

平成28年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 35

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		
	第1回	48件	60,000千円
昭和57年度	2	52	54,400
58	3	60	49,800
59	4	62	48,000
60	5	70	53,000
61	6	79	58,900
62	7	95	70,500
63	8	86	74,250
平成元年度	9	79	60,000
2	10	70	50,000
3	11	86	60,000
4	12	81	60,000
5	13	81	60,000
6	14	82	65,000
7	15	81	69,100
8	16	78	59,000
9	17	82	60,000
10	18	67	47,000
11	19	57	41,000
12	20	53	37,000
13	21	58	40,000
14	22	55	41,000
15	23	55	48,000
16	24	56	48,000
17	25	11	10,000
18	26	12	10,000
19	27	15	16,900
20	28	11	10,000
21	29	11	10,400
22	30	12	12,000
23	31	13	13,000
24	32	38	37,000
25	33	58	54,800
26	34	69	66,000
27	35	71	69,000
28			

## 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36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35回（平成28年度）助成事業における71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2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と学会等事業助成の概要をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成29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.35 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. 2017  
Koichi Ito  
The chief director  
The Ito Foundation



# 研究助成事業

## 目 次

食肉製品製造に使用される各種リン酸塩によるアクトミオシンのアクチンとミオシンへの解離に関する研究	3
……………松石昌典（日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科）……………	
食肉加工品添加物，亜硝酸塩によるメタボリックシンドローム改善作用の解明	9
……………宮本理人（徳島大学大学院医歯薬学研究部医薬品機能生化学分野）……………	
トリプトファン添加による有害細菌の増殖抑制ならびに不活化：食肉および加工品製造工程における活用と作用メカニズムの解明	13
……………小関成樹（北海道大学大学院農学研究科）……………	
新規アクチン結合タンパク質から豚肉の柔らかさの要因に迫る	19
……………灘野大太（名古屋大学大学院生命農学研究科）……………	
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（Ⅱ）：オートファジーと食肉の肉質の関連性	25
……………仲西友紀・河原聡（宮崎大学農学部応用生物科学科）……………	
ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その3）	31
……………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）……………	
ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定	40
……………早川徹（帯広畜産大学畜産衛生学研究部門）……………	
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（Ⅱ）	46
……………根岸晴夫（中部大学応用生物学部）……………	
食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチンの影響	52
……………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）……………	
黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ，および味認識装置による呈味性評価	61
……………山之上稔 <sup>1</sup> ・趙姫楠 <sup>1</sup> ・西田昌弘 <sup>1</sup> ・中田悠介 <sup>1</sup> 上田修司 <sup>1</sup> ・羽原正秋 <sup>2</sup> ・池崎秀和 <sup>2</sup> （ <sup>1</sup> 神戸大学大学院農学研究科， <sup>2</sup> 株式会社INSENT）……………	
タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの基質認識機構の改変	67
……………滝田禎亮（京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻）……………	
大規模ゲノム解析による腸管出血性大腸菌の国際的伝播経路の解明	76
……………李謙一（国立感染症研究所細菌第一部）……………	

## 新規な発酵食肉製品の機能性について (Ⅱ)

……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) …………… 81

## 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) …………… 89

## 肥満に伴う認知症の発症予防に対する豚肉摂取による腸内環境改善効果の有用性

……………後藤 孔郎・正木 孝幸・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) …………… 93

## 畜産物由来サプリメントの新規評価法の開発

……………吉川 豊・糸井 亜弥(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科) …………… 98

## 豚肝臓由来ペプチドが肝線維化に及ぼす影響 (Ⅱ)

……………實 安 隆 興(神戸大学大学院農学研究科) …………… 103

## 黒毛和種における *RBP4* 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) …………… 107

## 豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚の他慢性呼吸器感染症への

## 抗病性機構に関する研究および肉豚生産における抗病性育種豚の有効性に関する考察

……………佐久間 晶子<sup>1,2</sup>・吉野 淳良<sup>1</sup>・高橋 伸和<sup>1</sup>  
野地 智法<sup>2</sup>・須田 義人<sup>3</sup>・麻生 久<sup>2</sup>  
(<sup>1</sup>宮城県畜産試験場, <sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科, <sup>3</sup>宮城大学食産業学部) …………… 114

## 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 (Ⅱ)

……………古川 力・野村 こう・高橋 幸水(東京農業大学農学部) …………… 120

## 黒毛和種で致死に関与するゲノムコピー数多型の探索

……………佐々木 慎 二(公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所) …………… 126

## 黒毛和種牛肉の美味しさに関わる遺伝子マーカーの効果検証

……………笹 崎 晋 史(神戸大学大学院農学研究科) …………… 130

## 天然記念物「黒柏鷄」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」の DNA 識別手法の確立

……………伊藤 直弥<sup>1,3</sup>・関谷 正男<sup>1</sup>・佐藤 慎一<sup>2</sup>・大竹 剛<sup>2</sup>・都築 政起<sup>3</sup>  
(<sup>1</sup>山口県農林総合技術センター, <sup>2</sup>独立行政法人家畜改良センター,  
<sup>3</sup>広島大学大学院生物圏科学研究科) …………… 135

## 優良肉用家畜増産のための受精卵移植の基盤となる高品質卵子の選抜

……………眞 鍋 昇(大阪国際大学人間科学部) …………… 143

## 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・高木 優二・保地 眞一(信州大学繊維学部・農学部) …………… 148

## 種雄牛における精子メチル化可変部位の特性評価

……………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) …………… 153

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) .....	158
牛の超早期妊娠因子 (Super-EPF) ELISA による受精・着床診断 ..... 松原 和衛・小岩 佳夏子・平田 統一 (岩手大学農学部) .....	165
異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定 (Ⅱ) ..... 坂口 実・菊池 元宏・三浦 弘 (北里大学獣医学部) .....	171
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 (Ⅱ) ..... 阿 部 宏 之 (山形大学大学院理工学研究科) .....	180
牛伸長胚の生育に関わる子宮内膜細胞因子の同定と検証 ..... 細江 実佐・古澤 軌 (農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門) .....	186
アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の妊孕性に及ぼす影響 ..... 小 林 仁 (宮城大学食産業学部) .....	191
雄牛の新たな繁殖機能評価法の開発 ..... 北 原 豪 (宮崎大学農学部獣医学科) .....	196
牛の受胎性に関与する排卵後の黄体と主席卵胞の位置関係の人為的制御に関する研究 ..... 松 井 基 純 (帯広畜産大学畜産学部獣医学科) .....	202
氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した牛精液および受精卵の未凍結保存 ..... 星 野 由 美 (広島大学大学院生物圏科学研究科) .....	208
お灸は牛の卵巣機能の向上をもたらすか？ ..... 三 浦 亮太郎 (日本獣医生命科学大学獣医学部) .....	213
日本の養豚場における動物用抗菌剤使用に及ぼす要因の疫学的解析 —動物用抗菌剤使用量と農場バイオセキュリティレベルの関係— ..... 杉浦 勝明・松田 真理・磯村 れん・ナイジェル CL クワン (東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際動物資源科学研究室) .....	219
食鳥と体皮膚に対するカンピロバクターの付着メカニズムの解明 ..... 三 澤 尚 明 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター) .....	225
豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究2 (コンベンショナル豚) ..... 鈴木 亨・大橋 誠一・須田 遊人 (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部門) .....	230
遺伝子操作技術を駆使した生後感染型アカバネウイルスの病原性決定基の同定と 流行ウイルス予測への応用 ..... 正 谷 達 膳 (鹿児島大学共同獣医学部) .....	235
ジビエとして食される野生動物が保有する食中毒菌の薬剤耐性 ..... 安 藤 匡 子 (鹿児島大学農水産獣医学域獣医学系) .....	240

肉用子牛におけるマイコプラズマ感染症の新たな迅速診断用 PCR 法の構築と 肉用農場におけるマイコプラズマ感染症予防への応用	樋口 豪紀・岩野 英知* (酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医衛生学ユニット, *酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医化学ユニット)	244
肉養鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性	松 鶴 彩 (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)	249
リコンビナント抗原を用いたエゾシカにおける肝蛭症の血清診断法の確立と 疫学調査による家畜・ヒトに対するリスク分析	関 まどか・福本 晋也* (岩手大学農学部共同獣医学科, *帯広畜産大学原虫病研究センター)	256
野生獣肉の食肉利用に関する寄生虫性食中毒危害の科学的分析	山 崎 朗 子 (岩手大学農学部)	262
カンピロバクターフリーブローラーの分別出荷を目的とした養鶏場即時検出システムの確立	山崎 渉・イスラム イブラヒム サビック (宮崎大学農学部獣医学科)	270
毒素原性大腸菌易熱性毒素を迅速に検出するイムノクロマトグラフィーの開発	有 満 秀 幸 (藤田保健衛生大学医学部)	276
わが国の家畜における D 型インフルエンザウイルス感染の実態調査	堀本 泰介・村上 晋 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	283
牛由来黄色ブドウ球菌の増殖阻止を可能にする牛ポリクローナル抗体の特性解析	野地 智法・米山 裕 (東北大学大学院農学研究科)	288
食肉により媒介されるトキソプラズマ原虫感染症に対する新規血清診断法の確立	玄 学南・高 洋・郭 煥平・Adjou Moumouni PF 白藤 梨可・菅沼 啓輔・相馬 武久* (帯広畜産大学原虫病研究センター, *マルピー・ライフテック株式会社臨床検査部)	297
ゲノム疫学的アプローチによる豚抗酸菌症の実態解明	大屋 賢司・丸山 史人*・岩本 朋忠**・西内 由紀子*** (岐阜大学応用生物科学部, *京都大学大学院医学研究科, **神戸市環境保健研究所, ***大阪市立大学医学部)	302
データマイニング技術を用いた牛白血病ウイルス感染の免疫動態解明に関する研究	関口 敏・乗峰 潤三 (宮崎大学農学部)	307
肉用牛の出血性腸炎で認められる腸管病原性微生物の混合感染と病態との関連	桐野 有美・目堅 博久*・野中 成晃 (宮崎大学農学部, *宮崎大学テニユアトラック推進機構)	312

ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成促進：筋成長期での制御による食肉特性の向上を目指して	川口 舞・柴田 歩実・大宅 俊平・松吉 祐児 水野谷 航・中村 真子・辰巳 隆一 (九州大学大学院農学研究院)	319
粗飼料サイレージの発酵品質改善のためのサイレージ密度計測手法の開発	大 越 安 吾 (地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部根釧農業試験場)	326
粳米の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術の実規模での開発 (Ⅱ)	有賀 小百合・佐藤 衆介 (帝京科学大学生命環境学部)	334
代謝性疾患と関連病態の発症におけるスカトールおよび胆汁酸の役割	石塚 敏・清水 英寿* (北海道大学大学院農学研究院, *島根大学生物資源科学部)	339
<i>Lactococcus</i> 属乳酸菌で調製した発酵乳給与による離乳子豚の免疫機能の改善と生産性の向上	守谷 直子・兼松 伸枝・田島 清・成田 卓美・木元 広実 (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)	345
西南暖地におけるイネ科牧草リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発	石垣 元気・福山 喜一 (宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールド)	351
哺乳期の長日処理による黒毛和種の代謝調節	安 尾 しのぶ (九州大学大学院農学研究院)	356
耕作放棄地を利用しためん羊生産体系の確立の試み	田 中 智 夫 (麻布大学獣医学部)	360
竹笹サイレージの肉用鶏への給餌による食中毒菌の制御とプロバイオティクスの開発	谷口 喬子・三澤 尚明 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)	365
牛由来肝臓細胞における薬物代謝関連遺伝子の解析	吉 岡 都 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門)	371
山間地耕作放棄地内野草放牧と畜舎内濃厚飼料多給で生産されたサフォーク種ラム肉の食味および呈味成分の比較	石田 元彦・西村 苑夏・矢地 彩加・吉田 彩乃 浅野 桂吾・長井 誠・小西 康子 (石川県立大学生物資源環境学部)	376
黒毛和種肥育牛への穀物飼料増給に対するルーメン微生物相の応答に関する研究	小 池 聡 (北海道大学大学院農学研究院)	383

糖代謝産物および終末糖化産物がブロイラーの生産性に与える影響の解明 ..... 橘 哲也・牧野 良輔（愛媛大学大学院農学研究科） .....	388
動-静脈差でみる，発育不良豚の成長に必要なアミノ酸および他の栄養成分の推定 ..... 塚 原 隆 充（京都府立大学大学院生命環境科学研究科） .....	395
肉質向上に資するアミノ酸栄養の基礎研究 ..... 佐藤 祐介・二瓶 直浩・佐藤 より子（宇都宮大学農学部） .....	401
中鎖脂肪酸に着目した人工乳改良による離乳期子牛の発育改善 ..... 福森 理加 <sup>1,2</sup> ・増田 洋史 <sup>2</sup> ・長尾 慶和 <sup>1,2</sup> （ <sup>1</sup> 宇都宮大学農学部附属農場, <sup>2</sup> 東京農工大学大学院連合農学研究科） .....	406
ストレスホルモンによる日本短角種牛由来筋芽細胞の増殖と筋線維型への影響 ..... 佐 藤 勝 祥（秋田県立大学生物資源科学部） .....	412
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） .....	417

# CONTENTS

<b>Studies on the dissociation of actomyosin into actin and myosin induced by various phosphates used for manufacture of meat products</b>	
Masanori Matsuishi (School of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University) .....	3
<b>Molecular mechanisms underlying beneficial effects of nitrites ameliorating metabolic syndromes</b>	
Licht Miyamoto (Medical Pharmacology, Inst. of Biomedical Sciences, Tokushima University) .....	9
<b>Bacterial control by using tryptophan: Application to meat and meat products processing and investigation of its reaction mechanism</b>	
Shigenobu Koseki (Research Faculty of Agricultural Science, Hokkaido University) .....	13
<b>Understanding of factors involved in pork meat tenderness through analysis of a novel actin-binding protein</b>	
Daita Nadano (Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) .....	19
<b>Effect of autophagy on postmortem proteolysis in skeletal muscle (II) : Relationship between autophagy and meat quality</b>	
Tomonori Nakanishi and Satoshi Kawahara (Department of Biochemistry and Applied Biosciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	25
<b>Studies on clarification of the compounds involved in “<i>koku</i> attributes” of pork sausages (III)</b>	
Toshihide Nishimura and Ai Saiga Egusa (Department of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University) .....	31
<b>Identification of myosin rod region involved in the solubilization under the low ionic strength condition</b>	
Toru Hayakawa (Department of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) .....	40

<b>Study on processing technology and characteristics of fermented meat products produced using lactic acid bacteria cultures for dairy products (II)</b>	
Haruo Negishi (College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University) .....	46
<b>Effect of hypoxanthine on the improvement of taste during postmortem aging of meat</b>	
Sayaka Ichimura, Yukinobu Nakamura, Yuka Yoshida and Akihito Hattori (Japan Meat Science and Technology Institute) .....	52
<b>Intramuscular free fatty acids related to deliciousness of Japanese Black Wagyu beef and its taste-traits analyzed by an electronic taste sensing system</b>	
Minoru Yamanoue <sup>1</sup> , Yanan Zhao <sup>1</sup> , Masahiro Nishida <sup>1</sup> , Yusuke Nakada <sup>1</sup> , Shuji Ueda <sup>1</sup> , Masaaki Habara <sup>2</sup> and Hidekazu Ikezaki <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, <sup>2</sup> INSENT, Inc. ) .....	61
<b>Alteration of the substrate specificity of transglutaminase by protein engineering</b>	
Teisuke Takita (Graduate School of Agriculture, Division of Food Science and Biotechnology, Kyoto University) .....	67
<b>Large scale genome analyses of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> for exploring international transmission routes</b>	
Ken-ichi Lee (Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases) .....	76
<b>Functional properties of novel fermented meat products (II)</b>	
Michio Muguruma, Masato Kawagoe, Saki Kimoto, Kumiko Kawakita and Shinichi Takenoyama. (Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) .....	81
<b>Basic study of the development of an innovative hypocholesterolemic food materials using cattle heart peptides</b>	
Satoshi Nagaoka (Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) .....	89
<b>Efficacy of intestinal flora improvement by the pork intake on the prevention of dementia related with obesity</b>	
Koro Gotoh, Takayuki Masaki and Hirotaka Shibata (Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology, and Nephrology, Faculty of Medicine, Oita University) .....	93
<b>Development of new evaluation method for supplement derived from animal product</b>	
Yutaka Yoshikawa and Aya Itoi (Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University) .....	98

<b>Effect of dietary peptides derived from porcine liver on hepatic fibrosis (II)</b>	
Takaoki Saneyasu	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....	103
<b>Association analysis between <i>RBP4</i> gene polymorphisms and carcass traits</b>	
<b>in Japanese black cattle</b>	
Takashi Hirano, Hiromi Hara and Kei Hanzawa	
(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture) .....	107
<b>Study of the anti-disease mechanism for chronic respiratory infections in Landrace pigs</b>	
<b>selectively bred for Mycoplasmal Pneumonia of Swine (MPS) resistance and the effectiveness</b>	
<b>of anti-disease breeding regarding pork production</b>	
Akiko Sakuma <sup>1,2</sup> Jyunryo Yoshino <sup>1</sup> , Nobukazu Takahashi <sup>1</sup> , Tomonori Nochi <sup>2</sup> , Yoshihito Suda <sup>3</sup> and Hisashi Aso <sup>2</sup>	
( <sup>1</sup> Miyagi Livestock Experimental Station, Miyagi, Japan, <sup>2</sup> Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, <sup>3</sup> Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University) .....	114
<b>Sustainability of genetic diversity in original pig strains used for branding pork (II)</b>	
Tsutomu Furukawa, Koh Nomura and Yukimizu Takahashi	
(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture) .....	120
<b>Reverse genetic screen for copy number variation associated with lethality in Japanese Black cattle</b>	
Shinji Sasaki	
(Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association) .....	126
<b>Investigation on the effect of genetic markers for beef quality in Japanese Black cattle</b>	
Shinji Sasazaki	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....	130
<b>Establishment of a DNA-based discriminating method for Jidori “Chosyu-Kurokashiwa”</b>	
<b>genetically derived from “Kuro-Kashiwa”, a National Natural Treasure of Japan</b>	
Naoya Ito <sup>1,3</sup> , Masao Sekiya <sup>1</sup> , Shinichi Sato <sup>2</sup> , Tsuyoshi Ohtake <sup>2</sup> and Masaoki Tsudzuki <sup>3</sup>	
( <sup>1</sup> Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Livestock Technology Research Department, <sup>2</sup> National Livestock Breeding Center, <sup>3</sup> Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University) .....	135
<b>Selection of high quality egg for embryo transplantation to produce high-quality meat livestock</b>	
Noboru Manabe	
(Department of Human Sciences, Osaka International University) .....	143
<b>Development of porcine/bovine germline stem cell technology using novel growth factor</b>	
Seiji Takashima, Yuji Takagi and Shinichi Hochi	
(Faculty of Textile Science and Technology and Faculty of Agriculture, Shinshu University) .....	148

**Characterization of differentially methylated sites in bull spermatozoa DNA**

Kumiko Takeda and Eiji Kobayashi

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ..... 153

**Study of *in vitro* embryo production using growing oocytes collected from ovaries removed from beef calves before fattening**

Satoko Matoba, Yuji Hirao and Kumiko Takeda

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ..... 158

**Fertilization and implantation diagnosis by Super-early pregnancy factor (Super-EPF) ELISA of cattle**

Kazuei Matsubara, Kanako Koiwa and Toh-ichi Hirata

(Faculty of Agriculture, Iwate University) ..... 165

**Novel standard for artificial insemination timing based on different estrous detection criteria in cattle (II)**

Minoru Sakaguchi, Motohiro Kikuchi and Hiroshi Miura

(School of Veterinary Medicine, Kitasato University) ..... 171

**Development of novel system for quality evaluation of bovine embryos by analysis of mitochondrial function (II)**

Hiroyuki Abe

(Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University) ..... 180

**Identification of endometrium cell-derived factors involved in the early development of bovine embryo**

Misa Hosoe and Tadashi Furusawa

(Institute of Agrobiological Sciences, NARO) ..... 186

**Effects of adipokine and insulin resistance on the bovine fertility**

Jin Kobayashi

(School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University) ..... 191

**Research on novel evaluation of reproductive function in bull**

Go Kitahara

(Development of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ..... 196

**Study of artificial regulation of locational relationship between corpus luteum and dominant follicle after ovulation which relate to fertility of dairy cattle**

Motozumi Matsui

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ... 202

<b>Preservation of bovine semen and embryo by supercooling using an amino acid that effectively inhibits ice crystal formation</b>	
Yumi Hoshino	
(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University) .....	208
<b>Does the Moxibustion have positive effect to ovarian function ?</b>	
Ryotaro Miura	
(Department of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University) .....	213
<b>Epidemiological analysis of the factors affecting the use of veterinary antimicrobials at farm level on Japanese pig farms</b>	
<b>– the relationship between veterinary antimicrobial usage and on-farm biosecurity level –</b>	
Katsuaki Sugiura, Mari Matsuda, Ren Isomura and Nigel CL Kwan	
(Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) .....	219
<b>Elucidation of attachment manner of campylobacters on the skin surface of chicken carcasses</b>	
Naoaki Misawa	
(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki) .....	225
<b>Experimental infection with porcine deltacoronavirus in conventional pigs</b>	
Tohru Suzuki, Seiichi Ohashi and Yuto Suda	
(National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, NARO)	
.....	230
<b>Identification of pathogenic determinant of Akabane virus by using reverse genetics and application for endemic prediction of virus</b>	
Tatsunori Masatani	
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....	235
<b>Drug resistance of food-borne bacteria isolated from game meat animals</b>	
Masako Andoh	
(Research field in Veterinary Medicine, Agriculture, Fishery and Veterinary Medicine Area, Kagoshima University) .....	240
<b>A novel PCR methods for rapid screening of Mycoplasma infection of beef calf and their application for the prevention of Mycoplasma infection in beef farm</b>	
Hidetoshi Higuchi and Hidetomo Iwano *	
(Animal Health Lab., Faculty of Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ., * Veterinary Biochem., Faculty of Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ. ) .....	244

**Susceptibility of broiler chicken lines to high pathogenic avian influenza virus**

Aya Matsuu

(Transboundary Animal Diseases Research center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) ..... 249

**Immuno–diagnosis of fasciolosis in ezo deer using recombinant antigens to examine risk of transmission for livestock and human**

Madoka Ichikawa–Seki and Shinya Fukumoto\*

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, \* National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

..... 256

**Parasitological research for game meat hygiene**

Akiko Yamazaki

(Department of Agriculture, Iwate University) ..... 262

**Establishment of pen side diagnosis system for segregation of *Campylobacter*–negative flocks in chicken broiler farms**

Wataru Yamazaki and Islam Ibrahim Sabike

(Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ..... 270

**Development of immunochromatography for rapidly detecting heat–labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli***

Hideyuki Arimitsu

(Fujita Health University School of Medicine) ..... 276

**Surveillance on influenza D virus infection in livestock in Japan**

Taisuke Horimoto and Shin Murakami

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) ..... 283

**Characterization of bovine polyclonal antibodies that are capable of inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* isolated from cows**

Tomonori Nochi and Hiroshi Yoneyama

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ..... 288

**Establishment of new sero–diagnostic method against food–borne toxoplasmosis**

Xuenan Xuan, Yang Gao, Huanping Guo, Paul Franck Adjou Moumouni, Rika Umemiya–Shirafuji, Keisuke Suganuma and Takehisa Soma \*

(National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, \*Marupi Lifetech Co., Ltd. Ikeda, Osaka, Japan) ..... 297

<b>Research on actual insights into transmission routes of <i>Mycobacterium avium</i> in pigs by genomic ecological approach</b>	
Kenji Ohya, Fumito Maruyama*, Tomotada Iwamoto** and Yukiko Nishiuchi*** (Department of Applied Biological Sciences, Gifu University, *Graduate School of Medicine, Kyoto University, **Kobe Institute of Health, ***Osaka City University Medical School) .....	302
<b>Study of immune dynamics in bovine leukemia virus infection using data mining techniques</b>	
Satoshi Sekiguchi and Junzo Norimine (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	307
<b>Co-infection of <i>Eimaria</i> and enteropathogenic microbes and its role in the pathophysiology of haemorrhagic enteritis in beef cattle</b>	
Yumi Kirino, Hirohisa Mekata* and Nariaki Nonaka (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, * Organization for Promotion of Tenure Track) ....	312
<b>Slow-myofiber generation induced by dietary polyphenol feeding to growing animals, toward enhancing meat quality</b>	
Mai Kawaguchi, Ayumi Shibata, Shunpei Ohya, Yuji Matsuyoshi, Wataru Mizunoya, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi (Graduate School of Agriculture, Kyushu University) .....	319
<b>Development of silage density measurement method for improving fermentation quality of forage silage</b>	
Ango Ohkoshi (Hokkaido Research Organization, Agricultural Research Department Kosen Agricultural Experiment Station) .....	326
<b>Development of commercial based animal welfare friendly broiler production system by unhusked rice feeding in Japan (II)</b>	
Sayuri Ariga and Shusuke Sato (Teikyo University of Science, Faculty of Life and Environmental Sciences) .....	334
<b>Role of skatole and bile acids in development of metabolic diseases</b>	
Satoshi Ishizuka and Hidehisa Shimizu* (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, *Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University) .....	339
<b>Feeding milk fermented with a <i>Lactococcus</i> strain to weaning piglets ameliorates growth performance, but not immune function</b>	
Naoko Moriya, Nobue Kanematsu, Kiyoshi Tajima, Takumi Narita and Hiromi Kimoto-Nira (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) .....	345

<b>Development of soybean production technique by living multi method with tropical grasses in southwestern Japan</b>	
Genki Ishigaki and Kiichi Fukuyama (Sumiyoshi Livestock Science Station, Field Science Education Research Center, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	351
<b>Control of metabolism in Japanese black cattle by postnatal exposure to long photoperiod</b>	
Shinobu Yasuo (Faculty of Agriculture, Kyushu University) .....	356
<b>Attempt to establish a new sheep production system in abandoned farmland</b>	
Toshio Tanaka (School of Veterinary Medicine, Azabu University) .....	360
<b>Control of foodborne bacteria in poultry by feeding of bamboo silage and development of probiotics from the silage</b>	
Takako Taniguchi and Naoaki Misawa (Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki) .....	365
<b>Cytochrome P450 expression in SV40 large T antigen-immortalizes bovine liver cell lines</b>	
Miyako Yoshioka (National Institute of Animal Health, NARO) .....	371
<b>Comparison of the taste and the taste components in the meat between Suffolk lambs fattened by grazing on wild grass in abandoned fields in hilly area and those fattened by high concentrates diet in feeding barns</b>	
Motohiko Ishida, Sonoka Nishimura, Ayaka Yachi, Ayano Yoshida, Keigo Asano, Makoto Nagai and Yasuko Konishi (Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University) .....	376
<b>Response of rumen microbiota to grain-diet level during fattening period in Japanese Black cattle</b>	
Satoshi Koike (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) .....	383
<b>Studies on the effect of sugar metabolite and advanced glycation endproducts on broiler production</b>	
Tetsuya Tachibana and Ryosuke Makino (Graduate School of Agriculture, Ehime University) .....	388
<b>Use of venous-to-arterial difference for the determination of amino acid and other metabolites that can complement the growth of runt piglets</b>	
Takamitsu Tsukahara (Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University) .....	395

**Basic studies on the improvement of meat quality by amino acid supplementation**

Yusuke Sato, Naohiro Nihei and Yoriko Sato

(Utsunomiya University, School of Agriculture) ..... 401

**The effect of medium-chain fatty acids supplementation with calf starter on growth in calves during the weaning period**

Rika Fukumori<sup>1,2</sup>, Yoji Masuda<sup>2</sup> and Yoshikazu Nagao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>University Farm, Department of Agriculture, Utsunomiya University, <sup>2</sup>The United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) ..... 406

**The effect of stress hormone on the myoblast derived from Japanese shorthorn cattle proliferation and exchanges the muscle fiber type**

Katsuyoshi Sato

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University) ..... 412

**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) ..... 417

# 伊藤記念財団賞

## 目 次

- 江 草 (雑 賀) 愛** (日本獣医生命科学大学応用生命科学部 食品科学科食品機能化学教室 講師)  
食肉ならびにその副生物を由来とする機能性ペプチドに関する研究 ..... 431
- 岡 村 雅 史** (北里大学獣医学部 准教授)  
養鶏場および食鳥処理現場における鶏肉の食中毒菌汚染の実態とその対策 ..... 432
- 宮 口 右 二** (茨城大学農学部 教授)  
筋漿タンパク質による筋原線維加熱ゲル化促進作用に関する研究 ..... 433

# 学会等事業助成

## 目 次

### 第 17 回アジア・大洋州畜産学会議開催報告

公益社団法人日本畜産学会 理事長 小泉聖一 ..... 437

### 日本食肉研究会の助成事業実施報告

日本食肉研究会会長 根岸晴夫（中部大学応用生物学部） ..... 438

### 食肉の安全・安心および安定的生活を脅かす家畜感染症に関する国際研究集会開催報告

岩手大学農学部附属動物医学食品安全教育研究センター センター長 鎌田洋一 ..... 440



# 研究助成事業

---



# 食肉製品製造に使用される各種リン酸塩によるアクト ミオシンのアクチンとミオシンへの解離に関する研究

Studies on the dissociation of actomyosin into actin and myosin induced  
by various phosphates used for manufacture of meat products

松石昌典

(日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科)

Masanori Matsuishii

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

In this study, it was examined whether various phosphates dissociate free actomyosin or actomyosin restrained in myofibrils by gel filtration chromatography and SDS-PAGE. When actomyosin solubilized in 0.6 M KCl was subjected to a Sepharose CL-2B column equilibrated with a 0.6 M KCl solution, myosin heavy chains and actin monomers were detected together in fraction No.16 eluted from the column. Thus, actomyosin is not dissociated under these conditions. When actomyosin treated with 8 mM pyrophosphate (PYP), tripolyphosphate (TRP) or inosine-5'-monophosphate (IMP) in 0.6 M KCl was subjected to the column equilibrated with 0.6 M KCl solutions containing those phosphates, in all cases, almost myosin heavy chains and actin monomers were detected in fraction No.24 and 34 separately, although little protein was detected in fraction No.16. These results indicate that actomyosin is dissociated into actin and myosin with those phosphates. When actomyosin treated with 8 mM PYP or IMP in 0.2 M KCl was subjected to the column equilibrated with 0.2 M KCl solutions containing 8 mM PYP or IMP, myosin heavy chains and actin monomers were detected in fraction No.26 and 33 separately. On the treatment with TRP, myosin heavy chains and actin monomers were found together in fraction No.16. Thus, it is clarified that in 0.2 M KCl PYP and IMP can dissociate actomyosin, however TRP solubilizes whole actomyosin without dissociation. When myofibrils treated with 8 mM PYP or TRP were centrifuged and the obtained supernatants were subjected to a column equilibrated with a 0.2 M KCl solution containing 8 mM PYP or TRP, myosin heavy chains and actin monomers were detected together in fraction No.16. However, no protein was detected in all fractions in the case of IMP. Above results demonstrated that PYP and IMP dissociate actomyosin in both of 0.6 and 0.2 M KCl, however, TRP dissociates actomyosin only in 0.6 M KCl. Furthermore, although PYP and TRP can release actomyosin from particular restraints in myofibrils, actomyosin liberated from myofibrils would not be dissociated into actin and myosin because of another binding like a hoop which is not cleaved by PYP and TRP.

## 1. 目 的

食肉製品製造に使用されるピロリン酸塩 (PYP) やトリポリリン酸塩 (TRP) などの無機ポリリン酸塩は、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることにより、食肉からのミオシンの抽出を高め、低塩濃度でも結着性や保水性の高い製品を製造することを可能にしていると言われている<sup>1)</sup>。著者らは、0.2M KCl下でアクトミオシンは不溶性であるが、解離して生じるアクチンとミオシンは可溶性であるという性質を利用して、有機リン酸塩である5'-イノシン酸塩 (IMP) が、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることを示した<sup>2)</sup>。さらに、IMPがモデルソーセージにおいてPYPと同等の結着性と保水性の改善効果を有すること<sup>3)</sup>、および、IMPが食肉の熟成中の解硬因子の候補の一つであることを示した<sup>4)</sup>。しかし、このようなリン酸塩の中で、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離することが分子量の変化として明確に示されているのはATPのみである<sup>5)</sup>。

本研究では、PYP、TRPおよびIMPをアクトミオシンと筋原線維に作用させて、ゲル浸透クロマトグラフィーとSDS-PAGEで分析することにより、アクトミオシンのアクチンとミオシンへの解離および筋原線維からのアクトミオシンの遊離を分子量の変化として明らかにすることを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 材料

市販の鶏胸肉 (浅胸筋) を用いた。

### 2.2 アクトミオシンと筋原線維の調製

アクトミオシンは常法<sup>6)</sup> によって調製した。ひき肉に6倍量のWeber-Edsall溶液 (0.6M KCl/0.04 M NaHCO<sub>3</sub>/0.01 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) を加えて24時間抽出

した。この混合物を遠心分離して上清を得て、それに純水を加えてKCl濃度を0.2Mにした。希釈後に生じた沈殿を集めて、そのKCl濃度を0.6Mにしてアクトミオシンを溶解させた。このような希釈法を3回繰り返してアクトミオシンを精製した。筋原線維はYangらの方法<sup>7)</sup> で調製した。

### 2.3 ゲル浸透クロマトグラフィー

ゲル浸透クロマトグラフィーでは分画分子量が7万~4000万のSepharose CL-2B (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden) カラム (φ 2 cm × 80cm) を用いた。0.6M KCl存在下でのクロマトグラフィーでは、1.67mg/mlアクトミオシンを20mM Tris-HCl (pH 7.2)/2 mM NaN<sub>3</sub>/0.6 M KCl (0.6K-液) あるいは8mMリン酸塩を含む0.6K-液中で0℃に1時間インキュベートした後、6,500 × gで15分間遠心分離した。得られた上清を0.6K-液あるいは8mMリン酸塩を含む0.6K-液で平衡化したカラムにかけた。0.2M KCl存在下でのクロマトグラフィーでは、1.67mg/mlアクトミオシンあるいは4.17mg/ml筋原線維を20mM Tris-HCl (pH 7.2)/2 mM NaN<sub>3</sub>/0.2 M KCl (0.2K-液) あるいは8mMリン酸塩を含む0.2K-液中で0℃に1時間インキュベートした後、6,500 × gで15分間遠心分離した。得られた上清を0.2K-液あるいは8mMリン酸塩を含む0.2K-液で平衡化したカラムにかけた。

カラムからの溶出液を6mlずつフラクションコレクター (アドバンテック, 東京) で分取した。各フラクションのタンパク質濃度は280nmの吸光度あるいはTakara Bradford Protein Assay Kit (タカラバイオ (株), 滋賀) でモニターした。

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

溶出したタンパク質はSDS-PAGEで分析し<sup>8)</sup>、アクチン、ミオシンの挙動を調べた。

分子量マーカー (タカラバイオ (株), 滋賀 ;

ホスホリラーゼ *b* (PB) = 9.7万, 血清アルブミン (SA) = 6.6万, オボアルブミン (OA) = 4.4万, カルボニックアンヒドラーゼ (CA) = 2.9万, トリプシンインヒビター (TI) = 2万, リゾチーム (LZ) = 1.4万) を使用した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 0.6M KCl存在下で各種リン酸塩がアクトミオシンの挙動に与える影響

アクトミオシンにリン酸塩を添加せずに0.6M KCl存在下でSepharose CL-2Bカラムにかけ, 溶出物をSDS-PAGEで分析した結果をFig. 1 に示し

た。ミオシン重鎖 (分子量20万) とアクチンモノマー (分子量4.5万) はフラクションNo.16と一緒に検出された。また, 少量のミオシン重鎖とアクチンモノマーがそれぞれ単独でフラクションNo.25とフラクションNo.30に検出された。したがって, この条件では多くのアクトミオシンはアクチン, ミオシンに解離せずにカラムから溶出したと考えられた。

アクトミオシンに8 mM PYPを作用させたものを遠心分離して得た上清を, 0.6M KCl存在下でSepharose CL-2Bカラムにかけた結果, Fig. 1 ではアクトミオシンが検出されたフラクション

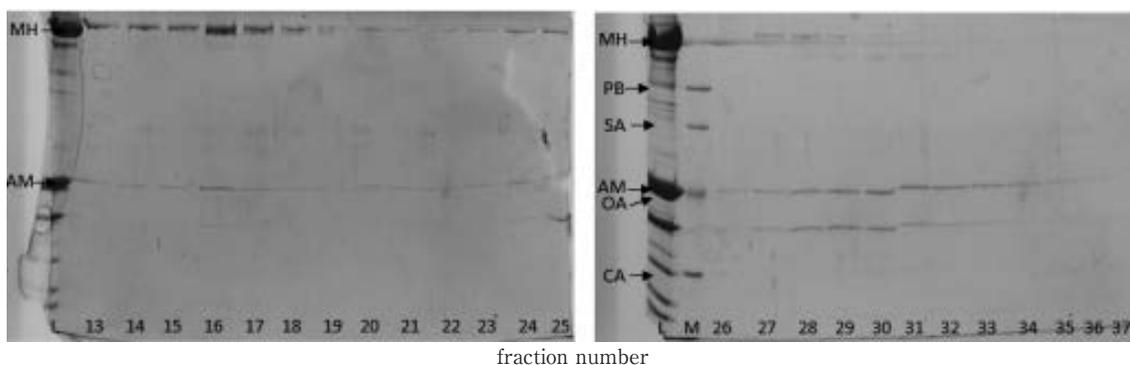


Fig. 1 SDS-PAGE of fractions eluted from a Sepharose CL-2B column on which supernatant of actomyosin treated with 0.6 M KCl was applied.

The column was equilibrated with 0.6K-solution (20 mM Tris-HCl (pH 7.2)/2 mM  $\text{NaN}_3$ /0.6 M KCl). W, whole actomyosin without centrifugation ; L, loaded sample ; M, molecular weight marker ; MH, myosin heavy chain ; AM, actin monomer ; PB, phosphorylase *b* ; SA, serum albumin ; OA, ovalbumin ; CA, carbonic anhydrase ; TI, trypsin inhibitor.

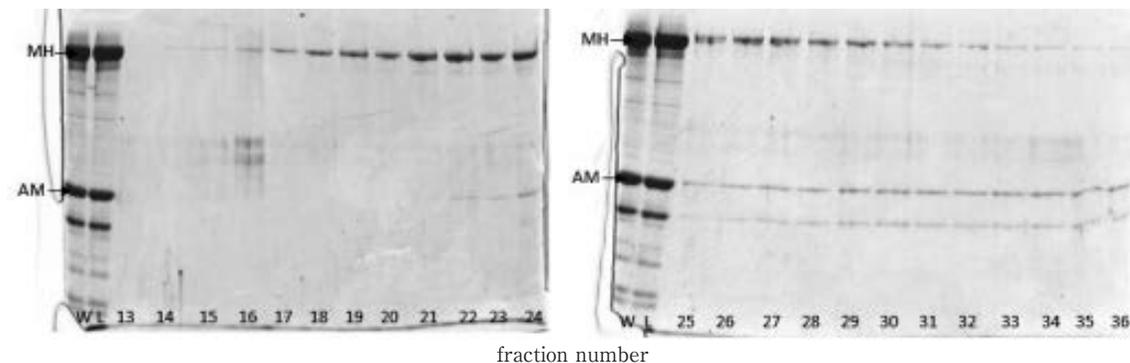


Fig. 2 SDS-PAGE of fractions eluted from a Sepharose CL-2B column on which supernatant of actomyosin treated with 0.6 M KCl and 8 mM PYP was applied.

The column was equilibrated with 0.6K-solution containing 8 mM PYP. Abbreviations on the pictures of gels are the same as those in Fig.1.

No.16には少量のミオシン重鎖が検出された。他方、多量のミオシン重鎖がフラクションNo.24に検出され、アクチンモノマーがフラクションNo.34に検出された (Fig. 2)。この結果は、粘度変化から推定されていたPYPによるアクトミオシンのアクチンとミオシンへの解離<sup>9)</sup>が分子の大きさの変化によって明確に示されたことを意味している。

アクトミオシンに8 mM IMPを作用させたものを遠心分離して得た上清を、0.6M KCl存在下でSephacryl CL-2Bカラムにかけた結果、フラクションNo.16には少量のアクトミオシンが検出され、フラクションNo.24とフラクションNo.34にミオシン重鎖とアクチンモノマーがそれぞれ分かれて検出された (図に示していない)。この結果より、IMPは溶解度の変化から推定されていた<sup>2)</sup>とおり、アクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることが明らかとなった。

アクトミオシンに8 mM TRPを作用させたものを遠心分離して得た上清を、0.6M KCl存在下でSephacryl CL-2Bカラムにかけた結果、フラクションNo.16にはほとんど何も検出されず、フラクションNo.24とフラクションNo.34にミオシン重鎖とアクチンモノマーがそれぞれ分かれて検出さ

れた (図は示していない)。この結果は、TRPがアクトミオシンをアクチンとミオシンに解離させることを明確に示している。

### 3.2 0.2M KCl存在下で各種リン酸塩がアクトミオシンの挙動に与える影響

アクトミオシンに8 mM PYPを作用させたものを遠心分離して得た上清を、0.2M KCl存在下でSephacryl CL-2Bカラムにかけた。Fig. 3に示したように、フラクションNo.16には何も検出されず、ミオシン重鎖とアクチンモノマーがフラクションNo.26とフラクションNo.33にそれぞれ分かれて検出された。この結果は、0.6M KCl存在下と同様に、0.2M KCl存在下でもPYPによりアクトミオシンがアクチンとミオシンに解離することを示している。同様に、アクトミオシンに8 mM IMPを作用させたときもアクチンとミオシンに解離した (図は示していない)。

他方、アクトミオシンに8 mM TRPを作用させたものを遠心分離して得た上清を、0.2M KCl存在下でSephacryl CL-2Bカラムにかけた結果、多くのミオシン重鎖とアクチンモノマーはフラクションNo.16と一緒に検出された (Fig. 4)。これは、0.2M KCl存在下では、TRPはアクトミオシンを解離させることなく、丸ごと溶解させること

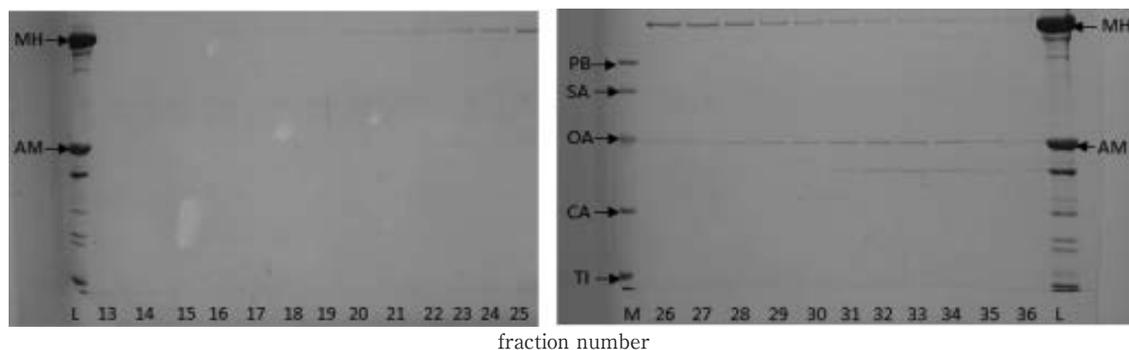


Fig. 3 SDS-PAGE of fractions eluted from a Sepharose CL-2B column on which supernatant of actomyosin treated with 0.2 M KCl and 8 mM PYP was applied.

The column was equilibrated with 0.2K-solution (20 mM Tris-HCl (pH 7.2)/2 mM  $\text{NaN}_3$ /0.2 M KCl) containing 8 mM PYP. Abbreviations on the pictures of gels are the same as those in Fig.1.

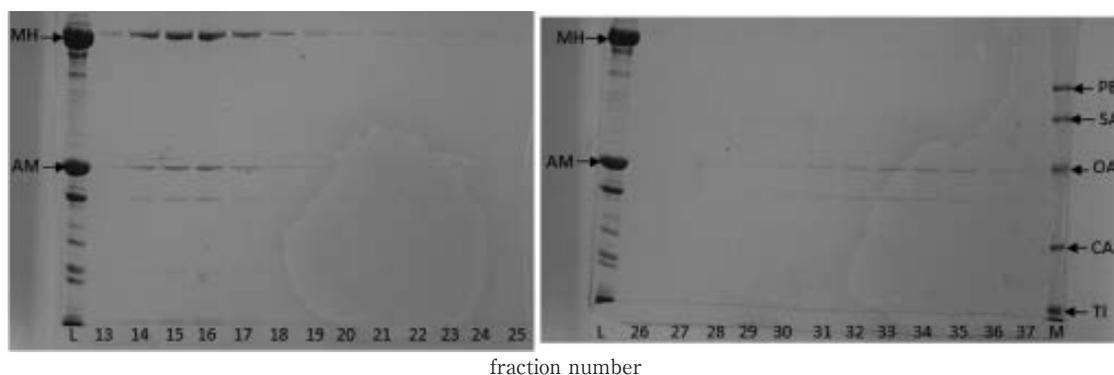


Fig. 4 SDS-PAGE of fractions eluted from a Sepharose CL-2B column on which supernatant of actomyosin treated with 0.2 M KCl and 8 mM TRP was applied. The column was equilibrated with 0.2K-solution containing 8 mM TRP. Abbreviations on the pictures of gels are the same as those in Fig.1.

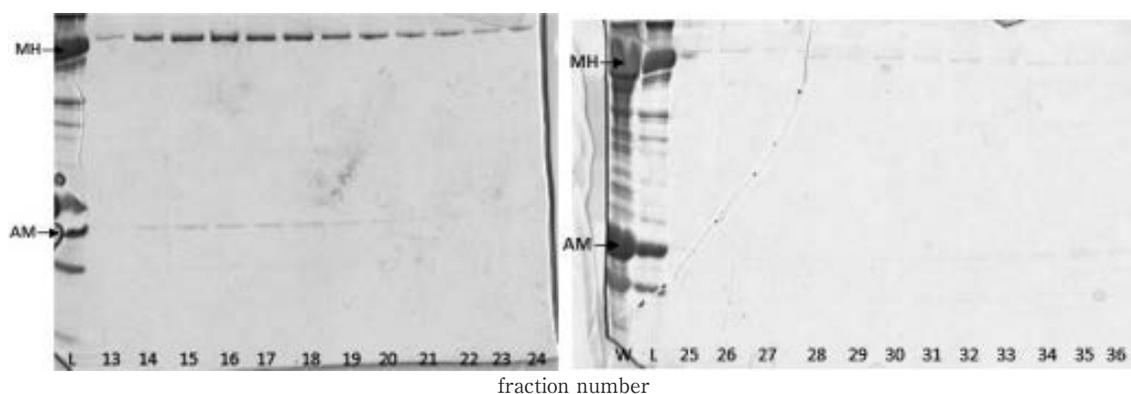


Fig. 5 SDS-PAGE of fractions eluted from a Sepharose CL-2B column on which supernatant of myofibrils treated with 0.2 M KCl and 8 mM PYP were applied. The column was equilibrated with 0.2K-solution containing 8 mM PYP. Abbreviations on the pictures of gels are the same as those in Fig.1.

を示している。

### 3.3 0.2M KCl存在下での各種リン酸塩による筋原線維からのアクトミオシンの遊離

筋原線維に 8 mM PYP を作用させたものを遠心分離して得られた上清を、0.2M KCl 存在下で Sepharose CL-2B カラムにかけた。その結果、Fig. 5 に示したように、ミオシン重鎖とアクチンモノマーはフラクション No.16 の同じ位置に溶出した。したがって、PYP は筋原線維からアクトミオシンを解離させることなく丸ごと遊離させることが判明した。これは、8 mM TRP を作用

させた場合も同じであった（図は示していない）。一方、8 mM IMP を作用させた場合は、フラクション No.13-36 には何も溶出しなかった（図は示していない）。これは、IMP は筋原線維からアクトミオシンを遊離させることができないことを示しており、先の報告<sup>4)</sup> に示された、アクトミオシンが筋原線維中に何らかの機構で拘束されており、PYP と TRP はその拘束を解除できるが、IMP は解除できないという推定を支持している。また、PYP と TRP は、食肉から Weber-Edsall 溶液で抽出された、つまり、すでに遊離しているアク

トミオシンをアクチンとミオシンに解離させることができる (Fig. 2)。しかし、筋原線維中から両者によって遊離してきたアクトミオシンは、それらによってもアクチン、ミオシンに解離されないため、両タンパク質間には、タガのようなもう一つ別の結合があることが示唆される。

#### 4. 要 約

各種リン酸塩が遊離のアクトミオシンあるいは筋原線維に組み込まれたアクトミオシンを解離させるかどうかをゲル浸透クロマトグラフィーとSDS-PAGEで調べた。0.6M KCl下で溶解しているアクトミオシンを0.6M KClで平衡化したSepharose CL-2Bカラムにかけた結果、多くのミオシン重鎖とアクチンモノマーはフラクションNo.16の位置と一緒に検出された。したがって、アクトミオシンは解離していないことが示された。0.6M KCl下で8 mM PYP, TRP, IMPで処理したアクトミオシンの遠心上清をカラムにかけた結果、いずれも、フラクションNo.16には少量のタンパク質のバンドしか検出されず、ミオシン重鎖とアクチンモノマーがフラクションNo.24とフラクションNo.34にそれぞれ分かれて検出された。したがって、これら3種のリン酸塩によりアクトミオシンは解離したことが示された。また、0.2M KCl下で8 mM PYPとIMPで処理したアクトミオシンの上清をかけたときには、ミオシン重鎖とアクチンモノマーがフラクションNo.26とフラクションNo.33にそれぞれ分かれて検出された。一方、TRPではミオシン重鎖とアクチンモノマーのほとんどがフラクションNo.16と一緒に検出された。したがって、PYPとIMPはアクトミオシン

を解離させるが、TRPはアクトミオシンを解離させずに丸ごと溶解させると考えられた。さらに、0.2M KCl下で筋原線維に各種リン酸塩を作用させて、上清をカラムにかけた結果、PYPとTRPではミオシン重鎖とアクチンモノマーはフラクションNo.16と一緒に検出されたが、IMPでは何も検出されなかった。以上の結果より、PYP, IMPは0.6Mおよび0.2M KCl下ではアクトミオシンを解離させるが、TRPは0.6M KCl下でのみアクトミオシンを解離させることが判明した。また、PYPとTRPは0.2M KCl下でアクトミオシンを筋原線維中の拘束から外す作用を有しているが、筋原線維から遊離したアクトミオシンにはPYPとTRPによってもはずれない、タガのような別の結合があるためにアクチンとミオシンに解離しないと考えられた。

#### 文 献

- 1) 山本克博：肉の機能と科学，朝倉書店，134～160，2015。
- 2) Okitani, A., Ichinose, N., Koza, M., Yamanaka, K., Migita, K., Matsuishi, M. : *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **72**, 2005～2011, 2008.
- 3) Nakamura, Y., Migita, K., Okitani, A., Matsuishi, M.: *Animal Science Journal*, **85**, 595～601, 2014.
- 4) Matsuishi, M., Tsuji, M., Yamaguchi, M., Kitamura, N., Tanaka, S., Nakamura, Y., Okitani, A. : *Animal Science Journal*, **87**, 1407～1412, 2016.
- 5) Gergely, J. : *Journal of Biological Chemistry*, **220**, 917～926, 1956.
- 6) Szent-Györgi, A. : Myosin, actin and actomyosin-myosin B. In "Chemistry of Muscular Contraction," Academic Press, New York, pp.146-152, 1951.
- 7) Yang, R., Okitani, A., Fujimaki, M. : *Agricultural and Biological Chemistry*, **34**, 1765～1772, 1970.
- 8) Laemmli, U. K. : *Nature*, **227**, 680～685, 1970.
- 9) Yasui T., Fukazawa T., Takahashi K., Sakanishi M., Hashimoto Y. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **12**, 399～404, 1964.

# 食肉加工品添加物，亜硝酸塩によるメタボリック シンドローム改善作用の解明

Molecular mechanisms underlying beneficial effects of nitrites ameliorating  
metabolic syndromes

宮 本 理 人

(徳島大学大学院医歯薬学研究部医薬品機能生化学分野)

Licht Miyamoto

(Medical Pharmacology, Inst. of Biomedical Sciences, Tokushima University)

Nitrites substantially exist in our daily foods like processed meats and vegetables. Recent studies have demonstrated beneficial effects of dietary nitrite against cardiovascular diseases. We have previously reported blood pressure lowering and glomerular protective actions of nitrite by reductive conversion into nitric oxide. In the current study, we further studied metabolic consequences of the oral administration of nitrite to clarify metabolic effects of dietary nitrite.

Sodium nitrite was administrated to male Wistar rats and ddY mice in drinking water for one, two or four weeks with high fat diet (HFD). In addition, we analyzed molecular effects of nitrite stimulation on cells in culture.

The dietary nitrite ameliorated glucose tolerance with increase in insulin sensitivity. Body weight was slightly decreased by administration of nitrite after two-weeks without changing food intake, suggesting increase in energy consumption. Fasting plasma triglyceride level was decreased. Lipogenic genes including SREBP1c were down-regulated in the livers from nitrite-treated animals. Thus, dietary nitrites should suppress lipogenesis.

In human glomerular endothelial cells, we found that nitrites activate eNOS dependently on 5'AMP-activated protein kinase (AMPK), which is a master regulator of intracellular energy status. Stimulation by nitrites activated AMPK also in hepatic cells with suppressing acetyl-coA carboxylase, a typical substrate of AMPK catalyzing fatty acid synthesis. Therefore, nitrites are supposed to ameliorate glucose and lipid metabolism through AMPK at least in part.

Furthermore, we hypothesized involvement of endocrinological effects because of metabolic profiles of nitrite-treated animals. We observed change in plasma levels of hormone A in these animals. Nitrite stimulation also altered secretion levels of hormone A producing endocrine cells. We did not find any difference in the down-stream signals of the receptor for hormone A. Thus, nitrites should improve metabolism by controlling endocrine systems as well as AMPK activation.

In conclusion, we suggest that dietary nitrite ameliorates glucose and lipid metabolism through AMPK activation as well as endocrinological regulation. Facilitation of eNOS-

dependent and-independent nitric oxide production should mediate vasoprotective action of nitrites, which may be beneficial to metabolism as well.

## 1. 目 的

亜硝酸塩は食肉加工品を中心に現在極めて多くの食品に添加されている。亜硝酸塩は赤みのある色調保持のみならず、風味を安定させ、ポツリヌス菌繁殖を抑えるなど、食肉加工品の製造、保存、流通のうえで欠かせない利点を有しているが、発がん性物質の一つである、ニトロソアミン生成の原因となるとして消費者から敬遠される物質の一つにもなっている。一方で、我々を含む複数のグループから近年、経口摂取された亜硝酸塩が血管保護作用を有する一酸化窒素 (NO) に生体内に変化することが報告され、亜硝酸塩の有用性が急速に注目を浴びている。実際、海外では亜硝酸塩の循環器系への有用性を目的とした複数の臨床試験が開始されている。

我々は亜硝酸塩の血管保護作用に関する解析を様々な実験系を用いて解析していく中で、メタボリックシンドローム様の代謝異常を呈する病態モデル動物において糖代謝、脂質代謝の双方を明らかに改善することを見出した。高齢化社会の進行とともに糖尿病、脂質異常症などを含め、メタボリックシンドロームの病態を呈する患者数が我が国をはじめ、多くの国々で急速に増加している。食肉加工品や野菜のように、亜硝酸塩を多く含む食品の日常的な摂取がこれらメタボリックシンドロームの病態改善、および、予防に有用であればその社会的意義も極めて大きいと期待される。

本研究では、経口摂取される亜硝酸塩のメタボリックシンドローム様病態改善効果とその分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、細胞レベル、個体レベル双方の観点から解析を行った。

## 2. 方 法

メタボリックシンドロームの病態モデル動物として、3週間高脂肪食を負荷することにより、耐糖能異常、肥満、および、軽度の脂質異常症などの代謝異常を呈した雄性WistarラットあるいはddYマウスを用いた。亜硝酸塩として、亜硝酸ナトリウムを用い、主に飲水中に添加することにより経口摂取させた。投与期間は1, 2ないし、4週間とした。細胞系として、ヒト正常腎糸球体由来血管内皮細胞 (HGEC) を用いたほか、骨格筋の培養細胞モデル系として、筋管様に分化させたC2C12細胞、肝臓の培養細胞モデル系として、Fao細胞および、ラット初代培養肝実質細胞を用いた。さらに、後述する内分泌に対するモデル細胞を解析に用いた。

遺伝子発現量の変化ならびにリン酸化修飾はウエスタンブロッティングないし、リアルタイムPCRによるmRNA量の解析により検討した。耐糖能は経口糖負荷試験により評価した。その他、一般的な代謝学研究に用いられる実験手法に準じて評価を実施した。

## 3. 結果と考察

高脂肪食負荷マウスおよびラットに対し、亜硝酸塩の経口負荷を行うと、空腹時血中中性脂肪値、および、耐糖能の改善が認められた。これらの改善は投与開始後1週目からおおむね認められ、4週目までは少なくとも維持された。このとき、インスリン負荷試験時の血糖推移が低下していたことから、耐糖能改善にはインスリン感受性の亢進が関与することが示唆された。なお、2週間以上の投与を続けると高用量群において若干の体

重低下が認められたが、このとき摂餌量に影響はなく、エネルギー消費量の増大が示唆された。血中中性脂肪値が低下していたことから、肝臓における脂質代謝に関わる遺伝子発現量を評価したところ、脂肪酸酸化に関わる遺伝子群への亜硝酸塩の影響は認められなかったが、SREBP1cをはじめとする、脂質合成系に関わる遺伝子群の発現量低下が認められ、食餌性の亜硝酸塩負荷により、脂質合成の抑制が生じることが明らかとなった。

亜硝酸塩はNO合成酵素非依存的に還元、もしくは不均化反応によりNOに変換され、血管および臓器保護的に働くことが示されてきた (Fig. 1)。また、NOを介した作用は糖脂質代謝の観点からも有益であると考えられる。そこで、次にHGECを用い、NO代謝および作用に関わるさまざまな検討を実施した。その結果、亜硝酸塩は血管内皮細胞におけるNO合成酵素、eNOSのリン酸化を促進し、eNOSの活性を促進する作用を併せ持つことを見出した。このとき、エネルギー代謝調節に関わる分子である、5'AMP-activated protein kinase (AMPK) の活性化が生じること、および、eNOSのリン酸化はAMPK阻害薬により抑制されることから、亜硝酸塩は血管内皮細胞におけるAMPK-eNOSシグナルを促進し、eNOS依存的なNO産生も増強していることが明らかと

なった。よって、亜硝酸塩はeNOS依存的、非依存的、双方のメカニズムにより、NOの増大を引き起こし、血管や臓器の保護、ならびに、代謝改善に寄与していると考えられる (Fig. 2)。

AMPKは肝臓や骨格筋などの組織においては細胞内のエネルギー代謝調節を行うだけでなく、全身の糖脂質代謝にも大きな影響を与えている。そこで、亜硝酸塩がこれらの組織においてもAMPKを介した代謝制御に関わるかどうかを培養細胞系を用いて検討した。分化C2C12細胞において、亜硝酸塩刺激によるAMPK活性化は弱いものの認められ、Fao細胞においてはより顕著に認められた。さらに、AMPKの代表的な基質であり、脂肪酸合成に関わるacetyl-CoA carboxylaseのリン酸化亢進も同時に認められた。よって、亜硝酸塩によるAMPK依存性シグナルの活性化は血管内皮細胞のみならず、肝実質細胞などの糖脂質代謝制御に影響の大きい細胞系においても生じることが明らかとなった。以上より、亜硝酸塩は肝臓や骨格筋などの末梢組織におけるAMPK活性化を介し、インスリン感受性の亢進、耐糖能改善、血中中性脂肪値低下などの糖脂質代謝改善作用を引き起こしている可能性が明らかとなった (Fig. 2)。

個体レベルの解析結果より、亜硝酸塩は末梢組

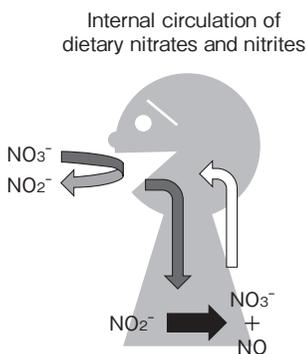


Fig. 1 NOS-independent production of NO from nitrites and nitrates

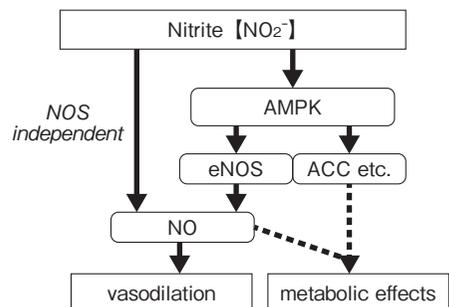


Fig. 2 Possible molecular mechanisms of AMPK-dependent metabolic actions of nitrites

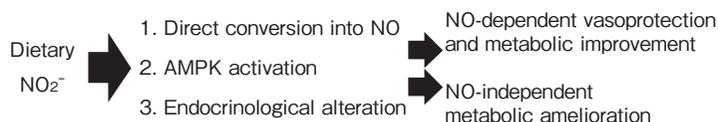


Fig. 3 Summary of our findings on the metabolic regulations by dietary nitrites

織におけるAMPK活性化のみならず、インスリン以外のなんらかの内分泌系への影響を介した効果が考えられた。そこで、亜硝酸塩投与後の糖脂質代謝制御に関わるホルモンAの血中レベルを評価したところ、変動していることが判明した。ホルモンAを分泌する内分泌細胞の培養細胞モデル系を用い、亜硝酸塩による刺激を行ったところ、培養液中に分泌されるホルモンAの濃度に同様の変化が認められた。一方、ホルモンAの標的組織の培養細胞モデル系に対し、亜硝酸塩による刺激を行ったが、ホルモンAに対する受容体下流のシグナルに対する影響は認められず、さらに、ホルモンAと同時に亜硝酸塩刺激を行っても、同様になんら影響は認められなかった。よって、亜硝酸塩はホルモンAの作用自体に影響することなく、ホルモンAの内分泌系に作用することで糖脂質代謝を改善する可能性を新たに見出した。これまでの解析結果を考慮すると、AMPKとホルモンAはいずれも個体レベルで生じた糖脂質代謝改善作用に関わっているものと考えられる (Fig. 3)。亜硝酸塩がホルモンAの分泌、あるいは産生を調節する機構に関しては今後の課題であり、現在検討を進めている。

#### 4. 要 約

本研究の結果、亜硝酸塩の経口摂取による糖脂質代謝改善作用を再確認するとともに、その分子メカニズムとしてAMPK活性化の重要性が強く示唆された。亜硝酸塩はAMPK活性化を介し、eNOS依存性のNO産生を増強することや、肝臓、

骨格筋などの糖脂質代謝を促進することにより、メタボリックシンドローム様の病態を改善すると考えられる。この時の血中脂質指標の改善にはAMPK依存性の脂質合成系抑制が主に寄与していると思われる。さらに、亜硝酸塩は内分泌系に作用し、生体内ホルモンレベルを制御することにより、糖脂質代謝を改善する作用も有していることが明らかとなった。本研究により、亜硝酸塩摂取の健康維持、増進効果の一端が明らかとなり、食肉加工品や野菜など、亜硝酸塩を多く含む食品の安心につながるものと期待している。

#### 参考文献

- 1) 宮本理人：血管関連疾患治療標的としてのAMPKの可能性, AMPK as a therapeutic target for vascular diseases, 血管, 39(3), 93~100, 2016. (invited review)
- 2) 宮本理人：多角的アプローチによる新規生活習慣病治療戦略の開発研究, Yakugaku Zasshi (薬学雑誌), 136(5), 751~9, 2016. (invited review), Doi10.1248/yakushi.15-00251
- 3) 宮本理人：メタボローム解析から見た運動療法による代謝改善メカニズムにおけるAMPK活性化の意義, 内分泌・糖尿病・代謝内科, 第41巻, 第5号(2015年11月号), 354~360, 2015. 特集/代謝疾患とメタボローム (invited review)
- 4) Miyamoto, L.: Can Food Factors Provide us with the Similar Beneficial Effects of Physical Exercise? *Food Sci. Biotechnol.*, 25(S), 9~13, 2016. (invited review)
- 5) Miyamoto, L.: Significance of 5'AMP-activated protein kinase inmetabolomic regulation by skeletal muscle contraction, *J Phys Fitness Sports Med.*, 4(1), 93~102, 2015. (invited review)
- 6) Miyamoto, L., Egawa, T., Oshima, R., Kurogi, E., Tomida, Y., Tsuchiya, K., Hayashi, T.: AICAR stimulation metabolome-widely mimics electrical contraction in isolated rat epitrochlearis muscle, *Am J Physiol-Cell Physiol.*, 2013; 305(12): C1214-22.

# トリプトファン添加による有害細菌の増殖抑制ならびに不活化： 食肉および加工品製造工程における活用と作用メカニズムの解明

Bacterial control by using tryptophan: Application to meat and meat products processing and investigation of its reaction mechanism

小 関 成 樹

(北海道大学大学院農学研究院)

Shigenobu Koseki

(Research Faculty of Agricultural Science, Hokkaido University)

We previously reported that D-Tryptophan exhibits adverse physiological effects on bacterial physiology under osmotic stress. However, underpinning working mechanism of D-tryptophan as an inhibitor and/or incompatible solute of bacterial growth has not yet been investigated in detail. The present study firstly aimed at clarifying the effect of osmotic pressure induced by different osmolytes such as sodium chloride (NaCl), potassium chloride (KCl), and sucrose. Even at the same level of osmotic pressure, D-Tryptophan with NaCl significantly inhibited growth of *Escherichia coli* the most, compared with KCl and sucrose. Because the bacterial growth inhibition effect of D-tryptophan with NaCl showed the most effectively, we determined the optimum concentration combination of D-tryptophan and NaCl. Growth inhibition/no growth inhibition boundary conditions as a function of D-tryptophan and NaCl concentrations was clarified by a logistic regression model. We quantified that the minimum level of NaCl was 2.5% w/v for *E. coli* growth inhibition with 40 mM D-tryptophan. The higher NaCl concentration, the lower D-tryptophan concentration was needed. The developed logistic regression model enabled us to set the condition of concentrations that need to inhibit bacterial growth. Furthermore, we examined the effect of working temperature ranging from 15 to 46°C on the bacterial growth inhibition induced by D-tryptophan. The higher the reaction temperature, the more rapidly viable *E. coli* numbers were decreased. This phenomena trend would be attributed to activation of physiological metabolism under the optimum growth temperature. The results obtained in the present study would significantly contribute to the development of a novel bacterial growth control strategy using D-tryptophan.

## 1. 目 的

近年、世界的にも消費者は安全性だけでなく、食品素材の持つ機能性・食感・香り等を保持した最小加工食品を望んでいる。しかしながら、この

ような食品は従来製法の加工食品に比べ、加熱・加工強度が低いことから微生物学的な安全性を安定的に確保することが難しい。その結果、必然的に消費期限を短く設定せざるを得ない。消費期限の短い食品は、短期間で消費が求められるが、

必ずしも適切に流通・消費されないために、結果として大量の廃棄を生み出す食品ロスの一要因として世界中で大きな社会問題になっている。

食品ロスを低減するための、新たな微生物制御方法として、本研究では細菌のストレス応答時の「適合溶質」の細胞質内への取り込みに注目した。細菌細胞が浸透圧ストレスなどを受けた際に、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 等のイオン性物質の取り込みなどに加えて、グリシンバタインやプロリンなどのアミノ酸を適合溶質として取り込むことで細胞内の浸透圧やpHなどの恒常性維持に重要な役割を果たしていることが知られている。一方で、正常に適合溶質として作用する物質以外の取り込みが誤って起きた場合には、代謝阻害を誘導することが報告されている<sup>1-3)</sup>。このような物質は「非適合溶質」と呼ばれている<sup>4)</sup>。

細菌細胞が浸透圧ストレスに応答して、誤って適合溶質として機能しない非適合溶質を取り込むことによって、代謝阻害を誘導し、結果として増殖を抑制する、との仮説のもとに非適合溶質として報告のあるD-トリプトファン<sup>5)</sup>の細菌増殖抑制効果を明らかにして、新たな微生物制御技術の開発を目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 供試細菌

*Escherichia coli* (ATCC 25922) を Tryptic Soy Broth 中で 37°C、24 時間の前培養を 3 回繰り返して、定常期に達した均一な細菌を用いた。本菌株は米国食品・医薬品安全局 (US Food and Drug Administration) が抗菌試験用標準菌株として採用している。

### 2.2 浸透圧ストレスがD-トリプトファンに

よる *E. coli* の増殖抑制に及ぼす影響の解明

Peptone Yeast Glucose (PYG) 培地を基礎培地として、種々の塩化ナトリウム、塩化カリウム、

シヨ糖濃度を用いて調整することで種々の浸透圧を有する環境を作成し、(1) で調製した *E. coli* を接種して増殖挙動を検討した。PYG 培地の浸透圧を 2.5MPa、3.4MPa、および 4.2MPa の 3 条件に上記の 3 種類の溶質を用いてそれぞれ調整した。各物質にて浸透圧調製した PYG 培地に D-トリプトファンを 40mM 添加して 25°C における *E. coli* の増殖抑制効果を検討した。96 穴マイクロプレート<sup>6)</sup>の各ウェルに、各条件の試料培地を 180  $\mu\text{L}$  ずつ分注した後、*E. coli* 液を 20  $\mu\text{L}$  ずつ接種した。調製したマイクロプレートを 25°C に設定したマイクロプレートリーダー (BIO-RAD Laboratories 製 iMark) に設置し、10 分ごとに 120 時間 595nm における吸光度を自動的に連続測定し、増殖挙動とした。

### 2.3 NaCl および D-トリプトファン濃度を環境要因とする *E. coli* の増殖限界予測モデルの開発

PYG 培地を基礎培地として、NaCl 濃度 (2-5% w/v)、D-トリプトファン濃度 (0-40mM) の種々の組み合わせ条件の培地を作成し、(1) で調製した *E. coli* を接種して 25°C における増殖挙動を前述 (2) と同様に検討した。120 時間培養後における吸光度変化が 0.05 以上の場合に増殖と判定し、それ以下では非増殖と判定した。

同一の実験を 5 回反復して行い、増殖抑制/増殖を判定した結果を、二値変数に対する多変量解析手法の一つであるロジスティック回帰分析により、NaCl 濃度と D-トリプトファン濃度を説明変数とする以下の式によりモデル化した。

$$\log\left(\frac{P}{1-P}\right) = \text{Logit}(P) \\ = a_1 + a_2 \text{Salt} + a_3 \text{DTrp} + a_4 \text{Salt} \times \text{DTrp} \quad (1)$$

ここで、 $P$  は増殖を抑制する確率を、 $\text{Salt}$  は NaCl 濃度を、 $\text{DTrp}$  は D-トリプトファン濃度を、 $a_i$  は推定パラメータをそれぞれ表す。パラメータの推定には統計解析環境 R (Ver. 3.1.5) の glm を

用いた。

#### 2.4 D-トリプトファンによる*E. coli*の増殖抑制効果の温度依存性

PYG培地を基礎培地として、NaCl濃度を3.0%、5.0%の2段階とし、D-トリプトファン濃度40mM環境下において、15℃、25℃、37℃、43℃、および46℃の5段階における*E. coli*の増殖抑制効果を検討した。5日間の培養期間中の*E. coli*の生菌数をTryptic Soy Agerを用いた寒天平板表面塗抹法にて、毎日計測した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 浸透圧ストレスがD-トリプトファンによる*E. coli*の増殖抑制に及ぼす影響

NaClによって浸透圧調製をした場合には2.4MPa以上の浸透圧条件下で、D-トリプトファンの添加により*E. coli*の増殖を完全に抑制できた (Fig. 1a)。一方で、同一の浸透圧条件下においても、KClおよびショ糖によって浸透圧調製した場合には、D-トリプトファン添加による*E. coli*の増殖抑制効果が顕著ではなかった (Fig. 1b, 1c)。特にショ糖では4.2MPaの高浸透圧条件下においても、*E. coli*の増殖を完全に抑制できなかった。

この結果は、D-トリプトファンの作用が浸透

圧のみに依存していないことを示していた。同一浸透圧条件において、NaClで浸透圧調製した場合にのみ、高い増殖抑制効果を示したことから、浸透圧上昇に伴い細菌の生体膜のNa<sup>+</sup>ポンプが作動して<sup>5)</sup>、それに伴いD-トリプトファンを細胞質内に取り込み、増殖抑制効果を発現していると考えられる。今後、より詳細に作用機序を解明するためには、生体膜のNa<sup>+</sup>ポンプの活性を支持する遺伝子発現量等の解析が必要である。

#### 3.2 NaClおよびD-トリプトファン濃度を環境要因とする*E. coli*の増殖限界モデルの開発

実験結果を増殖抑制 (○) / 増殖 (×) として評価し、NaCl濃度とD-トリプトファン濃度との関係をFig. 2に示した。D-トリプトファン濃度が40mMの際はNaCl濃度が2.6%以上、NaCl濃度5.0%の際はD-トリプトファン濃度が25mM以上であれば*E. coli*の増殖を完全に抑制した。

式 (1) のロジスティック回帰分析の結果より、増殖確率の変化が示され、境界条件を見出すことができた。これにより、*E. coli*増殖抑制に必要なD-トリプトファン濃度とNaCl濃度との組み合わせを容易に設定可能とした。両物質濃度の組み合わせによって増殖抑制効果が劇的に変化するが、

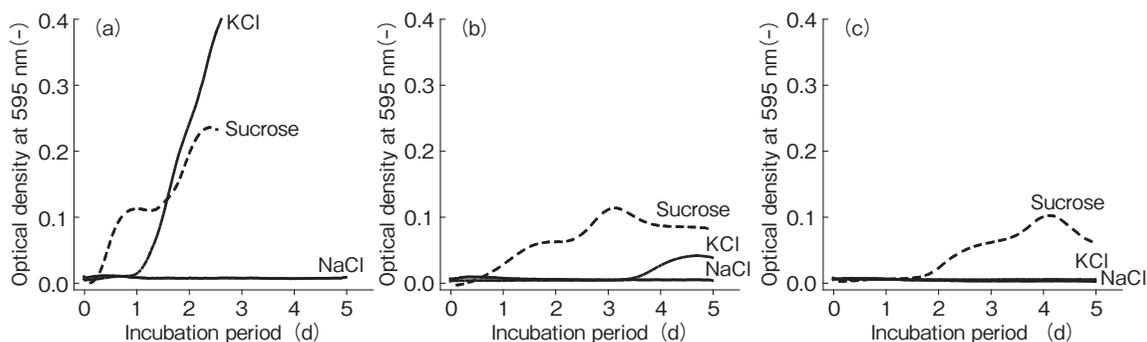


Fig. 1 Effect of osmotic pressure (a) 2.5 MPa, (b) 3.4 MPa, (c) 4.2 MPa adjusting by sodium chloride (solid line), potassium chloride (dotted line), and sucrose (dashed line) on the growth inhibition of *Escherichia coli* with 40 mM D-tryptophan. Results are mean values of triplicate trials.

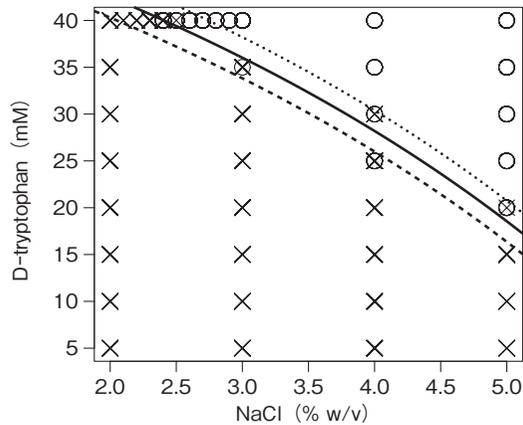


Fig. 2 Growth inhibition (○)/ no growth inhibition (×) boundary for *E. coli* in PYG under various concentration combinations of sodium chloride and D-tryptophan at 25°C incubation for 5days. The ○ and × represents growth inhibition and no growth inhibition in all three triplicate experiments, respectively. The model predictions from Eq. (1) were compared with the data used to generate the model, to determine the effect of sodium chloride concentration and D-tryptophan concentration during 25°C incubation on the potential for the inhibition of *E. coli* growth at three levels of probability :  $P=0.1$ ,  $P=0.5$ , and  $P=0.9$ . The interface with  $P=0.5$  (that is, a 50% probability of recovery) is indicated by the solid lines. The dotted and dashed lines represent the predictions at  $P=0.1$  (that is, a more conservative estimate) and  $P=0.9$  (that is, a less conservative estimate), respectively.

これは *E. coli* が一定以上の浸透圧ストレスと NaCl 濃度に応答して、迅速に周囲の D-トリプトファンを取り込むことが原因と考えられる。

### 3.3 D-トリプトファンによる *E. coli* の増殖抑制効果の温度依存性

Fig. 3 に生菌数の対数変化量の経時変化を示した。D-トリプトファン添加条件では、NaCl 濃度および保存温度によらず、*E. coli* の増殖を完全に抑制することが確認された。特に保存温度 25°C 以上では、NaCl 濃度 3.0% 環境下では 43°C で 5 日目に、46°C で 3 日目に *E. coli* は検出限界以下にまで減少した。また、NaCl 濃度 5.0% 条件では、46°C において 3 日目から *E. coli* は検出限界以下にまで減少した (Fig. 4)。

一方、D-トリプトファンを添加しない条件下においては、NaCl 濃度 3.0% では保存温度による

増殖速度に差はあるがいずれの温度においても *E. coli* は増殖した。NaCl 濃度 5.0% 条件において、25°C および 37°C では *E. coli* は増殖したが、15°C、43°C と 46°C では増殖しなかった。

これらの結果は、温度上昇に伴い *E. coli* の代謝活性が高まることによって、D-トリプトファンの細胞内への取り込みも活発になり、増殖抑制効果も高まったものと考えられる。*E. coli* の代謝活性が最も高まる 37°C から 43°C の温度帯よりも 46°C の死滅速度が高いことに関しては、NaCl による浸透圧ストレス、D-トリプトファンの取り込みに加えて温度ストレスが加わり、相乗効果によって *E. coli* を死滅させる効果となり、43°C よりも高い効果を発揮したと考えられる。

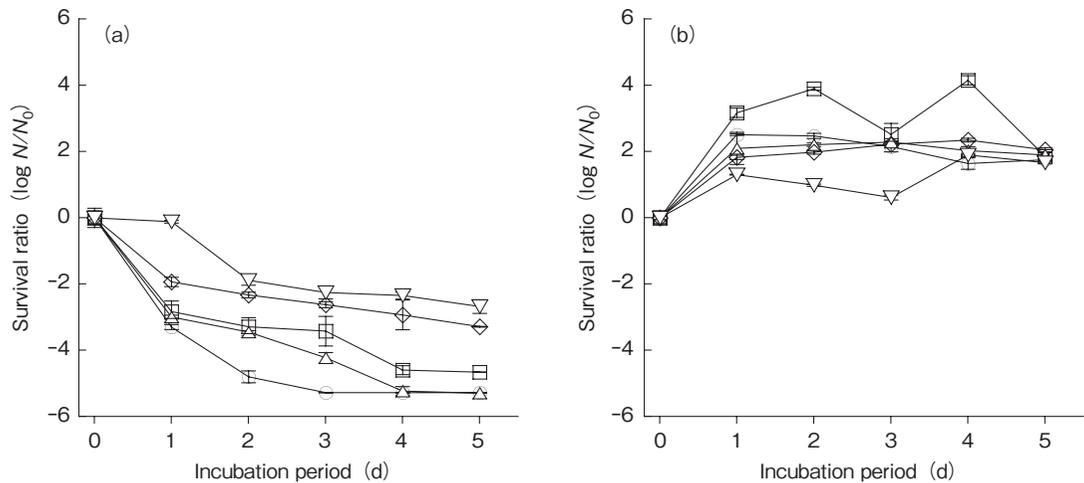


Fig. 3 Changes in the number of viable *E. coli* in PYG broth containing 3.0% sodium chloride with (a) or (b) without 40 mM D-tryptophan at 15(▽), 25(◇), 37(□), 43(△) and 46°C(○) for 5 days. Results are mean values with standard errors of triplicate trials.

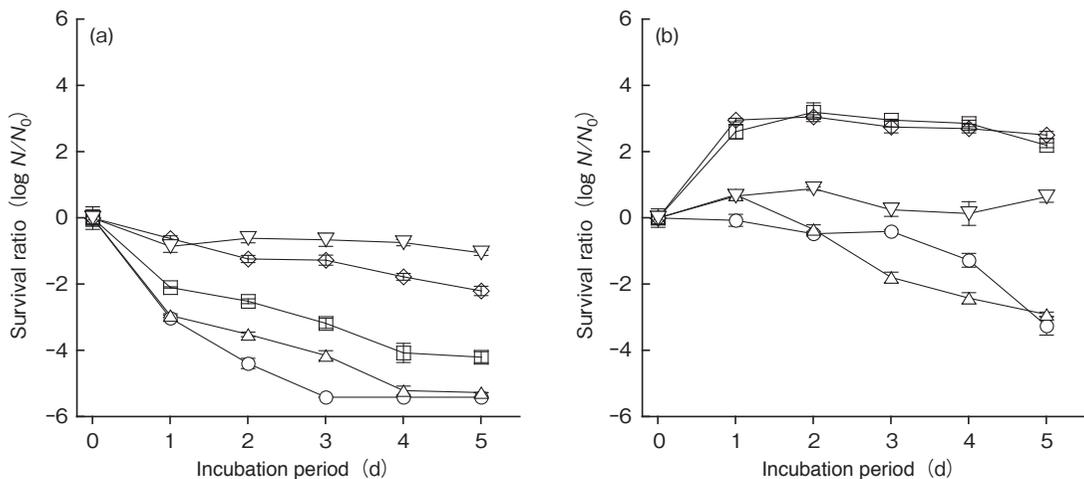


Fig. 4 Changes in the number of viable *E. coli* in PYG broth containing 5.0% sodium chloride with (a) or without (b) 40 mM D-tryptophan at 15(▽), 25(◇), 37(□), 43(△) and 46°C(○) for 5 days. Results are mean values with standard errors of triplicate trials.

#### 4. 要 約

本研究では、食品の安全性・保存性向上を目指して、新たな微生物制御技術の開発を最終的な目的とし、D-トリプトファンによる*E. coli*の増殖抑制効果に関する基礎的な検討を行った結果、以下の3点を明らかにした。

- 1) D-トリプトファンによる*E. coli*の増殖抑制効果は浸透圧ストレスのみによって誘導されるものでなく、NaCl濃度が重要な役割を果たしている。
- 2) NaCl濃度、D-トリプトファン濃度を説明変数とする、*E. coli*増殖限界予測モデルを構築し、効果発現に必要な濃度条件の組み合わせを探索

可能とした。

- 3) D-トリプトファンの取り込みによって *E. coli* は死滅し、その死滅速度は温度依存性が明確で、増殖の至適温度付近で最大の死滅速度になる。

#### 文 献

- 1) Beales, N. : Adaption of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress : A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **3**, 1~20, 2004.
- 2) Shahjee, H. M., Banerjee, K., Ahmad, F. : Comparative analysis of naturally occurring L-amino acid osmolytes and their D-isomers on protection of *Escherichia coli* against environmental stresses, *Journal of Bioscience*, **27** (5), 515~520, 2002.
- 3) Sasaki, H., Takaki, A., Oshima, A., Ishida, A., Nagata, S. : Comparison of the function of L- and D-proline as compatible solute in *Escherichia coli* K-12 under high osmolarity, *Annals of Microbiology*, **57** (2), 265~268, 2007.
- 4) Koseki, S., Nakamura, N., Shiina, T. : Growth Inhibition of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica*, and *Escherichia coli* O157 : H7 by D-Tryptophan as an Incompatible Solute, *J. Food Prot.* **78**, 819~824, 20150
- 5) Held, C., Neuhaus, T., Sadowski, G. : Compatible solutes : Thermodynamic properties and biological impact of ectoines and prolines, *Biophysical Chemistry*, **152**, 28~39, 2010.

# 新規アクチン結合タンパク質から豚肉の柔らかさの 要因に迫る

Understanding of factors involved in pork meat tenderness through  
analysis of a novel actin-binding protein

灘 野 大 太

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Daita Nadano

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Tenderness has been regarded as one of the most important meat quality traits for eating quality. Nonetheless, it is difficult to improve meat tenderness by traditional breeding methods. Genome wide association studies have recently been conducted to obtain information for the improvement and identified one gene as a candidate affecting the tenderness of pork meat. Because the molecular mechanisms regulating meat tenderness remain unknown, we analyzed the translated product of the gene in the present study. cDNA encoding the gene product was obtained by reverse transcription-polymerase chain reaction and subcloned into the vectors for the expression of the tagged protein in mammalian cells. The expression vectors were introduced into cultural cells by transient transfection. Expression of the tagged protein in these cells was confirmed by immunoblotting with anti-tag antibody. Intracellular localization of the protein was examined by immunocytochemistry of the transfected cells. The protein was detected strongly in the peripheral region of the cell. Since our preliminary data have implicated this protein as an actin-binding protein, co-staining of this protein with cytoskeletons was performed. This protein was not obviously colocalized with cytokeratins or microtubules and was colocalized with actin microfilaments near the inner surface of plasma membrane. This protein was not colocalized with stress fibers, thick actin filaments in the cytoplasm. Therefore, although this protein has an ability to bind to filamentous actin, the binding activity seems to be strictly controlled within the cell, which is considered to provide a new insight into the functions and importance of this protein.

## 1. 目 的

食品における「おいしさ」は甘味、塩味といった味覚や香りなどの化学的特性とならんで食感(テクスチャー)、外観、温度などの物理的特性によって決定される。食肉を含む固体(および半固

体)において、歯触り、舌触り、のど越しといった食感が重要とされており、たとえば湿気を帯びたせんべいがおしくいただけないなど身近でよく理解できるところである。

おいしさの物理的特性を支えるとされる食感について、本研究の主対象である食肉に焦点をあて

ると、測定可能な食感パラメーターの中で特に柔らかさは、ステーキ等の褒め言葉として普通に使われているように直接的かつ印象的に消費者の感興に訴える力があり、食肉製造における新製品の開発や販売戦略における成功のカギとなる<sup>1)</sup>。柔らかさについては市販の物性測定装置を用いて正確かつ簡便に定量化が可能になった一方で、そもそもの食肉の素材自体の柔らかさを決定づける牛・豚・鶏等の内在性因子の種類と重要度については残念ながらいまだ不明な点が多いと言わざるを得ない。

肉の柔らかさに限らず、哺乳類を含む高等動物の高度な機能・特性を司る因子は単一とは考えられず、よって従来の遺伝的、生化学的なアプローチからの因子同定は極めて困難とされてきた。ただこのような分野にも技術革新の新たな波が押し寄せており、たとえば個体のすべての情報すなわち全ゲノムレベルでの関連解析 (genome-wide association study, GWAS) からその情報の一端が明らかになってきており、その手法は改良を重ねながら食品を含めた産業的利用へと進められつつある。そのGWAS応用の一例として、ごく最近商用食用豚における肉の柔らかさに影響を与える遺伝性因子の探索が行われた。その研究において有力とされた遺伝子の翻訳産物を分子レベルで解析することを本研究の目的とする。

## 2. 方 法

まず、目的とする遺伝子産物の発現系を構築した。入手が容易なこともあり、各種細胞株において逆転写—ポリメラーゼ連鎖反応法により上記遺伝子産物の発現を調べた<sup>2)</sup>。安定した発現が示された細胞株から得られた全cDNAおよび遺伝子特異的なプライマーペアを用いて、同遺伝子翻訳産物のコード領域全長を含むcDNAを増幅した。上記のプライマーペアにはクローニング用に制限酵

素サイトが付加されており、これをFLAGタグ付きタンパク質の哺乳類細胞発現用ベクターに、同ベクターのマルチクローニングサイトを利用してクローニングを行った。得られたプラスミドベクターについて、制限酵素処理産物のアガロースゲル電気泳動ならびにABI社のDNAシーケンサーによる塩基配列により、(アミノ酸配列に影響をもたらすような変異を含まない)当初の予定どおりの発現ベクターが得られたことを確認した。なお、得られたプラスミドベクターについては、これ以降の実験に使用するため、市販のキット (Roche Applied Science社製) を用いて大量に調製した。

また詳細は省略するが、同様にして緑色蛍光タンパク質 (GFP) タグを付加した哺乳類細胞用発現ベクターも作製し大量調整した。

次にクローニングされた遺伝子産物を発現させ、これを免疫ブロッティングにより解析することとした<sup>3)</sup>。上記の実験で作製したFLAGタグ付きタンパク質の哺乳類細胞用発現ベクターを、10%牛胎児血清を含む細胞培養培地に37℃および5% CO<sub>2</sub>で培養した細胞株へ、遺伝子導入試薬としてポリエチレンイミンを用いて導入した。遺伝子導入後24時間培養した細胞を回収し、ラウリル硫酸ナトリウム—ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) 用の試料緩衝液に溶解し煮沸処理をした。これを10%ゲル用いたSDS-PAGEに供した後、セミドライ式ブロッティング法でポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜 (Millipore社製) に転写した。PVDF膜を5%スキムミルクを含むブロッキング液に浸した後、一次抗体としてウサギ抗FLAG抗体 (Sigma社製) 等タグに対する抗体、次に二次抗体としてヤギ抗マウス免疫グロブリンG血清 (Bio-Rad社製) 等と反応させた。発色試薬であるイモビロンウェスタン化学発光HRP基質 (Millipore社製) 等を用いて発色反

応を行い、ライトキャプチャー（アトー社製）を使用してバンドを検出した。

さらに蛍光免疫染色法により細胞内局在を観察することとした<sup>4)</sup>。滅菌済みのカバーガラスを入れた細胞培養用プレートに培養細胞を播種し、発現ベクターを免疫ブロッティングの場合と同様にポリエチレンイミンを用いて導入した。遺伝子導入後24時間培養した細胞を2%パラホルムアルデヒドを用いて室温で15分間細胞を固定した。その後、0.1% Triton X-100を含む牛血清アルブミン溶液で細胞透過およびブロッキング処理を行った。ただし微細管観察の際には $-20^{\circ}\text{C}$ の冷メタノールで細胞を固定・透過処理した。FLAGタグ付きタンパク質の検出に一次抗体としてウサギ抗FLAG抗体、次に二次抗体として蛍光標識された抗マウス免疫グロブリンGと反応させた後、カバーガラスごと細胞をスライドガラスに乗せて、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。GFPタグ付きタンパク質の場合にはGFP由来の緑色蛍光を検出した。

### 3. 結果と考察

まず、目的タンパク質の分子レベルでの解析の

ため、目的とするタンパク質のcDNAを調製し、FLAGまたはGFPタグ付きタンパク質として哺乳類細胞に発現させるためのベクターへのクローニングを行った。NCBI Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>)によると、本遺伝子には選択的スプライシングの違いに由来する複数のアイソフォームが存在するが、今回クローニングされたのはその中で最長のペプチド鎖のアイソフォームであった。得られた発現ベクターを培養細胞に導入し、免疫ブロッティングによって解析した結果をFig. 1Aに示す。45kDaと66kDaのマーカータの間を検出されたバンドは、計算分子量から目的とするFLAGタグ付きタンパク質のバンドであると推定された。なお、詳細は省略するがGFPタグ付きタンパク質の発現も同様に示された。

目的とするタンパク質の発現が免疫ブロッティングにより示されたことから、同じFLAGタグ付きタンパク質発現ベクターを培養細胞に導入し蛍光免疫染色法により同タンパク質の細胞内局在を観察した。核染色試薬であるヨウ化プロピジウム(PI)と共染色した結果をFig. 1Bに示す。特に細胞辺縁部においてFLAGタグ付きタンパク質の強いシグナルが観察された。

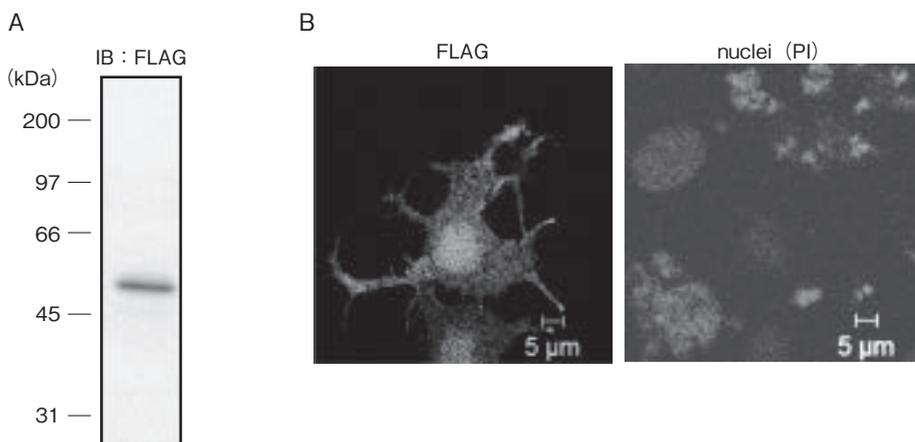


Fig. 1 Expression of the FLAG-tagged protein was analyzed by immunoblotting (A) and immunocytochemistry (B)

細胞には大きく分けて3種類の細胞骨格、すなわちG-アクチンの重合体であるマイクロフィラメント (F-アクチン)、上皮細胞の場合ケラチンからなる中間系フィラメント、ならびに $\alpha$ -および $\beta$ -チューブリンから構成される微小管が知られている<sup>5)</sup>。筆者らの予備的な実験により、今回着目したタンパク質はアクチンとの結合性が示唆されていたが詳細は不明であった。そこで、F-アクチンを含む細胞骨格との関連を精査することとした。これまでと同様にして、FLAGタグ付きタンパク質発現ベクターの導入により同タンパク質の発現細胞をカバーガラス上に用意し、ケラチンとの共染色の場合には、パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、モルモット抗ケラチンK8/K18抗体 (Progen社製) を用いてケラチン繊維を染色した。微小管との共染色の場合には、冷メタノールで細胞を固定し、微小管をウサギ抗 $\alpha$ -チューブリン抗体 (Thermo社製) で染色した。マイクロフィラメントとの共染色の場合には、パラホルムアルデヒドを用いて細胞を固定し、マイクロフィラメント特異的に結合するファロイジンを蛍光標識したAlexa Fluor488ファロイジンコンジュゲート (Invitrogen社製) を繊維状アクチンの染色に用いた。

染色像を拡大したものをFig. 2に示す。まず、FLAGタグ付きタンパク質はケラチンと共局在しなかった。微小管との共染色において、FLAGタグ付きタンパク質に微小管のような繊維像はみられなかったが、細胞の先端部において一部共局在しているようにも観察された。ただしこれらの領域は一般的に微小管を含め細胞骨格が密集することが知られており、結果の解釈に注意が必要と思われた。最後に、マイクロフィラメントとの共染色において、FLAGタグ付きタンパク質は細胞膜近傍に存在するアクチンとの共局在が観察された (Fig. 2Cの矢印)。一方でFLAGタグ付きタンパク

質は細胞質におけるアクチンの太い繊維であるストレスファイバーとは共局在しなかった (Fig. 2Cの矢じり)。したがって、このタンパク質は単純なアクチン結合タンパク質とは考えにくく、細胞膜においてアクチンとの関わりで機能すると推察された。データは省略するがGFPタグ付きタンパク質の場合にも同様の結果が得られた。

アクチンとミオシンは筋肉タンパク質の多くを占めており、筋原繊維の細いマイクロフィラメントを形成するアクチンと太いフィラメントを形成するミオシンとの結合が死後硬直の主要因である。両タンパク質の結合強度の減少が解硬 (硬直解除) をもたらし、そのままでは食肉に適さないことから熟成を経てから食用に供されることになる。アクチンの変性が味覚に大きく作用することも明らかになっており、アクチンは肉の品質管理という点から重要なタンパク質である。今回の解析によって対象タンパク質はそのアクチンに細胞表面近くで作用することが示唆された。上述のとおり肉の柔らかさを含む食感は複数の因子の複雑な相互作用によって最終的に決まってくるものと考えられる。今回の解析を契機として関連因子とその役割の解明がさらに進展することが期待される。

#### 4. 要 約

食肉のおいしさの物理的特性を支える食感において、最も重要なパラメーターのひとつは肉の柔らかさである。しかしながら食肉の素材自体の柔らかさを決定づける牛・豚・鶏等の内在性因子の種類と重要度については残念ながらいまだ不明な点が多い。全ゲノムレベルでの関連解析から、ごく最近商用食用豚における肉の柔らかさに影響を与える遺伝性因子の探索が行われた。その研究において有力とされた遺伝子の翻訳産物を分子レベルで解析した。対象とする翻訳産物の発現系を構

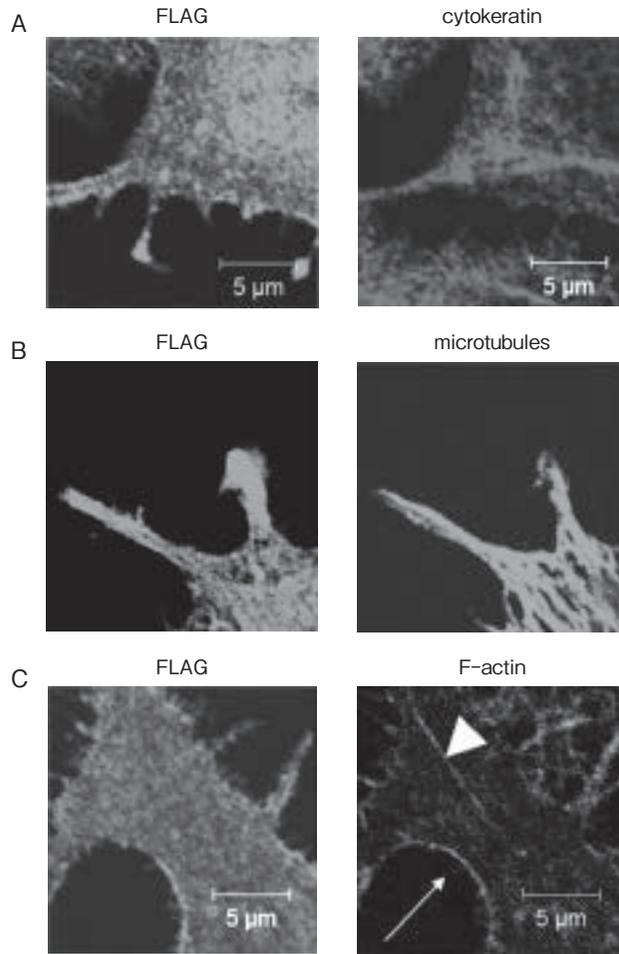


Fig. 2 Intracellular localization of the FLAG-tagged protein. Co-staining with cytokeratin (A), microtubules (B), and actin microfilaments (C)

築し、その細胞内局在を観察したところ、細胞辺縁部に多く存在することが示された。予備的な実験から示唆された細胞骨格との関連を調べたところ、同タンパク質は細胞膜近傍に存在するアクチンフィラメントと共局在した。しかしながらストレスファイバーとは共局在しなかったことから、同タンパク質のアクチン結合性の細胞内での厳密な制御が推察され、機能や重要性を解明する上での新たな指針が得られた。

#### 文 献

- 1) Grunert, K. G., Bredahl, L., Brunsø, K. : Consumer perception of meat quality and implications for product development in the meat sector-a review, *Meat Sci.*, **66**, 259~272, 2004.
- 2) Nakamura, M., Tomita, A., Nakatani, H., Matsuda, T., Nadano, D. : Antioxidant and antibacterial genes are upregulated in early involution of the mouse mammary gland: sharp increase of ceruloplasmin and lactoferrin in accumulating breast milk, *DNA Cell Biol.* **25**, 491~500, 2006.
- 3) Moriya, H., Uchida, K., Okajima, T., Matsuda, T., Nadano, D. : Secretion of three enzymes for fatty acid synthesis into mouse milk in association with fat globules, and rapid decrease of the secreted enzymes by treatment with rapamycin, *Arch.*

- Biochem. Biophys.* **508**, 87~92, 2011.
- 4) Nadano, D., Nakayama, J., Matsuzawa, S., Sato, T., Matsuda, T., Fukuda, M. N. : Human tastin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton, *Biochem. J.* **364**, 669~677, 2002.
- 5) Hosono, H., Yamaguchi, N., Oshima, K., Matsuda, T., Nadano, D. : The murine Gcap 14 gene encodes a novel microtubule binding and bundling protein, *FEBS Lett.* **586**, 1426~1430, 2012.

## 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（Ⅱ）：オートファジーと食肉の肉質の関連性

Effect of autophagy on postmortem proteolysis in skeletal muscle (Ⅱ) :

Relationship between autophagy and meat quality

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)

A number of studies have addressed the mechanism of proteolytic events during the conversion of muscle to meat; however, its precise mechanism is not fully understood. Autophagy is the bulk degradation process for intracellular proteins in eukaryotic cells, and contributes to homeostatic regulation of energy metabolism in skeletal muscle. In this study, we investigated the effects of pre-slaughter autophagic status on chicken breast meat quality. In experiment 1, normal broilers were fasted before slaughter for 48 h to induce autophagy, whereas the control group had free access to a diet. Breast meat samples were collected and stored at 4°C for 96 h, followed by evaluation of pH, color, water-holding capacity and the level of free amino acids. In experiment 2, a similar evaluation was performed using broilers administered with wortmannin, an inhibitor of autophagy. Results on experiment 1 indicated that postmortem pH decline in breast meat was inhibited and that relatively dark color was observed when broilers were fasted before slaughter. In addition, breast meat from fasted broilers showed lower drip loss and a higher level of free amino acids than that from fed broilers. Interestingly, fasting-induced changes in meat quality were almost completely cancelled in experiment 2 where broilers were administered with wortmannin. These findings suggest that autophagy is a mediator of metabolic reactions during the conversion of muscle to meat in chickens, and could contribute to meat quality.

### 1. 目 的

食肉の熟成は筋タンパク質の分解を伴う反応である。カテプシンおよびカルパイン等の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が<sup>1, 2)</sup>、一方で、食肉の熟成機構には未解明な点も多く残されている。食肉の熟成機構が解明され

れば、それは高品質な食肉を効率的に生産する技術の基盤になると考えられる。

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る。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ったが<sup>3)</sup>、これらの知見を食肉生産に応用させた研究例は少なく、特に、熟成過程の筋タンパク

質分解におけるオートファジーの役割は未解明であった。このような背景の下、筆者らはマウス骨格筋を用いた検討を行い、「と殺時のオートファジーが骨格筋タンパク質の死後分解を加速する一因である」ことを明らかにしてきた(2015年日本畜産学会第119回大会)。また、プロテオーム解析を用いた手法で、phosphoglucosyltransferase 1 (PGM1) や lactate dehydrogenase A (LDHA) の死後分解がオートファジーによって促進することも明らかにしている(17<sup>th</sup> AAAP Animal Science Congress)。PGM1やLDHAは食肉のpH、肉色、ドリップロスなどに関与する酵素であり<sup>4,5)</sup>、オートファジーと肉質の関連性が強く示唆される。

本研究の目的は、マウス骨格筋を用いた検討で得られた上記のような知見を、食肉に応用することにある。本研究では、肉用鶏を試験対象として、と鳥時のオートファジーが熟成後の肉質に与える影響を調査した。具体的には、栄養学的処置や薬理的処置でオートファジーを制御した鶏からムネ肉を採取し、96時間低温保存(熟成)した後に、pH、肉色、保水性、剪断力価および遊離アミノ酸含量の調査を実施した。

## 2. 方法

### 2.1 実験動物と処置

7週齢の雄ブロイラー15羽(チャンキー:2642±41kg)を試験に供した。実験1では、骨格筋にオートファジーを誘導する手法として、と鳥前48時間の絶食処置を施した(n=4)。対照群はと鳥まで自由摂食条件下で飼育した(n=3)。イソフルラン麻酔下で頸動脈から放血することでと鳥し、各鶏からムネ肉を採取した。採取したムネ肉は4℃で96時間保存し、pH、肉色、保水性、剪断力価および遊離アミノ酸含量などの肉質に関する評価に供した。また、実験2では、オートファジー阻害剤である wortmannin を 1 mg/kg皮下投

与した鶏を用いて実験1と同様の試験を行った(絶食群と対照群それぞれn=4)。

### 2.2 肉質に関する評価

pHメーター(Testo社製)および色差計(コニカミノルタ社製)を用いて、と鳥後0時間から96時間まで、pHと肉色を継時的に測定した。また、保水性に関する評価として、ドリップロスと加熱損失を測定した。ドリップロスは、96時間貯蔵した後に-20℃で凍結させたムネ肉を用いて、解凍後の水分損失率として算出した。加熱損失は、ドリップロスを算出した後のムネ肉を、80℃の湯湯で加熱した際の水分損失率とした。また、加熱損失を測定した後のムネ肉について、レオメーター(YAMADEN社製)で剪断力価を測定した。さらに、と鳥後96時間貯蔵したムネ肉の遊離アミノ酸含有量も測定した。すなわち、ムネ肉を5.4%トリクロロ酢酸中でホモジナイズし、トリクロロ酢酸をジエチルエーテルで除去することで遊離アミノ酸の抽出を行い、これをLC/MS高速アミノ酸分析システム(島津製作所社製)を用いて分析した。

## 3. 結果と考察

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、栄養飢餓時に活性化する<sup>6)</sup>。そこで本研究では、オートファジーを誘導するために、と鳥前に48時間絶食させる群を設けた。と殺前の絶食が最終的な肉質に影響を与えることは畜種を超えて広く知られている。長期間の絶食を強いられる動物の筋肉ではグリコーゲン量が低下する。このような筋肉では死後の乳酸蓄積、すなわちpH低下が抑制されるため、過度の絶食はDFD(Dark Firm Dry)肉のような異常肉発生の一因と考えられている<sup>7)</sup>。と鳥前の絶食がムネ肉のpHに与える影響を調査した本研究の結果をFig. 1(A)に示すが、絶食群

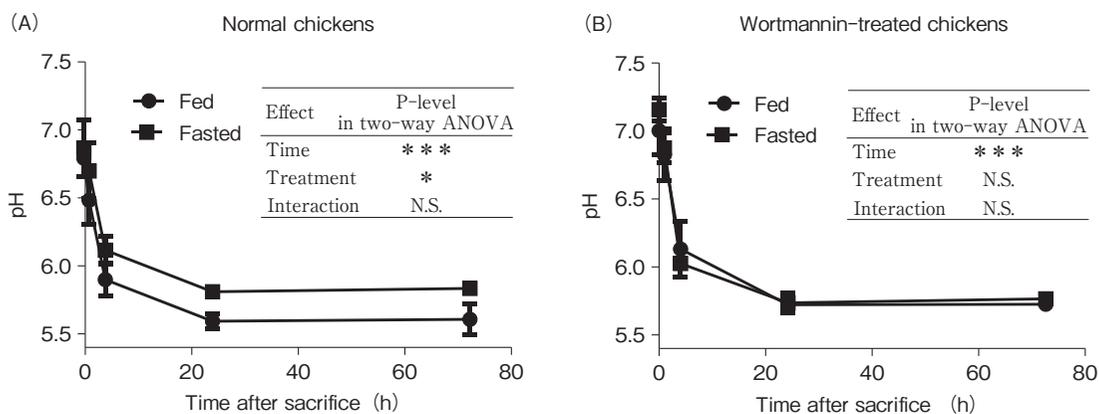


Fig. 1 Postmortem changes in pH of breast meat. Normal broilers (A) or those administered with wortmannin (B) were fasted before slaughter for 48 h, whereas the control group had free access to a commercial diet. The pH of each breast meat was measured by inserting electrodes into the incised surface using a pH meter. Data were analyzed by comparing groups using two-way ANOVA (factors : feeding condition and time after sacrifice).

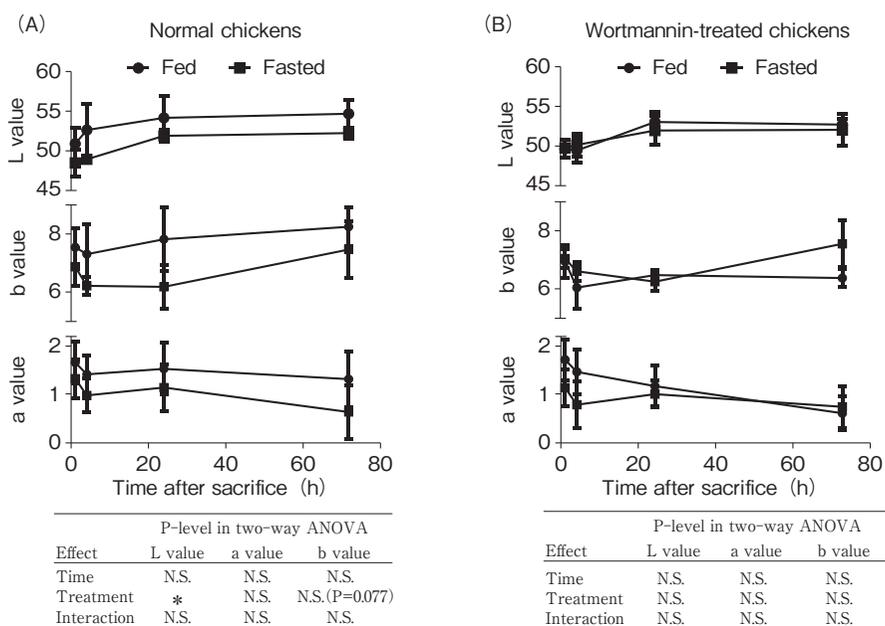


Fig. 2 Postmortem changes in color of breast meat. Normal broilers (A) or those administered with wortmannin (B) were fasted before slaughter for 48 h, whereas the control group had free access to a commercial diet. The color of breast meat was determined on the inside surface by measuring color parameter (L value : brightness, a value: redness, b value : yellowness) with a colorimeter. Data were analyzed by comparing groups using two-way ANOVA (factors : feeding condition and time after sacrifice).

ではpHが有意に高く推移しており、これまでの報告結果を支持するものであった<sup>7)</sup>。wortmanninはphosphatidylinositol-3 kinase (PI3K)の阻害剤である。PI3Kの中でもクラスⅢPI3Kがオートファジーの進展に必須であることから、wortmanninはオートファジー阻害薬として広く基礎研究に使用されている。本研究で、wortmanninを皮下投与した際の結果をFig. 1 (B)に示すが、興味深いことに、ムネ肉のpHに与える絶食の効果はまったく観察されなかった。これらの結果は、と鳥後のムネ肉のpH低下に与える絶食の影響の一部分をオートファジーが担っていることを示唆している。

と鳥前の絶食はpHのみならず、肉色にも影響を与えることが報告されている<sup>8)</sup>。本研究でも、

と鳥前48時間の絶食によってL値、a値、b値のすべてが低下しており、L値には非絶食群との間に有意差が認められた (Fig. 2 (A))。一方、と鳥前にwortmanninを投与した鶏では絶食の効果がほぼ見られず、L値、a値、b値のいずれにも非絶食群との間に有意差は認められなかった。肉色は消費者の購買意欲や評価に影響を与える肉質特性の一つであり、今回の結果はと鳥時のオートファジーの状態が鶏ムネ肉の肉質に影響を与えることを示している。

本研究ではさらに、各鶏から採取したムネ肉を用いて保水性評価も実施した。評価はドリップロスと加熱損失を指標として実施しており、その結果をそれぞれFig. 3 (A)と(B)に示す。加熱損失については、wortmannin投与の有無に関わ

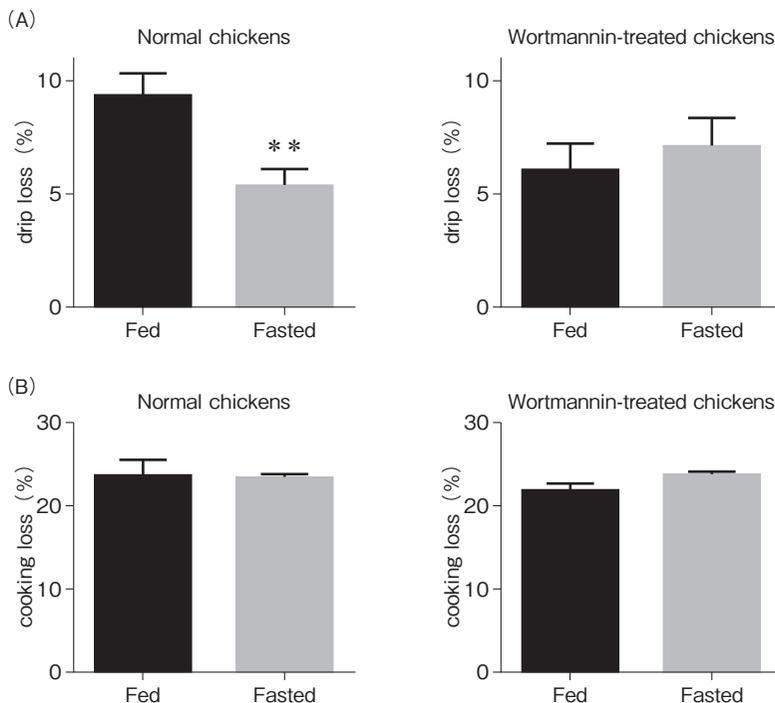


Fig. 3 Water-holding capacity in breast meat. (A) Drip loss was determined by weighting breast meat samples before and after a freeze-thaw process. (B) For cooking loss, breast meat samples were placed in a polyethylene bag and cooked at 80°C in a water bath. Cooking loss was calculated as the difference between weights before and after cooking. Differences between groups were compared using Student's unpaired t-test.

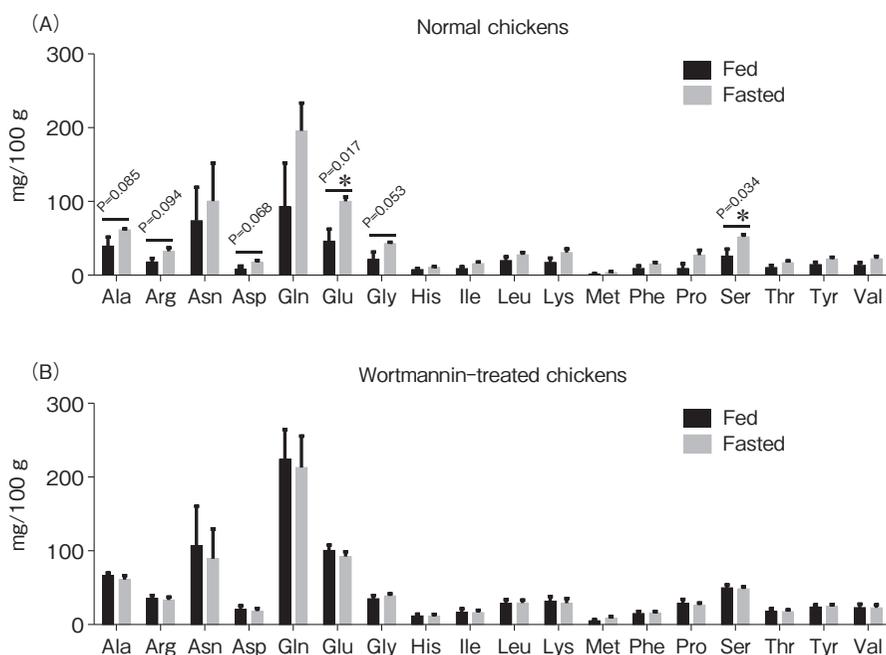


Fig. 4 Free amino acid contents in breast meat. Normal broilers (A) or those administered with wortmannin (B) were fasted before slaughter for 48 h, whereas the control group had free access to a commercial diet. The amino acids were extracted from each breast meat and quantitatively analyzed using a LC/MS system. Differences between groups were compared using Student's unpaired t-test.

らず、絶食群と非絶食群の間に明確な差は認められなかった。一方で、ドリップロスに関しては、wortmannin非投与の際、絶食によって保水性が向上することを示す結果が得られた。食肉の保水性は、pHとの関係が深いことが古くから知られており、pH5.0付近で最低となる<sup>9)</sup>。Fig. 1 (A)に示されるとおり、と鳥前48時間の絶食によりムネ肉のpHは高く推移しており、このことがドリップロスの低下につながったものと推察される。実際に、wortmannin投与下ではと鳥前の絶食がpHに影響を及ぼさなかったが (Fig. 1 (B))、この条件ではドリップロスに関して絶食群と非絶食群の差は認められない。なお、本研究では剪断力価に関する評価も行ったが、wortmannin投与の有無に関わらず、絶食群と非絶食群の間に明確な差は見られなかった (データ不掲載)。

本研究では、呈味性の指標の一環としてムネ肉中の遊離アミノ酸含量を調査した。その結果を Fig. 4 に示すが、wortmanninを投与していない鶏のムネ肉では、と鳥前の絶食によりグルタミン酸とセリンの含有量が有意に増加していた (Fig. 4 (A))。アラニン、アルギニン、アスパラギン酸、グリシンも増加傾向にあり、それ以外のアミノ酸についてもほぼすべてが非絶食群より絶食群で高値を示した。しかしながら、と鳥前にwortmanninを投与した鶏では、このような変化はまったく認められず、非絶食群と絶食群ですべてのアミノ酸がほぼ同じ含有量となった (Fig. 4 (B))。前述したとおり、オートファジーは細胞内タンパク質の主要分解経路の一つであり、栄養飢餓時に活性化し、細胞内タンパク質をアミノ酸に分解する。本研究では、と鳥前の絶食により

オートファジーが活性し、それによってムネ肉中の遊離アミノ酸含量が増加したものと思われる。

以上の結果より、と鳥前48時間の絶食が鶏ムネ肉のpH、肉色、保水性ならびに遊離アミノ酸含量に影響を与えること、ならびにその効果の大部分がオートファジー阻害剤である wortmannin によって消失することが明らかとなった。このことはと鳥前のオートファジーの状態が食肉の肉質に影響を与えることを示唆している。しかしながら本研究は、48時間の絶食でどの程度オートファジーが誘導されているのか、wortmannin によるどの程度オートファジーが阻害されているのかといった点、すなわちオートファジーの定量的解析には至っていない。また、wortmannin はクラス III PI3K 阻害を介してオートファジーを抑制するが、wortmannin はそれ以外のクラスの PI3K も阻害し、各種成長因子やサイトカインまたはインスリンなどのシグナル伝達にも干渉しうる点にも注意が必要である。食肉の肉質に与えるオートファジーの影響を明らかにするためには、さらなる詳細な検討が必要と考えられる。

#### 4. 要 約

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、これらの知見を食肉生産の分野に応用した研究は進展していない。本研究では、鶏のムネ肉を用いて、食肉の肉質に与えるオートファジーの影響を調査した。実験1では、と鳥前の絶食でオートファジーを誘導する群を設定し、ムネ肉のpH、肉色、保水性（ドリップロス、加熱損失）、剪断力価および遊離アミノ酸含量を

非絶食群と比較した。実験2では、オートファジー阻害剤である wortmannin を投与した鶏を用いて実験1と同様の試験を行った。実験1において、絶食群のムネ肉のpHは非絶食群より有意に高値を示した。肉色については、絶食によってL値、a値、b値のすべてが低下しており、L値には非絶食群との間に有意差が認められた。また、絶食によりドリップロスの低下や遊離アミノ酸含量の増加も認められた。一方で、加熱損失や剪断力価には明確な差は認められなかった。興味深いことに、pHや肉色、ドリップロス、遊離アミノ酸含量に与える絶食の効果は、実験2の wortmannin 投与下ではほぼ観察されなかった。以上のことから、と鳥前のオートファジーの状態が食肉の肉質に影響を与える一因であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Koochmaraie, 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) Malicdan, M. C., Noguchi, S., Nonaka, I., Saftig, P., Nishino, I. : *Neuromuscular Disorders*, 18, 521~529, 2008.
- 4) Zelechowska, E., Przybylski, W., Jaworska, D., Sante-Lhoutellier, V. : *European Food Research and Technology*, 234, 883~894, 2012.
- 5) Ramanathan, R., Mancini, R. A., Konda, M. R. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57, 1550~1555, 2009.
- 6) Mizushima, N., Komatsu, M. : *Cell*, 147, 728~741, 2011.
- 7) Newton, K. G., Gill, C. O. : *Meat Science*, 5, 223 ~ 232, 1981.
- 8) Smith, D. P., Lyon, C. E., Lyon, B. G. : *Poultry Science*, 81, 1584~1588, 2002.
- 9) Hamm, R. : *Advances in Food Research*, 10, 355~463, 1960.

## ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明 (その3)

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

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 Saiga Egusa

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

It is well known that smoked pork sausage is very popular food as one of delicious foods. However, the clarification of factors involved in the deliciousness of pork sausages have not been known yet.

In the previous research, the sensory characteristics in taste, aroma and texture of pork sausage were clarified by sensory evaluation. The addition of umami compounds to sausages was also shown to enhance the intensity and continuity in the retronasal aroma sensation of pork sausage. This result indicated that umami compounds contribute to “*koku* attribute” of pork sausages. Furthermore, the analyses of aroma compounds of smoked pork sausages showed that most aroma compounds detected seemed to be produced in the smoking process. So, this research was carried on to clarify the characteristic aroma compounds derived from pork meat involved in the sensation of “*koku* attributes” in pork sausages.

First, the sensory characteristics contributing to smoked and non-smoked pork sausages were examined by sensory evaluation. Sensory analyses showed that non-smoked pork sausages showed stronger undesired aroma such as nasty or fishy aroma. On the other hands, smoked pork sausage showed complexity, mouthfulness and continuity in taste and aroma sensation involved in “*koku* attributes” of pork sausages. The smoking process was also shown to make the texture of sausage skin tougher.

GC/MS analyses have shown that 16 aroma compounds in non-smoked pork sausages were identified, and GC/O and GC/MS analyses has shown that the characteristic aroma compounds of non-smoked pork sausages were identified to be  $\beta$ -pinene, 3-carene, D-limonene, acetic acid, copaene, methyleugenol in 16 aroma compounds detected. Since these 6 compounds were also identified in smoked sausages in previous report, they seemed to be common aroma compounds in pork sausages derived from pork meats and spices used as materials. *p*-cresol and 2, 6- dimethoxy-phenol identified as key compounds in only smoked pork sausages seemed to be produced in the smoking process.

## 1. 目 的

申請者らは、これまで食肉のおいしさを解明することを目的とし、食肉を熟成した時の呈味成分の変動ならびにそれにかかわるメカニズムに関する研究<sup>1)</sup>を進めてきた。その中で、うま味物質であるグルタミン酸は、熟成期間が長くなると増加することや、その増加に寄与する食肉特有の酵素を見出し、それらの特徴を調べてきた。また、それらの酵素が食肉の熟成に伴う遊離アミノ酸の増加に寄与する作用様式を解明した。さらに、熟成に伴い生成するペプチドが、酸味を抑制する効果を有し、食肉の熟成に伴う風味の向上に寄与していることを明らかにしてきた。

近年、食肉のおいしさには、味だけでなく、香りも重要であることが明らかとなっており、呈味成分の分析に加えて、香氣成分の分析も盛んとなっている。香氣成分の研究では、加熱により生じた香氣成分、あるいは保存した時の香氣成分の変化等に関するデータが多く蓄積されている。これまで、和牛肉では、ラクトン類が和牛肉を加熱した時の甘い香りに関わっていることが明らかとなっている<sup>2)</sup>。また、鶏肉の不快臭の原因物質として、2,4-デカジエナ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。さらに、豚肉を原料としただけの味わいに寄与する成分として、アセトール、オクタン酸、 $\delta$ -デカラクトン、デカン酸の4成分が特定されている<sup>3)</sup>。このように、牛肉、豚肉、鶏肉の特徴に関して、香氣成分の分析は多くなされているが、各食肉の特徴に寄与する香氣成分の特定は、十分に解明されていないのが現状である。

食肉の中でも、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氣成分は、ほとんど明らかにされ

ていない。豚肉を主原料とした食肉製品では、Mottram<sup>4)</sup>やRamarathnamら<sup>5)</sup>の報告により、硝酸アルキル、ベンゾニトリル、4-メチル-2-ペンタノン、2-ブチル-2-オクテナルなどの香氣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、最近、食べ物のおいしさの要因として知られているコクの定義を試み、「食べ物のコクは、味、香り、食感による多くの刺激により形成され、それらが広がりや持続する時に感じられる現象である」と提案している<sup>6)</sup>。また、うま味物質が食べ物のレトロネーザルアロマを増強させる働きがあることを解明した<sup>7)</sup>。これらの成果から、食肉は、熟成、加熱することにより、多くの刺激物質が生成されると同時に、熟成に伴い増加するうま味物質が、コクの刺激に広がりや持続性を与えることを提唱している。

昨年度は、ポークソーセージに添加されるうま味物質の味わいの感じ方への影響を解析し、うま味物質は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明らかとなった<sup>8)</sup>。また、ポークソーセージからエーテルで抽出した香氣成分を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)、2,6-dimethoxy phenol (スモーク、煙)がスモークソーセージの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。これらの成分には、フェノール類の香氣成分が多く、製造工程の燻煙時に生成されるチップ由来のものと考えられた。

そこで、本申請課題では、チップ由来の香氣成分を排除し、原料肉由来の香氣成分の解析を目的

として、スモークを行っていないポークソーセージを用いて再度コクの形成に関与する香気成分の特定ならびに同定を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 供試試料

燻煙を行う通常の製造条件で製造されたポークソーセージ（以下スモークソーセージ）と、燻煙を行っていないポークソーセージ（以下ノンスモークソーセージ）を調製した。冷凍保存されていたソーセージを冷蔵庫（0℃）で一晩保存、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（24cm φ × 12cm）に水を張り、鍋の中に、350mlの水を入れた4つの500ml容のビーカーを入れて加熱した。ビーカー内の水が沸騰したところで、各ビーカーにソーセージを5本ずつ投入し、水温80℃で3分間加熱した。なお、この時のソーセージの中心温度は50℃付近に達していることを確認した。加熱が終了したソーセージは1本ずつアルミホイルで包装し、試料提供まで発砲スチロール内で保温した。また、官能評価の際に使用する口濯ぎ用の水は、ソーセージの脂ならびに香辛料を口中から速やかに取り除くため、約60℃に温めたイオン交換水を保温容器（ステンレス製マグボトル）に入れて提供した。

### 2.3 官能評価方法

スモークソーセージとノンスモークソーセージの食味性の比較を行うために官能評価には伊藤ハム株式会社で製造された通常スモークソーセージと、スモークを行っていないノンスモークソーセージを用いた。各ソーセージを1本ずつ提供し、試料を喫食し感じたことを記入してもらった。なお、基本五味の識別ならびに、各味の濃度識別ができ、2か月以上の訓練を行った4名をパネリストに選定した<sup>9)</sup>。

### 2.4 ノンスモークソーセージの香気成分分析

昨年度に、スモークソーセージの香気成分を分析しているため、今年度は、ノンスモークソーセージの香気成分を分析し、昨年度明らかとなったスモークソーセージの結果と比較検討した。昨年度の分析において、エーテル抽出がより多くの香気成分を検出できたことから、本年度は、エーテル抽出のみでの香気成分分析を行った。

#### a：ノンスモークソーセージの特徴的な香りに寄与の大きい香気成分の特定

細切りした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、エーテル抽出試料とした。

エーテル抽出試料をGC/Oに供し、臭い嗅ぎを実施してノンスモーク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-wax52CB（30m x 0.25mm 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℃（10min）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。ソーセージの特徴的な香りに寄与の大きい香気成分の特定には、AEDA（Aroma extract dilution analysis）法を用い、エーテル抽出試料を段階的に希釈したものを臭い嗅ぎに供した。最大希釈濃度2048倍希釈で検出できた香気成分を、ソーセージの特徴的な香りに寄与の大きい香気成分とした。

#### b：GC/MSによる香気成分の同定

エーテル抽出試料をGC/MS（Agilent7890A GC-System, Agilent 7693 Auto-sampler, Agilent Technologies 5975 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の場合と同様で、検出器にはMSを

使用した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 スモークソーセージとノンスモークソーセージの官能的違い

はじめに、スモーク処理がソーセージの官能的特徴に及ぼす影響を明らかにするために、スモークソーセージとノンスモークソーセージを官能評価した。官能評価項目については、味、香り、食感、見た目、味わい全体について気づいたことをすべて記入してもらった。4名の官能評価の結果をTable 1にまとめた。

ノンスモークソーセージは、多くのパネリストが肉の臭み、生臭い、獣臭が強いなど一般的に好

ましくない香りを感じていた。また、皮が軟らかいと評価したものも多かった。一方、スモークソーセージについては、味がしっかり感じられ、複雑さ、濃厚感、広がり強いなど、既述した「コクの定義」にあてはまる感覚をノンスモークソーセージより強く感じるパネルが複数いた。これは、燻煙処理で生成される香気成分が付与されるため、ソーセージを食べたときの刺激の数が増えることにより、より複雑さが強くなったと推察された。また、スモーク臭により、肉独特の味わいが弱くなることもわかった。さらに、スモークにより皮の食感に変化が生じ、硬くなる可能性が示唆された。このようにスモークソーセージとノンスモークソーセージ間で味わいに、大きな違いが

Table 1 スモークソーセージとノンスモークソーセージの官能的特徴

<スモークソーセージ>

評価項目	評価	人数
味	甘味が強い	2
	塩味が強い	2
	うま味が強い	4
香り	スモーク臭が強い	4
食感	皮が硬い	3
	パリパリ感が強い	4
色	皮の色が濃い	4
味わい全体	複雑さ(味わい)	2
	濃厚感が強い	2
	広がりが強い	2
	油っぽさが強い	1
	肉汁が多い	2

<ノンスモークソーセージ>

評価項目	評価	人数
香り	スパイスの味わいが強い	4
	肉独特の香りが強い(臭み、生臭い、獣臭)	4
食感	皮がやわらかい	4
色	皮の色が薄い	3
味わい全体	あっさりしている(単純)	3

注) スモークソーセージとノンスモークソーセージを食べ比べて強いと感じられる項目をあげてもらい、その結果をまとめた。人数は、その項目をより強いと感じた人数を示している。なお、パネリストは基本五味の識別ならびに各味の濃度識別ができ、2ヶ月以上の訓練を行った4名を用いた。

認められた。

### 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り成分の特定

#### 1：GC/MSによるポークソーセージの香り成分の分析

スモークソーセージとノンスモークソーセージのエーテル抽出試料から得られたアロマグラムを

Fig. 1, Fig. 2に示した。また、それぞれの試料で検出された香り成分をTable 2にまとめた。Table 2における網掛けの香り成分は、スモークソーセージとノンスモークソーセージにおいて共に検出された香り成分である。

GC/MSによる分析の結果、スモークソーセージは22種類の香り成分、ノンスモークソーセージ

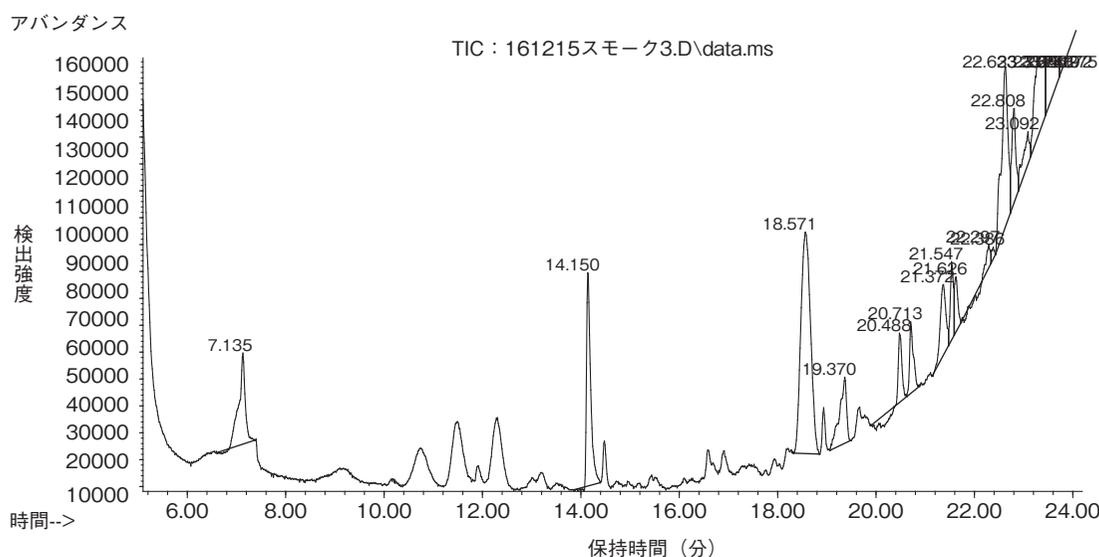


Fig. 1 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from smoked pork sausages

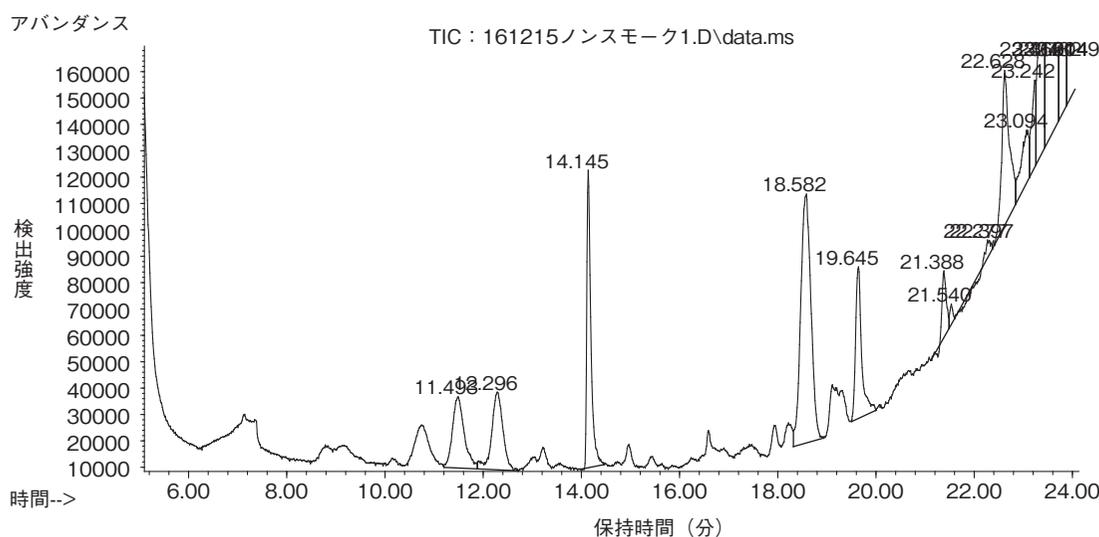


Fig. 2 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausages

Table 2 エーテルで抽出されたスモークソーセージとノンスモークソーセージの香気成分の比較

スモークソーセージ	ノンスモークソーセージ
$\beta$ -pinene	$\beta$ -pinene
3-carene	3-carene
D-limonene	D-limonene
acetic acid	acetic acid
furfural	
butanoic acid	
propanoic acid	
2-furanmethanol	
copaene	copaene
caryophyllene	caryophyllene
	2,4-decadienal
3-methyl-1,2-cyclopentanedione	
2-methoxy-phenol	
phenol	
methyleugenol	methyleugenol
<i>p</i> -cresol	
	Icosene
6-octadecenoic acid	6-octadecenoic acid
2-octyl-cyclopropaneoctanal	2-octyl-cyclopropaneoctanal
oleic acid	oleic acid
cis-vaccenic acid	cis-vaccenic acid
2-methoxy-3-(2-propenyl)-phenol	2-methoxy-3-(2-propenyl)-phenol
2,6-dimethoxy-phenol	
(E)-9-octadecenoic acid	(E)-9-octadecenoic acid

では16種類の香気成分が検出された。

スモークソーセージにおいてのみ検出される香気成分は furfural, butanoic acid, propanoic acid, 2-furanmethanol, 3-methyl-1, 2-cyclopentanedione, 2-methoxy-phenol, phenol, *p*-cresol, 2, 6-dimethoxy-phenol の 9 種類, ノンスモークソーセージにおいてのみ検出される香気成分は 2,4-decadienal, Icosene の 2 種類であった。スモークソーセージにおいてのみ検出されたこれら 9 種類の香気成分は、燻煙により付与された香気成分であるといえる。また、これら 9 種類の香気成分の中で、昨年の助成による研究で寄与が大きいと推定された香気成分である *p*-cresol, 2, 6-dimethoxy-phenol は、燻煙由来のポークソーセージを特徴付ける香気成分であることが明らかとなった。ノンスモークソーセージにおいてのみ 2, 4-decadienal, Icosene が検出された理由については、燻煙を行わないこ

とによる原料肉の劣化等, 今後検討が必要である。

## 2 : 特徴的な風味に寄与の大きい香気成分の特定と同定

ノンスモークソーセージにおいて検出されたこれらの香気成分の中で、寄与度の高い香気成分を特定ならびに同定するために AEDA 法に基づき、分析を行った。エーテル抽出試料を用いて GC/O 装置で臭い嗅ぎを行い、得られたクロマトグラムと、臭い嗅ぎの結果をもとに作成したアロマグラムを Fig. 3 と Fig. 4 に示した。なお、Fig. 3 のクロマトグラムには希釈を行っていないエーテル抽出試料を分析した結果を示した。

Fig. 3 に示すように、希釈していないサンプルでは 13 か所で臭いが検知された。AEDA 法に基づき希釈した最大希釈濃度 2048 倍では、③, ④, ⑤, ⑥, ⑧, ⑩, ⑬ の 7 か所まで絞り込むことができた。したがって、これら 7 成分が本研究で用

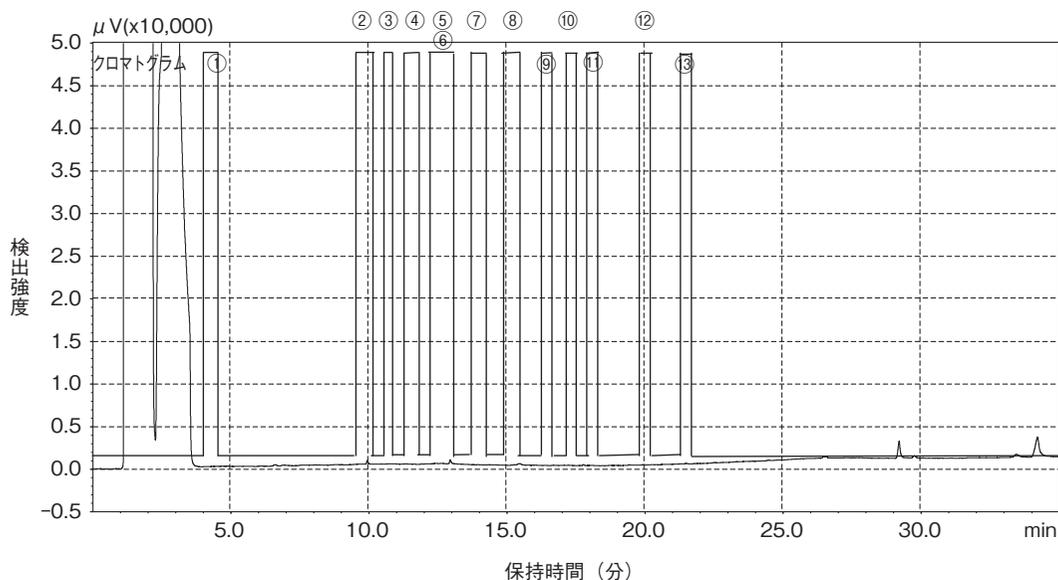


Fig. 3 GC/O-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausages

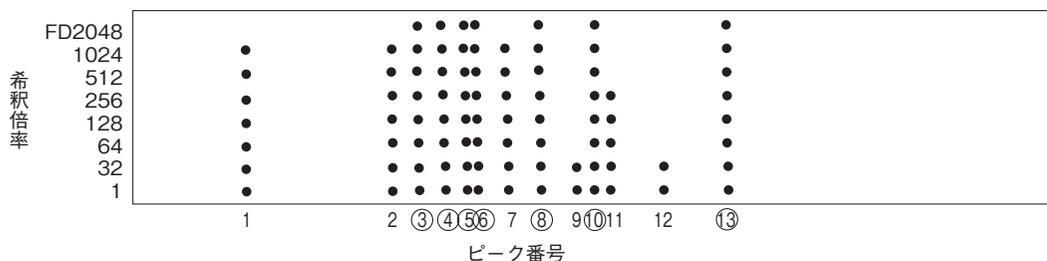


Fig. 4 Aroma-gram of non-smoked sausages analyzed by AEDA methods

いたノンスモ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推定された (Fig. 4)。

これら7成分のうち、6成分は、臭い嗅ぎで得られた香气成分の特徴とGC/MSの結果より候補物質が推定された (Table 3)。GC/Oで検知されたこれら7つの香气成分の特徴はそれぞれ、③が「生シイタケ、森、豆」、④が「卵スープ、青臭い」、⑤が「酸っぱい、青臭い、除光液」、⑥が「酸っぱい、酢」、⑧が「ほこり、ゴム」、⑩が「カメムシ、きゅうり、草」、⑬が「スパイス、カレー粉、漢方薬」を連想させることが明らかとなった。また、GC/MSにより、6つの成分、すなわち③が

$\beta$ -pinene、④が3-carene、⑤がD-limonene、⑥がacetic acid、⑩がcopaene、⑬がmethyleugenolであると推定された。

今回、ノンスモークソーセージの香りにおいて、寄与が大きいと推定されたこれら6成分は、昨年の助成による研究においてもGC/MSによる分析で検出された。そのため、 $\beta$ -pinene、3-carene、D-limonene、acetic acid、copaene、methyleugenolはすべて原料の豚肉由来、または香辛料由来であると推察された。その中でも、鷲尾 (高倉) 友紀子<sup>3)</sup>の報告により、豚だしの特徴的香气としてacetic acidがあげられていることから、acetic acidは原料の豚肉由来であると推察さ

Table 3 ノンスモークソーセージからエーテル抽出された香気成分と候補物質

番号	香りの質 (記述)	候補物質
3	生シイタケ, 森, 豆	$\beta$ -pinene
4	卵スープ, 青臭い	3-carene
5	酸っぱい, 青臭い, 除光液	D-limonene
6	酸っぱい, 酢	acetic acid
8	ほこり, ゴム	該当なし
10	カメムシ, きゅうり, 草	copaene
13	スパイス, カレー粉, 漢方薬	methyleugenol

れた。今回、ノンスモークソーセージの香りにおいて寄与が大きいとされた他の5成分が何由来の香気成分であるのかは、香辛料を添加していないポークソーセージを用いて再度検討する必要がある。

今回、スモークソーセージを特徴付けるとして推定された香気成分と、肉由来の香りを含むと考えられるノンスモークソーセージ特徴付ける香気成分として推定された香気成分を組み合わせ、原料肉、香辛料、燻煙の香りを有するのが特徴であると考えられるポークソーセージの香りを再現できるか否かを調べる必要がある。

#### 4. 要 約

ポークソーセージは、美味な食品の1つである。本研究では、ポークソーセージの特徴を明らかにするため、スモークソーセージとノンスモークソーセージを用いて、それぞれの官能的特徴、並びにソーセージ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。

GC/MSによる分析の結果、ノンスモークソーセージでは16種類の香気成分が検出された。また、GC/O分析を用いたAEDA法により、16成分のうち、 $\beta$ -pinene (生シイタケ, 森, 豆), 3-carene (卵スープ, 青臭い), D-limonene (酸っぱい, 青臭い, 除光液), acetic acid (酸っぱい, 酢), copaene (カメムシ, きゅうり, 草), methyleugenol (スパイス, カレー粉, 漢方薬) が、ノンスモー

クソーセージの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。これらの6成分は、スモークソーセージにおいても検出されていたことから、すべて原料の豚肉由来、または香辛料由来であると推察された。昨年度スモークソーセージのキー化合物と推定された成分のうち、*p*-cresolと2,6-dimethoxy-phenolは、ノンスモークソーセージで検出されなかったことから燻煙由来のポークソーセージを特徴付ける香気成分であることが明らかとなった。

今後は、スモークソーセージ、ノンスモークソーセージの香りの特徴に大きく寄与している香気成分として同定された香気成分の標品を組み合わせ、原料肉、香辛料、燻煙の香りを有するのが特徴であると考えられるポークソーセージの香りを再現できるか否かを調べる必要がある。そのためには、ソーセージ中のこれらの香気成分を定量し、その存在比率に基づき標品を用いて再構成する必要がある。

#### 文 献

- 1) Nishimura, T.: Mechanism Involved in the Improvement of Meat Taste during Postmortem Aging, *Food Sci. Technol. Int. Tokyo*, 4(4), 241~249, 1988.
- 2) 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.
- 3) Takakura, Y., Osanai, H., Masuzawa, T., Wakabayashi, H., Nishimura, T.: Characterization of the key aroma compounds in pork soup stock by

- using an aroma extract dilution analysis, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **78**, 124~129, 2014.
- 4) Mottram, D. M. : Organic Nitrates and Nitriles in the Volatiles of Cooked Cured Pork, *J. Agric. Food Chem.* **32**, 343~345, 1984.
  - 5) 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.
  - 6) 西村敏英：食肉のおいしさとそれを引き出すコクとは！, *JATAFFジャーナル*, **3**(12), 29~35, 2015.
  - 7) 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.
  - 8) 西村敏英, 江草愛：ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その2）, 平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.34, 2016.
  - 9) 古川秀子：おいしさを測る—食品官能検査の実際, 幸書房, 1994.

## ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定

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

早川 徹

(帯広畜産大学畜産衛生学研究部門)

Toru Hayakawa

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

Myosin, one of major proteins in meat, was believed to be insoluble in water until we have reported that myosin could be solubilized in low ionic strength solution containing histidine. The mechanism of the solubilization of myosin have not been clarified. We have already demonstrated that surface charges of some regions in myosin C-terminus were shifted negatively on solubilized condition (1 mM KCl, 5 mM histidine). However, it was not clear whether these changings of surface charge could be involved in solubilization of myosin in low ionic strength condition. In this study, to identify the region which involves the solubilization of myosin in low ionic strength solution containing histidine, two 56 amino acid residue fragments from myosin C-terminus region were determined whether they could be solubilized in low ionic strength solution and could form polymers in physiological condition. These fragments lack the ability of polymerization under the physiological condition, although they could be solubilized in low ionic strength solution regardless the presence of histidine. This means that these fragments could not interact with C-terminus region of myosin. However, this could not deny which these regions have no relationship with solubilization of myosin. To clarify the mechanism of solubilization of myosin, further research how histidine would affect these fragments was needed.

### 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、私たちの健康な生活に欠くことのできない食品の一つである。しかし、食肉は調理によってもほとんど形状が変化せず、嚥下力や咀嚼力が弱くなった高齢者などにとっては食することが困難な食品でもある。また、食肉には脂

肪分を多く含む部位もあり、高カロリー食品というイメージが根強く、特に高齢者には敬遠されがちである。そのような方々にも摂取しやすい液状もしくは粉末状の形態の食品の開発が望まれるが、食肉に含まれるタンパク質の大部分は、水や生理的塩濃度以下の低塩濃度溶液には溶けず、高塩濃度溶液にしか溶解しない塩溶性タンパク質であるために、これらの形態への加工には多量の塩

分が必要となり、食品としての価値は低くなると考えられる。そこで、塩の添加に依存せず、食肉タンパク質を溶解させる水溶化技術を確立することができれば、食肉タンパク質を様々な形態に加工できるようになり、その利用性が格段に広がることが期待される。

これまでに、鶏胸筋を低塩濃度溶液で洗い、超音波処理を施すことで、食肉タンパク質の水溶化を実現したが<sup>1)</sup>、操作が煩雑であったため産業への応用は困難であった。しかし、この一連の検討により、食肉タンパク質の溶解性向上のためには、主なタンパク質の一つであるミオシンの抽出性を高めることが重要であることが示された。そこで、筆者らは、食肉タンパク質の水溶化効率の向上を目指し、鶏胸筋より抽出したミオシンをモデルとし、水溶化条件下におけるミオシンの挙動について検討を行った。ミオシンは一般に高塩濃度溶液には溶解するが、生理的塩濃度およびそれ以下の低塩濃度溶液中では自己会合し重合体を形成することが知られている。しかし、ミオシンを、少量の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、その80%以上が溶解することが分かった<sup>2)</sup>。また、この方法で水溶化したミオシンの尾部領域（L-メロミオシン、LMM）はその分子長が伸長していることが示され<sup>3)</sup>、ミオシンの水溶化現象には、その尾部領域の構造変化が関係していることが示唆された。そこで、本研究では、ミオシンの水溶化現象におけるメカニズムの解明のため、水溶化に関連するミオシンのアミノ酸残基領域を特定することを目的とし、特にミオシン尾部領域に焦点をあて、その一部を模したタンパク質フラグメントを作製し、水溶化現象への関与について検討した。

## 2. 方法

### 2.1 タンパク質フラグメントの作製

タンパク質フラグメントの作製には、Profinity eXact™ Protein Purification System (Bio-Rad) を用いた。タンパク質フラグメントは、鶏骨格筋ミオシン重鎖1 C (NM\_001113709) をもとに、C末端領域（アミノ酸残基1700-1941）およびC末端領域内の56アミノ酸残基領域（アミノ酸残基1756-1811, 1813-1868）を模するように設計した<sup>4)</sup> (Fig. 1, Table 1)。精製したタンパク質フラグメントは、0.6M KCl, 5 mM リン酸緩衝液 pH7.2 からなる高塩濃度溶液に対して透析し、その透析内液を以降の実験に供した。

### 2.2 SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動

精製した各タンパク質フラグメントを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<sup>5)</sup>に従い、分離ゲルは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（ビス比は同上）を用いた。泳動後の固定液には40%メタノールおよび10%酢酸からなる溶液を、染色液には0.025%クマシーブリリアントブルー G-250および10%酢酸からなる溶液、そして脱色液には10%酢酸溶液を、それぞれ用いた。

### 2.3 タンパク質フラグメントの水溶化処理

各タンパク質フラグメントを、1 mM NaCl および5 mM ヒスチジンもしくはTris-HCl, pH7.2 からなる透析外液に対して透析し、その透析内液を超遠心分離 (100,000 G, 120分) した。超遠心分離により得られた上清を水溶化したタンパク質フラグメントとした。

### 2.4 SDS-PAGEによる分子間相互作用解析

各タンパク質フラグメントを、150mM NaCl および5 mM Tris-HCl, pH7.2 からなる透析外液に

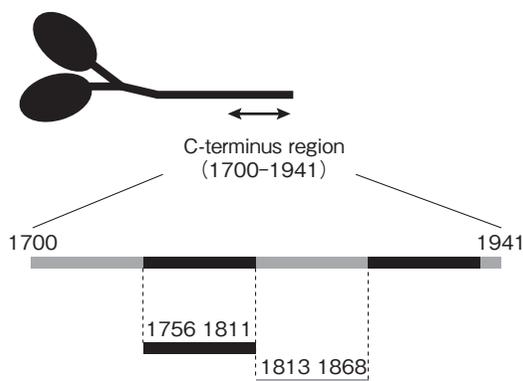


Fig. 1 Diagram of myosin heavy chain constructs. These constructs were expressed in *E. coli*. Construct 1700-1941 (C-terminus region) was expressed with primers #636 and #815. Construct 1756-1811 was expressed with primers #761 and #816, 1813-1868 was expressed with primers #763 and #940, and 1869-1924 was expressed with primers #765 and #818.

Table 1 List of PCR primers used in this study

	Primer Sequence	Restriction enzyme
#636	5'-ttgaattctcactcttctcttctatcttc-3'	EcoRI, STOP
#761	5'-ttgaattcctacttcagggcagctgc-3'	EcoRI, STOP
#763	5'-ttgaattcctacttaagaatgttcttgagatc-3'	EcoRI, STOP
#815	5'-ttaaagcttgacagagcgtcgagaaaag-3'	HindIII
#816	5'-ttaaagcttgactgaagagaaggccaagaag-3'	HindIII
#940	5'-ttaaagcttgacaagtggcaagaagcaattcag-3'	HindIII

対して透析した。その透析内液を超遠心分離 (100,000 G, 120分) し、上清を回収後、チューブに残った沈澱を、高塩濃度溶液を加え再度溶解することで回収した。透析内液、上清および沈澱をそれぞれ上述のSDS-PAGEに供した。上清および沈澱のいずれかの画分にバンドが出現するかどうかを確認することで、各タンパク質フラグメントが生理的塩濃度における重合体の形成を判断した。また、C末端領域フラグメントと56アミノ酸残基領域フラグメントを混合した後に同様に処理し、各タンパク質フラグメント同士における重合体の形成についても確認した。

### 3. 結果と考察

ミオシンの生理的条件における重合体形成には、C末端の約250残基領域が重要であるとされていることから<sup>6)</sup>、水溶化現象においてもこの領域が関与していると考えられる。これまでに、筆者は、この領域を分割した56アミノ酸残基のタンパク質フラグメントを大腸菌によるタンパク質強制発現系により作製し、そのうちの二種類のタンパク質フラグメントが、水溶化条件 (1 mM NaCl, 5 mMヒスチジン) において表面電荷が変化することを明らかにした<sup>4)</sup>。そこで、本研究では、この二種類のタンパク質フラグメントにおけ

る重合体形成能およびミオシンC末端領域との分子間相互作用について検討し、これらの領域の水溶化現象への関与について明らかにすることを目的とした。

### 3.1 タンパク質フラグメントの水溶化

各タンパク質フラグメントの水溶化の有無について確認するために、ヒスチジンを含む低塩濃度溶液に対して各タンパク質フラグメントを透析後、超遠心分離した上清および沈澱をSDS-PAGEに供した。ミオシンC末端領域のタンパク質フラグメントは、ヒスチジンの有無に関わらず、低塩濃度溶液には溶解しなかったが、二種類の56アミノ酸残基タンパク質フラグメントはヒスチジンの有無に関わらず、そのほとんどが低塩濃度溶液に溶解した (Fig. 2)。すなわち、56アミノ酸残基タンパク質フラグメントはいずれも自身のみで重合体を形成できない可能性が示唆された。ミオシンC末端領域は重合体形成に必須な領域であるとされており、この領域を含む250アミノ酸残基程度の長さのタンパク質フラグメントでは低塩濃度条件下で重合体を形成することが報告されている<sup>6~8)</sup>。しかし、重合体を形成した場合においても、規則的な会合ではなく、単なる凝集体となる場合もあることが示されている。インタ

クトなミオシンは、骨格筋組織においても、また *in vitro* においても規則正しく会合した重合体を形成するため、タンパク質フラグメントを利用した検討においても、規則的な会合かどうかを考慮する必要がある。これまでに、インタクトなミオシンおよびLMMにおいて、ヒスチジンを含む低塩濃度溶液に溶解することが示されているため<sup>2, 3)</sup>、本研究における水溶化条件下におけるミオシンC末端領域のタンパク質フラグメントは規則的な会合ではないと考えられる。

### 3.2 生理的条件下におけるタンパク質フラグメント間の相互作用

各タンパク質フラグメントの生理的条件下における重合体形成能について検討するために、各タンパク質フラグメントを生理的塩濃度溶液に対して透析し、超遠心分離後の上清および沈澱についてSDS-PAGEに供した。ミオシンC末端領域タンパク質フラグメントでは、上清にもバンドが確認され、低塩濃度条件とは異なり、三割程度が溶解していた。一方、56アミノ酸残基タンパク質フラグメントでは、低塩濃度条件と同様に、いずれのフラグメントにおいても沈澱画分にバンドが認められなかった。すなわち、これらのタンパク質フラグメントは自己会合による重合体形成能が欠

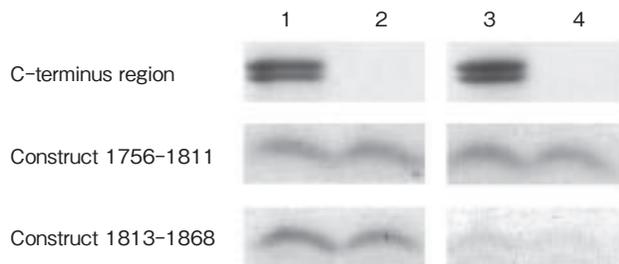
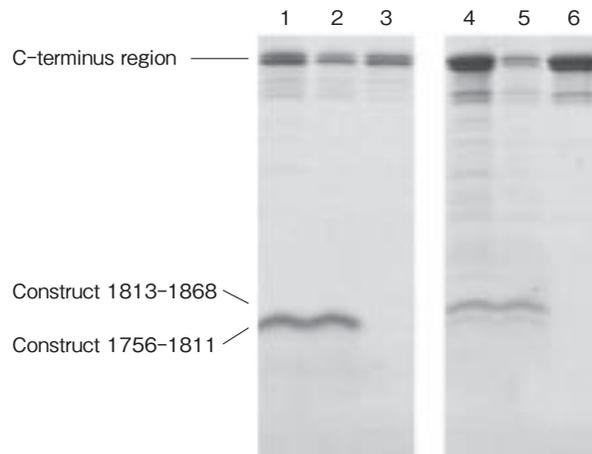


Fig. 2 SDS-PAGE patterns of solubilized constructs in low ionic strength solutions. Lane 1 : suspension in solution of 1 mM NaCl and 5 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; lane 2 : supernatant in solution of 1 mM NaCl and 5 mM Tris-HCl, pH 7.2 ; lane 3 : suspension in solution of 1 mM NaCl and 5 mM histidine ; lane 4 : supernatant in solution of 1 mM NaCl and 5 mM histidine.



**Fig. 3** SDS-PAGE patterns of constructs in physiological ionic strength condition. Each fractions of mixture of construct 1756-1811 and 1700-941 were loaded in lane 1, 2 and 3. Each fractions of mixture of construct 1813-1868 and 1700-1941 were loaded in lane 4, 5 and 6. Lane 1 and 4: suspension in solution of 150 mM NaCl and 5 mM Tris-HCl, pH 7.2; lane 2 and 5: supernatant in solution of 150 mM NaCl and 5 mM Tris-HCl, pH 7.2; lane 3 and 6: precipitation in solution of 150 mM NaCl and 5 mM Tris-HCl, pH7.2.

落していると考えられる。ミオシンの重合体形成はタンパク質表面の静電的相互作用によるとされており<sup>6)</sup>、ミオシンの分子表面にはいくつかの正または負の電荷クラスターが存在するため、正の電荷クラスターと負の電荷クラスターがお互いに引き付け合うことで重合する。今回用いた56アミノ酸残基タンパク質フラグメントには、正もしくは負の電荷クラスターが存在するものの対となる電荷クラスターが存在しない、もしくはどちらの電荷クラスターも存在しないために、低塩濃度および生理的塩濃度条件下において重合しないものと考えられる。

これら56アミノ酸残基領域がミオシンの水溶化に関与しているかどうかを明らかにするために、正および負の電荷クラスターの両方を含有するC末端領域と生理的条件下において相互作用するかどうかを検討する必要がある。そこで、56アミノ

酸残基タンパク質フラグメントをミオシンC末端領域タンパク質フラグメントと高塩濃度条件下で混合し、その後に生理的塩濃度溶液に透析することでタンパク質フラグメント間での重合体形成の有無を確認した (**Fig. 3**)。その結果、いずれの56アミノ酸残基タンパク質フラグメントと混合した場合においても、上清画分にのみ、56アミノ酸残基タンパク質フラグメントを示すバンドが認められ、これら56アミノ酸残基タンパク質フラグメントはミオシンC末端領域とは相互作用しないことが分かった。これまでのミオシンの重合体形成メカニズムについて検討した報告においても、200アミノ酸残基以下のタンパク質フラグメントが生理的塩濃度以下の条件で重合体を形成した例はほとんどない<sup>6-8)</sup>。このことは、単一のタンパク質フラグメントにおいて正および負の両方の電荷クラスターを持ち合わせていないと、重合体を

形成するための相互作用がなされないことを示唆している。これまでの検討により今回焦点を当てた56アミノ酸残基領域は水溶化条件下でタンパク質分子表面の電荷が変化することが明らかとなっており、ミオシンの水溶化に関与している可能性が高いことが示されているものの<sup>4)</sup>、これら領域の具体的な関与については明らかにすることができなかった。

#### 4. 要 約

本研究では、ミオシンの水溶化現象に関与しているアミノ酸残基領域を特定することを目的とし、特にミオシンC末端領域に焦点を当て、水溶化および分子間相互作用について検討を行った。その結果、今回対象とした56アミノ酸残基領域を模した二種類のタンパク質フラグメントは低塩濃度溶液に対して溶解するものの、重合体形成能が欠落しており、また、ミオシンC末端領域とも相互作用しないことが明らかとなった。この結果

は、これら領域がミオシンの水溶化現象に関与していることを否定するものではない。今後は、これらアミノ酸残基領域におけるヒスチジンによる作用について検討を進める。

#### 文 献

- 1) Ito, Y., Tatsumi, R., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, **74**, 417~425, 2003.
- 2) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **82**, 151~154, 2009.
- 3) Hayakawa, T., Ito, T., Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Science*, **84**, 742~746, 2010.
- 4) 早川徹 : 平成27年度食肉に関する助成研究調査報告書, **34**, 29~33, 2016.
- 5) Schägger, H. : *Nature Protocols*, **1**, 16~22, 2006.
- 6) Nakasawa, T., Takahashi, M., Matsuzawa, F., Aikawa, S., Togashi, Y., Saitoh, T., Yamagishi, A., Yazawa, M. : *Biochemistry*, **44**, 174~183, 2005.
- 7) Sohn, R. L., Vikstrom, K. L., Strauss, M., Cohen, C., Szent-Gyorgyi, A. G., Leinwand, L. A. : *Journal of Molecular Biology*, **266**, 317~330, 1997.
- 8) Ricketson, D., Johnston, C. A., Prehoda, K. E. : *Proceedings of the National Academy of Science*, **107**, 20964~20969, 2010.

## 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（Ⅱ）

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

根 岸 晴 夫

（中部大学応用生物学部）

Haruo Negishi

（College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University）

In this study, the growth and proteolytic properties of 26 strains of *Lactobacillus* (*Lb.*) groups were examined for the application to meat products, i.e. fermented pork jerky. The mixed cultures of *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (*Lb. bulgaricus*) and *Streptococcus thermophilus* (*Stc. thermophilus*) were used as control. On the proteolytic activities, *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Lb. zaeae*, *Lb. mucosae*, *Lb. parabuchneri*, and *Lb. pentosus* were more higher among all tested lactic acid bacteria (LAB). Especially, the proteolytic activities of *Lb. zaeae* and *Lb. parabuchneri* may be higher than other LABs. The SDS-PAGE patterns of myofibrillar proteins from 10% pork muscle suspension during fermentation with the selected 8 strains were almost similar. The rates of pH decreases during fermentation with the 7 strains excluding *Lb. mucosae* in the pork suspension were almost same to that of the control. The characteristics of the selected strains will be evaluated by making the fermented pork jerky. The nutrient components per 100g of fermented pork jerky using the control cultures were rich in protein (40.5 g) and vitamin B group (2.57 mg). Functional components related to human health, including  $\gamma$ -aminobutyric acid (42.0 mg/100 g), L-carnitine (15.4 mg/100 g), carnosine (493.0 mg/100 g), and anserine (21.8 mg/100 g) were also detected. Fermented pork jerky may be useful as a source of supply of proteins, vitamin B, or functional components.

### 1. 目 的

本研究は、ヨーグルトなどの発酵乳製品で汎用される乳酸菌の生物学的機能に注目し、食肉加工への利用技術を開発することを目的として行った。

食品に対する乳酸菌の利用は乳加工の分野で活発であり、発酵乳を中心に様々なプロバイオティ

クス食品が開発され、整腸、アレルギー症状の緩和、および免疫賦活などの生体調節作用が報告されている<sup>1)</sup>。一方、食肉加工の分野では発酵ソーセージの利用に留まり、今日まで乳酸菌の利用研究はほとんどみられない。近年の腸内フローラの研究で、ますます乳酸菌の有益性が報告され、食品などへの応用性は広がっている。このような状

況を踏まえ、著者らは、食肉加工への乳酸菌の新規利用技術として、発酵ポークジャーキーの開発研究を進めてきた<sup>2-4)</sup>。昨年度の本助成研究<sup>5)</sup>では、再構成肉発酵ポークジャーキーの加工技術の開発とその特徴について報告した。引き続き、今年度は再構成発酵ジャーキーの品質に及ぼす乳酸菌の作用として、高齢者にとっても食べやすいテクスチャーとするために、タンパク質分解活性の高い乳酸菌の検討、および発酵ジャーキーの栄養成分の特徴について分析を行った。以下に、検討結果について報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 豚肉試料

原料肉は、前報<sup>5)</sup>同様の方法に従って、輸入冷凍豚もも肉（カナダ産）から脂肪や筋膜を除去後、赤身肉から挽き肉（径3.2mm）を調製して実験に使用した。

### 2.2 乳酸菌

Table 1 の(株)明治食機能科学研究所から供与された26種類の*Lactobacillus*属乳酸菌について検討した。これらの乳酸菌株は*Lactobacilli* MRS broth (Difco : Ref 288130) で嫌氣的に賦活培養 (37°C, 18時間) 後に菌体を回収し、10%脱脂乳培地に懸濁し、使用時まで速やかに-80°Cに冷凍保管した。

コントロールとして、前報の再構成肉発酵ジャーキーに使用した乳酸菌スターターの*Lb. bulgaricus*/*Stc. thermophilus*混合乳酸菌末 (DVS YC-380 ; Christian Hansen), およびYC-380から分離した*Lb. bulgaricus*と*Stc. thermophilus*についても、上記の手順で凍結保存した。凍結菌株の賦活は次の手順で行った。凍結乳酸菌株を解凍し、その1白金耳を15ml ppチューブのMRS液体培地に接種した。37°Cのインキュベーターに18時間培養した後、培養したMRS brothの菌体を懸濁してから、その1白金耳を5 ml MRS培地に接種し、37°Cのインキュベーターで18時間培養して賦活した。

### 2.3 乳酸菌の性能評価

#### 1 : 脱脂乳寒天培地によるプロテアーゼ活性スクリーニング

10%脱脂乳/0.5%グルコース/0.5%酵母エキスの培養液に寒天15%を添加した脱脂乳寒天培地の平板を作製し、この平板に孔径6 mmの孔をあけた。賦活後の菌体懸濁液を脱脂乳寒天培地にあけた孔に20 µl注入し、37°Cで48時間培養し、孔の周りのクリアゾーンの大きさをプロテアーゼ活性を評価した。

#### 2 : 筋原線維に対する生育性

MRS液体培地で賦活した乳酸菌を、10%豚ひ

Table 1 26 different species of *Lactobacillus* groups used for the experiment

Species	Strains	Species	Strains	Species	Strains
<i>Lb. johnsonii</i>	ME-455	<i>Lb. rhamnosus</i>	ME-464	<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>lactis</i>	ME-473
<i>Lb. acidophilus</i>	ME-456	<i>Lb. salivarius</i>	ME-465	<i>Lb. delbruekii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ME-474
<i>Lb. crispatus</i>	ME-457	<i>Lb. zaeae</i>	ME-466	<i>Lb. ruminis</i>	ME-475
<i>Lb. amylovorus</i>	ME-458	<i>Lb. fermentum</i>	ME-467	<i>Lb. harvinensis</i>	ME-476
<i>Lb. gasseri</i>	ME-459	<i>Lb. helveticus</i>	ME-468	<i>Lb. panis</i>	ME-477
<i>Lb. brevis</i>	ME-460	<i>Lb. reuteri</i>	ME-469	<i>Lb. parabuchneri</i>	ME-478
<i>Lb. buchneri</i>	ME-461	<i>Lb. mucosae</i>	ME-470	<i>Lb. paraplantarum</i>	ME-479
<i>Lb. casei</i>	ME-462	<i>Lb. oris</i>	ME-471	<i>Lb. pentosus</i>	ME-480
<i>Lb. plantarum</i>	ME-463	<i>Lb. vaginalis</i>	ME-472		

き肉/0.5%グルコース/0.5%酵母エキスから構成される肉懸濁液200mlに接種し、37℃、6時間発酵し、0、2、4、6時間後のpHを測定した。

### 3：筋原線維のSDS-PAGE

前述2で0、2、4、6時間発酵した肉懸濁液5mlを遠心分離(3,500rpm、4℃、15分)し、沈澱部を回収して前報同様、Olsonらの方法<sup>6)</sup>で電気泳動用の筋原線維を調製し、SDS-PAGEを行った。

#### 2.4 発酵ポークジャーキーの試作

再構成肉を利用した発酵ポークジャーキーの試作は前報<sup>5)</sup>と同様の手順で行った。ただし、豚挽き肉には濃縮乳酸菌カルチャーを10%の割合で混合した。

#### 2.5 再構成発酵ポークジャーキーの栄養成分、機能性成分の分析

一般組成は(一財)日本食品分析センターに、 $\gamma$ -アミノ酪酸とビタミン類は(株)島津テクノリサーチに、カルノシン、アンセリン、およびカルニチンは(一社)食肉科学技術研究所に依頼分析した。その他の、pH、 $a_w$ 、微生物検査は、前報<sup>1)</sup>に従って行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *Lactobacillus*属乳酸菌26種類の生育性

賦活した26種類の*Lactobacillus*属乳酸菌と混合スターターYC-380、およびYC-380から分離した*Lb. bulgaricus*、*Stc. thermophilus*を10%ホエイ/0.5%酵母エキス/0.5%グルコース培養液に接種し、37℃、8時間発酵した。発酵中の培養液のpH変化(図略)から、8時間の発酵で培養液pHが4.6に達した乳酸菌株は、ME-462、463、464、465、466、470、478、および480の8種類で、これらの菌株の発酵性が良好であると判断した。

### 3.2 脱脂乳寒天培地によるたんぱく質分解活性スクリーニング

脱脂乳寒天培地にあけた円形の穴に乳酸菌培養液を接種し、37℃、18時間培養した。寒天培地の穴の周囲には寒天培地に含まれる乳タンパク質が分解されて生じるクリアゾーンが観察された。この円形のクリアゾーンの直径を計測し、その大きさにより、タンパク質分解活性の強さを比較した。その結果をFig. 1に示した。前述の生育性の実験結果と同様、ME-462、463、464、465、466、470、478、480、および*Lb. bulgaricus*/*Stc. thermophilus*混合乳酸菌(YC-380)のプロテアーゼ活性が強いことが判明した。これら8種類の*Lactobacillus*属の菌種は前述の生育性試験から、ホエイカルチャーでの生育性も優れていた。

### 3.3 豚肉懸濁液中における乳酸菌の生育性とプロテオリシス

脱脂乳寒天培地でプロテアーゼ活性が強い8種類の*Lactobacillus*属乳酸菌、および混合乳酸菌(YC-380)とその分離菌*Lb. bulgaricus*のMRS懸濁液を10%肉懸濁液に接種し、37℃で6時間発酵した。発酵中の豚肉懸濁液のpHをFig. 2に示した。ME-470株の*Lb. mucosae*とYC-380から分離した*Lb. bulgaricus*は他の菌に比べpH降下速度が遅く、これらの菌を接種した発酵中の肉懸濁液から調製した筋原線維の濃度も低かった。残りの7菌株とYC-380を接種した肉懸濁液のpH降下速度はほぼ同じであり、発酵中の肉懸濁液から調製した筋原線維の濃度も同傾向を示し、その濃度は発酵の進行とともに上昇した。発酵中のpH降下速度が速いことは豚肉懸濁液における乳酸菌の生育性が優れていることを示し、懸濁液から調製した筋原線維濃度が高いことは、発酵中の乳酸菌によるプロテオリシス作用の強さを示唆している。次に、乳酸菌による発酵中の豚肉懸濁液における筋原線維タンパク質のプロテオリシスを調べるため

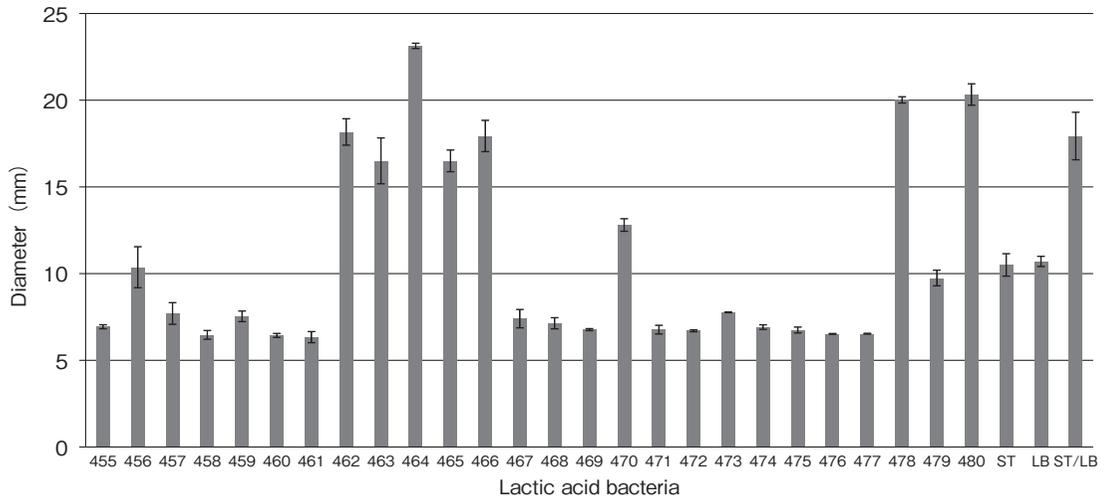


Fig. 1 Screening for proteolytic activities of lactic acid bacteria using 10% skim milk agar plate. Numbers of 455 to 480 show 26 different strains of *Lactobacillus*. ST, LB and ST/LB show *Stc. thermophilus*, *Lb. bulgaricus* and a combination of both strains, respectively. 20  $\mu$ L of MRS broth cultures of each strain was added into the hole made in the skim milk agar plate and then incubated for 2 days at 37°C. Diameters of clear zones formed in the outer of the hole after incubating were measured.

