

平成31年度(令和元年度)

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 38

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	36	74	75,000
29	37	84	101,200
30	38	74	105,000
31 (令和元年度)			



## 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38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38回(平成31年度/令和元年度)助成事業における74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5回となります伊藤記念財団賞授賞事業の受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。

令和2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.38 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. 2020  
Koichi Ito  
The chief director  
The Ito Foundation



# 研究助成事業

## 目 次

筋肉内間葉系前駆細胞の機能改変による肉質制御技術開発に向けた基盤研究 ..... 山 内 啓太郎（東京大学大学院農学生命科学研究科）.....	3
微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した食肉加工技術の開発 ..... 竹 中 慎 治（神戸大学大学院農学研究科）.....	9
乾塩漬ハム中の亜鉛プロトポルフィリン区の形成様相と存在形態に関する研究 ..... 若 松 純 一（北海道大学北方生物圏フィールド科学センター）.....	15
ドライエイジングビーフの香気に及ぼす真菌の影響 ..... 中川 麻衣・小室 春菜・中島 誠人・猪口 由美・高鳥 浩介* （一般社団法人食肉科学技術研究所, *NPO法人カビ相談センター）.....	20
枝肉の3Dグラフィック化システムの製作 ..... 本山 三知代・渡邊 源哉・中島 郁世・佐々木 啓介 （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）.....	26
ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果とそのメカニズムの解明（Ⅱ） ..... 西村 敏英・力石 麗奈（女子栄養大学栄養学部）.....	33
次世代畜産学のための培養肉技術の開発 ..... 福 田 智 一（岩手大学理工学研究科）.....	42
官能特性をベースとした分光分析による赤身肉評価装置の開発 ..... 口田 圭吾 <sup>1</sup> ・阿佐 玲奈 <sup>1</sup> ・小林 健一 <sup>2</sup> （ <sup>1</sup> 帯広畜産大学, <sup>2</sup> 一関工業高等専門学校）.....	47
枝肉の異臭クレーム防止のためのと畜場における最適な冷却温度管理法の開発 ..... 猪 島 康 雄（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）.....	51
地鶏肉の美味しさの決定要因の解明（Ⅲ） ..... 本 田 和 久（神戸大学大学院農学研究科）.....	58
非加熱食肉製品における生理活性発現に関与する微生物の解明 ..... 竹田 志郎 <sup>1</sup> ・水野谷 航 <sup>1</sup> ・内山 淳平 <sup>2</sup> （ <sup>1</sup> 麻布大学獣医学部動物応用科学科, <sup>2</sup> 麻布大学獣医学部獣医学科）.....	63
神経細胞保護効果を有する畜産物由来タンパク質の探索研究 ..... 糸井 亜弥・吉川 豊（神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科）.....	69

和牛肉のおいしさを「見える化」する (Ⅱ) 輸入牛肉との比較 .....山田 知哉 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター) .....	78
低温乳酸発酵ならびに超高温加熱処理を施した筋原線維タンパク質モデル系における タンパク質分解と機能性発現に関する研究 (Ⅲ) .....林 利哉・長澤 麻央・小川 幸彦*・芳賀 聖一 (名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場) .....	82
食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究 .....堀江 正一・渡邊 萌・堀井 千絵 (大妻女子大学家政学部食物学科) .....	88
食材の低温貯蔵履歴が大腸菌 O157:H7 の凍結損傷回復ならびに低温加熱耐性に及ぼす影響 .....本城 賢一・宮本 敬久 (九州大学大学院農学研究院) .....	99
ソーセージに混入する非金属異物の検出技術に関する研究 .....河野 俊夫 (高知大学農林海洋科学部) .....	106
牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響 .....大和 修・矢吹 映・Md Shafiqul Islam・Phahnaj Pervin (鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学分野) .....	112
沖縄県の島々の黒毛和種集団の多様性, 近交度のゲノムの視点からの評価 .....佐々木 慎二 (琉球大学農学部) .....	118
牛の小型ピロプラズマ病に対する感染抵抗性遺伝子の同定 .....平山 博樹 <sup>1</sup> ・藤川 朗 <sup>2</sup> ・和田 健太 <sup>1</sup> ( <sup>1</sup> 東京農業大学生物産業学部, <sup>2</sup> 北海道立総合研究機構畜産試験場) .....	123
地鶏の行動的ストレス反応性に関与する遺伝的多型の探索 (Ⅱ) .....青谷 大希 (秋田県畜産試験場) .....	128
豚の暑熱ストレス耐性マーカーの開発 .....佐藤 周史 (千葉科学大学危機管理学部) .....	134
牛の暑熱ストレス耐性を担う HSP70.1 遺伝子多型に関する研究 (Ⅱ) .....森 美幸・上田 修二・林 武司・和田 卓也 (福岡県農林業総合試験場) .....	140
肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索 (Ⅱ) .....後藤 達彦 <sup>1</sup> ・力丸 宗弘 <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 帯広畜産大学, <sup>2</sup> 秋田県畜産試験場) .....	147
OPU-IVP を活用したステーション型牛胚生産システムの構築 .....及川 俊徳 <sup>1</sup> ・矢島 りさ <sup>1</sup> ・沼邊 孝 <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 宮城県畜産試験場, <sup>2</sup> みやぎ農業振興公社) .....	151
牛の子宮疾患や機能診断に資する子宮内バイオマーカーの検索 .....田中 知己・遠藤 なつ美 (東京農工大学農学部) .....	157

豚における体表温と行動の変化に基づく分娩予測の試み ..... 檜垣 彰吾・吉岡 耕治・鈴木 千恵 (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) .....	162
牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発 ..... 杉 村 智 史 (東京農工大学大学院農学研究科) .....	168
牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基盤的研究(Ⅱ) ..... 木崎 景一郎・高橋 透 (岩手大学農学部共同獣医学科) .....	172
暑熱ストレスによる牛子宮内膜内分泌機能攪乱への温度感受性チャンネルの関与 ..... 木 村 康 二 (岡山大学大学院環境生命科学研究科) .....	177
黒毛和種体外受精卵のゲノム選抜技術確立に向けた割球分離卵凍結保存法の開発 ..... 藤 井 貴 志 (北海道立総合研究機構畜産試験場) .....	183
卵胞由来生体活性ペプチドによる牛の卵巣機能調節メカニズムの解明 ..... 松田 二子 <sup>1</sup> ・大蔵 聡 <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 東京大学大学院農学生命科学研究科, <sup>2</sup> 名古屋大学大学院生命農学研究科) .....	189
移植可能な牛伸長胚培養系評価法の検討 ..... 細江 実佐・林 憲悟 (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) .....	194
抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の解明(Ⅲ) 武田 久美子・緒方 和子・木村 和輝*・佐藤 伸哉**・今井 昭** (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, *茨城県畜産研究センター肉用牛研究所, **広島県立総合技術研究所畜産技術センター) .....	199
分娩後の空胎期間短縮をもたらす新規卵巣機能賦活化技術の開発研究 ..... 山村 崇・阪谷 美樹 (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) .....	204
ホルモンおよび成長因子の複合添加培地を用いた賦活培養による牛体外受精由来胚の 着床能力向上に関する研究 ..... 高崎 久子・宍戸 容子・湯澤 裕史・松本 浩道*・ 福井 えみ子*・関澤 文夫** (栃木県畜産酪農研究センター, *宇都宮大学, **関沢アニマルクリニック) .....	209
分娩後のプロスタグランジン製剤投与が牛子宮修復の促進およびその後の繁殖機能に及ぼす影響 ..... 伊 賀 浩 輔 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター 畜産飼料作研究領域) .....	215
繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響(Ⅱ) ..... 林 武司・深水 大・上田 修二・磯崎 良寛 (福岡県農林業総合試験場畜産部) .....	220

黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査 (Ⅱ)	225
..... 星 野 洋一郎 (京都大学大学院農学研究科附属牧場)	
周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの発症予知と制御 (Ⅲ)	232
..... 佐 藤 繁 (岩手大学農学部共同獣医学科)	
消化管寄生性コクシジウム, <i>Eimeria kriegsmanni</i> における発育休止期の解析 (Ⅱ)	239
..... 松 尾 智 英 (鹿児島大学共同獣医学部寄生虫学分野)	
豚インフルエンザウイルス国内分離株の抗原性解析	247
..... 小 澤 真 (鹿児島大学共同獣医学部)	
食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の開発・評価 (Ⅱ)	255
..... 石原 加奈子 <sup>1</sup> ・Shwe Thiri Maung Maung Khin <sup>1,2</sup>	
( <sup>1</sup> 東京農工大学農学研究院, <sup>2</sup> 日本獣医師会)	
牛呼吸器病症候群 (BRDC) 発症機序の解明	260
..... 帆保 誠二・石川 真悟 (鹿児島大学共同獣医学部)	
天然化合物による牛白血病ウイルス感染制御を目指した基礎的研究	266
..... 紙透 伸治・村上 裕信・藤野 寛・佐藤 礼一郎 (麻布大学獣医学部)	
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索 (Ⅲ) —より効果的なワクチン接種部位を求めて—	272
..... 市居 修・中村 鉄平・小千田 圭吾・山下 祐輔・池田 哲平	
(北海道大学大学院獣医学研究院)	
豚赤痢菌の全ゲノム系統解析および薬剤耐性機序の解明	277
..... 岩 田 剛 敏	
(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)	
豚高親和性乳酸菌を用いた新規経口ワクチンの開発	282
..... 大松 勉・堤 椋哉	
(東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター)	
牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの実施状況調査 (Ⅱ)	288
..... 森 本 素 子 (宮城大学食産業学群)	
鶏を対象としたトキソプラズマ症の抗体検査法の開発	293
..... 吉田 彩子・長安 英治*・高島 康信**	
(宮崎大学農学部, *宮崎大学医学部, **岐阜大学応用生物科学部)	
牛ウイルス性下痢ウイルスの準種 END-1 は弱毒生ワクチンになるか?	299
—より効果的に免疫を誘導するための可能性の追求—	
..... 塩 川 舞 (日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科)	

筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の検出法 (Ⅱ)	高島 康弘 <sup>1</sup> ・谷口 裕二 <sup>2</sup> ・斎藤 大蔵 <sup>2</sup> ・ Duong Duc Hieu <sup>3</sup> ・吉田 彩子 <sup>4</sup> ( <sup>1</sup> 岐阜大学応用生物科学部, <sup>2</sup> 岐阜大学大学院連合獣医学研究科, <sup>3</sup> 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科, <sup>4</sup> 宮崎大学農学部) ……	305
網羅的ジェノタイピングによる新規牛白血病抵抗性遺伝子の同定	目 堅 博 久 (宮崎大学テニユアトラック推進機構) ……	310
豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明 (Ⅱ)	岡 林 環 樹 (宮崎大学農学部獣医学科) ……	315
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索 (Ⅱ)	青山 真人 <sup>1</sup> ・燕山 由己人 <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> 宇都宮大学農学部生物資源科学科, <sup>2</sup> 宇都宮大学農学部応用生命化学科) ……	319
鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと共存する細菌の網羅的な挙動解析 (Ⅲ)	黒木 香澄・仁田 義弘・関崎 勉 (東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター) ……	325
アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する疫学研究 (Ⅱ)	杉浦 勝明・芳賀 猛 (東京大学大学院農学生命科学研究科) ……	332
牛における PTH/PTHrP 受容体シグナルの肥満とインスリン抵抗性への関与	恩田 賢・風間 啓 (麻布大学獣医学部) ……	338
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究 —飼養成績と免疫能に及ぼす影響—	勝俣 昌也・鈴木 武人 (麻布大学獣医学部) ……	344
暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレークスルー：筋幹細胞の活性化・増殖因子 HGF のニトロ化 (不活化) の関与の検証	辰巳 隆一・増原 夏海・Mohamed Zakaria Elhussiny・ Wishwajit Sur Chowdhury・城戸 潤力・今富 奈々・ Elgaabari Alaa Magdi Hassanein・松吉 祐児・中村 真子・古瀬 充宏 (九州大学大学院農学研究院) ……	349
骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索 (Ⅱ) —質的向上も目指して—	米 倉 真 一 (信州大学農学部) ……	354
黒毛和種繁殖雌牛の放牧行動における群内個体差は生産成績と関連するか？	安 在 弘 樹 (宮崎大学農学部) ……	359
茎葉多収型飼料用イネの茎部に蓄積する炭水化物の栄養的意義と生産現場との技術的連携	近藤 誠・Budi Wardiman・Randi Mulianda (三重大学大学院生物資源学研究科) ……	364



養鶏における個体管理と清掃ロボット導入による IoT 型食肉生産技術の開発 (Ⅱ)	堀口 健一 <sup>1</sup> ・Meng Tong <sup>1</sup> ・片平 光彦 <sup>1</sup> ・市浦 茂 <sup>2</sup>	( <sup>1</sup> 山形大学農学部, <sup>2</sup> 岩手大学大学院連合農学研究所) ……………	371
成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索 (Ⅱ)	鈴木 貴弘 (北海道大学大学院農学研究院) ……………		378
ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した採食可能量の予測モデルの開発	谷川 珠子 <sup>1</sup> ・田中 常喜 <sup>2</sup>	( <sup>1</sup> 地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場, <sup>2</sup> 地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場) ……………	385
鶏肉中のイミダゾールジペプチド含量を増やす飼養方法とその活用に関する研究	久恒 辰博 <sup>1</sup> ・戸塚 護 <sup>2</sup> ・江草 愛 <sup>2</sup> ・青谷 大希 <sup>3</sup> ・福田 栞 <sup>3</sup>	( <sup>1</sup> 東京大学大学院新領域創成科学研究科, <sup>2</sup> 日本獣医生命科学大学, <sup>3</sup> 秋田県畜産試験場) ……………	391
豚の未熟産子 (ひね豚) の発育遅延をもたらす生理的要因の解明 (Ⅱ)	中島 郁世・谷口 雅章・芦原 茜・荒川 愛作・ 渡邊 源哉・本山 三知代・佐々木 啓介	(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) ……………	397
黒毛和種育成牛のアミノ酸要求量に関する研究	寺田 文典 (東北大学大学院農学研究所) ……………		403
初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性	松崎 正敏 (弘前大学農学生命科学部) ……………		409
鶏の飼養管理における労力低減のための距離センサによる体重推定に関する研究	阿野 裕司・伊藤 直弥*・宇高 優美*・水上 嘉樹**・ 木村 裕昭***・原田 宏明****	(地方独立行政法人山口県産業技術センター, *山口県農林総合技術センター, **国立大学法人山口大学, ***深川養鶏農業協同組合, ****伊藤忠飼料株式会社) ……………	413
哺育期子牛の消化管機能を強化するための管理技術の開発	福森 理加 (酪農学園大学獣医学群) ……………		419

