA産生株である*Lactobacillus gasseri* LA39（以下LA39株）を用いた。

指標菌には、乳業用乳酸菌である*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T（以下JCM1002株）および以前分離した薬剤耐性菌を含む13菌株を用いた（Table 1）。

バクテリオシン産生株およびJCM1002株は

Table 1 The indicator bacteria for bacteriocin assay used in this study

Strain	Species	Source	Antibiotic resistance
JCM1002 ^T	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	Milk	—
MYU562	Not identified (Staphylococci)	Cucumber Karashizuke	GM, KM, ABPC
MYU564	<i>Lactobacillus sakei</i>	Cucumber Karashizuke	SXT, VCM
MYU572A	<i>Enterococcus faecalis</i>	Wasabizuke	RFP, AMK, GM, KM,
MYU598	<i>Staphylococcus warneri</i>	Kimchi	KM
MYU599A	<i>Bacillus</i> sp.	Kimchi	CPF, RFP, EM, CP, TC, AMK, GM, KM, SXT
MYU599B	<i>Bacillus</i> sp.	Kimchi	CPF, RFP, EM, CP, TC, AMK, GM, KM, SXT
MYU636	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Lettuce	Undefined
MYU644A	<i>Staphylococcus warneri</i>	Cabbage	Undefined
MYU644B	<i>Staphylococcus warneri</i>	Cabbage	RFP (induction)
MYU677	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Tomato	EM, SXT
R08	<i>Cellulosimicrobium</i> sp.	Feces (swine)	CPF, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)
R11	<i>Bacillus</i> sp.	Feces (swine)	CPF, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)
R18	<i>Lactococcus lactis</i>	Feces (swine)	CPF, AMK, IPM (Screened by antibiotic medium)

GM ; gentamicin, KM ; kanamycin, ABPC ; ampicillin, SXT ; trimethoprim/sulfamethoxazole, VCM ; vancomycin, RFP ; rifampicin
AMK ; amikacin, CPF ; ciprofloxacin, EM ; erythromycin, CP ; chloramphenicol, TC ; tetracycline, IPM ; imipenem

MRS broth (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を用い、30℃または37℃で24時間、静置培養した。JCM1002株を除く指標菌は、SCD培地 (日本製薬株式会社, 東京) を用い、37℃で18時間静置培養した。

2.2 抗菌活性試験

抗菌活性試験は、ペニシリンカップ法により行った。指標菌を0.25%となるよう接種した0.75% MRS agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) を作成し、その上にペニシリンカップ (外径8 mm, 内径6 mm) を静置した。次にペニシリンカップの中に培養上清100 μ l を添加し、37℃で一晩培養後、阻止円の直径 (mm) を測定した。また、コントロールとしてナイシン A (100U, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) も同様に試験した。

2.3 バクテリオシンの特徴付け

バクテリオシンの特徴付けは、JCM1002株を指標菌にして行った。培養上清を下記のとおり処理した後、抗菌活性試験を行った。中性化処理ではNaOHを用いてpHを6.2に調整した。プロテアーゼ処理では、アクチナーゼ E (科研製薬株式会社, 東京) を10 mM CaCl₂含有20 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に2 mg/mlで溶解し、培養上清と等量混合して37℃で18時間作用させた。熱耐性試験では121℃、15分間のオートクレーブ処理を行った。結果は阻止円の直径 (mm) で示した。

2.4 ヒートマップ・デンドログラムの作成

乳酸菌上清の抗菌活性について、群間比較を行う目的でクラスタリング解析に供した。JCM1002株は、未処理での結果に加え、熱処理、pH処理、プロテアーゼ処理した培養上清での結果も使用した。解析プログラムは、R (Ver. 3.1.2) を使用した。抗菌活性試験によって得られた阻止円直径を r 、乳酸菌上清ごとの阻止円直径の平均値 μ_{sup} 、乳酸菌上清ごとの阻止円直径の標準偏差を σ_{sup} と

し、各乳酸菌上清について $(r - \mu_{\text{sup}}) / \sigma_{\text{sup}}$ を求め、得られた値についてウォード法によるクラスタリング解析を行い、乳酸菌上清と指標菌のヒートマップ・デンドログラムを作成した。

2.5 バクテリオシンの簡易精製

新奇性が高いと推測される *Lc. lactis* MBR916 のバクテリオシンの簡易精製を行った。まず、余計な培地成分を除くためにSCD培地 (日本製薬株式会社, 東京) をMWCO3500の透析膜で透析し、透析外液を用いて菌の培養を行った。遠心分離 (3000 rpm, 15 min) した後、得られた上清を逆相カラムクロマトグラフィーに供した。カラムは、Bond Elut C18 (C18; Agilent technologies, Santa Clara, CA, USA) およびOasis HLB (HLB; Waters, Milford, MA, USA) を使用した。まず、上清をC18カラムに通過させた後、蒸留水および30% イソプロピルアルコール (IPA; 和光純薬工業株式会社, 大阪) で洗浄後、40%, 50%および60% IPAで溶出した。溶出液を遠心真空乾燥機で乾燥させ、10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.4) に再溶解し、HLBカラムに供した。次いで、蒸留水、IPA、アセトニトリル (AcCN; 和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて10%ずつの濃度勾配 (10%~90%) でステップワイズ溶出した。活性が確認できたものについて、SDS-PAGEおよび*in situ*抗菌活性試験を行った。

2.6 SDS-PAGEおよび*in situ*抗菌活性試験によるバクテリオシン分子量の推定

簡易精製により得られた抽出物のうち、抗菌活性が認められたサンプル10 mlを乾燥し、50 μ lのSDS化試薬で処理後、トリシンを使用したSDS-PAGEに供した。各サンプルは10 μ lずつウェルに添加し (ナイシン Aスタンダードは5 μ l)、2枚のゲルに対して40 mA印加し、280分間電気泳動した。マーカーは、Amersham ECL Rainbow Molecular Weight Markers (GEHealthcare,

Little Chalfont, England) を使用した。泳動終了後、2枚のうち1枚のゲルはCBB染色し、もう1枚は、JCM1002株を添加した軟寒天培地上に静置し、37°Cで一晩培養した (*in situ* 抗菌活性試験)。培養後、阻止帯から *Lc. lactis* MBR916 のバクテリオシンの分子量を推定した。

3. 結果と考察

Table 2 には、様々な条件で培養上清を処理した後の JCM1002 株に対する生育阻止円の直径を示した。培養上清は大きく、中性化処理で活性が減少しなかったグループと活性が激減したグループに分けられた。活性が減少しなかったグループは、プロテアーゼで活性が消失し、121°C、15分間の加熱処理でも強い活性を維持するという共通点が見られた。これはナイシン A 産生株である NBRC12007 株の培養上清と同じ挙動であった。本グループは、ほとんどの株が *Lc. lactis* であることから、ナイシン様抗菌物質を産生していることが強く示唆された。一方、中性化により活性の消失が認められたグループは、さらに耐熱性のペプチド性グループ、熱感受性のペプチド性グループ、その他に分けられた。興味深いことに MBR916 株は、どのグループにも属さず、すべての処理 (pH, プロテアーゼ, 熱) の影響を受けなかった。同様の特徴を示したサンプルは、コントロールとして用いた市販の精製ナイシン A とガセリシン A 産生株 (LA39 株) の培養上清のみであった。ナイシン A 産生株の NBRC12007 株はプロテアーゼ処理で活性が完全に消失したことから、市販の精製されたナイシン A は一部不溶化してプロテアーゼが作用しにくくなっている可能性が示唆された。また、精製ナイシン A および NBRC12007 株の培養上清の阻止円は境界面がクリアであるのに対し、MBR916 株のバクテリオシンでは境界面が不鮮明であるという特徴の違いも

見られた (データ示さず)。阻止円の不鮮明さは LA39 株の培養上清 (ガセリシン A) と類似しており、特徴も類似していることから MBR916 株のバクテリオシンは、環状化バクテリオシンである可能性も示された。

Table 3 には、乳酸菌培養上清の耐性菌群への抗菌効果について示した。コントロールとして用いたナイシン A はグラム陽性菌には有効であるが、*Enterococcus faecalis* MYU572A や *Bacillus* sp. R11 のようにほとんど効かない菌もあった。特徴的なものとして MBR738 株の培養上清は、他の培養上清と比較して、*Lc. lactis* R18 に対する抗菌活性が著しく高かった。それ以外にも、ナイシン A と比較して抗菌活性が高い培養上清が多く見られた。また、MBR325 株のバクテリオシンは、活性自体は微弱であったが供試したすべての耐性菌に有効であった。また、複数の培養上清を組み合わせることで幅広い多剤耐性菌の殺菌に有効である可能性が示された。

Fig. 1 には、阻止円の直径により作成したヒートマップ・デンドログラムを示した。デンドログラムにより、乳酸菌の培養上清は2つの大きなクラスターに分けられ、ナイシン様バクテリオシンを産生していると思われる上清が同じクラスターを形成した。本クラスターは、乳酸菌群への抗菌活性が強い傾向にあることが示唆され、MBR916 株も本クラスターに分類された。一方、中性化により抗菌活性が低下した上清のクラスターは、*Bacillus* 属や *Staphylococcus* 属への抗菌活性が高い傾向が見られ、これらの乳酸菌により産生される抗菌物質は、ナイシン様抗菌物質とは異なることが示唆された。

MBR916 株のバクテリオシンは、クラスター解析ではナイシン様バクテリオシンに分類されたが、その培養上清は、NBRC12007 株の培養上清と比較して8倍の活性値を示したこと (データ示

Table 2 Anti-bacterial assay for culture supernatants of selected LAB against *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T after pH-, protease- and heat-treatments

Sample	Species	Source	Non-treatment (acidic condition)	pH adjusted at 6.2	Non-protease treatment	Protease treatment (Actinase E)	Heat treatment (121°C, 15 min)
Nisin A (100 U)	—	—	28	28	22	21.5	26
NBRC12007	<i>Lactococcus lactis</i> (Nisin A producer)	—	25	25.5	19.5	0	22.5
LA39	<i>Lactobacillus gasserii</i> (Gassserisin A producer)	—	18	18	14	13	18
MBR21	<i>Lactococcus lactis</i>	cut pine apple	21	23	23	0	20.5
MBR286	<i>Lactococcus lactis</i>	sake bluwery	24	22	23	0	20.5
MBR325	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	meat processing plant	14	0	19	0	0
MBR479	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	eggplant (raw)	22	13	13	0	13
MBR514	<i>Lactococcus lactis</i>	nasuzuke	17	12.5	8	0	8
MBR648	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Hosta sieboldii</i>)	25	24	24	6	22
MBR652	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Hosta sieboldii</i>)	25	23.5	23	0	21.5
MBR653	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Hosta sieboldii</i>)	25.5	19.5	23	8	22
MBR655	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Hosta sieboldii</i>)	25.5	22	24	8	22
MBR656	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Hosta sieboldii</i>)	25.5	22.5	24	6	22
MBR707	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	spring water	22	11.5	17	0	14.5
MBR708	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	spring water	20.5	9	12	0	9.5
MBR709	<i>Leuconostoc lactis</i>	seawater	18	0	8	0	0
MBR710	<i>Leuconostoc</i> sp.	seawater	18	0	8	0	0
MBR711	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	seawater	18	0	8	0	10
MBR736	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	flower (<i>Gentiana triflora</i>)	16.5	6	8	0	6
MBR738	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Gentiana triflora</i>)	24.5	23	24	0	22.5
MBR739	<i>Lactococcus lactis</i>	flower (<i>Gentiana triflora</i>)	23.5	21.5	24	0	23
MBR826	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	24	22.5	23	0	23
MBR832	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	25	22.5	28	0	24
MBR837	<i>Lactococcus lactis</i>	raw milk	24	21	24	0	27
MBR916	<i>Lactococcus lactis</i>	huckleberry	23.5	21.5	22	20	29
MBR919	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	seawater	23	9.5	0	0	0
MBR920	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	seawater	22.5	8	0	0	0
MBR921	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	seawater	21	0	6	0	10.5
MBR922	not identified (coccioid lactic acid bacteria)	seawater	20	11	0	0	6
MBR756	<i>Lactobacillus zeae</i>	raw milk	8	0	0	0	13

Table 3 Anti-bacterial assay for culture supernatants of selected L-AB against the drug-resistance bacteria

Sample	Strain No. of the indicator bacteria													
	MYU562	MYU564	MYU572A	MYU598	MYU599B	MYU599C	MYU636	MYU644A	MYU644B	MYU677A	R08	R11	R18	
Nisin A (100U)	8	6	0	8	6	6	8	8	9	9.5	16.5	±	8	
MBR21	10.5	6	10.5	8	6	6	11	6	0	9	21	0	14	
MBR286	10	6	9.5	8	6	6	11	6	0	8.5	20	0	13.5	
MBR325	9.5	6	8	6	6	6	8	6	6	6	6	±	8	
MBR479	10.5	6	0	8	6	6	6	8	6	8	14	±	8.5	
MBR514	9	6	0	6	6	6	8	8	6	8	23	±	8	
MBR648	10	10	10	8	8	8	12	8	6	9	23	0	14	
MBR652	11	9	10.5	8	6	6	12	6	6	10	21.5	0	13.5	
MBR653	10	6	9.5	8	6	8	12	8	8	9	22	0	14.5	
MBR655	10	6	9.5	8	6	8	12	8	8	9	21	0	13.5	
MBR656	10	8	9.5	8	6	8	12	8	6	10	21.5	0	14	
MBR707	9	0	9.5	6	6	0	9	6	6	0	14	0	14	
MBR708	9	0	0	0	0	0	8	0	0	0	15	±	8	
MBR709	6	6	0	6	6	6	8	8	6	8	13	0	8	
MBR710	9	6	0	6	6	6	8	8	6	8	13	0	8	
MBR711	12	8	0	8	10	10	11	9.5	10	9	18.5	±	8	
MBR736	10.5	0	0	8	6	6	8	8	6	0	13	0	6	
MBR738	11	9.5	9.5	8	6	8	11.5	6	6	10	21.5	0	24	
MBR739	10	8	9	8	6	6	10.5	6	6	9	21	0	14	
MBR826	10	8	10	8	6	6	10	6	6	9	19	0	9	
MBR832	9	8	9	8	8	8	10	6	6	9	19	0	9	
MBR837	9	10	9.5	8	6	8	10	6	6	9	19	0	8.5	
MBR916	10	6	10	8	6	10.5	8	8	8	6	22.5	0	13	
MBR919	10	0	0	7	6	0	6	8	6	0	11	0	8	
MBR920	10	0	0	6	6	0	6	6	6	0	11	0	8	
MBR921	13	8	0	8	9	11.5	9.5	11	10.5	10	21.5	±	8	
MBR922	10.5	0	0	8	6	0	0	8	6	0	12	0	8	
MBR756	NT	NT	0	NT	NT	10	NT	NT	NT	NT	19	0	8	

NT : not tested
± : weak activity

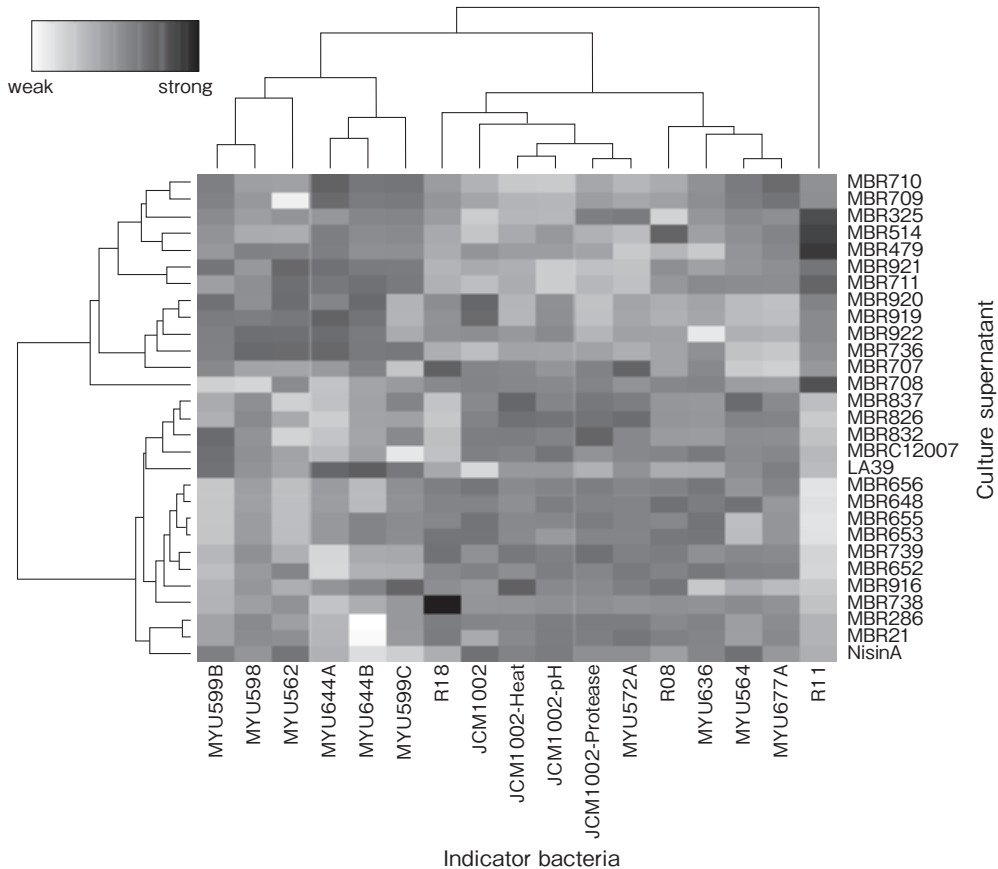


Fig. 1 Heat-map dendrogram in the anti-bacterial assay against drug-resistance bacteria JCM1002 : using an untreated sample, JCM1002-Heat, pH or Protease : using a heat-, pH- or protease-treated sample, respectively.