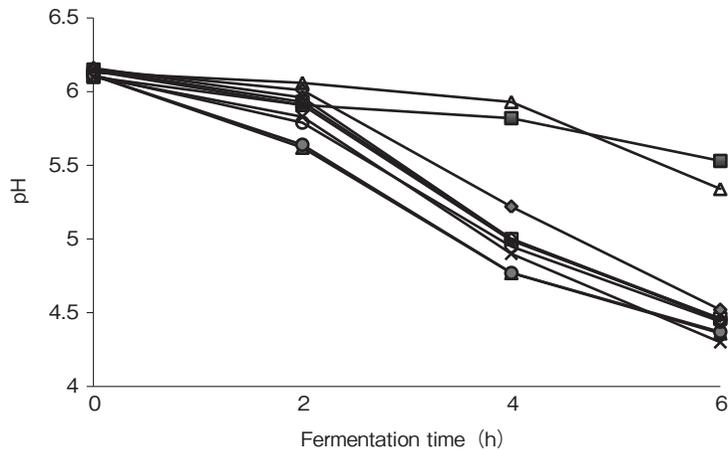
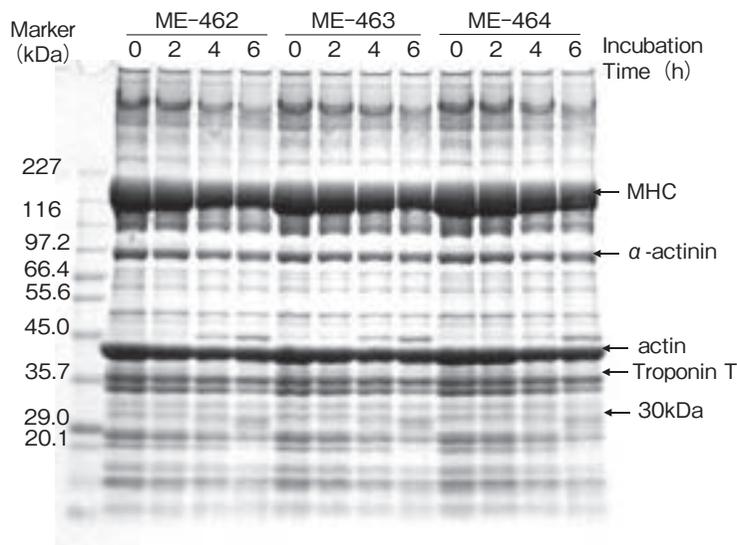


Fig. 2 pH changes of 10% suspension of pork muscle during fermentation using Lactic acid bacteria for 0, 2, 4 and 6 h at 37°C. *Lb. casei* ME-462 (-), *Lb. plantarum* ME-463 (□), *Lb. rhamnosus* ME-464 (◆), *Lb. salivarius* ME-465 (◇), *Lb. zeae* ME-466 (▲), *Lb. mucosae* ME-470 (△), *Lb. parabuchneri* ME-478 (●), *Lb. pentosus* ME-480 (○), *Lb. bulgaricus* (■), YC-380 (×). 0.5% glucose and 0.5% yeast extract were added into the pork muscle suspension.

に、筋原線維のSDS-PAGEを行った。

### 3.4 SDS-PAGEによる筋原線維の分解パターン

選抜した乳酸菌を接種した発酵中の豚肉懸濁液



**Fig. 3** 5-20% SDS-PAGE patterns of myofibrillar proteins from the pork suspension during fermentation with LAB for 0, 2, 4 and 6 h at 37°C. 5-20% gradient gel used.

*Lb. casei* ME-462, *Lb. plantarum* ME-463, *Lb. rhamnosus* ME-464

**Table 2** Nutrient components of fermented restructured pork jerky

	Fermented Jerky	Pork (fresh ham) *
Energy (kcal/100 g)	280	128
Water (g/100 g)	34.3	73.0
Protein (g/100 g)	40.5	22.1
Carbohydrate (g/100 g)	10.2	0.2
Fat (g/100 g)	8.6	3.6
Mineral (g/100 g)	6.4	1.1
Vitamin B <sub>1</sub> (mg/100 g)	1.07	0.96
Vitamin B <sub>2</sub> (mg/100 g)	0.36	0.23
Vitamin B <sub>6</sub> (mg/100 g)	0.51	0.33
Vitamin B <sub>12</sub> (μg/100 g)	0.63	0.30
γ-Aminobutyric acid (mg/100 g)	42.0	—

\*calculated using Standard Tables of Food Composition in Japan-2015- (Seventh Revised Edition)

から調製した筋原線維のSDS-PAGEパターンから、ME-470以外の7種の菌株はほぼ同程度のタンパク質分解性を示し、いずれの乳酸菌も同じ分解パターンでプロテオリシスの現象が観察された。ここではME-462, 463, 464の結果をFig. 3に示した。すなわち、pHが急激に低下する発酵4時間以降で筋原線維の分解が顕著となり、筋原線維の主要タンパク質の分子量20万付近のミオシ

ン重鎖、43kDaのアクチン、および10万付近のα-アクチニンの分解がみられた。筋原線維タンパク質の分解の程度には差があり、pH降下が速く発酵性が優れている乳酸菌が強いタンパク質分解作用を示した。特に*Lb. zae*と*Lb. parabuchneri*のプロテアーゼ活性が強かった。

### 3.5. 栄養成分と機能性成分について

再構成発酵ジャーキーの栄養成分の組成を

Table 2 に示した。豚もも肉 (生) と比較すると、発酵ジャーキーは乾燥によって、いずれの成分も増加し、特にタンパク質含量は40.5%と多く、タンパク質の良い給源となることを確認した。また体内の様々なエネルギー代謝において重要な働きをするビタミンB群も比較的豊富に含まれた。また、 $\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) が約40mg/100g 検出された。GABAは血圧降下や精神安定などの作用が知られている。GABAを多く含む発芽玄米で100g中に10mg程度であることから、その4倍量が期待された。発酵ジャーキー中のGABAは、*Lb. bulgaricus*/*Stc. thermophilus*混合菌によって生産されたものと考えられた。

その他の機能性成分として、カルノシン493.0mg/100g、アンセリン21.8mg/100g、およびL-カルニチン15.4mg/100gが検出された。

#### 4. 要 約

発酵ジャーキーなど、食肉加工への乳酸菌の利用技術を開発するために、26種類の*Lactobacillus*属乳酸菌を取り上げ、食肉加工への利用性を検討した。コントロールの乳酸菌は、前報の発酵ジャーキーに使用した*Lb. bulgaricus*/*Stc. thermophiles*混合菌とした。豚肉中での生育性とタンパク質分解性が共に優れた*Lactobacillus*として、*Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus*, *Lb. salivarius*, *Lb. zae*, *Lb. mucosae*, *Lb. parabuchneri*, および *Lb.*

*pentosus*を選抜した。なかでも*Lb. zae*と*Lb. parabuchneri*のプロテアーゼ活性が強かった。筋原線維のSDS-PAGE分析から、これら乳酸菌の筋原線維タンパク質の分解パターンはほぼ同じであった。今後、選抜した乳酸菌の発酵ポークジャーキーへの利用性について検討予定である。本研究で開発した、*Lb. bulgaricus*/*Stc. thermophilus*混合菌による再構成肉の発酵ポークジャーキーの栄養成分は、豚もも肉 (生) と比較し、タンパク質含量が40.5%と多く、ビタミンB群が比較的豊富に含まれた。機能性成分として、 $\gamma$ -アミノ酪酸40mg/100g、カルノシン493.0mg/100g、アンセリン21.8mg/100g、およびL-カルニチン15.4mg/100gが検出された。発酵ポークジャーキーはタンパク質などの栄養成分や機能性成分の補給源として有用であると考えられた。

#### 文 献

- 1) 飯野久和, 信田幸夫: 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) Ohashi, K., Negishi, H.: *Food Science and Technology Research*, 20, 679~685, 2014.
- 5) 根岸晴夫: 平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 34, 23~28, 2016.
- 6) Olson, D. G., Parrish, F. C. Jr., Stromer, M. H.: *J. Food Sci*, 41, 1036~1041, 1976.

# 食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチンの影響

Effect of hypoxanthine on the improvement of taste during postmortem aging of meat

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)

In preceding study, we revealed that hypoxanthine (Hx) is essential for the enhancement of the cured meat taste during maturation. Because Hx accumulates in meat by the degradation of inosine monophosphate (IMP) during postmortem aging, it is likely to play an important role in the improvement of meat taste induced by aging. Therefore, we examined the involvement of Hx in the taste of aged meat.

First, the concentrations of Hx and IMP, and the sensory analysis were preliminarily determined in the dry- and wet-aged meats. The concentrations of Hx in the dry-aged beef and pork were higher than those in the wet-aged ones, while the concentrations of IMP were higher in the wet-aged beef and pork than in the dry-aged ones. The sensory scores, that is, strength of umami and kokumi tastes were also higher in the dry-aged beef and pork than the wet-aged ones. Consequently, Hx may contribute to the improvement of meat taste more than IMP.

To remove the influence of texture on the sensory evaluation of aged meat, the soups were prepared from longissimus thoracis muscles of pork aged for 2 and 7 days, and then the taste of the soups were evaluated by sensory analyses when several concentrations of Hx were added to the soups. The enhancement of bitter, umami and kokumi tastes were recognized by the addition of Hx to the soups, and the enhancement was higher in soup prepared from pork aged for 7 days than in that for 2 days. The enhancement by the addition of Hx to the soups was in dose-dependent fashion up to a certain concentration of Hx. It was concluded that Hx is essential for the improvement of meat taste during postmortem aging.

## 1. 目的

食肉は、と畜後の一定期間低温で熟成することにより好ましい食感および風味、すなわち「おいしさ」が発現する。熟成の主目的は食肉の軟化で

あり、食肉中に内在するカルシウムイオンやプロテアーゼの関与によって軟らかさを獲得することが明らかになっている<sup>1,2)</sup>。食肉の軟化と同時に風味が改善することも明らかになっており、風味のうち香りに関しては熟成に伴う酸臭や獣臭の消

失が報告されている<sup>3)</sup>。一方、味に関しては遊離アミノ酸や低分子ペプチドの増加が食肉の旨味やコク味の増強の主要因であると考えられている<sup>4,5)</sup>。しかしながら、熟成に伴う食肉の風味の改善機構は複雑な化学的・生物的反応によって制御されており、詳細は明らかにされていない。

ハムやソーセージといった塩漬食肉製品もまた、塩漬熟成と称される塩漬期間が長いほど特有の好ましい風味が増強することが知られている。我々は、これまでに塩漬熟成に伴い特有の味を増強する因子について、食肉中の多くの呈味成分を含む筋漿画分に着目して探索してきた。その結果、塩漬熟成の過程で顕著に増加するのはヒポキサンチン (Hx) であり、これが塩漬肉特有の味の増強に必須な成分であることを明らかにしてきた<sup>6)</sup>。

Hxとは、食品中の旨味成分として広く認知されている核酸関連物質、イノシン酸 (IMP) が熟成に伴って分解したものであり、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<sup>4,7)</sup>。一方で、長期間の熟成により風味が増強したヨーロッパ産の生ハムや、近年わが国で脚光を浴びているドライエイジングビーフでは、IMP含量は低下しHx含量が増加している<sup>8~10)</sup>。従来、食肉の味の改善には旨味物質であるグルタミン酸とIMPの寄与が大きいと考えられてきたが、塩漬熟成に限らず、と畜後の熟成においても食肉中にHxが蓄積するため、熟成による味の改善はグルタミン酸とIMPによる旨味の増強のみでは説明が困難である。以上のことから、食肉の熟成に伴う味の改善へのHxの関与が強く示唆される。

Hxは、単体では苦味を呈し、その閾値は0.73  $\mu\text{mo/ml}$ と報告されている<sup>11)</sup>。苦味は一般には好ましくない味として捉えられているが、食品によっては嗜好性に寄与している場合もあり、Michikawaらは帆立貝には苦味を呈すアミノ酸の

一つであるアルギニンが閾値を大きく越える濃度含まれるにも関わらず、苦味は増強せずに帆立貝の味のコク味が増強すると報告している<sup>12)</sup>。我々は、塩漬肉特有の味の増強へHxの呈する苦味に関与するか否かについて調べた結果、苦味物質の種類に関わらず、一定程度の苦味が塩漬肉の旨味やコク味の増強を惹き起こすことを明らかにしてきた<sup>10)</sup>。また、Hxはアルギニンやロイシンといった食肉中の苦味を呈するアミノ酸と比較するとその閾値が低く<sup>12,13)</sup>、なおかつ熟成に伴って閾値の数倍量まで食肉中に蓄積するため、食肉の苦味の鍵となる物質と推定される。

本研究の目的は、食肉のと畜後の熟成に伴う味の改善に対するHxの関与を明らかにすることである。そこで、まず予備的な試験として長期熟成した豚肉および牛肉中の核酸関連物質含量と官能試験の関係を調べた。次に、熟成期間の異なる豚の胸最長筋からスープを調製し、そこへHxを加えた時のスープの味の変化について、官能試験を用いて苦味、旨味およびコク味の評価を中心に調べた。

## 2. 方 法

### 2.1 長期間熟成した豚肉および牛肉の成分分析および官能試験

3頭の三元豚および交雑種牛ロースの一方を無包装、0-1℃、湿度75%の条件で4週間ドライエイジング、もう一方を真空包装して同様の条件でウェットエイジングした後に胸最長筋を切り出し、成分分析および官能試験に供した。熟成後の胸最長筋をフードカッター (GM200, Retsch製) で細切し、水分、タンパク質、脂質、遊離アミノ酸および核酸関連物質含量を測定した。また、熟成後の胸最長筋を厚さ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分間加熱後冷却し、厚さ5mmにスライスして官能

試験に供した。評価法は7段階（0～6点）の採点法とし、旨味、コク味、および美味しさ（総合評価）を評価した。パネルは当研究所に所属する分析型パネル3名とし、旨味およびコク味の評価はノーズクリップを用いて鼻腔を閉じ香りの影響を排除して試験した。

## 2.2 理化学分析

水分含量は乾燥減量法により測定した。タンパク質含量および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）。pHはガラス電極により25℃で測定した（PH-METER F52, HORIBA製）。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ン洗浄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。核酸関連物質濃度は、北田らの方法で測定した<sup>14)</sup>。

## 2.3 豚肉スープの調製

と畜後2日経過したチルド豚ロース3本（LWD種）の胸最長筋を挽肉にして混合し、半量を4℃で5日間熟成した。と畜2および7日目の挽肉に1.5倍量の0.1M NaClを加えてフードカッターで5,000rpm, 30秒間混合し、非通気性の袋（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。生じたドリップを回収し、10,000g, 30分間、4℃で遠心分離して得られた上清を5Aろ紙でろ過したろ液を豚肉スープとし、使用するまで真空状態で-30℃で保管した。

## 2.4 豚肉スープの官能試験

と畜2および7日目の豚肉スープに、内在性のHx含量を考慮してHxの濃度が2  $\mu\text{mol/ml}$ となるように加え官能試験に供した。また、と畜7日目の豚肉スープには、Hx添加による味の変化に対する濃度依存性を調べるため、Hxの濃度が1お

よび3  $\mu\text{mol/ml}$ となるように加えた。

官能試験では、豚肉スープの塩味、苦味、旨味およびコク味（厚みthickness, 複雑さcomplexity, 持続性continuity）の強さについて、7段階の採点法で評価した。コク味は黒田らおよび西村らの定義を用い、厚みは「味が濃い、こってりしている」、複雑さは「味が複雑、深みがある」、持続性は「旨味の後味」を評価した<sup>15,16)</sup>。スコアは、各味について極めて弱いあるいは感じない場合を0点とし、反対に極めて強いあるいは感じる場合を6点とした。パネルは当研究所に所属する分析型パネル5名とし、事前にパネルへ熟成期間の異なる豚肉を官能評価してもらい、評価尺度の摺り合わせを行った。また、試験時はノーズクリップを着用して鼻腔を閉じ、香りの影響を排除した。

## 2.5 統計処理

すべての官能試験の結果はパネル5名の平均値±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。

## 3. 結果と考察

### 3.1 長期熟成した食肉の成分分析および官能試験

我々は、平成27年度の本助成研究において、予備的な試験として長期熟成した牛肉中の核酸関連物質含量と官能試験の関係を調べ、Hx含量が高い試料の旨味およびコク味が強い傾向であることを報告した<sup>10)</sup>。すなわち、Hxが食肉の熟成に伴う味の改善へ関与する可能性が示唆された。そこで、本研究では、Hxの味への関与が畜種によって違うかどうかを調べるため、牛肉と豚肉をウェットおよびドライエイジング法で熟成し、理化学分析および官能試験へ供して比較した。

まず、ウェットおよびドライエイジングした三元豚および交雑牛の胸最長筋の一般成分値をTable 1に示した。豚肉、牛肉共に、水分、たん

Table 1 General constituent of aged pork and beef

		pork		beef	
		wet-aged	dry-aged	wet-aged	dry-aged
water	g/100 g	71.1	70.4	67.3	65.1
protein	g/100 g	24.3	25.0	22.9	23.6
fat	g/100 g	4.1	3.1	8.6	8.6

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

		pork		beef	
		wet-aged	dry-aged	wet-aged	dry-aged
free amino acids (mg/100 g)	Asp	5.1	24.6	22.2	41.1
	Thr	14.3	41.8	49.6	69.1
	Ser	19.0	49.3	63.2	76.2
	Glu	27.0	75.9	70.3	111.1
	Gly	16.9	37.3	42.2	54.7
	Ala	35.9	70.8	118.6	145.3
	Val	17.5	47.4	87.1	106.4
	Cys	0.0	0.0	0.0	0.0
	Met	17.2	34.4	52.1	53.5
	Ile	17.1	37.5	64.2	74.3
	Leu	29.6	64.2	119.2	130.3
	Tyr	18.5	39.0	7.4	28.1
	Phe	17.9	40.0	77.2	82.1
	Trp	1.6	3.4	0.0	9.4
	Lys	20.4	59.7	95.6	128.8
ATP-related compounds ( $\mu\text{mol/g}$ )	His	6.7	20.7	30.6	41.9
	Arg	21.2	51.4	56.3	45.3
	Pro	5.3	18.8	17.6	41.0
ATP-related compounds ( $\mu\text{mol/g}$ )	IMP	3.2	1.2	0.4	N.D.
	Hx	1.4	2.5	1.6	2.0

ばく質および脂質含量において熟成条件の違いによる大きな差がなく、ドライエイジングによる試料の乾燥および濃縮はしていないと考えられた。続いて、遊離アミノ酸含量および核酸関連物質含量をTable 2に示した。遊離アミノ酸含量は、豚肉、牛肉ともにウエットエイジングよりもドライエイジングの方が顕著に高く、旨味を呈すアミノ酸であるグルタミン酸は豚肉で2.8倍、牛肉で1.6倍高かった。核酸関連物質含量は、牛肉、豚肉ともにウエットエイジングよりもドライエイジングのHx含量が高く、反対にIMPの含量は低かった。また、豚肉において、ウエットエイジングではHx含量よりもIMP含量が高いが、ドライエイジ

ングではIMPよりもHx含量の方が高かった。以上の結果から、牛肉、豚肉ともにドライエイジングした方が熟成の程度が進んでおり、特に豚肉はウエットおよびドライエイジングの熟成条件による差が顕著だった。

続いて、ウエットおよびドライエイジングした豚および牛の胸最長筋を75℃の水浴中で50分間真空加熱し、官能試験へ供した (Fig. 1)。豚肉、牛肉共に、ドライエイジングの方がウエットエイジングよりも旨味、コク味が顕著に強く評価され、総合評価である美味しさの評価も高かった。また、豚肉において熟成条件の違いによるコク味の強さの差が顕著であり、熟成の程度がコク味の

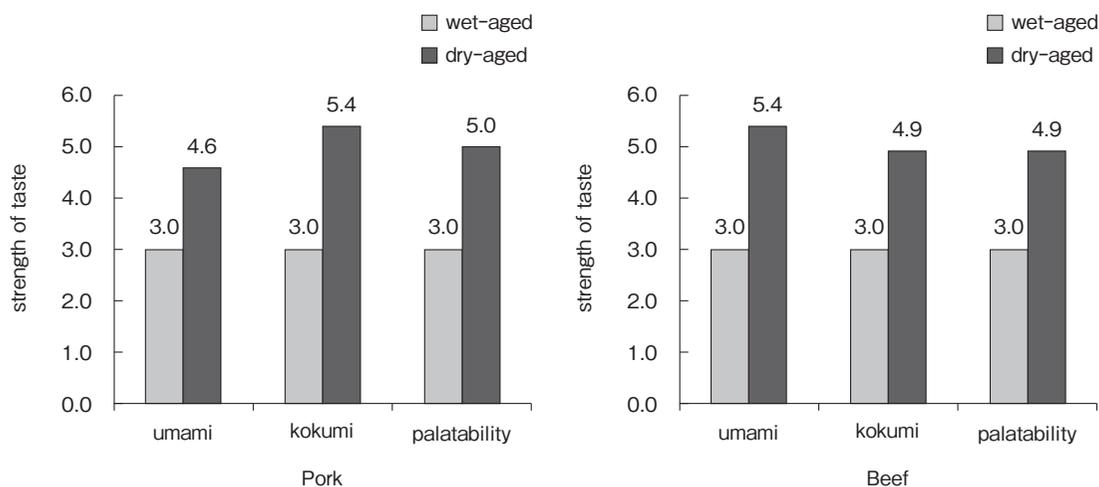


Fig. 1 Strength of taste of aged pork and beef

強さへ関与していることが推定された。以上の結果は、畜種に関係なく、ドライエイジングした試料のHx含量が高く、旨味およびコク味が顕著に強いことを示しており、食肉の熟成に伴う味の改善へのHx関与の可能性が示唆された。反対に、IMP含量が高いウェットエイジングした試料の旨味およびコク味は弱く、熟成に伴う味の改善へのIMPの寄与が低いことが示唆された。また、ドライエイジングした試料はウェットエイジングした試料より遊離アミノ酸含量が顕著に高く、遊離アミノ酸が熟成に伴う食肉の味の改善に不可欠であることが示唆された。

### 3.2 Hx添加による豚肉スープの味の増強

長期熟成した豚肉および牛肉を用いて核酸関連物質含量と官能試験の関係を調べた結果、畜種に関係なく食肉の熟成に伴う味の改善へのHxが関与の可能性が示唆された。しかし、熟成に伴い発現した軟らかな食感や多汁性が官能試験へ少なからず影響する可能性を否定できない。そこで、これらの影響を排除したより単純な実験系で食肉の味へのHxの関与を官能的に評価すべく、豚肉から水溶性以外の食肉成分を排除したスープ状の

試料を調製し、Hxが味の増強に関与するか否かを苦味、旨味およびコク味の評価を中心に調べた。

まず、と畜2および7日目の豚胸最長筋から調製したスープの成分分析の結果をTable 3に示した。2日目と7日目のスープを比較して顕著な差が認められたのは遊離アミノ酸および核酸関連物質であり、遊離アミノ酸は18種すべてにおいて熟成に伴い増加した。核酸関連物質は、IMPが熟成に伴い減少したのに対してHxは2倍に増加した。また、窒素濃度に変化がないため、原料肉の構造タンパク質の分解は進んでいないと考えられた。

続いて、と畜2および7日目の豚胸最長筋から調製したスープにHxを加え、スープの味へのHxの影響を官能試験により調べた。まず、2日目のスープについて、Hx不添加および添加したスープを官能試験に供した (Fig. 2)。Hxの添加濃度は、ドライエイジングした豚肉中のHx含量を参考に十分に熟成された豚肉中の濃度を想定して2  $\mu\text{mol/ml}$ とし、スープに内在する含量を考慮して加えた。官能試験の結果、Hxを添加したスープの苦味、旨味、およびコク味はHx不添加のスープと比較して強い傾向にあり、厚みは有意に強

Table 3 Profile of the pork soup

		2days-pork soup	7days-pork soup
pH		5.83	5.88
nitrogen (mg/100ml)		235	243
free amino acids (mg/100ml)	Asp	0.0	2.3
	Thr	0.9	2.0
	Ser	0.9	2.8
	Glu	0.8	1.7
	Gly	2.4	3.1
	Ala	5.1	7.4
	Val	2.3	3.4
	Cys	0.0	0.0
	Met	1.1	2.9
	Ile	0.8	1.9
	Leu	1.4	3.7
	Tyr	0.7	2.4
	Phe	0.5	2.0
	Trp	0.0	0.0
	Lys	1.0	2.5
His	0.0	0.7	
Arg	0.6	2.2	
Pro	0.0	0.0	
ATP-related compounds ( $\mu$ mol/ml)	IMP	0.99	0.70
	INO	0.61	0.95
	HX	0.15	0.30

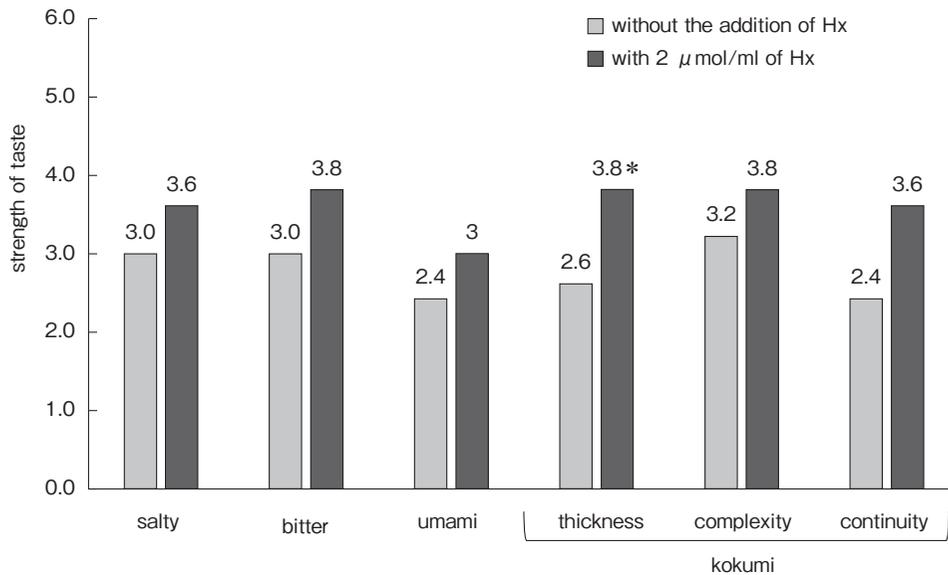
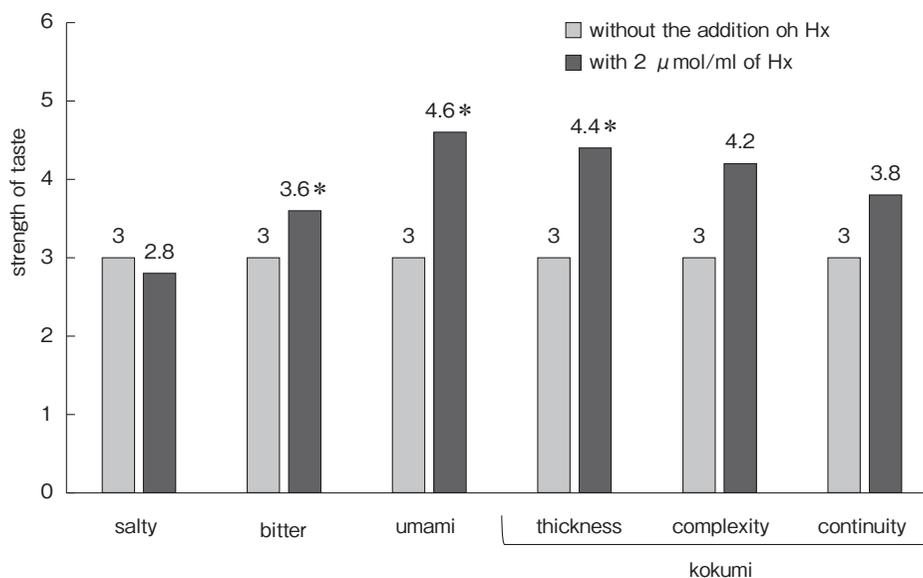


Fig. 2 Effect of hypoxanthine on the taste of soup prepared from pork aged for 2 days  
 The strength of taste of the soup prepared from pork aged for 2 days (without the addition of Hx) was compared with that of soup with 2  $\mu$ mol/ml of Hx. The vales of asterisks are significantly different ( $p < 0.05$ ). Histograms show mean values.



**Fig. 3** Effect of hypoxanthine on the taste of soup prepared from pork aged for 7 days  
 The strength of taste of the soup prepared from pork aged for 7 days (without the addition of Hx) was compared with that of soup with 2 μmol/ml of Hx.  
 The values of asterisks are significantly different ( $p < 0.05$ ). Histograms show mean values.

かった ( $p < 0.05$ )。次に、7日目のスープについて、2日目と同様にHx不添加および添加したスープを官能試験に供した (Fig. 3)。その結果、Hxを添加したスープの苦味、旨味はHx不添加のスープと比較して強く ( $p < 0.05$ )、コク味も強い傾向であった。また、2および7日目のスープはいずれもHx添加による塩味の変化がなかった。以上の結果から、豚肉スープにHxを加えると苦味、旨味およびコク味が増強することが確認された。ここで、Hxを2 μmol/ml加えた2日目と7日目のスープを比較すると、スープ中のHx濃度は同じであるが、7日目の方が不添加スープに対する添加スープの味の増強程度が強い傾向にあった。特に、旨味および厚みは7日目の方が顕著に強まった。この結果は、熟成に伴いスープ中の何らかの呈味成分が増えると、Hxとの相乗効果が強まり、結果としてスープの味が増強することを示唆している。我々は、平成27年度の本研究において塩漬熟成した場合の特有の味の増強にはHx

の呈する苦味が関与していることを明らかにしてきた<sup>10)</sup>。本研究では、スープ中の遊離アミノ酸含量は熟成に伴い増加し、苦味を呈すロイシンやアルギニンといった複数のアミノ酸も増加している (Table 3)。したがって、Hxを含めた苦味物質がスープ中に一定程度存在することによりスープの味の増強効果が強まる可能性が考えられた。

ここで、Hxによるスープの味の増強に対する濃度依存性を調べるため、旨味およびコク味の増強程度が強かったと畜7日目のスープへHxの濃度を変えて1～3 μmol/mlになるように加えて官能試験へ供した (Fig. 4)。その結果、苦味、旨味およびコク味のいずれも、Hx不添加のスープと比較してHxが1～2 μmol/mlの時に最も味が強くなった。一方で、3 μmol/ml加えるとHx不添加のスープとほとんど味の強さが変わらなかった。すなわち、Hx添加によるスープの旨味およびコク味の増強は一定の濃度までは濃度依存的で、一定のレベルを超えると認められなかつ

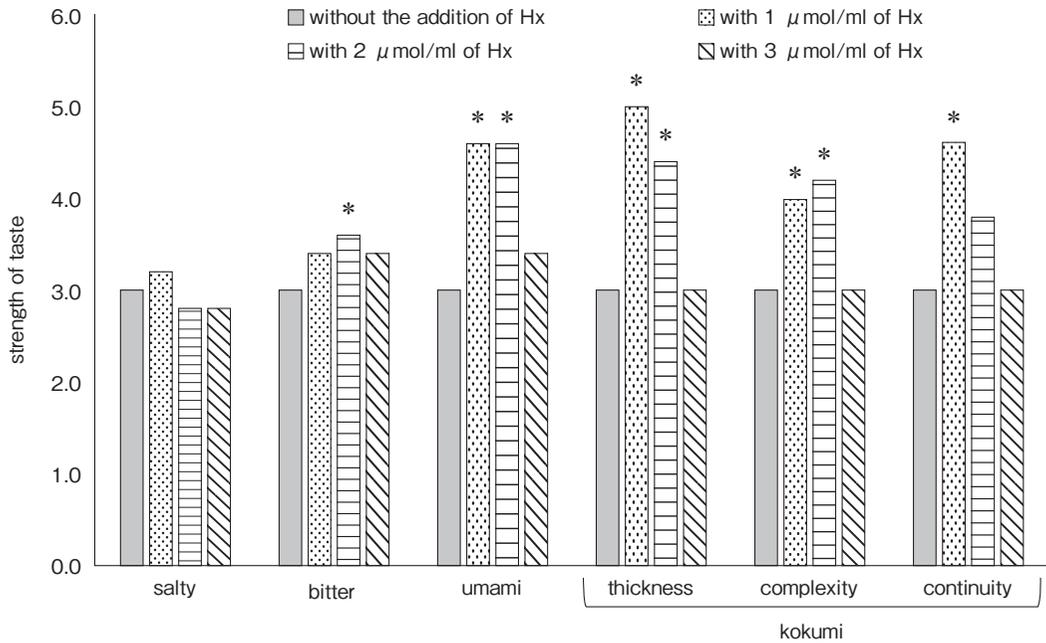


Fig. 4 Concentration-dependency on the effect of hypoxanthine on the taste of soup prepared from pork aged for 7 days

The strength of taste of the soup prepared from pork aged for 7 days (without the addition of Hx) was compared with that of soup with various concentrations of Hx (1, 2 and 3  $\mu\text{mol/ml}$ ).

The values of asterisks are significantly different ( $p < 0.05$ ). Histograms show mean values.

た。ある程度までHxの濃度依存的に味が増強したことから、Hxが食肉の熟成適期をはかる指標となり得ることが示唆された。また、Hxの濃度が高いと旨味およびコク味が弱くなったことは、ドライエイジングをした食肉において問題視されている過熟成による味の低下現象と関連している可能性が考えられた。しかし、Hxの濃度が高い場合に苦味自体も弱まっており、味の増強に対するHxの呈する苦味の関与について今後さらに検討する必要がある。

実際にHxが蓄積した状態の食肉中には、熟成に伴い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成分が同時に蓄積しており、これらが相互作用して熟成肉特有の味わいを形成していると考えられる。しかしながら、本結果から、熟成した食肉特有の味の発現には、これ

まで味への関与が否定されてきたHxが不可欠であると推定された。今後は、食肉の味の増強へのHxの作用機序について解明することにより、Hxを含めた食肉の味に関与する主要因子を用いて「食肉の熟成適期を判断する客観的な指標」を提案していきたい。

#### 4. 要 約

本研究では、と畜後の食肉の熟成に伴う味の改善に対するHxの関与について調べた。まず、長期熟成した豚肉および牛肉中の核酸関連物質含量と官能試験の関係を予備的に調べた結果、Hx含量が高いドライエイジングした試料の旨味およびコク味が顕著に強く、食肉の熟成に伴う味の改善へのHx関与の可能性が示唆された。反対に、IMP含量が高いウエットエイジングした試料の旨

味およびコク味は弱く、食肉の熟成に伴う味の改善へのIMPの寄与が低いことが示唆された。次に、食感の影響を排除したより単純な実験系として、熟成期間の異なる豚の胸最長筋から調製したスープにHxを加えた時の味の変化について官能試験を用いて調べた。その結果、スープにHxを加えると苦味、旨味およびコク味が増強し、その増強の程度は熟成期間の長い原料肉から調製したスープの方が強かった。また、Hx添加によるスープの味の増強は、一定の濃度まで濃度依存的であることが確認された。本結果から、熟成された食肉特有の味の発現にはHxが不可欠であると推定された。

#### 文 献

- 1) Takahashi, K. : *Animal Science Journal*, **70**, 1~11, 1999.
- 2) Hattori, A., Takahashi, K. : *The Journal of Biochemistry*, **103**, 809~814, 1988.
- 3) 松石昌典 : 食肉の科学, **36**, 183~198, 1995.
- 4) Nishimura, T., Kato, H. : *Food Reviews International*, **4**, 175~194, 1988.
- 5) Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., Kato, H. : *Agricultural and Biological Chemistry*, **52**, 2323~2330, 1988.
- 6) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, **88**, 379~385, 2017.
- 7) Escudero, E., Mora, L., Aristoy, M., Toldrá, F. : *Meat Science*, **89**, 536~539, 2011.
- 8) Shibata, K., Yoshida, Y., Matsunaga, T., Nakashima, M., Inoguchi, Y., Shinmura, H., Hattori, A. : 食肉の科学, **54(2)**, 165~174, 2013.
- 9) Escudero, E., Mora, L., Aristoy, M., Toldrá, F. : *Meat Science*, **89**, 536~539, 2011.
- 10) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : 平成27年度食肉に関する助成研究調査報告書, **33**, 23~29, 2015.
- 11) Konosu, S. : Food taste chemistry, ACS Symposium series, No.115, 185 ~ 203, American Chemical Society, Washington, DC, 1979.
- 12) Michikawa, K. : *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, **42(12)**, 982~988, 1995.
- 13) Ninomiya, K. : 調理科学, **1**, No.4, 185~197, 1968.
- 14) 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.
- 15) Kuroda, M., Yamanaka, T., Miyamura, N. : 日本味と匂学会誌, **11(2)**, 175~180, 2004.
- 16) Nishimura, T. : 日本味と匂学会誌, **19(2)**, 163~166, 2012.

# 黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ，および 味認識装置による呈味性評価

Intramuscular free fatty acids related to deliciousness of Japanese Black  
Wagyu beef and its taste-traits analyzed by an electronic taste sensing system

山之上 稔<sup>1</sup>・趙 姫楠<sup>1</sup>・西田 昌弘<sup>1</sup>・中田 悠介<sup>1</sup>・  
上田 修司<sup>1</sup>・羽原 正秋<sup>2</sup>・池崎 秀和<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>神戸大学大学院農学研究科, <sup>2</sup>株式会社INSENT)

Minoru Yamanoue<sup>1</sup>, Yanan Zhao<sup>1</sup>, Masahiro Nishida<sup>1</sup>, Yusuke Nakada<sup>1</sup>,  
Shuji Ueda<sup>1</sup>, Masaaki Habara<sup>2</sup> and Hidekazu Ikezaki<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, <sup>2</sup>INSENT, Inc.)

It is well known that sensory evaluation and an electronic taste sensing system are useful methods to analyze food tastes. The electronic taste sensing system, which employs the similar mechanism as that of human tongue, converts food tastes into numerical data. Recently, it has been developed advanced taste sensors as a method to evaluate taste-traits of meat and meat products. But the most appropriate and standard method of beef taste-trait evaluation has not been established yet, even though related reports by advanced taste sensors are gradually increasing. The purposes of this study were to develop a method which is suitable to taste-trait analysis of beef and to obtain the basic knowledge of generalizing the method using the electronic taste sensing system. Therefore, we revealed changes in beef taste-traits by the method depending on bovine species, postmortem aging days and cooking process. Sample beef slices were taken from carcass cross-section between the sixth and seventh ribs of Japanese Black Wagyu and Holstein cattle and stored at 4°C antiseptically. At 7-, 14- and 21-days postmortem, beef broths were prepared from raw and cooked samples. Each beef broth sample was analyzed by the electronic taste sensing system and estimated by sensory evaluation for comparison. As the results, beef broth from boiled *longissimus thoracis* muscles of Japanese Black Wagyu at 21-days postmortem is probably desirable to consumers. Different taste-trait patterns of beef broth removed protein or added ethanol in pretreatment procedures were demonstrated unlike the other methods. In order to establish the optimize pretreatment method, the results assessed not only by the electronic taste sensing system but also sensory evaluation of human panels should be needed.

## 1. 目 的

牛肉のおいしさは、熟成中に増加するペプチド、アミノ酸や核酸関連物質などの呈味物質に加

えて、脂肪交雑として知られる筋内脂肪が風味や軟らかさなどの食味性に影響して発現される<sup>1-3)</sup>。筋内脂肪では脂肪交雑の多さが高品質の牛肉として評価されるが、筋内脂肪量が同程度の牛肉でも

おいしさに優劣のあることが知られている。近年、筋内脂肪量だけでなく脂肪の質、すなわちトリアシルグリセロールの構成脂肪酸が牛肉の風味要因となることが示されている<sup>1)</sup>が、牛肉は長期間の熟成を経て加熱後に食されており、熟成および加熱で筋内脂肪が変化し、遊離脂肪酸の量や組成に変化が起きている可能性がある。

上記の観点から、平成23~26年度に伊藤記念財団からの研究助成を受けて、熟成および加熱前後の黒毛和種牛肉とホルスタイン種牛肉の摂取時に口腔に拡がる肉汁中の遊離脂肪酸の量および組成の変動を分析し、加熱牛肉の食味性を官能評価で調べた<sup>4~7)</sup>。それらの結果、食味の良い黒毛和種牛肉では、熟成に伴い肉汁中の遊離脂肪酸量が筋肉内リパーゼのはたらきにより増加すること<sup>5,7)</sup>、遊離脂肪酸組成は筋内脂肪であるトリアシルグリセロールの脂肪酸組成と異なり、パルミチン酸、ステアリン酸およびオレイン酸の3種のみが検出され、飽和脂肪酸であるパルミチン酸およびステアリン酸の割合が高く、熟成の進行とともにオレイン酸割合が増加することを見出した<sup>6)</sup>。そしてこれら筋内の遊離脂肪酸変化は牛肉のおいしさに寄与していることを示唆している。

牛肉のおいしさに密接に関連する味要素としての遊離脂肪酸の影響を、よく知られているペプチド、アミノ酸や核酸関連物質などの呈味物質と併せて明らかにするうえで、現在のところ、それらの物質が総じて知覚される呈味評価にはヒトによる官能評価以外に有効な方法が見出されていない。近年、食肉・肉製品の呈味性を客観的に機器分析する手法の一つに、味覚センサーを備える味認識装置<sup>8)</sup>を応用した報告例が増えてきている<sup>9~11)</sup>。しかし味覚センサーによる牛肉の呈味性評価では最適かつ統一された分析方法がまだ確立されておらず、評価間の比較検証に課題が残されている。本研究では、味覚センサーによる牛肉

呈味性分析の最適な手法を確立するために、種々の牛肉サンプルの分析を行い、官能評価との関連を調べた。

## 2. 方法

### 2.1 試薬および牛肉試料

試薬は特に表記してあるものを除き、ナカライテスク社もしくは和光純薬工業株式会社の特級試薬を用いた。牛肉試料は、伊藤ハム(株)食肉事業本部から購入した黒毛和種およびホルスタイン種枝肉の第6-7肋骨間のロース部を用いた。

### 2.2 熟成および加熱処理

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

### 2.3 肉汁サンプルの調製

未加熱および加熱牛肉の各4gを採取し、過去の報告<sup>9~11)</sup>におけるサンプル調製法を改変した次の前処理法で肉汁サンプルを調製した。方法1：破碎・均質化と低温固化による脂肪除去<sup>11)</sup>、方法2：15%EtOH中の破碎・均質化による脂肪除去<sup>10)</sup>、方法3：煮出しと低温固化による脂肪除去<sup>9)</sup>、および方法4：破碎・均質化と除タンパク質を行う<sup>5)</sup>。

### 2.4 味覚センサー分析

と畜後7、14および21日目に胸最長筋から牛肉片を採取した。未加熱または加熱牛肉片から4種類の 방법으로肉汁サンプルを調製し、6種類のセンサーを備える味認識装置 (INSENT社, TS-5000

ZまたはSA402B)で呈味性を分析した。

## 2.5 官能評価

食肉の官能評価ガイドライン (2005)<sup>12)</sup>に従って、と畜後21日目の加熱牛肉から肉汁サンプルを調製し、平均年齢23歳の男女14名の学生により6段階の評点法で評価した。

## 2.6 ペプチド定量

方法4で除タンパク質を行い調製した牛肉汁中のペプチド含量は、BSAを標準としてLowry法<sup>13)</sup>で定量した。

## 3. 結果と考察

ホルスタイン種および黒毛和種牛胸最長筋肉汁の呈味性に及ぼす熟成の影響を味覚センサーで調べ、結果を熟成7日目の未加熱サンプルを基準にして示す (Fig. 1)。両品種の牛肉汁ともに、熟成に伴い苦味雑味および旨味は増加し、酸味は減少する傾向であった。しかしそれらの変化の程度は両品種間で異なり、苦味雑味はホルスタイン種牛肉汁で強く、酸味の減少と旨味の増加は黒毛和種牛肉汁で顕著であった。結果は示していないが、加熱処理はホルスタイン牛肉汁の苦味雑味を軽減し、黒毛和種牛肉汁の旨味と甘味を増強した。加熱により我々が通常食している調理牛肉の特徴に近くなることが示唆された。

牛肉の部位間での呈味性の違いを調べるために、ホルスタイン種牛肉の胸最長筋と僧帽筋を加熱後に肉汁を調製し、味覚センサーで分析した (Fig. 2)。未加熱と加熱した胸最長筋のサンプルを基準にすると、胸最長筋では僧帽筋より甘味と酸味が強く検出され、苦味雑味と渋味刺激が弱い結果であった。筋肉部位間での呈味性の違いが示唆されたことから、今後の実験では継続してロース部の胸最長筋を用いた。

牛肉の味覚センサー分析に最適な肉汁サンプルを見出すために、分析値に及ぼす肉汁サンプル調

製法の影響を調べた結果をFig. 3に示す。加熱した牛肉から調製方法4に従って準備したサンプルを基準にして分析値を解析した結果、他の調製方法による肉汁分析値と異なるパターンを示した。すなわち両品種ともに他の3種類の方法に比較して検出された酸味値が高く、旨味は低値であり、特に黒毛和種牛肉汁の甘味値が低い結果であった。低pHが旨味センサーや甘味センサーに影響する可能性が考えられる。

牛肉汁の官能評価の結果をFig. 4に示す。加熱牛肉から方法4で調製したサンプル値を基準にして解析した結果、対象者全員の結果では両品種ともに酸味以外の味要素に関しては、Fig. 3に示す味覚センサー分析結果にほぼ一致して3種類の方法で調製した肉汁サンプルの各味要素がより強く知覚された。特に方法3で調製した肉汁サンプルにおける官能評価とセンサー分析結果の近似から、同方法で調製したサンプルが味覚センサー分析に適していることが示唆された。方法2で調製した肉汁サンプルには15%エタノールが入っており、肉汁中でより多量の脂肪の除去が起こり、筋内脂肪が多い黒毛和種牛肉では各味要素が高値で分析されたのではないかと考えられる。

牛肉汁には味覚センサー分析および官能評価に影響する多くの物質が含まれていると考えられる。その中のペプチド含量を分析した結果をFig. 5に示す。黒毛和種牛とホルスタイン種牛の両肉汁中に熟成に伴いペプチド量が増加し、これまでの結果と一致した。しかし黒毛和種牛とホルスタイン種牛間では筋内脂肪量の違いに関わらず、言い換えればいわゆる赤身肉量の違いに関わらず、両肉汁間のペプチド含量に差を見出せなかった。今後、核酸関連物質や遊離アミノ酸等の他の呈味物質を定量し、味覚センサー分析および官能評価の結果との関連を調べる必要がある。

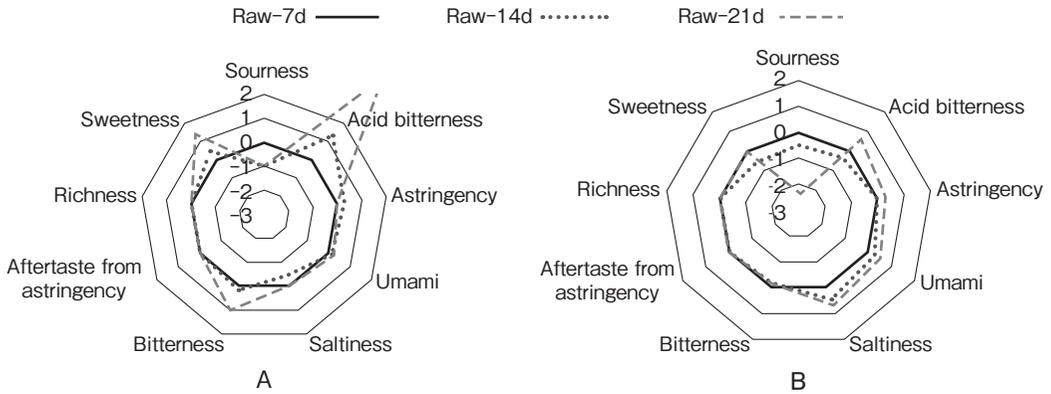


Fig. 1 Effects of postmortem aging on taste-traits of raw beef prepared by the method 4 and analyzed by an electronic taste sensing system. Beef broth from *longissimus thoracis* muscle of Holstein (A : n=2) and Japanese Black Wagyu (B : n=4) cattle.

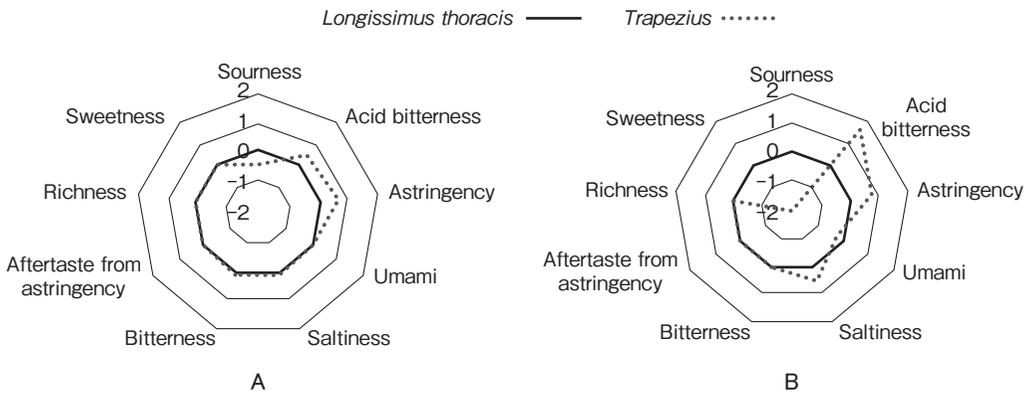


Fig. 2 Taste-traits of Holstein beef broth from *longissimus thoracis* and *trapezius* muscles prepared by the method 4 at 21-days postmortem and analyzed by an electronic taste sensing system. Raw (A : n=2) and cooked (B : n=2) beef.

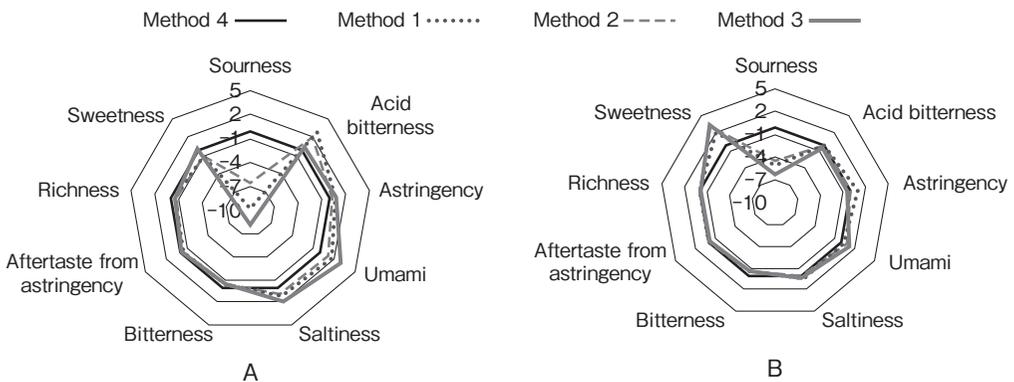


Fig. 3 Taste-traits of Holstein and Japanese Black Wagyu beef broth from cooked *longissimus thoracis* muscles prepared by various methods at 21-days postmortem and analyzed by an electronic taste sensing system. Holstein (A : n=4) and Japanese Black Wagyu (B : n=6) beef.

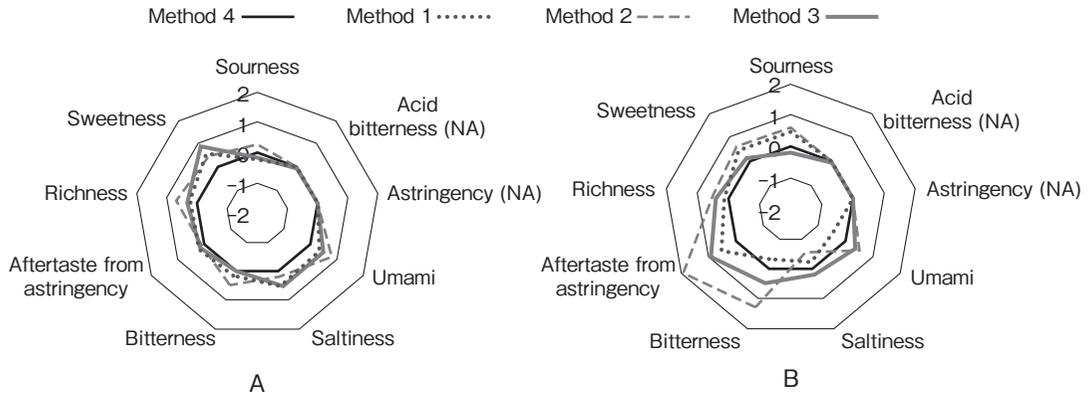


Fig. 4 Taste-traits of Holstein and Japanese Black Wagyu beef broth from cooked *longissimus thoracis* muscles prepared by various methods at 21-days postmortem and analyzed by sensory evaluation of human panels. Holstein (A : n=4) and Japanese Black Wagyu (B : n=4) beef. NA, Not analyzed.

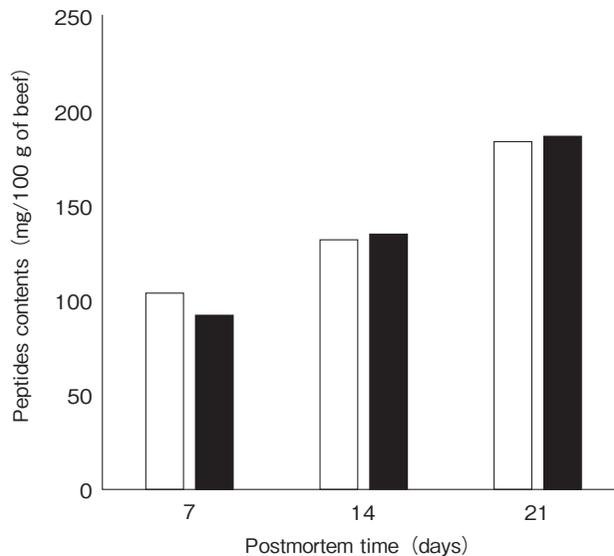


Fig. 5 Effect of postmortem aging on the amounts of peptides in cooked beef broth prepared by the method 4 from *longissimus thoracis* muscle and measured by the method in "Materials and Methods". Holstein (open box : n= 4) and Japanese Black Wagyu (closed box : n= 5) cattle.

#### 4. 要 約

本研究の目的は、味覚センサーで分析するための牛肉汁サンプルの最適な調製方法を見出すことと、その方法を標準化することについての基本的知見を得ることである。黒毛和種とホルスタイン種牛肉、熟成、加熱処理の違いにより得られた

種々の牛肉汁サンプルの呈味性を味覚センサーで分析し、これらの要件によるセンサー分析値の特徴を把握した。次に牛肉汁サンプルの調製方法を検討した。熟成21日の加熱処理した胸最長筋から4種類の調製方法を試みた結果、方法3による肉汁サンプルの味覚センサー分析値と官能評価が近似することが明らかになった。

## 文 献

- 1) Westerling, D. B., Hedrick, H. B. : *J. Anim. Sci.*, **48**, 1343~1348, 1979.
- 2) Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W., Backus, W. R. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 77~87, 1982.
- 3) Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. G., Cambell, C. P. : *J. Anim. Sci.*, **76**, 2619~2630, 1998.
- 4) 山之上稔, 矢野恵子, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成23年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.30, 68~75, 2012.
- 5) 山之上稔, 大和彩弥香, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成24年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.31, 42~48, 2013.
- 6) 山之上稔, 西田昌弘, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.32, 27~33, 2014.
- 7) 山之上稔, 西田昌弘, 趙姫楠, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.33, 116~120, 2015.
- 8) Toko, K. : *Mat. Sci. Eng. C*, **4**, 69~82, 1996.
- 9) Sasaki, K., Tani, F., Sato, K., Ikezaki, H., Taniguchi, A., Emori, T., Iwaki, F., Chikuni, K., Mitsumoto, M. : *Sensor. Mater.*, **17**, 397~404, 2005.
- 10) Chikuni, K., Oe, M., Sasaki, K., Shibata, M., Nakajima, I., Ojima, K., Muroya, S. : *Anim. Sci. J.*, **81**, 600~605, 2010.
- 11) Nodake, K., Numata, M., Kosai, K., Kim, Y. J., Nishiumi, T. : *Anim. Sci. J.*, **84**, 613~621, 2013.
- 12) 食肉の官能評価ガイドライン, (独)家畜改良センター編, 1~80, 日本食肉消費総合センター, 東京, 2005.
- 13) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.

# タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの 基質認識機構の改変

Alteration of the substrate specificity of transglutaminase by protein  
engineering

滝田 禎 亮

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)

Teisuke Takita

(Graduate School of Agriculture, Division of Food Science and Biotechnology, Kyoto University)

I cloned a transglutaminase (Tgl) gene from *Geobacillus stearothermophilus* NCA1503. The Tgl fusion protein with N-terminal His-tag was expressed in soluble form but did not bind to a Ni affinity column. The Tgl with C-terminal His-tag was expressed in insoluble form. The Tgl with no tag was expressed in soluble form and likely to have transglutaminase activity. I succeeded in the purification of the Tgl with no tag and generated the 14 mutants. In addition, I constructed an expression system of a protein substrate for Tgl, the N-terminal domain of lysyl-tRNA synthetase (ANT). The ANT fusion protein with N-terminal His-tag was expressed in soluble form, bound to a Ni affinity column, and was specifically digested by Factor Xa. I generated the ANT mutant in which all Gln residues are replaced with Asn. Further, I devised a novel assay for transglutaminases, which was based on fluorescence resonance energy transfer.

## 1. 目 的

トランスグルタミナーゼは、タンパク質のグルタミン側鎖とタンパク質のリシン側鎖との反応を触媒し、 $\epsilon$ -リシン共有結合を形成する。本反応によるタンパク質の架橋は、食肉の弾力性や食感の改善に大きな効果をもたらすため、食品産業に広く用いられている。現在、放線菌、*Streptomyces mobaraensis*由来のトランスグルタミナーゼが、味の素(株)からアクティバとして商品化されている。上記反応においては、グルタミン残基の $\gamma$ -カルボキシアミド基がアシル供与体、リシン

残基の側鎖アミノ基がアシル受容体となる。これまでの研究から、トランスグルタミナーゼは、アシル供与体に対する認識は非常に厳密であるのに対し、アシル受容体に対してはそうではないことが報告されている。例えば、ある化合物がアシル受容体として効果的に利用されるには、一級アミンが存在すればよくその周辺のアミノ酸配列に大きくは依存しない。一方、グルタミン残基の側鎖から1つのメチレン基が失われたアスパラギン残基は、複数のトランスグルタミナーゼにおいてアシル供与体として利用されない。この理由として、グルタミン残基の側鎖メチレン基と疎水性残

基の相互作用が重要であることが結晶構造をもとにした分子モデリングにより示唆されている<sup>1)</sup>。トランスグルタミナーゼによるタンパク質架橋反応により、さらに大きく食肉の弾力性や食感の改善をもたらすためには、その加工において未活用のアスパラギン残基をアシル供与体として効率的に利用できる新規なトランスグルタミナーゼの取得が望まれる。最近、*Bacillus subtilis*由来トランスグルタミナーゼ (Tgl) の結晶構造と特性が報告された<sup>2)</sup>。Tglは、最も小さなトランスグルタミナーゼで、*S.mobaraensis*由来のトランスグルタミナーゼに対し類似性を示さない。本研究では、酵素の安定性が高いと予想される*Bacillus (Geobacillus) stearothermophilus*由来のTglをクローニングおよび発現し、その基質特異性を調べ、部位特異的変異導入によりアスパラギン残基をアシル供与体として効率的に利用する変異酵素を取得することを目的とする。

## 2. 方法

### 2.1 発現ベクターの構築

本研究では、GST-tagを除いたpET-42aを用い、Tglホモログ酵素とタンパク質基質をN末端にHis-Tagを付加した形で発現させ (*PshAI*と*BamHI*部位)、Niアフィニティカラムで精製後、Factor Xaを用い余分な配列を除く戦略をとった。以下の2種のプライマーをアニールさせ、*NdeI*と*SpeI*切断サイトを有するリンカーを作成し、T4ポリヌクレオチドキナーゼを用いリン酸化した。このリンカーを、*NdeI*と*SpeI*で切断しGST-tagを除去したpET42aに導入した (pET42a(-GST))。以下の実験では、目的タンパク質発現を除くすべての遺伝子実験は、大腸菌DH5aを用いた。

1 : TATGGGTTTCAGGTTTCAGGTTCAA

2 : CTAGTTGAACCTGAACCTGAACCCA

### 2.2 タンパク質基質の発現系の構築

*G.stearothermophilus*由来リシル-tRNA合成酵素のNドメインは、145アミノ酸残基からなり分子量16,641で、グルタミン (9残基) とリシン (13残基) が多く、溶解度も非常に高い。そこで、このNドメイン (ANT) を基質としてタンパク質架橋反応を検出することにした。申請者は、ANT遺伝子もつpET11aを有していた。本プラスミドを鋳型に、以下のプライマーとPyrobest DNA Polymerase (Takara) を用い、ANT遺伝子を増幅し、*SnaBI*と*BamHI*で切断した。この断片を、*PshAI*と*BamHI*で切断したpET42a(-GST)に導入した (pET42a(-GST)-ANT)。

3 : GATATATCTAGATACGTAAGCCATGA  
AGAATTGAACGACCAATTG

4 : CGTGGGATCCTTACGGCAGCGGA

Factor Xaによる切断後得られるANTは、145アミノ酸残基からなり分子量16,609である。このプラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に導入し、30℃で培養し、IPTGを添加し、目的タンパク質の発現を誘導した。

### 2.3 タンパク質基質変異体の作製

本研究の目的は、Tglのアシル供与体の基質認識を、Gln残基からAsn残基に変換することである。ANTには、9個のGln残基がある。

VSHEELNDQLRVRREKLLKIEELGVDVDFGKR  
FERTHKAEEFLFELYGDLSKEELEEQQIEVAV  
AGRIMTKRGMGKAGFAHIQDVTGQIQIYVRQ  
DDVGEQQYELFKISDLGDIVGVRGTMFKTKV  
GELSIKVSSYEFLTKALRPLP

そこで、ANTのすべてのGln残基をAsn残基に置換した変異体を作成することにした (Q9N/Q56N/Q57N/Q81N/Q86N/Q88N/Q93N/Q99N/Q100N)。pET42a(-GST)-ANTを鋳型に、以下のプライマー (相補鎖のみ掲載) とPyrobest DNA Polymeraseを用いQC法により、変異体を

作成した。

Q9N(+): CATGAAGAATTGAACGAAACAT  
TGCGCGTCCGCGAC

Q81N(+): GGGCTTTGCTCACATCAACGAC  
GTGACGGGACAAA

Q99NQ100(+): ACGATGTTGGCGAAAACA  
ACTACGAGCTGTTTAAA

Q56NQ57N(+): GAGGAACCTCGAAGAGAAC  
AACATCGAAGTCGCCGT

Q86NQ88N(+): GACGTGACGGGAAACATT  
AACATTTACGTCCGC

Q93N(+): TAACATTTACGTCCGCAACGAC  
GATGTTGGCGAAA

#### 2.4 Tgl遺伝子のクローニング

*G.stearothermophilus* NCA1503のゲノムを調製した。ゲノム配列が明らかにされている、2種の*G.stearothermophilus*のTglのアミノ酸配列を比較した。ATCC12980とNUB3621のTglは、それぞれ、273と272アミノ酸残基から構成され、そのN末端およびC末端の配列は以下であった。

ATCC12980: MIRILSSPSGFHVSGSSSLPP ……  
PLGRLPWIAAGTLGSA AFLYR

NUB3621: MIRIQSAVDSNFLGFPSSLSK ……  
PMN-NKLITGTMGSATFLYW

その塩基配列のN末端およびC末端の配列は、以下であった。

ATCC12980: TTGATTCGCATCTTGTCATC  
……TTTCTTGTATCGTTAG

NUB3621: ATGATTCGAATTCAGCAATC  
……TTTCTTGTATTGGTAG

以下の混合プライマーとLA Taq DNA polymerase (Takara) を用い、上記ゲノムから、Tgl遺伝子を増幅した。

5: (A/T) TGATTCG (C/A) AT (C/T) (C/T)  
(A/T) G (C/T) (C/A) ATC

6: CTA (A/C) C (G/A) ATACAAGAAAG (C/

T) AGC (G/T) G

#### 2.5 Tgl遺伝子からの*Sna*BIサイトの消去

増幅したTgl遺伝子の配列は*Sna*BIサイトを含んでいた。そこで、TA-Tglを鋳型に、以下のプライマーとPyrobest DNA Polymeraseを用い、QC法により、上記サイトを消去した (TA-Tgl (*Sna*BIx))。

7: CCTGAACATATACCTATCCGAACGAACA

8: TGTTTCGTTTCGGATAGGTATATAGTTCAGG

#### 2.6 pET42a (-GST) へのTgl遺伝子の導入。

TA-Tgl (*Sna*BIx) を鋳型に、以下のプライマーとPyrobest DNA Polymeraseを用い、PCRを行った。その際、終止コドン(TAGからTAA)に変更した。

9: TGCAGACTGCAGTACGTAATTCGCATC  
TTGTCATCTCCGTCGGT

10: GGAATTGGATCCTTAACGATACAAGA  
AAGCAGCGGACCCTAACGT

増幅断片を*Sna*BIと*Bam*HIで切断後、pET42a (-GST) に導入した (pET42a(-GST)-Tgl (*Sna*BIx))。このプラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に導入し、30℃で培養し、IPTGを添加し、目的タンパク質の発現を誘導した。本発現系では、TglはN末端にHis-tag配列を含む334アミノ酸残基からなるタンパク質 (His<sub>6</sub>-Tgl: 分子量37,079) として発現する。

#### 2.7 C末端にHis-tagをもつTglの発現系の構築。

過去の論文では、*B. subtilis*のTglのC末端にHis-tagを付加していた<sup>3)</sup>。pET42a(-GST)-Tgl (*Sna*BIx) を鋳型に、以下のプライマーとPyrobest DNA Polymeraseを用い、PCRを行った。

11: TCCGGTCTGCAGCATATGGTAATTCGC  
ATCTTGTCATCTCCGTC

12: TTCGGACTCGAGACGATACAAGAAAG  
CAGCGGACCCTAACGT

このPCR断片を、*NdeI*と*XhoI*で切断し、pET22bに導入した(pET22b-Tgl (*SnaBI*X) CHis)。

このプラスミドを大腸菌BL21 (DE3) に形質導入した。本発現系では、TglはC末端にHis-tag配列を含む282アミノ酸残基からなるタンパク質(Tgl-His: 分子量32,215)として発現する。

## 2.8 tagをもたないTglの発現系の構築。

pET42a(-GST)-Tgl (*SnaBI*X) を鋳型に、プライマー11と10、とPyrobest DNA Polymeraseを用い、PCRを行った。増幅断片を*NdeI*と*BamHI*切断後、pET11aに導入した(pET11a-Tgl (*SnaBI*X))。

## 2.9 Tglの精製

pET11a-Tgl(*SnaBI*X)をもつ大腸菌BL21 (DE3) を、100  $\mu$ Mアンピシリンと1 mM IPTG存在下、30°Cで培養し菌体を得た。菌体を20 mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁し超音波破碎した。遠心上清(20,000 g  $\times$  10分) を、MonoQ 5/50 GLカラム (GE Healthcare Life Sciences) に供した。緩衝液は20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いた。0.5 ml/minの流速で、以下のプログラムで運転した：0-60分、0-1 M NaCl；60-90分、1 M NaCl。Tgl画分を脱塩濃縮後、再度、MonoQカラムに供した。0.5 ml/minの流速で、以下のプログラムで運転した：0-20分、0 M NaCl；20-80分、0.5 M NaCl；80-81分、0.5-1.0 M NaCl；81-121分、1.0 M NaCl。

## 2.10 蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) によるトランスグルタミナーゼ活性検出の検討

モルモット肝臓トランスグルタミナーゼ (TG) はSigma-Aldrichから購入した。アシル受容体蛍光ペプチド、Lys-MCA (K-MCA), Lys-Ala-MCA (KA-MCA), Boc-Val-Leu-Lys-MCA (Boc-VLK-MCA), Boc-Glu-Lys-Lys-MCA

(Boc-EKK-MCA) はペプチド研究所から購入した。アシル供与体蛍光ペプチド、Z-Asp-Gln-Met-Asp-AFC (Z-DQMD-AFC) は、Bachemから購入した。これらすべてのペプチドは、DMSOに溶解した。上記受容体ペプチドと供与体ペプチド (各10  $\mu$ M) を、TG (3.9  $\mu$ M) 存在下に、37°Cで反応させた (100  $\mu$ l)。反応後、900  $\mu$ lの水を加え、蛍光を測定した。

## 2.11 Tgl変異体の作製

pET11a-Tgl (*SnaBI*X) を鋳型に、以下のプライマー (相補鎖のみ掲載) とPyrobest DNA Polymeraseを用い、QC法により、14種の変異体を作成した。

F68A(+): GAAAAGCCGGGCGCAGGCGGCC  
ATTTTCCGTTTTT

F68Y(+): GAAAAGCCGGGCGCAGTATGCC  
ATTTTCCGTTTTT

F68W(+): GAAAAGCCGGGCGCAGTGGGCC  
ATTTTCCGTTTTT

E114A(+): CGAACTGTACGCCTTTGCGTGC  
GCGACGGCGATCG

E114D(+): CGAACTGTACGCCTTTGATTG  
CGCGACGGCGATCG

W148A(+): TTTGCTGCTGTATGACGCGCA  
TACGGACAAAGACC

W148F(+): TTTGCTGCTGTATGACTTTCA  
TACGGACAAAGACC

Y171A(+): CCCCAGGGACTGCCTTGCGTTT  
AAAAACCCGGACG

Y171F(+): CCCCAGGGACTGCCTTTTTTTTT  
AAAAACCCGGACG

E187A(+): GCCGCAATGGCAAGGGGCGAAC  
ACGATCTATTTGG

E187D(+): GCCGCAATGGCAAGGGGATAA  
CACGATCTATTTGG

N188A(+): GCAATGGCAAGGGGAGGCGACG

ATCTATTTGGGCG

N188Q(+): GCAATGGCAAGGGGAGCAGAC

GATCTATTTGGGCG

H200A(+): TGGCTTGTTTTACGGAGCGGGC

ATCGGCATCGAGA

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ANTの発現と精製

ANT融合タンパク質は、30℃で大量発現し (Fig. 1A), その大部分が可溶性であった (Fig. 1B)。可溶性画分を、Profinity IMAC Ni-charged resin (Bio-rad) に供した。ANT融合タンパク質は、この担体に結合し、20-50 mMイミダゾールで溶出され、高度に精製された (Fig. 1B)。ANT融合タンパク質を、FactorXaで処理すると、目的の大きさのバンド (分子量17,000) が確認できた。

#### 3.2 ANT変異体の作製

5種の変異体, Q9N/Q81N, Q9N/Q81N/Q99N/Q100N, Q9N/Q56N/Q57N/Q81N/Q99N/

Q100N, Q9N/Q56N/Q57N/Q81N/Q86N/Q88N/Q99N/Q100N, Q9N/Q56N/Q57N/Q81N/Q86N/Q88N/Q93N/Q99N/Q100Nを作成し、発現を確認した (未掲載)。

#### 3.3 Tgl遺伝子のクローニング

*G. stearothermophilus* NCA1503のゲノムから、0.8 kbpのDNA断片が増幅された。得られたTglのアミノ酸配列は以下ようになった。そのORFは273アミノ酸からなり、分子量は31,051であった。

MIRILSSPSGFHVSGSSSLPPNEQRILHALVSSPELYTYPNEQQLLFEIKLRSQIVQASVDLAKSR  
AQFAIFRFRSQCNSQFWLRDERGGFQLRPDVL  
PSDAINDIFVNSELYAFECATAIVIVFYKAVL  
EGIDVSAFNRLF A H L L L Y D W H T D K D L G I E T K  
KGEHFLPGDCLYFKNPVDPLTPQWQGENTI  
YLG DGLFYGHGIGIETADSIIAALNRRRKQWA  
TKSAYLLPHITQMNFA YLSQFARRFDELRLP  
LGRLPWIAGTLGSAAFLYR

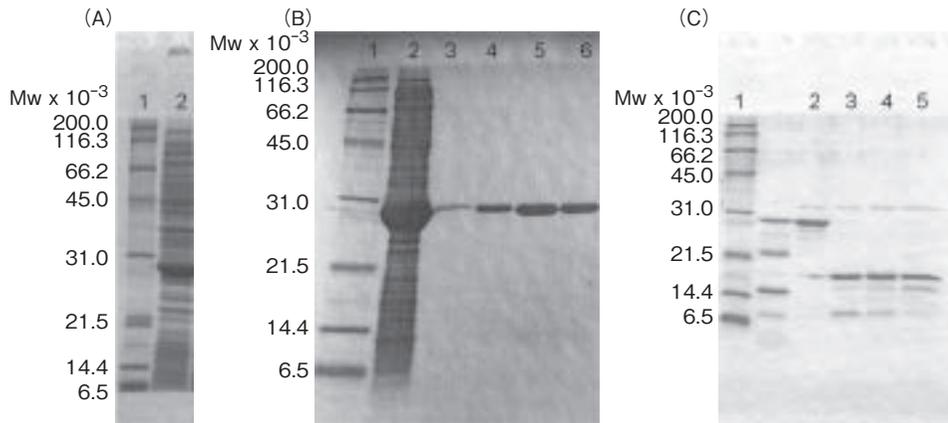


Fig. 1 Expression and purification of ANT.

(A) Expression of ANT fusion protein ANT at 30℃. Lane 1, marker; 2, total fraction (*E. coli* pellet) obtained in the presence of 1 mM IPTG. (B) Purification of ANT fusion protein by Ni-affinity chromatography. Lane 1, marker; 2, soluble fraction; 3, 4, 5, and 6, eluent at 20, 30, 40, and 50 mM imidazole, respectively. (C) Digestion of ANT fusion protein at 4℃ by Factor Xa. Lane 1, marker; 2, 0 hr; 3, 12 hr; 4, 24 hr; and 5, 48 hr.

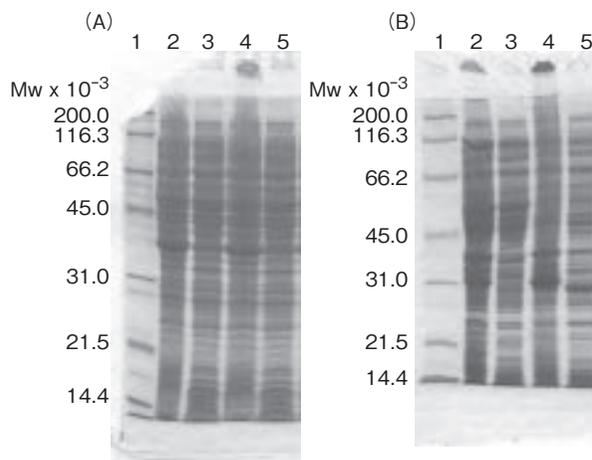


Fig. 2 Expression of His<sub>6</sub>-Tgl and Tgl-His<sub>6</sub>.

(A) Expression of His<sub>6</sub>-Tgl at 30°C. Lane 1, marker; 2 and 3, total and soluble (the centrifugal supernatant) fractions obtained in the absence of IPTG, respectively; 4 and 5, total and soluble fractions obtained in the presence of 1 mM IPTG. (B) Expression of Tgl-His<sub>6</sub> at 17°C. Lane 1, marker; 2 and 3, total and soluble fractions obtained in the absence of IPTG, respectively; 4 and 5, total and soluble fractions obtained in the presence of 1 mM IPTG.

### 3.4 His<sub>6</sub>-Tglの発現

His<sub>6</sub>-Tglは、30°Cで大量発現し、その大部分が可溶性であった (Fig. 2A)。可溶性画分を、Profinity IMAC Ni-charged resin (Bio-rad) に供したが、結合しなかった。変性状態 (6 M塩酸グアニジン存在下) では、結合した。Tgl-His<sub>6</sub>は、30°Cで発現したが不溶性であった (Fig. 2B)。培養温度を、17°Cにしても改善されなかった。変性状態では、上記担体に結合した。これらの結果は、C末端に付加したHis-tagが、タンパク質内部に埋もれ、Tglのフォールディングに影響している可能性を示唆した。C末端にHis-tagを付加したTglが精製されている*B. subtilis*のTglと比較すると<sup>3)</sup>、*G. stearothermophilus*のTglのC末端には、27 アミノ酸残基の余分な配列 (RFDELRLPLGRLPWIAGTLGSAAFLYR) がある<sup>4)</sup>。今後は、この領域とHis-tagの間にリンカーを導入する必要があると考えられた。

### 3.5 tagをもたないTglの発現

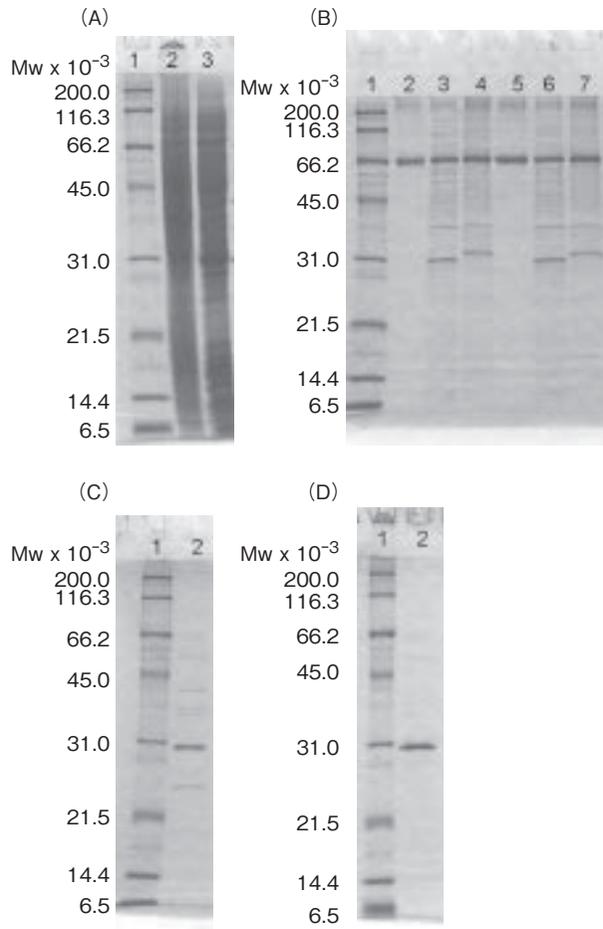
Tglは、30°Cで大量発現し、その大部分が可溶

性であった (Fig. 3A)。可溶性画分をBSAと37°Cでインキュベーションすると、分子量が増加し (Fig. 3B)、活性を有していることが強く示唆された。MonoQカラムによる精製では、1回目では、Tglは、35分 (0.6 M NaCl) で溶出した。2回目では、Tglの大部分は44分 (0.2 M NaCl) で、一部は86分 (1.0 M NaCl) で溶出した。それぞれの画分を濃縮すると、ほぼ均一に精製されていた。

前者に比べ (Fig. 3C)、後者の純度が高かった (Fig. 3D)。

### 3.6 FRETによるTG活性検出の検討

Fig. 4Aは、K-MCA単独、Z-DQMD-AFC単独、K-MCAとZ-DQMD-AFCが共存するときの、励起波長325 nmでの発光スペクトルを示している。混合液の結果は、用いた条件下では、上記2種のペプチドが架橋されていないとき、FRETは効果的に起きていないことを示している。Fig. 4Bは、K-MCA, KA-MCA, Boc-VLK-MCA, Boc-Glu-Lys-Lys-MCAをアシル受容体として、Z-DQMD-AFCをアシル供与体として、TG非存在下と存在



**Fig. 3** Expression and purification of Tgl.

(A) Expression of Tgl at 30°C. Lane 1, marker ; 2 and 3, total and soluble fractions obtained in the presence of 1 mM IPTG, respectively. (B) Incubation of soluble fraction with BSA at 50°C. Lane 1, marker ; 2 and 5, BSA, 12 hr ; 3 and 5, soluble fraction and BSA, 0 hr; 4 and 6, soluble fraction and BSA, 12 hr. The buffers used in lanes 2-3 and 4-6 were 20 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$  (pH 8.0) and 100 mM Tris-HCl (pH 8.0), respectively.  $[\text{BSA}]_0=0.1$  mg/ml. (C) and (D) Purified Tgl eluted from a Mono Q column at 0.2 and 1.0 M NaCl, respectively.

下に、反応させた溶液の励起波長325 nmでの495 nmでの発光スペクトルの強度を示している。K-MCAとKA-MCAを用いた場合、TG存在下に、蛍光強度が増加した。Fig. 4Cは、増加の著しい前者の反応液の励起波長325 nmでの発光スペクトルを示している。TG存在下では、ピーク波長が、450 nm付近に移動し、これは、TGがK-MCAのLys残基とZ-DQMD-AFCのGln残基間で架橋反応を触媒したことを強く示唆した。この結果は、

今後Tglの基質特異性の改変において、本測定が有効な手段となることを示している。

### 3.7 Tgl変異体の作製

14種の変異体を作成した。すべて30°Cで大量発現し、その大部分が可溶性であることを確認した (Fig. 5)。

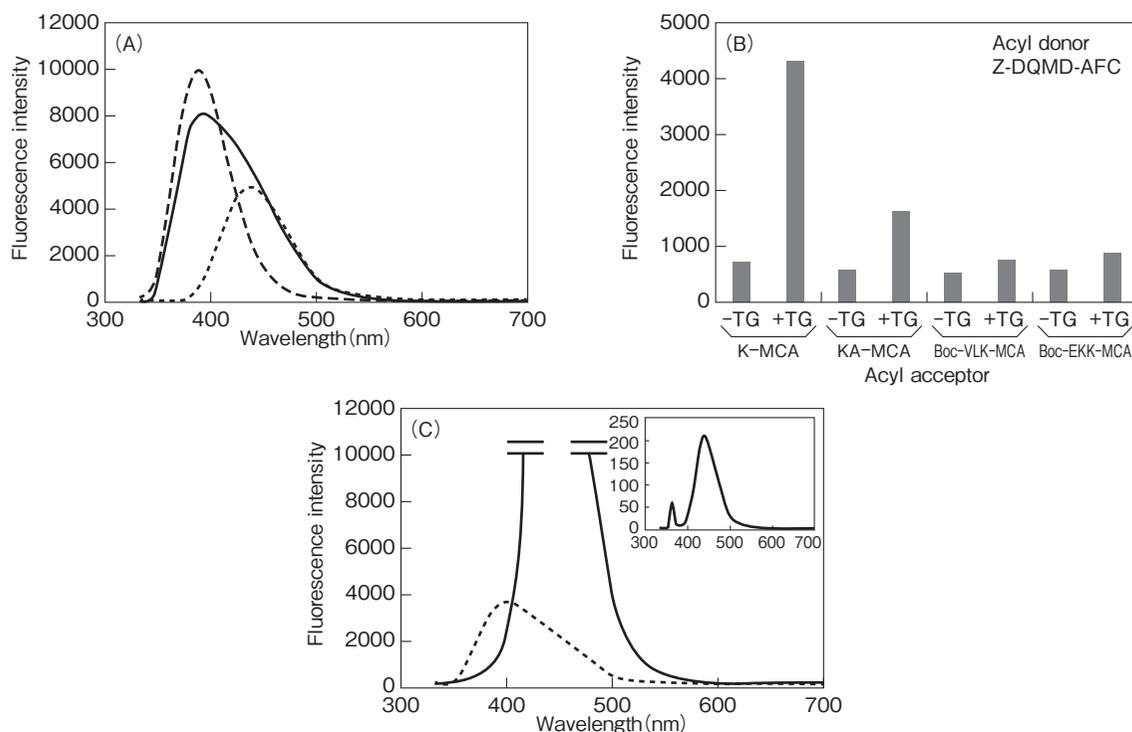


Fig. 4 Measurement of TG activity by FRET.

(A) Fluorescence emission spectra of K-MCA and Z-DQMD-AFC at  $\lambda_{ex} = 325\text{nm}$ . Dashed line, K-MCA ; dotted line, Z-DQMD-AFC ; and solid line, K-MCA and Z-DQMD-AFC. The concentration of each fluorescent peptide was  $1.0\ \mu\text{M}$ . (B) Fluorescence intensity after reaction by TG. The acyl donor (Z-DQMD-AFC) and an acyl acceptor were incubated in the presence of TG at  $37^\circ\text{C}$  for 16 hr.  $[\text{TG}]_0 = 3.9\ \mu\text{M}$ .  $[\text{acyl acceptor}]_0 = 10\ \mu\text{M}$ .  $[\text{Z-DQMD-AFC}]_0 = 10\ \mu\text{M}$ . The reaction mixture ( $100\ \mu\text{l}$ ) was mixed with water ( $900\ \mu\text{l}$ ) and, the fluorescence intensity at  $495\ \text{nm}$  was measured.  $\lambda_{ex} = 325\ \text{nm}$ . (C) Fluorescence emission spectra of the mixture containing Z-DQMD-AFC and K-MCA. Solid line, Tgl-catalyzed mixture; dotted line, the non-catalyzed mixture. Inset shows the emission spectra of the Tgl-catalyzed mixture mixed with 10 times as much water.

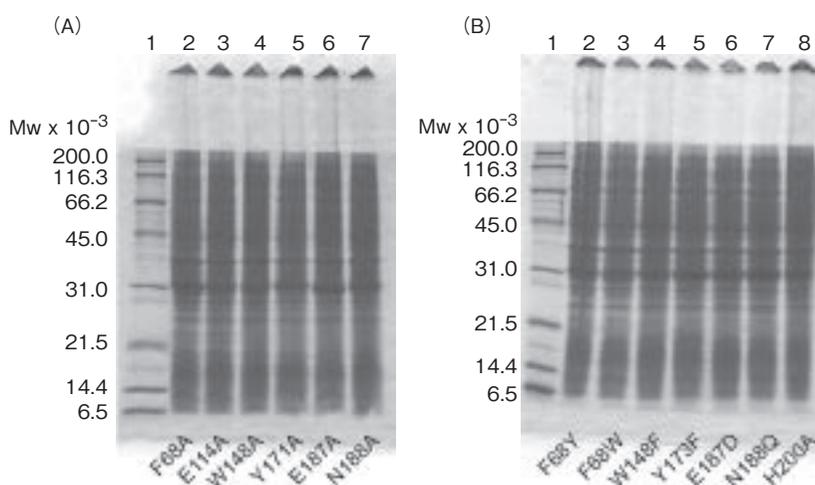


Fig. 5 Expression of Tgl mutants at  $30^\circ\text{C}$ .

(A) Ala mutants. (B) The other mutants. Total fraction obtained in the presence of  $1\ \text{mM}$  IPTG. Lane 1, marker in both (A) and (B).

#### 4. 要 約

*G. stearothermophilus* NCA1503のゲノムからTgl遺伝子をクローニングし、3種の発現系を構築した。N末端にHis-tagを付加したTgl融合タンパク質は可溶性であったが、Niカラムに結合しなかった。C末端にHis-tagを付加したTglは不溶性であった。tagをもたないTglは可溶性であり、活性を有していると考えられ、精製に成功した。ANT融合タンパク質の発現系を構築し、可溶性であり、Niカラムに結合し、Factor Xaで不要な部分を除去できることを確認した。TGを用い、FRETによるトランスグルタミナーゼ活性の検出に成功した。

#### 文 献

- 1) Chica, R. A., Gagnon, P., Keillor, J. W., Pelletier, J. N. : Tissue transglutaminase acylation : proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding, *Protein Sci.*, **13**, 979~991, 2004.
- 2) Fernandes, C. G., Plácido, D., Lousa, D., Brito, J. A., Isidro, A., Soares, C. M., Pohl, J., Carrondo, M. A., Archer, M., Henriques, A. O. : Structural and functional characterization of an ancient bacterial transglutaminase sheds light on the minimal requirements for protein cross-linking, *Biochemistry*, **54**, 5723~5734, 2015.
- 3) Plácido, D., Fernandes, C. G., Isidro, A., Carrondo, M. A., Henriques, A. O., Archer, M. : Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis* transglutaminase (Tgl) and its preliminary crystallographic characterization, *Protein Expr. Purif.*, **59**, 1~8, 2008.
- 4) Zilhão, R., Isticato, R., Martins, L. O., Steil, L., Völker, U., Ricca, E., Moran, C. P. Jr., Henriques, A. O. : Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol.*, **187**, 7753~7764, 2005.

# 大規模ゲノム解析による腸管出血性大腸菌の 国際的伝播経路の解明

Large scale genome analyses of enterohemorrhagic *Escherichia coli* for  
exploring international transmission routes

李 謙 一

(国立感染症研究所細菌第一部)

Ken-ichi Lee

(Department of Bacteriology I, National Institute of Infectious Diseases)

To elucidate the international transmission routes of enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O111, genome analyses on 190 isolates from five countries were performed. In single nucleotide polymorphism (SNP) analysis, although several domestic cattle isolates showed less than 30 SNPs to foreign isolates, there was no isolates that showed close genetic relationship (SNP  $\leq$  10). Variation in virulence gene profiles and length of *espF* suggested that biased distribution of virulence factors among countries. In conclusion, further investigation using the EHEC O111 genomes from various countries could reveal more clear international transmission routes and country specific virulence lineage.

## 1. 目 的

腸管出血性大腸菌 (Enterohemorrhagic *Escherichia coli* : EHEC) による感染症は腹痛、下痢、血便などを主徴とし、ときに溶血性尿毒症候群などの重篤な合併症を認める。日本国内では、年間2,000名以上の患者が報告されることから公衆衛生上の脅威となっている。EHECの主な保菌宿主は牛とされ、牛肉や牛糞に汚染された青果や水などから人へ伝播する。このうち、血清群O111は、国内においてO157、O26に次ぐ発生数であり、年間50~100例の感染者が報告されている。2011年には北陸および関東の焼肉店において同菌を原因とした、大規模な集団感染事例(死者5名を含む181名の患者が報告)も報告されてい

る。このようにO111は広域な集団感染の原因となり、また、EHEC感染症の重症化因子である志賀毒素2型 (Shiga toxin 2 : Stx2) を保有することから、全国レベルでの継続的な疫学調査が感染の拡大や防止のために必要とされている。

現在EHECにおいては、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法や反復配列多型解析 (MLVA) 法が疫学調査に用いられているが、解析結果は系統を反映しないため、伝播経路の推定には限界がある。近年、全ゲノム配列 (whole genome sequence : WGS) を用いた解析がより簡便・安価に行えるようになり、多数の株の関連性をWGSから明らかにする研究が盛んに行われている。WGSを用いた解析では、従来法よりも高い精度で系統を反映した型別が可能となり、病

原菌の院内感染の経路解明などに利用されている。EHECにおいても、WGSを用いたより精度を高い型別法の開発が進められている。一方、日本では大量の輸入牛肉が消費されており、同菌の伝播には輸入食品も大きな役割を果たしていると考えられるが、輸入牛肉や海外の牛由来株との比較はほとんど行われていない。

そこで本研究では、過去数年間に全国でヒトから分離されたO111のWGSデータに、国内外の牛および食品由来株の情報を加えたWGS解析を行い、国際的な牛および食品の流通と同菌の人への伝播過程との関係を明らかにし、食の安全に寄与する知見を得ることを目的とした。さらに、病原性に関わる遺伝型および表現型を解析することで、高病原性の株の国際的な伝播過程・経路に関わる知見を得ることを目的に研究を行った。

## 2. 方法

### 2.1 供試菌株

国内ヒト由来株としては、2005年から2014年に分離された135株を用いた。国内牛由来株としては、中国地方で分離された1株(LEC001)および九州地方で分離された3株(LEC002-004)を用いた。国外由来の株については、4か国からそれぞれ次の株数を供試した(アメリカ合衆国, 40株; イギリス, 9株; オーストラリア, 1株; ポルトガル, 1株)。これらの国外由来株については、GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) またはEnterobase (<https://enterobase.warwick.ac.uk/>) からドラフトゲノム配列をダウンロードして用いた。

### 2.2 DNA抽出および全ゲノム配列の取得

供試菌株を、緩衝ペプトン水(日水製薬株式会社, 東京)で一晩37°Cで静置培養した培養液から、DNeasy Blood and Tissueキット(QIAGEN, カリフォルニア, USA)を用いてDNAを抽出し

た。抽出したDNAからNextera XT DNA sample prep kit (Illumina, カリフォルニア, USA)を用いてDNAライブラリーを調整し、プール化したサンプルでMiSeq (Illumina)によるペアエンド(300bp×2)のゲノム配列解読を行った。

### 2.3 SNP抽出, 系統解析および病原性因子の検索

MiSeqによって得られたショートリードをA5-miseq pipeline<sup>1)</sup>によって*de novo* assemblyを行い、ドラフトゲノム配列を作製した。EHEC O111・11128株の完全長配列を参照配列にし、MUMmer version3.2259<sup>2)</sup>およびPerlスクリプトによって単一塩基置換(single nucleotide polymorphism: SNP)を抽出した。さらに、MUMmerによって参照配列中の50bp以上のリピート配列を検出し、解析から除いた。系統解析は、MEGA 7<sup>3)</sup>を用いた最尤法によって行った(ブートストラップ: 1,000回)。病原性因子等の保有状況は、BLAST+を用いた解析によって調べた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 SNP解析

全株に共通する領域(コアゲノム領域)から、8,138か所のSNPが抽出された。これらのSNPをもとに系統解析を行ったところ、分離国ごとに特定のクラスターは認められなかった(Fig. 1)。国内の牛由来株と最も近縁な株はECJ114(中国地方, ヒト由来)であり、LEC001(中国地方, 牛由来)間に16か所のSNPが認められた。同株は、アメリカの飼料由来CDPHFDLB-F15M03602-A4およびCDPHFDLB-F15M03602-A2との間のSNPもそれぞれ29および30であり比較的近縁であった。この他に、国内由来ECJ023, ECJ0684およびECJ070とアメリカの飼料由来CDPHFDLB-F15M03602-A2, CDPHFDLB-F15M03602-A4 お

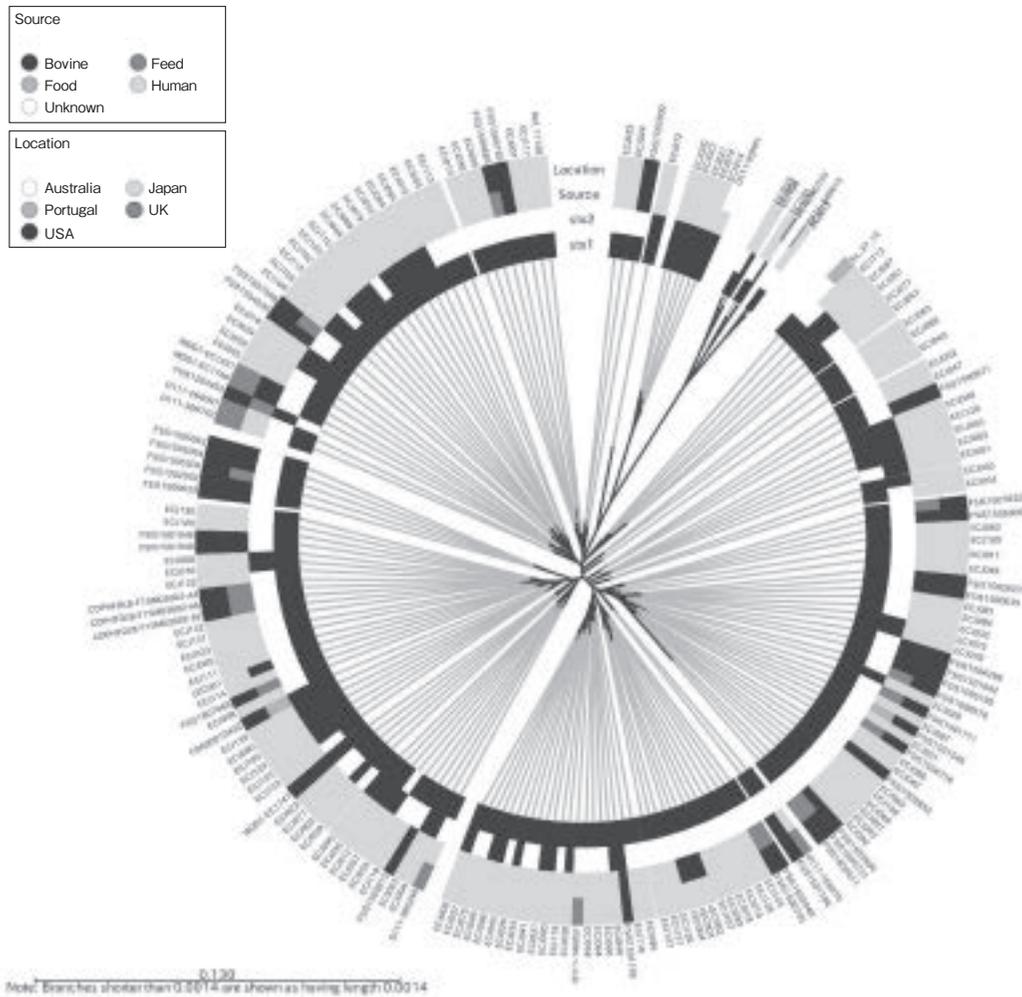


Fig. 1 Maximum likelihood tree of EHEC O111 from Japan and other four countries.

Information of the isolates is shown in the outer column. Black column represents the presence of *stx1* or *stx2*. The source and isolated location of the isolates were shown in colors as indicated in the legend.

よびCDPHFDLB-F15M03602-A6との間に25~30か所のSNPが認められた。EHEC O157の過去の研究では、同一集団感染内の株間ではSNPは7以内に収まるとされている<sup>4,5)</sup>。本研究ではそのようなごく近縁な株は検出されなかったが、SNPが30か所以内の関連性が示唆される株は多数検出された。このことから、国内外のヒト・牛・食品間の伝播経路を明らかにするためには、より多数の株を解析する必要があると考えられた。

### 3.2 病原性因子の保有状況

*stx*, インチミン遺伝子 (*eae*), エンテロヘモリシン遺伝子 (*ehxA*) などの主要な病原性因子および分離地によって保有率が異なっていた病原性因子について、Table 1に示す。ほぼすべての株が*stx1*を保有していたのに対して、*stx2*は一部の株のみが保有していた。*stx2*の保有率は、国内由来株で比較的高かった。*ehxA*, *espP*, *espI*, *iroN*, *iss*および*katP*についても、分離地別に保

Table 1 Prevalence of virulence factors in EHEC O111 from each country

Virulence factors	Function	Prevalence (%)		
		Japan	UK	USA
<i>stx1</i>	Shiga toxin 1	98.6	100	97.5
<i>stx2</i>	Shiga toxin 2	37.7	11.1	10.0
<i>eae</i>	Intimin	100	100	100
<i>ehxA</i>	Enterohemolysin	84.1	88.9	62.5
<i>espP</i>	Serine protease	2.2	22.2	0
<i>espI</i>	Non-LEE effector protein	13.0	22.2	32.5
<i>iroN</i>	Siderophore receptor	3.6	11.1	0
<i>iss</i>	Increased serum survival	52.2	55.6	25.0
<i>hatP</i>	Catalase-peroxidase	8.0	22.2	0

有率の差が認められた。これら遺伝子は、*espI*を除き、すべてプラスミド上に存在するとされる。EHECは、病原性因子を多数有する巨大プラスミドを保有することが知られている<sup>6)</sup>。ドラフトゲノム配列からは、上記の病原性因子が同一のプラスミド上に存在するかを明らかにすることはできないため、抽出プラスミドの配列解析やロングリードシーケンサーの利用によって、プラスミドの構造や病原性との関わりを明らかにする必要があると考えられた。

### 3.3 locus of enterocyte effacement (LEE) 領域の解析

参照株として用いたEHEC O111・11128株がLEE領域に保有する63のタンパク質コード領域(CDS)の配列をクエリとして、供試菌株のドラフトゲノム配列を調べたところ、供試菌株ではLEE領域に大きな挿入および欠失は認められなかった。一方、*espF*は株間で配列長の多型が認められ、437-945bpの26種のアリアルが認められた。同遺伝子の配列長は、アメリカ合衆国由来株においてより長い傾向が認められた [平均長±標準偏差 (bp) : 日本, 572±102; イギリス, 543±54; アメリカ, 734±99]。EspFは、宿主細胞へエフェクターとして働くタンパク質であり、プロリンリッチなリピート領域の長さが多型性を示す

ことが知られている<sup>7)</sup>。アリアル型は病原性に関与するとの示唆もあり<sup>8)</sup>、O111においても臨床症状との関連性について検討する必要がある。

## 4. 要 約

国内外由来のEHEC O111計190株のドラフトゲノム配列を用いた各種解析を行った。SNP解析では、国内ヒト由来株と関連性の示唆される (SNP ≤ 30) 株は複数存在したが、ごく近縁 (SNP ≤ 10) な海外由来株または国内牛由来株は認められなかった。同菌の国際的な伝播経路を明らかにするためには、より広範囲に輸入食品等から海外由来株を積極的に分離・解析する必要がある。また、プラスミド性病原性因子の分布や*espF*の多型は分離地によって異なっており、ヒトでの臨床症状との関連性など検討する必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) Coil, D., Jospin, G., Darling, A. E. : A5-miseq: an updated pipeline to assemble microbial genomes from Illumina MiSeq data, *Bioinformatics*, 31(4), 587~589, 2015.
- 2) Kurtz, S., Phillippy, A., Delcher, A. L., Smoot, M., Shumway, M., Antonescu, C., Salzberg, S. L. : Versatile and open software for comparing large genomes, *Genome Biol*, 5(2): R12, 2004.
- 3) Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K. : MEGA7 :

- molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets, *Mol Biol Evol*, 2016.
- 4) Holmes, A., Allison, L., Ward, M., Dallman, T. J., Clark, R., Fawkes, A., Murphy, L., Hanson, M. : Utility of whole-genome sequencing of *Escherichia coli* O157 for outbreak detection and epidemiological surveillance, *J Clin Microbiol*, **53**(11), 3565~3573, 2015.
  - 5) Joensen, K. G., Scheutz, F., Lund, O., Hasman, H., Kaas, R. S., Nielsen, E. M., Aarestrup, F. M. : Real-time whole-genome sequencing for routine typing, surveillance, and outbreak detection of Verotoxigenic *Escherichia coli*, *J Clin Microbiol*, **52**(5), 1501~1510, 2014.
  - 6) Ogura, Y., Ooka, T., Iguchi, A., Toh, H., Asadulghani, M., Oshima, K., Kodama, T., Abe, H., Nakayama, K., Kurokawa, K., Tobe, T., Hattori, M., Hayashi, T. : Comparative genomics reveal the mechanism of the parallel evolution of O157 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **106**(42), 17939~17944, 2009.
  - 7) Holmes, A., Muhlen, S., Roe, A. J., Dean, P. : The EspF effector, a bacterial pathogen's Swiss army knife, *Infect Immun*, **78**(11), 4445~4453, 2010.
  - 8) Tahoun, A., Siszler, G., Spears, K., McAteer, S., Tree, J., Paxton, E., Gillespie, T. L., Martinez-Argudo, L., Jepson, M. A., Shaw, D. J., Koegl, M., Haas, J., Gally, D. L., Mahajan, A. : Comparative analysis of EspF variants in inhibition of *Escherichia coli* phagocytosis by macrophages and inhibition of *E. coli* translocation through human- and bovine-derived M cells, *Infect Immun*, **79**(11), 4716~4729, 2011.

## 新規な発酵食肉製品の機能性について (II)

Functional properties of novel fermented meat products (II)

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 fermented sausage splayed with dried bonito bacteria (*Eurotium herbariorum*). The fermentation of sausage was carried out at 20°C and with humidity with 85% for 3 days. After fermenting, the surface of samples was covered by white mold. The drying and ripening of fermented sausage were carried out at 18°C and with humidity with 65% until the yield of each samples reduced to 60% (8 days storage) and 50% (12 days storage). The final pH of these fermented sausages were about 6. The water activities in Experiment 1 (60% yield) and 2 (50% yield) were 0.91 and 0.86, 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 fermented sausages 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 sausage. 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 fermented sausage may have potential applications as functional food. These fermented sausages inoculated with dried bonito bacteria showed the acceptable sensory quality characteristic.

### 1. 目 的

食肉は良質なタンパク質を多く含み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になってきた<sup>1,2)</sup>。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<sup>3~11)</sup>。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<sup>12,13)</sup>。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麴や糠を利用したものが多い。鰹節菌を利用した鰹節もカビ菌による発酵食品である。周知のように、鰹節菌による発酵により、鰹節の中に核酸系旨味成分（イノシン酸）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、日本鰹節協会の鰹節優良カビ菌「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」(和名：カワサキコウジカビ)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を目的に検討を重ねてその成果を報告した<sup>14)</sup>。今回はカビ発酵ソーセージの製造について検討した結果を報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 実験材料

ソーセージの原材料として新鮮な国産豚肩ロース肉、牛赤身肉および豚脂を購入して使用した。

### 2.2 発酵ソーセージの製造

新鮮な豚肩ロース肉150 g、牛赤身肉15 gおよび豚脂35 gを細切し、これに食塩5.6 g、グルコース5.6 g、亜硝酸ナトリウム0.06 gを添加してフードプロセッサー (Panasonic MK-K61) でソーセージエマルジョンを作製した。ソーセージエマルジョンを天然豚腸 (株式会社 松永商会製) に充填し85℃、30分間蒸煮した。冷却後、日本独自の有用菌株であり、日本鰹節協会の鰹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、この鰹節菌液をソーセージの全面に噴霧した。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良くし、酸素の供給を行ってカビの発育を促進させた。

カビがソーセージの全面に被覆後、温度18℃、湿度65%に調整した恒湿恒温器中で歩留り60% (試験区1) および50% (試験区2) 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 発酵ソーセージの消化酵素処理

発酵ソーセージに2倍量の蒸留水を添加してフードプロセッサー (Panasonic MK-K61) を用いて30秒間、2回ホモジナイズした。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°Cで1時間インキュベートした。NaOHを用いてpH6.8に調整し、10分間煮沸した後、溶液温度を40°Cまで低下させた。さらにトリプシン (和光純薬工業株式会社) およびパンクレアチン (同会社) をそれぞれペプシンと同量添加し、再び攪拌しながら37°Cで1時間インキュベートした。最後に10分間煮沸した試料を発酵ソーセージ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<sup>15)</sup>により行った。すなわち、タンパク質溶液に対し、4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液を島津製作所(株)製UV-VIS 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<sup>16)</sup>を適用し、測定を行った。すなわちタンパク質溶液の215nmの吸光度から225nmでの吸光度を差し引き、144倍した時の数値をタンパク質濃度とした。測定には上記と同じ分光光度計を使用した。

### 2.6 アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性の測定

Cushmanの方法<sup>17)</sup>に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンジオテンシンI変換酵素(ACE, Peptidyl dipeptidase, EC3.4.15.1, 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Milli Q水を用いて調整した溶液で溶解した。試料6  $\mu$ lに60unit/mlのACE溶液20  $\mu$ lおよび

7.6mM HHL溶液50  $\mu$ lを添加し37°Cで30分間反応させた。反応は0.1N HCl (和光純薬工業) 554  $\mu$ 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°C, 10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために1MのNaCl溶液を1ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸吸光度を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水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<sup>18)</sup>。すなわち、400  $\mu$ 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  $\mu$ lとサンプルを60  $\mu$ l加え、20分間反応させた。その後、サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また、サンプルの代わりに、0.2mM Trolox (Sigma社製) を使って標準として測定し、検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し、NaOHでpH6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

発酵ソーセージ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  $\mu$ 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

#### 3.1 発酵ソーセージの発酵過程でのカビの発生と歩留変化

作製したソーセージを，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*）」を利用して，この鏢節菌液をソーセージの全面に噴霧し，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良くし，酸素の供給を行ってカビの発育を促進させた。2日後に白色のカビがソーセージ表面に発育し，3日後に全面を覆うように増殖した。さらに，カビの発育したソーセージを，温度18℃，湿度65%に調整した恒湿恒温器中で，歩留り60%（試験区1），50%（試験区2）になるまで乾燥および熟成を進行させた。発酵ソーセージの製造過程の歩留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加熱直後のソーセージを対照区（Control）とした。カビを噴霧した試験区は，8日で歩留りが60%（試験区1；Fermented 60%）に低下し，12日経過して歩留りが50%（試験区2；Fermented 50%）にまで低下した。なお，カビを噴霧した試験区の歩留りの低下状態は，対照区と比較してわずかに早い傾向が認められた。

#### 3.2 カビ発酵ソーセージ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に示したように対照区が61%，試験区1が31%，試験区2が28%を示した。一方，いずれの製品もpHは約6位で，水分活性（Aw）は，対照区が0.96，試験区1が0.91および試験区2が0.86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，

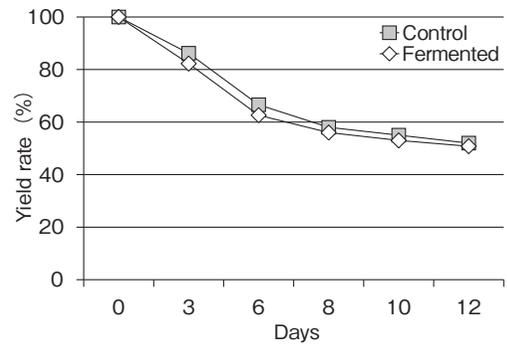


Fig. 1 Yield rate curve of control and fermented sausage.

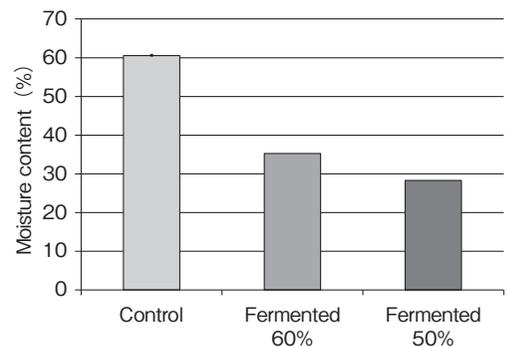


Fig. 2-a Moisture contents in control and each fermented sausages.

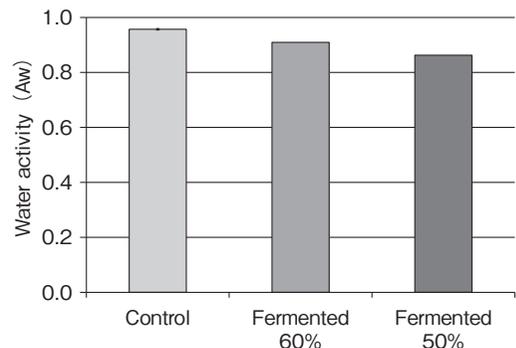


Fig. 2-b Water activities in control and fermented sausages.

歩留りの減少に伴い同様に減少する傾向を示した。食肉製品の規格基準に当てはめると<sup>19)</sup>，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，

試験区2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。

### 3.3 カビ発酵ソーセージの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、しかも官能評価でも高い評価を受ける製品を開発できた<sup>12,13)</sup>。本研究でも、カビ発酵ソーセージを、ヒトが食して消化したことを前提に、前回の報告<sup>14)</sup>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、対照区と比較すると、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、カビ発酵に伴い、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、一昨年報告した、「調理加工食肉・食肉製品およびその発現に関する研究」から得られた結果<sup>20)</sup>や、昨年報告したカビ発酵ハムで得られた結果とほぼ同様の値であった<sup>14)</sup>。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1,000~6,000Da間の成分の増加が観察された(データ未掲載)。最近のDenizらの研究<sup>21)</sup>でも、牛肉を材料としたトルコ産のバストゥルマから検出されたACE阻害ペプチドは、900~1,500Daの分子量域に多く存在することを認めている。

### 3.4 カビ発酵ソーセージの抗酸化活性の評価

Fig. 4に、対照区および2種類の試験区のカビ発酵ソーセージ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。対照区に比較して発酵ソーセージの試験区1は約1.26倍、試験区2は約1.8倍近い高い抗酸化活性を示した。これらの値は、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<sup>22)</sup>。なお、発酵ソーセージの試験区2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よりも若干低い活性であった<sup>20)</sup>。この要因は、それらの製品の発酵・熟成期間に起因すると想定された。Fuら<sup>23)</sup>は、内因性のプロテアーゼによる牛肉タンパク質やコラーゲンの分解が、ACE阻害活性やDPPHラジカル消去活性を発現することを報告している。また、生ハムやドライキュアードハムからACE阻害活性やDPPHラジ

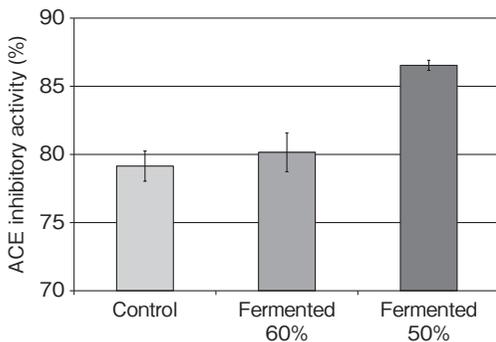


Fig. 3 ACE inhibitory activity of control and each fermented sausages.

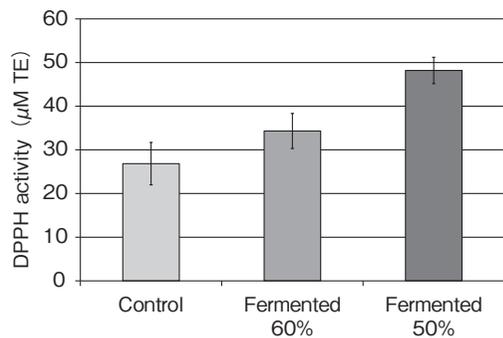


Fig. 4 DPPH radical scavenging activity of control and each fermented sausages.

カル消去活性が発現することが認められている<sup>24)</sup>。これらの抗酸化活性発現の要因は、それぞれの製品中に産生された抗酸化ペプチドの効果であることが示されている。さらに、トルコ産のパストゥルマ由来の遊離アミノ酸と生理活性ペプチドの発現様式を検討した報告では、DPPH活性は分子量700~2000Daくらいのペプチドに依存していることが報告されている<sup>21)</sup>。著者らの乳酸菌を用いた発酵ハムの研究でも、抗酸化活性の発現は、製品の製造過程で発現する低分子量のペプチドに起因することを認めている<sup>13)</sup>。本研究における、カビ発酵ソーセージからも、抗酸化ペプチドの産生により抗酸化活性が発現することが明らかになった。

3.5 カビ発酵ソーセージの遊離アミノ酸分析  
歩留り100%のカビを噴霧していない対照区と歩留り50%の発酵ソーセージの試験区2に含まれる遊離アミノ酸量を測定した (Fig. 5)。その結果、対照区に比較してカビを噴霧した発酵ソーセージは総遊離アミノ酸量が約2倍に増加した。また、カビ発酵させることによって、Asp以外の17種類のアミノ酸の増加が認められた。各遊離ア

ミノ酸の種類では、Gln, Ser, Gly, Ala, Pro, Val, Ile, Leuがいずれも2倍以上増加した。発酵ソーセージ100g当たり、Glnが52mgと最も多く、次いでAlaが約36mgと高い値を示した。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。Alaはアルコールの分解を促進し肝機能を改善する効果を有している。また、運動時のエネルギー源であるグルコースを生成するため長時間の運動時に必要で、持続的な運動を支える効果もある。一方、旨味に貢献するGluは、カビ発酵に伴って約2.2倍に増加したことから、発酵ソーセージは対照区に比較して旨味の顕著な増加が推測された。また、甘味を持ち天然の食品添加物として使用されているAlaの増加もカビ発酵ソーセージの味覚改善に寄与すると考えられた。前報<sup>20)</sup>で、鯉節カビ菌を用いて製造した発酵ハムの官能評価では、熟成風味発現と弾力性で高評価を受けることを報告し、日畜産学会大会でも公表した<sup>25)</sup>。今回の発酵ソーセージの官能評価でも、発酵熟成に伴い弾力性が

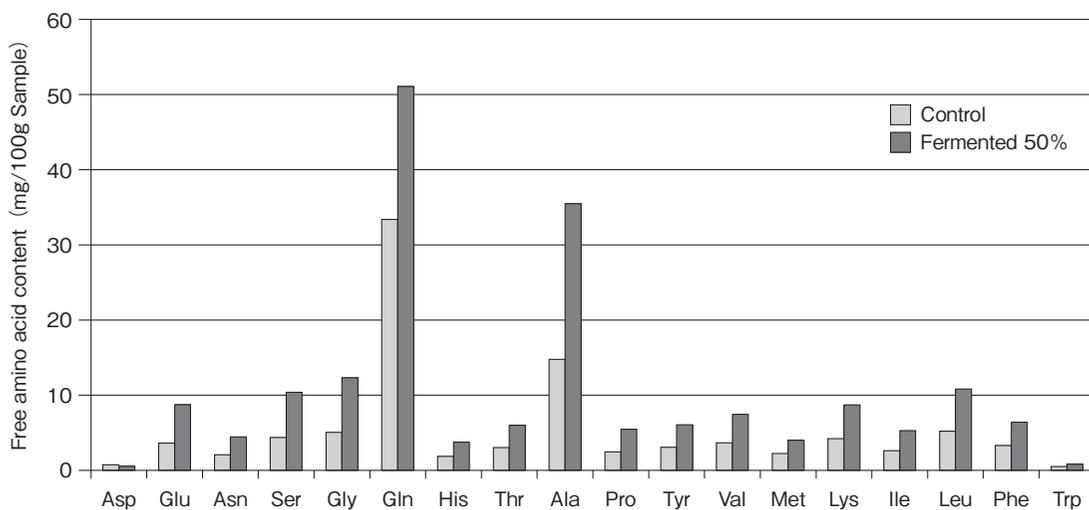


Fig. 5 Free amino acid contents in control and fermented sausage (50%).

増加し、ほどよい香りと適度の酸味や塩味有し、旨味のある製品となることが認められた<sup>26)</sup>。

以上、日本独自の有用菌株である鯉節優良カビ菌「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」を利用して、新鮮な豚肩ロース肉、牛赤身肉および豚脂を用いて調製したソーセージをさらに発酵・熟成させることで、高い血圧上昇抑制活性と抗酸化作用を持ち、ほどよい香りと適度の酸味や塩味有し遊離アミノ酸の増加に伴う旨味の付与された発酵ソーセージ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鯉節カビ菌である「ユーロティウム ハーバリオラム (*Eurotium herbariorum*)」を利用して、ソーセージを発酵させ、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。

新鮮な豚肩ロース肉、牛赤身肉および豚脂を細切し、これに食塩、グルコース、亜硝酸ナトリウムを添加しソーセージエマルジョンを作製した。このソーセージエマルジョンを天然豚腸に充填し、85℃、30分間蒸煮した。加熱処理したソーセージに鯉節菌を噴霧し、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60%、50%になるまで発酵・熟成させた。それらの水分含量、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。鯉節菌の噴霧後2日でカビの発生が認められ、3日で全面がカビで被覆された。歩留りが60%および50%になるまでに、それぞれ8日間および12日間を要した。いずれの製品もpHは約6位で水分活性は0.91以下を示した。カビ発酵ソーセージには、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ソーセージが製造された。

#### 文 献

- 1) 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田幹編著: 最新畜産物利用学, 123~124, 朝倉書店, 東京, 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., Jamhar., 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, A., 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) Takeda, S., Matsufuji, H., Nakade, K., Takenoyama, S., Ahhmed, A., Sakata, R., Kawahara, S., Muguruma, M.: *Anim. Sci. J.*, **88**, 507~516, 2017.
- 14) 六車三治男, 川越聖人, 木本早紀, 川北久美子, 竹之山愼一: 平成27年度食肉に関する助成調査成果報告書, 公益財団法人伊藤記念財団, 34, 96~103, 2016.

- 15) 岡田雅人, 宮崎香: タンパク質実験ノート抽出と分離精製, 29, 羊土社, 東京, 1996.
- 16) Murphy, J. B., Kies, M. W. : *Biochim. Biophys. Acta*, **45**, 382~384, 1960.
- 17) Cushman, D. W., Cheung, H. S. : *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637~1648, 1971.
- 18) Balyasnikova, I. V. : *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **34**, 545~554, 2001.
- 19) 齊藤忠夫, 西村敏英, 松田幹編著: 最新畜産物利用学, 146 V 152, 朝倉書店, 東京, 2007.
- 20) 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, 公益財団法人伊藤記念財団, 33, 96~38, 2015.
- 21) Deniz, E., Mora, L., Aristoy, M. C., Candogan, K., Toldra, F. : *Food Res. Inter.*, **89**, 194~201, 2016.
- 22) 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, 58(1), 103~108, 2015.
- 23) Fu, Y., Young, J. F., Therkildsen, M. : *Meat Sci.*, **123**, 134~142, 2017.
- 24) Mora, L., Escudero, E., Toldra, F. : *Food Res. Inter.*, **89**, 638~646, 2016.
- 25) 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, p 258, 2016.
- 26) 六車三治男, 川越聖人, 木本早紀, 川北久美子, 竹之山愼一, 中村豊郎: 新規な発酵食肉製品の開発 II カビ発酵ソーセージの開発と機能性について, 日本畜産学会第122回大会講演要旨集, p 185, 2017.

# 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 HRHUGf3-RPIB2 (purified by a gel filtration and a reverse phase chromatography and a reverse phase chromatography) -group compared to CTH-group. Mass Spectrometrical analysis reveal that peptide X contains in HRHUGf3-RPIB2. We identified for the first time the hypocholesterolemic peptide X derived from HRHUGf3-RPIB2 in rats.

## 1. 目 的

一般に、大豆タンパク質などの植物性タンパク質は、カゼインなどの動物性タンパク質と比較して、抗動脈硬化作用を有すると考えられている<sup>1)</sup>。しかし、現在活発に行われている有効成分の検討により<sup>2~10)</sup>、このような血清コレステロール低下作用は動物性素材にも見られることが明らかにされている。実際に、私は、牛乳の乳清タンパク質が、動物性タンパク質でありながら大豆タンパク質よりも、強力な血清コレステロール低下作用を発現することを発見し検討している<sup>2,3)</sup>。また、主要な食糧資源でありながら、従来ほとんど検討

がなされていない畜産食品素材のうち、牛肉ペプチド、牛レバーペプチドが体内コレステロール低下作用を有することも見出した<sup>6)</sup>。さらに、昨年度の研究で、動物性食餌タンパク質である牛肉に再度着目し、畜産資源の高度有効利用という観点から、廃棄部位を含めた各部位である牛肉、牛心臓、牛赤血球、牛血漿加水分解物を用いた研究を行った結果、特に牛心臓加水分解物 (HPH) が強力なコレステロール代謝改善作用を発現することを発見した<sup>7)</sup>。

さらに、我々の既報<sup>8~10)</sup>の研究手法を用いて、牛心臓タンパク質加水分解物 (HPH) のコレステロール低下作用機構を明らかにした。コレステ

ロールミセル溶解性はカゼインよりもHPHで有意に低下した。Caco-2細胞のコレステロール吸収抑制はカゼインミセルよりもHPHミセルで有意に高かった。血清コレステロールはカゼインよりもHPHで有意に低かった。放射性コレステロールで測定したコレステロール吸収はカゼインと比べてHPHで有意に減少し、HPHのコレステロール低下作用は空腸のコレステロール吸収阻害によるものである。さらに、HPH由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（HPHU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいてHPHよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し、報告した<sup>11)</sup>。

そこで、本研究では、ペプチド混合物であるHPHUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、HPHU由来ペプチドの分画精製を実施し、*in vitro*のコレステロールミセル溶解性試験を行い、活性ペプチドの特定を試みた。さらに、特定した活性ペプチド候補の活性をラットによる動物実験で評価した。

## 2. 方法, 結果, 考察

### 実験1

Fig. 1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。

平成27年度報告書より<sup>12)</sup>、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。

### 実験2

最大活性を発揮したHRHUgf3-RPIB2の活性ペプチドをTOF/MS分析を実施した。その結果、HRHUgf3-RPIB2からペプチドX（アミノ酸配列は特許の関係で非公表）を同定した。

### 実験3

牛心臓由来ペプチド分画物であるHRHUgf3-RPIB2からペプチドX（アミノ酸配列は特許の関係で非公表）を同定したので、ペプチドXについて、高コレステロール血症ラットにおいて、脂質代謝に対する影響を評価した。高コレステロール食の食餌組成は既報に従って調製した。Wistar系雄ラット4週齢を実験に使用した。ペプチドXは7日間ゾンデによって経口投与した。解剖前8時

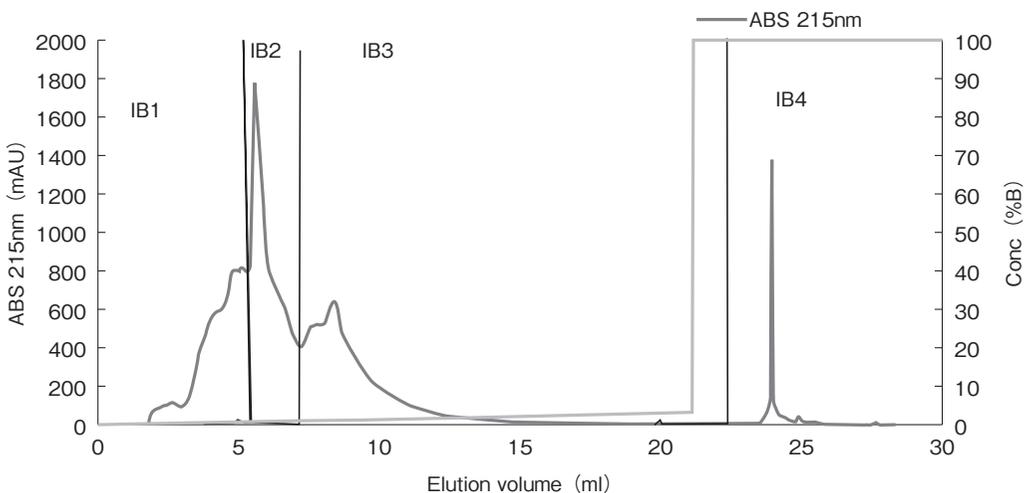


Fig. 1

Table 1 Effects of peptide X on lipid metabolism in Wistar rats

	C	300X	600X
Body weight gain (g/7days)	21.5±1.7 a	19.5±1.4 a	19.0±1.4 a
Food Intake 4-5days (g)	10.8±0.2 a	10.2±0.3 a	11.2±0.3 a
Liver Weight (g/100g Body Weight)	5.45±0.16 a	5.72±0.21 a	5.32±0.12 a
Serum Cholesterol (mg/dl)	452.2±19.1 a	422.6±37.2ab	359.0±18.1 b
Serum Triglyceride (mg/dl)	162.8±18.7 a	180.9±27.4 a	115.6±12.8 a

(Experimental condition)

C (control) : 5g/L Carboxymethylcellulose sodium salt

300X : 300mg/kg.B.W./day peptide X

600X : 600mg/kg.B.W./day peptide X

1. Initial body weight was 70g.
2. The data are shown by Means±SEM of 8 rats.
3. A feeding period was for 7 days and a fasting period was for last 8 hours.
4. Within a row, means with different letters are significantly different ( $P<0.05$ ) by Tukey's test.

間絶食後に解剖し、血液を採取し、遠心分離により血漿を得て、マイナス80度で保管した。なお、実験結果の統計的分析には、Turkey's-testを用いた。

実験の結果 (Table 1) から、体重増加量、食餌摂取量、肝臓重量には、群間で有意な変化は認められなかった。血清コレステロールは対照群 (C) と比較して、300X群で低下傾向、600X群では有意に低下した。血清トリグリセリドは、対照群 (C) と比較して、600X群で低下傾向を示した。今回の結果は、牛肉由来の最初のコレステロール代謝改善ペプチドの発見を意味するものあり、大変興味深いと考える。今後は、このペプチドXの血清コレステロール低下作用機構を解析する必要がある。

### 3. 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、ペプチド混合物であるHPHUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを

特定するために、HPHU由来ペプチドの分画精製を逆相クロマトグラフィーやゲル濾過クロマトグラフィーにより実施し、分画物について、in vitroのコレステロールミセル溶解性試験を行った。

本研究では、HRHUGf3-RPIBの逆相クロマトグラフィー分画物 (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をMS分析した結果、Xペプチドが含まれることを発見した。さらに、牛心臓由来のXペプチドは高コレステロール血症ラットにおいて、血清コレステロール濃度低下作用を発揮することを世界で最初に発見した。

### 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. Biotch. 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., Ahmed, A.M., Muguruma, M., Numata, M., Nagaoka, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **73**, 607, 2009.
- 12) 長岡利：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 91, 2015.

## 肥満に伴う認知症の発症予防に対する豚肉摂取による腸内環境改善効果の有用性

Efficacy of intestinal flora improvement by the pork intake on the prevention of dementia related with obesity

後藤 孔郎・正木 孝幸・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, Takayuki Masaki 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  $\beta$  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. In previous study, we observed that carnosine treatment recovered high-fat diet (HF)-induced reduction of BDNF expression in the brain. However, it is indicated that carnosine could activate central nervous system not directly through blood-brain barrier, but indirectly. Our previous study shows that HF-induced obesity decreases portal levels of glucagon-like peptide-1 (GLP-1) secreted from L-cells in the small intestine and the intraportal GLP-1 administration elevates BDNF expression in the brain. The aim of this study is to clarify that the intake of carnosine included a lot in pork improves obesity-induced reduction of GLP-1 secretion. 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 (250 mg/kg body weight) group, and HF-fed plus carnosine group for 2 months. We evaluated 1) portal GLP-1 levels and GLP-1 expression in small intestine, 2) the analysis of intestinal flora using T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) method. Carnosine treatment inhibited HF-induced reduction of GLP-1 secretion from small intestine. Moreover, carnosine also suppressed HF-induced decrease of "*Genus Ruminococcus*" in intestinal flora. "*Genus Ruminococcus*" produce short-chain fatty acid which stimulates L-cells in small intestine directly to promote GLP-1 secretion, indicating that the alteration of intestinal flora by carnosine treatment increases GLP-1 secretion from small intestine. Thus it is suggested that carnosine intake might be effective to prevent the development of Alzheimer's disease by elevation of GLP-1 secretion which induces BDNF expression in the brain.

## 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小腸にも炎症性変化がみられるとされている。最近の研究により、腸内細菌叢がこれらの疾患に関与する環境要因のひとつであることが明らかになってきた。近年、腸内細菌が宿主の糖脂質・エネルギー代謝に関与することや、腸内細菌叢とメタボリックシンドロームとの間に関連性があることを示す研究が相次いで発表された。これらのことは、腸内細菌叢が肥満およびメタボリックシンドローム発症の環境要因となりうること、いいかえれば腸内細菌叢がこれらの疾患の予防・治療の標的となりうることを示唆している。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、近年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。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予防にもきわめて重要であると考えられている。

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。これまで、我々は門脈血中のglucagon-like peptide-1 (GLP-1) 濃度が上昇すると、肝臓の門脈領域に存在するGLP-1受容体を介して求心性迷走神経を活性化させ、その活性

が摂食抑制作用、脳内BDNF発現の増加をもたらすことを明らかにしている。また、小腸から合成されるGLP-1は血糖降下作用を有しており、GLP-1関連薬が糖尿病治療に威力を発揮している。これまで、我々は門脈血中のGLP-1濃度が上昇すると脳内BDNF発現が増加することにより、膵臓への遠心性交感神経が活性化し、その活性が膵臓の細胞に作用してグルカゴン分泌を抑制させることを明らかにしている<sup>1,2)</sup>。さらに肥満モデルでは、GLP-1の発現が低下していることも認められている。

最近、豚肉に含まれる“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のではないかと示唆されている。しかしながら、豚肉摂取によって取り込まれたカルノシンが小腸内に直接作用して、小腸からGLP-1合成を促進させる可能性も考えられる。

今回、食餌誘導性肥満モデル動物を用い、カルノシンの摂取により、小腸からのGLP-1分泌が促進されか、さらにその変化には腸内環境が関与しているかについて検討する。以上より本研究では、豚肉の摂取は腸内環境を整えることで小腸からのGLP-1合成能を改善させ、アルツハイマー型認知症の進行予防効果をもたらすことを証明することを目的とする。

## 2. 方 法

雄ラットに通常食 (St ; 餌中の20%が脂肪成分) または高脂肪食 (HF ; 餌中の60%が脂肪成分) 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 (250mg/kg体重) と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 (St+control) 群、

通常食+カルノシン (St+carnosine) 添加群, 高脂肪食+コントロール (HF+control) 群, 高脂肪食+カルノシン添加 (HF+carnosine) 群の4群を作成し, 2ヶ月飼育する。その後, 以下のような評価項目について検討する。

a) 下部小腸のGLP-1発現, 門脈血GLP-1濃度をELISAキットで測定する。

b) T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 法を用いて, 腸内細菌解析を検討する。腸内細菌の構成菌種は, 16SrDNAの塩基配列が異なるため, 制限酵素による切断部位は菌種固有のものとなる。これらの処理によって得られるDNA断片に対応したピーク的位置 (断片長), 面積 (菌数) および数 (菌種の多様性) を解析することで糞便中の構成菌種およびその割合を推定する方法である。前述の4群の糞便を採取し, 上記方法で腸内環境を評価する。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 高脂肪負荷に伴うGLP-1発現の変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって下部小腸からのGLP-1発現および門脈内GLP-1濃度が有意に低下したが, それらの低下はカルノシンを経口投与により改善し

た (Fig.1A, B)。

#### 3.2 高脂肪負荷に伴う腸内環境の変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって腸内細菌叢の中のRuminococcus属が低下するが, その低下はカルノシンを経口投与により改善した (Fig.2)。

カルノシンは $\beta$ アラニンとヒスチジンのジペプチドで $\beta$ 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<sup>3,4)</sup>。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装荷するとともに筋肉脂質の過酸化や蛋白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蛋白変性を伴う疾患, 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 $\beta$ 蛋白 ( $A\beta$ ) の活性を抑制していると考えられている<sup>5,6)</sup>。これまで申請者は, カルノシンを摂取すると高脂肪負荷による脳内BDNF発現の低下が改善することを認めている。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 $A\beta$ 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

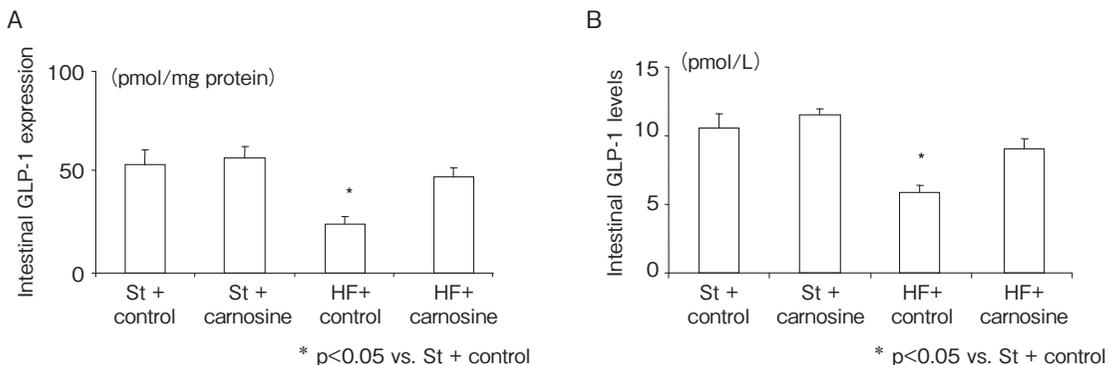


Fig. 1

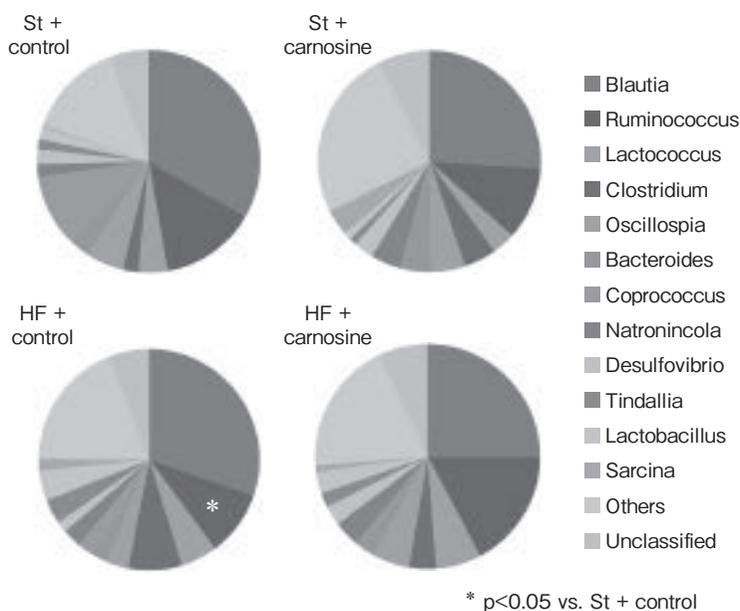


Fig. 2

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<sup>7-9)</sup>。ところが興味深いことに、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ことが明らかになっている<sup>10,11)</sup>。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腸内環境の改善、さらには小腸から分泌されるGLP-1の分泌促進による可能性が考えられ、本研究を遂行した。これまで我々は、小腸から分泌されるGLP-1が門脈を經由して肝臓内の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、ということを示している<sup>1,2)</sup>。本研究において、高脂肪負荷は小腸からのGLP-1分泌低下をもたらし、カルノシンの経口摂取はその

低下を回復させることが認められた。さらに、高脂肪負荷は腸内細菌叢の中のRuminococcus属を低下させるが、その低下もカルノシンを経口投与により改善した。Ruminococcus属は食物繊維を醗酵して、短鎖脂肪酸（酢酸、酪酸など）を産生することが知られている<sup>12)</sup>。さらにこれらの短鎖脂肪酸は、下部小腸のL細胞に直接作用してGLP-1分泌を促進させることが報告されている<sup>13)</sup>。以上より、本研究でみられたカルノシン摂取によるGLP-1分泌促進作用には、腸内でのRuminococcus属の増加が関与していることが示唆される。今後、カルノシン経口投与後における門脈血中のアミノ酸濃度などの解析が必要であると考えられる。

#### 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病態

生理に関しては、神経細胞外のA $\beta$ の沈着のみならず、慢性の炎症が大きく関わりとされているが、メカニズムの詳細は不明である。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。しかしながら、カルノシンは直接脳に作用していないのではないかという考えが一般的である。以上より本研究では、「豚肉の摂取は腸内環境を整えることで小腸からのGLP-1合成能を改善させ、アルツハイマー型認知症の進行予防効果をもたらす」ことを証明することを目的とする。カルノシンは、肥満による腸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、カルノシンを多く含む豚肉の摂取は、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 U S A*, **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<sup>1</sup>, 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 Abeta42-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-aging 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.
- 12) Gokarn, R. R., Elterman, M. A., Martin, S. A., Erikson, K. E.: Production of succinate from glucose, cellobiose, and various cellular materials by the ruminal anaerobic bacteria *Fibrobactor succinogenes* and *Ruminococcus flavefaciens*, *Appl Biochem Biotechnol*, **68**, 69~80, 1997.
- 13) Adachi, T., Tanaka, T., Takemoto, K., Koshimizu, T. A., Hirasawa, A., Tsujimoto, G.: Free fatty acids administered into the colon promote the secretion of glucagon-like peptide-1 and insulin, *Biochem Biophys Res Commun*, **340**, 332~337, 2006.

## 畜産物由来サプリメントの新規評価法の開発

Development of new evaluation method for supplement derived from animal product

吉川 豊・糸井 亜弥

(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 Aya Itoi

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

Stable isotope abundances of most elements are highly constant in nature but they are not invariant. Element transfer between physical and chemical compartments can alter the isotopic composition of an element slightly provided that the transfer process is incomplete and sensitive to the isotope's masses. For the lighter elements such as H, C, O, and N are now used widely in a number of scientific disciplines such as the earth and environmental sciences, plant science and food science. Recently, many researchers were reported that stable isotope ratio of the heavy elements such as Sr and Pb are measured and these data were used to the opinion of production area or human health. In this study, we examined the Fe stable isotope ratio of the blood powder, heme Fe, and,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  in supplied ILS Co. Ltd. or Wako Pure Chemical Industry Ltd.. We revealed that  $\delta^{65}\text{Fe}$  dissociated among the blood powder, heme Fe, and,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . In the future, we proposed that  $\delta^{65}\text{Fe}$  may be used as opinion of production area.

### 1. 目 的

分析技術の進歩により、様々な高精度の装置が開発されている。その中でも近年安定同位体の測定に注目が集まっている。同位体とは、同じ元素に属していても中性子数が異なるもの、つまり同じ元素でも質量数が異なるものをいう。多くの元素はいくつかの同位体の混合物であり、それらの存在比はほぼ一定である。同位体では電子配置の最外殻構造が同一のため、化学的性質は良く似ているが、原子核の重さが異なり、わずかに物理学的性質に違いが生じる。環境分野において

は、地球古環境試料に含まれる有機物の同位体組成が、生物の起源に関する情報や合成・代謝・分解などの生物化学的プロセスと密接にリンクしており、安定同位体比の解析は地球科学や生態学の分野で特に広く使われている<sup>1)</sup>。さらに、水素同位体を指標とした動物の行動範囲の環境変動調査、炭素・窒素同位体比を指標とする覚せい剤などの規制薬物合成原料の特定や流通過程の解明、炭素同位体比によるドーピング判定、ストロンチウムの同位体比を用いての、大麦、米、小麦、そばなどの産地判別など様々な分野で応用されている<sup>2, 3)</sup>。

より具体的には、同位体比は各元素により、反映する要因が異なることが報告されている。例えば、炭素の同位体比 ( $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ) は、光合成経路の異なる C 3 植物と C 4 植物ではその同位体比が異なり、C 3 植物の炭酸固定酵素 (リブローズ-1, 5-ビスリン酸カルボキシラーゼ/オキシゲナーゼ; RubisCO) は  $\text{CO}_2$ -酵素複合体を生成する際に分子量44の  $\text{CO}_2$  を選択し、分子量45の  $\text{CO}_2$  はほぼ使用しないため、それぞれの炭素の安定同位体にはわずかな差が生じる<sup>4)</sup>。窒素の同位体比 ( $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) は根から吸収する土壌中の窒素源の同位体比を反映するため、有機農法判定に応用できる。また、水においても、重水素 ( $^2\text{H}$ (D)) や  $^{18}\text{O}$  を含む水は低緯度地域のほうが高く、軽い水 ( $\text{H}_2^{16}\text{O}$ ) は重い水 ( $\text{H}_2^{18}\text{O}$ ) よりも蒸発しやすく、雨水として落ちてくるときには重い水が落ちてきやすい。そのため、海岸部と山間部では水由来の同位体比が異なることも明らかになっている。これらの背景原則に基づき農作物の産地判別に同位体比分析が多く用いられている。豪州産のコシヒカリは国産や米国産のものより  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  比が高く、世界の降水中の  $^{18}\text{O}/^{16}\text{O}$  比の分布傾向とよく一致し、産地判別できる可能性を示している<sup>5)</sup>。他にもアメリカ産の牛肉は、 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$  比の数値が国産や豪州産より高く、C 4 植物であるトウモロコシが餌に多く含まれていることを意味した結果となることも報告されている<sup>6)</sup>。

一方、生体に対する同位体の影響では、マウスにおいて、血漿中Caの同位体比 ( $^{44}\text{Ca}/^{42}\text{Ca}$  比) は餌中のその比とほぼ同じ値を示すが<sup>8)</sup>、骨中Caのその比は、餌中のものより有意に低値であり、軽い質量数の  $^{42}\text{Ca}$  を骨中に選択的に蓄積していた<sup>7)</sup>。また、ヒトの赤血球と血漿中のFeの同位体比を比較すると、赤血球では  $^{56}\text{Fe}/^{54}\text{Fe}$  比が血漿中より低く、赤血球に含まれるFeは軽い質量数の  $^{54}\text{Fe}$  を濃縮している可能性が認められている<sup>8)</sup>。このように同

位体比を測定することで、日常生活における様々な現象を評価することが可能になってきている。

そこで、本研究では、安定同位体ならびに安定同位体比を測定することで、畜産物由来のサプリメントの新たな食品価値を見出すため、畜産物由来サプリメント中の鉄 (Fe) (ヘムFe)、ヘムFe原料である血粉中のFe、および無機Fe中のFeなどの安定同位体比の測定を行い、無機FeとヘムFeの間でFeの同位体比が変わるのか、また、血粉のような食品中のFeとヘムFeの間でFeの同位体比が変わるのかを評価することを目的とした。

本実験の測定には、Agilent Technologies社の誘導結合プラズマ質量分析計 (ICPMS; 7700 シリーズ) を用い、各種サンプルを、湿式灰化することで溶液のサンプルとし、NIST認証標準物質のIron (Fe) Standard Solutionならびに和光純薬工業製の1000 ppm各種金属標準液を用いてサンプル中の微量元素の定量分析ならびに同位体比の測定を実施した。

## 2. 方法

産地の異なる (ベルギー産、オランダ産、スウェーデン産、スペイン産) 血粉とそれを原料としたヘムFeならびに和光純薬工業が発売している硫酸鉄 (II) 七水和物 (以下硫酸鉄) をサンプルとして用い、実験を実施した。

### 2.1 サンプル調整

ILS (株) より提供された、ベルギー産、オランダ産、スウェーデン産、スペイン産の家畜豚由来の血粉並びに同血粉から調製したヘムFeと硫酸鉄をサンプルとして使用した。試験に使用したヘムFeの調整は、まず血粉を温水に溶解させ、タンパク分解酵素を添加することでグロビン部分を酵素分解し、限外濾過膜処理によって不要成分を除き、ヘムFe含量を上昇させ、スプレードライにて粉末化したものである。これらのサンプル

を、有害金属測定用グレードの硝酸、過塩素酸、過酸化水素（すべてキシダ化学株式会社製）を用い、ホットプレート上で湿式灰化し、サンプル溶液の調整を行った。上記操作を要約すると、定量評価用のサンプルとしては、ヘムFeに関しては、Fujimoto等の方法に基づき、約4 mgのサンプルを5 mLのメスフラスコに入れ、硝酸を3 mL加え、約6時間ホットプレート上で加熱し、サンプルを完全に溶解させたものを9 mLにメスアップし使用した<sup>9)</sup>。血粉に関しては、Yoshikawa等の方法に基づき、約4 mgのサンプルをトールビーカーにはかりとり、上記3種の酸を用いて、トールビーカーの底に白い灰が残るまで150°Cに設定したホットプレート上で過熱処理（湿式灰化）を行った。その後、室温に戻るまで放置し9 mLにメスアップした<sup>10)</sup>。同位体比測定用のサンプルに関しては、ヘムFe、血粉ともに、約1.5 mgのサンプルをトールビーカーにはかりとり、上記3種の酸を用いて、トールビーカーの底に白い灰が残るまで150°Cに設定したホットプレート上で過熱処理（湿式灰化）を行い、各種サンプルが約100 ppbになるように希釈してサンプルとした。

## 2.2 定量評価ならびに同位体比の測定

2.1で調整したサンプルと同位体比測定のための認証標準物質としてアメリカ国立標準技術研究所（NIST）が製造販売しているFe標準液（3126a）を用い、ICPMSを使用して実験を行った。

定量評価で用いた検量線は、和光純薬工業が販売しているMg、Ca、Fe、Cu、Zn、Pbの1000 mg/Lの標準液を用い、0 ppb、5 ppb、10 ppb、50 ppb、100 ppb、500 ppbとなるように溶液を希釈し使用した。内標準物質としては、インジウムを1 ppbになるように添加した。また、Feの同位体比測定においては、標準液として、NIST製の認証標準物質を用いて100 ppbの溶液を調整し、同位体標準液とした。

ICPMSはAgilent社のAgilent7700を使用し、定量分析はヘリウムモードを使用した。同位体比の測定には同位体モードを使用し、積分時間を12秒、スイープ回数を100回、繰り返し回数を1サンプルに対して10回とした。

なお、同位体比は、Fe標準液の同位体比に対するサンプルのFe同位体比の比率で表し、下記の式から求めた。

<sup>56</sup>Fe/トータルFeの場合、

$$\delta^{56}\text{Fe} = \left[ \frac{R_{\text{試料}}}{R_{\text{標準}}} - 1 \right] \times 1000 \text{ (‰)}$$

$$R = \frac{{}^{56}\text{Fe}}{\text{トータルFe}}$$

## 3. 結果と考察

### 3.1 元素の定量結果

測定に用いた8種のサプリメント用サンプルの定量結果を、Table 1に示す。

測定した元素は、Mg、Ca、Fe、Cu、Zn、Pbの6種で、Feの含有量が最も多い結果となった。また、ヘムFeは血粉を濃縮して製造していることから、ヘムFe中の鉄の含有量が血粉より上昇していることは理にかなっていた。Fe以外の他の元素に関しては、血粉とヘムFe間で有意な増減は認められなかったが、CaとMgはヘムFe中で増加している傾向があった。これは、ヘムFe製造の際に濃縮の工程があるため、比較的血液中に多く含まれているCaとMgも濃縮されたためと考察した。また、6種の元素の産地による含有量の違いは、ベルギー産のものでMgが低い傾向にあった。

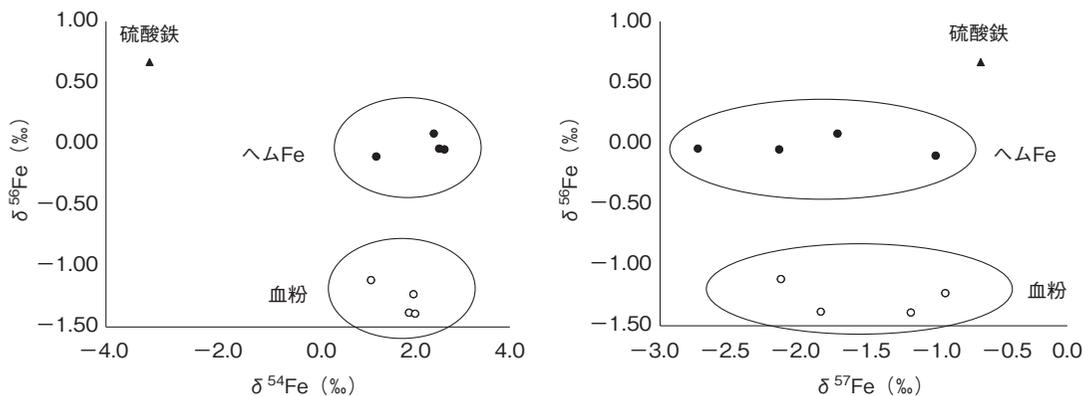
### 3.2 Feの安定同位体比の測定結果

Fe同位体比測定用サンプルを、ICPMSを用いて測定し、 $\delta^{54}\text{Fe}$ と $\delta^{56}\text{Fe}$ の相関ならびに、 $\delta^{56}\text{Fe}$ と $\delta^{57}\text{Fe}$ の相関の結果をFig. 1に示す。

Feには、質量数が54（5.845%）、56（91.754%）、57（2.119%）、58（0.282%）の4種の同位体が存

Table 1 Mineral concentration of the blood powder and heme Fe

mg/g		Mg	Ca	Fe	Cu	Zn	Pb
血粉	スウェーデン産	0.26	0.17	2.2	0.010	0.07	0.007
	オランダ産	0.29	0.16	2.4	0.006	0.02	0.001
	スペイン産	0.29	0.15	2.5	0.006	0.11	0.002
	ベルギー産	0.24	0.13	1.9	0.006	0.02	0.002
ヘム鉄	スウェーデン産	0.59	0.65	18.9	0.005	0.06	0.001
	オランダ産	0.81	0.37	18.9	0.006	0.07	0.001
	スペイン産	1.18	0.91	17.3	0.009	0.06	0.001
	ベルギー産	0.28	0.20	18.4	0.004	0.03	0.001

Fig. 1 The relationship among the blood powder, heme Fe, and,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  on isotope ratio of Fe

在し、また、トータルのカウントに対する各同位体の比が計算できるため、それぞれの同位体比の表し方は4通り存在し、同位体の種類が4つあるため、192種類の相関の表し方が存在するが、天然存在比の低い質量数の元素のICPMSを用いた同位体比分析は実用的ではないとの報告もあるため<sup>11)</sup>、本研究における同位体比の評価は $^{58}\text{Fe}$ を除く3通りとし、同位体の種類が3つあるため、54種類の相関の表し方が存在する。その中でも、今回は、トータルのカウントに対する各同位体の比を観察した場合、 $\delta^{56}\text{Fe}$ の値が、硫酸鉄と血粉中のFeとヘムFeとの間で乖離していることが明らかとなった。鉄の同位体の存在割合は、 $^{56}\text{Fe}$ が最も多いため、その変化が最も顕著に表れた可能性がある。また、血粉中には多くのタンパク質やペ

プチドも存在しているため、それらがFeの配位子となり、同位体分別（選択的な取り込み）効果が血粉では存在し、天然の存在比から乖離し、血粉からヘムFeを濃縮する過程において、天然存在比に近づいた可能性も考えられた。一方、湿式灰化の際にも血粉やヘムFe、硫酸鉄において、サンプルの様態が異なることも観察されたため、灰化方法の見直しも今後の課題の一つになるかもしれない。一方、産地による違いは、各産地由来のサンプルが一種類のみであったので、正確に比較することはできなかったが、ヘムFeと血粉中のFe間で、同じ地域のサンプルが同じような動きをしていないため、地域による差は認められないと考えられた。

今回の研究によって、四重極型のICPMSを用

いてのFeの同位体比測定のプロトコール作成はほぼ完成したといえる。現状の同位体比測定分野では、多くの場合は、マルチコレクターICPMS (MC-ICPMS) を用いての測定が多数であるが、装置が非常に高額であり、簡単に同位体比の測定が行える状況ではなかった。今回100 ppbというある程度濃いサンプル領域においては、四重極型のICPMSを使用した場合でも、測定が可能であることが分かり、また、低濃度から高濃度領域までの検量線の作成を行うと、10 ppb~200 ppbの範囲においては、再現性良く同位体比の測定を行うことができることも判明した。

今回の研究結果は、同ロットのサンプルのみの測定であるため、他のロットでも同様の傾向が観察されるのかなど、今後検討しなければならない課題は多数ある。一方で、本申請課題の研究が進展していくと、吸収性の良し悪しで多くの場合議論されている無機Feと有機Feの違いにもう一つ同位体比という物性データを付け加えることができ、新たなサプリメント開発のきっかけになる可能性を秘めている。特にサプリメント原料は、諸外国からの輸入に頼っていることが多いため、現在の日本においては、食品やサプリメントの安全性の担保が声高に叫ばれており、サプリメントの原料である血粉と、商品化されたサプリメント(ヘムFe)との間で $\delta^{56}\text{Fe}$ の同位体比に違いがあることが再現性良く検出できれば、原料の判別に本法を利用することができ、原料の偽装問題が疑われた時に役立つ一つの方法としての同位体比測定の可能性を提案することができる日も遠くはないと考えられる。

#### 4. 要 約

近年生態系の研究に安定同位体が広く使用されてきている。食品の産地判別には、水素、炭素、窒素、酸素の4種類の安定同位体を中心に、スト

ロンチウムや鉛の同位体の測定、並びに微量金属の測定などを組み合わせての評価が進んでいる。このような背景のもと、サプリメント素材として使用される家畜豚由来の成分(血粉ならびにヘムFe)に含まれるFeの同位体を測定することで、含有成分や産地の違いがFeの同位体に現れるかどうかの検討を行った。その結果、血粉とヘムFe中の $^{56}\text{Fe}$ に関して、トータルのFeに対する比に差が生じていた。今後、再現性や各種詳細な実験条件の検討を行うことで、家畜豚由来成分の素材の判別やそれらサプリメント素材の代謝ルート解明に同位体比を使用できる可能性があり、今後この分野のさらなる発展が期待される。

#### 5. 謝 辞

同位体比並びに微量金属の定量実験においては、京都薬科大学のICPMSの使用をさせて頂きました。装置の管理分野である代謝分析学分野の安井裕之教授に深く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 大野剛, 平田岳史: 分析化学, 53, 631~644, 2004.
- 2) 有山薫: 分析化学, 63, 205~220, 2014.
- 3) 植木真琴: 分析化学, 63, 161~169, 2014.
- 4) 伊永隆史: 臨床化学, 38, 257~265, 2009.
- 5) Suzuki, Y., Chikaraishi, Y., Ogawa, N., Ohkouchi, N., Korenaga, T.: *Food Chem*, **109**, 470~475, 2008.
- 6) Nakashita, R., Suzuki, Y., Akamatsu, F., Iizumi, Y., Korenaga, T., Chikaraishi, Y.: *Anal Chim Acta*, **617**, 148~152, 2008.
- 7) Hirata, T., Tanaoshima, M., Suga, A., Tanaka, Y., Nagata, Y., Shinohara, A., Chiba, M.: *Anal Sci*, **24**, 1501~1507, 2008.
- 8) Friedhelm, von, B., Marcus, O., Dietmar, G. S., Kirsten, van, Z., Hans-Peter, G., Alan, J. S., Sylvie, S., Daniel, K., Piet, S.: *Metallomics*, **6**, 2052~2061, 2014.
- 9) Fujimoto, S., Yasui, H., Yoshikawa, Y.: *J Inorg Chem*, **121**, 10~15, 2013.
- 10) Yoshikawa, Y., Adachi, Y., Yasui, H., Hattori, M., Sakurai, H.: *Chem Pharm Bull*, **59**, 972~977, 2011.
- 11) 馬淵久夫, 宮崎章, 山下信義編: 同位体環境分析, pp273-280, 丸善出版, 東京都, 2013.

## 豚肝臓由来ペプチドが肝線維化に及ぼす影響（Ⅱ）

Effect of dietary peptides derived from porcine liver on hepatic fibrosis（Ⅱ）

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 has been wasted. In the present study, we investigated the effects of peptides from pig liver (liver peptide) on mouse liver after carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced injury. In the liver of mice fed liver peptide, the mRNA levels of collagen  $\alpha 1$  (I),  $\alpha 1$  (III), and  $\alpha 1$  (V) chain increased 3 day after CCl<sub>4</sub> injection. In contrast, collagen  $\alpha 1$  (I) mRNA level increased in the liver of mice fed normal diet 3 day after the injection. It is therefore possible that type III and V collagen play an important role during hepatic tissue repair after CCl<sub>4</sub>-induced injury in mice fed liver peptide.

### 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ている。ここで、我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。しかしながら、食用に適さない内臓や血液等の畜産副生物は、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、いま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。

昨年度、申請者はマウスを用いて肝臓ペプチドの給与が四塩化炭素誘発性の急性肝障害に及ぼす

影響を調べた。その結果、25mg/kg体重の四塩化炭素を腹腔内投与した翌日の肝臓中のコラーゲン遺伝子の発現量は肝臓ペプチドの給与により減少した（I型コラーゲン、 $p < 0.1$ ；V型コラーゲン、 $p < 0.05$ ）。しかしながら、この量の四塩化炭素をマウスに単回投与した場合、投与から1週間程度で損傷した組織は完全に修復されるものと過去の報告から予想される。したがって、豚肝臓ペプチドの給与が肝障害に及ぼす影響の詳細を明らかにするためには、投与後の経時の変化を調べる必要がある。

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経時的に調べた。

## 2. 方 法

昨年度と同様に、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<sup>1)</sup>。投与前、投与3、5および7日後に麻醉下で安楽死させ、肝臓を採取した。採取した肝臓は重量を測定後、液体窒素にて素早く凍結し、

-80℃で保存した。凍結保存した肝臓からセバゾール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）、プライマー（Table 2）、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。

## 3. 結 果

投与経過日ごとに対照飼料給与区および試験飼料給与区を比較したところ、試験飼料給与区において、I、IIIおよびV型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖

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 <sup>1)</sup>	3.5	3.5
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	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 teg 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'

(COL1A1, COL3A1およびCOL5A1) の遺伝子発現量は、試験飼料給与区において有意に高い値を示した (Fig. 1)。また、試験区ごとにそれぞれの遺伝子発現量の経日的変化を調べたところ、対照飼料給与区においては、COL1A1 mRNA量のみ投与3日後に投与前に比べて有意に増加したが、試験飼料給与区においては今回調べたすべてのコラーゲンのmRNA量が投与3日後に有意に増加した。

#### 4. 考 察

コラーゲンは脊椎動物の体内に最も多く存在

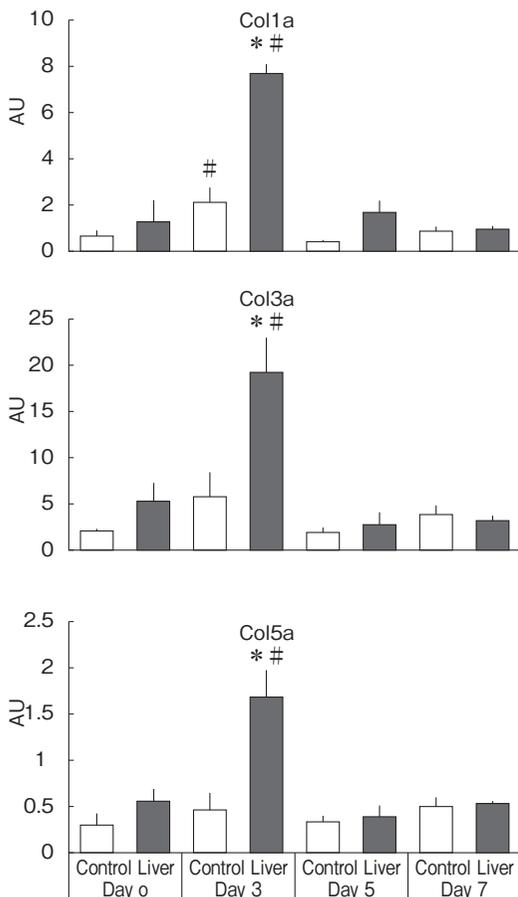


Fig. 1 Effects of peptides from pig liver on collagen mRNA levels in mice liver.

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<sup>2)</sup>。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、あるいは線維芽細胞様に変化した細胞により産生・分泌され、損傷部の修復に重要な役割を果たしている。分泌されたコラーゲンはアッセンブリするが、そのアッセンブリは一般的にフィブロネクチン依存的とされている。しかしながら、最近、肝臓フィブロネクチンを特異的にノックアウトしたマウスの肝臓においても、四塩化炭素投与による肝障害後にコラーゲンのアッセンブリが生じること、およびそのアッセンブリはTGF- $\beta$ およびV型コラーゲン依存的であることが報告されている<sup>3)</sup>。本研究において、対照飼料を給与したマウスでは、投与前に比べて投与3日後のCOL1A1 mRNA量のみが有意に増加したが、豚肝臓ペプチドを給与したマウスではCOL1A1に加えてCOL5A1のmRNA量も投与3日後に有意に増加した。これらのことから、四塩化炭素による肝障害後の治癒過程において、豚肝臓ペプチド給与マウスではV型コラーゲンが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

また、投与3日後において、今回調べたすべてのコラーゲン遺伝子のmRNA量は、対照飼料給与マウスに比べて豚肝臓ペプチド給与マウスの肝臓において有意に高い値を示したが、投与前および投与5日目以降において有意な差は認められなかった。これらのことから、豚肝臓ペプチド給与による四塩化炭素投与後のコラーゲン遺伝子の発現増加は一時的なものであり、肝線維化を促進するものではないと考えられた。今後、組織標本による評価や、慢性肝障害モデルでの試験によりその確認を行う必要がある。

昨年度の報告では、四塩化炭素投与翌日のCOL1A1およびCOL5A1のmRNA量は豚肝臓ペプチドの給与により低い値を示し、本年度の結果と

は逆の傾向を示した。投与翌日は主としてフィブロネクチンとフィブリンからなる provisional matrixが障害を受けた肝臓で形成されていると過去の報告から考えられるが、細胞外マトリックスはコラーゲンの遺伝発現を促進するTGF- $\beta$ の活性化を調節することが知られている。したがって、組織障害後に形成される provisional matrixの量あるいは構造が豚肝臓ペプチド給与により変化し、その結果、コラーゲンの遺伝子発現量が減少したのかもしれない。今後、再現性の確認も含めて詳細に検討する必要がある。

## 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。豚肝臓ペプチド給与マウスの肝臓では、四塩化炭

素投与3日後のI、III、およびV型コラーゲン $\alpha$ 1鎖の遺伝子発現量は、投与前に比べて有意に増加したが、対照飼料給与マウスの肝臓ではI型コラーゲン $\alpha$ 1鎖の遺伝子発現量のみ投与前に比べて有意に増加した。これらの結果から、四塩化炭素による肝障害後の治癒過程において、豚肝臓ペプチド給与マウスではIIIおよびV型コラーゲンが重要な役割を果たしている可能性が考えられた。

## 文 献

- 1) A nutrient mixture suppresses carbon tetrachloride-induced acute hepatic toxicity in ICR mice, *Hum Exp Toxicol*, 27, 559~566, 2008.
- 2) Mander, L. N., Liu, H. W. : Comprehensive natural products II, *chemistry and biology*, 469~530, Elsevier, Oxford, 2010.
- 3) Saneyasu, T., Yoshioka, S., Sakai, T. : Mechanisms of collagen network organization in response to tissue/organ damage : Composition and Function of the Extracellular Matrix in the Human Body, 235~260, INTECH, 2016.

## 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  
(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture)

Marbling is most characteristic feature in Japanese Black cattle, and it is known that the vitamin A (VA) restriction improves marbling significantly. In addition, it is known that 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 carcass traits. We searched polymorphisms on *RBP4* in Japanese Black cattle, and detected c.237C>G (exon 3), c.355+26C>T (intron 4) and c.\*50A>G (exon 6). However, for exon 1, 2 and their flanking region, search of polymorphisms had not been sufficiently due to obtain only a few sequence data. In the fattened population composed of 176 cattle, the analysis using these 3 SNPs showed that *RBP4* significantly associated with carcass weight ( $P < 0.05$ ). However, it was suggested that the association between *RBP4* and carcass weight was not caused with these SNPs, but other new polymorphism(s).

In this study, we searched again polymorphisms on exon 1, 2 and their flanking region, and c.-19+21delG was detected on intron 1. To perform association analysis in the fattened population composed of 260 cattle, c.-19+21delG was genotyped these 260 cattle, and the 3 SNPs were genotyped additional 84 cattle. In the analysis using these genotype data, it was validated that *RBP4* might associate with carcass weight. However, it was suggested that c.-19+21delG was not cause of the association. Furthermore, we searched polymorphisms locating on a region from 5' end of exon 1 to 1,439 bp upstream, and 10 SNPs were detected. We need to perform an association analysis between these SNPs and carcass weight.

### 1. 目 的

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種である。これまでに、黒毛和種の父方半きょうだい家系を用いたQTL (Quantitative trait locus) 解析により、脂肪交雑や枝肉重量など枝肉形質と関連する染色体領域が複数箇所検出されている<sup>1~3)</sup>。これら

QTLの責任遺伝子を特定するための解析が進められ、枝肉重量に関する責任遺伝子として *NCAPG* (chromosome condensation protein G) が同定されている<sup>4)</sup>。また、脂肪交雑の候補遺伝子として *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が探索され、これらと脂肪交雑の関連が示されている<sup>5~7)</sup>。

ビタミンA (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、その生理作用は視覚維持、成長作用、生殖作用、細胞増殖・分化、免疫機構、および転写調節など多岐に渡ることが知られている。また、黒毛和種の肥育は血中VAを低レベルにして行われ、肥育牛の血中VA濃度と脂肪交雑に有意な負の相関があることや、VAが脂肪前駆細胞の脂肪細胞分化を抑制することが示されている<sup>8~11)</sup>。

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に送られて貯蔵される。このVAはレチノールに変換され、Retinol-binding protein4 (RBP4) と結合し、血管を通して各臓器へ輸送される<sup>12,13)</sup>。我々は、このRBP4遺伝子の多型が枝肉形質に影響すると考え、黒毛和種69頭を用いてRBP4のエクソンを中心に多型を探索し、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3SNPsを検出した<sup>14)</sup>。エクソン1と2の多型は検出されていないが、多型探索のシーケンシングで配列データが得られた頭数が少ないため、十分な多型探索の結果とは言えない<sup>14)</sup>。これまでに検出されている3SNPs (既存3SNPs) と主要な枝肉形質の関連を肥育去勢牛176頭で解析したところ、RBP4と枝肉重量の関連が示唆された。しかし、これら3SNPsはアミノ酸置換を伴わずRBP4機能に影響しないと思われることから、新規のRBP4多型が枝肉重量に関係していることが示唆された<sup>15)</sup>。

本研究では、多型が十分に探索されていないエクソン1と2の多型を改めて探索し、新規多型を含めたRBP4多型と枝肉形質との関連を肥育去勢牛260頭で解析した。さらに、RBP4遺伝子上流

域に存在する多型も探索した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 共試个体

RBP4多型を探索するために、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 (多型探索用集団)。また、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たサンプルを用いた。これらから月齢が23~39ヶ月、枝肉重量が300~700kgの範囲である肥育去勢牛20,493頭を選抜し、さらに、同一種雄牛の産子が3頭を超えないように1,234頭を選抜した。これらのうち、2003年に収集した260頭のゲノムDNAを用いた (関連解析用集団) (Table 1)。既存3SNPsについては、この集団のうち同一種雄牛の産子を含まない176頭は解析済みのため、未解析の84頭を追加した。

### 2.2 多型探索

RBP4のエクソン1, 2とその周辺の多型を、これらエクソンの外側に各々配置したプライマーセットを用いて多型探索用集団で得られたPCR産物のシーケンシングにより探索した (Table 2, Fig. 1)<sup>14)</sup>。遺伝子上流域の多型探索は、エクソン1の5'端から上流約3.0kbをカバーするように配置したプライマーのうち、約1.4kbを増幅するup4Fとup6Rで同様に得られたPCR産物をこれらプライマーとup5F, up6Fの4プライマーでシーケンシングした (Table 2, Fig. 1)。エクソン1と2に対する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℃ :

Table 1 Phenotypes in the population (n = 260)

	Mean	SE	Minimum	Maximum
CW (kg)	464.07	2.85	338.00	605.60
REA (cm <sup>2</sup> )	53.69	0.53	33.00	95.00
RT (cm)	7.56	0.05	5.10	10.00
SFT (cm)	2.62	0.05	0.90	6.00
YEP (%)	73.29	0.09	69.50	78.90
BMS	5.15	0.11	2.00	11.00

CW : Carcass weight REA : Area of rib eye  
 RT : Rib thickness SFT : Subcutaneous fat thickness  
 YEP : Yield estimated percentage  
 BMS : Beef marbling standard

Table 2 Primers for search of polymorphisms

	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)	Usage
RBP4-ex1	F GCGCGTTATGCAAGTGCTGG	427	PCR, Sequencing
	R ACACCACTCCATCTCGCTC		
RBP4-ex2	F ATGGGTGTGATGAGGGTCTG	447	PCR, Sequencing
	R GCGACGATGTTGTCTTGCAG		
RBP4-up	4F GCTCCTAGTTAGCTGGTAGG	1578	PCR, Sequencing
	6R AGACCCTCATCACACCCATC		
	5F GACCATTGACGTCACAGACG	Sequencing	
	6F GCGGAAACAGTCCCAAACCTC		

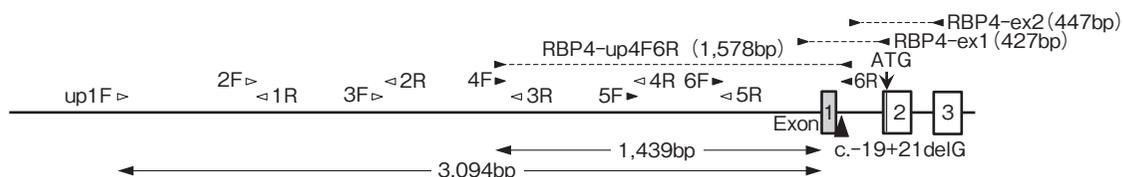


Fig. 1 Primers for search polymorphisms on exon 1, 2, their flanking region and upstream region.