# CONTENTS

<b>Elucidation of regulatory mechanisms of intramuscular mesenchymal progenitor cell function for the establishment of meat quality control technology</b>	
Keitaro Yamanouchi (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) .....	3
<b>Developments in technology for meat processing by fungal aspartic protease</b>	
Shinji Takenaka (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....	9
<b>Studies on the formation and the existence form of zinc protoporphyrin IX in dry-cured ham</b>	
Jun-ichi Wakamatsu (Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University) .....	15
<b>Effect of mold on the aroma of dry aging beef</b>	
Mai Nakagawa, Haruna Komuro, Yoshito Nakashima, Yumi Inoguchi and Kousuke Takatori* (Japan Meat Science & Technology Institute, *Center for fungal Consultation Japan) .....	20
<b>Development of a system for rendering 3D computer graphics of meat carcasses</b>	
Michiyo Motoyama, Genya Watanabe, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) .....	26
<b>Clarification of the enhancement mechanism of “<i>roku</i> attributes” by lipids in pork sausages (II)</b>	
Toshihide Nishimura and Reina Chikaraishi (Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University) .....	33
<b>Cultured clean meat technology for next generation livestock science</b>	
Tomokazu Fukuda (Graduate School of Science and Technology, Iwate University) .....	42
<b>Development of meat evaluation system by spectroscopic analysis based on sensory score for red meat</b>	
Keigo Kuchida <sup>1</sup> , Reina Asa <sup>1</sup> and Ken-ichi Kobayashi <sup>2</sup> ( <sup>1</sup> Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>2</sup> National Institute of Technology, Ichinoseki College) .....	47
<b>Development of an appropriate method of cooling temperature control for prevention of bone taint of beef carcasses in slaughterhouses</b>	
Yasuo Inoshima (Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) .....	51



<b>Identification of the main factor determining the taste of Jidori meat (III)</b>	
Kazuhisa Honda	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) .....	58
<b>Investigation of microorganism for expression of bioactivity in the uncooked meat products</b>	
Shiro Takeda <sup>1</sup> , Wataru Mizunoya <sup>1</sup> and Jyunpei Uchiyama <sup>2</sup>	
( <sup>1</sup> School of veterinary medicine, Department of animal science and biotechnology, <sup>2</sup> Department of veterinary medicine, Azabu University) .....	63
<b>The study of protective effect on neuronal cell by animal product protein</b>	
Aya Itoi and Yutaka Yoshikawa	
(Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University) .....	69
<b>Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality (II) Comparison of Wagyu beef with imported beef</b>	
Tomoya Yamada	
(Central Region Agricultural Research Center, NARO) .....	78
<b>Retort processing and cold lactic acid fermentation induce protein degradation and functional peptides derivation in myofibrillar protein system (III)</b>	
Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Yukihiko Ogawa* and Seiichi Haga	
(Faculty of Agriculture, Meijo University, *Experimental Farm, Meijo University) .....	82
<b>Study on awareness of consumers about safety of food additives</b>	
Masakazu Horie, Moe Watanabe and Chie Horii	
(Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University) .....	88
<b>Effects of storage history of food materials at low temperature on recovery from freezing injury and thermotolerance of <i>Escherichia coli</i> O157 : H7</b>	
Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto	
(Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University) .....	99
<b>Study on the detection technology of non-metal extraneous materials in sausages</b>	
Toshio Kawano	
(Department of Agriculture, Forestry, Bioresource and Environmental Sciences, Kochi University) ....	106
<b>Molecular basis of novel genetic disorders in cattle and their adverse impact</b>	
Osamu Yamato, Akira Yabuki, Md Shafiqul Islam and Phahnaj Pervin	
(Laboratory of Clinical Pathology, Department of Veterinary Clinical Sciences, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....	112
<b>Genomic evaluation of genetic diversity and inbreeding of Japanese Black cattle in the Okinawa islands</b>	
Shinji Sasaki	
(Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus) .....	118

### **Identification of genes involved with resistance to small piroplasmosis in cattle**

Hiroki Hirayama<sup>1</sup>, Akira Fujikawa<sup>2</sup> and Kenta Wada<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>Animal Research Center, Hokkaido

Research Organization) ..... 123

### **The search for genetic polymorphisms involved in behavioral stress response in slow-growing meat type chickens (II)**

Daiki Aoya

(Akita Prefectural Livestock Experiment Station) ..... 128

### **Development markers associated with heat tolerance in pigs**

Shuji Sato

(Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science) ..... 134

### **The study of polymorphism in the bovine *HSP70.1* gene associated with thermotolerance (II)**

Miyuki Mori, Shuji Ueda, Takeshi Hayashi and Takuya Wada

(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) ..... 140

### **Rapid genetic mapping for egg production and eggshell strength in Nagoya breed for production of meat-type chicken (II)**

Tatsuhiko Goto<sup>1</sup> and Kazuhiro Rikimaru<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Akita Prefectural Livestock Experiment

Station) ..... 147

### **Construction of station type bovine embryo production system using OPU-IVP**

Toshinori Oikawa<sup>1</sup>, Risa Yajima<sup>1</sup> and Takashi Numabe<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, <sup>2</sup>Miyagi Agricultural Development

Corporation) ..... 151

### **Investigation of uterine bio-markers for evaluation of uterine disease and function in cows**

Tomomi Tanaka and Natsumi Endo

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) ..... 157

### **Farrowing prediction based on changes of body surface temperature and behavior in sows**

Shogo Higaki, Koji Yoshioka and Chie Suzuki

(National Institute of Animal Health, NARO) ..... 162

### **Development of predictive system of chromosomal abnormality on bovine in vitro fertilized embryos**

Satoshi Sugimura

(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture) ..... 168

### **Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle (II)**

Keiichiro Kizaki and Toru Takahashi

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) ..... 172

<b>Involvement of temperature sensing channels in disorder of endocrine function of bovine endometrium by heat stress</b>	
Koji Kimura	
(Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University) .....	177
<b>Development of cryopreservation method for bovine demi-blastocysts produced by blastomere separation technique for establishment of preimplantation genomic selection system using <i>in vitro</i> fertilized embryos</b>	
Takashi Fujii	
(Animal Research Center, Hokkaido Research Organization) .....	183
<b>The role of a bioactive peptide derived from follicular cells on cattle ovarian function</b>	
Fuko Matsuda <sup>1</sup> and Satoshi Ohkura <sup>2</sup>	
( <sup>1</sup> Graduate School of Agricultural and Biosciences, The University of Tokyo, <sup>2</sup> Graduate School of Biagricultural Sciences, Nagoya University) .....	189
<b>Evaluation of culture system to elongate and transplant in bovine embryos</b>	
Misa Hosoe and Ken-Go Hayashi	
(Institute of Livestock and Grassland Sciences, NARO) .....	194
<b>Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of cryopreserved bull semen (III)</b>	
Kumiko Takeda, Kazuko Ogata, Kazuteru Kimura*, Nobunari Sato** and Akira Imai**	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, *Beef Cattle Institute, Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, **Hiroshima Prefectural Livestock Research Center) .....	199
<b>Development of novel method for reactivation of ovarian function in postpartum period that achieves shortening the open period</b>	
Takashi Yamamura and Miki Sakatani	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) .....	204
<b>Study on improvement of implantation potential in bovine embryo derived from IVMFC by combined treatment with hormone and growth factor</b>	
Hisako Takasaki, Yoko Shishido, Hirohumi Yuzawa, Hiromichi Matsumoto*, Emiko Fukui* and Fumio Sekizawa**	
(Tochigi Prefectural Livestock & Dairy Experimental Center, *Utsunomiya University, **Sekizawa Animal Clinic) .....	209
<b>Stimulatory effects of prostaglandin administration on bovine uterine involution and its subsequent effects on reproductive function</b>	
Kosuke Iga	
(Division of Livestock and Forage Research, Tohoku Agricultural Research Center, NARO) .....	215

<b>Effect of nutrition control on superovulation response and the number of recovered embryo in heifer (II)</b>	
Takeshi Hayashi, Dai Fukamizu, Shuji Ueda and Yoshihiro Isozaki (Department of Animal production, Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) .....	220
<b>Survey of the low durability of motile sperm in the frozen semen of Japanese Black cattle (II)</b>	
Yoichiro Hoshino (Kyoto University livestock farm) .....	225
<b>Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy cows</b>	
Shigeru Sato (Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) .....	232
<b>Analysis of the resting stage in the life cycle of the intestinal coccidian parasite, <i>Eimeria kriegsmanni</i> (II)</b>	
Tomohide Matsuo (Laboratory of Parasitology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....	239
<b>Antigenic analyses of swine influenza viruses isolated in Japan</b>	
Makoto Ozawa (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....	247
<b>Development and evaluation for determination of number of antimicrobial-resistant bacteria in meats (II)</b>	
Kanako Ishihara <sup>1</sup> and Shwe Thiri Maung Maung Khin <sup>1,2</sup> ( <sup>1</sup> Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup> Japan Veterinary Medical Association) .....	255
<b>Breakthrough of pathogenic mechanism of bovine respiratory disease complex (BRDC)</b>	
Seiji Hobo and Shingo Ishikawa (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) .....	260
<b>Basic research for controlling infection of bovine leukemia virus</b>	
Shinji Kamisuki, Hironobu Murakami, Kan Fujino and Reiichiro Sato (School of Veterinary Medicine, Azabu University) .....	266
<b>Study of mucosa-associated lymphoid tissues in farm animals (III) – to identify more effective regions for their vaccination –</b>	
Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Keigo Kosenda, Yusuke Yamashita and Teppei Ikeda (Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University) .....	272
<b>Whole-genome phylogenetic analysis and investigation of drug resistance mechanism of <i>Brachyspira hyodysenteriae</i></b>	
Taketoshi Iwata (National Institute of Animal Health, Agriculture and Food Research Organization, NARO) .....	277

<b>Development of novel oral vaccine using genome editing lactic acid bacteria with high affinity for pigs</b>	
Tsutomu Omatsu and Ryoya Tsutsumi	
(Research and Education Center for Global Infectious Diseases of Animals, Department of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) .....	282
<b>A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of parasite control program in cattle (II)</b>	
Motoko Morimoto	
(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University) .....	288
<b>Development of serological tests for <i>Toxoplasma</i> infection in poultry</b>	
Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu * and Yasunobu Takashima **	
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, *Faculty of Medicine, University of Miyazaki, **Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) .....	293
<b>Can END<sup>-</sup>, a quasispecies of bovine viral diarrhoea virus, be a live – attenuated vaccine ? – Pursing the possibility of more effectively inducing immunity –</b>	
Mai Shiokawa	
(School of Veterinary Nursing and Technology, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University) .....	299
<b>Detection strategy of <i>Toxoplasma gondii</i> infected pig and estimation of cysts burden in muscles (II)</b>	
Yasuhiro Takashima <sup>1</sup> , Yuji Taniguchi <sup>2</sup> , Taizou Saitou <sup>2</sup> , Duong Duc Hieu <sup>3</sup> and Ayako Yoshida <sup>4</sup>	
( <sup>1</sup> Faculty of Applied Biological Sciences, The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University, <sup>2</sup> Graduate School of Gifu University, <sup>3</sup> Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, <sup>4</sup> Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	305
<b>Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by comprehensive genotyping</b>	
Hirohisa Mekata	
(Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki) .....	310
<b>Mechanism of progression of sever porcine circovirus associated diseases by porcine intestine cell model (II)</b>	
Tamaki Okabayashi	
(Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	315
<b>Investigation of the physiological markers indicating ‘nausea’ in domestic ruminants (II)</b>	
Masato Aoyama <sup>1</sup> and Yukihiro Kabuyama <sup>2</sup>	
( <sup>1</sup> Department of Agrobiolgy and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, <sup>2</sup> Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University) .....	319

<b>Comprehensive analysis of the behavior of <i>Campylobacter</i> and coexistent bacteria in chicken food chain (III)</b>	
Kasumi Kuroki, Yoshihiro Nitta and Tsutomu Sekizaki (Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo) .....	325
<b>Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan</b>	
Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga (Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) .....	332
<b>Influence of PTH/PTHrP receptor signals for obesity and insulin resistance in dairy cows</b>	
Ken Onda and Kei Kazama (School of Veterinary Medicine, Azabu University) .....	338
<b>A study on requirements of lysine in weanling pigs</b>	
<b>– Effects on growth performances and immune functions –</b>	
Masaya Katsumata and Takehito Suzuki (School of Veterinary Medicine, Azabu University) .....	344
<b>Breaking-through the heat stress-induced suppression of postnatal muscle growth : possible implication of nitration of myogenic stem cell activation factor HGF</b>	
Ryuichi Tatsumi, Natsumi Masuhara, Mohamed Zakaria Elhussiny, Vishwajit Sur Chowdhury, Hirochika Kido, Nana Imatomi, Elgaabari Alaa Magdi Hassanein, Yuji Matsuyoshi, Mako Nakamura and Mitsuhiro Furuse (Graduate School of Agriculture, Kyushu University) .....	349
<b>Screening for phytochemicals that induce skeletal muscle hypertrophy</b>	
<b>– Aiming for quantitative improvement –</b>	
Shinichi Yonekura (Faculty of Agriculture, Shinshu University) .....	354
<b>Are inter-individual differences in grazing behavior of Japanese Black cows in a herd related with production performance ?</b>	
Hiroki Anzai (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) .....	359
<b>Nutritional value of carbohydrates accumulated in forage rice with high stem yield, and development of research-based cooperative extension service</b>	
Makoto Kondo, Budi Wardiman and Randi Mulianda (Graduate School of Bioresources, Mie University) .....	364

**Development of IoT type meat production system to introduce for individual management and cleaning robot of poultry farming (II)**

Kenichi Horiguchi<sup>1</sup>, Tong Meng<sup>1</sup>, Mitsuhiko Katahira<sup>1</sup> and Shigeru Ichiura<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Agriculture Yamagata University, <sup>2</sup>The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University) ..... 371

**The search study about myogenic stem cell population which can promote muscular hypertrophy efficiently in adult animals (II)**

Takahiro Suzuki

(Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University) ..... 378

**Prediction of feed intake capacity based on dynamic models of fiber digestion and passage in the rumen**

Tamako Tanigawa<sup>1</sup> and Tsuneki Tanaka<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Dairy Research Center, <sup>2</sup>Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center) ..... 385

**Feeding methods to increase imidazole dipeptide content in animal meat**

Tatsuhiko Hisatsune<sup>1</sup>, Mamoru Totsuka<sup>2</sup>, Ai Egusa<sup>2</sup>, Daiki Aoya<sup>3</sup> and Shiori Fukuda<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Nippon Veterinary and Life Science University, <sup>3</sup>Akita Prefectural Livestock Experiment Station) ..... 391

**Factors affecting mortality and growth retardation in runt pigs (II)**

Ikuyo Nakajima, Masaaki Taniguchi, Akane Ashihara, Aisaku Arakawa, Genya Watanabe, Michiyo Motoyama and Keisuke Sasaki

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ..... 397

**Amino acid requirements for growing Japanese Black cattle**

Fuminori Terada

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ..... 403

**Colostrum programming of physiological properties related to meat production**

Masatoshi Matsuzaki

(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University) ..... 409

**Research on weight estimation using a distance sensor for reducing labor of bird breeding management**

Yuji Ano, Naoya Ito\*, Yumi Udaka\*, Yoshiki Mizukami\*\*, Hiroaki Kimura\*\*\* and Hiroaki Harada\*\*\*\*

(Local Incorporated Administrative agency, Yamaguchi prefectural Industrial Technology Institute, \*Yamaguchi Prefectural Agricultural Technology Center, \*\*Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Yamaguchi University, \*\*\*FUKAWA Poultry Agricultural Cooperative, \*\*\*\*Itochu Feed Mills Co. Ltd. ) ..... 413