さず), 前述したように阻止円の特徴が異なること, 抗菌スペクトルが異なることから非常に特徴的なバクテリオシンである可能性が示唆された。そのため, 本バクテリオシンを簡易精製しSDS-PAGEおよび*in situ*抗菌活性試験にて分子量の推定を試みた (Fig. 2)。その結果, 70–90%IPA抽出物において生育阻止円が見られた (Fig. 2 B)。MBR916株のバクテリオシンは, ナイシン A (3.4 kDa) より分子量が大きく約3.7kDaを示した。分子量については構造により泳動位置が大きく変化するため (例えば環状構造をとっている場合は実際の分子量より小さい位置にバンドが現れる), 今後, 正確な分子量についてはTOF-MS解析で決定していく予定である。また, 本バクテリオシ

ンの阻止円の大きさはナイシン A (10 mg/ml, 2 μ l 添加) より大きかったが, SDS-PAGEにおいて明確なバンドを得ることができなかった (Fig. 2 A)。これはナイシン A に比べて活性値が非常に大きいか, 芳香族アミノ酸が少なくCBBでは染色されにくいことが考えられた。本バクテリオシンは銀染色でも染色されなかったことから, 非常に少量で強い活性を示す可能性が高いと考えられた。*Lc. lactis* が産生するバクテリオシンはナイシン A のほか, ナイシン Z, ナイシン Q, ラクティシン 481, ラクトサイクリシン Q, ラクトコッシン Q など様々なものが報告されている^{4,5)}。MBR916 株について, 既知の12種類のプライマーペアにて遺伝子の検出を試みたがいずれのプライマーペア

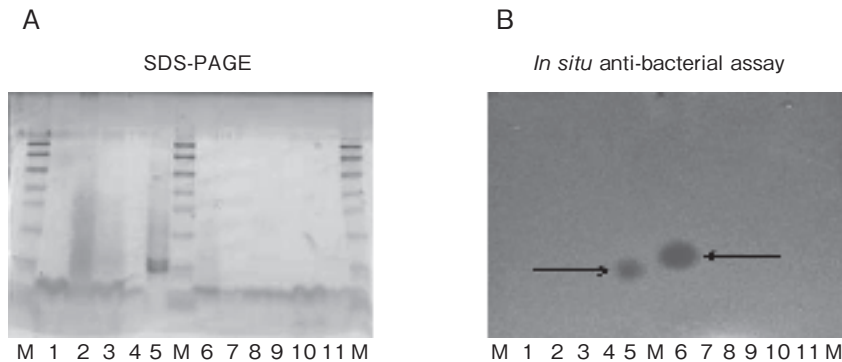


Fig. 2 SDS-PAGE (A) and *in situ* anti-bacterial assay (B) after column chromatography
 M : molecular weight marker, 1 : the permeate of HLB column, 2 : water and 10-20% IPA extract, 3 : 30% IPA extract, 4 : 40-60% IPA extract, 5 : nisin A standard (10 mg/ml), 6 : 70-90% IPA extract, 7 : 30 % AcCN extract, 8 : 60% AcCN extract, 9 : 90% AcCN extract, 10 : MeOH extract, 11 : 40-60% IPA extract after reverse-phase chromatography.
 The arrows indicate clear zones.

でも増幅は確認できなかった（データ示さず）。これらのことからMBR916株のバクテリオシンは新奇バクテリオシンである可能性が示唆された。現在、本バクテリオシンの完全精製を試みており、アミノ酸の一次構造等を決定し、バクテリオシンの同定を行う予定である。

本研究では、多剤耐性菌を乳酸菌バクテリオシンにより殺菌できる可能性が示された。特にMBR916株のバクテリオシンは、抗菌スペクトルが広く、pH、プロテアーゼ、熱安定性も非常に高いため、機能性家畜飼料の開発へと繋がる有用なバクテリオシンである可能性が示された。現在T-RFLPを用いた菌叢解析を行っており、実際にバクテリオシンが豚糞便中で多剤耐性菌を効果的に抑えることが可能かを検証している。

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。昨年までの研究で944菌株の乳酸菌から選抜した抗菌活

性を示す27菌株についてJCM1002株を指標菌として、pH中性化処理、プロテアーゼ処理、熱処理を行った後抗菌性を試験した。熱および中性化処理により、各上清の抗菌活性は熱耐性およびpH依存性によってグルーブ化できた。また、プロテアーゼ試験により、*Lc. lactis* MBR916株の培養上清が高いプロテアーゼ耐性を示した。本上清は、*Bacillus* sp. R11を除きすべての薬剤耐性菌に対して抗菌活性を示した。MBR916株のバクテリオシンは、抗菌活性スペクトルを比較すると、ナイシン様バクテリオシンであることが推察されたが、推定された分子量は、ナイシンAと比較してわずかに高分子量であったことから新奇バクテリオシンである可能性も示唆された。今後、アミノ酸の一次構造を決定し、遺伝子の解析を行う予定である。

本研究において、乳酸菌のバクテリオシンを用いた多剤耐性菌の殺菌の可能性が示された。現在、応用研究として豚糞便を用いたバクテリオシンでの多剤耐性菌殺菌効果の検証を進めており、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. : *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. : *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. : *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) 石橋直樹, 善藤威史, 園元謙二：日本乳酸菌学会誌, 22巻, 38~48, 2011.

黒毛和種子牛における呼吸器病の血清亜鉛濃度および 亜鉛投与による臨床的な症状改善効果の検討

Serum zinc value of respiratory disease calves in Japanese Black and
effect of supplemental zinc in Japanese Black calves against clinical
respiratory diseases

乙丸 孝之介・窪田 力・米重 隆一*・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, Ryuichi Yonesige* and Makiko Tokimori*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, *Hokusatsu Agricultural Mutual Aid Associations)

Respiratory disease occurs in all species of mammals including cattle and human. Respiratory disease is most commonly observed in calves, and it causes high economic losses. Zinc (Zn) is essential micronutrient in cattle diets. They are also essential antioxidants that play an important defensive role in the prevention of free radical induced damage to tissues for maintaining the health. In human, it has been reported that Zn has stimulatory effects on immunity, and those levels in blood are severely decreased with respiratory diseases. In cattle, mastitis condition decreases the serum Zn. However, alterations of Zn levels in calves with respiratory symptoms have not been reported. Therefore, This study was conducted to determine serum biochemical values in Japanese Black steer calves with respiratory symptoms at one ordinary farm in Kagoshima Prefecture, Japan. Ten Japanese Black calves with respiratory symptoms (respiratory group; rectal temperature $\geq 39.7^{\circ}\text{C}$, with symptoms of nasal discharge and coughing), and ten clinically healthy calves (control group) were used in this study. The following biochemical parameters were determined using a autoanalyzer: total protein (TP), albumin (Alb), globulin (Glb), Alb/Glb (A/G) ratio, urea nitrogen (UN), creatinine (Cre), total cholesterol (T-Cho), triglyceride (TG), nonesterified fatty acids (NEFA), beta-hydroxybutyrate (βHB), aspartate aminotransferase (AST), γ -glutamyltransferase (GGT), alkaline phosphatase (ALP), creatine kinase (CK), calcium (Ca), inorganic phosphorus (iP), magnesium (Mg) and Zn. The mean concentration of the serum Zn in the respiratory group were significantly lower than those in the control group ($P < 0.01$). The other items were not significantly different between the two groups. These results suggested that the serum Zn values in calves with respiratory symptoms might be lower than clinically healthy calves due to consumption for inflammation.

1. 目 的

呼吸器病は、すべての哺乳動物にみられる疾病

である^{1, 2)}。呼吸器病は牛において、もっとも頻繁に起こる病気の1つであり、重要な生産性阻害要因となっている¹⁾。亜鉛は牛において必須の微

量ミネラルであり³⁾、抗酸化物質として重要な役割を担っている⁴⁾。ヒトにおいて、亜鉛は免疫の向上効果があると報告されているとともに⁴⁾、呼吸器病を呈すると血液中の濃度は低下すると報告されている^{2, 5)}。牛においては、これまで乳房炎を呈した乳牛では、血液中の亜鉛が低値であったとの報告がある⁶⁾。しかしながら、呼吸器病と血液中の亜鉛濃度との関連性については報告されていない。そこで、本研究では、臨床的に呼吸器病を示した黒毛和種子牛の血清中の生化学性状を調査した。

2. 材料と方法

本研究は、鹿児島県内の1農場で実施された。供試牛は黒毛和種去勢子牛20頭で、Galyeanら⁷⁾の報告に準じ、直腸温39.7℃以上、鼻汁、発咳、活力低下などにより臨床的に呼吸器病症状を示した子牛を呼吸器病群 (n=10)、臨床的に健康であった子牛を対照群 (n=10) として区分した。供試牛の月齢は6~8ヵ月齢であり、呼吸器病群および対照群の平均月齢はそれぞれ7.4±0.9 (平均±SD)、7.6±0.9ヵ月齢であった。呼吸器病群および対照群の平均体重はそれぞれ、220.1±22.5 (平均±SD)、238.4±29.5kgであった。また、すべての供試牛は調査前に局所あるいは全身的な薬剤の投与を受けておらず、下痢等の疾病の発生もなかった。供試牛は、1日あたり濃厚飼料(びかいち、南日本くみあい飼料、鹿児島)を5kg、チモシー1kg、稲ワラ1kgが給与され、日本飼養標準⁸⁾およびNRC飼養標準⁹⁾に満たした飼養給与が行われていた(表1)。呼吸器病群の子牛は呼吸器病発症日に、頸静脈より血清分離用真空採血管(ベノジェクトII VP-S100K, テルモ, 東京)、およびEDTA-2AK添加、一般血液検査用真空採血管(ベノジェクトII VP-TK052K, テルモ, 東京)を用いて採血された。対照群の子牛も同様に

表1 給与飼料中の成分(乾物中)

粗タンパク	(%)	13.7
可消化養分総量	(%)	66.4
中性デタージェント繊維	(%)	34.8
非繊維炭水化物	(%)	38.2
粗脂肪	(%)	2.5
Ca	(%)	0.58
P	(%)	0.48
Mg	(%)	0.22
K	(%)	1.12
Na	(%)	0.30
Cl	(%)	0.46
Zn	mg/kg	65

採血された。血清分離用採血管は採血後、遮光下で2~3時間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。白血球数は採血後2時間以内に、自動血球計算機(Sysmex, pocH-100i, 東京)を用いて測定された。血清中のアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)、γ-グルタミルトランスフェラーゼ(GGT)、尿素窒素(UN)、クレアチニン(Cre)、総タンパク(TP)、アルブミン(Alb)、総コレステロール(T-Chol)、トリグリセリド(TG)、遊離脂肪酸(FFA)、βヒドロキシ酪酸(βHB)、カルシウム(Ca)、無機リン(iP)、マグネシウム(Mg)および亜鉛(Zn)濃度については自動分析装置(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。血清グロブリン(Glb)値は、TP値からAlb値を引いて求めた。

得られたデータは平均±標準偏差で示し、群間の比較をStudent's-T検定により行った。いずれも5%未満の危険率を有意な差とした。

3. 結果と考察

臨床所見および白血球数を表2に示した。呼吸器病群の体温および呼吸数は、対照群と比較し有意に高かった(P<0.01, P<0.01)。血清生化学検査値を表3に示した。呼吸器病群の血清Zn濃

表2 臨床所見および白血球数

	対照群 (n=10)	呼吸器病群 (n=10)
体温 (°C)	39.1±0.7	40.5±0.3**
心拍数 (/分)	101.4±11.1	103.2±9.6
呼吸数 (/分)	36.4±1.7	51.2±3.0**
白血球数 (/μl)	9090±2483	10410±2685

数値は平均±標準偏差。群間の有意差：** $P<0.01$ 。

表3 各群の血清成分値

	対照群 (n=10)	呼吸器病群 (n=10)
TP (g/dl)	6.2±0.3	6.3±0.3
Alb (g/dl)	3.2±0.2	3.1±0.3
Glb (g/dl)	3.0±0.2	3.2±0.3
A/G	1.1±0.1	1.0±0.2
UN (mg/dl)	11.6±1.3	9.8±3.2
Cre (mg/dl)	0.8±0.1	0.8±0.1
T-Cho (mg/dl)	106.5±35.3	92.6±26.1
TG (mg/dl)	15.2±3.3	13.0±5.5
AST (IU/l)	56.3±10.1	53.4±9.5
GGT (IU/l)	16.7±3.9	18.8±3.0
CK (IU/l)	197.0±52.3	183.0±53.5
FFA (μEq/l)	106.0±46.2	103.0±49.2
βHB (μmol/l)	601.5±130.3	516.0±167.0
Ca (mg/dl)	10.0±0.2	10.0±0.3
iP (mg/dl)	8.5±0.7	7.9±0.6
Mg (mg/dl)	1.9±0.2	1.9±0.3
Zn (μg/dl)	106.7±8.0	68.1±17.9**

数値は平均±標準偏差。群間の有意差：** $P<0.01$ 。

度は対照群と比較し有意に低値であった ($P<0.01$)。その他の項目については有意な差は認められなかった。

本研究において、呼吸器病群の血清亜鉛濃度は対照群と比較し有意な低値であった。対照群の血清亜鉛濃度は参照値内 ($80-120 \mu\text{g/dl}$) であった¹⁰⁾。一方、呼吸器病群では、飼料給与量は飼養基準を満たしていたにも関わらず、血清亜鉛濃度は、基準値未満であった。亜鉛は抗酸化作用を有し、フリーラジカル形成を防ぐ作用があるとされている^{3, 11)}。血液中の亜鉛濃度は、これまで酸化ストレスにより消費され、炎症状態で減少すると報告されている^{3, 6, 11)}。ヒトにおいて、呼吸器病は炎症や酸化ストレスを引き起こし、ホメオスタシス変化させて、血液中の亜鉛濃度を減少させる