Laid triangles indicate primers, and filled one indicates used primers in this study. Boxes indicate exons, and vertical triangle indicates c.-19+21delG position. ATG is initiation codon.

1分), 伸長反応 (72°C : 1分) を35サイクル繰り返し, 最終伸長反応 (72°C : 10分) を行った。上流域約1.4kbに対するPCRは, 上記条件の伸長反応時間を2分に変更して行った。

エクソン1, 2に対するPCR産物のシーケンシングによって得られた塩基配列をデータベースに登録されているウシRBP4塩基配列 (NM\_001040475) およびウシゲノム配列 (UMD3.1) と比較するこ

とによって多型を探索した。また, 上流域約1.4kbの多型探索は, PCR産物から4つのプライマーで得られた配列データのうちQualityスコアが40以上の部位を用いてアライメントし, 3個体以上でカバーされた領域の配列データをUMD3.1と比較して行った。また, エクソン1, 2およびその周辺で検出された多型については, 関連解析用集団260頭の型判定も行った。

### 2.3 既存3 SNPsの型判定

RBP4c.237C>G, c.355+26C>Tおよびc.\*50A>Gの型判定を関連解析用集団について、3種のプライマーセットを用いて行った (Table 3, Fig. 2)<sup>14, 15</sup>). PCRは、エクソン1と2に対するものと同じ条件で行った。得られたPCR産物をシーケンスし、決定した塩基配列に基づいて各SNPの型判定を行った。

### 2.4 統計解析

関連解析用集団の各多型の型判定結果に基づいてグループ分けした。各ジェノタイプ間の枝肉形質の平均値差をエクセルの分析プログラムを用いて分散分析およびダンカンの多重比較検定を行い、各種枝肉形質とRBP4多型との関連を調べた。

## 3. 結果と考察

RBP4のエクソン1と2およびその周辺に位置する多型を探索したところ、イントロン1に位置するindel (c.-19+21delG) が検出された (Fig. 1)。多型探索用集団における各ジェノタイプ頻度は、G/G型とG/del型がそれぞれ0.913と0.087で

あり、del/del型は検出されなかった。各アレル頻度は、Gアレルが0.957であり、delアレルが0.043であった (Table 4)。このindelと各種枝肉形質との関連を調べるために、関連解析用集団260頭を型判定した。関連解析用集団における各ジェノタイプ頻度は、G/G型：0.896、G/del型：0.10、del/del型：0であり、各アレル頻度はGアレル：0.948であり、delアレル：0.052であった。そこで、各種枝肉形質について、G/G型とG/del型間の平均値差を検定したところ、G/del型の枝肉重量が有意に低いことが示された (P = 0.05)。また、いずれの集団においてもHardy-Weinberg平衡に従っていた (Table 4)。このことから、この多型は子牛死亡に関連していないことが示唆された。

次に、関連解析用集団176頭の解析が終了しているRBP4c.237C>G, c.355+26C>Tおよびc.\*50A>Gについて追加個体84頭の型判定を行い、260頭の解析用集団として各種枝肉形質との関連を解析した。その結果、c.355+26C>Tの各ジェノタイプ間において、枝肉重量の平均値差に有意傾向が見られた (p = 0.08) (Table 5)。

Table 3 Primers for SNP genotyping

SNP	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
c.237C>G	F GAGAACTTCGACAAGGCTCG	438
	R ACACACGTCCCAGTTACTGC	
c.355+26C>T	F TCCGTCTCTTAAAGTCAGTGC	407
	R AGTTCTGGCTACTTACACACG	
c.*50A>G	F TTACAAGTACATCTAGCTGTCC	590
	R GCTAGAACAGACCGAAGGTC	

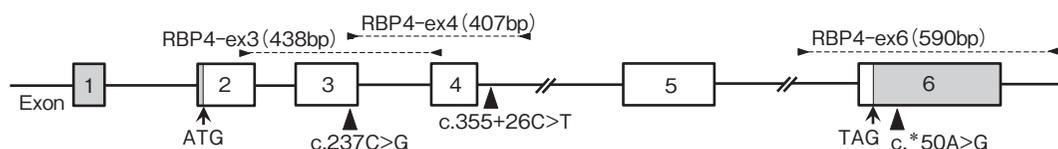


Fig. 2 Primers for genotyping of c.237C>G, c.355+26C>T and c.\*50A>G.

Boxes indicate exons, and filled triangles indicate each SNP position. ATG is initiation codon, and TAG is stop codon.

Table 4 Genotype and allele frequency of a new variant

SNP	Population	n	Genotype frequency (n)			HWE*	Allele frequency	
			G/G	G/del	del/del	P	G	del
c.-19+21delG (5'UTR)	Variation	69	0.913 (63)	0.087 (6)	0 (0)	>0.7	0.957	0.043
	Association	260	0.896 (233)	0.100 (27)	0 (0)	>0.3	0.948	0.052

\* : Hardy-Weinberg equilibrium test

Table 5 Association analysis between RBP4 and carcass traits

	genotype	n	CW (kg)	REA (cm <sup>2</sup> )	RT (cm)	SFT (cm)	YEP (%)	BMS
c.-19+21delG	G/G	233	466.00 ± 3.04	53.89 ± 0.57	7.58 ± 0.06	2.60 ± 0.05	73.33 ± 0.10	5.18 ± 0.11
	G/del	27	447.44 ± 7.63	51.93 ± 1.31	7.37 ± 0.14	2.77 ± 0.20	73.00 ± 0.30	4.96 ± 0.29
	del/del	0	—	—	—	—	—	—
	P		0.05	0.26	0.22	0.31	0.29	0.55
c.237C>G	C/C	81	469.16 ± 4.82	53.26 ± 0.82	7.57 ± 0.09	2.65 ± 0.09	73.14 ± 0.16	5.09 ± 0.20
	C/G	126	462.61 ± 4.02	53.37 ± 0.77	7.56 ± 0.07	2.60 ± 0.07	73.29 ± 0.14	5.14 ± 0.15
	G/G	53	459.76 ± 7.10	55.11 ± 1.37	7.54 ± 0.14	2.60 ± 0.13	73.52 ± 0.22	5.28 ± 0.23
	P		0.45	0.40	0.98	0.91	0.37	0.81
c.355+26C>T	C/C	34	479.80 ± 7.01	53.21 ± 1.14	7.70 ± 0.13	2.64 ± 0.11	73.09 ± 0.25	4.76 ± 0.30
	C/T	128	463.56 ± 3.58	53.64 ± 0.76	7.59 ± 0.08	2.55 ± 0.07	73.37 ± 0.14	5.05 ± 0.15
	T/T	98	459.28 ± 5.37	53.92 ± 0.93	7.47 ± 0.09	2.69 ± 0.09	73.26 ± 0.15	5.42 ± 0.17
	P		0.08	0.91	0.36	0.46	0.60	0.11
c.*50A>G	A/A	80	469.38 ± 4.88	53.33 ± 0.83	7.57 ± 0.09	2.66 ± 0.09	73.15 ± 0.16	5.10 ± 0.20
	A/G	129	463.18 ± 4.02	53.28 ± 0.75	7.57 ± 0.07	2.61 ± 0.07	73.28 ± 0.14	5.15 ± 0.15
	G/G	51	458.00 ± 7.02	55.29 ± 1.41	7.51 ± 0.14	2.58 ± 0.13	73.57 ± 0.23	5.25 ± 0.24
	P		0.37	0.33	0.90	0.86	0.30	0.88
4 polymorphisms Homozygous	G-C-C-A/G-C-C-A	17	471.88 ± 8.64 <sup>a,xy</sup>	52.24 ± 1.67	7.72 ± 0.20	2.59 ± 0.14	73.12 ± 0.37	4.59 ± 0.37
	G-C-T-A/G-C-T-A	16	487.13 ± 12.55 <sup>a,x</sup>	56.94 ± 2.09	7.76 ± 0.20	2.97 ± 0.21	73.23 ± 0.36	5.69 ± 0.49
	G-G-T-G/G-G-T-G	35	450.25 ± 9.05 <sup>c,y</sup>	55.11 ± 1.78	7.36 ± 0.17	2.64 ± 0.16	73.49 ± 0.28	5.54 ± 0.29
	P		0.04	0.34	0.23	0.36	0.71	0.12

a-c: p&lt;0.05

x-y: p&lt;0.01

c.-19+21delGのdel/del型個体は検出されていない。そこで、これら4多型の組み合わせによるRBP4遺伝子型と各種枝肉形質の関連を調べるために、c.-19+21delGがGアレルホモ型である個体のうち、その他3SNPsがホモ型である個体を選抜した。c.-19+21delG-c.237C>G-c.355+26C>T-c.\*50A>Gによる遺伝子型がG-C-C-Aホモ(17頭)、G-C-T-Aホモ(16頭)、G-G-T-Gホモ(35頭)の各種枝肉形質の平均値差を解析したところ、枝肉重量に有意差(P=0.04)が見られた。そこで、ダンカンの多重比較検定を行ったところ、G-C-C-A型(471.88±8.64kg)および

G-C-T-A型(487.13±12.55kg)はG-G-T-G型(450.25±9.05kg)よりも有意に高いことが示された(Table 5)。これらc.355+26C>Tと多型の組み合わせによる遺伝子型で示された結果は、176頭の関連解析用集団で得られたものと同様であった。

関連解析用集団260頭の平均枝肉重量は464.07±2.85kgであり、c.-19+21delGのdelアレルに負の効果が示唆された(Table 1, 5)。しかし、c.-19+21delGがGアレルを示すRBP4遺伝子型間で枝肉重量に差が見られたことから、このindelを含む4多型以外にRBP4機能に影響する多型の存在

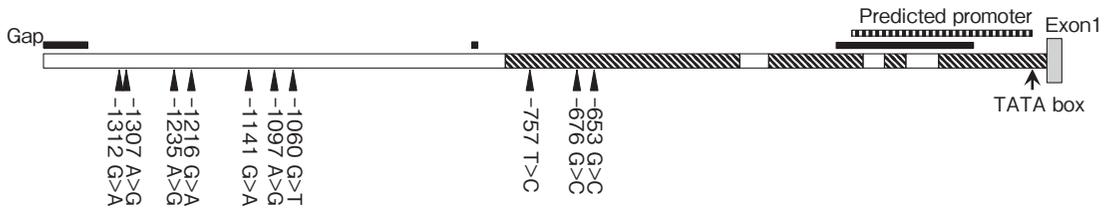


Fig. 3 Detected SNPs on the upstream region of *RBP4* gene.

Triangle indicates indicate SNPs, and each minus number indicate position counted from 5' end of exon1. ▨ : These regions indicate high homology with human genome. ▤ : The region was predicted as promoter by Promoter Scan (<https://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/>). ■ : These regions were not covered with at least three individuals.

が示唆された。

そこで、*RBP4*転写に影響する可能性がある遺伝子上流域の多型を探索した。エクソン1の5'末端から上流域3,094bpをカバーするように配置したプライマーのうち、エクソン1とその上流1,439bpを含む1,578bpを増幅するup4Fとup6Rによって多型探索用集団をPCRし、これらプライマーとup5Fとup6Fを用いて各PCR産物をシーケンシングした (Fig. 1)。up4Fとup6RのPCR産物から得られた配列データとエクソン1領域の多型探索で得られた配列データのQualityスコアが40以上の部位を用いてアライメントしたところ、3個体以上でカバーできた領域は1,165bp (81.0%)であった。これら配列データを用いて多型を探索したところ、10種のSNPが検出された (Fig. 3)。これらSNPsのうち、-653G>C、-676G>C、-757T>Cの3SNPsはヒトと相同性が高い領域に位置しているため、*RBP4*遺伝子発現に影響している可能性が示唆された (Fig. 3)。また、エクソン1の23bp上流から251bpは、TATA boxを含むプロモーター配列と予測された。しかし、この領域の67.7%は、3個体以上の配列データでカバーできていないGap部位に含まれるため、多型が探索できていない (Fig. 3)。そのため、このプロモーター領域を含むGap部位の多型を改めて探索するとともに、今回検出された多型が枝肉形

質と関連するかを解析する必要がある。

#### 4. 要 約

黒毛和種は脂肪交雑に優れた品種であり、脂肪交雑形成をさらに高めるために肥育中期のVA給与が制限されている。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ため、*RBP4*遺伝子の多型は枝肉形質に影響すると考えられた。我々は、これまでに黒毛和種のc.237C>G (エクソン3)、c.355+26C>T (イントロン4) およびc.\*50A>G (エクソン6) の3SNPsを検出した (既存3SNPs)。しかし、エクソン1、2とその周辺は配列データが得られず十分な多型探索が行えていない。関連解析用集団176頭におけるこれら3SNPsによる*RBP4*遺伝子型の解析で*RBP4*が枝肉重量と関連する可能性が示された。しかし、この*RBP4*と枝肉重量の関連はこれらSNPsによるものではなく、まだ検出されていない新規多型の影響によると思われる。そこで、改めてエクソン1、2およびその周辺の多型を探索したところ、イントロン1に位置するc.-19+21delGが検出された。このindelについて関連解析用集団260頭の型判定と既存3SNPsについて追加84頭の型判定を行い、各種枝肉形質との関連を解析したところ、

RBP4遺伝子が枝肉重量と関連する可能性が改めて示された。しかし、この関連は使用した4種の多型によるものではないと思われた。そこで、遺伝子上流域1,439bp位置する多型を探索したところ、10種のSNPsが検出された。今後、これら多型と枝肉形質との関連を調べる必要がある。

#### 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) Mizoguchi, Y., Watanabe, T., Fujinaka, K., Iwamoto, E., Sugimoto, Y. : Mapping of quantitative trait loci for carcass traits in Japanese Black (Wagyu) cattle population, *Animal Genetics*, **37**, 51~54, 2006.
- 3) Hirano, T., Watanabe, T., Inoue, K., Sugimoto, Y. : Fine-mapping of a marbling trait to a 2.9-cM region on bovine chromosome 7 in Japanese Black cattle, *Animal Genetics*, **39**, 79~83, 2007.
- 4) Setoguchi, K., Furuta, M., Hirano, T., Nagao, T., Watanabe, T., Sugimoto, Y., Takasuga, A. : Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate, *BMC Genetics*, **10**, 43, 2009.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) 肉牛大辞典飼育の基本から最新研究まで, 農分協, 2013.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 渭原博：レチノール結合蛋白-4, 生物試料分析, **34**, 354~358, 2011.
- 13) 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.
- 14) 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.
- 15) 平野貴, 原ひろみ, 半澤恵：黒毛和種におけるRBP4多型と枝肉形質の関連解析, 平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 34, 326~331, 2016.

豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚の  
他慢性呼吸器感染症への抗病性機構に関する研究および  
肉豚生産における抗病性育種豚の有効性に関する考察

Study of the anti-disease mechanism for chronic respiratory infections in  
Landrace pigs selectively bred for Mycoplasmal Pneumonia of Swine (MPS)  
resistance and the effectiveness of anti-disease breeding regarding pork  
production

佐久間 晶子<sup>1,2</sup>・吉野 淳良<sup>1</sup>・高橋 伸和<sup>1</sup>・野地 智法<sup>2</sup>・須田 義人<sup>3</sup>・麻生 久<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>宮城県畜産試験場, <sup>2</sup>東北大学大学院農学研究科, <sup>3</sup>宮城大学食産業学部)

Akiko Sakuma<sup>1,2</sup>, Jyunryo Yoshino<sup>1</sup>, Nobukazu Takahashi<sup>1</sup>,  
Tomonori Nochi<sup>2</sup>, Yoshihito Suda<sup>3</sup> and Hisashi Aso<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Miyagi Livestock Experimental Station, Miyagi, Japan, <sup>2</sup>Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University,

<sup>3</sup>Department of Food, Agriculture and Environment, Miyagi University)

Chronic respiratory infectious disease of swine happens in pig farms, causing severe economic damage. Mycoplasmal Pneumoniae of Swine (MPS) is the most common respiratory disease seen during slaughtering, and Porcine Pnueropneumonia (PP) occasionally makes pigs die suddenly. In a previous study, we recognized the possibility that our landrace pig breed (LA), which is resistant to MPS without needing an MPS vaccine, is also resistant to PP. In this study, we compared growth results, pathological lesions and immunological gene presence in lungs, and intestinal flora of LA vaccinated for MPS and PP (Cont.), LA unvaccinated for MPS (Non-MPSv), and LA unvaccinated for PP (Non-PPv). Additionally, we examined the economic viability of MPS resistance breeding method in LA.

Histopathologically, the inflammation in lamina propria scores and total microscopic lesion scores tended to be higher in Non-MPSv pigs than in Cont. and Non-PPv ( $p < 0.1$ ). However, all lung lesion scores in LA in this study were less than those in the general landrace pig breed in our previous study. Also, every group grew up satisfactorily and had similar intestinal flora. We also compared pork grading of 4 LA pigs with MPS lesions (MPS positive pigs) with 8 LA pigs with no MPS lesions (MPS negative pigs). In the grading results of MPS negative pigs, only high grade pork and middle grade pork was seen.

In conclusion, these growth and pathological results suggest that the LA breed grows up well and has less MPS related lesions without needing MPS or PP vaccines. In addition, the economic result also suggested that reducing the number of MPS pigs in pig farms increases the amount of high grade pork, which plays an important role in improving the profitability of pig farms.

## 1. 目 的

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、なかでも豚マイコプラズマ性肺炎（MPS：mycoplasmal pneumonia of swine）は、*Mycoplasma hyopneumoniae*（M.hp）により引き起こされ、と畜検査で最も多くみられる豚慢性呼吸器感染症である<sup>1-5</sup>。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<sup>6</sup>。一方で、我々は、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）の造成に成功している<sup>7,8</sup>。昨年度の調査で、LAと一般の無選抜ランドレース種（Cont.）をMPSワクチン未接種下で飼養したところ、LAはMPSワクチン接種の有無に関わらず、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<sup>9</sup>。さらに、LAは胸膜性肺炎（Porcine Pnueropneumonia：PP）に対しても抗病性をもつ可能性が示唆されている<sup>9</sup>。PPは、*Actinobacillus pleuropneumoniae*（App）により引き起こされる感染症であり、罹患した豚の多くは甚急性または急性の経過をたどり、死の転帰をとる症例が多く、Appは薬剤耐性菌も出現しやすいとされている<sup>10</sup>。

LA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た、MPS病変面積育種価が低い、ランドレース種系統豚であるが、PPおよびMPSワクチン未接種状態においても、細菌性呼吸器疾患に対する抗病性がLAで発揮されていれば、LAで行った、肉眼病変を指標とした抗病性育種方法は、家畜衛生学的側面から、一般養豚農家での実用性が高いだけでなく、公衆衛生的側面からも、薬剤耐性出現率の低減につながる可能性が示唆される。また、

LAの出生時からの腸内細菌叢安定時期を調査することは、肺炎病変との関与が示唆された腸内細菌との新たな知見につながる<sup>9</sup>。さらに、養豚業においては、豚を家畜衛生的側面からだけでなく、経営的側面からも精査することも重要であり、抗病性育種豚の導入による収益の増減を検討することは、とても重要である。

今回は、MPSおよびPPワクチン未接種状態下において、LAを肥育し、LAの呼吸器抗病性について病理学的・免疫学的に検証するとともに、肉豚生産的側面からも、LA抗病性育種方法の有効性を確認することを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 LAの腸内細菌叢推移調査

同腹出生のLA（4頭）を用いて、直腸便を出生時から離乳時まで採取し（出生時、1週齢時、3週齢時、5週齢時）、DNAを抽出後、T-RFLP法（株）テクノスルガ・ラボ）により腸内細菌叢の推移を調査する。

### 2.2 MPSおよびPPワクチン未接種下におけるLA肥育豚の抗病性調査

LA計12頭を用いて、MPSワクチン未接種群4頭（Non-MPSv）、PPワクチン未接種群4頭（Non-PPv）、両ワクチン接種群4頭（Cont.）を作成し、同一豚舎内で、抗菌性物質無添加の指定配合飼料を飽食させ、通常群飼肥育し、約6ヶ月齢（約115kg）で出荷した。発育調査として、一日平均増体量（DG）を前期期間（体重30～70kg）、後期期間（体重70～115kg）、全期間（30～115kg）で調査し、出荷体重と出荷日齢を比較した。

肥育開始時（12週齢目、Pre）と終了時（約149日齢、Post）で、採糞を行い、直腸便抽出DNAからは腸内細菌叢（T-RFLP法）を検査した。また、と畜検査時に肺を採取し、その肺を用

いてMPS肉眼病変スコアを測定した後<sup>9,11)</sup>、右肺中葉から、ホルマリン固定材料および生材料(RNA・DNA)を採取した。組織学的検索として、ホルマリン固定材料からパラフィン切片を作成し、HE染色後、組織病変の程度と出現度からスコア化した<sup>9,12)</sup>。さらに、肺パラフィン切片を用いてM.hp抗原への免疫組織化学染色(IHC)を行い、肺抽出DNAを用いてM.hp p36に対するPCRを行い、肺へのM.hp感染の有無を調査した。生材料は使用するまで-80度にて保管し、そこからtotal RNA抽出し、cDNA作成後、qRT-PCRにてIL-4、IFN- $\gamma$ のmRNA量を相対定量する(H遺伝子： $\beta$  actin)。

### 2.3 LA試験豚のMPS抗病性の肉豚生産成績に関する考察

供試したLA全頭の出荷成績(内臓検査結果、格付け成績)について、Cont.群、Non-MPSv群、Non-PPv群間で、MPS病変あり群となし群で、それぞれ比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 LAの腸内細菌叢推移調査

調査の結果は、Fig. 1に記載した。クラスター解析の結果、出生時(0週齢)から5週齢までのA群(主に0週齢から3週齢)とB群(主に5週齢)に大別できたことから、出生時から3週齢時までと、離乳後では腸内細菌叢が異なることが示された(Fig. 1)。

### 3.2 MPSおよびPPワクチン未接種下におけるLA肥育豚の抗病性調査

発育成績は、Table 1に記載した。Non-MPSv群、Non-PPv群で前期期間(体重30~70kg)では、一日平均増体量(DG)がCont.と比較して多かったが( $p < 0.05$ )、後期期間(体重70~115kg)では全群差がなく、すべての群で良好な発育となった。

病変調査の結果は、Fig. 2に記載した。肉眼検査結果で、PPを疑う所見(胸膜への線維素析出)がNon-PPv群の1頭のみに見られたが、MPSを疑う両側性肺の肝変化病変を呈する個体は、全群で散見された。肺内のM.hp抗原は、IHC、PCR

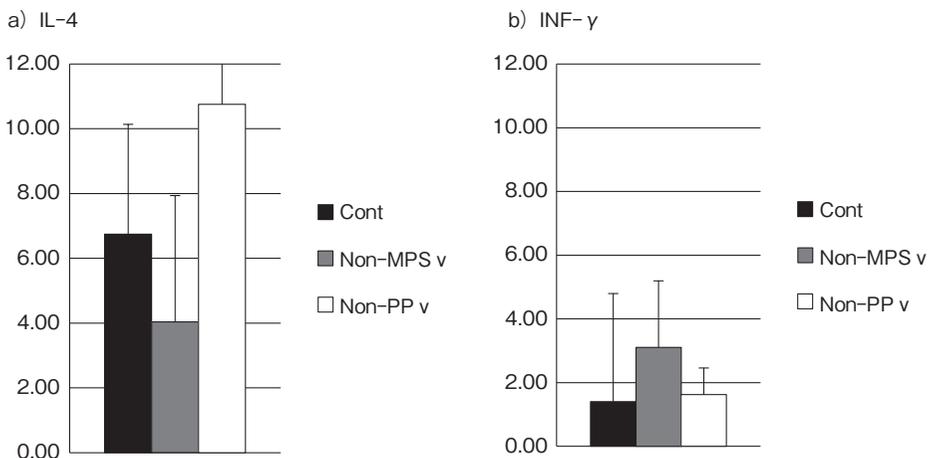


Fig. 1 Results of relative quantitation of real time PCR

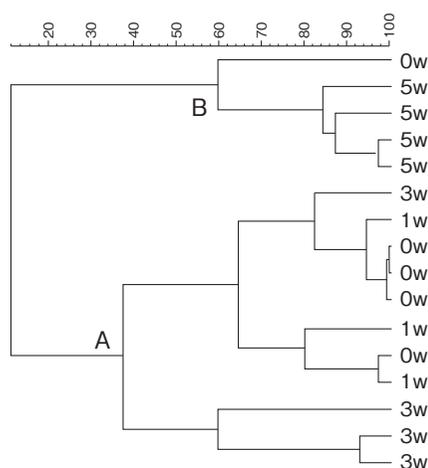
a) Amount of IL-4 in lungs,

b) Amount of INF- $\gamma$  in lungs,  $\beta$  actin was used as a housekeeping gene.

**Table 1** Results of growth, macroscopic and microscopic lesions in this study

Groups		Cont	Non-MPSv	Non-PPv
Growth results	DG during 30kg to 70kg (kg/day)	0.9±0.1 b	1.0±0.1 a	1.0±0.0 a
	DG during 70kg to a weight of slaughtering (kg/day)	1.0±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1
	DG during this study (kg/day)	0.4±0.0	0.5±0.0	0.5±0.1
	Age of slaughtering (days)	152.0±5.5	145.5±1.0	150.5±5.3
	Weight of slaughtering (kg)	107.5±8.6	113.0±0.6	110.9±5.1
the slaughtering inspections results	Number of MPS suspected pigs	3/4	2/4	3/4
	Number of PP suspected pigs	0/4	0/4	1/4
	Macroscopic MPS lesion area in lungs (%)	3.9±3.0	1.8±2.1	2.0±2.4
Microscopic Lung Lesion score	PCR of M.hp	0/6	0/6	0/6
	IHC of M.hp	0/6	0/6	0/6
	Alveolar Septal Infiltration	2.3±1.5	5.0±2.4	2.8±1.9
	Alveolar Exudate	0.0±0.0	1.3±2.5	0.3±0.5
	Peribronchiolar Lymphoid Hyperplasia	0.7±0.6	1.8±1.3	1.0±0.8
	Inflammation in Lamina Propria	0.3±0.5A	4.5±1.7B	2.5±3.0A
	Total Microscopic Lesion score	3.3±1.9A	12.5±6.0B	6.5±3.7A

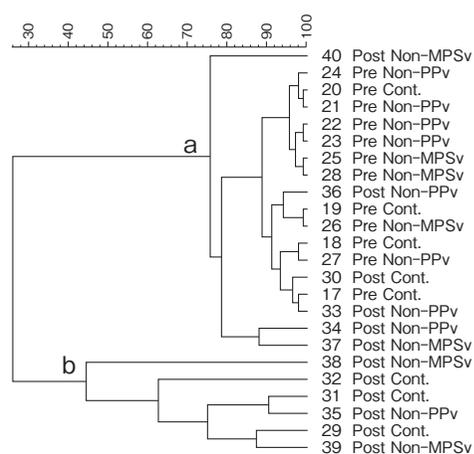
DG : Dairy gain per a day, a-b :  $p < 0.05$ , A-B :  $p < 0.1$



**Fig. 2** Result of cluster analysis of T-RFLP in study (1)  
W: weeks.

共に陰性だった。しかしながら、組織学的には肺および気管支関連病変が散見され、Non-MPSv群では気管支粘膜固有層への炎症細胞浸潤病変スコアや、組織総合病変スコアが多い傾向にあった ( $p < 0.1$ )。

肺のヘルパーT細胞1型 (Th1) およびヘルパーT細胞2型 (Th2) 関連サイトカイン遺伝子発現量を比較したところ、Cont.と比較して、Non-MPSv群で、IL-4 (Th2系サイトカイン) が



**Fig. 3** Result of cluster analysis of T-RFLP in study (3)

少なく、IFN- $\gamma$  (Th1系サイトカイン) が多い傾向にあり、対照的に、Non-PPv群では、IL-4が多く、IFN- $\gamma$ が少ない傾向がみられたが、有意な差は認められなかった (Fig. 2)。

腸内細菌叢の結果はFig. 3に記載した。調査の結果、大きくa群とb群に大別することができ、Pre時点ではすべての検体はa群に集約され (Fisher's exact test,  $p < 0.05$ )、Pre時点では、全群とも同様の腸内細菌叢を有していた。有意差

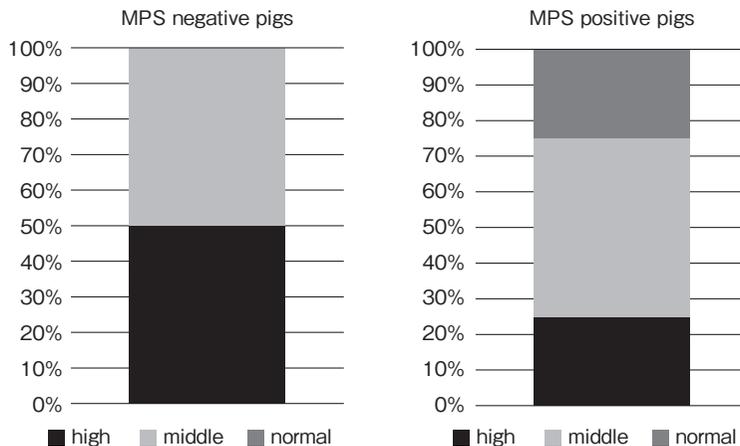


Fig. 4 Result of quality grading results of pork in this study.

There are 4 MPS negative pigs and 8 MPS positive pigs in this study by the slaughtering inspections.

はなかったものの、a群には、Post時点のCont.1/4頭、Non-MPS群2/4頭、Non-PP3/4頭が分類された。

### 3.3 LA試験豚のMPS抗病性の肉豚生産成績に関する考察

今回3.2の試験で調査した豚のうち、MPS病変があったLAは4/12頭であった。調査したLAのうちMPS病変あり群となし群で、背脂肪厚および格付け成績を比較した。背脂肪厚は、なし群で $1.9 \pm 0.24$ cm、あり群で $2.04 \pm 0.78$ cmとなり、有意差がなかったものの、あり群で背脂肪厚の結果となった。また、格付け成績では、MPS病変なし群はすべて「上」「中」と格付けされ、「並」とされた個体はいなかった (Fig. 4)。また、Cont.群、Non-MPS群、Non-PP群で格付け成績に有意な差はみられなかった。

MPSおよびPPワクチン未接種下におけるLA肥育豚の抗病性調査の結果から、LAはMPSワクチンおよびPPワクチン未接種条件下においても、発育成績、病変成績、格付け成績に、両ワクチン接種条件下と差がなく、良好な成績となった。

今回、Non-MPS群の肺ではCont.と比較して、

有意差はなかったものの、MPS肉眼病変面積、IL-4遺伝子発現量が少なく、組織病変、IFN- $\gamma$ 遺伝子発現量が多い傾向となった。Borjigin Lら (2016) は、MPS病変が一般ランドレース種と比較して少ないLAは、MPSワクチン接種により、血中内のIFN- $\gamma$ 量が増加する知見を得ている<sup>13)</sup>。これらの結果は、LAはMPSワクチン未接種でも、LBよりも肺局所で細胞性免疫を活性化させ、肉眼的にMPS病変が確認されないまでにM.hpに対抗できることを示唆している。

さらに、今回の腸内細菌叢の調査で、調査個体が異なるものの、出生時から3週齢目、5週齢目、12週齢目 (Pre)、出荷時 (Post) で、それぞれ腸内細菌叢が異なり、腸内細菌叢は、ワクチン接種の有無に関わらず、経時的に変化し続けることが明らかとなり、慢性疾患と腸内細菌叢の関係を調査するうえで重要な手がかりを得ることができた。

また、肉豚生産成績の結果から、MPS肉眼病変なし群では、背脂肪厚が薄く、格付け成績も上物率が多い傾向にあり (有意差なし)、農場におけるMPS罹患率を減らすことが、ワクチンや抗生物質等の医療費軽減に加えて、肉豚生産成績を

向上させることにもつながり、農家の収益性を向上させることが示唆された。

#### 4. 要 約

LAは、MPSワクチンおよびPPワクチン未接種条件下においても、発育成績、病変成績、格付け成績に、両ワクチン接種条件下と差がなく、良好な成績になることが分かった。また、養豚農場においてMPS罹患率を減らすことが、ワクチンや抗生物質等の医療費軽減に加えて、肉豚生産成績を向上させ、農家の収益性を向上させることが示唆された。

#### 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 mycoplasmal 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) Sakuma, A., *et al.*: Comparison of innate immune related molecules and an enteral environment between landrace pigs that have been selected for genetical resistance against mycoplasmal pneumonia of swine (MPS) and normal landrace pigs, *食肉に関する助成研究調査成果報告書*, 34, 266~271, 2016.
- 10) 石井康明, 井上勇, 小川信雄, 鈴木守編: 豚病臨床図説, 第1版, 240, 日本畜産振興会, 1985.
- 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) Borjigin, L., *et al.*: Immunogenic properties of Landrace pigs selected for resistance to mycoplasma pneumonia of swine, *Anim Sci J.*, 87, 321~9, 2016.

## 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（Ⅱ）

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

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）

Most Japanese pork brands are produced from three-way crossing and few from pure breeds. Because some original breeds were developed in closed-herd breeding systems, their genetic diversity should be considered. Therefore, we investigated the genetic diversity and genetic structure based on polymorphisms in 30 microsatellite loci in Tokyo X and Nakijin Agu. Tokyo X was developed using Berkshire (obtained from UK and Kagoshima separately), Duroc, and Beijing Black in 1997 as the first synthetic pig strain in Japan. In the phylogenetic tree based on the genetic distance of each pig, Tokyo X was related to Duroc and Berkshire but formed its own cluster. Even in the phylogenetic trees of each variety, Tokyo X was closely related to these two varieties, but independent from Meishan and Jinhua. In the pedigree information of Tokyo X, the ancestry varieties had almost the same contribution to each pig. However, in the DNA information of the current group, the number of ancestral groups that contributed to the current group was estimated to be 4, and the contribution of each ancestral group was greatly different among pigs. Nakijin Agu was maintained in three lines; although diversity was low in the lines with a small number of heads, overall diversity was maintained. In Nakijin Agu, because the observed heterozygosity value was higher than expected, mating to avoid inbreeding was performed. To maintain the original breeds of the pork brand, it was necessary to avoid inbreeding, and utilizing genetic marker information along with pedigree information was required.

### 1. 目 的

わが国において豚肉は食肉消費の約4割を占める重要な食肉である。量販店において通常の国産豚肉よりも高価格で販売されているのが銘柄豚肉である。銘柄豚として、現在約400ブランドが販売されており、その多くはランドレース（L）、

大ヨークシャー（W）、デュロック（D）による三元交雑豚であるが、TOKYO-X、かごしま黒豚、今帰仁アゲーなどのブランド豚肉は特定の系統、品種の純粋種によって生産されている<sup>1)</sup>。ここで、TOKYO-XはD、英国と鹿児島由来のパークシャー（B）および中国豚の北京黒豚（P）を基礎品種とし、1997年に認定された日本初の合成系

統トウキョウX (TX) を用いて生産された豚肉のブランド名である。また、三元交雑豚であっても、もとなる純粋種は閉鎖群育種によって造成された系統豚であるものも多い。

系統豚や希少品種は少頭数の繁殖豚で維持されており、年数が経過するに伴い近交度の上昇による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。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。しかし、今帰仁アグーなどの希少品種では血統の情報不足のため、血統情報に基づく交配管理が十分に行われておらず、近交度の上昇と繁殖能力の低下が危惧されている。

昨年度は、血統が詳細に判明しているTXについて、まず、維持群の血統情報と繁殖記録を用いて個体の近交係数を算出するとともに、近交度が繁殖能力に及ぼす影響を検討した<sup>2)</sup>。ついで、現有集団のDNAマーカーの遺伝子型を分析して、遺伝的多様性の状況を明らかにし、個体間の近縁係数とマーカーの近縁度との相関を明らかにした。その結果、TX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ことが示された。

今年度は、TXの基礎品種であるD、B、中国豚などについてDNAマーカーの遺伝子型を解析し、TXの遺伝的構造を明らかにする。一方、血統情報が不明な今帰仁アグー (NA) 集団についてDNAマーカーの遺伝子型を解析し、遺伝的多様性と遺伝的構造を明らかにする。

## 2. 方 法

### 2.1 材料

有限会社今帰仁アグーより繁殖豚79頭の耳片を

収集した。TXについては、前年度の解析に用いた、1991年から2014年までの血統情報および2014年繁殖集団72頭のマイクロサテライト30座位の多型データを使用した。なお、対照集団として、西洋系のL、W、D、Bと中国系の梅山豚 (M)、金華豚 (J) のマイクロサテライト30座位の多型データを用いた。

### 2.2 マイクロサテライト多型解析

DNAはNAの耳片からフェノール・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により目的領域を増幅した。PCR反応は Veriti96-Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) を用いて、予備変性94°C 5分間後、熱変性94°C 30秒、アニーリング30秒、伸長反応72°C 45秒を26サイクル行い、次いで最終伸長反応72°C 7分間とした。目的領域の増幅後、オートキャピラリーシークエンサーABI PRISM 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いて解析を行い、Gene Mapper Software 4.0 (Applied Biosystems) により遺伝子型を決定した。

決定した遺伝子型をもとに、GenAlEx6.5<sup>3)</sup> を用いて平均アレル数、有効アレル数、ヘテロ接合度の期待値および観測値、 $F_{IS}$  値および主座標分析を行い、FSTAT2.9<sup>4)</sup> を用いてアレリックリッチネスを算出した。Populations1.2<sup>5)</sup> を用いて個体間のDAS遺伝距離および集団間のDA遺伝距離の算出を行い、近隣結合法 (NJ法) により系統樹を作製した。Structure2.3<sup>6)</sup> を用いて、祖先集団数  $K = 1 \sim 15$  を想定し、各  $K$  について30,000回のBurn-in後、50,000回のMarkov chain Monte Carlo法を独立に20回試行した。得られた結果から、Structure Harvester0.6<sup>7)</sup> を用いて対数尤度および $\Delta K$ を算出し、Evannoら<sup>8)</sup> に従い最も妥当な分集団数を推定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 TXの遺伝的構造

TX, 西洋系および中国系の遺伝子頻度を用いて, 高次元データを低次元に集約する主座標分析を行ったところ, 28.9%の寄与率である第1主座標で中国系がその他の集団から独立し, 9.2%の第2主座標でLとWがその他の集団から分離し, 二次元上にTX, D, Bをまとまりとするグループが形成された。TXがDとBと同じグループを形成したことは, TXがこの2品種を基礎集団に含んでいたことの反映と考えられた。一方, TXのみを対象にした同様の分析では, 特定のまとまりは認められなかった。これは, 系統造成および維持において集団を均質化する交配が行われたためと考えられた。

個体間の $D_{AS}$ 遺伝距離にもとづくNJ系統樹では, TXはDおよびBと近隣に位置したが, 異なるクラスターを形成した。品種集団間での $D_A$ 遺伝距離にもとづくNJ系統樹はFig. 1のとおりであり, TXはDおよびBと同じクラスターに位置し,

中国系とは異なるクラスターを形成した。系統樹からもTXはDおよびBと近縁であることが示された。TXの基礎品種の一つPは, 華北型の在来種とB, 中ヨークシャーなどを基礎とする育成品種であり<sup>9)</sup>, 中南地区のMやJとは由来が異なるため, これらとの遺伝的距離が離れていたと考えられた。

全集団を対象にしたストラクチャー解析では, 最も妥当な分集団数は $K = 3$ のときで, TX, D, B集団が同一分集団を形成し, L, Wと中国系に分離した (Fig. 2)。ストラクチャー解析においても, 系統樹と同様に, TXはD, Bと同じ分集団に属した。

TXだけを用いたクラスター解析では, 最も妥当な祖先集団数は4であり, これはTXの基礎豚が4品種・系統から造成されているという血統情報と一致した。このときの個体ごとへの寄与率と血統情報に基づく基礎品種・系統の寄与率はFig. 3のとおりであった。上段がストラクチャー解析により算出された遺伝的寄与率, 下段が血統情報をもとに算出された遺伝的寄与率であり, 1本の

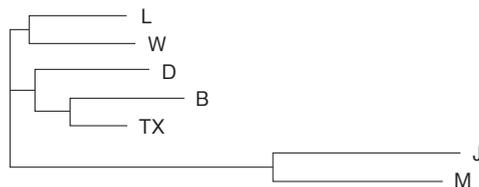


Fig. 1 Phylogenetic trees of seven populations constructed based on DA genetic distance (Tokyo X).

(L : Landrace, W : Large White, D : Duroc, B :  
Barkshire, M : Meishan, J : Jinhua, TX: Tokyo X)



Fig. 2 Clustering assignment of seven populations obtained by structure analysis (Tokyo X).

縦棒は各個体における祖先集団の寄与率である。血統情報をもとに算出された遺伝的寄与率は上からP, 鹿児島B, 英国B, Dを示しており, Dの寄与率が最も高かったが, 現集団の各個体に対する基礎豚の寄与率はほぼ一定であった。一方, 想定された基礎集団の現集団に対する寄与率は個体によって大きく異なっていた。血統情報では, 親世代の片親の対立遺伝子のいずれもが半分ずつ子世代に寄与するものとして寄与率を算出するが, 実際には一方の対立遺伝子だけが子世代に伝わることから, 実際の遺伝的構成はストラクチャー解析結果が示すように個体によって基礎集団の遺伝子頻度が異なると考えられる。したがって, 交配計画の策定にあたっては, 血統情報とともに遺伝子の多型情報を活用する必要がある。

### 3.2 今帰仁アグーの遺伝的多様性

供試動物としてTable 1の品種, 系統を用いた。有限会社今帰仁アグーにおいては沖縄県北部農林高校由来のAG (B), AG (R) および八重山由来のAG (W) は系統内で維持されており, それらの交雑群をAG (O) とした。アウトグループとして用いた西洋系のL, W, DおよびBは開放型育種集団であり, 中国豚のJとMは中国から導入されて以来閉鎖的に維持された集団であった。

マイクロサテライトを用いた多様性指数はTable 2に示した。全集団を通してマイクロサテライトマーカー30座位で合計279のアリルが検出され, マーカーごとのアリル数は6から17であった。集団ごとの平均アリル数は西洋系では3.10~4.87の範囲の値を示したのに対して, NAでは2.43~4.07であった。個体数に依存しない有効アリル

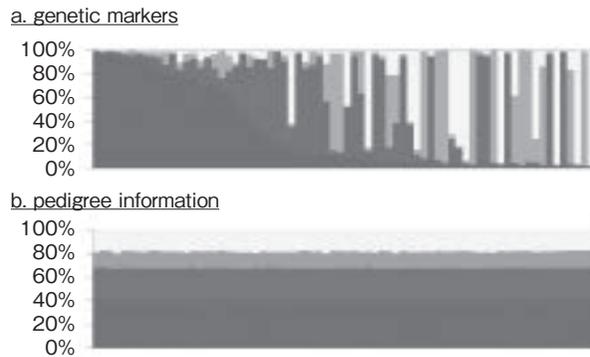


Fig. 3 Genetic contributions of base populations on present pigs in Tokyo X.

Table 1 Number of animals used for analysis of Nakijin Agu.

Breed	Line	Abbreviation	N
Nakijin Agu	B	AG (B)	6
	R	AG (R)	27
	W	AG (W)	9
	O	AG (O)	37
Landrace		L	30
Large White		W	30
Duroc		D	30
Barkshire		B	23
Jinhua		J	9
Meishan		M	23

Table 2 Genetic diversity within each population (Nakijin Agu).

Population	NA	MNA	ENA	AR	Ho	He	FIS
AG (B)	88	2.93	2.21	2.70	0.62	0.51	-0.20
AG (R)	120	4.00	2.66	2.92	0.66	0.61	-0.09
AG (W)	73	2.43	1.82	2.14	0.44	0.40	-0.09
AG (O)	122	4.07	2.93	3.11	0.74	0.65	-0.14
L	146	4.87	2.80	3.13	0.62	0.60	-0.02
W	140	4.67	2.82	3.08	0.61	0.60	-0.01
D	102	3.40	2.45	2.67	0.53	0.52	-0.01
B	93	3.10	2.19	2.42	0.49	0.47	-0.03
J	67	2.23	1.75	2.00	0.42	0.33	-0.23
M	84	2.80	2.09	2.37	0.51	0.47	-0.10

NA : number of alleles, MNA : mean number of alleles, ENA : effective number of allele-0.10es, AR : allelic richness, Ho : observed heterozygosity, He : expected heterozygosity, FIS : Wright's FIS

数は西洋系では2.19～2.82の範囲の値を示したのに対して、NAでは1.82～2.93であった。また、アレル数をサンプル数によって標準化した数値であるアレリックリッチネスは西洋系では2.42～3.13の範囲の値であったのに対して、NAでは2.14～3.11であった。NAではAG (W) は頭数も少なく多様性が低かったが、集団全体における多様性は西洋系と同程度の値を示した。大城ら<sup>10)</sup> はマイクロサテライト23座位を用いて、沖縄県内アグー (以下、県内アグー) 254頭の平均アレル数は4.35, その中の沖縄県畜産研究センターで維持されている (以下、畜研アグー) 35頭だけでは1.78と報告しており、NAは県内アグーと同程度の多様性を有していると推察された。

ヘテロ接合度の観測値は、西洋系では0.49～0.62の範囲であり、それぞれ期待値とほぼ同じ値を示したが、NAの観測値は0.44～0.66であり、それぞれ期待値よりやや高い値を示した。ヘテロ接合度の期待値および観測値から算出される集団の近親交配の程度を示すFIS値は西洋系ではほぼ0であったが、NAは-0.09～-0.20とすべて負の値を示した。これは、西洋系では集団内でほぼ無作為交配が行われていたのに対し、NAでは近親交配を避ける交配が行われていたためと考えられる。一方、畜研アグーではヘテロ接合度の観測値が期待

値よりも大きかったのに対して、県内アグーでは小さかったが、これは県内アグーがいくつかの集団からのサンプルであり、集団内で交配が行われていたためと推察されていた<sup>10)</sup>。

これらのことから、NAは3系統で構成されており、全体として多様性を維持しているものの、AG (W) の多様性がやや低いことから、今後、さらに近親交配を避ける交配を継続するように留意する必要がある。

#### 4. 要 約

わが国のブランド豚肉の多くは三元交雑により作出されているが、それらの原種豚の一部は系統豚や希少品種が用いられており、集団の遺伝的多様性の維持が課題となっている。そこで、トウキョウX (TX) と今帰仁アグー (NA) についてマイクロサテライト30座位の多型情報に基づく遺伝的多様性と遺伝的構造を明らかにした。TXはデュロック (D)、英国と鹿児島由来のパークシャー (B) および北京黒豚を基礎品種とする1997年に認定された日本初の合成系統である。個体ごとの遺伝距離に基づく系統樹では、TXはD、Bと近縁であるが独自のクラスターを形成した。品種ごとの系統樹でも、TXはこの2品種と近縁であり、梅山豚、金華豚とは離れていた。TXの

血統情報では祖先品種は各個体に対してほぼ同じ寄与率であったが、現集団のDNA情報ではその祖先集団は4と推定され、祖先集団ごとの寄与は個体により大きく異なっていた。NAは3系統に分類され、頭数が少ない系統では多様性が低いものの、全体では多様性が維持されていた。NAではヘテロ接合度の観測値が期待値よりも高く、近親交配を避ける交配が行われていることが推察された。ブランド豚肉の原種豚の維持にあたっては近親交配を避ける必要があり、血統情報とともに遺伝的マーカー情報を活用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、繁殖成績および血液を提供いただいた。また、有限会社今帰仁アグー

より繁殖豚の耳片をDNA抽出用サンプルとして提供いただいた。心より謝意を表する。

## 文 献

- 1) 食肉通信社：銘柄豚ハンドブック, 16, 食肉通信社, 大阪市, 2016.
- 2) 永井健一, 兵頭勲, 小嶋貞夫, 宇杉央, 野村こう, 高橋幸水, 古川力：日豚会誌, 53, 95~104, 2016.
- 3) Peakall, R., Smouse, P. E. : *Bioinformatics*, 28, 2537~2539, 2012.
- 4) Goudet, J. : *FSTAT*, Lausanne University, Lausanne, Switzerland, 2001.
- 5) Langella, M. : *Populations 1.2.30 : a population genetic software*, CNRS UPR9034, 1999.
- 6) Pritchard, J. K. : M. Stephens and P. Donnelly, *Genetics*, 155, 945~959, 2000.
- 7) Earl, D. A., vonHoldt, B. M. : *Conserv. Genet. Resour.*, 4, 359~361, 2012.
- 8) Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. : *Mol. Ecol.*, 14, 2611~2620, 2005.
- 9) 丹羽太左衛門：養豚ハンドブック, 養賢堂, 東京, 1994.
- 10) 大城まどか, 稲嶺修, 中村敏, 佐藤正寛, 石井和雄, 蝦名真澄：沖繩畜研研報, 44, 39~42, 2006.

# 黒毛和種で致死に関与するゲノムコピー数多型の探索

Reverse genetic screen for copy number variation associated with lethality  
in Japanese Black cattle

佐々木 慎 二

(公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所)

Shinji Sasaki

(Shirakawa Institute of Animal Genetics, Japan Livestock Technology Association)

Lethal phenotypes, such as embryonic mortality and neonate death, are a major source of economic loss in Japanese Black cattle. To identify copy number variation region (CNVR) associated with lethal phenotypes in Japanese Black cattle, we performed a reverse genetic screening. We aimed to identify loss-type CNVRs that included lethality-associated genes from 861 CNVRs using Ensembl gene set database and Mouse Genome informatics database. We identified 11 genes in 10 CNVRs that were associated with the lethal phenotypes between early embryonic stage and postnatal stage. Among them, the *MLLT4* gene in 19,107 bp loss type CNVR was genotyped in 1871 Japanese Black cattle. The frequency of the CNVR was 0.24% in the studied population. The results indicate that reverse genetic screening could be a useful procedure in detecting lethal phenotype-associated CNVRs in Japanese Black cattle.

## 1. 目 的

黒毛和種の生産現場では、胚死滅や子牛死亡など致死性の疾患による生産性の低下が問題になっている。原因となる遺伝的要因を特定するためには、致死個体のDNAを採材し、個体の遺伝子型と致死との関連を調べる必要があるが、致死個体のDNAの採材は極めて困難である。そこでまず、集団内の多数の個体の変異情報を収集し、変異が存在した遺伝子と致死との関連を調査する手法が有効と考えられる。そこで、遺伝子機能に大きな影響を与える多型の1つとして「1 kbから数Mbのゲノム領域の欠損や重複と定義されるゲノムコ

ピー数多型 (CNV)」を取り上げ、致死に関与するCNVの特定を試みた。解析は、1) CNV内に遺伝子が存在するか、2) 遺伝子機能の注釈が個体の生存に関わる遺伝子か、3) マウスオーソログの遺伝子改変マウスの表現型が「致死」であるか検索後、3) 黒毛和種集団で頻度調査を行いCNVと致死との関連を検討した。

## 2. 方 法

黒毛和種 1,481 頭を BovineHD BeadChip (Illumina社) で型判定をしたSNPデータを用い検出した861個のCNV領域 (CNVR) を検索に用いた<sup>1)</sup>。この中で、Ensemblの遺伝子セット

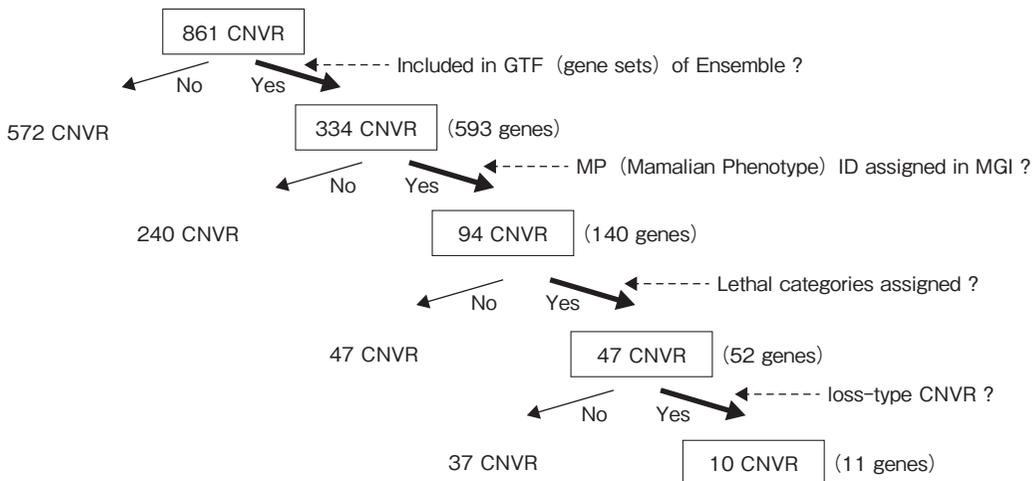
General Transfer format (GTF)<sup>2)</sup> で、CNVR内に遺伝子のエクソン部分が含まれるか検索した。CNVに遺伝子のエクソンが存在した場合、Mouse Genome Informatics (MGI) データベース (ジャクソン研究所)<sup>3)</sup> を用いて、マウスオソログの遺伝子改変マウスの表現型として致死と関連する注釈が付けられているか検索した。次に、CNVRの中で特に遺伝子機能の障害が想定される欠損型CNVRを選抜し、BovineHD BeadChipで型判定された1,871頭の黒毛和種集団で頻度調査を行った。

### 3. 結果と考察

861個のCNVRのうち、334個のCNVRに593個の遺伝子のエクソンが含まれていた (Fig. 1)。593個の遺伝子のマウスオソログについて遺伝子改変マウスの表現型をMGIデータベースで検索した結果、94個のCNVRに含まれる140個の遺伝子に表現型の注釈付けがされており (MP IDの付加)、その内、47個のCNVRに含まれる52個の

遺伝子について致死と関連する表現型の注釈が付けられていた (Fig. 1)。この内、10個のCNVRに11個の遺伝子が含まれていた (Table 1)。

11個の遺伝子は、マウスでは遺伝子が欠損すると発生初期に致死の遺伝子が3個、発生中期 (器官形成期) に致死の遺伝子が2個、出生直後に致死の遺伝子が3個、出生後に致死の遺伝子が3個含まれていた (Table 1)。このうち、*MLLT4* 遺伝子は、19,106bpの欠損型CNVR\_393に含まれ、発生期に細胞接着に関わり、遺伝子の欠損によって胎齢10日目で致死となることが報告されていた<sup>4,5)</sup>。そこで、CVNR\_393についてBovineHD BeadChipで型判定された1,871頭の黒毛和種集団で頻度調査を行った結果、0.24%であった。今回検索した集団では低頻度で黒毛和種において致死との関連を検討することができなかった。今後、頻度が高い集団で頻度調査を行うとともに、授精記録や子牛死亡サンプルを用いて、黒毛和種でCNVR\_393と胎子期の致死との関連を調査する予定である。また、他のCNVRについても引き続き頻度調査を



**Fig. 1** Results of screening procedure to identify loss-type CNVRs that included lethality-associated genes. In 861 CNVRs in detected in 1,481 Japanese Black cattle, 344 CNVRs that included 593 genes were detected using General Transfer format (GTF) of Ensembl database. Among them, 52 genes, orthologous to those of mice, in 47 CNVRs were categorized into lethal phenotype in Mouse Genome Informatics (MGI) database. Ten CNVRs included, which included 11 genes, were loss type CNVR.

**Table 1** Results of screening procedure to identify loss-type CNVRs that included lethality-associated genes.

CNVR_ID	Chr: Start-End (bp)	CNVR size (bp)	Gene Symbol	MGI description
CNVR_62	chr2:56690495-56744828	54,333	<i>LRPIB</i>	complete embryonic lethality
CNVR_106	chr3:40511241-40567792	56,551	<i>COL11A1</i>	complete neonatal lethality
CNVR_371	chr9:36934604-36951086	16,482	<i>HDAC2</i>	complete neonatal lethality
CNVR_393	chr9:103896317-103915423	19,106	<i>MLLT4</i>	complete embryonic lethality during organogenesis
CNVR_481	chr12:28400734-28424536	23,802	<i>PDS5B</i>	complete neonatal lethality
CNVR_640	chr17:9952569-9959315	6,746	<i>NR3C2</i>	complete postnatal lethality
CNVR_762	chr22:36315708-37194409	878,701	<i>ADAMTS9</i>	complete embryonic lethality between implantation and somite formation
CNVR_816	chr25:766584-785640	19,056	<i>LMF1</i>	postnatal lethality
CNVR_828	chr25:33321529-33352790	31,261	<i>GTF2I</i>	complete embryonic lethality
CNVR_873	chr28:30054567-30556761	502,194	<i>ADK</i>	complete postnatal lethality
CNVR_873	chr28:30054567-30556761	502,194	<i>VCL</i>	complete embryonic lethality during organogenesis

CNVR positions are based on the UMD3.1 assembly of the bovine genome

行い、CNVRと致死との関連を調査する計画である。加えて、ウシとマウスでは発生段階が異なるため、体節形成<sup>6~8)</sup>や性成熟の直前に迎える増体量の最高頂点速度期 (PHV)<sup>9)</sup>などを指標とし発生段階を比較検討することで、黒毛和種での致死時期について考察する予定である。

#### 4. 要 約

本研究は、致死に関連するCNVRを明らかにするため、黒毛和種1,481頭で検出された861個のCNVRのうち、マウスオーソログの遺伝子改変マウスの表現型が致死である遺伝子をMGIデータベースで検索した結果、発生初期から生後までの間の致死と関連する10個の欠損型CNVRとこれらのCNVRに含まれる11遺伝子を検出した。今後、頻度調査を行うとともに、授精記録や子牛死亡サンプルを用いてCNVRと致死との関連を調査することで、黒毛和種において致死に関連するCNVRを特定する予定である。致死との関連が認められるCNVRについては集団から排除することで生産性の向上が期待される。

#### 謝 辞

本研究は、公益社団法人畜産技術協会附属動物遺伝研究所杉本喜憲博士の協力のもと行われたこと、ここに感謝致します。

#### 文 献

- 1) Sasaki, S., Watanabe, T., Nishimur, S., Sugimoto, Y.: *BMC Genetics*, **17**, 26, 2016.
- 2) Ensembl ([[http://asia.ensembl.org/Bos\\_taurus/Info/Index](http://asia.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index)])
- 3) Mouse Genome Informatics ([<http://www.informatics.jax.org/>])
- 4) Zhadanov, A. B., Provance, D. W. Jr., Speer, C. A., Coffin, J. D., Goss, D., Blixt, J. A., Reichert, C. M., Mercer, J. A.: *Curr Biol*, **9**, 880~888, 1999.
- 5) Ikeda, W., Nakanishi, H., Miyoshi, J., Mandai, K., Ishizaki, H., Tanaka, M., Togawa, A., Takahashi, K., Nishioka, H., Yoshida, H., Mizoguchi, A., Nishikawa, S., Takai, Y.: *J Cell Biol*, **146**, 1117~1132, 1999.
- 6) Kaufman, M. H., Bard, J. B. L.: *The Anatomical Basis of Mouse Development* Academic Press, San Diego, USA, 1999.
- 7) Haldiman, J. T.: *Anat Histol Embryol*, **10**, 289~309, 1981.
- 8) Lopez-Rios, J., Duchesne, A., Speziale, D., Andrey, G., Peterson, K. A., Germann, P., Unal, E., Liu, J., Floriot, S., Barbey, S., Gallard, Y., Muller-

Gerbl, M., Courtney, A. D., Klopp, C., Rodriguez, S.,  
Ivanek, R., Beisel, C., Wicking, C., Iber, D., Robert, B.,  
McMahon, A. P., Duboule, D., Zeller, R. : *Nature*, 511, 46

~51, 2014.

9) 標準生理学, 第2版, 医学書院, 1990.

# 黒毛和種牛肉の美味しさに関わる遺伝子マーカーの 効果検証

Investigation on the effect of genetic markers for beef quality in Japanese  
Black cattle

笹崎 晋 史

(神戸大学大学院農学研究科)

Shinji Sasazaki

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

Oleic acid percentage (C18:1) is important for beef quality in term of the effect on beef palatability and our health. In the current study, we investigated the effect of previously reported DNA markers, SCD and SREBP1, on C18:1 in a Japanese Black population. In addition, we also investigated the effect of PLAG1 polymorphism (ss319607405), which is considered as a causative mutation affecting the bovine stature, on C18:1 in Japanese Black cattle.

We genotyped three polymorphisms, including A293V in SCD, 84bp in/del in intron5 of SREBP1 and ss319607405 in PLAG1 using 441 animals selected from a Prefectural population of Japanese Black cattle. Genotyping result and statistical analysis revealed that these three polymorphisms had significant effect on C18:1 ( $p < 0.01$ ) and the allele frequencies of favorable allele for C18:1 were 0.92 in SCD, 0.68 in SREBP1 and 0.53 in PLAG1. Moreover, the proportion of additive genetic variance in each marker were 3.59% in SCD, 7.54% in SREBP1 and 6.38% in PLAG1. These results suggested that these DNA makers would be useful for improvement of beef quality, but additional markers will be need for further breeding.

## 1 目 的

黒毛和種は、外国産の安価な牛肉との差別化を図るため脂肪交雑の向上が積極的に進められてきており、国際的にもその肉質が高く評価されている。しかし脂肪交雑は、牛肉の多汁性や柔らかさなどに関与するものの、粗脂肪含量が一定以上になると牛肉の旨味が低下することも報告されており、脂肪交雑の向上のみでは肉質の向上には限界がある。また近年の健康志向の高まりから、霜降り牛肉だけでなく脂肪交雑の高くない牛肉に対す

る需要も増えてきている。農林水産省の「酪農及び肉用牛生産の近代化を図るための基本方針」の中でも、適度な脂肪交雑を保ちつつも旨味に着目した指標研究や改良を進めることが奨励されている。また脂肪酸の種類の中でオレイン酸のようなモノ不飽和脂肪酸含有率が多い肉では風味・口解けが良いとされており、美味しさを決める大きな要因として脂肪酸組成があると言われている。以上の理由より近年我が国の黒毛和種牛肉市場では脂肪の量ではなく質つまり脂肪酸組成に着目されている。

脂肪酸はまず、アセチルCoAから炭素鎖の伸長反応が進められ、様々な長さの飽和脂肪酸として合成される。さらにそれぞれの飽和脂肪酸において炭素鎖間に二重結合が導入されることで不飽和脂肪酸の合成が進められる。我々は以前の研究において、その中の1つで飽和脂肪酸の不飽和化を促して不飽和脂肪酸を合成する酵素あるStearoyl-CoA desaturase (SCD) に着目して多型の調査を行った。結果、遺伝子の翻訳領域内にバリンからアラニンへのアミノ酸置換を検出し、この変異と一価不飽和脂肪酸との間に有意な関連が認められることを報告した<sup>1)</sup>。さらに、SCD遺伝子をはじめとする脂質代謝関連遺伝子に対して転写因子として働き、脂質代謝に影響を及ぼしていると考えられているSterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1) に着目した。多型探索によりSREBP-1遺伝子の第5イントロンに84bpのindel多型を同定し、黒毛和種において、本多型が一価不飽和脂肪酸と関連していることを報告した<sup>2)</sup>。また近年、黒毛和種において枝肉重量に対する責任変異であると考えられてきたPLAG1遺伝子の変異が脂肪酸組成に対しても関連がみられたことが報告された<sup>3,4)</sup>。

以上のように、これまでの先行研究において様々な遺伝子内の多型が調査され、脂肪酸組成との関連が報告されてきた。そこで本研究では、黒毛和種における脂肪酸組成の更なる改良のため、A県集団に焦点を当て、上記の多型の効果を検討するとともに、遺伝分散を推定することにより、これらのDNAマーカーを用いた際の育種改良の影響について調査した。

## 2 方法

### 2.1 供試動物

DNAマーカーの効果の検証のため、A県において2010年12月から2011年8月に出荷された496

頭のうち、同種雄牛の子が10頭未満である個体を除いた黒毛和種肥育牛441頭を供試した。本集団における平均出荷月齢は31.69ヶ月、オレイン酸含有率の平均はそれぞれ54.76%であった。DNAの抽出には屠殺後に採取した頸最長筋を使用した。また脂肪酸組成の測定のため、第6-7肋骨間の胸最長筋を採取した。

### 2.2 脂肪酸組成測定

脂肪酸組成はクロロフォルム・メタノール法による定法に従い胸最長筋内脂肪から脂肪酸を抽出し (Folchら1957), メチル化後 (O'Keefeら1968), ガスクロマトグラフG-3000 (HITACHI, 東京) を用いてオレイン酸含有率 (C18:1) を測定した。

### 2.3 遺伝子型判定

頸部筋肉組織から、フェノールクロロフォルム法による定法に従いDNAを抽出した。調査したDNAマーカーはSCD遺伝子のA293V<sup>1)</sup>, SREBP-1遺伝子イントロン中における84bpの挿入・欠失 (indel)<sup>2)</sup>, また黒毛和種において枝肉重量に対する責任変異だと考えられているPLAG1遺伝子の変異ss319607405<sup>3)</sup>の3つを用いた。これらのマーカーはPCR法またはPCR-RFLP法により遺伝子型を判別した。方法については各文献に従ったが、用いたプライマーの配列、PCRの反応条件、使用した制限酵素などについてはTable 1に示した。

### 2.4 統計解析

各マーカーのオレイン酸含有率に対する効果を調査するため、分散分析およびTukey-Kramerのhonestly significant difference (HSD) 検定を行った。解析においては遺伝子型、出荷年、性、種雄牛、月齢を要因とした。月齢は1次および2次回帰係数として考慮した。また、それぞれのマーカーの効果により説明される相加的遺伝分散の値を計算し、県集団全体の遺伝分散に対する割合を

**Table 1** Oligonucleotide primers and restriction enzymes used for genotyping

Gene	Primer (5'→3')	T <sub>m</sub> (°C)	Product size (bp)	Restriction enzyme
<i>SCD</i>	F : GTGGAAAAATCAGGTAGGTCTCAGCG R : CAAGCAAGACTACCACCCAGATCAG	60	569	<i>Aci</i> I
<i>SREBP-1</i>	F : CCACAACGCCATCGAGAAACGCTAC R : GGCCTTCCCTGACCACCCAACTTAG	65	432/348	—
<i>PLAG1</i>	F : AGAACTCACCGCGGGCTTTAACAT R : GGAGGAGCGCGGGGAAGG	65	346/340	—

F : forward primer R : reverse primer

**Table 2** Genotypic and allelic frequencies of three markers in Japanese Black population

Gene	Genotypic frequency			Allelic frequency	
	AA (n=405)	AV (n=36)	VV (n=0)	A	V
<i>SCD</i>	0.92	0.08	0	0.96	0.04
<i>SREBP-1</i>	LL (n=210)	LS (n=180)	SS (n=51)	L	S
	0.48	0.41	0.11	0.68	0.32
<i>PLAG1</i>	QQ (n=94)	Qq (n=276)	qq (n=71)	Q	q
	0.21	0.63	0.16	0.47	0.53

Q = (CCG)<sub>11</sub>, q = (CCG)<sub>9</sub>

示した。

### 3 結果と考察

#### 3.1 SCDおよびSREBP1マーカーの遺伝子型判定

これら2マーカーについては、これまでに黒毛和種における様々な集団で脂肪酸組成に対する効果が確認されている。本研究ではA県集団における効果を確認するため441頭の選抜した個体を対象に遺伝子型判定を行った (Table 2)。遺伝子型判定の結果、SCDマーカーについてはAA型が405個体、AV型が36個体であり、VV型の個体は観察されなかった。アレル頻度を計算したところAアレルの頻度が0.96となり、A県においては頻度に非常に偏りがみられることが分かった。また、SREBP1マーカーについては、LL型が210個体、LS型が180個体、SS型が51個体であり、アレル頻度を計算したところ、Lが0.68、Sが0.32と

なり、SCDよりも比較的遺伝子頻度が保たれていることが分かった。

#### 3.2 PLAG1マーカーの遺伝子型判定

これまで枝肉重量に対する責任変異であると考えられてきたPLAG1遺伝子多型 (マイクロサテライトss19607405) が脂肪酸組成に対しても効果を有するのかを確認するためSCDやSREBP1と同様に検証マーカーとして実験に加えた。本多型はCCGの繰り返し配列であり、11回繰り返しのものをQアレル、9回繰り返しのものをqアレルと表記している。441頭に対して遺伝子型判定を行った結果、QQ型が94個体、Qq型が276個体、qq型が71個体となり、アレル頻度はQが0.47、qが0.53となった (Table 2)。全国の黒毛和種を用いた過去の報告ではQの頻度は0.754であり、全国的にみるとA県ではqアレルの頻度が比較的高く、Qとqの頻度が同程度であることが明らかとなった。

**Table 3** Effect of DNA markers on oleic acid percentage in Japanese Black population

	Oleic acid percentage			P value (ANOVA)	%V <sub>A</sub> due to marker
	AA	AV			
SCD	54.97 <sup>a</sup> ±0.25	53.64 <sup>b</sup> ±0.48		0.0051	3.59
SREBP1	55.13 <sup>a</sup> ±0.31	54.44 <sup>b</sup> ±0.32	SS 53.34 <sup>c</sup> ±0.47	0.0002	7.54
PLAG1	53.59 <sup>a</sup> ±0.38	54.34 <sup>ab</sup> ±0.31	qq 54.98 <sup>b</sup> ±0.41	0.0085	6.38

%V<sub>A</sub> = proportion of additive genetic variance

a, b, c : Means with different superscript are significantly different between genotypes

### 3.3 3マーカーのオレイン酸含有率に対する効果と遺伝分散の推定

A県における3マーカーのオレイン酸含有率に対する効果を調査するため分散分析を行った(**Table 3**)。各マーカーにおけるオレイン酸含有率に対するP値はSCDで0.0051, SREBP1で0.0002, PLAG1で0.0085となり、いずれのマーカーも1%水準で有意な効果が確認された。また、TukeyのHSD検定により、各遺伝子型間の詳細な調査を行ったところ、SCDではAA型-AV型、SREBP1ではLL型-LS型-SS型、PLAG1ではQQ-qq型の間において5%水準での有意差が確認された。また、それぞれの最小自乗平均値を比較すると、SCDではAA型がAV型に比べて約1.33%、SREBP1ではLL型がSS型に比べて約1.79%、PLAG1ではqq型がQQ型に比べて約1.39%オレイン酸含有率が高いことが推定された。

次に、各マーカーにおける相加的遺伝分散の値を算出したところ、SCDで0.137, SREBP1で0.288, PLAG1で0.244となった。A県集団におけるオレイン酸含有率の遺伝分散は3.824と推定されており、すなわち各マーカーにより説明される遺伝分散の割合はSCDで3.59%、SREBP1で7.54%、PLAG1で6.38%であり、3マーカー全体では17.51%であると推定された。以前の他県集団を用いた研究において、本研究と同様にオレイ

ン酸含有率に対するDNAマーカーの検討を行ったところ、SCD, FASN, GHの3つマーカーにおいて効果が確認され、これらにより説明される遺伝分散の割合は約23%程度であることが報告されている<sup>5)</sup>。以上を踏まえると、現状として各県集団において明らかとなっているオレイン酸含有率に対する遺伝的要因はおよそ20%程度であると推測される。これまでに各集団において効果の認められたDNAマーカーはより肉質の良い牛肉生産に貢献するものであると考えられるが、今後もさらなる改良のために残りの遺伝的要因についての解明が期待される。

## 4 要 約

牛肉中脂肪に含まれるオレイン酸の含有率(C18:1)は肉質や食味性に関わる重要な形質である。本研究ではこれまでにC18:1に関わるとされてきた2つの遺伝子マーカーSCDおよびSREBP1についてその効果を調査した。さらに本研究では上記に加えて、これまでに牛の体高や体長の責任変異として報告されているPLAG1遺伝子の変異についてC18:1に対する影響を調査した。県集団441頭について遺伝子型判定を行い、C18:1に対する効果について統計解析を行ったところ、3マーカーとも1%水準で有意な効果が確認された。また、C18:1に対して好ましい方

のアリルにおける頻度はそれぞれSCDで0.96, SREBP1で0.68, PLAG1で0.53であった。さらにこれらマーカーにおける相加的遺伝分散の割合を計算したところ, SCDで3.59%, SREBP1で7.54%, PLAG1で6.38%であった。以上により, 上記の3多型はオレイン酸割合の向上に向けて選抜マーカーとしての効果が期待されるが, 今後もさらなる改良のために残りの遺伝的要因の解明が重要であることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 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*, **14**, 142~148, 2004.
- 2) Hoashi, S., Ashiba, 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.
- 3) Nishimura, S., Watanabe, T., Mizoshita, K., Tatsuda, K., Fujita, T., Watanabe, N., Sugimoto, Y., Takasuga, A. : Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the *PLAG1-CHCHD7* QTN for stature in Japanese Black cattle, *BMC Genetics*, **13**, 40, 2012.
- 4) Sasago, N., Abe, T., Sakuma, H., Kojima, T., Uemoto, Y. : Genome-wide association study for carcass traits, fatty acid composition, chemical composition, sugar, and the effects of related candidate genes in Japanese Black cattle, *Animal Science Journal*, **88**, 33~44, 2016.
- 5) Matsuhashi, T., Maruyama, S., Uemoto, Y., Kobayashi, N., Mannen, H., Abe, T., Sakaguchi, S., Kobayashi, E. : Effects of bovine fatty acid synthase, stearoyl-coenzyme A desaturase, sterol regulatory element-binding protein 1, and growth hormone gene polymorphisms on fatty acid composition and carcass traits in Japanese Black cattle, *Journal of Animal Science*, **89**, 12~22, 2014.

## 天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏 「長州黒かしわ」のDNA識別手法の確立

Establishment of a DNA-based discriminating method for Jidori “Chosyu-Kurokashiwa” genetically derived from “Kuro-Kashiwa”, a National Natural Treasure of Japan

伊藤 直弥<sup>1,3</sup>・関谷 正男<sup>1</sup>・佐藤 慎一<sup>2</sup>・大竹 剛<sup>2</sup>・都築 政起<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>山口県農林総合技術センター, <sup>2</sup>独立行政法人家畜改良センター, <sup>3</sup>広島大学大学院生物圏科学研究科)

Naoya Ito<sup>1,3</sup>, Masao Sekiya<sup>1</sup>, Shinichi Sato<sup>2</sup>, Tsuyoshi Ohtake<sup>2</sup> and Masaoki Tsudzuki<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Livestock Technology Research Department,

<sup>2</sup>National Livestock Breeding Center, <sup>3</sup>Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

The Kuro-Kashiwa (KRK) chicken is a National Natural Treasure of Japan originated in Yamaguchi and Shimane prefectures. The commercial meat-type brand chicken “Chosyu-Kurokashiwa (CK)” is produced by the mating of Yamaguchi-Kurodori (YK) males and Rhode Island Red (RIR) females. The YK breed has been established based on the four-way matings of KRK, Japanese Large Game (JLG), RIR, and White Plymouth Rock (WPR) breeds and maintained as a closed colony. Nowadays, it is required to distinguish the CK from the other brand chickens using DNA-based techniques. In the current study, we investigated haplotypes at the melanocortin-1 receptor (*MC1R*) gene and genotypes of the *SLC45A2* gene, along with the genotyping of 5 microsatellite markers on the Z chromosome, to establish the technique for DNA discrimination of CK from the other brand chickens. All in all, we used 414 blood samples collected from five native Japanese chicken breeds (KRK, JLG, Tomaru, Tosa-Jidori, and Yakido), three foreign breeds (WPR, Black Australorp, and Black Minorca), and two kinds of crossbreds (two-way matings of KRK and three-way matings of KRK), and investigated the differences in haplotypes at the *MC1R* locus and the genotype of the *SLC45A2* gene. In addition, we compared the allele sizes of 5 microsatellite markers among two native Japanese chicken breeds (KRK and JLG), three foreign breeds (WPR, RIR, and White Cornish), and three kinds of crossbreds (two-way matings of KRK, three-way matings of KRK, and YK), using 650 blood samples. As a result, we concluded that DNA discrimination of CK would be possible by establishing a parent stock that has the H2 haplotype at the *MC1R* locus, “silver” allele at the *SLC45A2* locus, and private alleles of KRK at three microsatellite loci on the Z chromosome.

## 1. 目 的

「長州黒かしわ」は、天然記念物「黒柏鶏（くろかしわ）」をもとにロードアイランドレッド (RIR)、軍鶏、ホワイトプリマスロック (WPR) を交配した黒柏四元交雑鶏を閉鎖群育種した雄系種鶏「やまぐち黒鶏（くろどり）」をRIRに交配したコマーシャル地鶏である<sup>1)</sup>。また、「国産銘柄鶏ガイドブック2011」（社団法人日本食鳥協会、2011）に掲載されている地鶏及び銘柄鶏の中で唯一「黒柏鶏」を交配に利用した地鶏である<sup>2)</sup>。

山口県の養鶏専門農協では、「長州黒かしわ」を最高級ブランドに位置付け、平成21年から生産・販売を開始している（商標登録5328087号、2009）。「長州黒かしわ」は山口県初のオリジナル地鶏として、平成22年度には県内の肉用鶏の生産団体、県養鶏協会および県で構成する「黒かしわ地どり振興協議会」が設立され、平成25年度に山口県初の統一ブランド「やまぐちブランド」として認証され、平成27年度には県産の特産物5銘柄「ぶちうまファイブ」に選出されるなど、県をあげての地鶏振興体制が整備される中で、首都圏や県内に販路を広げており、将来は10万羽生産を目指して関係者が一丸となって生産から販売まで取り組んでいる。

そのような中、比内地鶏や名古屋コーチンのような有名ブランド地鶏で行われている地鶏肉のDNA識別は、地鶏肉のブランド力の保持およびブランド価値の向上に繋がることから<sup>3)</sup>、「長州黒かしわ」においても生産羽数の増加に伴い確立が必要な技術の一つである。

そのため、関谷らは、黒柏鶏、RIRおよび軍鶏の比較によりZ染色体上の7つのマイクロサテライトDNAマーカー (*ABR0608*, *ABR1002*, *MCW0258*, *ABR1008*, *ABR0376*, *MCW0128*, *ABR0289*) 座位において黒柏鶏特有のアリルを

確認し、このアリルを保有する種鶏「やまぐち黒鶏」を作出することにより、「長州黒かしわ」のDNA識別技術が確立される可能性を報告している<sup>4)</sup>。

なお、羽色に関わる遺伝子のうち、メラノコルチン1受容体 (*MC1R*) および*SLC45A2*遺伝子には<sup>5-7)</sup>、品種により多型があることが報告されているが<sup>8,9)</sup>、筆者らはこのような表現型を支配する遺伝子についても黒柏鶏に品種特異性があることを確認しており（未発表）、黒柏鶏の特徴を有する種鶏を選抜することにより、「長州黒かしわ」のDNA識別技術の信頼性が向上する可能性が高くなると考えられる。

今回は、「長州黒かしわ」を他の品種と遺伝子レベルで識別する手法の確立を目的として、黒柏鶏特有のマーカー、*MC1R* 遺伝子型及び*SLC45A2*遺伝子型について、WPR、白色コーニッシュ (WC) およびやまぐち黒鶏等における保有状況の確認を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 供試鶏

本試験ではWC (商用鶏A雄10羽)、WC (商用鶏B雄10羽)、WPR (商用鶏A雌10羽)、WPR (商用鶏B雌10羽)、広島大学で保有している蜀鶏 (とうまる) (16羽)、土佐地鶏 (10羽)、八木戸鶏 (16羽)、オーストラロップ (16羽)、ミノルカ (16羽)、山口県農林総合技術センター畜産技術部で保有している黒柏三元交雑鶏の第4世代 (雄31羽)、やまぐち黒鶏の第2世代 (雄143羽、雌112羽) を用いた。また、黒柏鶏特有のDNAマーカー、*MC1R* 遺伝子型および*SLC45A2* 遺伝子型の比較に際しては、2013年に得られた結果 (黒柏鶏 (39羽)、RIR (29羽)、黒柏二元交雑鶏 (72羽)、軍鶏 (833系、16羽) ならびに黒柏三元交雑鶏の第2世代 (168羽)) を併用した。なお、やまぐち

黒鶏については、近交退化の抑制を目的とした系統更新のため、2003年、2011年および2015年に3つの系統を作出しているが、2003年および2011年に作出した系統は世代更新により黒柏鶏特有の遺伝子を保有していなかったことから、本研究では2015年に作出した系統のみを用いた。

※黒柏三元交雑鶏：黒柏鶏の雄をRIRの雌に交配させ作出した黒柏二元交雑鶏の雌に軍鶏(833系)の雄を交配させ作出 (Fig. 1)

※やまぐち黒鶏：WPR (981系) の雌に黒柏三元交雑鶏の第3世代を交配させ作出 (Fig. 1)

## 2.2 *MC1R*, *SLC45A2*およびマイクロサテライトDNAの多型調査

### a) *MC1R*および*SLC45A2*

血液より抽出したDNAをテンプレートに用いてPCRを行った。独自に設計した*MC1R*および*SLC45A2*遺伝子のforwardおよびreverseプライマー、ならびにKOD FX NEO酵素 (Takara) を

用いた。PCR条件は、熱変性94℃10分、次いで98℃10秒、アニーリング60℃30秒、エクステンション68℃60秒を35サイクルであった。PCR産物をPCR Purification Kit (QIAGEN) を用いて精製した後、3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により、両遺伝子の塩基配列を決定した。得られた塩基配列に対し、BioEdit version7.1.3ならびにMEGA6 version6.0を用いて解析を行った<sup>10,11)</sup>。

### b) マイクロサテライトDNA

供試鶏の血液からフェノールクロロホルム法<sup>12)</sup>により抽出し20ng/ $\mu$ lに調整したDNAをテンプレートに用い、Table 1に示した10マーカーをPCR法により増幅した。

PCRに際してはforwardおよびreverseプライマーをそれぞれ6.25pmol, dNTPを0.2mM, MgCl<sub>2</sub>を2mM, BIOTaq™ HS DNA polymerase (Bioline, Taunton, MA, USA) を0.375Uとし、合計15 $\mu$ l

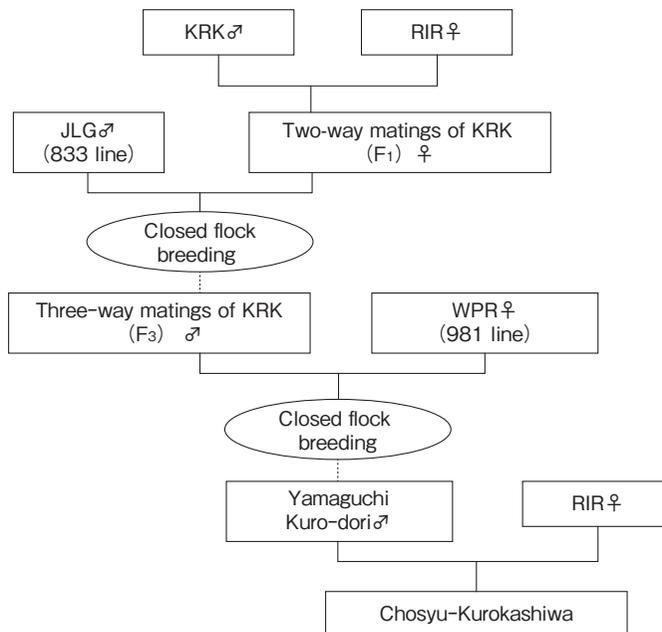


Fig. 1 Mating scheme of Chosyu-Kurokashiwa

※ KRK = Kuro-Kashiwa, RIR = Rhode Island Red, JLG = Japanese Large Game, WPR = White Plymouth Rock,

で反応させた。PCR反応条件は、熱変性を94℃で10分、その後95℃を30秒、アニーリングを55℃で30秒、伸張反応を72℃で30秒を35サイクル繰り返

し、最後に72℃で5分間保持した。PCR後、自動DNAシーケンサー (ABI3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて各

**Table 1** Microsatellite markers used in the current study

Marker	Chr.	Position (Mb)	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')	References
<i>ABR0608</i>	Z	8.8	GCAGGAAGGTTACAGAAAG	TTGGCAATAGCTTCAAAACA	Rikimaru and Takahashi (2007)
<i>ABR1002</i>	Z	13.1	TAGGAAAGATGCCCGATAAAA	CAAGGGTTGGGAATGTAGTGA	Rikimaru and Takahashi (2007)
<i>ABR1008</i>	Z	29.4	GGGCTCTTTAGACAACACTCAC	ATCAATATGAAGGCAGTTACAAGA	Rikimaru and Takahashi (2007)
<i>ABR0376</i>	Z	43.2	AGGGTATGGATGTCTTACTA	CACAAAGTTCCTGAATAATA	Rikimaru and Takahashi (2007)
<i>ABR0289</i>	Z	64.6	TTCTCAAACGTTAAGGTCCAC	AACTCCCACTCCACCACAAC	Rikimaru and Takahashi (2007)

**Table 2** Haplotypes at the *MC1R* locus found in the current study

Allele	Haplotype	Nucleotide position										
		69	212	274	376	398	427	636	637	645	834	
<i>e<sup>++</sup></i>	H0-1	Nucleotide	c	t	g	g	t	a	a	c	a	c
		Amino acid	Asn	Met	Glu	Val	Leu	Thr	Ala	Arg	His	Asn
<i>e<sup>+</sup></i>	H0-2		-	-	-	-	-	-	g	t	-	-
			*	*	*	*	*	*	*	Cys	*	*
<i>E</i>	H1		t	c	a	-	-	-	-	-	-	-
			*	Thr	Lys	*	*	*	*	*	*	*
<i>E</i>	H2		t	c	a	-	-	-	g	t	-	-
			*	Thr	Lys	*	*	*	*	Cys	*	*
<i>E</i>	H3		t	c	a	-	-	-	-	t	-	-
			*	Thr	Lys	*	*	*	*	Cys	*	*
<i>E or E<sup>R</sup></i>	H4		-	-	a	-	-	-	-	-	-	-
			*	*	Lys	*	*	*	*	*	*	*
<i>E or E<sup>R</sup></i>	H5		-	-	a	a	-	-	-	-	-	t
			*	*	Lys	Ile	*	*	*	*	*	*
<i>E<sup>Rf</sup></i>	H6		-	-	-	-	a	-	-	-	-	t
			*	*	*	*	Gln	*	*	*	*	*
<i>e<sup>b</sup></i>	H7		-	-	-	-	-	-	-	-	c	-
			*	*	*	*	*	*	*	*	Pro	*
—	H8		t	c	a	-	-	-	-	-	c	-
			*	Thr	Lys	*	*	*	*	*	Pro	*
<i>e<sup>wh</sup></i>	H9		-	-	-	-	-	g	-	-	-	-
			*	*	*	*	*	Ala	*	*	*	*

マーカーのタイピングを行った。

### 3. 結果と考察

本試験で区分した*MCIR*遺伝子型をTable 2に、黒柏鶏、蜀鶏、八木戸鶏、オーストラロープ、黒色ミノルカ、土佐地鶏およびWPRの*MCIR*遺伝子のハプロタイプおよび*SLC45A2*遺伝子型の結果をTable 3に示した。

*MCIR*遺伝子座は、11番染色体上に存在する黒色拡張遺伝子座 (extended black ; *E* 遺伝子座) と同義である。*E* 遺伝子座における対立遺伝子の優劣順位は、*E* (黒色拡張) > birchen ( $E^R$  : かば色) > dominant Wheaten ( $e^W$  : 優性コムギ色) > Wild type ( $e^+$  : 野生型) > partridge ( $e^b$  : 褐色) > speckled ( $e^S$  : 頭部斑紋) > buttercup ( $e^{bc}$  : バターカップ) > recessive wheaten ( $e^v$  : 劣性コムギ色) となっている<sup>13)</sup>。さらに、それぞれのアレルには品種特異性があることが報告されている<sup>5)</sup>。また、*SLC45A2*遺伝子座は、Z染色体上の*ABR0608*

(8.8Mb) と *ABR1002* (13.1Mb) の間の10.0Mbに位置し、鶏の銀笹羽装 (Silver型) と赤笹羽装 (野生型) の発現に関与することが報告されている<sup>9)</sup>。

本研究では、黒柏鶏における*MCIR*遺伝子のハプロタイプはH 1型が0.05、H 2型が0.95であった。黒柏三元交雑鶏における*MCIR*遺伝子のハプロタイプはH 2型が0.52、H 3型が0.48であり、*SLC45A2*遺伝子はすべてSilver型を示した。黒柏四元交雑鶏における*MCIR*遺伝子のハプロタイプはH 2型が0.56、H 3型が0.12であり、*SLC45A2*遺伝子はSilver型が0.62、野生型が0.38であった。蜀鶏は、黒柏鶏より大型であり長鳴性を示すものの、両品種ともに黒色羽装をもつために、両者の外観による判別は難しいとされているが<sup>14)</sup>、蜀鶏の*MCIR*遺伝子のハプロタイプは、黒柏鶏とは異なるH 1、H 5およびH 6型を示すとともに、*SLC45A2*遺伝子も黒柏鶏とは異なる野生型を示した。「国産銘柄鶏ガイドブック2011」

Table 3 Haplotype frequencies at the *MCIR* locus and genotype frequencies of the *SLC45A2* gene in each chicken population

Breed	Feather color	<i>MCIR</i> (E) locus											<i>SLC45A2</i> (S) locus		
		n	H0-2	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	n	Silver type	Wild type
Tosa-Jidori	BBR* (Wild type)	10	1.00	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	1.00
Toumaru	Black	15	-	0.40	-	-	-	0.07	0.53	-	-	-	10	-	1.00
Yakido	Black	16	-	-	-	0.84	-	-	-	0.13	-	0.03	No data		
Black Australorp	Black	16	-	-	1.00	-	-	-	-	-	-	-	10	1.00	-
Black Minorca	Black	16	-	0.43	-	-	-	-	0.44	-	0.13	-	10	-	1.00
WPR (981 Line)	White	16	-	-	0.09	-	0.06	-	-	0.84	-	-	10	0.20	0.80
Kuro-Kashiwa	Black	39	-	0.05	0.95	-	-	-	-	-	-	-	30	1.00	-
Yamaguchi Kuro-dori (F <sub>2</sub> )	Black	255	-	-	0.56	0.12	-	-	-	0.32	-	-	255	0.62	0.38
Three-way matings of KRK (F <sub>4</sub> )	Black	31	-	-	0.52	0.48	-	-	-	-	-	-	31	1.00	-

\*BBR = Black Breasted Red

に掲載されている「地鶏及び銘柄鶏の交配様式」の項目に掲載のある黒色を有する鶏種の中で、近江黒鶏の交配に活用されているオーストラロープは、*MC1R*遺伝子のハプロタイプにおいて黒柏鶏と同じH2型を保有していた。なお、オーストラロープは、*SLC45A2*遺伝子も黒柏鶏と同じSilver型を示した。

黒柏三元交雑鶏の第2世代の雄40羽、雌128羽において、Z染色体上にある黒柏鶏特有の7つのマイクロサテライトDNAマーカーすべてを有し

ていたのは雄2羽、雌15羽であったことから、本研究では7マーカーのうち5マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp), *ABR1008* (285 bp), *ABR0376* (156 bp), *ABR0289* (289 bp)) について調査を進めた。これら5つのマイクロサテライトDNAマーカーをすべて保有するものは黒柏鶏および黒柏二元交雑鶏の雌のみであり、黒柏二元交雑鶏の雄における5マーカーのアリル頻度は0.500であった (Table 4)。軍鶏を黒柏二元交雑鶏に交配させた黒柏三元交雑鶏においては、黒

Table 4 Allele frequencies at each marker locus on the Z chromosome in each chicken population

Makers (Alleles, bp)	Position (Mb)	Current study							Past study (Sekiya <i>et al.</i> , 2013)					
		Yamaguchi Kuro-dori (F2)	Yamaguchi Kuro-dori (F2)	Three-way matings of KKK (F4)	WC (A)	WC (B)	WPR (A)	WPR (B)	Kuro- Kashiwa	RIR	JLG	Two-way matings of KKK (F1)	Two-way matings of KKK (F1)	Three-way matings of KKK (F2)
		♂	♀	♂	♂	♂	♀	♀	♂	♀	♂	♂	♀	♂ ♀
<i>ABR0608</i>	8.8													
(197)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.15	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(203)		0.06	0.02	0.03	0.75	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	0.00	0.00	0.33
(213)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.10	0.00	0.02	0.00	0.00
(214)		0.21	0.45	0.00	0.10	0.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(220)		0.69	0.46	0.97	0.00	0.25	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.48
(222)		0.03	0.07	0.00	0.15	0.05	1.00	1.00	0.00	0.90	0.50	0.48	0.00	0.18
(224)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>SLC45A2</i>	10.0													
Silver type		0.68	0.46	0.98	0.90	0.85	1.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.45
Wild type		0.32	0.55	0.02	0.10	0.15	0.00	1.00	0.00	1.00	1.00	0.50	0.00	0.55
<i>ABR1002</i>	13.1													
(256)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.02
(348)		0.95	0.99	0.89	0.40	0.25	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.48
(353)		0.00	0.00	0.00	0.60	0.15	1.00	0.00	0.00	1.00	0.09	0.50	0.00	0.11
(356)		0.05	0.01	0.11	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.78	0.00	0.00	0.24
(358)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13
(359)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.60	0.00	0.00	0.00	0.00	0.13	0.00	0.00	0.01
<i>ABR1008</i>	29.4													
(276)		0.24	0.42	0.00	0.50	0.00	1.00	0.30	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(279)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	0.00	0.02	0.00	0.00
(280)		0.00	0.00	0.00	0.05	0.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(281)		0.23	0.13	0.14	0.45	0.05	0.00	0.00	0.00	0.76	0.52	0.48	0.00	0.45
(285)		0.53	0.45	0.86	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.44
(289)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.70	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(290)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.48	0.00	0.00	0.12
<i>ABR0376</i>	48.2													
(156)		0.42	0.29	0.59	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.42
(158)		0.00	0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(164)		0.40	0.32	0.31	0.00	0.00	0.80	0.00	0.00	0.24	0.40	0.19	0.00	0.27
(168)		0.18	0.39	0.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.76	0.60	0.31	0.00	0.32
(169)		0.00	0.00	0.00	1.00	1.00	0.20	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
<i>ABR0289</i>	64.6													
(271)		0.22	0.44	0.02	0.05	0.55	0.10	1.00	0.00	0.68	0.40	0.44	0.00	0.21
(273)		0.48	0.31	0.44	0.85	0.45	0.90	0.00	0.00	0.17	0.06	0.01	0.00	0.00
(276)		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(278)		0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
(283)		0.00	0.00	0.16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	0.00	0.00	0.29
(287)		0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.00	0.00	0.14	0.00	0.04	0.00	0.00
(289)		0.30	0.24	0.39	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00	0.00	0.00	0.50	1.00	0.36

柏鶏特有の5マーカーのアリル頻度は0.361から0.484と黒柏二元交雑鶏より低くなっており、5マーカーの遺伝子間で組み換えが起こっていることがうかがえた。また、WCや一部の鶏種のWPRにおいて、*SLC45A2*遺伝子はSilver型を保有し、黒柏鶏特有の2マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp)) を保有している個体も散見されたが、3マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp), *ABR1008* (285 bp)) を保有している個体は見られなかった。今回の調査結果において、*SLC45A2*遺伝子がSilver型を示し、黒柏鶏特有の3マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp), *ABR1008* (285 bp)) を保有する鶏種は、黒柏鶏、黒柏二元交雑鶏、黒柏三元交雑鶏およびやまぐち黒鶏のみであった。

また、黒柏鶏特有の5マーカー (*ABR0608*, *ABR1002*, *ABR1008*, *ABR0376*, *ABR0289*) は、Z染色体上において、それぞれ8.8, 13.1, 29.4, 43.2および63.4Mbに位置している (Table 4)。これらの遺伝子間の距離は54.6Mbと大きいために、やまぐち黒鶏が造成されるまでに遺伝子間で組み換えが起こることが予測された。実際にやまぐち黒鶏において、Z染色体上の後半に位置する *ABR0376*, *ABR0289* の黒柏鶏特有アリルの頻度は0.42, 0.30と低かった (Table 4)。一方、Z染色体上の前半に位置する *ABR0608*, *ABR1002*, *ABR1008* の3マーカーは、遺伝子間の距離が20.6Mbと短いために黒柏鶏特有のアリル型が1セットで遺伝することが予測された。やまぐち黒鶏におけるこれら3マーカーの黒柏鶏特有アリルの頻度は、それぞれ0.69, 0.95, 0.53であった (Table 4)。*SLC45A2* 遺伝子は *ABR0608*, *ABR1002* の2マーカー間に位置していた。やまぐち黒鶏において黒柏鶏が保有するSilver型の頻度が0.69であることから、黒柏鶏特有の5マーカーのうち、*ABR0608*, *ABR1002*, *ABR1008* の

3マーカーと*SLC45A2*遺伝子は品種識別に際し実用性が高いと考えられた。

以上の事実から、*MCIR*遺伝子はH2型を、*SLC45A2*遺伝子はSilver型を示し、黒柏特有の3マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp), *ABR1008* (285 bp)) を保有する雄系種鶏「やまぐち黒鶏」の造成を行うことにより、「長州黒かしわ」をブローラーや他の地鶏・銘柄鶏とDNAレベルで識別できる可能性は高いと考えられた。そのため、やまぐち黒鶏に対し、*MCIR*遺伝子のH2型、*SLC45A2*遺伝子のSilver型、ならびに黒柏特有の3マーカーに関し固定化を図ることにより、本技術を確立できることが示唆された。ただし、オーストラロープは、*MCIR*遺伝子はH2型、*SLC45A2*遺伝子はSilver型を示していたため、黒柏鶏特有の5つのマイクロサテライトDNAマーカーについては引き続き解析を実施する必要がある。

#### 4. 要 約

天然記念物「黒柏鶏 (くろかしわ)」をもとに開発された地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別を可能にするためには、*MCIR*遺伝子型はH2型を、*SLC45A2*遺伝子型はSilver型を保有し、黒柏鶏特有の3つのマイクロサテライトDNAマーカー (*ABR0608*, *ABR1002* および *ABR1008*) を保有する雄系種鶏「黒柏四元交雑鶏 (やまぐち黒鶏)」の固定化が必要と考えられた。

#### 引用文献

- 1) 関谷正男, 岡崎亮, 宮本和之, 野村利定, 藤本和正, 福坂一利: 黒柏を活用した県産オリジナル地どりの開発 (第1報) — 雄系種鶏「やまぐち黒鶏」の造成と実用地どりの開発一, 山口県畜産試験場研究報告, 第24号, 47~60, 2009.
- 2) 国産銘柄鶏ガイドブック2011, 社団法人日本食鳥協会, 東京, 2011.
- 3) Rikimaru, K., Takahashi, H.: A Method for Discriminating a Japanese Brand of Chicken, the

- Hinai-jidori, Using Microsatellite Markers, *Poultry Science*, **86**, 1881~1886, 2007.
- 4) 関谷正男, 奥村友美, 都築政起:天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別の可能性の検討-, 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 103~107, 2014.
  - 5) Dávila, S. G., Gil, M. G., Resino-Talaván, P., Campo, J. L. : Association between polymorphism in the melanocortin 1 receptor gene and E locus plumage color phenotype, *Poultry Science*, **93**, 1089~1096, 2014.
  - 6) Gunnarsson, U., Hellström, A. R., Tixier-Boichard, M., Minvielle, F., Bed'hom, B., Ito, S., Jensen, P., Rattink, A., Vereijken, A., Andersson, L. : Mutations in SLC45A2 cause plumage color variation in chicken and Japanese quail, *Genetics*, **175**, 867 ~ 877, 2007.
  - 7) Hall, T. A. : BioEdit: user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95~98, 1999.
  - 8) 奥村友美, 大竹剛, 佐藤慎一, 新實竜也, 上本吉伸, 小林栄治: 黒色羽装の発現を制御するMC1R遺伝子の品種間における多様性, 日本家禽学会誌, **50**, 1~9, 2013.
  - 9) 大竹剛, 佐藤妙子, 國分洋一, 上本吉伸, 佐藤周史, 奥村友美, 小林栄治: 会津地鶏の5色羽装とSLC45A2遺伝子上の変異との関係, 日本家禽学会誌, **48**, 58~62, 2011.
  - 10) Kerje, S., Lind, J., Schütz, K., Jensen, P., Andersson, L. : Melanocortin1receptor (MC1R) mutations are associated with plumage colour in chicken, *Animal Genetics*, **34**, 241~248, 2003.
  - 11) Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S. : MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0, *Molecular Biology and Evolution*, **30**, 2725~2729, 2013.
  - 12) Sambrook, J., Russell, D. W. : Molecular cloning: a laboratory manual. 3<sup>rd</sup> ed, Cold Springs Harbor Laboratory Press, New York, 2001.
  - 13) 若杉昇: 遺伝と育種, 新編畜産大辞典 (田先威和夫監修), 第一版, 株式会社養賢堂, 1066~1067, 1996.
  - 14) カラー版日本鶏外国鶏, 家の光協会, 2004.

## 優良肉用家畜増産のための受精卵移植の基盤となる 高品質卵子の選抜

Selection of high quality egg for embryo transplantation to produce high-quality meat livestock

眞 鍋 昇

(大阪国際大学人間科学部)

Noboru Manabe

(Department of Human Sciences, Osaka International University)

Many primordial ovarian follicles are present in the ovary of farm animals. Part of them grows at every sexual cycle and more than 99% of them die during ovulation process. The aim of the present study is to select the high quality oocytes for embryo transplantation of farm animals with high-quality meat.

Less than 1% of primordial ovarian follicles are developed and ovulated, and the remainders are eliminated *via* atresia. The traditional endocrinology-mechanisms involved in ovarian follicle development and growth have been characterized, but the precise mechanisms involved in the regulation of ovarian follicle selection remain unknown. Our recent findings indicate that apoptosis in the granulosa cells of ovarian follicles plays a crucial role in the oocyte and ovarian follicle selection. Notably, cell death ligand and cell death receptor systems including apoptosis inhibiting receptors and their intracellular signaling are the key mechanisms regulating granulosa cell apoptosis. In the present study, we revealed detailed mechanisms of granulosa cell apoptosis regulated by death ligand and receptor systems and their signaling pathways. Moreover, the roles of apoptosis inhibitory receptor [decoy receptor 3 (DcR3)] and intracellular signaling inhibitors [cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) and X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)], which are useful to assess the damaged oocytes and ovarian follicles and/or healthy oocytes and ovarian follicles and to produce high quality health embryos for transplantation, were revealed. We develop novel method to pick up high quality oocyte in ovarian follicle with the help of the inhibitory system assessment.

### 1. 目 的

申請者は、20年以上にわたって哺乳類の卵子が休眠後減数分裂を再開して発育成熟する過程で99%以上を選択的に死滅させてしまうことで不都合な卵子を取り除くことの調節機構を分子生物学

的に解明してきた。その結果、排卵に至る健常な卵胞と閉鎖されて消滅する卵胞との判別の指標となる可能性が高い分子をあげることができるようになってきた<sup>1,2)</sup>。本研究は、これまで遂行してきた卵胞とそれに内包される卵子を選択して死滅させる分子制御機構を解明する研究の成果を活用

して、肉用家畜として優良な遺伝子資源をもつ雌家畜の高品質な卵子を選抜して受精卵移植するための技術基盤を確立することを目的とした。すなわち、死滅すべき卵胞とそれに内包される品質が劣る卵子を判定して排除し、残りの排卵に至る卵胞に内包される高品質の卵子を積極的に救命して受精卵を生産して受精卵移植に供する技術システムを開発しようとするもので、学術的に独創的であり、かつ社会に貢献する意義深いものである。

## 2. 方 法

家畜の卵巣を食肉処理場にて入手し、実体顕微鏡下に卵胞を個別に切り出した後、個々の卵胞から顆粒層細胞を調製した。卵胞液中のプロゲステロン濃度とエストラジオール濃度をELISA法にて測定し、これらの比が15以下の卵胞を健常とした。卵胞別に顆粒層細胞におけるアポトーシス阻害因子 [decoy receptor 3 (DcR3), cellular FLICE-like inhibitory protein long form (cFLIP-1) およびX-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP)] の発現調節因子の探索とそれらを調節する分子機構の解明を進めた。

健常に発育している卵胞の顆粒層細胞に高発現しているcFLIP-1, XIAPおよびDcR3が、急速に消滅すると卵胞閉鎖が誘導される。これらの消滅を調節している機構は未解明である。cFLIP-1, XIAPおよびDcR3のmRNAをup-regulateあるいはdown-regulateする因子の探索の最初のステップは、不死化培養顆粒層細胞 (JC-410細胞) を用いて進めた。これは、ブタの顆粒層細胞が不死化したものであるが、形質転換をしておらず、様々な顆粒層細胞の特性を保持している。この細胞と卵胞に対して成長因子・生存因子として働く因子を探索するためにサイトカイン、性腺刺激ホルモン、ステロイドホルモンおよびアクチビン、インヒビン、フォリスタチン、増殖因子、プロス

タグランディン類、血管新生因子類、一酸化窒素などを添加して共培養し、これらのなかから候補因子の絞込を進めた。その結果、ブタやウシなどの完全性周期動物においては、最初に細胞を死滅させる作用が発見された腫瘍壊死因子 [tumor necrosis factor (TNF)  $\alpha$ ] が卵胞顆粒層細胞の増殖因子・成長因子・生存因子として働いていることが分かった。申請者は、完全性周期動物の卵胞顆粒層細胞においてはTNF 2型受容体のみが発現していることを報告している<sup>1)</sup>。TNF 2型受容体は、アポトーシス・シグナルを伝達するのではなく細胞増殖シグナルを伝達する。しかしながら不完全性周期動物である齧歯類ではアポトーシス・シグナルを伝達するTNF 1型受容体が発現していることも分かっている<sup>1, 2)</sup>。培養細胞を用いた実験では、TNF  $\alpha$  がアポトーシス・シグナル阻害因子のcFLIP-1, XIAPおよびDcR3の発現をup-regulateすること、そしてTNF  $\alpha$  の発現はinterleukin-6 (IL6) によってup-regulateされていることなどが分かった。

これらの知見を道標としてアポトーシス・シグナル阻害因子cFLIP-1, XIAPおよびDcR3の発現を支配的に制御しているマスター因子の同定を目指した。cFLIP-1とcellular FLICE-like inhibitory protein short form (cFLIP-s) とがスプライシングバリエーションであることを確認したが、スプライシング過程がどのような調節を受けて各々のバリエーションが産生されているのか不明である<sup>1)</sup>。ブタのゲノムのcFLIP遺伝子の5'-側の転写開始コドンから上流にむかって順次核酸配列を読み進め、転写制御ドメインの解析を進め、これまでに予備的にFOXO3aなどの転写因子が転写制御していると思われる成績を得ている<sup>2)</sup>。

次いで上記のIL6-TNF  $\alpha$  -inhibitors軸がアポトーシス・シグナル阻害因子の転写をup-regulateする場合、あるいは未探索な因子が

down-regulateする場合にどのような転写制御因子およびその複合体が働いているのか解明を進めた。アポトーシス・シグナル阻害因子の発現を人為的に調節することで卵子の救命が可能か否かを確かめることで、阻害因子の生理作用の確認を進めた。これらは、卵子の品質を評価するマーカーとして役立つのみならず、アポトーシス・シグナル阻害因子の発現を人為的にup-regulateすることで食肉処理場で日々廃棄されている卵巣内の卵子（潜在的卵巣内卵子）を救命するのに役立つと考えられる。

食肉処理場で採取した家畜卵巣の卵胞腔をもつ3次卵胞において、顆粒層細胞でのアポトーシス・シグナル阻害因子のcFLIP-1, XIAPおよびDcR3のmRNAとタンパクがともに高発現している卵胞は、プロゲステロン濃度とエストラジオール濃度の比が15以下であったので健常であると判定できた。この3次卵胞から卵子を取り出して体外成熟培養に供した。卵核胞崩壊、第一極体の放出を指標として成熟した卵子に凍結精子を用いた体外受精を施した。受精した初期胚を体外で培養して2細胞、8細胞、桑実胚、胚盤胞までの発生と各ステージの胚の形態異常の判別およびハッチング能の有無を確認した。このようにして卵子の発生能と受精能を調べて初期胚の発生能の正常性を評価した。

### 3. 結果と考察

家畜やヒトを含む哺乳類の卵巣においては胎児期に第一減数分裂前期のディプロテン期で停止した卵子が顆粒層細胞に包まれた原始卵胞の状態では休眠している。性成熟に達した後、性周期毎に一定数が発育を開始する。卵胞内では顆粒層細胞が卵子を保育し排卵に至るが、卵胞の発育の過程で99%以上が閉鎖する<sup>1, 2)</sup>。

重要な家畜であり完全性周期動物である豚を用

いて卵胞閉鎖過程を形態学的に精査し、極初期に誘起される顆粒層細胞のアポトーシスが閉鎖の調節に深く関わっていることを示し、この分子制御機構の解明を進めてきている。二次卵胞以降の顆粒層細胞にはtumor necrosis factor (TNF) familyに属するリガンド (TNF  $\alpha$ , TRAIL, FasL) とTNF受容体 (TNFR) familyに属する受容体 [TNFR-II, TRAIL受容体 (DR4, DR5, Ⅳ受容体1), FasL受容体 (Fas, Ⅳ受容体3, 可溶性Fas), リガンド不明受容体 (PFG-5)] が発現していることを見だし、併せてTNF  $\alpha$  /TNFR-II系は細胞増殖の亢進を担っていることを明らかにした<sup>1, 2)</sup>。これらの細胞死リガンドと細胞死受容体は、閉鎖卵胞のみならず、発育し続けている健常卵胞の顆粒層細胞でも発現していたので、細胞死阻害因子が存在すると考えた。細胞死阻害因子を探索した結果、卵胞の顆粒層細胞はミトコンドリアを介してシグナルが伝わるⅡ型アポトーシス細胞であることが分かるとともにⅣ受容体 (DcR3) と2種類の細胞内のアポトーシス・シグナル阻害因子 (cFLIP-1とXIAP) が存在することが判明した<sup>3-10)</sup>。

リガンドと結合した活性化受容体では受容体の細胞内ドメインであるdeath domain (DD) とアダプタータンパク (FADDやTRADD) のDDとが互いに介して結合する。このことで、アダプタータンパクにdeath effector domain (DED) を介してカスパーゼ-8前駆体 (カスパーゼは特異性の高いタンパク分解酵素で、下流の特定のタンパクだけを分解してシグナルを伝達する) が結合し、この前駆体が分解されて活性化する。Ⅳ受容体DcR3は受容体の細胞内ドメインが欠落しているのでアポトーシス・シグナルが伝達しない。免疫系等の多くの細胞では活性化カスパーゼ-8が直接下流のカスパーゼ-3前駆体を分解するが、卵胞の顆粒層細胞ではカスパーゼ-8がミトコン

ドリア外膜の透過性を調節するBidを分解することで活性化してミトコンドリアからチトクロームCを放出させる。このチトクロームCがApaf-1およびカスパーゼ-9前駆体と結合して複合体Apoptosomeを形成する。ここでカスパーゼ-9が活性化されてカスパーゼ-3前駆体を分解する。活性化したカスパーゼ-3がcaspase activated DNase (CAD) を活性化させることで活性化されたCADが核内に移行し、遺伝子DNAを分断する。このようにしてアポトーシスが実行されることを明らかにした<sup>3,4)</sup>。

健常卵胞顆粒層細胞ではFADDと結合してカスパーゼ-8前駆体との結合を阻害するcFLIPおよびカスパーゼ-9とカスパーゼ-3前駆体間のシグナル伝達を妨げるXIAPが発現していることを見いだした。これらの細胞内因子がアポトーシス・シグナルの伝達を阻止している (Fig. 1)。顆粒層細胞由来細胞で阻害因子を過剰発現させた場合、受容体依存性アポトーシスが阻害され、逆にRNA silencing法で発現を停止させると細胞は死滅した。阻害因子は、TNF  $\alpha$  とIL-6によって亢進することが分かった。リガンド・受容体結合

を阻害する囮受容体を含めてアポトーシス・シグナル阻害因子は卵子の品質を評価する指標として有用であると考えられた。

食肉処理場で採取した家畜卵巣の卵胞のうち卵胞腔をもつ3次卵胞において顆粒層細胞でのアポトーシス・シグナル阻害因子のcFLIP-1, XIAPおよびDcR3のmRNAとタンパクがともに高発現している卵胞は、プロゲステロン濃度とエストラジオール濃度の比が15以下であったので健常であると判定できた。この3次卵胞から卵子を取り出して体外成熟培養に供した。卵核胞崩壊と第1極体の放出を卵子の成熟の指標とし、成熟卵子に凍結精子を用いた体外授精を施した。受精した卵子(初期胚)を体外で培養して2細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞までの発生と各ステージの胚の形態異常の判別およびハッチング能の有無を指標として卵子の受精能および初期胚の発生能とその正常性を評価した。顆粒層細胞においてアポトーシス・シグナル阻害因子のcFLIP-1, XIAPおよびDcR3が高発現している卵胞から調製した卵子の体外成熟能と受精能は高かった。さらにこの卵子由来の初期胚の発生能は高く、発生した胚は正常

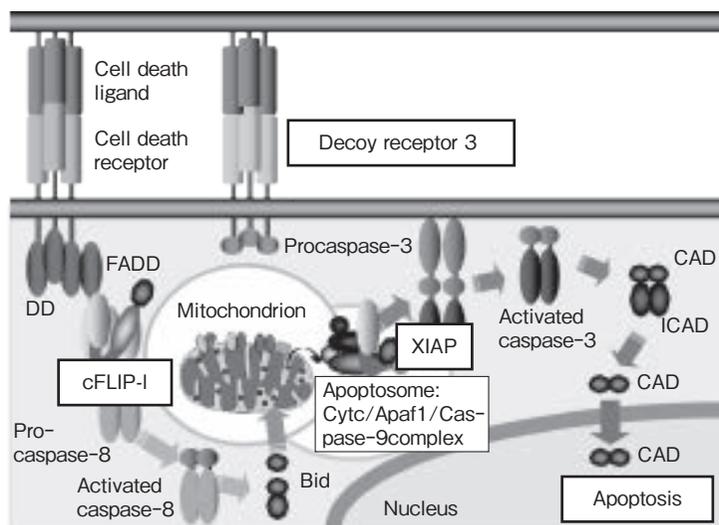


Fig. 1 家畜卵巣の顆粒層細胞におけるアポトーシス・シグナル伝達阻害因子 (cFLIP-1, XIAPおよびDcR3)

であった。

優秀な精子の遺伝子は、凍結保存・人工授精システムが一般化することで有効に利用されるようになってきている。しかし優秀な雌の遺伝子資源の有効利用は発展途上の段階にとどまっている。近年、生体内卵子吸引（経膈採卵）[ovum pick up (OPU)]によって得られた卵子を体外で培養し、授精後、受精卵移植（初期胚移植）によって産仔を得ることによって優秀な雌の遺伝子資源の有効利用が広まってきているが、従来から行われてきた食肉処理場で日々廃棄されている卵巣内の卵子（潜在的卵巣内卵子）を用いた受精卵移植も行われており、優秀な雌家畜の遺伝子資源の有効利用が進んでいる。アポトーシス・シグナル阻害因子の発現を指標として健全な卵子を選抜して体外培養・体外授精した後、受精卵移植するシステム<sup>8-10)</sup>を普及させることで、優秀な家畜の増産が一層亢進することが期待される。

#### 4. 要 約

本研究によって卵胞・卵子の死滅を調節しているアポトーシス・シグナル阻害因子を指標として家畜の卵子の品質を評価することで、体外成熟能と受精能の高い卵子の判別、およびその初期胚の発生能が高く正常胚率も高いことが分かった。生体内卵子吸引や食肉処理場にて廃棄される卵巣内卵子を用いた体外培養・体外受精・受精卵移植システムの高品質化と効率化が期待され、農業領域のみならず医療領域などを介して広く社会に貢献することも期待される。

#### 文 献

- 1) Matsuda, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S. : Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells, *Journal of Reproduction and Development*, **58**, 44~50, 2012.
- 2) Manabe, N., Matsuda-Minehata, F., Goto, Y.,

- Maeda, A., Cheng, Y., Nakagawa, S., Inoue, N., Wongpanit, K., Jin, H., Gonda, H., Li, J. : Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries, *Reproduction in Domestic Animals*, **43**, 268~272, 2008.
- 3) Sai, T., Goto, Y., Yoshioka, R., Maeda, A., Matsuda, F., Sugimoto, M., Wongpanit, K., Jin, H., Li, J., Manabe, N. : Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries, *The Journal of Reproduction and Development*, **57**, 421~427, 2011.
  - 4) Sai, T., Matsuda, F., Goto, Y., Maeda, A., Sugimoto, M., Gao, H., Mohammad, A., Kabir, A., Li, J., Manabe, N. : Effect of RNA interference of Bid and Bax mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells, *Journal of Reproduction and Development*, **58**, 112~116, 2012.
  - 5) Kominami, K., Nakabayashi, J., Nagai, T., Tsujimura, Y., Chiba, K., Kimura, H., Miyawaki, A., Sawasaki, T., Yokota, H., Manabe, N. : The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model, *Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Cell Research)*, **1823**, 1825~1840, 2012.
  - 6) Kominami, K., Nagai, T., Sawasaki, T., Tsujimura, Y., Yashima, K., Sunaga, Y., Tsuchimochi, M., Nishimura, J., Chiba, K., Nakabayashi, J., Koyamada, K., Endo, Y., Yokota, H., Miyawaki, A., Manabe, N. : *In vivo* imaging of hierarchical spatiotemporal activation of caspase-8 during apoptosis, *PLoS ONE*, **7** (11) : e50218. doi : 10.1371/journal.pone.0050218.
  - 7) Suzuki, C., Yoshioka, K., Yamada, M., Noguchi, M., Manabe, N. : Expressions of tumor necrosis factor- $\alpha$ , its receptor I, II and receptor-associated factor 2 in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy, *Veterinary Research Communications*, **38**, 1~10, 2014.
  - 8) Nakagawa, S., Maedomari, N., Kikuchi, K., Nagai, T., Miyano, T., Fulka, J. Jr., Manabe, N. : Rescue of vitrified fully grown and growing porcine oocytes by germinal vesicle transfer, *The Journal of Reproduction and Development*, **57**, 335~341, 2011.
  - 9) Việt, Linh, N., Kikuchi, K., Nakai, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Quangm, Dang-Nguyen, T., Somfai, T., Xuan, Nguyen, B., Nagai, T., Manabe, N. : Fertilization ability of porcine oocytes reconstructed from ooplasmic fragments produced and characterized after serial centrifugations, *The Journal of Reproduction and Development*, **59**, 549~556, 2013.
  - 10) Rátky, J., Egerszegi, I., Páble, T., Balogh, E., Manabe, N., Keonouchan, S., Brüssow, K. P. : Reproductive physiology in commercial and premium pig breeds, *Archives Animal Breedind*, **60**, 253~257, 2017.

# 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・高 木 優 二・保 地 眞 一

(信州大学繊維学部・農学部)

Seiji Takashima, Yuji Takagi and Shinichi Hochi

(Faculty of Textile Science and Technology and Faculty of Agriculture, Shinshu University)

Spermatogonial stem cells are a subpopulation of undifferentiated spermatogonia and the core of male reproductive system. In 2003, Kanatsu-Shinohara et al. established spermatogonial stem cell line termed germline stem (GS) cells. GS cells can expand under glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) stimulation. These cells can colonize the infertile testis, resume spermatogenesis, produce sperm, and restore fertility, even after 5-months of in vitro culture. Moreover, GS cells are susceptible for genome editing including gene trap mutagenesis, transfection, gene targeting technology, and CRISPR/Cas9 system. These properties led us to seek establishing GS cells from economic animals.

In this fiscal year's research, we tried to develop a method to purify spermatogonial cells from porcine testis and cultivation method of purified spermatogonial stem cells. It was confirmed that PSS-1 antibody selectively label porcine pre-spermatogonia, and that this antibody can be applied to cell purification by magnetic-activated cell sorting. We also tried to cultivate PSS-1<sup>+</sup> cells from neonatal porcine testes. Although PSS-1<sup>+</sup> cells were defeated by contaminating testicular somatic cells under standard culture condition for GS cells, serum reduction and/or MAP2K1 inhibitor PD0325901 permitted the survival and proliferation of PSS-1<sup>+</sup> cells.

## 1. 目 的

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り、げっ歯類ではすでに試験管内培養法が確立されている。胎児線維芽細胞で作成したフィーダー上、あるいは基底膜成分であるラミニンコートされたディッシュ上に、幼若個体の精巣細胞（体細胞、生殖細胞を

含む）を播種、自己複製促進因子であるGlial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) およびFibroblast growth factor 2 (FGF2) を添加し培養すると、精子幹細胞がぶどうの房状のコロニーを形成しながら選択的に増殖する。この細胞は試験管内培養後も精子形成能力を維持しており、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。この細胞は培養精子幹

細胞 (Germline Stem Cell : GS細胞) と命名され<sup>1)</sup>, マウスのほかラット, ハムスターで樹立に成功している<sup>2,3)</sup>。GS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<sup>4-6)</sup>。最近ではゲノム編集技術の応用も報告されている<sup>7)</sup>。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<sup>8,9)</sup>。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。

こうした背景から我々は, 豚精巣からのGS細胞樹立を試みてきた。これまでに, 豚精巣体細胞の増殖が激しく生殖細胞が培養過程で淘汰されてしまうこと, および, 豚幼若精巣中の精原細胞を標識し純化する技術の開発を進めてきた。今年度は, 精原細胞純化技術とその培養に関して進展があったので報告する。

## 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。三元豚の生後4~10日のものを使用した。譲渡された検体は, 冷却条件下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 豚精巣組織の免疫染色

得られた豚精巣組織をホルマリン固定し, パラフィンブロックを作製, 4  $\mu\text{m}$ 厚のパラフィン切片を作成した。脱パラフィン処理後親水化したのち, 定法に従って蛍光免疫染色を行った。切片を10%ヤギ血清でブロッキングしたのち, PSS-1抗体 (マウスモノクローナル抗体, 1/5000), およびウサギ抗UCHL1抗体 (Biogenesis, 1/300) で

4℃一晩インキュベートした。PBS(-)で洗浄後, Alexa Fluor488標識抗マウスIgG抗体 (Molecular Probes) およびCy3標識抗ウサギIgG抗体 (Chemicon) で染色, 蛍光観察を行った。

### 2.3 磁気分離法による前精原細胞の純化

得られた精巣の薄膜を除去しハサミで細切したのち, PBS (-)-EDTAの入った50mlコニカルチューブに入れボルテックス攪拌を行うことで精細管を遊離させ, ステンレスメッシュにより精細管を単離した。得られた精細管を4 mg/mlのパパインで消化し分散させ, シングルセルを回収した。得られた細胞を5%FCS添加のPBS (-)に分散させ, PSS-1抗体 (1/1000) と4℃で30分間反応させた。PBS (-)で細胞を3回洗浄後, Protein G結合フェライトビーズ (多摩川精機) と4℃で15分反応させた。細胞を15mlコニカルチューブに移し, 磁気スタンド (多摩川精機) で15分間静置し, PSS-1陽性細胞をチューブ側面に吸着させ, 陰性細胞を含む上清を取り除いた。この操作を2回繰り返したのち, PSS-1陽性細胞を回収した。得られた細胞はAlexa Fluor488抗マウスIgGで染色しPSS-1陽性細胞の純度を検証した。

### 2.4 豚精巣細胞の培養

基礎培地はIMDM培地にKnockout Serum Replacement (Invitrogen : KSR) を終濃度5%で添加したものを基本培地とした<sup>8)</sup>。この培地には, 各種栄養因子のほか, 増殖因子としてGDNF (10 ng/ml, Peprotech), FGF2 (10 ng/ml, Peprotech), 牛胎児血清 (0/0.1/1%, BioWest), およびMAP2K1/2阻害剤PD0325901 (0~3  $\mu\text{M}$ , Selleck) を添加した。得られた細胞は, マウス胎児線維芽細胞をフィーダーとして播種したディッシュ (24well), およびラミニンコートしたカバーガラス (直径15mm, 松浪ガラス) に $1 \times 10^5$  cells/wellで播種し37℃ 5%CO<sub>2</sub>条件で培養した。

### 3. 結 果

#### 3.1 豚におけるPSS-1陽性細胞の局在と性状解析

豚精巣細胞を抗原とするPSS-1抗体は、本研究グループのメンバーである高木優二博士が信州大学農学部で作製したマウスのモノクローナル抗体である。この抗体の抗原の精巣内局在を蛍光免疫染色で確認したところ、幼若豚精巣精細管内の細胞のうち、前精原細胞と思われる大型の細胞の細胞表面が特異的に染まっていた。この細胞が前精原細胞か否かを確認すべく既知の精原細胞マーカーUCHL1で共染色したところ、UCHL1陽性細胞の大半がPSS-1で標識されていた (Fig. 1)。このことは、PSS-1が豚前精原細胞を選別的に標識可能な抗体であることを強く示唆するものであった。

#### 3.2 幼若豚精巣からのPSS-1陽性細胞の純化

PSS-1抗体をもちいた磁気分離が可能かを検証した。酵素処理した幼若豚精巣細胞をPSS-1抗体で標識し、さらにフェライトビーズを結合させた

のち、磁気スタンドに静置することにより磁氣的に細胞をトラップした。磁気解放状態で遠心洗浄により細胞を回収し、蛍光免疫染色を行ったところ、90%以上の細胞がPSS-1陽性細胞であった (Fig. 2)。陽性細胞は陰性細胞と比較し、細胞のサイズがより大型であった。前精原細胞も大型であることから、PSS-1抗体による細胞選別が機能していることが示された。

#### 3.3 PSS-1陽性細胞の培養

得られた細胞の培養を試みた。定法に従い、1%FBS存在下、マウス胎児線維芽細胞フィーダー常に播種した場合、PSS-1陽性細胞は接着ししばらく生存したものの、混入したわずかな体細胞の増殖により淘汰されてしまった。そこで、接着基質をラミニンに変更し、血清濃度およびPD0325901の添加についても検討したところ、無血清条件下ではPSS-1陽性細胞が消失したものの、低血清条件 (0.1%)、あるいは1%FBS・1  $\mu$ M PD0325901条件下では体細胞の増殖が抑制され、PSS-1陽性細胞の分裂像が確認できた (Fig. 3)。ただし、その増殖速度は遅く、樹立には至

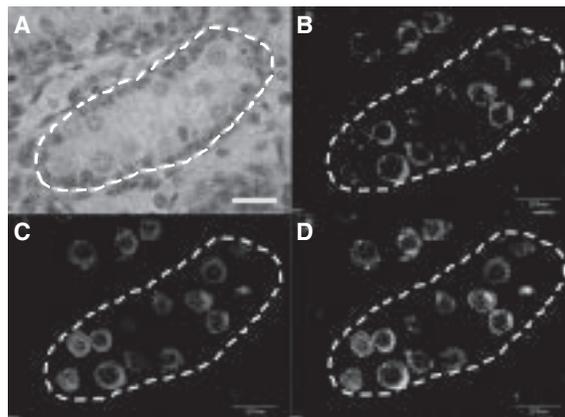


Fig. 1 Localization of antigen for PSS-1 mouse monoclonal antibody in neonatal porcine testis. (A) Hematoxylin/Eosin staining. (B) PSS-1 staining visualized by Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG. (C) UCHL1 staining visualized by Cy3-conjugated anti-rabbit IgG. (D) Merged image of B and C. Dotted line indicates the periphery of seminiferous tubule. Bar = 20  $\mu$ m.

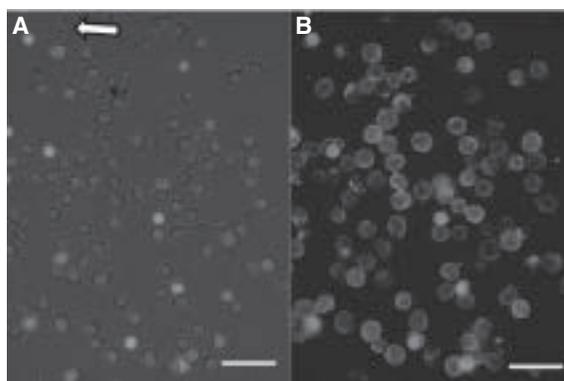


Fig. 2 PSS-1<sup>+</sup> pre-spermatogonia purified from newborn porcine testes. Testicular cells were incubated with PSS-1 antibody followed by magnetic activated cell sorting. Collected PSS-1<sup>+</sup> cells were further subjected to immunofluorescence to assess the purity. (A) Bright field image merged with images of staining with Hoechst 33342 (nuclei) and Propidium iodide (PI, nuclear staining specific for dead cells). (B) PSS-1 staining visualized by Alexa Fluor 488-conjugated anti-mouse IgG, merged with PI staining image. Arrow indicate PSS-1<sup>-</sup> cell. Bar = 50  $\mu$ m.

らなかった。

#### 4. 考 察

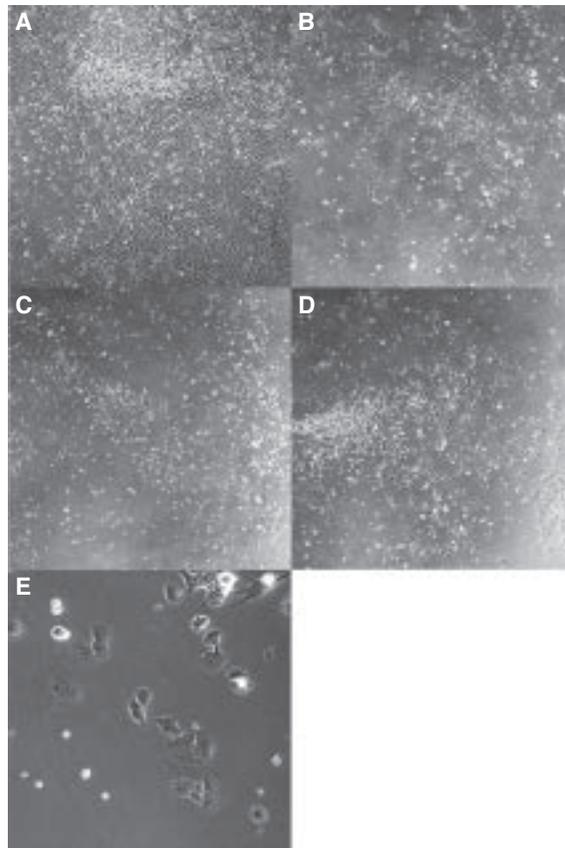
今年度は豚前精原細胞の純化法の開発を行い、これを培養に応用することを目指した。細胞の純化については、高木博士が作製したPSS-1抗体が豚前精原細胞を選択的に標識できることが判明し、磁気分離による細胞純化にも応用可能であることが確認できた。今後は新生仔豚だけでなく幼若～成獣個体でも応用可能かを検証したい。また、純化した細胞の培養についても、無血清条件あるいはPD0325901の添加が体細胞の増殖を抑制するとともに、PSS-1陽性細胞の生存・増殖を容認することも判明した。これらの条件を基盤として、培養条件を改良することで、豚GS細胞の培養が可能になると考えられる。

今後の課題としては、PSS-1細胞集団にわずかに混入する体細胞の除去法の確立、培地や接着条件の最適化があげられる。特に後者においては、「PSS-1陽性細胞の増殖を促進する」「体細胞の増殖を阻害する」ような培養条件が求められる。最

近京都大の篠原らはより安価な無血清培地の開発について報告している<sup>10)</sup>。彼らはさらに、GS細胞の自己複製に解糖系の活性上昇が必要であることを示し、これを促進する低分子化合物の添加により、GS細胞の樹立が困難なマウス系統からGS細胞を樹立することにも成功している<sup>11)</sup>。このことは、他のグループによっても検証されており、低酸素濃度条件下で解糖系の活性を亢進させると、やはり幹細胞活性や精子形成能力が上昇することが示されている<sup>12)</sup>。これらの知見を取り込むことで、豚GS細胞の培養効率改善が見込まれる。また、移植や試験管内分化誘導法によるPSS-1陽性細胞の精子形成能の検証も不可欠であろう。

#### 5. 要 約

今年度の研究では、豚精巣から精原細胞を純化する方法、および純化した精原細胞の培養法の開発を行った。純化法に関しては、高木博士が作製したPSS-1抗体が豚前精原細胞を選択的に標識できること、この抗体が磁気分離法による細胞純化に応用可能であることを確認した。さらに純化し



**Fig. 3** Culture of PSS-1<sup>+</sup> pre-spermatogonia purified from newborn porcine testes. PSS-1<sup>+</sup> cells were cultured on the laminin-coated cover glass. (A) PSS-1<sup>+</sup> cell culture under standard GS medium containing 1% FBS. In this condition, contaminating testicular somatic cells overwhelmed and PSS-1<sup>+</sup> cells were defeated. (B) Under FBS-reduced (0.1%) condition, somatic cell growth were suppressed and PSS-1<sup>+</sup> cells were observed. (C) Although serum-free condition suppressed somatic cell growth, PSS-1<sup>+</sup> cells were not observed. (D) MAP2K1/2 inhibitor PD0325901 permitted the survival and growth of PSS-1<sup>+</sup> cells even under 1% FBS condition. (E) High-power magnification image of PSS-1<sup>+</sup> cells under 1% FBS with PD0325901. Some cells exhibited cytokinesis.

た細胞の培養を試み、無血清、あるいはMAP2K1/2の活性化阻害剤が豚精巣体細胞の増殖を顕著に抑制することでPSS-1陽性の前精原細胞を選択的に増殖させることを見出した。

#### 引用文献

- 1) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Biol. Reprod.*, **69**, 612~616, 2003.
- 2) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Biol. Reprod.*, **78**, 611~617, 2008.
- 3) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Biol. Reprod.*, **85**, 208~217, 2011.
- 4) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Development*, **132**, 4155~63, 2005.
- 5) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Biol. Reprod.*, **72**, 236~240, 2005.
- 6) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 8018~8023, 2006.
- 7) Sato, *et al.* : *Stem Cell Reports*, **5**, 75~82, 2015.
- 8) Sato, *et al.* : *Nature*, **471**, 504~507, 2011.
- 9) Sato, *et al.* : *Nature Commun.*, **2**, 472, 2011.
- 10) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *Biol. Reprod.*, **91**, 88, 2014.
- 11) Kanatsu-Shinohara, M., *et al.* : *GenesDev.*, **30**, 2637~2648, 2016.
- 12) Helsel, *et al.* : *Stem Cell Reports*, 2017, in press.

# 種雄牛における精子メチル化可変部位の特性評価

Characterization of differentially methylated sites in bull spermatozoa DNA

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 changes in DNA methylation status in spermatozoa and to assess its use for the early evaluation of bulls. We found that genome-wide methylated DNA modifications of bull spermatozoa can be analyzed using a human DNA methylation microarray. The methylation levels of some CpG sites were verified by combined bisulfate restriction analysis (COBRA). In this study, age-related methylation changes in CpG sites of bull spermatozoa were confirmed. The region including CpG1 was confirmed as a differentially methylated region, which showed age-related increase by both COBRA and bisulfite sequencing. Frozen semen obtained from three young Japanese Black bulls during sexual maturation were used for COBRA analysis. Four of the CpG sites showed age-related changes or individual differences in methylation levels. Furthermore, two of the bulls were analyzed by improved human DNA methylation microarray, and differentially methylated CpG sites were newly detected as age-dependent changes during sexual maturation. In conclusion, methylation profiles of individual and age-related alterations in young bull spermatozoa throughout sexual maturation can be revealed using a human microarray and COBRA. Such methylation index might be expected to contribute to the early evaluation of bulls.

## 1. 目的

黒毛和種の子牛価格が年々高騰を続けており、肥育農家の経営を圧迫している。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年間で低下し続けている（家畜改良事業団資料より）。人工授精の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<sup>1)</sup>。優秀な遺伝形質を持つと期待され選抜

さ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。低受胎となる凍結精液の事前の検出が可能となれば、空胎雌牛を減らせるとともに、種雄牛の早期受胎性評価につながる。

精子形成過程においてDNAメチル化は全体的に進行することが知られる<sup>2)</sup>。精子形成の段階を経ても未成熟な精子は不妊や活性酸素種発生の要因となることが知られており、精液中に含まれる未成熟精子の割合、すなわちエピゲノムの不完全さを検出することが、新しい牛凍結精液の受胎性評価となりうる。受精可能な精子の射出機能が備わる性成熟は牛では約14ヶ月齢とされるが、精液性状が安定しない場合もあるため、性成熟を迎えても直ちに繁殖供用はできない。黒毛和種の性成熟はホルスタイン種より約1ヶ月早いとの報告があり、14ヶ月に満たない雄牛から質的、量的に十分な精液が得られる場合もある。このように、繁殖供用期へ達する時期は個体差が激しく、飼養環境にも大きく左右される。ヒトではDNAメチル化解析用チップの開発により、網羅的なCpGサイトのメチル化状態の比較解析が可能となっており<sup>3)</sup>、精子に起因する不妊に関連するDNAメチル化可変領域 (differentially methylated regions; DMRs) が明らかにされている<sup>4)</sup>。また、年齢に伴ったDMRsが多数判明し、老化による不妊等への影響も示唆されている<sup>5)</sup>。我々は、効率的かつより安価にウシゲノムのDNAメチル化プロファイルの評価およびDMRsの探索を行うための手法として、ヒト用DNAメチル化解析用チップが非常に有効であることを示し<sup>6)</sup>、この手法を用いて牛凍結精液間のメチル化状態の比較をすることを可能とした。そして平成27年度の本助成により、体外受精後の胚発生率が高い精液と低い精液の比較により、雄牛、もしくは精液採取時期（性成熟直後と繁殖供用時期）においてDNAメチル化状態が異なることを明らかにした<sup>7)</sup>。

そこで本年度の研究では、凍結精液のDNAメチル化状態についてヒト用チップによる網羅的解析データを追加すると同時に、繁殖供用期の採取月齢の異なる雄牛におけるDNAメチル化状態の

変化について検証し、その変化が種雄牛の早期評価への利用性を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 バイサルファイトシークエンスによる牛精子メチル化可変領域の検証

前年度に検出した精子メチル化可変部位のうち、COBRA法により加齢変化を示すと考えられたCpG1について、バイサルファイトシークエンスを行った。サンプルとして農研機構畜産研究部門で飼養している1頭のホルスタイン種雄牛の性成熟期から繁殖供用期に採取した精液（H1；10ヶ月齢，H2；11ヶ月齢，H3；15ヶ月齢，H4；25ヶ月齢，H5；35ヶ月齢）および、黒毛和種雄牛から採取した精液（A；159ヶ月齢，B；75ヶ月齢，C；20ヶ月齢）を用いた。PCR増幅した446bpのCpG1を含む断片は、2%アガロース電気泳動を行い、切り出したDNA断片を精製した（illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, GE Healthcare）。精製したPCR断片はpMD18-T vector（タカラバイオ社）によりクローニングを行い、コロニーPCR（EmeraldAmp<sup>®</sup> PCR system, タカラバイオ社）およびPCR断片の精製（FastGene Gel/PCR Extraction Kit, ニッポンジェネティックス社）後にシークエンス解析した。

### 2.2 COBRA法による牛精子メチル化可変部位の検出

性成熟期から繁殖供用期における凍結精液のメチル化変化を検出するため、前年度にヒト用メチル化解析用チップ（HumanMethylation450 BeadChip, イルミナ社）により可変部位として簡易検出可能とした4箇所のCpG部位（CpG1～4）をターゲットとしたCombined Bisulfate Restriction Analysis（COBRA）法によるサンプル間のメチル化レベルの相違についてスクリーニングを行っ

た。サンプルとして茨城県畜産センター肉用牛研究所より提供いただいた3頭の黒毛和種雄牛から採取した月齢の異なる凍結精液を供した (S 1-1 ; 14ヶ月齢, S 1-2 ; 19ヶ月齢, S 1-3 ; 28ヶ月齢, S 2-1 ; 15ヶ月齢, S 2-2 ; 20ヶ月齢, S 2-3 ; 26ヶ月齢, S 3-1 ; 14ヶ月齢, S 3-2 ; 18ヶ月齢, S 3-3 ; 21ヶ月齢)。

凍結精液は38°C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。精子ベレットより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した。精製したDNAは, キット (MethylEasy™ 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, メチル化レベルの相違性の確認を行った。

### 2.3 マイクロアレイによる牛精子のメチル化可変部位の検出

2.1で解析した凍結精液のうち2頭の黒毛和種雄牛の採取月齢の異なる凍結精液4検体 (S 1-1, S 1-2, S 2-1, S 2-2) について, 改良型ヒト用DNAメチル化解析用チップ (Infinium MethylationEPIC Kit, イルミナ社) による解析を行った。解析データは, 信頼性の指標であるDetection P-valueおよび総蛍光強度によりデータが有効であると判断したCpGサイトについて, 改良型メチル化解析用チップで得られたデータと改良前のメチル化解析チップ (Human Methylation450K BeadChip) のデータとの間で比較が可能かどうか検討を行った。次に性成熟直

後 (S 1-1, S 2-1) と繁殖供用期 (S 1-2, S 2-2) の試料間でメチル化レベルの比較解析を行い, メチル化可変部位を抽出しリストアップした<sup>6)</sup>。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, CpG部位の位置を特定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 バィサルファイトシーケンスによるメチル化可変領域の検出

CpG 1 部位 (ターゲットID : cg27100471) を含む120bpのヒト用プローブ配列のBLAST検索の結果, 牛の29番染色体上にある *mitochondrial glutamate carrier 1 isoform* 遺伝子の近傍配列と98%の相同性があった。CpG 1 部位を含む446bp領域のバイサルファイトシーケンス解析の結果, CpG 1 部位およびその領域内にある22箇所のCpG部位が全体として加齢に伴ってメチル化度が高くなる傾向がみられたことから, この領域は加齢変化を示すメチル化可変部位であることが明らかとなった (Fig. 1)<sup>7)</sup>。

### 3.2 性成熟期から繁殖供用期における牛精子メチル化変化の簡易検出

4箇所のCpG部位 (CpG 1 ~ 4) をターゲットとしたCOBRA法によるサンプル間のメチル化レベルのスクリーニングを行ったところ, 性成熟期から繁殖供用期の間の月齢で差異を示すものやそのメチル化レベルに個体間の相違が検出された (Fig. 2)。

これらのメチル化可変部位のメチル化レベル検出をいくつか組み合わせることにより, 雄牛ごとの繁殖供用以前のメチル化の正常性や特徴をカテゴリー化することが可能ではないかと考えられた。そのためには, 性成熟期から繁殖供用期における牛精子のメチル化可変部位の検索を更に進め

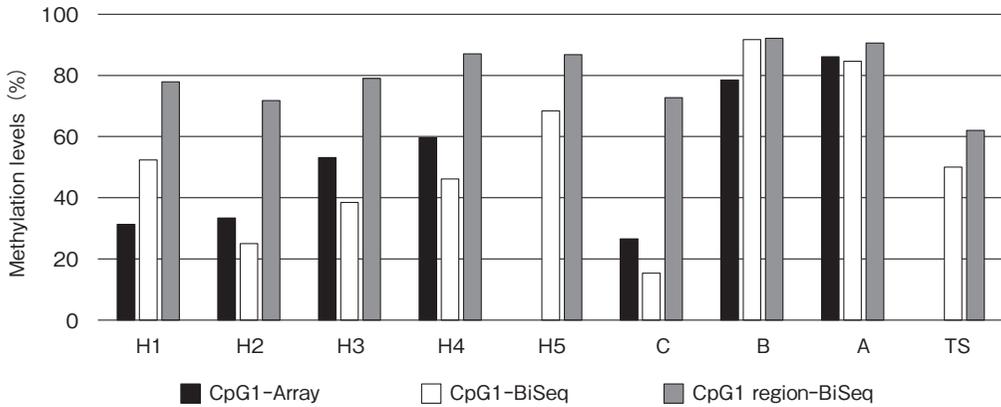


Fig. 1 Methylation levels (%) in CpG1 site analyzed by microarray (CpG1-Array) or bisulfite sequencing (CpG1-BiSeq). The methylation levels of 22 CpG sites (CpG1 region-BiSeq) were determined by bisulfite sequencing. H1~H5; semen samples were obtained from a Holstein bull at different ages (10~35months old). A~C; Japanese Black bulls (A; 159 months old, B; 75 months old, C; 20 months old). TS; bovine testis. H5 and TS did not apply microarray analysis.

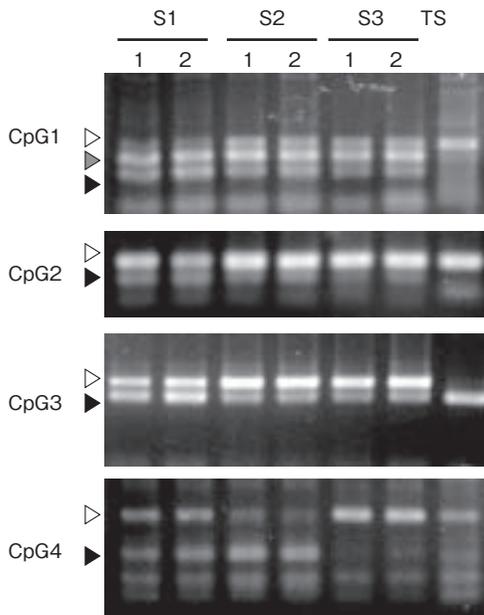


Fig. 2 Different methylation levels of CpG1-4 region in bovine spermatozoa revealed by COBRA. S1-1; 14 months old, S1-2; 19 months old, S2-1; 15 months old, S2-2; 20 months old, S3-1; 14 months old, S3-2; 18 months old, and, TS; testis.

る必要がある。

### 3.3 性成熟期から繁殖供用期における牛精子

#### のメチル化可変部位の検索

採取時の月齢が異なる凍結精液4検体 (S1-1, S1-2, S2-1, S2-2) について, 改良型ヒト用DNAメチル化解析用チップによる解析を行った。結果を改良前のメチル化解析用チップのデータとの比較が可能かどうか検討を行ったところ, 改良前後でクラスターが分かれてしまうため全体としての比較は困難であることが判明した。そこで, 改良型メチル化解析用チップによるデータのみを用いて性成熟直後 (S1-1, S2-1) と繁殖供用期 (S1-2, S2-2) との比較解析を行った結果, メチル化レベルの異なるCpG部位を315箇所抽出した (Fig. 3)。牛のゲノム配列とのホモロジー検索の結果, そのうち44箇所がヒットし, 制限酵素部位のあるCpG部位は17箇所であった。

以上の結果から, ヒト用DNAメチル化解析チップの利用で明らかになったDNAメチル化可変部位は, 性成熟期から繁殖供用期において精液を採取した若い雄牛の月齢や個体差を評価することが可能であると示唆された。今後は, 性成熟期から

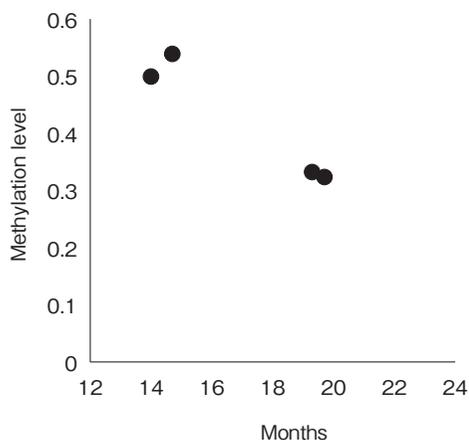


Fig. 3 Methylation levels of one of the CpG sites detected by human DNA methylation microarray. The methylation levels in the CpG sites were different before and after the breeding age of bulls (S1-1 & S2-1 vs. S1-2 & S2-2).

繁殖供用期において、精子の受精能に着目した特徴のあるメチル化可変部位を特定し、精子評価のためのパネルを構築することで、種雄牛の早期受胎性評価技術としての利用を目指していく予定である。

#### 4. 要 約

本研究の目的は、繁殖供用期の採取月齢の異なる雄牛におけるDNAメチル化状態の変化についてその利用性を明らかにし、種雄牛および凍結精液の早期評価に資することである。前年度、ヒトメチル化解析用チップを利用して精子DNAのメチル化可変部位を5箇所同定した(CpG 1~5)。本年度は、CpG 1を含む近傍22箇所のCpG部位についてバイサルファイトシーケンス解析による検証を行ったところ、加齢に伴ってメチル化度が高くなる傾向を確認した。また、4箇所のCpGについて3頭の黒毛和種雄牛の性成熟期から繁殖供用期の時期に採取した凍結精液間のメチル化レベルの違いをCOBRA法により解析したところ、CpG 1を含む3箇所において月齢によるメチル化

状態の差異および個体差が検出された。次に、そのうち2頭の雄牛について性成熟期および繁殖供用期の精子DNAを改良型ヒト用DNAメチル化解析用チップによる比較解析を行ったところ、この時期におけるメチル化可変部位が検出された。以上の結果から、精子DNAメチル化レベルは加齢に伴って変化しうること、またメチル化レベルの変化には個体差のあることが判明した。今後、繁殖供用期特異的なメチル化可変部位の差異を指標とした評価系を構築していくことで、受胎性に着目した雄牛および凍結精液の早期評価へ資すると期待される。

#### 文 献

- 1) 渡邊伸也, 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) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) Kobayashi, E., Takeda, K.: A data driven approach to utilizing Human Methylation arrays in genome-wide study for bovine DNA methylation, *The Journal of Animal Genetics*, 44, 1~8, 2016.
- 7) Takeda, K., Kobayashi, E., Akagi, S., Nishino, K., Kaneda, M., Watanabe, S.: Differentially methylated CpG sites in bull spermatozoa revealed by human DNA methylation arrays and bisulfite analysis, *J Reprod Dev*, 63(3), 279~287, 2017.

## 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

Study of *in vitro* embryo production using growing oocytes collected from ovaries removed from 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 both fully grown and growing oocytes collected from the ovaries of calves just before fattening (approximately 9.2-month-old) is beneficial for the rescue of genetic resources. The aim of this study was to investigate the effects of the presence or absence of the corpus luteum (CL+ or CL-), an indicator of puberty on developmental potential both immature (IM) and *in vitro* grown (IVG) oocytes. Fully grown IM (approximately 120  $\mu\text{m}$  in diameter) oocytes and 14-day IVG (approximately 100  $\mu\text{m}$  in diameter) oocytes collected at the growing stage were subjected to IVM-IVF-IVC, respectively. In both types of oocytes, embryo production was compared between those from ovaries with CL+ or CL-. Higher blastocyst formation and normal cleavage rates were obtained in IM oocytes with CL+ than those with CL- ( $P < 0.05$ ). However, no significant difference was found between IVG oocytes either with CL+ or CL-. Although puberty can affect the developmental competence and normality of early cleavage in IM oocytes, it may not strongly affect it in IVG oocytes. Mitochondrial DNA copy numbers were similar between IM and IVG oocytes irrespective of the presence/ absence of CL and the maturity of the donor (IVG oocytes in calf vs. cow). In both the IM and IVG groups, conception was achieved after the transfer resultant frozen-thawed embryos to the recipient cows. Live calves were delivered after the transfer of fresh embryos and the parentage of oocyte donors and the sire was verified by genetic test of DNA from the calves, recipient cows, sire and oocyte donors. In conclusion, we demonstrated the possibility of embryo and live calf production after IVM-IVF using both fully grown and growing stage oocytes collected from the ovary from calves either presence or absence of CL before fattening.

### 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<sup>1)</sup>、摘出卵巣からの卵子採取は1回限りであるため、1頭

(卵巣は1頭あたり2個)あたりの採取卵子数が少ない場合の発生率の向上が欠かせない。また、性成熟に達していない若齢牛の未熟な卵巣から得られる卵子は既存の体外受精・培養法では発生率が低いという報告がある<sup>2)</sup>。我々は、少数の卵子においても、体外発生能を最大限引き出せる個別識別可能な個別卵子・胚培養システム<sup>3)</sup>を用い、若齢子牛の未熟な卵巣に存在する通常サイズの卵子(直径約120 $\mu$ m)の体外受精胚生産技術や発育途上の卵母細胞(直径約100 $\mu$ m)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<sup>4,5)</sup>を用いて、胚盤胞期胚への発生が可能であることを明らかとした。昨年度の本助成により、通常サイズの卵子の胚発生率には雌子牛の性成熟が影響しており、性成熟に達すると胚の発生率が向上することが示唆された。さらに、両区から発生した胚を新鮮状態で受胎牛に移植すると受胎例が得られることが見出された。発育途上卵母細胞については、性成熟の影響を受けない可能性が示唆されたが、胚発生率はバラツキが大きく、実験回数を反復する必要性が課題として残った。最近、成牛において、初期卵割の正常性が子牛への高い発生能と相関が高いことが報告されていることから、子牛から生産した胚においても、その方法が応用可能か検証する必要があると考えられる。また、受胎牛が妊娠を継続して子牛が生産されるのか、生産子牛の素性を明らかにできるのかどうかについての検証も必要性である。

そこで、本研究では、若齢雌子牛の通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞において、初期卵割の正常性と性成熟の関係を検討し、国内の大半で実施される凍結胚移植による受胎性、さらにH27年度に受胎した牛の妊娠の進行や子牛の正常性、親子鑑定を検証した。

## 2. 方法

### 2.1 若齢雌子牛由来卵子、卵母細胞の体外受精後の卵割の正常性と黄体の存在の關係の検討

肥育前の黒毛和種雌子牛(平均9.2か月齢)から摘出された卵巣を、約5時間輸送後、直径2~6mmの卵胞から直径約120 $\mu$ mの未成熟卵子(通常サイズの卵子、IM oocytes)を吸引採取した。採取卵子の体外成熟、体外受精および体外発生培養は、既報<sup>6)</sup>に従って実施した。性成熟の判断基準<sup>7)</sup>は、卵巣に黄体が存在する個体を性成熟後、黄体が存在しない個体を性成熟前とした。発生培養には個別識別培養皿<sup>8)</sup>を用い、卵子の発生能の検証について、媒精後28時間目と50時間目の初期卵割および7~9日目の胚盤胞期胚への発生成績により比較した(黄体あり; CL+, n = 193, 黄体なし; CL-, n = 60)。直径0.5~0.8mmの卵胞から直径約100 $\mu$ mの発育途上卵母細胞(IVG oocytes)を採取し、体外発育培養および成熟培養を既報<sup>4,5)</sup>に従って実施した。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発育途上卵母細胞と顆粒膜細胞の複合体を採取し、これらをセルカルチャーインサート上で、38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>および90%N<sub>2</sub>の加湿気相下で13~14日間の体外発育培養を実施した。発育途上卵母細胞は体外発育培養後、通常サイズの卵子と同気相下で同時間、体外成熟培養を行った。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。これらの発育途上卵母細胞の卵子の発生能の検証と胚の生産性、卵子の卵割の正常性について、黄体の有無別に検討した(黄体あり; CL+, n = 95, 黄体なし; CL-, n = 57)。

両区とも、卵子を個別識別可能なりアルタイム細胞培養観察システムにより培養しながら卵割の

進行を経時的に撮影した。卵子の卵割の正常性について、既報<sup>9)</sup>に従って検証した。すなわち、第1卵割においては媒精後28時間目までに細部断片や突出部がなく均等な2細胞に卵割した卵子を正常卵割、それ以外を異常卵割とし、第2卵割においては第1卵割が正常であり、媒精後50時間目までに細胞断片や突出部がなく均等な6細胞以上に卵割した卵子を正常卵割とした。両区とも黄体の有無別に、正常な第1卵割、第2卵割パターンを経た胚盤胞期胚の発生率を比較した。

## 2.2 生産した卵子や胚の品質と遺伝子解析

黄体の有無別に採取された卵子および体外発育した発育途上卵母細胞について、ミトコンドリアDNA (mtDNA) コピー数からみた正常性を比較検証した。通常サイズの卵子は黄体の有無別に、発育途上卵母細胞は黄体の有無別に成牛の体内発育卵子と同等であるかどうかを比較検証した。通常サイズの卵子区は、体外成熟後の一部の卵子 (IM oocytes, 黄体あり; CL+, n = 4, IM oocytes, 黄体なし; CL-, n = 4) を、卵丘細胞の剥離除去後に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 (Light Cycler 1.5, Roche) により既報<sup>10)</sup>に従って行った。発育途上卵母細胞区は、約2週間の体外発育培養および体外成熟培養後の一部の卵子 (IVG oocytes, 黄体あり; CL+, n = 4, IM oocytes, 黄体なし; CL-, n = 4) を、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の体外成熟卵子 (IVM oocytes) を用いた (n = 5)。

## 2.3 凍結保存胚の受胎性の検討

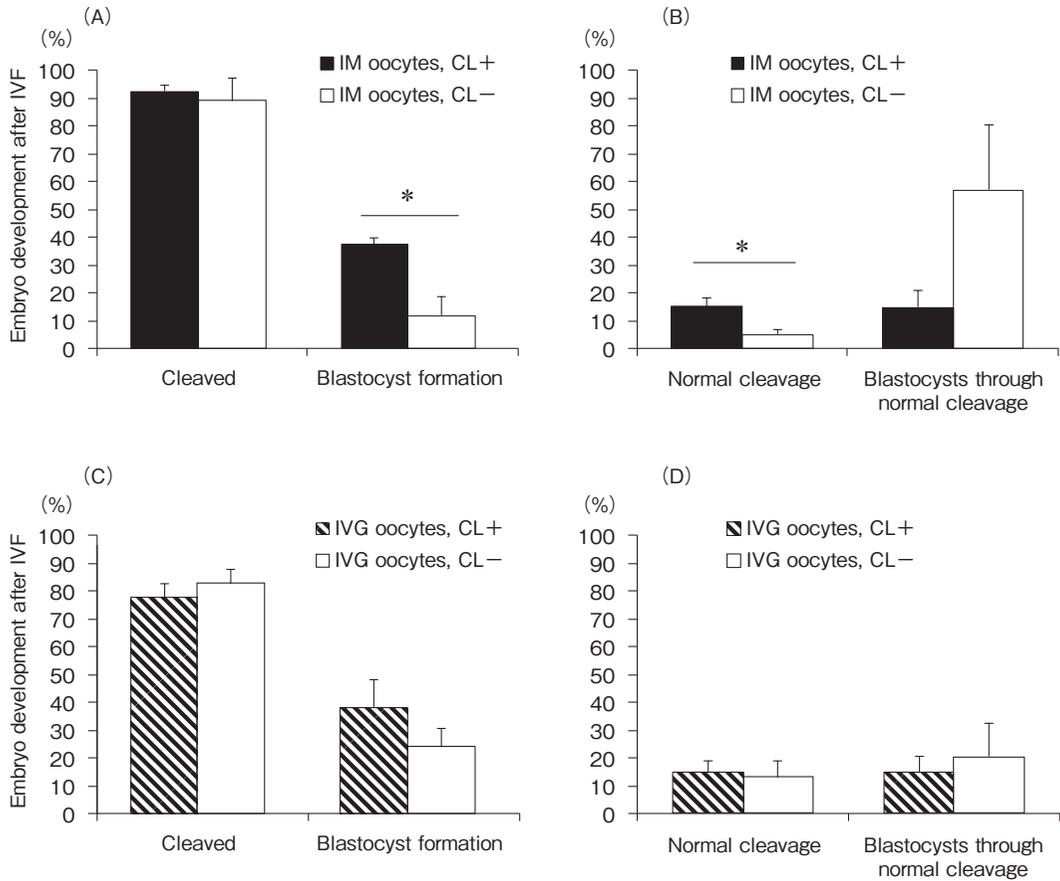
昨年度の本助成では、通常サイズの卵子、発育途上卵母細胞から生産された胚盤胞期胚を、受胎牛へ新鮮状態で移植して、両区ともに受胎が得られている。そこで、本年度は、凍結保存胚の受胎性の検討を行った。通常サイズの卵子および発育途上卵母細胞から生産した胚盤胞期胚の一部を、桑山らの報告<sup>11)</sup>に準じ、1.36Mグリセロールと0.25Mショ糖添加修正TCM199を用いて緩慢凍結保存した。これらの胚を、体外受精日と同日に発情が確認された受胎牛の黄体側卵巣の子宮角に移植した。受胎の確認は、移植直前の発情から40日以上を経過しても発情が回帰しなかった個体に超音波画像診断装置を用いて行った。

## 2.4 子牛の正常性の検証と親子鑑定

H27年度に新鮮胚移植によって得られた受胎牛の妊娠の進行を観察し、生存子牛の生産等の子牛の正常性の検証を行った。また、素性が明らかな後継牛を生産するために、卵巣摘出雌子牛の卵巣の一部、生産子牛、体外受精に用いた凍結精液の種雄牛および受胎牛の毛根を用い、遺伝子検査による親子鑑定を実施した (家畜改良事業団)。

## 3. 結果と考察

本研究において、黄体ありの個体は平均9.2か月齢、黄体なしの個体は平均9.0か月齢であり、両区に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ )。胚の発生能に関し、通常サイズの卵子の初期卵割率は黄体の有無の別なく高かった (Fig. 1A)。しかし、胚盤胞期への発生率においては、黄体あり区が黄体なし区に比べて高い値を示した ( $P < 0.05$ , Fig. 1A)。黄体の有無による平均月齢に有意差は認められなかったにもかかわらず、これらの月齢において性成熟に達しているかどうか、卵子の発生能に大きな影響を与えていることを示している。性成熟に達していない個体の通常サイ



**Fig. 1** The effect of the presence or absence of the corpus luteum on *in vitro* development of bovine embryos generated from calf oocytes and the normality of the first and second cleavages. Embryos were derived by *in vitro* maturation (IVM) and fertilization (IVF) of fully grown immature oocytes of approximately 120  $\mu\text{m}$  in diameter (IM oocytes) after aspiration (A, B) or from growing stage oocytes (approximately 100  $\mu\text{m}$  in diameter at the time of collection) (C, D) after *in vitro* growth culture and IVM. Both IM and IVG oocytes were isolated from ovaries either with (CL+) or without corpus luteum (CL-). Embryos with normal cleavage patterns finished their first cleavage (two even blastomeres without fragments nor protrusions before 28h IVF), second cleavage ( $\geq$  six even blastomeres without fragments nor protrusions before 50 h) and their development to the blastocyst stage (B, D). Cleavage was evaluated at 50 h (Day 2), blastocyst formation on Day 7-9 (Day 0=IVF). \*: Significant difference ( $P < 0.05$ , *t*-test).

ズの卵子を用いる場合、発生能を向上する検討が必要であると考えられる。初期卵割の正常性において、黄体あり区は、媒精後28時間目に正常な第1卵割パターンおよび媒精後50時間目に正常な第2卵割パターンを示して発生した卵子の割合が、黄体なし区に比べて有意に高かった ( $P < 0.05$ , **Fig. 1B**)。しかし、胚盤胞期に発生した全胚のうち、正常な初期卵割パターンを経た胚盤胞期胚の

割合は、両区に差は認められなかった ( $P > 0.05$ , **Fig. 1B**)。この結果は、黄体なし区の胚盤胞期胚の発生率が全実験回次を通じて低かったため、バラツキが大きくなったと考えられる。发育途上卵母細胞の初期卵割率、胚盤胞発生率に黄体の有無別に有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ , **Fig. 1C**)。この結果は、昨年同様、性成熟前の個体において、发育途上卵母細胞は性成熟後の個体で示

唆された卵子の低い発生能の影響を受けることなく胚生産を可能としたと考えられる。初期卵割の正常性および正常な初期卵割パターンを経た胚盤胞期胚の割合においても、黄体の有無にかかわらず有意差は認められなかった ( $P > 0.05$ , Fig. 1D)。成牛においては、初期卵割の正常な胚を移植に用いると約70%と受胎率の大幅な向上が報告

されている。今後は、卵割パターンの異なる胚盤胞期胚の受胎性についても検証する必要があると考えられる。

通常サイズの卵子において、黄体の有無別に、*CYTB*および*COX*によるmtDNAコピー数には有意な差は認められず、黄体の有無が卵細胞質の成熟度に影響を及ぼさないことが明らかとなった

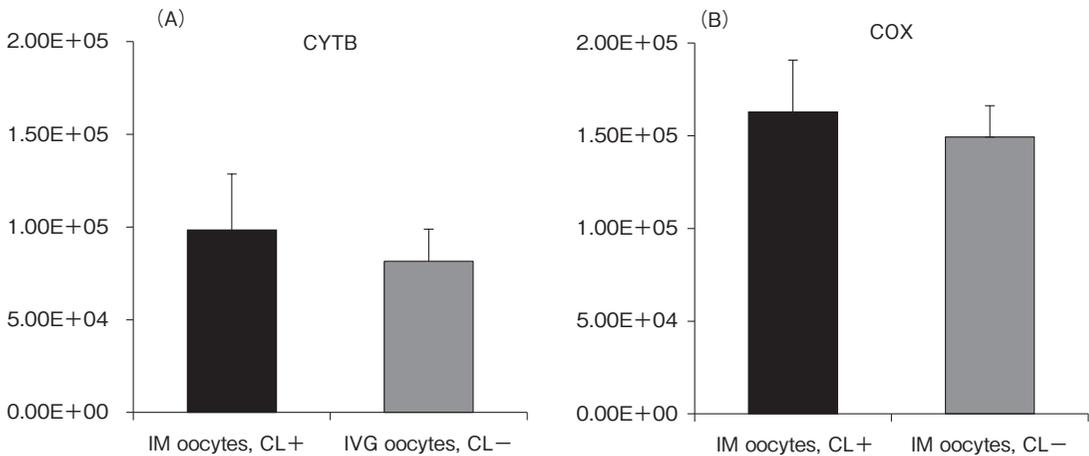


Fig. 2 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers in *in vitro* matured oocytes analyzed by the *CYTB* (A) and *COX1* genes (B), respectively. The experimental groups were derived from fully grown immature oocytes of approximately 120  $\mu\text{m}$  in diameter after aspiration of calf ovaries with or without corpus luteum (IM oocytes either CL+ or CL-), respectively. No significant difference was found between groups ( $P > 0.05$ , *t*-test).

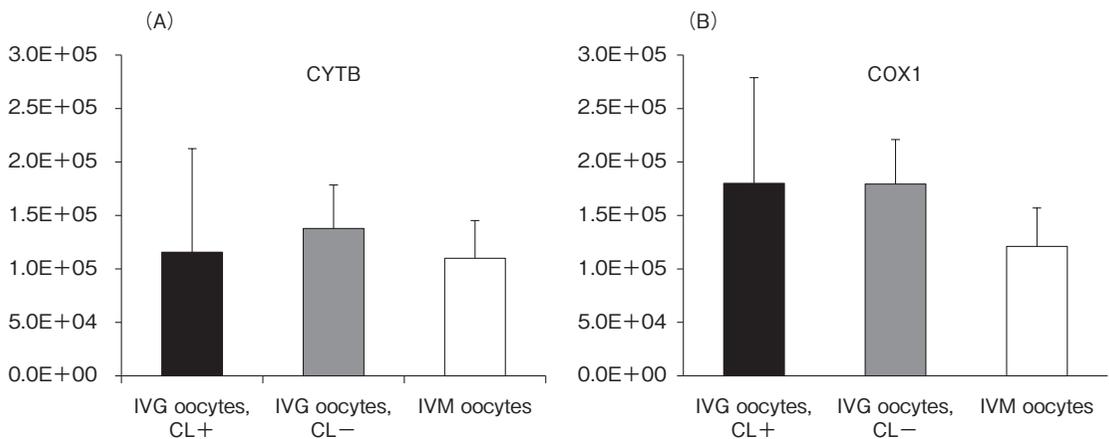


Fig. 3 Mitochondrial DNA (mtDNA) copy numbers in growing stage oocytes analyzed by the *CYTB* (A) and *COX1* genes (B), respectively. *In vitro* matured oocytes after *in vitro* growth culture (IVG oocytes, approximately 100  $\mu\text{m}$  in diameter at the time of collection) were derived from calf ovaries with or without corpus luteum (either CL+ or CL-), respectively. The IVM group represents *in vitro* matured oocytes collected from cow ovaries obtained from a local abattoir (IVM oocytes). No significant difference was found among the groups ( $P > 0.05$ , *t*-test).

( $P>0.05$ , Fig. 2)。発育途上卵母細胞においても、黄体の有無別にmtDNAコピー数に違いはなく、体内発育した成牛の体外成熟卵子とも同等であった ( $P>0.05$ , Fig. 3)。これらの結果は、通常サイズの卵子だけでなく、発育途上卵母細胞においても、性成熟に影響されず、成牛卵子と遜色ない正常なmtDNAコピー数の増幅が検証されたことを示している。

H27年度の本助成研究実績<sup>6)</sup>では、通常サイズの卵子、発育途上卵母細胞から生産された胚盤胞期胚を新鮮な状態で受胎牛へ移植して、両区ともに受胎が得られた。国内では胚移植の約70%が凍結保存胚を用いているため、凍結胚の融解後の受胎性を明らかにする必要がある。本年度は、両区から生産され、凍結保存した胚の移植後の受胎性を検討し、通常サイズの卵子区から2頭、発育途上卵母細胞区から1頭の受胎を得られた。このことから、肥育前子牛から生産された胚は、凍結保存した状態においても、受胎性に問題がないことが明らかとなった。成牛由来の体内受精胚においては、凍結胚は新鮮胚に比べて移植後の受胎率が約5%低下すること、体外受精胚は体内受精胚に比べて移植後の受胎率が約10%低下することが知られている<sup>12)</sup>。本研究で発育途上卵母細胞は、体外成熟・受精・発生培養前に約2週間の体外発育培養が加わっており、より詳細な耐凍性の検証を行う必要があると考えられる。

H27年度に新鮮胚移植による受胎牛4頭（通常サイズの卵子区2頭、発育途上卵母細胞区2頭）すべてから生存産子の生産が得られた。生時体重、在胎日数は一般的な成績であった。子牛の母である摘出卵巣の一部、生産子牛および受胎牛の毛根、体外受精に用いた凍結精液の種雄牛のDNA情報から、遺伝子検査により親子鑑定を検証することができた。今後は、通常の体外受精胚に体外発生培養が追加される発育途上卵母細胞の

耐凍性の向上のために、胚移植事例を増やし、胚の状態別や卵割パターン別の受胎性の検証を行う必要があると考えられる。

#### 4. 要 約

約9.2か月齢の肥育前若齢雌子牛の通常サイズの卵子は性成熟により、胚の発生能と初期卵割の正常性に影響を受けるが、発育途上卵母細胞はその影響を受けていない可能性が明らかとなった。mtDNAコピー数は、通常サイズの卵子、発育途上卵母細胞ともに性成熟の影響を受けず、成牛と遜色がなかった。生産胚は凍結状態であっても受胎例が得られた。新鮮胚移植により生存産子が得られた。卵巣摘出雌子牛、生産産子、体外受精に用いた種雄牛および受胎牛の遺伝子検査により親子鑑定が可能であった。今後は、発育途上卵母細胞由来胚の耐凍性の検討を行うために、胚の状態別や卵割パターン別の受胎性の検証を行う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., Flap, 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., Somfai, 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) 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.
- 7) 的場理子：公益法人伊藤記念財団平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 34, 225~230, 2016.
- 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.

- 9) Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somafai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Imai, K. : *Plos ONE*, **7**, e3627, 2012.
- 10) 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.
- 11) 桑山正成, 濱野晴三 : 家畜繁殖技術研究会誌, **13**, 165~171, 1991.
- 12) 農林水産省ホームページ, 牛受精卵移植実施状況 (平成26年度), [http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1\\_katiku/pdf/h26\\_gaiyou.pdf](http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/lin/1_katiku/pdf/h26_gaiyou.pdf), 2017.

# 牛の超早期妊娠因子（Super-EPF）ELISAによる 受精・着床診断

Fertilization and implantation diagnosis by Super-early pregnancy factor  
(Super-EPF) ELISA of cattle

松原和衛・小岩佳夏子・平田統一

(岩手大学農学部)

Kazuei Matsubara, Kanako Koiwa and Toh-ichi Hirata

(Faculty of Agriculture, Iwate University)

In this study, a measurement system of Super-EPF ELISA was established and an early pregnancy diagnosis of cattle (7th day after AI) by established method was carried out. As a result, it was suggested that the agreement rate of diagnostic results of 40 heads between pregnancy diagnosis using ultrasonic diagnostic equipment and Super-EPF ELISA was as high as 90%. The fertilization/pregnancy diagnosis of cattle by Super-EPF ELISA was possible on 7th day after AI. In addition, as a result of measuring serum from AI to delivery, in Super-EPF ELISA, the individuals that were positive up to 14 ~ 30 days after AI, after that, declined to negative. Furthermore, Super-EPF after embryo recovery turned to negative in most individuals on day 3 after collection. Therefore, it was suggested that Super-EPF was affected by the presence of embryos. This result is the first report by Super-EPF ELISA. However, it was indicated that there was no relevance between embryo number/rank and Super-EPF. By further examination, Super-EPF ELISA was proved to be usable as cattle early fertilization/pregnancy diagnosis technology.