**The study on the development of management method to strengthen the gut functions in calves**

Rika Fukumori  
(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) ..... 419



# 伊藤記念財団賞

## 目 次

<b>佐々木 啓 介</b> （農研機構畜産研究部門畜産物研究領域 ユニット長） 食肉の官能特性評価と消費者受容に関する研究 .....	431
<b>中 島 郁 世</b> （農研機構畜産研究部門畜産物研究領域 上級研究員） 肉用家畜における脂肪組織の形成・制御機構に関する研究 —in vitro から in vivo まで— .....	432
<b>永 野 昌 志</b> （北里大学獣医学部動物資源科学科 教授） 牛卵子の体外発育培養系の開発と卵胞発育機構研究 ：臨床現場における牛胚生産への応用 .....	433

# 学会等事業助成

## 目 次

シンポジウム「食鳥肉検査における日本とアジア諸国の HACCP の現状」に関する開催報告 公益社団法人日本獣医学会 代表理事 久和 茂（東京大学）……………	437
平成 31（令和元）年度事業実施報告書 日本畜産学会第 126 回大会 公開シンポジウム「畜産研究の成果を獣医臨床フィールドへ」 公益社団法人日本畜産学会 理事長 柏崎直巳（麻布大学）……………	439
日本食肉研究会への平成 31 年度・令和元年度事業助成実施報告 日本食肉研究会 会長 坂田亮一（麻布大学・明治大学）……………	441

# 研究助成事業

---

# 筋肉内間葉系前駆細胞の機能改変による肉質制御技術 開発に向けた基盤研究

Elucidation of regulatory mechanisms of intramuscular mesenchymal progenitor cell function for the establishment of meat quality control technology

山内 啓太郎

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Keitaro Yamanouchi

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

Accumulation of intramuscular adipose tissue (IMAT) and development of fibrous tissues due to accumulation of collagen both affect meat quality such as tenderness, texture and flavor. Thus, it is important for the production of high quality meat to regulate the amount of adipose and fibrous tissues in skeletal muscle. IMAT is comprised of adipocytes, while collagens included in fibrous tissues are mainly produced by activated fibroblasts. Both adipocytes and fibroblasts are differentiated from their common ancestors, called mesenchymal progenitor cells (MPC). We previously identified Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC) and Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4 (CSPG4) as possible regulator of MPC differentiation. In the present study, the effects of loss of these factors were examined both in vitro and in vivo. The results suggested that meat quality could be improved by controlling the function of SPARC and CSPG4.

## 1. 目 的

脂肪交雑割合や柔らかさ等、付加価値の高い食肉の生産は重要な課題であり、我が国の食肉産業の国際競争力強化にも資するものである。現在、付加価値をもつ食肉生産は和牛にみられるように主として遺伝的な選抜と飼養管理によりなされているが、さらなる向上に向けた新技術開発には脂肪交雑成立のメカニズムや肉の柔らかさに影響を与えるコラーゲンの蓄積等についての科学的な理解が重要である。

主として食肉を構成する筋肉内には間葉系前駆

細胞とよばれる一種の細胞群が存在する。間葉系前駆細胞は脂肪細胞への分化能をもち、いわゆる脂肪交雑にみられる脂肪細胞の主たる起源とされている。また、間葉系前駆細胞は線維芽細胞への分化能をもあわせもつ。線維芽細胞はコラーゲンをはじめとする細胞外基質の主要な供給源であるが、線維芽細胞からの過剰なコラーゲン産生・蓄積は結果として筋肉の硬化を生じる。したがって、肉質を制御するうえで、筋肉内に存在する間葉系前駆細胞からの脂肪細胞や線維芽細胞への分化ならびに線維芽細胞による細胞外基質の産生や蓄積についての制御機構を明らかにすることには

大きな意義がある。

われわれは間葉系前駆細胞の機能制御に関わる因子としてこれまでにSPARC (Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine)<sup>1-3)</sup>とCSPG4 (Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4)<sup>4)</sup>を同定した。SPARCは分泌性の非構造性マトリクスタンパク質で、脂肪分化抑制作用をもつだけでなく、細胞外コラーゲンタンパク質の凝集と安定化に関わることが知られている。一方、CSPG4は細胞膜表面に発現するタンパク質で、その一部は切断されて遊離型としても作用する。申請者のこれまでの研究によりCSPG4は間葉系前駆細胞の脂肪分化能維持に必要であるとともに、線維化を抑制する可能性が示されている。つまりSPARCは抗脂肪分化作用と線維化促進作用、CSPG4は脂肪分化促進作用と抗線維化作用という相反する作用をそれぞれもつ因子と位置づけられる。この仮説が実証できれば、SPARCの作用を減弱する一方でCSPG4の作用を増強するというストラテジーにより肉質を飛躍的に向上させる技術開発に繋がる。

そこで本課題では間葉系前駆細胞クローンや筋肉内に脂肪蓄積や線維化を生じるモデルラットを用いてSPARCやCSPG4の欠損が脂肪分化(脂肪蓄積)や線維芽細胞分化(線維化)に与える影響について解析を行い、*in vitro*ならびに*in vivo*の両方面から上記ストラテジーの蓋然性について検証することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 使用動物

SPARC欠損マウスはC57BL/6Jを背景とし、Dr. Amy D. Bradshawから分与された。SPARC欠損ラットおよびCSPG4欠損ラットは、当研究室にてCRISPR/Cas法を用いて作製した。いずれの動物も温度23℃、湿度60%に維持された動物室

にて飼育し、固形飼料、水は自由に摂取させた。すべての動物実験は東京大学農学部動物実験委員会の承認を受けて行った。

### 2.2 細胞培養

ラット間葉系前駆細胞2G11細胞は10%牛胎子血清を含むDMEM中で培養維持した。bFGFで一晩処理したのちに、インスリン、デキサメタゾン、IBMXおよびトログリタゾンを含む培地で培養することで脂肪細胞への分化誘導を行った。線維芽細胞へ分化誘導する際は、TGF- $\beta$ を添加した培地で4日間培養した。脂肪細胞の検出はオイルレッドO染色およびPPAR $\gamma$ の免疫染色により行った。線維芽細胞の検出は細胞抽出液を調整し、 $\alpha$ SMAのウェスタンブロットを用いて行った。CSPG4欠損2G11細胞はCRISPR/Cas法を用いて作製した。最終的にB2G9およびC1B3の2つの欠損株が得られた。

### 2.3 組織学的解析

イソフルラン麻酔の過剰吸入により動物を安楽死させたのち、骨格筋サンプルを採取した。採取した骨格筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し、使用時まで-80℃で保存した。骨格筋サンプルから凍結切片を作製し、マッソントリクローム染色による線維化の検出、オイルレッドO染色による脂肪化の検出を行った。また、PPAR $\gamma$ の免疫染色による脂肪細胞の検出もあわせて行った。

### 2.4 クリープメータによる骨格筋の硬度解析

高分解能型クリープメータ(RE2-33005C:山電、東京)を用い、ラットの腓腹筋に20Nまでの負荷圧をかけた時の筋の歪み率を測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 SPARC欠損マウスおよびSPARC欠損ラット骨格筋の表現型解析

本項目ではSPARC欠損が骨格筋の表現型にど

のような影響を与えるかについて知ることを目的とした。

まず、既存のSPARC欠損マウスと野生型マウス前脛骨筋における月齢ごとの前脛骨筋重量を測定したところ、調べたいずれの月齢においても、SPARC欠損マウスでは野生型マウスに比べ減少していることが分かった<sup>5)</sup>。この重量減少の要因の1つとして筋線維の発育不全が生じている可能性を考え、筋線維径の定量的な解析を行ったが、両マウス間で違いは観察されなかった<sup>5)</sup>。SPARCは細胞外コラーゲンタンパク質の凝集と安定化に関わることが報告されている。そこで、SPARC欠損マウスにおける筋重量の減少が、線維組織形成の減少による可能性について調べた。マッソントリクローム染色による定量的解析の結果、SPARC欠損マウス前脛骨筋では、2ヶ月齢以降、調べたいずれの月齢においても、野生型マウス前脛骨筋でみられる線維組織形成が抑制されていた<sup>5)</sup> (Fig. 1)。このことから、マウス骨格筋では

SPARCが線維化促進作用を示すことが明らかとなった。

次に、ゲノム編集によりSPARC欠損ラットを作製し、マウスにおけるのと同様の解析を行った。その結果、5ヶ月齢における前脛骨筋重量は、野生型ラットとの間で違いがみられなかったものの、筋線維径については野生型ラットに比べSPARC欠損ラットで有意な減少がみられた。一方、線維組織形成については両ラット間で違いが観察されなかった。興味深いことに、クリーブメータを用いて長指伸筋の歪み率を測定したところ、野生型ラットに比べSPARC欠損ラットで有意に硬度が低下していた (Fig. 2)。

SPARC欠損により、マウスでは線維組織形成が減少する一方、筋線維自体には変化がみられなかったのに対し、ラットでは線維組織形成に違いがなく、筋線維径の減少がみられた。これらの結果は、骨格筋におけるSPARCの作用が必ずしも哺乳類全般に普遍的ではないことを示すものかも

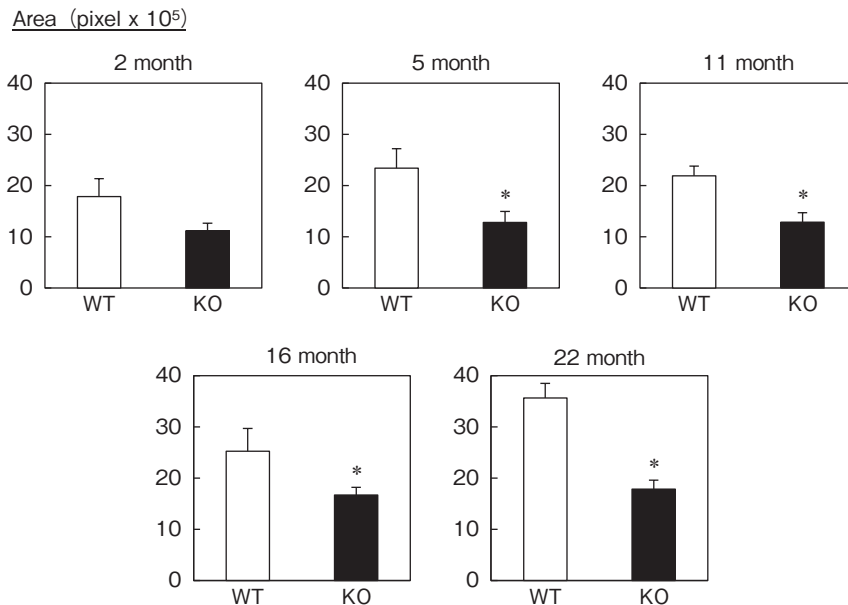


Fig. 1 Fibrillar collagen accumulation in tibialis anterior muscles of wild-type (WT) and SPARC-null (KO) mice<sup>5)</sup>. Graphed data are quantitative analysis of area stained with Masson trichrome. Data are means  $\pm$  SEM (n=3-9). \*, p<0.05 vs WT mice.

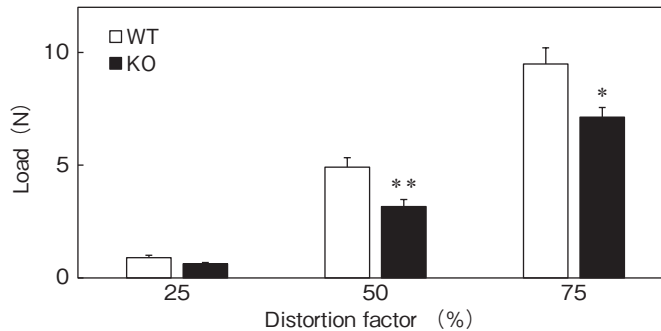


Fig. 2 The distortion factor of extensor digitorum longus muscles of wild-type (WT) and SPARC-null (KO) rats at 5 month-old. Graphed data are means  $\pm$  SEM (n = 6). \* and \*\*, p < 0.05 and 0.01 vs WT rats, respectively.

しれない。ゲノム編集技術の発達により、家畜でも積極的に遺伝子欠損動物を作出することが可能となっていることから、今後は広く家畜をも含めた比較動物学視点からの検証が求められる。

一方、食肉のテクスチャーは肉質評価の1つを構成する重要な指標であるが、今回、少なくともラット骨格筋ではSPARC欠損により硬度の低下が生じていることが定量的に示された。今後さまざまな因子を欠損させた動物を作出する際、クリープメータによる骨格筋硬度の測定は重要なパラメーターになると考えられる。

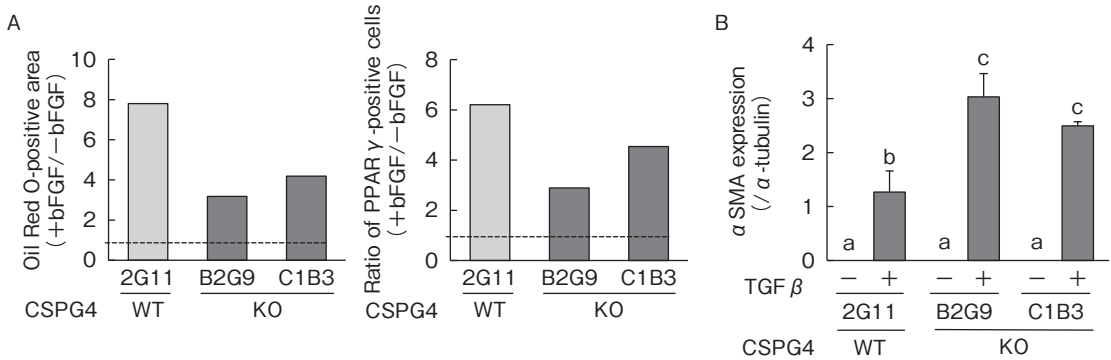
### 3.2 CSPG4欠損間葉系前駆細胞の樹立とその分化能

われわれはラット骨格筋からの間葉系前駆細胞の単離とそのクローン化に成功している<sup>6)</sup>。得られた間葉系前駆細胞クローン2G11細胞は、脂肪細胞、線維芽細胞両者への分化能を示す。CSPG4は2G11細胞を抗原としてマウスを免疫することで得られた単クローン抗体5C12が認識する分子である<sup>4)</sup>。これまでの研究により、siRNAを用いて2G11細胞のCSPG4発現を低下させると、脂肪細胞への分化能が低下することが示されている<sup>4)</sup>。そこで本項目では、ゲノム編集によりCSPG4発現を完全に欠損した2G11細胞を作成し、その脂肪細胞や線維芽細胞への分化について、

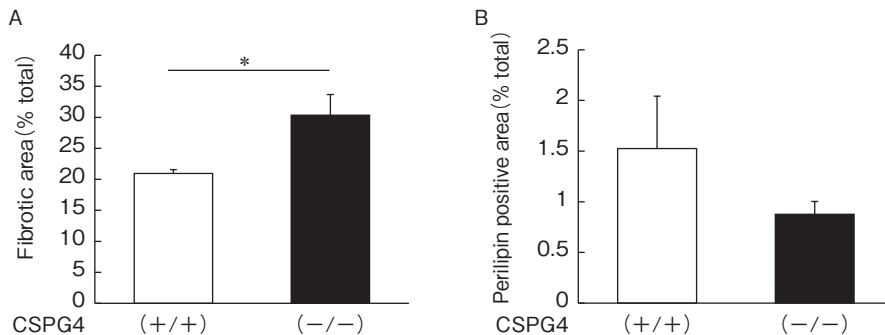
siRNA導入により得られた過去の知見と一致するかについて検証した。B2G9およびC1B3という2つのCSPG4欠損2G11細胞が樹立された。2G11細胞の特徴であるbFGF依存性の脂肪分化能<sup>7)</sup>について調べたところ、両者ともに野生型の2G11細胞に比べて脂肪分化能が低下していることが確認された (Fig. 3)。一方、TGF- $\beta$  依存性の線維芽細胞への分化については、両細胞で野生型2G11細胞に比べて亢進がみられた (Fig. 3)。これらの結果はいずれも、CSPG4が脂肪分化促進作用と抗線維化作用をもつというわれわれの仮説に合致するものであった。

### 3.3 CSPG4欠損筋ジストロフィーラットの作出とその骨格筋表現型解析

前記のin vitroでの結果を受け、CSPG4のもつ脂肪分化促進作用と抗線維化作用がin vivoでも再現されるかどうかについて検討を行った。われわれが作出した筋ジストロフィーラット (DMDラット) は、病態の進行に伴い、骨格筋内に著しい脂肪化や線維化を呈する<sup>8)</sup>。そこでまずゲノム編集によりCSPG4欠損ラットを作出し、さらにこのラットをDMDラットと掛け合わせることにによりCSPG4欠損DMDラットを作製した。5から6ヶ月齢における前脛骨筋およびヒラメ筋の脂肪化や線維化の程度について、DMDラットと



**Fig. 3** Adipogenic (A) and fibrogenic (B) potential of 2G11 cells lacking CSPG4 (clones B2G9 and C1B3). In B, data are means  $\pm$  SEM (n = 3). Different letters indicate statistically significant differences by Tukey-Kramer test (p < 0.05).