と報告されている^{2, 5)}。また、ヒトにおいては血液中の亜鉛濃度が低い状態では呼吸器病の発症のリスクが高いと報告されている^{12, 13)}。本研究において、呼吸器病群の血清亜鉛濃度は低値であったが、その要因として、呼吸器病群の子牛は、呼吸器病群の子牛には発熱などがみられたことから、炎症状態であったために血液中の亜鉛は消費され、血清亜鉛濃度が減少した、あるいは、なんらかの理由で呼吸器病発症前にすでに亜鉛濃度が低値であった可能性が考えられた。本研究では、呼吸器病起因病原体の検出は行っていないが、本研究の結果から、呼吸器病症状を示している子牛は、健康子牛と比較し血清亜鉛濃度は低い状態であることが示唆された。今後、呼吸器病症状を示す子牛に対する血清亜鉛濃度減少の機序を明らかにするとともに、ヒトにおいては、呼吸器病患者に亜鉛を経口投与すると治療日数が減少したという報告があることから¹⁴⁾、血液中の亜鉛濃度が減少している呼吸器病子牛に対して、亜鉛を添加することにより、血液中の亜鉛濃度が改善され、呼吸器病治療に効果があるか検討する必要があると考えられた。

4. 要 約

黒毛和種子牛における呼吸器病の血液生化学性状の調査を行った。供試牛は、鹿児島県内の1農場において飼養されていた去勢子牛20頭で、体温 39.7°C 以上、鼻汁および発咳など呼吸器病症状を示した初診日の子牛10頭を呼吸器病群、臨床的に健康であった子牛10頭を対照群として比較した。その結果、血清アスパラギン酸アミノ基転移酵素、 γ -グルタミルトランスフェラーゼ、尿素窒素、クレアチニン、総タンパク、アルブミン、グロブリン、総コレステロール、トリグリセリド、カルシウム、リンおよびマグネシウム濃度の平均値は両群に有意な差は認められなかった。いっぽ

う、血清亜鉛濃度の平均値は、呼吸器病群68.1 $\mu\text{g}/\text{dl}$ 、対照群106.7 $\mu\text{g}/\text{dl}$ であり、呼吸器病では対照群と比較して有意に低値であった ($P < 0.01$)。また、呼吸器病の血清亜鉛濃度は、参照値80~120 $\mu\text{g}/\text{dl}$ を下回る値であった。これらの結果から、呼吸器病症状を呈した黒毛和種子牛は、血清亜鉛濃度が低下している可能性が示唆された。

文 献

- 1) Bryson, D. G. : Calf pneumonia, *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **1**, 237~257, 1985.
- 2) Shakur, M. S., *et al.* : Zinc status in well nourished Bangladeshi children suffering from acute lower respiratory infection, *Indian Pediatr*, **41**, 478~481, 2004.
- 3) Spears, J. W. : Micronutrients and immune function in cattle, *Proc Nutr Soc*, **59**, 587~594, 2000.
- 4) Stefanidou, M., *et al.* : Zinc : a multipurpose trace element, *Arch Toxicol*, **80**, 1~9, 2006.
- 5) Ibraheem, R. M., *et al.* : Serum zinc levels in hospitalized children with acute lower respiratory infections in the north-central region of Nigeria, *Afr Health Sci*, **14**, 136~142, 2014.
- 6) Naresh, R., *et al.* : Zinc, copper, and cobalt concentrations in blood during inflammation of mammary gland in dairy cows, *Asian Australasian J Anim Sci*, **14**, 564~566, 2001.
- 7) Galyean, M. L., *et al.* : Effects of arrival medication with tilimicosin phosphate on health and performance of newly received beef cattle, *J Anim Sci*, **73**, 1219~1226, 1995.
- 8) 日本飼養標準・肉用牛, 農業・食品産業技術総合研究機構編, 2008年版, 中央畜産会, 東京, 2008.
- 9) Nutrient requirements of beef cattle, National Research Council ed, National Academy press, Washington, 2000.
- 10) Radostits, O. M., *et al.* : Disease associated with nutritional deficiencies. pp1698-1770. In : *Veterinary Medicine, 10th ed. A Textbook of the Diseases of Cattle, Horses, Sheep, Pigs and Goats*. Saunders Ltd, London, 2007.
- 11) Galyean, M. L., *et al.* : Interaction of cattle health/immunity and nutrition, *J Anim Sci*, **77**, 1120~1134, 1999.
- 12) Meydani, S. N., *et al.* : Serum zinc and pneumonia in nursing home elderly, *Am J Clin Nutr*, **86**, 1167~1173, 2007.
- 13) Shakur, M. S., *et al.* : Zinc status in well nourished Bangladeshi children suffering from acute lower respiratory infection, *Indian Pediatr*, **41**, 478~481, 2004.
- 14) Mahalanabis, D., *et al.* : Randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial of the efficacy of treatment with zinc or vitamin A in infants and young children with severe acute lower respiratory infection, *Am J Clin Nutr*, **79**, 430~436, 2004.

難培養性乳酸菌を用いた第3世代サイレージ添加剤の開発

Development of third-generation silage inoculant using difficult-to-culture lactic acid bacteria

西野直樹

(岡山大学大学院環境生命科学研究科)

Naoki Nishino

(Graduate School of Life and Environmental Science, Okayama University)

To examine potential as a third-generation silage inoculant, antimicrobial activity, inoculation effects on whole crop corn silage, and survival in the cow gut of *Lactobacillus acetotolerans* and *Lactobacillus pontis* were examined. A number of bacteria and fungi associated with aerobic spoilage of silage were tested as the undesirable target and inoculation study was performed with single and combined addition of *L. acetotolerans* and *L. pontis*. A practical survey was made to determine survival in the gut; samples of silage and feces were collected from a total of thirty silage-fed cows at six farms. Detection and identification of *L. acetotolerans*, *L. pontis*, and other bacteria were performed by denaturing gradient gel electrophoresis and quantitative real-time PCR.

In the soft-agar overlay assay, *L. acetotolerans* demonstrated inhibitory activity against *Aspergillus fumigatus* and *Bacillus subtilis*, and *L. pontis* inhibited *A. fumigatus*. The inhibitory activity of *L. acetotolerans* was also seen in the inoculation study with whole crop corn silage; aerobic spoilage was suppressed by single addition of *L. acetotolerans* and the effect of spoilage inhibition was greatly enhanced by combined use of *L. acetotolerans* and *L. pontis*. Survival of *L. acetotolerans* in the cow gut was well demonstrated by the practical survey, because *L. acetotolerans* DNA was detectable at any farms for both silage and feces samples. However, despite that *L. acetotolerans* was present at 10^6 cfu/g level in silage, the population in feces was as low as 10^4 cfu/g level; hence, it appeared difficult to exert health-promoting effect of *L. acetotolerans*, if any, through providing inoculated silage to dairy cows.

1. 目的

サイレージ化（発酵貯蔵）は自給飼料の主要な貯蔵形態であり、牧草、飼料作物、食品副産物など多種多様な飼料素材が、ロールバール、バンカー、トランスバッグなど様々なサイロに密封・

貯蔵されている。サイレージ生産者の約5割は乳酸菌製剤を使用しており、効果が大きい新製品への期待およびその普及性は非常に高い。第1世代の乳酸菌製剤は、貯蔵中の栄養素損失と有害微生物の生育を抑える目的で開発され、ホモ発酵型乳酸菌の選抜によって技術的に見ればそれらの取組

みはほぼ終了した。一方、開封後の好気的変敗や長期貯蔵時のカビ発生は、関連技術が進化した現代の方が解決困難になっている。ロールペールは強く予乾した低水分材料を用いることが多く、十分な圧密が困難なこともあって、好気性細菌、酵母およびカビが生育しやすい。バンカーサイロは細断した高あるいは中水分材料を用いるが、サイロ上部から微量の空気が侵入しやすく、開封後は取り出し面すべてが空気にさらされる。当然、酵母やカビの増殖リスクは大きく、特に高エネルギー飼料のトウモロコシWCSでは好気的変敗が起こりやすい。空気の存在下で乳酸を代謝する細菌、酵母およびカビは多く、乳酸優勢のいわゆる良質サイレージは開封後かえって好気的変敗を起こしやすい。第1世代の添加剤開発では、乳酸生成をいかに促進するかがキーポイントとされたが、酵母やカビを抑える第2世代では、発想の転換ならびに新技術の開発が必要である。現在、*L. buchneri*という1菌種が第2世代の乳酸菌製剤として普及している。多量の酢酸を生成するヘテロ発酵型菌種であり、関係者の誰もがさらなる改良および機能強化を求めている。

研究代表者らは、サイレージの貯蔵特性と細菌フローラを調べ、それらを品質制御に応用する研究を継続的に行ってきた。実規模サイロの実態調査も続けており、サイレージ乳酸菌の腸内生残性を評価する研究も行っている。それらの取組みの中で、これまでサイレージから分離されたことがない*L. acetotolerans*や*L. pontis*が、乳牛腸内で高い生残性を示すことを明らかにした。これらの乳酸菌を分離することにも成功しており、有用乳酸菌をサイレージ調製過程で増菌し、動物の疾病予防および健康増進につなげるという、第3世代の添加剤開発に向けた研究の準備が整ってきた。本研究では、上記2菌種を中心に、第2世代に求められる好気的変敗抑制作用の確認と作用機序の解

明および腸内生残性に関わる微生物学的解析を行った。

2. 方法

2.1 好気的変敗抑制作用の確認と機序解明

*L. acetotolerans*と*L. pontis*の純粋培養物を用い、*Aspergillus fumigatus*, *Bacillus subtilis*, *Acetobacter pasteurianus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*および*Candida krusei*に対する抗菌作用をソフトアガー重層法で調査した。*B. subtilis*と*A. pasteurianus*は真菌ではないが、好気的変敗を起こしたイネ科牧草サイレージおよびトウモロコシWCSにしばしば認められる。*P. anomala*と*C. krusei*を抑制する乳酸菌は世界的にもほとんど例がなく、*L. acetotolerans*と*L. pontis*にその作用が認められれば、新規添加剤候補としての優位性が際立つと考えた。なお、*A. fumigatus*, *B. subtilis*および*A. pasteurianus*に抑制効果を示せば、第2世代添加剤としての評価は十分可能である。

*L. acetotolerans*と*L. pontis*の好気的変敗抑制効果は、トウモロコシWCSを材料としてパウチサイロで評価した。MRS培地で*L. acetotolerans*と*L. pontis*を培養し、滅菌生理食塩水で洗浄した乳酸菌を 10^5 cfu/gレベルで添加して、2ヶ月間室温で保存した。開封後、発酵生成物と細菌フローラを調べるとともに、一部のサイレージを1週間空気にさらして好気的変敗試験を行った。

2.2 腸内生残性の評価

トウモロコシWCSを生産および給与している酪農家計6件を訪問し、サイレージと糞便(直腸糞)を採取した。いずれもバンカーサイロでトウモロコシWCSを生産しており、TMR中の混合割合(DM当たり)は20~40%であった。サイレージは代表的サンプルを、糞便は乳牛5頭から採取した。

細菌フローラの解析は、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法 (DGGE) とリアルタイムPCR (qPCR) で行った。市販キット (DNeasy Blood & Tissue Kit および QIAamp DNA Stool Mini Kit) を用いて細菌DNAを精製し、16S rRNA遺伝子のV3領域を対象とするユニバーサルプライマーを用いたDGGEおよびnested-PCRを応用した*Lactobacillus* 特異的DGGEを行った。主要なDNAバンドを切り出してTAクローニングを行い、DNAの塩基配列を測定してBLASTによる菌種同定を行った。

qPCRは全細菌と*L. acetotolerans*を対象として行い、全細菌数の推定には*E. coli*の16S RNA遺伝子を含むプラスミドを、*L. acetotolerans*の推定には*L. acetotolerans*の16S rRNA遺伝子を含むプラスミドを用いた。*L. pontis*のqPCRも試みたが、*L. pontis*だけを検出するプライマーが設計できなかった (Fig. 1)。

3. 結果と考察

*L. acetotolerans*は*A. fumigatus*と*B. subtilis*に対して抗菌活性を示したが、*A. pasteurianus*, *S. cerevisiae*, *P. anomala*および*C. krusei*を抑制しなかった。また、*L. pontis*は*A. fumigatus*にのみ抗菌活性を示した。*P. anomala*と*C. krusei*に抗菌活性を示せば強力な変敗抑制効果が期待できるが、*L. acetotolerans*と*L. pontis*のいずれもそれらを抑制することはなかった。一方、*L. acetotolerans*の培養上清を濾過滅菌してアガーウエル拡散法で抗菌活性を調べたところ、*A. fumigatus*と*B. subtilis*に対する抗菌活性はいずれも見られなくなった。機序解明の試みは現在も続けており、*L. acetotolerans*がフェニル乳酸を生成することは確認できている。抗菌活性の測定法を改良するなどして、機序解明を進めたい (Fig. 2)。

トウモロコシWCSへの添加効果は、*L. acetotolerans*単独でも認められたが、*L.*

*acetotolerans*と*L. pontis*を混合添加すると (Fig. 1のLA+LP)、好気的変敗に伴う発熱が開封後1週間まったく観察されなくなった。*L. pontis*の単独添加はまったく効果がなく、開封後2日以内にサイレージは発熱して変敗した。細菌フローラを調べたところ、*L. acetotolerans*および*L. pontis*の添加に関わらず、*Weissella cibaria*, *L. plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Lactococcus lactis*といった多様な乳酸菌が確認された。*L. acetotolerans*はこれらと共存する形で検出されたが、*L. pontis*は変敗抑制効果を示した*L. acetotolerans*との混合添加でもそのDNAを確認することはできなかった。好気的変敗を起こした無添加および*L. pontis*添加サイレージでは*Bacillus* sp.および*Paenibacillus* sp.が検出されたが、*L. acetotolerans*を添加したサイレージではそれらが見られず、抗菌活性の情報が反映された結果となった。

腸内生残性の評価で調べたトウモロコシWCSはすべて無添加で調製されていたが、いずれのサイレージにも*L. acetotolerans*が検出された。Farm 1, 2, 4 および 6 のサイレージには*L. pontis*も検出されており、トウモロコシWCSは*L. acetotolerans*と*L. pontis*が生育、生残しやすい飼料であると考えられた。*Lactobacillus fermentum*や*Lactobacillus amylolyticus*等、サイレージ中に存在する乳酸菌は必ずしも糞便まで到達しないと考えられたが、*L. acetotolerans*は安定して、*L. pontis*も多くの事例で糞便にも検出された (Fig. 3)。

qPCRで定量的な解析を行ったところ、サイレージ中の*L. acetotolerans*は 10^6 cfu/gレベルで全細菌数の100分の1程度であった。一方、糞便中の*L. acetotolerans*は 10^4 cfu/gレベルで全細菌数の10,000分の1程度に過ぎず、*Bacteroides* spp.や*Clostridium* spp.が優勢の牛腸内で健康増進効果を期待することは容易ではないと考えられた。*L. acetotolerans*を添加したトウモロコシWCSの給与

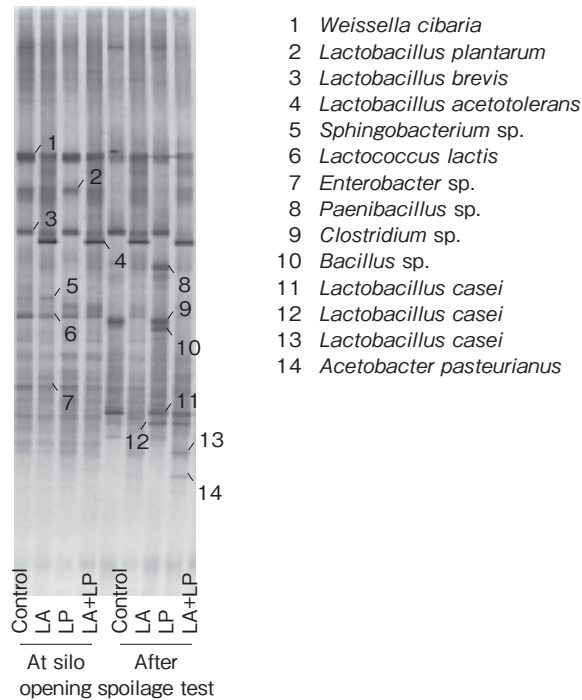


Fig. 1 Bacteria community of laboratory-scale whole crop corn silage inoculated with and without *Lactobacillus acetotolerans* (LA) and *Lactobacillus pontis* (LP). Silages were examined at silo opening and after aerobic exposure for seven days.