## 1. 目 的

受精卵移植が牛で行われるようになり母方からの改良が可能となった。しかし、移植した胚の確実な品質評価方法はなく、移植したにも関わらず流産するいわゆる早期胚死滅が問題になっている。移植した胚が問題なのか、移植された母牛に問題があるのかは現状では特定できない。また、現在の牛の妊娠診断は、一般的には発情開始予定日によるノンリターン（20日）と直腸検査（30～40日目の妊娠鑑定）である。最近、インターフェ

ロン-タウや遺伝子の発現解析を利用することによって、牛の早期の妊娠診断を行う試みがなされている。しかし、それらの現象は着床時期から胎盤形成以降のものであり、これらの解析によって受精から着床までのシグナルを検出することはできていない。一方、早期妊娠因子（Early Pregnancy Factor：EPF）は、1974年にMortonら<sup>1)</sup>によってマウスの受精12時間以降の血清中に発見され、妊娠極初期の受精シグナルとして知られ、我々も牛で24～48時間以降で検出している<sup>2)</sup>。しかし、検出方法（ロゼット抑制試験：RITest）

の困難さ、研究材料の特殊性（妊娠極初期）および血清中含量が極めて少ないなどの問題があり、EPFの産生機序や構造はいまだに不明である。1994年にMortonら<sup>3)</sup>はEPF=シャペロンIN10との報告を行ったが、この報告には多くの矛盾があり<sup>4)</sup>、我々は妊娠血清中で検出される活性を超早期妊娠因子（Super-EPF）、その他の材料で検出される活性をEPF様物質とすることを推奨している<sup>5,6)</sup>。このSuper-EPFは、牛で人工授精後24～48時間以降の母体血液中にRITestで検出され、胚を除去すると母体血液中には検出されなくなることから、Super-EPFを測定することにより、受精・着床、妊娠診断と胚のモニタリングが可能となる<sup>2,6)</sup>。RITestが難しいこと、EPF=シャペロンIN10という誤解が広がり、この研究を行っているのは今では我々のみである。我々は長年、牛のSuper-EPFの構造を決定すること、抗体を作製することを目的に研究を進めてきた。その結果、最近になって牛のSuper-EPFの精製方法の単純化に成功し、得られた抗原を元にしてウサギ抗牛Super-EPF IgGを作出した。昨年、この抗体を使用したSuper-EPF酵素免疫測定法（ELISA）に人工授精（AI）および胚移植（ET）後7日目の牛58頭の血清を適用した結果、その受精診断率は80%であった。

本研究では、昨年構築したSuper-EPF ELISAの詳細な条件検討を行い、測定系の安定化と簡易化をめざし、サンプル数を増加させることによって牛の受精・妊娠診断に応用できるかを検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 Super-EPF ELISAの条件確定と妊娠鑑定結果との関係

昨年構築した測定条件（ウサギ抗牛Super-EPF IgG, Biotin標識Anti-ウサギIgおよびStreptavidin標識ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）

をそれぞれ1,000倍希釈）では、サンプルを100万倍に希釈する必要があり希釈誤差を生じること、また、使用するSuper-EPF IgGの濃度を下げることによって抗体の節約を行う必要があるため、本研究ではSuper-EPF測定のための適正な条件を検討した。次に、完成した条件によるELISAでAIの血清サンプルを多数測定し、妊娠鑑定結果との一致率を検討した。なお、サンプルは当大学農学部附属御明神牧場のAIした黒毛和種40頭から、AI当日（Day 0）およびAI後7日目（Day 7）の血清を採取した。診断の評価は、Day 0とDay 7の吸光度間の有意差が危険率5%以下でDay 7で高い場合をSuper-EPF陽性とした。各牛はAI後42日目に超音波診断装置による妊娠診断（USPD：Pregnancy Diagnosis using Ultra Sonic diagnostic equipment）を行った。

### 2.2 妊娠期間中の血清中Super-EPFの変化

RITestでは、Super-EPFは受精後24時間以降の血液中で検出され、妊娠期間（280日）の2/3（186日）ころから検出されなくなることが報告されている<sup>2,6)</sup>。そこで、福島県畜産研究所のホルスタイン種6頭にAIを行い、継時的にAI後Day1, 3, 7, 14, 21, 30, 60, 120, 240, 300に血液を採取した（報告書作成現在240と300日目は未採取）。また、御明神牧場の黒毛和種1頭にETを行い、5～7日おきに302日まで採血した。次に、2.1で完成したSuper-EPF ELISAに各サンプルを適用し血清中Super-EPFの推移を検討した。なお、評価はDay 0の吸光度をブランクとして、各サンプルの吸光度から差し引いた吸光度の差をグラフにして考察した。

### 2.3 過排卵処理後AIを行った牛から回収された胚の数とSuper-EPFの関係

母体の血清中Super-EPFが、回収胚の数とラックに関係するかを検討した。福島県畜産研究所の4頭の黒毛和種に過排卵処理（SOV）後AIを

実施し、その後に胚を回収し採卵0, 1, 2, 3日に血清を採取した。この血清をSuper-EPF ELISAに適用し、Super-EPFの結果と胚の数および胚のランクとの関係を検討した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 Super-EPF ELISAの条件確定と妊娠鑑定結果

RITest用の妊娠 (P: AI後7日目) と非妊娠 (NP: 発情0日目) 標準血清は、Pがロゼット抑制力価 (RIT)  $\geq 4$  で陽性、NPがRIT  $< 3$  で陰性であり、この血清を使用してSuper-EPF ELISAの測定条件を検討した。その結果、第1抗体としてウサギ抗牛Super-EPF IgGを5,000倍希釈、第2抗体としてBiotin標識ヤギ抗ウサギIgおよび、Streptavidin標識HRPを1,000倍希釈にして $A_{450nm}$ で測定した場合、測定サンプルの希釈倍率が10万倍の時、Pの吸光度はNPの吸光度より有意 ( $P < 0.01$ ) に高かった。そこで、この条件で40頭の牛のDay 0とDay 7の血清を測定し、USPDの結果と比較した (Table 1)。その結果、40頭中36頭で結果が一致し、その確率は90%であった。その内訳は、ELISAとUSPD両方とも陽性であった牛は23頭、両方とも陰性の牛が13頭、ELISAの結果が陽性でUSPDが陰性の牛が2頭、その逆が2頭であった。また、ELISAとUSPD両方とも陽性の牛のDay 0の平均吸光度は0.919、Day 7は1.347であり、危険率0.1%で有意にDay 7が高かった (Table 2)。なお、両方とも陰性の牛はDay 0で1.026、Day 7で1.167と有意な差は認められなかった。さらに、すべての測定サンプルの測定値におけるSDは0.383から0.454と安定していた。したがって、本測定法ではAI後7日目の血清とAI時の血清の吸光度を比較することによって妊娠診断が可能であることが証明された。また、ELISAの結果が陽性でUSPDの結果が陰性の牛は、AIの

Table 1 Pregnancy diagnosis of cattle by Super-EPF ELISA

No.	Cattle No.	ELISA	USPD	Agree
1	B1.17	+	+	✓
2	B9.5	+	+	✓
3	B8.18	+	+	✓
4	B0.1	+	+	✓
5	B8.28	+	+	✓
6	B9.29	+	+	✓
7	B7.14	+	+	✓
8	B0.26	+	+	✓
9	B0.28	+	+	✓
10	B0.15	+	+	✓
11	B9.24	+	+	✓
12	B2.6	+	+	✓
13	B2.1	+	+	✓
14	B2.4	+	+	✓
15	B2.7	+	+	✓
16	B2.8	+	+	✓
17	B9.1	+	+	✓
18	B2.2	+	+	✓
19	B0.23	+	+	✓
20	B9.32	+	+	✓
21	B2.13	+	+	✓
22	B2.4	+	+	✓
23	B0.25	+	+	✓
24	B1.6	-	-	✓
25	B9.5	-	-	✓
26	B0.15	-	-	✓
27	B9.8	-	-	✓
28	B9.8	-	-	✓
29	B9.9	-	-	✓
30	B9.8	-	-	✓
31	B0.26	-	-	✓
32	B9.31	-	-	✓
33	B9.8	-	-	✓
34	B9.31	-	-	✓
35	B9.28	-	-	✓
36	B0.32	-	-	✓
37	B8.28	+	-	Disagreement
38	B2.13	+	-	Disagreement
39	B2.19	-	+	Disagreement
40	B2.20	-	+	Disagreement

Agreement Rate : 90% (36/40)

USPD : Pregnancy Diagnosis using Ultra-Sonic diagnostic equipment

**Table 2** Absorbance of pregnancy and nonpregnancy samples by Super-EPF ELISA

	NP		P	
	Day 0 <sup>a</sup>	Day 7 <sup>a</sup>	Day 0 <sup>b</sup>	Day 7 <sup>c</sup>
After AI				
Absorbance	1.026	1.167	0.919	1.347
SD	0.383	0.409	0.385	0.454
Number of bovine	15	15	25	25
T-test	P = 0.339		P < 0.001	

a-a : no significant difference, b-c : significant difference

7日まで胚は存在していたが、42日のUSPDまでの間に流産したか早期胚死滅した可能性がある。一方、本研究ではELISAの結果が陰性でUSPDの結果が陽性のケースが存在した。この原因は、その個体のDay 7の血清中Super-EPFが検出限界以下であり、その後上昇した可能性も考えられる。さらなる検討が必要である。

### 3.2 妊娠期間中の血清中Super-EPFの変化

ホルスタイン6頭の吸光度はDay 3日まで上昇し、No.14以外はDay21から120日までの間にゼロ近くに低下した (Fig. 1)。No.14はDay30がピークとなり、その後Day120まで若干低下したが吸光度は高いままであった。また、No.40と29はDay21以降、No.17はDay30以降ゼロであった。No.37はDay21でピークに至り、Day120でゼロ付近に低下した。なお、No.17以外は45日目のUSPDで胎仔を確認している。No.17はAIの30日目と60日目の間の45日目にUSPDを行ったところ胎仔が確認できず、60日目と120日目の間にAIを行っているが、その後の妊娠診断 (USPD) では陰性であった。過去のRITestではSuper-EPFは妊娠期間の2/3期以降陰性に低下することが示唆されているが、本研究で初めてELISAの結果と一致した。しかし、No.40と29はDay14日以降ゼロとなっており、再測定も含めて評価が必要と思われる。一方、黒毛和種1頭はET後133日までの吸光度の変化を見ると、ET後Day12からDay33まで吸光度は上昇し、その後急速に低下しDay47

以降でゼロとなった (データは示していない)。したがって、本測定方法を妊娠診断に用いるには、ホルスタイン種と黒毛和種ともおおよそDay20までに実施すべきものと推察された。ホルスタイン種のDay240と300および、黒毛和種のDay140から302の測定はまだであるが、これらのサンプルも含めてSuper-EPFの変化をさらに検討する必要がある。

### 3.3 回収胚の数とSuper-EPFの関係

4頭の血清中Super-EPF ELISAの吸光度の変化と、胚のランクおよび回収胚数はFig. 2に示した。過去のRITestの結果では、採卵1日後からSuper-EPFは陰性に低下することが示唆されている。本研究では4頭すべてが採卵時は陽性 (P < 0.05) であり、採卵後1日目では吸光度は0.4から0.8程度と高く、その後2から3日目に吸光度は減少した。したがって、胚を回収すると血清中Super-EPFは3日以降に陰性に低下することが示唆された。また、受精卵の存在がSuper-EPFに必要なことも確認された。一方、Aランク胚を生産したNo.16と15の採卵時の吸光度は他の個体より若干高い傾向があった。しかし、No.23は変性卵のみにも関わらず、吸光度は0.5程度とA'ランク胚を生産したNo.9よりも高く、子宮中の胚の数およびランクはSuper-EPFの吸光度に大きな影響を及ぼさないことが推察された。

以上のことから、本測定法は牛の生殖系の研究にとって新たなツールとなり得ることが示唆され

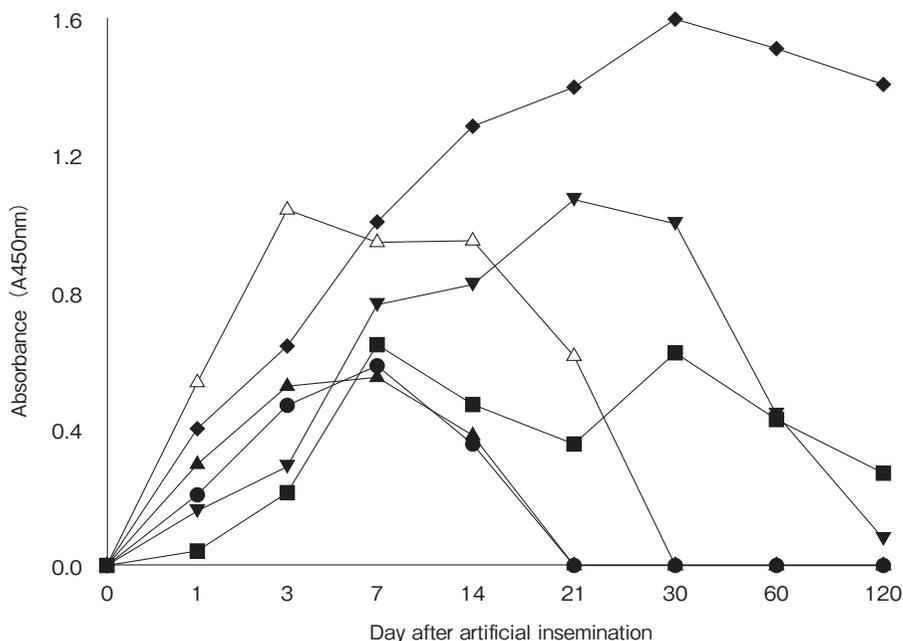


Fig. 1 Changes of absorbance after artificial insemination by Super-EPF ELISA  
 Cattle No. : ● No.40 ▲ No.29 ▼ No.37 ■ No.39 ◆ No.14 △ No.17

Cattle No.	Rank of Embryo							Total
	A	A'	B	C	Degeneration	Unfertilize	Zona pellucida	
9	0	1	0	0	1	1	2	5
15	1	0	1	0	0	0	0	2
16	5	1	0	0	0	0	0	6
23	0	0	0	0	3	0	0	3

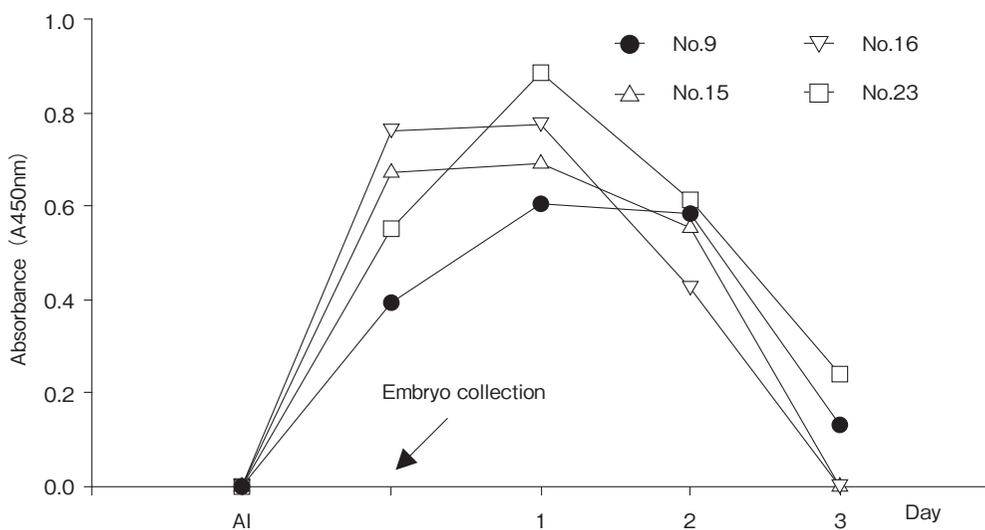


Fig. 2 Changes of Super-EPF ELISA absorbance in cattle collected embryo and rank of collected embryo

た。しかし、本研究ではサンプルの採取に時間を要し、いくつかのサンプルの測定が行えなかった。また、血清中のSuper-EPF含量を測定するための検量線の作成を検討したが、本研究期間内では良好なデータが得られなかった。引き続き検討することで、安定した測定系になると思われる。さらに、庭先で使用出来るようにするためにはモノクローナル抗体の作出が重要である。

#### 4. 要 約

本研究はSuper-EPF ELISAの測定系の確立を行い、確立した方法による牛の早期妊娠診断（AI後7日目）を実施した。その結果、40頭の牛のUSPDとSuper-EPF ELISAとの診断結果の一致率は90%と高く、AI後7日目には牛の受精・妊娠診断は可能であることが示唆された。また、AIから分娩までの血清を測定した結果、Super-EPF ELISAではAI後14日から30日まで陽性で、その後陰性に低下した。さらに、胚回収後のSuper-EPFはほとんどの個体で回収後の3日目から陰性に転じた。これは、母体の血清中Super-EPFは胚の存在に影響を受けることがSuper-EPF ELISAを使用して初めて示唆され

た。しかし、胚の数・ランクと血清中Super-EPFとの間には関連性はないことが推察された。さらに検討することによって、Super-EPF ELISAは、牛の早期受精・妊娠診断技術として使用可能であることが証明された。

#### 文 献

- 1) Morton, H., Hegh, V., Clunie, G. J. A. : Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test, *Nature*, **249**, 459~460, 1974.
- 2) 伊藤（松原）和衛：家畜の早期妊娠因子に関する研究, 東北畜産学会報, 45, 80~91, 1996.
- 3) Cavanagh, A. C., Morton, H. : The purification of early pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10, *European Journal of Biochemistry*, **222**, 551~560, 1994.
- 4) Kawamura, K., Fukuda, F., Itoh, H., Ito, K., Kodama, H., Kumagai, J., Kumagai, A., Tanaka, T. : Chaperonin 10 in the rat oocyte and early embryos : its expression and activity for early pregnancy factor, *American Journal of Reproduction and Immunology*, **44**, 242~248, 2000.
- 5) Ito, K., Takahashi, M., Kawahata, K., Goto, T., Takahashi, J., Yasuda, Y. : Supplementation effect of early pregnancy factor-positive serum into bovine in vitro fertilization culture medium, *American Journal of Reproduction and Immunology*, **39**, 356~61, 1998.
- 6) 徳中紘太, 鎌田晴己, 松原（伊藤）和衛：超早期妊娠因子の正体を追い求めて, *Journal of Reproductive Immunology and Biology*, **25**, 14~30, 2010.

## 異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定 (II)

Novel standard for artificial insemination timing based on different estrous detection criteria in cattle (II)

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 the effects of number of cows in estrus on other estrus-related behaviors and increased activity as estrus signs for the purposes of determining more optimal timing of insemination. 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. Number of cows in estrus influences estrous intensity, but not activity amount. When 2 or more cows were in estrus the onset of estrus was hastened and this should be taken into consideration to determine optimal insemination timing by the activity increment. Optimal insemination timing may be delayed in dominant cows under the circumstance that 2 or more cows are in estrus as compared to in non-dominant cows under circumstance that 1 cow is in estrus. It was indicated that both the number of cows in estrus and the dominance of cows in estrus influence the estrous activity resulting in influencing the optimal timing of insemination to the 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、特にスタンディング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<sup>1,2)</sup>。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<sup>3)</sup>。また、スタンディング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。

平成27年度の本研究助成では、目視観察による予備的検討と、同時発情条件下でのビデオによる連続観察を実施した<sup>4)</sup>。目視観察結果から、最も早く発現したのは匂い嗅ぎ行動であり、スタンディング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スタンディング行動を基準とした場合が最も短く、歩数上昇および匂い嗅ぎとの時間差は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。連続観察結果から、開始時間が一般的な範囲にあったのはスタンディング行動のみであり、終了時間では、匂い嗅ぎ、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スタンディング行動と発情スコアのみであった。したがって、スタンディング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と考えられた。同時発情条件下では、スタンディングおよびマウンティング行動は容易に発現し、顎のせと匂い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。また、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と考えられた。

一方、同時発情条件下と異なり、単独発情条件下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、今年度は同様の観察実験を単独発情について実施し、同時発情の結果

と比較した。

## 2. 方法

### 2.1 単独発情の誘起

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、単独での発情を確実に誘起するため、実験開始前に全供試牛について超音波診断装置による卵巣観察を行い、それまでの発情周期の経過から退行期黄体を有すると考えられる牛には臍内留置型黄体ホルモン製剤（CIDR：シダー1900，ゾエティスジャパン）を挿入し、全頭で黄体期を維持した。退行期黄体を有する牛から1頭選抜し、CIDRの抜去により発情を誘起した。当該牛の排卵確認の1～2日後、次の対象牛のCIDRを抜去する、という手順を繰り返すことによって14回の単独発情を誘起した。

### 2.2 発情行動の記録と解析

全供試牛の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。3台のビデオカメラ（RD-4402，株アルコム）を用いて発情行動を記録し、CIDR抜去2日後から、1日4回の給餌時に6時間間隔で主席卵胞の存在を確認し、その消滅の3時間前を排卵時刻とした。Van Eerdenburgら<sup>5)</sup>の発情スコア表（Table 1）にしたがい、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80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1.4倍以上への上昇を基準とした。発情スコア表に記載された行動に、他の牛への頭突き行動も加え、それらの特性を、前年度得られた同時発情での結果（13頭、のべ22発情）<sup>4)</sup>と比較した。

### 2.3 牛群内順位と発情行動の関係

近藤の提示した餌槽優先法<sup>6)</sup>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

Table 1 Scoring scale for estrous behavior

Behavior	Points
Standing heat	100
Mounting headside of other cows	45
Mounting (or attempting) other cows	35
Resting with chin on other cows	15
Mounted by other cows but not standing	10
Sniffing vagina of other cows	10
Restlessness	5
Flehmen	3

時刻への影響を解析した。14頭の14発情について、上位7頭、下位7頭に分けて発情行動の頻度を、前年度得られた同時発情での結果（上位・下位各6頭、のべ20発情）<sup>4)</sup>と比較した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 発情スコアおよび行動量の比較

発情スコアは、同時発情において単独発情と比較して有意に高かったが ( $P < 0.05$ , Fig. 1A), スコアに基づく持続時間については両者間に差はなかった (Fig. 1B)。発情開始および終了から排卵までの時間は、どちらも同時発情で長かったが、有意差は検出されなかった (Fig. 2)。一方、歩数倍率から見た行動量の上昇については、最大倍率の平均値 (Fig. 3A) および発情持続時間 (Fig. 3B) に差はなかった。発情開始および終了から排卵までの時間はFig. 4に示すように、発情スコアと同様、同時発情で延長し前者では10時間長かった ( $P < 0.05$ )。これらの結果は、同時発情では単独発情と比較して、排卵を基準とした発情の開始・終了ともに、数時間早い可能性を示している。また、発情頭数は行動量の上昇には影響せず、同時発情では発情行動の強度を高め、排卵を基準とした発情開始時間を早めていると考えられた。したがって、特に行動量の上昇から授精適期を判断する場合、同時発情では単独発情よりも発情開始から排卵までの時間は延長する、という点に留意が必要である。

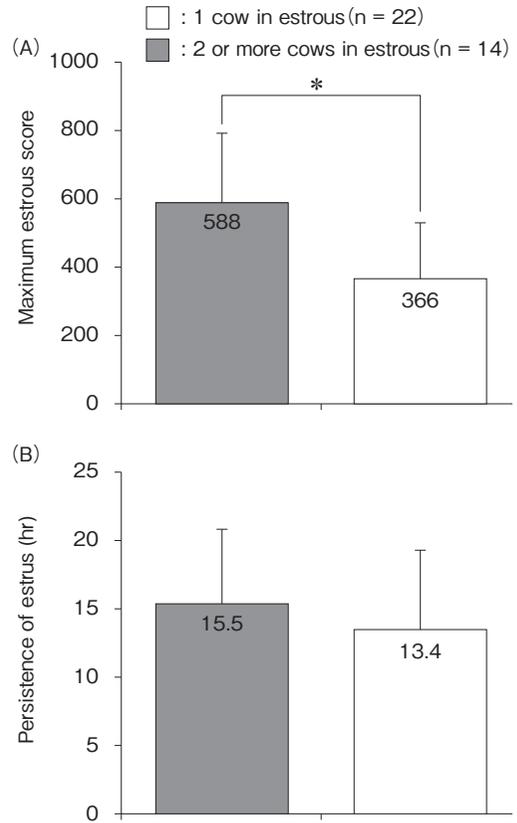


Fig. 1 Effect of the number of cows in estrus on estrous score. Vertical bar presents SD.

\*Values differ significantly between two groups ( $P < 0.05$ ).

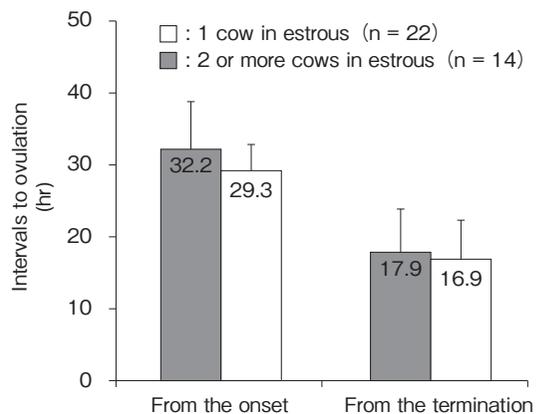


Fig. 2 Intervals from the onset and termination of estrus defined by estrous score to ovulation. Vertical bar presents SD.

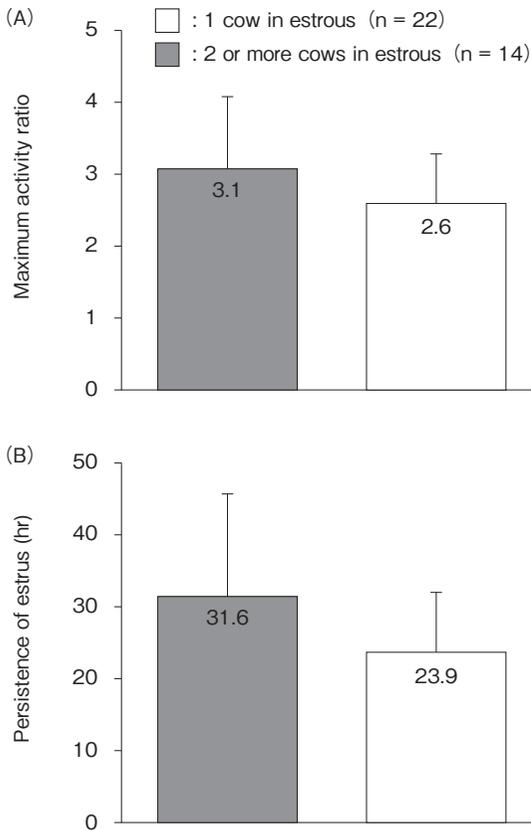


Fig. 3 Effect of the number of cows in estrus on activity. Vertical bar presents SD.

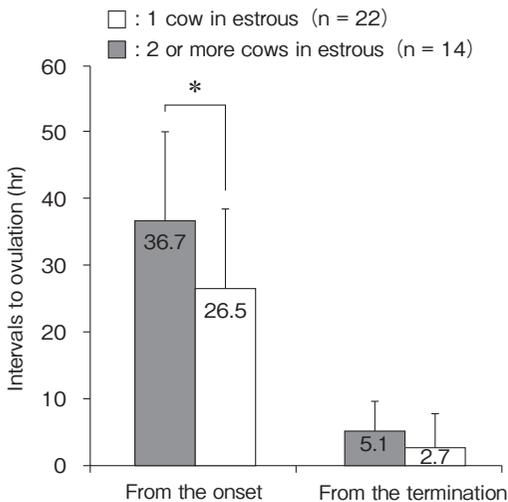


Fig. 4 Intervals from the onset and termination of estrus defined by activity ratio to ovulation. Vertical bar presents SD. \*Values differ significantly between two groups (P < 0.05).

### 3.2 各発情行動の比較

次に、各行動別に同時・単独間を比較してみると、排卵との関係では、フレーメン以外の行動で発情開始から排卵までの時間は、同時発情で延長していることが示された (Fig. 5A)。一方、発情終了から排卵までの時間は、匂い嗅ぎ、頭突きおよびフレーメンで、同時発情のほうが長かったが (P < 0.05)、他の行動に差はなかった (Fig. 5B)。各行動の持続時間については、同時発情でマウンティング行動が長く (P < 0.05)、逆にフレーメンは短かった (P < 0.05, Fig. 6A)。これらを1時間あたりの行動回数で見ると、スタンディング行動は同時発情で単独発情の5倍を超え (P < 0.05)、マウンティング行動の頻度も高かった (P < 0.05, Fig. 6B)。一方で、匂い嗅ぎおよび頭突き行動は単独発情で同時発情の2倍程度の頻度で観察された (Fig. 6B)。フレーメンについては、同時発情で頻度が高かった (P < 0.05)。したがって、単独発情ではスタンディング行動の相手を見つけられないため、他の牛の匂いを嗅いで回る行動や、マウンティング/スタンディング行動が不成立になった結果と推測される頭突き行動が、より頻繁にみられるものと解釈できる。また、単独発情では顎のせ行動までは他の牛に許容されても、それに続くマウンティング行動につながらないケースが多いものと推測できる。

これらの結果と、3.1で示した両者間に行動量の差はない、ということを考え合わせると、行動量を裏付けている発情行動は、同時・単独発情間で異なるといえる。

### 3.3 牛群内順位の影響

発情スコアについては、同時・単独発情ともに、上位・下位間に差はなかった (Table 2)。行動量の上昇については、終了から排卵までの時間が、単独発情の下位牛で同時発情の上位牛と比較して極端に短く (P < 0.05)、有意差はないもの

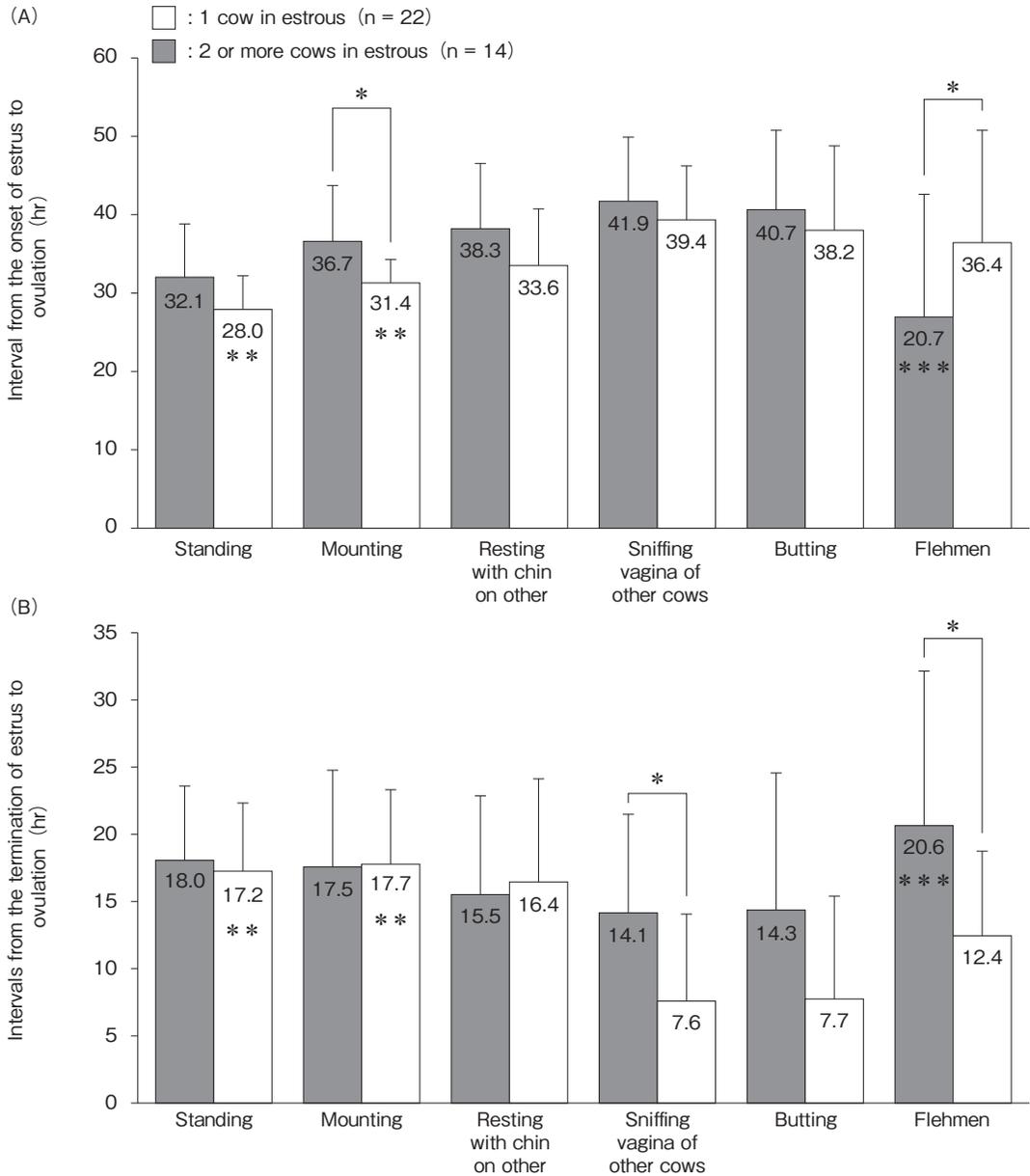


Fig. 5 Intervals from the onset (A) and the termination (B) of estrus defined by different estrous-related behaviors to ovulation.

\*Values differ significantly between two groups ( $P < 0.05$ ).

\*\*n = 13, \*\*\*n = 11

の、発情開始から排卵までの時間も単独発情・下位牛では同時発情・上位牛よりも平均で約13時間短いことから、行動量上昇による発情開始を指標とした場合、前者では後者よりも授精適期が半日程度早くなる可能性が示された。

スタンディング行動の開始から排卵までの時間は単独・上位牛で最も短く、同時・上位牛と比較して約8時間短かった ( $P < 0.05$ , Table 3A)。また、持続時間は、単独・上位牛で7時間と、他の3群の半分程度であった。1時間あたりの平均頻

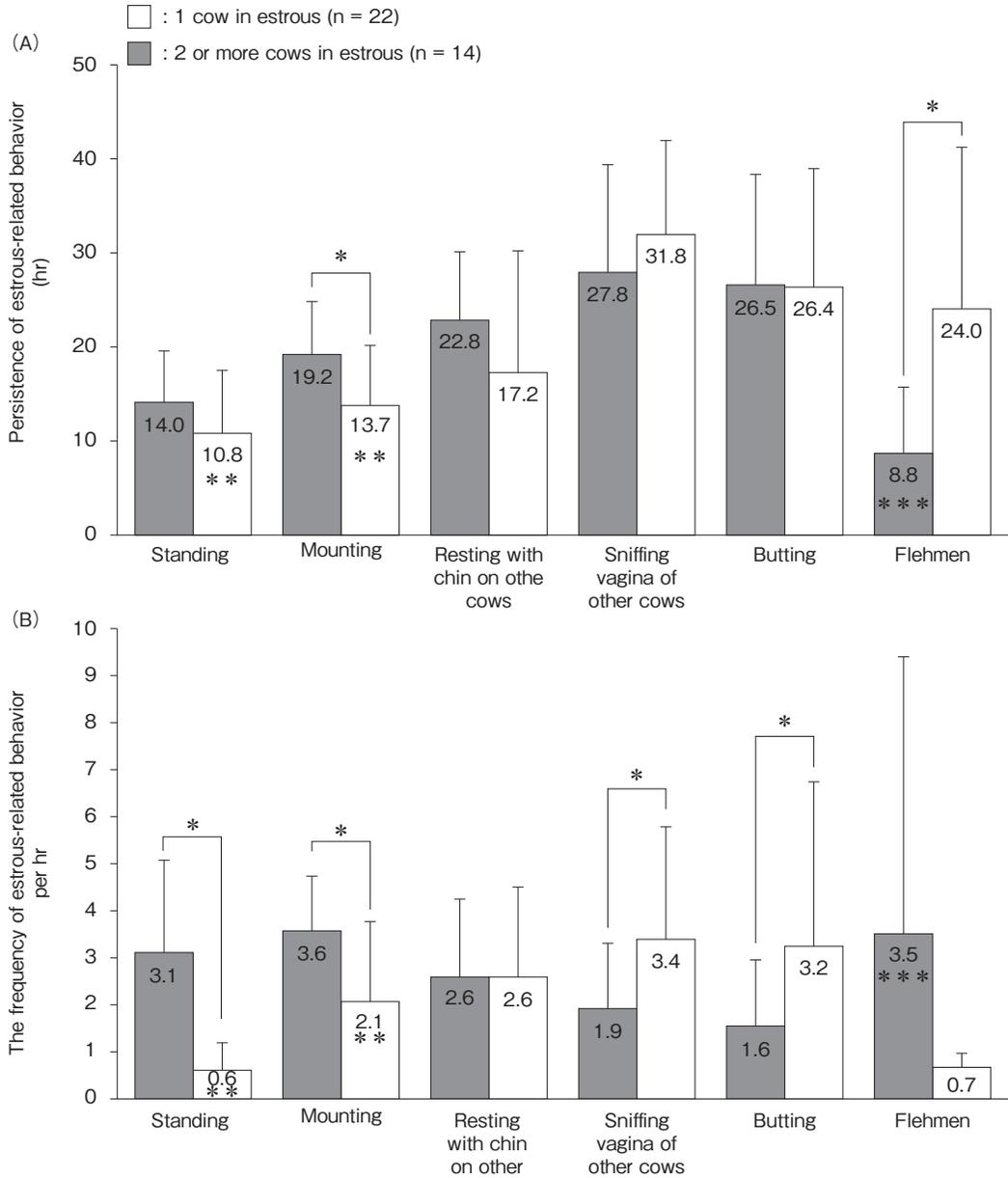


Fig. 6 Persistence of estrus defined by different estrus-related behavior (A) and its frequency per hr.

\*Values differ significantly between two groups ( $P < 0.05$ ).

\*\* $n = 13$ , \*\*\* $n = 8$

度は、単独・下位牛と同等であったことから、スタンディング行動に関しては、上位牛の単独発情で最も見つけにくいと考えられた。マウンティング行動に関しては、同時・単独それぞれにおいて、上位・下位牛間の有意な差は認められなかつ

た (Table 3A)。

顎のせ行動については、単独・下位牛で開始から排卵までの時間および持続時間が最も短く ( $P < 0.05$ , Table 3A), この条件下では顎のせ行動の発現が抑制されると考えられた。匂い嗅ぎ行動に

**Table 2** Effects of the number of cows in estrus and the order of cows in the herd on the estrous score and activity ratio

Detection methods of estrus		Number of cows in estrus			
		1		2 or more	
		Dominant (n = 8)	Non-dominant (n = 6)	Dominant (n = 11)	Non-dominant (n = 9)
Estrous score	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	29.3 ± 4.3	29.3 ± 2.3	32.9 ± 7.8	32.9 ± 3.1
	From the termination (B)	17.9 ± 6.3	15.7 ± 3.0	17.8 ± 7.4	17.4 ± 3.1
	Persistence of estrus (A-B, hr)	12.4 ± 5.3	14.7 ± 3.7	16.1 ± 5.1	16.4 ± 3.9
	Maximum score	386 ± 164 <sup>b</sup>	339 ± 142 <sup>b</sup>	603 ± 217 <sup>a</sup>	603 ± 183 <sup>a</sup>
Activity ratio	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	27.6 ± 15.0	25.1 ± 2.9	38.2 ± 15.1	35.9 ± 11.1
	From the termination (B)	4.1 ± 6.0 <sup>ab</sup>	0.8 ± 1.0 <sup>b</sup>	6.7 ± 4.3 <sup>a</sup>	3.5 ± 4.0 <sup>ab</sup>
	Persistence of estrus (A-B, hr)	23.5 ± 10.4	24.3 ± 2.8	31.5 ± 15.5	32.5 ± 13.7
	Maximum ratio	2.6 ± 0.7	2.6 ± 0.7	3.0 ± 0.8	3.3 ± 1.2

Data are presented as Mean ± SD.

<sup>ab</sup>Values with different superscript significantly differ (P < 0.05).

**Table 3A** Effects of the number of cows in estrus and the order of cows in the herd on each estrous-related behavior

Estrous-related behaviors		Number of cows in estrus			
		1		2 or more	
		Dominant (n = 8)	Non-dominant (n = 6)	Dominant (n = 11)	Non-dominant (n = 9)
Standing	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	26.5 ± 4.9 <sup>b</sup>	29.7 ± 1.9 <sup>ab</sup>	34.1 ± 7.1 <sup>a</sup>	30.8 ± 5.6 <sup>ab</sup>
	From the termination (B)	19.5 ± 5.2	14.5 ± 2.8	18.0 ± 7.1	17.6 ± 2.7
	Persistence of estrus (A-B, hr)	7.0 ± 6.2 <sup>b</sup>	15.2 ± 3.2 <sup>a</sup>	16.1 ± 3.5 <sup>a</sup>	13.2 ± 6.1 <sup>a</sup>
	Frequency per hr during estrus	0.5 ± 0.5 <sup>b</sup>	0.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.1 ± 1.9 <sup>a</sup>	3.3 ± 2.1 <sup>a</sup>
Mounting	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	32.8 ± 2.7 <sup>b</sup>	29.7 ± 2.0 <sup>b</sup>	39.4 ± 7.6 <sup>a</sup>	35.2 ± 4.4 <sup>ab</sup>
	From the termination (B)	19.0 ± 4.8	16.2 ± 5.6	19.1 ± 7.8	15.7 ± 5.6
	Persistence of estrus (A-B, hr)	13.9 ± 6.0 <sup>b</sup>	13.5 ± 6.3 <sup>b</sup>	20.4 ± 4.9 <sup>ab</sup>	19.5 ± 5.0 <sup>a</sup>
	Frequency per hr during estrus	1.5 ± 0.8 <sup>b</sup>	2.7 ± 1.1 <sup>ab</sup>	3.9 ± 2.0 <sup>a</sup>	3.4 ± 1.2 <sup>a</sup>
Resting with chin on other cows	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	35.5 ± 10.2 <sup>ab</sup>	31.8 ± 4.3 <sup>b</sup>	39.9 ± 8.2 <sup>a</sup>	37.3 ± 4.2 <sup>ab</sup>
	From the termination (B)	16.1 ± 5.7	16.8 ± 8.8	14.0 ± 8.1	16.8 ± 5.4
	Persistence of estrus (A-B, hr)	19.4 ± 14.4 <sup>ab</sup>	15.0 ± 9.7 <sup>b</sup>	25.8 ± 7.5 <sup>a</sup>	20.5 ± 5.4 <sup>ab</sup>
	Frequency per hr during estrus	2.6 ± 1.9	2.5 ± 1.8	2.3 ± 1.7	3.2 ± 1.3

Data are presented as Mean ± SD.

<sup>ab</sup>Values with different superscript significantly differ (P < 0.05).

Table 3B Effects of the number of cows in estrus and the order of cows in the herd on each estrous-related behavior

Estrous-related behaviors		Number of cows in estrus			
		1		2 or more	
		Dominant (n = 8)	Non-dominant (n = 6)	Dominant (n = 11)	Non-dominant (n = 9)
Sniffing vagina of other cows	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	43.0 ± 6.9	35.8 ± 4.1	43.1 ± 8.7	41.1 ± 7.3
	From the termination (B)	9.1 ± 6.1 <sup>ab</sup>	6.1 ± 6.0 <sup>b</sup>	11.8 ± 7.4 <sup>ab</sup>	16.2 ± 6.1 <sup>a</sup>
	Persistence of estrus (A-B, hr)	33.9 ± 11.7	29.8 ± 6.6	31.3 ± 11.4	24.9 ± 9.2
	Frequency per hr during estrus	3.1 ± 1.8 <sup>ab</sup>	3.7 ± 2.7 <sup>b</sup>	1.7 ± 0.6 <sup>a</sup>	2.3 ± 1.9 <sup>ab</sup>
Butting	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	40.5 ± 9.4	35.9 ± 9.8	39.9 ± 10.2	39.4 ± 10.7
	From the termination (B)	8.9 ± 7.6	14.5 ± 6.0	15.5 ± 7.8	11.3 ± 7.1
	Persistence of estrus (A-B, hr)	31.5 ± 13.1	21.5 ± 8.2	24.4 ± 7.3	28.1 ± 13.0
	Frequency per hr during estrus	2.7 ± 1.9 <sup>ab</sup>	3.8 ± 4.3 <sup>b</sup>	1.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	1.4 ± 1.3 <sup>ab</sup>
Flehmen	Intervals to ovulation (hr)				
	From the onset (A)	40.1 ± 6.6 <sup>a</sup>	31.6 ± 3.9 <sup>ab</sup>	30.0 ± 13.0 <sup>b*</sup>	26.0 ± 3.4 <sup>b*</sup>
	From the termination (B)	13.5 ± 6.6 <sup>b</sup>	11.0 ± 5.3 <sup>b</sup>	19.1 ± 7.7 <sup>ab*</sup>	22.9 ± 2.5 <sup>a*</sup>
	Persistence of estrus (A-B, hr)	26.6 ± 11.7 <sup>a</sup>	20.6 ± 5.1 <sup>ab</sup>	10.9 ± 6.3 <sup>b*</sup>	7.7 ± 4.8 <sup>b**</sup>
	Frequency per hr during estrus	0.6 ± 0.3	0.9 ± 0.4	2.0 ± 3.0 <sup>*</sup>	0.7 ± 0.3 <sup>**</sup>

Data are presented as Mean ± SD.

<sup>abc</sup>Values with different superscript significantly differ (P < 0.05).

\* n = 5, \*\* n = 2.

については、単独・下位牛で終了から排卵までの時間が最も短く、かつ頻度は最も高かった (P < 0.05, Table 3B)。頭突き行動については、単独・下位牛で最も高頻度に発現した (P < 0.05, Table 3B)。したがって、単独・下位牛では匂い嗅ぎおよび頭突きが最も優勢な発情行動であることが示唆された。フレーメンに関しては、同時・下位牛で持続時間が最も短く (P < 0.05)、頻度も低かったが、同時発情での欠測値が多かったこともあり、この理由については不明である (Table 3B)。

#### 4. 要 約

ビデオによる発情行動の連続観察および歩数計により、同時発情条件下での発情行動の特徴を明らかにした昨年度に続き、今年度は、これら同時発情と単独発情での行動を比較し、その違いを解析した。

その結果、同時発情では、単独発情と比較して

発情行動の強度は高くなるが、行動量には影響しないこと、および行動量を基準とした発情開始時間は早まることが分かった。したがって、特に行動量の上昇から授精適期を判断する場合、同時発情では単独発情よりも発情開始から排卵までの時間が長い、という点に留意が必要である。また、行動量の上昇を裏付けている発情行動は、同時・単独発情間で異なると考えられ、行動量上昇による発情開始を指標とした場合、単独発情の下位牛では、同時発情の上位牛よりも、授精適期が半日程度早くなる可能性が示された。

単独発情ではスタンディング行動の相手を見つけられないため、他の牛の匂いを嗅いで回る行動や、マウンティング/スタンディング行動が不成立になった結果と推測される頭突き行動がより頻繁に見られ、単独発情では顎のせ行動までは他の牛に許容されても、それに続くマウンティング行動につながるケースが多いものと推測でき

る。スタンディング行動に関しては、上位牛の単独発情で最も見つけにくいと考えられ、単独発情の下位牛では、匂い嗅ぎおよび頭突きが最も優勢な発情行動であることが示唆された。

以上、発情頭数と牛群内順位は発情行動に影響することが示され、その結果授精適期の判断にも影響することが分かった。

#### 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, 乳ウシ①, 基礎編, 乳ウシの生理, 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) 坂口実, 菊池元宏, 三浦弘：平成27年度食肉に関する助成研究成果報告書, 伊藤記念財団, 34, 175~180, 2016.
- 5) Van, Eerdenburg, F. J. C. M., *et al.* : *Vet. Quart.*, 18, 52~54, 1996.
- 6) 近藤誠司：北海道大学農学部紀要, 15, 192~233, 1987.

## 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（Ⅱ）

Development of novel system for quality evaluation of bovine embryos by analysis of mitochondrial function（Ⅱ）

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. Staining with JC-10 revealed the increase of mitochondrial membrane potential in morulae and blastocysts. Cytochrome c oxidase complex (COX) is one of the respiratory chain enzyme complexes and essential for cell respiration. In this experiment, Cox mRNAs were detected by RT-PCR. Cox mRNAs encoded by mitochondrial DNA were detected in all developmental stage. On the other hand, Cox mRNAs encoded by genomic DNA peaked at blastocyst stage. These results suggest that the mitochondrial respiratory activity in bovine embryos increased in morula and peaked in hatched blastocyst and the development of mitochondrial function depends on the gene expression of COX subunit encoded by genomic DNA. This study shows that the SECM technique is able to non-invasively assess the mitochondrial respiration function 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<sup>1,2)</sup>。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。そこで注目したのが、生体反応を非侵襲的に検出できる電気化学計測技術である。これまでに、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の開発に成功している。本研究では、ミトコンドリア呼吸機能を指標とする牛胚品質評価法と受精卵呼吸測定システムの有効性を検証するために、牛受精卵を用いた詳細なミトコンドリア呼吸機能解析を行った。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 高精度受精卵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。これまでの研究により、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ている<sup>3~5)</sup>。平成27年度の助成研

究調査では、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に、(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。その結果、これらの要素技術と、既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「受精卵呼吸測定システム」を構築することができた(Fig. 1)。平成28年度では、この「受精卵呼吸測定システム」の受精卵品質評価における有用性の検証を行った。

### 2.2 牛受精卵の培養

2.1で構築した受精卵呼吸測定システムの性能を評価するために、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細胞期胚から孵化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、各発生ステージのウシ胚を染色し、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

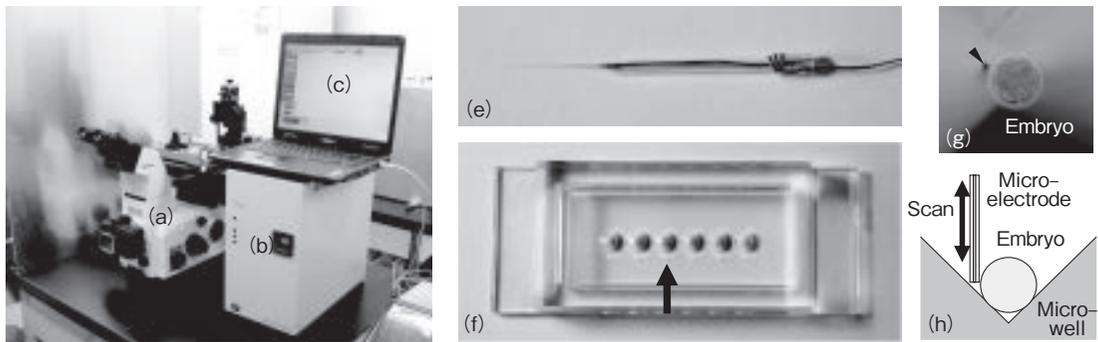


Fig. 1 A modified scanning electrochemical microscopy (SECM) measuring system. SECM system includes a measuring instrument on the inverted optical microscope stage (a), potentiostat (b), notebook computer (c), a microelectrode (e), and a plate (f) for measuring respiration activity of embryos. The plate 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).

活性を解析した。

ATPは多様なプロセスを通じて作り出されるが、最も効率的な方法はミトコンドリアの電子伝達系を経由した酸化リン酸化である。電子伝達系はミトコンドリア内膜に存在し、それぞれ多重のサブユニットによって構成される5つの酵素複合体（呼吸鎖複合体I，呼吸鎖複合体II，呼吸鎖複合体III，呼吸鎖複合体IV，ATP合成酵素）からなる。細胞に取り込まれる酸素の90%は、電子受容体として呼吸鎖複合体IV（シトクロムcオキシダーゼ：COX）により消費されている。哺乳類のCOXは計13のタンパクサブユニットで形成されている。ミトコンドリアゲノムはCOX1，COX2，COX3の3サブユニットを、一方の核ゲノムはCOX4，COX5a，COX5b，COX6a，COX6b，COX6c，COX7a，COX7b，COX7c，COX8の10サブユニットをコードしている<sup>6)</sup>。本研究では、電子伝達の終末酵素であるCOXを構成する核ゲノムおよびミトコンドリアゲノム由来のCOXサブユニットのmRNAをRT-PCR法により解析した。

### 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

単一牛胚の呼吸量計測には、先端径5  $\mu\text{m}$ 以下の白金電極が不可欠である。本研究では、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。その結果、酸素還元条件下（ $-0.6\text{ V}$  荷電下）において還元電流 $-1.0\text{ nA}$ 以下の感度を有する先端径2  $\mu\text{m}$ のディスク型マイクロ電極を作製することができた。この電極の性能評価を行った結果、単一ウシ胚および卵子の呼吸量計測が可能であった。また、感度向上に伴って検出されるノイズの量が増加したが、計測データには大きく影響しないことが分かった。

電気化学計測では感度の向上に伴い、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高くなる。そこで、昨年度までに開発したHTF (human tubal fluid) 培地をベースとする呼吸測定液の有効性を調べた結果、安定した還元電流の検出と酸素消費量の計測が可能であっ

た。

本研究では、新たに開発した高感度マイクロ電極と呼吸測定液をSECMに組み入れた受精卵呼吸測定システムの有用性を検討した。

### 3.2 呼吸測定による牛胚の品質評価

平成27年度の助成研究調査において、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明らかになった。また、各発生ステージの牛胚の呼吸量を測定した結果、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ることが明らかになっている (Fig. 2)。本研究では、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、発生過程におけるミトコンドリア膜電位活性の変化を調べた。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、ミトコンドリア膜電位活性の顕著な上昇が観察された (Figs. 3, 4)。さらに、形態良好胚と形態不良胚でミトコンドリア膜電位活性を比較したところ、形態不良胚では、ミトコンドリア膜電位の低下が観察された。

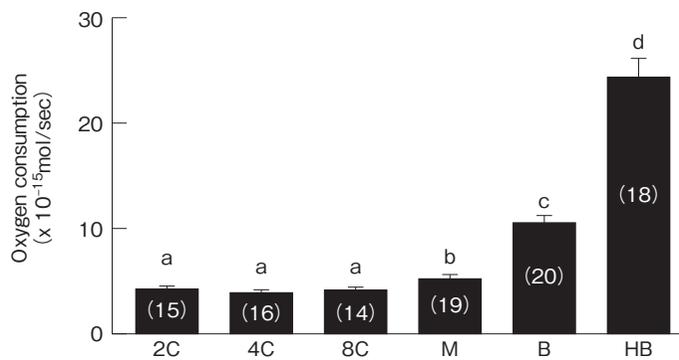


Fig. 2 Oxygen consumption rates of the single embryos were low from 2-cell to 8-cell. An increase in oxygen consumption rate was found at the morula stage and blastocysts and hatched blastocysts showed an even higher oxygen consumption rate. 2C : 2-cell, 4C : 4-cell, 8C : 8-cell, M : Molura, B : Blastocyst, HB : Hatched blastocyst. The numbers in parentheses represent the numbers of embryos examined. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Means with different subscripts are different.

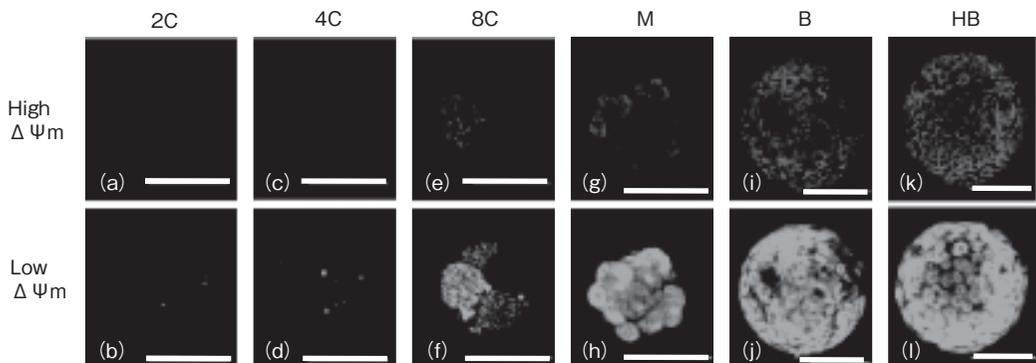


Fig. 3 Mitochondrial membrane potential (MMP) of bovine embryos during embryonic development. (a, c, e, g, i, k) Red fluorescens showing high (active) membrane potential. (b, d, f, h, j, l) Green fluorescens showing low membrane potential. An increase in MMP was found from the morula stage to blastocyst stage. 2C : 2-cell, 4C : 4-cell, 8C : 8-cell, M : Molura, B : Blastocyst, HB : Hatched blastocyst. Bars = 100  $\mu$ m.

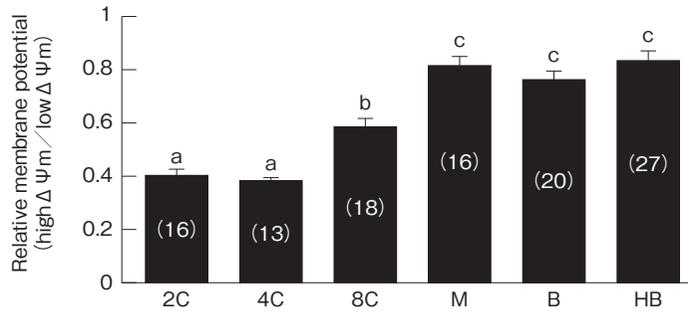


Fig. 4 Changes in mitochondrial membrane potential (MMP) of bovine embryos during embryonic development. MMP were low from 2-cell to 4-cell. An increase in MMP was found at the 8-cell stage and morula, blastocysts, and hatched blastocysts showed an even higher potential. 2C : 2-cell, 4C : 4-cell, 8C : 8-cell, M : Molura, B : Blastocyst, HB : Hatched blastocyst. The numbers in parentheses represent the numbers of embryos examined. Values are expressed as means  $\pm$  SEM. Means with different subscripts are different.

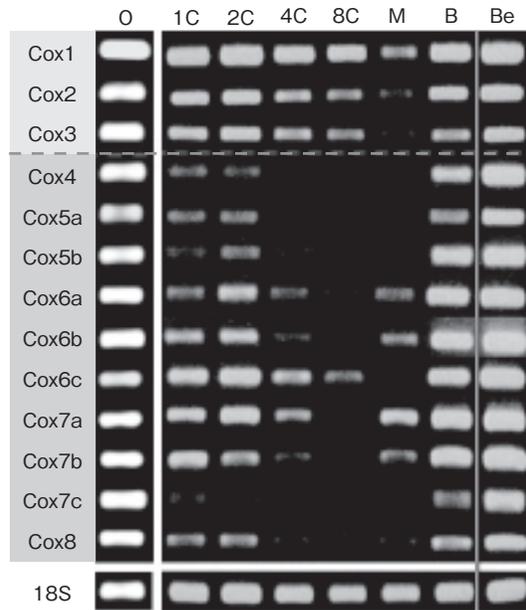


Fig. 5 COX mRNAs encoded by mitochondrial DNA (mt DNA) were strongly detected in all developmental stage. On the other hand, COX mRNAs encoded by genomic DNA (nDNA) increased from 8-cell embryos and peaked in blastocyst. O : oocyte, 1C : 1-cell, 2C : 2-cell, 4C : 4-cell, 8C : 8-cell, M : Molura, B : Blastocyst, Be : beef.

次に、COXサブユニットのmRNAをRT-PCR法により解析した結果、ミトコンドリアゲノム由来のCoxm RNAは、1細胞から胚盤胞のすべての発生ステージにおいて検出された (Fig. 5)。一方、核ゲノム由来のCox mRNAは、ミトコン

ドリアゲノム由来のCOXサブユニットmRNAと比べて発生過程で顕著な発現量の変化を示した。4細胞期から8細胞期にかけてmRNA量は減少したが、胚盤胞では核ゲノム由来のCox mRNAの発現量は顕著に増加した。以上の結果から、核

ゲノム由来のCox mRNAは、酸素消費量が増加する胚盤胞において発現量が顕著に増加することが明らかになった。これにより、本研究で開発した「受精卵呼吸測定システム」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できることが分子生物学的レベルでも確認できた。

本研究で開発した「受精卵呼吸測定システム」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、電気化学計測法を応用した呼吸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<sup>7,8)</sup>。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とともに、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培養幹細胞の機能診断などへの応用を試みる。

#### 4. 要 約

本研究では、電気化学計測技術を応用した「受精卵呼吸測定システム」とミトコンドリア呼吸機能を指標とする牛胚品質評価法の有効性を検証した。牛胚の呼吸測定に特化した高精度の受精卵呼吸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、ミトコンドリアの膜電位活性と

COX遺伝子発現の上昇と一致していることが示された。これらの結果は、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を示しているとともに、本研究で開発した受精卵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して有効であることが分かった。今後は、呼吸測定した胚の移植試験を行い、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検証する予定である。

#### 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) Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yoshikawa, S. : *Science*, **272**, 1136~1144, 1996.
- 7) Goto, K., Koike, M., Kumasako, Y., Utsunomiya, T., Araki, Y., Abe, H. : *Journal of Fertilization and Implantation*, **27**, 53~58, 2010.
- 8) 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同定と 検証

Identification of endometrium cell-derived factors involved in the early  
development of bovine embryo

細 江 実 佐・古 澤 軌

(農業・食品産業技術総合研究機構生物機能利用研究部門)

Misa Hosoe and Tadashi Furusawa

(Institute of Agrobiological Sciences, NARO)

To establish the embryo culture system for generating transplantable elongated bovine embryos in vitro, we screened the endometrium cell-derived factors that expression levels were upregulated in the presence of embryos. Total RNAs were purified from endometrium cells that cultured with hatched blastocysts and subjected to RNA-seq analysis. We identified 237 genes as being upregulated with a more than 2-fold difference or only detectable in cocultured endometrium cells. Among these genes, we selected the genes that expected to be concerned with the maternal-embryo communications, and focused on two secretory factors, PDCD1LG2 and BTC. The supernatants of Cos7 cells that transfected expression vectors of two genes were added to the embryo culture medium from day 3 to day 10 after IVF. Although there were no significant differences, the hatched rate of blastocysts and expression levels of ICM marker genes, NANOG, tended to be improved in BTC group. Conversely, the expression levels of POU5F1 and NANOG were slightly decreased in PDCD1LG2 group.

## 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。最近、受精後14日目前後の伸長胚を子宮から回収してその一部を切り取り（伸長胚バイオプシー）、遺伝子診断を行ったのちに再び子宮に戻して産子を得る技術が開発された<sup>1)</sup>。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、近年発展が目覚ましいゲノム育種等の遺伝子診断に有効な方法である。しかしいまだに移植可能な伸長胚を体外で作成す

る系が開発されていないために、伸長胚を得るには体外受精胚をいったん受胎牛に移植し、再び回収する必要がある。我々は伸長胚の発育に関わる子宮内膜細胞由来の因子を同定するため、伸長胚と子宮内膜細胞の共培養系とRNA-seqを利用したスクリーニングを行った（平成27年度当財団研究助成）。胚と共培養した子宮内膜細胞の遺伝子発現を非共培養細胞と比較した結果、非共培養区よりも2倍以上発現が高かった遺伝子を140個、また、共培養区のみで発現が確認された遺伝子を97個同定した。本年度はこれらの遺伝子について機能や発現様式を詳細に解析し、伸長胚の生育へ

の関与が期待される液性因子や、細胞表面分子や細胞外マトリクスなど母体-胚間のコミュニケーションに関わる分子を選別した。さらに選別した遺伝子の発現ベクターを構築して培養上清を調製し、伸長胚培養系への効果を調べた。

## 2. 方法

### 2.1 発現ベクターの構築と培養上清の調製

胚と共培養した子宮内膜細胞よりRNAを抽出し (RNeasy Micro Kit, QIAGEN), cDNA を合成した (PrimeScript™ II 1st strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)。BTCおよびPDCD1LG2について、全長を増幅するPCRプライマーを用いてcDNAを増幅し、pBlueScriptKS+ベクターにサブクローニングした。シークエンスを確認した後、pCDNA3.1プラスミドベクターにcDNAを組み込み発現ベクターを構築した。対照区には同発現ベクターにlacZの遺伝子を挿入したものをを用いた。エレクトロポレーション法によりCos7細胞にプラスミドを導入し (1.0 μg/100 μl OPTI-MEM, NEPA21, ネッパジーン), 10% FCS添加DMEM培地で培養した。2日後に培養上清を回収し、0.22 μMのフィルターを通したものを添加試料とした。

### 2.2 培養上清の胚への影響

常法により牛体外受精胚を作成し<sup>2)</sup>, 媒精後7日まで5% FCS添加SOFaa培地, 7-10日目までは10% FCS, 20ng/ml LIF, 0.5mM MTG, 非必須アミノ酸添加KnockOut-DMEM培地で, 38.5°C, 5% CO<sub>2</sub>, 5% O<sub>2</sub>, 90% N<sub>2</sub>の条件下で培養した。媒精後3日目に培地の半量をCos7細胞の培養上清に置換し, 以降毎日半量を培地交換した。媒精後7日目に胚盤胞への発生率, 10日目に胚盤胞の孵化率を調べるとともに, 各胚の内部細胞塊 (inner cell mass, ICM) と栄養膜細胞 (trophectoderm, TE) を分離し, それぞれにつ

いてRNAを採取した (PicoPure RNA Isolation Kit, Thermo)。前述の方法に従いcDNAを合成し, ICMおよびTEで発現するマーカー遺伝子について定量的PCRを行った。各遺伝子発現量はGAPDH発現量を内部標準として, 相対値で示した。

## 3. 結果と考察

はじめに前年度に行った胚-子宮内膜細胞共培養系のRNA-seqの結果について詳細な解析を行った。共培養開始後24時間と48時間目において, 非共培養区よりも2倍以上発現が高いと判定された遺伝子は140個であり, うち胚が産生するサイトカインであるインターフェロントウ (IFNtau) でも誘導される遺伝子は85個であった。また共培養区のみで発現が検出された遺伝子は97個であり, うちIFNtauでも誘導される遺伝子は20個であった。それぞれの上位20の遺伝子について, 機能と局在部位を調べたリストをChart 1に示した。このリストにおいて, 共培養区で2倍以上発現が高いと判定された遺伝子のうち, 細胞外あるいは細胞膜表面に局在すると思われる分子はそれぞれ12個および7個であった。また共培養区のみで発現が認められた遺伝子のうち, 細胞外あるいは細胞膜表面に局在すると思われる分子はそれぞれ9個および10個であった。これらの分子のうち, すでに妊娠牛の子宮内膜細胞で発現が上昇することが報告されているものを除外し, RT-PCRによる検証を行った。発現の上昇が確認された分子のうち, PDCD1LG2 (NM\_001292036) とBTC (NM\_173896) は24時間目においてIFNtau添加区よりも共培養区での発現誘導が顕著であった (Fig. 1)。PDCD1LG2はPD-1のリガンドであり, T細胞の増殖等に関わることが報告されている<sup>3)</sup>。またBTCはEGFファミリーに属する分子で, EGFレセプター等を介して細胞増殖

Gene Name	2-fold difference (also upregulated by FNAu)																				only expressing in occulter cells (also upregulated by FNAu)																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Gene Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Biological Process																																								
Cellular Component																																								
Gene Name	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Biological Process																																								
Cellular Component																																								

Chart 1 Top 20 differentially expressed genes in bovine endometrium cells cultured with hatched blastocysts.

制御に関与することが報告されている<sup>4)</sup>。これら2つの因子の発現ベクターをCos7細胞に導入し、培養上清を体外受精胚の培養系に添加して、発生率と分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、胚盤胞の発生率に有意な差は認められなかつ

たものの、BTC添加区において脱出胚盤胞の割合がやや高かった (Table 1)。ICMの指標であるPOU5F1, NANOGおよびCDH1の発現をRT-PCRで調べたところ、BTC添加区においてNANOGはやや高い値を示し、逆にPDCD1LG2添加区では

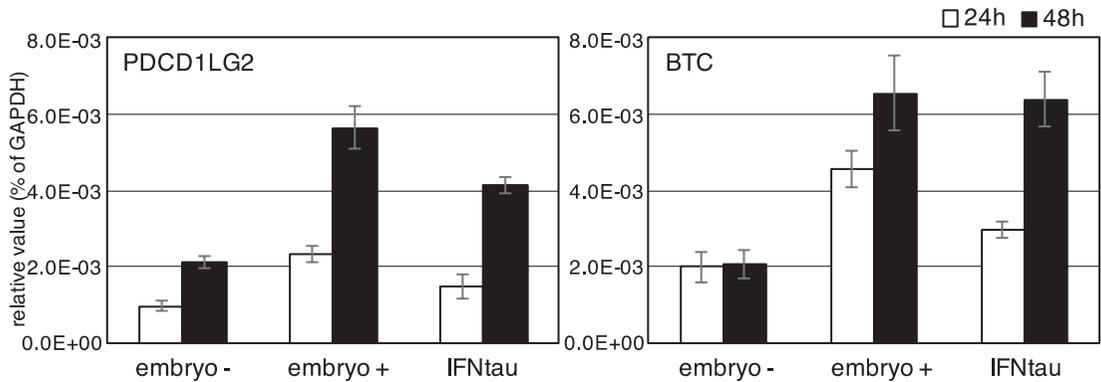


Fig. 1 Expression analysis of PDCD1LG2 and BTC genes in endometrium cells. Values were showed as relative values of GAPDH.

Table 1 Effect of endometrial cell-derived factors on early development of bovine embryos

expressing gene in Cos7 cells	No. of cultured embryos (8 cells)	No. of blastocysts at Day7 (%)	No. of hatched blastocysts at Day10 (%)
lacZ	57	29 (50.9)	17 (29.8)
PDCD1LG2	57	30 (52.6)	21 (36.8)
BTC	57	26 (45.6)	24 (42.1)

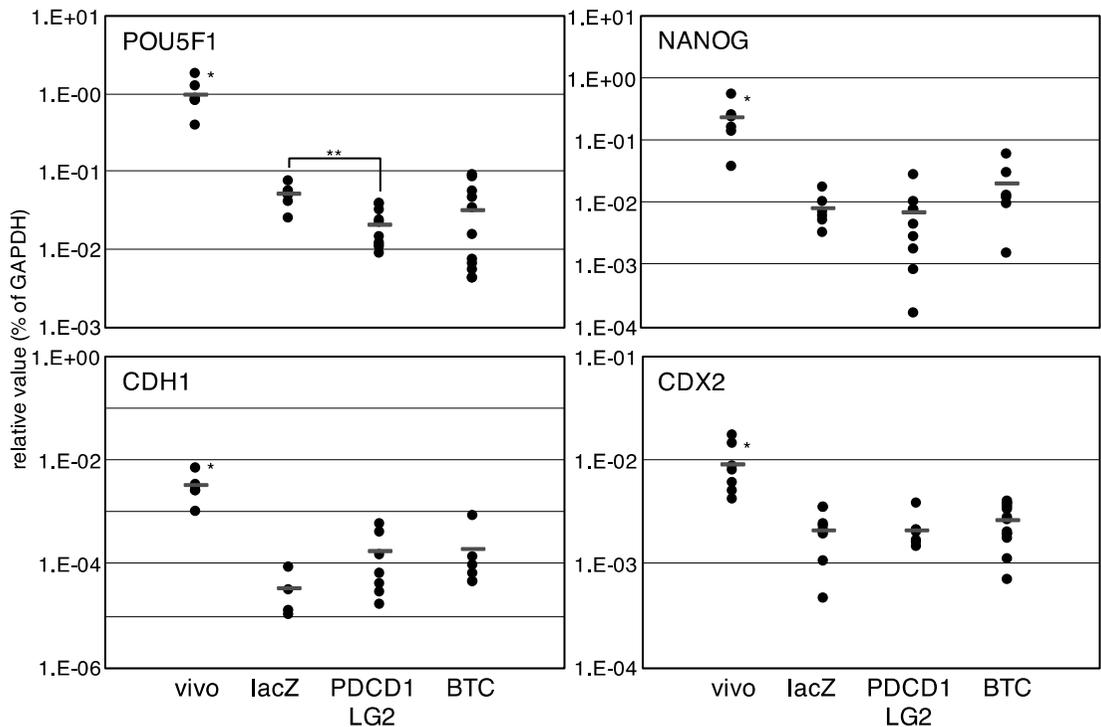


Fig. 2 Expression of ICM and TE marker genes in Day 10 embryos cultured with Cos7 cell-supernatant containing PDCD1LG2 and BTC. Values were showed as relative values of GAPDH. Asterisk represents significant difference ( $P < 0.05$ ).

低い傾向を示した (Fig. 2)。CDX2については3区間で顕著な差は認められなかった (Fig. 2)。

今回胚の発育への影響を調べた2つの因子では、BTCでやや胚の発育が改善される傾向が認められたものの、体内発生胚と比較し、POU5F1やNANOGなどICMの指標となるマーカー遺伝子の発現は有意に低かった (Fig. 2)。PDCD1LG2においてはICMの発育が悪くなる傾向が認められたことから、アンタゴニストや阻害剤が効果的である可能性がある。今後、RNA-seqで抽出した他の因子や、複数の因子による相乗効果について検討を行う予定である。

#### 4. 要 約

胚の存在下で発現が増加することが確認された子宮内膜細胞由来因子、PDCD1LG2とBTCについて胚の発生への影響を調べた。RT-PCRにより得た全長cDNAを発現ベクターに挿入し、Cos7細

胞に導入した。導入2日目に培養上清を回収し、体外受精胚の培養系に添加して、発生率と分化マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、胚盤胞の発生率に有意な差は認められなかったものの、BTC添加区において脱出胚盤胞の割合がやや増加した。ICMの指標であるPOU5F1、NANOGおよびCDH1の発現を調べたところ、BTC添加区においてNANOGはやや高い値を示し、逆にPDCD1LG2添加区では低い傾向を示した。CDX2については3区間で顕著な差は認められなかった。

#### 文 献

- 1) Kimura, K., Matsuyama, S. : *J Reprod Dev*, **60**, 210~215, 2014.
- 2) Hosoe, M., Shioya, Y. : *Zygote*, **5**, 71~376, 1997.
- 3) Greenwald, R. J., Freeman, G. J., Sharpe, A. H. : *Annu. Rev. Immuno*, **23**, 515~548, 2005.
- 4) Shing, Y., Christofori, G., Hanahan, D., Ono, Y., Sasada, R., Igarashi, K., Folkman, J. : *Science*, **12**, 259 (5101), 1604~1607, 1993.

## アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の 妊孕性に及ぼす影響

Effects of adipokine and insulin resistance on the bovine fertility

小林 仁

(宮城大学食産業学部)

Jin Kobayashi

(School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

The aim of the present study was to investigate nutritional and metabolic parameters during the pasture mating of low fertility cows. Blood samples from 8 infertile cattle were collected at start of pasture and the day after the mating day. Six cows (75%) became pregnant during the pasture mating. Cattle were keeping with pasture mating, but the deficient feed was supplemented with rice straw, which is a low protein feed. BCS, BUN and T-cho decreased significantly after grazing ( $p < 0.05$ ), whereas no difference was found in other parameters. In the steroid hormones, no difference was found in  $A_4$  between the start of pasture and after mating, whereas in  $E_2$  it was recognized to increase significantly after grazing ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference in adiponecin and  $TNF-\alpha$ .

In conclusion, it is suggested that feed management with low nutrition (low protein) may be conducted improving fertility.

### 1. 目 的

近年、牛の受胎率低下が続いており、その原因の解明が急務となっている。このため、生産現場ではその対策として、不受胎牛を妊娠させる不妊牛専門の牧場開設の動きがある。不妊牛専門の牧場の一つである宮城県のH牧場では、受託した不妊牛を放牧牧牛繁殖で一定期間繋養することで約80%が妊娠するとしており、注目を集めている。もし、不妊牛が入牧して受胎するまでの体調の変化を捉えることができれば、不妊の原因の解明や受胎率改善に役立つ可能性がある。

牛群の栄養状態や健康状態の推定に代謝プロファイルテスト (MPT) が行われている<sup>1)</sup>。

MPTは、牛群から一部の個体を抽出して多項目の血液生化学検査値 (BC値) やボディ・コンディション・スコア (BCS) を調べ、良好な生産性が期待できる繁殖ステージごとのBC値の範囲 (適正範囲) と比較することで調査牛の栄養状態や繁殖性を推定することができる。最近、良好な牛群を基にした黒毛和種における繁殖ステージごとのBC値やBCSの適正範囲が報告され<sup>2)</sup>、黒毛和種でもMPTが利用できる状況になった。このためH牧場が受託した不妊牛についてもMPTを実施することで、栄養状態や健康状態の推定が可能である。また、BCSが示す肥満の程度が母体の繁殖性に関係していることは、経験的に知られている。H牧場で受託する不妊牛に過肥と判断され

る牛が多いことから、脂肪細胞が産生するアディポネクチン (Adn)、レジスチンおよび腫瘍壊死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) などのアディポカインと血中ステロイドホルモンを調べることで脂肪代謝と繁殖性の関係を明らかにできないかと考えた。

以上のことから、本研究では、H牧場が受託した不妊牛が入牧して受胎するまでの体調の変化をMPTの血液検査に加え、アディポカインおよび性ホルモンを調べることで、不妊や受胎率改善に関係する要因の検討を行った。

## 2. 方 法

宮城県登米市南方町のH牧場で不妊牛として預託された黒毛和種の中から、ボディ・コンディション・スコア (BCS: るい瘦1~10肥満) が7以上の牛8頭を供試した。供試牛への餌の給与は、放牧による自由採食と、朝・夕2回の稲わらの給与 (約5 kg/頭) の粗飼料のみとした。調査項目は、目視によるBCSの測定と血液生化学検査値 (BC値)、ステロイドホルモン、アディポカインとした。採血は入牧時と入牧後の発情発見時の夕方、飼料摂取に集まったところを保定して頸静脈から真空採血管を用いて行った。採血管は血液分離剤および凝固促進用シリカ微粒子添加 (SST) 管およびフッ化名ナトリウム添加 (NaF) 管の2種類を用いた。採血後は-20℃に冷却した保冷剤入りの保冷バッグに入れ、宅配便で冷蔵のまま宮城大学に送付した。採血の翌日、研究室に搬入された採血管を20分間冷却遠心して血漿の分離を行い、直ちに測定するか、いったん-30℃で凍結保存した後3日以内に測定を行った。

BC値の測定は、臨床化学分析装置 (ドライケムNX500: 富士フイルム) により行った。測定項目は、ブドウ糖 (Glu)、尿素窒素 (BUN)、総コレステロール (T-cho)、アルブミン (Alb)、総タンパク質 (TP)、アスパラギン酸アミノトラン

スフェラーゼ (AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ (GPT) とした。血中ステロイドホルモンについてはアンドロステンジオン ( $A_4$ ) とエストラジオール17 $\beta$  ( $E_2$ ) について検討し、実際の測定は清水 隆博士の好意により帯広畜産大学にて行った。また、アディポカインとしてAdn、レジスチン、TNF- $\alpha$ は、Adiponectin ELISA Kit, Bovine (Cloud-clone Corp)、Resistin ELISA Kit, Bovine (Cloud-clone Corp)、TNF  $\alpha$  VetSet™ ELISA Development Kit (Kingfisher Biotech) を使い、マイクロプレートリーダー (SpectraMAX 250: Molecular Devices) にて測定した。

本試験の調査期間は、平成28年10月~平成29年2月とし、調査牛の年齢、産次数、空胎日数はTable 1に示したとおりである。

## 3. 結果と考察

預託された牛の中で、BCSが7以上の牛8頭 (未経産牛5頭、経産牛3頭) を調査した。調査牛の平均の空胎期間は8.0カ月 (3.0カ月~12.2カ月) で、入牧前の人工授精回数は4.4回 (2回~7回)、入牧後27.2日で発情を示した。このうち妊娠したのは6頭 (75%) で、未経産牛が3頭 (60%)、経産牛では3頭すべてが妊娠し、未経産牛に比べ経産牛が受胎に至る確率が高かった。また、妊娠した牛の半数が入牧後初回の発情で妊娠しており、放牧牧牛繁殖が不妊牛の妊娠性向上に有効であることが示された (Table 2)。

調査牛の入牧時および入牧後最終発情時 (以後、入牧後とする) のBCS、血液生化学検査値、ステロイドホルモンおよびアディポカインについてTable 3に示した。調査牛の入牧時と入牧後のBCSを比較すると、8.0から6.9に有意に減少した ( $p < 0.01$ )。また、BUNは10.0 mg/dlから3.4 mg/dlに、T-choは153.5 mg/dlから104.3 mg/dlにそれぞれ減少し、有意差が認められた (BUN  $p <$

**Table 1** Various traits of low fertility cows before pasture.

Traits	Mean	Range
Number of cows for analysis	8	
Age (yr.)	4.1	2.4-8.1
Months open <sup>#</sup>	8.0	3.0-12
Number of AI	4.4	2-7
Number of first-calf heifers	5	
Months open <sup>#</sup>	6.8m	3.0-10
Number of AI	4.3	2-7
Number of mature cows	3	
Number of calving	2.7	1-4
Months open	9.9	7.2-12.2
Number of AI	4.4	2-7

<sup>#</sup> : In the case of heifer, the age minus 15.

**Table 2** Reproductive status of low fertility cows during pasture mating.

Traits	Mean	Range
Number of cattle whose estrus cycle returned	8	
Days to first mating (range)	27.2d	(11-46)
Number of pregnant cattle (%)	6	(75.0)
First-calf heifers (%)	3	(60.0)
Mature cows (%)	3	(100.0)
Pregnant at first estrus (%)	3	(25)
Pregnant at estrus after second time (%)	3	(50)

0.01, T-cho  $p < 0.05$ )。一方, Glu, TGおよびTPには入牧時と入牧後の値に差は認められなかった。入牧後にBCS, BUNおよびT-choが減少する傾向は, 受胎牛および非受胎牛において共通して認められた。T-choとBUNは, 乾物摂取量と正の相関があるとされ, 入牧後の飼料摂取量の減少が血液生化学検査値に反映されたと推察された。肝臓機能を示すGOT, GPTでは, 入牧時の値が受胎牛に比べ非受胎牛において高い傾向を示した(受胎牛 GOT 71.5 IU/l, GPT 29.0 IU/l, 非受胎牛 GOT 83.5 IU/l, GPT 36.5 IU/l)。また, 受胎牛および非受胎牛ともに入牧時が入牧後よりもGPTが高い傾向を示し, 入牧時に肝機能が低下していた可能性が示唆された。

入牧時および入牧後の血中A<sub>1</sub>濃度に有意な差は認められなかったものの, 受胎牛に比べ非受胎牛ではA<sub>1</sub>が低い傾向を示した。E<sub>2</sub>濃度では入牧

時に比べ入牧後の血中濃度が有意に高くなった( $p < 0.05$ )。受胎牛と非受胎牛に分けると, 有意ではないものの入牧時よりも入牧後にE<sub>2</sub>濃度が高くなる傾向を示した。TNF- $\alpha$ は, 入牧時と入牧後に有意な差は認められなかったものの, 受胎牛に比べ非受胎牛で高くなる傾向を示した。また, アディポネクチンでは入牧時と入牧後および受胎牛および非受胎牛で差は認められなかった(**Table 3**)。

不妊牛として預託された牛の75%が妊娠していることから, H牧場の飼養管理が繁殖牛の妊孕性の向上に有効であることが明らかになった。BUNおよびT-choについて, 渡邊ら(2016)が報告した適正範囲(黒毛和種BUN 9~13 mg/dl, T-cho 71~107 mg/dl)と比較すると, T-choでは適正範囲よりも過剰であった値が入牧後は適正範囲内に減少し, BUNでは適性範囲内または適

**Table 3** BCS, blood biochemical values, steroid hormone and adipokine in low fertility cows during pasture mating condition.

	n	Blood sampling <sup>#</sup>	BCS	Glu (mg/dl)	BUN (mg/dl)	T-cho (mg/dl)	TG (mg/dl)	TP (mg/dl)
Total	8	Start of pasture	8.0**	75.4	10.0**	153.5*	8.3	7.1
		After mating	6.9**	74.0	3.4**	104.3*	8.5	6.9
Concived	6	Start of pasture	8.2**	77.8	8.6*	151.8*	9.3	7.2
		After mating	7.0**	73.0	3.6*	102.5*	8.8	7.0
Non-conceived	2	Start of pasture	7.5	68.0	13.9	158.5	5.0	6.8
		After mating	6.5	76.5	2.9	109.5	7.5	6.5

	Blood sampling <sup>#</sup>	Alb (mg/dl)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	A <sub>4</sub> (pg/ml)	E <sub>2</sub> (pg/ml)	TNF- $\alpha$ (ng/ml)	Adn (ng/ml)
Total	Start of pasture	3.8	74.5	30.9	897.5	32.1*	1.41	2921.7
	After mating	3.4	74.3	22.3	947.7	41.8*	3.23	2234.5
Concived	Start of pasture	3.8	71.5	29.0	1079.7	33.8	1.13	2755.2
	After mating	3.3	75.8	22.8	1023.6	38.7	1.53	2300.9
Non-conceived	Start of pasture	3.7	83.5	36.5	350.8	26.7	2.25	3421.1
	After mating	3.7	69.5	21.0	492.5	49.6	7.48	2068.7

<sup>#</sup> : start of pasture 0-6 days, after mating the day after the last mating, BCS : body condition score, Glu : glucose, BUN : blood urea nitrogen, T-Cho : blood urea nitrogen, TG : triglyceride, TP : total protein, Alb: albumin, GOT: aspartate aminotransferase, GPT : alanine aminotransferase, A<sub>4</sub> : androstenedione, E<sub>2</sub> : estradiol-17 $\beta$ , TNF- $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ , Adn : adiponectin, statistical significance is indicated by an asterisk (\*P<0.05, \*\*P<0.01)

正範囲よりも高い個体が入牧後は適正範囲以下に減少を示した。BUNは過剰でも不足でも繁殖性を低下させることが知られており、乾物摂取量の減少によってBUNが適正範囲を下回る場合、エネルギー不足による受胎率の低下や流産率の上昇が指摘されている<sup>3)</sup>。入牧後のGluが比較的高めに推移しているのに対しBUNは適正範囲以下に減少しており、この状態で妊娠している。このため消化粗タンパク質 (DCP) の少ない低タンパク粗飼料である稲わらを中心とした飼養管理に切り替えたことが受胎率向上に作用した可能性が

示唆された。

性ステロイドホルモンでは、前駆体であるA<sub>4</sub>濃度に差が認められないものの、E<sub>2</sub>濃度は入牧後に上昇が認められた。E<sub>2</sub>は発情周期に関与しており、分泌量の増加が受胎率向上に働いた可能性が考えられた。一方、Adnは入牧時に比べ入牧後に減少する傾向が見られた。Adnはインシュリン感受性を高め、インシュリン非依存性の細胞内へのグルコースの取り込みを促進させることが知られている<sup>4)</sup>。TNF- $\alpha$ は、入牧後に上昇する傾向が見られ、特に非受胎牛で顕著でTNF- $\alpha$ が増

加していた。入牧後は全頭でBCSが減少しており体脂肪も減少していると考え、脂肪細胞以外の細胞がTNF- $\alpha$ の産生に関与していると推察された。TNF- $\alpha$ は、炎症性サイトカインともいわれ脂肪細胞以外からも産生され、アポトーシスの誘導やIL-1, IL-6の他の炎症性サイトカインの産生を促進させる。今回の結果からは、アディポカインが牛の妊孕性に直接関与している結果は得られなかった。しかし、ヒトではアディポカインが母体代謝および妊娠性インシュリン抵抗性を支配していることが報告されており<sup>5)</sup>、今回測定を行っていないアディポカインについても調べる必要があると考えられる。

以上のことから、不妊牛としてH牧場に預託された牛が受胎した要因として、入牧前の高栄養の飼養管理から入牧後の低タンパク粗飼料のみの飼養管理に移行させたことが関係している可能性があり、性ステロイドホルモン産生が亢進することで妊孕性の向上が図られたと推測された。

#### 4. 要 約

不妊牛を専門の牧場で受託した牛8頭の入牧時と入牧後の牛のBCS、血液生化学検査 (Glu, BUN, T-cho, Alb, TP, ASTおよびGPT)、ステロイドホルモン (A<sub>4</sub>, E<sub>2</sub>)、アディポカイン (Adn, TNF- $\alpha$ ) を調べた。受託した牛は、低タンパク飼料である稲わらを中心とした粗飼料給与と牧牛

繁殖方式により、6頭 (75%) が妊娠した。入牧後はBCS, BUNおよびT-choが有意に減少したのに対し、その他の項目では差は認められなかった。ステロイドホルモンでは、A<sub>4</sub>では入牧時と入牧後に差は認められなかったのに対し、E<sub>2</sub>では入牧後に有意に上昇することが認められた。入牧時および乳牧後のAdnおよびTNF- $\alpha$ に有意な差は認められなかった。

以上のことから、不妊牛としてH牧場に預託された牛が受胎した要因として、入牧前の高栄養の飼養管理から入牧後の低タンパク粗飼料の飼養管理に移行させたことが関係し、性ステロイドホルモン産生が亢進することで妊孕性の向上が図られたと推測された。

#### 文 献

- 1) 岡田啓司：全国家畜産物衛生指導協会，生産獣医療システム乳牛編3，第1部代謝プロファイルテストを基本とした栄養管理 第1章～第V章，第VIII章，7～45，(株)農山漁村文化協会，東京。
- 2) 渡邊貴之，小西一之，熊谷秀一郎，野口浩正，武井直樹：日本畜産学会報，85(3)，295～300，2014。
- 3) 渡邊貴之，小西一之：多頭飼養における黒毛和種繁殖雌牛生産性向上のための代謝プロファイルテストを用いた飼養管理マニュアル，平成28年度版，1～159，独立行政法人家畜改良センター鳥取牧場，鳥取，2016。
- 4) Kadowaki, T., Yamauchi, T.: *Endocrine reviews*, 26(3), 439～451, 2005.
- 5) Briana, D. D., Malamitsi-Puchner, A.: *Reprod Sci*. 16(10), 921～937, 2009.

## 雄牛の新たな繁殖機能評価法の開発

Research on novel evaluation of reproductive function in bull

北 原 豪

(宮崎大学農学部獣医学科)

Go Kitahara

(Development of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Selection of sire takes more than five years, and also requires much labor and cost. Once sire or bull gets disorder in reproductive function, the livestock industry receives large influence. Therefore, it is better to provide an evaluation capable of finding abnormality earlier. For a test for abnormality of testis, there are semen and histological examinations. However, the safety and the suitable marker in histological examination are unknown yet. In the present study, we examined the effects for testis by multiple needle biopsies and the expression of anti-Müllerian hormone (AMH) in the collected testicular tissue. In five Japanese Black calves, the right testis was repeatedly received by needle biopsies on four weeks interval during 4 to 24 weeks of age (total six times). At the same time, the treated testis was examined by thermographic and ultrasound examination, and also the scrotal circumference was measured. At 28 weeks of age, both right and left testes were castrated, and compared for the volume of the each testis and the diameter of the seminiferous tubule. The collected testicular tissue was examined by AMH immunohistochemistry. There were not the abnormal observations on the treated testis in every time. The volume of the each testis and the diameter of the seminiferous tubule in the treated testis (right testis) did not differ from in the contrast testis (left testis). The staining intensity of AMH on 8 to 16 weeks of age was showed stronger than on the other weeks of age. In conclusion, the multiple needle biopsies in four weeks interval did not affect the testicular growth during the pre-puberty period. The collected testicular tissue was able to be stained by AMH immunohistochemistry. Therefore multiple needle biopsies with anti-Müllerian hormone immunohistochemistry might be useful to evaluate function of testis objectively, especially function of Sertoli cells.

### 1. 目 的

我が国における最近の牛の飼育頭数は、乳用牛が137万1,000頭、肉用牛が248万9,000頭で、そのうち供用されている種雄牛の頭数は、ホルスタイン

種が385頭、肉用種が1,534頭である。種雄牛の供用開始には5年以上を要し、その選抜および育成には多くの労力と経費がかかる。また、種雄牛1頭から1年間に生産される凍結精液ストローは3万本以上となるため、種雄牛に繁殖障害が生じ

れば、遺伝資源的観点からだけでなく、経済的にも損失が大きい。よって、種雄牛や種雄牛候補牛の精巣における将来の不可逆的異常が早期に予測できれば、経費軽減が可能となる。

精巣の異常を調べる検査として、精液検査と組織検査がある。しかし、牛では生後40週で初めて成熟した精子が精巣内で認められ、生後8~10カ月で精細管内に遊離精子が認められる<sup>1)</sup>が、精液採取が困難な性成熟前では精液検査を行うことはできない。組織検査は精巣組織および精子を検査することが可能なため有用な検査法であるが、牛では血腫や壊死を引き起こすことが報告されている<sup>2,3)</sup>。近年、単回によるバイオペシーニードルによる組織検査（ニードルバイオペシー）は牛精巣に対し影響が少なく、繁殖能力の検査に有用であったと報告された<sup>4,5)</sup>。しかし、異常状態からの回復や予後を診断するには、複数回のバイオペシーが必要となるが、その影響に関する報告はほとんどない。

抗ミュラー管ホルモン（AMH）は、組織の成長や分化にかかわるTGF- $\beta$ スーパーファミリーに属する140kDaのホモダイマー糖タンパクで、セルトリ細胞から特異的に合成、分泌されるホルモンである。胎子期では性分化における雄性化に欠かせないホルモンであり<sup>6)</sup>、生後はライデッヒ細胞におけるテストステロン合成を抑制することなどが分かっているが、いまだはっきりしない。ヒトでは、AMHは、間性、潜在精巣および無精巣症の診断の一助として有効であることが報告されている<sup>7)</sup>。しかし、雄牛で、精巣におけるAMHの発現を調べた報告は少なく、また経時的な変化を明らかにした報告はない。

本研究では、雄牛の新たな繁殖機能評価法の開発のため、黒毛和種雄牛の精巣に対し4週間隔で複数回のニードルバイオペシーを行い、その後の精巣の発育に及ぼす影響を調べるとともに、

ニードルバイオペシーで採取した精巣組織にAMHの免疫組織学的染色（AMH-IHC）を行い、生後からの精巣におけるAMHの発現の経時的変化を明らかにする。

## 2. 方法

### 2.1 供試動物

宮崎大学農学部附属フィールド科学教育センター住吉フィールドで飼養され、ニードルバイオペシーを行う5頭（処置群）と無処置の12頭（対照群）の計17頭の黒毛和種雄牛を供した。

### 2.2 精巣の計測および組織の採取

処置群（ $n = 5$ ）は、生後6日以内を0週齢とし、4週齢から28週齢で去勢するまでの4週間隔（4, 8, 12, 16, 20, 24週齢）で、右側精巣に対しニードルバイオペシーを実施し、精巣組織を採取した。キシラジン0.04 g/100kg（セラクター<sup>®</sup>、バイエル薬品株式会社）を静脈内注射にて鎮痛および鎮静後、サーモグラフィ検査（testo875-1i型赤外線サーモグラフィ、testo）、超音波検査（iMAGO、ECM）、陰囊周囲長の測定を行った。なお、陰囊周囲長の対照群として、無処置の黒毛和種雄牛12頭を供した。検査後、陰囊を剃毛および消毒した後、右側精巣の外側中心の部位で14Gバイオペシーニードル（自動生検針エースカット、タスク株式会社）で組織を採取した。組織採取後、頸部筋肉内にペニシリンプロカイン300万単位（懸濁水性プロカインペニシリリング明治、明治製菓株式会社）を投与した。

### 2.3 精巣組織の組織検査

ニードルバイオペシーにて採取した精巣組織は、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で3日間以上固定し、パラフィン包埋、4  $\mu$ mで薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察した。また、28週齢で去勢した左右精巣は、生理食塩水中に水浸させ、その前後の変化量を精

巢容積とした。その後、10%リン酸緩衝ホルマリン溶液で7日間以上固定後、上述と同様に組織標本を作製した。過去の報告<sup>8)</sup>に従い、400倍視野で精細管直径を15か所計測し、その平均を精細管直径とした。精巢容積および精細管直径は、ニードルバイオプシーを行った右精巢に対し、行わなかった左精巢を対照として比較した。ニードルバイオプシーで採取した精巢組織はAMH-IHCを行い<sup>9)</sup>、同一観測者により各週齢の染色強度の評価を行った。染色強度は、既報を参考に<sup>10)</sup>、2視野中の200個の細胞を観察し、染色強度を0；染色されていないもの、1；弱い染色、2；中等度の染色、3；強い染色の4段階に分類した。

#### 2.4 統計解析

統計解析ソフト (JMP<sup>®</sup>, SAS institute Japan) を用いて、陰嚢周囲長の変化率 (4週齢に対する水準) は週齢ごとに処置群と対照群の間で、精巢容積および精細管直径は左右精巢間で、それぞれ Wilcoxon test により解析した。また、精巢組織における AMH 染色強度は、一元配置散分析 (Post hoc test として Tukey-Kramer の HSD 検定) により解析した。なお、有意水準は、 $P < 0.05$  とした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ニードルバイオプシーによる精巢発育への影響

処置群の 8, 12, 16, 20, 24, 28 週齢において、サーモグラフィ検査による陰嚢表面温度の左右非対称性、超音波検査による精巢実質のエコー輝度の変化はみられなかった (Fig. 1)。処置群および対照群ともに陰嚢周囲長は週を追うごとに増加し、いずれの週齢においても両群間に有意な差はみられなかった (Fig. 2,  $P = 0.36 \sim 0.78$ )。摘出した右精巢において、処置群すべてで刺入部位の白膜に水腫様の痕跡を認めたが、組織学的な異常

所見はみられず、精巢容積および精細管直径についても左右精巢間で有意な差はみられなかった (Fig. 3)。処置群のすべての週齢で陰嚢表面温度に左右非対称性がみられなかったことは、馬における報告と同様であった<sup>11)</sup>。牛精巢におけるバイオプシーで陰嚢表面温度の左右非対称性がみられた報告がある<sup>5)</sup>が、これは精巢上部に傷害を与えたことによると考えられている。したがって、精巢上部を避けてニードルバイオプシーを行えば、陰嚢表面温度の左右非対称性にみるような炎症を惹起しないと考える。生殖細胞の減少によって精細管直径が減少し、最終的には精子形成の低下が起こるとされている<sup>5)</sup>。しかし今回、4週間隔で6回のニードルバイオプシーを行っても精細管直径に差がみられなかったことは、その後の精子形成に影響がないことを示唆する。よって、春機発動前の黒毛和種雄牛において、精巢へのニードルバイオプシーは、精巢上部を避けて4週間隔で行えば、精巢実質に不可逆的な障害を与えず、組織

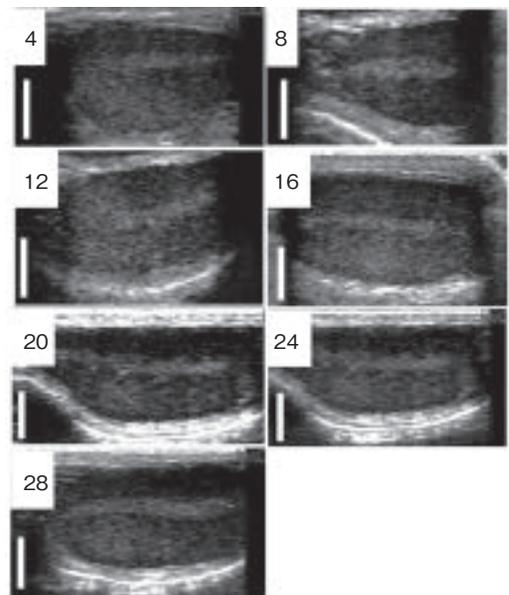


Fig. 1 Change of ultrasound image in the treated testis. These images are from #2816 at 4, 8, 12, 16, 20, 24, and 28 weeks of age. The white bar shows 10 mm.

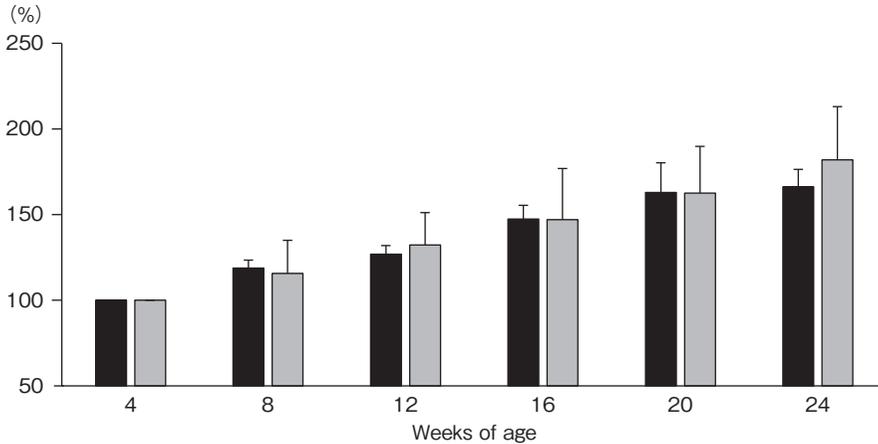


Fig. 2 Growth rate of the scrotal circumference.

The solid bars were showed in the treated group, the others (hatched) in the control group. The data at four weeks of age was defined for 100%. Data represent mean  $\pm$  SD.

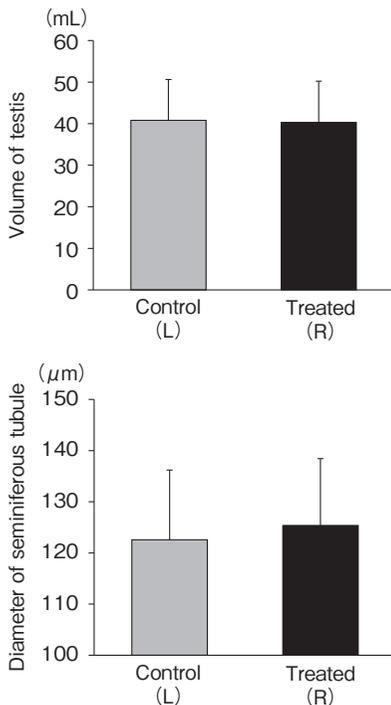


Fig. 3 Differences in the volume of testis and the diameter of seminiferous tubule at 28 weeks of age with or without six needle biopsies.

The solid bars were showed in the treated group, the others (hatched) in the control group. There were not significance between the groups ( $P = 0.94$  and  $0.78$ , respectively). Data represent mean  $\pm$  SD.

を採取できることが分かった。

### 3.2 AMH-IHCによるセルトリ細胞の染色性変化

AMH-IHCによるセルトリ細胞の染色強度は、24~28週齢よりも8~16週齢が有意に高かった ( $P < 0.05$ , Fig. 4)。黒毛和種雄子牛の血中AMH濃度<sup>12)</sup>は、出生後から2カ月齢まで有意に上昇し ( $P < 0.01$ )、その後5カ月齢にかけて有意に ( $P < 0.01$ ) 減少していたことから、本試験で染色強度が高かった8~12週齢時には、正常に陰囊内に下降した精巣ではAMHがセルトリ細胞で盛んに合成、分泌されていたことが組織学的にも明らかとなった。このことは、馬の正常に陰囊内に下降した精巣におけるAMH-IHCの結果<sup>9)</sup>とも一致しており、正常に陰囊内に下降した牛精巣のニードルバイオプシーで採取した組織を用いAMHの染色強度が評価できることが分かった。

以上より、雄牛における精巣の機能を評価するうえで、特に性成熟前において、ニードルバイオプシーによる組織学的検査は有用であり、精巣上体への穿刺を避けることで、4週間隔で採取しても精巣の発育に影響がないことが分かった。ま

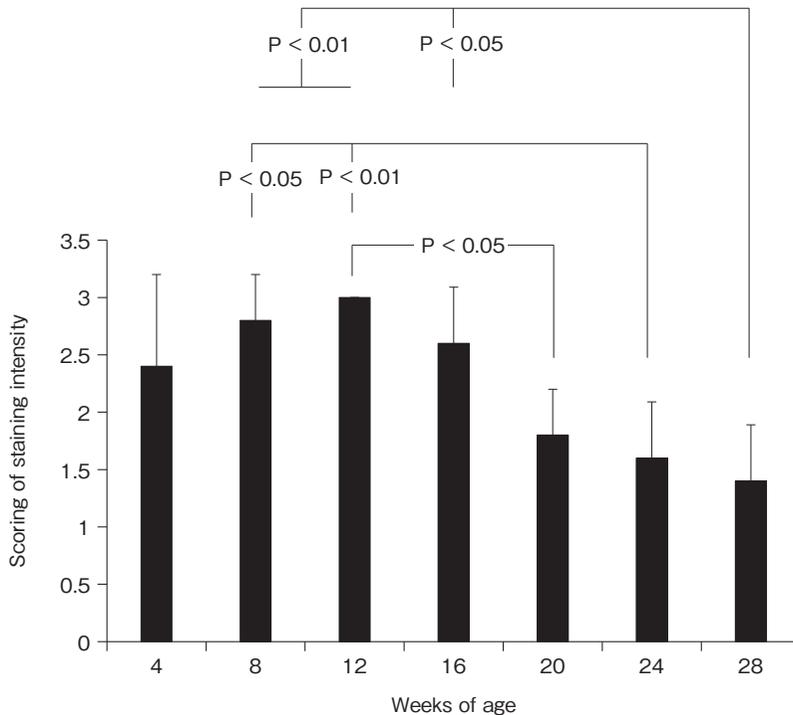


Fig. 4 Staining intensity of AMH in the testicle tissue collected by needle biopsies.  
0 : not stained, 1 : weakly stained, 2 : mildly stained, 3 : strongly stained.  
Data represent mean  $\pm$  SD.

た、ニードルバイオプシーで採取した組織を用い、抗ミューラー管ホルモンの免疫組織化学染色を行えば、精子の形成に関与するセルトリ細胞の正常性や成熟度を評価でき、雄牛の新たな繁殖機能評価法につながる可能性が示唆された。

#### 4. 要 約

種雄牛の供用開始には5年以上を要し、その選抜および育成には多くの労力と経費が掛かる。よって、種雄牛や種雄牛候補牛の精巣における将来の不可逆的異常が早期に予測できる新たな繁殖機能評価法があれば、経費軽減が可能となる。

精巣の異常を調べる検査として、精液検査と組織検査がある。しかし、精液採取が困難な性成熟前では精液検査を行うことはできず、組織検査も組織を採取することによる傷害が懸念される。組

織を採取する方法にニードルバイオプシーがあるが、複数回の実施が精巣に及ぼす影響を調べた報告はほとんどない。

抗ミューラー管ホルモン (AMH) は、セルトリ細胞のみから合成・分泌されるホルモンであり、その成熟度を示す。しかし、経時的に牛精巣におけるAMHの発現を調べた報告はほとんどない。

本実験では、黒毛和種雄子牛の精巣にニードルバイオプシーを繰り返し行い、精巣の発育に及ぼす影響を調べ、採取した精巣組織におけるAMHの発現を免疫組織学的染色で調べた。生後4週から24週まで4週間隔で6回、ニードルバイオプシーを片側精巣に行い、陰囊周囲長、精巣容積、精細管直径を調べたが、無処置の牛あるいは対側の精巣と比較し、有意な差はみられなかった。ま

た、サーモグラフィ検査による陰囊表面温度および超音波検査によるエコー輝度も左右精巣間で差はみられなかった。採取した精巣組織におけるAMHの発現は8週から16週齢に染色強度が有意に高くなり、その後低下した。

よって、性成熟前の雄牛における精巣の機能を評価する際に、ニードルバイオプシーは有用であり、精巣上体への穿刺を避けることで、4週間隔で採取しても精巣の発育に影響を及ぼさないことが分かった。また、採取した組織でAMHの免疫組織化学染色を行えば、精子の形成に参与するセルトリ細胞の正常性や成熟度を評価でき、雄牛の新たな繁殖機能評価法につながる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 中尾敏彦, 津曲茂久, 片桐成二: 獣医繁殖学, 第4版, 111~112, 文永堂出版, 東京, 1995.
- 2) Gassner, F. X., Hill, H. J.: Testicular biopsy in the bull: II. Effect on morphology of testes, *Fertil. Steril.*, **6**, 290~301, 1955.
- 3) Pedrosa, M., Martinez, E., Peraza, N.: Autoimmune response to semen and testicular tissue provoked in bulls by testicular biopsy, *Rev. Cubana. Cien. Vet.*, **13**, 157~166, 1982.
- 4) McDonald, L. E., Hudson, R. E.: The 12 gauge Vin-Silverman needle for testicular biopsy in the bull, *Am. J. Vet. Res.*, **21**, 772~774, 1960.
- 5) Heath, A. L., Carson, R. L., Purohit, R. C., Sartin, E. M., Wenzel, J. G., Wolfe, D. E.: Effects of testicular biopsy in clinically normal bulls, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **220**, 507~512, 2002.
- 6) Amann, R. P.: Endocrine changes associated with onset spermatogenesis in Holstein bulls, *J. Dairy Sci.*, **66**, 2606~2622, 1983.
- 7) Lee, M. M., Misra, M., Donahoe, P. K., MacLaughlin, D. T.: MIS/AMH in the assessment of cryptorchidism and intersex conditions, *Mol. Cell Endocrinol.*, **211**, 91~98, 2003.
- 8) Fénichiel, P., Rey, R., Poggioli, S., Donzean, M., Chevallier, D., Pointis, G.: Anti-Müllerian hormone as a seminal marker for spermatogenesis in non-obstructive azoospermia, *Hum. Reprod.*, **14**, 2020~2024, 1999.
- 9) Ball, B. A., Conley, A. J., Grundy, S. A., Sabeur, K., Liu, I. K.: Expression of Anti-Müllerian hormone (AMH) in equine testis, *Theriogenology*, **69**, 624~631, 2008.
- 10) Haraguchi, W., Matsuo, T., Yoshida, K., Nagata, I.: Adenine-and-Uridine-rich element RNA-binding factor 1 (AUF1) as an additional marker in human gliomas, *Acta Medica Nagasakiensis*, **59**, 7~11, 2014.
- 11) Rode, K., Sieme H., Otzen H., Schwennen, C., Lüpke, M., Richterich, P., Schrimpf, R., Distl, O., Brehm, R.: Effects of Repeated Testicular Biopsies in Adult Warmblood Stallions and Their Diagnostic Potential, *J. Equine Vet. Sci.* **38**, 33~47, 2016.
- 12) Kitahara, G., Kamata, R., Sasaki, Y., El-Sheikh Ali, H., Mido, S., Kobayashi, I., Hemmi, K., Osawa, T.: Changes in peripheral anti-Müllerian hormone concentration and their relationship with testicular structure in beef bull calves, *Dom. Anim. Endocrinol.*, **57**, 127~132, 2016.

## 牛の受胎性に関与する排卵後の黄体と主席卵胞の位置関係の人為的制御に関する研究

Study of artificial regulation of locational relationship between corpus luteum and dominant follicle after ovulation which relate to fertility of dairy cattle

松 井 基 純

(帯広畜産大学畜産学部獣医学科)

Motozumi Matsui

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Previous study reported that the conception rate after AI in dairy cattle was reduced when the first-wave dominant follicle (DF) developed in the ovary ipsilateral to the corpus luteum (CL). The aim of the present study is to clarify the effect of hormonal treatment for estrus synchronization on the locational relationship between a DF and CL after ovulation. In Experiment 1, sixty-seven lactating dairy cows were received GnRH on 7 days after spontaneous ovulation. Prostaglandin F<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) were administrated on 7 days after GnRH treatment, then, cows were randomly assigned to two groups, PG groups (n=33) and PG+GnRH group (n=34). PG+GnRH group were received GnRH at 48 hours after PGF<sub>2</sub>α treatment. PG group were not received GnRH. In Experiment 2, forty-four lactating dairy cows were received PGF<sub>2</sub>α on mid-luteal phase. Cows were randomly assigned to two groups, PG1 group were received one injection of PGF<sub>2</sub>α (n=22). PG2 group were received two injections of PGF<sub>2</sub>α with 12 hours interval (n=22). All cows were received GnRH at 56 hours after 1st injections of PGF<sub>2</sub>α. In both experiments, the location of the first-wave DF in the ovary was confirmed to be ipsilateral or contralateral to the CL on 7 days after ovulation. Data from cows (n=269) showed spontaneous estrus and ovulation was used as control group. The ratio of the cow having the first-wave DF located contralateral to the CL tended to be high in PG+GnRH group (61.8%) than that in PG group (39.4%) and control (46.5%). There was no effect of number of PGF<sub>2</sub>α injections on the locational relationship between a DF and CL after ovulation. At the beginning of hormonal treatment, if the preovulatory follicle located contralateral to the CL, the ratio of the cow having the first-wave DF located ipsilateral to the CL was higher in PG group (84.6%) than that in PG+GnRH group (37.5%). Hormonal treatment to induce estrus and ovulation may be involved in the locational relationships between the first-wave DF and CL.

### 1. 目 的

牛では発情周期中に卵巣内で2～3回の卵胞群

の発育(卵胞波)がみられ、各卵胞波では、一つの卵胞(主席卵胞)が選抜され大きく発育する<sup>1)</sup>。発情・排卵から1週間後頃には、最初の卵

胞波（第1卵胞波）の主席卵胞が存在する。つまり、すべての牛で、発情・排卵から1週間後頃には、必ず排卵後に形成される黄体と主席卵胞が存在している。主席卵胞は左右の卵巣でランダムに発育するため、発情・排卵から1週間後頃の卵巣状態は、黄体と主席卵胞が、同じ卵巣に存在する場合（共存）とそれぞれ異なる卵巣に存在する場合（非共存）の2通りのパターンが存在する。

これまで、受胎成立に不可欠なプロゲステロンを分泌する黄体の発育やその機能と受胎性との関係について、多くの研究が行われてきたが、その黄体と同時に発育する第1卵胞波主席卵胞が受胎性に及ぼす影響は、ほとんど調べられていない。近年、牛の排卵後の卵巣内での卵胞発育と受胎性との関係について、人工授精後5日目に主席卵胞が黄体と非共存であった場合は受胎率が69.3%であるのに対し、共存では40.2%と顕著に低かった<sup>2)</sup>。このことから、人工授精後に黄体と主席卵胞が同一卵巣に存在する共存状態が、牛の受胎性を低下させることが明らかになった。

このことは、授精後に共存状態とならない、つまり、黄体と主席卵胞がそれぞれ異なる卵巣に存在する非共存状態となるように卵巣状態を人為的に制御することで、受胎率を改善できる可能性を示している。

本研究では、人工授精後に非共存状態を誘導することのできる新しい発情誘起プログラム開発のための基礎的情報の収集を目的に、現在、臨床現場で用いられているホルモン処置が、排卵後の共存・非共存の発生状況に及ぼす影響を調べた。

## 2. 方 法

### 2.1 試験① ホルモン処置が排卵後の共存・非共存の発生に及ぼす影響

帯広畜産大学畜産フィールド科学センター(FSC) 繋養のホルスタイン種経産泌乳牛67頭を

用いた。ホルモン処置時の卵胞動態をそろえるために、すべての牛は、発情排卵後7日目に性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH, 酢酸フルチレリン100 $\mu$ g)を投与し、新規卵胞波を誘導した。その7日後に発情誘起のために、黄体退行を目的としたプロスタグランジンF2 $\alpha$ (PGF2 $\alpha$ , ジノプロスト25mg)を投与した。PGF2 $\alpha$ 投与後に発情観察および排卵確認を行った試験区をPG区(33頭)とした。さらに排卵誘起を目的にPGF2 $\alpha$ 投与から48時間後にGnRHを投与した試験区をPG+GnRH区(34頭)とした。両試験区とも排卵確認から7日後に、黄体および最大卵胞(第1卵胞波主席卵胞)の位置を調べた。黄体と最大卵胞が同じ卵巣に位置する場合を共存、それぞれ異なる卵巣に位置する場合を非共存とした。

また、対照試験として、FSC繁殖管理データから、2008年から2014年までのホルスタイン種経産泌乳牛(のべ269頭)の繁殖状況データを用いて、ホルモン処置を行わない場合(無処置区)の排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞との位置関係を調べた。発情観察により発情診断を行い、その後、直腸検査により排卵を確認した。排卵確認から7日後に、黄体と最大卵胞の位置関係を調べ、共存と非共存を判定した。

### 2.2 試験② 黄体退行誘起処置が排卵後の共存・非共存の発生に及ぼす影響

帯広市内の酪農場において、ホルスタイン種経産泌乳牛44頭を用い、発情周期の中期にPGF2 $\alpha$ 投与による黄体退行誘起を行った。PGF2 $\alpha$ 投与は1回(PG1回区)あるいは12時間間隔で2回(PG2回区)実施した。それぞれの群について、1回目のPGF2 $\alpha$ 投与から56時間後にGnRHを投与して排卵誘起を行った。試験①と同様に排卵確認から7日後に、黄体と最大卵胞の位置関係を調べ、共存と非共存を判定した。

### 3. 結 果

#### 3.1 試験①

ホルモン処置を行わず自然排卵した無処置区において、排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞との位置関係について、共存(53.5%)および非共存(46.5%)の発生状況に差異は認められず、それぞれ、およそ50%の確率で発生することが示された(Table 1)。

ホルモン処置による排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞との位置関係について、黄体退行誘起処置のみ行ったPG区では、共存は60.6%、非共存は39.4%の発生割合であった。黄体退行誘起処置に

加え排卵誘起処置を行ったPG+GnRH区では、共存は38.2%、非共存は61.8%の発生割合であった(Table 1)。

統計学的には、無処置区とPG区との間で、共存および非共存の発生状況に差異は認められなかった。一方、PG+GnRH区では、無処置区およびPG区と比べ、非共存の発生が多い傾向がみられた。

#### 3.2 試験②

黄体退行誘起処置の違いによる排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞との位置関係について、PGF2 $\alpha$ を1回投与したPG1回区では、共存は40.9%、非共存は59.1%の発生割合であった

**Table 1** Effects of hormonal treatment on the locational relationship between CL and 1st wave DF after ovulation<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>	n	Locational relationship <sup>c</sup> (%)	
		Ipsilateral	Contralateral
Control	269	53.5	46.5
PG	33	60.6	39.4
PG+GnRH	34	38.2	61.8

a) CL : corpus luteum, DF : dominant follicle

b) Cows were received GnRH on 7 days after spontaneous ovulation. Prostaglandin F2 $\alpha$  (PGF2 $\alpha$ ) were administrated on 7 days after GnRH treatment, then, cows were randomly assigned to two groups, PG groups and PG+GnRH group. PG+GnRH group were received GnRH at 48 hours after PGF2 $\alpha$  treatment. PG group were not received GnRH.

c) Ipsilateral : DF developed in the ovary ipsilateral to CL

Contralateral : DF developed in the ovary contralateral to CL

**Table 2** Effects of PGF2 $\alpha$  treatment on the locational relationship between CL and 1st wave DF after ovulation<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>	n	Locational relationship <sup>c</sup> (%)	
		Ipsilateral	Contralateral
PG1	22	40.9	59.1
PG2	22	54.5	45.5

a) PGF2 $\alpha$  : prostaglandin F2 $\alpha$ , CL : corpus luteum, DF : dominant follicle

b) Cows were received PGF2 $\alpha$  on mid-luteal phase. Cows were randomly assigned to two groups, PG1 group were received one injection of PGF2 $\alpha$ , PG2 group were received two injections of PGF2 $\alpha$  with 12 hours interval. All cows were received GnRH at 56 hours after 1st injections of PGF2 $\alpha$ .

c) Ipsilateral : DF developed in the ovary ipsilateral to CL

Contralateral : DF developed in the ovary contralateral to CL

(Table 2)。PGF 2  $\alpha$  を2回投与したPG 2回区では、共存は54.5%、非共存は45.5%の発生割合であった。PG 1回区とPG 2回区との間で、共存および非共存の発生状況に差異は認められなかった。

#### 4. 考 察

本研究の結果から、ホルモン処置を行わない場合（無処置区）、自然発情排卵後の排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞との位置関係は、共存と非共存が同じ程度に発生する状況であった。

ホルモン処置をした場合、PGF 2  $\alpha$  を投与し発情誘起のみを行った場合（PG区）、無処置区と比べ有意差はないが、排卵後におよそ6割で共存となった。一方、PGF 2  $\alpha$  を投与し発情誘起を行い、さらにGnRHを投与し排卵誘起も行った場合（PG+GnRH区）、排卵後の非共存の発生が、無処置区やPG区と比べ高くなる傾向が示された。

このようなホルモン処置の違いによって共存と非共存との発生状況の差異が起こる理由は、本研究からは明らかにされなかった。一般にPGF 2  $\alpha$  投与による発情発現は、投与後48時間以降に起こることが知られている<sup>3)</sup>ことから、PG+GnRH区では、発情発現より前にGnRH投与が行われていると考えられる。これまでの研究報告では、排卵の直前に第1卵胞波の発育が開始すること<sup>1)</sup>が知られている。これらのことから、PG区では生理的な卵胞波発育が行われているのに対し、PG+GnRH区では卵胞波発現より前に小卵胞へGnRH処置による影響が及んでいる可能性があり、そのことが、ホルモン処置の違いによる排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係の差異を生み出している可能性が考えられた。

既報において、黄体退行の差異による血中P 4濃度推移の違いによって、卵胞発育を刺激するFSHの小規模な血中濃度上昇が排卵前に観察される個体が存在する<sup>4)</sup>ことが報告された。このこ

とは、黄体退行の状況によっては、排卵の直前に発育を開始する第1卵胞波の卵胞がFSHの作用を受けている可能性を示している。つまり、黄体退行の状況が、排卵後の共存・非共存の発生を制御している可能性がある。

本研究では、試験②において、黄体退行誘起処置として、PGF 2  $\alpha$  投与を1回（PG 1回区）から2回（PG 2回区）に増やすことで、黄体退行の状況に差異をもたらしたが、PG 1回区とPG 2回区との間で、共存および非共存の発生状況に差異は認められなかった。試験①からは黄体退行の状況が、排卵後の共存および非共存の発生に影響を及ぼすことが示唆されたが、試験②からその影響は大きくないことが示された。しかし、試験①と②では、黄体退行誘起のためのPGF 2  $\alpha$  投与時の卵胞の状態が異なる可能性があり、また、排卵誘起のためのGnRH投与の時期が異なる。今後、黄体退行誘起時の卵胞の状態や黄体退行と排卵の時期との関係が、排卵後の共存および非共存の発生に及ぼす影響について詳細に調べる必要があると考えられた。

最近の研究報告にて、排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係が、排卵時の退行黄体と排卵卵胞との位置関係と関連していることが示された<sup>5)</sup>。そこで、本研究において、それぞれのホルモン処置において、排卵時の退行黄体と排卵卵胞との位置関係が排卵後の共存および非共存の発生状況に及ぼす影響について整理し、ホルモン処置時の黄体と排卵に至った卵胞の位置関係と排卵後の共存および非共存の発生状況との関係を解析したところ（Table 3）、有意差は認められなかったが、PG区と無処置区では、処置時に非共存の場合、高い確率で、排卵後に共存の状態となることが示された。一方、PG+GnRH区では、処置時の黄体と卵胞の位置関係に関わらず、排卵後に非共存となる割合が高くなることが明らかとなった。この

**Table 3** Effects of the locational relationship between CL and PF at treatment on the locational relationship between CL and 1st wave DF after ovulation<sup>a</sup>

Treatment <sup>b</sup>	n	Locational relationship at treatment <sup>c</sup> (n)		Locational relationship after ovulation <sup>d</sup> (%)	
				Ipsilateral	Contralateral
Control	269	Ipsilateral	138	44.9	55.1
		Contralateral	131	62.6	37.4
PG	33	Ipsilateral	20	45.0	55.0
		Contralateral	13	84.6	15.4
PG + GnRH	34	Ipsilateral	18	38.9	61.1
		Contralateral	16	37.5	62.5

a) CL : corpus luteum, PF : preovulatory follicle DF : dominant follicle

b) Cows were received GnRH on 7 days after spontaneous ovulation. Prostaglandin F2 (PGF2 $\alpha$ ) were administrated on 7 days after GnRH treatment, then, cows were randomly assigned to two groups, PG groups and PG + GnRH group. PG + GnRH group were received GnRH at 48 hours after PGF2 $\alpha$  treatment. PG group were not received GnRH.

c) Ipsilateral : PF was located in the ovary ipsilateral to CL

Contralateral : PF was located in the ovary contralateral to CL

d) Ipsilateral : DF developed in the ovary ipsilateral to CL

Contralateral : DF developed in the ovary contralateral to CL

ことは、排卵後の共存あるいは非共存の状態を決定する要因として、黄体退行から排卵までの内分泌の変化とその時間的推移が強く関与している可能性を示唆している。今後、より詳細な内分泌状況の解析が必要であると考えられた。

本研究の結果から、ホルモン処置をしない場合には排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係は共存と非共存がほぼ同じ割合で発生するが、ホルモン処置による発情誘起および排卵誘起処置は、排卵後の共存および非共存の発生状況に影響を及ぼすことが明らかとなった。今後、様々なホルモン処置について、授精後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係およびその後の受胎率を調べることで、高い受胎性をもたらす卵巣状態（排卵後の非共存状態）を誘導するホルモン処置を開発できることが、本研究の知見から示唆された。

## 5. 要 約

本研究では、排卵後に主席卵胞が黄体と同じ卵巣に存在する共存状態あるいはそれぞれが異なる

卵巣に存在する非共存状態を人為的に誘導するための要件を探ることを目的に、現在、臨床現場で用いられているホルモン処置が、排卵後の共存・非共存の発生状況に及ぼす影響を調べた。試験①では、PGF2 $\alpha$ のみを投与して発情・排卵に至った場合とPGF2 $\alpha$ に加えてGnRHを投与して排卵誘起を誘起した場合について、排卵後の共存・非共存の発生状況を比較した。PGF2 $\alpha$ とGnRHを投与した場合、無処置の自然発情およびPGF2 $\alpha$ のみを投与した場合に比べ、非共存の発生が多い傾向がみられた。試験②では、黄体退行誘起のためにPGF2 $\alpha$ を1回あるいは2回投与した後、GnRHを投与して排卵誘起を誘起することで、PGF2 $\alpha$ の投与回数が排卵後の共存・非共存の発生状況に及ぼす影響を調べた結果、PGF2 $\alpha$ の投与回数による影響は認められなかった。本研究から、排卵後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係について、ホルモン処置による発情誘起および排卵誘起処置が、排卵後の共存および非共存の発生状況に影響を及ぼすことが明らかとなった。今

後、様々なホルモン処置について、授精後の黄体と第1卵胞波主席卵胞の位置関係およびその後の受胎率を調べることで、高い受胎性をもたらす卵巣状態（排卵後の非共存状態）を誘導するホルモン処置を開発できる可能性が考えられた。

#### 文 献

- 1) Adams, G. P., Jaiswal, R., Singh, J., Malhi, P. : *Theriogenology*, **69**, 72~80, 2008.
- 2) Miura, R., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M. : *J. Dairy Sci.*, **98**, 318~321, 2015.
- 3) Stevenson, J. S., Thompson, K. E., Forbes, W. L., Lamb, G. C., Grieger, D. M., Corah, L. R. : *J. Anim. Sci.*, **78**, 1747~1758, 2000.
- 4) Ginther, O. J., Rakesh, H. B., Bashir, S. T., Hoffman, M. M. : *Theriogenology*, **81**, 437~445, 2014.
- 5) Ginther, O. J., Siddiqui, M. A., Baldrighi, J. M., Hoffman, M. M. : *Theriogenology*, **83**, 153~161, 2015.

# 氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した牛精液 および受精卵の未凍結保存

Preservation of bovine semen and embryo by supercooling 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 preserving reproductive cells such as sperm cells, oocytes and early embryos. This method offers a major advantage as the frozen material can be preserved almost indefinitely in liquid nitrogen. However, DMSO and ethylene glycol, which are used in the preservation solution, are known to be cytotoxic, and freezing-induced cellular damage can reduce the fertilization and development rates. In this study, the validity of a non-cryopreserve compound and an amino acid expected to have supercooling-promoting effects was investigated for developing a non-freeze preservation technology for semen and early embryos. Coffee extract was used as a supercooling-accelerating substance. The coffee extract comprised caffeine, caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, and chlorogenic acid. Among these, the supercooling-facilitating activity was highest for caffeine. The supercooling-promoting effect was observed for coffee extract and caffeine during the preservation of semen and oocyte for 7 days. The viability and motility of the sperm were improved when coffee extract or caffeine was added; this addition also contributed to the maintenance of the oocyte nuclear membrane structure. In this study, supercooling preservation of semen and oocytes was achieved using supercooling-accelerating substances such as coffee extract and caffeine. Thus, under appropriate conditions, semen and early embryo could be preserved without freezing-induced damages.

## 1. 目的

生殖細胞の保存は、優良形質をもつ家畜遺伝資源の活用や希少動物の遺伝子保存に有効であり、重要な技術となっている。細胞の長期保存には、ガラス化法や緩慢凍結法などの凍結保存法が広く用いられており、液体窒素中で半永久的な保存が可能である。しかし、凍結により生じる細胞膜へ

のダメージや、保存液に含まれる凍害保護物質による細胞毒性は、現行の凍結保存法では避けることができない<sup>1,2)</sup>。また最近の研究によると、保存液に含まれる凍害保護物質が受精卵移植後に子宮内で炎症を引き起こす原因になることも指摘されている。精子や受精卵がダメージを受けると、細胞の生存やその後の受精・発生に大きく影響する。これらの問題を回避するために、未凍結保存

の可能性を検討することとした。関西大学の河原秀久教授らは、植物（ヒノキ、大根、エノキダケなど）や食品廃棄物（コーヒー粕、あん粕、日本酒など）から氷晶形成抑制物質を発見し、その抽出に成功している。氷晶形成抑制物質には、不凍タンパク質や過冷却促進物質として分類されるものがあり、氷結晶の形成やその成長を抑制する効果がある。これを適切な濃度で加えると、低温下でも氷核形成が抑制されるため、過冷却状態を維持させることができる。一般に液体が凝固点以下でも固体にならない状態を過冷却というが、液体中に異物が存在すると過冷却温度は上昇し凍結しやすくなる。しかし、氷晶形成抑制物質を添加することで過冷却温度を下げるのが可能になるため、細胞や組織の保存に有効であると考えられる。ハーバード大学の研究チームは、過冷却を利用してラットの肝臓を3日間保存することに成功した<sup>3)</sup>。本研究では、植物由来の氷晶形成抑制物質を用いて、細胞毒性のない保存液で生殖細胞の過冷却保存の可能性を検証することとした。

## 2. 方 法

生殖細胞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行った。まず、ICR成熟雄マウスの精巣上体尾部より精子塊を採取した。採取した精子塊は、37℃に加温したUW液（University of Wisconsin (ViaSpan), アステラス製薬）100  $\mu$  lのドロップに10分間静置し、精子を自然に懸濁させた。均一に拡散した精子懸濁液10  $\mu$  lは各保存液100  $\mu$  lに希釈して、過冷却保存に供した。卵子はPMSG投与46時間後の3週齢ICR雌マウスの卵巣から採取した。卵丘細胞を除去した後、100  $\mu$  lの保存液に卵子3個を浸漬し、過冷却保存を行った。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（クライオポーター, サイニ

クス）を使用し、20℃から段階的（0.1℃/分）に温度を下げ、-6, -8, -10, -12℃の温度下で1, 3, 7日間保存を行った。温度回復時には、段階的（0.1℃/分）に温度を上げ、20℃で回収した。温度制御は、Berendsenらの方法に準じて行った<sup>3)</sup>。保存液に添加する氷晶形成抑制物質は、過冷却促進効果が報告されているコーヒー粕エキスに基づいて比較検討した。コーヒー粕エキスは、熱水抽出した後、分子量1万以上を除去して酢酸エチル分画によって抽出した。各分画の成分を同定し、それぞれの抗氷核活性値を算出した。抽出成分に基づいて、本研究では、①生理食塩水、②UW液、③コーヒー粕エキスを含むUW液、④カフェインを含むUW液、を保存液として用いた。精子の健全性は、HTF培地で培養1時間後の生存性と運動性、その後の体外受精によって評価した。卵子については、核および核膜の正常性を評価するため、2%パラホルムアルデヒドで固定し、Lamin B1抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。核相の判定にはPropidium iodide (PI)を用い、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。マウスでの保存条件に基づき、ウシ精液および受精卵の過冷却保存条件の検討を行った。

## 3. 結果と考察

コーヒー粕エキス1 mg/mlに含まれる成分を分析したところ、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、クマル酸が含まれていることが明らかになった。それぞれの濃度と抗氷核活性値を比較したところ、弱酸性フェノール層にカフェインが多く含まれ、抗氷核活性が最も高かった（Table 1）。カフェインは哺乳動物の卵子や受精卵の活性を維持する効果があり、培養液にも添加されることが多い<sup>4)</sup>。このことから、本研究ではコーヒー粕抽出液とカフェインを氷晶形成抑制物質（過冷却促進物質）として使用することとした。それぞれ0.5

**Table 1** Concentration and anti-ice nucleation activity of each coffee component

	Concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )				Anti-ice nucleation activity ( $^{\circ}\text{C}$ )
	Caffeine	Caffeic acid	Chlorogenic acid	Coumaric acid	
coffee extract	169.9	0.9	141.2	0	2.50 $\pm$ 0.42
carboxylic acid	221.3	6.0	200.9	0	2.03 $\pm$ 0.29
strong acidic phenol	435.9	19.2	113.6	0.3	3.03 $\pm$ 0.41
mild acidic phenol	655.1	2.7	25.2	0.1	4.40 $\pm$ 0.42
neutrality	365.4	3.8	34.3	0.1	3.53 $\pm$ 0.24

**Table 2** The motility of the sperm after 7-day supercooling preservation

	Temperature ( $^{\circ}\text{C}$ )				
	4	-6	-8	-10	-12
Saline	-	-	-	-	-
UW	-	-/+	-	-	-
UW + coffee	-	+	+	+	-/+
UW + caffeine	+	++	++	++	++

または1.0mg/mlの濃度になるようUW液に添加し、氷晶形成抑制効果（過冷却促進効果）を検証したところ、どちらも $-6^{\circ}\text{C}$ ～ $-12^{\circ}\text{C}$ の温度条件下では過冷却を維持できることを確認した。また、この温度条件においては、7日間維持しても保存液の凍結は認められず、生殖細胞の保存に有効であると判断した。

精子は、コーヒー粕エキスまたはカフェインを含むUW液で1, 3, 7日間、 $4^{\circ}\text{C}$ または $-6^{\circ}\text{C}$ ～ $-12^{\circ}\text{C}$ で保存したところ、生存性および運動性に効果が認められた（Table 2）。すなわち、コントロールとして設けた、生理食塩水またはUW液単独の保存液では、保存温度・日数に関わらず、その運動性は極めて低く不動精子が多数を占めたが、カフェイン添加区では $4^{\circ}\text{C}$ 、 $-6^{\circ}\text{C}$ ～ $-12^{\circ}\text{C}$ で、コーヒー粕エキス添加区では、 $-6^{\circ}\text{C}$ ～ $-12^{\circ}\text{C}$ で精子の運動性を維持できることが明らかとなった。また、顕微鏡下での形態観察においては、保存後の精子形態に異常は認められなかった（Fig. 1）。 $4^{\circ}\text{C}$ よりも過冷却条件で精子の運動性

が良好であったことから、過冷却によって代謝を抑えられた結果と考えられた。卵子は、精子保存と同様にコーヒー粕エキスまたはカフェインを含むUW液で最大7日間保存を行った。保存後、核膜構造を観察するためにLamin B1抗体を用いて免疫蛍光染色を行った結果、UW液単独に比べ、コーヒー粕エキスとカフェイン添加区において、核膜が正常に維持されていた。添加濃度によって有意な差は認められなかったが、1 mg/ml添加区でより高い効果が得られた（Fig. 2）。保存温度については、 $-6^{\circ}\text{C}$ で細胞形態と核膜構造が最も安定して維持された結果であった。以上の結果から、精子や卵子の保存においては、コーヒー粕エキスやカフェインを含むUW液が有効であり $-6^{\circ}\text{C}$ で未凍結保存が可能であることが示された。

牛の精液や受精卵の保存に展開するため、保存液のスケールアップによる影響を調べたところ、10mlまでは安定して保存できることを確認した。牛精液と受精卵については、条件検討を進めているが、精子濃度によって生存率や運動性にばらつ

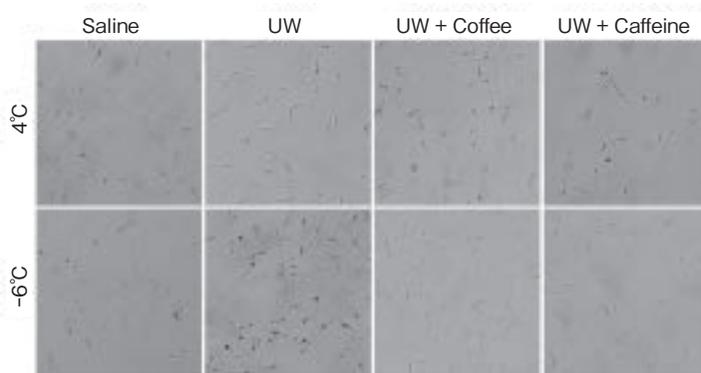


Fig. 1 Evaluation of the sperm after supercooling preservation. The sperms treated with saline, UW solution, UW with coffee extract, or UW with caffeine for 7 days at 4 or -6°C.

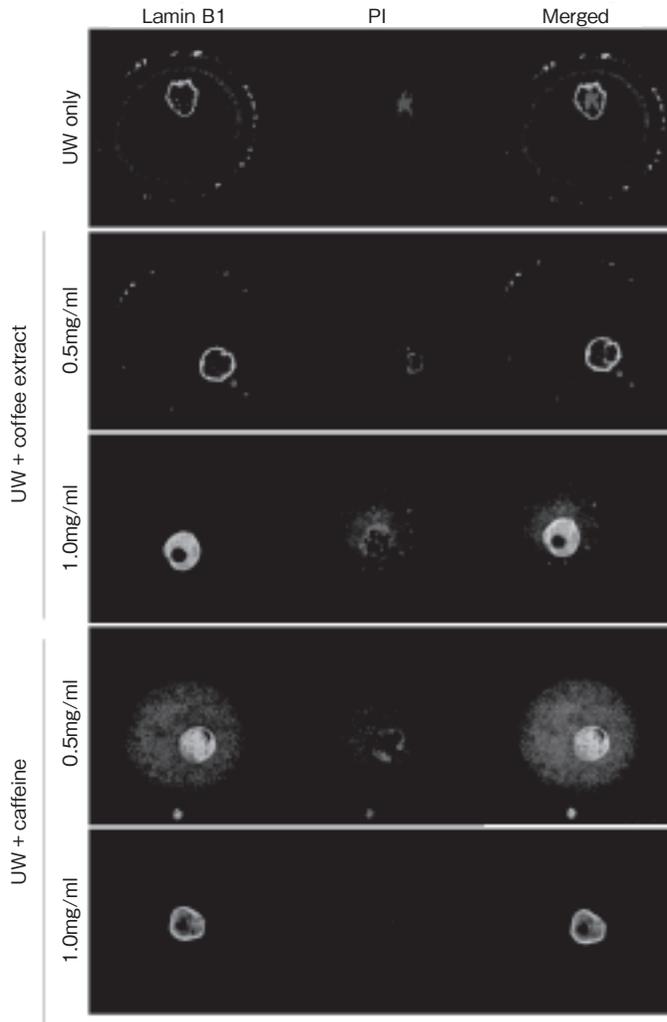


Fig. 2 Distributions of Lamin B1 and chromosomes after 7-day supercooling preservation.

きがあり、保存液量や希釈方法を含めて、引き続きの検討が必要である。

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<sup>5)</sup>。コーヒー粕エキスに含まれるクロロゲン酸は、抗酸化物質としても知られており、抗酸化作用によって細胞が保護されたことも考えられる。本研究では、コーヒー粕エキスとその成分であるカフェインを添加することで、精子や卵子の過冷却保存に有効であることを示した。動物種や対象細胞に最適な条件検討を行う必要はあるが、適切な条件を構築できれば、新規保存法としての発展が期待される。

#### 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られず、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、凍結により生じる細胞膜の損傷、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、本研究では植物由来の氷晶形成抑制物質を用いて、細胞毒性のない保存液で生殖細胞の過冷却保存（未凍結保存）の可能性を検証することとした。氷晶形成抑制効果が知られているコーヒー粕エキスの有効成分を分析したところ、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、クマル酸が含まれ、特にカフェインで抗氷核活性（過冷却促進効果）が高いことが明

らかになった。そこで、コーヒー粕抽出液とカフェインを氷晶形成抑制物質（過冷却促進物質）として保存液に添加し、その効果を検証した。その結果、コーヒー粕エキスとカフェインが、精子や卵子の過冷却保存に有効であり、 $-6^{\circ}\text{C}$ の温度条件下で7日間の保存が可能であることを明らかにした。動物種や対象細胞に最適な条件検討を行う必要はあるが、適切な条件を構築できれば、新規保存法としての発展が期待される。

#### 文 献

- 1) Saragusty, J., Arav, A. : Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction*, 141(1), 1~19, 2011.
- 2) Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., Fowler, K. E. : Cryopreservation of animal oocytes and embryos: Current progress and future prospects, *Theriogenology*, 86(7), 1637~1644, 2016.
- 3) 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, *Nat Med*, 20(7), 790~793, 2014.
- 4) Ariu, F., Bogliolo, L., Leoni, G., Falchi, L., Bebbere, D., Nieddu, S. M., Zedda, M. T., Pau, S., Ledda, S. : Effect of caffeine treatment before vitrification on MPF and MAPK activity and spontaneous parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes, *Cryo Letters*, 35(6), 530~536, 2014.
- 5) Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. : The effects of oxidative stress on female reproduction: a review, *Reprod Biol Endocrinol*, 10(49), 2012.

## お灸は牛の卵巣機能の向上をもたらすか？

Does the Moxibustion have positive effect to ovarian function ?

三 浦 亮太郎

(日本獣医生命科学大学獣医学部)

Ryotaro Miura

(Department of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University)

In the present study, we examined the effect of Moxibustion to the corpus luteum (CL) function in cows. We used fifteen lactating dairy cows (Holstein : n=9, Jersey : n=5, Guernsey : n=1) and nine non-lactating cow (Holstein : n=5, Jersey : n=2, Japanese Black : n=1, Japanese Polled : n=1) for the experiment. On day 10 of the estrous cycle (Day 0=the day of ovulation), cows were divided into two groups ; (1) Moxibustion group (Lactating dairy cows : n=8, Non-lactating cows : n=5), in which the cows were treated moxibustion and (2) Control group (Lactating dairy cows : n=7, Non-lactating cows : n=4). Moxibustion treatment were applied on nine specific points in Moxibustion group. Before moxibustion treatment, we collected the blood sample (only lactating dairy cows) and examined the size and blood flow area of CL using color-doppler ultrasonography in Moxibustion group and Control group (Pre). After the moxa were burn out (0h), blood collection (only lactating dairy cows) and ovarian examination were done at 1h, 4h, 12h, 24h, 36h and 48h in Moxibustion group and Control group. Mean cross-section area of CL were not different between Moxibustion group and Control group during the experimental period. Mean blood flow area of CL were significantly higher at 24h in Moxibustion group than in Control group, and mean blood flow area of CL were tended to be higher from Pre to 24h in Moxibustion group. In lactating dairy cows, mean blood flow area of CL were no difference between Moxibustion group and Control group during the experimental period, however, mean blood flow area of CL were significantly higher in Moxibustion group than in Control group during the experimental period. Mean plasma progesterone concentration were not different between Moxibustion group and Control group during the experimental period in lactating dairy cows. From the present study, it was suggested that moxibustion treatment may have an effect of improving the CL function in cows.

### 1. 目 的

近年、世界中で乳牛の受胎率低下が大きな問題となっており、日本においてもその例外ではない。牛は分娩を経ることで乳生産や肉生産を行

い、収益を得ることができる。そのため、受胎率の低下は畜産農家の経済的損失に直結する。これまで、卵巣静止および卵胞囊腫などの卵巣疾患に対して排卵誘起とその後の授精を目的としたホルモン治療<sup>1)</sup>や、人工授精後の受胎率向上を目的に

プロゲステロン製剤を補充する処置が行われてきた<sup>2)</sup>。しかしながら、牛本来の生理状態や体調が十分に回復していない状態でホルモン処置を行ったとしても、効果を発揮しないのが現状である。そのため、牛が本来有する能力を引き出すというアプローチで繁殖成績改善を目指していくことが重要であると考えられる。

お灸とは、東洋医学の独特の概念である、気と血がめぐる通路（経絡）に存在する経穴（ツボ）と呼ばれる特定の部位に、温熱刺激を与えることにより、生理状態の変調を整え変化させることで、本来持っている感染に対する免疫力や機能を増進させ疾病の治療もしくは予防を目的に行われるものである。中国医学、モンゴル医学およびチベット医学などで行われる代替療法である<sup>3)</sup>。

ヒトの領域において鍼灸治療が行われているのはアジアの国々だけではなく、アメリカおよびヨーロッパの国々を含む世界中の国々で治療として正式に取り入れられており、疼痛管理、感染症および不妊治療などに適応されている。また、ヒトの医療のみならず牛、馬および豚などの動物においてもツボは開発されており、お灸が実施されている。これまで、牛のお灸は発情兆候の明瞭化、胎盤の排出および子宮の早期回復に対して効果を持つことが知られてきたが<sup>3)</sup>、この現象に対する科学的な証明は十分になされていない。しかしながら、人を対象にした研究において、妊娠女性に対してお灸を実施したところ、施灸前後の子宮動脈および臍帯動脈の血管抵抗値が低下、つまり血流量の増加が起きることが示されている<sup>4)</sup>。また、卵卵期の女性に対して鍼治療を施したところ、血中エストラジオール濃度が高値を示した症例が観察された<sup>5)</sup>。これらのことから、鍼灸治療を施すことで卵巣および子宮機能に何らかの効果を及ぼすことが示唆される。

そこで、本研究は牛に対するお灸の卵巣機能へ

の効果を、卵巣内構造物の発育動態および血中性ステロイドホルモン濃度推移を評価することで明らかにすることを目的としたものである。この研究を通してお灸の効果を科学的に評価し、牛の繁殖成績向上および卵巣疾患に対する新たな治療方法や方向性を示すとともに、現在の畜産現場で見られるホルモン処置の乱用を打開するための礎の研究となることを目指す。

## 2. 方法

日本獣医生命科学大学付属牧場（富士アニマルファーム）にて飼養されていた泌乳乳牛（ホルスタイン種：9頭、ジャージー種：5頭、ガーンジー種：1頭：雌）、非泌乳乳牛（ホルスタイン種：5頭、ジャージー種：2頭：雌）および肉用繁殖雌牛（褐毛和種：1頭、無角和種：1頭：雌）を用いた。

お灸の黄体機能に与える影響を調査するために、開花期黄体を有する泌乳乳牛に対してお灸を実施し、黄体血流および血中プロゲステロン（P4）濃度に与える影響とその持続期間を評価するため以下の手順で試験を実施した。

- 1) 試験牛をお灸実施群（泌乳牛：8頭、非泌乳牛：5）とコントロール群（泌乳牛：7頭、非泌乳牛：4）に分ける。
- 2) 発情周期の10日目（排卵確認日=0日目）に牛の繁殖に効果のあるとされる9つのツボ<sup>1)</sup>にお灸を実施した（Fig. 1）。コントロール群に対してはお灸を実施しなかった。

お灸は、牛を保定枠場内に入れ実施した。

お灸はそれぞれのツボに艾（もぐさ）を2.5gずつ配置し、9箇所（ツボ）に配置した艾に同時に着火する。艾はおおよそ15分で燃え尽き、すべての艾が燃え尽きたタイミングを0時間とした。

- 3) お灸実施直前（Pre）、1.0時間後、4.0時間後、

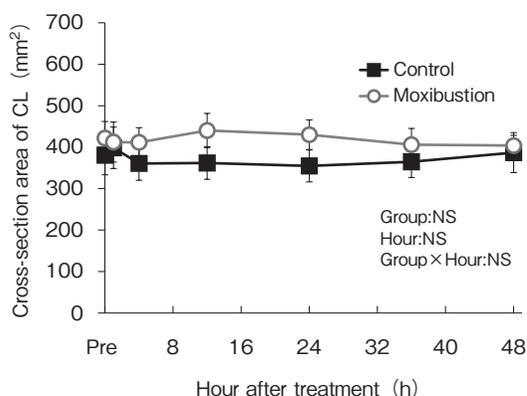


Fig. 1 Comparative changes of mean cross-section area of CL in Moxibustion group and Control group between Pre to 48 hours. Data are presented as the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). CL = Corpus luteum

12.0時間後、24.0時間後、36.0時間後および48.0時間後に卵巣観察および採血（採血は泌乳牛のみ）を実施した。

卵巣観察は、カラードプラ画像診断装置を用いて黄体画像および黄体血流を捉えた画像を記録した。その後、画像解析ソフトを用いて黄体断面積および黄体血流面積を算出し解析に用いた。採血はヘパリン採血管を用いて尾静脈から行った。採血後30分以内に遠心分離機にて血漿を分離し、血中P4濃度を測定するまで $-30^{\circ}\text{C}$ 冷凍庫にて保管した。血中P4濃度は市販の血中P4濃度測定EIAキットを用いて測定した。データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。統計解析においては、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

### 3. 結果

#### 3.1 黄体断面積推移の結果

反復測定-分散分析を行ったところ、黄体断面積は試験期間を通じて、お灸実施群とコントロール群で有意な差はなかった。また、泌乳牛と非泌乳牛で区分して、黄体断面積をお灸実施群とコントロール群で比較した場合においても黄体断面積

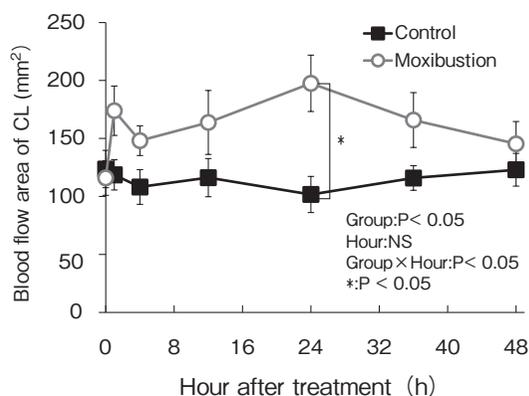


Fig. 2 Comparative changes of mean blood flow area of CL in Moxibustion group and Control group between Pre to 48 hours. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. The asterisk denotes difference between each points. \*:  $P < 0.05$ . CL = Corpus luteum

推移に差はなかった (Fig. 1)。

#### 3.2 黄体血流推移の結果

反復測定-分散分析を行ったところ、時間要因には有意差はなかったが、群要因および時間 $\times$ 群交互作用に有意差があった。交互作用に有意差が確認されたので、多群比較検定を行ったところ、お灸実施群内においてPreから24時間後に血流が増加する傾向 ( $P < 0.1$ ) が観察された。また、お灸実施24時間後においてお灸実施群でコントロール群と比較して黄体血流面積は有意に高かった (Fig. 2)。また、泌乳牛のみのデータで解析したところ、時間要因、群要因および時間 $\times$ 群交互作用に有意差はなかった (Fig. 3)。非泌乳牛のみのデータで解析したところ、時間要因および時間 $\times$ 群交互作用に有意差はなかったが、群要因に有意差があり、試験期間を通じてお灸実施群で高く推移した (Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4)。

#### 3.3 血中P4濃度推移の結果

泌乳牛のみのデータに関して反復測定-分散分析を行ったところ、血中P4濃度は試験期間を通じて、お灸実施群とコントロール群で有意な差はなかった (Fig. 5)。

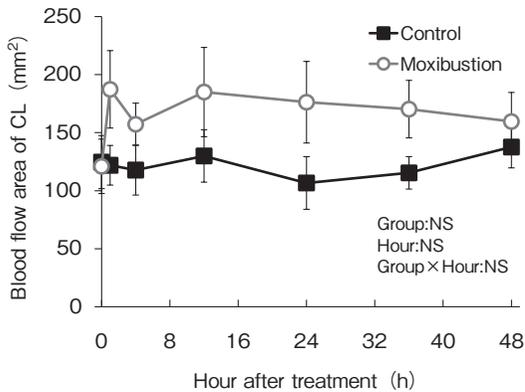


Fig. 3 Comparative changes of mean blood flow area of CL in Moxibustion group and Control group between Pre to 48 hours in lactating dairy cows. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. CL=Corpus luteum

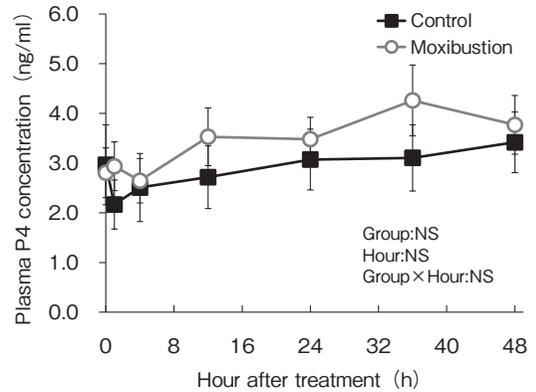


Fig. 5 Comparative changes of mean plasma P4 concentration in Moxibustion group and Control group between Pre to 48 hours in non-lactating cows. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. P4 = Progesterone

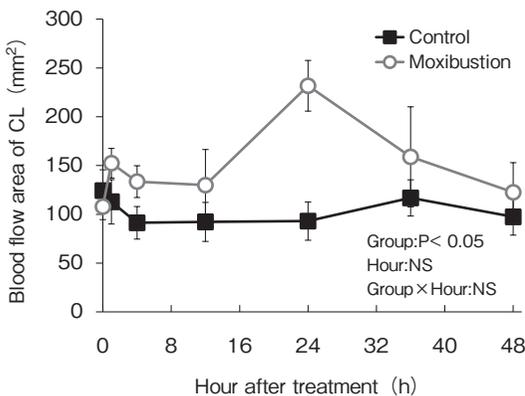


Fig. 4 Comparative changes of mean blood flow area of CL in Moxibustion group and Control group between Pre to 48 hours in non-lactating cows. Data are presented as the mean  $\pm$  SEM. CL=Corpus luteum

#### 4. 考 察

牛におけるお灸の繁殖成績に及ぼす効果を検証した報告では、分娩後の早期にお灸を実施し、その後の子宮回復および初回授精受胎率を評価しており、お灸実施をすることで繁殖成績が向上する可能性が示されている<sup>6,7)</sup>。しかしながら、卵巢周期を正常に繰り返している経産牛に対して施灸することで卵巢機能に対してどのような影響を与

えるかを十分に検証した研究はほとんど存在しない。そこで、本研究はお灸が牛の卵巢機能に対してどのような影響を与えるのかを、発情周期10日目の黄体を有する個体に対してお灸を実施する群とコントロール群を設け、両群間で黄体断面積、黄体血流面積および血中P4濃度推移を比較し検証した。黄体断面積の推移にお灸実施群とコントロール群で差はみられなかったが、黄体血流面積はお灸実施群で増加することが示された。過去の報告から黄体機能を評価する指標として黄体血流量は有効であることが示されている<sup>8)</sup>。本研究の結果から、お灸実施群でお灸が卵巢機能に対して直接的に影響を与える、黄体機能を向上させたことが推測される。しかしながら、黄体血流面積を泌乳牛と非泌乳牛で分けて解析した場合、非泌乳牛ではお灸実施群が期間を通して有意に高く推移したが、泌乳牛では有意な上昇は確認されなかった。これは、お灸に対する反応が泌乳牛と非泌乳牛で異なることが推測される。繁殖障害牛に対する施灸は、1回/日を3日間連続で実施することが推奨されており<sup>3)</sup>、泌乳牛では泌乳による代謝亢進などの影響があることが考えられるため、卵

巣機能の亢進をはかるためには1回のみではなく数回の施灸が必要であることが推察された。過去の報告から、血中P4濃度は黄体血流面積と正の相関関係があることが示されている<sup>8)</sup>。そのため黄体血流量を増加させることで、血中P4濃度を上昇できる可能性がある。妊娠牛では非妊娠牛と比較して人工授精後の血中P4濃度が高いこと<sup>9)</sup>、また前発情周期の血中P4濃度が高い牛で受胎率が高くなること<sup>10)</sup>が報告されており、発情周期中の血中P4濃度を高めることは牛の繁殖成績向上のために重要であることが示されている。そのため黄体機能を向上させ、血中P4濃度を上昇させる方法が求められる。今回、泌乳牛における血中P4濃度推移にお灸実施群とコントロール群間で差はなかったが、黄体血流面積推移に差がなかったことからこの結果は納得できるものであった。今後は、より黄体機能を向上させ血中P4濃度を上昇させるお灸の方法やより少ないツボ数でも効果が得られる組み合わせを探索する必要があると考えられる。

本研究から、お灸を実施することで黄体機能が向上する可能性が示唆された。牛に対するお灸は、民間療法として実施され効果があることが報告されているが、十分な科学的な裏付けがなされておらず、広範囲に普及しているとは言いがたい。しかしながら、本研究によりお灸の卵巣機能へ与える影響を科学的に裏付けすることで、一般の産業動物臨床現場でより広範囲に利用されることが期待され、畜産現場での生産性向上に寄与できると考えられる。

## 5. 要 約

本研究課題では、牛に対するお灸の卵巣機能に対する効果を、発情周期中期の開花期黄体の黄体断面積、黄体血流面積および血中性ステロイドホルモン濃度推移を評価することで明らかにするこ

とを目的としたものである。発情周期10日目の開花期黄体を有する泌乳経産牛および非泌乳経産牛に対して、牛の繁殖に効果のあるとされる9つの経穴に艾を2.5 gずつ配置し、着火した。すべての艾が燃え尽きたタイミングを0時間とした。黄体断面積と黄体血流面積を評価するためにカラーDプラ画像診断装置を用いて卵巣観察を行った。また泌乳経産牛のみ、血中P4濃度を評価するために尾静脈より採血を行った。卵巣観察と採血はお灸実施直前 (Pre)、1.0時間後、4.0時間後、12.0時間後、24.0時間後、36.0時間後および48.0時間後に実施した。黄体断面積推移にお灸実施群とコントロール群で差はなかった。黄体血流面積推移は、お灸実施群内においてPreから24時間後に血流が増加する傾向が観察され、また、お灸実施24時間後においてお灸実施群でコントロール群と比較して黄体血流面積は有意に高かった。血中P4濃度推移はお灸実施群とコントロール群で差はなかった。黄体血流の増減は黄体機能を評価する上で有用な指標となることから、これらの結果から、お灸を実施することで黄体機能に直接的に影響を与え機能を向上させる可能性が推察された。今後はより黄体機能を向上させるお灸の実施方法やより少ないツボ数でも効果が得られる組み合わせを探索する必要があると考えられる。これらの研究を進めることで、牛の繁殖成績向上および卵巣疾患に対する新たな治療方法や方向性を示すとともに、牛の生産性向上を目指した取り組みが可能になると考える。

## 文 献

- 1) López-Gatius, F., Mirzaei, A., Santolaria, P., Bech-Sabat, G., Nogareda, C., García-Ispuerto, I., Hanzen, Ch., Yániz, J. L.: *Theriogenology*, **69**, 1095~1103, 2008.
- 2) Garcia-Ispuerto, I., López-Gatius, F.: *Theriogenology*, **90**, 20~24, 2017.
- 3) 保坂虎重, 白水完児: 家畜のお灸と民間療法クス

- りに頼らず経営改善, 9~59, 農山漁村文化協会, 東京, 1997.
- 4) 高橋佳代, 相羽早百合, 武田佳彦: 東京女子医科大学雑誌, 65, 801~807, 1995.
- 5) 麻生武士, 本橋亨, 村田匡好: 産婦科治療, 33, 200~205, 1976.
- 6) Korematsu, K., Takagi, E., Kawabe, T., Nakao, T., Moriyoshi, M., Kawata, K.: *J. Vet. Med. Sci.*, 55, 613~616, 1993.
- 7) 秋葉貞治, 杉浦健太郎, 堂地修, 小山久一: *J. Rakuno Gakuen Univ.*, 30, 235~238, 2006.
- 8) Herzog, K., Brockhan-Lüdemann, M., Kaske, M., Beindorff, N., Paul, V., Niemann, H., Bollwein, H.: *Theriogenology*, 73, 691~697, 2013.
- 9) Lopes, A. S., Butler, S. T., Gilbert, R. O., Butler, W. R.: *Anim. Reprod. Sci.*, 99, 34~43, 2007.
- 10) Folman, Y., Rosenberg, M., Herz, Z., Davidson, M.: *J. Reprod. Fertil.*, 34, 267~278, 1973.

# 日本の養豚場における動物用抗菌剤使用に及ぼす要因の疫学的解析

## —動物用抗菌剤使用量と農場バイオセキュリティレベルの関係—

Epidemiological analysis of the factors affecting the use of veterinary antimicrobials at farm level on Japanese pig farms

– the relationship between veterinary antimicrobial usage and on-farm biosecurity level –

杉浦 勝明・松田 真理・磯村 れん・ナイジェル CL クワン

(東京大学大学院農学生命科学研究科農学国際専攻国際動物資源科学研究室)

Katsuaki Sugiura, Mari Matsuda, Ren Isomura and Nigel CL Kwan

(Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences,

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

Antimicrobial resistance (AMR) is a global health issue, with currently 700,000 people dying of resistant infections every year. By 2050, 10 million lives a year will be at risk due to the rise of drug resistant infections if no proactive solutions are taken to slow down the rise of drug resistance. Improving farm-level biosecurity is a potentially very effective measure which could facilitate the reduction in veterinary antimicrobial usage while promoting better animal husbandry and health. This study aimed to analyze the relationship between antimicrobial usage and biosecurity level at pig farm level since the use of antimicrobials on pig farms accounts for up to 80% of veterinary antimicrobial usage in Japan. Data on annual antimicrobial usage in 2015 based on prescription records was collected from 110 pig fattening farms under contract with members of the Japanese Association of Swine Veterinarians (JASV). Of these farms 33 farms were selected for assessment of biosecurity (BS) levels using BioAsseT scoring system developed by the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome-Japan Elimination Team (P-JET). On these farms, the average annual antimicrobial usage per fattener produced was 27.47 (SD=23.26)g. The use of oral antimicrobials accounted for more than 96% of total usage, and tetracyclines were used most frequently (43.8%), followed by macrolides (16.9%) and penicillins (11%). Within the class of tetracyclines, oxytetracycline was used most frequently (44.9%), followed by doxycycline (42.5%) and chlortetracycline (12.5%). In terms of BS level, the overall BioAsseT score averaged 62.5 (SD=12.5) out of 100, while the external BS score averaged 174.3 (SD=41.6) out of 290, the internal BS score averaged 161.9 (SD=25.9) out of 259 and the monitoring BS score averaged 78.2 (SD=22.5) out of 138. Linear regression analysis using BioAsseT scores as independent variables and antimicrobial usage as dependent variables was performed. The results highlighted that a lower total antimicrobial usage is associated with a higher external BC score, while a lower critically

important antimicrobial (CIA) usage of fluoroquinolones is associated with a higher internal BC score of “pigflows” (e.g. the use of all-in all-out system).

## 1. 目 的

薬剤耐性菌による死者は現在世界で70万人(2013年)であるが、何も対策をとらない場合には2050年には1000万人に達すると推測され<sup>1)</sup>、薬剤耐性菌問題は喫緊の課題である。欧米諸国ではアクションプランが作成され、畜産分野での抗菌剤使用量の削減目標などが定められ、使用量の削減に取り組んでいる。日本でも昨年4月にアクションプランが発表され、2020年までに畜産分野で分離される大腸菌のテトラサイクリンに対する耐性率を現在の45%から33%に下げるという目標が設定された。耐性率を下げるためには、耐性菌の選択圧を下げるのが有用であり、そのためには抗菌剤の使用量を削減する必要がある。日本における動物用抗菌剤販売量の8割は豚用に販売されており<sup>2)</sup>、養豚分野での抗菌剤使用量の削減は極めて重要度が高い。しかし抗菌剤使用量の削減は、感染性疾患の発生リスクを高め、畜産経営に多大な影響を及ぼす可能性がある。現在求められている「治療」から「抗菌剤に依存しない予防」へのシフトには、抗菌剤削減の必要性に対する畜産農家および獣医師の理解を醸成するとともに、その代替となる措置が必要である。

本研究では、畜産農家における動物用抗菌剤の使用と関連し、かつ畜産農家にとって実現可能な措置として考えられる農場バイオセキュリティ(BS)水準と農場レベルでの動物用抗菌剤使用量との関係について疫学的解析を行い、家畜衛生環境の向上による抗菌剤使用量削減策の提案を目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 農場における抗菌剤使用量データなどの収集

農場における抗菌剤使用量データは、日本養豚開業獣医師協会(JASV)の会員獣医師とコンサルティング契約を結ぶ養豚場(N=110)から収集した。2015年1月1日~12月31日の1年間にこれらの農場を対象に発行されたすべての抗菌剤処方記録(品目名、販売単位規格、数量)のデータを指示書集計システム(伊藤貢JASV会員獣医師が開発したシステム)を用いて統合抽出した。WHOのATCvet分類に基づき、日本での販売が認可されている動物用抗菌剤のうち豚を対象畜種として含むすべての製品に7桁の抗菌剤コードを付与したりストを作成し、13抗菌剤クラス42薬剤を投与経路別に有効成分重量をグラムで算出した。抗菌剤コードは1桁目に投薬経路、2および3桁目に抗菌剤クラス、4から6桁目に製品番号、7桁目に包装単位を設定した。2015年の農場別の年間出荷頭数値については、PigINFO(JASVおよび農研機構動物衛生部門により共同開発された生産性に関するベンチマーキングシステム)において収集されたデータを用いた。これらのデータを用いて、以下の式より2015年における出荷豚一頭当たりの抗菌剤使用量を算出した。

$$2015\text{年出荷豚一頭当たりの有効成分重量 (g / 頭)} = \frac{2015\text{年処方の有効成分重量 (g)}}{2015\text{年年間出荷頭数 (頭)}}$$

### 2.2 農場BSレベルの評価

農場BSレベルの評価は、BioAsseT(大竹聡JASV会員獣医師他からなるPRRS撲滅推進チームJAPAN(P-JET)<sup>3)</sup>により開発された農場BS

レベルのスコアリングシステム)を用い、その使用方法に関し事前に研修を受けた各農場の管理獣医師の査定により行った。BioAsseTはPRRS清浄化を目的として開発されたスコアリングシステムである。①農場外BS、②農場内BS、③モニタリングBSの3大項目からなり、それぞれ①農場への病原体の侵入防止、②農場内における病原体の伝搬防止、③農家の防疫意識(モニタリング検査、情報共有、教育、啓蒙)を測定することを目的としている。これらの3大項目は合計20の小評価項目からなり、評価は現場で実践される最大限の対策がとられている場合はA評価、まったくとられていない場合はE評価とし、さらに臨床的重要度を高中低に分けて小項目の重み付けをした。重要度「高」は6点満点、重要度「中」は5

点満点、重要度「低」は4点満点で評価される(Table 1)。また、E評価を受けた項目は飼養衛生管理基準<sup>4)</sup>を満たしていないことと同等の評価となる。農場外BSスコアは290点満点、農場内BSスコアは259点満点、モニタリングBSスコアは138点満点で算出した。総合BSスコアは各20小項目を合計100点満点換算のうえ、大項目ごとに合計100点満点換算し、さらにこれら3大項目の点数を合計100点満点換算して算出した。2015年の年間抗菌剤使用量データが収集された農場のうち、2016年10月1日～2017年3月31日にBioAsseTによる査定が実施された33農場を解析の対象とした。なお、査定実施期間は使用量調査の期間とは一致しないが、BSレベルはPRRS等の重度の伝染性疾患が流行しないかぎり大きく変化

**Table 1** Categories of “BioAsseT”, their number of questions with high, medium and low importance and their weighted scores in each category.

Categories	# Questions (Total 131)			Weighted Scores			
	High	Medium	Low	High (*6)	Medium (*5)	Low (*4)	Total
External Biosecurity	28	18	8	168	90	32	290
1 Farm Location	4	1	1	24	5	4	33
2 Replacement Glits	5	3	1	30	15	4	49
3 Purchase of Semen	1	1	1	6	5	4	15
4 Personnels	3	2	1	18	10	4	32
5 Transport vehicle	5	7	2	30	35	8	73
6 Manure & Carcass	6	1	0	36	5	0	41
7 Farm Equipments	0	1	1	0	5	4	9
8 Vermin Controls	2	2	0	12	10	0	22
9 Visitors	2	0	1	12	0	4	16
Internal Biosecurity	26	15	7	156	75	28	259
10 Pen Layouts	2	2	1	12	10	4	26
11 Pigflows	6	2	0	36	10	0	46
12 Cleaning & Disinfection	9	3	0	54	15	0	69
13 Personnels	2	5	0	12	25	0	37
14 Injection Needles	3	1	1	18	5	4	27
15 Delivery Stalls	4	1	0	24	5	0	29
16 Health Conditions	0	1	5	0	5	20	25
Monitoring Biosecurity	5	12	12	30	60	48	138
17 Monitoring Tests	4	8	9	24	45	36	100
18 Pathology Appraisals	0	2	0	0	0	0	10
19 Communications	0	0	3	0	15	12	12
20 Sociability	1	2	0	6	0	0	16

することはないと考え、本研究ではこれらの農場で重度伝染性疾患の発生がなかったことを確認したうえで査定結果を採用した。

### 2.3 統計分析

統計分析はすべてSPSS ver24. (IBM) を用いて行った。まず説明変数となる3大項目と従属変数となる抗菌剤使用量との関係性について単変量回帰分析モデルを用いて解析を行った。次にこの結果を踏まえ、3大項目を細分化した20小項目を説明変数とし、同様の解析を実施した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 記述統計

33農場における2015年出荷豚頭数は平均15,444.3 (SD=26891.3) 頭であり、2015年出荷豚一頭当たりの抗菌剤総使用量は平均27.47 (SD=23.25) gであった。そのうち経口抗菌剤が96%以上を占めており、使用量が最も多かった抗菌剤はテトラサイクリン系 (43.8%) で、次いでマクロライド系 (16.9%)、ペニシリン系 (11.0%) であった。テトラサイクリン系使用量の内訳は、オキシテトラサイクリン44.9%、ドキシサイクリン42.5%、クロルテトラサイクリン12.5%であった。

BioAsseTによるBSレベル査定結果の総合スコアは平均62.3 (SD=12.5) 点であった。農場外BSスコアは平均174.3 (SD=41.6) 点、農場内BSスコアは平均161.9 (SD=25.9) 点、モニタリングBSスコアは平均78.2 (SD=22.5) 点であった。

### 3.2 養豚場における抗菌剤使用量と農場BSレベルとの関連

養豚場の抗菌剤使用量を目的変数とし、BioAsseTによるBSレベル査定結果を説明変数に用いた単変量解析の結果は表 (Table 2) のとおりである。抗菌剤総使用量と農場外BSスコア (特に小項目4. 人に関するBS対策) との間に関連が認められ ( $p < 0.001$ ) (Fig. 1), BS対策を改

善することにより抗菌剤総使用量およびマクロライド系の使用量の低減につながることを示唆された。小項目4. 人に含まれる具体的なBS対策としては、衛生管理区域内への人の入場管理や農場関係者のシャワーイン・アウトの徹底があげられる。

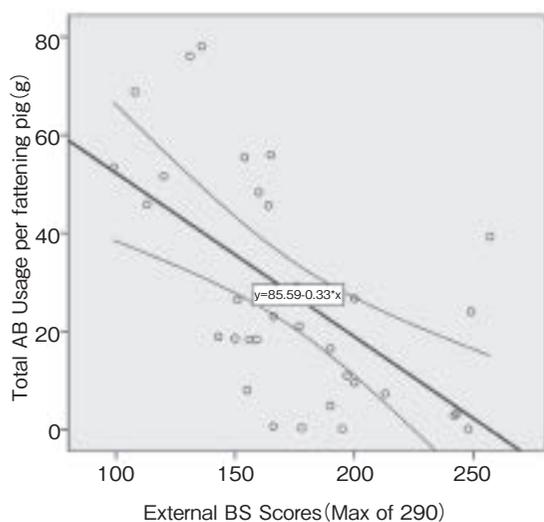
また、最重要抗菌剤に定義<sup>5)</sup>されるフルオロキノロン系および第3・第4世代セファロスポリン系 (セフトオフル) の合計使用量とBSスコアの間では有意な関連は認められなかったが、フルオロキノロン系のみ使用量に注目すると、農場内BSの小項目11. ピッグフローのスコアが高いほど使用量が少なかった ( $p < 0.002$ ) (Fig. 2)。この小項目11. ピッグフローでは、各生産ステージの豚舎のオールイン・オールアウトの徹底レベルや病豚・出荷残り豚の扱いが評価対象となっている。オールイン・オールアウトなどの実施によりフルオロキノロン系抗菌剤による治療を必要とする感染性下痢症などの発生が減少しているとも推測されるが、さらなる情報収集が必要である。

最後に、ペニシリン系および最も多く使用されているテトラサイクリン系の一つであるドキシサイクリンの使用量については、農場外BSのうち小項目1. 農場立地条件のスコアが高いほど少なかった ( $p < 0.002$ )。すなわち、半径3km以内に近隣農場、PRRS陽性農場やと畜場がある農場では、そうでない農場より多くのペニシリン系およびドキシサイクリンを使用していることが判明した。しかし、農場立地条件は農家の努力で改善することが難しい要因であり、立地条件がこれらの抗菌剤の使用量に影響を及ぼしている原因を明らかにしたうえで、具体的な対策を検討する必要がある。

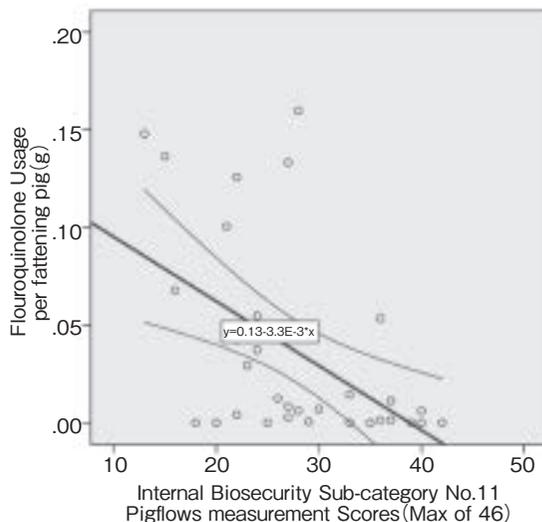
本研究の対象養豚場は、JASV会員獣医師によるコンサルティングが行われている養豚場であることから、全国の平均的養豚場よりもBSレベル

**Table 2** Results of univariable general linear regression models (N = 33). The figure shows the results with  $p < 0.2$ .