**Fig. 4** Fibrillar collagen accumulation (A) and appearance of adipocytes (B) in soleus muscles of DMD rats with (+/+, n = 5) or without (-/-, n = 4) CSPG4. Graphed data are quantitative analysis of area stained with Masson trichrome (A) and anti-perilipin (B). Data are means  $\pm$  SEM. \*, p < 0.05 vs DMD (+/+) rats.

CSPG4欠損DMDラットとの間で比較を行った。その結果、前脛骨筋における脂肪化や線維化の程度には違いはみられなかったものの、ヒラメ筋ではCSPG4欠損により線維化の亢進（マッソントリクローム染色）と脂肪化の抑制（ペリリピンの免疫染色）がみられた（Fig. 4）。现阶段で、このような筋によるCSPG4欠損の影響に差異が生じる原因については明らかではないが、前脛骨筋がいわゆる速筋型筋線維優位であるのに対し、ヒラメ筋が遅筋型筋線維優位であることを鑑みると、in vivoにおけるCSPG4の作用は、周囲に存在する筋線維の型により修飾される可能性が考えられた。

#### 4. 要 約

本研究では、筋肉内に存在する間葉系前駆細胞が脂肪細胞・線維芽細胞両者へと分化することに着目し、その分化制御に関わる因子SPARCやCSPG4の発現を人為的に改変した場合のin vitro, in vivoにおける表現型を観察した。これらの因子がどのような機序により脂肪細胞や線維芽細胞への分化能を制御するかについては今後引き続き研究を進める必要があるが、得られた成果は、実際にこれらの因子を改変することにより肉質を制御できる可能性を強く示すものであった。



## 文 献

- 1) Nakamura, K., Nakano, S. I., Miyoshi, T., Yamanouchi, K., Matsuwaki, T., Nishihara, M. : Age-related resistance of skeletal muscle-derived progenitor cells to SPARC may explain a shift from myogenesis to adipogenesis, *Aging*, **4**, 40~48, 2012.
- 2) Nakamura, K., Nakano, S. I., Miyoshi, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Loss of SPARC in mouse skeletal muscle causes myofiber atrophy, *Muscle Nerve*, **48**, 791~799, 2013.
- 3) Nakamura, K., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Secreted protein acidic and rich in cysteine internalization and its age-related alterations in skeletal muscle progenitor cells, *Aging Cell*, **13**, 175~184, 2014.
- 4) Takeuchi, S., Nakano, S., Nakamura, K., Ozoe, A., Chien, P., Yoshihara, H., Hakuno, F., Matsuwaki, T., Saeki, Y., Takahashi, S., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Roles of chondroitin sulfate proteoglycan 4 in fibrogenic/adipogenic differentiation in skeletal muscle tissues, *Exp Cell Res*, **347**, 367~377, 2016.
- 5) Omi, S., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Matsuwaki, T., Nishihara, M. : Reduced fibrillar collagen accumulation in skeletal muscle of secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC)-null mice, *J Vet Med Sci*, **81**, 1649~1654, 2019.
- 6) Murakami, Y., Yada, E., Nakano, S. I., Miyagoe-Suzuki, Y., Hosoyama, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Establishment of bipotent progenitor cell clone from rat skeletal muscle, *Anim Sci J*, **82**, 764~772, 2011.
- 7) Nakano, S. I., Nakamura, K., Teramoto, N., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Basic fibroblast growth factor is pro-adipogenic in rat skeletal muscle progenitor clone, 2G11 cells, *Anim Sci J*, **87**, 99~108, 2016.
- 8) Nakamura, K., Fujii, W., Tsuboi, M., Tanihata, J., Teramoto, N., Takeuchi, S., Naito, K., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Generation of muscular dystrophy model rats with a CRISPR/Cas system, *Sci Rep*, **4**, 5635, 2014.

# 微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した 食肉加工技術の開発

Developments in technology for meat processing by fungal aspartic  
protease

竹 中 慎 治

(神戸大学大学院農学研究科)

Shinji Takenaka

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

During postmortem aging and meat processing, endogenous proteolytic degradation of muscle fibers into oligopeptides and release of nucleotides and free amino acids etc. lead to increase meat flavor. In addition, treatment by commercially obtained hydrolytic enzymes is one of efficient methods to improve meat flavor and its texture with reducing conditioning- and processing periods. In the food industry, several proteases such as papain, bromelain, and calpain are widely used for proteolytic hydrolysis, to improve meat tenderness. Aspartic protease from *Aspergillus repens* shows decolorization activity toward myoglobin. Our aim is to apply the limitedly hydrolysis of heme proteins by the aspartic protease for meat processing. The substrate specificity toward myofibrillar, myogenic, and extracellular matrix proteins were examined using the recombinant aspartic protease (rPepA). Among 9 tested natural proteins, rPepA showed the extremely high activity toward hemoglobin from Porcine, Human, and Bovine blood ; and the hydrolytic activity toward collagen and elastin from Bovine were very low. The relative activity of rPepA toward casein (1) and elastin (0.08) was similar that of papain and bromelain as previously reported. The hydrolysis profile in rPepA probably would be able to apply for meat tenderizing. The limitedly hydrolysis and decolorization of myoglobin by rPepA are expected for adjusting the color of sausages and salami. We tried to propose the mechanism of the limited hydrolysis and decolorization of myoglobin by rPepA. After hydrolysis of myoglobin by rPepA, released peptides were separated by SDS-PAGE and reverse phase chromatography by ODS column and the N-terminal amino acid sequences were analyzed. Based on analyses of the amino acid sequence of myoglobin and the 3D-structure model, myoglobin was hydrolyzed at least at 13 positions by rPepA. Especially, heme-binding regions were limitedly hydrolyzed.

## 1. 目 的

香味や食感に優れた食肉やハム、ソーセージ、  
ベーコン等の食肉加工品を得るためには、低温熟

成を一定期間行うことが好ましいとされ、うま  
味・こく味を増大させるためには1週間から1か  
月以上も熟成させる。長期熟成の目的は、自己の  
プロテアーゼによって自己消化を引き起こすこと

で呈味性の遊離アミノ酸やペプチドの含量を増大させることにある。一方、熟成期間を短縮化することは、冷蔵・保蔵コストの削減、微生物による腐敗や品質劣化の防止につながるが、うま味を付与するために別の熟成手段が必要となる。

食肉やその加工品のおいしさを決める重要な要因として「肉の柔らかさ」、「くちどけ」、「うま味」があげられる。肉はおいしさだけでなく、咀嚼しやすいやわらかさも消化効率や栄養摂取の面で重要である。特に、高齢化が進む先進諸国では肉質の改善のためにプロテアーゼが検討されている。例えば、植物由来のパパイン、ブロメライン、アクチニジンやコラーゲンを加水分解する微生物由来コラゲナーゼ等があげられる<sup>1-3)</sup>。一方、うま味の因子のひとつである遊離アミノ酸含量の増大のために、微生物由来ペプチダーゼも検討されている<sup>4)</sup>。近年、肉を「塩麴」に漬け込むことで「うま味やこく味を増しつつ、中までしっとりとした深い味わい」を引き出す調理法が注目されており、食肉やその加工品の高付加価値化はこれからますます重要視されると思われる。

申請者オリジナルの好乾性糸状菌由来アスパルティックプロテアーゼは、ヘムタンパク質を限定分解する<sup>5)</sup>。よって、肉由来のタンパク質を過剰に加水分解することなく、「肉の柔らかさ」と「うま味」両方をほどよく改善できると期待される。そこで、本研究では、同アスパルティックプロテアーゼについて筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解活性を調べるとともにミオグロビンの限定分解機構を明らかにし、食肉加工への潜在能力を明らかにすることを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 材料

分解活性試験で使用した基質は、筋原線維タンパク質以外Sigma Aldrichから購入した。また、

筋原線維タンパク質は、オーストラリア産牛もも肉から調製した。アスパルティックプロテアーゼは、既報の方法に従って調製した<sup>6)</sup>。

### 2.2 組換えアスパルティックプロテアーゼの調製

A. *repens* MK88由来アスパルティックプロテアーゼ (rPepA) は、*Pichia pastoris*-pPICZaA-PepA<sup>6)</sup> をBMMY培地 (100ml/500ml坂口コルベン) にて0.5% (v/v) となるようにメタノールを添加しながら9日間培養し、遠心上清を回収した。つづいて、上清にアセトンを添加し、沈殿として回収して得られた酵素を20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) に対して透析することで成熟rPepA (200から250U) を得た。

### 2.3 筋原線維タンパク質の調製

牛もも肉のミンチ (5 g) に対し、6倍量のTEK溶液 (0.1M KCl/1mM EDTA/10mM Tris-HCl (pH7.0)) を加え、ホモジナイズ (10,000rpm, 1min) (エースホモジナイザーAM-5, 日本精機製作所) した。遠心分離 (600×g, 10min) 後、6倍量のTEK溶液で懸濁・再度ホモジナイズし、遠心して沈殿物を得た。メッシュフィルターで結合組織を除去し、遠心後の沈殿物をTEK溶液で穏やかに懸濁した。得られた筋原線維画分を、TEK溶液での懸濁と遠心による上清の廃棄を繰り返して、均質化した。

### 2.4 筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解活性

既報の方法に従い<sup>5)</sup>、0.6% (w/v) 基質-50mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.0) 550  $\mu$ l に対して2.5  $\mu$ gの精製rPepAを添加し、30°Cで1時間反応を行った。加水分解により遊離したペプチド量をFolin-Ciocalteu試薬 (和光純薬工業) にて定量した。同条件で標準のL-チロシン (和光純薬工業) を用いて算出したモル吸光係数は $9.43 \times 10^3 \text{ cm}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ であった。酵素単位1 unitは、1分間に1  $\mu$ mol

のチロシンを含むペプチドを生成させる酵素量と定義した。試験した基質は、Table 1に記載の9種類である。

## 2.5 ヘムタンパク質の加水分解と生成ペプチドの解析

ミオグロビン（馬心筋由来）を基質とし、2.4で述べた方法にて加水分解物を得て、SDS-PAGE解析とODSカラムによる分析によって、精製ペプチドを解析した。

### 2.5.1 SDS-PAGEによる生成ペプチドの解析

ATTO AE-6530Mラピダス・ミニスラブ電気泳動装置（アトー株式会社、東京）を用いた。同装置マニュアルに従い、15%（w/v）ポリアクリルアミドゲル（ePagel ET-15L）を用いて、泳動した。タンパク質検出方法も同マニュアルに従い、Coomassie brilliant blue R-250（CBB）染色法を行った。メインバンドについては、PVDF膜に転写後、N末端アミノ酸配列解析を行った。

### 2.5.2 HPLCによる生成ペプチドの解析

以下に示す条件で分析し、主要なピーク由来のペプチド画分についてN末端アミノ酸配列解析を行った。

- ・カラム：COSMOSIL 5C18-AR-II(4.6×150mm, ナカライテスク、京都)

- ・溶離液：Solvent A：5mM TFAおよびSolvent B：5mM TFA-アセトニトリル（4：6，v/v）
- ・溶出：Sol.A-Sol. B（100：0，v/v）→（75min）→Sol.A-Sol. B（0：100，v/v）
- ・流速：0.5ml/min、・検出：UV 280nm

## 3. 結果と考察

### 3.1 rPepAにおける基質特異性試験

筋形成・結合組織・筋原線維タンパク質等に対する分解活性を調べた（Table 1）。親株MK88株由来アスパルティックプロテアーゼにおけるヘモグロビンに対する活性（pH3.0）を100%とした際の相対活性はミオグロビン（23.3%）、カゼイン（33.3%）、BSA（28.3%）である<sup>5)</sup>。本研究では食肉の加工や熟成への応用を念頭に、pHをより弱酸性側にシフトさせて加水分解活性を調べたが、相対活性は類似していた（Table 1）。今回市販品として入手できなかったが、Table 1の脚注に述べたように牛由来ミオグロビンやヘモグロビンは、馬や豚由来同タンパク質とアミノ酸レベルで82-88%の高い類似性があることから、rPepAは牛由来ミオグロビンやヘモグロビンに対しても同程度の活性を示すと予想される。

牛、豚、鶏などの食肉の硬さは筋細胞内の筋原

Table 1 Hydrolytic activity of rPepA toward various natural proteins

	Substrate / Source								
	Myoglobin		Hemoglobin		Collagen	Elastin	Myofibrillar proteins	BSA	Casein
	Horse Skeletal muscle	Porcine	Human	Bovine blood	Bovine (Achilles)	Bovine (neck)	Bovine	Bovine	Bovine
Enzyme activity (U/ml)	0.47 ± 0.020	1.55 ± 0.054	1.62 ± 0.040	1.52 ± 0.045	0.15 ± 0.030	0.038 ± 0.030	0.35 ± 0.045	0.43 ± 0.019	0.50 ± 0.054
Relative activity (%)	29.1	95.9	100	93.8	9.4	2.4	23.5	29.3	30.9

# The amino acid sequence of myoglobin from *Equus caballus* (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. P68082, 154 a.a.) showed 88% identity (136/154 a.a.) with that from *Bos taurus*. The sequence of hemoglobin alpha- and beta-subunits from *E. caballus* (1QPW\_C, 141 a.a.; 1QPW\_B, 146 a.a.) showed 86% (122/141 a.a.) and 82% (119/144 a.a.) identities with those from *B. taurus* (1FSX\_C, 141 a.a.; 1FSX\_D, 145 a.a.). Means ± SD.