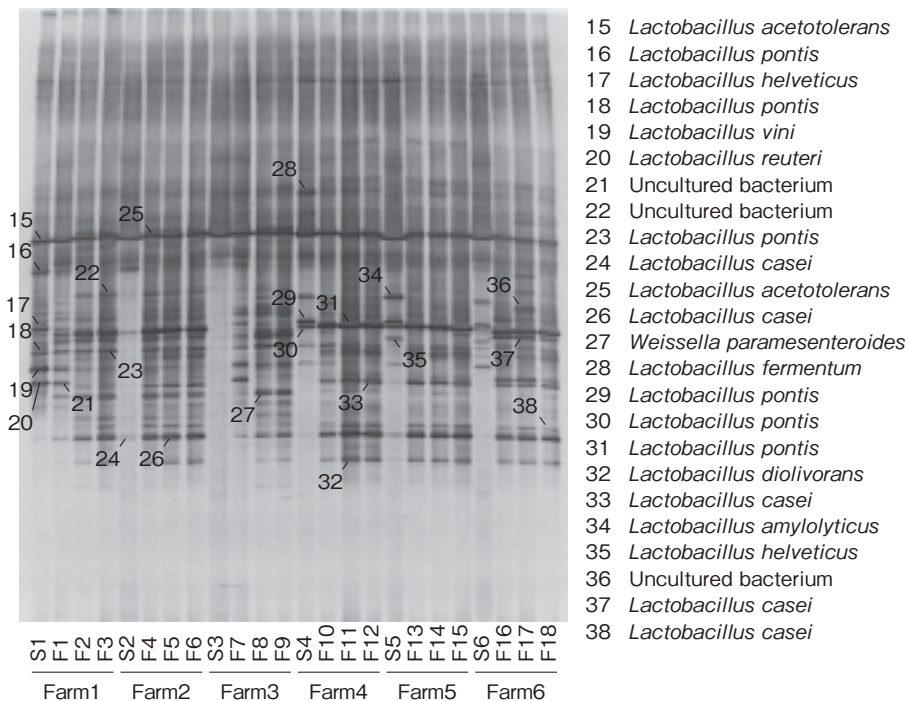


Fig. 2 Lactic acid bacteria communities of bunker-made whole crop corn silage and dairy cow feces from six farms. S and F indicate silage and fecal samples respectively.

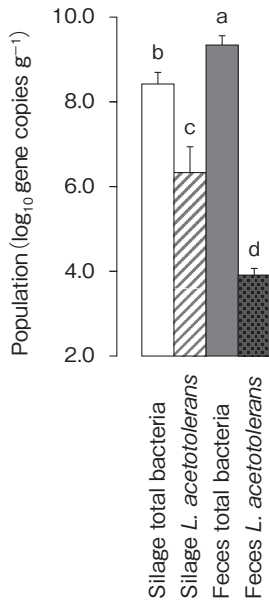


Fig. 3 Quantitative real-time PCR analysis for populations of total bacteria and *Lactobacillus acetotolerans* in whole crop corn silage and feces of silage-fed dairy cows. Columns indicate mean values for silage and feces with standard deviations represented by vertical bars.

試験は現在実施中であるが、サイレージ中の割合を高めても糞便で検出される *L. acetotolerans* のレベルを 10^6 cfu/g 以上にするには難しい。動物の疾病予防および健康増進につなげる第3世代の添加剤としては能力が十分でないが、候補のひとつ

であることは間違いなく、今後も選抜を続ける予定である。

4. 要 約

トウモロコシWCSから分離した *L. acetotolerans* および *L. pontis* を用い、サイレージの好気的変敗に関わる細菌および真菌に対する抗菌活性を測定した。トウモロコシWCSに単独および混合添加するサイレージ調製試験も行い、好気的変敗の抑制効果も検証した。腸内生残性はトウモロコシWCSを生産、給与する酪農家6件の実態調査で評価し、乳牛計30頭の糞便フローラを調べて *L. acetotolerans* と *L. pontis* の有無を調べた。

L. acetotolerans は *A. fumigatus* と *B. subtilis* に、*L. pontis* は *A. fumigatus* に抗菌活性を示した。*L. acetotolerans* の変敗抑制効果は単独添加でも確認されたが、*L. pontis* と混合添加すると抑制作用は顕著に高まった。腸内生残性の評価でも、*L. acetotolerans* は非常に優れた乳酸菌種であると判断された。ただし、サイレージ中に 10^6 cfu/g レベルで存在しても糞便には 10^4 cfu/g レベルでしか検出されず、牛腸内で優勢菌種となることは難しいと考えられた。

食肉由来病原体に対する腸管免疫に関与する血清 アミロイドAの機能解析

Biological characterization of serum amyloid A in intestinal
immunity against edible meat-borne pathogens

猪 島 康 雄

(岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)

Yasuo Inoshima

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Serum amyloid A (SAA) protein is known as the major acute phase protein, and as a precursor of amyloid A (AA) protein in AA amyloidosis, which is a serious complication of chronic diseases. SAA isoforms, such as SAA1, SAA2, SAA3, and SAA4, have been identified. Although the biological functions of SAA3 are not completely understood, recent studies suggested that SAA might play a role in host defense. Expression of SAA3 was increased in mouse colon surface in the presence of microbiota *in vivo*, and SAA3 increased mucin2 (MUC2) mRNA expression in the murine colonic epithelial cells *in vitro*. Mucin is the major component of the protective mucus barrier in the intestinal tract. However, it is not understood how SAA3 and other SAAs differ with respect to in the up-regulation of MUC2 expression.

This study aimed to identify the regions in amino acid sequence of SAA3 that influence MUC2 expression. For this, recombinant murine SAA1 (rSAA1), rSAA3, rSAA1/3, which was constructed from mature SAA1 (1-36 amino acids) and SAA3 (37-103 amino acids), and rSAA3/1, which was constructed vice versa as rSAA1/3, were obtained using *Escherichia coli*. The mRNA expression of MUC2 was measured in murine colonic epithelial CMT-93 cells treated with rSAA1, rSAA3, rSAA1/3, or rSAA3/1. Up-regulation of MUC2 mRNA expression was strongly stimulated by rSAA3 and rSAA3/1. Significant difference in protein structure was not expected among the four rSAAs. These results suggest that the region between 1-36 amino acids in SAA3 may be responsible for up-regulation of MUC2 expression.

1. 目 的

ヒトは食肉を介して様々な病原体を経口的に摂取するリスクに対し、生体内の免疫応答により感染の防御や病原体の排除を行っている。特に腸管に感染し下痢や出血を引き起こす病原体や腸管から取り込まれ全身に移行する病原体に対しては、

腸管の免疫応答が重要な役割を果たしている。腸管では抗菌物質の分泌や病原体に特異的なIgA抗体が産生されるほか、ムチンを主成分とする粘液が分泌され物理的な感染防御機能を発揮している。近年、Reigstadらによりマウス腸管上皮において血清アミロイドA (Serum amyloid A, SAA) ファミリーの一つであるSAA3が発現しているこ

と、無菌マウスではその発現が見られないことが報告され、SAA3が腸管上皮における免疫機構になんらかの関わりを有することが示唆された¹⁾。

SAAは、炎症時に血中濃度が通常の1,000倍以上増加する急性期タンパクの一つであり、鳥類を含めほとんどの動物に存在することが知られている²⁾。SAAはアミロイドの前駆タンパクとしても知られ、なんらかのきっかけにより立体構造が不溶性のアミロイドA (AA) に変換し、臓器や組織に凝集、沈着、蓄積すると臓器不全を引き起こしAAアミロイドーシス (ヒトでは厚生労働省が指定する難病の一つ) の原因となる³⁾。SAAにはアミノ酸配列の異なる複数のアイソフォームが知られており、マウスではSAA1~4のアイソフォームが存在する²⁾。しかし炎症時に血中濃度が増加するのは主にSAA1であり、さらに構造変換してアミロイドとなるのも主にSAA1である⁴⁾。一方、その他のアイソフォームの生物学的な機能や生体内での役割はいまだ明らかになっていない。我々は、腸管感染病原体である原虫、ウイルス、細菌として、トキソプラズマ、ロタウイルス、ブドウ球菌、大腸菌O-157をマウスの腸管上皮由来CMT-93細胞に添加すると、大腸菌O-157添加でのみSAA3のmRNA発現が特異的に上昇することを発見した⁵⁾。さらに大腸菌発現により作製した組換えSAA3を細胞に添加すると、ムチン2 (MUC2) のmRNA発現量が上昇することを明らかにし、SAA3が粘液ムチンの分泌を促進することで腸管免疫に関与していることを示唆した⁵⁾。そこで本研究では、SAA3のMUC2発現に関与するアミノ酸領域の同定を試みた。また、抗菌タンパク発現に対するSAA3の関与についても検討した。

2. 方法

2.1 組換えタンパク

マウスのSAA1 (GenBank accession No. BC087933) およびSAA3 (NM011315) 遺伝子情報をもとに、アミノ酸配列を変化させず塩基配列を大腸菌発現システムに最適化させたDNAフラグメントを合成した。合成したDNAをタンパク発現プラスミドpRSET A (Invitrogen) にクローニングし、大腸菌BL21 (DE3) pLysS (Invitrogen) にトランスフォーム後培養し、得られた発現タンパクをニッケルアフィニティーカラムで精製、透析、限外ろ過により濃縮し、組換えタンパクrSAA1およびrSAA3を作製した。またアミノ酸配列の前半 (36アミノ酸残基) をSAA1、後半 (67アミノ酸残基) をSAA3に組み換えたキメラタンパクrSAA1/3、およびその逆のrSAA3/1も作製した。作製した組換えタンパクは、DC Protein Assay Kit (Bio-Rad) により定量し、SDSポリアクリルアミド電気泳動後Coomassie

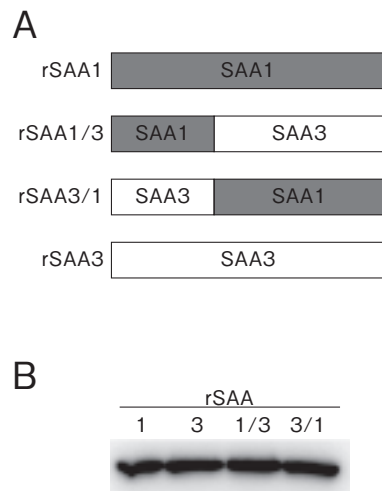


Fig. 1 Production of recombinant SAA (rSAA). (A) Scheme of construction of rSAA1 and rSAA3, and chimeric rSAA1/3 and rSAA3/1. (B) Detection of rSAAs by Western blot analysis using anti-Xpress tag antibody.

Brilliant Blue (CBB) 染色, および抗Xpressタグ抗体 (Invitrogen) を用いたウェスタンブロットニングにより確認した (Fig. 1)。

2.2 リアルタイムPCR

マウス腸管上皮由来CMT-93細胞 (ECACCから購入) にそれぞれのrSAAを添加し2時間後, RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いてトータルRNAを回収した。DNaseI処理後, cDNAを合成し, Fast SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) を用いてMUC2⁶⁾ および抗菌タンパクであるregenerating islet-derived III (REG III- γ ⁷⁾, α defensin (Def)⁸⁾, β Def-3⁹⁾, β Def-4⁹⁾, および内在性コントロールglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) のmRNAの発現をリアルタイムPCRで検出し, 相対発現量を $\Delta\Delta$ Ct法¹⁰⁾により定量した (Table 1)。

2.3 立体構造モデル解析

組換えタンパクrSAA1, 3, 1/3, および3/1の予想される立体構造をそれぞれのアミノ酸配列か

らSWISS-MODEL^{11, 12)}により解析し, PyMOL Molecular Graphics System Version 0.99rc9 (Schrödinger, LLC, NY, <http://www.pymol.org/>)によりグラフィック化した。

3. 結果と考察

CMT-93細胞においてrSAA無添加を基準としたMUC2のmRNA発現量は, rSAA3およびrSAA3/1の添加で顕著な上昇が見られた。一方, rSAA1およびrSAA1/3の添加では有意な上昇は見られなかった (Table 2)。SAA3がMUC2以外のタンパク発現にも関与している可能性を検討するため, 抗菌タンパクとして腸管で発現するREG III- γ , α Def, β Def-3, および β Def-4のmRNAについて解析したが, それぞれのrSAA添加による変化は見られなかったことから, SAA3はこれらの抗菌タンパク分泌には関与しないことが示唆された。以上の結果より, ムチン発現上昇に重要な領域はSAA3のN末端 (1~36のアミノ酸配

Table 1 Oligonucleotide primers used for real-time PCR

Target*	Sequence (5'-3')	Reference
MUC2 F	GCTGACGAGTGGTTGGTGAATG	Wlodarska <i>et al.</i> , 2011
MUC2 R	GATGAGGTGGCAGACAGGAGAC	
REG III- γ F	TTCCTGTCTCCATGATCAAAA	Cash <i>et al.</i> , 2006
REG III- γ R	CATCCACCTCTGTTGGGTTC	
α Def F	AAGAGACTAAAAGTGGAGGAGCAGC	Clarke <i>et al.</i> , 2004
α Def R	GGTGATCATCAGACCCAGCATCAGT	
β Def-3 F	CCTTCTCTTGCATTCTCCTGG	Rahman <i>et al.</i> , 2010
β Def-3 R	CATTTGAGGAAAGAACTCCACAA	
β Def-4 F	TCTTACATTTCTCCTGGTGTCTGCTG	Rahman <i>et al.</i> , 2010
β Def-4 R	TTGCTGGTTCTTCATCTTTTATCT	
GAPDH F	TGACCACCACCAACTGCTTAG	Shigemura <i>et al.</i> , 2014
GAPDH R	GGATGCAGGGATGATGTTTC	

*MUC2, mucin 2 ; REG III- γ , regenerating islet-derived III- γ ; Def, defensin ; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

Table 2 Relative mRNA expression of MUC2 in CMT93 cells by rSAAs

	Control	rSAA1	rSAA3	rSAA1/3	rSAA3/1
Mean relative mRNA expression level (\pm SD)	1	2.4 (\pm 0.9)	12.3 (\pm 2.9)	2.5 (\pm 1.7)	8.52 (\pm 0.9)
<i>P</i>		>0.05	<0.01	>0.05	<0.01

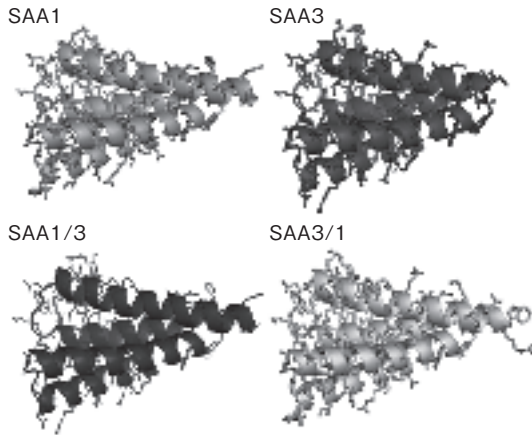


Fig. 2 Expected protein structures of rSAAs. One chain indicates structure of SAA monomer; the chains form tetramer. Right and left sides of the chains indicate the N- and C-terminals, respectively.