Independent Variables	Dependent Variables													
	Total Antimicrobial Usage		Critically Important Antimicrobial Usage		Fluoroquinolones Usage		Macrolides Usage		Penicilins Usage		Tetracyclines Usage		Doxycycline Usage	
	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>	p-value	Adjusted R <sup>2</sup>
Total Biosecurity Scores	0.005	0.201					0.006	0.196	0.007	0.189	0.178	0.058	0.075	0.070
Internal & External Biosecurity Scores	0.001	0.274			0.131	0.042	0.001	0.271	0.003	0.221			0.039	0.102
External Biosecurity Scores	0.000	0.336			0.155	0.034	0.000	0.351	0.002	0.246	0.040	0.102	0.033	0.111
1 Farm Location	0.007	0.185	0.041	0.100	0.112	0.050	0.006	0.193	0.002	0.237	0.042	0.126	0.002	0.253
2 Replacement Glits														
3 Purchase of Semen											0.099	0.056		
4 Personnels	0.002	0.249			0.080	0.067	0.000	0.340	0.007	0.185	0.152	0.065	0.053	0.087
5 Transport vehicle	0.010	0.169					0.004	0.211			0.135	0.041	0.118	0.047
6 Manure & Carcass	0.013	0.156					0.009	0.172	0.004	0.217	0.090	0.061	0.086	0.063
7 Farm Equipments	0.006	0.194					0.010	0.171	0.021	0.133	0.109	0.051		
8 Vermin Controls	0.017	0.144					0.060	0.081	0.133	0.041				
9 Visitors	0.014	0.153					0.060	0.191			0.150	0.036	0.064	0.077
Internal BS Scores	0.022	0.131					0.022	0.131	0.023	0.129			0.096	0.057
10 Pen Layouts			0.104	0.053	0.154	0.034	0.019	0.137	0.025	0.124			0.096	0.058
11 Pigflows			0.030	0.116	0.002	0.237			0.046	0.097			0.035	0.108
12 Cleaning & Disinfection														
13 Personnels	0.052	0.088					0.039	0.103						
14 Injection Needles														
15 Delivery Stalls									0.137	0.040				
16 Health Conditions													0.114	0.049
Monitoring Biosecurity Scores							0.033	0.111						
17 Monitoring Tests							0.029	0.117						
18 Pathology Appraisals														
19 Communications													0.036	0.106
20 Sociability														



**Fig. 1** Linear regression between External Biosecurity Scores and the Total Antimicrobial Usage per fattening pig (g) (N = 33,  $y = 85.59 - 0.33 \cdot x$ , adjusted  $R^2 = 0.336$ ).



**Fig. 2** Linear regression between Internal Biosecurity Sub-category No.11. Pigflows Scores and the Fluoroquinolones Usage per fattening pig (g) (N = 33,  $y = 0.128 - 0.003 \cdot x$ , adjusted  $R^2 = 0.237$ ).

が高い養豚場の割合が多い可能性がある。しかし、本研究では農場レベルでの抗菌剤使用量と農場BSレベルとの間に関連が認められ、農場外BSレベルの向上が抗菌剤使用量の低減につながることを示唆された。この結果は、農場外BSスコアが高いほど肥育豚における使用量が低くなること ( $p < 0.01$ ) を示唆するEU諸国での先行研究の結果とも整合性がある<sup>6)</sup>。本研究は横断研究であり、BSレベルと抗菌剤使用量との間の因果関係を明らかにするには十分でない (BSレベルが高いために抗菌剤の使用が不要となっている農家だけでなく、使用量が多いために衛生状態を改善した農家もいるかもしれない)。今後は農家における抗菌剤使用量に影響を与えるBS以外の潜在的要因 (特にBSレベルが高いにもかかわらず抗菌剤使用量が多い農家やBSレベルが低いにもかかわらず抗菌剤使用量が少ない農家における特異的な要因) に関する農場データも収集し、抗菌剤使用量との関係についてプロスペクティブに追跡する縦断研究を進めることにより、使用量削減のために有効な具体的方策を特定できると考える。

最後に、本研究における抗菌剤使用量データおよびBioAsseTによる査定データの収集に協力くださった、日本養豚開業獣医師協会 (JASV) 会員獣医師および農家に深謝する。

#### 4. 要 約

本研究では、日本養豚開業獣医師協会 (JASV) 会員獣医師とコンサルティング契約を結ぶ33農場について、2015年の出荷肉豚一頭当たりの年間抗菌剤使用量データおよびBioAsseTを用いた2016年10月～2017年3月に実施されたバイオセキュリティ (BS) レベルの査定結果を収集し、両者間の関連の解析を行った。その結果、農場外BSレ

ベルと抗菌剤総使用量およびマクロライド系使用量との間に有意な関連が認められ ( $p < 0.001$ )、BSの改善がこれらの抗菌剤使用量の低減につながることを示唆された。また、人医療における最も重要な抗菌剤に定義されるフルオロキノロン系に関しては、農場外BSに加えて農場内BS、特に豚舎のオールイン・オールアウトや病豚・出荷戻り豚を含めた群の再構成との間に有意な関連が認められた。今後は農家における抗菌剤使用量に影響を与えるBS以外の潜在的要因に関する農場データも収集し、使用量との関係についてプロスペクティブに追跡する縦断研究を進めることにより、抗菌剤使用量削減のために有効な具体的方策を特定できると考える。

#### 文 献

- 1) O'Neill, J. : Review of antimicrobial resistance, AMR Review Organization, May, 2016.  
[https://amr-review.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf#search=%27O%27Neil%2C+antimicrobial+resistance%2C+review%27](https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf#search=%27O%27Neil%2C+antimicrobial+resistance%2C+review%27)
- 2) 杉浦勝明, 松田真理 : 平成27年度抗菌性物質薬剤耐性評価情報整備事業④, 動物用抗菌剤の使用量に関する情報整備。
- 3) PRRS撲滅推進チームJAPAN:<http://site-pjet.com/index.html> (最終確認日 : 2017年4月5日)
- 4) 農林水産省 : 平成23年度飼養衛生管理基準 (豚・いのしし編), [http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e\\_koutei/kaisei\\_kadenhou/pdf/buta\\_pam.pdf](http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/e_koutei/kaisei_kadenhou/pdf/buta_pam.pdf), 2013.
- 5) WHO : Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use, [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43330/1/9241593601\\_eng.pdf?ua=1&ua=1](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43330/1/9241593601_eng.pdf?ua=1&ua=1), 2005.
- 6) Postma, M., Backhans, A., Collineau, L., Loesken, S., Sjölund, M., Belloc, C., Dewulf, J. : Evaluation of the relationship between the biosecurity status, production parameters, herd characteristics and antimicrobial usage in farrow-to-finish pig production in four EU countries, *Porcine Health Management.*, 2 (1), 9, 2016.

# 食鳥と体皮膚に対するカンピロバクターの 付着メカニズムの解明

Elucidation of attachment manner of campylobacters on the skin surface  
of chicken carcasses

三 澤 尚 明

(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

Naoaki Misawa

(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

*Campylobacter jejuni* and *C. coli* are the leading causes of enteric infections in many developed countries, and the public health burden due to campylobacteriosis is increasing. Healthy chickens are considered to act as reservoirs of campylobacters, as the organisms colonize the intestinal tract. Once infected birds enter a processing plant, contamination of chicken carcasses with *C. jejuni* and *C. coli* occurs over the entire skin during defeathering and evisceration due to leakage of crop and/or intestinal contents. In the present study, we observed the morphology of the feather follicles of chicken carcasses after defeathering and chilling. Moreover, we examined the presence of adhesion factors in chicken skin that bind to *C. jejuni*. A total of 3,133 feather follicles were examined for morphological change before and after chilling. Shortly after defeathering, most of the follicles were closed, whereas after chilling they were either closed or open, even though a low proportion of enlarged follicles had become closed, suggesting that *C. jejuni* may not be confined to feather follicles as a result of chilling. The ability of *C. jejuni* strain 81-176 to adhere to chicken skin was reduced to one-tenth after treatment of the skin with NaOH (pH 13.0), but not with HCl (pH 2.0), suggesting that adhesion factors present on chicken skin may be extracted or inactivated by treatment with alkali. Binding of skin extracts with the outer membranes of *C. jejuni* was confirmed by an overlay assay. These findings strongly suggest that campylobacters may have a specific mode of attachment to the skin surface of chicken carcasses.

## 1. 目 的

厚生労働省の食中毒統計で、細菌性食中毒発生件数が第一位となっているカンピロバクター食中毒の原因食品として重要視されているのが鶏肉で、我々が以前行った調査によると、国産市販鶏生肉の約7割が本菌に汚染されていた<sup>1)</sup>。その主

な理由として、鶏肉は皮付きで流通されることが挙げられる。すなわち、汚染菌は皮膚表面に存在する脂質等の膜状物質の内部にも生息し、皮膚表面から菌が剥離されにくいこと、皮膚表面の傷や羽毛の毛穴に入った微生物の殺菌が困難であること、有機物の存在下では殺菌効果が低下することなどが考えられる。

食鳥処理場では、脱羽工程において約60℃の湯に食鳥と体を浸漬しているにもかかわらず、脱羽直後の皮膚の表面に多数のカンピロバクターが付着すること、ブロイラーと地鶏においてカンピロバクターの汚染菌数は同程度であっても、ブロイラーに対する殺菌効果が低いことなどが報告されている<sup>2)</sup>。このことは、カンピロバクターの食鳥と体表面への付着メカニズムは非常に複雑で、細菌側の要因に加えて食鳥や環境中の要因も関与していることを示唆している。カンピロバクターの腸管粘膜上皮に対する付着機序については、病原性解明のための研究テーマとして研究が進んでいるが、食鳥と体表面への付着機序についてはほとんど明らかにされていない。そこで本研究では、鶏皮膚に対する本菌の付着メカニズムを明らかにすることを目的としている。

## 2. 方法

### 2.1 食鳥と体冷却前後の羽毛包の形態的变化とカンピロバクターの汚染調査

15体の脱羽直後の地鶏（地頭鶏）と体を用いて、背側頸部（n = 960）、腹部（n = 851）、大腿部（n = 684）、背部（n = 391）、股（n = 247）の羽毛包の写真を撮影した。その際、撮影した各部位の皮膚をマチ針と焼烙により目印を付けた後、と体を氷水が入ったチャンバーに入れて表面温度を4℃まで冷却し、浸漬90分後のと体の同一部位の羽毛包の写真を同一角度から撮影した。冷却前後の羽毛包の面積を画像解析ソフト（Image J 1.47 Wayne Rasband）を用いて測定した。冷却前後の羽毛包の面積の有意差検定には、t検定を用いた。

3体の地鶏から、羽毛包の形態を観察した頸部、背部、胸腹部、大腿部の皮膚を各2検体、10gずつ採材した。各検体に9倍量のプレストン培地（Oxoid）を加え10倍乳剤を作製するため、60

秒間ストマッカー処理を行い、最確数（MPN）法により*Campylobacter*属菌数を測定した。

### 2.2 酸およびアルカリ処理した鶏皮膚を用いたカンピロバクターの付着試験

ブロイラーの中抜きと体の背部から25cm<sup>2</sup>の皮膚を採取し、直径3cmの円筒の底部に貼りつけて固定した。0.01M HCl（pH 2.0）または0.1M NaOH（pH 13.0）を3ml添加し、室温で30分静置した後、滅菌蒸留水で3回洗浄した。次に、*C. jejuni* 81-176株を10<sup>3</sup>~10<sup>8</sup>cfu/mlに調整した菌液3mlを皮膚表面に添加し、30分静置した。その後滅菌リン酸緩衝液（PBS）で洗浄し、鶏皮膚に付着した菌数を平板希釈法またはMPN法より定量的に測定した。

### 2.3 オーバーレイアッセイ法

ブロイラーの中抜きと体の背部から25cm<sup>2</sup>の皮膚を採取し、皮膚上皮面を0.1M NaOHで処理した抽出液（皮膚アルカリ抽出画分）を収集し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法によりタンパクを分離したのち、ニトロセルロース膜に転写した。ブロッキングを行った後、これに*C. jejuni* 81-176株の外膜タンパク画分を添加し、家兎抗*C. jejuni* 81-176株ポリクローナル抗体および酵素標識2次抗体を用いたオーバーレイアッセイ法により、菌体外膜タンパクが結合した皮膚アルカリ抽出画分中のタンパクを検出した。陰性コントロールとして*C. jejuni*の酸抽出抗原を加えずに一次抗体および酵素標識2次抗体を反応させた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 食鳥と体冷却前後の羽毛包の形態的变化とカンピロバクター汚染調査

と体を氷水で冷却すると、羽毛包の形態変化に4パターンが認められた。すなわち、冷却の前後で羽毛包が閉じていたもの（n = 2679；85.5%）、冷却前に閉じていた羽毛包が冷却後に拡大したも

の ( $n = 187$ ; 6.0%), 冷却前に開いていた羽毛包が冷却後さらに拡大したもの ( $n = 184$ ; 5.9%), 冷却後に羽毛包が縮小したもの ( $n = 83$ ; 2.7%) である (Fig. 1)。これらのと体の冷却後のカンピロバクター汚染を部位別に調べた結果, 頸部での汚染が最も高く (0.790 log cfu/10g), 次に背部 (0.783 log cfu/10g) と続き, 大腿部と腹部の汚染度は同程度 (0.301 log cfu/10g) であった (Fig. 2)。これらの結果から, 羽毛包の開閉と汚染菌数の間には関連性は認められなかった。

Berndtsonらは, 湯漬け後の脱羽工程で開いた羽毛包の中に本菌が入り, その後の冷却工程で羽毛包が閉じるため, 菌が毛包内に封じ込められるという仮説を提唱した<sup>3)</sup>が, 今回の結果より, 食鳥と体は脱羽の工程で*Campylobacter*に汚染されるが, その後の冷却の過程で羽毛包が閉じ, 菌が毛包内に封じ込められる可能性は低いことが示唆された。

### 3.2 酸およびアルカリ処理した鶏皮膚を用いたカンピロバクターの付着試験 と体への付着能に及ぼす鶏皮膚のアルカリ処理

の影響を調べたところ, 水酸化ナトリウム水溶液を用いた鶏皮膚の前処理によって, 鶏皮膚の表面に付着する*C. jejuni*の菌数が約1/10に減少した (Fig. 3)。一方, 鶏皮膚の酸処理が本菌の付着能に及ぼす影響を調べたところ, 塩酸のpHに関わらずすべての接種菌数において無処理と比較して付着菌数に有意差は認められなかった (Fig. 4)。これらの結果から, 宿主側の皮膚には*C. jejuni*に対する付着因子が存在し, それらはアルカリ処理

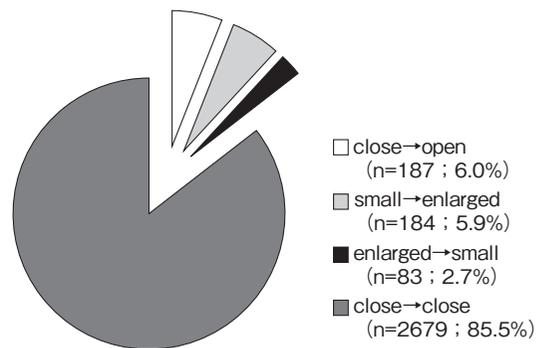


Fig. 1 Morphological changes of feather follicles examined after chilling.

Morphological changes in the feather follicles of chicken carcasses after defeathering and chilling were evaluated using image analysis software.

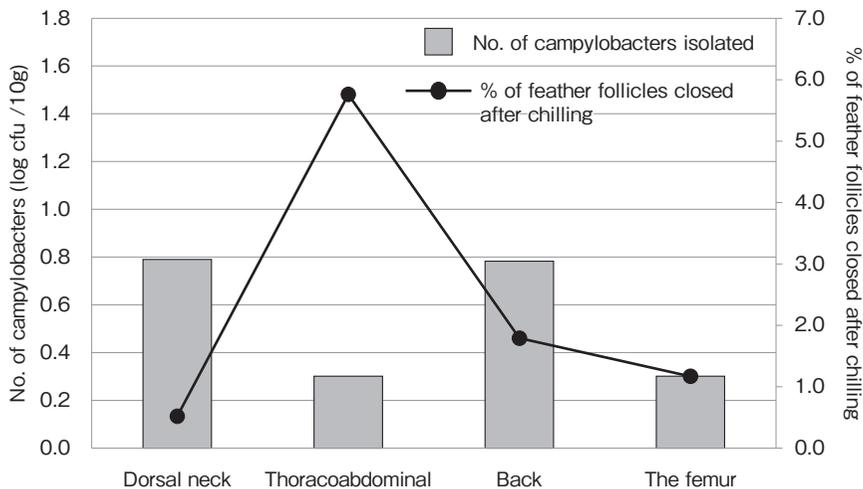


Fig. 2 Ratio of closed feather follicles and contamination by campylobacters in different parts of the skin of chicken carcasses after chilling

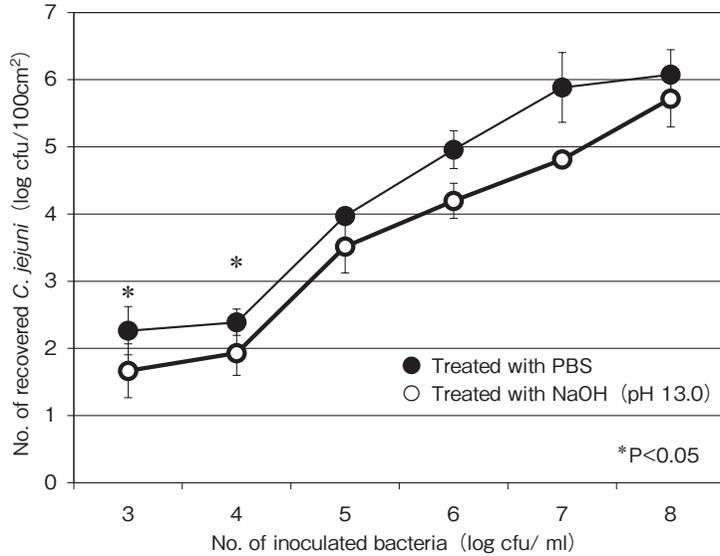


Fig. 3 Effect of alkaline treatment on adhesion of *C. jejuni* to the chicken skin

The counts of *C. jejuni* adhering to the back skins of broiler chickens treated with sodium hydroxide (pH 13.0) were compared to those of controls treated with PBS.

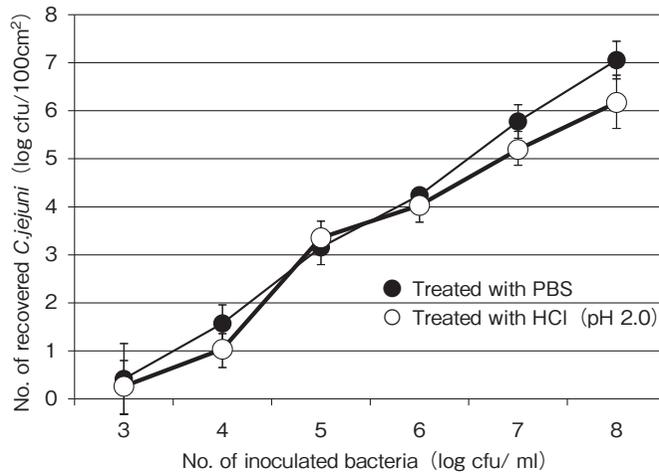


Fig. 4 Effect of acid treatment on adhesion of *C. jejuni* to the chicken skin

The counts of *C. jejuni* adhering to the back skins of broiler chickens treated with hydrochloric acid (pH 2.0) were compared to those of controls treated with PBS.

により遊離あるいは不活化された可能性が示唆された。

3.3 オーバーレイアッセイ法による鶏皮膚アルカリ抽出画分に存在する*C. jejuni*の付着因子の検出

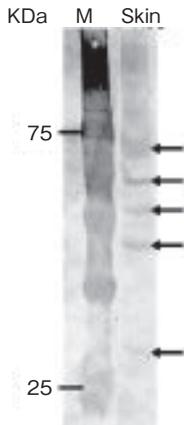


Fig. 5 Detection of adhesion factors in extracts of chicken skin binding to the outer membranes of *C. jejuni* strain 81-176 using an overlay assay  
M; molecular maker, Skin; chicken skin extractions. Arrows represent positive bands.

鶏皮膚上皮のアルカリ処理画分には、カンピロバクターの付着因子の存在を示唆する結果が得られたため、オーバーレイアッセイ法によるブロイラー皮膚アルカリ抽出画分と菌体外膜タンパクとの結合試験を行った。その結果、皮膚上皮のアルカリ処理画分に複数の付着因子が検出された (Fig. 5)。よって、食鳥処理工程で起こる本菌のと体への汚染は、物理的な付着だけでなく、特異的な付着機序の存在が強く示唆された。

#### 4. 要 約

*Campylobacter jejuni* (以下、*C. jejuni*) は世界各国で人の主要な食水系感染症の起因菌として重要視され、疫学調査の結果から鶏肉とその関連調理食品が主な感染源と考えられている。カンピロバクターを保菌した食鳥が処理場に搬入されると、処理場内では容易に交差汚染が起こる。特に、脱羽処理後では、いずれの部位からも高い菌数のカンピロバクターが分離されることから、脱羽処理によると体の物理的な圧迫により総排泄腔から

腸内容物が漏出し、と体表面にカンピロバクターが付着したためと考えられているが、その付着機序を明らかにするまでには至っていない。本研究では、*C. jejuni*がブロイラー皮膚に存在する付着因子を介して特異的に結合しているとの作業仮説を立て、皮膚に存在する付着因子の存在を確認することを試みた。まず、湯漬け後の脱羽工程で開いた羽毛包の中にカンピロバクターが入り、その後の冷却工程で羽毛包が閉じるため、菌が毛包内に封じ込められるという汚染機序の仮説を検証するため、脱羽後と冷却後の羽毛包の形状を比較した。その結果、羽毛包の大部分は脱羽後と冷却後においても閉鎖しており、開いた羽毛包が冷却後に閉じる割合は低く、カンピロバクターの汚染菌数と羽毛包の開閉には関連が認められなかった。次に、食鳥と体皮膚上皮をアルカリ処理すると本菌の皮膚への付着能が低下したが、酸処理では変化しなかった。オーバーレイアッセイ法によるブロイラー皮膚アルカリ抽出画分と菌体外膜タンパクとの結合試験では、複数の付着因子が検出され、食鳥処理工程で起こる本菌のと体への汚染は、物理的な付着だけでなく、特異的な付着機序の存在が強く示唆された。

#### 参考文献

- 1) 三澤尚明, 近藤房生, 後藤公吉, 斎藤志保子, 川森文彦, 小野一晃, 重茂克彦, 品川邦汎: 人および鶏肉由来*Campylobacter jejuni* HS: 2およびHS: 19血清型株のPCR-RFLP法による遺伝子解析, 日獣会誌, 56, 471~475, 2003.
- 2) 三澤尚明: 食鳥処理場におけるカンピロバクター制御法の現状と課題: 日獣会誌, 65, 617~623, 2012.
- 3) Berndtson, E., Tivemo, M., Engvall, A.: Distribution and numbers of *Campylobacterin* newly slaughtered broiler chickens and hens, *Int. J. Food Microbiol.*, 15, 45~50, 1992.

## 豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究2 (コンベンショナル豚)

Experimental infection with porcine deltacoronavirus in conventional pigs

鈴木 亨・大橋 誠一・須田 遊人

(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部門)

Tohru Suzuki, Seiichi Ohashi and Yuto Suda

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

Deltacoronaviruses were first identified in rectal swab samples from several birds and mammals including pigs collected in Hong Kong in 2006–2011. Porcine deltacoronaviruses (PDCoVs) were also detected in United States and Korea in 2014. PDCoV is currently one of common enteric viral pathogen in pigs, because pigs inoculated with only PDCoV show diarrheas. In recent years, we discovered multiple PDCoVs from fecal samples with PEDV- and TGEV-specific PCR negative collected around Japan since 2013, when PED re-emerged. In our previous study, we characterized clinical signs, virus shedding in feces and sera, and viral distribution in various tissues of hysterectomy-produced and colostrum-deprived (HPCD) piglets (3 days old) orally inoculated with PDCoV, YMG/JPN/2014, isolated in ST cell culture. In this study, we performed experimental infections in conventional piglets (they can suckle freely colostrum and nature milk from sows) using the inoculums identical with those in HPCD piglets. In results, conventional piglets inoculated with the PDCoV showed mild symptoms during the observation period as compared with those of HPCD piglets inoculated with the same strain. Our data suggests that suckling milk from sow is important to prevent piglets from the enteric pathogens exist outside them.

### 1. 目 的

近年、アルファ、ベータ、ガンマコロナウイルス属に次ぐ4番目の新しい属に分類される新型コロナウイルス、すなわちデルタコロナウイルスが多様多様な鳥類および数種の哺乳類で検出された<sup>1)</sup>。さらに、Wooらの研究グループは2009年から2010年にかけて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<sup>2)</sup>。また米国では、豚流行性下痢 (PED) が全国的に流行

している最中である2014年に、下痢を呈した個体から初めて豚デルタコロナウイルスが検出され、その後の遡り調査によって少なくとも2010年には豚デルタコロナウイルスが米国に侵入していたことが明らかとなっている<sup>3,4)</sup>。

米国での豚デルタコロナウイルスの発見を受けて、我が国でもPEDの発生が後を絶たない状況であった2014年に、当所において、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、日齢別の陽性数は哺乳豚が最も高く、次いで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<sup>5,6)</sup>。しかしながら、使用しているウイルス株(野外由来株あるいは細胞分離株)やウイルス接種時の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が、その他の病態に関しては一致した知見が得られていない。そのため、PEDやTGEとの類症鑑別上不可欠である豚デルタコロナウイルス特有の臨床症状や感染動態はいまだに把握できないままである。

申請者は昨年度感染症に対して感受性が高い子宮摘出初乳未摂取子豚を用いて、豚デルタコロナウイルスの感染実験を実施し、本ウイルス特有のこれら子豚における臨床症状および感染動態を明らかにした。しかしながら、子宮摘出初乳未摂取子豚は微生物学的に無菌豚であるため、ウイルス単独さらに特有の病原性を詳細に解析するには適しているが、実際に生産現場における状況をよりよく反映しているかという点には疑問が残る。そこで、今年度は微生物学的に生産農場と同等のグレードの子豚(コンベンショナルな子豚)を対象に、感染実験を実施し、子宮摘出初乳未摂取子豚の感染実験で得られた結果の再現性を解析・検証することを試みた。

## 2. 方法

### 2.1 ウイルスと細胞

昨年度と同様に、山形県内で発生した下痢を発症した豚の小腸内容10%乳剤からST細胞で分離

した豚デルタコロナウイルス株(YMG/JPN/2014)を使用した。なお、感染価は $10^6$  TCID<sub>50</sub>/mlであった。

### 2.2 豚への感染実験

民間企業から妊娠母豚を購入し、当所動物実験施設において自然分娩させ、子豚計12頭を得た。分娩後、子豚は母乳(初乳、常乳)を自由に摂取できる環境で飼育・管理した。子豚は3日齢時で上記ウイルス株を2mlずつ経口投与され、投与後29日目(約4週間)まで臨床症状および感染動態を観察した。ウイルス投与後から8日間、糞便は1—2日おきに、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、本ウイルス株の体内分布を調べるために、投与後4日目と8日目で、4頭ずつを解剖し、残りの4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(腸管膜リンパ節、扁桃)を採取し、ウイルス学的解析に供した。

### 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%乳剤を作製し、遠心分離(3000×g, 10分)により夾雑物を取り除いた上清を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で粉碎し、リン酸緩衝液で希釈して20%乳剤を作製し、遠心分離(3000×g, 10分)により夾雑物を取り除いた上清を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。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 臨床症状

個体間で程度に差はあるが、いずれの個体も一過的に元気消失や軽い下痢（軟便）を示した程度であり、観察期間を通じて顕著な臨床症状は認められなかった。また、すべての個体が観察期間を通じて生存した。本結果は本研究に用いたウイルス株を分離した野外（農場）での結果を反映するものであった。

#### 3.2 糞便中および血中におけるウイルス排泄量

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。なお、本図には参考として昨年度の研究成果である子宮摘出初乳未摂取子豚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も合わせて表示した。糞便中に排泄されるウイルス量は投与後6日目前後から上昇し、投与後11日目あるいは14日目でピーク（糞便1 mlあたり $10^8$ — $10^9$ コピー数）に達し、そ

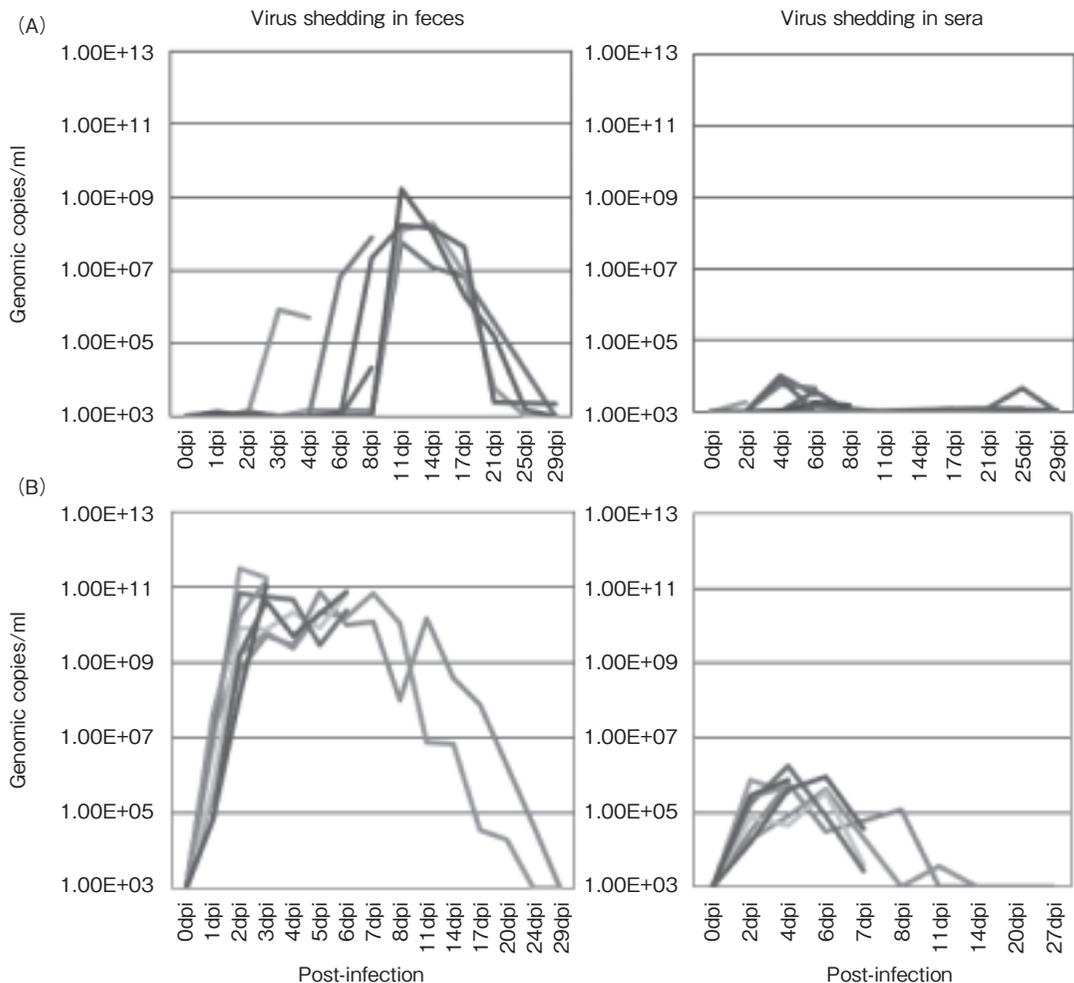


Fig. 1 Virus shedding in feces and sera of conventional (A) and gnotobiotic (B) piglets inoculated with YMG/JPN/2014. Individual virus shedding (shown in different colors) was detected by a quantitative porcine deltacoronavirus membrane(M) gene specific real-time RT-PCR at each time point.

の後徐々に減少して投与後29日目(観察最終日)ではほぼ検出限界以下となった。子宮摘出初乳未摂取子豚の糞便中に排泄されるウイルス量の経時的变化と比べると、排泄開始時に遅れがあるとともに、排泄されるウイルス量も少ないことが明らかとなった。次に、血中に排泄されるウイルス量は一過的に上昇(投与後4日目あるいは6日目でピーク)を示すが、観察期間を通じてほとんど検出限界以下であった。また、子宮摘出初乳未摂取子豚の血中に排泄されるウイルス量の経時的变化と比べると、排泄期間および排泄量ともに著しく少ないことが明らかとなった。以上のことから、本研究に用いたコンベンショナルな子豚は子宮摘出初乳未摂取豚と比べて、特に感染初期においてウイルスの増殖が抑えられていることが明らかとなった。コンベンショナルな子豚は母豚の初乳および常乳が自由摂取であったことから、それらに含まれる免疫成分によりウイルスの増殖が抑えられ、症状が緩和されている可能性が示唆された。

### 3.3 豚デルタコロナウイルスの体内分布

投与後4日目、投与後8日目および投与後29日目にそれぞれ4頭ずつを解剖し、リアルタイムRT-PCRを用いて各種臓器におけるウイルス量を定量・解析した。投与後4日目および8日目では、特に空腸下部から結腸にかけて多数のウイルスが存在していることが示された。また、腸間膜リンパ節を除く他の免疫器官および主要臓器ではウイルスの存在はほとんど認められなかった。投与後29日目では、回腸以外の臓器でウイルス遺伝子は検出されなかった。これらの結果は昨年度行った子宮摘出初乳未摂取子豚における解析結果およびChenらによって報告された結果とほぼ同様の結果であった<sup>6)</sup>。すなわち、豚デルタコロナウイルスは主に子豚の空腸から大腸にかけて存在・増殖していることが明らかとなった。

## 4. 要 約

今年度は微生物学的に生産農場と同等のグレードの子豚(コンベンショナルな子豚)を対象に、昨年度実施した子宮摘出初乳未摂取子豚の感染実験と同じ条件(ウイルス接種時の日齢、用いたウイルス株および接種量など)で感染実験を実施した。ウイルスを接種されたコンベンショナルな子豚は子宮摘出初乳未摂取子豚の場合と比べて、顕著な臨床症状(水様性下痢など)を示さないまま、すべての個体が観察期間を通じて生存した。また、糞便中および血中のウイルス排泄期間および量に関して、両者で顕著な相違が認められた。すなわち、コンベンショナルな子豚は子宮摘出初乳未摂取子豚と比べて、ウイルス排泄期間および量が少ないことが明らかとなった。その一方で、いずれの子豚においても感染から1週間程度は本ウイルスは主に空腸~大腸で活発に増殖しているが、時間経過に伴いウイルスが消失していくことが示唆された。本研究により、コンベンショナルな子豚は母乳に含まれる免疫成分により本ウイルスの増殖が効果的に抑えられ、臨床症状が緩和されている可能性が示唆された。したがって、母豚の健康状態を良好に保ちつつ、その母乳を子豚にしっかりと与えることは感染症を防御するうえで重要であることが示唆された。

## 文 献

- 1) Woo, P. C., Huang, Y., Lau, S. K., Yuen, K. Y.: Coronavirus genomics and bioinformatics analysis, *Viruses*, 2, 1804~1820, 2010.
- 2) 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.

- 3) Wang, L., Byrum, B., Zhang, Y.: Detection and genetic characterization of deltacoronavirus in pigs, Ohio, USA, 2014, *Emerg Infect Dis*, **20**, 1227~1230, 2014.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

## 遺伝子操作技術を駆使した生後感染型アカバネウイルスの病原性決定基の同定と流行ウイルス予測への応用

Identification of pathogenic determinant of Akabane virus by using reverse genetics and application for endemic prediction of virus

正 谷 達 膳  
(鹿児島大学共同獣医学部)

Tatsunori Masatani  
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Akabane virus (AKAV) is an arthropod-borne virus (arbovirus) which causes Akabane disease when susceptible cattle are infected. The main clinical signs of Akabane disease are congenital abnormalities in the fetus; however, some AKAV variant strains cause encephalomyelitis in adult cows. The gene(s) responsible for the pathogenesis and mechanism of encephalomyelitis in adult cows is still unknown. To reveal the mechanism of AKAV pathogenesis, we tried to establish a reverse genetics system of virulent AKAV strains. To determine the full-genome RNA sequences of virulent AKAV strains recently isolated in Japan, we utilized KM-2/Br/06, an AKAV strain which has broken out on a large scale in southern Japan in 2006, and FI-1/Br/08, an AKAV strain which caused neurological symptoms in adult cattle in Fukui Prefecture in 2008, and then we performed the 5'-rapid amplification of cDNA ends (RACE) and 3'-RACE, and RT-PCR on the basis of sequences determined by 5'-and 3'-RACEs. Finally, we constructed full genome plasmids containing sequences of sense RNA segments driven by T7 polymerase, with the 3' ends trimmed by the hepatitis delta virus ribozyme. Following transfection with the plasmids, we rescued the infectious viruses. Further studies will be needed to check the biological characteristics of the rescued recombinant viruses.

### 1. 目 的

アカバネ病は、ブニヤウイルス科に属するアカバネウイルス (AKAV) によって引き起こされる牛の疾病である。AKAVは小型吸血昆虫 (蚊、ヌカカなど) によって媒介され、夏季—秋季に鹿児島・熊本・宮崎県など南日本を中心に毎年流行する。AKAVは感染宿主の血中で一過性に増殖し、媒介昆虫がこれを吸血し、他の牛を刺咬する

ことで感染が拡大する。本ウイルスは、通常は牛に対する病原性は低く、無症状のまま耐過する。しかし、本ウイルスが妊娠牛に感染し子宮内の胎仔に到達・増殖した場合、流産・死産および仔牛の奇形を生じる。このため、本疾病による牛繁殖農家に対する経済的ダメージは大きい。AKAVに対するワクチンは存在するものの、いまだに毎年散発的に発生しており、時として数十戸の農家に同時発生して多大な損害を与える。そのため、

牛繁殖農家にとっては対策を要する疾病の一つである。特に、流行地である南日本は我が国の重要な肉牛生産基地でもあるため、予防の徹底が求められている。

AKAVは、本ウイルスを保有する小型吸血昆虫が季節風に乗って春—夏にアジアから日本へ上陸し、毎年異なるウイルス株が日本南部を中心に各地に流行する。このため越境性動物疾病としても重要な感染症であり、動物衛生研究所や家畜保健衛生所よる媒介昆虫のサーベイランスが定期的に行われ、その年に流行する株を予測している。これらAKAV株の中には、上述の胎仔にのみ病原性を発揮する「通常型」のAKAVとは異なり、成牛に対して致死的な非化膿性脳炎を引き起こす「生後感染型」と呼ばれるウイルス株が存在し、我が国でも度々流行している<sup>1,2)</sup>。生後感染型ウイルスによる被害は通常型ウイルスに比べて甚大であり、2006年に熊本県・鹿児島県で集団流行した際は数百頭を超える被害を出している<sup>3)</sup>。しかし、その病原性発現メカニズムは不明であり、またどの遺伝子領域の変異が両タイプの病原性の違いを決定しているのかは不明である。我々は、生後感染型AKAVの病原性を決定する遺伝子領域およびそのアミノ酸配列が同定されれば、流行前の媒介昆虫サーベイランスの際に当該遺伝子領域を解読することで、生後感染型AKAVの早期摘発、流行予測ならびにワクチン接種の徹底を農家へ周知するうえでの科学的根拠となりうる「ウイルス予報」の一助になると考えた。

我々はこれまでに、狂犬病ウイルスにおいて遺伝子組換え技術（リバースジェネティクス）を駆使し、強毒株と弱毒株の遺伝子を入れ替えたキメラウイルスを作出しその性状（増殖性、病原性、免疫回避能力など）を比較することで、どの遺伝子のどのアミノ酸の変異がウイルスの病原性を決めているかを明らかにしてきた<sup>4)</sup>。そこで本研究

では、これら技術をAKAVに応用することで、生後感染AKAVと通常型AKAVの病原性の違いを決定する遺伝子領域をアミノ酸レベルで同定することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 細胞

ハムスター肺由来HmLu-1細胞及びBHKT 7-9細胞（岐阜大学・伊藤直人博士より分与<sup>5)</sup>）を用いた。これら細胞はともに10% Tryptose phosphate broth, 5%牛胎仔血清およびペニシリン・ストレプトマイシンを含むイーグル最小必須培地（EMEM, Wako）で培養した。

### 2.2 ウイルス

2006年に熊本県で集団流行した際に分離されたKM-2/Br/06株<sup>2)</sup>、2008年に福井県で分離されたFI-1/Br/08株<sup>3)</sup>およびAKAVのプロトタイプであるJaGAr39株は、動物衛生研究所より供与されたものを使用した。これらウイルスはすべてHmLu-1細胞で増殖させたのちストックウイルスとして分注し、使用するまで-80℃にて保存された。

### 2.3 RNA抽出

ストックウイルス140  $\mu$ lをもとに、QiaAmp Viral RNA Mini Kit（Qiagen）を用いてRNAを添付のプロトコールに基づいて抽出した。抽出されたRNAは濃度・純度を測定後、使用するまで-80℃にて保存された。

### 2.4 RACE

各ウイルスの全ゲノムRNA配列のうち3'および5'末端の配列は、Liらの方法<sup>6)</sup>を改変した以下に示す rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法によって決定した。

3'-RACE：抽出したウイルスRNA（1  $\mu$ g）にDT88アダプター（5'-GAAGA GAAGG TGGAA ATGGC GTTTT GG-3'：3'末端をcordecypin修

飾および5'末端をリン酸修飾したものを、T4 RNA ligase 1 (New England Biolabs) を用いて結合させ、さらにDT88と相補的なプライマーであるDT89 (5'-CCAAA ACGCC ATTTTC CACCT TCTCT TC-3') およびPrimescript II first strand cDNA synthesis kit (タカラバイオ) を用いてcDNAを合成した。得られたcDNAをRNaseH (タカラバイオ) により処理したのち、InnuPrep PCR Pure Light Kit (Analytik Jena) によって精製した。

5'-RACE: 抽出したウイルスRNA (1  $\mu$ g) を用いて、AKAV各分節5'末端特異的プライマーを用いてPrimescript II first strand cDNA synthesis kitによりcDNAを合成した。RNaseHにより処理したのち、InnuPrep PCR Pure Light Kitによって精製し、3'-RACE同様DT88をcDNAに結合させた。

5'-および3'-RACEともに、得られたcDNAを鋳型とし、Tks Gflex DNA polymerase (タカラバイオ)、AKAV各分節の3'または5'末端特異的プライマーおよびDT89を使用してSemi-nested PCRを行った。得られた増幅産物をTOPO Zero blunt PCR cloning kit (Invitrogen) によってクローニングし、得られたプラスミドを4クローン精製した。シークエンス解析によって各ウイルスの3'および5'末端配列を決定した。

### 2.5 RT-PCR

抽出した各ウイルスRNAより、Primescript II first strand cDNA synthesis kitによりランダムヘキサマーを用いてcDNAを合成した。これを鋳型とし、後述のpT7-riboSM2ベクターに入るように、制限酵素*Esp3I*サイトを各ウイルスゲノムRNA配列の両端に付くよう設計されたプライマーを用いて、RT-PCRにより全ゲノム配列を増幅した。酵素はPrimestar MAX (タカラバイオ) を使用した。

### 2.6 フルゲノムプラスミドの構築

T7プロモーター配列、2つの*Esp3I*サイトおよびデルタ肝炎ウイルス由来リボザイム配列を有するpT7-riboSM2<sup>7)</sup>は、Friedemann Weber教授(ギーセン大学)より分与された。*Esp3I*で消化したpT7-riboSM2に、同じく*Esp3I*で消化した各ウイルスゲノム配列をDNA Ligation Kit Mighty Mix (タカラバイオ) を用いて挿入した。

### 2.7 トランスフェクション

BHKT7-9細胞にTransIT-LT1を使用して、各株についてフルゲノムプラスミドを既報に従いトランスフェクションした<sup>8)</sup>。トランスフェクション後4日目に細胞培養上清を回収し、新たにコンフルエントになるよう培養したBHKT7-9細胞に接種した。4日後に細胞を4%パラホルムアルデヒドにて固定し、メタノールによって膜透過処理を行ったのち、抗AKAV Mタンパク質モノクローナル抗体(東京大・堀本泰介教授より分与)にて間接蛍光抗体法を行うことによって感染性ウイルスの有無を評価した。

## 3. 結果と考察

今回、T7プロモーターをプロモーターとし、デルタ肝炎ウイルス由来リボザイムによって転写産物の末端を成形し、ウイルスゲノムとして産生させるようにフルゲノムプラスミドを設計した(Fig. 1A)。全長ウイルスゲノムRNA分節をPCRにより増幅するにあたり、KM-2/Br/06株、FI-1/Br/08株およびJaGAr39株の各3ゲノム分節について両末端の配列が不明であったため、5'-RACEおよび3'-RACEによってそれぞれの末端配列を決定した。その結果、各ウイルスともに、オルソブニヤウイルス属の3つのゲノム分節すべてで保存されているとされる両端7塩基(3'末端:3'-AGTAGTG-5'および5'末端:3'-CACTACT-5')は保存されていた。これら塩基は互いに相補的配

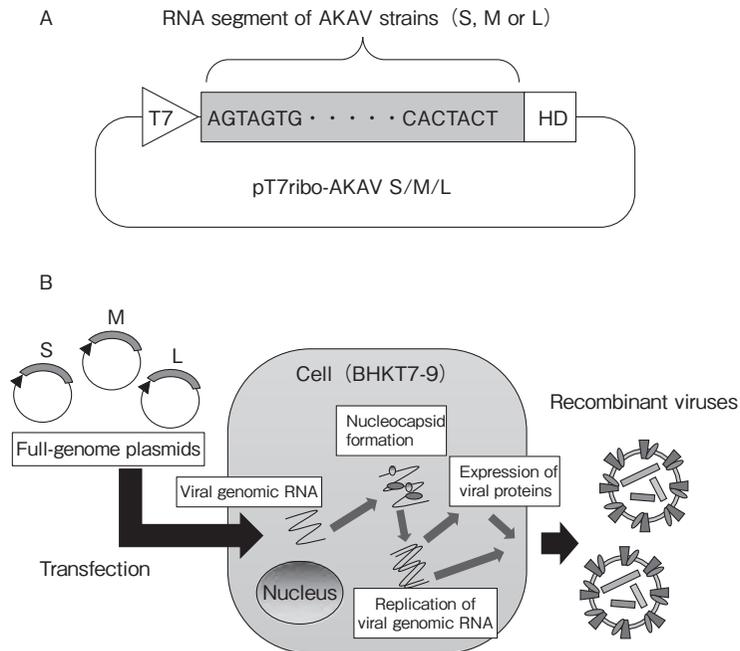


Fig. 1 Reverse genetics system of AKAV.

- A: Schematic representation of full-genome plasmids.  
T7 promoter (T7) and HDV ribozyme (HD) are shown.  
B: Schematic figure of reverse genetics for AKAV.

列であり、感染細胞およびウイルス粒子中で相補的結合し、ゲノムRNAをヌcleoカプシド化するのに重要であると考えられた。

各ウイルスについて、3つの分節について全塩基配列を決定したのち、pT7-riboSM2の*Esp3I*サイトに各配列を挿入した。挿入後、改めて全塩基配列を確認したのち、これらを各ウイルスについて3分節分のプラスミドをセットでBHK7-9細胞へとトランスフェクションした (Fig. 1B)。トランスフェクション後、4日間観察を続けたが、細胞に著変はみられなかった。感染性粒子が得られていることを確認する目的で、トランスフェクション後4日目の細胞上清を遠心し、これを新しく培養したBHK7-9細胞へと接種した。間接蛍光抗体法によってAKAV感染細胞の有無を評価したところ、いずれの株についても、感染5日目においてわずかに感染細胞を確認すること

ができた。しかし、感染細胞数が少なかったこと、トランスフェクション後4日目においてもAKAV感染時に特徴的な細胞変性効果 (CPE) が認められなかったことから、トランスフェクション効率およびウイルス培養条件の最適化が必要であると考えられた。

今後、条件最適化によってウイルスを回収できた場合、得られた組換えウイルスの性状 (増殖性、プラーク形成性、マウスへの病原性など) について親株と比較するほか、各分節をウイルス間で交換した「人工リアソータント株」を作出し、病原性に関与するウイルスゲノム分節およびコードされるタンパク質の同定を行っていく予定である。

#### 4. 要 約

アカバネウイルス (AKAV) は小型吸血昆虫

(蚊, ヌカカなど)によって媒介される牛のウイルスである。AKAV株の中には, 妊娠牛に感染し胎仔に病原性を発揮するタイプの株と, 成牛に対しても致死的な非化膿性脳炎を引き起こす「生後感染型」と呼ばれるタイプの株が存在する。しかし, 両タイプの病原性の違いを決めるウイルス遺伝子やそのメカニズムは不明である。そこで本研究では, 生後感染型株の病原性発現機構を明らかにするために, 種々の生後感染型株AKAV株の遺伝子操作系を確立することを目的とした。2006年に熊本県で集団流行した際に分離されたKM-2/Br/06株, 2008年に福井県で分離されたFI-1/Br/08株について全ゲノム分節RNA配列を解読する目的で, まず5'-RACE法および3'-RACE法によって3本のゲノムRNA分節の両末端を解読・決定した。決定された両末端配列に基づいてゲノムRNAをRT-PCRによって増幅し, 各ゲノム分節の上流にT7プロモーター配列を, 下流にデルタ肝炎ウイルス由来リボザイム配列を付した形でフルゲノムプラスミドを両ウイルスの全分節について構築した。

#### 文 献

- 1) Miyazato, S., Miura, Y., Hase, M., Kubo, M., Goto, Y., Kono, Y.: Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus, *Nippon Juigaku Zasshi*, **51**, 128~136, 1989.
- 2) Kato, T., Yanase, T., Suzuki, M., Katagiri, Y., Ikemiyagi, K., Takayoshi, K., Shirafuji, H., Ohashi, S., Yoshida, K., Yamakawa, M., Tsuda, T.: Monitoring for bovine arboviruses in the most southwestern islands in Japan between 1994 and 2014, *BMC Vet Res*, **12**, 125, 2016.
- 3) Kono, R., Hirata, M., Kaji, M., Goto, Y., Ikeda, S., Yanase, T., Kato, T., Tanaka, S., Tsutsui, T., Imada, T., Yamakawa, M.: Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabanevirus in southern Japan, *BMC Vet Res*, **4**, 20, 2008.
- 4) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H., Sugiyama, M.: Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG-I-mediated antiviral response, *J Virol*, **84**, 4002~4012, 2010.
- 5) Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M., Minamoto, N.: Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system, *Microbiol Immunol*, **47**, 613~617, 2003.
- 6) Li, Z., Yu, M., Zhang, H., Wang, H. Y., Wang, L. F.: Improved rapid amplification of cDNA ends (RACE) for mapping both the 5' and 3' terminal sequences of paramyxovirus genomes, *J Virol Methods*, **130**, 154~156, 2005.
- 7) Habjan, M., Penski, N., Spiegel, M., Weber, F.: T7 RNA polymerase-dependent and -independent systems for cDNA-based rescue of Rift Valley fever virus, *J Gen Virol*, **89**, 2157~2166, 2008.
- 8) Takenaka-Uema, A., Sugiura, K., Bangphoomi, N., Shioda, C., Uchida, K., Kato, K., Haga, T., Murakami, S., Akashi, H., Horimoto, T.: Development of an improved reverse genetics system for Akabane bunyavirus, *J Virol Methods*, **232**, 16~20, 2016.

## ジビエとして食される野生動物が保有する食中毒菌の薬剤耐性

Drug resistance of food-borne bacteria isolated from game meat animals

安藤 匡子

(鹿児島大学農水産獣医学域獣医学系)

Masako Andoh

(Research field in Veterinary Medicine, Agriculture, Fishery and Veterinary Medicine Area, Kagoshima University)

Consumption of game meat is becoming popular due to the increasing number of hunted animals in order to control wildlife population in Japan. However, food hygiene control for game meat processing needs to be improved to prevent foodborne illness which include bacterial infections. To support improvement of food safety management, food borne-bacteria carriage and drug resistance of isolates in wild deer and boar were investigated. Fresh fecal samples from 306 deer and 211 boars were collected. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* was isolated from 50 deer (16.3%) and 3 boars (1.4%). O serotypes of the isolates included O157 and O26 that may cause serious disease to human. Drug resistant screening against Ampicillin, Cefazolin, Cefotaxime, Streptomycin, Gentamycin, Kanamycin, Oxytetracycline, Colistin, Nalidixic acid, and Ciprofloxacin was conducted and a Streptomycin and Oxytetracycline resistant isolate was found. *Staphylococcus aureus* was also isolated from 57 deer (18.5%) and 3 boars (1.4%). Methicillin-resistance was not observed in these isolates. In summary, the presence of antimicrobial resistant isolate in game meat animals was low in this study, however, sustained monitoring would still be necessary for better public health. Overall, prevention of fecal contamination during processing is critical for adequate hygiene management for game meat.

### 1. 目 的

日本各地において、野生シカ、イノシシの生息数が著しく増加しており、それに伴い様々な被害が増大している。畜産業においては、牧草地への侵入、家畜用飼料の盗食が経済的損失とともに疾病防疫の観点から深刻である。被害防止の対策として、野生鳥獣の狩猟捕獲が促進され捕獲件数は年々増加している。こうした野生動物を資源とし

て有効利用するための一案として、捕獲動物をジビエとして食肉加工することに注目が集まっている。従来はジビエの消費は狩猟者や愛好家を中心であったが、地域振興としての利用が増加するなど一般消費者への流通が増加している。しかし、家畜と異なり、ジビエとなる野生動物のと殺・解体処理の衛生管理に関しては法律（と畜場法など）の対象にはなっていない。国および自治体によりマニュアルが作成されているが、実際には自

主的な管理で解体処理されているのが実情である。国内外でジビエ由来の細菌性食中毒の発生があり、今後、ジビエの普及に伴う食中毒事件の増加が懸念される。現行のマニュアル遵守を励行し、ジビエの適切な衛生管理を普及するために、リスクを評価させるための基礎的データが必要である。

近年、ヒトから薬剤耐性を持つ病原性細菌の検出が増加し、世界的な問題となっている。抗菌薬を投与された家畜に出現した耐性菌がヒトへ伝播することが大きな問題である。食中毒を含む細菌感染症において、治療のために抗菌薬が使用される場合も多く、薬剤耐性はその治療効果への影響が懸念される。野生動物は、自然に発生した耐性菌だけでなく、動物薬を投与した家畜あるいはヒトの生活活動により汚染された環境から薬剤耐性菌を獲得する可能性がある。行動範囲に制限のない野生動物は農場や地域を越えて病原性細菌・薬剤耐性菌を伝播させる可能性があることから、ヒトへの危害防止と家畜の疾病防疫のために野生動物における薬剤耐性菌の情報は重要である。このような背景から、ジビエとして食される野生動物の食中毒菌保有状況とその薬剤耐性を調査する。

## 2. 方法

### 2.1 材料

2014年6月から2016年5月の毎月、中国および九州地方において捕獲・解体された野生シカ308頭、イノシシ211頭から新鮮直腸便を採集した。

### 2.2 細菌の分離と同定

志賀毒素産生性大腸菌 (Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: STEC) は、糞便スワブをクロモアガーSTEC寒天培地 (関東化学) に直接塗抹し分離した。本培地においてSTECに特徴的な藤色コロニーを釣菌し、非選択培地にて純培養した。菌種は、マトリックス支援レーザー脱離イオ

ン化飛行時間型質量分析法 (MALDI TOF-MS)、すなわち質量分析装置 autoflex speed TOF/TOF-KG (Bruker Dalconics) および MALDI Biotyperソフトウェアにより同定した。取得したマススペクトルをライブラリとのマッチングにより、マッチングスコアが1.7以上で属 (*Escherichia* 属) 同定、2.0以上で種 (*Escherichia coli*) 同定とし、1.7未満であった株を同定不能とした。志賀毒素遺伝子 (*stx1*, *stx2*) の保有はPCRにより確認し<sup>1)</sup>、STECと同定した。O血清型は、遺伝子タイピング<sup>2)</sup>により決定した。

黄色ブドウ球菌は、糞便1gを7%食塩加ミューラーヒントン培地10mlにて増菌後、卵黄加マンニット食塩寒天培地にて分離した。卵黄反応が認められたコロニーを釣菌し、非選択培地にて純培養した。グラム染色およびMALDI TOF-MSにて同定した。

### 2.3 薬剤感受性試験

STECは、最小発育阻止濃度 (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) を寒天平板希釈法およびClinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の基準を用いて測定した。家畜との接触の可能性を検討するために、牛または豚への使用が承認されている薬剤、および牛または豚への使用が承認されている薬剤と耐性機序が類似している薬剤として農林水産省の家畜のモニタリングに用いられている<sup>3)</sup>、アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、オキシテトラサイクリン、コリスチン、ナリジクス酸、シプロフロキサシンの10薬剤を試験した。

黄色ブドウ球菌については、メチシリン耐性をディスク拡散法により試験した。オキサシリンおよびセフォキシチンディスクを用い、CLSIの基準を用いて判定した。

### 3. 結果と考察

STECは、シカ306頭中50頭から61株（保有率16.3%）、イノシシ211頭中3頭から4株（保有率1.4%）分離された（Table 1）。一頭から複数の株が分離されることもあった。保有率はシカが有意に高かった（オッズ比=13.44, 95%信頼区間：4.13~43.70）。分離株の*stx*遺伝子およびO血清型（遺伝子型）は、Table 2に示した。

分離されたSTECの薬剤耐性は、1株においてストレプトマイシンおよびテトラサイクリンに対して認められた。耐性株のMIC（ $\mu\text{g/mL}$ ）はストレプトマイシン（耐性限界値：32  $\mu\text{g/mL}$ ）32（ $\mu\text{g/mL}$ ）、オキシテトラサイクリン（耐性限界値：16  $\mu\text{g/mL}$ ）128（ $\mu\text{g/mL}$ ）であり、耐性率は両薬剤ともに1.5%であった。耐性株は、シカ由来の血清型O113であり、病原因子*stx1*, *stx2*, *eaeA*を保有していた。O113は、ヒトの下痢症例

から分離された例もあり、ジビエがヒトの薬剤耐性病原性大腸菌感染症に関与する可能性が示された。耐性株の検出率は低かったが、その存在が証明されたことから、同様の調査を継続する必要性が示された。また、分離株が保有する耐性遺伝子について解析する必要がある。

大型野生動物におけるSTECの保有状況および保有株については、北海道のシカでの詳細な解析報告があるが、その他の地域についての情報は極めて限定的である。同一の地域において通年を通しての調査は、国内で初めてであり、食肉として加工される野生シカ・イノシシの危害分析のために有益な情報である。

黄色ブドウ球菌は、シカから57株（保有率18.6%）、イノシシから3株（保有率1.4%）分離された（Table 1）。保有率はシカが有意に高かった（オッズ比 = 15.74, 95% 信頼区間：4.19 ~ 32.93）。薬剤感受性試験を行った49株はすべて、

Table 1 Number of positive animals for Shiga toxin producing *Escherichia coli* (STEC) and *Staphylococcus aureus*

	Number of animal	STEC positive	<i>S. aureus</i> positive
Deer	306	50 (16.3%)	57 (18.6%)
Boar	211	3 (1.4%)	3 (1.4%)

Table 2 Characterization of Shiga toxin producing *Escherichia coli* isolated in this study

O serotype (O genotype)	Number of isolate	Origin animal	<i>stx1</i> gene	<i>stx2</i> gene	<i>eaeA</i> gene	Drug resistance
O11	11	Deer	-	+	-	None
O26	1	Deer	-	+	+	None
O54	9	Deer	-	+	-	None
O84	3	Deer	+	-	+	None
O113	1	Deer	+	+	-	SM, OTC
O128	1	Deer	-	+	-	None
O146	33	Deer, Boar	- / +	+	-	None
O156	1	Deer	+	+	+	None
O157	4	Deer, Boar	-	+	+	None

SM: Streptomycin, OTC: Oxytetracycline.

メチシリン耐性の指標となるオキサシリンおよびセフォキシチンに対して感受性であった。

野生動物における薬剤耐性ブドウ球菌は、鳥類および齧歯類の調査が多く、大型野生動物については報告が少ない。スペインの野生シカおよびイノシシは、黄色ブドウ球菌の保有率は高いが、耐性菌の保有率は極めて低いことが報告されている<sup>4,5)</sup>。本研究においてメチシリン耐性株は認められなかったが、分離株の遺伝子型を含め、国内の大型野生動物が保有する菌株のモニタリングが必要である。

本研究は、国内における野生動物由来の食肉であるジビエの安全性を確かめ、適切なリスク回避対策のための基礎的データとなる。増加傾向にある狩猟動物の食肉への有効利用を促進し、農業・畜産業における野生鳥獣による被害軽減を期待したい。これまで知られていない野生動物が保有する食中毒菌の薬剤耐性の把握は、ヒトの健康被害の防止に重要である。

#### 4. 要 約

日本各地でジビエの加工・消費が増加傾向にあり、適切な衛生管理ための基礎データとして、野生動物が保有する食中毒細菌とその薬剤耐性を調査した。野生シカ306頭およびイノシシ211頭の新鮮糞便を調査した。それぞれ16.3%および1.4%がSTECを保有していた。分離されたSTECのO血清型はヒトから検出される型であり、重篤な疾患の原因となるO157およびO26が含まれた。アンピシリン、セファゾリン、セフォタキシム、ストレプトマイシン、ゲンタマイシン、カナマイシン、

オキシテトラサイクリン、コリスチン、ナリジクス酸、シプロフロキサシンに対する感受性試験では、1株(O113)がストレプトマイシン・オキシテトラサイクリン耐性であった。黄色ブドウ球菌は、シカ18.6%、イノシシ1.4%から分離され、メチシリン耐性を示す株は認められなかった。今回の研究では分離株の薬剤耐性率は低かったが、継続したモニタリングが必要である。ジビエとして食される野生動物がヒトへ危害を及ぼす可能性のある細菌を保有することが確認された。ジビエ由来の危害を防ぐ一助として、食肉への加工課程における糞便汚染防止が重要である。

#### 文 献

- 1) Flemming Scheutz, Louise D. Teel, Lothar Beutin, Denis Piérard, Glenn Buvens, Helge Karch, Alexander Mellmann, Alfredo Caprioli, Rosangela Tozzoli, Stefano Morabito, Nancy A. Strockbine, Angela R. Melton-Celsa, Maria Sanchez, Soren Persson, Alison D. O'Brien: *Journal of Clinical Microbiology*, **50**, 2591~63, 2012.
- 2) Atsushi Iguchi, Sunao Iyoda, Kazuko Seto, Tomoko Morita-Ishihara, Flemming Scheutz, Makoto Ohnishi, Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan: *Journal of Clinical Microbiology*, **53**, 2427~32, 2015.
- 3) 農林水産省動物医薬品検査所, [http://www.maff.go.jp/nval/tyosa\\_kenkyu/taiseiki/](http://www.maff.go.jp/nval/tyosa_kenkyu/taiseiki/)
- 4) M. Concepción Porrero, Aránzazu Valverde, Pedro Fernández-Llario, Alberto Díez-Guerrier, Ana Mateos, Santiago Lavín, Rafael Cantón, José-Francisco Fernández-Garayzabal, Lucas Domínguez: *Emerging Infectious Diseases*, **20**, 899~901, 2014.
- 5) Porrero MC, Mentaberre G, Sánchez S, Fernández-Llario P, Casas-Díaz E, Mateos A, Vidal D, Lavín S, Fernández-Garayzabal JF, Domínguez L: *Applied and Environmental Microbiology*, **80**, 4865~70, 2014.

# 肉用子牛におけるマイコプラズマ感染症の新たな迅速診断用PCR法の構築と肉用農場におけるマイコプラズマ感染症予防への応用

A novel PCR methods for rapid screening of Mycoplasma infection of beef calf and their application for the prevention of Mycoplasma infection in beef farm

樋口 豪 紀・岩 野 英 知\*

(酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医衛生学ユニット, \*酪農学園大学獣医学群獣医学類獣医衛生化学ユニット)

Hidetoshi Higuchi and Hidetomo Iwano\*

(Animal Health Lab., Faculty of Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ.,

\*Veterinary Biochem., Faculty of Vet. Med., Rakuno Gakuen Univ.)

A specific polymerase chain reaction (PCR) was developed for fast and easy screening of mycoplasma infection of beef calves. Major species of *Mycoplasma* strains (*M. bovis*) in liquid cultured swab samples were detected by specific PCR. The minimum limit for detection of *Mycoplasma bovis* by the specific PCR was estimated to be about  $2.0 \times 10^3$  cfu/ml. Of 37 swab samples cultured in mycoplasma broth®, simplified PCR detected *Mycoplasma* DNA in 22 that were also positive by culture. Incidence rate of mycoplasma infection of beef calves were closely related to nasal infection of *Mycoplasma bovis*. The results suggest that the specific PCR is useful for screening of mycoplasma infection of calves on a large-scale beef farm.

## 1. 目 的

畜産を取り巻く世界情勢は「競争激化」の様相を呈し、国内の畜産業にとっても大きな打撃となることが危惧されている。日本政府や北海道はこれらの状況を受け、畜産農場における経営基盤の強化を推進しており、限られた生産資源を用いながら、いかに生産効率を向上させるかについて、新たな技術開発を進めている。肉用子牛の安定的な供給は、日本における畜産の基盤として位置付けられるものであり、我国が世界の畜産大国と伍し、さらに将来的な貿易戦略を展開するうえで、重要な課題であると認識されている。肉用

子牛の安定供給において、その最大の阻害要因として位置付けられているものが「感染症」である。多くの微生物が危険因子として位置付けられているが、近年、新興および再興の二面的性質を有する「マイコプラズマ」が全国の農場に浸潤しつつあることが獣医・畜産領域において、大きな問題とされている<sup>1~4)</sup>。人医領域でもマイコプラズマの周期的発生が疫学的に報告されているが2000年代に入り、その発件数は原因不明のまま増加し続けている。一方、畜産領域でも、これと呼応するように2000年代に入り、牛のマイコプラズマ感染症が全国的に増加傾向を示している。その原因については疫学的手法を駆使した研究にお

いても十分に解明されていない。

マイコプラズマは一般細菌の3分の1程度の極めて小さな微生物であり、牛の体内に侵入すると、親牛では「乳房炎」を、また、子牛では「肺炎」、「中耳炎」および「関節炎」を引き起こす<sup>5,6)</sup>。通常の微生物は特定の臓器に病原性を発現するが、マイコプラズマは多臓器に同時に定着する能力を発現することで、牛に対し致命的な感染症を引き起こす。侵入門戸は呼吸器とされるが、体内に侵入した後は血液やリンパ液等の体液循環に侵入し、免疫を逃れながら末梢まで到達する。マイコプラズマ感染症は難治性疾患として淘汰率の極めて高い疾患に位置付けられている。近年実施された調査では、子牛鼻腔内マイコプラズマの農場浸潤率は85%にまで上昇している。

マイコプラズマ感染症の制圧において、最も重要な技術は感染初期の段階において迅速かつ正確に微生物を摘発することである。その意義は感染個体の摘発による感染拡大の阻止と、早期の治療開始を可能にし、高い治癒率を実現することである。しかし、マイコプラズマは通常の培養技術では菌種同定に1ヶ月近くを要し、農場での本病制圧にあってはその応用が極めて困難であるとされてきた。

そこで本研究ではマイコプラズマ感染症が最も問題となっている肉用子牛について、マイコプラズマの侵入門戸として最上位に位置付けられている鼻腔において、高病原性のマイコプラズマ種の迅速検出技術をPCR法を基盤技術として構築し生産農場での疾病制御における応用について検討した。

## 2. 材料および方法

### 2.1 肉牛の鼻腔由来マイコプラズマ種の検出技術構築

本申請課題では遺伝子解析技術 (Polymerase

Chain Reaction : PCR) を基盤とした検出技術を構築した。

#### 2.1.1 対象マイコプラズマ種

呼吸器感染症において最も病原性の高い *Mycoplasma bovis* を対象菌種とした。

#### 2.1.2 検体処理

マイコプラズマ用液体培地に一般細菌の排除を目的とした抗菌性物質を添加し鼻腔由来の雑菌の発育を高度に阻止する。また、高濃度コレステロールを含有するウマ血清を添加しマイコプラズマの発育を促進する。本培地で鼻腔サンプルを48時間程度処理し効率的な増菌を行った。

#### 2.1.3 遺伝子サンプル

多検体処理のためDNA抽出精製を実施せず、増菌試料を直接PCR mixtureに添加することで、作業時間および検査費用の低減を行う。本技術の構築にあっては、PCRの反応阻害物質を除去する性能を持った薬剤をPCR mixtureに導入する。

#### 2.1.4 PCR

*Mycoplasma bovis* 特異的プライマーを新たに設計し、1. *M. bovis* (ATCC 25523), 2. *M. arginini* (ATCC 23838), 3. *M. bovis genitalium* (ATCC 19852), 4. *M. californicum* (ATCC 33461), 5. *M. bovirhinis* (ATCC 27748), 6. *M. alkalescens* (ATCC 29103), 7. *M. canadense* (ATCC 29418) の各標準株において交差性を評価した。また、多検体処理を目的とし、96穴プレートをを用いたリアルタイムPCR系を構築した。培養法による *M. bovis* の検出は、2.1.2をマイコプラズマ寒天培地に塗布し、5%CO<sub>2</sub>下で2~3週間の観察のうち、目玉焼状コロニー、フィルムスポットおよびジギトニン試験により同定を行った。

### 2.2 肉牛農場に対する新規検査技術の応用と感染症制圧への有効性評価

#### 2.2.1 供試牛およびサンプリング

4農場 (A, B, C および D) より得られた

6ヶ齢未満の子牛100頭を供試した。鼻鏡（鼻先）を70%アルコール綿花で清拭したのち、滅菌綿棒を鼻腔に挿入し鼻汁を採材し4℃に保存した。

### 2.2.2 試料処理

鼻汁サンプルをマイコプラズマ増菌液に接種し48時間培養したものをPCR用試料として解析に用いた。2.1.4の方法に則って実施した。

### 2.2.3 監視疾病

マイコプラズマ性肺炎、マイコプラズマ性中耳炎、マイコプラズマ性関節炎

### 2.2.4 監視微生物

①*Mycoplasma bovis*, ②*Pasteurella multocida*, ③*Histophilus sommi*, ④*Mannheimia haemolytica* (②, ③および④については既存のプライマーを用いたPCR法によって解析を行った)。

## 3. 結果および考察

本研究では*Mycoplasma bovis*の検出において必要なPCR系の構築を試みた。*Mycoplasma*属は遺伝子配列の相同性が高く、既報のプライマーにおいては、しばしば非特異的な交差反応が検出されるが、本研究において構築したリアルタイムPCRでは、主要なマイコプラズマ種において、非特異反応は確認されなかった (Table 1)。検出感度は $2.0 \times 10^3$  cfu/mlであった。また、野外株を用い、従来の培養法との比較を実施したところ、培養法で陰性と確認された8検体については、PCRの結果は陽性であった。*Mycoplasma bovis*は培養法では目玉焼き状コロニー、バイオフィルム、ジギトニン感受性を示すが、生化学検査においてこれらが不明瞭な株も存在する。そのため、培養検査で*Mycoplasma bovis*と同定されなかったものの、PCRにおいて特定されたものであると考察された。一方、培養陽性において陽性と確認された2検体についてPCRでは陰性を示した。一部のマイ

Table 1 Specificity of *M. bovis*-specific realtime PCR

<i>M. bovis</i> -specific realtime PCR	
<i>M. bovis</i>	+
<i>M. arginini</i>	-
<i>M. alkalescens</i>	-
<i>M. bovigenitalium</i>	-
<i>M. bovirhinis</i>	-
<i>M. californicum</i>	-
<i>M. canadense</i>	-
<i>Acholeplasma</i>	-

Table 2 Comparison between culture and PCR methods

		PCR	
		-	+
Culture	-	5	8
	+	2	22

コプラズマ種は、*Mycoplasma bovis*と同様のコロニー性状を示し、また、*Mycoplasma bovigenitalium*は*Mycoplasma bovis*と同様にフィルムスポットを形成する。このことから、培養法で*Mycoplasma bovis*陽性と認めたものの、実際には他種であったものと考えられる。これらのことから、肉眼的所見および生化学検査による*Mycoplasma bovis*の識別には一定の限界があると考えられた (Table 2 網掛け部分)。

本検査系を用い、A～Dの農場について各微生物の陽性個体数を評価した (Table 3)。全体として48頭から*Mycoplasma bovis*が検出された。また、23頭から*Pasteurella multocida*、8頭から*Histophilus sommi*、6頭から*Mannheimia haemolytica*が分離された。各農場での評価において、D農場ではいずれの病原体も検出されなかったのに対し、他の農場ではいずれの病原体も広く分離された。その分離率はB、CおよびAの順に高く、特にB農場では80% (20/25)の個体で確認された。*Mycoplasma bovis*は気管粘膜上皮における線毛運動を強く抑制するとともに、粘膜

Table 3 Pathogens isolated from nasal swab of calves

	Farm				Total
	A	B	C	D	
<i>Mycoplasma bovis</i>	8	20	15	0	43
<i>Pasteurella multocida</i>	3	18	2	0	23
<i>Histophilus sommi</i>	2	1	5	0	8
<i>Mannheimia haemolytica</i>	2	1	3	0	6

(A, B, C and D : each 25 calf, total 100 calves)

Table 4 Incidence of *Mycoplasma* infection in each farms

	Farm				Total
	A	B	C	D	
Pneumoniae	3	16	5	0	24
Otitis media	0	4	1	0	5
Arthritis	0	5	1	0	6

免疫をはじめ、関連する免疫担当細胞の機能低下をもたらすことが報告されている<sup>7-9)</sup>。本研究の結果より *Mycoplasma bovis* の感染個体では *Pasteurella multocida*, *Histophilus sommi* および *Mannheimia haemolytica* が重複感染していることから、*Mycoplasma bovis* が初期感染の微生物として粘膜免疫を抑制し、*Pasteurella multocida*, *Histophilus sommi* および *Mannheimia haemolytica* がそれに続いて感染する可能性が示唆された。

各農場における主要なマイコプラズマ感染症の発生率について Table 4 に示した。鼻腔からいずれの微生物も分離されなかった D 農場ではマイコプラズマ感染症の発生は認められなかった。一方、最も分離率の高かった B 農場では、肺炎、中耳炎および関節炎のいずれの感染症もすべての農場の中でもっとも高く、重複感染が確認された。A および C 農場においても肺炎の発生が確認された。本結果より、鼻腔由来の病原性微生物は、農場におけるマイコプラズマ感染症の発生に深く関わっていることが示された。鼻腔の微生物は扁桃を介して全身循環に入り、生体の各組織に移行す

ることが知られており、本研究でも鼻腔のマイコプラズマと全身感染が深く関連している可能性が示唆された。

以上、本研究ではターゲットとした PCR 系を確立し、さらにそれらを農場で活用することで、発生しうるマイコプラズマ感染症を予見しうる可能性が示唆された。今後、さらに多くの農場で本検査系の有効性を評価し、生産性の向上と高品質な牛肉の生産に寄与することが重要であると考えられる。

#### 4. 要 約

肉用子牛におけるマイコプラズマ感染症を特異的に検出する PCR 検査系の構築を試みた。主要なマイコプラズマ種である *Mycoplasma bovis* について鼻腔スワブからの検出を試みた。本検査系における検出感度は  $2.0 \times 10^3$  cfu/ml であった。37 検体の鼻腔スワブについて PCR および培養法の比較を実施したところ、22 サンプルにおいて両者が陽性であることが確認された。一方、培養法で陰性とされた 8 検体は PCR 法で陽性であることが確認

された。農場での応用を検討した結果、鼻腔スワブにおける *Mycoplasma bovis* の分離率は、*Mycoplasma bovis*による肺炎、中耳炎および関節炎の発生と深く関与することが明らかになった。これらの結果より *Mycoplasma bovis*の特異PCRは、大型肉牛農場における子牛のマイコプラズマ感染症スクリーニングに有用である可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Arcangioli, M., Chazel, M., Sellal, E., Botrel, M., Bezille, P., Poumarat, F., Calavas, D., Le Grand, D.: Prevalence of *Mycoplasma bovis* udder infection in dairy cattle: Preliminary field investigation in southeast France, *N Z Vet J*, **59**, 75~78, 2011.
- 2) Higuchi, H., Iwano, H., Gondaira, S., Kawai, K., Nagahata, H.: Prevalence of *Mycoplasma* species in bulk tank milk in Japan, *Vet Rec*, **22**, 169, 2011.
- 3) Bushnell, R. B.: *Mycoplasma mastitis*, *Vet Clin North Am Exot Anim Pract*, **6**, 301~312, 1984.
- 4) Bicknell, S. R., Gunning, R. F., Jackson, G., Boughton, E., Wilson, C. D.: Eradication of *Mycoplasma bovis* infection from a dairy herd in Great Britain, *Vet Rec*, **112**, 294~297, 1983.
- 5) Hewicker-Trautwein, M., Feldmann, M., Kehler, W., Schmidt, R., Thiede, S., Seeliger, F., Wohlsein, P., Ball, H. J., Buchenau, I., Spergser, J., Rosengarten, R.: Outbreak of pneumonia and arthritis in beef calves associated with *Mycoplasma bovis* and *Mycoplasma californicum*, *Vet Rec*, **151**, 699~703, 2002.
- 6) Nicholas, R. A., Ayling, R. D.: *Mycoplasma bovis*: disease, diagnosis, and control, *Res Vet Sci*, **74**, 105~112, 2003.
- 7) Kauf, A. C., Rosenbusch, R. F., Paape, M. J., Bannerman, D. D.: Innate immune response to intramammary *Mycoplasma bovis* infection, *J Dairy Sci*, **90**, 336~348, 2007.
- 8) Bürki, S., Frey, J., Pilo, P.: Vet Virulence, persistence and dissemination of *Mycoplasma bovis*, *Dev Comp Immunol*, **179**, 15~22, 2015.
- 9) Wang, Y., Liu, S., Li, Y., Wang, Q., Shao, J., Chen, Y., Xin, J.: *Mycoplasma bovis*-derived lipid-associated membrane proteins activate IL-1 $\beta$  production through the NF- $\kappa$ B pathway via toll-like receptor 2 and MyD88, doi: 10.1016/j.dci.2015.10.017, 2016.

# 肉養鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルス に対する感受性

Susceptibility of broiler chicken lines to high pathogenic avian influenza  
virus

松 鶴 彩

(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)

Aya Matsuu

(Transboundary Animal Diseases Research center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) causes severe clinical symptoms in chickens. The mechanisms underlying the highly pathogenic manifestation of the HPAIV in chickens has not been fully elucidated. The identification of a genetic factor affecting the resistance or susceptibility to HPAIV would aid in the elucidation of the mechanism underlying pathogenesis. However, there are no studies conducted to evaluate the differences in susceptibility among the breeds of Japan native chickens. The purpose of this study is to elucidate the sensitivities to HPAIV in 4 breeds of broiler chicken including commercial broiler, and 3 different native chickens.

Four breeds of chicken (Broiler, native chicken A, B, and C) were inoculated with two H5N8 isolates at the dose of  $10^6$  EID<sub>50</sub>. Broiler showed 100% motility against two H5N8 virus, and three native chicken showed higher viability. Analysis of the differences in the Kaplan-Meier survival curves between the various breeds of chicken by log-rank test showed significant differences between Broiler and 3 native chickens. The expression of IL-8 and Interferon Regulatory Factor 7 (IRF7) RNA in lung 24 hour after inoculation was different among breed of chicken, but more detail study is needed to elucidate the relationship between virus multiplication and immune related gene expression.

## 1. 目 的

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) は、家禽に対して強力な病原性を有する H5 あるいは H7 亜型インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患である。国内では2003年に79年ぶりに発生が認められて以降、野鳥や養鶏場において散発的な流行が認められている。高病原性鳥インフル

エンザウイルス (HPAIV) に感染した鶏は急激な臨床症状の悪化を示し、また強い伝播性を有することから、HPAIは畜産界において甚大な被害をもたらす重要疾病の一つである。HPAI制圧のためには、本疾患の鶏における病原性発現機構および防御機構を解明し、これに基づいた対策を講じる必要がある。

病原性に関わるウイルス因子についての研究は

進歩しており、ウイルスタンパク質をコードする遺伝子における複数のアミノ酸置換がウイルス複製や宿主サイトカイン応答に影響を与えることが証明されている。一方、宿主側の要因、例えば鶏 Mx 1 遺伝子多型や主要組織適合遺伝子複合体 (MHC) ハプロタイプ等がHPAIVに対する感受性に関与する可能性も示唆されているものの<sup>1,2)</sup>、この分野の研究はあまり進んでいない。過去の研究では、イタリアの肉用コマーシャル鶏の一部の系統がHPAIVに対して抵抗性を示すこと<sup>3)</sup>、2003—2004年の東南アジアにおける流行の際、タイ在来種鶏が高い生存率を示したことが報告されている<sup>4)</sup>。このことからHPAIVに対して抵抗性を示す系統や品種の鶏を用いて宿主側のHPAIV感受性関連因子を特定できれば、鶏のHPAIVに対する防御機構の解明につながる可能性に着目した。過去の研究において3種類のタイ在来種鶏がH5N1亜型HPAIVに対して抵抗性を有することを感染実験によって証明し、これらの鶏のMx遺伝子およびMHCハプロタイプについて解析を行ったが、HPAIV感受性との明らかな関連性は認められなかった<sup>5)</sup>。鶏のHPAIV感受性関連因子特定のためにはより網羅的な解析が必要であると思われる。

一方、日本国内で飼養されている養鶏においてHPAIV感受性を比較した研究は皆無である。国内で鶏のHPAIV感受性関連因子特定に向けた研究を実施するためには、まず日本の養鶏の中で感受性の異なる系統の抽出を行うことが必要である。そこで本研究では、最近国内に侵入したH5N8亜型HPAIVを用いて、国内で飼養されている肉養鶏の品種によるHPAIV感受性の違いを明らかにし、感染初期の免疫応答を比較することを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 ウイルス株

本研究では2014年冬季に鹿児島県内の野鳥から分離されたH5N8亜型HPAIVであるA/crane/Kagoshima/KU-1/2014 (crane-01) およびA/duck/Kagoshima/KU-70/2015 (duck-70) を用いた。これらのウイルスの遺伝学的解析を行い、いずれもclade2.3.4.4.に属することを確認した<sup>6)</sup>。SPF鶏を用いた予備実験によりduck-70の方がcrane-01に比べて強い病原性を有すること(生存期間の短縮, 生存率の低下)を確認した(データ非表示)。

### 2.2 供試動物

鶏はブロイラーと3種類の鹿児島県産地鶏(A, BおよびC)計76羽を用いた。いずれの鶏も県内の養鶏農場より譲受あるいは購入し、バイオセーフティレベル3実験施設内の鶏用アイソレーター内で2日以上馴化した後実験に用いた。すべての鶏について感染前に採血を行い赤血球凝集抑制(HI)試験によってH5N8亜型HPAIVに対する抗体を有さないことを確認した。ウイルス接種時の鶏の週齢はすべて4週齢とした。

### 2.3 生存性とウイルス排泄

4種類の系統群の鶏、各5羽ずつに対して $10^{6.5}$  EID<sub>50</sub>のcrane-01あるいはduck-70を鼻腔内接種した後14日間、24時間ごとに観察を行い、生存性と臨床兆候を評価した。経時的なウイルス排泄を評価するために、接種から2, 4, 6, 8, 11, 14日後にクロアカおよび口腔内からスワブ検体を採取し、検体中のウイルス力価(logEID<sub>50</sub>/ml)について発育鶏卵を用いてReedらの方法<sup>5)</sup>に従い算出した。観察時に重度の臨床症状(沈鬱, 低体温, 神経症状)を示した鶏については人道的エンドポイントと判断し安楽殺を行った。14日後に生存している鶏については安楽殺を実施した。すべての

鶏を解剖し、脳および肺からRNAを抽出後、A型インフルエンザウイルスM1遺伝子量をreal-time PCR法によって確認した。2種類のウイルス接種後の生存性はLog-rank検定により比較した。スワブ検体のウイルス力価および脳および肺におけるM遺伝子Ct値の群間比較は一元配置分散分析とTurkey法によるpost-hoc検定を実施した。

#### 2.4 感染初期の免疫応答解析

各群3羽の鶏に対して $10^6$  EID<sub>50</sub>のduck-70を接種し、24時間後に解剖を行い、肺を採取した。生理食塩水を接種した鶏各群3羽ずつを対照とし、同様に24時間後に肺を採取した。臓器乳剤を作成し発育鶏卵を用いてウイルス力価(logEID<sub>50</sub>/g)を測定した。臓器中の宿主サイトカインおよび免疫関連遺伝子(IL-6, IL-8, IL1b, TNF $\alpha$ , IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\gamma$ , TLR3, TLR4, IFR-7, Mx, OAS)の発現についてSYBR Greenを用いたreal-time PCR法( $\Delta$ Ct法)により解析した<sup>5)</sup>。群間の比較は一元配置分散分析とTurkey法によるpost-hoc検定を実施した<sup>7)</sup>。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 4種類の肉養鶏のH5N8亜型HPAIV接種後の生存性とウイルス排泄

crane-01を接種後、ブロイラーが7日までに全羽死亡し、観察期間中の生存率は0%であったのに対し、地鶏A, B, Cは14日間の生存率がそれぞれ80%, 60%, 20%で、地鶏AおよびBはブロイラーと比べて有意に高い生存性を示した( $P < 0.01$ )。duck-70を接種後、ブロイラーが4日目までに全羽死亡、観察期間中の生存率が0%であったのに対し、地鶏A, B, Cは14日後までの生存率が80%, 40%, 20%で、地鶏A, BおよびCはブロイラーと比べて有意に高い生存性を示した( $P < 0.05$ ) (Fig. 1)。2種類のHPAIV接種後のブ

ロイラーはいずれも顔面の腫脹、肉冠や脚の皮下出血、関節の腫脹など明らかな異常所見を示したのに対し、3種類の地鶏ではこのような病変はほとんど確認されず、肉眼的な異常は認められないか、あっても軽度であった。

感染後に経時的に採取したクローアカおよび口腔内スワブからは、いずれのウイルスにおいてもブロイラーは接種2日目から死亡時まで高力価のウイルス排泄が認められた。これに対して3種類の地鶏のウイルス排泄量は、特に接種2日目および4日目においてはブロイラーと比べて低い傾向が認められた。いずれのウイルス接種後においても

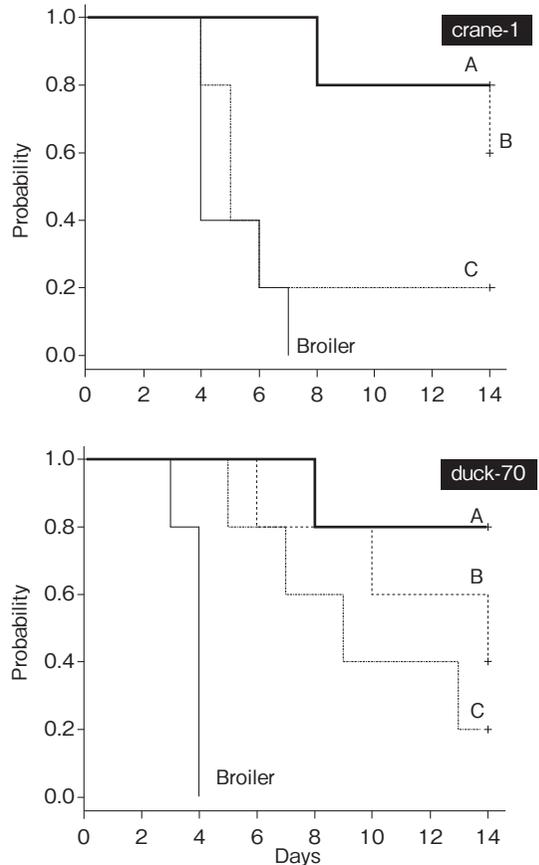


Fig. 1 Kaplan-Meier survival curves between the Broiler and 3 different native chickens (A-C) inoculated with A/crane/Kagoshima/KU-1/2014 (crane-01) or A/duck/Kagoshima/KU-70/2015 (duck-70).

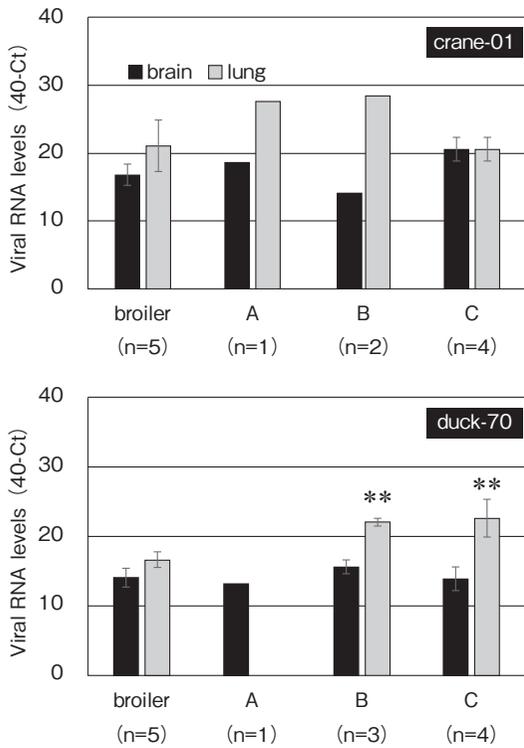


Fig. 2 Viral RNA is expressed in brain and lung of dead chicken within 14 days after inoculated with crane-01 or duck-70. Graphs represent mean  $\pm$  SD of Ct value for MI RNA. \*\* $P < 0.01$  versus broiler.

5羽中4羽の生存が認められた地鶏Aは生存期間中の持続的なウイルス排泄が認められた (Table 1)。

2種類のウイルス接種後14日までに死亡した鶏の肺および脳におけるウイルス遺伝子量 (Ct値) をFig. 2に示した。HPAIVを接種後死亡した鶏は1羽を除いて、肺および脳におけるウイルス分布が認められ、特に脳でのウイルス増殖が顕著であったが、duck-70接種後に死亡した地鶏BおよびCの肺におけるウイルス遺伝子のCt値はプロイラーに比べて有意な高値を示し、ウイルス増殖が抑制されている可能性が示唆された。

今回用いたH5N8亜型HPAIVは過去に国内に侵入したウイルスに比べて鶏に対する病原性が弱い可能性が指摘されている<sup>8)</sup>。おそらくこのことが鶏品種間の感受性の差を顕著にした要因であると考えられる。本研究に用いた3種類の地鶏の中でも特にAは2種類のHPAIV接種後、8割が不顕性感染となった。より病原性の強いHPAIV感染時の生存性についても検討する必要があるが、仮

Table 1 Viral shedding after inoculation of two H5N8 HPAIV

virus	line	survival rate within 14 days (survived/inoculated chicken number)	median survival days (range)	median log EID <sub>50</sub> /ml in swab samples (range)												
				n = tested chicken number												
				cloaca swab				oropharyngeal swab								
				2dpi	4dpi	6dpi	8dpi	11dpi	14dpi	2dpi	4dpi	6dpi	8dpi	11dpi	14dpi	
A/crane/Kagoshima/KU-01/2014 (crane-01)	Broiler	0% (5/5)	4 (4-7)	2.9 (0-3.7)	3.0 (2.7-4.2)	4.7 (3.2,6.2)	—	—	—	—	0 (0-2.4)	6.0 (2.0-6.7)	5.0 (4.0,6.0)	—	—	—
	A	80% (4/5)	8 (8)	0 (0)	0 (0-2.2)	0 (0-1.2)	1.2 (0-3.0)	0.6 (0-1.7)	0 (0-1.2)	0 (0)	1.7 (0-3.0)	0 (0-1.7)	0 (0-6.4)	0.7 (0-2.2)	0 (0-3.2)	0 (0-4)
	B	60% (3/5)	11 (8,14)	0 (0)	0 (0-4.7)	0 (0-3.7)	1.2 (0-2.7)	0 (0-1.2)	0 (0-2.2)	0 (0-1.5)	0 (0-4.4)	0 (0-5.0)	0 (0-4.2)	1.1 (0-3.2)	0 (0-3.2)	0 (0-4)
	C	20% (1/5)	5 (4,6)	0 (0-3.2)	0 (0-4.4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1.7 (0-2.2)	5.0 (0-6.0)	1.5 (0,3.0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
A/duck/Kagoshima/KU-70/2015 (duck-70)	Broiler	0% (5/5)	4 (3,4)	3.2 (0-3.7)	5.4 (4.5-6.3)	—	—	—	—	4.2 (4.0-4.7)	6.8 (5.9-8.0)	—	—	—	—	—
	A	80% (4/5)	8 (8)	0 (0)	0 (0-1.9)	3.0 (2.7-3.4)	3.2 (3.1-4.9)	3.4 (3.4-3.5)	0.6 (0-1.2)	2.7 (2.0-4.7)	3.9 (1.7-4.5)	2.7 (1.7-4.7)	2.2 (0-3.7)	2.2 (1.9-3.4)	0 (0-2.7)	0 (0-4)
	B	40% (2/5)	14 (6-14)	0 (0-1.2)	1.5 (0-2.9)	2.0 (0-2.5)	0 (0-3.7)	0 (0-2.4)	0 (0-4.6)	0 (0)	0 (0-3.0)	0 (0-6.4)	0 (0-2.2)	0 (0-2.2)	0 (0-6.2)	0 (0-3)
	C	20% (1/5)	9 (5-13)	1.7 (0-3.7)	1.7 (0-2.5)	1.2 (0-2.7)	0 (0-1.9)	2.4 (0.4,9)	1.2 (1.2)	2.2 (1.7-3.2)	2.4 (1.7-8.0)	1.7 (0-5.0)	0 (0-2.2)	1.6 (0.3,2)	0 (0)	0 (0-1)

\* $P < 0.05$  (vs. Broiler, A, and C)

にこのような性質を有する地鶏を飼育する農場において発生があった場合、異常の発見に遅れが生じる可能性があることからその防疫には特に注意が必要であると思われる。一方これら地鶏には、感染成立後のウイルス増殖抑制機構、もしくは病原性発現抑制機構の存在が疑われる。本研究で得られた結果からこれら地鶏は今後鶏における病原

性発現機構および防御機構の解明に有用なモデルとなることが期待される。

### 3.2 4種類の肉養鶏における感染初期の免疫応答

duck-70接種24時間後の肺におけるウイルス力価は、いずれの品種においても低く、ブロイラーと地鶏Cの各1羽ずつでウイルスが検出されたの

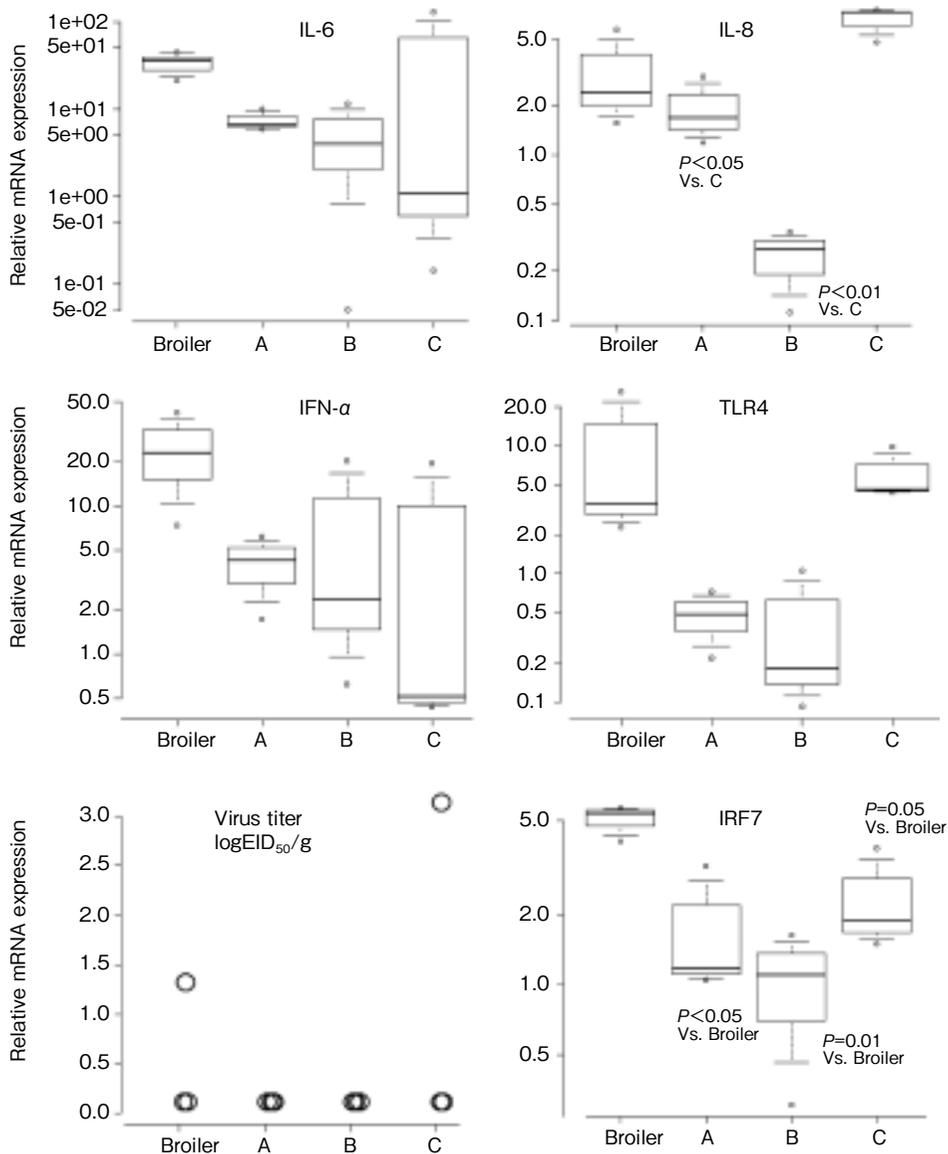


Fig. 3 Comparison of the host gene responses and virus titer at 24hr after inoculation with A/duck/Kagoshima/KU-70/2015 in the lung in 4 different line of chicken.

みであった。肺における14種類の遺伝子発現量を比較したところ、地鶏A ( $P < 0.05$  vs C) およびB ( $P < 0.01$  vs C) におけるIL-8 遺伝子発現抑制が認められた。またIFN遺伝子発現誘導に必須の因子とされるIRF-7 遺伝子の発現は地鶏A およびBにおいて有意に抑制されていた。3種類の地鶏においてIFN  $\alpha$  およびTLR 4 は低下傾向にあったが統計学的有意差は認められなかった (Fig. 3)。その他の遺伝子発現については群間で明らかな傾向は認められなかった (データ非表示)。

最近IRF-7は鶏のA型インフルエンザウイルス感染後のI型IFNの誘導に中心的な役割を果たす可能性が報告されている<sup>9, 10)</sup>。また他の複数の研究でHPAIV感染後の鶏臓器中におけるIL-8やIL-6の過剰な増加が急激な臨床症状の悪化に関連している可能性も指摘されている<sup>11)</sup>。今回高い生存性を示した地鶏AおよびBにおいてIL-8とIRF-7 遺伝子の発現抑制が認められたことは、HPAIVに対する耐性機構と関連する可能性がある。残念ながら本研究ではウイルス接種24時間後の肺におけるウイルス力価が低く、品種間での臓器中のウイルス増殖性の違いについての検討は困難であった。上記で得られた宿主の免疫関連遺伝子発現状況の差はウイルス増殖性の違いに起因する可能性もあることから、より詳細な検討を行う必要がある。またウイルス増殖抑制機構や自然免疫応答についての細胞レベルでの解析も必要であると思われる。

#### 4. 要 約

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) は、家禽特に鶏に対して強い病原性と伝播性を有する高病原性鳥インフルエンザウイルス (HPAIV) によって発生し、畜産界に多大な被害をもたらす重要疾病の一つである。過去に報告された海外の研究でHPAIVに対して抵抗性を示す鶏の品種が存

在することが指摘されているが、抵抗性形質の品種は、鶏におけるHPAIV病原性発現機構の理解に有用であると思われる。そこで本研究では、最近日本に侵入したH5N8亜型HPAIVを用いて、国内で飼養されている3種類の地鶏におけるHPAIV感受性を明らかにし、感染初期の免疫応答を比較することを目的とした。

2種類のH5N8亜型HPAIVを4種類の鶏 (ブロイラーおよび地鶏A-C) に接種し、その後の生存性について検討を行ったところ、3種類の地鶏はブロイラーに比べて有意に高い生存性を示した。感染24時間後の肺における宿主免疫応答について評価したところ、IL-8 およびIRF-7 遺伝子発現について品種間で差が認められ、品種によって感染後の宿主免疫応答が異なる可能性が疑われたが、ウイルスの増殖性との関連性についてもより詳細な検討が必要である。今後この品種の鶏は、鶏のHPAIV感受性関連因子特定に向けた有用なモデル動物となる可能性が期待される。

#### 文 献

- 1) Ewald, S. J., Kapczynski, D. R., Livant, E. J., Suarez, D. L., Ralph, J., McLeod, S., *et al.* : Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus. *Immunogenetics*, 2011 ; 63(6) : 363-75. doi: 10.1007/s00251-010-0509-1. PubMed PMID : 21286706.
- 2) Sasaki, K., Yoneda, A., Ninomiya, A., Kawahara, M., Watanabe, T. : Both antiviral activity and intracellular localization of chicken Mx protein depend on a polymorphism at amino acid position 631. *Biochem Biophys Res Commun*, 2013 ; 430 (1) : 161-6. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.11.053. PubMed PMID : 23201406.
- 3) Sironi, L., Williams, J. L., Moreno-Martin, A. M., Ramelli, P., Stella, A., Jianlin, H., *et al.* : Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene polymorphism coding amino acid position 631. *Virology*, 2008 ; 380(1) : 152-6. doi: 10.1016/j.virol.2008.07.022. PubMed PMID : 18723201.

- 4) Boonyanuwat, K., Thummbabutra, S., Sookmanee, N., Vatchavalkhu, V., Siripholvat, V., Mitsuhashi, T. : Influences of MHC Class II Haplotypes on Avian Influenza Traits in Thai Indigenous Chicken. *The Journal of Poultry Science*, 2006 ; 43(2) : 120-5. doi: 10.2141/jpsa.43.120.
- 5) Matsuu, A., Kobayashi, T., Patchimasiri, T., Shiina, T., Suzuki, S., Chaichoune, K., *et al.* : Pathogenicity of Genetically Similar, H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Strains in Chicken and the Differences in Sensitivity among Different Chicken Breeds, *PLoS One*, 2016;11(4):e0153649. doi: 10.1371/journal.pone.0153649. PubMed PMID: 27078641; PubMed Central PMCID: PMC4841636.
- 6) Ozawa, M., Matsuu, A., Tokorozaki, K., Horie, M., Masatani, T., Nakagawa, H., *et al.* : Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15, *Euro Surveill*, 2015;20(20). PubMed PMID : 26027484.
- 7) Kanda, Y. : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZRR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplant*, 2013 ; 48(3) : 452-8. doi: 10.1038/bmt.2012.244. PubMed PMID: 23208313; PubMed Central PMCID: PMC3590441.
- 8) Tanikawa, T., Kanehira, K., Tsunekuni, R., Uchida, Y., Takemae, N., Saito, T. : Pathogenicity of H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses isolated from a wild bird fecal specimen and a chicken in Japan in 2014. *Microbiol Immunol*, 2016 : 60(4) : 243-52. doi : 10.1111/1348-0421.12369. PubMed PMID : 26916882.
- 9) Wang, Y., Brahmakshatriya, V., Lupiani, B., Reddy, S. M., Soibam, B., Benham, A. L., *et al.* : Integrated analysis of microRNA expression and mRNA transcriptome in lungs of avian influenza virus infected broilers, *BMC Genomics*, 2012;13: 278. doi : 10.1186/1471-2164-13-278. PubMed PMID: 22726614; PubMed Central PMCID: PMC3496578.
- 10) Kim, T. H., Zhou, H. : Functional Analysis of Chicken IRF7 in Response to dsRNA Analog Poly (I:C) by Integrating Overexpression and Knockdown, *PLoS One*, 2015; 10(7): e0133450. doi: 10.1371/journal.pone.0133450. PubMed PMID: 26186542; PubMed Central PMCID: PMC4505898.
- 11) Kuribayashi, S., Sakoda, Y., Kawasaki, T., Tanaka, T., Yamamoto, N., Okamatsu, M., *et al.* : Excessive cytokine response to rapid proliferation of highly pathogenic avian influenza viruses leads to fatal systemic capillary leakage in chickens, *PLoS One*, 2013; 8(7): e68375. doi: 10.1371/journal.pone.0068375. PubMed PMID: 23874602; PubMed Central PMCID: PMC3706397.

# リコンビナント抗原を用いたエゾシカにおける肝蛭症の血清診断法の確立と疫学調査による家畜・ヒトに対するリスク分析

Immuno-diagnosis of fasciolosis in ezo deer using recombinant antigens to examine risk of transmission for livestock and human

関 まどか・福本 晋也\*

(岩手大学農学部共同獣医学科, \*帯広畜産大学原虫病研究センター)

Madoka Ichikawa-Seki and Shinya Fukumoto\*

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,

\*National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Fasciolosis caused by the liver flukes (*Fasciola* spp.) is one of the major problems in livestock industry. Fasciolosis is a zoonotic disease, and humans are infected by eating vegetables or livers which are contaminated with juveniles of the parasite. The number of wild sika deer (*Cervus nippon yezoensis*) continues to increase in Hokkaido Prefecture, Japan. As a result, enormous economic damage to agricultural crops by sika deer is observed throughout Hokkaido prefecture. Therefore, attempts have been made for effective population control by utilizing sika deer as a meat resource (gibier). Recently, fasciolosis has been recognized as emerging infectious diseases among sika deer in Hokkaido; however, the lack of epidemiological study made it hard to paint the precise picture of the disease. The objective of this study was to obtain the precise seroprevalence of fasciolosis in sika deer from Hokkaido Prefecture by establishing an Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA). This epidemiological study enables us to evaluate the risk of sika deer as a meat resource for human as well as the risk of them as a source of the liver fluke infection to domestic cattle. The ELISA with recombinant Cathepsin L1 (rCatL1) established in this study was highly reliable. Its sensitivity and specificity were 90 % and 96 %, respectively. The seroprevalence of 210 sika deer from 12 locations of Tokachi subprefecture revealed that the prevalence of anti-rCatL1 reached 100% in maximum. Therefore, it is very important to pay enough attention for the seroprevalence of fasciolosis in sika deer as a source of the liver fluke infection to humans and cattle.

## 1. 目 的

北海道では、エゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) の個体数が増加の一途をたどっており、農作物に与える経済被害は甚大である。近年、効果的な個体数コントロールのために、狩猟した

エゾシカを食肉資源 (ジビエ) として有効活用する試みがはじまり、産業としての発展が期待されている。一方で、エゾシカが保有する人獣共通感染性の病原体に関する調査はほとんど進んでいない。また、エゾシカは生物学的に家畜牛に極めて近縁であるため、共通の病原体が数多く存在する<sup>1)</sup>。

したがって、エゾシカが保有する病原体を把握することはヒトへの危害分析だけにとどまらず、家畜衛生学的にも必須の課題である。そこで本研究では、エゾシカ、牛、ヒトのいずれにも感染する肝臓の寄生虫「肝蛭」のエゾシカにおける感染状況に着目した。北海道では釧路、十勝などでエゾシカの肝蛭感染率が高いと推定されているが<sup>2,3)</sup>、具体的な疫学情報が十分に得られておらず、ヒトならびに家畜牛への感染源としてのリスクは正確に把握されていない。

肝蛭 (*Fasciola* spp.) は主に牛などの反芻類の肝臓に寄生する大型の吸虫で、宿主に重篤な肝障害を引き起こす。ヒトは水耕野菜や感染初期の反芻類の肝臓 (レバー) に付着した幼虫を生食することにより感染する。我が国では食肉衛生検査所で獣医師による目視検査が実施されており、肝蛭症に罹患した家畜牛の肝臓は摘発・廃棄される。しかしながら、感染初期の幼虫は非常に小さいため、獣医師であっても摘発は難しい。また、エゾシカなどの野生鳥獣は、と畜場法の対象動物ではなく獣医師による検査が義務付けられていないため、肝蛭に感染したレバーが見逃されて市場に出回るリスクがある。食品衛生法により2012年には牛、2015年には豚のレバーを生食用として提供することが禁止されたため、代用品としてエゾシカレバーの需要が高まる恐れがあり、今後、ヒトの肝蛭症の発生が懸念される。したがって、科学的知見に基づく肝蛭保有状況の調査結果を適切に公表し、消費者に注意を促すことは急務である。

本研究では、リコンビナント抗原を用いた特異性の高いEnzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法により北海道におけるエゾシカの肝蛭抗体保有率を正確に把握し、ジビエとして供給する際のヒトへの感染リスク、ならびに家畜牛への感染源としてのリスクを評価することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 リコンビナント抗原の作製

遺伝子組換え技術を用いて大腸菌や酵母に作製させるリコンビナントタンパク質は、不純物を含まないために特異性の高い診断用抗原になる。本研究では、肝蛭が宿主の体内で分泌する10種類のタンパク質群<sup>4)</sup>の中から、最も分泌量が多いと報告されているCathepsin L1 (Cat L1) に着目した。RT-PCR法によって増幅したCatL1のcDNAをタンパク質発現用ベクター (pHAT10) に組み込んだ後、大腸菌 (BL21) にトランスフォーメーションし、リコンビナントCatL1 (rCatL1) を発現する大腸菌を得た。得られたrCatL1を6Mグアニジンで変性・可溶化した後に、尿素の段階希釈によりリフォールディングし、His-tagカラムを用いたクロマトグラフィによって精製した。SDS-PAGEにより精製タンパク質を確認し、ウェスタンブロット法により、rCatL1の抗原としての有用性を確認した。

### 2.2 ELISA法

剖検時の目視検査で、肝臓に肝蛭の寄生が確認されたエゾシカから得た血清 (n = 20) を陽性コントロールとした。また、肝臓に槍形吸虫 (*Dicrocoelium* sp.) の感染が確認されたニホンシカの血清 (n = 5) と肝臓に寄生虫が見出されなかったニホンシカの血清 (n = 20) を陰性コントロールとした。ELISAでは、得られた血清を100倍で用いた。また、二次抗体には西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) で標識されたウサギ由来抗シカイムノグロブリン (KPL, Milford, MA, USA) を600倍希釈で用いた。その後、o-Phenylenediamine (OPD) 溶液 (Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて発色を行い、マイクロプレートリーダー (ARVO) (Perkinelmer, Waltham, MA, USA) で490nmの吸光 (OD<sub>490</sub>) を

測定した。得られた結果の解析では、肝臓に寄生虫が見出されなかった陰性コントロール (n = 20) の平均 ± 3 S.D. をカットオフ値とし、カットオフ値を超えたものを陽性と判定し、感度と特異度を算出した。

さらに、本研究では北海道十勝支庁を中心に12地域からエゾシカの血清210検体を得てELISAに供し (Table 1), エゾシカにおけるrCatL1抗体の保有状況を調査した。陽性率の95%信頼区間 (Confidence intervals: CI) を www.vassarstats.net. を用いて算出した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 rCatL1の精製

SDS-PAGEでrCatL1を確認したところ、HAT-Tagタンパク質の約1kDaを含めた約38kDa付近にバンドが認められた。また、変性・可溶化の影響と考えられるフラグメント化したバンドも認められた。これらのバンドはいずれもウェスタンブロット法によりHAT-Tagが陽性であると確認され、かつ肝蛭感染牛血清の反応が認められた。したがって、得られたrCatL1はELISA用の抗原として有用であることが確認で

きた (Fig. 1)。

#### 3.2 ELISAにおける感度・特異度

rCatL1を用いたELISAでは、目視で肝臓に肝蛭が確認された陽性コントロールのうち2検体を除く18検体のOD<sub>490</sub>がカットオフ値を上回ったため、感度は90%と算出された。一方、陰性コントロールでは、肝臓に槍形吸虫 (*Dicrocoelium* sp.) が確認された1検体でOD<sub>490</sub>がカットオフ値をわずかに上回ったものの、他の24検体ではすべてがカットオフ値を下回ったため、特異度は96%と算出された。したがって、本研究のELISAは信頼性が非常に高いことが確認された (Fig. 2)。

#### 3.3 北海道十勝支庁のエゾシカにおける疫学調査

北海道十勝支庁を中心に、12地域から210検体の血清を得てELISAに供した結果、5検体以上の血清を解析した地域では、陽性率が25—100%と非常に高い数値であることが判明した (Table 1, Fig. 3)。したがって、地域によりレベルに差があるものの、エゾシカ肉をジビエとして供給する際のヒトへの感染リスク、ならびに家畜牛への感染源としてのリスクが非常に高いことが明らかになった。

Table1 The seroprevalence of anti-rCatL1 antibody determined by ELISA for 210 sika deer obtained from 12 locations in Tokachi subprefecture, Hokkaido.

Location ID	No. of tested	No. of positive	Positive rate	95%CI
#1	99	37	37.40%	28.0-47.7%
#2	55	30	54.60%	40.7-67.8%
#3	17	9	52.90%	28.5-76.1%
#4	7	2	28.60%	5.1-69.7%
#5	3	1	33.30%	1.8-87.5%
#6	2	0	0%	0-80.2%
#7	1	0	0%	0-94.5%
#8	8	8	100%	59.8-100%
#9	8	2	25%	4.5-64.4%
#10	3	0	0%	0-69%
#11	2	1	50%	2.7-97.3%
#12	5	2	40%	7.3-83%

95%CI = confidence interval

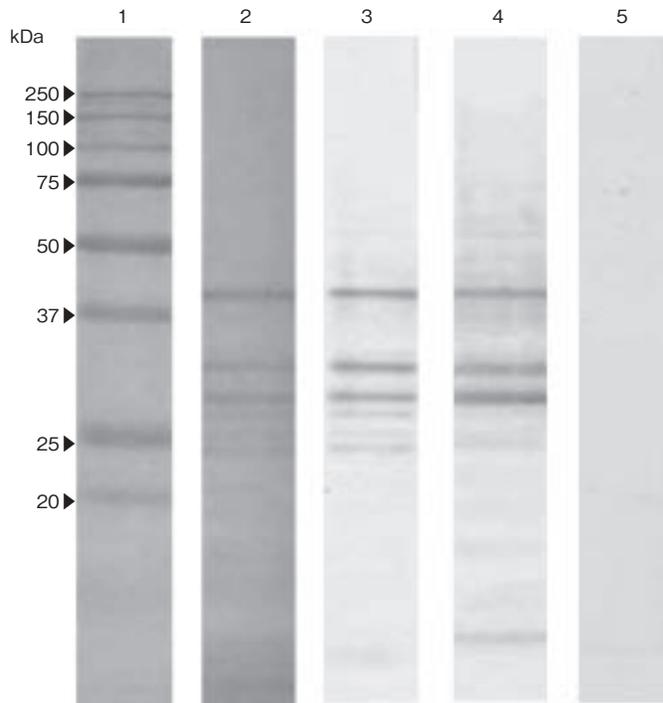


Fig. 1 Purification of recombinant Cathepsin L1 of the *Fasciola* fluke.

- 1 Molecular weight marker
- 2 SDS-PAGE and CBB staining
- 3 Western blotting to detect HAT tag
- 4 Western blotting with positive control serum
- 5 Western blotting with negative control serum

個体数が急増したエゾシカは、家畜牛の放牧牧野へ日常的に侵入している。エゾシカには駆虫薬を投与できないため、今後、肝蛭の感染率は増加の一途をたどると予想される。エゾシカの侵入により、牧野が肝蛭に汚染されるリスクは非常に高いため、継続的に疫学調査を実施することでリスクを的確に把握し、家畜牛の感染が起こらないように対策を講じる必要がある。

また、家畜のレバーの生食が禁止されているため、法的規制のないジビエとしてエゾシカのレバーが生食用として提供されるリスクは否定できない。本研究で明らかになった感染率に基づき、適切に注意を喚起することで、エゾシカのレバーがヒトへの感染源になることを防止する必要がある。

また、本研究成果をイムノクロマト法などのジビエの供給現場で使用できる簡易診断キットの開発に発展させることが望ましい。

今後、北海道全土に解析地域を拡大する必要がある。特に、道東地域では家畜牛の肝蛭症が多いことが知られており、エゾシカの肝蛭保有率を正確に把握して、リスクを評価することは緊急の課題であると考えられる。

#### 4. 要 約

肝蛭症は大型の吸虫「肝蛭 (*Fasciola* spp.)」が肝臓に寄生することにより起こる疾患で、主に家畜牛で問題となってきた。肝蛭症は人獣共通感染症でもあり、ヒトは水耕野菜などに付着した幼

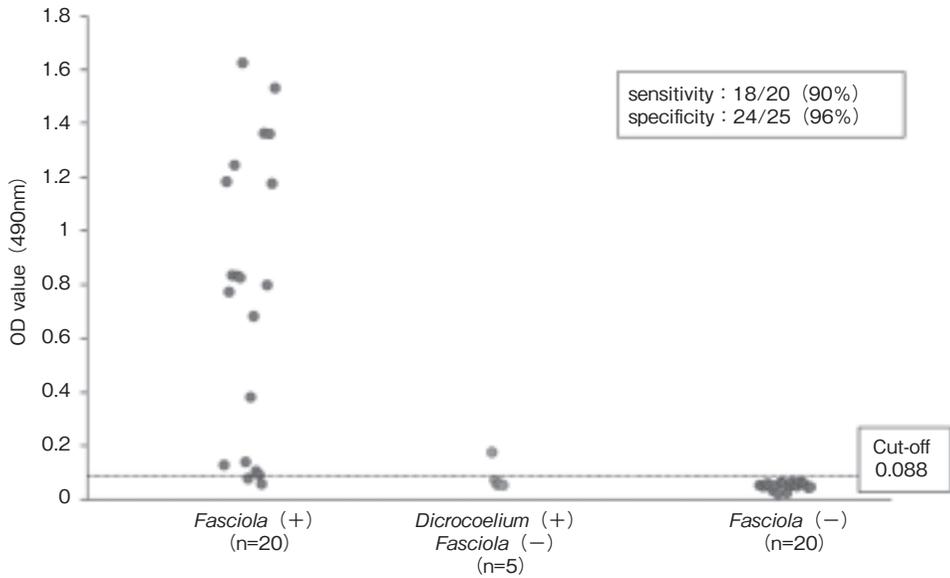


Fig. 2 ELISA with rCatL1 using positive and negative control sera of sika deer. Dotted line indicates the cut-off value.

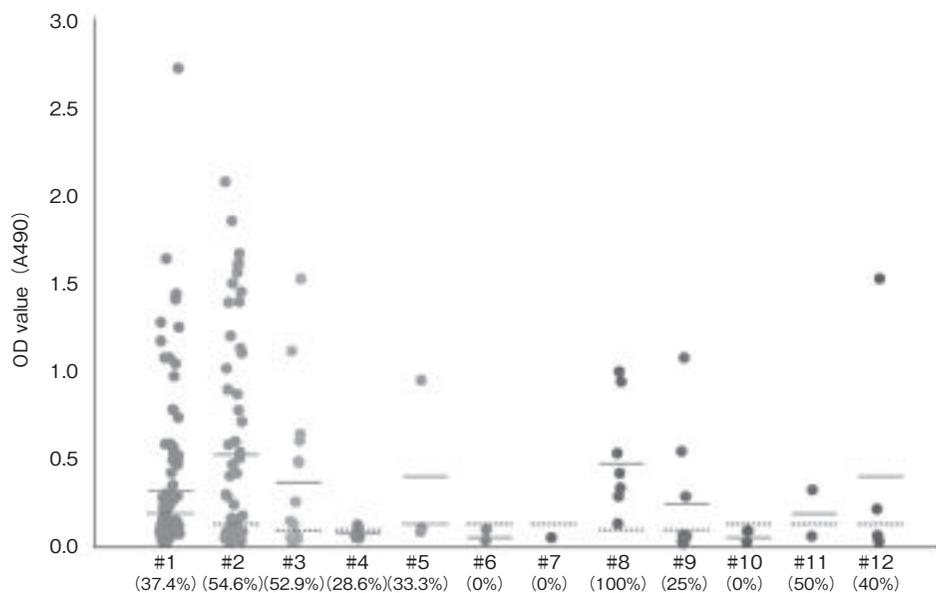


Fig. 3 ELISA with rCatL1 using 210 sera of sika deer from 12 locations in Tokachi subprefecture, Hokkaido. Dotted and solid lines indicate the cut-off and average values, respectively.

虫や感染動物の肝臓を摂食することにより感染する。北海道では、エゾシカ (*Cervus nippon yezoensis*) の個体数が増加の一途をたどっており、農作物に与える経済被害は甚大である。近年、効果的な個体数コントロールのために、狩猟した

エゾシカを食肉資源 (ジビエ) として有効活用する試みをはじめ、産業としての発展が期待されている。最近、エゾシカにおいて肝蛭症が増加してきたと認識されてきたが、大規模な疫学調査の実施例はなく、その実態は不明であった。そこで、

ELISA法を確立して疫学調査を実施することにより、北海道におけるエゾシカの肝蛭抗体保有率を正確に把握し、ジビエとして供給する際のヒトへの感染リスク，ならびに家畜牛への感染源としてのリスクを評価することを目的とした。

本研究で確立したリコンビナントCathepsinL1 (rCatL1)を用いたELISAは感度90%，特異度96%を達成し，信頼性が高いことが確認された。北海道十勝支庁を中心に，12地域から210検体の血清を得てELISAに供した結果，抗rCatL1抗体の保有率は最も高い地域で100%に達することが判明した。

今後，エゾシカの肝蛭保有率を正確にモニタリングして，家畜牛，ヒトへの感染源として適切な注意喚起を行う必要がある。

## 文 献

- 1) Ichikawa-Seki, M., Shiroma, T., Kariya, T., Nakao, R., Ohari, Y., Hayashi, K., Fukumoto, S.: Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan, *Parasitol. Int.*, in press, 2017.
- 2) 尾針由真, 押田龍夫: 北海道十勝地方のエゾシカ (*Cervus nippon yesoensis*) における日本産カンテツ (*Fasciola* sp.) の寄生状況調査, *日本野生動物医学雑誌*, 18, 115~120, 2013.
- 3) 横井佳寿美, 稲原一幸, 岡崎ひづる: エゾシカの疾病状況調査—エゾシカの衛生管理技術の構築を目指して, 平成19年度北海道家畜保健衛生発表演題 (抄録), 2007.
- 4) Robinson, M. W., Menon, R., Donnelly, S. M., Dalton, J. P., Ranganathan, S.: An integrated transcriptomics and proteomics analysis of the secretome of the helminth pathogen *Fasciola hepatica*: proteins associated with invasion and infection of the mammalian host, *Mol Cell Proteomics*, 8, 1891~1907, 2009.

# 野生獣肉の食肉利用に関する寄生虫性食中毒危害の科学的分析

Parasitological research for game meat hygiene

山 崎 朗 子

(岩手大学農学部)

Akiko Yamazaki

(Department of Agriculture, Iwate University)

Recently, the population of wild deer have been growing explosively in Japan, resulting in terrible feeding damage of farm and forest industries. To control number of them, game meat industry is promoted by Japanese government for the efficient use of resources. Because wild animals are not hygienically controlled, there is a possibility of contamination by unknown pathogenic microbes. However, epidemiological information about wild animals is still insufficient. Meanwhile, the first Sarcocystic food poisoning was caused by *S. fayeri*-contaminated raw horse meat (basashi). That report made Genus *Sarcocystis* be widely known in Japan. Genus *Sarcocystis* is a protozoa which has two host species in its life cycle. Herbivores are main intermediate hosts, and *Sarcocystis* forms sarcocysts in their muscle tissue. Infection in human occurs by eating the infected cattle meat. And soon after that second Sarcocystic outbreak was caused by raw venison which also be infected by *Sarcocystis* spp.. The main symptom of those cases was vomiting and diarrhea same as reported before, but some people also shows neurologic manifestation. This is first report of food poisoning case caused by *Sarcocystis* spp. in deer. In this study, we tried to clarify the epidemiology of *Sarcocystis* spp. in wild deer (*Cervus Nippon*) in Japan. 257 Samples of deer muscle tissue were collected from Hokkaido, Kanto, and Kyushu area. *Sarcocystis* specific 18S ribosomal RNA gene was detected by polymerase chain reaction (PCR), followed by sequencing analysis of full length of 18Sr RNA gene to identify species. Genetic screening test revealed that more than 99% of wild deer in Japan is infected by *Sarcocystis* spp. regardless of age, area, and sex. From the result of identification by sequencing analysis, two species of *Sarcocystis* are shown as common species in all areas in Japan, on the other hand, some species are area specific.

## 1. 目 的

近年、多くの地域で獣害対策のため捕獲された野生動物の肉をジビエとして有効活用する地域振興事業が行われている。家畜に比べ、野生鳥獣は

成育環境が管理されないため、より多くの病原微生物に暴露される可能性が大きい。国内ではすでに野生獣肉の喫食による食中毒例が報告されており、その病原体は細菌、ウイルス、寄生虫と広範囲にわたっている<sup>1)</sup>。最近では、2011年に報告さ

れた馬刺の食中毒事例で新規性食中毒起因微生物として発見された住肉胞子虫 *Sarcocystis* sp. が野生ニホンジカにも寄生していることが分かり、2014年に馬刺同様シカ肉の生食で食中毒事例を起こした。

住肉胞子虫については、牛に寄生する *S. cruzi*、ウマに寄生する *S. fayeri*、豚に寄生する *S. mniescheriana* などが知られ、ヒトにも感染すると規定している。野生動物であるニホンジカは、広範囲を行き来しながら複数の家畜生息域と接触することが考えられる。事実、国内でのシカによる被害に、放牧地での牧草の食害があげられていることから、すでに牛とも接触していることが考えられる。このように、野生ニホンジカに寄生している住肉胞子虫はジビエ喫食時のリスクに加え、家畜への感染源、伝播源となる可能性も想定される。

しかし、これまでに報告された疫学研究は、調査地域の偏りや、検体数の数などの点からも十分でないうえに、実体顕微鏡および光学顕微鏡による形態的調査が主であり、詳細な種同定ができていない。申請者は、北海道からのエゾジカ試料を用いて遺伝解析を行った結果、一個体に数種の混合感染が起きていることを発見した。家畜における住肉胞子虫では固有の優勢種のみが感染していることが報告されており、この相違は家畜と野生動物の成育背景の違いが顕著に現れたものと考えられる。さらに、前述のように、野生ニホンジカの増殖により家畜との接触機会が増大していることを考慮すると、ニホンジカが保有している多種の住肉胞子虫が家畜にまで伝播していく可能性が高い。

そこで本研究では、ジビエ産業の発展、および野生ニホンジカから家畜への感染防御策への寄与を目的としてさらに広い範囲での野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の疫学調査を遺伝子検査法に

基づいて行う。調査地域は日本全国とし、住肉胞子虫保有率、感染種を同定し、地域、性別、年齢などの起因因子を推定することとした。

## 2. 方法

研究試料は、国内野生ニホンジカの横隔膜、骨格筋、季節によっては妊娠個体の胎盤、胎子を採用する。試料採取は各県の処理施設や猟師の協力のもと行う。

### 2.1 これまでの調査地域の整理と新たな試料採取地域の決定

調査場所は、積極的に野生ジカの駆除と食肉利用を行っている地域にサンプリング協力を依頼した。また、住肉胞子虫の垂直感染の有無を確認するため、妊娠個体の胎盤および胎子を採用した。

### 2.2 遺伝子検出法

厚生労働省暫定法：生食用馬肉中の *Sarcocystis fayeri* 検査法<sup>2)</sup> に準拠し、住肉胞子虫特異的 18 S リボソーム RNA を PCR 法によって検出した。ニホンジカ筋肉組織 10 g を採取し、PBS 30 ml を加えエクセルオートホモジナイザー（日本精機製作所）を用いて乳液状になった試料から、DNeasy Blood & Tissue Kits（Quiagen）を用いて核酸を抽出した。F-primer (18S1F)：5'-GGATAACCGTGGTAATTCTATG、R-primer (18S1R)：5'-TCCTATGCTGGACCTGGTGAG を用い、Takara EX-Taq の初期変性温度と加熱時間に従って、94℃、3 分間の後、94℃、30 秒間、60℃、1 分間、72℃、1 分間を 1 サイクルとし、40 サイクルの PCR 増幅を行った。増幅産物をアガロースゲル電気泳動にて泳動し、1,800bp のバンドを確認した。

### 2.3 遺伝子配列による種同定法

2.2 の遺伝子検出法の PCR により得られた 18 S リボソーム RNA の増幅産物を用いて、アガロース電気泳動を行い、1,800bp のバンドを確認した

後、バンド部分のアガロースゲルを切り出し、Nucleo spin (TaKaRa) を用いて増幅産物を精製した後、in-fusion cloning反応により、遺伝子クローニング用ベクターであるT-vector pMD20 (TaKaRa) に導入した。大腸菌DH5 *a* を用いて形質転換を行い、終濃度100  $\mu\text{g/ml}$ アンピシリン含有LB寒天培地に形成されたコロニーからプラスミドを精製し、サンプルDNAとした。Big Dye v3.1 (Applied biosystems) を用いた蛍光ラベリングののち、シークエンサー (ABI3500, Applied Biosystems) にて塩基配列を取得した。得られた塩基配列についてNational Center for Biotechnology Information (NCBI) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を用いて相同性検索を行った。既存のSarcocystis属18S rRNA遺伝子塩基配列と比較するため、クリスタルWを用いてマルチプルアライメントを行った後、最尤法を用いて系統樹を作製した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 採取された検体数

本研究で採取した野生ニホンジカ筋肉組織検体は、北海道114検体、関東地方66検体、九州地方77検体の計257検体であった。ニホンジカ種別ではエゾシカ114頭、ホンシュウジカ66頭、キュウシュウジカ77頭であった。性別が分かるものは、雄77検体、雌51検体であった。年齢は、1歳18検体、2歳41検体、3歳37検体、4歳22検体、5歳以上12検体であった。

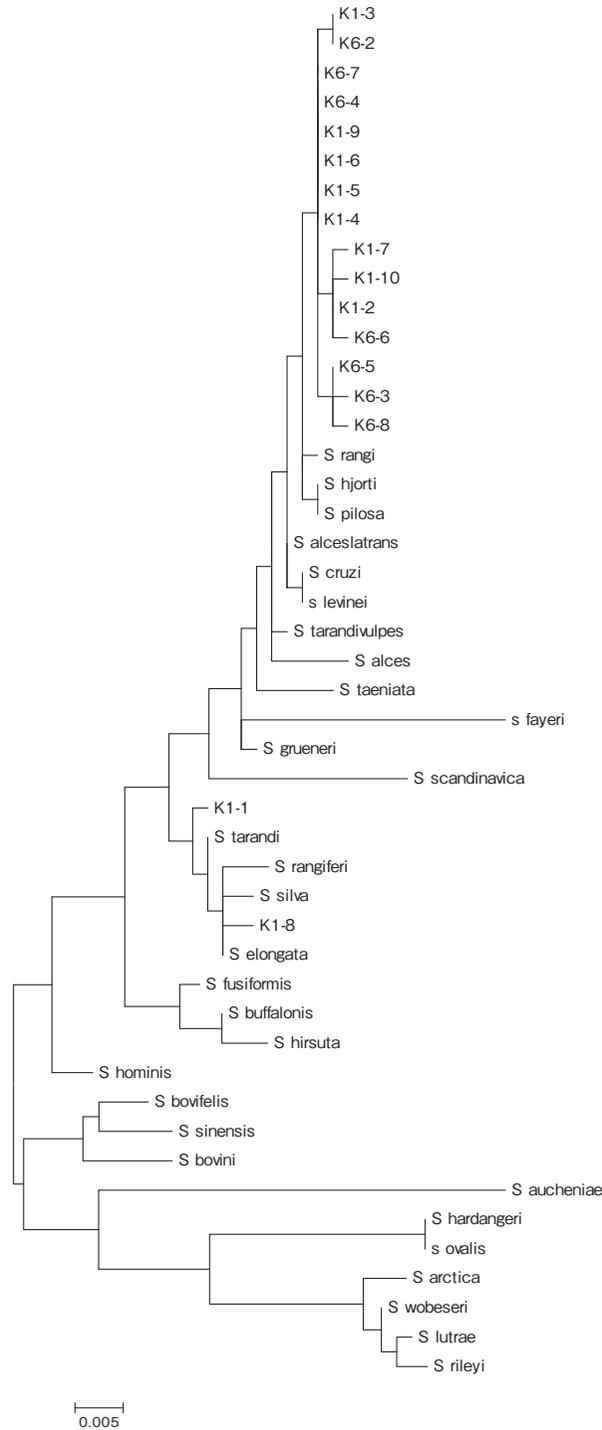
#### 3.2 国内野生ニホンジカにおけるSarcocystis属の保有率

定性的遺伝子検査法を用いて国内各地から採取した野生ニホンジカ供試験検体を検査した結果、北海道では100% (114/114: 陽性検体数/試験検体数)、関東地方では98.5% (65/66) 九州地方では98.7% (76/77) の割合で陽性が確認された。

本研究で行った野生ニホンジカ調査では、国内3地域ともSarcocystis属の高率な寄生が確認された。このことから、調査地域においては、野生ニホンジカ生息環境中におけるSarcocystis属の生活環が十分に保持されていると推察される。また、全検体の感染率が99%を超えていたことから分かるように、ニホンジカ種別、性別、年齢による寄生率の偏りは確認されなかった。

#### 3.3 国内野生ニホンジカに寄生するSarcocystis属の種同定結果

国内3地域の野生ニホンジカ検体から得られたSarcocystis spp.と、既知のSarcocystis種21種について18S rRNA遺伝子の塩基配列に基づき、系統樹を作製した。その結果、九州地方ではS. tarandi, S. elongata, S. rangiferi, およびS. silvaと相同性が99%のものと、既存種との相同性が97%以下であるS. spp.が検出された (Fig. 1)。関東地方の検体から得られたプラスミド群は、S. pilosa, S. tarandiおよびS. elongataと一致するグループが検出された (Fig. 2)。北海道の検体から得られたプラスミド群は、S. tarandi, S. elongata, S. rangiferi, およびS. silvaと相同性が99%一致した (Fig. 3)。このように、国内3地域の野生ニホンジカにはS. tarandi, S. elongataが共通して寄生していることが判明した。その一方、各地域に固有の種も同定された。関東地方のホンシュウジカ肉検体からはS. pilosaが同定された。これは、リトアニアの動物園で飼育されていたニホンジカから発見された新種で、ニホンジカ固有種の可能性が高いと考えられる<sup>3)</sup>。九州地方のキュウシュウジカ検体からは、現在NCBIに登録されている既存種の18S rRNA遺伝子とは一致しないS. spp.が検出された。キュウシュウジカは、ニホンジカ亜種の中でも、エゾシカおよびホンシュウジカと比較して形態的変異が大きいことが知られており<sup>4)</sup>、エゾシカおよびホンシュウジカと異



**Fig. 1** Phylogenetic relationships between *Sarcocystis* sp. from wild deer in Kyushu area obtained in this study and other previously published *Sarcocystis* species.

Isolates from this study are marked in K-No. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene were aligned against reference sequences retrieved from GenBank using ClustalW program. A phylogenetic tree was constructed by neighbor joining method with the maximum composite likelihood substitution model. The reliability of the tree was assessed using bootstrap method with 1000 replicates.

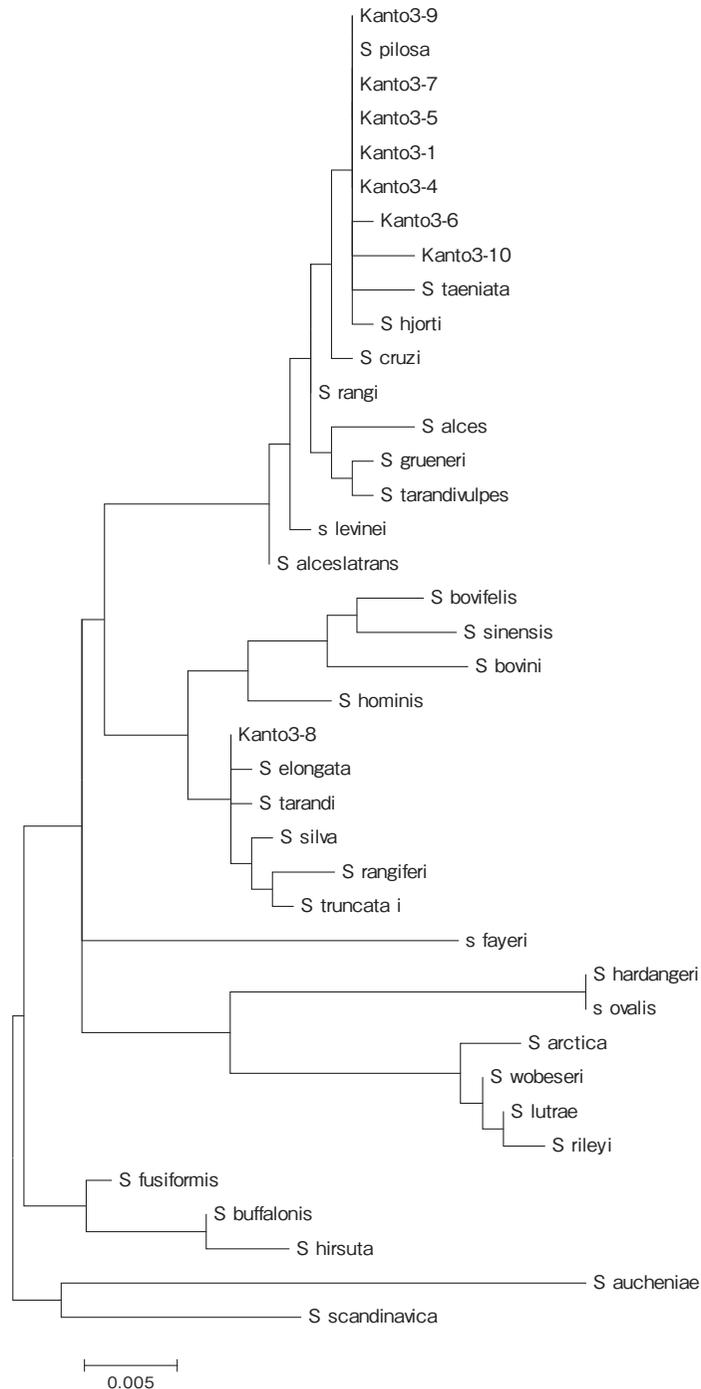
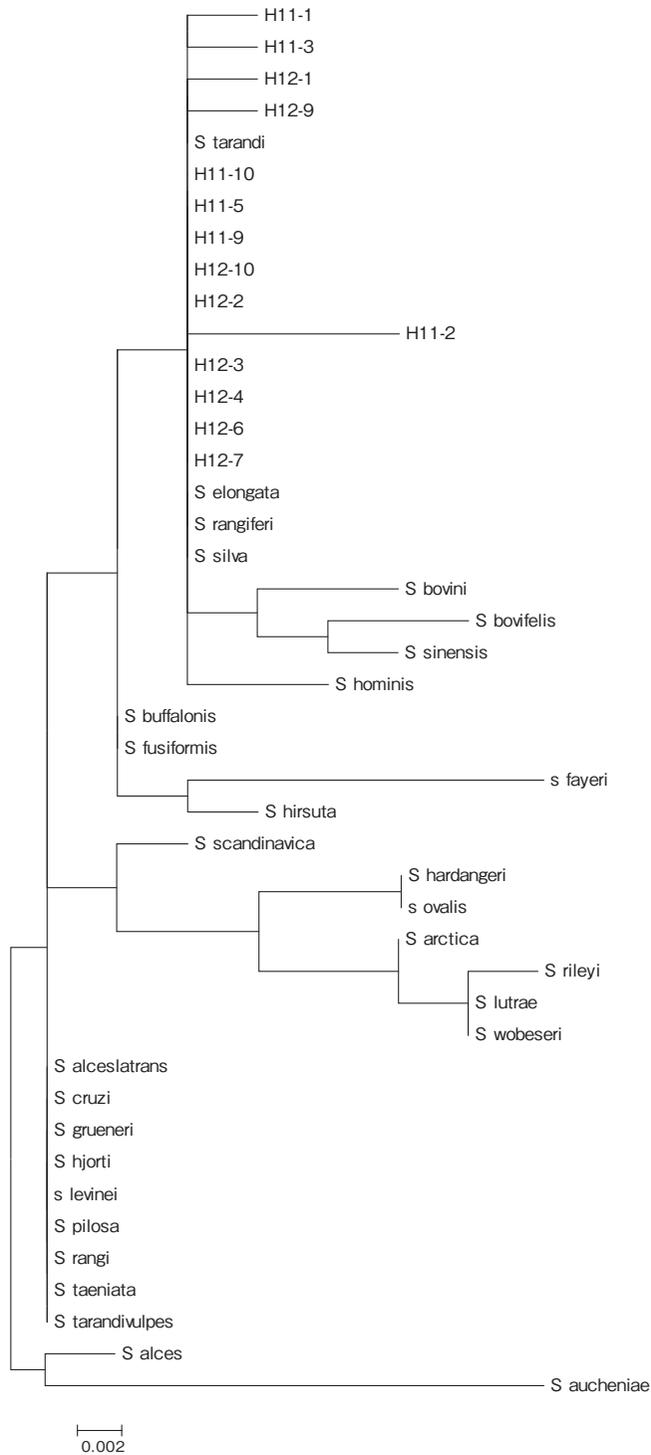


Fig. 2 Phylogenetic relationships between *Sarcocystis* sp. from wild deer in Kanto area obtained in this study and other previously published *Sarcocystis* species.

Isolates from this study are marked in Kanto-No. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene were aligned against reference sequences retrieved from GenBank using ClustalW program. A phylogenetic tree was constructed by neighbor joining method with the maximum composite likelihood substitution model. The reliability of the tree was assessed using bootstrap method with 1000 replicates.



**Fig. 3** Phylogenetic relationships between *Sarcocystis* sp. from wild deer in Hokkaido area obtained in this study and other previously published *Sarcocystis* species.

Isolates from this study are marked in H-No. Nucleotide sequence of the 18S rRNA gene were aligned against reference sequences retrieved from GenBank using ClustalW program. A phylogenetic tree was constructed by neighbor joining method with the maximum composite likelihood substitution model. The reliability of the tree was assessed using bootstrap method with 1000 replicates.

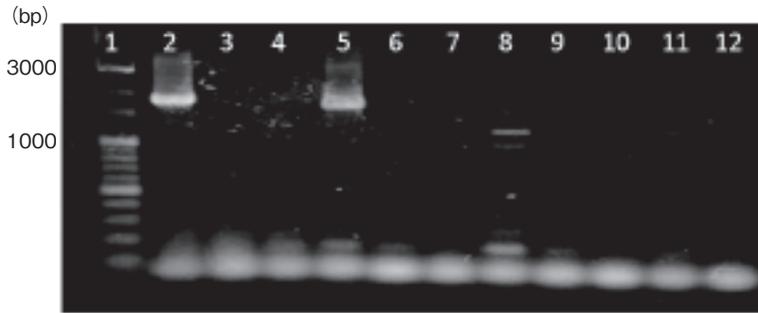


Fig. 4 Detection of *Sarcocystis* sp. 18S ribosomal RNA gene by Polymerase Chain Reaction (PCR).

- Lane 1 : 100bp DNA marker
- Lane 2 : muscle tissue (maternal)
- Lane 3 : uterus (maternal)
- Lane 4 : caruncle (maternal)
- Lane 5 : placenta (maternal)
- Lane 6 : placenta (fetus)
- Lane 7 : umbilical cord
- Lane 8 : muscle tissue (fetus)
- Lane 9 : diaphragm (fetus)
- Lane 10 : heart (fetus)
- Lane 11 : tongue (fetus)
- Lane 12 : Negative control (PBS)

なった*Sarcocystis*種が寄生している可能性が推測される。

#### 3.4 国内野生ニホンジカにおける*Sarcocystis*属の胎子移行

捕獲時の推定年齢が1歳の検体にも高率に*Sarcocystis*属が寄生していることが確認されたことから、垂直感染の可能性が推測されたため、北海道で捕獲された妊娠エゾシカ個体から、母体と胎子における*Sarcocystis*属の感染の有無を調べた。その結果、エゾシカ妊娠個体では、子宮、胎子側胎盤および胎子の臍帯、骨格筋組織、心臓、舌を検査した結果、1,800bpのバンドは認められなかった。一方、母体由来骨格筋組織および母体側胎盤を用いた検査では1,800bpのバンドが確認された (Fig. 4)。このことから、*Sarcocystis*属のメロゾイトは胎盤関門を通過できないことが示唆され、胎子移行はできないが、生後1年間の間にスポロシストによる暴露を受ける可能性が示唆された。しかし、本研究では1例のみの調査結果で

あるため、信頼性向上のために調査検体の増加、かつ妊娠初期、中期、後期の胎子の成長時期に対応した調査を行う必要がある。

今回*Sarcocystis*種に関して調査を実施した野生ニホンジカは、3地域由来の個体であるが、ニホンジカに寄生する*Sarcocystis*属の種の多様性および多様な種ごとの毒性、国内に分布するニホンジカの亜種の多様性を鑑みると、さらに多く調査が必要である。

本研究の疫学的解析から、国内野生ニホンジカには*Sarcocystis*属感染が避けられないと推察された。*Sarcocystis fayeri*による食中毒性が判明しているウマ生肉の食肉利用には加熱、冷凍など予防対策が講じられている<sup>5)</sup>ことから、シカ肉の食肉利用の際にも、十分なりリスク管理を行うために危害性予防対策が必要である。

#### 4. 要 約

今回の研究では、これまでに知られていなかっ

た野生ニホンジカに寄生する*Sarcocystis*属の種同定を遺伝学的手法で明らかにした。固有宿主に一種のみが感染する家畜での感染形態とは異なり、野生ニホンジカについては、日本国内に広く分布している共通種と、生息地域に特異的に分布する固有種が混合感染している。*Sarcocystis*属についてはこれまでも食中毒性が指摘されているため、ニホンジカ寄生性*Sarcocystis*種についても、食中毒性を明らかにしていく必要がある。

## 文 献

- 1) 食品安全委員会ファクトシート：ジビエを介した人獣共通感染症（食品安全委員会HP）[https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140805\\_gibier.pdf](https://www.fsc.go.jp/sonota/factsheets/140805_gibier.pdf)
- 2) 平成23年8月23日付け食安監発0823第1号「*Sarcocystis fayeri*の検査法について（暫定版）」<http://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzendu/0000125127.pdf>
- 3) Prakas, P., Butkauskas, D., Rudaitytė, E., Kutkienė, L., Sruoga, A., Pūraitė, I.: *J Parasitology Research*, **115**, 3021~3032, 2016.
- 4) 大泰司紀之：哺乳類科学, 26(2), 13~17, 1986.
- 5) 齊藤守弘, 鉢須桂一, 岩崎一弥, 中島董, 渡辺昭宣, 守屋英樹, 板垣博：日本獣医師会雑誌, 37(3), 158~162, 1984.

## カンピロバクターフリーブロイラーの分別出荷を 目的とした養鶏場即時検出システムの確立

Establishment of pen side diagnosis system for segregation of  
*Campylobacter*-negative flocks in chicken broiler farms

山 崎 渉・イスラム イブラヒム サビック  
(宮崎大学農学部獣医学科)

Wataru Yamazaki and Islam Ibrahim Sabike

(Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

We established an effective *Campylobacter* screening system based on loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for both boiler chicken farm and slaughterhouse settings. We evaluated a turbidimetric LAMP (T-LAMP) and a fluorescent LAMP (F-LAMP) assays for the direct screening of naturally contaminated chicken cecal and cloaca samples for *C. jejuni*/*C. coli* to compare these assays with conventional quantitative culture methods. While a real-time turbidimeter with AC power supply was used for T-LAMP analysis in a laboratory, only 1.75kg weight mobile machine with in-house battery was used for F-LAMP analysis. In total of 165 cecal samples, 93 samples (71.0%) were *C. jejuni*/*C. coli*-negative and 38 (29.0%) showed *Campylobacter* loads of between 6.4 and 9.0 log CFU/g in conventional culture methods. The performance of T-LAMP and F-LAMP assays were both 100% accurate in terms of diagnostic sensitivity (38/38) and specificity (93/93). Furthermore, in a comparison study of 165 cloaca samples, both T-LAMP and F-LAMP assays showed 82.8% (48/58) diagnostic sensitivity, 100% (107/107) diagnostic specificity. In a comparison of 55 flocks, both LAMP assays showed 90.5% (19/21) diagnostic sensitivity and 100% (34/34) specificity. While the T-LAMP assay required between 38 and 80 min from the beginning of DNA extraction to results, the F-LAMP assay required only between 31 and 65 min. Reagent cost for both LAMP assays were less than 100 JPY for single sample analysis. These suggest that the F-LAMP assay will facilitate the separation of *C. jejuni*/*C. coli*-negative and -positive broiler flocks at the farm level or in slaughterhouses before slaughtering, which would make it an effective tool in preventing the spread of campylobacteriosis to humans.

### 1. 目 的

カンピロバクター・ジェジュニとカンピロバクター・コリ（以下「カンピロバクター」）は日本における細菌性食中毒の原因の第一位であり、判

明した原因食品のほとんどが鶏肉である。カンピロバクターによる食中毒低減のためには原材料汚染防止が重要なので、市販鶏肉の汚染を低減させる方法が模索されているが、有用な手法はまだ確立されていない。カンピロバクターは外部環境か

ら養鶏場内に侵入し、感染鶏（ブロイラー）腸内で増殖したのちに鶏群全体に急速に広がる。カンピロバクターの鶏腸内への定着は移行抗体の低下期あるいは腸内細菌叢構成の急変期である21～28日齢以降におこり、糞食習慣や密閉鶏舎内での多頭飼育、暑熱対策の過換気等の要因を背景に、出荷時である45～55日齢までに同一鶏群全体に広がる<sup>1-3)</sup>。

国内外の調査報告によれば、出荷時における鶏のカンピロバクター保菌率は0～100%であり、養鶏場単位で明確な違いが認められる（同一養鶏場で飼育されていても飼育鶏舎が異なる別個の鶏群では保菌状況が異なることもある）。養鶏場（あるいは鶏群）ごとにカンピロバクター保菌率が異なる理由は不明だが、これらの知見は適切なバイオセキュリティ対策を取り、外部環境からの侵入を阻止している養鶏場はカンピロバクターフリー（陰性）の鶏を出荷していることを意味している。カンピロバクター陰性の鶏は鶏肉汚染を引き起こさないの、カンピロバクター食中毒の低減に重要な貢献をすることができる。

しかし、鶏はカンピロバクターの無症状保菌者なので、臨床的・肉眼的所見からカンピロバクターの陽性・陰性を鑑別することは不可能である。それゆえ、現在はカンピロバクター陽性・陰性鶏群が分別されずに、食鳥処理場に出荷されている。結果として、陽性鶏群の処理後に陰性鶏群が処理されることにより、食肉加工時に原材料汚染が拡大している。養鶏場でカンピロバクター陰性の鶏群を分別したうえで出荷し、食鳥処理場で先行処理するシステムや食鳥処理場内でカンピロバクター陽性・陰性鶏群を分別できるシステムを確立できれば、鶏肉加工時のカンピロバクター汚染を合理的に低減させ、食中毒被害を予防できる。本研究の目的は、出荷時および食鳥処理時にカンピロバクター陽性・陰性の鶏群を簡易・迅速

かつ正確に鑑別できるシステムを確立し、食中毒被害低減に貢献することである。

## 2. 方法

宮崎県内養鶏場の計99鶏群から採取した盲腸内容物131ならびにクロアカ（総排泄腔内容物）165サンプルを試験に供した（いずれも1鶏群から無作為に3サンプルずつ採取）。まず、定法に従い、サンプルの10倍希釈系列を作製したうえでmCCDA培地上に各希釈液を塗布した。42℃・2～3日の条件化で微好気培養を行い、サンプル内カンピロバクター量を定量した。さらに、サンプル約1gをプレストン増菌培地で42℃・1日の微好気培養後に、1白金耳量をmCCDAとバター培地上に塗布し、42℃・2～3日の条件で微好気培養を行い、カンピロバクターの定性試験も同時に行った。培地上のカンピロバクター様コロニーを各サンプルあたり計4つ鈎菌し、菌種を同定した。

さらに、既報に従い<sup>4-6)</sup>、サンプルから総DNA（陽性サンプルはカンピロバクター遺伝子を含む）の直接検出を行った。抽出したDNAに対して、濁度LAMP法ならびに蛍光LAMP法を実施した。LAMP法は既報に従い<sup>4,6)</sup>、カンピロバクター・ジェジュニのみを検出するプライマーセット（C. jejuni-LAMP）、カンピロバクター・コリのみを検出するプライマーセット（C. coli-LAMP）ならびに2菌種を包括して検出するための2つのプライマーセットの混合（duplex LAMP）の3種の検出系を評価した。

## 3. 結果と考察

131サンプルの盲腸内容物に対するカンピロバクター培養試験の結果、93サンプル（71.0%）は陰性、38サンプル（29.0%）が陽性を示した。濁度LAMP法ならびに蛍光LAMP法を実施した結

果、いずれも培養試験の結果と完全に一致し、診断的感度（陽性サンプル判定の正確度）(38/38) および診断的特異度（陰性サンプル判定の正確度）(93/93) は両法ともに100%を示した（Table 1）。

165サンプルのクロアカに対するカンピロバクター培養試験の結果、107サンプル（64.8%）は陰性、58サンプル（35.2%）は陽性を示した。陽性58サンプルのうち、50サンプルは直接培養において陽性を示した。残る8サンプルは直接培養では陰性を示したが、増菌培養で陽性を示した。濁度LAMP法ならびに蛍光LAMP法を実施した結

果、2つのLAMP法の判定結果は一致した。いずれも診断的特異度は100%（107/107）、診断的感度は82.8%（48/58）をそれぞれ示した（Table 2 およびTable 3）。

本研究においては、鶏肉の流通・消費前段階である生産者レベル（養鶏場）でのカンピロバクター陽性鶏群の摘発・分別や加工レベル（食鳥処理場）での二次汚染拡大防止を可能とするために、日数を要する増菌培養を行うことなく、クロアカ（出荷直前に養鶏場での使用を想定）および盲腸内容物（食肉処理場での使用を想定）からのカンピロバクタースクリーニングを目的としたシ

Table 1 Results of turbidimetric and fluorescent LAMP assays for 131 broiler chicken cecal samples

	Culture results			
	<i>C. jejuni</i> -positive but <i>C. coli</i> -negative (n = 35)	<i>C. coli</i> -positive but <i>C. jejuni</i> -negative (n = 0)	<i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> -positive (n = 3)	<i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> -negative (n = 93)
Turbidimetric LAMP				
<i>C. jejuni</i> -LAMP positive	35	0	3	0
<i>C. coli</i> -LAMP positive	0	0	3	0
Duplex LAMP positive	35	0	3	0
Fluorescent LAMP				
<i>C. jejuni</i> -LAMP positive	35	0	3	0
<i>C. coli</i> -LAMP positive	0	0	3	0
Duplex LAMP positive	35	0	3	0

Table 2 Results of turbidimetric and fluorescent LAMP assays for 165 broiler chicken cloaca samples

	Culture results			
	<i>C. jejuni</i> -positive but <i>C. coli</i> -negative (n = 50)	<i>C. coli</i> -positive but <i>C. jejuni</i> -negative (n = 6)	<i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> -positive (n = 2)	<i>C. jejuni</i> and <i>C. coli</i> -negative (n = 107)
Turbidimetric LAMP				
<i>C. jejuni</i> -LAMP positive	41	0	2	0
<i>C. coli</i> -LAMP positive	0	5	2	0
Duplex LAMP positive	ND	ND	ND	ND
Fluorescent LAMP				
<i>C. jejuni</i> -LAMP positive	41	0	2	0
<i>C. coli</i> -LAMP positive	0	5	2	0
Duplex LAMP positive	43	5	2	0

ND: Not determined.

**Table 3** Comparison of *C. jejuni/C. coli* population and LAMP screening results in 58 culture-positive broiler fecal samples

Culture results <i>C. jejuni/C. coli</i> enumeration (log cfu/g)	<i>C. jejuni/C. coli</i> LAMP			Concordance of culture and LAMP results (%)
	No. of culture- positive ( <i>n</i> = 58)	No. of LAMP- positive ( <i>n</i> = 48)	No. of LAMP- negative ( <i>n</i> = 10)	
>9.00	1	1	0	100%
>8.00	2	2	0	100%
>7.00	13	13	0	100%
>6.00	15	15	0	100%
>5.00	9	8	1	88.9%
>4.00	8	4	4	50.0%
≥ 3.00	2	0	2	0%
<3.00	8*	5	3	62.5%

\*Of the eight samples, all tested negative by direct plating, but five tested positives with enrichment culturing.

システムを開発し、その性能を評価した。従来から国内で広範に使用されてきた濁度LAMP法に加えて、より迅速性・視認性・携帯性（現場持込が容易）に優れているモバイル測定機器と自家製比色蛍光試薬を用いる蛍光LAMP法も並行して実施した。リアルタイム増幅確認による最も早い陽性判定時間と陰性確認時の最終判定所要時間は濁度LAMP増幅で18分と60分、蛍光LAMP増幅で11分と45分であった。両法いずれも肉眼での陽性判定が可能であったが、反応副生物である白濁を確認する濁度LAMP法よりも、ハイドロキシルナフトールブルーによる比色変化（深青色から淡青色）を示す蛍光LAMP法の方が明確に判定できた。先行して実施する20分のDNA抽出ステップの時間を加えて、濁度LAMP法は38分から80分、蛍光LAMP法は31分から65分で迅速に判定が可能であることが分かった。1サンプルあたりの試薬コストは濁度LAMP法、蛍光LAMP法のいずれにおいても自家製試薬を用いており、市販品（200円から400円）よりも安価な100円弱であった。

盲腸内容物を対象とした試験では、培養試験の結果、陽性サンプルのカンピロバクター菌数は、いずれも1gあたり6.0logから9.0log CFU（100万個から10億個）とLAMPの検出限界（サンプル

1gあたり4,000から6,000個）を大幅に上回る数値を示しており、濁度LAMP法、蛍光LAMP法のいずれにおいても培養試験と100%の一致度でカンピロバクターのスクリーニングが可能であった（Table 1）。それゆえ、1鶏群から無作為抽出した3羽を食鳥処理場での加工直前に選別し、開発システムを用いてスクリーニングをすれば、カンピロバクター陽性・陰性鶏群の鑑別が可能となる。同定した陰性鶏群を先行処理後に、陽性鶏群を処理することで食鳥処理場での相互汚染頻度を減少させられることが示唆された<sup>7)</sup>。

これに対し、クロアカを対象とした試験では、陽性サンプルのカンピロバクター菌数は1gあたり3.0log未満から9.0log CFU（1,000未満から10億個）であり、盲腸内容物と比較して菌数のばらつきが認められた（Table 3）。さらに、濁度LAMP法、蛍光LAMP法のいずれにおいても、培養陽性の58サンプルのうち、10サンプルを正しく陽性と判定することができなかった（LAMP法の偽陰性判定）。この偽陰性10サンプルは3サンプルのみが低菌量による検出感度不足に起因していた。残る7サンプルはむしろ、検出限界を十分に上回りながら、偽陰性を示した（Table 3）。これらの7サンプル中5サンプルは同一時期に採取した特

定の1農場に集中しており、クロアカ内に含有される遺伝子増幅阻害物質（例えば盲腸内容物にはほとんど存在しないが、クロアカ内に高濃度で存在する尿酸や特定の飼料に起因する物質）によって、LAMP増幅が阻害されたと推測した<sup>8,9)</sup>。なお、蛍光LAMP法において、2サンプルのみC. jejuni-LAMPとC. coli-LAMPが陰性かつdupelx LAMPのみが陽性を示す部分的な不一致例が認められた（Table 2）。2つのプライマーセットを組み合わせた相乗効果により、検出限界付近のサンプルを幸運にも検出できた可能性が示唆されたが、慎重な判断を期すため、C. jejuni-LAMPとC. coli-LAMPの結果を採用し、最終的に陰性サンプルと判定した。

逆に、カンピロバクター菌数が1gあたり3.0log（1,000個）未満でありながら、5サンプルはLAMP陽性を示している（Table 3）。これらのサンプルはすべて、直接培養（mCCDA培地使用）では雑菌が過剰に発育し、培地上にカンピロバクターの発育が確認できなかった。しかし、増菌培養（プレストン培地での増菌後、mCCDAとバター培地に塗抹）では、純培養上にカンピロバクターの発育が観察されている。プレストン培地、mCCDA培地ならびにバター培地はそれぞれ、異なる抗菌スペクトラムの抗生物質／抗菌性物質を含有しているので、増菌培養では雑菌発育を効果的に抑制できる。それゆえ、元来、サンプル内にはLAMP法の検出限界を上回るカンピロバクターが存在していたが、直接培養中の雑菌過剰発育（直接培養の偽陰性）により、見かけ上、菌数が少なく算出されたものと推測された<sup>8)</sup>。

クロアカサンプルでは鶏個体単位では偽陰性が17.2%の頻度で確認されたものの、鶏群単位で解析した場合（3羽の結果をまとめて1羽でも陽性個体があれば鶏群を陽性と判定）、診断的特異度は100%（34/34）、診断的感度は88.5%（17/19）

となり、偽陰性の発生頻度は11.5%まで低下する。それゆえ、1鶏群あたり3羽以上を出荷直前に本LAMP法を用いてスクリーニングをすれば、カンピロバクター陽性・陰性鶏群の特定と分別出荷による食鳥処理場での相互汚染リスク低減が90%近くの精度で可能となることが示唆された。上述の盲腸内容物を対象としたスクリーニング法と組み合わせ、食鳥処理場での鶏肉原材料のカンピロバクター汚染の低減により、食中毒発生の減少が実現できる可能性が示唆された<sup>8)</sup>。

蛍光LAMP法と濁度LAMP法の診断精度とコストは同等であったが、視認性・迅速性・携帯性の面で、蛍光LAMP法に利点が多いことが明らかになった。今後は蛍光LAMP法に焦点をあてた改良を推進する予定である。当初は自家製比色蛍光試薬を常温保存可能な乾燥試薬化し、より現場での使用に即したシステム開発を想定していた。しかし、予備試験において検出感度の低下が認められ、実用化には至らなかったため、改良を図る。今回開発したシステムはDNA抽出ステップに20分、さらに遠心機とヒートブロックの使用を必要としている。今後はDNA抽出ステップもさらに使用機材・試薬の簡便化と迅速化を図るとともに、サンプル内の遺伝子増幅阻害物質を簡易に除去できる手法を開発し、陽性・陰性鶏群を100%の正確性で鑑別できるよう、合わせて改良を図っていきたい。カンピロバクターのスクリーニングが養鶏場等の現場で実現できるように、簡易迅速かつ高精度なスクリーニングシステムを確立したい。

#### 4. 要 約

出荷時および食鳥処理時にカンピロバクター陽性・陰性の鶏群を簡易・迅速かつ正確に鑑別するためのシステムを開発した。131の鶏盲腸内容物サンプルに対して、本システムによる迅速スク

リーニングの結果は培養試験の結果と完全に一致し、診断的特異度 (93/93) および診断的感度 (38/38) はともに100%を示した。さらに、165のクオアカサンプルに対して、本システムの診断的特異度は100% (107/107)、診断的感度は82.8% (48/58) をそれぞれ示した。判定所要時間は11分から45分であった。開発システムは高感度かつ迅速であり、カンピロバクター陽性・陰性鶏群の特定と分別、食鳥処理場での相互汚染リスク低減に応用できる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Rudi, K., Høidal, H. K., Katla, T., Johansen, B. K., Nordal, J., Jakobsen, K. S. : *Appl Environ Microbiol*, **70**, 790~797, 2004.
- 2) Wagenaar, J. A., Jacobs-Reitsma, W., Hofshagen, M., Newell, D. : *Campylobacter* 3<sup>rd</sup> edition, pp.667~667, ASM press, Washington DC, USA, 2008.
- 3) Yamazaki, W., Uemura, R., Sekiguchi, S., Dong, J.B., Watanabe, S., Kirino, Y., Mekata, H., Nonaka, N., Norimine, J., Sueyoshi, M., Goto, Y., Horii, Y., Kurogi, M., Yoshino, S., Misawa, N. : *J Appl Microbiol*, **120**, 1711~1722, 2016.
- 4) Yamazaki, W., Taguchi, M., Ishibashi, M., Kitazato, M., Nukina, M., Misawa, N., Inoue, K. : *J Med Microbiol*, **57**, 444~451, 2008.
- 5) Yamazaki, W., Taguchi, M., Kawai, T., Kawatsu, K., Sakata, J., Inoue, K., Misawa, N. : *Appl Environ Microbiol*, **75**, 1597~1603, 2009.
- 6) Yamazaki, W. : *Methods Mol Biol*, **943**, 267~277, 2013.
- 7) Sabike, I. I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, Farid, A. S., Goto, Y., Horii, Y., Yamazaki, W. : *Food Control*, **74**, 107~111, 2017.
- 8) Sabike, I. I., Uemura, R., Kirino, Y., Mekata, H., Sekiguchi, S., Okabayashi, T., Goto, Y., Yamazaki, W. : *Front Microbiol*, **7** (article number: 1582), 2016.
- 9) Wilson, I. G. : *Appl Environ Microbiol*, **63**, 3741~3751, 1997.

## 毒素原性大腸菌易熱性毒素を迅速に検出する イムノクロマトグラフィーの開発

Development of immunochromatography for rapidly detecting heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*

有 満 秀 幸

(藤田保健衛生大学医学部)

Hideyuki Arimitsu

(Fujita Health University School of Medicine)

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) causes watery diarrhea both against humans and swine. ETEC produces heat-labile enterotoxin which is intrinsic each for humans and swine (LTh and LTp, respectively). Since ETEC causes diarrhea in piglets which affects growth after weaning, it is important for immediate preventive measures to establish simple and rapid diagnosis methods to detect ETEC infection in piglets. For this purpose, we attempted to develop an immunochromatographic detection method for LTp using mouse monoclonal antibodies. From hybridoma clones derived from mice which were intranasally immunized with genetically attenuated mutant LTp, we isolated five types of LTp-specific monoclonal antibody (mAb) producing hybridoma clones; two of which were B subunit specific and three of which were A subunit specific. Among them, one of the B subunit-specific mAb 57B9 was cross-reactive not only with LTh, but also with cholera toxin (CT) produced by *Vibrio cholerae*. Although immunochromatographic test strips using all combinations of mAbs did not work, the one using a combination of gold colloid-conjugated mAb 57B9 with LTp-specific rabbit polyclonal antibodies on the membrane could rapidly (within 30 minutes) detect purified LTp at the detection limit of 10 ng/ml. This test strip also cross-detected not only purified LTh but also purified CT at the same detection limit. This test strip detected not only LT in the supernatant of LT gene-positive strains cultured in CAYE broth supplemented lincomycin, but also CT in the supernatant of *Vibrio cholerae* cultured in Syncase broth. These results indicate that this test strip is commonly applicable for the diagnosis of both ETEC and *V. cholerae* infection both in humans and swine.