繊維タンパク質の構造とエラスチン, コラーゲンなどの硬質タンパク質による筋細胞外の構造が関与している。前者の構造は熟成によって変化を受けるが, 筋細胞外の構造は内在するエンドペプチダーゼの作用を受けず, 熟成によっても, 変化を受けない。そこで, 機械的に破壊した後にパパインやブロメラインなどの植物由来のプロテアーゼによる軟化が行われている。細菌由来エラスターゼ, パパインおよびブロメラインについてエラスチンに対する活性比較では, エラスターゼ, パパイン, ブロメラインの相対値 (elastin/casein) は0.53, 0.035, 0.045である<sup>7)</sup>。また, メタロプロテアーゼは, 15% NaCl存在下ではelastin/caseinの相対値は5.78と結合組織タンパク質の加水分解に優れるが, 塩非存在下では0.97と同程度となる<sup>8)</sup>。一方, rPepAの相対値(elastin/casein)は0.076であり, パパインやブロメラインと同程度であることが分かった。肉の軟化には, 筋原線維タンパク質の分解も重要であるが, 過剰に分解が進むと肉組織が脆くなり, べたつき感が生じ肉本来の弾力感が損なわれる。*A. oryzae*由来アスパルティックプロテアーゼを中性条件下で作用させると, 筋原線維タンパク質の限定加水分解を行

い, 肉の柔らかさを25-30%改善する<sup>9)</sup>。rPepAもまたpH7.0においても70-80%の残存活性があり, 筋原線維タンパク質の限定加水分解が期待される。本研究では, 筋原線維タンパク質のSDS-PAGEによる加水分解パターンの解析に至っていないが, 今後検討したい。

### 3.2 rPepAの加水分解によって生じるミオグロビン由来ペプチド類の解析

牛肉の購入に際し, 判断基準として食肉の色調があげられる。肉の色は主にミオグロビンの量と酸化状態によるが, 還元状態のミオグロビンは深紅色を示し, 酸化したオキシミオグロビンは好ましい鮮紅色となる。rPepAはミオグロビンやヘモグロビンを限定分解することが予備的な知見で分かっているが<sup>5)</sup>, 加水分解位置の詳細は明らかでない。そこで, 加水分解によって生じたペプチドの配列を解析することで分解位置の推定を行った。

#### 3.2.1 SDS-PAGEによる生成ペプチドの解析

rPepAとミオグロビンを反応し, 得られた分解物をSDS-PAGEに供した (Fig.1 (A))。主要なバンドをPVDF膜に転写後, N末端アミノ酸配列解析を行った結果, 加水分解位置を5か所明らかにできた (Table 2)。

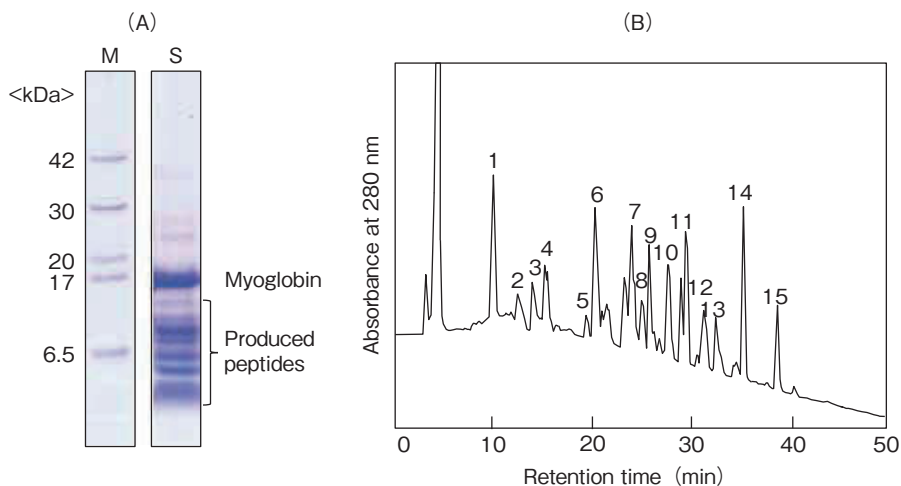


Fig. 1 SDS-PAGE (A) and HPLC (B) analyses of hydrolysate of myoglobin by rPepA





対側に多数存在することが分かった。配列未同定のサンプルが7つあり (Table 3), SDS-PAGEで検出したポリペプチド由来のペプチドも含まれていると思われる。

ミオグロビンに含まれるヘムのまわりには,<sup>29</sup>Leu, <sup>64</sup>His, <sup>68</sup>Val, <sup>93</sup>His, <sup>95</sup>His, <sup>138</sup>Phe, <sup>142</sup>Ile残基が配位している<sup>10)</sup>。rPepAは少なくともこれらの近傍の3か所を加水分解できることから、ヘムの遊離によるミオグロビンの脱色が引き起こされると予想される。*A. niger*由来glutamic peptidaseは、ヘモグロビンの部分分解はHis残基を好んで加水分解し、加水分解物は乳化性を有することが報告されているが、ミオグロビンの加水分解については明らかではない<sup>11)</sup>。rPepAによるミオグロビンの脱色は、サラミやドライエージングハムの色調調整にも利活用可能である。本研究では、rPepAを用いて食肉に含まれるタンパク質について個々に加水分解能を調べたが、それらの混合物や食肉に対する分解様式や遊離ペプチドについて調べることで、食肉加工・熟成工程における熟成の短縮化、呈味性や食感の向上への寄与を明らかにできると考えられる。

#### 4. 要 約

香味や食感に優れた食肉やハム、ソーセージ、ベーコン等の食肉加工品を効率よく製造するためには、「肉の柔らかさ」、「くちどけ」、「うま味」といったおいしさを決める要因を向上しながら熟成期間を短縮化することが重要である。肉質改善法の1つとして酵素処理法があげられる。申請者オリジナルのアスパルティックプロテアーゼは、ミオグロビンに対して限定分解を示す。本研究で

は、同プロテアーゼについて筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解活性やミオグロビンの限定分解機構を調べ、食肉加工への潜在能力を明らかにすることを目的とした。エラスチン／カゼインの相対値を算出すると同プロテアーゼはパパインやブロメラインと同じく結合組織タンパク質に対する活性は低かった。また、ミオグロビン由来加水分解ペプチドのN末端アミノ酸配列解析を行った。同酵素はミオグロビンのヘム近傍の3か所を加水分解し、ヘムの遊離によるミオグロビンの脱色<sup>5)</sup>が引き起こされると予想される。今後、食肉に対する分解様式や遊離ペプチドについて調べることで、食肉加工・熟成工程における熟成の短縮化、呈味性や食感の向上への寄与を明らかにできると考えられる。

#### 文 献

- 1) 味の素株式会社, 特開平05-007476
- 2) 昭和産業株式会社, 特開平05-252911
- 3) エーザイ株式会社, 特開平06-169729
- 4) Flores, M., Toldrá, F. : *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 81~90, 2011.
- 5) Aoki, K., Matsubara, S., Umeda, M., Tachibana, S., Doi, M., Takenaka, S. : *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 1349~1355, 2013.
- 6) Takenaka, S., Umeda, M., Senba, H., Koyama, D., Tanaka, K., Yoshida, K., Doi, M. : *J. Sci. Food Agric.*, **97**, 95~101, 2016.
- 7) Qihe, C., Guoqing, H., Yingchun, J., Hui, N. : *Food Chem.*, **98**, 624~629, 2006.
- 8) Kim, M., Nishiyama, Y., Mura, K., Yokue, C., Arai, S. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **68**, 1533~1540, 2004.
- 9) Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L., Nielsen, P. M. : *Food Sci.*, **67**, 2138~2142, 2002.
- 10) Chu, K., Vojtchovský, J., McMahon, B. H., Sweet, R. M., Berendzen, J., Schlichting, I. : *Nature*, **403**, 921~923, 2000.
- 11) Shi, J., Roos, A., Schouten, O., Zheng, C., Vink, C., Vonk, B., Kliphuis, A., Schaap, A., Edans, L. : *Food Sci.*, **80**, 1202~1208, 2015.

# 乾塩漬ハム中の亜鉛プロトポルフィリンIXの形成様相 と存在形態に関する研究

Studies on the formation and the existence form of zinc protoporphyrin IX  
in dry-cured ham

若松 純一

(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)

Jun-ichi Wakamatsu

(Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)

In order to elucidate the mechanism by which zinc protoporphyrin IX (ZnPP) in nitrite/nitrate free dry-cured meat products, we tried to clarify ZnPP-binding protein in water-extractable ZnPP from Parma ham and to observe the aspect of ZnPP formation in dry-cured ham. It was clarified that ZnPP was bound to hemoglobin and myoglobin in Parma ham water-extract. When the aspect of ZnPP formation was observed in dry-cured ham during processing, the strong red fluorescence was emitted at the inside but the formation of ZnPP was not occurred in the peripheral part due to oxygen. In the inner area of the cross-section, the strong ring-like fluorescence of ZnPP was formed compared to the center area of ham. According to the microscopic observation, there were no difference of ZnPP distribution between the ring and center areas in ham section and the formation speed in the ring area seemed to be faster than that in the center area. However, these results would be a useful clue to elucidate the mechanisms by which ZnPP is formed in meat products without the addition of nitrite/nitrate.

## 1. 目 的

イタリアの伝統的な生ハムの1つであるパルマハム (*Prosciutto di Parma*) は、硝酸塩や亜硝酸塩などの発色剤を使用していないにもかかわらず、鮮やかな色調をしている。この色調は発色剤を用いた食肉製品に存在するニトロシルミオグロビンによるものではなく、亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP) が多量に形成されて<sup>1,2)</sup>、パルマハムの特徴的な色調に寄与していることが明らかにされた。発色剤は色調だけでなく、風味形成やボツリヌス菌の増殖抑制など多彩な機能を有して

いるが、酸性条件下でアミンやアミド類と反応して発がん性物質を形成することから、発色剤を嫌う消費者が存在する。ZnPPの形成は発色剤を使用しない無塩漬食肉製品の色調改善に期待できる。

ZnPPの前駆物質に関する研究では、ZnPPはへんに配位している鉄が亜鉛に置換した構造であるため、食肉内に多量に存在するミオグロビン内のへんがZnPPの前駆物質である<sup>3,4)</sup>とする「へん由来説」が多い。置換反応にはフェロケラターゼ (FECH) が関与するという報告があるものの、ミオグロビンよりも3倍程度分子量の大きいFECHが、ミオグロビン内部に位置するへんの鉄



を亜鉛に置換する触媒作用を物理的に可能かは疑わしい。さらに、FECHは哺乳動物ではミトコンドリア内膜に結合するため、作用するにはミオグロビンがミトコンドリア内に侵入してFECHに近づくか、FECHがミトコンドリア内から遊離する必要がある。このようにヘム由来説は物理的な矛盾点が多い。

一方、我々はヘムからではなく、ヘム生合成系の前駆物質から形成すると報告した<sup>5)</sup>。また、パルマハム内のZnPPは水溶性と不溶性のものが存在し、なんらかのタンパク質と結合して存在しているが、水溶性ZnPPは分子量からはミオグロビンではないようで(未発表データ)、結合タンパク質を明らかにすれば形成場所の推測ができるかもしれない。さらに、ZnPPの蛍光による局在検出技術を確認しているため、製造中のZnPP分布相を明らかにすれば、ZnPPがどの時期にどこで作られるかを視覚的に明らかにできるかもしれない。

そこで本研究では、ZnPP形成機構を解明するため、水溶性のZnPPに着目してZnPP結合タンパク質の解明と、乾塩漬ハム製造中のZnPP形成様相を明らかにすることにした。

## 2. 方法

### 2.1 パルマハム水抽出物の調製と尿素ゲル電気泳動による分離

市販のパルマハム原木から切り出して細切したものに、6倍量の純水を加えて、ホモジナイズした。懸濁液を遠心&ろ過して、ろ液をパルマハム水抽出物とした。尿素ゲル電気泳動は、Laemmliの緩衝液系を用いて、0.1% SDSの代わりに4 M尿素を加えたゲルを調製した。なお、泳動緩衝液中のSDSも加えなかった。電気泳動後、ただちに暗室内で、ガラス板から外さないで、420nm付近の光を透過するバンドパスフィルターを通して紫

色LED(中心波長400nm)を照射して、600nm付近の光を透過するバンドパスフィルターを装着したデジタルカメラでZnPPの蛍光を撮影した。その後、ただちにCBB染色を行い、タンパク質の染色を行った。

### 2.2 分離した水溶性ZnPP結合タンパク質の同定

パルマハム水抽出物を尿素ゲル電気泳動で分離したバンドを回収したもの、またはパルマハム水抽出物を各種クロマトグラフィにて分離したものをSDS-PAGEに供試して、PVDF膜に転写したものをエドマン分解によりN末端のアミノ酸配列を解析した。さらに、エドマン分解により同定したタンパク質に対する抗体を用いて、尿素電気泳動で分離したものをウェスタンブロットティングによりPVDF膜に転写して化学発光法で検出した。

### 2.3 小型乾塩漬ハムの製造

豚大腿二頭筋から100-150 gの肉塊を切り出し、食塩を肉重量の3%加えて混ぜ、真空包装して3日間乾塩漬を行った。セロハンケーシング(折径6 cm)に充填して結紮し、4℃で1週間吊りした。その後、20℃で8時間加温後、7℃に温度を下げた。その後、2日に1℃ずつ、2週間かけて14℃まで温度を上げ、そのまま14℃で保持した。なお、乾燥・熟成期間中の湿度は75%にした。製造期間中に適宜サンプリングと凍結切片のブロックの作製を行い、実験まで凍結保存した(-35℃)。

### 2.4 小型乾塩漬ハム中のZnPPの分布観察

サンプリングしたパルマハムの断面を、上述の尿素ゲル電気泳動と同様にZnPPの自家蛍光を観察・撮影した。また、微細局在の観察では、凍結切片を作製後、共焦点レーザー顕微鏡を用いて、405nm Blue diodeレーザーにより励起して590nmで観察した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 水抽出可能なZnPP結合タンパク質の分離と同定

市販の3本のパルマハムの水抽出物を尿素ゲル電気泳動に供したところ、いずれの個体においても、同様に7本の赤色の蛍光バンドが観察された (Fig. 1)。しかし、CBB染色像では、蛍光バンドの位置には多くの他のタンパク質が共存していた。また、ゲル下端の泳動先端のバンド (バンド7) は、試薬のZnPPと同じ移動度を示したため、遊離のZnPPであることが示されたが、パルマハム中に遊離で存在しているか、4 M尿素により外れたかは明らかにできなかった。このため、中央部で分離された6本の蛍光バンド (バンド1-6) を以降の実験で検討した。