列)に存在すると考えられた。

rSAA1とrSAA3のアミノ酸配列の違いがタンパクの立体構造に大きく影響し、MUC2 mRNA発現の違いの原因となる可能性を考え、rSAAの予想される立体構造を解析したが、見かけ上のわずかな違いは見られるもののダイナミックな構造的な違いは見られなかった。rSAA1/3およびrSAA3/1の立体構造についても同様に大きな違いは見られなかったことから、MUC2 mRNA発現の上昇はSAA3タンパクの立体構造に起因するものではないことが示唆された (Fig. 2)。

合成ペプチドを用いた実験により、SAA3の24~38番目のアミノ酸残基が細胞表面のtoll-like receptor 4 (TLR4)/MD2複合体に結合するという報告がある¹³⁾。今後は、1アミノ酸ずつSAA1のアミノ酸に置換したSAA3を作製し、TLR4/MD2との結合性、TLR4の下流に存在するNF-κBの活性化、NF-κB活性化によるMUC2発現の増加、さらにはSAA3添加による各種サイトカインの動態についても解析し、SAA3が腸管免疫に果たす役割とそのメカニズムについても明らかにしていく予定である。

4. 要 約

血清アミロイドAタンパク (SAA) は鳥類を含め多くの動物に存在する急性相タンパクであり、AAアミロイドの前駆タンパクとしても知られている。SAAにはアミノ酸配列の異なる複数のアイソフォームが知られており、マウスではSAA1~4のアイソフォームが存在する。SAA3の生物学的機能はまだまだ明らかにされていないが、近年SAA3が細菌に対する感染防御に関与している可能性を示唆するデータが報告された。我々は、腸管感染病原体である原虫、ウイルス、細菌として、トキソプラズマ、ロタウイルス、ブドウ球菌、大腸菌O-157をマウスの腸管上皮由来CMT-93細胞に添加すると、大腸菌O-157添加でのみSAA3のmRNA発現が特異的に上昇することを発見し、組換えSAA3を細胞に添加すると、ムチン2 (MUC2) のmRNA発現量が上昇することを明らかにした。そこで本研究では、SAA3のMUC2発現に関与するアミノ酸領域の同定を試みた。また、抗菌タンパクとしてREG III-γ、ディフェンシンの発現に対するSAA3の関与についても検討し、SAA3の予想される立体構造についても解析した。大腸菌により組換えマウスSAA1 (rSAA1) とrSAA3を作製し、さらにSAA1の1~36番とSAA3の37~103番のアミノ酸配列からなるrSAA1/3、およびその逆からなるrSAA3/1を作製した。これらをCMT-93細胞に添加後、real-time PCRを用いて、MUC2や抗菌タンパクの発現をmRNAレベルで評価した。rSAA3とrSAA3/1は、rSAA1とrSAA1/3と比較して、MUC2のmRNAの発現を強く亢進した。いずれの抗菌タンパクについても各種SAA添加による発現の影響は見られなかった。4種類のSAAの立体構造に大きな違いは認められなかった。これらの結果から、MUC2mRNA発現の上昇には、

SAA3の1～36番までのアミノ酸配列内に重要な領域が存在していることが示唆された。

文 献

- 1) Reigstad, C. S., Lundén, G. O., Felin, J., Bäckhed, F. : *PLoS One*, **4**, e5842, 2009.
- 2) Uhlar, C. M., Whitehead, A. S. : *Eur. J. Biochem.*, **265**, 501～523, 1999.
- 3) Obici, L., Merlini, G. : *Swiss Med. Wkly.*, **142**, w13580, 2012.
- 4) Westermark, G. T., Fändrich, M., Westermark, P. : *Annu. Rev. Pathol.*, **10**, 321～344, 2015.
- 5) Shigemura, H., Ishiguro, N., Inoshima, Y. : *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 985～991, 2014.
- 6) Wlodarska, M., Willing, B., Keeney, K. M., Menendez, A., Bergstrom, K. S., Gill, N., Russel, S. L., Vallance, B. A., Finlay, B. B. : *Infect. Immun.*, **79**, 1536～1545, 2011.
- 7) Cash, H. L., Whitham, C. V., Behrendt, C. L., Hooper, L. V. : *Science*, **313**, 1126～1130, 2006.
- 8) Clarke, L. L., Gawenis, L. R., Bradford, E. M., Judd, L. M., Boyle, K. T., Simpson, J. E., Shull, G. E., Tanabe, H., Ouellette, A. J., Franklin, C. L., Walker, N. M. : *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **286**, G1050～G1058, 2004.
- 9) Rahman, A., Fahlgren, A., Sundstedt, C., Hammarström, S., Danielsson, Å., Hammarström, M. L. : *Clin. Exp. Immunol.*, **163**, 123～130, 2010.
- 10) Yuan, J. S., Reed, A., Chen, F., Stewart, C. N. Jr. : *BMC Bioinformatics*, **7**, 85, 2006.
- 11) Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., Schwede, T. : *Bioinformatics*, **22**, 195～201, 2006.
- 12) Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T. G., Bertoni, M., Bordoli, L., Schwede, T. : *Nucleic Acids Res.*, **42**, W252～W258, 2014.
- 13) Deguchi, A., Tomita, T., Omori, T., Komatsu, A., Ohto, U., Takahashi, S., Tanimura, N., Akashi-Takamura, S., Miyake, K., Maru, Y. : *J. Immunol.*, **191**, 1856～1864, 2013.

牛肉の各部位に含まれる機能性成分に与える品種の影響について

Effect of bleed on the functionality composition of beef

平山 琢二

(滋賀県立大学環境科学部)

Takuji Hirayama

(School of Environmental Science, University of the Shiga Prefecture)

In this examination, we studied the effect of breed (Wagyu, Holstein and F1) and region (ribulose and round) on the functionality composition of meat (36 head sample ; Wagyu : 11 head, Holstein : 13 head and F1 : 12 head). In fatty acid, myristic acid, palmitic acid, a stearic acid, a milli strain acid, palmitoleic acid, an oleic acid and a linoleic acid were detected. In amino acid, an aspartic acid, a glutamic acid, an asparagine, serine, a glycine, threonine, an alanine, lysine, proline, histidine, arginine, tyrosine, 2-amino-3-methylbutyric acid, methionine, a tryptophan, a phenylalanine, Iso leucine, a leucine, glutamine, carnosine, towering, anserine and a cystine were detected. In the meat of wagyu, hematin, oleic acid, sweetness, bitterness content was higher than other breed meat. From this result, there is a possibility of explaining the flavor and taste of Wagyu brand beef which is the worldwide brand. In future, it'll be necessary to consider the relation between the fattening period and the genetic polymorphism.

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を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、牛肉中に多量に含有されるが、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^{1~3)}。

いっぽう、牛肉は、部位によって脂質やタンパク質量など成分組成が大きく異なり、さらにそれらは品種によっても異なり、それらが食味などに影響を与えることが報告されている^{4,5)}。したがって、牛肉の成分について部位や品種の関連性について検討することで、消費者のニーズにマッチした牛肉生産が促進されるものとする。

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部位の関連性について検討し、成分組成や牛肉に含まれる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、国内で肥育された市販の黒毛和種去勢牛11頭、ホルスタイン去勢牛13頭およびF1去勢牛12頭の合計36頭の牛肉（いずれもリブローズ部位およびモモ部位）を供試した。サンプル牛肉は、サンプル採取後、分析に供するまで-30℃下で保存した。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（アスパラギン、グルタミン酸、アスパラギン酸）、甘み成分（プロリン、アラニン、トレオニン、グリシン、セリン）、苦

み成分（リジン、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、トリプトファン、メチオニン、バリン、チロシン、アルギニン、ヒスチジン）および機能性成分（アンセリン、カルノシン-タウリン、ベータアラニン、グルタミン）に分けて検討した。

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含量を示した。肉中に含まれるカルニチン割合は、和牛、ホルスタインおよびF1間で有意な差は認められなかった。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。今回はいずれの品種も去勢であったことから、品種間差がみられなかったものと考えられる。しかし、その一方で和牛とF1ではリブローズ部位に比べモモ部位でカルニチン含量が高くなる傾向が認められた。ホルスタインでは逆にリブローズ部位に比べモモ部位で低くなる傾向がみられた。



Fig. 1 Carnitine content of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose and round)

Fig. 2 にサンプル肉中に含まれるヘム鉄割合を示した。ヘム鉄割合は、和牛肉がホルスタインおよびF1牛肉に比べ高くなった。また、和牛肉とF1牛肉では、リブローズ部位に比べモモ部位でその割合が高くなる傾向にあり、ホルスタイン牛肉では、その逆の傾向を示した。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肉やホルスタイン肉よりも多くのヘム鉄が含まれている可能性が示唆された。また、部位による含量の差は、品種によって異なる可能性も示唆された。

Fig. 3 およびFig. 4 にサンプル肉中に含まれる脂肪酸組成を示した。いずれの牛肉においても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、オレイン酸はいずれの部位においても和牛肉がホルスタインおよびF1肉に比べ高くなる傾向にあった。パルミチン酸は、逆に品種間の差よりもむしろ部位による違いが認められた。すなわち、リブローズ部位に比べモモ部位で、その割合が高くなる傾向がみられた。ステアリン酸は、パルミチン酸と同様に、リブローズ部位に比べモモ部位で高くなる傾向が認められたが、モモ部位では、品種間差も認められた。すなわちモモ部位におけるステアリン酸割合は、ホルスタイン肉が最も高く、次いでF1、和牛肉の順となった。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、いずれ

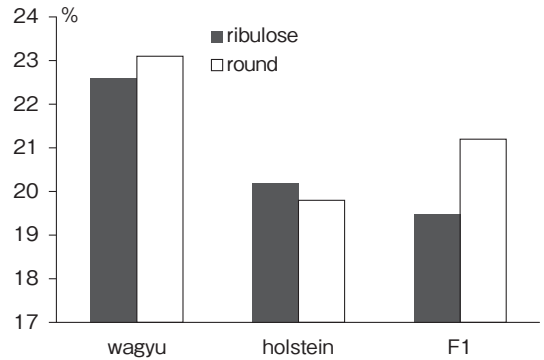


Fig. 2 Hematin content of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose and round)

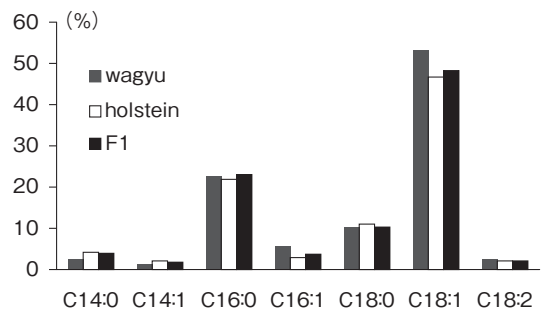


Fig. 3 Fatty acid composition of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose)

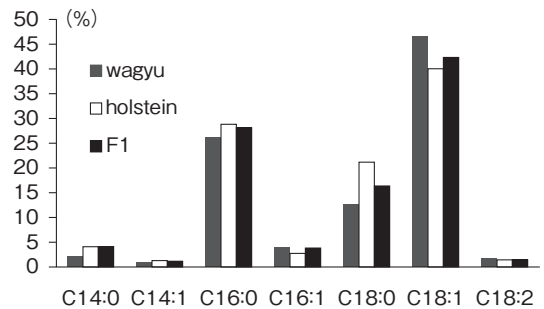


Fig. 4 Fatty acid composition of wagyu, holstein and F1 meat (round)

の部位においても和牛肉で最も高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うえで大変興味深い結果である⁶⁾。

Fig. 5 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、リブローズ部位に比べモモ

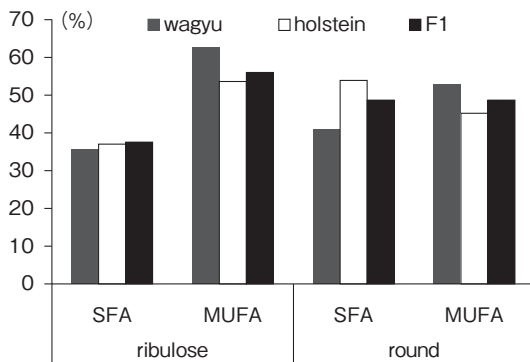


Fig. 5 SFA and MUFA content of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose and round)

部位で高くなる傾向にあり、リブローズ部位では品種間差がみられなかったが、モモ部位ではホルスタイン肉が最も高く、次いでF1、和牛肉の順となった。不飽和脂肪酸の割合は飽和脂肪酸割合とは逆にリブローズ部位がモモ部位に比べ高くなる傾向にあった。また、いずれの部位においても品種間差が認められ、和牛肉が最も高く、F1およびホルスタイン肉の順に低くなった。肉中の不飽和脂肪酸割合は、食味官能評価試験との関連性が高く、特に多汁性との関連性が示唆されている⁷⁾。一般的に和牛肉がホルスタイン肉やF1肉に比べ美味しいと評価される場合が多く、本調査において、和牛肉の不飽和脂肪酸割合が最も高かったこととの関連性が示唆され、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。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。またこれらの遺伝子発現には飼育期間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. 6 および Fig. 7 にサンプル肉中に含まれるアミノ酸組成を示した。いずれの牛肉サンプルに

においても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、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、さらに和牛肉が最も高く、次いでF1肉、ホルスタイン肉の順となった。また、牛肉の美味しさに関連の深いとされるグルタミン酸は、部位によって品種間差がみられ、モモ部位においては、和牛肉がホルスタイン肉やF1肉に比べ割合が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^{8,9)}。

Fig. 8 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、肉中に含まれる甘み成分および苦み成分割合は、いずれも部位においても和牛肉がホルスタイン肉やF1肉と比べて高くなった。また、機能性成分の割合では和牛肉が最も高く、次いでF1およびホルスタイン肉の順となった。牛肉の美味しさに関連する甘みおよび苦みの成分割合が和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ている¹⁰⁾。一方で、カルニチン含量では品種間差は認められず、部位間で差が認められており、筋肉組織の機能性の点から詳細な検討が必要であろう。

今回の調査では、和牛肉がホルスタインやF1肉に比べ、機能性成分やヘム鉄割合が高く、美味しさに関連の深いオレイン酸、さらに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、和牛ブランド肉の美味しさを説明できる

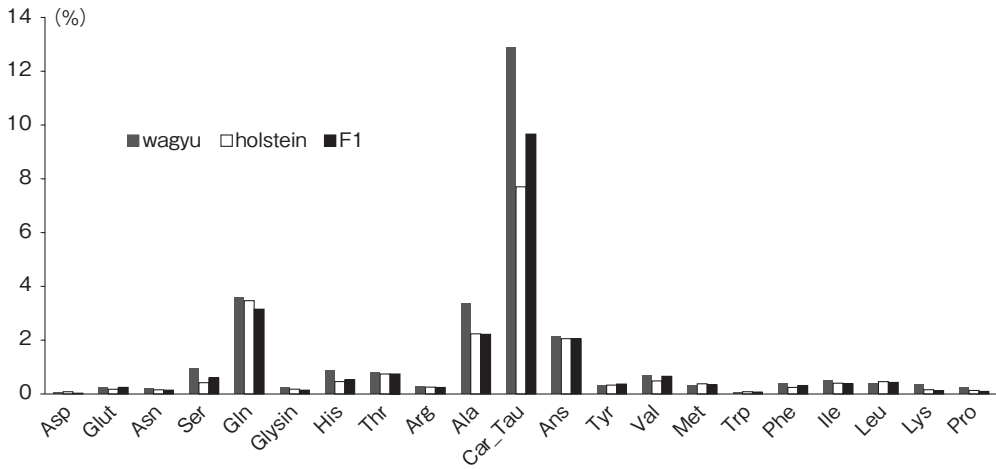


Fig. 6 Amino acid content of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose)

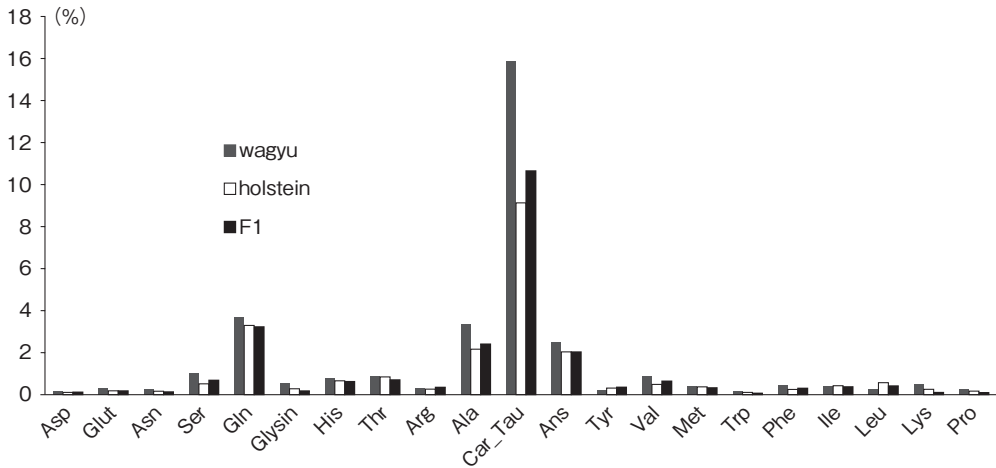


Fig. 7 Amino acid content of wagyu, holstein and F1 meat (round)