### 1. 目 的

毒素原性大腸菌 (ETEC) 感染症は発展途上国における乳幼児下痢症や旅行者下痢症の主要な原因菌であるが、我が国においても汚染生野菜など

の摂取による食中毒事例が散発する疾患である。また家畜においては豚の離乳後下痢症の原因菌となっており、肥育に影響を与えることから、先進国においても畜産農家に経済的損失を与える疾患である。ETECによる下痢の主要な病原因子は、

易熱性下痢毒素 (LT) と耐熱性下痢毒素 (ST) の2種類の下痢毒素である。そのうちのLTはヒト下痢症と豚下痢症から分離される菌株で抗原性がわずかに異なり、それぞれLTh, LTpと厳密に区別される。またLTはコレラ菌が産生するコレラ毒素 (CT) と血清学的に交差し、ペプチドであるSTとは異なり、1分子のAサブユニットと5分子のBサブユニットからなる約86kDaの複合体タンパクであるため抗原性が高い。

LTの検出には分離培養された菌の培養上清を試料とした、ウサギポリクローナル抗体を用いたラテックス凝集反応キットが市販されているが、結果を得るために約18~20時間を要することが難点である。特に獣医畜産領域においては、オンサイトでの診断の可否がその後の速やかな防疫対策につながることで、またヒトの公衆衛生分野においても安価な検出キットを提供できることは、本菌の蔓延する途上国の医療への貢献の観点でも重要であると考えられる。

LTによる下痢の発症はCTと同様、小腸上皮細胞での持続的なアデニル酸シクラーゼの活性化によるcAMPの上昇で起こるが、一方でLTは高い粘膜アジュバント活性を示すことが報告されており、我々の研究室では弱毒化させた変異LTp (mLT) を種々のワクチン抗原と経鼻投与することにより、ワクチン効果を強めることを報告してきた。さらに我々はmLTをワクチン抗原とともに混合免疫したマウスに由来する、LTに対するモノクローナル抗体 (mAb) 産生ハイブリドーマを数種分離したことから、このmAbがLT、ひいては交差反応するCTを迅速かつ高感度に検出できる診断薬開発に利用できないかと考えた。

そこで本研究では、得られたLTに対するmAbの性状を詳細に解析し、迅速簡易診断に利用できる可能性のあるLT検出用のイムノクロマトグラフィーのテストストリップの作製を試みた。

## 2. 方法

### 2.1 材料

抗体の作製およびスクリーニングに使用するLT (LTh, LTp), mLTおよびCTは既報<sup>1-3)</sup>に準じて組換えタンパク質として作製、精製した。豚由来の野生株大腸菌は共立製薬株式会社より分与された菌株を使用した。LTh産生菌株であるH10407株、CT産生株のコレラ菌である *Vibrio cholerae* 569B株は研究室の保管株を使用した。

### 2.2 モノクローナル抗体およびウサギポリクローナル抗体の作製

mAb産生ハイブリドーマクローンは既報の志賀毒素 (Stx) に対する抗体を作製<sup>4,5)</sup>する際に、Stx抗原とともにアジュバントとしてmLT<sup>3)</sup>を混合免疫したBALB/cマウス由来ハイブリドーマから分離した。LT特異抗体産生クローンはLTpを抗原としたELISAで選別した。限界希釈法を2回実施して単一化したクローンをBALB/cマウスの腹腔内に接種して、腹腔内に滲出する腹水を回収後、ProteinGセファロースを用いてIgGを精製した。ポリクローナルIgG抗体はmLTをフロイントアジュバントと乳化後にウサギに皮下免疫し、採血して得た抗血清からProtein Aセファロースを用いて精製した。精製抗体のLTやCTに対する感度はELISA、反応特異性はウェスタンブロットまたはDynabeads Protein Gを用いた免疫沈降法により確認した。

### 2.3 イムノクロマトグラフィーのテストストリップの作製

テストストリップの作製は既報に準じて行った<sup>4)</sup>。作製したmAbは金コロイド粒子 (WRGH 2; ワインレッドケミカル社) で標識し、1% BSAを含むPBSで希釈した溶液をコンジュゲートパッド (ミリポア社) に染みこませて乾燥させた。テストストリップはメンブレンとしてHi-

FlowPlus135メンブレンカード (ミリポア社) を使用し、テストライン (検出部) には金コロイド標識抗体とは異なる別のmAb, またはウサギポリクローナルIgGを画線塗布, コントロールライン (対照部) には抗マウスIgGヤギ抗体を画線塗布し, 37℃で2時間乾燥させた。ブロッキング溶液 (0.5%カゼイン加50mMホウ酸, pH8.5) に45分間振盪後, 安定化溶液 (0.5%ショ糖加50mMTris-HCl, pH7.5) に30分置換し, その後室温で一晩乾燥させた。これに上述の金コロイド標識抗体を含むコンジュゲートパッドと試料添加パッド (サンプルパッド), 吸収パッドを貼り付け完成品とした。

#### 2.4 試料の作製およびテストストリップでの毒素の検出

大腸菌株の培養にはカザミノ酸—酵母エキス (CAYE) 培地, トリプティックソイ (TS) 培地, Syncase培地, ブレインハートインフュージョン (BHI) 培地に加え, BHIはカザミノ酸を2%になるよう添加したBHI-CA培地も使用した。コレラ菌培養にはSyncase培地を使用した。いずれの培地も毒素産生増強効果があることが報告されているリンコマイシン (最終濃度90  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) の添加の影響も検討した。37℃で一晩培養した菌液のポリミキシンB処理遠心上清をフィルターで濾過し, その150  $\mu\text{l}$  をサンプルパッドを通じてテストストリップに展開し, 30分以内にテストラインとコントロールライン上のバンドの出現の有無を確認した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 得られたmAbの感度と特異性

今回5種類のLTp特異的なmAb産生クローンが得られた。各抗体の特性をFig. 1に示す。LTpを抗原としたウェスタンブロットにより, 2種類 (57B9, 58D3) がBサブユニット抗体, 3種類

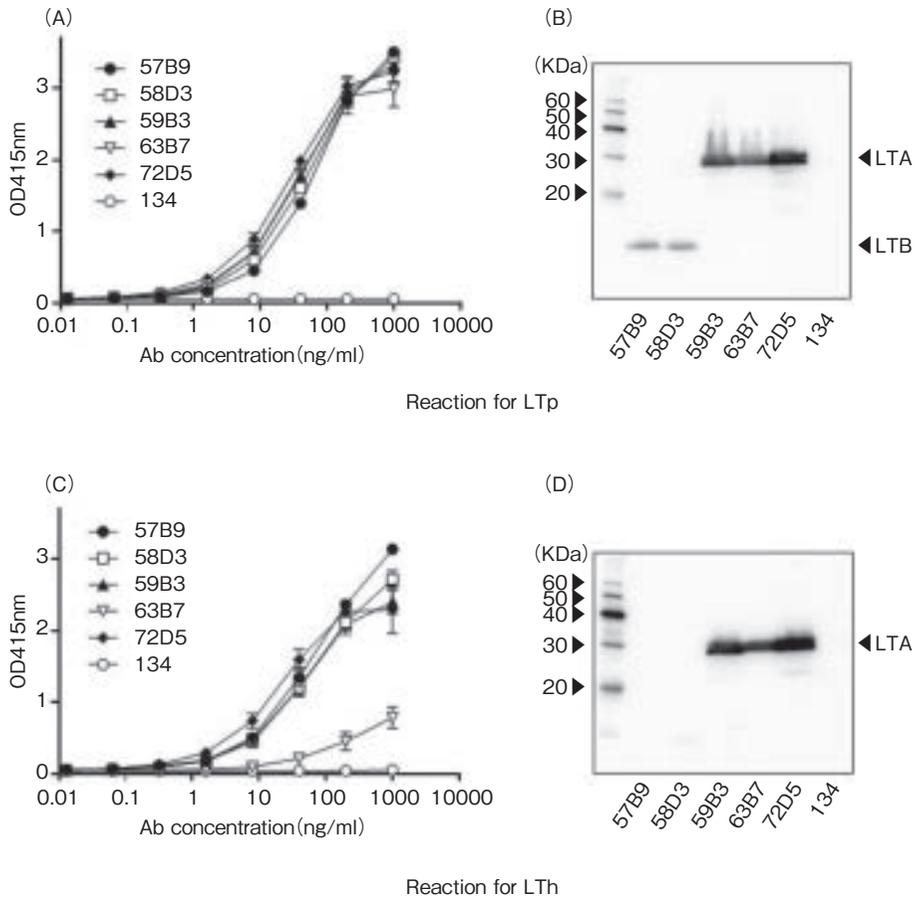
(59B3, 63B7, 72D5) がAサブユニット特異抗体であることが明らかとなった。LTpを抗原としたELISAでは抗体間に感度の差はほとんど見られなかったが, LThに対しては63B7の感度が低下し, またBサブユニット抗体2種についてもウェスタンブロットでバンドが検出できないなど反応性に違いが見られた。また, CTに対してはFig. 2に示すように, 57B9のみがLTp, LThとほぼ同感度で交差反応することがELISAで明らかとなったが, LThに対してと同様, ウェスタンブロットではバンドとして認められず, 免疫沈降により特異性が確認された。これらの結果から, 57B9はLTp, LTh, CTに同等に交差反応する抗体であり, 残る4抗体はLT特異抗体と判断した。

#### 3.2 テストストリップの反応性

次にイムノクロマトグラフィーに用いる最適な抗体の組み合わせを見いだすため, 各mAbを金コロイド標識抗体, メンブレン塗布抗体として検証を行った。しかしながら予備実験の段階で, mAb同士の組み合わせではどれも1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ のLTでさえ検出ができなかったため, 塗布抗体はウサギポリクローナルIgGに切り替え, 最適なmAbを金コロイド標識抗体として使用することにした (この抗LTpポリクローナルIgGはELISAでLTp>LTh>CTの順の反応感度を示し, またウェスタンブロットでの反応性にも差があるものの, 3種すべての毒素に交差反応する)。Fig. 3に結果を示すように, 作製したテストストリップのうち, 57B9を金コロイド標識抗体としたものが最も感度が高く, 10ng/mlまでの精製LTpおよびLThを検出できることが明らかとなった。その他のmAbではこの感度に至らなかったことから, 57B9を金コロイド標識抗体としたテストストリップを用いて以降の検証を行うことにした。

#### 3.3 最適な供試菌培養条件の検討

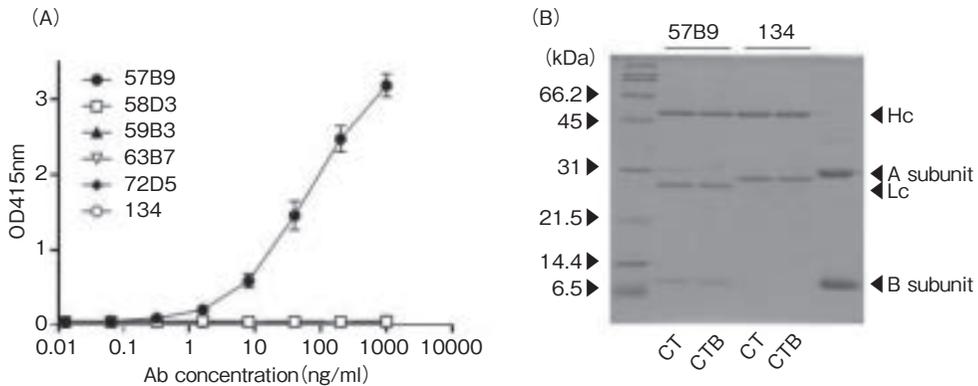
豚の臨床材料から分離されたETECからの最適



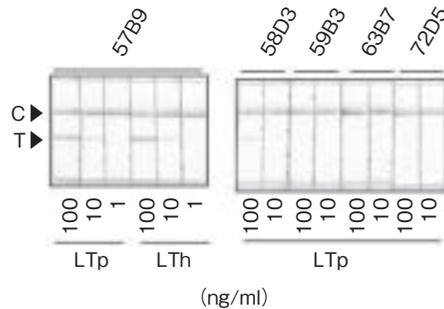
**Fig. 1** Immunological properties of the LT-specific mouse mAbs prepared in this study. The reaction of each mAb against purified LTP (A) and LTh (C) in ELISA. The data represent the mean of three separate experiments and the error bars indicate the standard error of the mean. (B) Western blot analysis of each mAb (57B9 and 58D3, 100 ng/ml; 59B3, 63B7, and 72D5, 10 ng/ml; 134, 1  $\mu$ g/ml) against the cell extracts of LTP (B) and LTh (D) -expressing recombinant *E. coli* MV1184 strains. Each lane was separated after blocking and recombined in the detection step. mAb 134 was used as a negative control.

なLT産生条件を決定するため、種々の培地で培養し、テストストリップでのLT検出の可否を検証した。Fig. 4(A) に結果を示す。この中でCAYE培地とSyncase培地におけるETECの培養上清でLTが検出できた。BHI培地ではカザミノ酸添加の有無に関わらずLTの検出ができず、TS培地では結果が安定せず良否の判定ができなかった。また、ETECのLT産生は培地中にリンコマイシンを添加すると増強することが知られていることより、各培地に添加して培養したところ、

CAYE培地、Syncase培地でより明瞭なバンドが検出できたため、この2種の培地にリンコマイシンを添加した培養条件が適していると考えた。次に種々の遺伝子型を示す豚由来大腸菌株培養上清中のLT検出の可否を確認したところ、Fig. 4(B) に示すように、ST遺伝子 (*est*)、浮腫病の原因因子である志賀毒素バリエーション *Stx2e* 遺伝子 (*stx2e*) の有無に関わらず、LT遺伝子 (*elt*) 保有株の培養上清中からはLTを検出することができ、非保有株においては非特異反応、STや *Stx2e* との交差



**Fig. 2** Response of anti-LT mAbs to CT. (A) Sensitivity of each mAb against purified CT. The data represent the mean of three separate experiments and the error bars indicate the standard error of the mean. (B) Immunoprecipitation of mAbs against 150  $\mu$ l of cell extract from recombinant *E. coli* MV1184 strains expressing CT or CTB. "Hc" and "Lc" indicate the heavy and light chains of each mAb, respectively. Purified CT (5  $\mu$ g) was loaded in the right lane as a reference band. In all experiments, mAb 134 (anti-His tag mAb) was used as a negative control antibody.



**Fig. 3** Immunochromatographic detection limits of the test strip against purified LT. Rabbit anti-LTp polyclonal IgG (1 mg/ml) and goat anti-mouse IgG antibody (1 mg/ml) were applied to the membrane as test (T) and control (C) lines, respectively. Each mAb was used in the form of a gold colloid-conjugated antibody. One hundred and fifty microliters of purified LTp and LTh were loaded onto the test strips.

反応は見られなかった。また本テストストリップはLTh産生株であるH10407株の培養上清中のLThも検出できたことより、豚のみならずヒトのETEC感染症診断にも利用可能であると考えられた。

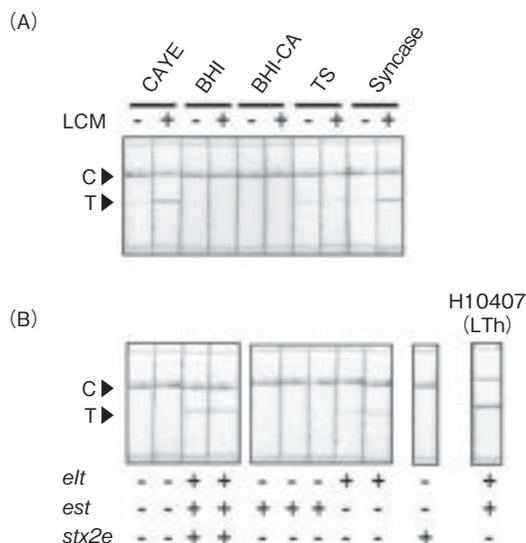
#### 3.4 コレラ毒素の検出の可否の検証

用いた金コロイド標識mAb57B9、画線したポリクローナルウサギIgGともにCTとの交差反応性が確認されていることから、作製したテストストリップのCTの検出の可否を検証した。**Fig. 5**

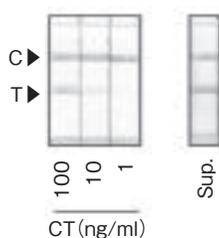
に結果を示す。ポリクローナル抗体の交差反応性がLTに比べると低下する事実にも関わらず、精製したCTに対してもLTと同じく10ng/mlまで検出可能であった。また、Syncase培地で培養した*V. cholerae* 569B株の培養上清中のCTも同様に検出できた。

#### 3.5 総括

本テストストリップに用いた抗体はLTpを免疫原として作製したものであるため、当初の目的は豚のETEC感染症の診断に特化した迅速診断法の



**Fig. 4** Immunochromatographic detection of LT in the culture supernatant of *E. coli* strains. (A) Effect of culture media with or without lincomycin (LCM) on the production of LT in the *elt*-positive strain. (B) Detection of LT in various genotypes of *E. coli* strains cultured in CAYE broth containing lincomycin. Rabbit anti-LTP polyclonal IgG (1 mg/ml) and goat anti-mouse IgG antibody (1 mg/ml) were applied to the membrane as the test (T) and control (C) lines, respectively. mAb 57B9 was used in the form of a gold colloid-conjugated antibody. One hundred and fifty microliters of culture supernatant of various genotypes of clinical isolates from swine were loaded onto the test strips. Culture supernatant of H10407 was used as an LTh-producing strain. The toxin gene profile of each strain is shown under the panel.



**Fig. 5** Immunochromatographic cross-detection of CT. Rabbit anti-LTP polyclonal IgG (1 mg/ml) and goat anti-mouse IgG antibody (1 mg/ml) were applied to the membrane as the test (T) and control (C) lines, respectively. Cross-reactive mAb 57B9 was used as in the form of a gold colloid-conjugated antibody. One hundred and fifty microliters of purified CT were loaded onto the test strips. "Sup." indicates the result of CT detection in the culture supernatant of *V. cholerae* strain 569B in syncase broth (without lincomycin).

開発であった。しかしながら、今回作製したテストストリップはヒトのEPEC感染症、コレラ菌感染症の診断にも拡大して利用できるものであると考えられた。これを実現できたのは金コロイド標識抗体として用いた抗体 (57B9) のLThおよびCTに対する同感度の交差反応性によると思われる。

血清レベルでもLTとCTが交差することは知られているが、今回のウサギポリクローナルIgGの結果でも明らかのように、その反応性の強さは免疫抗原との抗原性の類似度に相関するため、通常は同等の感度は期待できない。そのポリクローナル抗体の検出力の差異をmAb57B9が補い、本

テストストリップにおける同等の検出感度をもたらしていると考えられた。豚の大腸菌感染症にはLTやSTが関与する下痢症と、Stx2eが引き起こす浮腫病があり、その分離菌株の遺伝子プロファイルはFig. 4に示すように多岐にわたる。作製したテストストリップはこれらの他の病原因子への交差反応性や非特異反応を示さなかったことより、豚大腸菌感染症の正確な迅速診断に利用できる可能性がある。また、感染症診断のみならず、食肉におけるETECの汚染状況のチェッカーとしても利用できる可能性がある。

なお、本研究の成果はJournal of Microbiological Methods誌にアクセプトされ、掲載された<sup>6)</sup>。

#### 4. 要 約

毒素原性大腸菌 (ETEC) の下痢因子である易熱性下痢毒素 (LT) に対するmAbを作製し、ウサギポリクローナル抗体と組み合わせて、迅速に豚由来菌中のLT (LTp) を検出するイムノクロマトグラフィーのテストストリップを作製した。5種類のmAbから選別したBサブユニット特異抗体57B9は、ヒト由来ETEC中のLT (LTh) にも、コレラ菌が産生するCTにも同感度の交差反応を認めた。これらを使用したテストストリップは10ng/mlの感度でLTp, LTh, CTを検出し、野生株のETECやコレラ菌の培養上清中のそれぞれ

の毒素を検出することができたことから、豚のみならずヒトのETEC感染症やコレラ感染症の迅速診断に利用できると思われる。

#### 文 献

- 1) Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Ochi, S., Sasaki, K., Kato, M., Taniguchi, K., Oguma, K., Tsuji, T.: Lincomycin-induced over-expression of mature recombinant cholera toxin B subunit and the holotoxin in *Escherichia coli*, *Protein Expr Purif*, **67**, 96~103, 2009.
- 2) Tsuji, T., Kato, M., Kato, Y., Kawase, H., Imamura, S., Miyama, A.: Construction of plasmids useful for production of the B subunit of cholera toxin from *Vibrio cholerae* or a heat-labile enterotoxin from enterotoxigenic *Escherichia coli*, *Eur J Epidemiol*, **10**, 393~398, 1994.
- 3) Tsuji, T., Yokochi, T., Kamiya, H., Kawamoto, Y., Miyama, A., Asano, Y.: Relationship between a low toxicity of the mutant A subunit of enterotoxigenic *Escherichia coli* enterotoxin and its strong adjuvant action, *Immunology*, **90**, 176~182, 1997.
- 4) Arimitsu, H., Sasaki, K., Tsuji, T.: Development of a simple and rapid diagnosis method for swine edema disease to specifically detect Stx2e protein by immunochromatographic test, *Microbiol Immunol*, **60**, 334~342, 2016.
- 5) Arimitsu, H., Sasaki, K., Iba, Y., Kurosawa, Y., Shimizu, T., Tsuji, T.: Isolation of B subunit-specific monoclonal antibody clones that strongly neutralize the toxicity of Shiga toxin 2, *Microbiol Immunol*, **59**, 71~81, 2015.
- 6) Arimitsu, H., Sasaki, K., Tsuji, T.: Immunochromatographic detection of the heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cross-detection of cholera toxin, *J Microbiol Methods*, **132**, 148~152, 2017.

# わが国の家畜におけるD型インフルエンザウイルス感染の実態調査

Surveillance on influenza D virus infection in livestock in Japan

堀本 泰介・村上 晋

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Taisuke Horimoto and Shin Murakami

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

Influenza (flu) D virus was first isolated as a flu C-like virus from pigs with respiratory illness in the US in 2011, epidemiological analyses suggested that cattle are the major reservoirs of this virus and that the virus is potentially involved in the bovine respiratory disease complex. Flu D viruses were also detected in China, France, Italy, and Mexico, suggesting their wide global geographic distribution. Here, we report bovine flu D virus infection in Japan and the isolation and characterization of a Japanese strain. We conducted a serological survey with an HI test for flu D virus, using archived bovine serum samples collected from several herds of beef or dairy cattle nationwide. Nasal swab samples of cattle exhibiting respiratory symptoms were screened for viral RNA with real-time RT-PCR. Full-genome sequences of positive samples were phylogenetically analyzed. For virus isolation, nasal swab samples were inoculated onto HRT-18G and ST cells, followed by CPE. We found sero-positive cattle in all prefectural regions tested with a total positivity rate of 30.5%. The flu D genome sequence was detected in a nasal swab sample from a diseased cow. One isolate was successfully obtained from an RT-PCR-positive sample. Full-genome sequences showed high similarity among Japanese strains, which form independent clusters from isolates of other countries. In conclusion, bovine flu D viruses have circulated country-wide in Japan. Horizontal transmission of the viruses might occur readily within a herd. The virus is possibly related to mild respiratory illness in cattle. The phylogenetic analysis indicates the independent evolution of flu D viruses in Japan.

## 1. 目 的

2011年、米国オクラホマ州の牧場で飼育されていた呼吸器疾患のある豚から、新しいインフルエンザウイルスが分離された<sup>1)</sup>。遺伝子・抗原解析によりこのウイルスは既知のインフルエンザウイルス(A～C型)とは異なる性質を示し、D型イ

ンフルエンザウイルスと分類された<sup>2)</sup>。米国におけるその後の調査により、D型インフルエンザウイルスは、本来は牛の病原体であり、畜産衛生上の最重要疾患である牛呼吸器病症候群(BRDC)の患畜から高頻度でウイルス遺伝子が検出されることから、BRDCの原因ウイルスの一つである可能性が示されている。実際、牛への感染実験によ

り単独で呼吸器疾患を引き起こすことが示された(2016年)<sup>3)</sup>。また、米国以外でも、フランス(2015年)<sup>4)</sup>、中国(2015年)<sup>5)</sup>、イタリア(2015年)<sup>6)</sup>において呼吸器疾患の牛や豚からこのウイルスが検出されていることから、すでに世界規模で侵淫していると考えられる。一方、米国ではD型インフルエンザウイルスに対する特異抗体がヒツジやヤギでも見つかっており、家畜全般に対する考慮すべき病原体である可能性が高い<sup>7)</sup>。

本研究では、わが国の牛や豚などの家畜におけるD型インフルエンザウイルス感染の実態調査を実施し、その呼吸器病との関連性や、日本に存在するD型インフルエンザウイルスの生物性状を明らかにすることを目的とする。

## 2. 方 法

D型インフルエンザウイルス抗体調査を、北海道、岩手、東京、岐阜、大阪、宮崎、鹿児島農場で飼育されている牛の血清(血漿)を用い(2011—2016年に採血)、米国D/OK株<sup>8)</sup>(農林水産省の許可を得てカンザス大Hause博士より分与)を抗原として七面鳥赤血球を用いた赤血球凝集抑制HI試験を常法により行った。特異的な反応と判断されるHI価40倍以上を陽性とした。

茨城県の乳牛および山形県のBRDCを発症した肉牛から呼吸器(鼻腔)スワブを採取し、株間の

共通性が高いと推測されるウイルスPB1遺伝子特異的なりアルタイムRT-PCR法によりウイルス遺伝子陽性検体を検索した。さらに、陽性検体に関しては、検体を培養細胞に接種しウイルス分離を試みた。初めてD型インフルエンザウイルスを分離したHause博士らの方法<sup>1)</sup>に従い、検体は抗生物質処理した後、ヒト結腸腺癌HRT-18G細胞に接種し、その上清を豚精巢ST細胞で盲継代するという方法により、CPEおよび上清の赤血球凝集HA活性が観察できるまでトリプシン存在下で継代した。

分離ウイルスの各RNA分節をRT-PCR法で増幅し、全長ウイルスゲノム塩基配列を決定し、外国株のデータベース配列と共に最尤法により進化系統樹解析を行った。

## 3. 結果と考察

調査したすべての都道府県の牛で陽性が認められた(各陽性率は14～50%)。全国陽性率は30.5%を示した(Table 1)。陽性率は牛の年齢が上がるにつれて高くなっていった。5歳以上の高齢牛では半分近くの個体が抗体陽性を示した。したがって、わが国の牛社会にはD型インフルエンザウイルスが広く侵淫していることが明らかになった。乳牛(ホルスタイン)と肉牛(黒毛和種)間で陽性率に有意な差はなかった。また、

Table 1 Serological survey for influenza D virus infection in Japanese cattle

地域	牛種	検体数	陽性数	陽性率
北海道	ホルスタイン	199	56	28.1
岩手	黒毛和種	50	10	20.0
東京	ホルスタイン	66	30	45.5
岐阜	ホルスタイン	37	5	13.5
大阪	ホルスタイン	24	7	29.2
宮崎	黒毛和種	879	272	30.9
鹿児島	黒毛和種	12	6	50.0
合計		1267	386	30.5

2010年に採材した検体からも陽性が検出されたことより、ウイルスはそれ以前に日本に侵入していた可能性が示された。

宮崎県の検体における調査結果から、陽性率の高い農場と低い（もしくは0%）農場が明瞭に区別された。この違いは牧場の地域性によるものではなかった。したがって、ウイルスの農場内における水平伝播性は極めて高いと推測される。

茨城県の乳牛2頭および山形県の肉牛1頭からウイルス遺伝子RT-PCR陽性検体が得られた。これらの全ゲノム配列はウイルス間で非常に同一性が高く（99%以上）、D型インフルエンザウイルスのゲノムは他の型のインフルエンザウイルスに比べ、比較的安定であると考えられた。系統樹解析の結果、日本分離株は他国分離株とは異なるクラスターを形成していることが分かったが、M分節のみはフランスおよび中国株と同じクラスターに属していた（Fig. 1）。日本株と他の外国分離株との進化系統学的な違いは、外国株が最近導入されたのではなく、日本のD型インフルエンザウイルスが独自の進化をとげたことを示している。つまり、日本にはかなり以前からD型インフルエンザウイルスが牛社会に存在していたことを示唆している。

山形県のRT-PCR陽性検体から、D型インフルエンザウイルスの分離に成功した。初めての日本株の分離である。分離ウイルスのゲノム全塩基配列は検体中のRT-PCR増幅産物の全塩基配列と同一であることから、その正当性が証明された。日本株の独立した遺伝学的クラスターから、日本株はウイルス学的にも外国株と異なった特性を有していることが推測される。例えば、ウイルスの中和活性に関与するウイルスエンベロープHEFタンパク質の抗原性が日本株と外国株とで相違するのであれば、D型インフルエンザに対するワクチンは、日本株をベースに開発する必要がある。現

在、日本株のウイルスの性状をさらに解析している。

今回の調査では、わが国のBRDC牛にD型インフルエンザウイルスが検出されることが明らかになったものの、果たしてD型インフルエンザウイルスがBEDCの主要な原因であるかどうかの判断までには至っていない。しかし、最近の海外でのメタゲノム解析では、BRDC牛からこれまでBRDCの原因とされる他の既知の病原体（牛RSウイルス、牛パラインフルエンザウイルス3、牛ヘルペスウイルス1など）より極めて高頻度でD型インフルエンザウイルスが検出されることが示されている<sup>9, 10)</sup>。したがって、今回の成果は、現在までその効果的な制御法が見つかっていないわが国のBRDCの発生を予防する（軽減する）ためのブレイクスルーとして、D型インフルエンザウイルスに対するワクチン開発や抗ウイルス薬の開発などの必要性を検討するための礎になると考えられる。

#### 4. 要 約

D型インフルエンザウイルスは、2011年米国の呼吸器症状のある豚から初めて分離された。その後、牛が主要なレゼルボアであり、牛の呼吸器病症状候群（BRDC）の病原体であることが示唆された。また、D型インフルエンザウイルスは、中国、フランス、イタリアでも見つかり、地球規模で感染が広がっていると推測された。本研究では、日本におけるD型インフルエンザウイルスの感染実態を調査した。HI試験を用いた血清調査では、調べたすべての都道府県の牛検体（ホルスタイン、黒毛和種）で陽性が見つかった（陽性率30.5%）。一方、RT-PCRによりウイルス遺伝子が陽性であったBRDC牛の鼻腔スワブ検体からウイルス分離を試みたところ、初めて日本株の分離に成功した。分離ウイルスゲノムの系統樹解析か

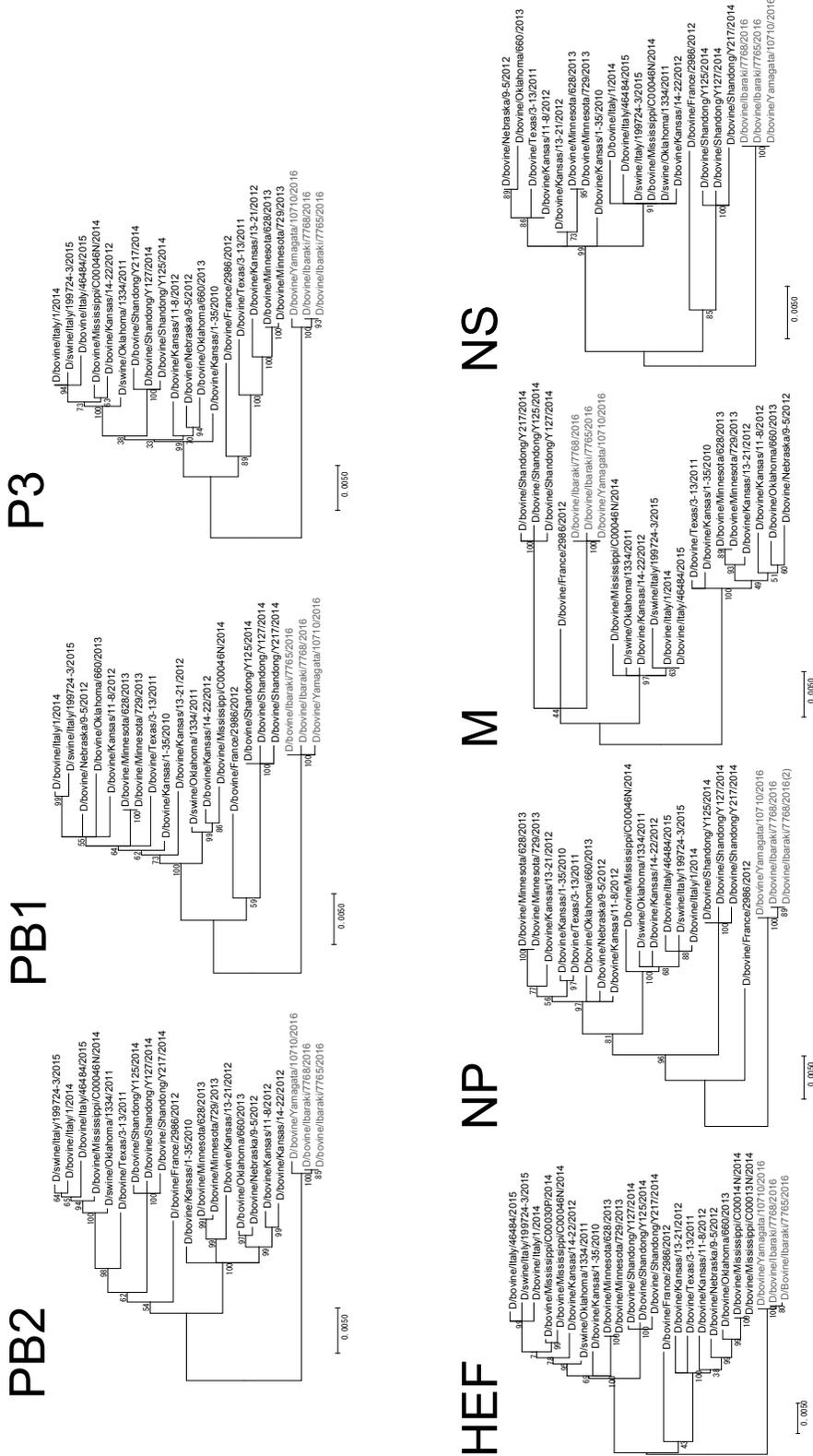


Fig. 1 Phylogenetic trees of the 7 segments of influenza D virus isolates at the nucleotide level. Japanese viruses are shown as red color.

ら、日本株は外国株とは異なるクラスターを形成することが示された。これらの成績から、牛のD型インフルエンザウイルスはわが国に広く存在しBRDCに関与する可能性があること、ウイルスは日本で独自に進化してきたことが明らかとなった。

#### 文 献

- 1) Hause, B. M., Ducatez, M., Collin, E. A., Ran, Z., Liu, R., Sheng, Z., *et al.* : *PLoS Pathog.* 9: e1003176, 2013.
- 2) Hause, B. M., Collin, E. A., Liu, R., Huang, B., Sheng, Z., Lu, W., *et al.* : *MBio*, 5: e00031-14, 2014.
- 3) Ferguson, L., Olivier, A. K., Genova, S., Epperson, W.B., Smith, D. R., Schneider, L., *et al.* : *J Virol.* 90, 5636~5642, 2016.
- 4) Ducatez, M. F., Pelletier, C., Meyer, G. : *Emerg Infect Dis.* 21, 368~371, 2015.
- 5) Jiang, W. M., Wang, S. C., Peng, C., Yu, J. M., Zhuang, Q. Y., Hou, G. Y., *et al.* : *Virus Genes.* 49, 493~496, 2014.
- 6) Chiapponi, C., Faccini, S., De Mattia, A., Baioni, L., Barbieri, I., Rosignoli, C., *et al.* : *Emerg Infect Dis.* 22, 352~354, 2016.
- 7) Quast, M., Sreenivasan, C., Sexton, G., Nedland, H., Singrey, A., Fawcett, L., *et al.* : *Vet Microbiol.* 180, 281~285, 2015.
- 8) Collin, E. A., Sheng, Z., Lang, Y., Ma, W., Hause, B. M., Li, F. : *J Virol.* 89, 1036~1042, 2015.
- 9) Mitra, N., Cernicchiaro, N., Torres, S., Li, F., Hause, B. M. : *J Gen Virol.* 97, 1771~1784, 2016.
- 10) Ng, T. F. F., Kondov, N. O., Deng, X., Van Enennaam, A., Neibergs, H. L., Delwart, E. : *J Virol.* 89, 5340~5349, 2015.

# 牛由来黄色ブドウ球菌の増殖阻止を可能にする 牛ポリクローナル抗体の特性解析

Characterization of bovine polyclonal antibodies that are capable of inhibiting  
the growth of *Staphylococcus aureus* isolated from cows

野地 智法・米山 裕

(東北大学大学院農学研究科)

Tomonori Nochi and Hiroshi Yoneyama

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is a pathogen that causes various infectious diseases in not only humans but also animals. A few vaccines for livestock are currently available and they are expected to induce production of *S. aureus*-specific antibodies that prevent bacterial adherence to host cells or promote opsonization by phagocytes. However, despite the widespread use of such vaccines, economic losses related to *S. aureus* infections have not been reduced. Therefore, further researches focused on seeking an additional mechanism of action of *S. aureus* vaccine is required to increase the efficacy of current vaccines. In this study, we generated *S. aureus*-specific bovine IgG antibodies (anti-*S. aureus*) and demonstrated that anti-*S. aureus* directly inhibited bacterial growth *in vitro* in the absence of complement and phagocytes. A further *in vitro* culture study using a laboratory strain of *S. aureus* JE2 and its deletion mutant JE2 $\Delta$ SrtA, which lacks the gene encoding sortase A, revealed that the effect of anti-*S. aureus* to inhibit the bacterial growth was in a sortase-A-independent manner. Sortase A is involved in the synthesis of cell-wall-associated proteins. Thus, other surface molecules, such as membrane proteins, cell surface polysaccharides, or both, may trigger the inhibition of bacterial growth by anti-*S. aureus*. Together, our findings contribute insights into developing new strategies to further improve the available vaccine by designing a novel antigen on the surface of *S. aureus* to inhibit bacterial growth *in vivo*.

## 1. 目 的

家畜の生産現場を含む環境中に広く存在する黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、食中毒などの感染症の原因菌として広く知られている。ヒトを対象とした黄色ブドウ球菌に関する微生物学および分子生物学的研究を通して、黄色ブドウ球菌の病原性に関する分子が多数特定さ

れ、それらを抗原としたワクチン開発を目指した研究がこれまで数多く行われてきた。しかしながら、黄色ブドウ球菌に対する効果的なワクチンはいまだ開発されておらず、さらなる研究が必要とされている。また、家畜用の黄色ブドウ球菌ワクチン開発を目的とした研究は、医学領域でのそれと比べ著しく遅れており、その進展は、安心安全な食肉生産を可能にするためにも非常に重要であ

る。本研究では、肉牛を含む家畜生産現場における黄色ブドウ球菌を原因とする疾病制御を可能とする、新たな予防・治療戦略を構築することを最終目標とし、現在使用されている黄色ブドウ球菌に対するワクチンの作用機序を明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 供試菌

本研究では供試菌として *Staphylococcus aureus* (BM1006<sup>1</sup>, SA003<sup>2</sup>) および JE2<sup>3</sup>, JE 2 由来のトランスポゾンミュータント JE2ΔSrtA<sup>4</sup>), *Staphylococcus epidermidis*, ATCC14990<sup>5</sup>), *Bacillus atrophaeus* (ATCC9372)<sup>6</sup>), *Escherichia coli* (JM109)<sup>7</sup>) を用いた。

### 2.2 抗体精製

ホルスタイン牛 (5 ヶ月齢, 雄) に, ホルマリン処理した黄色ブドウ球菌 (BM1006,  $1.5 \times 10^{10}$ CFU, 以後, *S. aureus*) をアジュバントである TiterMax<sup>®</sup>Gold (TiterMax) とともに, 2 週間間隔で 3 回免疫 (皮下接種) した。最終免疫から 1 週間後に抗血清を回収し, Protein G Sepharose 4 Fast Flow (GE healthcare) を用いて免疫グロブリン G (IgG) を精製した。

### 2.3 ELISA

作製した牛 IgG の質量および *S. aureus* に対する特異性を解析するために, 精製 IgG を ELISA 解析に供した。抗 *S. aureus* 抗体の含量を測定する試験では 96 ウェルプレート (Nunc) に  $2 \mu\text{g/ml}$  の精製 ヒツジ 抗牛 IgG 重鎖抗体 (Bethyl) を固相し, また, 特異性を確認する試験では, ホルマリン処理した *S. aureus* (BM1006, SA003, JE2, JE2ΔSrtA), *S. epidermidis* (ATCC14990), *B. atrophaeus* (ATCC9372), *E. coli* (JM109) を  $5 \mu\text{g/ml}$  に調整し, 一晩  $4^\circ\text{C}$  で固相した。翌日, トリス緩衝化生理食塩水で希釈した  $0.05\%$  (v/v)

の Tween-20 を用い, 室温で 1 時間ブロッキングした後, 抗血清より作製した牛 IgG (抗 *S. aureus* 抗体) または市販の牛 IgG (Sigma, コントロール IgG と表記) を 2 倍ごとに段階希釈し, 室温で 2 時間反応させた。洗浄後, HRP 標識ヒツジ抗牛 IgG 重鎖抗体 (Bethyl, 1 : 10,000 希釈) を室温で 1 時間処理し, 最後に TMB microwell peroxidase substrate system (KPL) で発色させた。

### 2.4 Flow cytometry

作製した抗 *S. aureus* 抗体とコントロール IgG をそれぞれ FITC (Sigma) で標識し,  $1000 \mu\text{g/ml}$  に調整し, 2,3 の供試菌とともに  $4^\circ\text{C}$  で 30 分間反応させた。また, 未処理の供試菌も対照群として調製した。洗浄後のサンプルは, BD Accuri C6 Flow Cytometer (BD Bioscience) を用いて測定し, 得られたデータを FlowJo (Digital Biology) を用いて分析した。

### 2.5 SDS-PAGE および Western-blot 解析

供試菌を SDS サンプルバッファー ( $62.5 \mu\text{M}$  の Tris-HCl (pH6.8),  $2\%$  (w/v) SDS,  $10\%$  (v/v) グリセロール,  $5\%$  (v/v) 2-メルカプトエタノール,  $0.02\%$  (w/v) プロモフェノールブルーを含む) で溶解し, タンパク質を抽出した。その後, 抽出物を 5–20% の ePAGEL ポリアクリルアミドゲル (ATTO) を用いた SDS-PAGE 解析に供した。電気泳動後, ゲルを SimplyBlue SafeStain (Invitrogen) で染色し, または一部のゲルは Immobilon-P membrane (Millipore) に転写し, Western-blot 解析に供した。転写後のメンブレンは, Tris 緩衝液で希釈した  $0.05\%$  (v/v) Tween-20 を用いて  $4^\circ\text{C}$  で一晩ブロッキングした後,  $10 \mu\text{g/ml}$  に調整した抗 *S. aureus* 抗体もしくはコントロール IgG を, それぞれ室温で 1 時間処理した。洗浄後のメンブレンは, 10,000 倍希釈した HRP 標識ヒツジ抗牛 IgG 重鎖抗体 (Bethyl) を用いて室温で 1 時間処理した後, EzWestLumi plus

(ATTO) を用いて抗*S. aureus*抗体に特異的なバンドを検出した。

### 2.6 *in vitro*の増殖阻害試験

*S. aureus* (BM1006, SA003, JE 2 および JE2  $\Delta$ rtA) および *E. coli* (JM109) を, Trypto-Soya (TS) 培地 (Nissui) で, 一晚37°Cで前培養した。新しいTS液体培地 (4 ml) に前培養した菌液を40  $\mu$ l 加え, 作製した抗*S. aureus*抗体 (10, 100 および 1000  $\mu$ g/ml) またはコントロールIgG (1000  $\mu$ g/ml) を添加した。培養開始0.5, 2, 5 および 24時間後の細菌数を, TS寒天培地上の細菌コロニーの数を測定することで計測した。また, 培養開始後0.5, 2, 5 および 24時間後に培地を回収し, 0.45  $\mu$ mのシリンジフィルター (Advantec) を用いて濾過することで, 素通り画分中に含まれる (培地中に残存する) 牛IgG含量と, *S. aureus* に対する特異性をELISA法で評価した。

### 2.7 統計

統計分析は, Kruskal-Wallis検定を用いたOne-way ANOVAおよびTukey多重検定を用いたtwo-way ANOVAをPrism 7 software (GraphPad) で行った。

## 3. 結果と考察

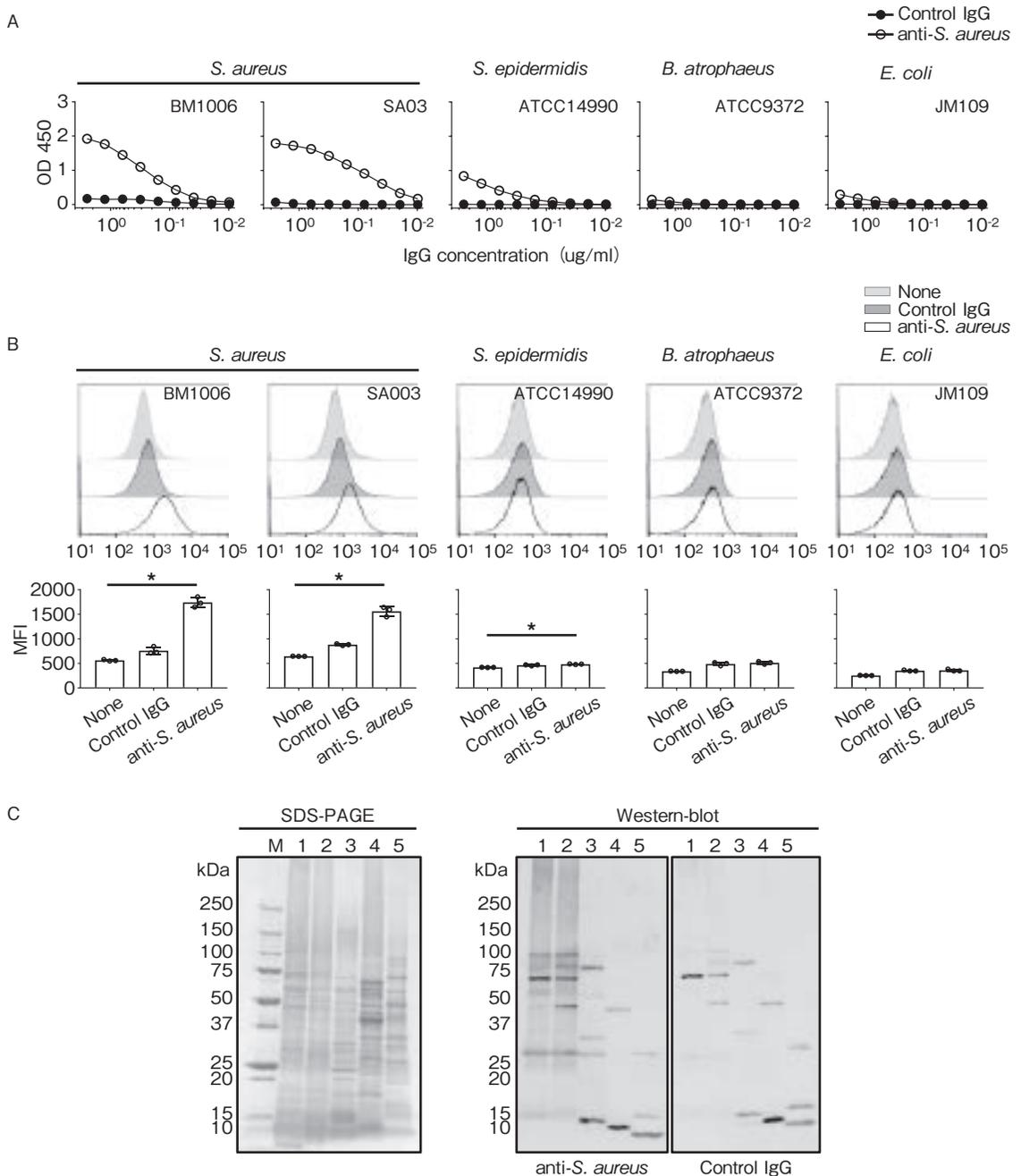
### 3.1 *S. aureus*特異的牛IgGの作製

ホルスタイン牛 (♂) に*S. aureus* (BM1006株, 死菌) を皮下接種し, その後に得られた抗血清より精製した牛IgGの特異性をFig.1Aに示した。市販のコントロールIgGと比較し, 免疫したホルスタイン牛から得られたIgG抗体は, 濃度依存的にBM1006株に反応することが確認された。また, 別株の黄色ブドウ球菌であるSA003に対しても, 作製した牛IgGは高い反応性を有していた。このことから作製した牛IgGは, *S. aureus*に共通する抗原に反応することが考えられた。*S. aureus* に対して反応することが確認されたため, 以後, 本

研究で作製した牛IgGを抗*S. aureus*抗体と表記する。興味深いことに, *S. aureus*と系統的に近い*S. epidermidis*に対しても, 抗*S. aureus*抗体による反応性が確認された。しかしながら, *S. aureus*と同じFirmicutes門に属し分類が科から異なる*B. atrophaeus*, またProteobacteria門に属する*E. coli*に対する抗*S. aureus*抗体の反応性はほとんど認められなかった。Flow cytometryの結果からも抗*S. aureus*抗体が, *S. aureus*に対して高い反応性を有し, また*S. epidermidis*に対してもわずかに反応すること, 一方で, *B. atrophaeus* および *E. coli*には反応性を示さないことが確認された (Fig. 1B)。これらの結果から, 抗*S. aureus*抗体は, *S. aureus*特有の, あるいは*S. aureus*と*S. epidermidis*が共通して有する抗原を認識していることが示唆された。また, Western-blot解析では, 抗*S. aureus*抗体およびコントロールIgGともに反応する自然抗体由来の反応が認められたが, 抗*S. aureus*抗体のみに反応する, *S. aureus*特有の様々な分子量からなる特異的な反応が存在することが明らかになった (Fig. 1C)。

### 3.2 *in vitro*での増殖阻害試験

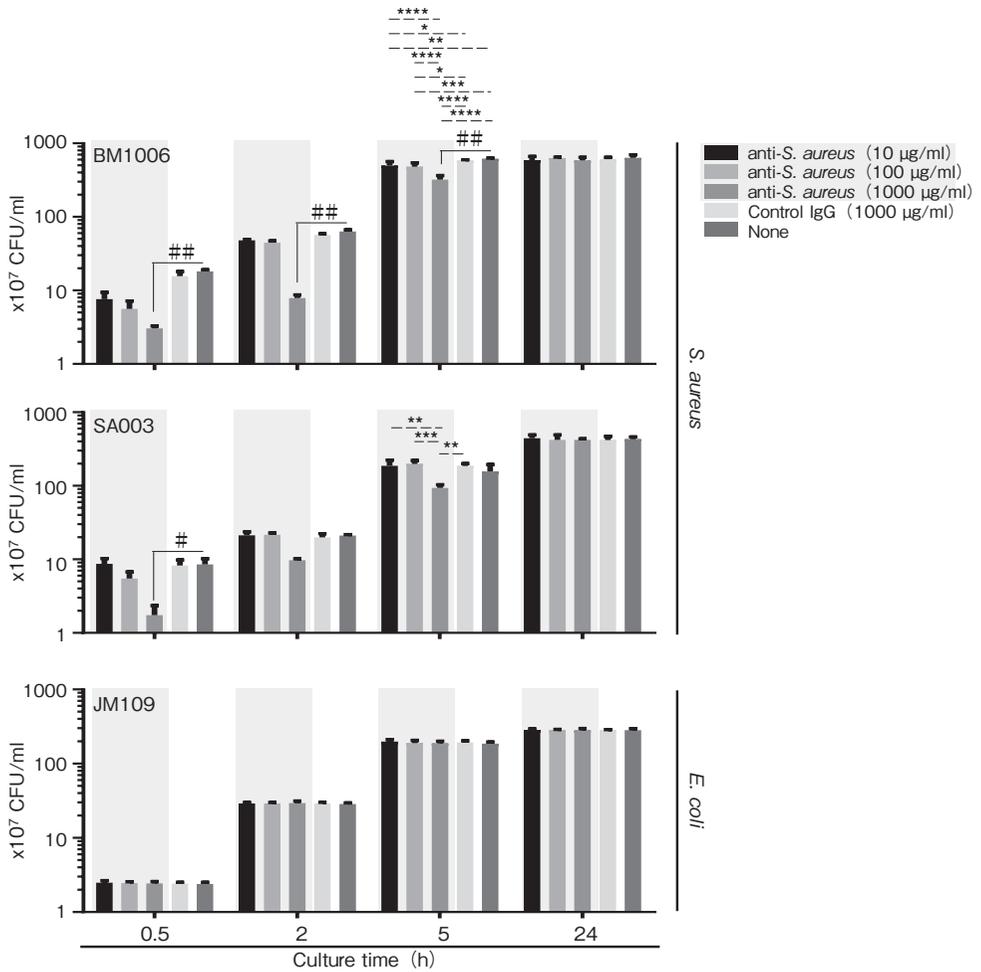
BM1006およびSA003の培養液中に抗*S. aureus*抗体もしくはコントロールIgGを添加した結果, 両株ともに, 抗*S. aureus*抗体を添加することで, 濃度依存的に増殖が阻害されることが確認された (Fig. 2A)。また, このような増殖阻害効果は, コントロールIgGを添加した場合にはまったく認められなかった (Fig. 2A)。一方で, 抗*S. aureus*抗体が反応性を示さなかった*E. coli*の培養液中に抗*S. aureus*抗体を添加しても, *E. coli*の増殖阻害効果はまったく認められなかった。これらの結果からは, 抗*S. aureus*抗体の有する*S. aureus*に対する特異的な反応が, *in vitro*での増殖阻害に必要な不可欠であることを示すものであった。しかしながら, *S. aureus*の菌数は, 抗*S. aureus*抗体



**Fig. 1** Generation of anti-*S. aureus*-specific bovine IgG antibodies.

*S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. atrophaeus*, and *E. coli* were used to confirm the specificity of anti-*S. aureus* generated by immunization of a Holstein dairy cow with killed *S. aureus*. (A) ELISA analyses showed that anti-*S. aureus* was highly reactive with two strains of *S. aureus* (BM1006 and SA003) and less reactive with *S. epidermidis*. In contrast, almost no reactivity was detected when anti-*S. aureus* was treated with *B. atrophaeus* and *E. coli*. (B) Flow cytometric analyses confirmed the results obtained by ELISA. (C) SDS-PAGE and western blot analyses revealed that anti-*S. aureus* reacted with *S. aureus*-specific molecules with a broad range of molecular masses. M: molecular marker, 1: *S. aureus* (BM1006), 2: *S. aureus* (SA003), 3: *S. epidermidis*, 4: *B. atrophaeus*, 5: *E. coli*. Three separate experiments were performed, and the data represent the mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). \* $p < 0.05$ .

A



B

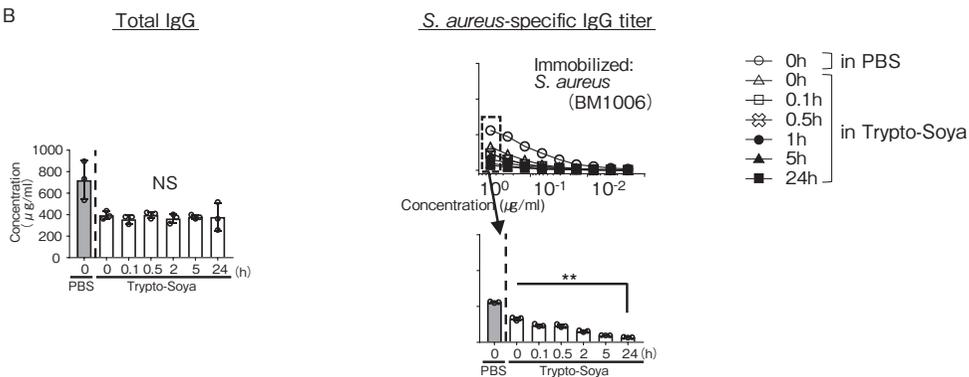


Fig. 2 Growth Inhibition of *S. aureus* in the presence of anti-*S. aureus*.

(A) Growth of *S. aureus* (BM1006 and SA003) was inhibited in the presence of anti-*S. aureus*, whereas the growth of *E. coli* (JM109) was not detectably inhibited. (B) The amount of uncoupled total IgG remained was constant in the culture broth during the overnight culture. In contrast, the titer of residual *S. aureus*-specific IgG was decreased during the culture. Three separate experiments were performed, and the data represent mean  $\pm$  SEM. The *p* values calculated using one-way or two-way factorial analyses of variance are #*p* < 0.05 and ##*p* < 0.01 or \**p* < 0.05 ; \*\**p* < 0.01 ; \*\*\**p* < 0.001; and \*\*\*\**p* < 0.0001, respectively.

の存在の有無に関わらず、一晚培養すると抗体を添加していない試験区と同程度にまで増加し、このことは、増殖阻害効果が培養中、持続されないことを意味していた。そのため、培養中の抗*S. aureus*抗体の濃度および特異性の変化を調べるための経時的な解析を行ったところ、培養液中に残存する牛IgG含量は培養時間を通して変化していないのに対し、*S. aureus*に特異的な牛IgGの力価は、培養中試験を通して経時的に減少しており、培養開始24時間後にはほとんど消失していることが明らかとなった (Fig. 2B)。これらの結果から、抗*S. aureus*抗体は多様な抗原を認識するポリクローナル抗体であり、*S. aureus*の増殖を直接的に阻害する生理活性を有していること、また、*in vitro*環境では、*S. aureus*に特異的に反応する抗体が枯渇することで、*S. aureus*は増殖を開始することが明らかになった。

### 3.3 抗*S. aureus*抗体による増殖阻害効果には *S. aureus*に特異的な分子が関与する

抗*S. aureus*抗体が*S. epidermidis*にもある程度の反応を示していたことから、*S. aureus*と*S. epidermidis*に共通して発現する分子を、あるいは*S. aureus*特異的な分子を抗*S. aureus*抗体が認識することが増殖阻害に必須であるか否かを明らかにすべく、*S. epidermidis*と結合した抗*S. aureus*抗体を遠心分離によって除去したうえで、増殖阻害試験を実施した。*In vitro*での増殖阻害試験の前に実施したELISA解析から、*S. epidermidis*による吸収処理を行った抗*S. aureus*抗体は、*S. epidermidis*に対する反応性をほとんど失っていること、また、黄色ブドウ球菌に対する反応性は、わずかに減少した程度であることが明らかになった (Fig. 3A)。その後、*in vitro*での増殖阻害試験を行った結果、無処理の抗*S. aureus*抗体と比較し、吸収処理を行った抗*S. aureus*抗体は、その生理活性は若干低下するもの

の、黄色ブドウ球菌の増殖を阻害する傾向が確認された (Fig. 3B)。これらの結果は、抗*S. aureus*抗体が認識する多数の抗原の中でも、特に増殖阻害に関わる*S. aureus*特異的な抗原が存在していることを示していた。*S. epidermidis*は、*S. aureus*の増殖を抑制していることも報告されており<sup>8)</sup>、そのことは、*S. aureus*特異的な抗原をワクチンとして用いることが、*S. aureus*が引き起こす感染症を予防するためには重要であることを示唆していた。

### 3.4 SortaseA依存的細胞壁結合タンパク質は、抗*S. aureus*抗体の増殖阻害作用には影響しない

*S. aureus*表層のペプチドグリカンに連結する細胞壁結合タンパク質は、*S. aureus*の病原性に関与していることから、*S. aureus*ワクチンの候補分子とした研究がこれまで広く行われてきた<sup>9)</sup>。そこで細胞壁結合タンパク質が、抗*S. aureus*抗体による増殖阻害に関与するか否かを調べるため、*S. aureus*の野生株であるJE2と、SortaseA遺伝子を欠くトランスポゾンミュタントであるJE2ΔSrtAを利用し、ELISAと*in vitro*での増殖阻害試験を行った。ELISAの結果から、抗*S. aureus*抗体の反応性はJE2とJE2ΔSrtAでほぼ同程度であることが確認された (Fig. 4A)。また、増殖阻害試験を行ったところ、多くの細胞壁結合タンパク質を欠損しているJE2ΔSrtAでも野生株のJE2と同程度の増殖阻害効果が見られた (Fig. 4B)。これらの結果から抗*S. aureus*抗体による増殖阻害効果は、細胞壁結合タンパク質が関与するのではなく、膜タンパク質などのその他の表層抗原が関与する可能性が示唆された。

## 4. 要 約

黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*) は、家畜の生産

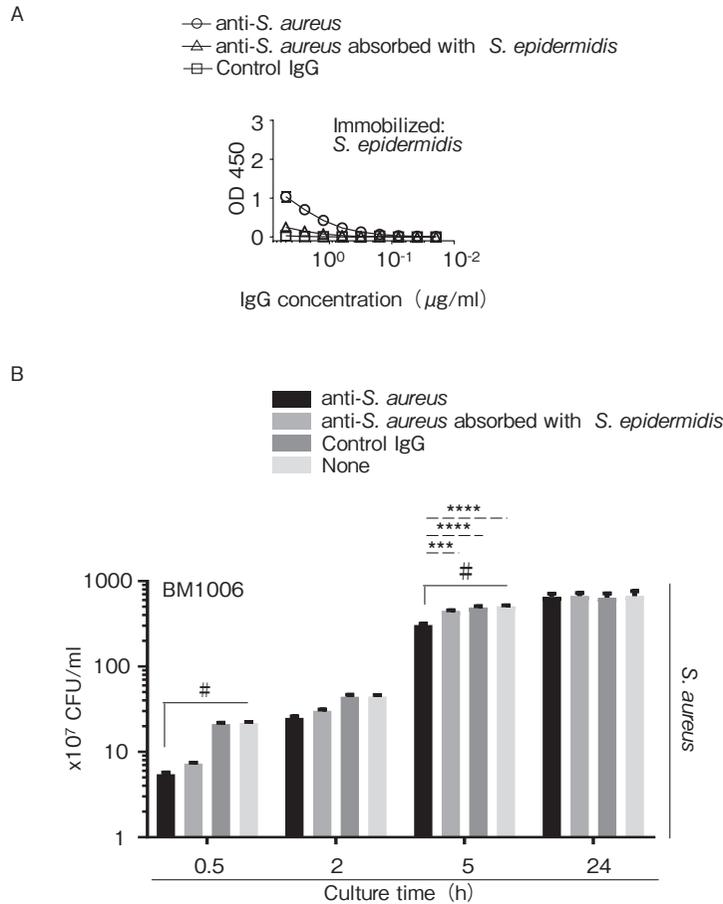


Fig. 3 Involvement of *S. aureus*-specific molecules in anti-*S. aureus*-induced growth inhibition.

ELISA analyses and *in vitro* bacterial culture studies confirmed the bacterial specificity of growth inhibition induced by anti-*S. aureus*. (A) After absorption of anti-*S. aureus* with *S. epidermidis*, the *S. aureus*-specific antibody titer was slightly decreased compared with that of the original anti-*S. aureus*. In contrast, little reactivity of anti-*S. aureus* with *S. epidermidis* was detected after absorption. (B) Anti-*S. aureus* absorbed with *S. epidermidis* did not inhibit the growth of *S. aureus*. Three separate experiments were performed, and the data represent the mean  $\pm$  SEM. The *p* values calculated using one-way or two-way factorial analyses of variance are #*p*<0.05 or \*\*\**p*<0.001 and \*\*\*\**p*<0.0001, respectively.

現場において様々な感染症を引き起こす病原体である。*S. aureus*による感染症を防ぐためのワクチンは牛でも利用可能であり、それらのワクチンの作用機序として、*S. aureus*の宿主細胞への細菌接着阻害や、オプソニン作用の亢進等があげられている。しかし、*S. aureus*ワクチンの普及にもかかわらず、家畜生産現場での*S. aureus*が引き起こす感染症は減少する傾向にない。したがっ

て、今日用いられているワクチンの有効性を高めるためには、現在行われているワクチンの評価方法とは別の、新たな観点からの研究に取り組むことが必要である。本研究では、*S. aureus*に対する特異的な抗体（抗*S. aureus*抗体）を作製し、抗*S. aureus*抗体が、補体や免疫細胞が存在しない条件であっても、*in vitro*での細菌増殖を直接阻害可能であることを明らかにした。また、*S.*

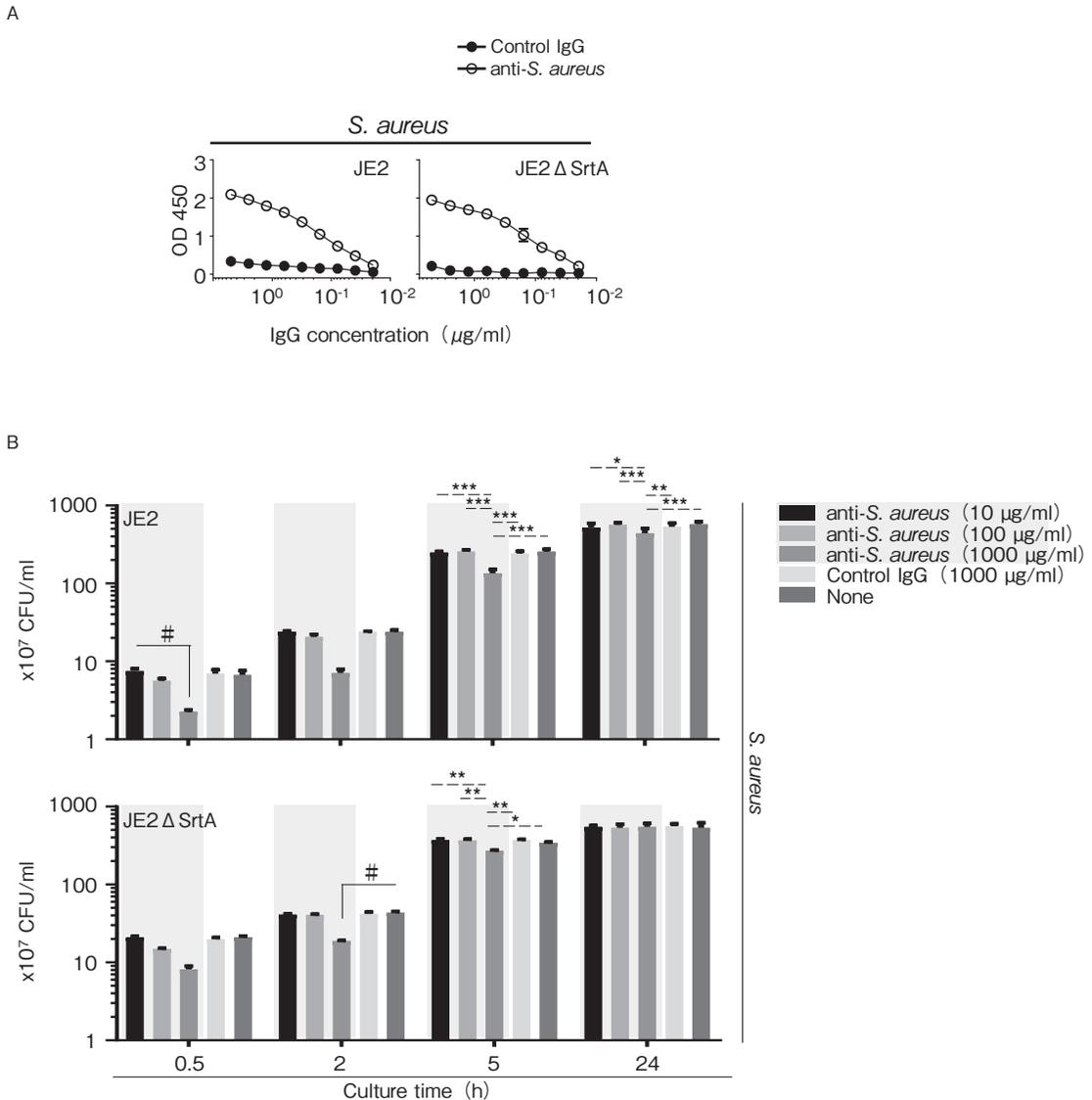


Fig. 4 Dispensable role of the sortase A-dependent cell-wall-associated proteins in anti-*S. aureus*-induced growth inhibition.

The involvement of antibody recognition of sortase-A-dependent cell wall-associated proteins in the growth inhibition of *S. aureus* was addressed using *S. aureus* strains JE2 and JE2 $\Delta$ SrtA. (A) ELISA analyses revealed that anti-*S. aureus* reacted equally with JE2 and JE2 $\Delta$ SrtA. (B) The growth of JE2 and JE2 $\Delta$ SrtA was delayed equally when they were cultured with anti-*S. aureus*. Three separate experiments were performed, and the data represent the mean  $\pm$  SEM. The *p* values calculated using one-way or two-way factorial analyses of variance are #*p*<0.05 or \**p*<0.05; \*\**p*<0.01 and \*\*\**p*<0.001, respectively.

*aureus*の病原性に関与する細胞壁結合タンパク質のペプチドグリカンへの連結に関与するプロテアーゼであるSortaseAに着目し、細胞壁結合タンパク質が抗*S. aureus*抗体による増殖阻害に関

与するか調べた結果、抗*S. aureus*抗体による増殖阻害効果はSortaseA非依存的であることが確認された。したがって抗*S. aureus*抗体はその他の表層抗原（膜タンパク質、細胞表面多糖類、ま

たはその両方など)に結合することにより増殖阻害を引き起こすことが示唆された。今後、トランスポゾンミュータントライブラリーを用いて、本研究で確認された増殖阻害に関与する分子を特定し、特定した抗原を利用することで、より効果の高い*S. aureus*に対するワクチンの開発が可能になると期待される。

#### 文 献

- 1) Kiku, Y., Nagasawa, Y., Tanabe, F., Sugawara, K., Watanabe, A., Hata, E., Ozawa, T., Nakajima, K. I., Arai, T., Hayashi, T.: The cell wall component lipoteichoic acid of *Staphylococcus aureus* induces chemokine gene expression in bovine mammary epithelial cells, *J Vet Med Sci*, **78**, 1505~1510, 2016.
- 2) Synnott, A. J., Kuang, Y., Kurimoto, M., Yamamichi, K., Iwano, H., Tanji, Y.: Isolation from sewage influent and characterization of novel *Staphylococcus aureus* bacteriophages with wide host ranges and potent lytic capabilities, *Appl Environ Microbiol*, **75**, 4483~4490, 2009.
- 3) McCarthy, H., Waters, E. M., Bose, J. L., Foster, S., Bayles, K. W., O'Neill, E., Fey, P. D., O'Gara, J. P.: The major autolysin is redundant for *Staphylococcus aureus* USA300 LAC JE2 virulence in a murine device-related infection model, *FEMS Microbiol Lett*, **363**: fnw087, 2016.
- 4) Fey, P. D., Endres, J. L., Yajjala, V. K., Widhelm, T. J., Boissy, R. J., Bose, J. L., Bayles, K. W.: A genetic resource for rapid and comprehensive phenotype screening of nonessential *Staphylococcus aureus* genes, *MBio*, **4**: e00537-00512, 2013.
- 5) Jones, D., Deibel, R. H., Niven, C. F. Jr.: Identity of *Staphylococcus epidermidis*, *J Bacteriol*, **85**, 62~67, 1963.
- 6) Fritze, D., Pukall, R.: Reclassification of bioindicator strains *Bacillus subtilis* DSM 675 and *Bacillus subtilis* DSM 2277 as *Bacillus atrophaeus*, *Int J Syst Evol Microbiol*, **51**, 35~37, 2001.
- 7) Phue, J. N., Shiloach, J.: Transcription levels of key metabolic genes are the cause for different glucose utilization pathways in *E. coli* B (BL21) and *E. coli* K (JM109), *J Biotechnol*, **109**, 21~30, 2004.
- 8) Iwase, T., Uehara, Y., Shinji, H., Tajima, A., Seo, H., Takada, K., Agata, T., Mizunoe, Y.: *Staphylococcus epidermidis* Esp inhibits *Staphylococcus aureus* biofilm formation and nasal colonization, *Nature*, **465**, 346~9, 2010.
- 9) Stranger-Jones, Y. K., Bae, T., Schneewind, O.: Vaccine assembly from surface proteins of *Staphylococcus aureus*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **103**, 16942~16947, 2006.

# 食肉により媒介されるトキソプラズマ原虫感染症 に対する新規血清診断法の確立

Establishment of new sero-diagnostic method against food-borne  
toxoplasmosis

玄 学南・高 洋・郭 煥平・Adjou Moumouni PF・  
白藤 梨可・菅沼 啓輔・相馬 武久\*

(帯広畜産大学原虫病研究センター, \*マルビー・ライフテック株式会社臨床検査部)

Xuenan Xuan, Yang Gao, Huanping Guo, Paul Franck Adjou Moumouni,  
Rika Umemiya-Shirafuji, Keisuke Sukanuma and Takehisa Soma\*

(National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,  
Veterinary Diagnostic Laboratory, \*Marupi Lifetech Co., Ltd. Ikeda, Osaka, Japan)

Two antigens (TgSRS2, TgGRA9) of *Toxoplasma gondii* were expressed in *Escherichia coli* as fusion proteins with glutathione S-transferase tags. Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISAs) using rTgSRS2 and rTgGRA9 were established, and the antibody responses in experimentally infected mice were detected by these two methods. The former (rTgSRS2-ELISA) could detect the specific antibodies in both acute and chronic stages, while the latter (rTgGRA9-ELISA) could detect the specific antibodies only in acute stage. To evaluate the usefulness of the ELISAs in the field, feline serum samples were used for detecting the specific antibodies and compared with commercialized latex agglutination test (LAT). rTgSRS2-ELISA and rTgGRA9-ELISA detected 31 (88.6%) and 19 (54.3%) samples as positive from 35 LAT-positive samples, respectively. These results suggested that rTgSRS2-ELISA could be useful to detect the infected animals in the field.

## 1. 目 的

トキソプラズマ原虫とは、猫科動物を終宿主とし、ヒトや他の動物を中間宿主とする病原体である。トキソプラズマ原虫感染症は世界的に広がっている重要な人獣共通感染症であり、豚・羊など産業動物のトキソプラズマ原虫感染症は日本では届出伝染病に指定されている。ヒトでは特に妊婦が初感染した場合、流・死産や新生児の水頭症・脈絡網膜炎などの先天性感染症を惹き起こす。ま

た、トキソプラズマ原虫性脳炎はエイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者の主要な死因の一つでもある。ヒトへの主な感染源として猫糞便中に排泄されるオーシストと感染動物の食肉とされる。したがって、トキソプラズマ原虫感染動物を的確に診断し、その対策をとることは公衆衛生上きわめて重要である。

トキソプラズマ原虫感染症に対する診断法は、血清診断法とDNA診断法に大別される。トキソプラズマ原虫は動物やヒトに一旦感染すると宿主

が生涯を終えるまで寄生するので、血清診断法により特異抗体が検出されれば、体内に原虫が寄生していると確定診断を下すことができる。現在、世界中でもっともよく使われている血清診断法として虫体凝集反応とラテックス凝集反応がある。日本では、長年栄研のラテックス凝集反応キット(商品名:猫・豚用「トキソチェック-MT」, ヒト用「トキソテスト-MT」)が動物(猫・豚)およびヒトの血清診断法として主流であった。しかし、これらの商品が2015年に製造中止となり、現場で混乱を招いている。

近年、我々の研究グループではトキソプラズマ原虫の抗原分子の特定と診断・予防法の開発に関する研究を精力的に行ってきた。これまでにトキソプラズマ原虫由来の組換え TgSAG1<sup>1)</sup>, TgSAG2<sup>2)</sup>, TgAMA1<sup>3)</sup>, TgGRA4<sup>4)</sup>, TgGRA7<sup>5)</sup>, TgROP2<sup>6)</sup> などを作製し、これらの組換えタンパク質を抗原とした酵素免疫測定法(ELISA法)やクロマトグラフィックテスト法(ICT法)はそれぞれマウス感染モデルや感染猫において特異抗体を検出可能であることを明らかにした。しかしながら、トキソプラズマ原虫は多くの抗原分子を保持し、より理想的な抗原分子の探索が望まれる。

そこで、本研究ではいままで解析されなかったトキソプラズマ原虫の2種類の抗原分子の特定と診断抗原としての有用性を検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 抗原分子TgSRS2とTgGRA9をコードする遺伝子のクローニングと発現

トキソプラズマRH株よりmRNAを抽出し、RT-PCR法によりTgSRS2の全長遺伝子(1,119bp, 372aa)とTgGRA9のC末端の膜貫通領域を除いた遺伝子断片(897bp, 298aa)を増幅した。PCR産物をそれぞれ大腸菌発現用ベクターpGEX-4T-1にクローニングし、グルタチオ

ンSトランスフェラーゼ(GST)融合タンパク質として大腸菌で発現した。大腸菌の可溶化分画からグルタチオンカラムを用いて組換えタンパク質rTgSRS2とrTgGRA9を精製した。

### 2.2 rTgSRS2とrTgGRA9に対する特異抗体の作製

精製したrTgSRS2とrTgGRA9をそれぞれフロインドアジュバントと混合し、ICRマウスに2週間間隔で3回ずつ免疫した後、特異抗体を採集した。得られた抗体を用いて虫体におけるTgSRS2とTgGRA9の分子局在を調べた。

### 2.3 ELISA法

陽性抗原としてrTgSRS2またはrTgGRA9を、陰性抗原としてrGSTをそれぞれ10mM炭酸緩衝液(pH9.6)で1 $\mu$ g/mlに調製し、50 $\mu$ l/ウェルで96穴ELISAプレート(Nunc, デンマーク)に分注した。4 $^{\circ}$ Cで一晩固相化後、抗体希釈液(3%スキムミルク加PBS液)を100 $\mu$ l/ウェルで分注し、37 $^{\circ}$ C 1時間反応させた。洗浄液(0.05% Tween-20加PBS液)でプレートを6回洗浄後、抗体希釈液で100倍希釈した被検血清を50 $\mu$ l/ウェル分注した。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、洗浄液でプレートを6回洗浄し、抗体希釈液で2000倍希釈したペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ネコIgG抗体(Bethyl, 米国)を50 $\mu$ l/ウェル分注した。37 $^{\circ}$ Cで1時間反応後、洗浄液でプレートを6回洗浄した。基質溶液(0.05% ABTSと0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>加クエン酸緩衝液)を100 $\mu$ l/ウェルに分注し、室温で1時間反応後、415nmの吸光度を測定し、それぞれの陽性抗原と陰性抗原の吸光度の差をELISA値とした。また、SPF猫血清30検体から求めた平均値+3 $\times$ 標準偏差をカットオフ値とした。

### 2.4 ラテックス凝集反応

ラテックス凝集反応キット(トキソチェック-MT, 栄研)により、被検血清中のトキソプラズマ抗体保有率を調べた。

2.5 マウスの実験感染

ICRマウス一匹あたりトキソプラズマPLK株1,000虫体ずつ腹腔内に接種し、1週間間隔で血清を採集し、トキソプラズマに対する抗体の検査に供した。

2.6 被検血清

マルピー・ライフテック株式会社臨床検査部に保有している猫血清をELISA法の評価に供した。

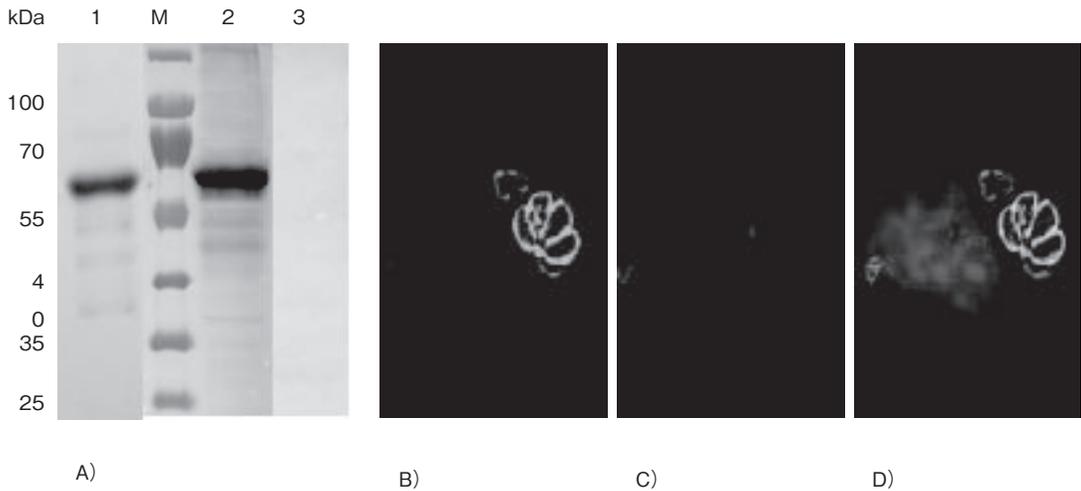


Fig. 1 Reactivity of recombinant antigen rTgSRS2 (A), and localization of its native protein (B-C).

A) Lane 1, purified rTgSRS2; line 2, rTgSRS2 reacted with *T. gondii*-infected mouse serum; line 3, rTgSRS2 reacted with SPF mouse serum; line M, molecular marker. B) *T. gondii* tachizoites reacted with anti-rTgSRS2 mouse serum (green fluorescence). C) *T. gondii* tachizoites reacted with anti-rTgSAG1 rabbit serum (red fluorescence). D) Merged form of panels B and C.

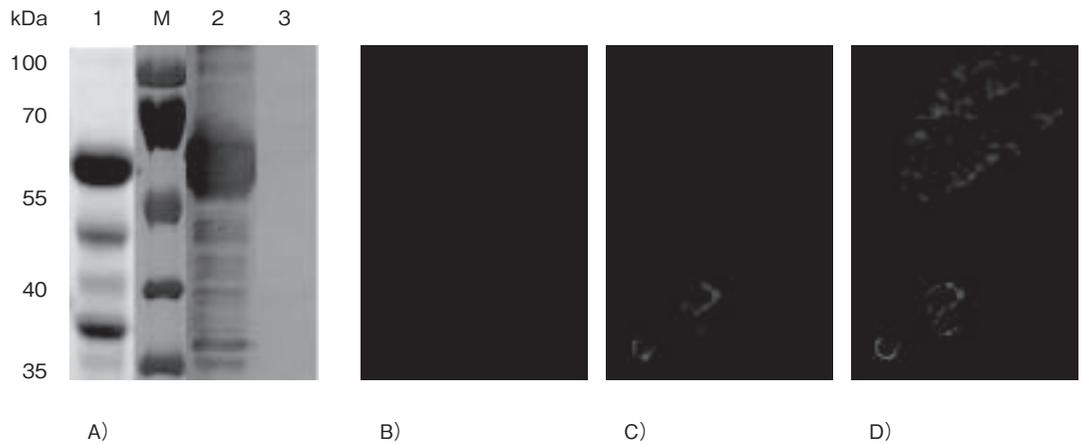


Fig. 2 Reactivity of recombinant antigen rTgGRA9 (A), and localization of its native protein (B-C).

A) Lane 1, purified rTgGRA9; line 2, rTgGRA9 reacted with *T. gondii*-infected mouse serum; line 3, rTgGRA9 reacted with SPF mouse serum; line M, molecular marker. B) *T. gondii* tachizoites reacted with anti-rTgGRA9 mouse serum (green fluorescence). C) *T. gondii* tachizoites reacted with anti-rTgSAG1 rabbit serum (red fluorescence). D) Merged form of panels B and C.

### 3. 結果と考察

TgSRS2とTgGRA9をクローニングし、組換えGST融合タンパク質として大腸菌で発現したところ、分子量はそれぞれ予想通りの66kDaと60kDaであった (Fig. 1, 2)。両組換え抗原 (rTgSRS2とrTgGRA9) は、トキソプラズマ実験感染マウス血清とは反応したが、SPFマウス血清とは反応しなかった (Fig. 1, 2)。両組換え抗原をマウスに免疫し、得られた特異抗体を用いて、虫体における分子局在を調べたところ、TgSRS2は細胞表面に、また、TgGRA9は細胞内小器官に局在していることが示唆された (Fig. 1, 2)。

rTgSRS2とrTgGRA9を抗原としたELISA法を確立し、実験感染マウスにおける抗体応答を調べた (Fig. 3)。感染後2週目に両抗原に対する抗体が上昇し始め、4週目には抗体価がピークに達した。その後、TgSRS2に対する抗体は、実験が終了する12週目まで慢性感染期においても高い抗体価を維持した。一方、TgGRA9に対する抗体は、5週目以降は下降し始め、慢性感染期には低値を示した。この結果より、rTgSRS2を抗原としたELISA法は、急性感染期と慢性感染期の両方の感染動物の検出に有効である可能性が示唆された。一方、rTgGRA9を抗原としたELISA法は、急性感染期の感染動物の検出のみに有効である可能性が示唆された。両組換え抗原を用いたELISA法の組み合わせにより、被検動物の感染時期の推定も可能かも知れない。

次に、終宿主である猫から採集した被検血清を用いて、両ELISA法の診断効果を市販のLAT診断キットと比較検討した (Fig. 4, 5)。rTgSRS2を抗原としたELISA法においては、LAT陽性血清35例中31例 (88.6%) が陽性と判定された。また、LAT陰性41例中10例 (24.4%) が陽性と判定

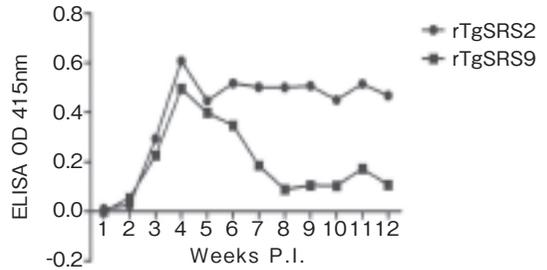


Fig. 3 Antibody responses to TgSRS2 and TgGRA9 in experimentally infected mice. Antibody titers were detected by the ELISAs using rTgSRS2 and rTgGRA9.

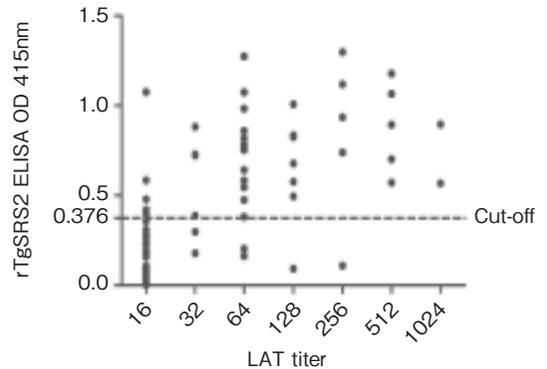


Fig. 4 Detection of specific antibodies to *T. gondii* in cats by ELISA using rTgSRS2 and LAT. The ELISA values over cut-off were judged as positive. The titers of LAT over 1: 64 were judged as positive.

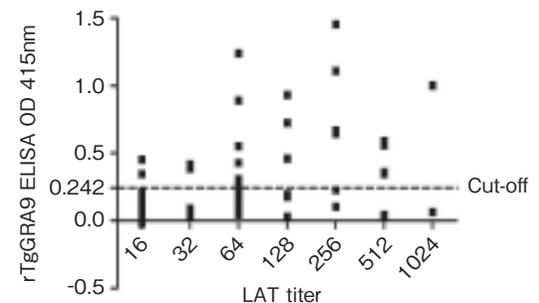


Fig. 5 Detection of specific antibodies to *T. gondii* in cats by ELISA using rTgGRA9 and LAT. The ELISA values over cut-off were judged as positive. The titers of LAT over 1: 64 were judged as positive.

された。一方、rTgGRA9を抗原としたELISA法においては、LAT陽性血清35例中19例（54.3%）が陽性と判定された。また、LAT陰性41例中5例（12.2%）が陽性と判定された。これらの結果より、rTgSRS2を抗原としたELISA法は、比較的に優れた診断効果があることが示唆された。今後、LATとの不一致例については、さらなる詳細な検討が必要である。

#### 4. 要 約

本研究では、これまでに解析されなかったトキソプラズマ原虫の2種類の抗原分子の特性解明と診断抗原としての有用性を検討した。TgSRS2とTgGRA9遺伝子を大腸菌発現用ベクターpGEX-4T-1にクローニングし、GST融合タンパク質として発現した。rTgSRS2とrTgGRA9を抗原としたELISA法を確立し、実験感染マウスにおける抗体応答を調べたところ、前者は急性感染期と慢性感染期の両方の感染動物の検出に有効であり、後者は急性感染期の感染動物の検出のみに有効である可能性が示唆された。次に、終宿主である猫から採集した被検血清を用いて、両ELISA法の診断効果を市販のLAT診断キットと比較検討したところ、LAT陽性血清35例中それぞれ31例（88.6%）と19例（54.3%）が陽性と判定された。これらの結果より、rTgSRS2を抗原としたELISA法は、比較的に優れた診断効果があることが示唆された。今後、LATとの不一致例につ

いては、さらなる詳細な検討が必要である。

#### 文 献

- 1) Kimbita, E. N., Xuan, X., Huang, X., Miyazawa, T., Fukumoto, S., Mishima, M., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Suzuki, N., Mikami, T., Igarashi, I. : Serodiagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats by enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant SAG1, *Vet Parasitol.*, **102**, 35~44, 2001.
- 2) Huang, X., Xuan, X., Kimbita, E. N., Battur, B., Miyazawa, T., Fukumoto, S., Mishima, M., Makala, L. H., Suzuki, H., Sugimoto, C., Nagasawa, H., Fujisaki, K., Mikami, T., Igarashi, I. : Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay with recombinant SAG2 for diagnosis of *Toxoplasma gondii* infection in cats, *J Parasitol.*, **88**, 804~807, 2002.
- 3) Zhang, H., Compaore, M., Lee, E. G., Liao, M., Zhang, G., Sugimoto, C., Nishikawa, Y., Xuan, X. : Apical membrane antigen 1 is a cross-reactive antigen between *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii*, and anti-NcAMA1 antibody inhibit host cell invasion by both parasites, *Mol Biochem Parasitol.*, **151**, 205~212, 2007.
- 4) Zhang, G., Huong, T., Battur, J., Zhou, J., Zhang, H., Liao, M., Kawase, O., Lee, E. G., Dautu, G., Igarashi, M., Nishikawa, Y., Xuan, X. : A heterologous prime-boost vaccination regime using DNA and a vaccinia virus, both expressing GRA4, induced protective immunity against *Toxoplasma gondii* infection in mice, *Parasitology*, **134**, 1339~1346, 2007.
- 5) Huang, P., Liao, M., Zhang, H., Lee, E. G., Nishikawa, Y., Xuan, X. : The dense granule protein NcGRA7, a new marker for the serodiagnosis of *Neospora* infection in aborting cows, *Clin. Vaccine Immunol.*, **14**, 1640~1643, 2007.
- 6) Mishima, M., Xuan, X., Yokoyama, N., Igarashi, I., Fujisaki, K., Nagasawa, H., Mikami, T. : Recombinant feline herpesvirus type 1 expressing *Toxoplasma gondii* ROP2 antigen inducible protective immunity in cats, *Parasitol Res.*, **88**, 144~149, 2002.

# ゲノム疫学的アプローチによる豚抗酸菌症の実態解明

Research on actual insights into transmission routes of *Mycobacterium avium* in pigs by genomic ecological approach

大屋 賢司・丸山 史人\*・岩本 朋忠\*\*・西内由紀子\*\*\*

(岐阜大学応用生物科学部, \*京都大学大学院医学研究科, \*\*神戸市環境保健研究所, \*\*\*大阪市立大学医学部)

Kenji Ohya, Fumito Maruyama\*, Tomotada Iwamoto\*\* and Yukiko Nishiuchi\*\*\*

(Department of Applied Biological Sciences, Gifu University, \*Graduate School of Medicine, Kyoto University, \*\*Kobe Institute of Health, \*\*\*Osaka City University Medical School)

Swine mycobacteriosis, caused by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH), represents chronic proliferative lymphadenitis in pigs. It doesn't display apparent symptom, but is usually found as miliary tubercles during inspection at a slaughterhouse. Detected tubercles should be discarded, leads economical loss, especially at farms where MAH is highly prevalent in pigs and surrounding environments. In this study, we attempted to isolate MAH from discarded lymph nodes of pigs, reared pigs and surrounding environment in Tokai area in Japan. Isolated MAH strains were applied to the SNPs analysis of *hsp65* gene, the variable number of tandem repeat (VNTR) analysis and whole genome sequencing. We succeeded in revealing a part of transmission route of MAH between pigs and surrounding environment by genomic epidemiological approach. Currently extensive genome analysis of isolated MAH strains is on-going.

## 1. 目 的

豚抗酸菌症は、非結核性抗酸菌群のうち、特に *Mycobacterium avium* subsp. *Hominissuis* (MAH) を原因とする、慢性増殖性のリンパ節炎である。通常、感染豚の臨床症状は認められず不顕性感染となり、食肉検査場での内臓検査にて粟状の結節性病変として発見される<sup>1)</sup>。本症による臓器の廃棄率は全国平均約1%である(平成9年度 全国食肉衛生検査協議会資料)。この廃棄による損害は1ヶ所あたり数百円であるが、全廃棄となった場合や、蔓延している生産者における経

済的損害は大きい。

MAHは、豚をはじめとした感染動物の糞便中に排泄され、それに汚染された土壌、水、おがくずなどが豚への感染源となることが知られている<sup>2)</sup>。そのため、豚抗酸菌症が蔓延した環境においては、豚や周りの環境におけるMAHの分布状況、豚への伝播経路を把握することにより、豚舎衛生環境の改善など本症の蔓延を防ぐための対策を講じることが可能となる。

MAHを分子疫学的に型別するための方法としては、*hsp65*遺伝子の一塩基多型(single nucleotide polymorphism: SNP)解析、多重反復数多型配列

(variable number of tandem repeat: VNTR) 解析がある<sup>3)</sup>。またこのような特定の遺伝子、領域を対象とした型別に加え、近年、全ゲノム上の違いを型別することも可能になってきた。本研究では、これら手法を組み合わせたゲノム疫学的アプローチにより、MAHの伝播経路、宿主や地域特性を明らかにすることを目的として研究を行った。

## 2. 方法

### 2.1 抗酸菌の分離

東海地方の食肉検査場で廃棄された豚内蔵（腸間膜リンパ節）および東海地方の養豚場で飼育されている豚の糞便、養豚場のおがくず、土壌を分離材料とした。腸間膜リンパ節は、20mgを400  $\mu$  lの2%NaOHとともに、卓上破砕機（シェイクマン3；バイオメディカルサイエンス）を用いて2,800rpm、30秒間処理し接種用乳剤とした。豚の糞便、おがくず、土壌は10倍量のPBSで懸濁した後、等量の2%NaOHを加え接種材料とした。いずれも室温で一晩放置し、100  $\mu$  lを2%小川PS培地（日水製薬株式会社）およびミジット分離培養剤（日本BD）に接種し37°Cで3週間から4週間培養した。生育したコロニーは、2%小川PS培地もしくはMiddlebrook 7H11寒天培地（日本BD）を用いて3回クローニングを行い供試菌株とした。

### 2.2 分離した抗酸菌の菌種・亜種同定

菌種の同定は遅発育性抗酸菌14菌種と豚抗酸菌症の原因菌*M. avium*、*M. intracellulare*の各16S rRNA領域の配列解析により行った<sup>4)</sup>。亜種に関しては、挿入配列（insertion sequence: IS）保有パターンによりまず検討した<sup>5)</sup>。その後、*hsp65*遺伝子3'側領域の塩基配列解析を行い、コード分類と亜種の決定を行った<sup>3)</sup>。

### 2.3 抗酸菌のゲノム疫学的解析

VNTR解析は、反復配列領域として

Mycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)-VNTRと*Mycobacterium avium* Tandem Repeats (MATR)-VNTRの計19領域の反復配列領域を対象とした<sup>3,5)</sup>。決定した塩基配列情報より Tandem Repeat Finder (<https://tandem.bu.edu/trf/trf.html>)を用いて、*M. avium* subsp. *hominissuis* MAH104株<sup>6)</sup>を標準株として反復配列、反復数を算出した。反復数が小数値となった場合は、小数点以下第一位で四捨五入して整数値とした。最小全域木（minimum spanning tree: MST）は、Bionumerics ver.7 (Applied Maths)を用いて作成した。全ゲノム配列は、150bp paired endでIllumina HiSeqに供しデータを得た。

## 3. 結果と考察

本研究では、豚の病変部、糞便、飼育環境よりMAHを分離し、それらの疫学的関連を検証した。豚の抗酸菌症においては、Fig.1Aに示すような明らかな腸間膜リンパ節の壊死様病変を示す場合でも、顕微鏡下で菌を検出できない場合も多い。また、抗酸菌の細胞壁はワックスD、ミコール酸など多量の脂質を含むためDNA抽出効率が悪く、ゲノムDNAはGC含量が高い<sup>1)</sup>。そのため、このような病変部から核酸を抽出し通常のPCRに供しても菌の検出感度は悪く、その後の解析には菌の分離を行うことが重要である。試料をアルカリで一晩処理した後に、小川培地に接種することにより抗酸菌を分離することができ（Fig.1B）、その後の解析に供した。

まず、食肉検査場で腸抗酸菌症として廃棄された腸間膜リンパ節より分離される抗酸菌について検討した。分離された13株について詳細な遺伝学的解析を行った。分離された13株は、16S rRNA配列解析の結果、すべて*M. avium*であった。*M. avium*には4亜種が存在するが、*hsp65*配列解析の結果、すべて*M. avium* subsp. *hominissuis*

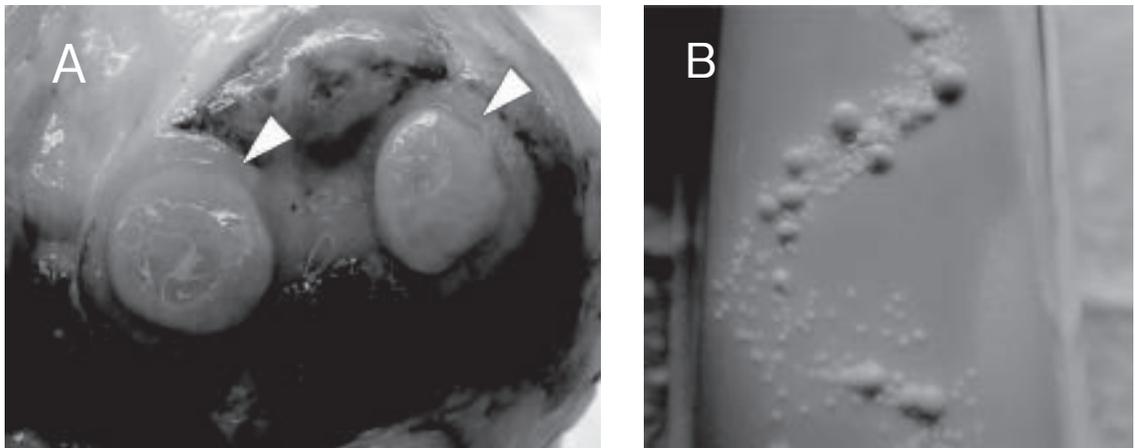


Fig. 1 Isolation of acid-fast bacteria. A. A mesenteric lymph node that was inspected as swine mycobacteriosis in a slaughterhouse. Necrotic lesions are shown (arrowheads). B. Colonies of acid-fast bacteria appeared on a slant of Ogawa-agar.

(MAH)であった。*M. avium*の亜種は、ISの保有パターンにより鑑別が可能とされている<sup>5)</sup>。たとえば、ヨーネ病の原因菌である*M. avium* subsp. *paratuberculosis*はIS900を保有するが、他の亜種には存在しない。日本の豚から分離されるMAHは、ほとんどがIS1245を保有するとされている<sup>2)</sup>。しかしながら、本研究で豚から分離したMAHは、13株中8株がIS1245を保有していなかった (Table 1)。これら8株のVNTR解析を行い、MSTを作成し既報のMAH株と比較したところ、ヒトの非結核性抗酸菌症患者由来株、国内・国外の豚から分離された株いずれからも離れた距離に配置された (データ示さず)。Hibiyaらは、国内の豚由来MAHにおけるIS1245の保有率は90%以上であると報告している<sup>2)</sup>。この報告では、IS1245陽性のMAHは外部から種豚を導入している農場で分離され、IS1245陰性のMAHは、種豚を自家繁殖している農場より分離されていた<sup>2)</sup>。IS1245陽性のMAHは豚の間で伝播され、IS1245陰性のMAHは特定の農場の環境および豚の間で循環しているのではないかと考察されている。

また、特定の農場において、生体から分離され

るMAHと環境から分離されるMAHの比較も行った。この農場から出荷された豚において、腸抗酸菌症として廃棄された腸間膜リンパ節から分離された株と、豚舎の床に敷いているオガ粉から分離された株のVNTRパターンが完全に一致した (Table 2)。このことから、同農場においてはオガ粉がMAHの温床となり、豚へ感染していることが強く示唆された。また、土から分離された株のVNTRパターンも非常に近かった (データ示さず)。

本研究では、特徴的なIS保有パターンを示すMAH株、および同一農場内の生体・周辺の環境から分離されたMAH株の詳細な解析を行った。特にオガ粉と腸間膜リンパ節から分離された株のVNTRパターンが完全に一致していたことは、本症の蔓延にオガ粉が重要であることを分子疫学的に改めて示した点で意義深い。これらの株はすべてゲノム解析に供し、詳細な解析が進行中である。

本研究のように、MAHを豚および周辺の環境から分離し、ゲノム疫学的観点から家畜～環境の間での“循環動態”を解析することにより、感染源の同定やその後の衛生対策を講じることが可能

**Table 1** Classification of *M. avium* subspecies by the IS sequences distribution

Species	Subspecies	IS900	IS901	IS1245
<i>M. avium</i>	<i>avium</i>	-	+	+
<i>M. avium</i>	<i>silvaticum</i>	-	+	+
<i>M. avium</i>	<i>hominissuis</i>	-	-	+
<i>M. avium</i>	<i>paratuberculosis</i>	+	-	-
8 strains isolated in this study.				
<i>M. avium</i>	<i>hominissuis</i>	-	-	-

**Table 2** Genetic profile of MAH isolated in a pig farm

ID	Source of MAH strains	VNTR locus						
		A	B	C	D	E	F	G
1	mesenteric lymph node	2	3	3	1	2	8	2
2	mesenteric lymph node	2	3	3	1	2	8	2
3	mesenteric lymph node	2	3	3	1	2	8	2
4	saw dust	2	3	3	1	2	8	2

となる。MAHを含む、非結核性抗酸菌群のうち、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. kansasii*, *M. abscessus*は、ヒトの非結核性抗酸菌症の主要な原因となる。これら4菌種のうち、*M. avium*と*M. intracellulare*は生化学的性状も非常に似かよっているため、MAC (*Mycobacterium avium-intracellulare* complex) 菌と総称されている。MAC菌は、ヒトや動物だけでなく環境中にも広く存在することが知られている。豚の抗酸菌症の原因菌であるMAHは、ヒトの非結核性抗酸菌症との関連も示唆されている。本研究で得られた知見は、家畜衛生のみならず、ヒトも含めた公衆衛生学的点からも意義深いと思われる。

#### 4. 要 約

豚抗酸菌症は、非結核性抗酸菌群のうち、特に *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH) を原因とする、慢性増殖性のリンパ節炎である。通常、感染豚の臨床症状は認められず不顕性感染となり、食肉検査場での内臓検査にて粟状の結節性病変として発見される。病変部は部分

廃棄となるが、複数の臓器に発見された場合は全廃棄となる。本研究では、東海地方で抗酸菌症疑いで廃棄される豚内臓、飼育される豚および周辺の環境からMAHの分離を試みた。分離したMAHは、*hsp65*遺伝子のSNPs解析、多重反復数多型配列 (variable number of tandem repeat: VNTR) 解析、ゲノム解読を行った。このようなゲノム疫学的アプローチにより、本菌の生体、環境における分布状況の一端を明らかにすることができた。現在、詳細なゲノム解析が進行中である。

#### 文 献

- 1) 後藤義孝：マイコバクテリウム族 (抗酸菌) と感染症, 獣医微生物学 (見上彪監修), 第三版, 文英堂出版 (東京), 117~120, 1995.
- 2) Hibiya, K., Kazumi, Y., Nishiuchi, Y., Sugawara, I., Miyagi, K., Oda, Y., Oda, E., Fujita, J.: Descriptive analysis of the prevalence and the molecular epidemiology of *Mycobacterium avium* complex-infected pigs that were slaughtered on the main island of Okinawa, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **33**, 401~21, 2010.
- 3) Iwamoto, T., Nakajima, C., Nishiuchi, Y., Kato, T., Yoshida, S., Nakanishi, N., Tamaru, A., Tamura, Y., Suzuki, Y., Nasu, M.: Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains

- isolated from humans, pigs, and human living environment, *Infect Genet Evol.*, **12**, 846 ~ 252, 2012.
- 4) Chen, Z. H., Butler, W. R., Baumstark, B. R., Ahearn, D. G. : Identification and differentiation of *Mycobacterium avium* and *M. intracellulare* by PCR, *J Clin Microbiol.*, **34**, 1267~9, 1996.
- 5) Inagaki, T., Nishimori, K., Yagi, T., Ichikawa, K., Moriyama, M., Nakagawa, T., Shibayama, T., Uchiya, K., Nikai, T., Ogawa, K. : Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing, *J Clin Microbiol.*, **47**, 2156~64, 2009.
- 6) Uchiya, K., Takahashi, H., Nakagawa, T., Yagi, T., Moriyama, M., Inagaki, T., Ichikawa, K., Nikai, T., Ogawa, K. : Characterization of a novel plasmid, pMAH135, from *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*, *PLoS One*, **10**, e0117797. 2015.

# データマイニング技術を用いた牛白血病ウイルス感染の免疫動態解明に関する研究

Study of immune dynamics in bovine leukemia virus infection using data mining techniques

関 口 敏・乗 峰 潤 三

(宮崎大学農学部)

Satoshi Sekiguchi and Junzo Norimine

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The bovine MHC class II DRB3 alleles are associated with polyclonal expansion of lymphocytes caused by bovine leukemia virus (BLV) infection in cattle. To confirm the genetic resistance, we measured BLV proviral load of BLV-infected cattle to examine whether the *DRB3\*0902* allele, one of the resistance-associated alleles, is associated with the proviral load. Fifty-seven animals with *DRB3\*0902* were identified out of 835 BLV-infected cattle and had significantly lower proviral load ( $P < 0.000001$ ) compared with the rest of the infected animals, in both Japanese Black and Holstein cattle. This result strongly indicates that the bovine MHC class II DRA/*DRB3\*0902* molecule plays an important immunological role in suppressing viral replication, resulting in resistance to the disease progression.

## 1. 目 的

我が国の畜産・酪農経営は、高齢化や離農の増加による生産基盤の縮小に歯止めがかからず、子牛価格の高騰による肥育経営の悪化や、国内乳製品需給のひっ迫のため生乳換算18万トンを超える乳製品の追加輸入を余儀なくされるなど、過去例のない危機的な状況となっている。肉用牛繁殖経営では、戸数が年々減少するなか、離農による子取り用めす牛の飼養頭数の減少を規模拡大により補ってきたものの、平成22年度から子取り用めす牛の頭数は継続して減少している。また、子取り用めす牛の飼養頭数の減少により子牛価格が高騰

し、子牛を素畜として購入する肥育経営の収益性の悪化を招いている。肥育経営の安定をはかるため、一刻も早い肉用牛繁殖基盤の回復が求められている。これらの課題に追い打ちをかけるように、我が国における牛白血病の感染拡大は増加の一途をたどっている。牛白血病は、牛白血病ウイルス (BLV) の感染を原因とし、リンパ球の異常増加や全身性のリンパ肉腫を主徴とする疾病である。本疾病に対するワクチンや治療法はない。またBLV持続感染牛は免疫能の低下による易感染性を示し、様々な複合感染症を発症する危険性がある。さらに、肉質の低下や繁殖成績への影響も懸念されていることから、肉用牛生産にとって

も深刻な問題となっている。本疾病はすべての感染牛が発症することはなく、一部のBLV感染牛は発症に対して抵抗性を示す。1993年に、ある特定のMHC class IIを持つことで抵抗性を獲得することが示された (Mirsky *et al.*, 1993)<sup>1)</sup>。抵抗性を持つBLV感染牛の血中ウイルス量は感受性牛に比べて極めて低く、発症のリスクも低い。レトロウイルス感染症では、感染後の病気の進行が宿主の持つ遺伝形質によって著しく異なる場合があることは知られている。しかしながら、抵抗性を示す遺伝形質の発見から20年以上が経った今でも、そのメカニズムは明らかにされていない。これは解析に必要なツールがなかっただけでなく、病原体に対する宿主の様々な因子が複雑に絡み合っているため、免疫応答を単純化して解析することが困難であることなどが考えられる。免疫反応では外部からの抗原刺激を受けて、多くの遺伝子やタンパク質の発現が変化し、その最終結果として体内代謝物質の変化が現れる。さらに、様々なサイトカインや免疫構築を担う受容体の抑制あるいは活性化が促進される。このような複雑な免疫機構を解析するためには、無数の宿主因子から免疫応答に関連する重要な因子を抽出し、同定する必要がある。そこで本研究では、BLV感染の疫学調査を行い、BLVに感染した抵抗性牛を同定した。次に、抵抗性の遺伝子型とプロウイルス量との関係を調べた。

## 2. 方法

### 2.1 血液の採材

臨床獣医師らと連携しながら、九州県内にある複数の研究協力農場から835頭のBLV感染牛の血液を採取した。採血後は速やかに遠心分離し、血漿と血球成分を分離した。分離後の血漿はマイナス20度で冷凍保存し、血球成分からはゲノムを抽出し、マイナス20度で冷凍保存した。ゲノム抽出

には「Wizard<sup>®</sup> Genomic DNA Purification Kit (Promega)」を使用した。

### 2.2 BLV感染の診断

分離した血漿について、抗BLV抗体を検出する検査法 (ELISA) を用いてBLV感染の有無を診断した。ELISAは「牛白血病エライザキット (JNC)」を用いた。

### 2.3 BLV感染プロウイルスの定量

ELISAで陽性を示した感染牛から抽出したゲノムを用いて、Real-Time PCR法を用いてBLV感染牛の血中のウイルス量を測定した。Real-Time PCRには「ウシ白血病ウイルス検出用Probe/Primer/Positive control (TaKaRa)」および「Cycleave PCR Starter Kit (TaKaRa)」を使用した。

### 2.4 RFLP法による抵抗性遺伝子の決定

生物のゲノム中に存在する制限酵素認識部位の配列には個体差があり、制限酵素切断後に生じる特異配列の長さは個体ごとで差が現れる。RFLP法とは、制限酵素によって切断されたDNA断片の長さの違いを利用して、個体間で異なる多型を識別する方法である。このことを利用して、RFLP法で感染牛の抵抗性遺伝子を決定した。

### 2.5 BLVの系統樹解析

感染牛の血液から抽出したBLVについて、ウイルスエンベロープの部分塩基配列440bpを決定し、MEGA 6ソフトウェアを用いて多重アライメント解析および遺伝子系統樹の作成を行ったウイルス遺伝子の系統樹解析を行った。

### 2.6 統計処理

データは各群の平均値、中央値および標準偏差を算出し、両群間でウィルコクソンの順位和検定を行い、統計学的有意差検定を行った。なお、有意水準は5%とした。

2.7 人権の保護および法令等の遵守への対応  
本研究で取り扱う農場情報や試料は生産者を含

む畜産関係者の同意の下、実施しているものであり、「国立大学法人宮崎大学個人情報保護規則」および「国立大学法人宮崎大学保有個人情報管理規定」を遵守するものである。

### 3. 結果と考察

835頭（和牛：653頭，乳用牛：182頭）のうち，抵抗性遺伝子（*DRB3\*0902*）を保有していたのは57頭（和牛：44頭，乳用牛：13頭）で，BLV感染牛全体の約6.8%であった（Table 1）。抵抗性

牛と非抵抗性牛の感染プロウイルス量を比較した結果，和牛，乳用牛ともに抵抗性遺伝子を持つ牛のプロウイルス量が持たない牛のそれより有意に低かった（Fig. 1）。この結果は，和牛も乳用牛も抵抗性遺伝子を持つ牛ではBLVの増殖が抑えられていることを示す重要な知見である（論文投稿中）。次に，感染牛から抽出したBLVの遺伝子について系統樹解析を行ったところ，20種の異なる遺伝子サブタイプが検出された（Fig. 2）。これらの多くは遺伝子サブタイプ1型に分類され

Table 1 Proportion of *BoLA-DRB3\*0902* allele in animals giving with E band in PCR-RFLP

	The number of animals			Percentage of each allele (%) (allele count = 1,670)
	Japanese Black (n = 653) (allele count = 1,306)	Holstein (n = 182) (allele count = 364)	Total (n = 835) (allele count = 1,670)	
<i>DRB3*0901</i>	1	2	3	0.18 (0.05–0.57) <sup>a)</sup>
<i>DRB3*0902</i>	44	13	57	3.41 (2.62–4.43) <sup>a)</sup>
<i>DRB3*0903</i>	0	0	0	0.00 (0.00–0.29) <sup>a)</sup>
Total	45	15	60	

<sup>a)</sup> indicates 95% confidence interval for the percentage of each allele. There was no animal with homozygous *DRB3\*0901* nor *DRB\*0902* allele.

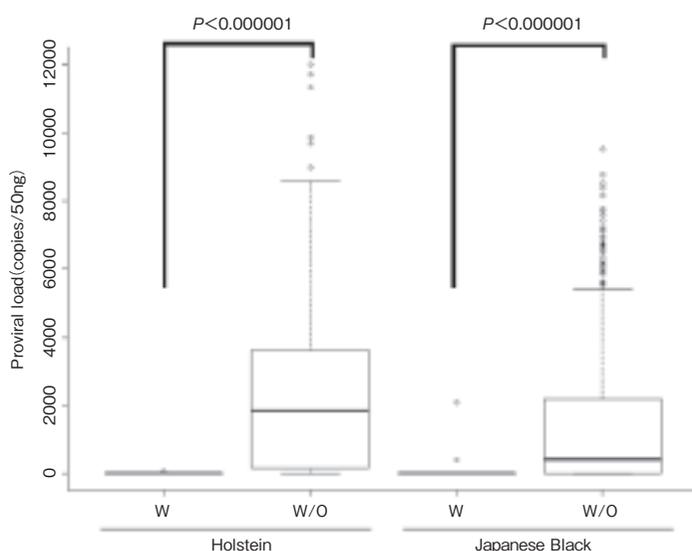


Fig. 1 Association between the *DRB3\*0902* allele and proviral load. Proviral load is indicated as the number of copies per 50ng DNA. Holstein cattle with *DRB3\*0902* : W; without *DRB3\*0902* : W/O. Japanese Black cattle with *DRB3\*0902* : W; without *DRB3\*0902* : W/O).

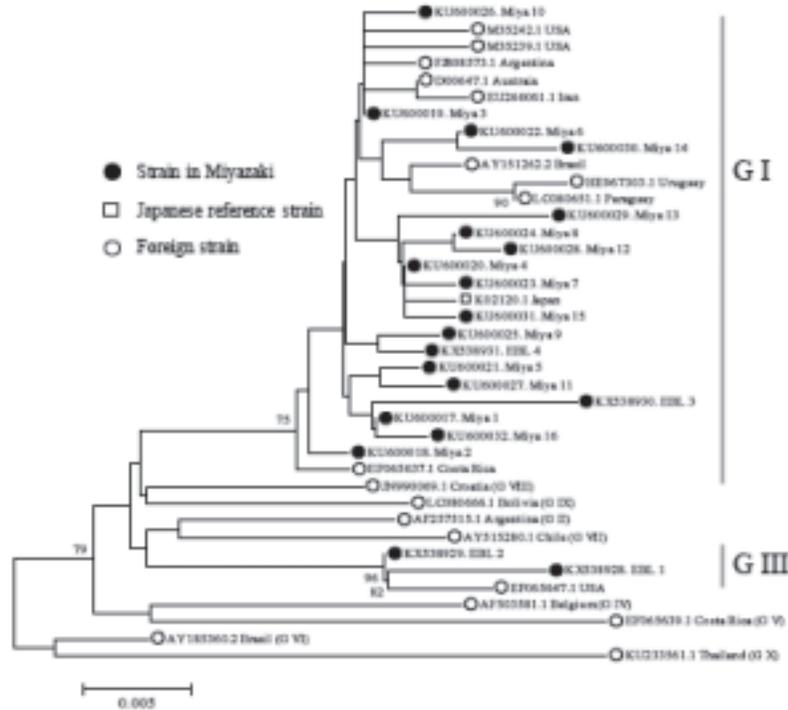


Fig. 2 Phylogenetic tree of the BLV genotypes. The phylogenetic tree was based on partial sequences (423 nt) of the env gene. The sequences from this study labeled with black circle and from Genbank labeled with white square (Japanese strain) or circle (foreign strain). The BLV genotypes are indicated on the right (G I and G III) or in parentheses (G II, G III and G IV-G X). The evolutionary history was inferred using the Neighbor-Joining method with bootstrap probability more than 70%. The bootstrap values, more than 70%, are shown next to branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree.

た。また、地域によって遺伝子サブタイプの分布が異なることが明らかとなった (Fig. 3)。このような遺伝子サブタイプと地理的な分布の関係を示した研究成果は初めての報告であり、感染経路やウイルスの感染拡大パターンの解明に有用な知見となりうる (Marawan *et al.*, 2017)<sup>2)</sup>。今後は、抵抗性遺伝子を持つ牛を用いて網羅的なタンパク質の比較定量解析を実施し、データマイニングの手法を用いてBLV感染に重要な因子を抽出・同定する予定である。

#### 4. 要 約

本研究は、BLVに感染したフィールド牛（和牛

および乳用牛）を用いて、抵抗性遺伝子 (*DRB3\*0902*) の有無と末梢血プロウイルス量との関連性を解析する事を目的とした。その結果、*DRB3\*0902*保有牛は、和牛および乳用牛のどちらにおいても保有していない牛と比較してプロウイルス量が有意に低かった。プロウイルス量の低い感染牛は、水平および垂直伝播経路において感染源となるリスクが低いことから、*DRB3\*0902*を保有する牛は、BLVに感染しても感染拡大源となり難いことが示唆される。このことから、全国で牛白血病が蔓延している現状から、*DRB3\*0902*を保有する牛の白血病清浄化対策への有効活用が期待される。今後は、ウイルス増殖を抑制する免疫

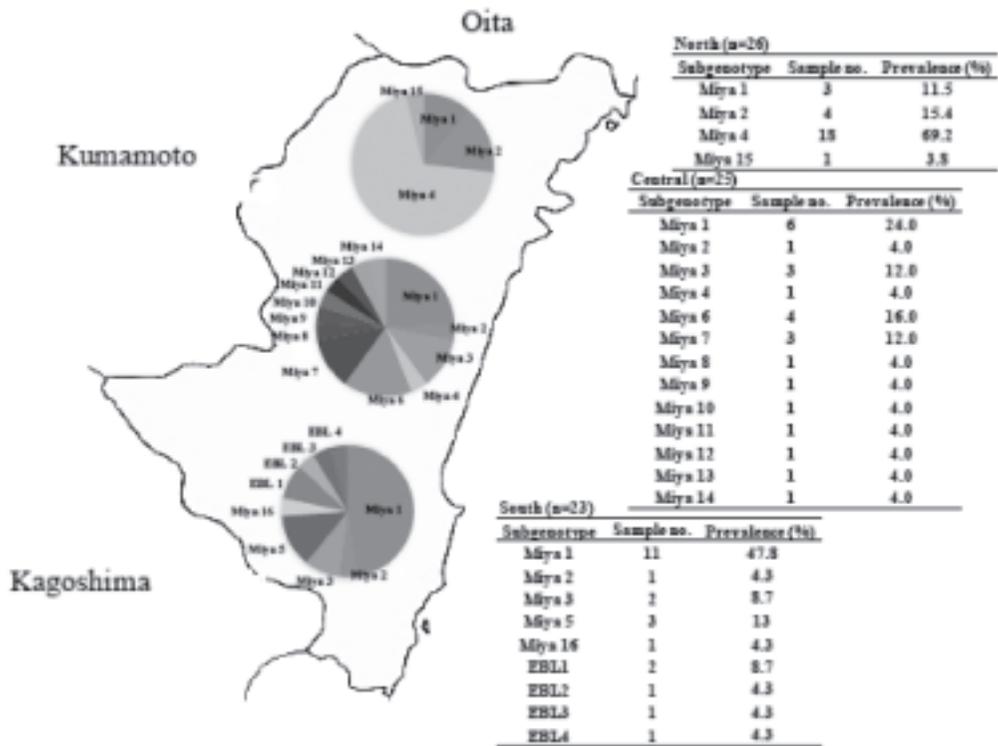


Fig. 3 Prevalence and distribution of different subgenotypes in 3 different localities of the Miyazaki prefecture.

学的機序の解明していく予定である。

文 献

1) Mirsky, M. L., Da, Y., Lewin, H. A. : Detection of bovine leukemia virus proviral DNA in individual cells, *PCR Methods Appl.* 2 (4) : 333~340, 1993.

2) Marawan, M. A., Mekata, H., Hayashi, T., Sekiguchi, S., Kirino, Y., Horii, Y., Moustafa, A. M., Arnaut, F. K., Galila, E. S., Norimine, J. : Phylogenetic analysis of env gene of bovine leukemia virus strains spread in Miyazaki prefecture, Japan, *J Vet Med Sci*, in press, 2017.

## 肉用牛の出血性腸炎で認められる腸管病原性微生物の混合感染と病態との関連

Co-infection of *Eimeria* and enteropathogenic microbes and its role in the pathophysiology of haemorrhagic enteritis in beef cattle

桐野有美・目堅博久\*・野中成晃

(宮崎大学農学部, \*宮崎大学テニュアトラック推進機構)

Yumi Kirino, Hirohisa Mekata\* and Nariaki Nonaka

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, \*Organization for Promotion of Tenure Track)

Bovine *Eimeria* species are found nationwide in Japan and the vast majority of calves are exposed to them. Most cases of haemorrhagic enteritis (HE) in cattle are related to the infection of these causal protozoa, which is responsible for severe economic losses in farms. It has been recently demonstrated that such HE cases are caused by co-infection of *Eimeria* and other pathogens. This study explored potential microorganisms which are associatively involved in the pathophysiology of HE in cattle by coprological molecular diagnosis. A total of 27 cases and their respectively matched controls in 20 farms were sampled. Fecal samples were collected on the onset of disease, the third day since the onset, and the cure phase. Realtime PCR was performed targeting ten viral species and six bacterial species considered enteropathogenic to cattle. *Eimeria* oocysts were quantitatively examined by McMaster method. Severe infection of *Eimeria* (OPG>10,000) was found in 70% of the cases and 4% of the controls. *Clostridium perfringens* was detected in 30% of the cases while in 4% of the controls. Bovine enterovirus was detected in 67% of the cases and 71% of the controls. Group A rotavirus, Bovine torovirus, and bovine coronavirus were also detected in a few cases. According to matched-pairs analysis, the existence (“severe infection” instead, in the case of *Eimeria*) of *C. perfringens*, *E. zuernii*, *E. bovis*, and other *Eimeria* species were verified to have a significant association to the disease. These pathogens showed significant decrease or tendency of decrease along toward the cure phase. These results indicate that infection of *Eimeria* and *C. perfringens* is likely to play an important role in HE pathophysiology. On the other hand, Bovine enterovirus was not considered to associate to the disease as it was detected frequently in both cases and controls and the proportion of the test-positive animals didn't decrease during the cure phase. *Eimeria*-associated HE seems to have several patterns of pathophysiology, which can be one of the reasons for the different outcomes of treatments in the field. The information on such patterns and the factors involved will contribute to the establishment of effective treatment methods.

## 1. 目 的

牛, 特に肉用牛の出血性腸炎は, 増体率の低下, 時には死亡を招くこともあり, 畜産農家における経済損失の重大要因のひとつとして定着している。主な原因とされるコクシジウム (*Eimeria*属原虫) はわが国に広く分布し, 若齢牛を中心に高率に感染しているが, 発症や重症化のメカニズムについては未解明の部分が多い。臨床現場では抗コクシジウム剤 (サルファ剤) の投与を中心とした治療が行われるが, これによりコクシジウムのオーシスト排出が認められなくなっても, しばしば重症化を抑えることができない<sup>1)</sup>。

近年, ニワトリやブタにおいては, コクシジウム単独ではなく他の消化管病原性微生物との混合感染が重要な発症因子であることが示唆されている<sup>2,3)</sup>。申請者が行った先行研究においても, コクシジウムが関与する出血性腸炎の約半数において*Clostridium perfringens*の著しい増殖が観察された<sup>4)</sup>。しかし残りの半数においては, *C. perfringens*以外の病原体が, コクシジウムとの混合感染により出血性腸炎を引き起こしている可能性を示唆している。

そこで本研究では, 牛の出血性腸炎の病態形成に複合的に関与している病原体を明らかにすることを目的に, 発症牛の糞便に排出される病原性ウイルスおよび細菌の消長をリアルタイムPCRを用いて経時的に観察した。

## 2. 方 法

### 2.1 検査材料の採取

平成28年7月から平成29年1月, 宮崎県および鹿児島県の計20農場において, 臨床獣医師により出血性腸炎と診断された牛 (以下「発症牛」) 27頭を対象に調査を行った。直腸便を検査材料とし, 発症1日目 (初診時), 第3病日目, 寛解時

(最終治療日) の3時点で採材を行った。対照として発症牛と飼養条件をそろえた臨床健康な同居牛 (以下「健康牛」) から, マッチド・ペア方式で同時に採材した。健康牛24頭のうち3頭は, それぞれ同居する複数の発症牛の対照として採材されたため, のべ27組の発症牛-健康牛のペアを解析に供した。検査材料は冷蔵にて運搬し, 遺伝子抽出および検査を行うまでPBS10%乳剤として-80℃にて保管した。採材と同時に, 牛の個体情報, 臨床症状, 治療内容などの臨床情報を記録し, 解析に用いた。

### 2.2 病原体の検出

土赤らが開発した牛下痢関連病原体の網羅的診断系Dembo-PCR<sup>5)</sup>を一部改変し, 牛の腸管に病原性を示すとされる10種のウイルスと6種の細菌の遺伝子をターゲットにTaqManリアルタイムPCRを行った (Table 1)。細菌DNAとウイルスRNA/DNAは, それぞれQIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (QIAGEN, Hilden, Germany) およびHigh pure viral nucleic acid kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて製品の指示書に従って抽出した。RNAウイルスの遺伝子増幅はOne Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) で, またDNAウイルスと細菌の遺伝子増幅はPremix Ex Taq™ (TaKaRa Bio, Otsu, Japan) で行った。これらの製品の指示書に従い, 核酸抽出産物, Table 1に示す各プライマーとプローブ (いずれも最終濃度0.2 μM) を加え, 超純水で全量20 μl に調整したものをターゲット病原体ごとに反応チューブに入れ, LightCycler® 96 (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を使用して遺伝子増幅反応を行った。なお, 抽出工程における核酸損失を監視するため, β-actinをインターナルコントロールとして検出した。すべての反応温度条件は45℃ 5分, 95℃ 30秒ののち, 95℃ 10秒, 55℃ 20秒,

Table 1 Primer-probe sets used for TaqMan realtime PCR

Pathogen	Target gene	Forward primer (5'-3') Reverse primer (5'-3') Probe (5'-3')	Reference No.
Bovine viral diarrheal virus	5'UTR	GGGNAGTCGTCARTGGTTCCG GTGCCATGTACAGCAGAGWTTTT FAM-CCAYGTGGACGAGGGCAYGC-TAMRA	5)
Bovine enterovirus	5'UTR	GCCGTGAATGCTGCTAATCC GTAGTCTGTTCCGCCTCCACCT FAM-CGCACAAATCCAGTGTGCTACGTCGTAAC-TAMRA	7)
Bovine coronavirus	M protein	CTGGAAGTTGGTGGAGTT ATTATCGGCCATAACATACATC FAM-CCTTCATATCTATACACATCAAGTTGTT-ZEN/IBFQ*	8)
Group A rotavirus	VP6	ACTCCAATGTAAGTGATCTAATTC GAGTTGTTCCAAGTAATCCAAA FAM-ACCAATTCCTCCAGTTTGGAAYTCATTYCC-ZEN/IBFQ*	5)
Group B rotavirus	VP6	TGGCAGGTGGTCAGGTAATAA ACACCACAGTCTAGCTTCAG FAM-GTCACATGTGTCTCAGGCATGGAAGC-ZEN/IBFQ*	5)
Group C rotavirus	VP6	GCCAATACGAGAAGGGATTCT TCTTCACGGATGCAACTAGC FAM-CCAGGATTTCCATGGGAACAGACGT-TAMRA	5)
Bovine torovirus	Nucleocapsid	CGTATTCAAAACCAAAGACGTG GTGCAGTCTCATTGCCATC FAM-CCAGCAGTCACTATCTTTGCCATTTGA-ZEN/IBFQ*	5)
Mammalian orthoreovirus	$\lambda$ 3	TCGATATCGGGAATGCAG CTGACGGGAAAGTGGTRGTCA FAM-ATGATCCAGCATCTATCGAAACTRTATAAACG-ZEN/IBFQ*	5)
Bovine herpes virus-1	gE	CAATAACAGCGTAGACCTGGTC GCTGTAGTCCCAAGCTTCCAC FAM-TGCGGCTCCGGGCTTTACGTCT-TAMRA	9)
Bovine adenovirus	Hexon	CRAGGGAATAYYTGCTGAAAATC AAGGATCTCTAAATTTYTCTCCAAGA FAM-TTCATCWCCTGCCACWCAAAGCTTTTT-TAMRA	10)
<i>Salmonella</i> Dublin	VagC	GGGTGAGCGAGCTGGAAA CGCCATAAAGTCCGGGTCA FAM-TTTTTCGAGCTGCCGGAACGAGC-TAMRA	11)
<i>Salmonella</i> Enteritidis	sefA	GGTAAAGGGGCTTCGGTATC TATTGGCTCCCTGAATACGC FAM-TGGTGGTGTAGCCACTGTCCCGT-TAMRA	12)
<i>Salmonella</i> Typhimurium	fliC	TGCAGAAAATTGATGCTGCT TTGCCAGGTGGTAATAGC FAM-ACCTGGGTGCGGTACAGAACCGT-ZEN/IBFQ*	12)
<i>Mycobacterium avium</i> sub. <i>Paratuberculosis</i>	IS900	CAGCGGCTGCTTTATATTCC GCAGAGGCTGCAAGTCGT FAM-AAGACCGACGCCAAAGACGCTGCGA-ZEN/IBFQ*	13)
<i>Clostridium perfringens</i> ( $\alpha$ -tixin)	Cpa*	TGCACTATTTTGGAGATATAGATAC* CTGCTGTGTTATTTTATACTGTTTC* FAM-TCCTGTAATGTTACTGCCGTTGA-ZEN/IBFQ*	14)
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	K99	GCTATTAGTGGTCATGGCACTGTAG TTTGTFTTCGCTAGGCAGTCATTA FAM-ATTTTAAACTAAAACCAGCGCCCGGCA-ZEN/IBFQ*	15)
$\beta$ -actin	Actin	AGCGCAAGTACTCCGTGTG CGGACTCATCGTACTCTGCTT FAM-TCGCTGTCCACCTTCCAGCAGATGT-TAMRA	9)

\*Modified from the primer-probe sets which are listed in Dembo-PCR<sup>5)</sup>

72℃20秒を40サイクルとした。

*Eimeria*属原虫と線虫類の検出は、McMaster法により糞便中のオーシストあるいは虫卵を種別に定量した。*Eimeria*属原虫については、糞便1gあたりのオーシスト数(OPG)が10,000を超えるものを重度感染とした。

### 2.3 統計解析

検出された病原体と病態発生との関連を以下の方法で解析した。まず、McNemar検定により、病原体の保有と疾病との関連をマッチド・ペア方式で解析した。次いで、発症牛において、各病原体の検出率を経時的に多重比較検定した。すべての解析は統計プログラムR (www.r-project.org)を用いて行い、 $P < 0.05$ の時に有意と判断した。

## 3. 結果と考察

今回、調査対象とした症例は、子牛(8カ月齢未満)15頭、肥育牛9頭、種雄牛1頭、肉用繁殖母牛1頭、不明1頭の計27症例であった。

初診時の検査結果から、*Eimeria*属原虫の重度感染(OPG > 10,000)が発症牛の70% (19/27)で認められ、そのうち79%は*E. zuernii*によるものであった。健康牛の4% (1/24)で認められた重度感染は*E. bovis*によるものであった。また、*C. perfringens*は発症牛の30% (8/27)から検出された一方で、健康牛からの検出は4% (1/24)にとどまった。牛エンテロウイルスは発症牛の67% (18/27)および健康牛の71% (17/24)で検出された。A群ロタウイルス、牛トロウイルス、牛コロナウイルスが検出された症例も少数(それぞれ1例、1例、3例)認められた。

発症牛と健康牛のマッチド・ペアで解析した結果、病原体の保有(*Eimeria*属原虫の場合は重度感染、以下同様)と発症との間に有意な関連が認められた病原体は、*C. perfringens* ( $P = 0.019$ )、*E. zuernii* ( $P = 0.0001$ )、*E. bovis* ( $P = 0.025$ )、

そしてその他の*Eimeria*属原虫 ( $P = 0.045$ )であった(Table 2)。このうち病状の寛解に向かって保有率が有意に低下したのは*E. zuernii* ( $P = 0.004$ )のみであったが、*C. perfringens*、*E. bovis*、およびその他の*Eimeria*属原虫においても低下傾向が認められた(それぞれ $P = 0.268$ 、 $P = 0.198$ 、 $P = 0.265$ ) (Fig. 1)。なお、本調査では経過中に保有率が有意に上昇した病原体はなかった。

以上の結果は、*Eimeria*属原虫と*C. perfringens*の存在が、病態形成に関与していることを示している。著者らは先行研究において、*Eimeria*属原虫の重度感染が、腸管内における*C. perfringens*の増殖に重要な役割を果たす可能性を指摘している<sup>4)</sup>。今回のマッチド・ペアによる解析および病原体保有率の経時的観察のいずれもこれを支持する結果となった。一方で、牛エンテロウイルスは発症牛・健康牛ともに高頻度で検出され、その保有率は治癒経過においても低下しなかった。本ウイルスの自然感染による病原性については未だ不明であり<sup>6)</sup>、牛群によっては無症候的に定着しているとされる<sup>7)</sup>。これらのことから、本ウイルスの存在と病態との関連は弱いと推測されるが、経時的定量解析で確認する必要がある。

今回、病態との関連は証明されなかったものの、*Eimeria*属原虫と*C. perfringens*以外の病原体との組み合わせも検出されたことから、コクシジウムが関与する出血性腸炎には複数の病態があることが示唆された。この違いが、実際の臨床現場における治療への反応に影響を与えているものと推察される。したがって、どのような病態パターンが存在し、それぞれにどのような病原因子が関与しているかを明らかにできれば、各病態に対応する適切な治療法の提案につなげることができると考えられる。そのためには、症例の検査結果をさらに蓄積し、ロジスティック回帰分析により各病原体の関与の程度を詳細に評価する必要がある。また、デ

Table 2 Test results for the targeted pathogens on the matched case-control in each disease stage examined

Pathogen	No. of pairs (Case/Control)											
	Onset				Day 3				Cured			
	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-	+/+	+/-	-/+	-/-
Bovine viral diarrheal virus	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
Bovine enterovirus	16	2	4	5	11	4	3	5	6	2	0	6
Bovine coronavirus	0	1	0	26	0	0	0	23	0	0	0	14
Group A rotavirus	0	1	0	26	0	1	0	22	1	0	1	12
Group B rotavirus	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
Group C rotavirus	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
Bovine torovirus	1	2	0	24	0	1	1	21	1	1	1	11
Mammalian orthoreovirus	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
Bovine herpes virus-1	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
Bovine adenovirus	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Salmonella</i> Dublin	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Salmonella</i> Typhimurium	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Mycobacterium</i> avium sub. <i>paratuberculosis</i>	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Clostridium</i> <i>perfringens</i>	0	8	1	18*	0	4	0	19*	0	1	1	12
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i>	0	0	0	27	0	0	0	23	0	0	0	14
<i>Eimeria</i> <i>zuernii</i>	0	15	0	12*	0	6	2	15	0	1	0	13
<i>Eimeria</i> <i>bovis</i>	2	5	0	20*	0	2	0	21	0	1	0	13
<i>Eimeria</i> spp. (Except <i>E. zuernii</i> and <i>E. bovis</i> )	0	4	0	23*	0	1	2	20	0	0	0	14
Nematodes	1	1	3	22	1	0	2	20	0	1	0	13

NB: The counts represent pairs containing 1 case and 1 control rather than individual cases.

NA, all cases and controls tested were negative for the pathogen.

+/+, both case and control were test positive. +/-, case was test positive while control was test negative. -/+, case was test negative while control was test positive. -/-, both case and control were test negative.

\*An association was verified between case status and the presence of the pathogen by McNemar test.

デジタルPCRによる絶対定量解析や次世代シーケンサによる網羅的遺伝子解析により、今回検査対象としなかった他の微生物の関与について追及することも重要である。

#### 4. 要 約

牛に感染する*Eimeria*属原虫はわが国に広く分布し、若齢牛を中心に高率に感染している。牛の出血性腸炎の多くにこの原虫が関与し、畜産農家

の経済損失の原因となっている。近年この病態の形成において、*Eimeria*属原虫と他の病原性微生物の混合感染が重要であることがわかってきた。本研究では、牛の出血性腸炎の病態形成に複合的に関与する病原体を明らかにするために、臨床症例の糞便中に排出される病原体遺伝子を経時的に検査した。計20農場において出血性腸炎発症牛27頭とそれぞれに対応する健康同居牛から、マッチド・ペア方式で採材した。初診時、3病日目、そ

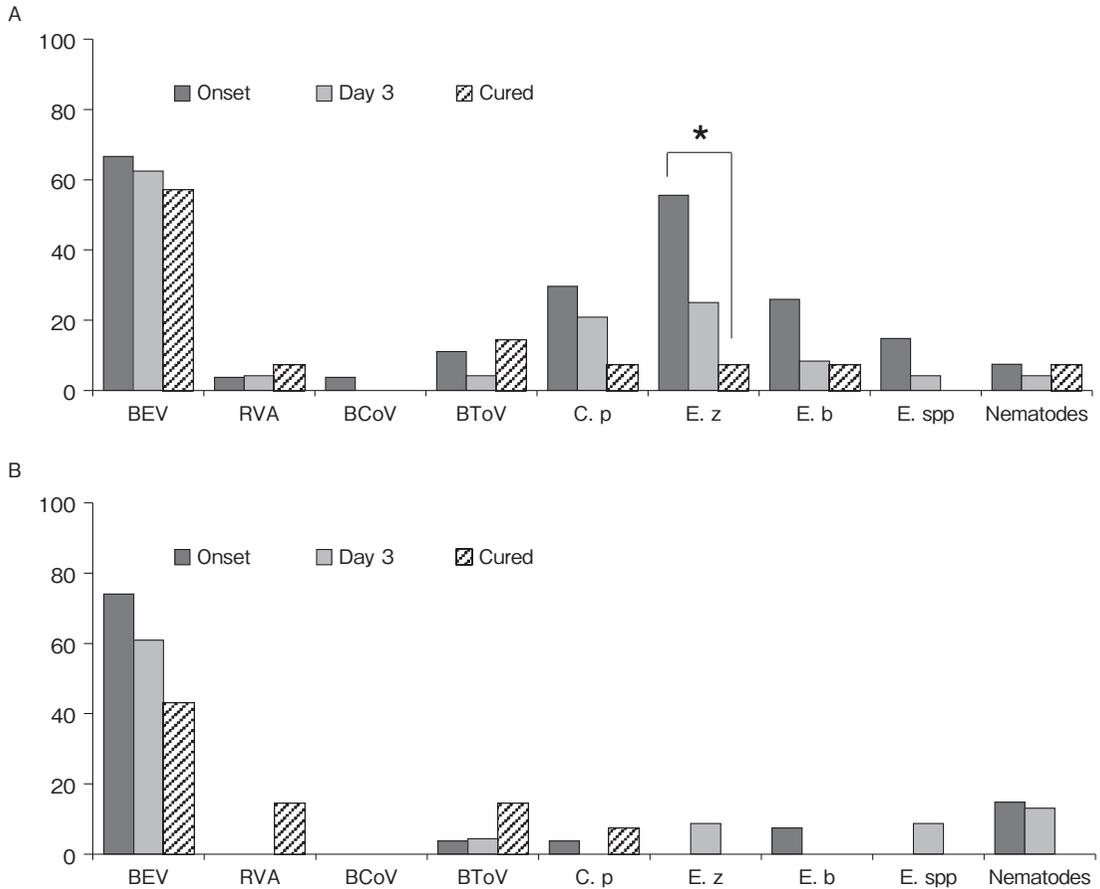


Fig. 1 Proportion of individuals with positive test result for each pathogen in each disease stage

(A) Haemorrhagic enteritis cases. (B) Healthy animals for matched controls. \*,  $P < 0.05$ .

BEV, Bovine enterovirus. RVA, Group A rotavirus. BCoV, Bovine coronavirus. BToV, Bovine torovirus. C. p, *Clostridium perfringens*. E. z, *Eimeria zuernii*. E. b, *Eimeria bovis*. E. spp, *Eimeria* species except *E. zuernii* and *E. bovis*.

して寛解時の3時点で糞便を採取し、牛の腸管に病原性を示すとされる10種のウイルスと6種の細菌の遺伝子をターゲットにリアルタイムPCRを行った。またMcMaster法により*Eimeria*属原虫のオーシストを種別に定量した。その結果、*Eimeria*属原虫の重度感染(OPG>10,000)が発症牛の70%および健康牛の4%で認められた。また、*Clostridium perfringens*が発症牛の30%から検出された一方で、健康牛からの検出は4%にとどまった。牛エンテロウイルスは発症牛の67%および健康牛の71%で検出された。A群ロタウイル

ス、牛トロウイルス、牛コロナウイルスが検出された症例も少数認められた。マッチド・ペアで解析した結果、*C. perfringens*, *E. zuernii*, *E. bovis*, そしてその他の*Eimeria*属原虫において、病原体の保有(*Eimeria*属原虫の場合は重度感染)と病態発生との関連が示唆された。これらの病原体の保有率は病状の寛解に伴って有意に低下、あるいは低下傾向を示した。以上の結果は、*Eimeria*属原虫と*C. perfringens*の感染が病態形成の一部を成す可能性が高いことを示している。一方で、牛エンテロウイルスは発症牛・健康牛ともに高頻度

で検出され、その保有率は治癒経過においても維持されたことから、病態との関連は弱いと推測される。*Eimeria*属原虫が関与する出血性腸炎には複数の病態があり、この違いが臨床現場における治療への反応に影響を与えているものと推察される。どのような病態パターンが存在し、それぞれにどのような病原因子が関与しているかを明らかにできれば、各病態に対応する適切な治療法の提案につなげることができる。

#### 文 献

- 1) Kano, S., Yoshida, Y., Takahashi, T., *et al.* : *J Livest Med*, **58**, 679~84, 2011.
- 2) Collier, C. T., Hofacre, C. L., Payne, A. M., *et al.* : *Vet Immunol Immunopathol*, **122**, 104~15, 2008.
- 3) Mengel, H., Kruger, M., Kruger, M. U., *et al.* : *Parasitol Res*, **110**, 1347~55, 2012.
- 4) Kirino, Y., Tanida, M., Hasunuma, H., *et al.* : *Vet Rec*, **177**, 202~202, 2015.
- 5) Tsuchiaka, S., Masuda, T., Sugimura, S., *et al.* : *J Vet Med Sci*, **78**, 383~9, 2016.
- 6) Blas-Machado, U., Saliki, J. T., Sánchez, S., *et al.* : *Vet Parasitol*, **48**, 1075~84, 2011.
- 7) Jiménez-Clavero, M. A., Escribano-Romero, E., Mansilla, C., *et al.* : *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3536~43, 2005.
- 8) Decaro, N., Elia, G., Campolo, M., *et al.* : *J Virol Methods*, **151**, 167~71, 2008.
- 9) Wernike, K., Hoffmann, B., Kalthoff, D., *et al.* : *J Virol Methods*, **174**, 77~84, 2011.
- 10) Wong, K., Xagorarakis, I. : *J Appl Microbiol*, **109**, 605~12, 2010.
- 11) Persson, S., Jacobsen, T., Olsen, J. E., *et al.* : *J Appl Microbiol*, **113**, 615~21, 2012.
- 12) Lee, S. H., Jung, B. Y., Rayamahji, N., *et al.* : *J Vet Sci*, **10**, 43~51, 2009.
- 13) Bull, T. J., Gilbert, S. C., Sridhar, S., *et al.* : *PLoS One*, **2**: e1229, 2007.
- 14) Gurjar, A. A., Hegde, N. V., Love, B. C., *et al.* : *Mol Cell Probes*, **22**, 90~5, 2008.
- 15) West, D. M., Springings, K. A., Cassar, C., *et al.* : *Veterinary Microbiology*, **122**, 323~31, 2007.

## ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成促進： 筋成長期での制御による食肉特性の向上を目指して

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

川口 舞・柴田 歩実・大宅 俊平・松吉 祐児・  
水野谷 航・中村 真子・辰巳 隆一

(九州大学大学院農学研究院)

Mai Kawaguchi, Ayumi Shibata, Shunpei Ohya, Yuji Matsuyoshi,  
Wataru Mizunoya, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

(Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Muscle fiber-type proportions are responsible for skeletal muscle properties including contractility (fast-and slow-twitch), metabolism (glycolytic and oxidative), fatigue resistance (low and high), and meat quality (differential tasting-component contents and fat deposition). The mechanisms that regulate such properties are therefore, important targets of research on meat-animal production and human sports and health sciences. 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 heavy chain (MyHC) signaling, during muscle regeneration. Here we report that the Sema3A ligand-dependent pathway may also work during postnatal muscle growth. *In vivo* experiments were conducted using satellite cell-specific Sema3A conditional knockout (cKO) mice which received Sema3A-cKO treatment at 3 wks after birth and evaluation of the effect on fiber-type proportions at 15 wks by quadruple-immunofluorescence microscopy. Results demonstrated that Sema3A-cKO mice had a drastically diminished proportion of slow fibers and a corresponding increase in the proportion of fast IIb fibers in areas originally rich in slow fibers, the medial head of gastrocnemius muscle examined here (at 15 wks). At the cKO starting time-point (3 wks), there was no significant difference in the fiber-type proportion between control and Sema3A-cKO mice, indicating that the particular phenotype observed results from Sema3A deletion during postnatal muscle growth from 3 wks to 15 wks. These features of the postnatal phenotype were supported by results from primary cultures of satellite cells prepared from 3-wks-old control and Sema3A-cKO mice. There were significant decreases in the expression of slow MyHC, myogenin, and MEF2D, and a complementary increase in fast MyHC type IIb message and total fast-MyHC protein (IIa+IIx+IIb) observed at 72 h post-differentiation by RT-qPCR and/or Western blotting of cell lysates. These emerging results directly support our finding that myoblast-secreted Sema3A ligand plays an essential role in slow-fiber “commitment” during myofiber formation period in postnatal muscle growth. Therefore, the present study provides a possible

contribution of dietary agonist of Sema3A cell-membrane receptor (including polyphenols described in a previous research report) to increasing slow-fiber population 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（Ⅰ型）」と「速筋型（Ⅱ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性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。

私達は、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。すなわち、「筋損傷により活性化・増殖・分化した筋幹細胞が互いに融合して新しい筋線維を形成する際にSema3Aを合成・分泌し、細胞膜受容体neuropilin2-plexinA 3複合体→筋特異的転写制御因子群myogenin/MEF2D→遅筋型myosinからなるシグナル伝達軸により遅筋型筋線維の形成を誘導する」という新規の分子機構である<sup>1~9)</sup>。動物の出生後の筋成長過程でも同様に新しい筋線維を形成することで筋が肥大・伸長するので、上記のSema3A依存的な自律制御機構が遅筋型筋線維の形成を誘導していると予想され

る。また、この分子機構の最も重要な点は、「Sema3Aが細胞膜受容体に結合するとシグナル伝達が開始する」ことにあり、このことは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。

一方、一昨年度の助成研究により、リンゴ幼果皮（未利用食品資源）から調製したポリフェノールを10週齢程度のラット（ヤングアダルト期）に8週間給餌すると遅筋型筋線維の割合が増加し筋持久力が格段に向上することを明らかにするとともに<sup>10, 11)</sup>、このリンゴポリフェノール中のある単一成分がその有効成分であることを見出した。このような特性を持つ食品成分はこれまでに報告がなく、上記のSema3A細胞膜受容体のアゴニストであることを実証する必要がある。

したがって本研究ではまず、動物の出生後の筋成長過程でもSema3A・細胞膜受容体依存的な自律制御機構が遅筋型筋線維の形成を制御するかどうかを検証した。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ことにもなる。この目的を高い精度で達成するため、成長期の筋幹細胞特異的Sema3Aコンディショナルノックアウトマウス（Sema3A-cKOマウス）を用いた*in vivo*・*in vitro*実験を実施した。それらの実験結果をここに報告する。なお、現在、リンゴポリフェノールのアゴニスト活性の実証試験を進めており、研究成果は次の機会に報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 実験動物

出生後3週目の雄性Pax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>lox</sup>マウスにER<sup>T2</sup>のアゴニストであるタモキシフェンを腹腔内投与し (Sigma-Aldrich 社製 T 5648 ; 200 µg/g体重を1日1回, 計3回), 衛星細胞特異的にSema3A遺伝子をcKOした。マウスの後肢大腿部および背部の筋から単離・培養した衛星細胞に対してゲノムPCRを行い, cKOされた個体を選別し実験に供した。対照区として同週齢のSema3A-loxPマウスにタモキシフェンを同様に投与した。各群3匹のマウスを配置した。15週齢まで通常餌 (Oriental Yeast社製CRF-1) にて自由摂食・飲水条件下で飼育し (室温22±2℃, 湿度55±10%, 12:12明暗サイクル), 後肢下腿部ふくらはぎの筋を採取・解析した。初期体重, 総摂食量および体重増加量はいずれも対照区とSema3A-cKO区間で有意な差がないことを確認した。

### 2.2 筋線維型組成解析

3週齢および15週齢でそれぞれふくらはぎの筋を回収し, その凍結切片に対して抗myosin重鎖 (MyHC) アイソフォームモノクローナル抗体を用いた4重蛍光免疫染色を行った<sup>12)</sup>。ヒフク筋のうち, 遅筋型筋線維が豊富な骨側の内側部 (medial head部) の遅筋型・速筋型筋線維の数をそれぞれ測定し (各個体, 合計500—1000本の筋線維), それらの相対的割合 (%) を算出した。有意差の検定はStudent's-tテストにて行った。

### 2.3 衛星細胞初代培養系での解析

3週齢のコントロールマウスおよびSema3A-cKOマウスの後肢大腿部および背部の筋からAllenら<sup>13)</sup>の方法に従い衛星細胞を単離し (純度95%以上), poly-L-lysineとfibronectinで2重コートした培養用プレートに播種した。10%正常ウマ

血清を含むDMEM基礎培地にて3日間培養した後, 5%ウマ血清-DMEMで3日間分化誘導し筋管を調製し, 遅筋型・速筋型MyHCアイソフォーム, myogenin, MEF2Dなどの発現をリアルタイムRT-qPCR (TaqMan Probe法; 内部標準はHPRT) およびWestern blotting (内部標準はβ-actin) により調べた。

これらの遺伝子組み換え実験および動物実験はすべて, 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下実施した (許可番号: No. A26-091, A26-081, A28-091, A28-092)。

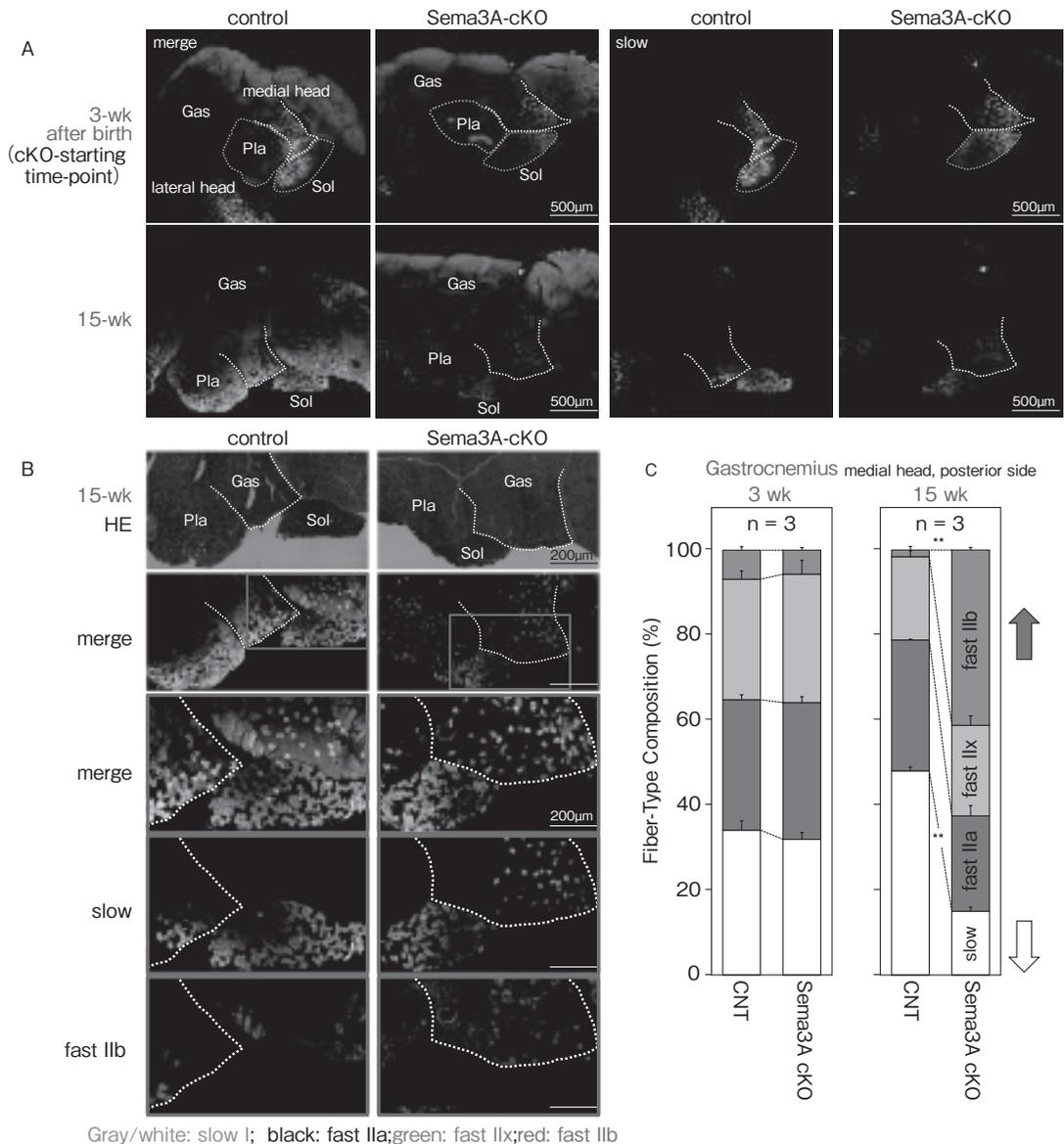
## 3. 結果と考察

### 3.1 筋成長期のSema3A-cKOが遅筋型筋線維形成に及ぼす影響: *in vivo*実験 (Fig. 1)

筋の成長期にある3週齢で衛星細胞特異的にSema3AをcKOすると, 成熟期 (15週齢) のヒフク筋の遅筋型筋線維割合 (%) が有意に減少し, 超速筋型であるIIB型筋線維の割合が代替的に増加した (Fig. 1A, 1B, および1Cの右側のグラフ;  $p < 0.01$ )。cKOを開始した3週齢では, 筋線維型組成にコントロール区とSema3A-cKO区間で有意な差は認められなかったことから (Fig. 1Cの左側のグラフ), 上記の筋線維型組成変化は, 筋成長期のSema3A発現のcKOに起因することが明確になった。したがって, 衛星細胞が合成・分泌するSema3Aは, 筋成長期の遅筋型筋線維の形成に重要な因子であることが明らかになった。

### 3.2 Sema3A-cKOが遅筋型myosin発現に及ぼす影響: *in vitro*実験 (Fig. 2)

上記の*in vivo*実験結果をさらに検証するため, 3週齢のコントロールマウス (タモキシフェン非投与のPax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>lox</sup>マウス) およびSema3A-cKOマウス (タモキシフェン投与のPax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>lox</sup>マウス) から単離した衛

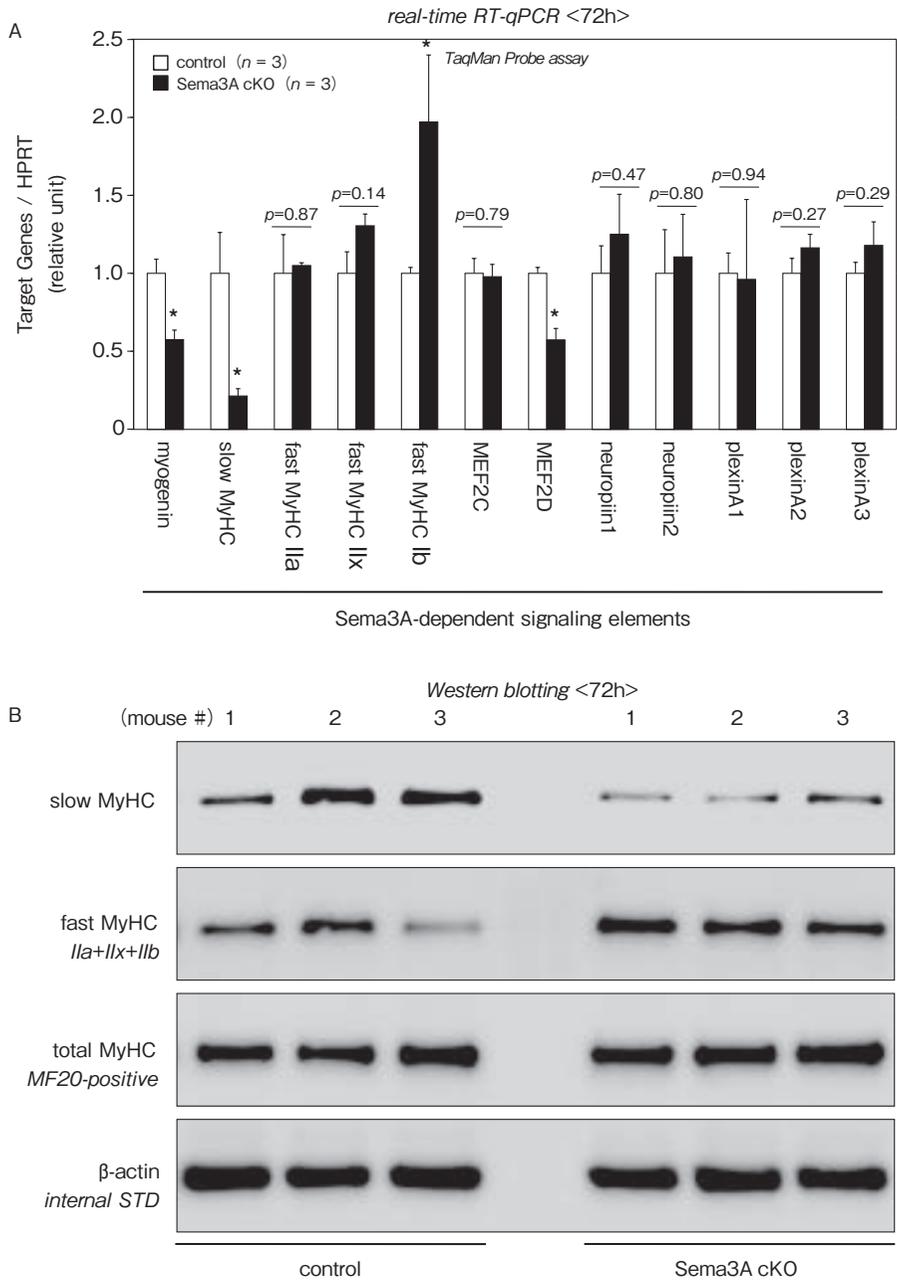


**Fig. 1** Sema3A-cKO abolishes slow-fiber generation during postnatal muscle growth. (A)

Demonstration of quadruple MyHC-immunofluorescence. Merged and slow-MyHC views photographed under the Tile-Scan program at 3 wks and 15 wks after birth (calf muscles of Sema3A-loxP controls and Pax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>fllox</sup> Sema3A-cKO mice). Gas, gastrocnemius; Pla, plantaris; Sol, soleus muscles. (B)

MyHC-immunofluorescence of calf muscle (posterior side) at 15 wks. First and second rows display representative low-magnification views of HE-staining and merged immunofluorescence, respectively; lower micrographs show magnified views of boxed areas (medial head region of the muscle). (C)

Slow fibers (type I) and fast fibers (types IIa, IIx, and IIb) were counted for medial head region of gastrocnemius and expressed as relative ratios (percentages). Bars depict the mean  $\pm$  SEM for three mice in each group and significant differences from control at  $p < 0.01$  are indicated by (\*\*).



**Fig. 2** Evaluation of Sema3A-cKO effect in primary cultures of satellite cells. Satellite cells were prepared from control (Pax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>lox</sup> without tamoxifen-i.p. injection) and Sema3A-cKO mice (Pax7CreER<sup>T2</sup>-Sema3A<sup>lox</sup> with tamoxifen i.p.), and maintained in proliferation medium (DMEM-10%HS) for 72 h and in differentiation medium (DMEM-5%HS) for the next 72-h period. Cultures were evaluated by RT-qPCR for mRNA expression levels of myogenin, slow MyHC, fast MyHC types IIa, IIx, and IIb, MEF2C, MEF2D, neuropilin1, neuropilin2, and plexinA1-3 (A) and by Western blotting for protein expression of slow MyHC, total fast MyHC (IIa, IIx, IIb), total MyHC (pan MyHC, MF20 antibody-positive) (B). Bars depict the mean and SEM (3 mice per group) as arbitrary units relative to the mean of the control. Significant differences from the control (open bars) at  $p < 0.05$  are indicated by (\*).

星細胞の初代培養系にて、筋線維型のマーカー分子である遅筋型・速筋型MyHCの発現変化を調べた。幼若な筋線維の形成期にあたる分化誘導後3日目の細胞試料に対してRT-qPCR解析を行ったところ、遅筋型MyHC発現の減少と超速筋型MyHC (Iib) の発現増加が認められた (Fig. 2A;  $p < 0.05$ )。これらの結果は、Fig. 2Bに示したWestern blottingの結果、すなわち、遅筋型MyHCタンパク質の減少と速筋型myosin重鎖タンパク質の代替的増加 (IIa, IIx, Iibの合成量) と一致するとともに、先のFig. 1の結果ともよく符合した。また、Sema3A-cKOによってもSema3A細胞膜受容体であるneuropilinとplexinAの発現量は変化しない一方、転写制御因子群myogeninおよびMEF2DのmRNA発現が有意に減少したことから (Fig. 2A;  $p < 0.05$ )、筋再生と同様に筋成長においてもSema3Aリガンド→細胞膜受容体→myogenin/MEF2D→遅筋型MyHCのシグナリング軸により遅筋型筋線維の形成が誘導されていると考えられた。

以上の結果から、筋の成長期において、衛星細胞が合成・分泌するSema3Aによって遅筋型筋線維の形成が誘導されていることが明らかになった。また、細胞内シグナリングには細胞膜受容体とその下流因子であるmyogeninおよびMEF2Dが関与すると考えられた。したがって、Sema3A細胞膜受容体のアゴニストによって遅筋型筋線維の形成を促進できると期待され、前述の食品成分 (ポリフェノール) のアゴニスト活性およびその摂餌効果を早急に実証する必要がある。

#### 4. 要 約

遅筋型筋線維は速筋型に比べて直径が小さく、脂肪が沈着しやすい他、旨味成分や機能性栄養成分の含量が高いことが知られている。本研究では、先行研究で見出したリンゴポリフェノールの

有効性に着目し、そのサプリメント給餌によって遅筋型筋線維の割合を増やし食肉特性を向上させることを指向した。これを実現するため、まず、「筋の成長期における遅筋型筋線維の形成機構」を明らかにすることを目的とした。筋成長期にある生後3週齢のマウスを用いて、筋幹細胞 (衛星細胞) 特異的にSema3Aの合成・分泌をノックアウト (cKO) すると、成熟期 (15週齢) のヒフク筋の遅筋型筋線維割合が有意に減少し、速筋型筋線維 (Iib型) が代替的に増加した。3週齢のSema3A-cKOマウスから単離した衛星細胞の初代培養系においても、遅筋型筋線維のマーカーである遅筋型myosin重鎖の発現低下および速筋型myosin重鎖 (Iib型) の増加が認められた。また、転写制御因子群myogeninおよびMEF2Dの発現が有意に減少したことから、筋再生と同様に筋成長においてもSema3Aリガンド→細胞膜受容体→myogenin/MEF2D→遅筋型myosin重鎖のシグナリング軸により遅筋型筋線維の形成が誘導されていると考えられた。したがって、Sema3A細胞膜受容体のアゴニストによって遅筋型筋線維の形成を促進できると期待されるので、前述の食品成分 (リンゴポリフェノール) のアゴニスト活性およびその摂餌効果を早急に検証する予定である。

研究成果は食肉生産科学の他、加齢筋医科学・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を向上させる技術開発に資すると期待される。また、脂肪酸を $\beta$ 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) Sakaguchi, S., Shono, J., Suzuki, T., Sawano, S., Anderson, J. E., Do, M.-K. Q., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sato, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Yamada, K., Ikeuchi, Y., Tatsumi, R. : *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **54**, 272~285, 2014.
- 8) Do, M.-K. Q., Shimizu, N., Suzuki, T., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Nakamura, M., Sawano, S., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *Physiol. Rep.*, **3**, e12553, 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.14814/phy2.12553>
- 9) Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y., Anderson, J. E., Sibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Shibata, A., Ojima, K., Nishimatsu, S., Nohno, T., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Nishimura, T., Yagi, T., Allen, R. E. : *Stem Cells*, **35**, 1815~1834, 2017.
- 10) Mizunoya, W., Miyahara, H., Okamoto, S., Akahoshi, M., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohtsubo, H., Komiya, Y., Mu, L., Waga, T., Iwata, A., Nakazato, K., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *PLoS One*, **10**: e0134303, 2015. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0134303>
- 11) Mizunoya, W., Okamoto, S., Miyahara, H., Akahoshi, M., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohtsubo, H., Komiya, Y., Qahar, M., Waga, T., Nakazato, K., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, **88**, 489~499, 2017.
- 12) Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ohkawa, Y., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y., Mizunoya, W. : *PLoS One*, **11**, e0166080, 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0166080>
- 13) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. M. : *Methods in Cell Biol.*, **52**, 155~176, 1997.

# 粗飼料サイレージの発酵品質改善のための サイレージ密度計測手法の開発

Development of silage density measurement method for improving  
fermentation quality of forage silage

大越安吾

(地方独立行政法人北海道立総合研究機構農業研究本部根釧農業試験場)

Ango Ohkoshi

(Hokkaido Research Organization, Agricultural Research Department Konsen  
Agricultural Experiment Station)

In order to improve fermentation quality of forage silage, it is important to increase the density of forage material during filling into silo. As a method of checking silage filling degree, there is a method of measuring the silage density after opening the silo. It is said that the most accurate density measurement method is based on weighing after sample collection using a core sampler and drying treatment. However, preparation of instrument and complicated work are necessary, so it is a problem that it can not be used frequently.

In this research, the frictional resistance measurement method was studied as a new density measurement method instead of the core sampler method. In the frictional resistance measurement method, each frictional resistance is measured with respect to a silage cross section in three ways. The first is the penetration resistance when stabbing the shaft in the silage, the second is the torque resistance generated by twisting the shaft, and the third is the pulling resistance generated when pulling out the shaft. Firstly, a total of 25 types of shafts with 5 type diameters and 5 type tip angles were manufactured, and a test for determining the shaft specification was conducted. A shaft standard with a diameter of 12 mm, a tip angle of 15°, and an effective length of 250 mm + tip length was selected.

Measurement of frictional resistance on silage samples of pasture and feed corn with variable moisture content revealed that there were no correlations, although approximation formulas of linear functions with gentle slope were obtained with respect to the wet matter density. In dry matter density, all three methods obtained approximate expressions on the exponential function and the correlation was very high. Especially, the accuracy of the torque resistance was higher than the penetration resistance and the pulling resistance. Although the correlation with the wet density was high with the core sampler method, it was found that the correlation was low and the measurement error was large in the dry matter density.

From the above, it was found that the frictional resistance measurement method has a very high correlation with dry matter density of silage, and the measurement accuracy is in order of torque resistance > penetration resistance, drawing resistance > core sampler method.

## 1. 目 的

牧草や飼料トウモロコシなど粗飼料は国内で自給可能な飼料であり、近年の飼料穀物相場の高騰により、国策として飼料自給率の向上が掲げられている。これら粗飼料の大半はサイレージとして給与されている。営農規模の拡大によりサイレージの品質低下の件数割合が10年前から倍増していることから、サイレージの品質改善は急務の課題である。湿潤な気候である日本では、十分な予乾が行えないことでサイレージ調製が困難であることが意外に知られていない。サイレージの発酵品質に影響する要因には、「原料草の品質」「適正水分での収穫」「異物混入の抑制」「十分な踏圧」「迅速な密封」「添加剤の適切な利用」などが挙げられるが、中でも粗飼料の踏圧不足による粗飼料の低密度が引き起こす発酵不良が挙げられる。粗飼料サイレージは、収穫した粗飼料をサイロ内で十分に踏圧し密度を高めることで、嫌気性細菌である乳酸菌の働きにより良質なサイレージとなる。十分な乳酸発酵をさせたサイレージは、サイロの開封以降もサイレージ品質が安定的に確保される<sup>1)</sup>。しかし、近年では収穫作業機が大型化・高能率化し、コントラクターなどの外部支援組織による作業代行が進んだことで収穫作業能率は向上したが、踏圧作業などの調製作業能率が停滞していることで、両者の作業能率にずれが生じている。このため、サイロ内では踏圧不足により粗飼料が低密度化し乳酸菌以外の菌の増殖を助長し、発酵不良の原因となっている。踏圧の重要性が軽視されており、かつ具体的な基準が存在していなかった状況に対し、本研究の担当者はサイロ内の適正な踏圧程度の指標として、サイロ容積に対して充填すべき粗飼料容量を指数化した踏圧指標「圧縮係数」を制定し<sup>2)</sup>、サイレージの発酵品質の向上に大きく寄与した<sup>3)</sup>。これを基に農業改良

普及センターなどの営農指導組織は、サイレージ調製時に粗飼料の充填程度を計測することで踏圧作業の過不足を検証し営農指導を行っている。しかし最近では、作業を効率化するためにサイロでの調製作業の中盤までは収穫作業速度を優先し、踏圧不足な状態で粗飼料をサイロに充填し、終盤に踏圧作業を念入りに行うことで所定の踏圧指標を達成させる不適切な事例が多発し、再びサイレージの発酵品質が低下し始めている。このため、サイロ開封後のサイレージ密度を計測することで、踏圧状況を把握し、営農指導することが行われ始めている。

細切サイレージの密度計測法には、所定の部位を掘削し、重量/容量を計量する手法<sup>4)</sup>や取り出し機械による大まかな密度計測法<sup>5)</sup>がある。ロールベールサイレージの密度計測法として、先端部をナイフ状に加工したシャフトをフォースゲージに接続した器具で現物密度の高・低を定性的に表現する手法も示されている<sup>6)</sup>が、直径5~10cmのコアサンプラーによる部分掘削・重量/容量計量手法<sup>7)</sup>が広く利用されている。コアサンプラー法には、手動方式と、電動ドリルによる電動方式があるが、双方とも取扱いが煩雑で計測に時間がかかることや、発電機等の備品が必要であること(手動式は平成27年に販売終了)など利用上の制約が多いため、一部の研究機関や営農指導組織が限定的に利用するに留まっている。これら営農指導組織からは現行のコアサンプラー法に替わる新機軸の密度計測手法の開発が要望されている。

本研究で新たな密度計測法として検討する摩擦抵抗計測法は、サイレージに対して検出器であるシャフトの貫入時、引抜時、シャフトのねじり時の各種抵抗力からサイレージ密度を推定する手法であり、サイレージ密度との関連性を明らかにすることで、簡易かつ精度の高い非破壊型サイレージ密度計測手法を検討する。

## 2. 方 法

### 2.1 計測方法および計測機の選定

粗飼料サイレージの乾物密度（または現物密度）を推定するための手法開発として、シャフトを対象物に「貫入」「貫入状態でのねじり（以降、トルクとする）」「引抜」時の最大応力を計測するため、貫入・引抜の抵抗計測には高荷重用デジタルフォースゲージ（IMADA製ZPH-5000N）を使用した。トルク抵抗計測にはトルクドライバー（東日製FTD200CN2-S）とシャフトを接続するためのドリルチャックを使用した。

### 2.2 検出用シャフトの製作および選定試験

#### <検出用シャフトの製作>

検出用シャフトは、貫入・引抜・トルク計測を兼用とし、高強度で軽量、かつ切削性に優れるジェラルミン製丸棒を採用した。シャフトの規格選定のため、直径5mm、8mm、10mm、12mm、15mmの丸棒を350mmごとに切断し、先端部の円錐角を15°、30°、60°、90°、120°に調整加工したシャフト25種を製作した。円錐部末端を起点としてシャフト円柱部に対し50mmごとに目印用の切削加工を施した。

#### <検出用シャフトの選定>

チモシー主体・1番草サイレージ（GS1）が貯蔵されているバンカーサイロにおいて、乱されていないサイレージ断面のうち、低密度（サイロ上部）および高密度（サイロ中央下部）の2カ所に対して、検出用シャフト各種を先端円錐部の貫入抵抗計測から以降50mmごとに貫入抵抗およびトルク抵抗を計測、シャフト円柱部を250mmまで貫入した後、引抜抵抗を段階的に計測した。各種計測値の範囲と抵抗値が描く線形形状、計測時の状況から、検出用シャフトの規格および貫入深を決定した。

### 2.3 サイレージ密度（現物・乾物）およびコアサンプラー法との比較検証

前項で決定した検出用シャフトを用いて、バンカーサイロから採取したチモシー主体・1番草サイレージおよび飼料用とうもろこしサイレージ（CS）を、30～35℃の中低温で段階的に風乾処理し、異なる水分のサイレージサンプルを調製した（GS1の水分23.9%、45.3%、63.3%、70.4%、80.3%。CSの水分16.2%、44.8%、59.2%、66.1%、70.0%）。内寸法102×103×400mm、有効内容量4202mlの筐体に、重量を可変したサイレージサンプルを段階的に充填し、筐体側面部に施した開口部からシャフトを貫入し、貫入・引抜・トルクの各抵抗値を各々3反復ずつ計測した。併せて、内寸法66mm、外寸法69mm、有効深200mmの電動式コアサンプラーを用いたコアサンプラー法による密度計測を3反復ずつ行った。筐体充填物の状態を現物密度および乾物密度の真値として、摩擦抵抗計測3手法と3種のサイレージの現物密度および乾物密度との相関性および検量線の精度、計測手法自体の計測精度の比較・検証を行った。併せて、コアサンプラー法についても同様の処理を行い計測精度の比較・検証を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 検出用シャフトの選定

まず、高密度のサイレージ断面に検出用シャフト候補25種類を貫入したところ、直径5mmと8mmでは、貫入時に検出用シャフトが座屈もしくは曲がる可能性が確認された。直径15mmでは先端角全域において貫入抵抗が500N以上に達した。直径10mmの先端角が60°以上、直径12mmの先端角が90°以上においても同様に貫入抵抗が500N以上に達し、貫入作業が困難であった。また、貫入時の抵抗値は、先端角が鋭角上であれば直線上の形状を示すが、鈍角上では対数関数上の線形形状を示す

ことから、先端部が貫入部分を乱している可能性が確認された。先端角30°以下では貫入時の反復計測による誤差が比較的小さく、先端角15°で最小となった。検出用シャフトの貫入長が深くなるに連動して貫入抵抗、引抜抵抗、トルク抵抗とも抵抗値が増加した。土質力学分野では、軟弱地盤への貫入抵抗時の挙動研究において土壌の固さを示すコーン指数が存在し、先端角に対し補正係数を乗じることで対応できることが示されているが<sup>8)</sup>、粗飼料では土壌以上に貫入部分の乱れが生じるため、検出用シャフトの規格を決定した方が効率的と判断した。

以上の結果から、検出用シャフトの形状は、先

端円錐角15°、直径12mm、有効貫入深250mm+先端部長が適当と判断した (Table 1)。

### 3.2 サイレージ密度 (現物・乾物) および慣行法との比較検証

原料水分を可変させたチモシー主体・1番草サイレージおよび飼料用とうもろこしサイレージを所定の筐体に充填して、任意の密度条件のもとで、摩擦抵抗3種の検量線を作成した。筐体中のサイレージ密度を真値と設定した場合、サイレージの現物密度と摩擦抵抗3手法には一定の傾向が見られたが、相関の高い近似式は存在しなかった (図表省略)。筐体中のGS1およびCSの乾物密度と摩擦抵抗3計測法との関係を精査したところ、3

Table 1 Shape selection test of detection shaft

shaft form			maximum friction resistance value			standard deviation			by penetration		
diameter (mm)	tip angle (°)	penetration length (mm)	penetration (N)	pull (N)	torque (cN·m)	penetration	pull	torque	measurement magnification	possibility bend or buckling	liner form
15	15	250 + tip	732	443	333	26	31	6	6.0	N	straight
	30		622	386	288	64	17	10	3.5	N	straight
	60		818	286	207	146	31	12	16.0	N	logarithm
	90		859	225	200	44	65	0	3.2	N	logistic
	120		981	239	195	134	40	5	8.3	N	logarithm
12	15	250 + tip	494	346	192	21	6	8	8.2	N	straight
	30		494	300	173	34	14	6	6.1	N	straight
	60		628	243	138	102	14	6	6.5	N	straight
	90		696	199	117	130	47	6	9.3	N	logarithm
	120		745	192	120	99	15	10	6.1	N	logarithm
10	15	250 + tip	415	278	117	27	33	3	8.4	N	straight
	30		402	242	125	56	27	9	3.7	N	straight
	60		469	239	112	53	4	8	3.4	N	logarithm
	90		504	180	81	61	4	1	5.8	N	logarithm
	120		518	156	100	39	31	4	4.8	N	logarithm
8	15	250 + tip	279	204	69	6	3	2	6.2	Y	straight
	30		201	149	55	12	7	1	5.6	Y	straight
	60		279	135	60	48	12	0	1.8	Y	logarithm
	90		355	118	41	97	27	1	7.1	Y	straight
	120		400	110	35	49	17	0	5.8	Y	logarithm
5	15	250 + tip	151	121	25	10	9	1	4.8	Y	straight
	30		138	114	41	7	2	3	3.9	Y	logistic
	60		128	97	30	33	12	1	1.1	Y	logistic
	90		164	78	13	6	7	1	5.1	Y	logarithm
	120		152	66	20	21	16	2	3.4	Y	logarithm
passing grade			<500	-	-	<50	<50	<50	<8	N	straight

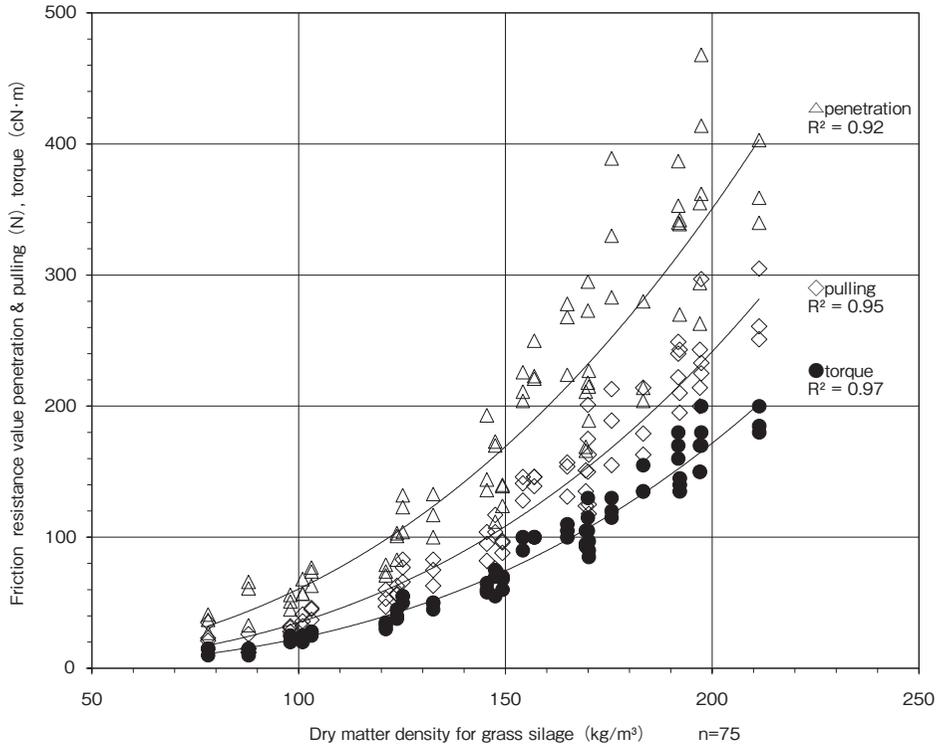


Fig. 1 Dry matter density of grass silage by three types of frictional resistance method.