尿素ゲル電気泳動で分離したバンドを、さらにSDS-PAGEで分離したものをPVDF膜に転写してエドマン分解によるN末端アミノ酸配列を解析したところ、バンド4 (Fig. 1) のみがミオグロビンと同定された。これは夾雑タンパク質の影響であると考えられたため、各種クロマトグラフィ

により分離して同様にN末端アミノ酸配列を解析したところ、バンド1 (Fig. 1) はヘモグロビン $\alpha$ サブユニットと同定された。

次に、パルマハムの水抽出物を尿素ゲル電気泳動で分離したものをPVDF膜に転写して、抗ミオグロビン抗体ならびに抗ヘモグロビン抗体を用いてウェスタンブロッティングにより検出したところ、ZnPP由来の6本の蛍光バンドの上3本が、抗ヘモグロビン抗体に、下3本が抗ミオグロビン抗体と陽性反応を示した (Fig. 2, PHE)。一方、新鮮な豚肉水抽出物を同様に分離して同様に反応させたところ、いずれも一番上のバンドのみが陽性反応を示し (Fig. 2, PE), 残り2本は各々の分解産物であることが推察され、大部分の水溶性ZnPPはヘモグロビンとミオグロビンと結合して存在することが示唆された。

#### 3.2 小型乾塩漬ハム中におけるZnPPの分布

小型の乾塩漬ハムを製造して、製造中に経時的にサンプリングを行い、断面におけるZnPPの分布を観察した。蛍光は経時的に強くなり、外縁部とその内側にリング状の強い蛍光が観察された (Fig. 3)。これは、酸素がZnPP形成を阻害する

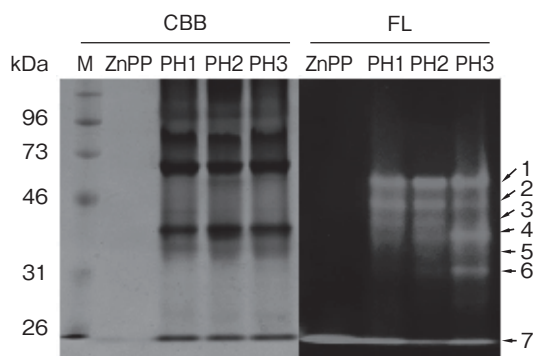


Fig. 1 Urea-PAGE image of three Parma ham water-extracts (PH1-3). Immediately after electrophoresis the fluorescence image of the gel was taken (FL) and then the gel was stain with CBB (CBB). ZnPP : ZnPP reagent was applied. M : Marker.

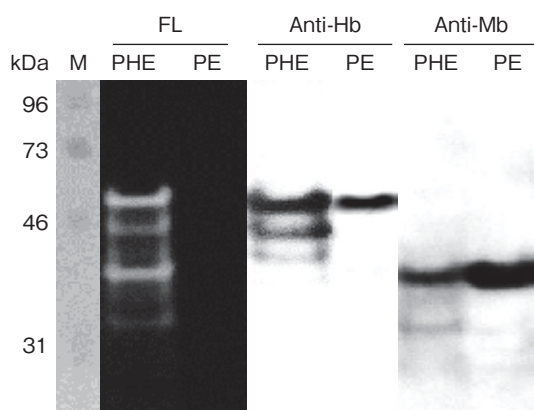


Fig. 2 Urea-PAGE fluorescence and western-blotting images. Anti-hemoglobin (Hb) and anti-myoglobin (Mb) antibodies were used in western-blotting. PHE : Parma ham water extract, PE : pork water-extract, M : Marker.

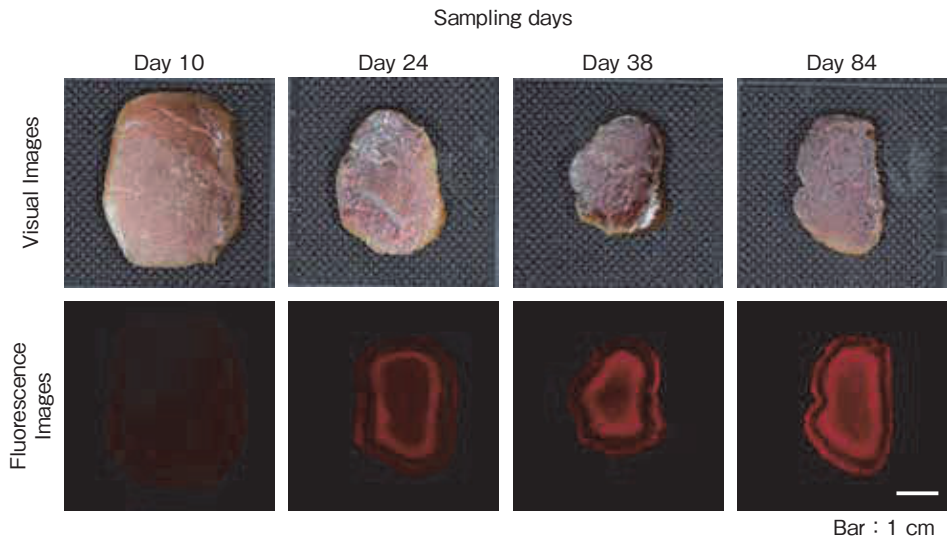


Fig. 3 Changes on the aspect of appearance and fluorescence in the cross section of dry-cured ham during processing.

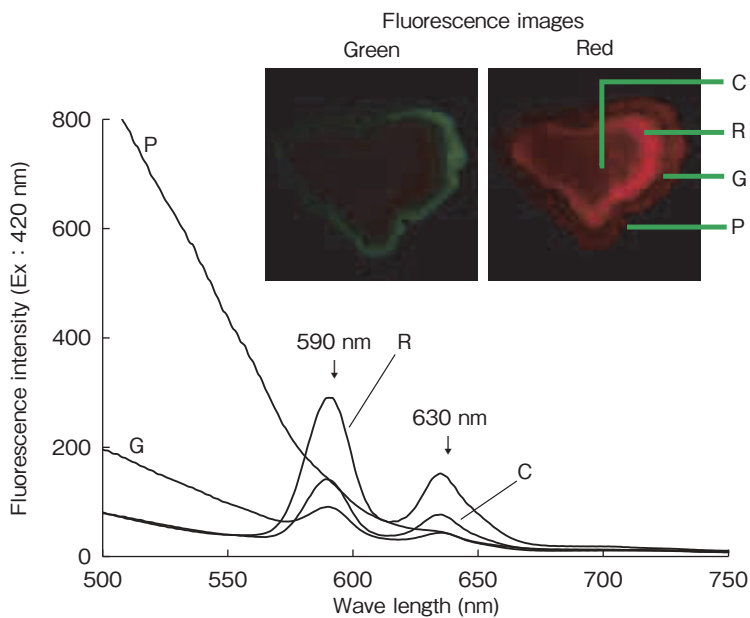


Fig. 4 Green and red fluorescence images and fluorescence spectra at each area. C : center area, R : ring-like area, G : gap area, P : peripheral area.

というこれまでの報告<sup>6)</sup>と合致した。外縁部の蛍光は目視によると黄緑色であったことから、各部分における蛍光スペクトルを観察したところ、外縁部だけ異なる蛍光スペクトルがみられ、緑色のフィルターを介して蛍光像を観察すると、強い蛍

光が観察された (Fig. 4)。代表的な低温細菌である *Pseudomonas* 属が産生するピオベルジンと色が類似していたこと<sup>7)</sup> から、ZnPP由来ではないことが示された。一方、他の部分はZnPP特有の590nmと630nmにピークを有する蛍光スペクト

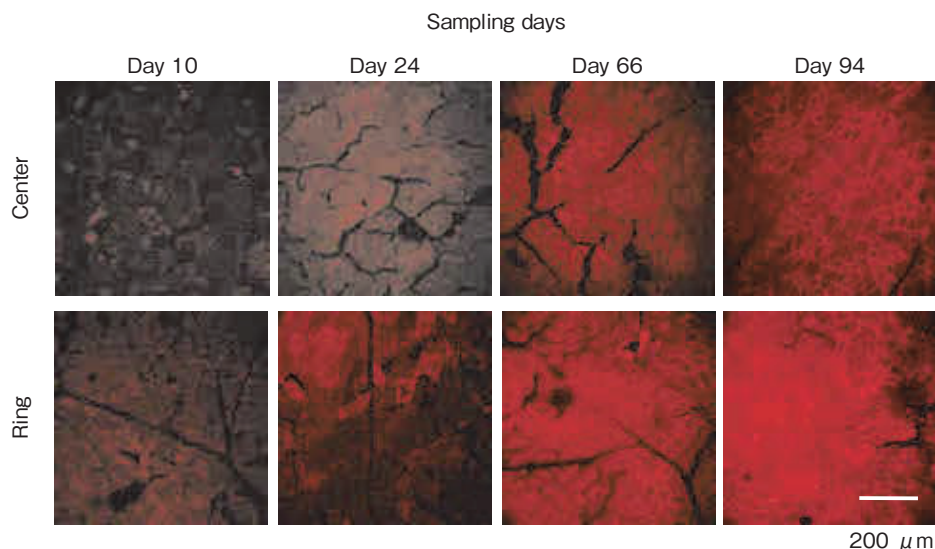


Fig. 5 Changes on the microscopic aspect of red fluorescence in the center and ring areas of ham during processing.

ルが観察された。

次に、リング部と中心部で蛍光の強さ、すなわちZnPP形成量が異なる原因を検討するため、凍結切片を作製して、ZnPPの分布の微細観察を行った。断面の蛍光と同様に、製造に伴い、筋線維におけるZnPP由来の蛍光は強くなり、断面で蛍光の強かったリング部のほうが強い蛍光が観察された (Fig. 5)。しかし、ZnPPの分布様相については、リング部と中心部では違いが認められず、形成速度の違いによるものと思われたが、その原因を明らかにすることはできなかった。

#### 4. 要 約

発色剤無添加の食肉製品中のZnPP形成機構を解明するため、水溶性のZnPPに着目してZnPP結合タンパク質の解明と、乾塩漬ハム製造中のZnPP形成様相を明らかにすることにした。水抽出可能なZnPPは、主にヘモグロビンとミオグロビンと結合して存在することが明らかにされた。一方、小型の乾塩漬ハムを製造して、ZnPPの形

成様相を経時的に観察したところ、製品の内部にZnPPの強い蛍光が観察され、外縁部には酸素の影響でZnPPの形成が認められなかった。しかし、内部のZnPPの蛍光は中心部より外側にリング状の強い蛍光が観察されたが、形成速度の違いによると考えられ、その原因を明らかにすることはできなかった。

#### 文 献

- 1) Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.*, **67**, 95~100, 2004.
- 2) Wakamatsu, J., Odagiri, H., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.*, **82**, 139~142, 2009.
- 3) Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari, Y., Kitajima, S. : *Biochemistry*, **46**, 15054~15061, 2007.
- 4) Paganelli, M. O., Grossi, A. B., Dores-Silva, P. R., Borges, J. C., Cardoso, D. R., Skibsted, L. H. : *Food Chem.*, **210**, 491~499, 2016.
- 5) Wakamatsu, J., Okui, J., Hayashi, N., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.*, **77**, 580~586, 2007.
- 6) Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.*, **68**, 313~317, 2004.
- 7) Meyer, J. : *Arch. Microbiol.*, **174**, 135~142, 2000.

## ドライエイジングビーフの香気に及ぼす真菌の影響

Effect of mold on the aroma of dry aging beef

中川 麻衣・小室 春菜・中島 誠人・猪口 由美・高鳥 浩介\*

(一般社団法人食肉科学技術研究所, \*NPO法人カビ相談センター)

Mai Nakagawa, Haruna Komuro, Yoshito Nakashima, Yumi Inoguchi and Kousuke Takatori\*

(Japan Meat Science & Technology Institute, \*Center for fungal Consultation Japan)

In this study, we attempted to effect of molds on aging-aroma of dry-aging beef. The time course of aging-aroma and molds during the aging period was investigated. Aging-aroma increased after 20 days of aging. The psychrophilic molds *Thamnidium elegans* and *Mucor strictus* were detected in the sample. These increased as aging period. When the isolated *M.strictus* was incubated at 5°C for 20 days, a strong nutty-flavor similar to that of aging-aroma was generated from the colony. It was possible that the aroma produced by molds was added to meat as aging-aroma. In addition, *T.elegans* and *M.strictus* has the enzyme productivity. These were confirmed to be able to proceed even under low temperature by aging for 15 days or more. The fact that the time required for enzyme production by the molds coincided with the time until the appearance of the aging-aroma showed that the enzymatic reaction might also influence aging-aroma. These results suggest that aging-aroma is related to enzyme productivity of molds and the aroma produced by *M.strictus*. In particular, it's thought probability that of *M.strictus* had a great effect on aging-aroma. There is a possibility that aging-aroma can be efficiently give by controlling molds.

### 1. 目 的

食肉の熟成による効果には、軟化、呈味の向上および独特の香りの発現など食肉の品質特性の変化がある。近年、これらの品質特性に多様性をもたらし、その食肉に付加価値を与える熟成方法として、ドライエイジング法が盛んに行われている。ドライエイジング法は、温度および湿度を一定に保ち、空気を循環させた熟成庫内において、フィルム等に包装せず食肉を空気と接することができる条件下で熟成させる方法であり、世界では

古くから取り組まれている。この熟成方法は、食肉が空気と接することができる点において、フィルム包装により空気と食肉を遮断するウェットエイジング法と区別される。

熟成は呈味の向上に必要不可欠であり、それには食肉内在性の酵素による遊離のアミノ酸やペプチドの増加の寄与が明らかにされているが<sup>1)</sup>、これら以外の物質の関与が示唆されており<sup>2)</sup>、熟成期間中に起こる化学的あるいは生物的反応の全容解明には至っていない。

一方、熟成によって発現する香り（熟成香）に



関しては、微生物の影響が示されており、*Brochothrix thermosphacta*がミルク臭に似た生鮮香気を発現するとの報告がある<sup>3)</sup>。ドライエイジング法では、熟成された牛肉（ドライエイジングビーフ）に、特徴的な香りとされるナッツ臭様の熟成香が発現することが、経験的に知られている。しかし、その発現メカニズムについては、ほとんど研究が進んでいない。ドライエイジング法では、温度、湿度および気流を管理することに加えて、真菌を利用する場合がある。真菌はチーズやサラミの製造に利用されており、その香りの発現の因子となっている<sup>4,5)</sup>。ドライエイジング法においても、真菌が熟成香の発現に関与する可能性が報告されているが、特定の真菌との関連性は明確にされていない<sup>6)</sup>。熟成香の生成に真菌が与える影響や真菌による熟成の指標を特定することができれば、商品価値や安全性の高い熟成肉を効率的に製造することが可能となり、食肉業界に与える経済的ならびに衛生的なメリットは大きいと考えられる。本課題では、ドライエイジング法により長期熟成を施した牛肉を用いて、菌叢の変化ならびに菌叢より得られた真菌の特性のほか、熟成に伴う食肉の水分含量および水分活性値の変化ならびにpHを調べた。さらに、熟成中の香りの経時的変化を官能試験によって評価し、ドライエイジングがもたらす熟成香と真菌の関連性を解明することとした。