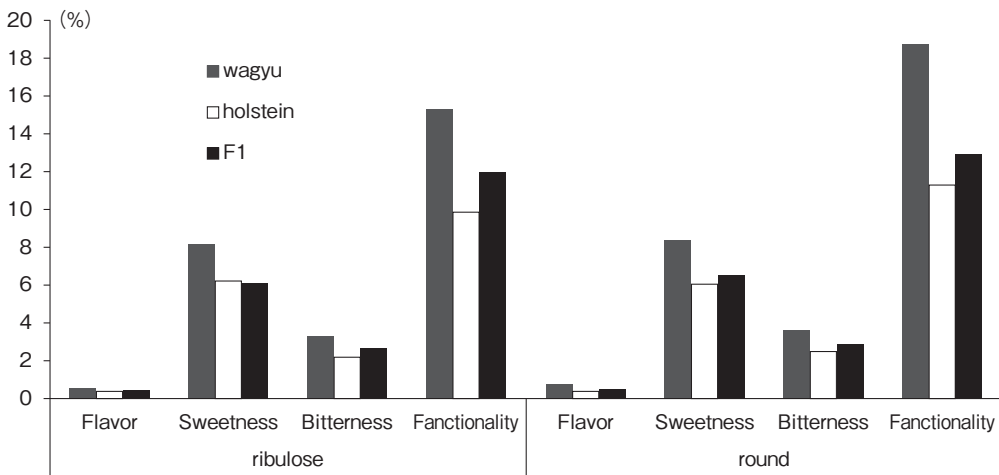


Fig. 8 Fancionality composition of wagyu, holstein and F1 meat (ribulose and round)

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、機能性成分の一つであるカルニチン含量が部位による差が、品種間による差よりも大きかったことについて、筋肉組織の機能面も含め今後詳細に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（アミノ酸、脂肪酸など）の牛肉中の含有量と品種や部位の関連性について検討することを目的とし、国内で肥育された市販の黒毛和種去勢牛11頭、ホルスタイン去勢牛13頭およびF1去勢牛12頭の合計36頭の牛肉（いずれもリブローズ部位およびモモ部位）を供試して、試験を実施した。和牛肉がホルスタインやF1肉に比べ、機能性成分やヘム鉄割合が高く、美味しさに関連の深いオレイン酸、さらに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、和牛肉の美味しさが成分組成や部位と大きく関連している可能性が示唆された。

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) 織田一恵, 岡幸宏: 黒毛和種去勢牛肉の脂肪含量の異なる部位での熟成効果の検討, 愛媛畜研セ研報, **2**, 35~42, 2014.
- 5) 平田祐介, 河原貴裕, 栗木隆吉: 機能性成分を生かしたジャージー生産物の付加価値向上技術の開発, 岡山総畜研報, **19**, 5~10, 2010.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) Hornstein, I., Crowe, P. E., Sulzbacher, W. L.: Constituents of meat flavor: beef, *J Agr, Food Chem*, **8**, 65~67, 1960.

同腹産仔間で成長が異なる仔豚の代謝特性比較

Analysis on the metabolic profiles between healthy and mal-development piglets in same littermates

塚原 隆 充

(京都府立大学大学院生命環境科学研究科)

Takamitsu Tsukahara

(Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University)

Retarded growth is one of the serious economic problems on swine industry and is caused by many factors such as infections and stresses. To date, no comprehensive analysis on metabolites of such piglets is conducted. In this study, we detected the metabolic abnormalities in plasma and muscle of piglets with colibacillosis or runt piglets using a metabolome inclusive analysis. Further a quantitative analyses of amino acids were performed to determine the metabolic disorder among amino acids.

Plasma and longissimus dorsi muscle were collected from 36-days-old LWD piglets ; healthy growing (n = 4) , mild colibacillosis (n = 4) , serious colibacillosis (n = 4) and runt (n = 4) piglets. Metabolome analysis was determined by gas chromatography mass spectrometry. The data were identified and analyzed using MetAlign software and AOutput2 software. Additionally, quantitative assay of amino acids was used ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. From these results, metabolic pathway differences were evaluated by MetaboAnalyst 3.0 software.

In plasma, many metabolomic pathways were differed among the groups; biotin metabolism, taurine and hypotaurine metabolism, pantothenate and CoA biosynthesis, and many amino acid metabolisms such as methionine, alanine, glycine, serine and threonine. Meanwhile, the pathways of ammonia recycling, protein biosynthesis, taurine and hypotaurine metabolism, and some amino acid metabolisms such as histidine metabolism and lysine degradation were altered in muscle among the groups. According to the quantitative analyses of amino acids, lysine concentration was drastically higher in the plasma of piglets with colibacillosis and runt piglets than those of healthy growing piglets; furthermore, lysine concentration was higher in the muscle of piglets with colibacillosis than those of healthy growing piglets.

Many metabolic pathways were altered by colibacillosis and retarded growth on weaned piglets. Particularly, colibacillosis or healthy but stunted piglets might be affected by the metabolic disorder of lysine.

1. 目 的

繁殖母豚は1回の分娩で約10頭の仔を娩出する。養豚経営の効率化のためには、分娩時体重やその後の発育ができるだけ揃うことが望ましいが、しばしば分娩時には極端に大きな仔や小さな仔が認められる。大きな仔はともかく、小さな仔はその後成長を挽回することは難しくいわゆる「ヒネ豚」になりがちである。

また、娩出時には比較的体重が同一である産仔も、その後の成長に差が出る場合がある。これは第一には感染症の関与が考えられる。とくに下痢または発咳などの臨床的な症状が確認できない不顕性感染は、増体の悪化のみが主徴として発現するため、養豚農家は特別な対処を行っていない。

これら出生時矮小仔豚および出生後発育不良仔豚は、離乳舎移動時または育成舎移動時に体重を目安に豚房を分けて飼育するケースが一般的であるが、給与する飼料は豚舎ごとにラインで管理されているため、同一飼料を摂取している。日本飼養標準ならびに飼料会社が販売する飼料設計は、元々発育が良好である豚にあわせて設計しているため、発育不良豚では栄養成分がマッチしていない可能性がある。

最近、マイコプラズマ性肺炎とインフルエンザとの混合感染時に特定のアミノ酸が血中で不足している事例が報告されており¹⁾、また特定のアミノ酸を強化した飼料を給与した豚に病原性大腸菌²⁾または豚繁殖障害・呼吸障害症候群ウイルス³⁾を感染させたところ成長改善が認められたという報告がある。これは疾病罹患時にはある種の栄養成分が不足するため、増体不良が起きる可能性を示唆している。以上のことから、出生時矮小仔豚および出生後発育不良仔豚もある種の栄養成分の不足が起こり、さらなる増体不良の悪循環に陥っている可能性がある。

近年、網羅解析の発達によって、生体の変化の全体像を捉えることが可能になった。本申請課題では、代謝物の網羅解析であるメタボローム解析を行うことで、出生時矮小仔豚および出生後発育不良仔豚と、発育良好豚での血液および筋肉での代謝変動の全体像を捉えることを目的とする。なお出生後発育不良仔豚は、大腸菌を感染させることで人為的に作成した。

本研究実施によって、『出生時矮小仔豚および出生後発育不良仔豚では発育良好豚と代謝が異なることを確認する』という重要な基盤情報を得ることができ、これらの基盤情報を活用することで、上記発育不良豚にある種の栄養成分を飼料中に添加することで、発育不良を改善させることが可能となるかもしれない。本成果によって、養豚農家の潜在的なコスト増加要因と考えられる発育不良仔豚の育成改善を行える可能性がある。

2. 方 法

2.1 動物の飼育

一般的な一貫経営の養豚場から、健康な、分娩予定日が同日の妊娠母豚3頭を導入した。導入は分娩前2週間とし、導入後は分娩ストール内に個体ごとに収容し、飼育した。母豚へは、分娩前から分娩、離乳を通して市販繁殖豚用飼料ブリーミールマキシム（フィードワン株式会社製）を推奨量給与した。

分娩予定日に分娩が揃うように、分娩前日に分娩誘発剤 α -クロプロステノール製剤（ダルマジン、共立）を用法用量どおり投与した。各豚とも正常な分娩を行い、母豚1から13頭、母豚2から11頭、母豚3から15頭の生存産仔を得た。産仔用の飼料は、剖検時（36日齢）までSDS No.1（フィードワン株式会社製）とし、7日齢以降餌付け飼料としても使用した。なお、飼料成分は既報のとおりである⁴⁾。21日齢で離乳を行った。こ

の中で、生時体重が小さく、その後の発育も不良であった4頭をヒネ豚群とした。また、良好な発育を示した仔豚の中で、剖検時まで健康にあった仔豚4頭を健常群とした。25日齢で、良好な発育を示した仔豚に病原性大腸菌を感染させた。感染の手法は既報のとおりとした⁵⁾。感染後、大腸菌症を発症したものの増体が健常対照群と変わらなかった群 (n = 4)、大腸菌症を発症し増体が著しく悪化した群 (n = 4) を設けた。剖検前日の17時から絶食させた。剖検は、ペントバルビタール麻酔後、開腹して腹部大静脈からヘパリン血を採取し、背最長筋を採取した。血液は速やかに遠心分離後、血漿を分取し、分析まで凍結保存した。

2.2 代謝物網羅解析

血漿50 μL に対し、内部標準物質である2-イソプロピルリンゴ酸5 μL および前処理液(メタノール:超純水:クロロホルム = 2.5 : 1 : 1)を添加しボルテックス後、暗所、37°C、1,200rpmの条件で30分間振盪した。その後、4°C、5分間、16,000 \times gで遠心分離し、上清225 μL を蒸留水200 μL と混合しボルテックス後、再び4°C、5分間、16,000 \times gの条件で遠心分離を行った。得られた上清250 μL を室温、真空下で20分間遠心濃縮を行い、-80°Cのディープフリーザーで凍結させた後、減圧乾固させた。その際余った上清をすべてのサンプルから等量ずつ混合し、クオリティコントロールとして用いた。完全に乾燥したことを確認し、メトキシアミン塩酸塩のピリジン溶液40 μL を添加しボルテックス後、暗所、30°C、1,200rpmの条件で90分間振盪した。さらにN-メチル-N-トリメチルシリルトリフルオロアセトアミドを20 μL 添加しボルテックス後、暗所、37°C、1,200rpmの条件で45分間振盪し、4°Cで10分間冷却し分析を行った。

背最長筋は液体窒素による凍結粉碎後、20mgを秤量し、2-イソプロピルリンゴ酸5 μL および前

処理液250 μL を添加しホモジナイズ処理を行い、37°C、1,200rpmの条件で30分間振盪した。その後、4°C、5分間、16,000 \times gで遠心分離し、上清180 μL を蒸留水200 μL と混合しボルテックス後、再び4°C、5分間、16,000 \times gの条件で遠心分離を行った。以降の手順は血漿と同様とした。分析にはGCMS-QP2010 Ultra (Shimadzu)を用い、カラムはInertCap 5MS/NP (GL Science)を使用した。カラム温度は、分析開始後2分間は80°Cに維持し、その後は1分につき15°Cのペースで330°Cまで加温し6分間維持した。インジェクション温度は230°C、ヘリウムガス流速は1 mL/min、ライン温度は250°C、イオン源温度は200°Cに設定した。得られたデータはMetAlign software (Wageningen UR) および AIOutput2 software⁶⁾を用いて解析し、内部標準物質のピーク面積に対する各物質のピーク面積の割合で示した。結果は後述のアミノ酸分析のものとあわせてMetaboAnalyst 3.0 software⁷⁾により統計解析を行うとともに、影響が大きいと予想される代謝経路を選別した。

2.3 アミノ酸分析

血漿に等量の0.4M過塩素酸を添加しボルテックス後、暗所、4°Cで30分間静置した。その後、0°C、20,000 \times gの条件で15分間遠心分離を行った。得られた上清100 μL に対しタンパク質構成アミノ酸の安定同位体混合液を5 μL 添加し分析を行った。

背最長筋には5容量の0.2M過塩素酸を加え、ビートビーダー (Tomy)を用いて3,000rpmの条件で30秒間破碎処理を行い、暗所、4°Cで30分間静置した。以降の手順は血漿と同様であった。分析にはACQUITY UPLC-MS/MS (TQD, Waters) およびIntradaカラム (Imtakt)を用いた。カラム温度は35°Cに設定した。グラジェント条件はバッファーA (アセトニトリル:テトラヒドロフ

ルラン：25mMギ酸アンモニウム：ギ酸 = 90：750：160：3）およびバッファーB（アセトニトリル：100mMギ酸アンモニウム = 1：4）を、A液100%（0-3 min）、A液100-83%（3-9 min）、A液0%（9-16min）に設定した。

3. 結果と考察

代謝パスウェイ解析の結果、健常対照群、大腸菌症軽度群、大腸菌症重度群およびヒネ豚群間に

おいて、血漿中成分ではビオチン代謝、タウリンおよびヒポタウリン代謝、パントテン酸およびCoA合成、メチオニン代謝、アラニン代謝、グリシン、セリンおよびトレオニン代謝、グルコース-アラニン回路、フェニルアラニンおよびチロシン代謝、イノシトール代謝、リジン分解、チロシン代謝、およびグルタチオン代謝が顕著に変化した (Fig. 1)。一方、背最長筋では、アンモニア再利用、タンパク質合成、タウリンおよびヒ

Metabolite Sets Enrichment Overview

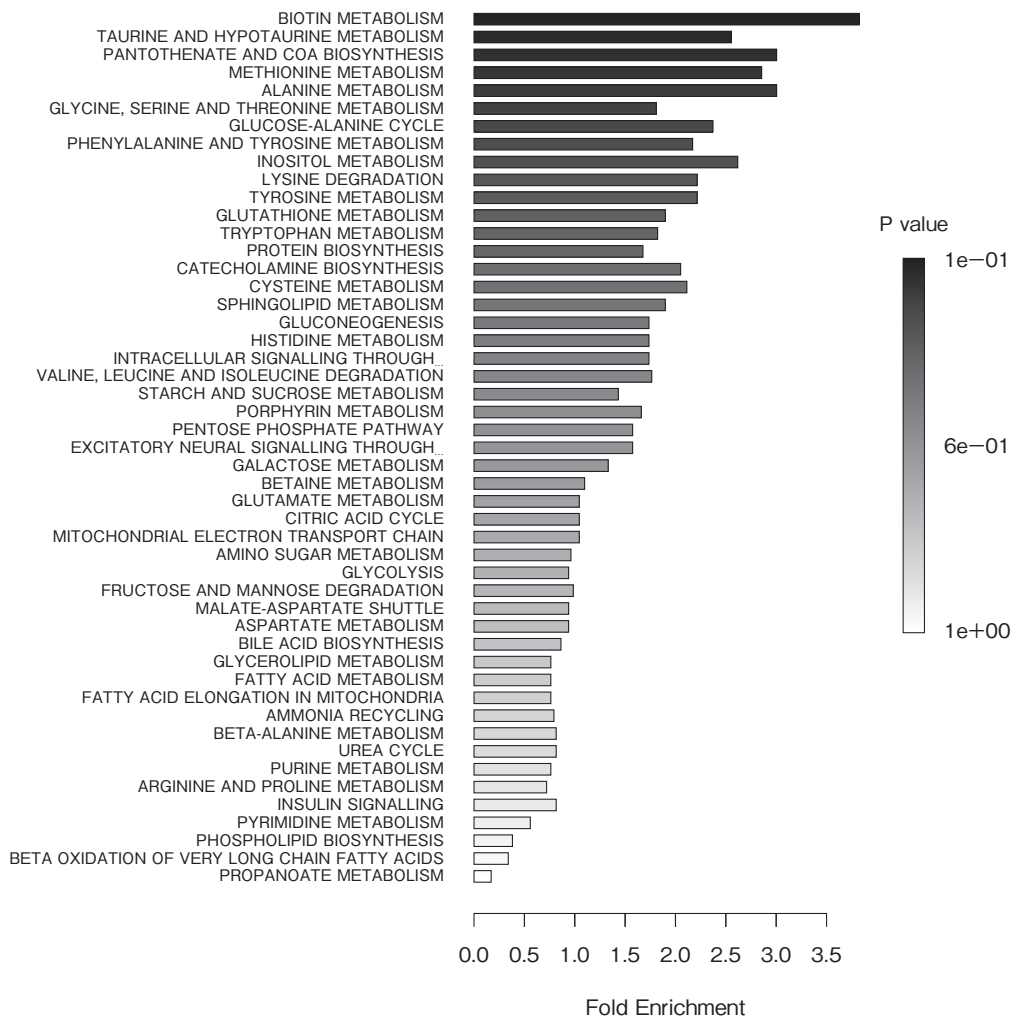


Fig. 1 MetaboAnalyst 3.0 softwareを用いた血漿における代謝パスウェイ解析結果

ポタウリン代謝, 胆汁酸生成, ヒスチジン代謝, リジン分解, ビオチン代謝, カテコールアミン合成, クエン酸回路, アミノ糖代謝, パントテン酸およびCoA合成, およびリン脂質合成が顕著に変化した (Fig. 2)。