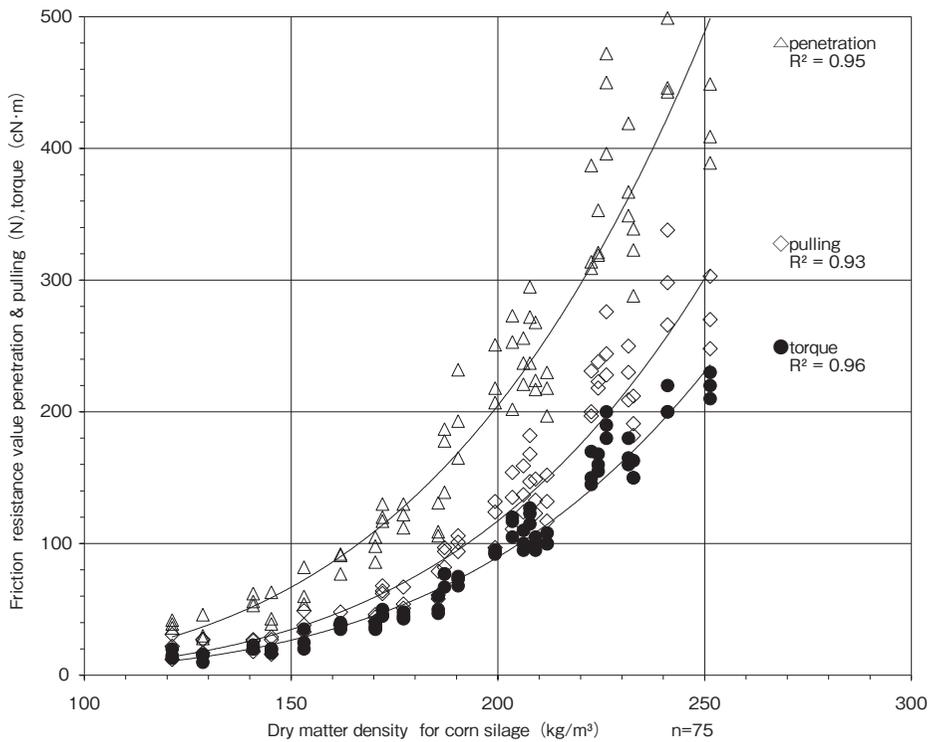


Fig. 2 Dry matter density of corn silage by three types of frictional resistance method.

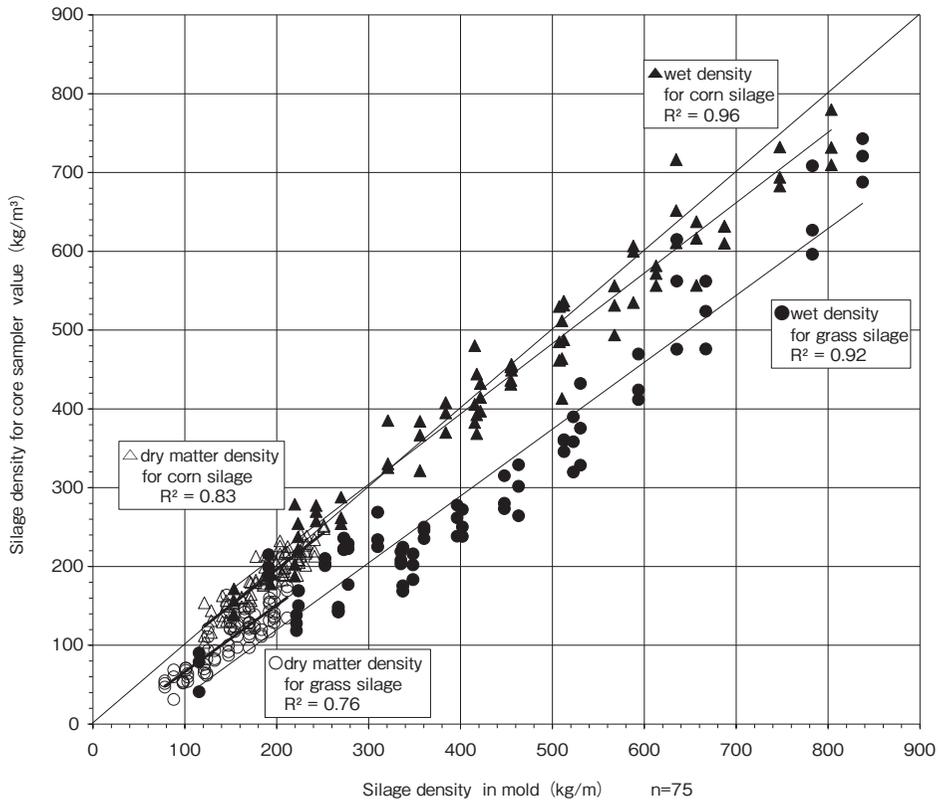


Fig. 3 Density measurement by core sampler method for grass and corn silage.

種とも非常に高い相関が確認された (Fig. 1, Fig. 2)。また、GS1とCSでは検量線の幅がずれることも判明したが、各々単体での検量線は、非常に精度の高い二次曲線が得られた。コアサンプラー法による筐体中のサイレージ密度計測では、双方の現物密度との相関が非常に高いことが確認されたが、乾物密度においては、相関が低く、特にgrassでは低く推移しており、材料の弾力性が影響しているものと考えられた (Fig. 3)。

各計測法の計測誤差は、各地点に対する3反復計測から算出した変動係数において、トルク抵抗法が最も精度が高いことが判明した (Fig. 4)。貫入抵抗の変動係数が大きくなる理由として、先端部の抵抗が影響しているものと考えられる。また鋭角状の先端であっても貫入経路が少なからず

乱されるため、引抜抵抗においてもその乱れによる誤差が影響したものと考えられる。

筐体中のサイレージの現物密度と摩擦抵抗法3手法にはゆるやかな関係を見出すことはできるが、精度面からは実用性がない水準であった。反面、乾物密度と摩擦抵抗法3手法には、非常に高い相関と精度を見出すことができることから、サイレージに対する摩擦抵抗計測法はサイレージの繊維部分との関連が大きく、水分の影響は受けないと判断された。

以上の結果から、摩擦抵抗計測手法はサイレージの乾物密度と非常に高い相関があり、その計測精度はトルク抵抗>貫入抵抗・引抜抵抗>コアサンプラー法の順序となることが判明した。

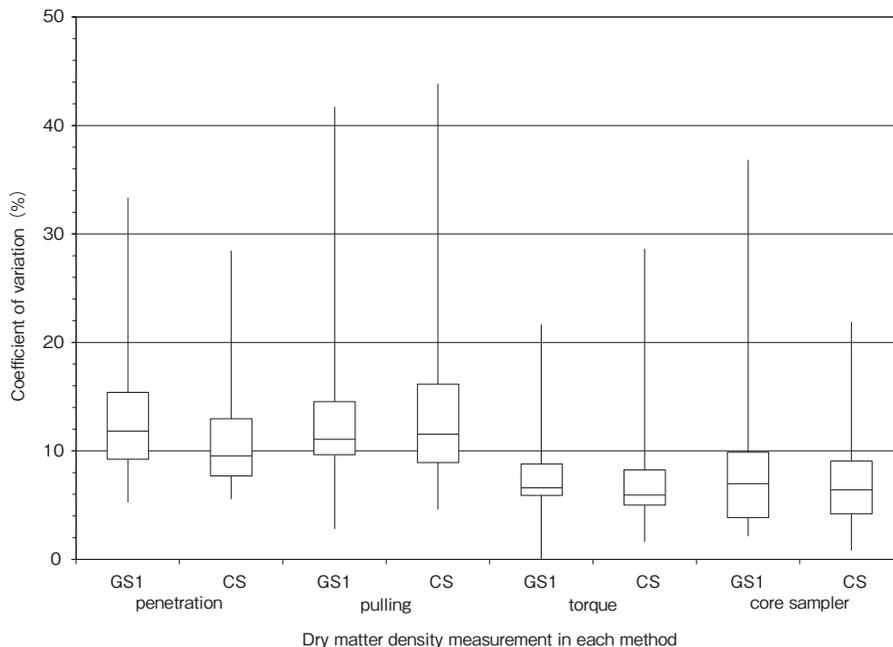


Fig. 4 Measurement error of dry matter density in each method

#### 4. 要 約

粗飼料サイレージの発酵品質の改善のためには、サイロへ充填する粗飼料の密度を高めることが重要である。サイレージの充填程度を把握する方法として、開封後にサイレージ密度を計測する方法がある。最も精度の高い密度計測法は、コアサンプラーを用いたサンプル採取と乾燥処理後の秤量によると言われている。しかし機材の用意と煩雑な作業が必要となるため、頻繁に利用できないことが問題である。

本研究では、コアサンプラー法に替わる新たな密度計測手法として、摩擦抵抗計測法を検討した。摩擦抵抗計測法は、サイレージ断面に対して3手法の摩擦抵抗を計測する。一つ目は、サイレージにシャフトを突き刺した時の貫入抵抗、二つ目はシャフトをねじることで生じるトルク抵抗、三つ目はシャフトを引き抜く時に生じる引抜抵抗である。

まず、直径5種類×先端角5種類で合計25種類のシャフトを製作し、シャフト規格を決定するための試験を行った結果、直径12mm、先端角15°、有効長250mm+先端長のシャフト形状を選定した。水分含量の異なる牧草と飼料トウモロコシのサイレージ試料の摩擦抵抗を測定したところ、3手法とも現物密度に対して緩やかな傾斜を有する線形関数の近似式が得られたが相関はなかった。乾物密度においては、3手法すべてが指数関数上の近似式が得られ、相関も非常に高かった。特に、トルク抵抗は貫入抵抗や引抜抵抗よりも反復時の計測精度も高かった。また、コアサンプラー法では現物密度との相関は高いが、乾物密度においては相関も低く計測誤差も大きいことが判明した。

以上のことから、摩擦抵抗計測手法はサイレージの乾物密度と非常に高い相関があり、その計測精度はトルク抵抗>貫入抵抗・引抜抵抗>コアサンプラー法の順序となることが判明した。

## 文 献

- 1) 坂本登他：梱包サイレージの密度に関する研究，三重県農業技術センター研究報告，8号，91～96，1976.
- 2) 大越安吾：大型バンカーサイロの踏圧法，北海道農業試験成績会議資料，1～29，2005.
- 3) 三浦康雄他：グラスサイレージ調製技術の実証的調査研究・普及とTMRセンター支援，北海道草地研究会報43，5～8，2009.
- 4) Latsch, R. : Density determination of grass silage- Comparison of five measurement methods, *Landtechnik*, 66, no.6, 418～421, 2011.
- 5) 高木正季：サイレージ容積量の実態とその推定法，北海道草地研究会報30，p110，1996.
- 6) 名久井忠他：ドリル式コアサンプラーによるバンカーサイロの簡易密度計測，農研機構新しい研究成果，40～43，1997.
- 7) 服部育男他：ロールバールサイレージの流通促進のための迅速な水分測定手法，日本草地学会誌60(4)，268～274，2015.
- 8) 室町忠彦：静的コーンペネトロメーターの軟弱地盤調査への適用に関する実験的研究，鉄道技術研究報告，No.757，1971.

## 粳米の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術 の実規模での開発（Ⅱ）

Development of commercial based animal welfare friendly broiler  
production system by unhusked rice feeding in Japan（Ⅱ）

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)

This study aimed to investigate the effect of feeding corn-based diet containing 20% unhusked rice (20%-UR) on behaviour and physical and psychological health of broiler chicken. 45 male and 45 female chickens were fed 20%-UR. Their behaviour, fear response to novel object, chronic stress, incidences of dermatitis and dirty body, and quality of litter in their pens were compared with those of chickens fed corn-based diet containing 0% unhusked rice (CORN).

The nitrogen content rates of litter in the pen of male and female chickens fed 20%-UR (%) were lower than that of chickens fed CORN ( $p < 0.01$ ; male: CORN;  $2.91 \pm 0.12$  vs. 20%-UR:  $2.50 \pm 0.08$ ; Female:  $2.77 \pm 0.10$  vs.  $2.46 \pm 0.15$ ). Male chickens fed 20%-UR had lower incidences of severe hock dermatitis and mid-level dirty body, compared with those of male chickens fed CORN ( $p < 0.05$ ). The rate of number of chickens that rested at standing posture was more in male chickens fed 20%-UR than in male chickens fed CORN ( $p < 0.05$ ). Smaller numbers of female chickens fed 20%-UR attempted to contact to novel object ( $p < 0.05$ ; CORN:  $5.4 \pm 4.3$  vs. 20%-UR:  $0.0 \pm 0.0$ ) and vocalized discomfort ( $p = 0.08$ ;  $29.3 \pm 4.4$  vs.  $20.7 \pm 4.5$ ), compared with those of female chickens fed CORN. Female chickens fed 20%-UR tended to have lower plasma corticosterone concentrates (ng/ml) than chickens fed CORN ( $p = 0.08$ ; CORN:  $1.12 \pm 0.70$  vs. 20%-UR:  $0.55 \pm 0.18$ ).

In conclusion, it seems that feeding corn-based diet containing 20% unhusked rice have effects to reduce incidences of hock dermatitis and dirty body, promote activity, and reduce fear response to novel object and chronic stress in the broiler chicken.

### 1. 目的

近年、家畜福祉（AW）の国際規約化が進んでおり、2013年にはOIE（世界動物保健機構）がブロイラーのAW世界基準を作成した。畜産物の国

際流通が加速する中、日本の畜産も国際規約との整合性を保つ必要がある。日本の肉用鶏生産における主な福祉問題は「接触性皮膚炎の重症化」「正常行動（砂浴び行動等）の発現制限」「敷料の質の悪さ」である<sup>1)</sup>。

小原の報告<sup>1)</sup>では、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、コーン配合飼料給与鶏より、活動性(立位休息行動等)が向上、慰安行動(羽繕い)が増加、慢性ストレス指標(偽好酸球/リンパ球比)が低下、趾蹠接触性皮膚炎の発症が軽減、モモ肉、ササミ、筋胃重量が増加した。肉用鶏への米粉配合飼料の給与は、正常行動の発現や心理的および身体的健康性を改善し、生産性の向上にも効果があることから、有効な福祉改善技術となり得る。

しかし、米粉配合飼料はその代謝エネルギーの低さから、油脂をより多く添加する必要がある。多量の油脂添加は、飼料タンク内でのブリッジ現象の原因となるため、米粉配合飼料の実用化に対しては生産現場を中心に懸念が生じている。米粉配合飼料の実用化には、米粉配合率の低率化が鍵となる。低率な米粉配合飼料が肉用鶏の生産性に与える影響に関してはいくつか報告があり、米粉19.5%配合飼料では米粉0%飼料と比較して体重が重く、モモ肉中総アミノ酸含量と筋胃重量割合が多く、飼料要求率を改善するなど<sup>2)</sup>、生産性を向上する効果がある。しかし、低率な米粉配合飼料が肉用鶏の福祉性に与える影響は不明である。そこで、本研究では、肉用鶏に米粉20%配合飼料を給与し、行動発現、心理的および身体的健康性に与える影響を解明することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 飼養方法

日本農産工業株式会社畜産技術センター(茨城)にて、2016年6月28日~8月10日に、チャンキー種肉用鶏、雌雄各120羽を飼養した。0~6日齢(6d)まで、雌雄別にペン(155×118cm)で群飼し、幼雛用飼料と米粉を不断給餌した。7dに雌雄ともコーン60%・米粉0%配合飼料給与区(コーン区)と、コーン40%・米粉20%配合飼

料給与区(米粉区)の2区に45羽ずつ配分し、42dまで平飼いした(4.65㎡/45羽/区)。7~27dには前期飼料(両区ともCP:20.70%, ME:3100kcal/kg)、28~42dには後期飼料(両区ともCP:19.00%, ME:3150kcal/kg)を給餌した。敷料にはオガクズを用い、2週に1度攪拌した。

### 2.2 生産性調査

7d以降1週間おきに体重を計測し(n=45×2×2)、雌雄ごとに区間でt検定を行った。飼料摂食量(g/羽)は、前期・後期飼料の合計飼料製造量から、前期・後期飼料の給与期間終了時の合計飼料残量を引き、羽数/区で除し算出した(n=1×2×2)。日増体重(g/羽/day)は、7~42dの増体重(g/羽)を経過日数で除し算出した(n=1×2×2)。飼料要求率は、7~42dの飼料摂食量を増体重(g/羽)で除し算出した(n=1×2×2)。

### 2.3 行動発現調査

30dの1200h~2100hにビデオカメラで各区を撮影した。撮影期間を2時間ごとの5期間(1200h~, 1400h~, 1600h~, 1800h~, 2000h~)に分け、各期間の初めの30分間を5分間隔の瞬間サンプリングにより観察し、維持行動(摂食、立位休息、伏臥位休息、移動)の発現羽数割合(%)を記録した。各期間の平均値(7データ/期間)を1データとし、統計分析に用いた(n=5×2×2)。5期間の初めの10分間で連続観察を行い、計50分間の慰安行動(砂浴び、羽繕い)および敷料つつき行動の発現回数を算出した(n=5×2×2)。維持行動は雌雄ごとに区間でMann-Whitney's U検定を、快適性行動は $\chi^2$ 検定を行った。

### 2.4 敷料の質の調査

42dに敷料サンプル約100gを5カ所/区で採取した(n=5×2×2)。60℃で2日間敷料を乾燥させ、敷料中水分含有率(%)を算出した。

その後、燃焼法により、全窒素含有率(%;NR)を算出した。各項目にて雌雄ごとに区間でt検定を行った。

## 2.5 身体的健康性調査

アニマルウェルフェア技術研修会テキスト〜ブローラー〜<sup>3)</sup>を基に、40~42dに跛行、羽毛の汚れ、接触性皮膚炎の発生状況を目視で観察した。全個体にて、跛行は「歩行不可能」「明らかに異常」「正常」に、羽毛の汚れは「中度」「軽度」「汚染なし」に、胸部皮膚炎は「炎症あり」「炎症なし」に分類し、各評価の羽数を算出した(n=45×2×2)。膝節および趾蹠皮膚炎は、脚2本/羽を「重度」「軽度」「炎症なし」に分類し、各評価区分の脚数を算出した(n=90×2×2)。各項目にて雌雄ごとに区間で $\chi^2$ 検定を行った。

肝・腎機能や代謝機能評価のため、42dに雌雄各6羽/区にてEDTA-2K採血管を用いて採血した。1500g、4℃、10分間の遠心分離後、血漿を採取し、TP、BUN、CRE、UA、Na、iP、AST、LDH、AMY、CK、 $\gamma$ -GT、T-CHO、TG、NEFA、TBA、GLUを測定した。各項目にて雌雄ごとに区間でt検定を行った。

## 2.6 心理的健康性調査

ストレス条件下での反応性評価のため、Welfare Quality<sup>®</sup> Assessment protocol for poultry<sup>4)</sup>を基に、40dに新奇物への恐怖反応性を調査した。鶏群内に新奇物(NO:黄、青、赤のビニルテープを巻いた50cm長の棒)を置き、設置直後から2分間、10秒間隔の瞬間サンプリングにより、NOから30cm内にいる羽数を計測した。3ヵ所/区で反復測定した。30cm内の羽数の結果から、平常時との個体密度比(30cm内の個体密度(kg/m<sup>2</sup>)/40dでの飼養密度(kg/m<sup>2</sup>))を算出した(n=3×2×2)。雌雄ごとに時間と区間を要因とした二元配置分散分析を行った。また、NO試験時の鶏群の様子をビデオカメラで撮影し

た。NO設置直後から2分間、10秒間隔の1-0サンプリングにより、NOから30cm内にいる個体のうち、NOへの接触を試みた羽数割合(%)を計測し、Mann-Whitney's U検定を行った(n=3×2)。雄の映像に不具合があったため、雌のみ調査した。また、映像内の音声を音声分析ソフトウェア(WaveSurfer, KTH, Sweden)により解析し、NO試験時2分間の発声回数とその音圧を観測した。聴覚で認識できた47dB以上52dB未満の発声と、不快性や興奮性を示す52dB以上の高音圧な発声の回数および持続時間(秒)を計測し、高音圧発声の回数割合(%)と持続時間割合(%)を算出し、区間でt検定を行った(n=3×2)。

慢性ストレス指標である血漿中コルチコステロン(CORT)濃度分析のため、42dに雌雄各6羽/区にてEDTA-2K採血管を用いて採血した。1500g、4℃、10分間で遠心分離後、血漿を採取し、ジエチルエーテルにより抽出し、Corticosterone ELISA Kit (K014-H1, Arbor Assays, USA)によりCORT濃度(pg/ml)を計測した。雌雄ごとに区間でt検定を行った(n=6×2×2)。

## 3. 結果と考察

### 3.1 生産性

体重(g)の結果、雄では42d(コーン区:3394±269 vs. 粳米区:3515±305)、雌は35d(2300±151 vs. 2365±134)と42d(2833±190 vs. 2911±172)に粳米区でコーン区より有意に重かった(p<0.05)。飼料摂食量(g/羽;雄:コーン区:5146 vs. 粳米区:5152;雌:4380 vs. 4470)、増体重(g/羽;雄:3169 vs. 3290;雌:2625 vs. 2702)、日増体(g/羽/day;雄:91 vs. 94;雌:75 vs. 77)は、雌雄ともに粳米区で多かった。飼料要求率は雌雄ともに粳米区で少なかった(雄:1.62 vs. 1.57;雌:1.67 vs. 1.65)。粳

米20%配合飼料の給与により生産性が向上する可能性が示唆された。

### 3.2 行動発現

維持行動発現羽数割合の結果、雄の粳米区ではコーン区より立位休息行動が有意に多く発現した ( $p < 0.05$ )。他の項目では有意差はなかった。雌雄ともに粳米区では羽繕い行動発現回数 (雄: コーン区: 316 vs. 粳米区: 342; 雌: 345 vs. 397) と敷料つき行動回数 (雄: 231 vs. 261; 雌: 248 vs. 280) が多かったが、有意ではなかった。雄の粳米区では砂浴び行動回数がコーン区よりわずかに多かったが (コーン区: 54 vs. 粳米区: 72), 有意ではなかった。粳米20%配合飼料の給与は、羽繕いや砂浴び等の慰安行動、敷料つき行動の発現には大きな影響はないが、活動性を向上させる効果があった。

### 3.3 敷料の質

NR (%) は、雌雄ともに粳米区でコーン区より有意に低かった ( $p < 0.01$ ; 雄: コーン区:  $2.91 \pm 0.12$  vs. 粳米区:  $2.50 \pm 0.08$ ; 雌:  $2.77 \pm 0.10$  vs.  $2.46 \pm 0.15$ )。敷料中の水分含有率は雌雄ともに差がなかった。粳米20%配合飼料の給与は、敷料の質を改善する効果があった。

### 3.4 身体的健康性

膝節の接触性皮膚炎の結果、雄の粳米区ではコーン区より「重度」羽数が少なく、「炎症なし」羽数が多かった ( $p < 0.05$ ; 重度: コーン区: 7羽 vs. 粳米区: 1羽, 炎症なし: 43 vs. 56)。羽毛の汚れの結果、雄の粳米区ではコーン区より「中度」羽数が少なく、「汚染なし」羽数が有意に多かった ( $p < 0.05$ ; 中度: 6 vs. 3, 汚染なし: 1 vs. 9)。他の項目に有意差はなかった。粳米20%配合飼料の給与は、肉用鶏の膝節接触性皮膚炎や羽毛の汚れの軽減に効果があると示唆した。前項のとおり、雌の粳米区では雄同様に敷料の質が改善したが、接触性皮膚炎への影響はな

かった。これは雌雄間の体重と飼育密度の差、雄の粳米区での活動性の向上が要因であると考えられる。体重と膝の皮膚炎には正の相関があり<sup>5)</sup>、高飼育密度は低密度よりも膝や胸の皮膚炎が多い<sup>6)</sup>。本試験では、42 dでの雌雄間の体重差は600 g, 飼育密度差は6 kg/m<sup>2</sup>に及んでいた。雌は雄より体重が軽く、飼育密度が低く、コーン区、粳米区ともに行動が制限されていなかったため、飼料の効果が表れなかった可能性がある。雄の粳米区では活動性が増え、敷料との接触時間が短かったことから、皮膚炎が軽減したと推察される。

血液生化学分析の結果、雄の粳米区ではコーン区より血漿中NEFA濃度 ( $\mu\text{Eq/L}$ ) が高かった ( $p < 0.05$ ; コーン区:  $156.2 \pm 28.5$  vs. 粳米区:  $204.7 \pm 43.7$ )。有意ではなかったが、雌の粳米区でもコーン区より高い値となった ( $p = 0.15$ ;  $117.0 \pm 21.5$  vs.  $141.7 \pm 33.0$ )。他の項目に有意差はなかった。血漿中NEFA濃度は脂質代謝の指標とされ、高脂肪飼料の給与や飼料摂取量の増加により増加するとされている<sup>7)</sup>。本試験の飼料中粗脂肪 (%) は、コーン区 (前期3.6; 後期3.9) より粳米区 (5.9; 6.3) で多かった。粳米区での血漿中NEFA濃度の上昇は、飼料中脂肪分の増加が一因と考えられる。

### 3.5 心理的健康性

NO試験の結果、雌の粳米区ではコーン区よりNO周辺の個体密度比が有意に少なく ( $p < 0.01$ )、30cm内滞在時のNOへの接触試み行動の発現羽数割合 (%) が有意に少なく ( $p < 0.05$ ; コーン区:  $5.4 \pm 4.3$  vs. 粳米区:  $0.0 \pm 0.0$ )、試験期間中の高音圧発声回数割合 (%) ;  $29.3 \pm 4.4$  vs.  $20.7 \pm 4.5$ ) と持続時間割合 (%) ;  $62.6 \pm 12.5$  vs.  $44.8 \pm 4.2$ ) が少ない傾向があった ( $p = 0.08$ )。血漿中CORT濃度 (ng/ml) の結果、雌の粳米区ではコーン区より低い傾向があり ( $p = 0.08$ ; コーン区:  $1.12 \pm 0.70$  vs. 粳米区:  $0.55 \pm 0.18$ )、雄では

個体差が大きく有意ではなかったが、粳米区で低かった ( $1.24 \pm 1.57$  vs.  $0.62 \pm 0.43$ )。粳米は嗜好性が高く<sup>1)</sup>、選り分け行動などの欲求行動(正常行動の一つ)の発現を促進する効果がある<sup>8)</sup>。また、本研究でも、粳米配合飼料の給与は活動性を向上させ、わずかながら慰安行動の発現も促進した。動物の嗜好性や正常行動発現への欲求を満たす飼育環境(エンリッチメント環境)では、慢性ストレスを軽減し、新奇刺激に対する恐怖反応性を緩和させることが明らかとなっている<sup>9)</sup>。粳米20%配合飼料の給与は、肉用鶏の新奇刺激に対する恐怖反応性や慢性ストレスを軽減する効果があり、環境エンリッチメント技術として有効であると考えられた。

### 3.6 総括

全飼料重量比20%の粳米配合飼料は、膝節の接触性皮膚炎や羽毛の汚れの軽減、活動性の向上、新奇刺激に対する恐怖反応性や慢性ストレスの軽減などの効果があり、粳米30%配合飼料の報告<sup>1)</sup>と同様に、肉用鶏の福祉改善技術として有効である。

## 4. 要約

本研究では、粳米20%配合飼料の給与が肉用鶏の行動発現、心理的および身体的健康性に与える影響を解明するため、肉用鶏、雌雄各45羽に粳米0%配合飼料(コーン区)と粳米20%配合飼料(粳米区)を給与した。敷料の質の悪さの指標である敷料中全窒素含有率は、雌雄ともに粳米区でコーン区より有意に低かった ( $p < 0.01$ )。健康性評価では、雄の粳米区ではコーン区より「重度の膝節皮膚炎」「中度の羽毛汚れ」が少なかった ( $p < 0.05$ )。行動調査の結果、雄の粳米区ではコーン区より立位休息行動が有意に多く発現した  $p < 0.05$ )。新奇物への反応性では、雌の粳米区はコーン区より新奇物への接触を試みる羽割割合が有意に少なく ( $p < 0.05$ )、不快性を示す発声の回数割合が少ない傾向があった ( $p = 0.08$ )。慢性ストレス指標である血漿中コルチコステロン濃度 (ng/ml) の結果、雌の粳米区ではコーン区より低い傾向があった ( $p = 0.08$ )。粳米20%配合飼料は、膝節の接触性皮膚炎や羽毛の汚れを軽減し、活動性を高め、新奇物への恐怖反応性や慢性ストレスを軽減する効果がある。

ン区より立位休息行動が有意に多く発現した  $p < 0.05$ )。新奇物への反応性では、雌の粳米区はコーン区より新奇物への接触を試みる羽割割合が有意に少なく ( $p < 0.05$ )、不快性を示す発声の回数割合が少ない傾向があった ( $p = 0.08$ )。慢性ストレス指標である血漿中コルチコステロン濃度 (ng/ml) の結果、雌の粳米区ではコーン区より低い傾向があった ( $p = 0.08$ )。粳米20%配合飼料は、膝節の接触性皮膚炎や羽毛の汚れを軽減し、活動性を高め、新奇物への恐怖反応性や慢性ストレスを軽減する効果がある。

## 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，2015. <http://hdl.handle.net/10097/61423>.
- 2) 龍田健，石川翔：飼料用全粒粉の給与割合がブロイラーの生産性に及ぼす影響，兵庫農技総七研報(畜産) 50：9～14，2014.
- 3) 公益社団法人畜産技術協会：アニマルウェルフェア専門家養成事業アニマルウェルフェア技術研修会テキスト～ブロイラー，2015.
- 4) Welfare Quality®. 2009. Welfare Quality® Assessment protocol for poultry. Welfare Quality® Consortium, Lelystad, Netherlands.
- 5) Broom, D. M., Reefmann, N. : Chicken welfare as indicated by lesions on carcasses in supermarkets, *British Poultry Science*, 46(4), 407～414, 2005.
- 6) Shepherd, E. M., Fairchild, B. D. : Footpad dermatitis in poultry, *Poultry Science*, 89(10), 2043～2051, 2010.
- 7) 秋葉征夫：鶏における脂質代謝の制御，日本畜産学会報，53(7)，449～461，1982.
- 8) 有賀小百合，佐藤衆介：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，平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，34，338～342，公益社団法人伊藤記念財団，東京，2016.
- 9) Reed, H. J., Wilkins, L. J., Austin, S. D., Gregory, N. G. : The effect of environmental enrichment during rearing on fear reactions and depopulation trauma in adult caged hens, *Applied Animal Behaviour Science*, 36(1), 39～46, 1993.

# 代謝性疾患と関連病態の発症におけるスカトール および胆汁酸の役割

Role of skatole and bile acids in development of metabolic diseases

石塚 敏・清水 英寿\*

(北海道大学大学院農学研究院, \*島根大学生物資源科学部)

Satoshi Ishizuka and Hidehisa Shimizu\*

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,

\*Faculty of Life and Environmental Science, Shimane University)

We previously found that an increase in the concentration of skatole originated from high-protein diet in the gastrointestinal tract induces bile acid secretion in rats. A high-fat diet consumption during aging enhances secretion of a primary bile acid, cholic acid. A cholic acid-supplementation without disturbance of bile acid metabolism by intestinal bacteria is considered to mimic bile acid environment under high-fat diet during aging. Such condition successfully induces some aspects of metabolic disorders in our previous observation. Therefore, we investigated the role of skatole on the host health condition. Male Sprague-Dawley rats were fed a diet supplemented with or without skatole for four weeks. The dietary intervention did not affect the food intake and body weight gain. However, the skatole diet induced increased liver weight and enhanced glycogen accumulation. Also, the skatole diet raised proportion of deoxycholic acid in the feces. In contrast, there was a tendency to reduce  $\omega$ -muricholic acid in the feces of the rats fed the skatole diet. These results suggest that an increase of skatole concentration in the digestive tract provokes some disease phenotypes in the host via promotion of 12  $\alpha$ -hydroxylated bile acid proportion.

## 1. 目 的

糞便臭や豚肉の臭みの原因となる3-メチルインドールはスカトールとも呼ばれ、タンパク質に含まれるトリプトファンに由来し、高タンパク質食摂取では消化管内でのスカトールの産生量が増加することが知られている。また、男性ホルモンの一つであるアンドロステロンが肝臓におけるスカトール代謝を抑制するため<sup>1)</sup>、スカトールが蓄積することが結果として豚肉の臭みを増す原因と

なる。近年、スカトールが核内受容体farnesoid X receptor (FXR) の活性を抑制するのみならず逆向きに亢進するインバースアゴニストであることが報告された<sup>2)</sup>。FXRは体内での胆汁酸生合成を負に制御し、胆汁酸が過剰となった場合のネガティブフィードバック機構に寄与している。我々はこれまでに、飼料中へのスカトール添加が胆汁酸分泌増加を引き起こすことを見出した<sup>3)</sup>。胆汁酸は、肝臓においてコレステロールから合成されて脂質吸収に寄与し、その消化管内への分泌は高

脂肪食の摂取により増大する<sup>4)</sup>。

胆汁酸はステロイド骨格に水酸基やカルボキシ基等の親水性の官能基が付与された構造であり、胆汁酸が界面活性剤として作用することが食品成分からの脂質吸収に一役買っている。また、加齢により一次胆汁酸組成はコール酸 (CA) に偏ることが報告されている<sup>5)</sup>。腸内細菌により胆汁酸自体が代謝、すなわち脱抱合化や脱水酸化等を受けることが知られている。CAは腸内細菌により7 $\alpha$ 脱水酸化を受け二次胆汁酸であるデオキシコール酸 (DCA) に変換され、肝臓や大腸におけるガンの発症を促進することが知られている<sup>6)</sup>。加齢に伴う高脂肪食摂取により分泌が増加した場合でも、脱抱合化や7 $\alpha$ 脱水酸化は問題なく進行する。また、消化管内での胆汁酸濃度は最大で数十mMにも昇るため腸内細菌への影響も考えられる。実際、加齢や高脂肪食で生じる胆汁酸代謝を模倣するために胆汁酸を添加した飼料をラットに摂取させると、腸内細菌叢が劇的に影響を受け高脂肪食摂取時の菌叢と極めて類似した状態になることを見出した<sup>7)</sup>。これは肥満における腸内細菌叢攪乱の一部が胆汁酸によることを示唆する結果と考えられる。このように胆汁酸と腸内細菌叢は互いに影響を受けつつ、それぞれが宿主に対して少なからず影響を及ぼすと推察される。

胆汁酸は多様な分子種からなり、動物種により代謝が異なる。したがって、胆汁酸代謝の全貌を正確に把握するためには体内に存在する胆汁酸分子種を精密に測定し、それぞれの分子種の挙動を評価することが必要となる。我々は、臓器や血液、糞便等の生体試料からの胆汁酸を測定するための抽出法を最適化し、約30種類の胆汁酸分子種をLC/MSを用いて一斉分析する方法を確立した<sup>8)</sup>。この方法を用いれば、生体内の胆汁酸代謝の網羅的解析が可能である。

加齢に伴う高脂肪食摂取で分泌が増加する一次

胆汁酸であるCAを食餌に添加することで、この時の胆汁酸環境のみを模倣する系ができると推察した。飼料中のCAの添加濃度を変えて消化管内容物や糞便中の胆汁酸濃度を測定し、腸内細菌叢による胆汁酸代謝を阻害しない添加量を確定し、その条件で長期間飼育することで宿主の状態を評価したところ、CA摂取で腸内細菌叢の多様性減少が観察される以外にも、脂肪肝や消化管粘膜のバリア機能の脆弱化などの異常が観察された (投稿中)。このことは高脂肪食で生じる程度の消化管への胆汁酸分泌増加が結果として一種の未病状態を作り出すことを示している。そこで本研究では、消化管内でのスカトール濃度の増加が、胆汁酸負荷で観察される未病状態を誘導し得るか否かを検証した。

## 2. 方法

### 2.1 ラットを用いたスカトール添加食摂取実験

Sprague-Dawley系ラット (5週齢雄性) にAIN-93Gに準拠した基本飼料を与え5日間の予備飼育後、基本飼料または0.025%スカトールを含む飼料 (Table 1) を摂取させた群 (各n = 11) として4週間の試験期間を設定した。試料を自由摂取として、試験期間終了時に一晚採糞を行った。解剖時に麻酔下で採血した後、放血致死させた。各種臓器を採取して重量測定をした。血漿を分離してトリグリセリドおよびコレステロールを測定した。また、肝臓サンプルについて、クロロホルム:メタノール (2:1) で抽出して溶媒を除去した後トリグリセリドおよびコレステロールを測定した。また、フェノール硫酸法を用いて肝臓グリコーゲン測定した。

### 2.2 糞便中胆汁酸の分析

採取した糞便を凍結乾燥粉末とした後にnordeoxycholic acid (23-nor-5 $\beta$ -cholanolic acid-3

Table 1 Diet composition

	Control diet	Skatole diet
	g/kg diet	
Corn starch	397.5	397.5
Casein <sup>1</sup>	200.0	200.0
Dextrin <sup>2</sup>	132.0	132.0
Sucrose <sup>3</sup>	100.0	99.75
Soybean oil <sup>4</sup>	70.0	70.0
Cellulose <sup>5</sup>	50.0	50.0
Mineral Mixture <sup>6</sup>	35.0	35.0
Vitamin mixture <sup>7</sup>	10.0	10.0
Choline bitartrate	2.5	2.5
L-Cystine	3.0	3.0
Skatole	—	0.25

<sup>1</sup> NZMP Acid Casein (Fonterra Co-Operative Group Limited, Auckland, New Zealand)

<sup>2</sup> TK-16 (Matsutani Chemical Industry Co., Ltd., Hyogo, Japan)

<sup>3</sup> Nippon Beet Sugar Manufacturing Co., Ltd., Tokyo, Japan

<sup>4</sup> J-Oil Mills, Inc., Tokyo, Japan

<sup>5</sup> Crystalline cellulose (Ceolus PH-102, Asahi Kasei Chemicals Corp., Tokyo, Japan)

<sup>6</sup> AIN-93G Mineral Mix (MP Biomedicals, USA)

<sup>7</sup> AIN-93VX Vitamin Mix (CLEA Japan, Inc., Tokyo, Japan)

$\alpha$ , 12  $\alpha$ -diol) を内部標準として添加し, エタノール抽出したものをさらに固相抽出した。各胆汁酸組成の分析にはAquity UPLC BEH column (100 x 2.0mm i.d., 1.7  $\mu$ m thickness, Waters) および LC/MS (Acquity UPLC System, Quattro Premier XE, Waters) を用い, 30種の胆汁酸分子種を分析した<sup>8)</sup>。検出定量された分子種はCA (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 7  $\alpha$ , 12  $\alpha$ -triol),  $\alpha$ -muricholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 6  $\beta$ , 7  $\alpha$ -triol,  $\alpha$  MCA),  $\beta$ -muricholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 6  $\beta$ , 7  $\beta$ -triol,  $\beta$  MCA),  $\omega$ -muricholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 6  $\alpha$ , 7  $\beta$ -triol,  $\omega$  MCA), ursodeoxycholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 7  $\beta$ -diol, UDCA), DCA (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 12  $\alpha$ -diol), lithocholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ -ol, LCA), ursocholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 7  $\beta$ , 12  $\alpha$ -triol, UCA), 7-oxo-deoxycholic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ , 12  $\alpha$ -diol-7-one, 7oDCA), 12-oxo-lithocholic

acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-3  $\alpha$ -ol-12-one, 12oLCA) and 3-oxo-12  $\alpha$ -5  $\beta$ -cholanolic acid (5  $\beta$ -cholanolic acid-12  $\alpha$ -ol-3-one, 3o12  $\alpha$ ) であったため, これらをモル百分率として示した。

### 2.3 統計解析

数値は平均値および標準誤差として示した。有意水準を5%としてStudent's *t*-test (JMP ver. 12.2.0, SAS institute) を用いて群間比較を実施した。

### 3. 結果と考察

スカトール添加食の摂取実験では, 摂食量および体重に群間差は見られなかった (Table 2)。興味深いことに, スカトール摂取により肝臓重量に増加が見られた一方, 腎臓と精巣上体脂肪の重量に群間差は見られなかった (Table 3)。別途実施したCA負荷実験では, トリグリセリドとコレステロール蓄積を伴う脂肪肝が観察されたことから, 本研究でもこれらの測定を行うとともに, 肝

**Table 2** Growth parameters of the rats fed control diet or the skatole-supplemented diet for four weeks

	Initial body weight (g)	Total food intake (g)	Final body weight (g)
Control diet	161.2 ± 2.0	361.5 ± 5.3	577.3 ± 6.5
Skatole diet	162.7 ± 1.6	368.4 ± 5.5	565.2 ± 9.9

Values are shown as mean ± SEM (n = 11).

**Table 3** Organ weights of the rats fed control diet or the skatole-supplemented diet for four weeks

	Liver (g/100 g BW)	Kidney (g/100 g BW)	Epididymal fat (g/100 g BW)
Control diet	4.11 ± 0.09	0.65 ± 0.01	1.71 ± 0.09
Skatole diet	4.71 ± 0.14*	0.64 ± 0.02	1.83 ± 0.13

Values are shown as mean ± SEM (n = 11).

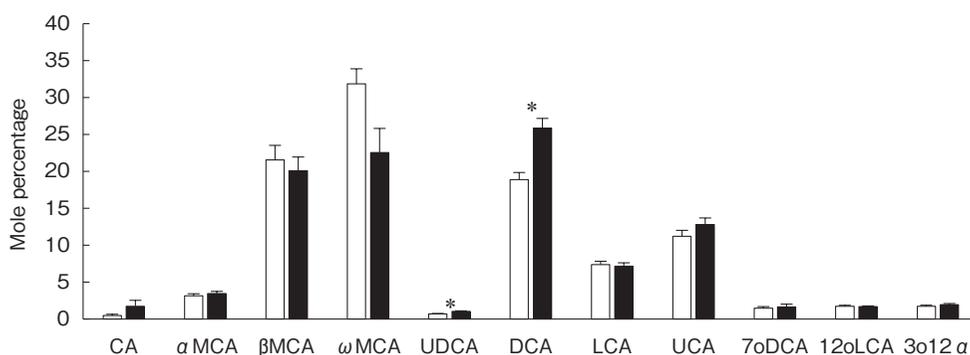
\*Significant difference versus the values in control diet (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).

**Table 4** Accumulation of triglycerides, cholesterol, and glycogen in the liver of the rats fed control diet or the skatole-supplemented diet for four weeks

	Triglycerides (mg/liver)	Cholesterol (mg/liver)	Glycogen (mg/liver)
Control diet	330.0 ± 34.3	39.9 ± 1.6	829.5 ± 73.8
Skatole diet	293.0 ± 41.3	56.1 ± 9.5	1079.0 ± 70.4*

Values are shown as mean ± SEM (n = 11).

\*Significant difference versus the values in control diet (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).



**Fig. 1** Composition of fecal bile acids in the rats fed control diet and the skatole-supplemented diet. Open and closed bars represent the values in the rats fed control diet and the skatole-supplemented diet, respectively. The values are means ± SEM (n = 11). Asterisks show significant difference from control (Student's *t*-test,  $P < 0.05$ ).

臓に蓄積し得るエネルギー源としてグリコーゲンを測定した。その結果、トリグリセリドおよびコレステロールには差が見られなかったにもかかわらず、グリコーゲンについてはスカトール摂取群で有意な増加が観察された (Table 4)。血漿中の

トリグリセリドとコレステロールについても差は見られなかった。これらのことから、スカトールは肝臓へのグリコーゲンの蓄積を増加させた結果、肝臓重量の増加を引き起こしたことが推察された。

糞中の胆汁酸組成を見ると、スカトール添加食群ではDCAとUDCAの比率が有意に増加した(Fig. 1)。中でもDCAの増加は著明であり、スカトール摂取によりCAの分泌増加により、結果として大腸内でのDCA生成比率が増加したと推察された。ラットにおける一次胆汁酸としてはCA以外にケノデオキシコール酸から合成される複数のミュリコール酸(MCA)分子種が知られている。スカトールの摂取ではこれらのミュリコール酸分子種の濃度に有意な群間差は観察されなかったが、 $\omega$ MCA比率が低下する傾向にあった。以前の研究でスカトール摂取ラットの肝臓における胆汁酸生合成関連因子の発現解析を行ったところ、胆汁酸合成の律速酵素である*Cyp7a1*の発現が0.025%スカトール摂取で有意に増加したものの、CA等12 $\alpha$ に水酸基を持つ胆汁酸の合成に関わる*Cyp8b1*発現に有意差は見られなかった<sup>3)</sup>。したがって、スカトール摂取による糞中DCA比率の増加に、必ずしも*Cyp8b1*の発現制御は関与しないと考えられる。血漿中の12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸レベルはヒトでのインスリン耐性と相関があることが報告されている<sup>9)</sup>。もとよりDCAは12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸であることを考慮すると、ガンや各種代謝疾患等の予防を目指すうえで、この12 $\alpha$ 水酸化胆汁酸の生成を減らすという取り組みが重要であると考えられる。

スカトールの生成は食事タンパク質中のトリプトファンに由来することから、食肉をヒトが摂取した結果、体内でのスカトール生成が増加する可能性が考えられる。また、食肉供給のための家畜の管理環境次第では、不必要なスカトールをあらかじめ家畜の体内で増やしてしまうリスクも考えられる。このような食肉を摂取した状況を模倣したスカトールの負荷が、結果としてCAやDCAに代表される12 $\alpha$ 胆汁酸の体内での増加に関わる可能性が重ねて示された。このことは、家畜の健康

を健全に保つことは衛生上の問題だけとして重要なだけでなく、それを食する側の健康維持のリスクにもなり得ることを改めて示す結果と考えられる。

#### 4. 要 約

食餌タンパク質の過剰摂取により消化管内で生成するスカトールが、胆汁酸の分泌増加を引き起こすことをこれまでに見出した。加齢に伴う高脂肪食摂取で分泌が増加する胆汁酸はコール酸である。したがって、腸内細菌による胆汁酸代謝を攪乱しない程度のコール酸胆汁酸の摂取は、加齢・高脂肪食摂取での生体内での胆汁酸環境のみを模倣した状態と考えることができる。この条件が肝脂肪蓄積増加等の代謝疾患に至る未病状態を誘導することから、スカトールの負荷が宿主の状態に及ぼす作用を検証した。Sprague-Dawley系雄性ラットを、対照群とスカトール摂取群に分け、4週間の試験飼育後に解剖を行った。結果として、スカトール摂取は肝臓重量の増加を引き起こすとともに、肝臓グリコーゲン蓄積の有意な増加を引き起こした。糞中胆汁酸の組成をLC/MSで解析したところ、スカトール摂取はデオキシコール酸比率が著しく増加した一方で、 $\omega$ ミュリコール酸比率が低下する傾向を示した。結果として、消化管内におけるスカトール濃度の増加は12 $\alpha$ 胆汁酸比率の増加を引き起こすことで未病状態の形成に関与する可能性が示された。

#### 文 献

- 1) Gray, M. A., Squires, E. J.: Effects of nuclear receptor transactivation on boar taint metabolism and gene expression in porcine hepatocytes, *J Steroid Biochem Mol Biol*, **133**, 110~119, 2013.
- 2) Gray, M. A., Pollock, C. B., Schook, L. B., Squires, E. J.: Characterization of porcine pregnane X receptor, farnesoid X receptor and their splice variants, *Exp Biol Med (Maywood)*, **235**, 718~736, 2010.
- 3) 石塚敏, 清水英寿: スカトールによる胆汁酸代謝

- の攪乱：ヒト・家畜の健康維持を目指したその制御、公益財団法人伊藤記念財団平成26年度食肉に関する女性研究調査成果報告書vol.33, 139~142, 2015.
- 4) Reddy, B. S., Hanson, D., Mangat, S., Mathews, L., Sbaschnig, M., Sharma, C., Simi, B. : Effect of high-fat, high-beef diet and of mode of cooking of beef in the diet on fecal bacterial enzymes and fecal bile acids and neutral sterols, *J Nutr*, **110**, 1880~1887, 1980.
- 5) Uchida, K., Chikai, T., Takase, H., Nomura, Y., Seo, S., Nakao, H., Takeuchi, N. : Age-related changes of bile acid metabolism in rats, *Arch Gerontol Geriatr*, **10**, 37~48, 1990.
- 6) Yoshimoto, S., Loo, T. M., Atarashi, K., Kanda, H., Sato, S., Oyadomari, S., Iwakura, Y., Oshima, K., Morita, H., Hattori, M., Honda, K., Ishikawa, Y., Hara, E., Ohtani, N. : *Nature*, **499**, 97~101, 2013.
- 7) Islam, K. B., Fukiya, S., Hagio, M., Fujii, N., Ishizuka, S., Ooka, T., Ogura, Y., Hayashi, T., Yokota, A. : Bile acid is a host factor that regulates the composition of the cecal microbiota in rats, *Gastroenterology*, **141**, 1773~1781, 2011.
- 8) Hagio, M., Matsumoto, M., Fukushima, M., Hara, H., Ishizuka, S. : Improved analysis of bile acids in tissues and intestinal contents of rats using LC/ESI-MS, *J Lipid Res*, **50**, 173~180, 2009.
- 9) Haeusler, R. A., Astiarraga, B., Camastra, S., Accili, D., Ferrannini, E. : Human insulin resistance is associated with increased plasma levels of 12  $\alpha$ -hydroxylated bile acids, *Diabetes*, **62**, 4184~4191, 2013.

## *Lactococcus*属乳酸菌で調製した発酵乳給与による 離乳子豚の免疫機能の改善と生産性の向上

Feeding milk fermented with a *Lactococcus* strain to weaning piglets  
ameliorates growth performance, but not immune function

守谷 直子・兼松 伸枝・田島 清・成田 卓美・木元 広実

(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)

Naoko Moriya, Nobue Kanematsu, Kiyoshi Tajima, Takumi Narita and Hiromi Kimoto-Nira

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Fermented milk by lactic acid bacteria is expected to have a beneficial effect on not only growth performance but also immune response for weaning piglets. In this study, the effects of fermented milk feeding for 4 weeks on the performance from weaning period to growing period and on the immune function during weaning period were examined. For the preparation of fermented milk, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain J50 was selected from lactic acid bacteria collection of our institute. This strain indicated some probiotic properties, such as tolerance to low pH and bile. Additionally, strain J50 was able to survive in fermented milk at 4°C for 1 week. During weaning period, although dry matter intake of fermented milk fed group (n=6) was significantly increased than that of milk fed group (n=6), there is no significant difference in average daily gain of both groups. Consequently, feed efficiency of fermented milk fed group was significantly lower than that of milk fed group. The piglets of fermented milk fed group were assumed to take 9~13 log<sub>10</sub> cfu of live microorganism every day. White blood cell differentiation and lymphocyte subset of piglets in both groups were similar. IgA and IgG levels in the fecal samples were not different between milk and fermented milk fed piglets. During growing period, dry matter intake and average daily gain of fermented milk fed group was significantly increased than those of milk fed group. It was suggested that fermented milk feeding to weaning piglets stimulated the feed intake during growing period as well as weaning period. The fermented milk may therefore improve the growth performance during growing period.

### 1. 目 的

離乳直後の移行期の子豚は、母豚からの分離や母乳から粉末飼料への摂取飼料の切り替わりなどの生育環境の急激な変化により、しばしば一時的な発育停滞が観察される。また母乳を通して受け

取った移行免疫の抗体値が低下することも知られており、感染性疾患の増加も問題となっている。この時期の発育停滞は生産性を低下させる一因であるが、離乳時期の子豚の飼養管理として液状飼料を給与することは増体の改善に効果があることが知られている<sup>1)</sup>。大塚らは、離乳期の子豚を用

いた試験を行ったところ、粉状の人工乳を給与する場合と比較して、人工乳と発酵乳を混合した液状飼料の給与が飼養成績の改善に有益であったと報告している<sup>2)</sup>。離乳子豚への液状飼料の給与は乾物摂取量を増大させることから、その結果として、腸管絨毛が伸長するなど消化管が健全な状態に保たれ、子豚の成長につながると考えられている<sup>3)</sup>。さらに、発酵乳には乳酸菌が多く含まれることから、乳酸菌が子豚の消化管内でプロバイオティクスとして働くことによる腸内環境の改善や免疫賦活などの効果が期待される。

*Lactococcus lactis*は牛乳中でよく生育することから、昔から乳業用乳酸菌として広く利用されてきた。*Lactococcus*属乳酸菌が、培養細胞系において免疫賦活効果を有することが木元ら<sup>5,6)</sup>により報告されているが、豚の免疫機能に及ぼす影響について調べた報告はない。そこで本試験では、離乳直後の子豚に*Lactococcus*属乳酸菌を用いて調製した発酵乳を給与する試験を行い、離乳期の子豚の成長と免疫機能に及ぼす効果について検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 *Lactococcus*属乳酸菌株の選抜および発酵乳の調製

畜産研究部門の乳酸菌ライブラリーに分離、保存されている*Lactococcus*属乳酸菌<sup>4)</sup>より、乳発酵能を示す9株を選抜した。低pH耐性および胆汁酸耐性試験を実施し、消化管内で生残性が高く、プロバイオティクス効果が期待される*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を、本試験で発酵乳調製に用いる乳酸菌株として選定した。牛乳は畜産研究部門で搾乳された生乳を80℃で30分間殺菌することで調製した。発酵乳は、あらかじめ8%スキムミルクに接種して30℃で24時間培養しておいたJ50株を、殺菌後30℃に冷却し

た牛乳に1% (wt/wt) 添加し、30℃で一晩発酵させることで調製した。牛乳および発酵乳は4℃で保管し、1週間ごとに必要量を調製した。

### 2.2 発酵乳給与試験

試験には母豚2頭の産子であるLWD三元交雑種の雌の離乳子豚12頭を用いた。供試子豚は3週齢で離乳し、28℃に温度制御された動物飼育室の単飼用ケージに収容して4週間の飼養試験を行った。単飼用ケージの上部には子豚の保温のために赤外線ランプを設置した。試験区は牛乳給与区(牛乳区)と発酵乳給与区(発酵乳区)の2区とし、供試子豚を腹、体重が等しくなるように6頭ずつ割り当てた。給与する基礎飼料には抗菌性飼料添加物および生菌剤を含まない市販の人工乳後期用(SDS No.2, フィード・ワン株式会社)を用いた。牛乳区の子豚には、基礎飼料と牛乳を現物比で1:2の割合で混合した飼料を、発酵乳区の子豚には、基礎飼料と発酵乳を現物比で1:2の割合で混合した飼料を、それぞれ9:00と15:00に飽食となるように給与した。

### 2.3 育成試験

発酵乳給与試験終了後の7週齢の雌子豚12頭(牛乳区6頭, 発酵乳区6頭)を、引き続き育成試験に供試した。コンクリート平床式の豚房に1頭ずつ収容して、上部には子豚の保温のために赤外線ランプを設置した。牛乳区、発酵乳区ともに市販の配合飼料を用いた。発酵乳給与試験終了後、各試験区の平均体重が30kgとなるまでパーティクル後期(豊橋飼料株式会社)を飽食となるように給与した。

### 2.4 測定項目

飼料摂取量は、発酵乳給与試験中は毎日、育成試験中は毎週測定した。体重は両試験期間を通じて毎週測定した。発酵乳給与試験前(3週齢)と試験終了後(7週齢)に頸静脈より採血するとともに新鮮糞を採取した。血液については生化学性

状と血液像（江東微生物研究所）を測定した。また単核球を分離した後、CD3, CD4, CD8, CD21, CD335に対する蛍光標識抗体を用いて細胞表面の抗原マーカーを染色し、フローサイトメーター（Gallios, ベックマンコールター株式会社）を用いてリンパ球サブセット割合を測定した。糞便については、免疫グロブリン（IgAおよびIgG）濃度についてELISAキット（Bethyl Laboratories）を用いて測定した。

### 2.5 統計解析

統計解析には、SAS（バージョン9.4）プログラムのGLMプロシージャを用いた。結果は平均値±標準誤差で表した。

## 3. 結果と考察

発酵乳給与試験期間中の飼養成績をTable 1に示した。乾物摂取量（DMI）は、牛乳区に対して発酵乳区で有意に（ $p < 0.01$ ）増加した。平均日増体重（ADG）は牛乳区と発酵乳区で差が認められず、その結果を受けて、飼料効率は発酵乳区において有意に（ $p < 0.01$ ）低下した。また、血液生化学性状をTable 2およびTable 3に示した。3週齢から7週齢へ成長するに伴って、血漿中のカルシウムおよびリン濃度がそれぞれ有意に（ $p < 0.01$ ）変動したが、発酵乳の給与による影響は認められなかった。また、血漿中の総タンパク質、アルブミン含量、アルブミン/グロブリン（A/G）比についても、両試験区に有意な差は認められず、発酵乳給与の影響はなかった。血中の中性脂肪、総コレステロール、HDL-コレステロールおよびLDL-コレステロール濃度は、いずれも3週齢から7週齢へ成長するに伴って有意に（ $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ）低下したが、発酵乳給与による影響は認められなかった。大塚らは、脱脂粉乳または脱脂発酵乳を人工乳に混合して離乳子豚へ給与する試験を行った結果、脱脂

発酵乳の給与によって飼料効率が低下したことを報告している<sup>7)</sup>。本試験の結果は、この大塚らの結果と一致している。発酵飼料の給与により、飼料効率が低下することはよく知られている。この原因としては、発酵過程において乾物やエネルギーの損失が起きている可能性や微生物が産生する有機酸の基質となる糖の損失が影響を及ぼしている可能性などが指摘されている<sup>1)</sup>。本試験ではLactococcus属乳酸菌を用いて牛乳の発酵調製を行ったが、発酵過程においてこれらの損失が起こっていたかどうかは不明である。しかし、血中の総タンパク質、アルブミン含量やA/G比に両試験区で差が認められず、栄養状態に問題はなかったと考えられることから、発酵乳給与区において飼料効率が低下した原因については今後、さらに詳細な検討が必要である。

本試験で給与した発酵乳は、MRS培地中で低pH、胆汁酸に耐性を示し、低温保管後の生菌数が高かったLactococcus lactis subsp. cremoris J50株を用いて調製した。発酵乳のpHは4.2まで低下し、発酵乳中のJ50株の菌数は調製直後において $10.6 \pm 0.5 \log_{10} \text{cfu/g}$ 、1週間貯蔵後において $8.7 \pm 0.4 \log_{10} \text{cfu/g}$ であった。これを給与した発酵乳区の子豚における乳酸菌摂取量は、成長による摂食量の増加に伴って増加し、 $9 \sim 13 \log_{10} \text{cfu/day}$ であった。ヒトでは発酵乳の摂取によって血中コレステロール濃度が低下する保健効果が報告されている。本試験では、血中脂質性状に発酵乳の給与による有意な差は認められなかった。発酵飼料中に含まれる乳酸菌の摂取は、消化管内において大腸菌群の競合阻害に有効で、宿主の消化管環境を健全に保つ効果があると考えられている。

Mizumachiらは、乳酸菌の摂取が離乳子豚の免疫機能の賦活に効果を示したと報告している<sup>8)</sup>。そこで、発酵乳の給与が全身免疫に及ぼす影響を明らかにするために、末梢血中の白血球像と単核

**Table 1** Growth performance of piglets during milk and fermented milk feeding experiment

	milk	fermented milk	<i>P</i> -value
Average daily gain (g/day)	432 ± 17	450 ± 13	ns
Dry matter intake (g/day)	666 ± 25	798 ± 17	<i>p</i> < 0.01
Feed efficiency (weight gain/feed intake)	0.65 ± 0.02	0.56 ± 0.02	<i>p</i> < 0.01

Values are means based on 6 piglets ± SEM. Piglets were fed basal diet with milk or fermented milk for 4 weeks.

**Table 2** Plasma biochemical parameters of experimental piglets

	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	Albumin/ globulin	Calcium (mg/dL)	Phosphorus (mg/dL)
milk					
3weeks old	5.4 ± 0.2	3.6 ± 0.2	2.0 ± 0.2	10.8 ± 0.2	9.6 ± 0.1
7weeks old	5.3 ± 0.1	3.6 ± 0.1	2.2 ± 0.1	10.2 ± 0.1**	11.2 ± 0.2**
fermented milk					
3weeks old	5.5 ± 0.1	3.8 ± 0.1	2.3 ± 0.1	10.9 ± 0.1	9.7 ± 0.2
7weeks old	5.5 ± 0.1	3.8 ± 0.1	2.3 ± 0.1	10.3 ± 0.1**	10.5 ± 0.4**

Values are means based on 6 piglets ± SEM. milk, milk fed group from weaning at 3 weeks old for four weeks; fermented milk, fermented milk fed group during weaning period. The statistical comparisons were made in same colum within each group. \*\* : *p* < 0.01

**Table 3** Plasma lipid profiles of experimental piglets

	Triglycerides (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	LDL cholesterol (mg/dL)
milk				
3weeks old	58 ± 9	174 ± 17	80 ± 3	92 ± 14
7weeks old	33 ± 5*	99 ± 3**	46 ± 1**	49 ± 2**
fermented milk				
3weeks old	53 ± 8	148 ± 11	74 ± 3	71 ± 9
7weeks old	35 ± 5*	92 ± 7**	43 ± 2**	44 ± 5**

Values are means based on 6 piglets ± SEM. milk, milk fed group from weaning at 3 weeks old for four weeks; fermented milk, fermented milk fed group during weaning period. The statistical comparisons were made in same colum within each group. \* : *p* < 0.05, \*\* : *p* < 0.01

球中のリンパ球サブセット比率を測定した。白血球像を測定した結果を **Table 4** に示した。発酵乳の給与による影響や試験期間中の成長に伴う有意な変化は認められなかった。出生直後の子豚の白血球像は好中球優位であるが、生後8日目と生後15日目にはリンパ球優位に変化することが報告されている<sup>9)</sup>。本試験においても3週齢および7週齢の子豚の白血球像ではリンパ球が70%程度を占めており、離乳後の時期においてもリンパ球優位

の状態であることが明らかとなった。末梢血単核球中のリンパ球サブセット比率を測定した結果を **Table 5** に示した。T細胞を示すCD3抗体陽性細胞の割合が3週齢から7週齢へ成長するに伴って、両試験区において有意に (*p* < 0.05) 増加した。発酵乳の給与は、T細胞、B細胞 (CD21抗体陽性細胞)、NK細胞 (CD335抗体陽性細胞)、すべてのサブセットの比率に影響しなかった。次に腸管免疫に及ぼす影響を明らかにするために、

**Table 4** White blood cell differentiation of piglets during milk and fermented milk feeding experiment

	neutrophil	eosinophil	basophil	lymphocyte	monocyte
	(%)				
milk					
3weeks old	25±5	0.7±0.3	0.0±0.0	71±5	3.3±0.6
7weeks old	21±5	1.3±0.5	0.3±0.2	75±5	2.5±0.7
fermented milk					
3weeks old	24±3	0.3±0.2	0.0±0.0	73±4	2.7±0.7
7weeks old	27±2	1.8±1.1	0.0±0.0	69±2	2.2±0.5

Values are means based on 6 piglets±SEM. Piglets were fed basal diet with milk or fermented milk from weaning at 3 weeks old for four weeks.

**Table 5** Lymphocyte subset of piglets during milk and fermented milk feeding experiment

	CD3 <sup>+</sup>	CD4 <sup>+</sup>	CD8 <sup>+</sup>	CD21 <sup>+</sup>	CD335 <sup>+</sup>
	(%)				
milk					
3weeks old	40±4	25±2	28±2	18±3	13±1
7weeks old	50±3*	25±2	37±2	20±3	11±2
fermented milk					
3weeks old	45±6	25±3	28±2	21±2	11±1
7weeks old	54±4*	26±1	35±3	20±2	11±2

Values are means based on 6 piglets±SEM. milk, milk fed group from weaning at 3 weeks old for four weeks; fermented milk, fermented milk fed group during weaning period. The statistical comparisons were made in same column within each group. \* : p < 0.05

糞便中の免疫グロブリン (IgAおよびIgG) 含量を測定したが、発酵乳給与による影響は認められなかった (data not shown)。

発酵乳給与試験終了後、引き続き育成試験を行った。この期間中のDMIは、牛乳区に対して発酵乳区で有意に ( $p < 0.001$ ) 増加し、ADGも発酵乳区で有意に ( $p < 0.05$ ) 高い値となった (data not shown)。育成試験期間中、両試験区の豚は同じ飼料を給与されていたことから、DMIの増加が増体成績の改善につながったと考えられる。育成期以降の飼養成績に及ぼす影響についても、さらに検討中である。以上の結果から、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を用いて調製した発酵乳を離乳期の子豚へ4週間給与することによって、離乳期の増体成績と免疫機能には

影響が認められなかったが、乾物摂取量が増加して、育成期の増体成績が改善する可能性が示唆された。

#### 4. 要 約

離乳期の子豚の成長と免疫機能の改善を期待して発酵乳を給与する試験を行った。発酵乳調製のために、農研機構畜産研究部門で所有する乳酸菌ライブラリーから乳発酵能を示し、低pH、胆汁酸および低温耐性が高い*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を選抜した。発酵乳区の子豚では、発酵乳給与試験期間中の乳酸菌摂取量が9～13log<sub>10</sub>cfu/dayであった。発酵乳区では牛乳区と比較してDMIが有意に増加したが、ADGは両試験区で差が認められず、飼料効率は発酵乳区にお

いて有意に低下した。J 50株を含む発酵乳の給与は、離乳子豚の末梢血中の白血球像とリンパ球サブセットに影響を及ぼさず、糞便中のIgAおよびIgG含量も両試験区で差が認められなかった。発酵乳給与試験終了後の育成試験では、発酵乳区のDMIおよびADGが牛乳区に対して有意に高い値となった。離乳期に発酵乳を給与することでDMIが高まり、育成期間の増体成績が改善される可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Missotten, J. A. M., Michiels, J., Obyn, A., Smet, S. D., Dierick, N. A. : *Arch. Anim. Nutr.*, **64**, 437~466, 2010.
- 2) Otsuka, M., Ishida, A., Murakami, H., Narita, T., Minato, H., Takada, R. : *Jpn. J. Swine Sci.*, **42**, 54~60, 2005.
- 3) Lawlor, P. G., Lynch, P. B., Gardiner, G. E., Caffery, P. J., O'Doherty, J. V. : *J. Anim. Sci.*, **80**, 1725~1735, 2002.
- 4) Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. : *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 396~405, 2006.
- 5) Kimoto, H., Mizumachi, K., Okamoto, T., Kurisaki, J. : *Microbiol. Immunol.*, **48**, 75~82, 2004.
- 6) Kimoto-Nira, H., Suzuki, C., Kobayashi, M., Mizumachi, K. : *J. Food Prot.*, **71**, 2124 ~ 2128, 2007.
- 7) Otsuka, M., Ejiri, D., Katsumata, M., Takada, R., Kanto. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 54~60, 2005.
- 8) Mizumachi, K., Aoki, R., Ohmori, H., Saeki, M., Kawashima, T. : *Animal.*, **3** : 5, 670~676, 2009.
- 9) Gardiner, M. R., Sippel, W. L., McCormick, W. C. : *Am. J. Vet. Res.*, **14**, 68~71, 1953.

## 西南暖地におけるイネ科牧草リビングマルチ体系 による飼料用ダイズ生産技術の開発

Development of soybean production technique by living multi method  
with tropical grasses in southwestern Japan

石垣 元気・福山 喜一

(宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールド)

Genki Ishigaki and Kiichi Fukuyama

(Sumiyoshi Livestock Science Station, Field Science Education Research Center,  
Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Tropical grasses mainly utilized in southwestern Japan have exhibited that the dry matter yield is increased as the growth stage developed. However, the nutritive value such as crude protein (CP) and non fibrous carbohydrate (NFC) tends to be decreased strikingly as the growth stage developed. Therefore, the introduction or breeding the new grass or crops which have high potential as high protein source will be urgent problem. However, the practical success cases have not been reported in southern-western region of Japan. The aim of study were i) to investigate the dry matter yield of soybean ('Miyakonojo' and 'Williams 82') under cultivation method that rhodes grass have been used as multi-living plant after 1st cutting and ii) to investigate the nutritive value of the silage and the digestibility for pig. Rhodes grass grew vigorously after 1st cutting and started to generate the head at around the end of October. The development growth of the rhodes grass hampered the growth of soybean at the initial growth stage and the subsequent stages. As a result, the dry matter yield of soybean ranged from 9.8 kg/10a to 26.6 kg/10a, correspond to about 3% and 10% among the total dry matter yield. However, the nutritive value of EE, CA and CP tended to be higher than those of rhodes grass silage. The digestibility of rhodes grass-soybean mixed silage was significantly lower than that of concentrate. The low digestibility value was derived from the increase of fiber accompanied with development growth in rhodes grass.

### 1. 目 的

農業算出額における畜産部門のうち、九州は24%を占めており、我が国の主要な畜産生産地帯となっている。特に南九州（宮崎県、熊本県、鹿児島県）は九州全体の5割以上を占める畜産県であるが、生産農家は配合飼料のほとんどを海外か

ら輸入している。また、配合飼料価格は年々高騰する傾向にあり、生産農家の負担が増加していることから、輸入配合飼料に代替する新しい飼料を自給生産することが喫緊の課題となっている。

国内の西南暖地（主に西日本）において主に栽培されている暖地型イネ科牧草は、生育段階が進むにつれて、乾物収量は増加するものの、タンパ

ク質や消化性が著しく低下し、家畜における繁殖障害や増体・発育の遅延が認められるケースがある。このことから、今後、高タンパク粗飼料となるような作物を新たに探索、導入することが望まれる。最近、国内の寒冷地では、新しい高タンパク質供給源として、ダイズサイレージが注目されており、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスをリビングマルチとして利用することでダイズを栽培する技術を確認している(内野ら2014)<sup>1)</sup>。一方、南九州を含む西南暖地での牧草を利用した飼料用ダイズ生産の技術開発はいまだ行われていない。西南暖地の牧草生産において特徴的な問題点として、①暖地型イネ科牧草の土壤窒素に対する低い窒素利用性、②暖地型イネ科牧草の生育段階の推移に伴う栄養成分の急激な低下があげられる。このような問題点を解決し、西南暖地における高タンパク飼料生産を技術開発できれば、西南暖地における家畜生産(肉用牛生産、乳生産など)の生産コストを大きく縮小することが可能となる。

本課題は、九州で採草用としてよく用いられる暖地型イネ科牧草ローズグラスの1番草刈り後の刈り株をマルチリビングとして用いて、ダイズ2系統(都城およびWilliams 82)を栽培し、その収量性を調査した。さらに、採草したローズグラス-ダイズでサイレージを調製し、豚における消化性について調査した。

## 2. 方 法

### 2.1 供試材料

暖地型イネ科牧草ローズグラス品種カタンボラ(雪印種苗)をマルチリビングとして供試した。ダイズ系統として都城およびWilliams 82を供試した。

### 2.2 ダイズ栽培試験およびサイレージ調製

試験は、国立大学法人宮崎大学農学部附属

フィールド科学教育研究センター住吉フィールドの圃場(北緯39°59′, 東経131°28′, 海拔12m)にて、2016年5月から2016年12月に行った。供試土壌は、礫が比較的少なく、有機物に乏しい砂質土壌である。2016年5月にローズグラス種子を3.0 kg/10 aの播種量で散播した。ローズグラスの1番草刈りは2016年8月22日に行い、地際15cmで刈り取った。1番草刈り後、耕起区はロータリー(クボタ社)を用いて40cm幅で一部耕起した。ダイズ播種は、ダイズ種子(都城およびWilliams 82)を株間20cmで1点2粒播きの条件で点播した。各供試植物の草丈(cm)および乾物収量(kg/10 a)を2016年11月23日に調査した。施肥は、10 a当たり換算量で基肥として発酵牛糞1 t (N2.5%, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>4.0%, K<sub>2</sub>O2.1%), 化成肥料でNを4 kg, P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>を3.4kg, K<sub>2</sub>Oを2.9kg施用し、追肥として1番草刈り後に、化成肥料でNを4 kg施用した。2016年11月23日に、地際15cmで刈り取ったローズグラスおよびダイズは、同圃場で約1日予乾処理した。予乾処理後、刈り取りサンプルは、約1 cm幅に細断し、ポリエチレン製バックに約1500 gずつ詰め、室温で貯蔵した。また乳酸発酵を促進させるために、乳酸菌(サイマスターLP, 雪印種苗株式会社)を添加した。サイレージは、調製から30日目に各処理3袋ずつ開封し、粗タンパク質(CP), 粗脂肪(EE), 粗灰分(CA), を調査した。

### 2.3 豚における消化率の推定

サイレージの粗タンパク質(CP), 粗脂肪(EE), 粗繊維(CF)および可溶性無窒素物(NFE)の消化率を全糞採取法により行った(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構2009)<sup>3)</sup>。供試動物は繁殖豚2頭を用いて、ラテン方格に濃厚飼料(繁殖豚用)およびサイレージを各々7日間給与し、後の3日間を本試験とした。本試験期間において排泄された糞を全量採取し、一部を消化率

の推定に供試した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 ローズグラスおよびダイズ系統の収量性

ダイズ系統‘都城’および‘Williams 82’は、いずれも播種後5日目から出芽し、旺盛に伸長したものの、ローズグラスの1番草刈取り後の再生がさらに旺盛であったため、ダイズ播種後3週間目には、ローズグラスの草高がダイズよりも高くなった (Fig. 1)。収穫前では、耕起区におけるダイズの草丈は、有意ではないものの、いずれの系統も不耕起よりも高い傾向が認められた。さらにローズグラスの草丈は、耕起区、不耕起区のいずれの処理においてもダイズの草丈よりも有意に高い値であったことから、ダイズ播種前の耕起処理がダイズの初期生育およびその後の生育に与える効果は認められなかった (Table 1)。乾物収量

は、ローズグラスでは、いずれのダイズ系統および処理区においても300kg/10 a程度であったのに対し、ダイズ系統は9.8kg/10 aから26.8kg/10 aと低い値であった (Table 1)。しかしながら、ダイズ系統Williams 82の耕起区では、全体収量の10.1%を占めていたことから、耕起処理によって、ダイズ系統Williams 82の個体数が不耕起区よりも高く維持されたと推察される。

以上の結果から、西南暖地の秋季における暖地型イネ科牧草ローズグラスをマルチリビングとして用いたダイズ栽培では、ローズグラスの高い再生性および生殖成長に伴う出穂茎の伸長により、ダイズ植物体の初期生育およびその後の生育に負の影響を及ぼすことが明らかとなった。本試験では、ダイズの収穫時期に合わせて収穫したため、ローズグラスの生育段階が過度に進んだ状態となった。このことから、西南暖地での粗飼料生産



Fig. 1 Experimental field (Figure 1a) of rhodes grass and two soybean plants (“Miyakonoyo”, Figure 1b; “Williams 82”, Figure 1c) at pre-harvest time (23th November 2016).

Table 1 Plant length and dry matter yield of rhodes grass and two soybean strains.

Parameter	‘Miyakonoyo’			‘Williams82’		
	Non tillage	Tillage	<i>P</i>	Non tillage	Tillage	<i>P</i>
Plant length (cm)						
Rhodes grass	156.1 <sup>a</sup>	137.3 <sup>a</sup>	0.011	156.2 <sup>a</sup>	131.7 <sup>a</sup>	0.001
Soybean	57.3 <sup>b</sup>	54.7 <sup>b</sup>	0.227	52.0 <sup>b</sup>	47.7 <sup>b</sup>	0.055
Dry matter yield (kg/10a)						
Rhodes grass	318.1 <sup>a</sup>	337.0 <sup>a</sup>	0.784	318.6 <sup>a</sup>	266.5 <sup>a</sup>	0.358
Soybean	9.8 <sup>b</sup>	15.2 <sup>b</sup>	0.343	16.8 <sup>b</sup>	26.8 <sup>b</sup>	0.254
Soybean mixing (%)	3.1	4.5	0.496	5.3	10.1	0.240

Values followed by different letters between rhodes grass and soybean differ significantly ( $P < 0.05$ ) by t-test.

体系において、ダイズ生産を組み入れられるような時期を、秋季以外で新たに検討する必要がある。南九州をはじめとする西南暖地の多くの地域では、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスの2番草の刈取りが5月上旬頃には行われ、その後、トウモロコシなどの長大作物や暖地型イネ科牧草が作付けされる。今後、イタリアンライグラスの2番草刈取り株をリビングマルチとして利用する技術や、ローズグラスとの混播によるダイズ生産技術を検討する必要がある。

### 3.2 ハスモンヨトウの発生数

ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) は、鱗翅目ヤガ科に属し、多くのマメ科作物やマメ科牧草を対象とする広食性の害虫であり、多くの作物で被害が報告されている (山口1968; 遠藤ら2002)<sup>2,4)</sup>。本試験期間中では、調査開始時からヨトウガの成虫 (雄) が確認された。確認個体数は8月4日に最も多くなり (約160匹)、その後、急激に低下した (Fig. 2)。播種後1週間目の9月7日にはヨトウガ成虫は確認されなかった。本試験地では、

これまでにマメ科作物およびマメ科牧草の栽培されていないため、ハスモンヨトウなどの害虫の発生数が顕著ではなかったと考えられる。

### 3.3 ローズグラス・ダイズ混合サイレージの栄養成分および消化性

ローズグラス単体およびローズグラスとダイズを混合したサイレージでは、サイレージ調製前の子乾により、いずれも水分含量 (%) が60%まで低下した。各サイレージの栄養成分は、粗脂肪 (EE)、粗灰分 (CA)、粗タンパク質 (CP) のいずれにおいてもダイズを混合したサイレージが高い傾向を示した (Table 2)。

濃厚飼料の粗タンパク質 (CP)、粗脂肪 (EE)、粗繊維 (CF) および可溶性無窒素物 (NFE) における消化率は、各々80.6%、86.0%、38.7%および88.6%であったのに対し、ローズグラス・ダイズ混合サイレージの消化率は15.3%、11.0%、5.1%および17.1%となり、濃厚飼料よりも有意に低い値であった。サイレージの低い消化性は、サイレージのほとんどを占めているローズグラスの

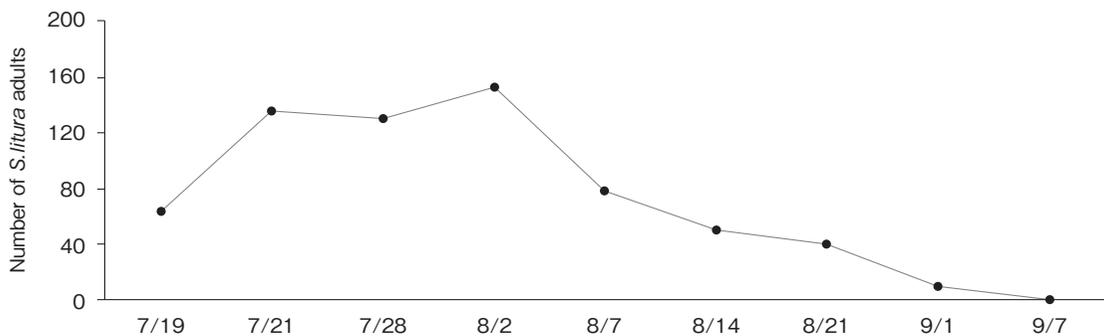


Fig. 2 The transition of number of *Spodoptera litura* male adults during experimental period.

Table 2 Chemical compositions of rhodes grass (RG) and RG+Soybean silage (Miyakonjojo).

	Moisture	EE	CA	CP
	-%DM-			
Rhodes grass (RG)	60.5	2.2	10.2	10.5
RG+Soybean	61.9	2.5	10.5	12.0

There was no significant differences in two silages for each nutritive values.

**Table 3** Digestibility of concentrate and RG + Soybean silage.

		CP	EE	CF	NFE
Concentrate	Pig A	79.4	85.9	39.9	88.9
	Pig B	81.8	86.1	37.6	88.3
	Mean	80.6 <sup>a</sup>	86.0 <sup>a</sup>	38.7 <sup>a</sup>	88.6 <sup>a</sup>
RG + Soybean silage	PigA	17.7	14.2	5.2	16.5
	PigB	13.0	7.8	5.1	17.7
	Mean	15.3 <sup>b</sup>	11.0 <sup>b</sup>	5.1 <sup>b</sup>	17.1 <sup>b</sup>

Means followed by different letters between concentrate and RG + Soybean silage differ significantly ( $P < 0.001$ ) by t-test.

高い繊維含量が起因していると考えられる (Table 3)。しかしながら、肥育豚の肥育後期における成長速度は低下し、脂肪が蓄積しやすくなることから、飼養管理では厚脂を防ぎ、良好な筋肉増加を図る工夫が必要である。本試験で調製されたサイレージが示した高い繊維性および低い消化性は、このような飼養管理に対して一つの打開策になるかもしれない。今後、このような高い繊維性および低い消化性を示したローズグラス・ダイズ混合サイレージの肥育後期豚への給与が筋肉の発育や肉質、または脂肪の蓄積にどのような影響を及ぼすのか調査する必要がある。

#### 4. 要 約

国内の西南暖地において主に栽培されている暖地型イネ科牧草は、生育段階が進むにつれて、乾物収量は増加するものの、タンパク質や消化性が著しく低下し、家畜の繁殖障害や増体・発育の遅延が認められるケースがある。このことから、今後、高タンパク粗飼料となるような作物を新たに探索、導入することが望まれている。しかしながら、これまでこのような高タンパク粗飼料となるような作物が西南暖地において導入された例はない。本課題は、九州で採草用としてよく用いられる暖地型イネ科牧草ローズグラスの1番草刈取り後の刈り株をマルチリピングとして用いて、ダイズ2系統（都城およびWilliams 82）を栽培し、

その収量性を調査した。さらに、採草したローズグラス・ダイズでサイレージを調製し、サイレージの栄養成分および豚における消化性について調査した。ローズグラスの高い再生性および生殖成長に伴う出穂茎の伸長は、ダイズ植物体の初期生育およびその後の生育を抑制した。その結果、ダイズの乾物収量は、全体収量のうち、数パーセントから10%程度しか占めなかった。しかしながら、調製したローズグラス・ダイズ混合サイレージの栄養成分は、粗脂肪 (EE)、粗灰分 (CA)、粗タンパク質 (CP) のいずれにおいてもローズグラスサイレージよりも高い傾向を示した。また、ローズグラス・ダイズ混合サイレージの消化率は、濃厚飼料よりも有意に低い値であったことから、ローズグラスの生育段階の進行に伴う繊維含量の増加が起因していると考えられる。

#### 文 献

- 1) 内野宙, 魚住順, 嶋野英子, 河本英憲, 出口新: イタリアンライグラスをリピングマルチとして導入した飼料用大豆生産体系—大豆の播種時期が収量性に及ぼす影響について—, 第237回日本作物学会講演要旨, 2014.
- 2) 遠藤信幸, 和田節, 水谷信夫, 高橋将一: ダイズ育成系統九系279のハスモンヨトウと大豆カメムシ類に対する品種特性, 九州病害虫研究会報48巻, 262~263, 2002.
- 3) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構: 消化試験法 (豚), 262~263, 2009.
- 4) 山口福男: ハスモンヨトウとその防除, 農業および園芸43巻, 681~684, 1968.

## 哺乳期の長日処理による黒毛和種の代謝調節

Control of metabolism in Japanese black cattle by postnatal exposure  
to long photoperiod

安尾 しのぶ

(九州大学大学院農学研究院)

Shinobu Yasuo

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

Seasons or photoperiod during lactation period affects growth and metabolism of the skeletal muscle in animals. Thus, photoperiodic control during lactation period in livestock may increase productivity and modulate meat quality. This study analyzed the effect of long photoperiod during lactation period on body weight and metabolism-related parameters using Japanese Black cows. The cows were exposed to long or short photoperiod during 3-months lactation period. The body weight at 3 months old, as well as milk intake during 3 months and plasma insulin levels at 3 months old, was higher in the cows exposed to long photoperiod than those exposed to short photoperiod. Expression of several genes including myostatin in the skeletal muscle at 2 months old were not changed by photoperiod, but the effect may appear after weaning. Analysis of long-term effect, including wide range of analysis of gene expression and meat quality, is needed in future studies.

### 1. 目 的

動物の成長や代謝は哺乳期における環境要因に多大な影響を受ける。例えば、哺乳期における栄養状態やストレス、免疫活性が様々な生理機能に影響を及ぼし、肥満や糖尿病などの病気に関わることが広く知られている<sup>1)</sup>。哺乳期における季節や日長も、動物の生理機能に影響を及ぼす重要な要因である。ハムスターにおいて、哺乳期の日長が性線の発達や性成熟、また成長に影響することが報告されている<sup>2-4)</sup>。

我々は最近、マウスの哺乳期を長日条件で飼育

すると、成熟後に至るまで体重増加が促進されることを見出した<sup>5)</sup>。さらに、成熟後の骨格筋を用いてメタボローム解析を行ったところ、インスリン感受性の向上機能があるパルミトリン酸が増加することや、TCA回路が活発化すること、また脂肪酸代謝に関わるperoxidome proliferator-activated receptorの発現が変化することが明らかとなった。これを牛に応用すれば、哺乳期の長日処理により生産性を高める技術や、付加価値の高い新たな食肉の生産技術の開発が期待できる。牛は周年繁殖動物であるが、乳牛を長日条件で飼育すると、体重や乳量が増加する<sup>6)</sup>。この

ことから、体重や代謝関連の指標に関しては、牛でも長日処理の効果が得られることが予想される。

そこで本研究では、黒毛和種の牛を長日条件下で飼育すると体重増加や代謝にどのような変化が見られるかを明らかにすることを目的として、哺乳期の長日処理が体重増加やホルモン分泌に及ぼす影響、また骨格筋代謝関連遺伝子の発現に及ぼす影響を調査した。

## 2. 方 法

牛の日長調節を行うため、飼育舎内で光コントロールを行う小屋を2つ準備して、長日区と短日区を設定した。牛を一日中小屋に閉じ込めると多大なストレスがかかるため、日中は屋外で適度に運動しながら自然日光を利用し、明期終了時刻を小屋内で調節するシステムとした。長日区は日の出から16時間の光を浴び、短日区は日の出から10時間の光を浴びるように設定し、日長調節が終了した夜間には扉が自動で開くように設定した。

5月に出生した牛を用いて、当該システムにて飼育を開始した（長日区：オス2頭、短日区：オス1頭およびメス1頭）。日長調節は離乳（3カ月齢）までとし、離乳後は自然日長下において粗飼料で飼育した。約10日ごとに体重や体格の調査を行い、3カ月齢までの採食量や飼料効率を測定した。2カ月齢において血漿および骨格筋バイオプシーを採取した。

血漿を用いて、ELISA測定キットによりインスリン濃度を測定した。骨格筋バイオプシー試料を用いてcDNAを合成し、リアルタイムPCRにより、PPAR-delta (PPARd) および $\gamma$ -gamma (PPAR $\gamma$ )、また骨格筋形成抑制因子であるマイオスタチンの発現を解析した。各発現量はGAPDHの発現量で補正した。

## 3. 結果および考察

### 3.1 体重・体格・摂食量

出生後から哺乳期にかけて日長処理を3カ月間行ったところ、3カ月齢の体重は短日区で96kgおよび78kg、長日区で129.5kgおよび108kgとなり、長日区では短日区に比べて約1.36倍の体重増加が見られた（Table 1）。体高、体長、胸囲のいずれについても、長日区の牛では短日区の牛よりも大きい値を示した（それぞれ1.06倍、1.13倍、1.09倍、Table 1）。また、3カ月間におけるミルク摂取量は、短日区で102.4kgおよび85.1kg、長日区で119.8kgおよび111.5kgであり、長日区では短日区の約1.23倍であった（Table 1）。ミルク摂取量に粗飼料やスターター給与量を加えて、飼料効率を計算した結果、長日区では0.45および0.42、短日区では0.57および0.43であった。

本研究で用いた牛は5月に出生したため、哺乳期は春から夏にあたる。離乳直後（夏）の被毛状態を観察すると、短日区では冬毛が、長日区で夏

Table 1 Various measurements in cows maintained under short or long day conditions

Photoperiod	No.	Sex	Birth		3-month old			0-3 month old
			BW	BW (kg)	WH (cm)	BL (cm)	CW (cm)	Milk intake (kg)
Short day	1	M	28	96	92.2	85.4	105	102.4
	2	F	30	78	86.2	83.2	99	85.1
Long day	1	M	31	129.5	98	95	115	119.8
	2	M	34.5	108	92.6	95.6	108	111.5

BW: Body weight, WH: Withers height, BL: Body length, CW: Chest width

毛が見られた。そこで、毛量を計測したところ、短日区では9.67および6.42 g/100cm<sup>2</sup>、長日区では1.98および1.88 g/100cm<sup>2</sup>であった。

本研究の結果から、黒毛和種の哺乳期を長日条件で飼育すると、短日飼育に比べてより多く摂食し、体重増加が促進されることが示唆される。長日条件では短日条件に比べて明期が長いから、本研究の結果は、単に摂食の機会が多くなった結果とも考えられる。しかし、夜行性であるハムスターにおいても、長日条件では活動時間が短いにもかかわらず、摂食や体重が増加する<sup>7)</sup>。このメカニズムとして、松果体から分泌されるメラトニンの分泌パターンが日長によって変化し、その分泌パターンにより視床下部における摂食・エネルギー恒常性関連遺伝子の発現が変化することが解明されている<sup>8)</sup>。牛においても、メラトニンの分泌パターンは季節や日長により異なることから<sup>9, 10)</sup>、視床下部における摂食・エネルギー恒常性機構が日長の影響を受けた可能性が考えられる。しかし、本研究では、出生体重が長日区で若干高いことや、短日区でメスが含まれることなどの区間の違いがあり、その影響が反映された可能性が否めない。個体数を増やして条件を整えた上で、より正確な解析をしていく予定である。

本研究では、短日区と長日区でそれぞれ冬毛と夏毛が観察された。ハムスターでも被毛状態が日長の影響を受けるが、これは日長によって変化するプロラクチンの分泌により制御されている<sup>11)</sup>。牛でもプロラクチンの分泌は日長により変化することから<sup>10)</sup>、同様のメカニズムが考えられる。

### 3.2 ホルモン濃度および遺伝子発現

代謝状態の指標として、糖の取り込みによりタンパク質および脂肪酸の合成を促進するインスリンの血漿中濃度を測定した。2カ月齢における血漿中のインスリン濃度は、長日区で2.61および1.59 μg/l、短日区で0.55および0.34 μg/lであり、長日

区のほうが高濃度であった。長日区でインスリン濃度が高いという結果は、長日区で摂食量が多く体重が重いという結果と一致する。しかし、摂食量の違い(約1.23倍)に比べて、インスリン濃度の違いは4.76倍と大きいことから、摂食量を介さない経路に対する日長の影響が示唆される。ハムスターでも同様に、長日条件では短日条件より血漿インスリン濃度が高い<sup>12)</sup>。さらに、長日条件のハムスターでは、脳におけるインスリン受容体の発現や、インスリンシグナル伝達に関わるPTP1Bの発現やリン酸化AKTの濃度が高く<sup>13)</sup>、インスリン作用機構の全体が日長の影響を受けていることが分かる。マウスでは、骨格筋や脂肪組織においても、糖の取り込みを制御するGlucose transporter 4の発現は長日条件のほうが高く、インスリンの高感受性と相関している<sup>14)</sup>。以上より、黒毛和種のインスリン分泌およびインスリン作用機構が日長の影響を受けていることが示唆される。しかし、血漿インスリン濃度は摂食タイミングにより変動するため、直前の摂食状態に影響を受けた可能性は否定できない。今後は、摂食のタイミングを合わせたうえで、濃度を比較する必要がある。また、糖負荷試験によりインスリン分泌の反応性を比較することも重要である。

2カ月齢の骨格筋におけるPPARd, PPARg, およびマイオスタチンの発現には日長の明確な影響は見られなかった。しかし、我々が行ったマウスにおける予備実験では、哺乳期の日長によるPPARdの発現変化は離乳以降に現れ始めたことから、引き続き牛を飼育していくことで、離乳の3カ月齢以降に発現変化が現れる可能性がある。また、血漿インスリン濃度に変化していたことから、インスリン伝達シグナルの下流にある遺伝子群の発現が変化している可能性が考えられる。本研究では限られた遺伝子の発現のみ調査したが、網羅的な遺伝子発現解析などにより、より広範な

発現プロファイルを明らかにし、骨格筋の日長反応機構を明らかにする必要がある。

#### 4. 要 約

哺乳期の季節や日長条件は動物の成長や骨格筋代謝に影響を及ぼす。この性質を畜産に応用すれば、哺乳期の日長コントロールによる生産性の向上や肉質の制御などが期待できる。本研究では、黒毛和種の牛において、哺乳期の長日処理が体重増加や代謝関連指標に及ぼす影響を解析した。3カ月間の哺乳期を長日区と短日区に分けて飼育した結果、3カ月齢時の体重は長日区で短日区より重く、ミルク摂取量も多かった。また、血漿インスリン濃度は長日区で短日区より高い傾向が見られた。2カ月齢の骨格筋におけるマイオスタチンなどの発現に変化は見られなかったが、離乳後に影響が現れる可能性がある。今後は、実験個体数を増やした上で、長期的な影響の調査や、広範な遺伝子発現の解析および肉質の解析をしていく予定である。

#### 文 献

- 1) Levin, B. E. : Metabolic imprinting: critical impact of the perinatal environment on the regulation of energy homeostasis, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **361**, 1107~1121, 2006.
- 2) Gorman, M. R. : A plastic interval timer synchronizes pubertal development of summer- and fall-born hamsters, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **281**, R1613~1623, 2001.
- 3) Hoffmann, K. : Effects of short photoperiods on puberty, growth and moult in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus*), *J. Reprod. Fertil.*, **54**, 29~35, 1978.
- 4) van Haaster, L. H., van Eerdenburg, F. J., de Rooij, D. G. : Effect of prenatal and postnatal photoperiod

- on spermatogenic development in the Djungarian hamster (*Phodopus sungorus sungorus*), *J. Reprod. Fertil.*, **97**, 223~232, 1993.
- 5) Uchiwa, T., Takai, Y., Tashiro, A., Furuse, M., Yasuo, S. : Exposure of C57BL/6J mice to long photoperiod during early life stages increases body weight and alters plasma metabolomic profiles in adulthood, *Physiol. Rep.*, **4**, e12974, 2016.
- 6) Peters, R. R., Chapin, L. T., Leining, K. B., Tucker, H. A. : Supplemental lighting stimulates growth and lactation in cattle, *Science*, **199**, 911~912, 1978.
- 7) Bartness, T. J., Wade, G. N. : Photoperiodic control of seasonal body weight cycles in hamsters, *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **9**, 599~612, 1985.
- 8) Morgan, P. J., Ross, A. W., Mercer, J. G., Barrett, P. : Photoperiodic programming of body weight through the neuroendocrine hypothalamus, *J. Endoc.*, **177**, 27~34, 2003.
- 9) Oginio, M., Matsuura, A., Yamazaki, A., Irimajiri, M., Kushibiki, S., Shingu, H., Kasuya, E., Hasegawa, Y., Hodate, K. : Plasma melatonin secretion rhythms in cattle under varying seasonal conditions, *Anim. Sci. J.*, **84**, 253~257, 2013.
- 10) Dahl, G. E., Auchtung, T. L., Kendall, P. E. : Photoperiodic effects on endocrine and immune function in cattle, *Reprod. Suppl.*, **59**, 191~201, 2002.
- 11) Lincoln, G. : Melatonin modulation of prolactin and gonadotrophin secretion. Systems ancient and modern, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **460**, 137~153, 1999.
- 12) Korhonen, T., Mustonen, A. M., Nieminen, P., Saarela, S. : Effects of cold exposure, exogenous melatonin and short-day treatment on the weight-regulation and body temperature of the Siberian hamster (*Phodopus sungorus*), *Regul. Pept.*, **149**, 60~66, 2008.
- 13) Tups, A., Helwig, M., Stohr, S., Barrett, P., Mercer, J. G., Klingenspor, M. : Photoperiodic regulation of insulin receptor mRNA and intracellular insulin signaling in the arcuate nucleus of the Siberian hamster, *Phodopus sungorus*, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **291**, R643~650, 2006.
- 14) Tashiro, A., Shibata, S., Takai, Y., Uchiwa, T., Furuse, M., Yasuo, S. : Changes in photoperiod alter Glut4 expression in skeletal muscle of C57BL/6J mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **485**, 82~88, 2017.

## 耕作放棄地を利用しためん羊生産体系の確立の試み

Attempt to establish a new sheep production system in abandoned farmland

田中智夫  
(麻布大学獣医学部)

Toshio Tanaka  
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

This study was conducted aimed to establish the sheep production system in abandoned farmland. The grazing areas were in Toyooka, Suzaka, Nagano prefecture, Japan. Suffolk ewes were grazed after weaning their lambs. Some wheat bran was fed as supplement feed. The body weight and body condition score of them were recorded every 2 months. Improvement of both measurements was relatively slow. The quality of grasses on abandoned farmland was variously, so the supplement feed might be very important for recovering their body condition. The feeder size of supplement was needed for all ewes in the group could eat simultaneously. The ability of successful mating was different in each ram, especially the youngest ram could not success to copulate. Therefore, the selection of ram also might be very important.

### 1. 目的

近年、わが国における耕作放棄地面積は年々増加しており、とくに最近20年間で倍増して約40万haにもなっている。その原因として、農業者の高齢化と後継者不足が主なものとしてあげられるが、放棄された土地が野生動物の隠れ家として利用され、それら野生動物が周辺の耕作地を荒らすことで放棄される農地がさらに増えるといった悪循環も見られる。実際、イノシシやシカ、サルなどの野生動物による農作物被害額も増加の一途をたどっている。

一方、わが国は、飼料自給率および食糧自給率ともに低く、これらの向上が強く求められてお

り、その方策の1つとして耕作放棄地の有効活用が期待されている。筆者は、約20年前から耕作放棄地を利用しためん羊の放牧に関する研究に着目し、(社)日本緬羊協会(現(公社)畜産技術協会 緬山羊振興部)のめん羊振興対策事業の一員として、全国各地の休耕田や果樹園跡地等でのめん羊放牧の実態調査を実施し、取り組みの背景や問題点を明らかにした。その後、一部は貴財団および文科省科学研究費の助成金を受けて、岐阜県郡上市や島根県美郷町、および本研究実施地である長野県須坂市の耕作放棄地にめん羊を導入して、行動研究や草生変化などの研究に取り組んできており、その成果を日本畜産学会や日本緬羊研究会で報告するとともに論文発表してきた。これらの中

で、めん羊は短草ばかりでなくセイタカアワダチソウやススキなど草高のあるものもよく摂取し、放棄地がほぼ裸地化するまで摂取すること、補助飼料として野菜くずを給与することでコストをかけずに維持管理が可能なことなどを明らかにした<sup>1~5)</sup>。

本研究は、耕作放棄地を利用しためん羊の放牧について、これまで数年間にわたって試験的に取り組んできた長野県須坂市における基礎的知見を踏まえ、めん羊による除草効果とそれに伴う景観保全だけでなく、子めん羊や羊肉の販売を見すえためん羊生産体系の確立を目指し、耕作放棄地を農地として再生し、食糧自給率の向上も期待できる技術の開発を目的とした。

## 2. 方 法

長野県須坂市豊丘の「信州豊丘めん羊飼育協議会」の協力の下に、同地域に散在する耕作放棄地にサフォーク種めん羊を放牧して、以下の実験を実施した。

### 実験1：耕作放棄地へ放牧した離乳後の繁殖羊の体重変化

サフォーク種成雌羊13頭（2～5歳）を供試した。2016年5月に離乳し、9頭と4頭に分けて耕作放棄地AとBに導入した。なお、放棄地Aに導入したうちの3頭は、協力団体（信州豊丘めん羊飼育協議会）の都合により、繁殖開始前に出荷され、データは6頭となった。放牧開始後1.5～2ヵ月ごとに各個体の体重とボディコンディションスコア（BCS）を測定した。

### 実験2：耕作放棄地における放牧時の補助飼料給与法の検討

耕作放棄地での放牧ではスペースや労力が限られていることが多く、設置する飼槽は可能な限り少なく、コンパクトであることが望まれる。そこで、まず麻布大学の羊舎内で大学産のサフォーク

種成雌羊4頭を使用し予備実験を行った。予備実験ではプランターを利用した飼槽を分割や連結によって長さの調節を行って4つのパターンで配置し、それぞれ6回ずつ実験を行った。飼料は、ヘイキューブとスーダン乾草を細断したものを給餌した。その結果、飼槽を2つ用いて飼槽の幅の合計が羊の体幅の合計より1頭分大きくすることにより、群れの最優位個体と最劣位個体の間で採食時間に有意差が認められなくなった。

この結果を元に前述の耕作放棄地を利用した放牧場A、Bの2箇所で行った。実験1に示したように、Aにはサフォーク種成雌羊9頭、Bには成雌羊4頭が放牧されていた。飼槽は予備実験と同様のプランター2つを配置し、その合計幅を体幅の合計と同じまたは体幅の合計より1頭分大きくした。飼料は日常的に給餌されているふすまを使用した。

### 実験3：耕作放棄地における放牧羊の性行動解析

実験2の終了後、8月20日に耕作放棄地AとBに雄羊を1頭ずつ導入し、雌雄混飼直後から2日間、午前と午後各2時間ずつ性行動を連続観察した。以下、2頭の雄を雄A、雄Bとよぶ。9月12日に両区の雄を入れ替えて、再度2日間、午前と午後各2時間ずつ性行動を連続観察した。加えて、11月21日に畜舎において、実験1で受胎しなかった2頭に対し、新たな雄（当歳：以下雄C）を混飼して、その後2日間、午前と午後各2時間ずつ性行動を連続観察した。

## 3. 結果と考察

実験1：耕作放棄地Aの6頭と、放棄地Bの4頭の体重およびBCSの推移をTable 1に示した。放牧開始1.5ヵ月後においても、BCSは2.0—3.0（平均2.5）と十分な回復はみられず、その後は補助飼料として1日1頭100gのふすまを給与したが、

Table 1 Changes in body weight and body condition score (BCS) of ewes (Exp.1)

Individual number	Body weight: kg (BCS)			
	June 23 a	Aug. 20 b	Oct. 7 c	Nov. 14 d
Area A				
3194	79.0 (3.0)	84.0 (3.5)	79.5 (3.0)	87.5 (4.0)
0004	74.0 (2.5)	70.5 (2.0)	72.5 (3.0)	74.5 (4.0)
W6	72.5 (2.0)	73.0 (2.0)	73.5 (2.5)	67.5 (2.5)*
R7	66.0 (2.0)	67.0 (3.0)	72.5 (3.0)	77.5 (4.0)
G5	73.5 (3.0)	76.5 (3.0)	86.5 (4.0)	90.5 (4.0)
Y56	71.5 (2.0)	70.5 (2.0)	72.5 (3.0)	73.0 (3.0)
Mean	72.8 (2.4)	73.6 (2.6)	76.2 (3.1)	78.5 (3.6)
Area B				
1311	68.0 (3.0)	70.0 (3.0)	69.5 (2.5)	71.5 (3.0)*
1422	78.5 (3.0)	78.0 (3.0)	79.5 (3.5)	87.5 (4.0)
Y7	63.5 (2.0)	59.5 (2.0)	61.0 (2.5)	70.0 (3.0)
B1	68.5 (2.0)	74.0 (2.0)	73.0 (3.0)	81.0 (4.0)
Mean	69.6 (2.5)	70.4 (2.5)	70.8 (2.9)	77.5 (3.5)
Total mean	71.5±5.1 (2.5)	72.3±6.6 (2.5)	74.0±6.8 (2.9)	78.1±8.2 (3.5)

a : 1.5 mo. after grazing, b : introducing a ram, c : 1.5 mo. after b, d : after mating

\*: non pregnancy

その2ヵ月後においても平均体重は0.8kgの増加に留まり、BCSも一部の個体でわずかに改善された程度であったが、その日（8月20日）から雄を導入して交配を開始した。交配開始後も補助飼料を同量給与し、1.5ヵ月後には、すべての個体において交尾が確認され、その時点での体重は交配開始時に比べて平均で2.7kg、BCSは0.5改善されていた。そのひと月後には、さらに体重が4.1kg増加し、BCSも0.5改善したが、ほとんど増体していなかった2頭は、受胎しなかった。耕作放棄地を利用した放牧においては、草生状態が不均一でその栄養価にもばらつきが大きい。そのようななかでの補助飼料の種類や量の検討を意図したが、現地管理者の協力が頼らざるをえない部分が大きく、十分な検討はできなかった。

実験2：耕作放棄地AとBにおける最上位個体と最下位個体の採食時間をTable 2に示した。放棄地それぞれに補助飼料用の飼槽を2つ用意し、

その合計幅を体幅の合計と同じにしたところA、B共に個体間の採食時間に有意差がみられ、最上位個体が最下位個体の2倍以上であった（ $P < 0.001$ ）。飼槽を体幅の合計より1頭分大きくしたところ、Aでは有意差はみられなくなったが、Bではなおも有意差がみられた（ $P < 0.01$ ）。予備調査を行った麻布大学の羊群と本調査の羊群それぞれのLandauの直線性指数<sup>6)</sup>を求めたところ、予備調査群の0.3に対し、本調査のA群は0.6、B群は0.7と、いずれも値が大きく、より強い順位社会であったことと、Bでは飼槽が周囲の壁に近い場所に配置したことで羊が体を使って飼槽を専有できたことが原因だと考えられた。したがって、耕作放棄地を利用した4～5頭の少頭数の放牧では、羊の体幅の合計より1頭分大きい飼槽を2つに分け、飼槽は周りの壁と羊の体で飼槽が囲われない位置に配置する、という条件が目安となることが示唆された。今後は飼料や放牧場所の多

Table 2 Eating time (min.) of the highest and lowest social ranked ewes from supplement feeders (Exp.2)

Area	Social rank	Eating time (min.)	
		Feed trough 1 a	Feed trough 2 b
A	Highest	4.2 <sup>X</sup>	4.5
	Lowest	2.1 <sup>Y</sup>	3.9
B	Highest	3.7 <sup>X</sup>	4.4 <sup>X</sup>
	Lowest	1.5 <sup>Y</sup>	2.3 <sup>Y</sup>

a : equal width of total width of ewes in the group

b : equal width of total width of ewes in the group plus one ewe

X-Y : P&lt;0.001, x-y : P&lt;0.01

様な様式に対応できる飼槽の設置方法の検討が課題となろう。

実験3：雄A、雄Bおよび雄Cの総観察時間に占める性行動の発現割合は、それぞれ3.60%、1.69%、1.83%であった。雄Aは5回の乗駕が観察され、そのうち2回は交尾に成功した。雄Bは4回の乗駕のすべてで交尾に成功したのに対して、雄Cは交尾に至る乗駕は観察されなかった。交尾の成功率が低い雄Aと高い雄Bでは、性行動の各要素の発現割合に有意な差（ $P<0.05$ ）がみられ、交尾が成功した日には雄Aではツイスト、尿嗅ぎ、フレーメン、前蹴りが発現しやすく、雄Bは陰部嗅ぎ、擦り付け、前蹴り、顎のせが発現しやすかった。ガーディングからツイスト、前蹴り、顎のせ、乗駕と続き、交尾に至る連鎖が多く観察され（ $P<0.05$ ）、顎のせが乗駕から交尾に至るポイントとなる行動と考えられた。

以上をまとめると、目的に掲げた「めん羊による除草効果とそれに伴う景観保全だけでなく、補助飼料の給与も行いながら子めん羊や羊肉の販売を見すえためん羊生産体系の確立」までには至らなかったものの、先に得られていた以下の知見、すなわち、1) 耕作放棄地でのめん羊放牧には、舎飼いから直接導入するよりも、過去に放牧経験のある何頭かの個体を混飼することで、馴化が促進され、入牧当初から放牧地全体が利用されやす

く、また、サフォーク種だけでなくより活動的な品種（ポールドーセット種など）を混飼することにより、サフォーク種の行動も活性化されうること、2) めん羊放牧により、近隣農地への野生動物の出現が抑制され、その効果は長期に持続されること、3) 牛の放牧に用いられるイヤータッグ型殺虫剤を装着することにより、羊においても有害昆虫の飛着だけでなく飛来そのものも抑制できること、4) 羊肉の加工には、サフォーク種純粋よりもポールドーセット種とのF1のほうが適している可能性が示唆されるものの、さらなるデータの蓄積が必要なこと、に加えて、本研究により、5) 耕作放棄地の草資源は多様であり、一律に評価はできないものの、適切に補助飼料を給与することで有効に活用できること、6) 補助飼料用の飼槽は、全個体が同時に摂食可能な幅を確保する必要があること、および7) 繁殖時には、雄の交尾成功率の個体差が大きく、雄の選択が重要であること、などが明らかとなった。

また、耕作放棄地を利用した小規模のめん羊生産においては、下牧後に飼い直して肥育しても、肉の出荷先の確保が容易ではない。一方で、子羊の需要は大きいものの供給可能頭数は少ないので、手間をかけて肥育するよりは、子羊で出荷するほうが生産者の負担が小さく、収入も安定する。本研究地においても、大規模に肉生産してい

る農家や、種雄羊候補を求めている各地の農家からの譲渡希望が多く、子羊の生産販売という体系ができつつある。今後もこのような体系を確立していくことが、中山間地域における耕作放棄地利用のめん羊生産が目指すひとつの方向と考えられる。

#### 4. 要 約

耕作放棄地を利用してめん羊を放牧し、食草による除草効果とそれに伴う景観保全だけでなく、子めん羊や羊肉の販売を見据えためん羊生産体系の確立を試みた。まず、離乳後の繁殖用雌羊を放牧し、ふすまを補助飼料として給与しつつ定期的に体重とBCSを測定した。耕作放棄地の草資源は多様であり、一律に評価はできないものの、適切に補助飼料を給与することで有効に活用できる可能性が示唆された。また、補助飼料用の飼槽は、全個体が同時に摂食可能な幅を確保することで、社会的順位の優劣にかかわらず摂食が可能であった。さらに、繁殖時に自由交配させた場合、雄の

交尾成功率の個体差が大きく、雄の選択が重要であること、などが明らかとなった。以上の結果から、「めん羊による除草効果とそれに伴う景観保全だけでなく、補助飼料の給与も行いながら子めん羊や羊肉の販売を見据えためん羊生産体系の確立」までには至らなかったものの、本研究以前に得られていた知見とあわせ、中山間地域における耕作放棄地の有効利用のひとつの方向性を示した。

#### 文 献

- 1) 田中智夫, 内藤範剛, 赤堀友紀, 植竹勝治, 江口祐輔: (財)伊藤記念財団平成15年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 22, 161~167, 2004.
- 2) 田中智夫, 田井斐子, 植竹勝治, 江口祐輔: (財)伊藤記念財団平成17年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 24, 180~185, 2006.
- 3) 田井斐子, 江口祐輔, 植竹勝治, 田中智夫: 日緬研会誌, 43, 13~18, 2006.
- 4) 渡邊祐輔, 小林麻由, 田嶋美穂, 植竹勝治, 田中智夫: 日緬研会誌, 51, 1~8, 2014.
- 5) 渡邊祐輔, 植竹勝治, 田中智夫: 日緬研会誌, 53, 1~6, 2016.
- 6) Martin, P., Bateson, P. (粕谷英一, 近雅博, 細馬宏通 訳): 行動研究入門, 初版, 94~101, 東海大学出版会, 東京, 1990.

## 竹笹サイレージの肉用鶏への給餌による食中毒菌の制御とプロバイオティクスの開発

Control of foodborne bacteria in poultry by feeding of bamboo silage and development of probiotics from the silage

谷口 喬子・三澤 尚明

(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

Takako Taniguchi and Naoaki Misawa

(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

As “bamboo silage” has strong antibacterial activity, it may be used not only as roughage but also as a functional feed to inhibit colonization by bacteria that can cause foodborne infections from the intestinal tracts of food animals. In the present study, we evaluated whether bamboo silage or *Lactobacillus* species isolated from the silage might have efficacy as feed additives to reduce *Campylobacter jejuni* contamination in free range chickens, as poultry are considered to be a major source of human campylobacteriosis. *Lactobacillus* species were isolated from bamboo silage, and nine strains including *L. brevis*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, and *L. acetotolerans* showed antibacterial activity against *C. jejuni*. However, bamboo silage as a feed additive had no inhibitory effect on intestinal colonization by *C. jejuni* in free range chickens. Similarly, addition of heat-killed *L. brevis*, *L. plantarum*, and *L. buchneri* isolated from bamboo silage to drinking water had no inhibitory effect on intestinal colonization by *C. jejuni*.

### 1. 目 的

宮崎県畜産試験場は、飼料自給率向上および地域未利用資源の飼料化を目的として、竹の主軸（棹）部分だけではなく、高い栄養価が期待される竹葉（笹）部分を原料とした“竹笹サイレージ”を考案し、栄養成分の分析ならびに牛への給与試験の結果から、“竹笹サイレージ”が粗飼料として利用可能であることを確認した<sup>1)</sup>。さらに、本飼料を給与することにより、ロース、筋間脂肪、皮下脂肪中のオレイン酸含量が非給与牛に比べ有意に高く、食味も良好であることを明らかにして

いる<sup>1)</sup>。我々は、“竹笹サイレージ”の経産肥育牛への給餌により食中毒菌として重要視されている腸管出血性大腸菌の保菌率を低下させるデータを得るとともに、飼料抽出物中に強い抗菌活性物質を含んでいることを明らかにした（未発表データ）。これらの試験結果から、“竹笹サイレージ”は単に粗飼料としてではなく、食中毒細菌の排除や肉質改善などの効果を有する機能性飼料である可能性が高いと考えられた。

カンピロバクターによる食中毒は国内で最も発生件数の高い細菌性食中毒として重要視されており、その主要な感染源の一つに食鳥が挙げられ

る<sup>2)</sup>。本菌による食中毒を防ぐには、養鶏場において防除対策を講じることが最も重要であるが、現時点では有効な手段はまだ確立されていない<sup>3,4)</sup>。

そこで本研究では、“竹笹サイレージ”の肉用鶏への給餌による腸管からのカンピロバクター排除の効果を明らかにし、プロバイオティクスとなる有用菌の検索を行うことを目的とした。最終的なゴールは国内外の未利用資源である竹の飼料化による粗飼料自給率の向上と食鳥肉の安全かつ肉質向上を目指した取り組みにつなげることである。

## 2. 方法

### 2.1 竹破砕物および竹笹サイレージの調製

孟宗竹を樹木粉碎機で10mm程度に細断し、竹破砕物を調製した。竹破砕物1tあたり廃糖蜜50kgを混ぜたものをロールペールに成型した。成型後のロールペールは、1ロールにつき約300kgでラッピングを行い、60日以上経過したものを開封して竹笹サイレージとして用いた。

### 2.2 乳酸菌分離および優勢乳酸菌種の同定

竹破砕物・竹笹サイレージともに、10gを秤量し、これに滅菌リン酸緩衝液(PBS)90mlを加えて10倍希釈乳剤とした。この乳剤を階段希釈してMRS寒天培地(Difco)に接種し、嫌気培養条件下で30℃、約5日間培養した。優勢乳酸菌は、最も高い希釈倍率の乳剤を接種した培地に生育した集落の中から無作為に8個釣菌した。

分離された乳酸菌は、Genetic Analyzer3130(Applied Biosystems)により16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、BLAST(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>)のホモロジー検索により同定した。

### 2.3 抗菌活性の検出

竹破砕物および竹笹サイレージから分離した乳酸菌64株を、MRS寒天培地で5日間、嫌気条件下で培養後、GYP液体培地でさらに4~5日間

培養した培養上清を試験液とした。直径10mmのペーパーディスクを試験液に浸漬し、*Campylobacter jejuni*を塗布した5%馬脱繊維血を含む血液寒天基礎培地(Oxsoid)上に置き、37℃、48時間微好気培養(75% N<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 5% H<sub>2</sub>, 10% O<sub>2</sub>)後、発育阻止円の直径を測定した。すべての試験において発育阻止円の直径が12mmを超えるものを陽性と判定した。

### 2.4 *C. jejuni*の鶏腸管定着阻害効果試験

#### 2.4.1 実験動物

実験動物として、宮崎県畜産試験場で交雑種開発したみやざき地頭鶏を使用した。感染実験は、宮崎大学動物実験委員会の承認(承認番号2015-002)を得た後、P2仕様のアイソレーター内で1ケージにつき2~3羽を飼育して行った。これらの鶏については実験開始前に、後述するクロアカ内容物検査法で*C. jejuni*陰性であることを確認した。

#### 2.4.2 供試菌株と経口投与

供試菌株には、ブロイラー盲腸内容物由来*C. jejuni* T2A-5A-1株を用いた。5%馬脱繊維血を含む血液寒天基礎培地上において、37℃、48時間、微好気条件下で培養したものをPBSに懸濁し、550nmにおける吸光度を1.0±0.1に調製した。マウス用プラスチックゾンデを使用し、嗉嚢内に1羽につき1ml投与した。陰性対照群には、PBSを1羽につき1ml投与した。

#### 2.4.3 クロアカ内容物および盲腸内容物中の

##### *C. jejuni*の定量的検出

滅菌綿棒を用いて採材したクロアカ内容物および安楽殺時に採材した盲腸内容物をPBSで階段希釈し、mCCDA培地(Oxsoid)に塗布後、37℃、48時間、微好気条件下で培養した。

#### 2.4.4 竹破砕物および竹笹サイレージの給餌

試験区として、通常飼料給餌区、竹破砕物20%添加飼料給餌区、および竹笹サイレージ20%添加

飼料給餌区の3区とし、各試験区にPBSと*C. jejuni*をそれぞれ4羽ずつ投与し、計24羽の鶏を用いた。4週齢時に*C. jejuni*  $6.4 \times 10^8$  cfuまたはPBSを経口投与した後、5週齢から竹破砕物または竹笹サイレージの添加飼料の給餌を開始した。竹破砕物および竹笹サイレージ添加飼料は、それぞれ通常飼料（パワーチェックZK）に、竹破砕物あるいは竹笹サイレージを20%添加し、よく混合したものを用いた。*C. jejuni*またはPBSを嗉嚢内に投与した後、3日～4週でクロアカ内容物中の*C. jejuni*数を測定した。PBS投与鶏を13週齢で、*C. jejuni*投与鶏を16週齢（*C. jejuni*投与後12週）で安楽殺し、盲腸内容物中の*C. jejuni*数を測定した。

#### 2.4.5 竹笹サイレージ由来乳酸菌の鶏への飲水投与試験

竹笹サイレージから分離された*Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus buchneri*をMRS寒天培地上において30℃で1週間、嫌気条件下で培養した。これらを滅菌蒸留水に懸濁したものを、乳酸菌懸濁液（*L. brevis*  $2.8 \times 10^8$  cfu/ml, *L. plantarum*  $4.0 \times 10^7$  cfu/ml, *L. buchneri*  $2.6 \times 10^9$  cfu/ml）とし、60℃で40分加熱した。これを、5週齢から1羽につき1日1mlを飲水に添加した。6週齢で*C. jejuni*  $5.4 \times 10^9$  cfuまたはPBSの嗉嚢内投与を行い、投与1週～5週後にクロアカ内容物中の*C. jejuni*数を測定した。PBS投与鶏を12週齢で、*C. jejuni*投与鶏を15週齢（*C. jejuni*投与後9週）で安楽殺し、盲腸内容物中の*C. jejuni*数および乳酸菌数を測定した。乳酸菌の優勢菌種については、16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、BLASTのホモロジー検索により同定した。

試験区は、滅菌蒸留の飲水投与区および竹笹サイレージ由来乳酸菌懸濁液の飲水投与区であり、各試験区にPBSと*C. jejuni*をそれぞれ4羽ずつ投与し、計16羽の鶏を用いた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 竹破砕物および竹笹サイレージ中の乳酸菌数および優勢乳酸菌種

竹破砕物中の乳酸菌数は $5.2 \times 10^6$  cfu/gで、優勢乳酸菌種は*Weissella cibaria*であった。竹笹サイレージ中の乳酸菌数は $1.5 \times 10^5$  cfu/gで、優勢乳酸菌種は*L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis*であった。高品質サイレージを調製するためには、乳酸菌は材料草に共存する酢酸菌などの微生物と競合し増殖するため、材料草1gあたり $10^5$  cfu/g以上の菌数が必要だといわれており<sup>5)</sup>、孟宗竹はサイレージ調製のための十分な乳酸菌数を保持していることが確認できた。また竹笹サイレージの優勢乳酸菌である*L. plantarum*は、サイレージの乳酸発酵を促進するスターターとして、*L. buchneri*および*L. brevis*は、好気的変敗を抑制するスターターとして広く利用されている。これらが優勢乳酸菌種として分離されたことは非常に興味深く、竹笹サイレージの発酵品質へ影響を及ぼしている可能性が高い。

#### 3.2 竹破砕物および竹笹サイレージから分離した乳酸菌の抗菌活性

68株中9株（*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. buchneri*, *L. acetotolerans*）が*C. jejuni*に対して抗菌活性を示した（Table 1）。中でも*L. plantarum*の活性が最も強く、カンピロバクター排除のためのプロバイオティクスとなりうる可能性が示唆された。

#### 3.3 竹破砕物および竹笹サイレージの*C. jejuni*鶏腸管定着阻害効果

*C. jejuni*投与後のクロアカ内容物および盲腸内容物の*C. jejuni*菌数は、通常飼料給餌群、竹破砕物20%添加飼料給餌群、竹笹サイレージ20%添加飼料給餌群において有意な差はなく、実験期間中安定して $10^4$ から $10^6$  cfu/gが検出された（Fig.

1)。しかしながら、竹破碎物および竹笹サイレージの給餌による *C. jejuni* の腸管定着阻害効果は認められなかった。

#### 3.4 竹笹サイレージ由来乳酸菌投与鶏における *C. jejuni* の腸管定着阻害効果

*C. jejuni* 投与後のクロアカ内容物および盲腸内容物の *C. jejuni* 菌数は、対照群および乳酸菌懸濁液添加群において有意な差はなく、実験期間を通

して  $10^4$  から  $10^6$  cfu/g 程度の *C. jejuni* が検出された (Fig. 2)。PBS 投与群において *C. jejuni* は検出されなかった。盲腸内容物の乳酸菌数は、PBS および *C. jejuni* 投与群ともに、滅菌蒸留の飲水対照群に比べ、乳酸菌懸濁液の飲水添加群において有意に高い値を示した (Fig. 3)。その優勢菌種は、乳酸菌懸濁液の投与により、*L. reuteri*、*L. johnsonii* の占める割合が増加したものの、両者

Table 1 Antibacterial effect of *Lactobacillus* isolated from bamboo and bamboo silage on *Campylobacter jejuni*

Species	antibacterial activity	
	+	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	2*	11
<i>Lactobacillus buchneri</i>	3	11
<i>Lactobacillus brevis</i>	3	11
<i>Lactobacillus acetotolerans</i>	1	5
<i>Weissella cibaria</i>	0	8
<i>Lactobacillus casei, paracasei</i>	0	5
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	0	1
<i>Pediococcus cellicola</i>	0	2
<i>Burkholderia sp.</i>	0	1

+ Positive, - Negative

\*No. of strains.

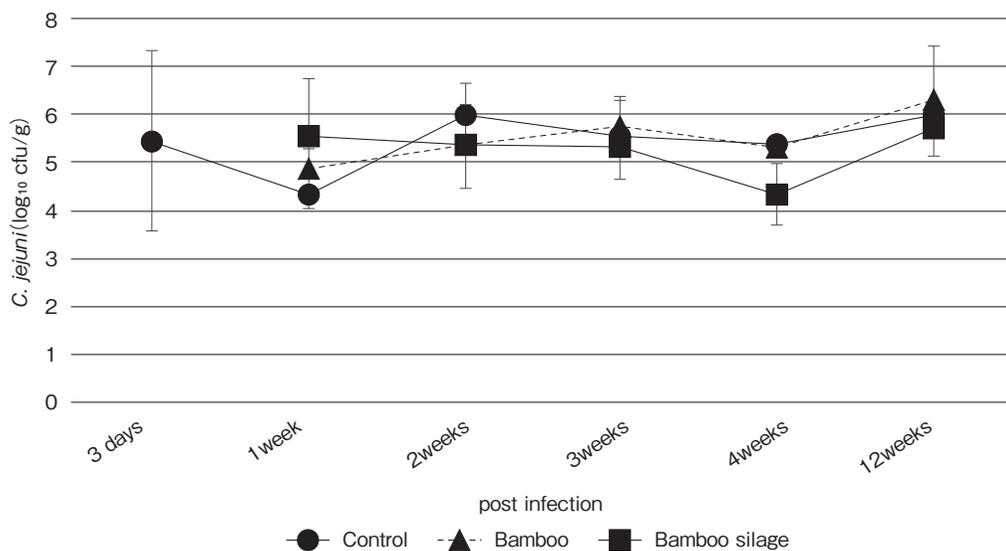


Fig. 1 Counts of *C. jejuni* recovered from the cloaca or cecal contents of chickens fed bamboo tips or bamboo silage. Viable *C. jejuni* cells were recovered from the cloaca at 3 days, and 1, 2, 3, and 4 weeks, and from the cecal contents at 12 weeks post-infection, respectively. Bars, standard errors.

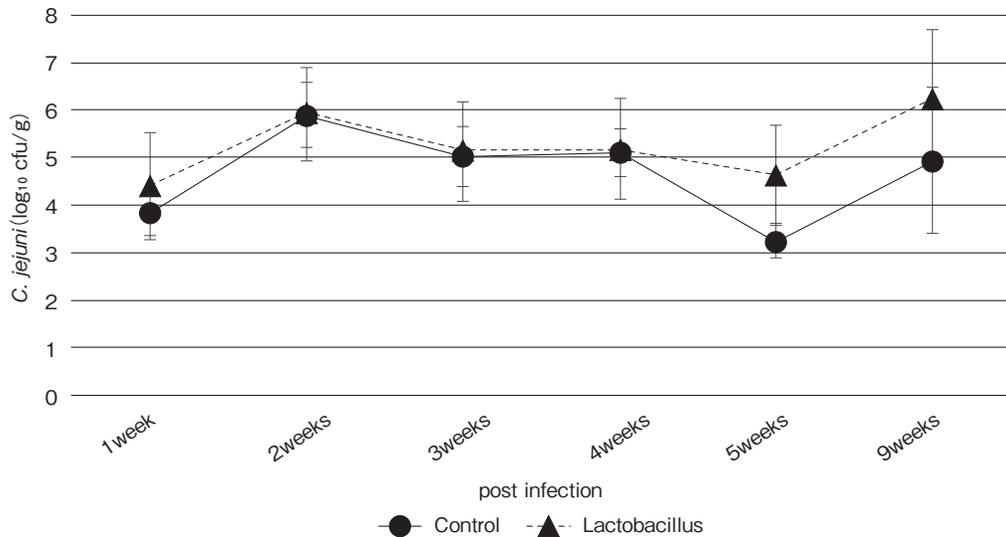


Fig. 2 Counts of *C. jejuni* recovered from the cloaca and cecal contents of chickens given lactobacilli post-infection. Viable *C. jejuni* cells were recovered from the cloaca at 1, 2, 3, and 4 weeks, and from the cecal contents at 9 weeks post-infection, respectively. Bars, standard errors.

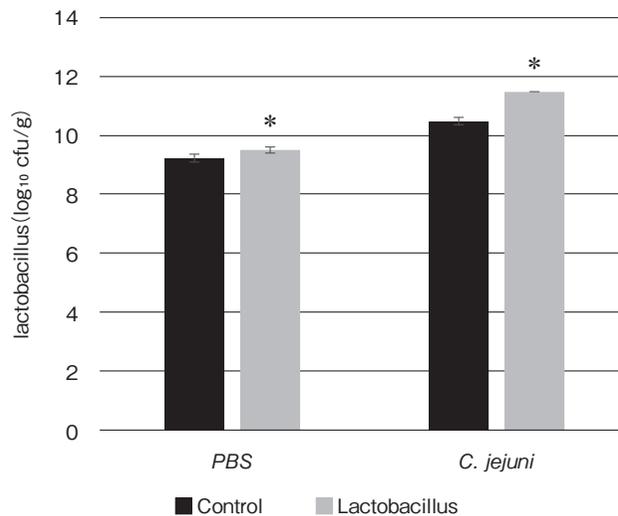


Fig. 3 Counts of lactobacilli recovered from cecal contents of chickens given three *Lactobacillus* species and a control after administration of *C. jejuni* or PBS.

Viable lactobacilli were recovered from the cloaca of chickens after 6 and 9 weeks of PBS or *C. jejuni* administration, respectively. Bars, standard errors. \*,  $P < 0.05$ .

の構成菌種には大きな違いは認められなかった (Fig. 4)。

#### 4. 要 約

我々は、地域未利用資源である竹を活用して作

製した“竹笹サイレージ”の抽出物中に、強い抗菌活性物質を含んでいることを明らかにし、“竹笹サイレージ”は単に粗飼料としてではなく、食中毒細菌の排除や肉質改善などの効果を有する機能性飼料である可能性を示した。そこで主要な食

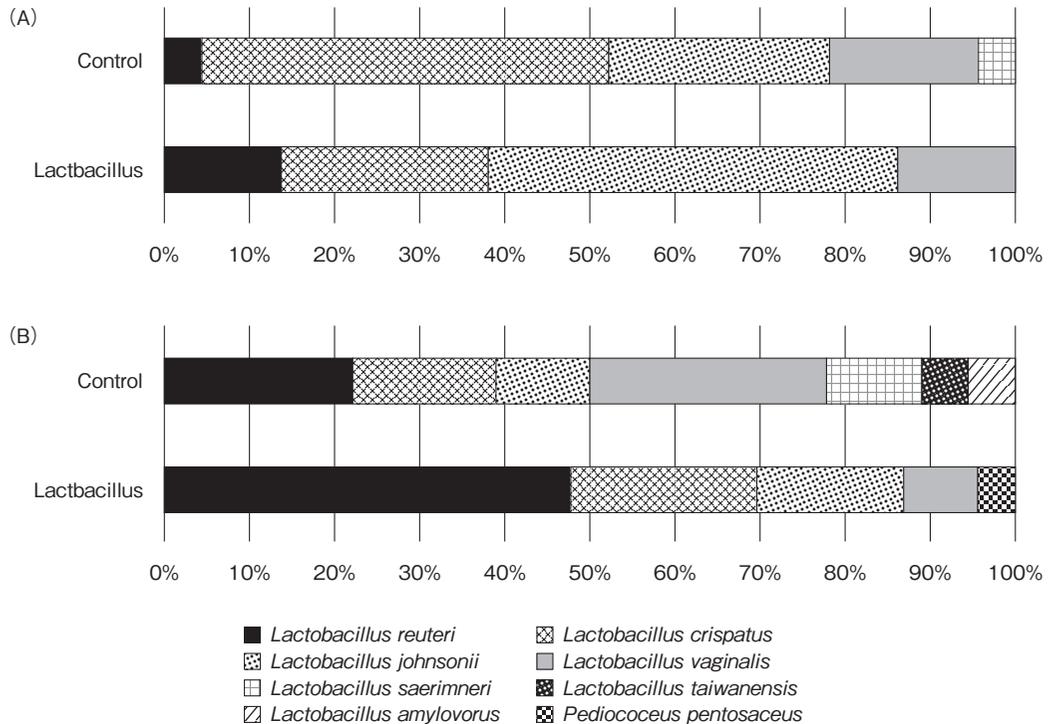


Fig. 4 Composition of dominant *Lactobacillus* species in cecum contents.

(A) Chickens administrated with PBS

(B) Chickens administrated with *C. jejuni*

中毒の原因菌であるカンピロバクターに対するプロバイオティクスとなる有用菌の検索を“竹笹サイレージ”より行ったところ、本菌に抗菌活性を保持する乳酸菌数株が分離された。一方、肉用鶏であるみやざき地頭鶏を用いて“竹笹サイレージ”の給餌によるカンピロバクターの腸管定着阻害を調べたところ、その効果は認められなかった。さらに“竹笹サイレージ”由来乳酸菌である *L. buchneri*, *L. plantarum*, *L. brevis* の死菌の飲水投与を行ったところ、盲腸内容物中の乳酸菌数は増加したが、カンピロバクターの腸管定着阻害効果は認められなかった。

#### 文 献

- 鍋西久：平成24年度宮崎県畜産関係学術研究委託調査報告書，2012。
- Corry, J. E., Atabay, H. I. : *Symp Ser Soc Appl. Microbiol.* 30, 96S-114 S, 2001.
- Stern, N. J., Svetoch, E. A., Eruslanov, B. V., Perelygin, V. V., Mitsevich, E. V., Mitsevich, I. P., Pokhilenko, V. D., Levchuk, V. P., Svetoch, O. E., Seal, B. S. : *Antimicrob Agents Chemother.* 9, 3111~6, 2006.
- de Zoete, M. R., van Putten, J. P., Wagenaar, J. A. : *Vaccine*, 30, 5548~57, 2007.
- Hellings, P., Bertin, G. : *Proceedings 15th International Grassland Congress*, 932 ~ 933, Kyotosyuppan, Kyoto, Japan, 1985.

## 牛由来肝臓細胞における薬物代謝関連遺伝子の解析

Cytochrome P450 expression in SV40 large T antigen-immortalizes bovine liver cell lines

吉 岡 都

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門)

Miyako Yoshioka

(National Institute of Animal Health, NARO)

In the livestock industry, development of easy and reliable screening methods for detection of harmful substances in the cattle feed is essential. In this study, to establish an *in vitro* model for evaluation of effects of xenobiotics in livestock, we characterized drug-metabolizing cytochrome P450 (CYP) induction in primary bovine hepatocyte and SV40 large T antigen-immortalizes bovine liver cell lines (parenchymal hepatocyte-like BH4, BH5 cells, and myofibroblast-like A26 cells). Primary bovine hepatocytes were highly responsive to 3-methylcholanthrene (3MC), showing increased levels of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNA 48 h after stimulation, while no changes were observed for CYP3A4, CYP2C9, CYP2C18, and CYP2B6 mRNA. In contrast, primary bovine hepatocytes were exhibited upregulation of CYP3A4, CYP2C9, CYP2C18, and CYP2B6 mRNA 48 h after stimulation by phenobarbital (PB), and there were no changes of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNA. Among the immortalized bovine liver cells, the parenchymal hepatocyte-like BH4 cells were highly responsive to 3MC for CYP1A1 expression. The myofibroblast-like A26 cells had relatively high CYP1B1 response to 3MC. There were no differences for CYP1A2 regulation among the immortalized bovine liver cells. This study showed that mRNA levels of CYPs in the immortalized bovine liver cells were significantly lower than primary bovine hepatocytes, however, BH4, BH5 and A26 cells had measurable response to CYP induction. These immortalized bovine liver cells can be employed as a useful tool to study the effects of xenobiotics in bovine.

### 1. 研究の目的および背景

近年、牛の飼料は、飼料の高騰による未利用資源の有効利用や環境負荷を軽減するためエコフィードの利用など、経済性追求のために多様化している。また、薬剤耐性菌の問題から抗生物質

に代わる新規抗菌成分の添加など、新規の飼料添加物の開発が進められている。しかし、新規の飼料・飼料添加物やエコフィード等には未知の危害要因が含まれる可能性がある。家畜の健康を保ち、安全な畜産物を消費者に提供するためには、このような家畜の飼料、飼料添加物の安全性を迅

速、適切に評価することが重要である。しかし、牛は大動物であるため、牛を用いた飼養試験は経済的にも環境負荷の点でも負担が大きい。一方、牛は反芻動物であるため、マウスやラット等とは代謝機能が大きく異なっている。牛特有の薬物代謝機能を評価可能で、かつ迅速・簡便、経済的な安全性評価試験法としては、細胞を用いた代替手法が非常に有用である。

我々はこれまでに、家畜由来の初代培養肝細胞を用いた研究で、ダイオキシンやかび毒などの有害物質に対し、生体に近い応答性が得られることを確かめている<sup>1)</sup>。しかし、初代培養細胞を用いた評価は試験のたびに動物から臓器を採取して細胞分離する必要があるため、株化細胞（不死化細胞）を用いた簡便で安定した条件での毒性評価法の開発が望まれる。生体の代謝の中核である肝臓は、代謝の場である肝実質細胞のほかクッパー細胞、類洞内皮細胞、星細胞等の非実質細胞から構成されている。これらの非実質細胞のパラクラインによる肝実質細胞とのクロストークは、毒性発現を含めた薬物代謝のほか、肝再生や脂肪肝などの病態にも関与していることが知られている<sup>2)</sup>。我々は、肝実質細胞、類洞内皮細胞、筋線維芽細胞など、牛の肝臓由来の複数の不死化細胞を作出してきているが<sup>3)</sup>、薬物代謝に関連する酵素群、受容体等の遺伝子群の発現動態に関する知見が不足している。これらの細胞の薬物代謝学的特性が明らかになれば、これらを単独、または組み合わせて使用することで、また培養条件を調整して生体の状態に近づけることで、より有効な毒性評価手法を開発することができる。そこで、本課題では、これら牛肝臓由来不死化細胞の薬物代謝関連遺伝子の発現動態を解析し、種としての特性および不死化による変動を解明し、牛の飼料汚染物質の簡便な毒性評価系確立のための基礎的知見を得ることを目的とする。このような牛の飼料の簡便

な毒性評価法が確立されれば、畜産物の安全性確保技術に大きく貢献する。

## 2. 材料および方法

### 2.1 肝実質細胞の分離と初代培養

生後7～10日齢のホルスタイン新生子牛を動物衛生部門実験動物委員会のガイドラインに従って実験に供した。ペントバルビタール麻酔下での放血による安楽死後、肝尾状葉を採取し、二段階灌流法により肝実質細胞を含む肝臓細胞を得た<sup>4)</sup>。肝実質細胞は、10%牛胎児血清、100U/mlストレプトマイシン、100g/mlペニシリンを添加したWilliam's E mediumに再浮遊させ、 $5 \times 10^5$  cells/mlの細胞密度で6穴の培養プラスチックシャーレに播種、培養した。

### 2.2 不死化細胞株の樹立と培養方法

培養2日目の初代培養肝実質細胞に、Fugene HD transfection reagentを用いてSV40LT geneをエンコードしたpSVneoを導入した<sup>5)</sup>。導入細胞はG418を用いて選択を行い、クローニングを繰り返し、BH4およびBH5細胞株を得た。同様に、肝臓分離後の非実質細胞分画の培養から、類洞内皮細胞株（B46細胞）および筋線維芽細胞株（A26細胞）を得た<sup>3)</sup>。継代の際にはacutaseを用いて分散させ、 $5 \times 10^5$  cellsの細胞を35mmディッシュに播き、3～4日ごとに継代した。培養に用いた培地は、BH4およびBH5細胞は、初代培養肝実質細胞と同様に、William's E mediumで、B46細胞およびA26細胞は、Dulbecco's modified Eagle's mediumで行い、継代には10%の牛胎児血清を添加するが、薬物添加実験の際には、血清中の生理活性物質の影響を除くため、無血清培地に交換して実施した。

### 2.3 RNA抽出とReal-time PCR

培養細胞のtotal RNA抽出はQuickGene-810 Nuclear Acid isolation System (KURABO) を用

いて抽出し、Brilliant II SYBR QRT-PCR kit (Agilent Technologies) を用いたリアルタイムPCRにより解析した。プライマーはSigma社の市販牛用プライマーセットを用いた。解析法は内在性コントロールとしてグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた $\Delta\Delta Ct$ 法により実施した<sup>3)</sup>。

### 3. 結果と考察

牛初代培養肝実質細胞の薬物代謝機能を定量的かつ数値的に評価可能なアッセイ系を確立するため、外来性異物代謝酵素を誘導する代表的な薬物である3-メチルコラントレン (3MC: 1  $\mu$ M) またはフェノバルビタール (PB: 1mM) を牛初代培養肝実質細胞に添加し、48時間後にチトクロームP450 (CYP) の薬物代謝酵素遺伝子の発現を解析した。

3MCはAhR (Aryl hydrocarbon receptor) のリガンドの一つであり、CYP1Aファミリーを誘導することが知られている。我々の牛初代培養肝実質細胞においても、3MC刺激に対して、

CYP1A1, 1A2および1B1のmRNAが著しく誘導されたが、3A4, 2C9, 2C18および2B6はほとんど誘導されなかった (Fig. 1)。以前にも、牛初代培養肝実質細胞において、AhRのアゴニストであるTCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) やPBDD/Fs (polybrominated dibenzop-dioxins, dibenzofurans) によってCYP1A1および1B1が誘導されることが報告されており<sup>1)</sup>、今回の結果と一致した。

一方、PBはCYP2A, 2B, 2C, 3Aといった複数のCYPを、AhRとは別の核内レセプターを介して誘導する。とくに、CYP2Bサブファミリーに対する誘導が強く、CAR (Constitutive androstane receptor) を介してCYP2Bを誘導する。牛初代培養肝実質細胞のPB刺激に対する応答は、3A4, 2C9, 2C18および2B6が上昇し、1A1, 1A2および1B1は変化しなかった (Fig. 1)。これらのことから、我々の牛初代培養肝実質細胞が、多くの動物種の肝臓および肝細胞で報告されているのと同様に、薬剤に対応した高いCYP誘導能を有しており、その薬物代謝

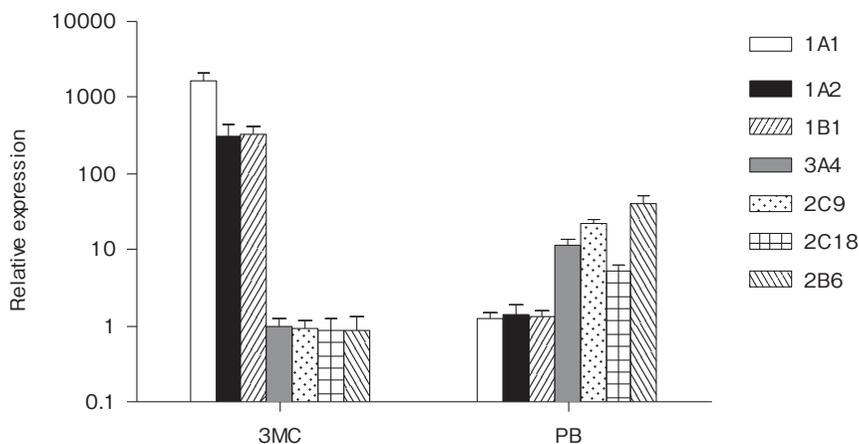


Fig. 1 Comparison of CYP mRNA expression in bovine primary hepatocytes after stimulation with 3-methylcholanthrene (3MC) or phenobarbital (PB) of 48 h. Data are expressed as fold increase in CYP mRNA content compared with control samples (means  $\pm$  SD).

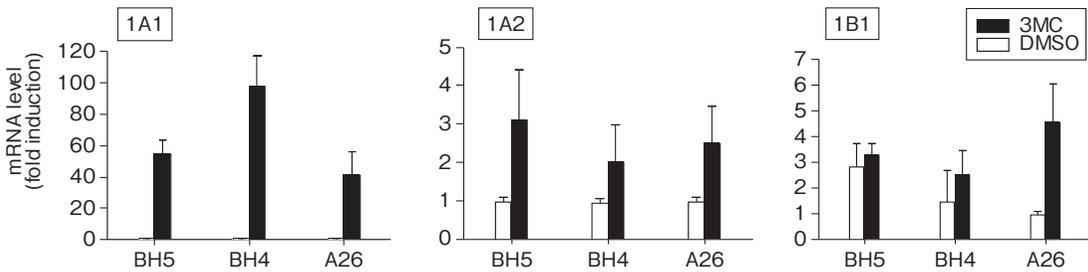


Fig. 2 Comparison of CYP1A1, CYP1A2 and CYP1B1 mRNA expression by 3-methylcholanthrene (3MC) in immortalized bovine liver cells (BH5, BH4 and A26 cells). Data are expressed as fold increase in CYP mRNA content compared with control samples (means  $\pm$  SD).

機能をリアルタイムPCRで評価することが可能であることが明らかとなった。

初代培養肝実質細胞と同様の方法で、BH4、BH5およびA26細胞の不死化細胞株における3MCによるCYP誘導の比較検討を行った。その結果、1A1の誘導はBH4細胞で最も高く、1B1はA26細胞で高かった。1A2は細胞間で差が認められなかった (Fig. 2)。CYP1A1は、主に肝臓以外の臓器で発現し、ラットやヒトでは肝臓での発現は低いとされている<sup>6)</sup>。しかし、牛では肝臓を含む多くの臓器でCYP1A1の発現が報告されており、とくに肝臓と腎臓で高発現している<sup>7)</sup>。我々の不死化細胞株においても、肝実質細胞様のBH4およびBH5細胞および筋線維芽細胞様のA26細胞において、3MC刺激により、1A1、1A2、および1B1の誘導が認められた。とくに、1A1の誘導は50~100倍と高く、そのうちBH4細胞による誘導が最も高いことが明らかとなった。一方、1A2と1B1の誘導は認められるものの、2~5倍であった。1B1の誘導はA26細胞で高かったが、1A2の誘導では細胞間で差は認められなかった。これらのCYP誘導は、初代培養肝実質細胞と比べると著しく低かった。

ヒト肝ガン由来であるHepG2細胞などの細胞株では、CYP発現が初代培養肝実質細胞に比べ

て低いことは知られているが、細胞分離の煩雑さや個体差・培養条件による結果のバラつきが少なく、細胞株による毒性試験等の有効性が認められており<sup>8)</sup>、ヒトの毒性研究に広く用いられている。報告されているHepG2細胞の3MCによる1A2発現が10倍程度であることを考慮すると<sup>9)</sup>、今回の不死化細胞によるCYP誘導も、今後の培養条件の改善によって向上する可能性がある。また、1A1については高い誘導能が認められるため、AhRを介する薬物代謝についての解析に十分対応できる。3A4などAhR以外の核内レセプターを介する薬物代謝酵素の誘導については、今後さらに検討が必要である。

これまで、牛の薬物代謝動態を検討しうる肝臓由来細胞株は報告されてこなかったが、最近、いくつか牛由来の不死化細胞株が報告されている<sup>10, 11)</sup>。我々のBH4およびBH5細胞は3MCに対してCYP1A1、1A2、1B1の発現能を有しており、リアルタイムPCRで発現量を数値化することによって、新しい牛の実験動物代替法への応用が可能である。また、肝臓は肝実質細胞だけでなく非実質細胞との複合的な組織であり、様々な代謝調節を共同で行っている。このため、肝実質細胞株のみの単独培養系よりも、非実質細胞との複合培養系の方が、薬物代謝においても高い機能を保持する可能性が考えられる。今回、筋線維芽

細胞様のA26細胞は1B1の発現は最も高く、これらの細胞を組み合わせた複合培養系を構築することで、さらなる薬物代謝発現の高度化が期待される。

#### 4. 要 約

本研究では、牛の飼料汚染物質の簡便な毒性評価系確立のため、牛初代培養肝実質細胞の薬物代謝機能を定量的かつ数値的に評価可能なアッセイ系を確立し、牛肝臓由来不死化細胞の薬物代謝関連遺伝子の発現動態を解析した。牛初代培養肝実質細胞は外来性異物代謝酵素を誘導する代表的な薬物である3-メチルコラントレン(3MC)刺激に対して、CYP1A1、1A2および1B1のmRNAが著しく誘導されたが、3A4、2C9、2C18および2B6はほとんど誘導されなかった。一方、フェノバルビタール(PB)刺激に対しては、3A4、2C9、2C18および2B6が上昇し、1A1、1A2および1B1は変化しなかった。不死化細胞株である、牛肝実質細胞様のBH4、BH5および筋線維芽細胞様のA26細胞における3MCによるCYP誘導を比較したところ、1A1の誘導はBH4細胞で最も高く、1B1はA26細胞で高かった。1A2は細胞間で差が認められなかった。これらの牛肝臓由来不死化細胞株の単培養系は、初代培養細胞と同水準ではないものの、一定のCYP誘導能を有し、毒性評価系への利用が可能であることを見出した。

#### 文 献

- 1) Crispe, I. N. : The liver as a lymphoid organ, *Annual Review of Immunology*, **27**, 147~163, 2009.
- 2) Guruge, K. S., Yamanaka, N., Hasegawa, J., Miyazaki, S. : Differential induction of cytochrome P450 1A1 and 1B1 mRNA in primary cultured bovine hepatocytes treated with TCDD, PBDD/Fs

- and feed ingredients, *Toxicology Letter*, **185**(3), 193~196, 2009.
- 3) Yoshioka, M., Takenouchi, T., Kitani, H., Okada, H., Yamanaka, N. : Establishment of SV40 large T antigen-immortalized bovine liver sinusoidal cell lines and their immunological responses to deoxynivalenol and lipopolysaccharide, *Cell Biology International*, **40**(12), 1372~1379, 2016.
- 4) Yoshioka, M., Watanabe, A., Shimada, N., Murata, H., Yokomizo, Y., Nakajima, Y. : Regulation of haptoglobin secretion by recombinant bovine cytokines in primary cultured bovine hepatocytes, *Domestic Animal Endocrinology*, **23**(3), 425~433, 2002.
- 5) Takenouchi, T., Yoshioka, M., Yamanaka, N., Kitani, H. : Reversible conversion of epithelial and mesenchymal phenotypes in SV40 large T antigen-immortalized rat liver cell lines, *Cell Biology International Reports*, **17**(1), e00001, 2010.
- 6) Ioannides, C. : Cytochrome P450 expression in the liver of food-producing animals, *Current Drug Metabolism*, **7**, 335~348, 2006.
- 7) Darwish, W. S., Ikenaka, Y., Ghareeb, W. R., Ishizuka, M. : High expression of the mRNA of cytochrome P450 and phase II enzymes in the lung and kidney tissues of cattle, *Animal*, **4**(12), 2023~2029, 2010.
- 8) Westerink, W. M. A., Schoonen, W. G. E. J. : Cytochrome P450 enzyme levels in HepG2 cells and cryopreserved primary human hepatocytes and their induction in HepG2 cells, *Toxicology in Vitro*, **21**, 1581~1591, 2007.
- 9) Choi, J. M., Oh, S. J., Lee, S. Y., Im, J. H., Oh, J. M., Ryu, C. S., Kwak, H. C., Lee, J. Y., Kang, K. W., Kim, S. K. : HepG2 cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction by xenobiotics, *Archives of Pharmacal Research*, **38**(5), 691~704, 2015.
- 10) Donai, K., Kiyono, T., Eitsuka, T., Guo, Y., Kuroda, K., Sone, H., Isogai, E., Fukuda, T. : Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase, *Journal of Biotechnology*, **176**, 50~57, 2014.
- 11) Gleich, A., Kaiser, B., Schumann, J., Fuhrmann, H. : Establishment and characterization of a novel bovine SV40 large T-antigen-transduced foetal hepatocyte-derived cell line, *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, **52**, 662 ~ 672, 2016.

## 山間地耕作放棄地内野草放牧と畜舎内濃厚飼料多給 で生産されたサフォーク種ラム肉の食味および呈味 成分の比較

Comparison of the taste and the taste components in the meat between  
Suffolk lambs fattened by grazing on wild grass in abandoned fields in  
hilly area and those fattened by high concentrates diet in feeding barns

石田 元彦・西村 苑夏・矢地 彩加・吉田 彩乃・  
浅野 桂吾・長井 誠・小西 康子

(石川県立大学生物資源環境学部)

Motohiko Ishida, Sonoka Nishimura, Ayaka Yachi, Ayano Yoshida,  
Keigo Asano, Makoto Nagai and Yasuko Konishi

(Faculty of Bioresources and Environmental Sciences, Ishikawa Prefectural University)

Nutrients intake, blood metabolites, carcass traits, the taste and the taste components of the meat in lambs fattened by grazing on wild grass grown in abandoned farm lands of hilly area were compared with those in lambs fattened by feeding high concentrates diets at feeding barns. Ten Suffolk lambs were used. Five of the lambs were allotted to either indoor treatment where lambs were fed the diet composed of 30% barley hay and 70% concentrate on a dry matte basis or grazing treatment where lambs were grazed on wild grass grown in abandoned farm lands of hilly area, and the feeding trials were conducted for 133 days from July to November. After feeding trials, the lambs were slaughtered to determine carcass traits. The eating quality tests of the meat were conducted by four chefs and the principal component analysis on the taste components in the meat determined by the metabolome analysis were also carried out. The intake of crude protein and total digestible nutrients were not significantly different between the treatments except August when the intake were higher in the indoor treatment than in grazing treatment. As the trials proceeded after August, the intake increased in the grazing treatment and decreased in the indoor treatment. The blood metabolites analysis suggested the improvement of nutrition and immune in the grazing treatment and disorders in lever in the indoor treatment. The daily gain and carcass weight tended to be lower in the grazing treatment than in indoor treatment. The dressing percentage was significantly lower in the grazing treatment than in indoor treatment ( $P < 0.05$ ). Although the factor 1 of the principal component analysis showed the remarkable difference in the taste components between the treatments, there was no significant difference in the R-index value of the eating quality tests between the treatments. The results suggested a possibility to make brand meat by using lambs fattened by grazing on wild grasses grown in abandoned farm lands of hilly areas because they were healthier than those fattened by feeding high concentrate diets in feeding barns and the taste of the meat might be different between them.

## 1. 目 的

国産ヒツジ肉の商品価値は高い。著者らが行った北海道と長野県の調査においては、枝肉1kgあたり2,900円で生産者が販売していた。この価格は平成28年5月東京市場での和牛去勢A-4の価格、2,709円と比べても高かった。

著者らは、平成25年度に石川県立大学附属実験農場で生産したラム肉を用いて石川の農林漁業まつりにおいて試食・アンケート調査を行うとともに、金沢市内のレストランにラム肉を用いた料理試作を依頼、検討した結果から、県内産ラム肉を求める消費者、飲食店、食肉卸売業者が多く存在することを見出した。また、平成27年度に山間部耕作放棄地において野草を用いた放牧試験を実施し、子ヒツジを放牧肥育することによって放牧終了時生体重50kgを達成できる可能性を得た<sup>1,2)</sup>。

一方、山間部には狭小で機械化のできない圃場が多く、効率的な農業生産ができないことから、過疎化、高齢化が進行している。このような耕作放棄地において放牧によるヒツジ生産を行えば生産物をブランド化でき大きな付加価値を付けることができるものと期待できる。

ブランド化する場合、イメージだけでなく、生産物の食味に特徴があり、その理由を科学的に証明できれば、さらに付加価値を高めることができる。従来、ラム肉は畜舎内でエネルギー価の高い穀類を主体とした飼料を与えて生産されている。これに対して、山間部放棄地での放牧では草主体の飼養で肥育される。牧草を栽培した人工草地での放牧で肥育されたラム肉は、畜舎において穀類多給で肥育されたものよりも肉は赤身の多いものとなり、より消費者に好まれると報告されている<sup>3)</sup>。しかしながら、著者らの知る限り、放牧と濃厚飼料多給肥育ヒツジ肉との間の食味の違いとその差異をもたらす呈味成分を科学的に解明しよ

うとした試みはない。

そこで、本研究では山間部耕作放棄地において放牧肥育したヒツジと畜舎で濃厚飼料多給肥育したヒツジとの養分摂取量、血液性状、枝肉性状、肉の呈味成分と食味を比較、検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 飼養試験

a) 供試動物と処理区：サフォーク種去勢ヒツジ10頭（平均体重31.6kg、平均日齢147日）を供試し、平均体重と日齢が等しくなるように畜舎区と放牧区の各処理区に5頭ずつ割り当てた。

b) 寄生虫予防対策：試験前に駆虫剤（イベルメクチン1%）注射を行い、1ヶ月に1回糞便検査を実施して寄生虫が認められた場合に駆虫した。

c) 飼養管理：畜舎区の試験は石川県立大学実験農場畜舎において平成28年7月20日から133日間実施した。ヒツジを木製スノコ床ペンに1頭ずつ収容し、1日あたり200g増体するのに必要な可消化養分総量（TDN）を満たすようにエンバク乾草と濃厚飼料（規格外大麦と大豆粕を95：5の割合で混合したもの）を3：7の割合で給与した。水は自由飲水とした。

放牧区の試験は石川県白山市木滑区の耕作放棄地において平成28年7月20日から132日間実施した。耕作放棄地に2aの牧区を8区画設け、約4日おきに転牧を行った。1日あたり50g増体するのに必要なTDNを満たすように規格外大麦と市販大豆粕を混合した補足飼料を給与した。水は自由飲水とした。飼料摂取量を測定するために補足飼料にはDoveらの方法<sup>4)</sup>に従ってミツロウを塗布した。10月、11月は放牧地の野草では十分な飼料を摂取することができなくなったため、エンバク乾草と稲ホールクロップサイレージを給与した。

d) 測定項目と方法：放牧区、舎飼区ともに2週間ごとに体重測定を行った。畜舎区では毎日残

飼を回収し、その重量を測定した。残飼は1週間ごとに混合して採取し、給与した飼料原料を飼料秤量時に採取した。放牧区では採食状況調査における上位10種の野草を、転牧直後に採取するとともに、ミツロウ標識補足飼料、11月に与えたエンバク乾草と稲ホールクロップサイレージを飼料秤量時に採取した。また、転牧時の朝の飼料給与前にひとつかみ程度の直腸糞を全頭から採取した。採取した試料は60℃で24時間乾燥後、粉碎して分析に供した。各飼料の乾物、粗灰分、総繊維、高消化性繊維、低消化性繊維を測定し、出口らの式<sup>5)</sup>でTDN含量を算出した。アルカンの分析はNarvaez et al<sup>6)</sup>の方法を参考にして行った。飼料摂取量の算出は、畜舎区においては乾物給与量と残飼乾物量の差から算出し、それにTDN含量を乗じてTDN摂取量を算出した。放牧区では野草、エンバク乾草、稲ホールクロップサイレージ、ミツロウ標識補足飼料の採食割合を計算ソフトEATWHAT<sup>7)</sup> (Dove et al 1995)を用いて算出した。この値を用いて野草と各飼料の乾物摂取量を以下の式を用いて算出した。各野草と飼料の乾物摂取量にそれぞれのCPとTDNの含量を乗じてCPとTDNの摂取量を算出した。

$$IT = IS/PS \cdot \cdot \cdot (1)$$

$$IF = IT \times PF \cdot \cdot \cdot (2)$$

ここで、IT：総摂取量 (g)、IS：補足飼料摂取量 (g)、PS：補足飼料割合 (%)、IF：各野草摂取量 (g)、PF：各野草摂取割合 (%)

試験終了後と殺解体し、枝肉重量を測定して枝肉歩留を算出し、第12-13肋骨間切開面の背脂肪厚を測定した。

e) 得られたデータを分散分析して両区の差を検定した。

## 2.2 食味試験と呈味成分分析

a) 供試試料：飼養試験終了後にと殺解体した

畜舎区と放牧区の各1頭の枝肉の左半丸から部分肉としたロース部分を-20℃で冷凍保存しておき、食味試験前日に室温にて約12時間かけて半解凍し、5mm厚、20g程度にスライスしたものを供試した。

b) パネリスト：金沢市内飲食店のシェフ、料理長など4名であった。

c) 食味試験の実施方法：2試料間に差があるかどうかを明らかにするために、R-インデックス法を採用し、クローズドパネルで実施した。テスト時間は午後1時～3時頃とし、それぞれの食肉を同一条件で焼いた調理試料を調製し同一形状の容器に入れ、パネリストに提供した。パネリストは予備ラウンドで試料のかたさや味などで2試料間の違いについて自己の判断基準を設定し、その基準をもとに、本評価では12試料について6段階で評価した。得られた評点結果を統計解析して2試料間の差の検定を行った。さらにGC/MS分析によるメタボローム解析を実施、主成分分析を実施して2試料間の差を化学的見地からも検証した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 養分摂取量

CPとTDNの摂取量をFig. 1に示す。8月ではCP、TDNともに放牧区の方が畜舎区よりも有意に低かった (P<0.05)。しかし、8月から11月にかけての摂取量は試験の進行とともに放牧区で増加、畜舎区で低下したために、9月以降の摂取量は両区で差は認められなかった。畜舎区では濃厚飼料多給の影響でアシドーシスとなったために飼料摂取量が低下したと考えられた。一方、放牧区では寄生虫対策として午後5時から翌日の午前7時までの放牧を控えたため、8月はヒツジが暑熱の影響で昼間に放牧地へ出る時間が少なくなり、草の摂取量が低下したが、9月以降気温が低

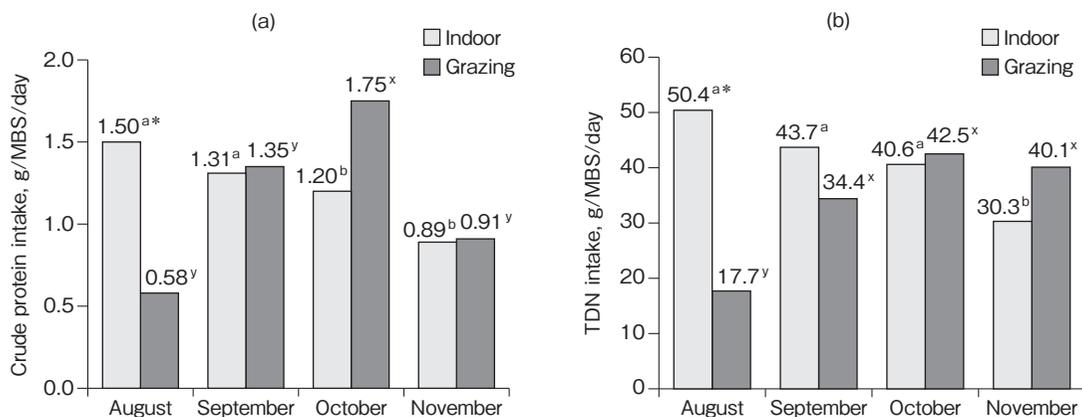


Fig. 1 Comparison of crude protein (a) and total digestible nutrients (b) intakes between indoor and grazing treatments. TDN: Total digestible nutrients, MBS: Metabolizable body weight

\*indicates that means are significantly different between indoor and grazing ( $P < 0.05$ ).

<sup>a, b</sup>indicate that means are significantly different among months within indoor treatments ( $P < 0.05$ ).

<sup>x, y</sup>indicate that means are significantly different among months within grazing treatments ( $P < 0.05$ ).

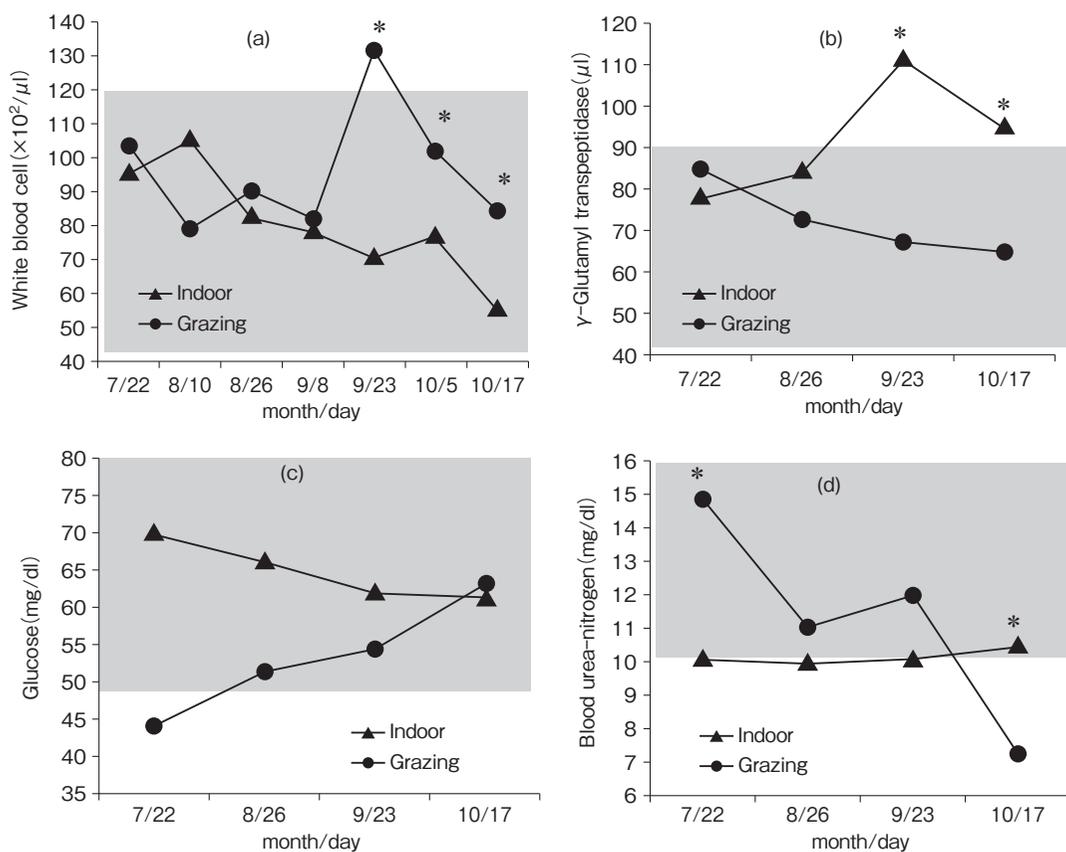


Fig. 2 Changes in white blood cell (a),  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase (b), glucose (c) and urea-nitrogen (d) in blood of lambs. Gray area fills show the range of the normal values of each metabolites.

\*indicates that means are significantly different between indoor and grazing treatments within the same day ( $P < 0.05$ ).