## 2. 方法

### 2.1 試験材料

供試料には国産交雑牛（と畜月齢27ヶ月）の3頭を用いた。と畜から3日目にサーロインを採取後厚さ9 cmに8等分した。温度を4℃以下、相対湿度を75%に調節した熟成庫内に、試料を常に送風があたるように静置した。ドライエイジング法では一般的に食肉表面に付着した微生物等を取

り除くトリミング作業を行う。試料はトリミング作業によって、取り除いた表面部分と可食部分に分割した。熟成0, 5, 10, 14, 20, 30, 40および50日目の試料は、表面より2 cmまでをトリミングし、それを表面試料として微生物試験に供した。一方、表面試料を除いた可食部分の胸最長筋をトリミング後試料として微生物試験、理化学試験および官能試験に供した。官能試験用の試料は真空包装し、試験まで-30℃で凍結保管した。試験前日に2℃の冷蔵庫に移し、一晩かけて解凍した後、官能試験に供した。

### 2.2 理化学試験

トリミング後試料（胸最長筋）において、水分活性の分析には3 cm幅に切り出したもの、pHおよび水分含量の分析にはフードカッター（GRANDMIX GM200, Retsch）で均一化したものを試料とした。水分活性は電気抵抗法（AW-ラボ2, ROTRONIC）、pH測定はガラス電極（PH-METER F52, 堀場製作所）を用いて測定、水分は常圧加熱乾燥法により測定した。

### 2.3 官能試験による熟成香評価

試料を4 cm×4 cm×0.8 cmに整形し230℃に設定したホットプレート（ATF-500, アサヒ理化製作所）上で両面を60秒ずつ加熱調理した。調理後の試料をただちに当研究所所属の訓練された分析型パネル5名により評価した。

熟成香評価の方法は特性プロファイル法を用いた。同一個体の熟成0日目をコントロールとし、熟成香（ナッツ臭）の強度を-3点～+3点の7段階で評価した。

### 2.4 微生物試験

試料を食品衛生検査指針に準じて一般生菌数、乳酸菌数、真菌数を測定した。*B.thermosphacta*数はISO13722：1996に準じて測定した。真菌の培養条件は25℃7日間およびドライエイジング法熟成条件と同じ4℃以下を保つため3℃15日間と

した。得られた真菌は同定後、追加試験としてポテトデキストロース寒天培地に接種し5℃, 10℃, 15℃, 20℃の4温度帯で40日間培養した。また、真菌の生育至適温度を確認するとともに酵素産生性確認の試験に供した。リパーゼ産生用培地は、Cz寒天培地にCaCl<sub>2</sub>・H<sub>2</sub>Oとクロラムフェニコールを添加し加圧滅菌後、Tween20を添加し平板としたもの、プロテアーゼ産生用培地は、寒天培地にSkim Milkとクロラムフェニコールを添加し加圧滅菌後平板にしたものとし、それぞれに得られた真菌を接種し生育至適確認の培養条件に3℃, 25℃を加えた6温度帯で酵素産生性を判定した。なお、微生物の菌数は試料1g当たりのコロニー形成数で表した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 理化学的特性と微生物試験結果

理化学試験の結果をTable 1に示す。水分含量は熟成開始時には61.9%であったものが50日目には38.8%にまで減少した。この結果は、ドライエイジング法では熟成庫内の空気と触れられる条件にあることから、熟成期間中に乾燥が進んだことを示している。しかしながら水分活性値は熟成期間中に変動がなかった。微生物の増殖できる環境を維持していたにもかかわらず後述する生菌数・乳酸菌は検出されなかった。pHは熟成期間中に0.1ユニット増加した。

微生物試験の結果をTable 2に示す。表面試料は40日目までは多少の増減はあるものの安定して推移していたが、50日目に乳酸菌数・*B.*

*thermosphacta*はワンオーダー上昇した。一方、トリミング後試料(胸最長筋)は生菌数・乳酸菌・*B.thermosphacta*いずれも検出されず、可食部として良好な状態を熟成期間中維持していた。

#### 3.2 熟成期間中の熟成香の変化

官能試験によって熟成期間中の熟成香の強さの変化を調べた(Fig. 1)。その結果熟成香は熟成5日目には香りが感知され、熟成期間中に連動して増強していく傾向が認められた。特に20日目以降は15日目までと比較して顕著に増強が確認された。以上の結果より一定の期間を経過後熟成香は熟成期間に依存して増強していることが示唆された。

#### 3.3 ドライエイジングビーフより検出された真菌

今回のドライエイジングの条件下において熟成日数が進むと、試料表面には明らかな真菌の発生が観察された。表面試料を一部採取して25℃で培養したところ、*Penicillium* spp.が5日目より検出され、その数は増減しながらも熟成期間中検出され続けた。3℃培養では、5日目から*Thamnidium.elegans*と*Mucor.strictus*の2種類の真菌が検出され、これらは熟成日数の経過とともに増加した。両者の生育至適温度は、*T.elegans*が5℃および15℃、*M.strictus*が15℃および20℃であった。両者は好冷性であるが*T.elegans*の生育至適温度は*M.strictus*と比べて低温にある傾向がみられた。

次に*T.elegans*および*M.strictus*に着目し、表面試料について熟成期間の経過に伴う菌数の変化を

Table 1 Changes in water, pH and water activity of beef during dry-aging.

		dry-aging periods (day)							
		0	5	10	15	20	30	40	50
trimmed meat	water (%)	61.9	61.9	57.1	54.2	44.5	41.2	36.7	38.8
	pH	5.54	5.55	5.54	5.55	5.53	5.54	5.58	5.64
	Aw	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97	0.97

Values show the mean of three samples.

Table 2 Changes in microorganisms of beef during dry-aging.

		dry-aging periods (day)							
		0	5	10	15	20	30	40	50
meat surface	aerobic bacteria (cfu/g)	<300	1.5.E+04	6.2.E+04	8.5.E+04	6.3.E+04	2.2.E+05	5.2.E+04	2.5.E+05
	Lactic acid bacteria (cfu/g)	<300	5.3.E+03	5.6.E+04	1.5.E+04	3.4.E+04	6.7.E+04	2.4.E+04	6.8.E+05
	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (cfu/g)	<100	1.6.E+03	7.0.E+04	9.5.E+04	9.3.E+04	1.5.E+04	6.4.E+03	2.7.E+05
trimmed meat	aerobic bacteria (cfu/g)	<300	<300	<300	<300	<300	<300	<300	<300
	Lactic acid bacteria (cfu/g)	<300	<300	<300	<300	<300	<300	<300	<300
	<i>Brochothrix thermosphacta</i> (cfu/g)	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100

Values show the mean of three samples.

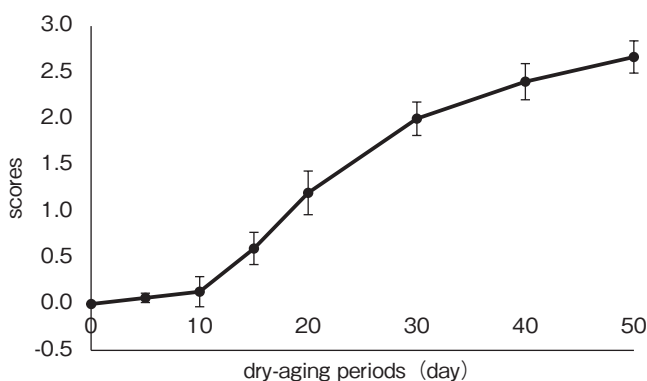


Fig. 1 Changes in the sensory scores of beef during dry-aging. The strength of aging aroma of dry-aging beef (n=3) are estimated by sensory evaluations (mean ± standard error).

比較したところ (Table 3, Fig. 2), 全熟成期間を通して *T.elegans* の菌数が *M.strictus* より高かった。この結果は, *T.elegans* は *M.strictus* と比べて生育至適温度が熟成条件に近いことによると考えられる。

*T.elegans* はドライエイジングビーフの肉質向上に有益な真菌として報告されている。一方, *M.strictus* については, 生育至適温度ではない 5℃ で培養すると 20 日間で形成された集落より熟成香 (ナッツ臭) が発現した。この 20 日間は, 先の官能試験において, 熟成香が顕著となった日数と一致していた。すなわち, ドライエイジング

ビーフにおける熟成香の発現には, *M.strictus* が関与しており, これが食肉表面で発育し食肉に熟成香を付与するという発現機構の存在が示唆された。この *M.strictus* による熟成香は, 生育至適温度での培養では確認できないことは非常に興味深い。

トリミング後試料 (胸最長筋) では, 25℃ 培養で全熟成期間中真菌は検出されなかった。3℃ 培養では 15, 30 および 40 日熟成において *T.elegans* と *M.strictus* が検出されたが, 50 日熟成のトリミング後試料からは再び検出されなかった。この結果は, 熟成期間中に真菌が試料の表面から内部に



Table 3 Comparison of *Mucor* and *Thamnidium* in meat surface (incubation at 3°C)

		dry-aging periods (day)							
		0	5	10	15	20	30	40	50
untrimmed meat (incubation at 3°C)	<i>Thamnidium</i> (cfu/g)	<10	1.E+03	3.E+03	7.E+04	2.E+05	1.E+06	4.E+06	7.E+06
	<i>Mucor</i> (cfu/g)	<10	8.E+01	1.E+02	2.E+05	9.E+05	3.E+05	6.E+05	6.E+05

Values show the mean of three samples.

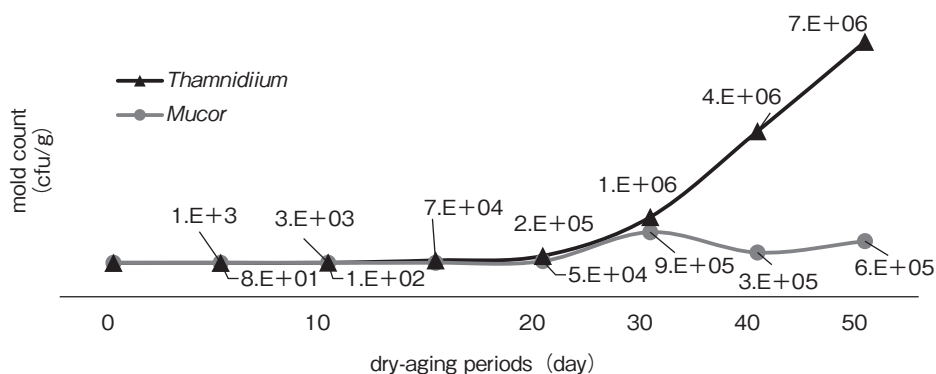


Fig. 2 Changes in mold detected by incubation at 3°C on the surface of dry-aging beef (n=3)

侵入した可能性が考えられるが明らかでない。

### 3.4 環境中に存在する真菌

表面試料では25°C培養と3°C培養で真菌の種類と検出量に大きく差があった。25°C培養では *Penicillium* spp.が一定量検出された。3°C培養では *T.elegans*と *M.strictus*が熟成日数に連動して増加し *Penicillium* spp.は検出されなかった。検出された *Penicillium* spp.は環境中の浮遊真菌が付着したものの熟成庫内の温度環境が適していなかったため試料表面上では発育しなかったと考えられる。低温による温度管理は熟成に不要な真菌の増殖を抑制できている可能性が高いと思われた。しかしながら *Penicillium* spp.の一部は低温でも長期間培養することにより発育するため<sup>7)</sup>、熟成日数の長さによっては少なからず影響を与える可能性も示された。

### 3.5 真菌の酵素産生性の特定

*T.elegans*と *M.strictus*のリパーゼ産生性、プロテアーゼ産生性を確認した結果をFig. 3, Fig. 4に示す。

両者のプロテアーゼ産生性は3°C培養で培養開始直後から非常に強い反応を示した。40日後には集落の発育とともに培地上の基質は完全に分解された。リパーゼ産生性は両者ともに至適温度帯以外では反応が弱かった。3°C培養では陽性反応を示すまでに20日以上培養期間を必要とした。これまでも低温下での酵素産生性は活発でないため肉に与える影響は少ない<sup>8)</sup>との報告がされている。しかし、酵素産生性が進む速度と熟成香の発現が重なることから長期間の熟成においては酵素がなんらかの熟成香付与に関連する可能性も示唆された。

## 4. 要 約

本研究では、ドライエイジングビーフの熟成香に真菌が及ぼす影響を検討した。熟成期間中における香りと真菌の経時的変化を調査した。

試料は熟成20日経過後熟成香が上昇した。試料からは好冷性真菌である *T.elegans*と *M.strictus*が検出された。これらは熟成が進むにつれ増加して

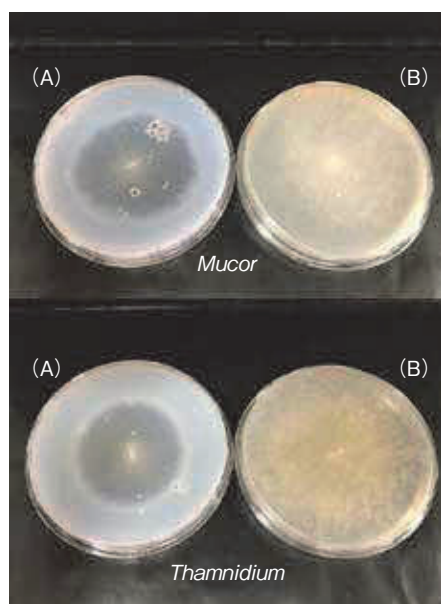


Fig. 3 Proteolytic activity of incubation at 3°C, (A) incubated for 14days (B) incubated for 40days.

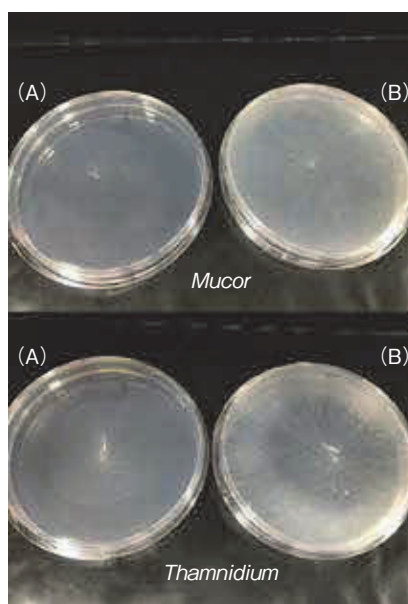


Fig. 4 Lipase activity of incubation at 3°C, (A) incubated for 14days (B) incubated for 40days.