遊離アミノ酸の定量分析の結果から, 血漿中の遊離リジン濃度 ($\mu\text{mol/L}$) は, 健常対照群の52.3に対し, 大腸菌症軽度群で135.9, 大腸菌症重度群で193.3, ヒネ豚群で154.8と, 健常対照群に対

しそれぞれ有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。背最長筋では ($\mu\text{mol/kg}$), 健常対照群で52.6, 大腸菌症軽度群で199.8, 大腸菌症重度群で436.8, ヒネ豚群で177.8と, 健常対照群に対し大腸菌症軽度および重度群が有意に高い値を示した。また背最長筋中遊離アルギニン濃度は ($\mu\text{mol/kg}$), 健常対照群で125.3, 大腸菌症軽度群で111.8, 大腸菌症重度群で250.1, ヒネ豚群で131.0と健常対照群に対し大腸菌症重度群が有意 ($p < 0.05$) に

Metabolite Sets Enrichment Overview

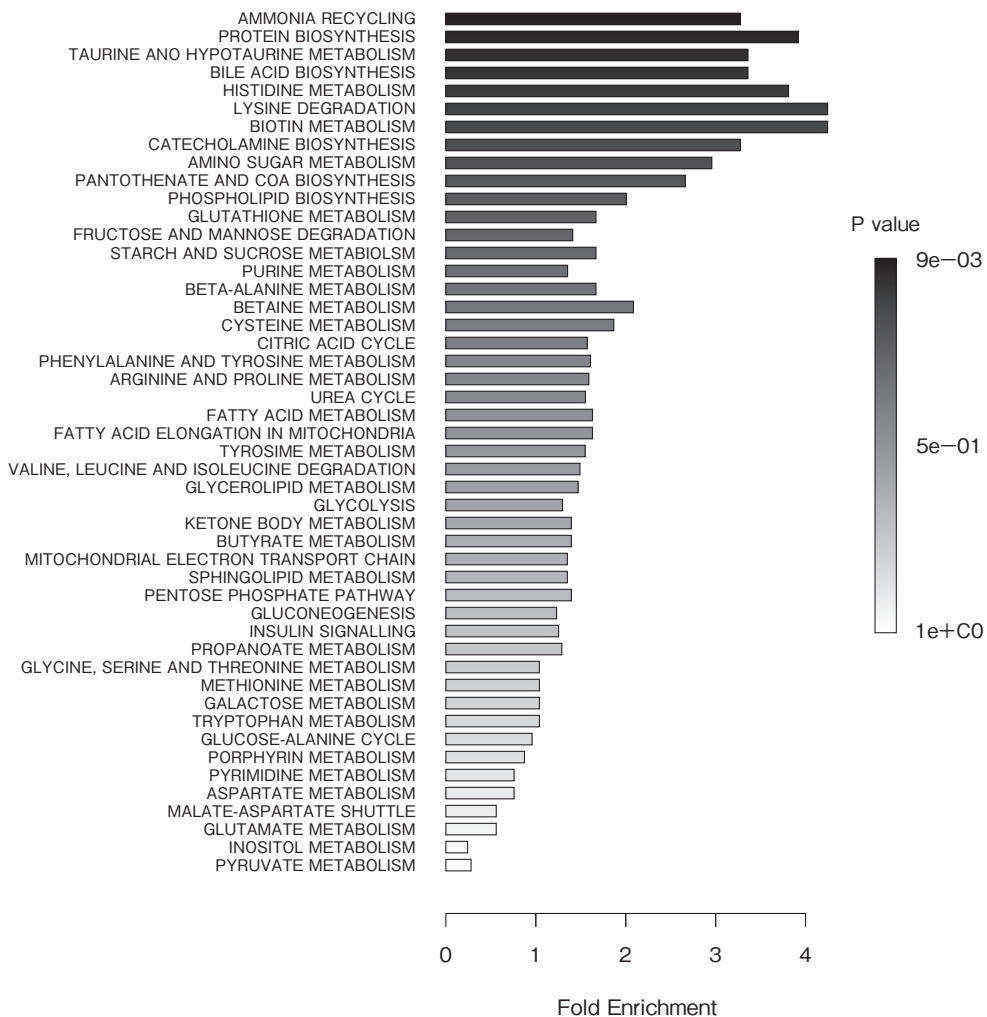


Fig. 2 MetaboAnalyst 3.0 softwareを用いた背最長筋における代謝パスウェイ解析結果

高い値を示した。背最長筋中遊離チロシン濃度は ($\mu\text{mol/kg}$)、健常対照群で53.1、大腸菌症軽度群で46.1、大腸菌症重度群で108.1、ヒネ豚群で82.9と健常対照群に対し大腸菌症重度群が有意 ($p < 0.05$) に高い値を示した。

以上の結果から、血漿および背最長筋におけるビオチン代謝、タウリンおよびヒポタウリン代謝、パントテン酸およびCoA生成、およびリジン分解の代謝経路は大腸菌症発症豚およびヒネ豚に共通して関わっている可能性が示唆された。これらの代謝経路の中で、リジン分解経路はアセチルCoAを介してクエン酸回路に関わるほかにも、ピペコリン酸経路に接続していることから生体内においてとくに重要な経路であると考えられる。したがって、大腸菌症発症豚およびヒネ豚はリジンの一次代謝が正常に行われず、その下流の代謝経路の活性も低下している可能性が示唆された。また、健常対照群および大腸菌症軽度群と比較すると、大腸菌症重度群は体内のアミノ酸恒常性が維持できていないことから、大腸菌症を発症し、増体に支障が認められる個体は、複数のアミノ酸代謝異常が発生している可能性が考えられた。

4. 要 約

疾病罹患やストレスによって起こる豚の発育不良は、養豚経営上深刻な問題である。これら発育不良豚の代謝に関する検討はこれまで行われてこなかった。本検討では、母豚3腹から娩出した仔豚を用い、発育不良による末梢血漿中および背最長筋中の代謝物を、代謝物網羅解析で比較した。また、アミノ酸に関する異常が多く認められたため、アミノ酸の定量解析もあわせて実施した。

36日齢の、健常発育豚 ($n = 4$)、大腸菌症軽度発症豚 ($n = 4$)、大腸菌症重度発症豚 ($n = 4$)、ヒネ豚 ($n = 4$) を剖検し、末梢血および背最長筋を採取した。末梢血からは血漿を分取し

た。血漿および筋肉の代謝物網羅解析はガスクロマトグラフィー質量分析計を用いて行った。得られたデータの解析は、MetAlign softwareおよびAInput2 softwareを用いた。また、パスウェイ解析は、MetaboAnalyst 3.0 softwareを用いて行った。さらに、アミノ酸濃度を定量解析した。解析はUPLC-MS/MSを用いて行った。

多くの代謝物パスウェイが、群間で変動した。血漿ではビオチン代謝、タウリンおよびヒポタウリン代謝、パントテン酸およびCoA生成、メチオニン代謝、アラニン代謝、グリシン、セリンおよびトレオニン代謝などが顕著に変化した。一方で背最長筋では、アンモニア再利用、タンパク質合成、タウリンおよびヒポタウリン代謝、ヒスチジン代謝、リジン分解などが顕著に変化した。アミノ酸定量解析の結果、血漿中のリジン濃度が大腸菌症およびヒネ豚群で健常対照群よりも有意に高値を示した。さらにリジン濃度は、筋肉中でも大腸菌症豚で健常対照群よりも有意に高値を示した。

多くの代謝物パスウェイが、発育不良時に変化した。とくに、発育不良時にはリジンの代謝異常が顕著になることが示唆された。

文 献

- 1) Le Floch, N., Deblanc, C., Cariolet, R., Gautier-Bouchardon, A. V., Merlot, E., Simon, G. : Effect of feed restriction on performance and postprandial nutrient metabolism in pigs co-infected with *Mycoplasma hyopneumoniae* and swine influenza virus, *PLOS ONE* 9, e104605, 2014.
- 2) Trevisi, et al. : A tryptophan-enriched diet improves feed intake and growth performance of susceptible weanling pigs orally challenged with *Escherichia coli* K88, *J. Anim. Sci.*, **87**, 148~156, 2009.
- 3) Oota, Y., Tsukahara, T., Fujieda, T. : Unique amino acid composition in plasma during porcine reproductive and respiratory syndrome virus viremia. Proceedings of "The 7th International Symposium on Emerging and Re-emerging Pig Diseases", Kyoto, Japan, 2015.

- 4) Tsukahara, T., Iwasaki, Y., Nakayama, K., Ushida, K. : Stimulation of butyrate production in the large intestine of weaning piglets by dietary fructooligosaccharides and its influence on the histological variables of the large intestinal mucosa, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **49**, 414~421, 2003.
- 5) Tsukahara, T., Nakanishi, N., Nakayama, K., Matsubara, N., Ushida, K. : Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathogenic characteristics in the intestine, *J. Vet. Med. Sci.*, **67**, 1167~1171, 2005.
- 6) Tsugawa, H., Tsujimoto, Y., Arita, M., Bamba, T., Fukusaki, E. : GC/MS based metabolomics : development of a data mining system for metabolite identification by using soft independent modeling of class analogy (SIMCA), *BMC Bioinformatics*, **12**, 131, 2011.
- 7) Xia, J., Sinelnikov, I., Han, B., Wishart, D. S. : MetaboAnalyst 3.0-making metabolomics more meaningful, *Nucl. Acids Res.*, **43** (W1), W251-7, 2015.

平成27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：

食肉に関する研究または調査（製造加工，食品の価値，家畜生産，飼料，疾病，食肉・食肉製品の流通など）

単位：千円

研 究 課 題	継続年数	代 表 研 究 者		助成金額
		代表者名	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（その2）	H.26～	増田 俊哉	大阪市立大学大学院生活科学研究科	1,000
ZnPP形成能を有する微生物の探索と応用		若松 純一	北海道大学北方生物圏フィールド科学センター	1,000
筋タンパク質の死後分解に与えるオートファジーの影響：プロテオーム解析を用いたアプローチ		仲西 友紀	宮崎大学農学部応用生物科学科	1,000
乳業用乳酸菌カルチャーを接種した発酵乾燥食肉製品の加工技術と特徴に関する研究		根岸 晴夫	中部大学応用生物学部	1,250
ミオシンの水溶化現象に関連する尾部領域の特定	H.26～	早川 徹	帯広畜産大学畜産衛生学研究部門	1,000
廃食肉中のタンパク質を用いた貴金属リサイクル技術の開発		丸山 達生	神戸大学大学院工学研究科	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（Ⅱ）—ヒポキサンチンによる呈味性発現機構—	H.26～	服部 昭仁	（一社）食肉科学技術研究所	1,300
鶏肉フライの加熱・保存過程におけるテクスチャーの決定要因と変化機構の解明		杉山 寿美	県立広島大学人間文化学部健康科学科	1,000
デジタルPCR法を用いた食肉加工品中におけるリステリア菌の迅速定量法の開発		高橋 肇	東京海洋大学学術研究院食品生産科学部門	1,000
メタボロミクス解析結果に基づく黒毛和種牛肉の美味しさに関わる指標の検証	H.26～	鈴木 啓一	東北大学大学院農学研究科	1,000
野生動物肉の加工利用のための技術開発：加工適性に及ぼす血絞りと塩漬法の効果		坂田 亮一	麻布大学獣医学部	750
ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その2）	H.26～	西村 敏英	日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科	1,000
畜産物由来ペプチドの肝障害改善の効果について		實安 隆興	神戸大学大学院農学研究科	1,000
肥満に伴う認知症の発症予防における豚肉摂取の効果		後藤 孔郎	大分大学医学部内分泌代謝膠原病腎臓内科学講座	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	H.26～	長岡 利	岐阜大学 応用生物科学部	1,000
新規な発酵食肉製品の機能性について		六車三治男	南九州大学 健康栄養学部	1,200
豚レバーパウダーの脂質代謝に及ぼす影響		岡本 芳晴	鳥取大学農学部	1,000
機能性食肉の開発を目指した「身体に効く成分」の分析		加治屋勝子	鹿児島大学農学部	1,000
血中トリプトファン濃度とうつ状態との関連：双極性と単極性の鑑別を目指して		堀 宏治	昭和大学院 横浜市北部病院 メンタルケア センター	800
食肉および家畜の微生物制御に資する乳酸菌由来抗菌ペプチドの探索		善藤 威史	九州大学大学院 農学研究科	800
成長期女子スポーツ選手の食事摂取状況と畜産物由来ヘム鉄摂取の有効性についての検討～特に貧血予防とメンタルヘルスに及ぼすヘム鉄の影響に着目して～		吉川 豊	神戸女子大学 健康福祉学部 健康スポーツ栄養 学	800
豚増体量に及ぼす暑熱ストレス耐性の遺伝的ばらつきの原因遺伝子を探る		山田 宜永	新潟大学農学部	900
揮発性脂肪酸が牛筋肉内脂肪細胞分化に及ぼす影響		溝口 康	明治大学農学部	800
ブランド豚肉生産用原種豚の遺伝的多様性の維持に関する研究		古川 力	東京農業大学 農学	800
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	H.26～	山崎 瑞穂	広島県立総合技術 研究所畜産技術 センター	1,000
黒毛和種牛のルーメン絨毛組織の発達関連遺伝子の網羅的解析に関する研究		盧 尚建	東北大学大学院 農学研究科	900
牛CHFRおよびRB1遺伝子プロモーター流域のDNAメチル化多型と肉質形質との関係に関する分子遺伝的研究	H.26～	須田 義人	宮城大学 食産業学部	1,000
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	H.26～	高島 誠司	信州大学繊維学部	900
乳牛における炎症性子宮疾患の迅速診断を目指した子宮の炎症度スコアの確立		清水 隆	帯広畜産大学畜産 衛生学研究部門	1,200
異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定		坂口 実	北里大学獣医学部	1,000
氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した豚卵巣および精液の過冷却保存		星野 由美	広島大学大学院 生物圏科学研究科	900
赤外線深度センサーによる和牛の分娩予測技術の検討	H.26～	小針 大助	茨城大学農学部	1,100
ミトコンドリア機能解析に基づく家畜優良胚選別法の開発		阿部 宏之	山形大学大学院 理工学研究科	1,000
牛伸長胚の生育に関わる子宮内膜細胞因子の探索		細江 実佐	農業生物資源 研究所 動物発生分化研究 ユニット	800
<i>Rhizopus oryzae</i> 水抽出物の肝障害抑制効果を応用した牛受精卵生産技術の向上		鈴木 武人	麻布大学獣医学部	1,200
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	H.26～	佐々木羊介	宮崎大学テニユア トラック推進機構	900