下するとともに採食時間が長くなって草の摂取量が高まったと考えられた。放牧区のCP摂取量が11月に低下したのは、冬季となり粗タンパク質の高い野草の摂取をできなくなったためであった。

### 3.2 血液性状

血液成分の測定結果をFig. 2に示す。白血球数は畜舎区では試験の進行とともに低下し、9月と10月においては放牧区の方が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。白血球数は免疫と関係することから、畜舎飼養では養分摂取量の低下とともに免疫が低下するが、放牧においては摂取量の増加とともに免疫が高まることが示唆された。γグルトミルトランスペプチダーゼは畜舎区において試験の進行とともに高まったが、放牧区においては低下傾向にあり、9月と10月において畜舎区は放牧区よりも有意に高く ( $P < 0.05$ )、正常値を上回った。これより、濃厚飼料多給によって肝機能障害が発生する可能性が示唆された。グルコースは畜舎区で低下傾向にあったが、放牧区では増加傾向にあった。畜舎区においては、TDN (エネルギー) 摂取量の低下に伴いグルコースが低下し、放牧区ではその逆の現象が生じたものと考えられた。血液中尿素態窒素 (BUN) 濃度は第一胃内の粗タンパク質とエネルギーの過不足を示唆する。BUNが高いとエネルギー摂取不足を示し、低いと粗タンパク質不足を意味する。畜舎区においては試験期間中正常値の下限に近く、粗タンパク質が不足気味であったことが示唆された。一方、放牧区では8月、9月とは正常値範囲内であったが、10月に低下した。野草の生育が停滞する秋には草摂取量が低下するために粗タンパク質不足に陥ることが示唆された。

### 3.3 増体量、枝肉性状

体重、日増体量、枝肉性状の結果をTable 1に示す。終了時体重と日増体量は畜舎区のほうが高い傾向が認められた。養分摂取量は両区の間で8

月を除いて差は認められなかった (Fig. 1) が、放牧区では放牧地を移動するためのエネルギーが必要で増体に利用できるエネルギーが畜舎区よりも少なかったために増体量が低くなったと考えられた。枝肉重量は終了時体重の高かった畜舎区のほうが高い傾向にあり、枝肉歩留は畜舎区が有意に高かった ( $P < 0.05$ )。放牧ヒツジは草主体の飼料摂取となるために繊維の摂取量が多く、消化管内容物の重量が重くなったために枝肉歩留が畜舎飼養ヒツジよりも低くなると考えられた。また、放牧区では増体に向けられるエネルギーが少なく、背脂肪が畜舎区に比べて薄くなったと考えられた。

### 3.4 呈味成分と食味

呈味成分の主成分分析結果をFig. 3に示す。第一主成分において大きな差が認められた。食味試験の結果をTable 2に示す。2試料の違いを識別できない場合のR-indexは0.500、識別した場合は1.000である。4番のパネリストのみが高いR-index値を示し、両区のラム肉の違いを識別できたが、残りの3名のパネリストの値は低く食味の違いを識別できなかった。差を分かりにくくした原因として、塩の味付けが強過ぎたこと、また、コショウの使用がラム肉の香りの違いを分かりにくくしたことが考えられた。

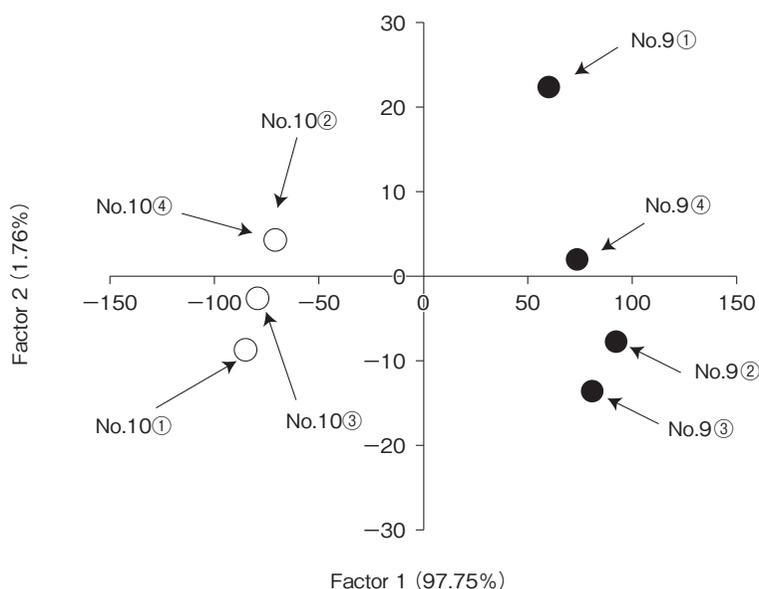
本試験の結果、放牧肥育されたヒツジは畜舎肥育ヒツジに比べて発育は遅いものの、健康であり、ラム肉の呈味成分が異なることが示唆された (Fig. 3) ことから、放牧仕上げによって従来のラム肉と食味の異なるラム肉のブランド化の可能性が示唆された。今後は、放牧ヒツジの発育の改善とラム肉への味付けを控えた食味試験を実施することが望まれる。

## 4. 要 約

野草が自生する山間部耕作放棄地において放牧

**Table 1** Live body weight, daily gain, carcass weight, dressing percentage and thickness of back fat.

Items	Treatment		P value
	Indoor	Grazing	
Number of lamb (head)	4	5	–
Initial body weight (kg)	32.2 ± 2.7 <sup>1)</sup>	31.1 ± 2.4	0.77
Final body weight (kg)	42.0 ± 3.4	37.7 ± 3.0	0.38
Daily gain (g/day)	76.8 ± 12.0	50.8 ± 10.8	0.15
Carcass weight (kg)	19.7 ± 1.6	16.1 ± 1.4	0.14
Dressing percentage (%)	46.9 ± 1.1	42.7 ± 1.0	<0.05
Thickness of back fat (mm)	3.2 ± 0.6	1.3 ± 0.5	0.05

<sup>1)</sup> Mean ± standard error**Fig. 3** Result of the principal component analysis on taste components obtained by metabolome analysis.**Table 2** R-index of the panellists

Panellist	R-index
1	0.736
2	0.583
3	0.458
4	0.847
Total	0.63

肥育したヒツジの養分摂取量, 血液性状, 枝肉性状, 肉の食味と呈味成分を畜舎において濃厚飼料多給で肥育したヒツジと比較した。サフォーク種去勢ヒツジ10頭を5頭ずつ2群に分け, エンバク

乾草と濃厚飼料を3対7の割合で与える畜舎区と自然草地に8区画の放牧地を設け4日ごとに転牧する放牧区に割り当てて飼養試験を実施した。飼養試験の終了後, と殺解体して枝肉性状を調査し, メタボローム解析による呈味成分の主成分分析を実施するとともに, 調理専門家をパネラーとした食味試験を実施した。その結果, 粗タンパク質と可消化養分総量の摂取量は8月を除いて両区に差は認められなかったが, 試験の進行に伴って畜舎区においては低下, 放牧区では増加した。血液検査の結果から放牧区では栄養状態と免疫の向

上が示唆されたが、畜舎区においては肝機能障害が認められた。日増体量と枝肉重量は、放牧区で畜舎区よりも低い傾向にあり、枝肉歩留は放牧区が畜舎区よりも有意に低かった ( $P < 0.05$ )。呈味成分の主成分分析の第一主成分において、両区のラム肉には明らかな違いが認められたが、食味試験のR-index値は両区の間で有意な差は認められなかった。以上の結果から、放牧肥育されたヒツジは畜舎肥育ヒツジに比べて発育は遅いものの、健康であり、ラム肉の呈味成分が異なることが示唆されたので、野草地放牧肥育で生産されるラム肉をブランド化できる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 中谷晏子, 伊藤愛莉, 長井千恵, 浅野桂吾, 石田元彦: 山間部耕作放棄地でのヒツジ放牧における野草地の植生, 採食草種の変化, 日本草地学会誌, 62 (別号), p51, 2016.
- 2) 伊藤愛莉, 長井千恵, 中谷晏子, 浅野桂吾, 石田元彦: 耕作放棄地に放牧したヒツジのアルカン法による採食草の構成と採食量の推定, 日本草地学会誌, 62 (別号), p52, 2016.
- 3) Zervasa, G., Hadjigeorgioub, I., Zabelic, G., Koutsotolisc, K., Tzialac, C.: Comparison of a grazing-with an indoor-system of lamb fattening in Greece, *Livestock Production Science*, 61 245~251, 1999.
- 4) Dove, H., Scharch, C., Olivan M., Mates, R. W.: Using n-alkanes and known supplement intake to estimate roughage intake in sheep, *Animal. Prod. Aust.*, 24, 57~60, 2002.
- 5) 出口健三郎, 甘利雅拓, 榎木茂彦, 阿部亮: 寒地型イネ科牧草数種を込みにしたTDN含量の推定および推定精度の草種間差異, 日本草地学会誌, 43 (別号), 290~291, 1997.
- 6) Narvaez, N., Brosh A., Pittroff, W.: Use of n-alkane to estimate seasonal diet composition and intake of sheep and goats grazing in California chaparral, *Small Ruminant Research*, 104, 129~138, 2011.
- 7) Dove, H., Moore, D.: Using a least-squares optimization procedure to estimate botanical composition based on the alkanes of plant cuticular wax, *Aust. J. Agric. Res.*, 46, 1535~1544, 1995.

# 黒毛和種肥育牛への穀物飼料増給に対する ルーメン微生物相の応答に関する研究

Response of rumen microbiota to grain-diet level during fattening period  
in Japanese Black cattle

小池 聡

(北海道大学大学院農学研究院)

Satoshi Koike

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Japanese Black (JB) is the most popular beef breed and accounts for 60% of beef cattle in Japan. In order to produce marbling meat, JB cattle are fed concentrate-based diet for over one year. It can be assumed that rumen microbiota of this breed is adapted to long-term feeding of concentrate diet. In this study, we aimed to identify the core microbiome and its compositional changes during fattening period in the rumen of JB cattle. Thirty-two fattening JB cattle were employed in the present study. Ruminal content was collected at different fattening stages (17-month-old as early fattening stage, 19- to 21-month-old as mid fattening stage and 26-month-old as finishing stage) using the stomach tube. Total DNA was extracted from the individual rumen samples and employed for real-time PCR quantification of representative bacterial species/groups. *Butyrivibrio* group, Lachnospiraceae OTU 8, *Prevotella* genus, *Ruminococcus bromii*-related group C1 and novel group U4 had higher population size compared to the other bacterial species, and sum of these five bacterial groups occupied more than 30% of total bacteria, irrespective of fattening stages. Therefore, these five bacterial groups were considered to be a core member of rumen microbiota (i.e., core microbiome) of JB cattle. However, the composition of core microbiome fluctuated during fattening periods; rumen microbiome of JB cattle was dominated by either *Prevotella* genus or *R. bromii*-related group C1. *Prevotella* genus-dominated microbiome seemed to be more common in early- and finishing stage of fattening cattle, while *R. bromii* C1-dominated microbiome tended to be common in mid fattening stage. These findings indicate that key bacterial species in the rumen of JB cattle differ during fattening period.

## 1. 目 的

黒毛和種は日本国内で約177万頭が飼育され、国内肉用牛飼養頭数の約65%を占める<sup>1)</sup>、日本における重要な肉用牛である。他の牛品種に比べて

黒毛和種は脂肪の蓄積、特に筋繊維間脂肪の増加率が高く<sup>2)</sup>、肉質の良さ（霜降り肉）が世界的に有名である。本品種は霜降り肉を生産するために、1年半以上の長期間にわたって濃厚飼料を多給する特徴的な条件で飼養される。一方、濃厚飼

料多給条件下においては澱粉分解性の乳酸菌群 (*Streptococcus bovis* など) の過増殖に起因するルーメン発酵停滞が起こりやすく、長時間にわたりルーメン内pHが5.5を下回る亜急性アシドーシス、場合によってはpH5を下回る急性アシドーシスに発展する<sup>3)</sup>。これにより、消化不良や食欲減退が引き起こされ、回復が遅れた場合には肉生産に大きなダメージを与える。このように濃厚飼料多給時にはルーメン内での発酵代謝障害の発生リスクが増加するため<sup>4)</sup>、黒毛和種においてもルーメン発酵の安定維持に貢献するコア菌群を特定し、それらを破綻させない飼養管理が重要となる。

当研究グループでは黒毛和種肥育牛のルーメン細菌叢の解析に着手しており、これまでにいくつかの基礎的知見を得ている。すなわち、16S rRNA遺伝子クローンライブラリ解析により黒毛和種牛ルーメン微生物相を構成する主要微生物群23群がルーメン全体の約40%を占めることを突き止めている (未発表データ)。これら23群には既知のデンプン分解性細菌である *Ruminococcus bromii* や *Butyrivibrio* 属細菌などが含まれることから、黒毛和種ルーメン内において濃厚飼料の分解発酵に貢献している可能性が高いものと考えられる。一方、それらの分布量は肥育ステージにより変動することも判明している。したがって、肥育の進行に伴う濃厚飼料増給によってルーメン微生物相が変動すると推察されるが、詳細については不明な点が多い。そこで本研究では肥育期間を通してルーメン微生物相の変動をモニタリングすることで、黒毛和種において安定的なルーメン発酵を支える重要微生物を明確にすることを目的とした。

## 2. 方 法

供試動物は北海道立総合研究機構畜産試験場で

飼養された黒毛和種肥育牛32頭 (すべて去勢) を用いた。供試牛の出荷月齢は28ヶ月齢で、17, 19, 21および26ヶ月齢の時点で給餌4時間後のルーメン内容物を経口採取した。給与飼料は乾草、麦稈および肥育用配合飼料による慣行飼料 (n=16)、一部をコーンサイレージに置換した飼料 (n=8) もしくは一部をコーンサイレージと飼料用米に置換した飼料 (n=8) とした。採取したルーメン内容物は液相と固相を分離せずに分析まで-80℃で凍結保存した。採取したルーメン内容物からRepeated Bead Beating Plus Column法<sup>5)</sup>により各個体のルーメン内容物サンプル中の総DNAを抽出した。黒毛和種ルーメン内で重要な働きをするコア微生物群を特定するために、慣行飼料で育成および肥育を実施した7個体について次世代シーケンサー (MiSeq) による網羅的微生物相解析を実施した。これにより特定されたコア微生物群のうちデンプン分解菌と類推された *Prevotella* 属細菌, *Butyrivibrio* グループ, Lachnospiraceae OTU8, *Ruminococcus bromii* 近縁グループC1および新規細菌群U4についてreal-time PCR定量を行い、これら菌群の肥育期間を通じた活性変動をモニタリングした。

## 3. 結果と考察

次世代シーケンシングによる網羅的菌叢解析の結果をFig. 1に示す。先行研究にて高頻度で検出されたPrevotellaceae科, Lachnospiraceae科, Ruminococcaceae科およびUnclassified Clostridialesが本研究でも主要菌群として認められた。これら4分類群の個体ごとの分布量は、Prevotellaceae科が8.96から31.88%, Lachnospiraceae科が5.88から11.72%, Ruminococcaceae科が15.49から34.41%およびunclassified Clostridialesが7.17から27.41%であり、いずれの個体においても他の菌群に比べて検出割合が高かった。これら4分類群には

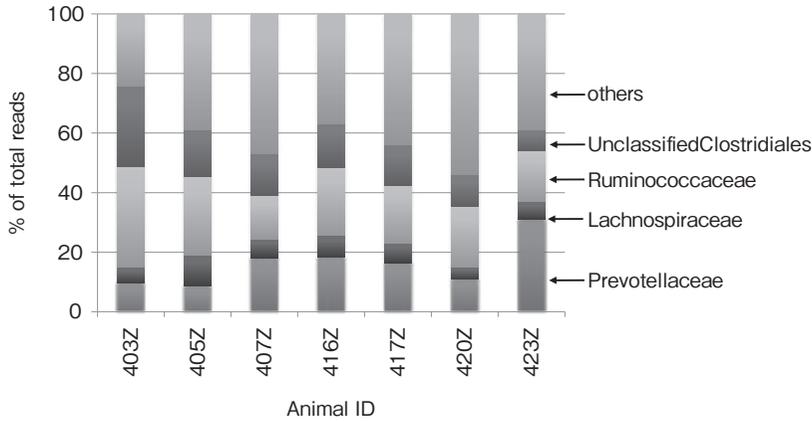


Fig. 1 Determination of core rumen microbes in Japanese Black cattle by MiSeq

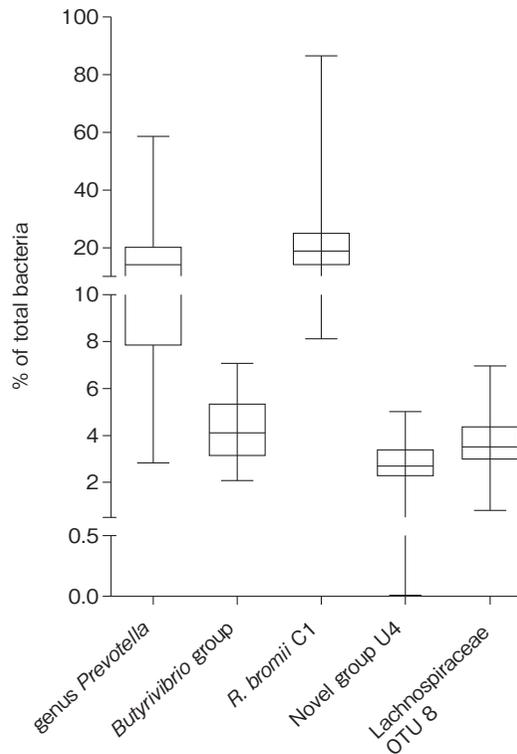


Fig. 2 Quantification of core starch degraders in the rumen of Japanese Black cattle

*Prevotella*属細菌 (Prevotellaceae科), *Butyrivibrio*グループ (Lachnospiraceae科), *R. bromii*近縁グループC 1 (Ruminococcaceae科) または新規細菌群U 4 (Unclassified Clostridiales) といったデンプン分解能をもつ分離株が属している。ま

た, 未培養ではあるものの, 分子系統位置からLachnospiraceae OTU 8についてもデンプン分解能を有する可能性が極めて高いことが当研究グループの先行研究において示唆されている (未発表データ)。そこで, デンプン分解に貢献すると

考えられる上記5菌群について全個体・全サンプルを対象にreal-time PCRによる定量的モニタリングを行った (Fig. 2)。定量した5菌群のうち、*Prevotella*属細菌および*R. bromii*近縁グループC 1の分布量が多く、個体ごとの分布量はそれぞれ総細菌の2.79から27.41%および0.12から86.55%を占めた*Prevotella*属細菌および*R. bromii*近縁グループC 1の分布量の中央値はそれぞれ11.00%および15.60%であり、半数以上のサンプルにおいて総細菌の10%以上を占めていた。*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae OTU 8および新規細菌群U 4の総細菌に占める割合はそれぞれ1.45から9.86%、OTU 8が0.06から8.44%、U 4が0.03から6.87%であった。*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae OTU 8および新規細菌群U 4の分布量の中央値はそれぞれ3.25%、3.32%および2.74%だった。これら5菌群の分布量の合計値は、総細菌の11.73から107.0%であった。以上の結果から、黒毛和種ルーメン内では*Prevotella*属細菌、*R. bromii*近縁グループC 1、*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae OTU 8および新規細菌群U 4が主要な構成メンバーであり、いずれもデンプン分解性細菌であることから、これらが濃厚飼料の分解、発酵において重要な役割を担っている可能性が高い。

一方、重要5菌群の分布量はサンプルの間の変動が大きく、分布量は個体もしくは肥育ステージの影響を強く受けることが示唆された。そこで、各菌群の分布量の相関解析を実施したところ、*Prevotella*属細菌は他4菌群のいずれとも分布量に負の相関があることが判明した。一方、*R. bromii*近縁グループC 1、*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae OTU 8および新規細菌群U 4の4菌群はいずれも分布量に正の相関が認められた。そこで*Prevotella*属細菌の分布量を他の4菌群の合計分布量と比較したところ、給与飼料を問わず負の相関が確認され (Fig. 3)、両者が競合関係もしくは補完関係にあることが示唆された。この可能性について確認するために、肥育前期、中期、後期における両者の分布量を比較した (Fig. 4)。慣行肥育では肥育ステージを通じて*Prevotella*属細菌および4菌群の分布量に有意な変動は見られなかったが、コーンサイレージや飼料用米を給与すると肥育中期に*Prevotella*属細菌の減少もしくは*R. bromii*近縁グループC 1、*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae OTU 8および新規細菌群U 4の増加が認められた。これらの結果は濃厚飼料が増給される肥育中期に*Prevotella*属細菌が減少し、それを*R. bromii*近縁グループC 1、*Butyrivibrio*グループ、Lachnospiraceae

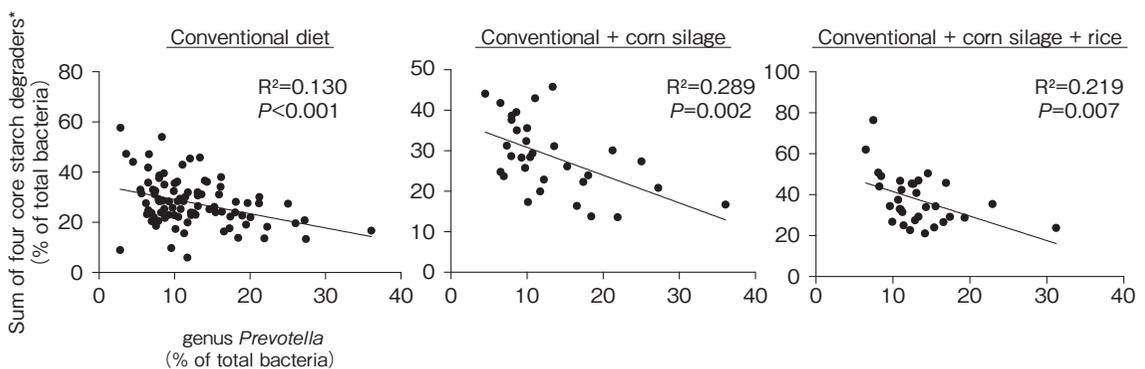


Fig. 3 Correlation between genus *Prevotella* and the other four core starch degraders determined by real-time PCR  
\*sum of population sizes of *R. bromii* C1, *Butyrivibrio* group, Lachnospiraceae OTU 8 and novel group U4

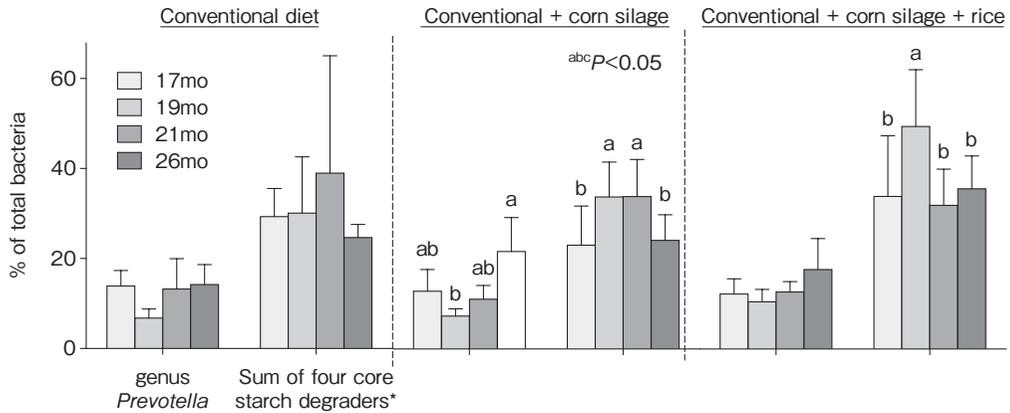


Fig. 4 Population changes of genus *Prevotella* and the other four core starch degraders during fattening periods  
\*sum of population sizes of *R. bromii* C1, *Butyrivibrio* group, Lachnospiraceae OTU 8 and novel group U4

OTU 8 および新規細菌群 U 4 が補完する形でルーメン発酵が維持されることを示唆している。

#### 4. 要 約

黒毛和種牛の安定生産において健全なルーメン発酵は極めて重要である。肥育期間を通してルーメン微生物相の変動をモニタリングすることで、黒毛和種において安定的なルーメン発酵を支える重要微生物を明確にすることを目的とした。黒毛和種肥育牛32頭から肥育前期、中期および後期の時点でルーメン内容物を経口採取し、MiSeqおよびreal-time PCRによる菌叢解析に供した。黒毛和種牛ルーメン内ではLachnospiraceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae および unclassified Clostridiales に属する細菌が総細菌の半数以上を占めた。なかでもデンプン分解菌と類推される5つの細菌群 (*Butyrivibrio*グループ, Lachnospiraceae OTU8, *Prevotella*属, *Ruminococcus bromii*近縁グループおよび新規細菌群U4) はいずれも総細菌の1%以上の割合で検出され、合計で総細菌の30%以上を占めていた。したがって、この5細菌群が黒毛和種牛ルーメン内の重要細菌群であり、これらの安定分布が健全なルーメン発酵の鍵を握るも

のと考えられた。一方、5細菌群の分布量は個体もしくは肥育ステージによって変動し、*Prevotella*属細菌とその他の4細菌群の分布量に負の相関が認められた。特に飼料条件によっては肥育中期に*Prevotella*属細菌の減少と*R. bromii*近縁グループ, *Butyrivibrio*グループ, Lachnospiraceae OTU 8 および新規細菌群U4の増加が認められた。これらの結果から、濃厚飼料が増給される肥育中期に*Prevotella*属細菌が減少し、それを*R. bromii*近縁グループC1, *Butyrivibrio*グループ, Lachnospiraceae OTU 8 および新規細菌群U4が補完する形でルーメン発酵が維持されることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 農林水産省：平成25年度畜産統計調査，東京，2014.
- 2) Gotoh, T., Albrecht, E., Teuscher, F., Kawabata, K., Sakashita, K., Iwamoto, H., Wegner, J. : *Meat Sci.*, **82**, 300~308, 2009.
- 3) Nagaraja, T. G., Titgemeyer, E. C. : *J. Dairy Sci.*, **90** : E17~38, 2007.
- 4) Khafipour, E., Li, S., Plaizier, J. C., Krause D. O. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 7115~7124, 2009.
- 5) Yu, Z., Morrison, M. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 4800~4806, 2004.

## 糖代謝産物および終末糖化産物がブロイラーの生産性に与える影響の解明

Studies on the effect of sugar metabolite and advanced glycation endproducts on broiler production

橘 哲也・牧野良輔

(愛媛大学大学院農学研究科)

Tetsuya Tachibana and Ryosuke Makino

(Graduate School of Agriculture, Ehime University)

The aim of this study was to investigate the presence of methylglyoxal (MG) and advanced glycation endproducts (AGEs) in broilers, and further investigate the relationship between MG and metabolic diseases including ascites syndrome. First, we established the analytical technique for MG and AGE using liquid chromatography-mass spectrometry. Although MG was detected in the plasma, heart, liver and muscle of several ages of broilers, aging did not affect MG levels in any tissues. It was indicated that heart has high MG level per protein compared with liver and muscle. The plasma level of N<sup>ε</sup>-carboxymethyl lysine (CML), which is an AGE, was decreased with aging. Secondary, we investigated the relationship between MG and ascites, because MG is thought to disrupt the cardiovascular system and ascites is induced by the malfunction of the cardiovascular system. In broilers, it is known that cold stress and hypoxia induce malfunction of the cardiovascular system and thereby cause ascites syndrome. We therefore exposed broilers to acute or chronic cold stress to produce ascites model and measured plasma MG level. Although we could not observe remarkable ascites symptoms in broilers, MG level in the plasma tended to increase after chronic cold stress. We therefore investigated the effect of repeated intraperitoneal administration of MG on the incidence of ascites. As a result, ascites was observed in more than half of the broilers administrated with MG. The injection of MG increased the plasma level of triacylglycerol but not glucose and insulin. Finally, oral glucose tolerance test was performed to investigate the effect of MG on glucose metabolism. Intraperitoneal injection of MG lowered plasma glucose level after loading glucose, suggesting that MG suppressed glucose absorption in the small intestine. In summary, these results suggest that MG might suppress glucose absorption, alter lipid metabolism, and induce ascites syndrome in broilers.

### 1. 目 的

肉用鶏として普及しているブロイラーは、より多くの飼料を摂取するとともに飼料中の栄養素を

効率的に利用することで他の鶏品種にはない成長速度を実現している。しかし、ブロイラーは急激に成長するため、過剰な脂肪蓄積や腹水症、突然死などの代謝性疾患をも引き起こすことが知られ

ている。これらの問題の解決が安定した鶏肉生産につながると考えられているが、ブロイラーの代謝性疾患に対する根本的な解決策はいまだ確立されていない。

ヒトの代謝性疾患の代表的なものの一つに糖尿病がある。糖尿病によりインスリンの作用が低下して高血糖になるとグルコースからメチルグリオキサール (MG) が生成される。MGは反応性が高い物質であり、酸化ストレスを増加させて血管を傷害する。さらにレニン-アンジオテンシン系を活性化させ、酸化ストレスを増加させるとともに血圧を上昇させてしまう<sup>1)</sup>。これらに加え、MGはインスリン抵抗性をもたらすことで糖尿病をさらに進行させる<sup>2,3)</sup>。また、MGは糖化反応により非酵素的にタンパク質と結合することでN<sup>ε</sup>-carboxymethyl lysine (CML) などの終末糖化産物 (AGEs) となり、タンパク質の機能を損失させてしまう<sup>4)</sup>。MGはタンパク質や脂質からも生成するため、体内の栄養状態が過多になるとMGが大量に生産され様々な悪影響をもたらすと考えられている。

鶏は哺乳類よりも2倍ほど高い血糖値を示す高血糖動物である。その中でもブロイラーは多くの飼料を摂取するため栄養状態が過剰であると言える。したがって、ブロイラーではMGやAGEsがより多く生産されていると予想され、その結果として様々な代謝性疾患が発生している恐れがある。しかしながら、鶏ではMGやAGEsと代謝性疾患の関係性が未解明であるだけでなく、体内でどれくらい生産されているのかさえ明らかにされていない。

本研究では、ブロイラーの代謝性疾患にMGやAGEsが関わっているかを明らかにすることを目的とした。まず、鶏を対象としたMGおよびAGEsの測定系の確立を行った。次いで腹水症を代謝性疾患モデルとし、腹水症発生鶏の作出を試

みた。最後に、MGをブロイラーに投与した後の腹水症の発生と血液性状等を調べ、MGと代謝性疾患の関係性を検証した。

## 2. 方法

### 2.1 飼養試験

[実験1] 1, 2, 4および6週齢のブロイラー雌から血液および組織を採取した (各6羽)。各週齢のブロイラーから採血し、5,000 xg, 10分間、4℃条件下で遠心分離し血漿を得た。さらに心臓、肝臓および浅胸筋を採取し、液体窒素で凍結した。いずれのサンプルも分析まで-80℃で保存した。

[実験2] 6週齢のブロイラー雌を対照区と寒冷ストレス区に分け、対照区は26℃、寒冷ストレス区は18℃で7時間飼育した (各6羽)。その後、直腸温を測定し、さらに採血して血漿を得た。

[実験3] 3および5週齢のブロイラー雌を対照区と寒冷ストレス区に分け (各6羽)、対照区は24℃、寒冷ストレス区は17℃で3日間飼育した。その後、直腸温を測定するとともに、血液を採取し血漿を得た。

[実験4] 5週齢のブロイラー雌を対照区、MG 60 mg投与区およびMG 120 mg投与区の3群に分けて単飼した (各6羽)。その翌日から7日間、1日1回ずつ、超純水 (対照区)、60 mgMG水溶液または120 mgMG水溶液を腹腔内投与した。試験終了後に血液を採取し血漿を得た。

[実験5] 実験4と同様に5週齢のブロイラー雌をそれぞれ6羽ずつ3群に分けて超純水またはMG水溶液を7日間、1日1回ずつ投与した。その後16時間絶食した後にグルコースを体重1 kg当たり2 g経口投与した。投与0, 15, 30, 60および120分後に採血して血漿を得た。

### 2.2 血漿中および組織中MGの測定

組織サンプルにDPBSを加えて、ビーズ式ホモ

ジナイザー (QIAGEN GmbH, ドイツ) で破碎した。破碎したサンプルを10,000 xg, 2分間, 4℃で遠心分離し上清を回収した。回収した上清中のタンパク質濃度をWarburg-Christianの式を用いて測定した。血漿または組織抽出サンプルに5 M過塩素酸を加えて氷上で10分間静置し, 10,000 xg, 10分間, 4℃で遠心分離して除タンパク質した。この上清にo-フェニレンジアミンを添加し, 30℃で3時間反応させてMGから2-メチルキノキサリンに誘導体化させた。C18固相抽出カラム (InertSep C18, ジーエルサイエンス株式会社, 東京) とバキュームマニホールド (Visiprep, シグマアルドリッチジャパン, 東京) で精製した後に, 液体クロマトグラフ三連四重極質量分析装置 (LC/MS, Waters Corporation, USA) で定量分析した。

### 2.3 血漿中AGEsの測定

上記2.2と同様に組織抽出サンプルを得た。血漿および組織抽出サンプルに0.4M過塩素酸を加えて氷上で10分間静置し, 14,000 xg, 5分間, 4℃条件下で遠心分離してタンパク質を沈殿させた。上清を0.45 μmフィルターでろ過した後に, LC/MSで定量分析した。

### 2.4 血漿中成分の分析

血漿中グルコース, トリグリセライド (TG) およびインスリン濃度はそれぞれグルコースCII-テストワコー, トリグリセライドE-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) およびマウスインスリン測定キット (森永生科学研究所, 神奈川) を用いて測定した。

### 2.5 統計解析

統計解析は統計解析ソフトSASを用いた。GLMプロシージャを用いて分散分析を行い, さらにt検定またはTukeyの多重検定を実施した。有意水準は5%とした。また, 経口糖負荷試験では曲線下面積 (AUC) を算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ブロイラーの各週齢におけるMGおよびCML濃度

上記の方法によりMGおよびCMLの定量に成功した。血漿中MG濃度および組織中MG濃度をFig. 1に示す。いずれのMG濃度も週齢による変化は認められなかった。また, 心臓におけるタンパク質重量当たりのMG濃度は肝臓および浅胸筋よりも有意に多かった。

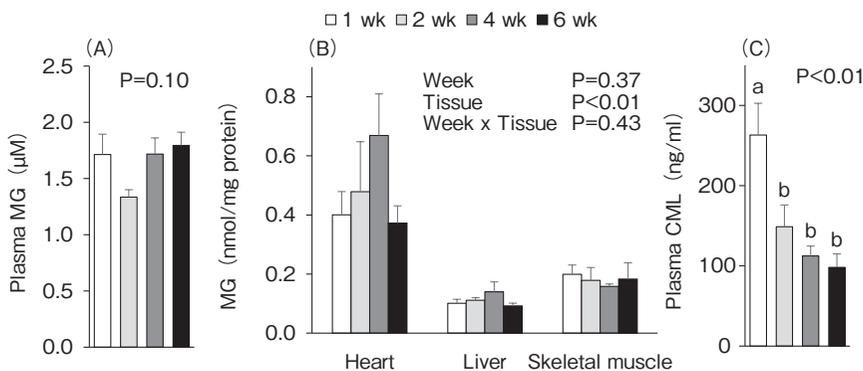


Fig. 1 MG level in plasma (A) and heart, liver and muscle (B) and plasma CML level (C) in broilers. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n = 6. The result of ANOVA is indicated within each graph. <sup>a, b</sup>Means with different superscript letters are significantly different at p<0.05.

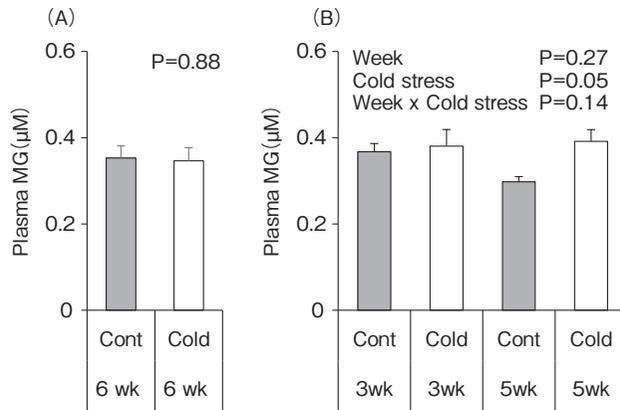


Fig. 2 Plasma MG level in broilers exposed to acute (A) or chronic cold stress (B). Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=6. The result of t-test or ANOVA is indicated within each graph.

Fig. 2 に血漿中CML濃度を示す。血漿中CML濃度は1週齢で最も高く、2週齢以降に有意な差は認められなかった。通常、AGEsは加齢に伴って蓄積することが知られている<sup>5,6)</sup>。しかしながら、若齢のブロイラーの血漿中CML濃度が高いことが示された。これは、ブロイラーの加齢に伴いCMLの産生が減少する、または産生されたCMLの除去反応が発達したことを示唆している。ただし、今回の測定系は遊離体CML量を測定するものであるため、タンパク質修飾体のAGEsを測定する必要がある。

### 3.2 急性および慢性寒冷ストレス負荷による腹水症作出の試み

急性寒冷ストレスを負荷した6週齢のブロイラーの試験終了時の直腸温は対照区が $39.8 \pm 0.2^\circ\text{C}$ 、寒冷ストレス負荷区が $38.9 \pm 0.2^\circ\text{C}$ であり、寒冷ストレス負荷区が対照区と比べて有意に低下した ( $P < 0.01$ )。また、寒冷ストレス負荷区6羽中1羽で心膜腔に黄色透明の液体が貯留していることを確認した。Fig. 2 に急冷寒冷ストレスを負荷したブロイラーの血漿中MG濃度を示す。血漿中MG濃度は両区で有意な差は認められなかった。

慢性寒冷ストレスを負荷した3および5週齢のブロイラーの体重、組織重量および直腸温をTable 1 に示す。3週齢時では、終体重、増体量、浅胸筋重量および直腸温において有意差が認められたものの、5週齢時では寒冷ストレスの影響は認められなかった。また、どちらの週齢においても腹水の貯留は認められなかった。Fig. 2 に慢性寒冷ストレスを負荷したブロイラーの血漿中MG濃度を示す。慢性寒冷ストレス負荷により血漿中MG濃度が上昇する傾向が見られたが ( $P = 0.05$ )、週齢による違いはなかった。

急性寒冷ストレスによるMG濃度の変化は見られなかったが、これはMGの体内半減期が短いことが原因であると考えられる<sup>7)</sup>。一方で慢性寒冷ストレスにより血漿中MG濃度上昇の傾向が示されたことから、MG濃度は寒冷ストレスの影響を受けることが示唆された。鶏へのMG単回投与が血圧を上昇させ、腹水症へのMGの関与が示唆されていることから<sup>8,9)</sup>、寒冷環境下ではMGが腹水症に関与している可能性が考えられた。

### 3.3 MG反復腹腔内投与によるブロイラー生理機能の変化

MGの反復投与により実験終了時の体重が用量

**Table 1** Body weight, tissue weight, and rectal temperature of broilers exposed to chronic cold stress.

	Control	Cold stress	Probability
3 weeks old			
Initial body weight (g)	1008.8 ± 16.7	1009.2 ± 18.9	0.99
Final body weight (g)	1200.8 ± 30.8 <sup>a</sup>	1057.2 ± 29.3 <sup>b</sup>	<0.01
Body weight gain (g)	192.0 ± 26.2 <sup>a</sup>	48.0 ± 11.7 <sup>b</sup>	<0.01
Heart (g)	8.0 ± 0.8	6.6 ± 0.3	0.11
Heart/BW (g/kg)	6.7 ± 0.6	6.2 ± 0.2	0.48
Liver (g)	30.1 ± 0.9	27.9 ± 1.4	0.21
Liver/BW (g/kg)	25.1 ± 0.4	26.4 ± 1.0	0.25
P. major (g)	97.9 ± 3.2 <sup>a</sup>	82.1 ± 4.3 <sup>b</sup>	<0.05
P. major/BW (g/kg)	81.6 ± 2.3	77.7 ± 3.4	0.36
Rectal temperature (°C)	39.1 ± 0.1 <sup>a</sup>	38.6 ± 0.2 <sup>b</sup>	<0.05
5 weeks old			
Initial body weight (g)	2053.7 ± 32.4	2053.0 ± 24.8	0.99
Final body weight (g)	2345.2 ± 45.3	2296.5 ± 39.4	0.44
Body weight gain (g)	291.5 ± 15.3	243.5 ± 17.5	0.06
Heart (g)	11.9 ± 0.7	10.3 ± 0.3	0.08
Heart/BW (g/kg)	5.1 ± 0.3	4.5 ± 0.1	0.07
Liver (g)	49.6 ± 3.3	46.3 ± 2.2	0.42
Liver/BW (g/kg)	21.1 ± 1.1	20.2 ± 1.0	0.56
P. major (g)	471.0 ± 20.0	475.7 ± 14.2	0.85
P. major/BW (g/kg)	200.6 ± 5.8	207.7 ± 8.5	0.50
Rectal temperature (°C)	39.4 ± 0.1	39.4 ± 0.2	0.86

Data are expressed as mean ± S.E.M.

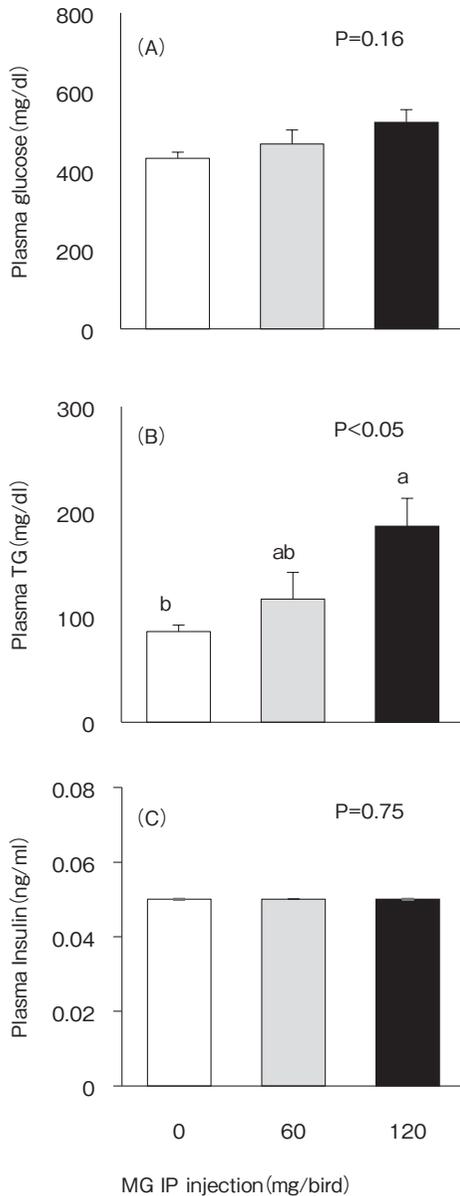
<sup>a, b</sup>Means with different superscript letters are significantly different.

依存的に低下する傾向が見られた (P = 0.09, 対照区, 2167 ± 26 g ; 60 mg, 2140 ± 50 g ; 120 mg, 1882 ± 124 g)。また, MG 60 mg投与区では6羽中4羽, MG 120 mg投与区では6羽中3羽で腹腔内に黄色透明の液体の貯留が認められた。血漿中グルコース, TGおよびインスリン濃度をFig. 3に示す。MG反復投与は血糖値およびインスリン濃度に影響を与えなかったものの, 血漿中TG濃度は用量依存的に増加した。

MGが耐糖能に及ぼす影響を調査するため, MGを反復腹腔内に投与したブロイラーを用いて経口糖負荷試験を実施した。糖負荷試験による血

糖値の経時的変化およびAUCをFig. 4に示す。AUCには有意差が見られなかったものの, 経口投与15分後のMG投与区の血糖値が対照区よりも有意に低いことが示された。

MGの反復投与によりいくつかのプロイラーで腹水症が確認されたことから, MGがプロイラーの腹水症発生に関わっている可能性が示唆された。また, MGが血漿中TG濃度を増加させることが明らかとなった。MGをラットに4週間投与すると血漿中TG濃度が上昇することが報告されており<sup>10)</sup>, 本研究でも同様の現象が確認されたことから, MGの作用は齧歯類とブロイラーで類似



**Fig. 3** Plasma glucose (A), TG (B), and insulin (C) levels of broilers administered with MG for 7 days. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $n=6$ . The result of ANOVA is indicated within each graph. <sup>a, b</sup>Means with different superscript letters are significantly different at  $p<0.05$ .

していることが示された。このことから、MGはブロイラーの脂質代謝に影響を与えられ。一方で、飲水によってMGをラットに8週間与えても血漿中TG濃度が上昇しないことか

ら<sup>11)</sup>、MGの作用は投与経路によって異なる可能性がある。糖負荷試験ではMG投与区の血糖値が対照区のように上昇しなかった。これは糖が即座に代謝されている可能性も考えられるが、血糖値および血漿中インスリン濃度が対照区と同等であったため、むしろ消化管からの糖吸収能が低下している可能性が考えられた。

以上の結果から、本研究によりMGがブロイラーにおける腹水症発生に関与しており、さらに脂質代謝に影響を与えること、糖の吸収能を低下させることが示唆された。

#### 4. 要 約

本研究の目的は高血糖動物である鶏において、糖代謝産物であるMGおよびAGEが生体内でどれだけ存在しているかを調査するとともに、腹水症をはじめとする代謝性疾患とMGの関係性を調査することを目的とした。まず、LC/MSを用いた、ブロイラーの血漿、心臓、肝臓および筋肉中のMGおよびAGEの定量分析法を確立した。また、ブロイラーにおいて、週齢の変化が血漿中および組織中MG濃度に与える影響は認められなかった。心臓は肝臓および浅胸筋と比較してタンパク質重量当たりのMG量が多い組織であることが示された。一方で、血漿中AGE濃度は加齢に伴って低下することが示された。哺乳類では、MGは血圧を上昇させる働きがあり、血管系を障害することが知られている。腹水症は寒冷条件下や低酸素条件下などの心臓を中心とした循環器への負荷が高まることが発祥の一因とされている。これらのことから、MGはブロイラーの腹水症発生に関わっていると考えられる。そこで、急性および慢性寒冷ストレス処理を行うことで腹水症モデルのブロイラーの作出を試み、腹水症とMGの関係性を調査した。その結果、慢性寒冷ストレス処理によって明確な腹水症を発症しなかったものの、血

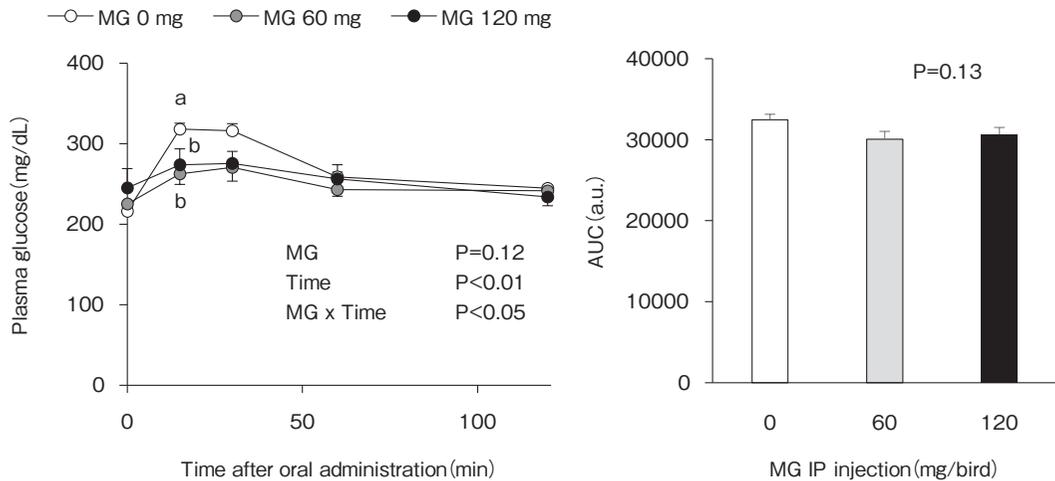


Fig. 4 Oral glucose tolerance test in the broilers administrated MG. Data are expressed as mean  $\pm$  S.E.M. n=6. The result of ANOVA is indicated within each graph. <sup>a, b</sup>Means with different superscript letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

漿中MG濃度が上昇する傾向が認められた。次にMGを7日間反復腹腔内投与したところ、MG投与を実施した半分以上の鶏において腹水の貯留が認められた。また、MGを投与した鶏において、血漿中TG濃度の上昇が示されるとともに、消化管における糖吸収能の低下が示唆された。これらの結果から、MGはプロイラーにおける腹水症の発生に関わっている可能性が示されたとともに、脂質代謝や糖の吸収に影響を与えることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Dhar, I., Dhar, A., WU, L., Desai, K. M. : Methylglyoxal, a reactive glucose metabolite, increases renin angiotensin aldosterone and blood pressure in male Sprague-Dawley rats, *Am. J. Hypertens.*, **27**, 308~316, 2014.
- 2) Riboulet-Chavey, A., Pierron, A., Durand, I., Murdaca, J., Giudicelli, J., Van Obberghen, E. : Methylglyoxal impairs the insulin signaling pathways independently of the formation of intracellular reactive oxygen species, *Diabetes*, **55**, 1289~1299, 2006.
- 3) Oliveira, L. M. A., Lages, A., Gomes, R. A., *et al.* : Insulin glycation by methylglyoxal results in native-like aggregation and inhibition of fibril formation, *BMC Biochem.*, **12**, 41, 2011.
- 4) Matafome, P., Sena, C., Seiça, R. : Methylglyoxal, obesity, and diabetes, *Endocrine*, **43**, 472~484, 2013.
- 5) Nagai, R., Shirakawa, J., Fujiwara, Y., Ohno, R. : Detection of AGEs as markers for carbohydrate metabolism and protein denaturation, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, **55**, 1~6, 2014.
- 6) Wagner, K-H., Cameron-Smith, D., Wessner, B., Franzke, B. : Biomarkers of aging: from function to molecular biology, *Nutrients*, **8**, 338, 2016.
- 7) Dhar, A., Desai, K. M., Wu, L. : Alagebrium attenuates acute methylglyoxal-induced glucose intolerance in Sprague-Dawley rats, *Br. J. Pharmacol.*, **159**, 166~175, 2009.
- 8) Khajali, F., Liyanage, R., Wideman, R. F. : Methylglyoxal and pulmonary hypertension in broiler chickens, *Poult. Sci.*, **90**, 1287~1294, 2011.
- 9) Khajali, F., Fahimi, S. : Influence of dietary fat source and supplementary  $\alpha$ -tocopheryl acetate on pulmonary hypertension and lipid peroxidation in broilers, *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.*, **94**, 767~772, 2010.
- 10) Dhar, A., Dhar, I., Jiang, B., Desai, K. M., WU, L. : Chronic methylglyoxal infusion by minipump causes pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction and induces type 2 diabetes in Sprague-Dawley rats, *Diabetes*, **60**, 899~908, 2011.
- 11) Rodrigues, T., Matafome, P., Seiça, R. : Methylglyoxal further impairs adipose tissue metabolism after partial decrease of blood supply, *Arch. Physiol. Biochem.*, **119**, 209~218, 2013.

## 動一静脈差でみる，発育不良豚の成長に必要な アミノ酸および他の栄養成分の推定

Use of venous-to-arterial difference for the determination of amino acid and other metabolites that can complement the growth of runt piglets

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)

[Introduction] “Venous-to-arterial difference” is one of the useful methods to determine the requirement of nutrients in mammals. In this study, I examined the usefulness of “the difference between the various vessel segments” to apply the porcine industry. Therefore, the blood was collected from five blood vessel segments in healthy and infection piglets, and amino acid concentration in plasma was measured. Furthermore, I also consider the correlation between daily weight gain and amino acid concentration including “the difference between the various vessel segments”.

[Method] Twenty-four piglets were divided to healthy growing (n=19) and PRRSV infection (n=5) piglets at 35-day-old. All piglets were fed the commercial diet (SDS No.2) *ad libitum* throughout this study. All piglets were slaughtered at 56- to 60-day-old. The blood in cecal vein, ileal vein, portal vein, ventral aorta and abdominal vein was collected, and plasma was isolated by centrifugation. Quantitative assay of amino acids was used ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry.

[Results] Comparison from peripheral blood as the blood of abdominal vein, the amino acid composition in the blood of ileal- and cecal-vein was affected remarkably. Particularly, the concentrations of aspartic acid and glutamic acid were higher but those of arginine were lower in the ileal- and cecal-vein blood than that in peripheral blood. Aspartic acid and asparagine concentration was correlated with daily weight gain in peripheral blood, whereas tryptophan concentration was correlated with daily weight gain in “portal- to abdominal vein difference”.

[Conclusion] According to the results, it is beneficial to determine the amino acid and other nutrients concentrations in five vessel segments to consider the requirement and absorption in pigs. I also suggested the correlation effect between daily weight gain and amino acid concentration in blood, the parameter of “portal- to abdominal vein difference” was suitable to consider the requirement of amino acid in pigs.

## 1. 目 的

養豚経営における支出の大半は飼料代であることから、肉豚1頭当たりの飼料効率を少しでも改善できれば、飼養頭数が多い農家ほど経営は大きく改善する。この問題を解決するために、これまで多くの研究が行われてきた。その研究成果の多くは、飼料組成を改変する、もしくは飼料中に生菌剤や成長促進用抗菌剤などを添加する、など養豚場の経営システム自体を改変する必要があるため、養豚農家がこれらの研究成果を応用する場合、よほどの思い切りがないと成功事例までたどり着けないというジレンマがあった。

改善率は小幅でも、もう少し農家が手軽に着手できるような飼料効率改善策はないかを、平成27年度伊藤記念財団助成金の研究資金を得て「同腹産仔間で成長が異なる仔豚の代謝特性比較」というテーマで研究を行った。これは、一般的な養豚農家は、肉豚の成長による豚舎移動ごとに体重を目安に豚房を分けて飼育するが、給与する飼料は同じであることに着目したことが研究の発端である。日本飼養標準ならびに飼料会社が販売する飼料は、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。これら発育不良豚の栄養成分過不足を特定できれば、発育不良豚の豚房のみの飼料組成介入で手軽に養豚経営が改善する可能性を考えた。課題検討の結果、発育が良好な豚と、元々の生時体重が小さくその後の発育も不良であるいわゆる「ヒネ豚」や、もしくはその後の疾病などの要因で発育が不良になった豚とでは、末梢血および筋肉中の代謝が大きく変動しており、とくにアミノ酸の変動が顕著であった<sup>1)</sup>。このことから、疾病に罹患した仔豚だけではなく、疾病に罹患はしていないが生時体重が極端に小さく、その後も発育不良である「ヒネ豚」でも、健康な成

長を示す仔豚とは異なる代謝特性を示し、栄養要求が異なる可能性をうかがわせた。一方この成果では、代謝成分とくにアミノ酸の変動は明確であったものの、特定の成分が不足しているのか、それとも不要なのかを特定するには至らなかった。

栄養成分の生体への利用を推定するために、動一静脈差で検討する手法がある。この方法を用いて、肉豚でのタンパク質—アミノ酸要求<sup>2)</sup>や、糖要求<sup>3)</sup>についての検討がすでに行われている。本研究課題では、平成27年度伊藤記念財団研究助成で得られた成果をさらに発展させ、健康豚および感染豚を剖検し、血管各部位から採血を行い、血管部位ごとにアミノ酸濃度解析を行い、血管部位同士の差を検討することで、栄養成分の過不足を詳細に検討可能か調査した。また、それらのアミノ酸濃度と日増体量の相関を検討することで、増体改善とアミノ酸要求との関連性についても検討を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 動物の飼育

一般的な一貫経営の養豚場で飼育されている、健康な妊娠母豚4頭の産仔を試験に用いた。すべての仔豚(計24頭)は21日齢で離乳させ、その後35日齢までは市販試験用人工乳前期飼料(SDS No.1, フィードワン)を、それ以降は市販試験用人工乳後期飼料(SDS No.2, フィードワン)を飽食で給与した。なお、飼料成分は既報のとおりである<sup>4,5)</sup>。35日齢で、そのうち5頭に豚繁殖障害・呼吸障害症候群ウイルスを感染させた。感染の手法は既報のとおりとした<sup>6)</sup>。56~60日齢で全頭剖検した。剖検はすべて午前中に行い、ペントバルビタールを用いた深麻酔後、開腹し、盲腸静脈血、回腸静脈血、門脈血、腹部大動脈血、腹部大静脈血の順に採血を行った。すべてへパリン血として採取し、速やかに氷冷した。遠心分離後、

血漿を分取し、分析まで凍結保存した。

なお、21、35および剖検時に体重を測定した。

## 2.2 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℃で30分間静置した。その後、0℃、20,000×gの条件で15分間遠心分離を行った。得られた上清100μLに対しタンパク質構成アミノ酸の安定同位体混合液を5μL添加し分析を行った。

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℃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% (0-3min), A液100—83% (3-9min), A液0% (9-16min) に設定した。

## 2.3 統計解析

体重測定結果から日増体量を算出し、日増体量と各アミノ酸濃度、血管部位差についてピアソンの相関解析を行った。P<0.05を有意差あり、p<0.1を有意傾向ありと判断した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 血管各部位のアミノ酸濃度

健常豚における血管各部位のアミノ酸濃度と、末梢血 (腹部大静脈血) との濃度比較を行った結果をFig. 1に示す。腸管から吸収された直後のアミノ酸組成は (回腸静脈血および盲腸静脈血)、末梢血と比較してアスパラギン酸およびグルタミン酸濃度が高い傾向にあり、アルギニン濃度が低い傾向にあった。一方で、腸管で吸収されたアミノ酸が集められて、肝臓へ入る直前である門脈血中のアミノ酸組成は、アスパラギン酸およびグルタミン酸濃度に加えてリジン濃度が高い傾向に

あった。腹部大動脈血中のアミノ酸組成比較では、アスパラギン酸およびグルタミン酸濃度が高値を示す傾向にあった。

感染豚における血管各部位のアミノ酸濃度と、末梢血との濃度比較を行った結果をFig. 2に示す。腸管から吸収された直後のアミノ酸組成は一部健常豚とは異なっており、末梢血と比較してアスパラギン酸およびグルタミン酸濃度が高い傾向は同様であったが、リジンやアルギニン濃度も高値を示す傾向にあった。一方で門脈血中のアミノ酸組成は、アスパラギン酸およびリジン濃度に加えて、アスパラギン、ヒスチジン濃度が高い傾向にあった。腹部大動脈血中のアミノ酸組成比較では、アスパラギン酸およびグルタミン酸濃度が高値を示す傾向にあった。

### 3.2 回腸静脈血中アミノ酸と日増体量との相関

回腸静脈血中アミノ酸濃度は、小腸から吸収されたアミノ酸の代表とする。健常豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸は認められず、負の有意な相関を示したアミノ酸はトレオニン、アスパラギン酸、アルギニンであった。健常豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸は認められず、負の相関傾向を示したアミノ酸はロイシン、メチオニン、バリン、グルタミン酸、グリシン、アスパラギン、リジンであった。

一方で、感染豚の日増体量と有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。感染豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸はイソロイシン、バリンであった。負の相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

### 3.3 盲腸静脈血中アミノ酸と日増体量との相関

盲腸静脈血中アミノ酸濃度は、大腸から吸収されたアミノ酸の代表とする。健常豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸は認められず、負の有意な相関を示したアミノ酸はアスパラギン酸であった。健常豚の日増体量と正の相関傾向を

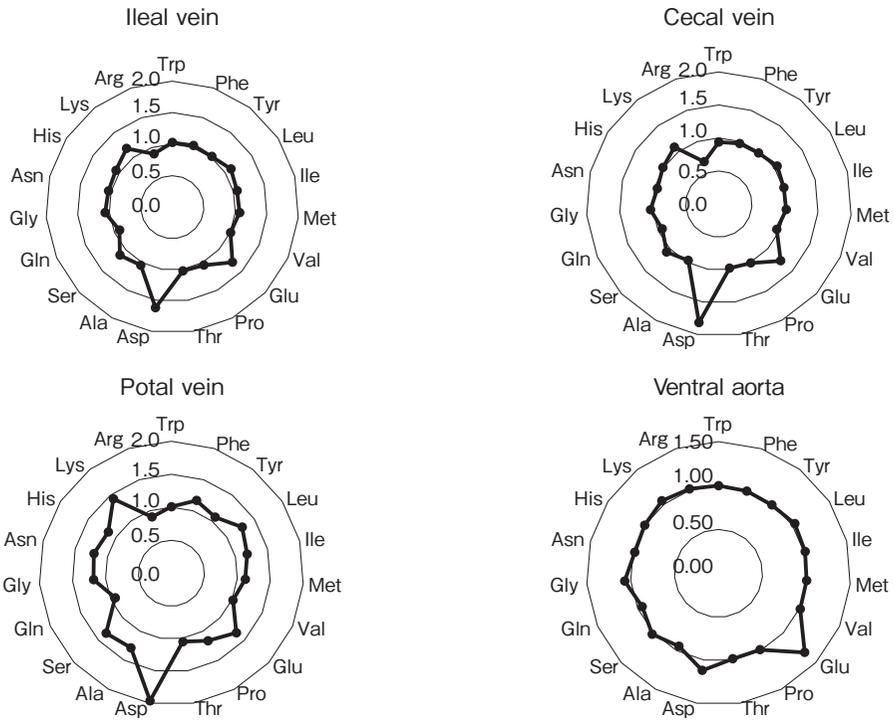


Fig. 1 Relative concentration against abdominal vein in healthy piglets (n=19) (/abdominal vein concentration)

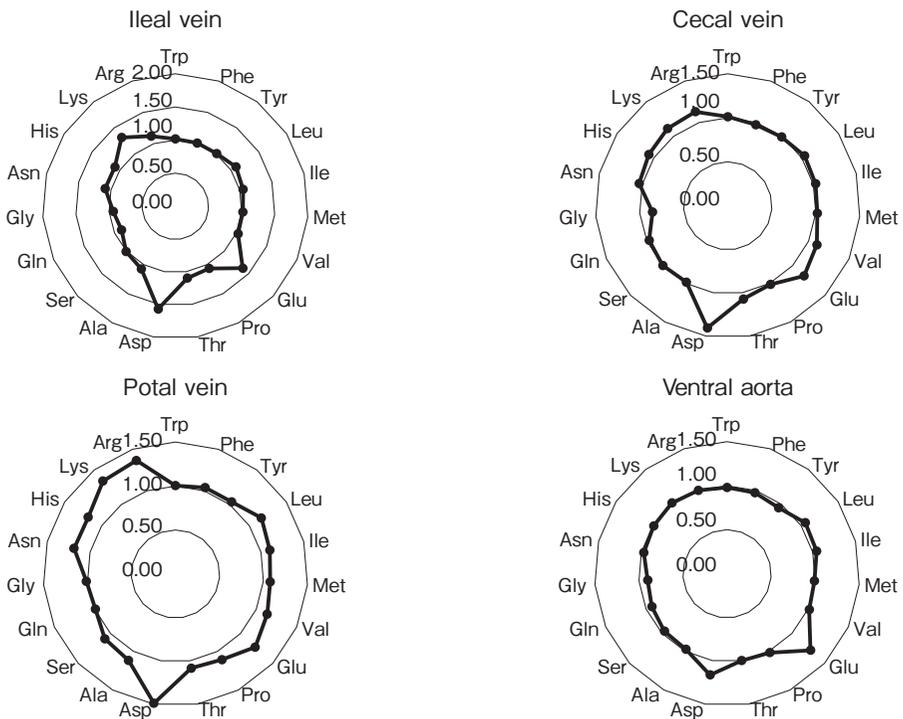


Fig. 2 Relative concentration against abdominal vein in infection piglets (n=5) (/abdominal vein concentration)

示したアミノ酸は認められず、負の相関傾向を示したアミノ酸はメチオニン、バリン、トレオニン、アルギニンであった。

一方で、感染豚の日増体量と有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。感染豚の日増体量と相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

### 3.4 アミノ酸門脈—静脈差と日増体量との相関

アミノ酸門脈—静脈差は、肝臓および全身で利用されたアミノ酸の推定値である。健常豚の日増体量と有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。健常豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸はトリプトファンであった。負の相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

一方で、感染豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸は認められず、負の有意な相関を示したアミノ酸はトリプトファン、グルタミン酸であった。感染豚の日増体量と相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

### 3.5 アミノ酸動脈—静脈差と日増体量との相関

アミノ酸動脈—静脈差は、全身で利用されたアミノ酸の推定値である。健常豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸はチロシンであった。負の有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。健常豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸はプロリンであった。負の相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

一方で、感染豚の日増体量と有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。感染豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸は認められず、負の相関傾向を示したアミノ酸はイソロイシンであった。

### 3.6 腹部大静脈血（末梢血）と日増体量との相関

腹部大静脈血中アミノ酸濃度は、一般的なアミノ酸濃度解析に用いられているアミノ酸値であ

る。健常豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸は認められず、負の有意な相関を示したアミノ酸はアスパラギン酸であった。健常豚の日増体量と正の相関傾向を示したアミノ酸は認められず、負の相関傾向を示したアミノ酸はアスパラギンであった。

一方で、感染豚の日増体量と正の有意な相関を示したアミノ酸はイソロイシンであった。負の有意な相関を示したアミノ酸は認められなかった。感染豚の日増体量と相関傾向を示したアミノ酸は認められなかった。

### 3.7 まとめ

以上の結果から、末梢血中と腸管から吸収された直後のアミノ酸が含まれていると考えられる回腸静脈血および盲腸静脈血ではアミノ酸組成が大きく変化することが分かった。また、それらの血液が集められる門脈血でも同様の傾向が示された。これらのことから、アミノ酸吸収を詳細に検討する場合は、これらの部位での採血を行う方がよい可能性が示唆された。一方で、疾病に感染することで変化するアミノ酸組成は変化することが確認できた。とくに、感染豚では回腸静脈血や盲腸静脈血中のアミノ酸組成が顕著に変化していたことから、疾病に感染することでアミノ酸吸収や生体での利用が変化する可能性が示唆された。

通常末梢血（今回は腹部大静脈血が該当）を用いた場合、日増体量と関連すると考えられたアミノ酸はアスパラギン酸およびアスパラギンのみであった。一方で、例えば、門脈—静脈差をとることで、必須アミノ酸であるトリプトファンとの関連性が確認できるようになった。とくに、既報では、PRRSV感染によってトリプトファンおよびグルタミン酸濃度が変化することが知られており<sup>6)</sup>、これらのアミノ酸は門脈—静脈差で変化が認められていたことから、部位ごとの差をとることで鋭敏にアミノ酸要求を検討できる可能性がう

かがえた。

#### 4. 要 約

【目的】栄養成分の生体への利用を推定するために、動—静脈差で検討する手法がある。この方法を用いて、健常豚および感染豚を剖検し、血管各部位から採血を行い、血管部位ごとにアミノ酸濃度解析を行い、血管部位同士の差を検討することで、栄養成分の過不足を詳細に検討可能か調査した。また、それらのアミノ酸濃度と日増体量の相関を検討することで、増体改善とアミノ酸要求との関連性についても検討を行った。

【方法】離乳豚24頭を35日齢で、健常豚（n = 19）、PRRSV感染豚（n = 5）に分けた。試験用離乳後期飼料（SDS No.2）で飼育後、56～60日齢で剖検した。盲腸静脈血、回腸静脈血、門脈血、腹部大動脈血、腹部大静脈血の順に採血した。血液からは血漿を分取した。血漿中のアミノ酸濃度を定量解析した。解析はUPLC-MS/MSおよびIntradaカラムを用いて行った。

【結果】末梢血（腹部大静脈血）と比較して、腸管から吸収された直後のアミノ酸組成を反映していると思われる回腸静脈血や盲腸静脈血中のアミノ酸の一部が大きく変化していることが分かった。また、部位ごとのアミノ酸濃度および部位毎の差と日増体量との相関を検討したところ、末梢血中ではアスパラギン酸およびアスパラギンと日増体量が関連していたが、門脈—静脈差ではトリ

プトファンとの関連性が確認できた。

【まとめ】血管部位でアミノ酸濃度が顕著に変化していたことから、アミノ酸吸収・要求を詳細に検討する場合には、血管部位での採血を行い、それらの濃度を総合的に検討する方が良い可能性が示唆された。また、日増体量との相関を検討する場合は、門脈—静脈差で検討するとより生体のアミノ酸要求に合致している可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) 塚原隆充：同腹産仔間で成長が異なる仔豚の代謝特性比較，平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，2016
- 2) Guan, X., Pettigrew, J. E., Ku, P. K., Ames, N. K., Bequette, B. J., Trottier, N. L. : Dietary protein concentration affects plasma arteriovenous difference of amino acids across the porcine mammary gland. *J. Anim. Sci.*, **82**, 2953~2963, 2004.
- 3) Noah, L., Krempf, M., Lecannu, G., Maugere, P., Champ, M. : Bioavailability of starch and postprandial changes in splanchnic glucose metabolism in pigs. *Am. J. Endocrinol. Metab.*, **278**, E181~E188, 2010.
- 4) Tsukahara, T., Ushida, K. : Organic acid profiles in feces of pigs with pathogenic or non-pathogenic diarrhea. *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1351~1354, 2001.
- 5) Tsukahara, T., Kishino, E., Inoue, R., Nakanishi, N., Nakayama, K., Ito, T., Ushida, K. : Correlation between villous height and the disaccharidase activity in the small intestine of piglets from nursing to growing. *Anim. Sci. J.*, **84**, 54~59, 2013.
- 6) 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.

## 肉質向上に資するアミノ酸栄養の基礎研究

Basic studies on the improvement of meat quality by amino acid supplementation

佐藤 祐介・二瓶 直浩・佐藤 より子

(宇都宮大学農学部)

Yusuke Sato, Naohiro Nihei and Yoriko Sato

(Utsunomiya University, School of Agriculture)

Amino acids have the ability to change metabolism by regulation of gene expression through mTOR pathway in skeletal muscle. MicroRNAs (miRs) are known to regulate gene expression by post-transcriptional repression or degradation of target mRNA. However, signaling pathways for miR expression remains unknown. In this study, we investigated the effects of L-leucine administration on miR expression in skeletal muscle. Food-deprived C57Bl/6 mice were administrated saline and L-leucine (135mg/100g B.W.) by oral gavage. Five hours after administration of saline or L-leucine, total RNA was isolated from soleus and EDL muscles of mice. Poly-A was added to total RNA before reverse transcription to detect miRs. The expression levels of muscle-specific miRs (1, 133a/b, 206, 208b and 499b) were measured by qPCR. Skeletal muscle-specific mTOR knockout mice (*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>) were generated by crossing mTOR<sup>flox/flox</sup> mice with *Mlc1*-Cre mice to determine the signaling pathway in the regulation of miR expression. The expressions of miR-1, 133a/b were increased in soleus muscle, and miR-206, 208b and 499b were increased in EDL muscle after L-leucine administration. To determine whether miRs expression were regulated by mTOR signaling, miRs of soleus and EDL muscles from *Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup> were measured by qPCR. In the *Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup> mice, miR-133a expression was decreased in both soleus and EDL muscles compared with mTOR<sup>flox/flox</sup>. These results demonstrated that L-leucine administration induced miR-133a expression through mTOR signaling in skeletal muscle. Previous report demonstrated that miR-133a deficiency caused mitochondrial dysfunction and myopathy in skeletal muscle. We conclude that L-leucine regulates the mitochondrial function and skeletal muscle homeostasis by expressing miR-133a through mTOR signaling pathway.

### 1. 目 的

近い将来、地球の人口は100億人に達する見込みであり、我々は世界的食料不足の時代を迎える。この問題の解決策として、様々な食料資源

(肉類、穀類など)の安定供給策を考えなければならない。現在、我が国の肉類自給率は50%程度であるが、家畜の飼料自給率は20%程度とさらに低く大きな問題となっている。国産米などを家畜飼料に用いる代替飼料の研究も行われているが、

コスト等の問題は解決できていない。そのため、家畜への給餌量を維持（あるいは減少）しながら、「肉質の維持・向上」が可能かどうかについて、調査する基礎的研究が必要である。肉質（味・テクスチャー）と骨格筋の筋線維型・代謝特性などには密接な関係があることから、飼料中への特定の成分添加により、骨格筋の特性を変化させることが可能かどうか、まずは実験動物レベルで精査することが重要である。

これまでに多くのポリフェノール等の抗酸化物質による骨格筋の代謝特性の制御に関する研究が報告されている。マウスを用いた実験動物レベルでは、赤ブドウのレスベラトロールによる骨格筋の代謝特性の変化やザクロのウロリチンAによる筋機能の向上作用が報告されている<sup>1,2)</sup>。これらを家畜飼料へ添加すれば肉質の変化を誘導できる可能性もあるが、一方で、抗酸化物質の一部にはDNAを損傷させる可能性が報告されており、生体への未確認の有害性が危惧されている<sup>3)</sup>。また、実際に抗酸化物質等を生産レベルで家畜飼料へ応用するには、大量に必要となることから現実的とは言い難い。

そこで、研究代表者は抗酸化物質以外の既存の飼料添加物であるアミノ酸に着目し、骨格筋の特性を変化させるかどうか確認した。準備研究のマイクロアレイ解析の結果、生理的濃度の一部のアミノ酸（特にロイシン）投与が、ラット骨格筋の特性に関連する遺伝子の発現を上昇させることを見出した。これまで、アミノ酸摂取による骨格筋タンパク質代謝については多くの研究がなされているが<sup>4,5)</sup>、骨格筋の特性に及ぼす影響についての報告はほとんどない。研究代表者は、一部のアミノ酸には骨格筋の特性を変化させる作用があると仮説を立て、将来の食肉生産技術へ貢献する「肉質向上に資するアミノ酸栄養の調査とその作用機序の解明」を目指している。

研究代表者らのこれまで研究から、分岐鎖アミノ酸の1つであるロイシンは、筋細胞のmTOR経路を介して骨格筋の筋線維型や代謝特性に関連する遺伝子の発現を制御することが分かった。近年、mTOR経路はタンパク質代謝やmRNA発現制御だけでなく、遺伝子の転写後発現調節を担う短鎖非コードRNA（microRNA、以下miR）の発現・成熟をも制御していることが報告された<sup>6,7)</sup>。すでに、筋特異的なmiRが骨格筋の発生・肥大・特性を制御する重要な因子であることが明らかになっているが<sup>8)</sup>、一方で、特にアミノ酸などの栄養シグナルによるmiRの発現制御についての報告はほとんどない。そこで、本研究では、ロイシン摂取がmTOR経路を介してmiR発現を制御しているか検討することにした。

## 2. 方法

18時間絶食させた18週齢のC57Bl/6マウス（ $n = 5$ ）に、ロイシンを強制的に胃内投与した（135mg/100g B.W.）。コントロールマウスには生理食塩水を投与した。投与5時間後に遅筋型のヒラメ筋および速筋型の長趾伸筋を摘出し、Trizol法により全RNAを抽出した。ロイシン投与によるTOR経路の活性化を確認するため、qPCR法により*Actb*を内部標準として18s rRNAの発現量を測定した。miR検出のため、逆転写前に全RNAにpoly-Aを付加した。M-MLV逆転写酵素を用いて逆転写し、qPCR法によりmiRを定量した。また、mTOR<sup>lox/lox</sup>マウスと*Mlc1*-Creマウスを交配させることで骨格筋特異的mTOR欠損マウス（*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>）を作製し、そのヒラメ筋および長趾伸筋におけるmiRの発現量をqPCR法により定量した（マウス実験の一部は、海外の共同研究機関にて実施した）。本研究では、すでに骨格筋に骨格筋における機能の一部が明らかになっているmiR（1, 133a/b, 206, 208b, 499）に着目して

解析を行った。内部標準として核内small RNAであるU6を用いた。student t-testにより  $p < 0.05$  で有意差ありとした。

### 3. 結果と考察

ロイシン摂取は骨格筋のmTOR経路を活性化させることが分かっている<sup>5)</sup>。マウスへのロイシンの強制胃内投与は、骨格筋の18srRNA発現を増加させた (Fig. 1)。これは、ロイシン投与が骨格筋のmTOR経路を活性化させたことを間接的に示している。ロイシン投与による骨格筋の

mTOR経路活性化が確認できたため、miR発現が変化しているかqPCRにより調べた。ロイシン投与5時間後、遅筋型のヒラメ筋では、投与前と比べmiR (1, 133a/b) の発現量が有意に増加していた (Fig. 2)。一方、速筋である長趾伸筋ではmiR (206, 208b, 499b) の発現量が有意に増加しており、miR-133aは増加傾向を示した (Fig. 2)。これらから、ロイシン摂取がmiRの発現に与える影響は遅筋と速筋で異なると考えられる。生体においてもmTOR経路がmiR発現を制御しているか確認するため、骨格筋特異的mTOR欠損

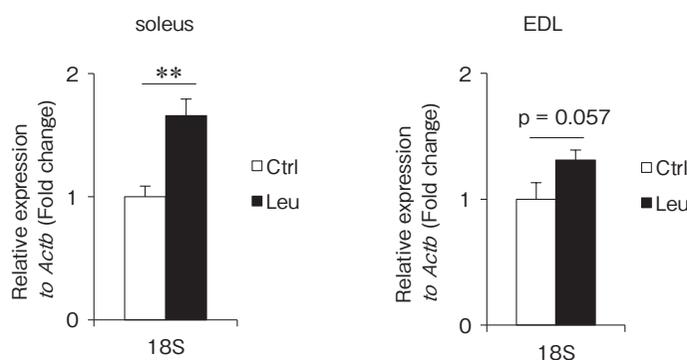


Fig. 1 Expression of 18s gene in soleus and EDL muscles after oral administration of L-leucine. Expression levels were calculated relative to *Actb* and the data are expressed as fold-increase. Graphs represent mean  $\pm$  SEM. All assessment of significance was performed with student's t-test (\*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 5$ ).

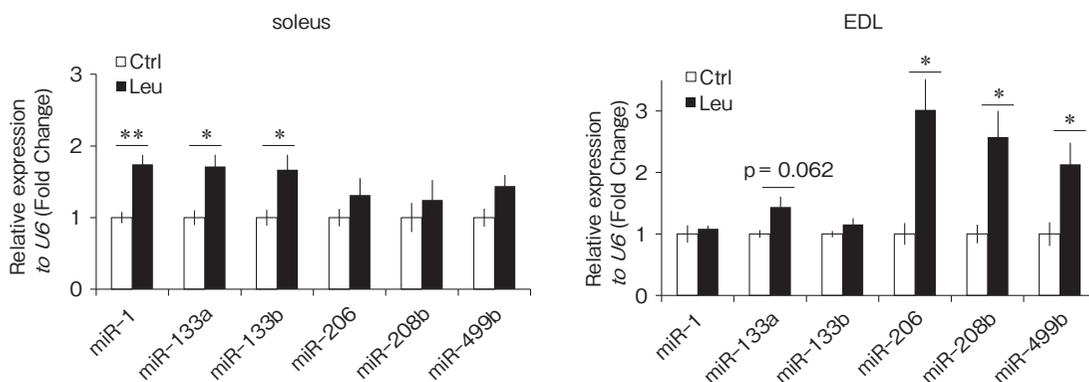


Fig. 2 Expression of miRs (1, 133a/b, 206, 208b and 499b) in soleus and EDL muscles after oral administration of L-leucine. Expression levels were calculated relative to small RNA *U6* and the data are expressed as fold-increase. Graphs represent mean  $\pm$  SEM. All assessment of significance was performed with student's t-test (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ) ( $n = 5$ ).

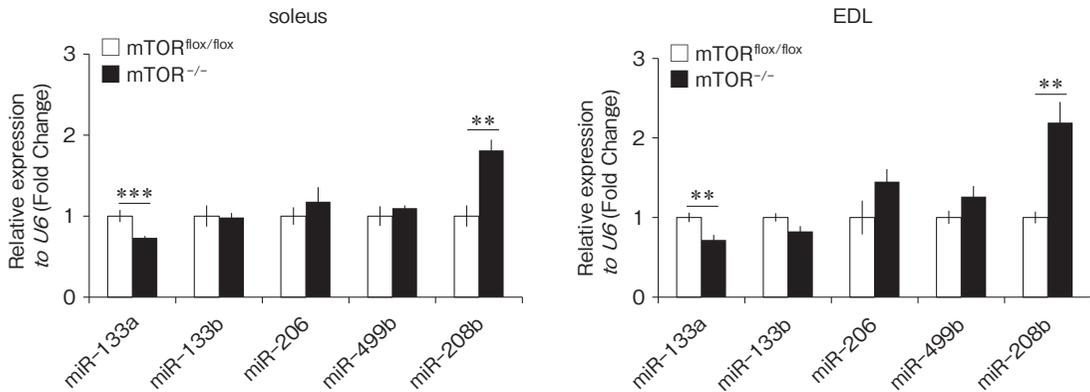


Fig. 3 Expression of miRNAs (133a/b, 206, 499b and 208b) in soleus and EDL muscles of mTOR<sup>flax/flax</sup> and mTOR<sup>-/-</sup> mice. Expression levels were calculated relative to small RNA *U6* and the data are expressed as fold-increase. Graphs represent mean  $\pm$  SEM. All assessment of significance was performed with student's t-test (\*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ ,) ( $n = 5$ ).

マウス (*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>) を作製した。先行研究で作製された筋特異的mTOR欠損マウス (*HSA*-mTOR<sup>-/-</sup>) では、筋萎縮や遅筋に関連する遺伝子群の発現低下が報告されている<sup>9)</sup>。本研究で作製した*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>マウスは、先行研究とほぼ同様の表現型 (形態・遺伝子発現など) を示していた。このマウスを用いて、生体レベルでmTOR経路がmiRの発現に及ぼす影響について調べることとした。qPCRの結果、*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>マウスのヒラメ筋および長趾伸筋ではmiR-133 aの発現量が野生型 (mTOR<sup>flax/flax</sup>) に比べて有意に減少した (Fig. 3)。これらの結果から、骨格筋ではmTOR経路がmiR-133 aの発現を制御していると考えられる。MiR-133 aを欠損したマウスでは、骨格筋のミトコンドリアの機能不全や筋疾患が引き起こされると報告がある<sup>10, 11)</sup>。すなわち、ロイシン摂取によるmTOR経路の活性化がmiR-133 aの発現を介して、骨格筋中のミトコンドリアの恒常性を維持している可能性が示唆された。

本研究により、これまで不明な点が多かったmiRの発現制御について、ロイシンが骨格筋中のmiR発現に関与する知見が得られた。これは、ア

ミノ酸栄養が、筋細胞の特性をmiRにより制御する可能性を示すものである。一方で、本研究で調査したmiRは、すでに骨格筋における機能が明らかとなっているものに局限しており、実際には他にもアミノ酸栄養により発現するmiRが存在すると考えられる。今後は、アミノ酸により制御されるmiRをRNA-seq等により網羅的に探索する必要がある。

#### 4. 要 約

アミノ酸は骨格筋のmTORシグナル伝達経路を介して、タンパク質代謝やmRNA発現を制御している。本研究では、分岐鎖アミノ酸の1つであるロイシン投与が、骨格筋のmicroRNA (以下、miR) 発現に与える影響について検証した。ロイシン投与は、遅筋であるヒラメ筋では、投与前と比べmiR (1, 133a/b) の発現量を有意に増加させた。一方、速筋である長趾伸筋では、ロイシン投与によりmiR (206, 208b, 499b) の発現量が有意に増加されており、miR-133 aは増加傾向を示した。また、骨格筋特異的mTOR欠損マウス (*Mlc1*-mTOR<sup>-/-</sup>) のヒラメ筋および長趾伸筋で

は、miR-133 a の発現量が有意に減少していた。これらの結果から、骨格筋においては、ロイシンによるmTOR経路の活性化がmiR-133 a の発現を制御していると考えられる。

#### 文 献

- 1) Lagouge, M., Argmann, C., Gerhart-Hines, Z., Meziane, H., Lerin, C., Daussin, F., Messadeq, N., Milne, J., Lambert, P., Elliott, P., *et al.* : Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha, *Cell*, **127**, 1109~1122, 2006.
- 2) Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P. A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-Dit-Felix, A. A., Williams, E. G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., *et al.* : Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents, *Nature Medicine*, **22**, 879~888, 2016.
- 3) Fox, J. T., Sakamuru, S., Huang, R., Teneva, N., Simmons, S. O., Xia, M., Tice, R. R., Austin, C. P., Myung, K. : High-throughput genotoxicity assay identifies antioxidants as inducers of DNA damage response and cell death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 5423~5428, 2012.
- 4) Shimomura, Y., Yamamoto, Y., Bajotto, G., Sato, J., Murakami, T., Shimomura, N., Kobayashi, H., Mawatari, K. : Nutraceutical effects of branched-chain amino acids on skeletal muscle, *The Journal of Nutrition*, **136**, 529S~532S, 2006.
- 5) Anthony, J. C., Yoshizawa, F., Anthony, T. G., Vary, T. C., Jefferson, L. S., Kimball, S. R. : Leucine stimulates translation initiation in skeletal muscle of postabsorptive rats via a rapamycin-sensitive pathway, *The Journal of Nutrition*, **130**, 2413~2419, 2000.
- 6) Sun, Y., Ge, Y., Drnevich, J., Zhao, Y., Band, M., Chen, J. : Mammalian target of rapamycin regulates miRNA-1 and follistatin in skeletal myogenesis, *The Journal of Cell Biology*, **189**, 1157~1169, 2010.
- 7) Ye, P., Liu, Y., Chen, C., Tang, F., Wu, Q., Wang, X., Liu, C. G., Liu, X., Liu, R., Liu, Y., *et al.* : An mTORC1-Mdm2-Drosha axis for miRNA biogenesis in response to glucose- and amino acid-deprivation, *Molecular Cell*, **57**, 708~720, 2015.
- 8) Guller, I., Russell, A. P. : MicroRNAs in skeletal muscle: their role and regulation in development, disease and function, *The Journal of Physiology*, **588**, 4075~4087, 2010.
- 9) Risson, V., Mazelin, L., Roceri, M., Sanchez, H., Moncollin, V., Corneloup, C., Richard-Bulteau, H., Vignaud, A., Baas, D., Defour, A., *et al.* : Muscle inactivation of mTOR causes metabolic and dystrophin defects leading to severe myopathy, *The Journal of Cell Biology*, **187**, 859~874, 2009.
- 10) Liu, N., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Frisard, M. I., Hulver, M. W., McMillan, R. P., Wu, Y., Voelker, K. A., Grange, R. W., Richardson, J. A., *et al.* : Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2-dependent centronuclear myopathy, *The Journal of Clinical Investigation*, **121**, 3258~3268, 2011.
- 11) Nie, Y., Sato, Y., Wang, C., Yue, F., Kuang, S., Gavin, T. P. : Impaired exercise tolerance, mitochondrial biogenesis, and muscle fiber maintenance in miR-133a-deficient mice, *The FASEB Journal*, **30**, 3745~3758, 2016.

## 中鎖脂肪酸に着目した人工乳改良による離乳期子牛の発育改善

The effect of medium-chain fatty acids supplementation with calf starter on growth in calves during the weaning period

福森理加<sup>1,2</sup>・増田洋史<sup>2</sup>・長尾慶和<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>宇都宮大学農学部附属農場, <sup>2</sup>東京農工大学大学院連合農学研究所)

Rika Fukumori<sup>1,2</sup>, Yoji Masuda<sup>2</sup> and Yoshikazu Nagao<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>University Farm, Department of Agriculture, Utsunomiya University,

<sup>2</sup>The United Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Our objective was to determine the effects of calcium salts of medium-chain fatty acids (MCFA-Ca) on growth and metabolic profiles in calves during the weaning transition period. In exp.1, Sixteen Holstein × Japanese Black crossbred (F1) bull calves weaned at 4 months of age and 6 Holstein calves weaned at 7 weeks of age were used in this study. In both experiments, calves were randomly assigned to 2 dietary treatments (MCFA and control). Calves were fed milk replacer (MR) and treatment supplements including MCFA-Ca (MCFA) or not (control) with concentrate or calf starter and timothy hay. Jugular blood samples were taken and body weight (BW) were measured temporally related to the weaning. In exp. 1, BW and average daily gain did not differ between treatments. However, plasma insulin-like growth factor-1 (IGF-1) concentrations were higher and plasma insulin concentrations were lower in MCFA calves compared with those in control calves. In exp. 2, BW during the post weaning period was greater in MCFA calves than control calves. MCFA calves showed the higher plasma concentrations of total cholesterol and beta hydroxy-butyrate after weaning compared with control calves. Our results suggest that feeding a solid feed including MCFA-Ca improves daily gain in early weaning calves and may contribute the future productivity through the endocrine changes.

### 1. 目的

酪農場から生産されるホルスタイン種雄子牛やF1子牛（ホルスタイン×黒毛和種）は、国内牛肉生産を支える重要な存在であるが、その栄養管理は省力的かつ早熟であることが望まれ、栄養水準や飼養基準は明確でない。特に、子牛の哺育期の飼養管理は、下痢や肺炎などの疾病、事故率が

高く、また、この時期は将来の生産性に大きく関わることから高度な栄養管理が必要とされるが、標準的な管理法が確立されていないのが現状である。慣行の哺育プログラムでは、省力・省コストや早期に反芻胃発育を促す目的で代用乳の給与制限が行われてきたが、最近では哺乳量の増加や代用乳組成の見直しに関する多くの研究がなされ、自然な牛の哺乳量に近づける高栄養での哺乳管理

が推奨されるようになってきた。一方で、代用乳から固形飼料へと切り替わる離乳移行期の栄養管理に関する調査研究は少ない。離乳移行期において、子牛は単胃動物から反芻動物へと消化吸收機構が劇的に変化する。この時期の子牛においては、デンプンのような易発酵性の栄養素がルーメンの絨毛発育に極めて重要であることから、代用乳給与を制限あるいは停止することで、人工乳（カーフスターター）や育成期配合飼料などの固形濃厚飼料の摂取量を増加させ、反芻発酵に依存した栄養摂取への切り替えを促している。このとき、子牛が吸収するエネルギー栄養素は、代用乳中に豊富に含まれる糖や脂肪から固形飼料の発酵によって得られる揮発性脂肪酸（VFA）へと急速に変化する。ルーメンの発達と人工乳摂取量のバランスを崩すと、デンプン発酵によるVFA産生速度に吸収速度が追い付かず、ルーメンアシドーシスの危険性が高まり、食欲停滞による発育停滞、離乳の遅れなど深刻な影響をもたらす。また早期離乳法では発酵機能が十分に発達していないことが多く、糞中に未消化のデンプンが多く含まれる等、栄養素の利用効率が低くなるリスクを伴う<sup>1)</sup>。これらの現状は、ルーメンアシドーシスや消化不良（下痢）等による損耗率の増加に直結している。また、デンプンの急速な発酵によるVFA吸収量の増加は、血中成長ホルモン（GH）濃度を減少、ならびにインスリン濃度を増加させる<sup>2)</sup>。GHは肝インスリン様成長因子-1（IGF-1）合成を介した筋肉・骨成長の促進作用を有するのに対し、インスリンは体脂肪蓄積に代謝をシフトさせる傾向があることが示されていることから、これらホルモンの代謝機能や栄養素分配調節機能を介して子牛の増体や体組成の発育パターンは影響をうけるかもしれない。

このようなことから、最近では、離乳移行期の人工乳の繊維含量増加や粗飼料給与の推奨が行わ

れている。しかしながら、このような低デンプン飼料は、子牛のエネルギー供給には不十分である可能性がある。そこで本研究では、離乳移行期の子牛への油脂、特に中鎖脂肪酸の給与効果に着目した。中鎖脂肪酸は、炭素数8~12の脂肪酸であり、長鎖脂肪酸と比較して消化吸收スピードが速く、速やかに代謝、エネルギーとして利用される。牛乳中にも含まれ、哺乳期のエネルギー補給に適していることから代用乳にも添加されるが、固形飼料への添加効果については詳細な検討がなされていない。泌乳牛への中鎖脂肪酸カルシウム添加試験では、成長ホルモン分泌促進因子である血中グレリン濃度が高まる<sup>3)</sup>など、エネルギー補給効果に加えて内分泌機能活性化による成長促進効果も期待でき、離乳移行期の子牛の発育に好適である可能性がある。そこで本研究では、離乳移行期の子牛にエネルギー補給および内分泌賦活化効果を目的として中鎖脂肪酸を脂肪酸カルシウムとして離乳期の固形飼料に添加し、成長および内分泌機能に及ぼす影響を、離乳時期の異なる条件下で検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 飼養試験

民間牧場および宇都宮大学農学部附属農場で飼養されるF1（ホルスタイン×黒毛和種）およびホルスタイン種子牛を供試した。民間牧場におけるF1子牛の飼養試験を《試験1》、宇都宮大学農学部附属農場におけるホルスタイン種子牛の飼養試験を《試験2》として実施した。

#### 《試験1》

1か月齢時に市場導入したF1雄子牛を16頭供試した。離乳を4か月齢とし、離乳10日前（Day-10）から離乳後85日後（Day85）までを試験期間とした。試験開始まで、供試牛は代用乳を1.0kg/d給与され、カーフスターター、チモシー乾草お

よび水は不断給与された。その後、Day-10から-1まで、代用乳給与量を0.5kg/dに減量し、育成期配合飼料（上限7.5kg/d）、試験用飼料（270g/d）およびチモシー乾草（不断給与）を給与した。供試牛はMCFA区と対照区の2区に配置され、試験区ごとにフリーバーンで飼養された。MCFA区ではMCFA-Caを10%含む試験用ペレット飼料、対照区ではMCFA-Caを含まない試験用ペレット飼料を試験期間を通して一律270g/d/頭が配合飼料にトップドレスで給与された。使用した中鎖脂肪酸カルシウムの組成は脂肪酸75% [脂肪酸としてC 8 : 0, C 10 : 0, C 12 : 0を含む]、カルシウム25%であった。採血および配合飼料+試験用飼料の摂取量、体重の測定をDay-10, Day 0, Day 13, Day 22, Day 50, Day84に行った。

#### 《試験2》

ホルスタイン種子牛を6頭供試した。出生時に子牛をMCFA区または対照区に配置し、出生時から14週齢までを試験期間とし、個別ペンで飼養した。出生後5日間は初乳を出生時体重の10%量給与し、その後は代用乳を0.6kg/d（5日齢～）、0.8kg/d（1週齢～）、1.0kg/d（2週齢～）、0.8kg/d（5週齢～）、0.6kg/d（6週齢～）で給与したのち7週齢で完全離乳した。試験用人工乳を、5日齢から試験期間終了まで2.5kg/dを上限として給与した。試験用人工乳は、市販人工乳と試験1と同様の試験用ペレット飼料を9 : 1で混合したものである。すなわち、MCFA区ではMCFA-Caを1%含んでいた。チモシー乾草および水は不断給与とした。体重、飼料摂取量の計測および採血を毎週齢始めの給飼前に実施した。

#### 2.2 評価項目

体重、日増体量および飼料摂取量を測定した。また、採取した血液から、血漿代謝産物（総ケトン体、グルコース、総コレステロール）濃度およ

び代謝ホルモン（IGF-1およびインスリン）濃度を測定した。

### 3. 結果と考察

#### 《試験1》

子牛の体重、日増体量、配合飼料摂取量の成績をTable 1に示した。試験期間を通じて、体重、日増体量、配合飼料摂取量に処理区間の差は認められなかった。血液性状の結果をFig. 1に示した。血漿総コレステロール濃度は、離乳後に低下し、その後回復した。血漿ケトン体濃度は、離乳後に増加した。血漿総コレステロールおよびケトン体濃度は、処理区間で差が認められなかった。血漿グルコース濃度は、離乳前後の変動はなく、MCFA区の試験開始時濃度が対照区と比べて高値を示した。血漿インスリン濃度は、離乳後に増加したが、MCFA区では、対照区と比較して離乳後の増加が小さく、低い値を示していた。一方、血漿IGF-1濃度は試験期間を通して、MCFA区で高値を示した。

#### 《試験2》

供試牛の体重をTable 2に示した。離乳前および11週齢までの体重は両区間で差がなかったが、12および13週齢では、MCFA区で対照区と比較して高値を示す傾向にあり、試験終了時の14週齢では有意に高かった。本試験において、離乳時の人工乳摂取量は量処理区ともに1kg/dを上回っており、離乳可能なレベルに達していた。また、人工乳の給与上限である2.5kg/dを摂取するようになったのは8～9週齢であり、処理区間に違いはなかった（データ未掲載）。出生時体重に差がなく、人工乳摂取量が急速に増加する離乳後から体重の差が認められたことから、人工乳組成の違いによる効果であると推察された。

血液性状の結果をFig. 2に示した。血漿グルコース濃度は両区間に差がなかったが、血漿総コ

Table 1 Body weight and average daily gain for calves fed treatment diets

Item	Treatment <sup>1</sup>			Treatment P-value
	Control	MCFA	SEM	
Initial BW, kg	160.88	181.38	20.24	0.64
Weaning BW, kg	178.38	190.56	7.84	0.29
Final BW, kg	307.38	322.38	11.51	0.37
ADG, kg	1.58	1.52	0.06	0.53
Intake				
Concentrate,kg/d	5.88	6.04		
Supplement,kg/d	0.24	0.24		
<sup>2</sup> FCR	3.92	4.19		

<sup>1</sup> Treatment : Control = no MCFA ; MCFA = MCFA at 24 gDM/d (4.8 gDM/d C8:0, 4.8 gDM/d C10:0, 14.4 gDM/d C12:0)

<sup>2</sup>FCR : Total Concentrate and supplement DMI (kgDM) /Total gain (kg)

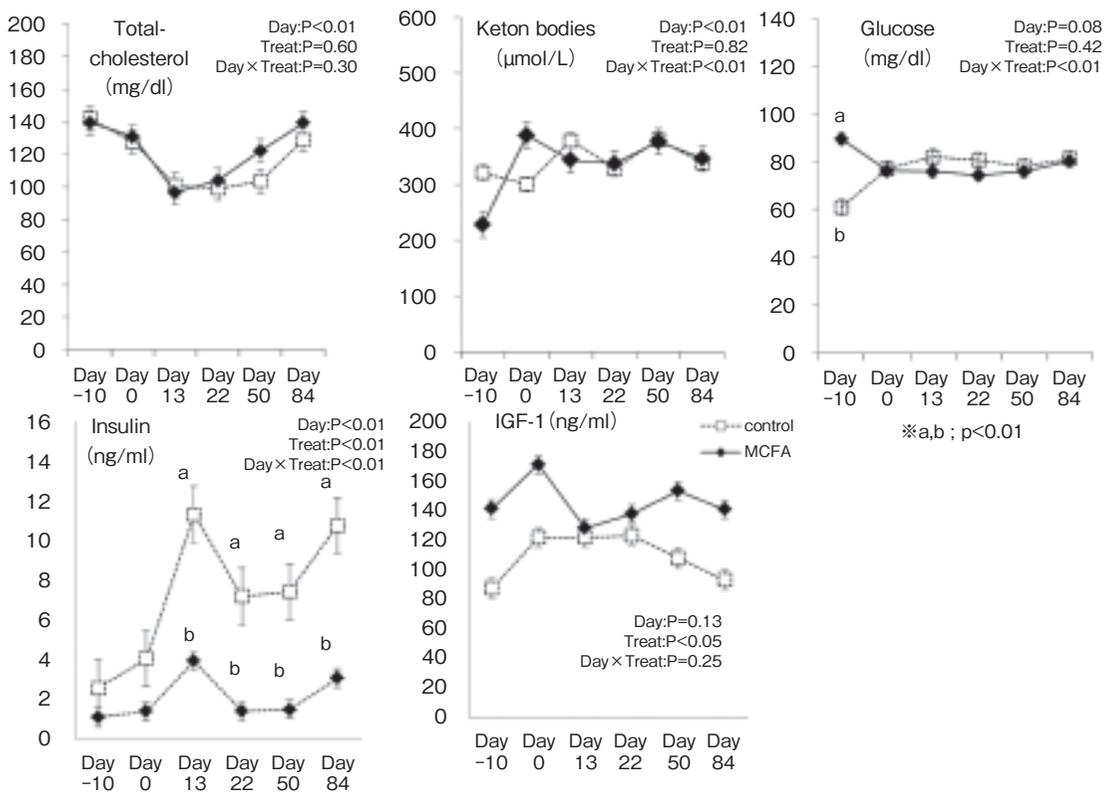


Fig. 1 Plasma concentrations of total cholesterol, ketone bodies, glucose, insulin, and IGF-1 for calves weaned at 4 months of age in MCFA and control.

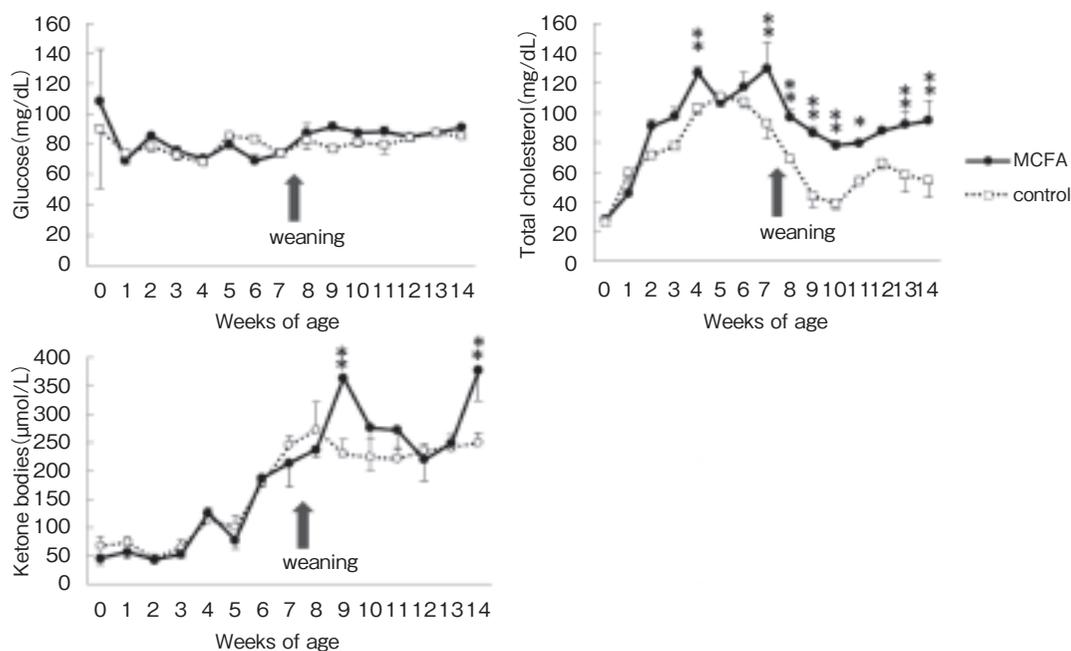
**Table 2** Body weight for calves weaned at 7 wk of age in MCFA and control

wk of age <sup>1</sup>	Control		MCFA	
	mean	SE	mean	SE
0	44.2	0.81	45.3	1.44
1	45.2	0.96	46.0	1.32
2	48.4	1.48	49.3	1.04
3	53.0	1.72	54.9	1.67
4	58.7	1.61	60.5	1.51
5	65.1	2.00	66.0	1.50
6	69.0	3.12	71.5	2.51
7	73.3	3.69	77.0	2.29
8	76.0	4.82	84.0	2.18
9	85.0	5.77	92.0	3.12
10	91.7	5.92	99.1	3.41
11	96.7	6.05	105	3.06
12	100*	5.80	112	2.65
13	109*	5.01	121	2.29
14	115**	5.69	129	3.55

<sup>1</sup>Calves were weaned at 7 wk of age.

\*Weekly means between MCFA and control tend to be different ( $P<0.1$ )

\*\*Weekly means between MCFA and control are different ( $P<0.05$ )



**Fig. 2** Plasma concentrations of glucose, total cholesterol, and ketone bodies for calves weaned at 7 wk of age in MCFA and control. \*:shows the tendency of differences ( $P<0.1$ ) and \*\*:shows the differences ( $P<0.05$ ) between MCFA and control.

レステロールおよびケトン体濃度は、離乳後に MCFA区で高値を示した。

試験1および試験2の結果から、MCFA-Ca給与による増体効果は離乳時期によって異なることが示唆された。4か月離乳の子牛は、離乳前のDay-10から離乳時のDay 0において、反芻胃発酵の指標となる血漿ケトン体濃度が既に高く、反芻胃発酵に依存した栄養摂取が十分可能になっており、日増体量も試験期間を通じて1.5kg/d以上と量処理区とも良好であったことから、MCFA-Caの補給効果が明瞭に現れなかったかもしれない。一方、7週齢離乳の子牛では、離乳時に1kg/d以上の人工乳を摂取できていたものの、反芻胃や代謝の機能は不十分であったことが推察される。このような時期において、MCFAは有効な栄養素として、増体に寄与した可能性がある。7週齢離乳子牛において、MCFA-Caの給与は、離乳後の血漿ケトン体濃度を増加させ、血漿コレステロール濃度の低下を抑制した。MCFAは、小腸で吸収され、肝門脈を經由して肝臓で速やかに代謝される。このとき、MCFAの一部はケトン体やコレステロールの合成に利用され、全身で利用される。MCFA-Ca給与によって増加したケトン体およびコレステロールは、エネルギーや生体成分の材料として、子牛の発育に寄与した可能性がある。また、試験1では、MCFA-Caの給与によって、血漿インスリン濃度増加が抑制され、血漿IGF-1濃度が増加した。MCFAによる血漿インスリン濃度の降下作用については、その機序はあきらかでないが泌乳牛への給与試験においても同様の結果が得られている。インスリンは、細胞増殖作用を持つが、若齢牛におけるインスリン分泌の過剰は過肥を招くことが指摘されている。一方で、IGF-1は筋肉や骨格の成長を促す成長因子であり、GHの刺激によって産生される。哺育期および育成期には、過剰な脂肪蓄積を防ぎなが

ら骨格や筋肉を成長させることが望まれる。したがって、MCFA-Ca給与は、子牛期において好適な代謝ホルモンの変化をもたらした可能性がある。本試験で供試した子牛の追跡調査を引き続き行う予定である。

#### 4. 要 約

本研究では、子牛の発育改善を目的として、離乳移行期に与える固形飼料に中鎖脂肪酸カルシウム (MCFA-Ca) を添加して、その効果を検討した。結果として、MCFA-Caは早期離乳子牛 (7週齢離乳) において、増体改善効果が認められた。4か月離乳子牛において、増体促進効果は認められなかったが、インスリン分泌を抑制し、骨格や筋肉成長を促進するIGF-1の血漿中濃度を増加させたことから、将来の生産性に寄与する可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Eckert, E., Brown, H. E., Leslie, K. E., DeVries, T. J., Steele, M. A. : Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage, *Journal of Dairy Science*, **98**, 6315~6326, 2015.
- 2) Matsunaga, N., Arakawa, T., Goka, T., Nam, K. T., Ohneda, A., Sasaki, Y., Katoh, K. : Effects of ruminal infusion of volatile fatty acids on plasma concentration of growth hormone and insulin in sheep, *Domestic Animal Endocrinology*, **17**, 17~27, 1999.
- 3) Fukumori, R., Sugino, T., Shingu, H., Moriya, N., Kobayashi, H., Hasegawa, Y., Kojima, M., Kangawa, K., Obitsu, T., Kushibiki, S., Taniguchi, K. : Ingestion of medium chain fatty acids by lactating dairy cows increases concentrations of plasma ghrelin, *Domestic Animal Endocrinology*, **45**, 216~223, 2013.

## ストレスホルモンによる日本短角種牛由来筋芽細胞の増殖と筋線維型への影響

The effect of stress hormone on the myoblast derived from Japanese shorthorn cattle proliferation and exchanges the muscle fiber type

佐藤 勝 祥

(秋田県立大学生物資源科学部)

Katsuyoshi Sato

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University)

In recent years, the idea of animal welfare is widespread in animal husbandry field. In addition, stress adversely affects on productivity and the quality of animal product. So, it is very important to reduce the stress of livestock. We have studied with attention to stress related hormones in animal husbandry field. The aim of this study, therefore, 1) to investigate the correlation coefficients among the stress related hormones (apelin, oxytocin and serotonin), insulin like growth factor-I (IGF-I) and cortisol, 2) the effect of these stress related hormones to myoblast cell growth and differentiation. In Experiment 1 with Japanese short horn cattle, plasma IGF-I concentrations positively correlated with apelin, yet negatively correlated with serotonin. In Experiment 2 with mouse myoblast cell line C2C12 from RIKEN, apelin stimulated cell growth, but serotonin inhibited cell proliferation. In addition, MyHC 2x mRNA expression levels with serotonin were lower than that of control group, and MyHC 1 (slow type) mRNA expression levels with apelin group were lower than that of with oxytocin group. These results demonstrate that apelin, oxytocin and serotonin play important role of muscle growth and the quality of meat.

### 1. 目 的

近年、輸入飼料に依存した我が国の牛肉生産はBSE等の発生に見られる食の安全性に関する問題や、集約的な飼養形態における家畜福祉に関する問題等多くの問題を抱えている。秋田県立大学附属フィールド教育研究センター（FC）で飼育されている日本短角種牛は、粗飼料の利用効率に優れており、放牧飼育に適していることから、地元の飼料資源を有効に活用してのびのびと飼養し

た、安全安心な食肉資源として魅力的である。また、ストレスは家畜の成長や畜産物の質に悪影響を及ぼす可能性があることから、ストレスの少ない飼育環境の構築は畜産現場において重要な課題である。筆者らは、ストレス応答ホルモンを指標としてストレスの少ない飼育環境の構築を目指しており、特に、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンの3つのホルモンに着目して研究を行っている。アペリンは、ヤギやヒツジの水分代謝に関するストレス反応によって分泌が促進されるこ

とが明らかとなっており、反芻動物におけるストレス応答において重要な役割を担っていることが報告されている<sup>1)</sup>。また、オキシトシンには母性行動や攻撃性をコントロールする働きがあり、セロトニン不足はストレス耐性の低下や睡眠障害を引き起こすことが知られている。ところで、筋肉の質（筋線維型）は、運動負荷などの物理的な刺激によって調節されていると考えられていたが、最近の報告では内分泌ホルモンによる調節機構の存在が明らかになってきている。Elabらは老齢マウスへのオキシトシン投与によって骨格筋の再生能が回復することを報告し<sup>2)</sup>、渡邊らは高脂肪食由来の肥満マウスへのセロトニン投与がI型筋線維割合を増加させることを報告している<sup>3)</sup>。これらの報告から、ストレス応答ホルモンが筋肉の成長と肉質へ影響を与える可能性が示唆されている。そこで、本研究ではアペリン、オキシトシンおよびセロトニンによる骨格筋への影響を検討することを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 ストレス応答ホルモンと産肉性の検討

ストレス応答ホルモンと産肉性の関連を検討するため、FCで飼育されている肉用牛から採血を行い、各種ホルモン濃度の相関を検討した。FCで飼育されている日本短角種牛9頭（繁殖雌牛、月齢：78.0±12.2カ月齢、体重：568.8±33.3kg）と黒毛和種牛3頭（繁殖雌牛、月齢：72.0±18.0カ月齢、体重：497.7±11.9kg）を試供牛とした。1日2回（9時と16時）の給餌を行い、水と鈹塩は自由摂取とした。13時にヘパリン入真空採血管を用いて頸静脈から血液を採取し、遠心分離（3,000rpm, 10min）後の血漿サンプルを回収して、本研究で着目しているアペリン、オキシトシンおよびセロトニンと、ストレスの指標としてコルチゾール濃度を、産肉性の指標としてインスリ

ン様成長因子I（IGF-I）濃度を測定した。アペリンおよびセロトニンの測定は、ユーロピウムを用いた時間分解蛍光法と2抗体法による競合法を利用して測定方法を確立した。他のホルモンについては市販のキット（オキシトシンおよびコルチゾール；Enzo Life Sciences, IGF-I；R&D systems）を使用した。

### 2.2 筋芽細胞の増殖および分化誘導におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

#### 2.2.1 筋芽細胞の増殖におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

本研究では、理化学研究所から購入したマウス由来筋芽細胞株（C2C12細胞株）を用いた。ダルベッコ変性イーグル培地（DMEM, high-glucose）に、牛胎児由来血清（FBS）を10%、抗生物質（ペニシリン-ストレプトマイシン）を1%添加して増殖用培地とした。ストレス応答ホルモンとしてPyr-1 apelin-13, oxytocin, serotonin（ペプチド研究所、大阪）を用い、増殖用培地に各ホルモンを1.0 μMの濃度で添加して刺激用培地を作成した。6 wellプレートを用いて、1 wellあたり $9 \times 10^4$ 個（ $1.0 \times 10^4$ 個/cm<sup>2</sup>）程度になるように細胞を播種し、2日おきに培地を交換しながら、7日間培養を行った。培養条件は、37℃、5% CO<sub>2</sub>、95%空気とした。刺激区ごとに4枚のプレートを用意し、培養開始1, 3, 5および7日目に1枚のプレート（6 well分）の細胞を回収し、トリパンブルー染色後、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。

#### 2.2.2 分化誘導におけるストレス応答ホルモン刺激の影響

2%ウマ血清を加えたダルベッコ変性イーグル培地（DMEM, low-glucose）を分化誘導培地とした。6 wellプレートを用いて、細胞がウェルの8割程度を占めるまで培養を続けた後、培地を分化誘導培地に変え、分化誘導刺激を行った。細胞

は10日程度の分化誘導刺激によって、筋管を形成した(データ未掲載)。この時、2.2.1と同様にして分化誘導培地に各ホルモンを1.0  $\mu$ Mの濃度で添加し、分化誘導時におけるストレス応答ホルモンの影響を検討した。2日おきに培地交換を行いながら10日間培養した後、各ウェルにRNAiso Plus(タカラバイオ)を700  $\mu$ lずつ加えて細胞を回収した。回収したRNAiso Plusにクロロホルムを200  $\mu$ lずつ加えて10秒間混和した後、室温で5分間静置し、12,000  $\times$  G、4  $^{\circ}$ Cで15分間遠心分離した。その後、上清のみを回収し、イソプロパノールを500  $\mu$ lずつ加えて数回転倒混和した後、室温で10分間静置し、12,000  $\times$  G、4  $^{\circ}$ Cで10分間遠心分離した。上清をアスピレートした後、70%エタノールを加え、同様にして遠心分離した。上清をアスピレートした後、回収したRNAをRNase-free-H<sub>2</sub>Oに溶解させた。逆転写キット(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser; タカラバイオ)を用いてcDNAを作成した後、リアルタイムPCR法(LightCycler<sup>®</sup> 96 System, Roche)を用いてI型筋線維に発現するMyHC I mRNAおよびII型筋線維に発現するMyHC II a, MyHC II b, MyHC II x mRNAの発現量を解析した。用いたプライマーとPCR条件は、Shenらの報告<sup>4)</sup>に従い、18s rRNAを内部標準として相対定量解析を行った。

### 3. 結果と考察

肉用牛の各種ホルモン濃度の相関をTable 1に示す。この結果、ストレスの指標であるコルチゾール濃度と産肉生の指標であるIGF-I濃度の間には、弱い負の相関(-0.409)が見られ、牛の成長においてストレスが負の影響を与えることが示唆された。また、アペリン濃度とIGF-I濃度の間には強い正の相関(0.827)が見られ、セロトニン濃度とIGF-I濃度の間には弱い負の相

関(-0.356)が見られた。この結果から、アペリンが筋肉の成長を促進し、セロトニンは成長を抑制する可能性が示唆され、これらのホルモンが産肉性の指標となり得る可能性が示された。

筋芽細胞の増殖におけるストレス応答ホルモン刺激試験の結果をTable 2に示した。ここでは、1日目の細胞数を100とした細胞増殖率を示している。アペリン刺激区では、3日目の細胞増殖率が対照区と比較して有意に低くなったが、5日目には有意に高くなるという結果が得られた(いずれも $P < 0.05$ )。また、オキシトシン刺激区では対照区に対して有意な差は見られなかったが、セロトニン刺激区では3日目と7日目の細胞増殖率が対照区に比べて有意に低い値となった(いずれも $P < 0.05$ )。以上の結果から、アペリンは筋芽細胞の増殖を促進し、セロトニンは抑制する可能性が示唆された。この結果は、血中ホルモン濃度の相関を検討した結果とも一致する。アペリン濃度は筋芽細胞の増殖を促進する作用が知られているIGF-I濃度と強い正の相関があり、セロトニン濃度はIGF-I濃度と弱い負の相関が見られた。以上の結果から、アペリンによる成長促進作用およびセロトニンによる成長抑制作用の可能性が示唆された。

筋芽細胞の分化刺激におけるストレス応答ホルモン刺激試験の結果をTable 3に示す。分散分析およびTukeyの多重比較検定を用いて、遺伝子別に各ホルモン刺激区の影響を解析した結果、対照区と比較してセロトニン刺激区のMyHC II x mRNA発現が有意に低くなった。また、MyHC II aおよびMyHC II b mRNA発現には有意な差が見られなかったが、MyHC ImRNA発現を見ると、アペリン刺激区の値がオキシトシン刺激区よりも有意に低い値となった(いずれも $P < 0.05$ )。これらの結果から、セロトニンがII型筋線維への分化を、アペリンがI型筋線維への分化をそれぞれ抑

**Table 1** Correlation coefficients among plasma apelin, oxytocin, serotonin, cortisol and IGF-I concentrations, in cattle (n = 15).

	oxytocin	serotonin	cortisol	IGF- I
apelin	0.049	-0.140	-0.283	0.827
oxytocin		0.044	0.140	-0.055
serotonin			0.115	-0.356
cortisol				-0.409

**Table 2** Cell proliferation rate of C2C12 with apelin, oxytocin and serotonin.

	day1	day3	day5	day7
control	100 ± 6	699 ± 104	1274 ± 55	1446 ± 58
apelin	100 ± 9	315 ± 34 *	1548 ± 73 *	1680 ± 89
control	100 ± 8	855 ± 30	1461 ± 88	1889 ± 98
oxytocin	100 ± 10	705 ± 43	1247 ± 61	1861 ± 111
control	100 ± 14	1294 ± 80	2347 ± 78	3836 ± 111
serotonin	100 ± 13	987 ± 64 *	2484 ± 149	2937 ± 170 *

All values were presented as the mean ± SEM and analyzed by ANOVA and t-test. \* P < 0.05 vs. control group.

**Table 3** MyHC I, MyHC II a, MyHC II b, MyHC II x mRNA expression in differentiated C2C12 with apelin, oxytocin and serotonin.

	MyHC I	MyHC II a	MyHC II x	MyHC II b
control	100 ± 19.95 <sup>ab</sup>	100 ± 17.62	100 ± 16.23 <sup>a</sup>	100 ± 7.40
apelin	73.21 ± 4.76 <sup>b</sup>	114.19 ± 21.47	83.89 ± 11.99 <sup>ab</sup>	122.59 ± 8.68
oxytocin	148.67 ± 11.05 <sup>a</sup>	97.24 ± 11.16	90.03 ± 15.65 <sup>ab</sup>	129.76 ± 12.14
serotonin	109.97 ± 19.01 <sup>ab</sup>	48.60 ± 12.09	43.45 ± 5.96 <sup>b</sup>	132.49 ± 38.34

The mRNA expression levels were normalized to 18s rRNA levels. The data are expressed as mean ± SEM. The values labeled with different letters are significantly different (P < 0.05).

制する可能性が示唆された。今後はミオシン重鎖タンパク質の発現解析を行い、実際に分化した筋線維型をさらに詳しく解析することで、これらの作用について検討を続ける必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、アペリン、オキシトシンおよびセロトニンの三種類のストレス応答ホルモンに着目し、産肉生と肉質への影響を検討することを目的

として、肉用牛における血中ホルモン濃度動態の検討と、筋芽細胞の増殖と筋管への分化におけるストレス応答ホルモン刺激の影響を検討した。結果、肉用牛の血中アペリン濃度は成長因子の指標として用いた血中インスリン様成長因子 I (IGF- I) 濃度との間に強い正の相関が見られた。さらに、筋芽細胞の増殖においてもアペリン刺激によって有意に細胞増殖が促進される結果が得られ、アペリンが筋肉の成長を促進する可能性

が示唆された。また、血中のセロトニン濃度と血中IGF-I濃度の間には弱い負の相関が見られ、筋芽細胞の増殖においてもセロトニン刺激によって有意に細胞増殖が抑制されるという結果が得られた。この結果から、セロトニンは筋肉の成長において抑制的な作用を持つ可能性が示唆された。筋芽細胞から筋管への分化におけるストレス応答ホルモンの影響では、アペリンがI型筋線維への分化を、セロトニンがII型筋線維への分化をそれぞれ抑制する可能性が示唆された。この結果は今後、発現しているタンパク質を解析することで実際に分化した筋線維型を分析し、詳細を検討していく必要があると考えられる。以上の結果から、本研究で着目したストレス応答ホルモンが牛においても産肉性と肉質に影響を与える可能性が示唆され、ストレスの少ない飼育環境と、産肉性と肉質の向上に向けてこれらのホルモンを指標として用いることの可能性が示された。今後は、実際の牛の生体内、細胞への影響を検討していく。

## 文 献

- 1) Sato, K., Takahashi, T., Kobayashi, K., Hagino, A., Roh, S. G., Katoh, K. : Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone and growth hormone in the ruminant, *Domestic Animal Endocrinology*, **42**(3), 165~72, 2012.
- 2) Elabd, C., Cousin, W., Upadhyayula, P., Chen, R. Y., Chooljian, M. S., Li, J., Kung, S., Jiang, K. P., Conboy, I. M. : Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration, *Nature communications*, **5**, 4082, 2014.
- 3) Watanabe, H., Nakano, T., Saito, R., Akasaka, D., Saito, K., Ogasawara, H., Minashima, T., Miyazawa, K., Kanaya, T., Takakura, I., Inoue, N., Ikeda, I., Chen, X., Miyake, M., Kitazawa, H., Shirakawa, H., Sato, K., Tahara, K., Nagasawa, Y., Rose, M. T., Ohwada, S., Watanabe, K., Aso, H. : Serotonin Improves High Fat Diet Induced Obesity in Mice, *PLoS One*, **11**(1) : e0147143, 2016.
- 4) Shen, L., Chen, L., Zhang, S., Du, J., Bai, L., Zhang, Y., Jiang, Y., Li, X., Wang, J., Zhu, L. : MicroRNA-27b Regulates Mitochondria Biogenesis in Myocytes, *PLoS One*, **5** : 11(2) : e0148532, 2016.

## 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所)

Hideki Kinoshita and Junichi Ishikawa\*

(Department of Bioscience, School of Agriculture, Tokai University,

\*Graduate School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

Recently, many multidrug-resistant bacteria have appeared due to the use of a large amount of antibiotics, which have been feared the spread of infection to humans. Therefore, in this study, we examined whether the bacteriocins produced by LAB can suppress drug resistance bacteria effectively. First, the characterization of bacteriocin, Bac916, produced by *Lactococcus lactis* MBR916 was performed. The culture supernatant of MBR916 strain showed very high antibacterial activity as 939 A.U./100  $\mu$ l. The culture supernatant showed antibacterial activity in a wide pH range (pH 2-11), although it became unstable at pH 5 or more after autoclaved. In the protease resistibility test, the culture supernatant showed high resistance to proteinase K, actinase E, and chymotrypsin, but the resistibility decreased by a neutralization treatment. In the cross test, when the MBR916 strain was used as an indicator bacterium, it was sensitive to all the supernatants excluding *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM 1002<sup>T</sup>. The tendency of antibacterial activity of MBR 916 showed a similarity to *Lb. gasseri* JCM11657 which is a gassericin A producer. In the antibacterial activities at the different culture condition, the activity value of MBR916 strain was as high as 2,048 (2<sup>11</sup>) A.U./100  $\mu$ l at 30°C, but the value disappeared at 37°C. Further, the bacteriocin productivities also decreased at cyclic culture and stirring condition. Finally, MBR916 strain and Bac916 were added to porcine feces and the number of resistant bacteria was measured after 7 days. The number of multidrug-resistant bacteria significantly decreased in Bac916-added group as compared with the control (P<0.01). In the microflora analysis by Terminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP), when MBR916 strain and Bac916 were added to porcine feces, *Bacteroides* order decreased compared with the control and bacitracin-added groups whereas *Lactobacillales* order was increased compared with bacitracin-added group. In this study, the possibility of reduction of multidrug-resistant bacteria using bacteriocin of lactic acid bacteria was shown, and it is expected to develop functional feed for livestock suppressing multidrug-resistant bacteria.

## 1. 目 的

現在、病院での抗菌薬の過度の処方や不適切な使用により多剤耐性菌が出現し、ヒトへの感染とその拡大が問題となっている<sup>1, 2)</sup>。また、動物用抗菌剤や抗菌性飼料添加物の使用も耐性菌を生み出す要因となっている。そのため厚生労働省は薬剤耐性対策のためのアクションプランを作成し、抗生物質の適正使用を呼びかけている<sup>3)</sup>。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、バクテリオシンによる多剤耐性菌の殺菌が可能であることを明らかにした。特に*Lactococcus lactis* MBR916のバクテリオシン（以下、Bac916）は多くの多剤耐性菌に有効で、耐熱性に優れ、中性領域でも抗菌活性を示し、プロテアーゼ（アクチナーゼE）に対して高い耐性を有することを明らかになり、非常に有用なバクテリオシンであることが示された<sup>4)</sup>。そこで、Bac916のさらなる特徴付けと、豚糞便中での多剤耐性菌の殺菌効果について検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 使用菌株と培養条件

本研究では、MBR916株<sup>4)</sup>、ナイシンA産生株である*Lc. lactis* subsp. *lactis* NBRC12007、ナイシンZ産生株である*Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM7638<sup>5)</sup>、ガセリシンA産生株である*Lactobacillus gasseri* JCM11657<sup>6)</sup>、ガセリシンT/X産生株である*Lb. gasseri* JCM11064と、バクテリオシン非産生株とされる*Lc. lactis* JCM5805および*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002<sup>T</sup>を用いた。各菌株は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。

### 2.2 抗菌活性値測定

抗菌活性値の測定は、ペニシリンカップ法<sup>7)</sup>またはSpot on Lawn法<sup>8)</sup>により行った。JCM1002株を混合した寒天平板上にペニシリンカップを静置し、2<sup>0</sup>倍ずつ希釈した培養上清100 $\mu$ lを添加し、37℃で一晩培養後、生育阻止円の直径 (mm) を測定した。阻止円が形成される最大希釈倍率を上清100 $\mu$ l当たりの抗菌活性値 (A.U./100 $\mu$ l) とした。Spot on Lawn法では、寒天平板上にサンプル3 $\mu$ lを直接滴下し試験した。なお、Spot on Lawn法もペニシリンカップ法とほぼ同等の結果が得られたため、単位を (A.U./100 $\mu$ l) とした。プロテアーゼ耐性試験の抗菌活性値は、指標菌を混合した寒天平板上を120 $\mu$ lずつ96ウェルマイクロプレート (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に分注し、サンプルを20 $\mu$ lずつ上層して37℃、24h培養後、生育状況を観察した。また、それぞれの菌株同士のクロステストは、ペニシリンカップ法にて行った。

### 2.3 培地の調製と粗精製バクテリオシンおよび凍結乾燥粉末の調製

MRS培地から肉エキス、Tween80、およびグルコースを除いたMRS-BT溶液を調製し透析後、透析外液を取得した。この透析外液にグルコースを添加して（終濃度2%）フィルター滅菌し、MBR916株を植菌し、30℃、18時間培養した。遠心分離（3,000 rpm, 15 min）後、上清を一晩透析し、透析内液をフィルター滅菌して粗精製Bac916溶液を取得した。また、一部を凍結乾燥して粗精製Bac916凍結乾燥粉末 (Bac916FD) を取得した。

### 2.4 Bac916のpH特性と耐熱性の評価

純水に1 mg/ml Bac916FDを溶解し、pHを2.0～12.0に調整し、室温で1時間程度放置した後、Spot on Lawn法で抗菌活性の有無を判定した。また、pH調整後のサンプルをオートクレーブ

(121°C, 15 min) し、同様に抗菌活性試験を行った。

### 2.5 Bac916のプロテアーゼ耐性の評価

MBR916株の培養上清、pH 7に調整した培養上清、1 mg/mlのナイシン A (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) およびJCM11657株の培養上清をそれぞれ1 mlずつ分注し、Proteinase K (和光純薬工業株式会社, 大阪)、トリプシン (和光純薬工業株式会社)、アクチナーゼ E (科研製薬, 東京)、キモトリプシン (Sigma-Aldrich)、ペプシン (和光純薬工業株式会社) を各々適切な緩衝液を用いて、終濃度が0.5~32 mg/mlになるように等量混合し、37°C, 24 h インキュベートし、マイクロプレート法により活性が完全に消失したプロテアーゼ濃度を調べた。

### 2.6 培養条件の違いによるバクテリオシン産生の消長比較

各種菌株を24時間培養し、培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 15 min) 後、ろ過滅菌した上清を抗菌試験に用いた。異なる培養温度条件における試験では、培養温度を30°Cと37°Cに設定し試験した。サイクル培養試験では、至適温度で培養し、集菌後、新しい培地を入れて培養する作業を3回繰り返した。それぞれの培養上清を回収しサンプルとした。また、培養中、30°Cにおける攪拌操作も行い、上清の活性値を静置培養と比較した。

### 2.7 豚糞便における菌数の経時変化

凍結保存していた豚の糞便6サンプルから各10 gずつ計60 gのサンプルを混合し、同重量の滅菌水を添加し、室温でよく攪拌した。攪拌後、30 gずつチューブに分注し、4区分のサンプルを作製した。区分ごとに、Bac916FD添加区分 (終濃度1 mg/g)、バシトラシン (BC) 添加区分 (終濃度256  $\mu$ g/g)、MBR916株添加区分 (終濃度10<sup>7</sup> CFU/g)、無添加区分とし、25°C, 1週間静置した。菌数の測定は、0日目および7日後の2回行った。サンプルごとに、変法GAM寒天培地 (日

水製薬株式会社, 日本) を基とし、3種類の抗生物質 (AMK 12  $\mu$ g/ml, IPM 12  $\mu$ g/ml, CPMX 1  $\mu$ g/ml) 添加、256  $\mu$ g/ml BC添加、無添加培地を用い、定法に従い生菌数を測定した。

### 2.8 豚糞便の菌叢解析

上記菌数変化測定サンプルの1日目、3日目、7日目の対照区、BC添加区、Bac916FD添加区、MBR916株添加区のサンプルをそれぞれ1 g程度採取し、ただちに-80°Cにて凍結した。凍結したサンプルを株式会社テクノスルガラボ (静岡市, 日本) に依頼し、Nagashima法にてTerminal-Restriction Fragment Length Polymorphism (以下、T-RFLP) 解析に供した。

## 3. 結果と考察

最初にBac916の特徴付けを試みた。抗菌活性試験を行ったところ、MBR916株の上清はナイシン A 産生株であるNBRC12007株上清とほぼ同値の活性を有していることが明らかになった。また、Bac916は、室温条件において、pH 2-12まで安定した活性を示し、加熱条件では、pH 5以上で阻止円直径の縮小が観察された。Daviesら<sup>9)</sup>は、ナイシンの場合、pH 2-4の酸性条件で安定な活性を保持するが、それ以上のpH条件では不溶化により活性を減少させ、加熱した場合でもほぼ同様の結果となると報告している。

Table 1には、各種プロテアーゼへの耐性試験の結果を示した。pH未調整のMBR916株の上清は、トリプシン以外のプロテアーゼでは32 mg/mlと非常に高い濃度でないと活性の消失は見られなかった。特にアクチナーゼEおよびキモトリプシンにおいては、ガセリシン A 産生株であるJCM11657株の培養上清よりも数倍高い耐性を示した。一方、中性化処理した場合、活性が大きく低下したことからBac916の酸性領域での構造的安定性が、プロテアーゼ耐性に寄与している可能

**Table 1** The concentrations of the proteases showing complete disappearance of the antimicrobial activity of the bacteriocins

	Protease (mg/mL)			
	Proteinase K	Trypsin	Actinase E	Chymotrypsin
MBR916 Sup.	32	1	32	32
MBR916 Sup. (pH7.0)	1	0.5	8	0.5
Nisin	8	0	1	0.5
JCM11657 Sup.	32	0.5	2	8

**Table 2** Inhibition circle of culture supernatant against each indicator bacteria (unit: mm)

	Indicator bacteria						
	JCM1002	JCM5805	NBRC12007	JCM7638	JCM11657	JCM11064	MBR916
JCM1002	12.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
JCM5805	14.3	0.0	14.3	11.8	2.0	4.2	15.3
NBRC12007	34.0	16.8	4.0	0.0	12.8	9.7	18.3
Supernatant JCM7638	33.3	14.0	7.2	10.3	8.5	4.7	15.7
JCM11657	24.5	0.0	12.0	9.3	0.0	9.2	14.0
JCM11064	21.5	0.0	12.2	6.8	6.5	0.0	12.7
MBR916	28.2	0.0	10.3	9.5	0.0	10.0	13.3

性が示唆された。ナイシンはトリプシンで 0 mg/ml で活性が失われた。これは緩衝液の pH の影響だと考えられたため、使用する緩衝液を再検討する必要がある。

**Table 2** には、バクテリオシン産生株同士のクロステストの結果を示した。MBR916 株を指標菌として使用した場合、JCM1002 株の上清を除く、すべての上清の抗菌活性に感受性であった。また、抗菌の傾向を比較すると JCM11657 株と類似性の高い傾向を示した。JCM11657 株が産生するガセリシン A は、標的受容体を持たないバクテリオシンであり、抗菌スペクトルが類似する Bac916 も同様のタイプである可能性が示された。また、バクテリオシン産生性でないとされている JCM5805 株も抗菌活性を示したが上清の pH は試験に供した乳酸菌株が生育を阻害される pH ではないため、何らかの抗菌物質を産生している可能性が示唆された。

**Fig. 1** には、培養条件の違いによる活性値の比較を示した。MBR916 株は、30℃ においては、活性値が 2,048 A.U./100  $\mu$ l と高い活性を示したが、37℃ においては、活性が消失した (**Fig. 1a**)。MBR916 株は 37℃ でも目視でも十分に確認できるほど菌は増殖していたため、菌株の生育不良ではなかった。次に、培養ごとに上清のみを交換するサイクル培養において、サイクルを繰り返すと、JCM11064 株を除くすべての株で活性値の低下傾向が示された (**Fig. 1b**)。また、静置条件下と攪拌条件下における抗菌活性を比較したところ、MBR916 株では攪拌条件下で著しく活性が減少した (**Fig. 1c**)。以上の結果から Bac916 産生にかかわる遺伝子群が温度感受性プラスミド上に存在する可能性が考えられた<sup>10)</sup>。タンパク質複製遺伝子 *repA* を有する温度感受性プラスミド pVE6002 は、37.5℃ 培養で複製数が著しく低下することが知られており<sup>11)</sup>、Bac916 も同様である可能性が考えら

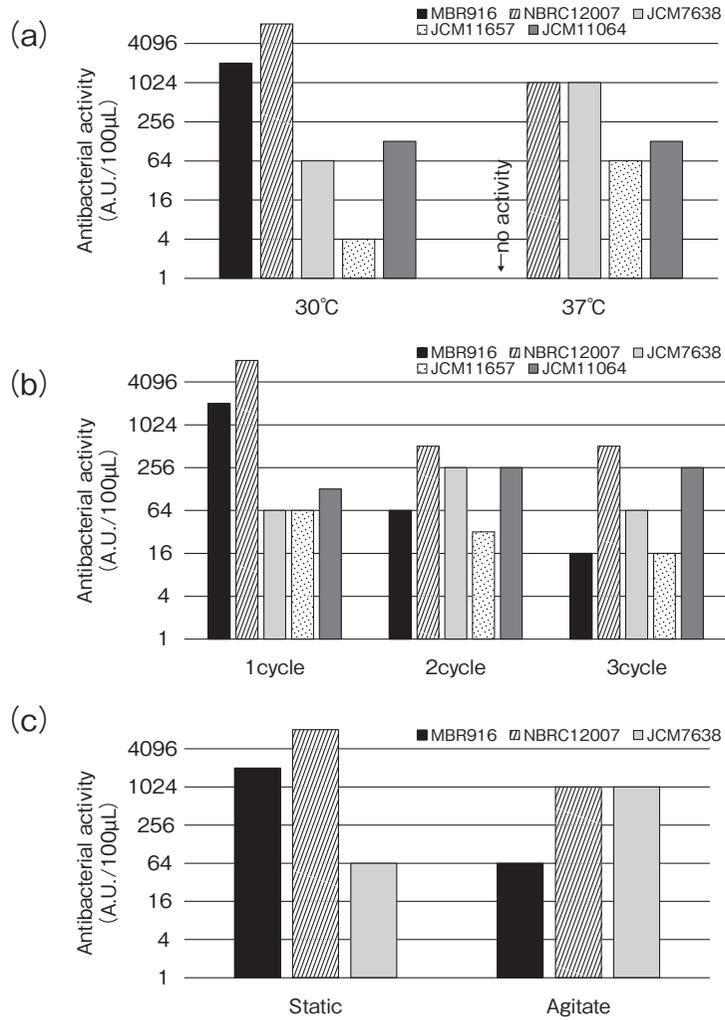


Fig. 1 Antibacterial activities comparison by differential cultural condition, (a) temperature, (b) exchanging new supernatant, (c) static or agitated condition (30°C).

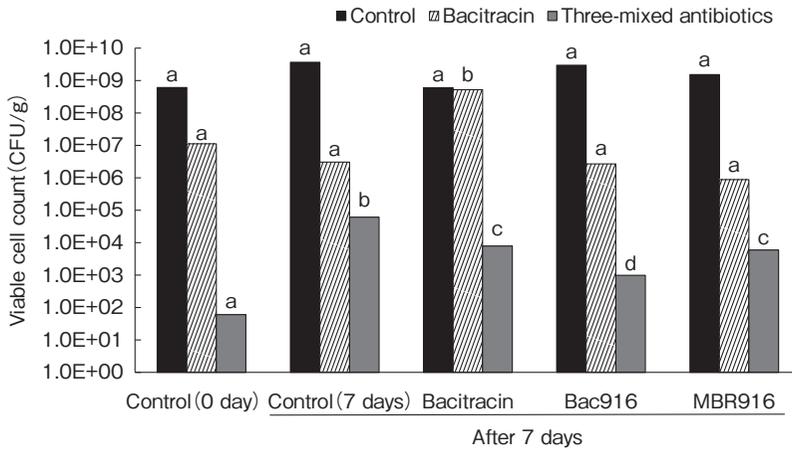


Fig. 2 Changes in the number of porcine fecal bacteria after adding bacitracin, Bac916, and MBR916.

れた。また, Jiangら<sup>12)</sup>は, *Lc. lactis*のナイシンの産生が酸素の影響で増加したと報告しており, 攪拌による酸素の影響がバクテリオシンの産生に影響している可能性も考えられた。

Fig. 2には, 豚糞便にBC, Bac916FD, MBR916株を添加した際の一般生菌数および耐性菌数を示した。一般生菌数は, 各試験区分で変化がなかったが, BC耐性菌数は, BC添加区で有意に高かった ( $P < 0.01$ )。これはBC感受性菌が抗菌されたため耐性菌数が大幅に増えたか, 耐性遺伝子の水平伝播や変異により感受性菌がBC耐性を獲得した可能性が考えられた。また, すべての試験区で, 3種混合抗生物質の耐性菌菌数が有意に増加したが, Bac916FD添加区では7日目において, 他の試験区よりも有意に少なかった ( $P < 0.01$ )。これは, Bac916の抗菌スペクトルの広さと, 抗生物質との作用機序の違いが関係していると考えられた。BCは, 環状ポリペプチドであり, その作用機序は, 細菌の細胞壁合成阻害である。この作

用機序は, バクテリオシンの作用機序と一部類似しているが, バクテリオシンはもう一つ, 細胞膜への孔形成能力があるため, これにより耐性菌を減少させたと推察できる。もしBac916に孔形成能力があるならば, 静菌的ではなく殺菌的に作用すると考えられ, 殺菌的に作用することで, 自身の耐性菌を生み出すことなく豚糞便中の多剤耐性菌の増殖を抑えることができる可能性がある。しかしながら, 本試験ではBac916耐性菌数を測定していないため, 今後検討する必要があるだろう。

Fig. 3には, 各糞便サンプルの菌叢変化を示した。コントロールとBC添加区分において, 7日目では*Bacteroides*目細菌が増加した。*Bacteroides*目の主構成種である*Bacteroides*属細菌は, 日和見感染症の原因菌であることが報告され, 耐性遺伝子を受け取り, プールする役割を担うとされている。一方, MBR916株添加区分においては, *Lactobacillales*目, *Clostridium* subcluster XIVaの増加が観察されたが, 他の*Clostridium* subcluster

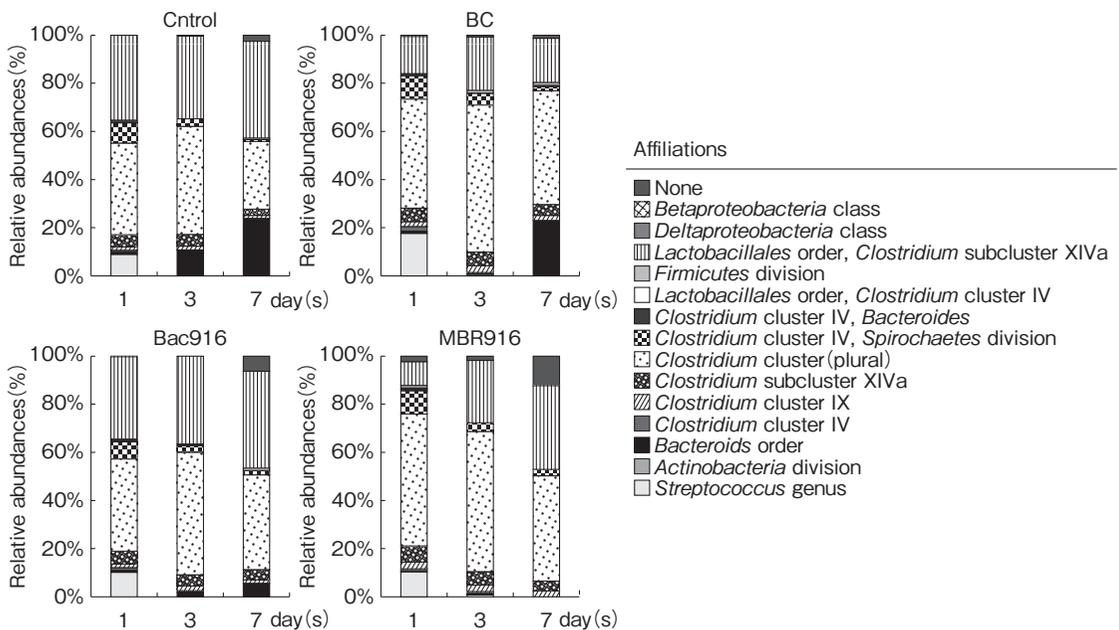


Fig. 3 Changes in the dominant bacteria in porcine feces after adding bacitracin, Bac916, and MBR916 by T-RFLP analysis.

XIVaのOTUが増加していないことを考慮すると、これらの増加は、*Lactobacillales*目の増加によるものと考えられた。*Lactobacillales*目の主構成菌種は、*Carnobacteriaceae* (カルノバクテリウム科)、*Enterococcaceae* (エンテロコッカス科)、*Lactobacillaceae* (乳酸桿菌科)、*Leuconostocaceae* (ロイコノストック科)、*Streptococcaceae* (レンサ球菌科)等の乳酸菌でありこれらの乳酸菌が増えた可能性が考えられた。

以上のことから、堆肥化の前処理として豚の糞便にMBR916株を添加することで、耐性遺伝子をプールする*Bacteroides*目の増加を抑え、乳酸菌を増加させることが期待できる。今後、実際に豚に投与し実証研究を行い、糞便中の耐性菌減少に寄与するプロセスの構築を目指していきたい。

#### 4. 要 約

本試験では乳酸菌バクテリオシンによる多剤耐性菌の殺菌効果を試験した。まず、Bac916の特徴付けを行った。MBR916の培養上清は、非常に高い活性を示し、広いpHレンジで有効であるが、オートクレーブ処理をするとpH5以上では不安定になることが明らかになった。また、Proteinase K、アクチナーゼ、およびキモトリプシンに高い耐性を示したが、中性化処理によりプロテアーゼ耐性は減少した。クロステストでは、ガセリシンA産生株であるJCM11657株と類似性の高い傾向を示した。また、MBR916株は、30℃においては、高い活性を示したが、37℃においては、活性値が消失した。また、サイクル培養および攪拌によってもバクテリオシン産生能は減少することが明らかになった。最後に豚糞便中にMBR916株およびBac916を添加して耐性菌数を測

定したところ、Bac916添加区では、コントロールに比べ有意に多剤耐性菌数が減少した ( $P < 0.01$ )。T-RFLPによる菌叢解析では、MBR916株添加区およびBac916添加区では、コントロール区およびバシトラシン添加区に比べ*Bacteroides*目細菌が減少し、バシトラシン添加区に比べ*Lactobacillales*目の増加が観察された。

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、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) 厚生労働省, 薬剤耐性 (AMR) 対策アクションプラン, 2016~2020, 2016.
- 4) 石川潤一, 木下英樹, 菰田俊一, 須田義人, 石田光晴: *Milk Sci*, 65, 179~190, 2016.
- 5) Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K., Ishizaki, A.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 36~40, 1996.
- 6) Kawai, Y., Saito, T., Kitazawa, H., Itoh, T.: *Biosci Biotechnol Biochem*, 62, 2438~2440, 1998.
- 7) Cholden, L. S.: *J. Bacteriol.*, 47, 402~403, 1944.
- 8) Mayr-Harting, A., Hedges, A. J., Berkeley, R. C. W.: *Methods in Microbiology*, 7A, 315~422, 1972.
- 9) Davies, E. A., Bevis, H. E., Potter, R., Harris, J., Williams, G. C.: *J. Delves-Broughton, Lett. Appl. Microbiol.*, 27, 186~188, 1998.
- 10) Muth, G., Nußbaumer, B., Wohlleben, W., Pühler, A.: *GG Molecular & General Genetics*, 219, 341~348, 1989.
- 11) Maguin, E., Duwat, P., Hege, T., Ehrlich, D., Gruss, A.: *J. Bacteriol.*, 174, 5633~5638, 1992.
- 12) Jiang, L., Liu, Y., Yan, G., Cui, Y., Cheng, Q., Zhang, Z., Meng, Q., Teng, L., Ren, X.: *Biotechnol. Lett.*, 37, 2039~2045, 2015.



# 平成28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	
I 食肉の品質，加工分野				
食肉製品製造に使用される各種リン酸塩によるアクトミオシンのアクチンとミオシンへの解離に関する研究		松石 昌典	日本獣医生命科学大学応用生命科学部	1,000
食肉加工品添加物，亜硝酸塩によるメタボリックシンドローム改善作用の解明		宮本 理人	徳島大学大学院医歯薬学研究所	1,100
トリプトファン添加による有害細菌の増殖抑制ならびに不活化：食肉および加工品製造工程における活用と作用メカニズムの解明		小関 成樹	北海道大学大学院農学研究院	1,000
新規アクチン結合タンパク質から豚肉の柔らかさの要因に迫る		灘野 大太	名古屋大学大学院生命農学研究科	900
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（Ⅱ）：オートファジーと食肉の肉質の関連性	H.27～	仲西 友紀	宮崎大学農学部	1,100
ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その3）	H.26～	西村 敏英	日本獣医生命科学大学応用生命科学部	1,100
ミオシンの水溶化現象に関連するミオシン尾部領域の特定	H.26～	早川 徹	帯広畜産大学学門帯畜産衛生学門	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（Ⅱ）	H.27～	根岸 晴夫	中部大学応用生物学部	1,100
食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチンの影響		服部 昭仁	食肉科学技術研究所	1,000
黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ，および味認識装置による呈味性評価		山之上 稔	神戸大学大学院農学研究科	1,100
タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの基質認識機構の改変		滝田 禎亮	京都大学大学院農学研究科	900
大規模ゲノム解析による腸管出血性大腸菌の国際的伝播経路の解明		李 謙一	国立感染症研究所細菌第一部	1,000

II 食肉の食品の価値				
新規な発酵食肉製品の機能性について (II)	H.27～	六車三治男	南九州大学 健康栄養学部	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
肥満に伴う認知症の発症予防に対する豚肉摂取による腸内環境改善効果の有用性		後藤 孔郎	大分大学医学部 内分泌代謝・膠原病 科学腎臓講座	800
畜産物由来サプリメントの新規評価法の開発		吉川 豊	神戸女子大学 健康福祉学部	800
豚肝臓由来ペプチドが肝線維化に及ぼす影響 (II)	H.27～	實安 隆興	神戸大学大学院 農学研究科	800
III 遺伝育種分野				
黒毛和種における <i>RBP4</i> 多型と枝肉形質の関連解析	H.26～	平野 貴	東京農業大学 農学部	900
豚マイコプラズマ性肺炎抗病性育種ランドレース豚の他慢性呼吸器感染症への抗病性機構に関する研究および肉豚生産における抗病性育種豚の有効性に関する考察	H.27～	佐久間晶子	宮城県畜産試験場	1,000
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 (II)	H.27～	古川 力	東京農業大学 農学部	700
黒毛和種で致死に関与するゲノムコピー数多型の探索		佐々木慎二	畜産技術協会附属 動物遺伝研究所	1,000
黒毛和種牛肉の美味しさに関わる遺伝子マーカーの効果検証		笹崎 晋史	神戸大学大学院 農学研究科	1,000
天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別手法の確立		伊藤 直弥	山口県農林総合 技術センター	1,000
IV 繁殖分野				
優良肉用家畜増産のための受精卵移植の基盤となる高品質卵子の選抜		眞鍋 昇	大阪国際大学 人間科学部	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	1,000
種雄牛における精子メチル化可変部位の特性評価	H.27～	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
牛の超早期妊娠因子 (Super-EPF) ELISAによる受精・着床診断		松原 和衛	岩手大学農学部	1,000
異なる発情判定基準による牛人工授精適期の再設定 (II)	H.27～	坂口 実	北里大学獣医学部	1,000
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 (II)	H.27～	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同定と検証	H.27～	細江 実佐	農業・食品産業 技術総合研究機構 生物機能利用 研究部門	800

アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の妊孕性に及ぼす影響	小林 仁	宮城大学 食産業学部	1,000
雄牛の新たな繁殖機能評価法の開発	北原 豪	宮崎大学農学部	1,100
牛の受胎性に関与する排卵後の黄体と主席卵胞の位置関係の人為的制御に関する研究	松井 基純	帯広畜産大学 畜産学部獣医学科	1,000
氷晶形成抑制効果の高いアミノ酸を利用した牛精液および受精卵の未凍結保存	星野 由美	広島大学大学院 生物圏科学研究科	1,000
お灸は牛の卵巣機能の向上をもたらすか？	三浦亮太郎	日本獣医生命科学 獣医学部	800
V 動物衛生分野			
日本の養豚場における動物用抗菌剤使用に及ぼす要因の疫学的解析	杉浦 勝明	東京大学大学院 農学生命科学研究科	1,000
食鳥と体皮膚に対するカンピロバクターの付着メカニズムの解明	三澤 尚明	宮崎大学産業 動物防疫リサーチ センター	1,100
豚デルタコロナウイルスの感染動態に関する研究2 (コンベンショナル豚)	H.27~ 鈴木 亨	農業・食品産業 技術総合研究機構 動物衛生研究部門	1,200
遺伝子操作技術を駆使した生後感染型アカバネウイルスの病原性決定基の同定と流行ウイルス予測への応用	正谷 達膳	鹿児島大学 共同獣医学部	1,000
ジビエとして食される野生動物が保有する食中毒菌の薬剤耐性	安藤 匡子	鹿児島大学 農水産獣医学系 獣医学	1,000
肉用子牛におけるマイコプラズマ感染症の新たな迅速診断用PCR法の構築と肉用農場におけるマイコプラズマ感染症予防への応用	樋口 豪紀	酪農学園大学 獣医学群獣医学類	1,100
肉養鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルスに対する感受性	松嶋 彩	鹿児島大学 共同獣医学部	1,000
リコンビナント抗原を用いたエゾシカにおける肝蛭症の血清診断法の確立と疫学調査による家畜・ヒトに対するリスク分析	関 まどか	岩手大学農学部 共同獣医学科	1,100
野生獣肉の食肉利用に関する寄生虫性食中毒危害の科学的分析	山崎 朗子	岩手大学農学部	1,000
カンピロバクターフリープロイラーの分別出荷を目的とした養鶏場即時検出システムの確立	山崎 渉	宮崎大学農学部 獣医学科	1,000
毒素原性大腸菌易熱性毒素を迅速に検出するイムノクロマトグラフィーの開発	有満 秀幸	藤田保健衛生大学 医学部	800
わが国の家畜におけるD型インフルエンザウイルス感染の実態調査	堀本 泰介	東京大学大学院 農学生命科学研究科	1,000
牛由来黄色ブドウ球菌の増殖阻止を可能にする牛ポリクローナル抗体の特性解析	野地 智法	東北大学大学院 農学研究科	1,000
食肉により媒介されるトキソプラズマ原虫感染症に対する新規血清診断法の確立	玄 学南	帯広畜産大学 病原研究 センター	1,000
ゲノム疫学的アプローチによる豚抗酸菌症の実態解明	大屋 賢司	岐阜大学 応用生物 学	800

データマイニング技術を用いた牛白血病ウイルス感染の免疫動態解明に関する研究		関口 敏	宮崎大学農学部	800
肉用牛の出血性腸炎で認められる腸管病原性微生物の混合感染と病態との関連		桐野 有美	宮崎大学農学部	1,000
VI 家畜飼養, 飼料分野				
ポリフェノール給餌による遅筋型筋線維の形成促進: 筋成長期での制御による食肉特性の向上を目指して		辰巳 隆一	九州大学大学院農学研究院	1,200
粗飼料サイレージの発酵品質改善のためのサイレージ密度計測手法の開発		大越 安吾	北海道立総合研究機構農業研究本部根釧農業試験場	600
粳米の給与を軸とした日本型動物福祉鶏肉生産技術の実規模での開発 (II)	H.27~	佐藤 衆介	帝京科学大学生命環境学部	1,000
代謝性疾患と関連病態の発症におけるスカトールおよび胆汁酸の役割		石塚 敏	北海道大学大学院農学研究院	1,200
<i>Lactococcus</i> 属乳酸菌で調製した発酵乳給与による離乳子豚の免疫機能の改善と生産性の向上		守谷 直子	農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門	1,000
西南暖地におけるイネ科牧草リピングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発		石垣 元気	宮崎大学農学部附属フィールド科学教育センター	1,000
哺乳期の長日処理による黒毛和種の代謝調節		安尾しのぶ	九州大学大学院農学研究院	700
耕作放棄地を利用しためん羊生産体系の確立の試み		田中 智夫	麻布大学獣医学部	800
竹笹サイレージの肉用鶏への給餌による食中毒菌の制御とプロバイオティクスの開発		谷口 喬子	宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター	800
牛由来肝臓細胞における薬物代謝関連遺伝子の解析		吉岡 都	農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門	1,000
山間地耕作放棄地内野草放牧と畜舎内濃厚飼料多給で生産されたサフォーク種ラム肉の食味および呈味成分の比較		石田 元彦	石川県立大学生物資源環境学部	850
黒毛和種肥育牛への穀物飼料増給に対するルーメン微生物相の応答に関する研究		小池 聡	北海道大学大学院農学研究院	1,000
糖代謝産物および終末糖化産物がプロイラーの生産性に与える影響の解明		橘 哲也	愛媛大学大学院農学研究科	1,000
動-静脈差でみる, 発育不良豚の成長に必要なアミノ酸および他の栄養成分の推定	H.27~	塚原 隆充	京都府立大学大学院生命環境科学研究科	1,000
肉質向上に資するアミノ酸栄養の基礎研究		佐藤 祐介	宇都宮大学農学部	1,000
中鎖脂肪酸に着目した人工乳改良による離乳期子牛の発育改善		福森 理加	宇都宮大学農学部附属農場	1,200
ストレスホルモンによる日本短角種牛由来筋芽細胞の増殖と筋線維型への影響		佐藤 勝祥	秋田県立大学生物資源科学部	850
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	1,000
合 計	7 1 件			69,000

# 伊藤記念財団賞

---



# 江草（雑賀） 愛

日本獣医生命科学大学応用生命科学部 食品科学科食品機能化学教室 講師

## 〔業績の課題名〕

### 食肉ならびにその副生物を由来とする機能性ペプチドに関する研究

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉は栄養価が高く、呈味性の良い食糧資源である。さらに、食肉は栄養素の供給源としてのみならず、豊富に存在するタンパク質を活用して、生体調節作用を有する機能性成分を新たに作製することが可能である。そこで「抗酸化作用」や「血圧上昇抑制作用」に着目し、畜産資源を由来とする機能性ペプチドの作出と、その作用機序の解明について研究を進めてきた。

#### 1. 抗酸化作用を有する機能性ペプチドに関する研究

豚筋原線維タンパク質の酵素分解物から、脂質の過酸化を抑制するペプチドを単離同定し、その作用機序が金属キレート作用によることを明らかにした。この内容は食肉由来ペプチドの機能性を示したものと先駆的であり、現在までに350報以上の論文に被引用されている。この他、ローヤルゼリー加水分解物の抗酸化作用についても、2報分の研究に関わってきた。

#### 2. 血管機能を改善するための機能性ペプチドに関する研究

生活習慣病は、血管の機能不全から心筋梗塞や脳卒中などを引き起こす。チキンエキスは循環器疾患の改善を目的として、古来より薬膳や伝承療法として使われてきた。この背景をもとに鶏卵抽出物から、昇圧因子であるアンジオテンシン変換酵素の阻害活性を有する血圧上昇抑制ペプチドを単離した。さらに、その構造を明らかにするとともに、生体（高血圧自然発症ラット）での降圧作用を見出してきた。このペプチドはコラーゲン由来であったため、コラーゲンを豊富に含む鶏足を原料として、新たに血圧上昇抑制ペプチドを単離した。コラーゲン由来のペプチドは血管内皮細胞の一酸化窒素合成酵素を活性化して血管の保護作用に働いたり、SHRにおいて動脈硬化マーカーを改善することが明らかとなった。また、ヒトを対象とした臨床試験では、血圧の上昇を抑えるだけでなく、血管内皮前駆細胞を活性化して血管を守る働きが示唆された。

#### 3. 内因性機能性ペプチド「カルノシン」に関する研究

タンパク質の酵素分解物だけでなく、内因性のペプチドであるカルノシンについても、研究を進めている。カルノシンは、抗疲労効果や抗酸化作用の改善が示されている。鶏やウズラを用いてカルノシンが増加する飼養条件を検討したり、カルノシン合成酵素の遺伝子情報をもとに、その生理作用に関する研究を進めている。これらの研究を通して、食肉ならびに畜産業が、ヒトの健康維持・増進に重要であることを明らかにしてきた。

# 岡村 雅史

北里大学獣医学部 准教授

## 〔業績の課題名〕

### 養鶏場および食鳥処理現場における鶏肉の食中毒菌汚染の実態とその対策

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

大学院在学時に *Salmonella enterica* serovar Enteritidis の血清型特異的な鶏卵汚染メカニズムの一端を明らかにし、さらに米国農務省 Beltsville 農学研究センター（USDA-BARC）において客員研究員として、このメカニズムにおける宿主マクロファージの血清型特異的反応の潜在的関与を明らかにした。これらの成果を投稿論文としてまとめ、学位論文「*Salmonella* Enteritidis Infection in Chickens: Differential Mechanisms of Ovarian and Oviductal Colonization and Macrophage Activation among *Salmonella* serovars.」を作成、大阪府立大学大学院にて博士（獣医学）の学位を取得した。その後、USDA-BARC で博士研究員として勤務し、米国食品医薬品局（FDA）およびメリーランド大学獣医学部の研究グループと共同で、鶏の *Salmonella enterica* serovar Enteritidis 感染予防のためのワクチンの開発・評価を実施した。また、その過程で特に鶏における細胞性免疫反応に関する基礎研究も行い、優れた成果を得た。

北里大学獣医学部赴任後は、製薬企業との共同研究により、鶏用サルモネラワクチンの開発・評価、感染鶏の早期摘発を目的とした新規検査法の開発に携わった。一方、これらの研究と並行して、サルモネラ／カンピロバクター汚染鶏肉に由来するヒトの食中毒事例数の減少を目的として、農場と食鳥処理場における両菌の制御を軸としたリスク管理法の確立に関する研究を開始した。この研究は、ブロイラー生産会社数社とコンサルタント獣医師の協力を得て行い、農場における両菌によるブロイラーの汚染が市販鶏肉の汚染に結びついていることを明らかにした。本研究はその後、内閣府食品安全委員会「食品健康影響評価技術研究」（2008—2009年）および農林水産省「レギュラトリーサイエンス事業」（2010—2012年）に採択され、両菌による鶏の汚染が孵卵場ではなくブロイラー農場で起こること、および農場内外のヒト・モノの移動が農場間伝播の原因となる可能性を示した。現在は、農場や処理場、関連業者を含めた鶏肉供給全体における従事者に対する教育・啓発が必須と考え、近隣の食肉衛生検査所等と連携してその具現化を目指している。

# 宮口 右二

茨城大学農学部 教授

## 〔業績の課題名〕

### 筋漿タンパク質による筋原線維加熱ゲル化促進作用に関する研究

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

筋肉内に含まれる水溶性画分には、ミオグロビンをはじめとする約 100 種類ほどの解糖系酵素を含んでおり、その量は食肉タンパク質のうち 30%程を占めている。これら筋漿タンパク質は、食肉の色調には関与していることが知られているが、食肉加工、とくに加熱食肉製品の物性に及ぼす筋漿タンパク質の役割については、十分な知見が得られていなかった。そこで本研究では、ブタ由来の筋漿タンパク質がモデルソーセージの物性に及ぼす影響および作用機序を解明することを目的に実施した。

その結果、まず筋漿タンパク質は乳清や卵白など異種タンパク質に匹敵するほどの乳化力を有することを明らかにした。さらに、ミートエマルジョンゲルのゲル強度が筋漿タンパク質の添加により高くなることが明らかとなった。この効果は、鶏肉由来の筋漿タンパク質にもあることが示された。

そこで、筋漿画分による食肉ゲルの物性改変効果の作用機序を明らかにするため、筋漿タンパク質を塩析処理したところ、硫酸アンモニウム 75%飽和可溶性画分に食肉のゲル強度を高める効果のあることを明らかにした。なお、その画分の主要成分は 35kDa 付近であり、アミノ酸配列の解析から、同タンパク質がグリセルアルデヒド 3 リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を明らかにした。さらに、食肉中から簡便で、高効率に GAPDH を回収する方法を見出し、精製された GAPDH で筋原線維の加熱ゲル化促進効果を確認した。

また、0.2M NaCl の低塩濃度下でミオシン B に GAPDH を添加したところ、ミオシンの一部が可溶化していることが確認され、同効果は GAPDH をサクシニル化すると失われることから、GAPDH の正の帯電（塩基性）がゲル化促進では重要であることが示された。また、免疫組織化学的手法および ATP アーゼの活性測定法を用いて、GAPDH とアクトミオシンとの相互作用を解析し、GAPDH はアクチンと結合していることが示唆された。以上のとおり、筋原線維加熱ゲル化促進作用は、筋漿タンパク質中の GAPDH によりもたらされ、同タンパク質がアクトミオシンとの分子間相互作用を示すことで発現されることを初めて明らかにした。



# 学会等事業助成

---



## 第17回アジア・大洋州畜産学会議開催報告

公益社団法人日本畜産学会 理事長 小泉聖一

平成28年8月22日(月)から25日(木)まで、古瀬充宏九州大学大学院農学研究院教授を大会長とし、「環境と人類・家畜の福祉に寄与する持続的家畜生産の進展を目指して」をメインテーマに、第17回アジア・大洋州畜産学会議(英文名: XV II The Asia-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP) Animal Science Congress)を福岡県九州産業大学にて開催いたしました。本会議の日本開催は平成8年10月に千葉県幕張市で行われた第8回 AAAP 会議以来、実に20年ぶりであります。

本会議を日本で開催することは、我が国の畜産学の発展に大きく寄与するだけでなく、経済成長に伴って家畜飼養が急速に進展しているアジア・大洋州地域に対して我が国の畜産技術を移転・支援する機会や、次世代の畜産学の発展を担う多くの国の若手研究者の交流の場となることが期待されます。そこで、平成23年度の日本畜産学会総会において、我が国に本会議を招致することを決定し、翌24年度にタイで開催された第15回 AAAP カウンシルミーティングにて日本開催を提案したところ満場一致の賛成を得ることができました。それを受けて、平成27年度の日本畜産学会総会にて、第17回 AAAP 組織委員会を発足し、学術・出版・プログラム部会、財務・経理部会、募金・広報・登録部会、宿泊・旅行部会、会場・接遇・展示部会の5つの部会を中心とし、有識者67名からなる顧問の助言を適宜受けながら、会議開催に向けたさまざまな活動を展開して参りました。

本会議では、畜産における多様化・高度化した研究の利用、医学との連携、新産業の創成、アジアを中心とした畜産物需要への対応、家畜伝染病の阻止、地球環境に配慮した畜産の発展などを主要題目として、19の分野にわたる一般演題発表819題(口頭発表41セッション377題、ポスター発表5セッション442題)に加えて、4つの基調講演、10のシンポジウム、6つのワークショップが行われ、連日多くの国からの参加者で賑わいました。また、会期中には、地元福岡県の獣医師会主催(後援:福岡県・福岡県教育委員会、福岡市)による公開シンポジウム「~いのちを考えるシンポジウム~人と家畜、そしてウイルス、現在&未来」を開催し、一般の方々への畜産学に対する啓蒙活動を同時に行いました。

本会議への参加者総数は1,160名で、そのうち海外からの参加者は25ヶ国から730名でありました。本会議の開催にあたっては、各国の若手研究者の積極的な参加を促すために参加費を極力低く設定するとともに、一般演題発表のうち優れたものに対しては、厳正なる審査により若手研究者優秀発表賞を授与しました(口頭発表30題、ポスター発表15題)。また、アジア・大洋州からの参加者が多く、その宗教的背景がさまざまであることを考慮し、会場にて提供される食事についても格段の配慮を行いました。

本会議開催により、我が国独自の畜産学研究とアジア・大洋州諸国における実践的研究が融合することによる新たな研究の発想、応用研究の進展、新規市場への展開の可能性などの成果が得られ、次回平成30年にマレーシアで行われる第18回 AAAP 会議での再会を約束し、無事に最終日の閉会式を迎えることができました。

以上、本会議が成功裡に終了するにあたっては公益財団法人伊藤記念財団平成28年度学会等事業助成に多大な協力を賜りましたこと、ここに深く感謝いたします。

# 日本食肉研究会の助成事業実施報告

日本食肉研究会会長 根岸晴夫（中部大学応用生物学部）

## 1. 海外派遣事業

国際食肉科学技術会議派遣助成として、第62回会議に日本食肉研究会から会員2名が参加した。この会議は毎年8月中旬に交互に開催され、本研究会からは、会長、副会長あるいは常任幹事の中から1名を派遣し、代表者会議に出席し、会議報告を研究会機関誌の「食肉の科学」に掲載し内容を全員に周知することが研究会の中で義務づけられている。今年は8月14～19日にタイ（バンコク）で開催され、本助成（各人20万円の補助）により、西海理之会員（新潟大学農学部）と坂田亮一会員（麻布大学獣医学部）が参加した。

2022年には日本での開催が予定されており、開催準備のための情報収集、ならびに情宣活動を行うために、当会では準備委員会を立ち上げ準備に入り、開催地は神戸国際会議場に決定している。その日本開催を成功させるために、現時点から2022年開催時に中心となって活躍する会員を一人でも多く派遣することが重要である。この8月期はアジア圏内であっても飛行機代等の旅費が高額であり、また大会派遣では会議参加費、宿泊費と合わせると負担が大きい。今回の伊藤記念財団からの助成により参加者は積極的に海外の研究者との学術交流を行い、日本での会議参加のアピールを大いに実施できた。この会議の詳細は、本研究会会長である筆者、ならびにICoMST2022準備委員会の坂田・本山らが、食肉の科学（2016年2号）および日本食肉加工情報（2016年12月号）でそれぞれ報告している。

## 2. 国内における研究会でのセミナー

「国際的な食肉研究のトップランナー（現時点ではドイツあるいはフランスの食肉研究者1名を想定）を海外から招聘し、討論重視型の食肉ワークショップを開催するために、旅費として50万円、会場費と交流費用として30万円が必要であるが、旅費の50万円は貴財団からの助成をもって充当し、後者の30万円は食肉研究会の負担とする。本セミナーは食肉研究会大会（平成29年3月、神戸大学開催）とジョイントすることで、より多くの研究者、技術者および学生の参加を見込むとともに、会場費節減等を行い、本予算内で効率的に開催・運営する」との申請内容で、本年3月30日に神戸大学国際文化学部で開催された第58回日本食肉研究会大会の中で特別講演としてセミナーを実行した。

今回招聘したのは、ドイツからProf. Schwägele (Director, Max-Rubner Institute, Kulmbach)で、「Recent Developments in Meat Science in Europe : Analytical Approaches for Tracking and Tracing」の演題で約1時間、所属する研究所の紹介からスタートし、次に最近の研究として、食肉における有害物質のトレサビリテイ分析について以下の4項目を分かりやすい英語で説明し、活発な質疑応答がなされた。

- 1) Analysis of organic residues and contaminants,
- 2) Heat-induced contaminants,
- 3) Animal species and quantitation by real-time PCR.
- 4) Allergens in meat products by HPLC-MS/MS

この講演で、欧州の中心としてドイツが発信する研究情報の影響力と指導力を、日本の研究者にも知らせる機会ともなった。

### 3. 全日本大学対抗ミートジャッジング競技会

食肉産業界の次代を担うリーダーの育成に努めるために、平成21年から全国の畜産系大学生を対象として食肉評価の技術競技会が毎年開催されており、日本食肉研究会はこの競技会を積極的に支援している。これまで8回の競技会に参加した学生は300名を超え、その9割近くが畜産・食肉産業界に就職し活躍しており、産学における貢献度は非常に高い。

今回の第9回全日本学生対抗ミートジャッジング競技会では、3月1日（水）～3日（金）に開催され、59名の大学生（13大学）が東京食肉市場（港区港南）内の格付現場で、牛豚の枝肉とカット肉を前にして日頃の学習成果を競い合った。また宿泊先の代々木オリンピックセンターで、食肉産業セミナーなど豊富に組まれたプログラムに全員が参加し、我が国の食肉における産官学の最前線に勤める講師の話を中心に聴講した。なお、個人総合成績優秀者5名は、今年6月に開催されるオーストラリア大学対抗ミートジャッジング競技会に日本代表チームのメンバーとして参加が決まっている。

この競技会の運営にあたっては、これまで畜産・食肉関連企業・団体からの協賛金で賄ってきたが、競技会内容の充実に伴う経費増加と協賛金の漸減によって適正な運営に支障をきたしている。今回の財団からの助成は、競技会を運営する上で極めて有効であった。その使用内訳として、大会中の宿舎の代々木オリンピックセンターから品川の東京食肉市場までの移動用バス代および競技会会期中に用いる施設利用の補助費とした。

# 食肉の安全・安心および安定的生活を脅かす家畜感染症 に関する国際研究集会開催報告

岩手大学農学部附属動物医学食品安全教育研究センター センター長 鎌田洋一

## 〔講演会演題〕

東北から One World One Health を実現する：家畜感染症制御と食品安全を結ぶ架け橋

〔日時〕平成 28 年 9 月 26 日（月）

〔場所〕岩手大学総合教育研究棟（教育系）北桐ホール

（岩手大学農学部附属動物医学食品安全教育研究センター第 13 回全体研修会として）

## 〔事業報告〕

実施した事業では、中国農業科学院蘭州獣医研究所 劉光亮 教授を招き、家畜感染症の制御と食品安全に関する講演を実施した。講演の構成を以下に示す。

- ・「日本における家畜感染症の制御戦略」武久智之 農林水産省消費・安全局動物衛生課課長補佐（岩手大学客員教授）
- ・「中国における豚流行性下痢：何を知り、何をすべきか？（PEDV in China : What we know & what to do ?）」劉光亮 教授 中国農業科学院蘭州獣医研究所
- ・「FAMS が展開する牛白血病清浄化モデル開発事業」彦野弘一 准教授・村上賢二 教授 FAMS（岩手大学農学部）
- ・「広まる農場 HACCP 普及活動：HACCP の現状および東北における活動」酒井淳一 会長 東北農場 HACCP 研究会

講演では、まず、農林水産省 武久講師から、日本における家畜感染症の現状と、その対策についての基本的な戦略が示された。

次に、海外研究者として招聘した劉講師からは、直近で我が国において大流行がみられた豚流行性下痢症に関してその疾病の概要と近年の中国の状況と蘭州獣医研究所の研究状況について講演があった。以下その内容について詳述する。豚流行性下痢（以下 PED）は 1970 年代初期に英国で初めてその発生が報告された。数年後、PED の病原体である豚流行性下痢ウイルス（PEDV）がベルギーで分離され、その後、東アジアに広がっていった。中国における PED の発生は 1980 年代初期以来散発的かつ地域的であった。しかし、過去 5 年の間に PEDV はアジアだけでなく北米やヨーロッパのいくつかの国においては、養豚産業にとって重要な経済損耗の原因となっている。講演では PEDV 病原体、病理発生、診断法、免疫、感染伝播、ワクチン開発について示された。さらに、中国における PED の歴史、現在の PEDV 感染状況、ワクチン開発ならびに、劉講師が所属する研究所で展開している研究プロジェクトが紹介された。

さらに、招聘機関である FAMS が独自展開している牛白血病清浄化モデル開発事業について、

FAMS 研究員である彦野講師および村上講師による解説があった。

最後に、酒井講師から、FAMS が事務局となっている東北農場 HACCP 研究会の事業の進捗について講演があった。

本事業において、中国より招聘した劉教授による講演によって、中国や東アジアにおける豚流行性下痢症の現状やその制御について最新情報が提供され、また FAMS 側から東北地域の家畜感染症の現状や牛白血病に関する情報が交換されたとともに、岩手大学および東北地区における畜産・獣医学関係の研究者間で有意義な交流が生まれ、今後の国際的な食肉の安全・安心に関する研究事業の発展などに大いに期待できるものとなった。

## 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28年度 (Vol. 35)

---

2017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>