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 農学研究科 生体計測工 学研究室	1,000
種雄牛の受胎性評価に資する精子メチル化可変部位の解明		武田久美子	農業・食品産業 技術総合研究機構 畜産研究部門	1,000
肥育前の和牛雌子牛の摘出卵巣からの胚生産に関する研究	H.26～	的場 理子	農業・食品産業 技術総合研究機構 畜産研究部門	900
牛白血病ウイルス高感染牛の予後の評価		目堅 博久	宮崎大学 テニュアトラック 推進機構	1,100
鶏糞由来バイオセラミックによるウイルスの伝播抑制		竹原 一明	東京農工大学大学院 農学研究	1,200
シカ肉に寄生する住肉胞子虫の形態学的・分子生物学的同定ならびに腸管毒性評価		松田 一哉	酪農学園大学 獣医学群獣医学類	1,000
肉用鶏における <i>Salmonella Agona</i> の emerging とその発生意因の解析		鳥居 恭司	東京農業大学 農学部畜産学科	1,000
マダニの酸化ストレス制御分子を標的とした抗マダニワクチンの開発		田仲 哲也	鹿児島大学 共同獣医学部	800
食肉からの感染源となるトキソプラズマの休眠型虫体に関する研究		加藤健太郎	帯広畜産大学原虫 病研究センター	800
鶏肉の生産性向上を目指した安全な原虫防除法の開発		松林 誠	大阪府立大学 大学院生命環境科 学研究科	800
豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚と一般ランドレース豚との自然免疫関連分子および腸内環境比較		佐久間晶子	宮城県畜産試験場	1,100
磁気ビーズシフェラーゼ免疫沈降法による抗豚流行性下痢ウイルス抗体検出系の開発		堀江 真行	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	800
豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究		鈴木 亨	農業・食品産業 技術総合研究機構 動物衛生研究所	1,200
国際競争に勝つ『サルモネラ・ゼロ』モデル養豚場の作出		末吉 益雄	宮崎大学 産業動物防疫 リサーチセンター	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	H.26～	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	900
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	900
飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の検証—内分泌攪乱作用の有無と繁殖性に与える影響の解明		高木 光博	山口大学 共同獣医学部 臨床獣医学講座	800
非侵襲的生体電気インピーダンス法による牛枝肉脂肪交雑の推定		橋元 大介	長崎県農林技術 開発センター	1,000

食肉特性の向上を目指して：ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成誘導		辰巳 隆一	九州大学大学院 農学研究科	1,200
リンゴジュース粕の機能性を生かした高付加価値豚肉生産技術の開発		房 家琛	弘前大学農学生命 科学部	650
「乳質の良さ」が注目されるブラウンスイス種乳牛の栄養・繁殖特性の解明		遠藤なつ美	東京農工大学 農学部	1,000
黒毛和種における <i>RBP4</i> 多型と枝肉形質の関連解析	H.25～	平野 貴	東京農業大学 農学部	1,100
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	H.26～	福田 智一	東北大学 農学研究科	1,200
米粉の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術の開発		佐藤 衆介	帝京科学大学 生命環境学部	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	H.26～	高橋 秀之	九州大学 農学部附属農場	900
放牧養豚用アニマルウェルフェア評価法の開発		瀬尾 哲也	帯広畜産大学 畜産学部	600
効率的な家畜生産に資する生殖中枢メカニズムの解明		上野山賀久	名古屋大学大学院 生命農学研究科	1,100
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	H.26～	木下 英樹	東海大学農学部 バイオサイエンス 学	800
黒毛和種子牛における呼吸器病の血清亜鉛濃度および亜鉛投与による臨床的な症状改善効果の検討		乙丸孝之介	鹿児島大学 共同獣医学部	450
難培養性乳酸菌を用いた第3世代サイレージ添加剤の開発		西野 直樹	岡山大学大学院 環境生命科学研究科	800
食肉由来病原体に対する腸管免疫に関与する血清アミロイドAの機能解析		猪島 康雄	岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科	600
牛肉の各部位に含まれる機能性成分に与える品種の影響について	H.26～	平山 琢二	滋賀県立大学 環境科学部	900
同腹産仔間で成長が異なる仔豚の代謝特性比較		塚原 隆充	京都府立大学 大学院生命環境 科学研究科	1,100
合 計				66,000

伊藤記念財団賞

尾嶋 孝一

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門畜産物研究領域 上級研究員

〔業績の課題名〕

骨格筋細胞における筋原線維の形成とその構成タンパク質分解に関する分子細胞生物学的研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

家畜の骨格筋形成過程では、形成初期段階で単核の筋芽細胞が分化することで多核の筋管細胞を形成し、筋線維へと成熟する。そのプロセスは食肉の生産効率性と品質に大きく影響し、その中で規則正しく形成される微細なタンパク質複合体の構造と性質が、テーブルミートや加工用原料肉の保水性等品質に直結する。

受賞者はこれまで、家畜よりも効率的に研究を推進できるマウスをモデル動物に用い、骨格筋組織の形成メカニズムの解明を進めてきた。筋芽細胞については分泌するタンパク質性因子を網羅的に解析し、細胞分泌因子が筋形成に深く関与する可能性を明らかにした。また、霜降り肉に存在する脂肪細胞についても分泌性因子の網羅的解析を行い、筋細胞の場合との相違や、分泌性因子を介した異種細胞間の相互作用についての解析により、脂肪交雑形成において骨格筋および脂肪細胞が分泌する因子の重要性を見出している。筋分化した筋線維については、内部のタンパク質高次構造体（太いフィラメントと細いフィラメント）の伸張や代謝に関するメカニズムについて詳細を明らかにした。これらはミオシン等、筋原線維タンパク質の性質の理解を前進させるものであり、その分子レベルの理解が新たな食肉加工品を設計する上で重要な基盤となるものと期待される。

さらに受賞者は、タンパク質分解酵素カルパインのうち、骨格筋特異的なカルパイン3（p94）に注目し、その生理的意義と酵素学的性質について追及した。その結果、p94のリン酸化の筋原線維形成への関与、筋小胞体上でCa²⁺放出制御への関与、食肉の構造タンパク質コネクチンに結合すると不活化される特性、その細胞内局在の筋原線維（サルコメア）の伸張・収縮等による変化、またそのプロテアーゼ活性が骨格筋の運動ストレス緩和に関与する可能性等、他のカルパインにはない性質を明らかにした。これらは、運動という骨格筋の本質やその細胞内のタンパク質蓄積メカニズムにp94が密接に関係することを示唆し、家畜の筋量増加やその指標にp94が応用できる可能性を示している。また、タンパク質の高次構造形成に関与するp94の作用機序解明は、食肉熟成中の筋原線維の崩壊メカニズムの解明に寄与し、食肉の軟化機構解明を前進させるものと期待される。以上のような成果は、筋細胞内での分子複合体構築等、基礎的な骨格筋形成メカニズムの解明に貢献してきただけでなく、今後、家畜改良のための育種メーカー開発や、食肉構成分子の性質を踏まえた食肉加工法開発など、効率的な食肉生産技術や品質向上技術の開発に大きく寄与できる。

山内 啓太郎

東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

〔業績の課題名〕

骨格筋前駆細胞群の分化制御機構解明を通じた高付加価値食肉生産のための知的基盤の確立

〔業績の概要（受賞理由）〕

脂肪交雑割合や柔らかさ等、付加価値の高い食肉の生産は重要な課題であり、我が国の食肉産業の国際競争力強化にも資するものである。現在、付加価値をもつ食肉生産は和牛に見られるように主として遺伝的な選抜と飼養管理によりなされているが、さらなる向上に向けた新技術開発には脂肪交雑成立のメカニズムや肉の柔らかさに影響を与えるコラーゲンの蓄積等についての科学的な理解が重要である。受賞者はこれまでに骨格筋内に存在するさまざまな前駆細胞群の分化制御に関する研究に従事し、高付加価値の食肉生産のための知的基盤となり得る成果を多数あげてきた。以下にこれまでの主要な研究成果を示す。

1. 筋発達制御における非筋細胞及び内分泌性液性因子の関与

骨格筋発達を負に制御する myostatin が骨格筋線維芽細胞で発現していることや、筋前駆細胞である筋衛星細胞の活性化を担う HGF が脾臓から血流を介して供給されることを初めて見いだした。また、独自に開発した測定系により泌乳期や副腎機能低下時の活性型 myostatin の血中動態を明らかにし、これが胎子の骨格筋発達に深く関連している可能性を提示した。これらの知見は、骨格筋の発達が骨格筋内に存在する筋細胞以外の細胞や内分泌性因子による多様な制御を受けることを示すだけでなく、これらの細胞や因子が肉質改善の上で重要な標的となり得ることを明らかにしたものである。

2. 骨格筋内脂肪細胞の起源である間葉系前駆細胞の同定及び筋分化-脂肪分化間の相互分化制御作用の発見

骨格筋内における脂肪交雑成立機序を解明する一端として、実験動物から家畜に至るまで骨格筋内には脂肪分化能やコラーゲンを産生する線維芽細胞への分化能をもつ間葉系前駆細胞群が存在することを示し、その性質を安定かつ忠実に維持した間葉系前駆細胞クローン 2G11 細胞の取得に成功した。この細胞を利用した研究により、骨格筋に存在する間葉系前駆細胞の脂肪分化能維持には FGF が必須であること、また間葉系前駆細胞が脂肪細胞へと分化した際には筋発達を負に制御することを見いだした。同時に、筋衛星細胞の筋分化が活発に生じている環境では間葉系前駆細胞の脂肪分化は著しく制御されることから、筋発達（筋分化）と脂肪交雑（脂肪分化）との間に相互分化制御作用が存在することを明らかにした。さらに間葉系前駆細胞の分化制御に関わる因子を複数発見し（SPARC, CSPG4 など）、その新規作用調節機序について解明を行ってきた。これらの知見は、科学的な新規知見に基づいた脂肪蓄積（脂肪交雑）やコラーゲン蓄積の人為的制御による高付加価値食肉生産の方法論を開発する上で極めて有用である。

盧 尚 建

東北大学大学院農学研究科 准教授

〔業績の課題名〕

高品質牛肉の産肉性を特徴づける脂肪細胞由来の新規調節因子の解明に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉の肉質を評価する上で、「脂肪交雑」と「脂肪の質」は重要な形質である。育種改良や飼養技術の改善によりこれらの形質は改善されるが、そのためには、体内での皮下、内臓、筋肉内脂肪組織における脂肪細胞の形成と脂肪酸などの合成過程に関わる新規調節因子の解明など、応用技術を支える基礎的な研究情報の蓄積がきわめて重要となる。受賞者はこれまで脂肪細胞由来の脂肪蓄積に関連する因子について同定と解析を行い、さらに産肉性との関連を調査して以下のような研究成果をあげている。

1. 新規脂肪細胞由来のウシケメリン遺伝子の同定と脂肪蓄積との関連性の解析

- ① 肝臓と脂肪組織で高いケメリン遺伝子の発現を確認した。また、ウシ培養脂肪細胞への分化過程においてウシケメリン遺伝子の発現量が上昇し、ウシ脂肪細胞において脂肪細胞由来のアディポカイン、ケメリンが存在することを明らかにした。
- ② ケメリンアナログペプチドを投与してインスリン分泌を刺激し、ケメリンが糖脂質代謝の調節作用を持つことを明らかにした。
- ③ ウシ培養脂肪細胞と肝細胞において、アディポカインや脂肪酸の自己分泌／傍分泌的な作用によりケメリンの発現が調節され、体内ではエネルギーの放出や取り込みを制御する可能性を示唆する結果を得た。

2. 黒毛和種牛のケメリン遺伝子一塩基多型が枝肉形質および遺伝子発現に与える影響

ケメリン遺伝子のコード領域内に3箇所の一塩基多型 (c.12A > G (4aa), c.276C > T (92aa), c.321A > G (107aa)) を発見し、枝肉形質との関連性を調べたところ、c.276C > Tの一塩基多型と経済形質であるBMS NO.等との間に関連性があることを明らかにした。

3. 反芻動物の産肉性に関わる脂肪細胞分化と形成に関わる遺伝子について解析し、脂肪蓄積を調節するシグナルおよびメカニズムの解析に共役リノール酸, TNF- α , adipogeninなどの果たす役割が大きいことを報告した。

4. 新規脂肪蓄積調節因子を探索するために、ウシの皮下および内臓脂肪組織において網羅的遺伝子解析を行い、脂肪蓄積に関連する遺伝子を同定し、解析を行った。

以上の研究成果は、ケメリンが牛肉の脂肪交雑に関して重要な役割を果たすと同時にその一塩基多型がBMS No.を高める上で重要な遺伝的指標となることを明らかにしたものである。基礎的研究情報を高品質牛肉生産を特徴付ける応用技術として発展させその利用可能性を検討した内容である。

若松 純一

北海道大学北方生物圏フィールド科学センター 准教授

〔業績の課題名〕

食肉製品中の新規赤色色素の形成機構および食肉の体熱産生機構に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

受賞者は、非加熱食肉製品中で形成される新規赤色色素・亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) の形成機構ならびに食肉の体熱産生機構に関する研究を行っている。主要な成果は以下に要約される。

1. 食肉製品中の新規赤色色素の形成機構に関する研究

イタリアのパルマハムなどでは発色剤を使用していないにもかかわらず好ましい色調を発現するが、その色調発現機構は不明であった。受賞者はパルマハム中の色素の同定を試み、パルマハムではヘム内の鉄が亜鉛に置き換わった赤色色素・亜鉛プロトポルフィリン IX (ZnPP) が形成されていることを世界で初めて明らかにし、食肉研究の分野で国際的にも高い評価を得た。その ZnPP 形成機構を解明する手法としてモデル実験系を開発し、ZnPP 形成には食肉の内在性酵素が関与すること、酸素存在下で ZnPP 形成は阻害されることを示した。さらに、金属キレート剤を加えると前駆物質であるプロトポルフィリン IX (PPIX) が形成・蓄積され、ZnPP 形成にはミオグロビンのヘムの関与は小さいことから、ZnPP は PPIX に亜鉛が挿入されて形成される可能性が高いことを示した。また、紫色 LED を照射して ZnPP の自家蛍光を観察する方法を開発し、パルマハム中の ZnPP の分布を調べた結果、肉塊の中心部と脂肪組織に比較的強い ZnPP の蛍光が観察され、空気の触れる肉塊切開面直下では ZnPP がほとんど形成されないことを示した。また、ZnPP, PPIX, ヘムの一括抽出・同時測定法を確立し、パルマハム中で ZnPP 量はヘムの約 2 倍含まれており、ZnPP がパルマハムの色調に大きく寄与することを示した。

2. 食肉と健康関連・食肉の体熱産生能機構に関する研究

食肉には、畜種によって我々の体を温めたり冷やしたりする効果があることが古くから経験的に知られているが、そのメカニズムは不明であった。そこで、食肉による食餌誘発性体熱産生能の違いとそのメカニズムについて栄養学的研究を行った。羊肉、豚肉、牛肉および鶏肉をタンパク資源ならびに脂質原としてラットに与えた結果、食後の体温は鶏肉、牛肉、豚肉、羊肉の順に高くなり、体を温めると言われている羊肉で体温を上昇させる効果があることを実証した。そこで、羊肉を分画してラットに与えたところ、精製タンパク質画分は脱脂羊肉画分と同様に高い体温上昇効果が示され、羊肉タンパク質摂取時には甲状腺ホルモンの分泌促進とエネルギー代謝促進が関与していることが示唆された。また、羊肉、鶏肉、豚肉、牛肉、馬肉からタンパク質を精製してラットに与えた結果、鶏肉ならびに羊肉タンパク質の摂取により食後の体温が有意に上昇し、甲状腺ホルモンの標的遺伝子およびタンパク質の発現量が有意に増加した。以上の結果から、畜種による食肉の食餌誘発性体熱産生能の違いは、食肉タンパク質に起因すること、ならびに甲状腺ホルモンが深く関係することを明らかにした。

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27年度 (Vol. 34)

2016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>