いった。分離された*M.strictus*を5°Cで20日間培養したところ、熟成香と同様の強いナッツ臭が集落より発生した。真菌が熟成香を産生し、それを食肉に付与している可能性が考えられた。また、*T.elegans*と*M.strictus*は酵素産生性を有していた。これらは15日間以上の熟成を行うことにより低温下でも反応が進むことが確認できた。真菌の酵素産生に必要な期間が熟成香の発現に至るまでの期間と一致することにより酵素反応も熟成香に影響を与えている可能性が示された。

以上より熟成香は真菌の酵素産生性と*M.strictus*の産生する香りが関係していることが示唆された。特に*M.strictus*の存在は熟成香の付与に大きく影響していると思われた。今後、真菌をコントロールすることにより熟成香を効率的に付与できる可能性が示された。

#### 文 献

- 1) 西村敏英：日本味と匂学会誌，8(2)，161～168，2001.
- 2) 市村さやか，高橋真佐郎，中村幸信，吉田由香，猪口由美，服部昭仁：平成30年度食肉に関する助成研究成果報告書，37，54～63，2018.
- 3) 沖谷明紘：日本食品工業学会誌，40(7)，535～541，1993.
- 4) 川端史郎：*Milk Science*，59(3)，303～307，2010.
- 5) 沼田正寛，富家崇弘，橋本小由利，中村豊郎：日畜会報，59(1)，12～22，1988.
- 6) 安里直和，下地秀作，津嘉山勤子，大城隼人，花ヶ崎敬資，荷川取秀樹：沖縄県畜産研究センター研究報告，55，9～12，2017.
- 7) 諸角聖，藤川浩，和宇慶朝昭，千葉隆司：東京健安研七年報，55，3～12，2004.
- 8) A. W. KOTULA, S. G. CAMPANO, D. M. KINSMAN：*Journal of Food Protection*，45, No.13, 1242～1244，1982.

## 枝肉の3Dグラフィック化システムの製作

Development of a system for rendering 3D computer graphics of meat carcasses

本山 三知代・渡邊 源哉・中島 郁世・佐々木 啓介

(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)

Michiyo Motoyama, Genya Watanabe, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

With the recent improvement of computer performance, three-dimensional (3D) graphic that visually expresses objects with a three-dimensional feeling on a two-dimensional monitor has become our familiar technology. If it becomes possible to create 3D graphics for meat carcasses, it will be possible to digitize information on the carcass shape and appearance that are not currently evaluated. 3D graphics also enable us to easily check more realistic carcasses from 360° around anywhere on portable devices such as smartphones with combining ICT technology, which will lead to the creation of new value in meat production and distribution.

We had previously developed a basic technology for rendering 3D graphics of carcasses. In this research, a prototype device for carrying this basic technology to practical use was designed, manufactured and tested.

This prototype device was a simultaneous releasing system controlled by a note PC, with twenty GigE Vision cameras powered by an ethernet switching hub. With this device, it became possible to acquire 3D data without stopping the carcasses proceeding the production line. Through trials on site, we were able to clarify the camera and lens specifications, shutter speed, camera placement, lighting, and other appropriate conditions for rendering sharply-defined 3D carcasses without blind angle. The obtained 3D graphic made it possible to measure the carcass cross-sectional shape, which was difficult to digitize before.

This research revealed the hardware and software that are necessary for the practical machine. In the future we will add cameras to the prototype to develop a practical machine, aiming to acquire 3D carcass data constantly.

### 1. 目 的

近年のコンピュータの性能向上により、物体や空間を二次元のモニタ上に奥行き感（立体感）を持って視覚表現する三次元（3D）グラフィック技術は、さまざまなゲームやデジタル映像など

我々の身近なものとなり、その作製と表示のための技術進歩と低価格化が目覚ましい。

枝肉についても3Dグラフィックが作製可能になれば、現在は枝肉の価格形成に活用されていない立体形態や外観の情報を新たに数値化できるようになるだけでなく、ICT技術と組み合わせるこ

とでスマートフォン等でよりリアルな枝肉を確認することが簡単に可能になり、新しい価値の創造に結び付くと考えられる。

例えば、枝肉3Dグラフィックは、生産者が食肉センターに赴くことなく農場に居ながらにしてスマートフォン等のインターネット端末で枝肉を任意の方向から確認することを可能にするため、省力化・家畜防疫に貢献するだけでなく、枝肉のオンライン取引等にも活用できる (Fig. 1)。また、3Dグラフィックから枝肉の任意の部分の体積や断面積が求められるため、現行の格付制度において目視評価されている「肋張り」や「均称」、部分肉構成等の立体形態が、客観的に数値化できるようになる。さらに、枝肉形態が精度良く計測できるので、整形やカットの自動化への貢献や、

価値の高い枝肉形態を持った家畜の改良や飼養法改善にも役に立つと考えられる。このような枝肉形態や外観に関する新しい数値情報の蓄積は、ビッグデータの形成・活用を促し、将来的には枝肉の写真1枚から、さまざまな品質が分かるようになり、ニーズに応じた製品のオンデマンド供給が可能な社会 (Society 5.0) の実現に貢献する。

申請者らはこれまでの研究により、枝肉の3Dグラフィックを作製するための基盤技術を開発したことから、本研究では当該基盤技術を実用化に繋げるために、1. プロトタイプ装置製作、2. 実際の現場での試用、3. 得られた3Dグラフィックの精度検証、により実用機に必要な要件を明らかにし、装置を最適化することを目的とした。



Fig. 1 New values from the use of carcass 3D graphics

## 2. 方 法

申請者らが開発した枝肉3Dグラフィック製作の基盤技術は、写真計測に用いられる手法であるStructure from Motion法を枝肉に応用したものである<sup>1)</sup>。本法は、異なる方向から撮影した複数の写真から抽出した同じ特徴点について、画像間の対応関係により対象物の三次元座標データを計測する技術である。

本基盤技術の実用化には、枝肉生産ラインの流れに干渉することなく枝肉周囲から複数の画像を同時撮影可能なシステムを製作する必要があり、そのプロトタイプを構築した。

### 2.1 プロトタイプシステムの具体的構成

#### 2.1.1 カメラ

産業用カメラの規格にはさまざまあるが、申請者らは過去に実施した別の研究において食肉センターの場所依存的にノイズの影響を受け計測に問題が出た経験があることから、想定される電気的ノイズを考慮して、ノイズに強い規格であるGigEを採用した。本規格では、LANケーブル経由でカメラに給電も可能で配線が簡単になることに加え、生産ライン近傍は水濡れの恐れからパソコンを遠隔に設置する場合でもシグナルが減衰し難い利点がある。

また、これまでの研究から、3Dグラフィックの完成精度には画像のピクセルサイズが大きいこと(2 $\mu$ m $\times$ 2 $\mu$ m以上)が重要であることが分かっている。家庭用コンパクトデジタルカメラなどの民生品カメラは、記録画素数の高い画像が安価に得られる長所がある一方、ピクセルサイズが小さく3Dグラフィックの精度が悪くなる傾向があるため、本研究ではピクセルサイズの大きい産業用カメラを中心に、枝肉の3Dグラフィック化に相当と考えられた、記録画素数が約3Mbのカラー画像が撮影可能な機種(3社5種類)より選

定した。

#### 2.1.2 レンズ

写真のボケは3Dグラフィックの精度の悪化に直結することが分かっており、被写界深度が深くピントの合いやすいレンズを検討した。また、枝肉は生産ラインを動いておりブレやすいため、シャッタースピードが速くても明るい画像が撮影可能な、瞳の大きいレンズであることも条件とした。食肉センターの生産ライン周囲には空間的余裕が一般的にないことから、枝肉近傍からの撮影を可能にする広角レンズを中心に2社6種類を検討した。

#### 2.1.3 カメラ支持フレーム

枝肉の動線に干渉しない位置(枝肉の下方)に、枝肉を中心とする環状のフレームを塩ビ管で作製し、雲台を介してカメラ20台を設置した。

#### 2.1.4 ハブ

GigEカメラにLANケーブル経由で給電可能なPower over Ethernet (PoE) ハブで、サイズの大きい画像データの通信に適切なジャンボフレームに対応した1ギガビットハブを採用した。

#### 2.1.5 コンピュータ

画像処理が高速に行えるグラフィックチップを備え、現場への持ち運びが便利なノート型パソコンを準備した。

#### 2.1.6 ソフトウェア

枝肉生産ラインの流れに干渉せず3D計測を行うには、枝肉を静止させなくとも計測を瞬時に完了できる必要があるため、パソコンから全カメラに同時シャッターの信号を送り、撮影した画像を取り込むためのソフトウェア(Character User Interface)を準備した。また、カメラのシャッター速度とゲインの調整には、カメラ付属のソフトウェアを用いた。

## 2.2 現地検討

実用機に必要な要件を明らかにするために、製



作したプロトタイプ装置を実際の食肉センターにおいて試用した。計測対象として、剥皮後に背割りした、奇形や瑕疵のない豚枝肉(77.5kg)を用いた。左右の半丸(正中線に沿って左右に分割した枝肉)を、腹腔を内側に向けてハンガーの腕に吊り下げ、ハンガーを介してレールに吊り下げた。

枝肉生産ラインの速度が速い場合、ブレのない写真を得るためには速いシャッタースピードが必要になるため照明が明るいことが好ましく、環境光や装置への照明の搭載なども検討した。

### 2.3 作製した3Dグラフィックの精度検証

選定したカメラおよびレンズが適切であったかの検討のために、得られた写真からソフトウェア Zephyr Aerial (3Dflow社) を用いて、Structure from Motion法により三次元モデル(テクスチャ付メッシュデータ)を作製し完成度を確認した。三次元グラフィック断面は、ソフトウェア Netfabb (Autodesk社) を用いて確認した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 プロトタイプシステムの具体的構成

枝肉の3D計測に適したカメラとレンズを明ら

かにするために、複数のGigEカメラとレンズを試用・検討した結果、カメラはOmron-Sentec社のSTC-MCS312POE(ピクセルサイズ $3.45 \times 3.45 \mu\text{m}$ 、有効画素数 $2,048 \times 1,536$ )、レンズは東京パーツセンター社のTPC-GO6F18-3M(焦点距離6mm、F1.8)が、明るく鮮明で歪みも少ない画像が得られ、最適であった。

これらのカメラとレンズを用いて、枝肉3D計測のためのプロトタイプ装置を製作した(Fig. 2)。本研究助成金で準備したカメラ10台の他に、自己研究資金(農研機構)で準備した10台を加えた計20台により、枝肉を瞬時に計測するシステムとした。

### 3.2 現地検討

3.1で製作したプロトタイプ装置を食肉センターに持ち込み、組み立て、試用した。これまでの研究から枝肉全体について3Dグラフィックを作製する場合、カメラは約40台必要なことが分かっているが、本研究ではカメラ台数の制約から、計測したのは枝肉の一部とした。

プロトタイプは現地への持ち運びの必要から塩ビ管の組み立て式としたが、フレームの組み立て

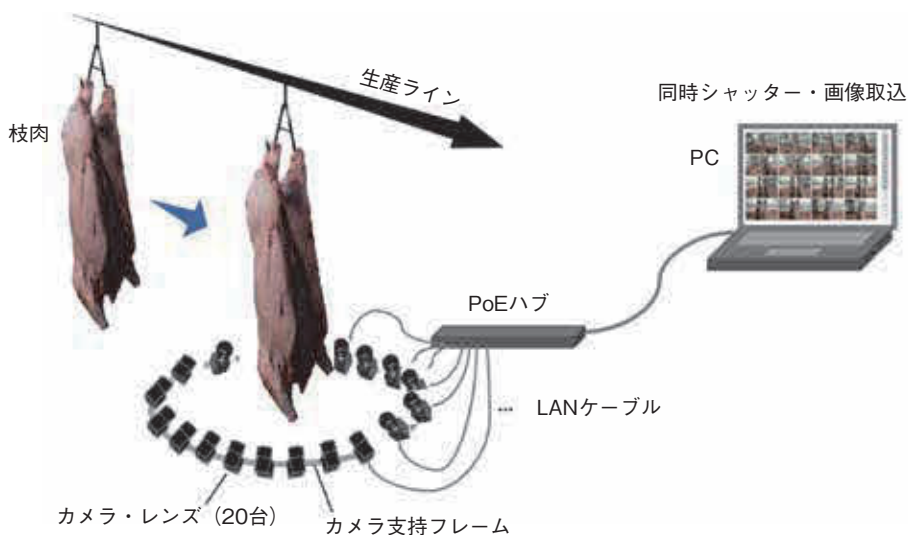


Fig. 2 Prototype system to acquire 3D data of carcass proceeding production line

やすさと、カメラ台数を増やして重量が増加したときの強度の点で、実用機製作時には留意が必要と考えられた。

ルールに沿って移動中(秒速約0.5m)の豚枝肉をプロトタイプ装置で撮像し、その画像を確認した結果、枝肉の移動速度が秒速約0.5mの場合、シャッタースピードは15ms程度以下としないと、画像にブレが生じることが分かった。このシャッタースピードにおいて明るさが十分な画像を取得するためには、撮影装置に照明を設置することが効果的であった。

また、現場環境に由来する電氣的ノイズの影響は、画像を目視確認する限り認められなかった。

### 3.3 作製した3Dグラフィックの精度検証

秒速約0.5mで移動する枝肉を、シャッタースピード15msで撮像した画像データを用いて作製した3DグラフィックをFig. 3に示す。画像に収めることができた枝肉下側の一部分について、3Dグラフィックが問題なく構築できた。

枝肉の下方にカメラを配置したことによって、枝肉の動線を妨げることなく、枝肉に対してカメラを環状に360°配置することが可能になり(Fig. 2)、枝肉の向いている方向にかかわらず計測が

可能となった(Fig. 3)。

枝肉の3Dグラフィック化の利点として当初考えられたことの1つに、これまで難しかった枝肉断面形状の評価が可能になることがあった。Fig. 3の3Dグラフィックの断面を確認したところ、断裂のない輪郭線に囲まれており、枝肉の腹腔の窪みも死角もなく3D計測できることが明らかになった(Fig. 4)。断面の形状は、「豚枝肉取引規格の概要」(公益社団法人日本食肉格付協会)に掲載のものと同様であった。これらの断面から、面積および周囲長を数値化することも可能であった(Fig. 4)。

また、枝肉から垂れ下がった皮下脂肪組織や同じハンガーに吊るした他方の半丸の陰になり、計測できない部分(腹腔の窪みなど)が出るのが想定されたが、枝肉の下方から見上げる角度で撮影することにより死角を作らず、欠けのない3Dグラフィックが作成できた<sup>2)</sup>。

本研究により、実用機開発に必要なハードウェアおよびソフトウェアの要件が明らかになったことから、今後カメラ台数を増やして実用機製作を行い、枝肉の3D形態データの利活用に向けたデータ取得を進める。

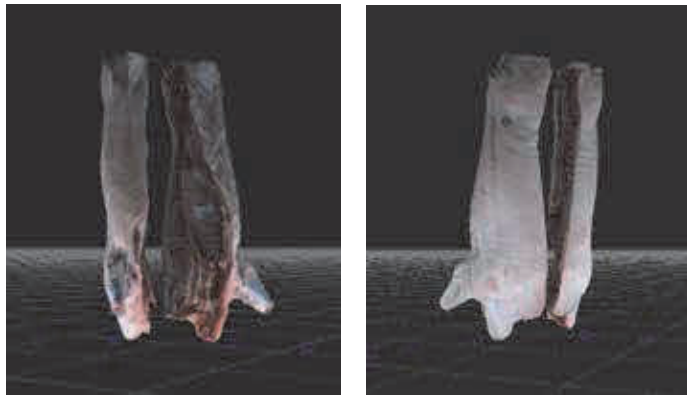


Fig. 3 Carcass 3D graphic constructed from 20 image data measured instantaneously by the prototype device (from two points of view)

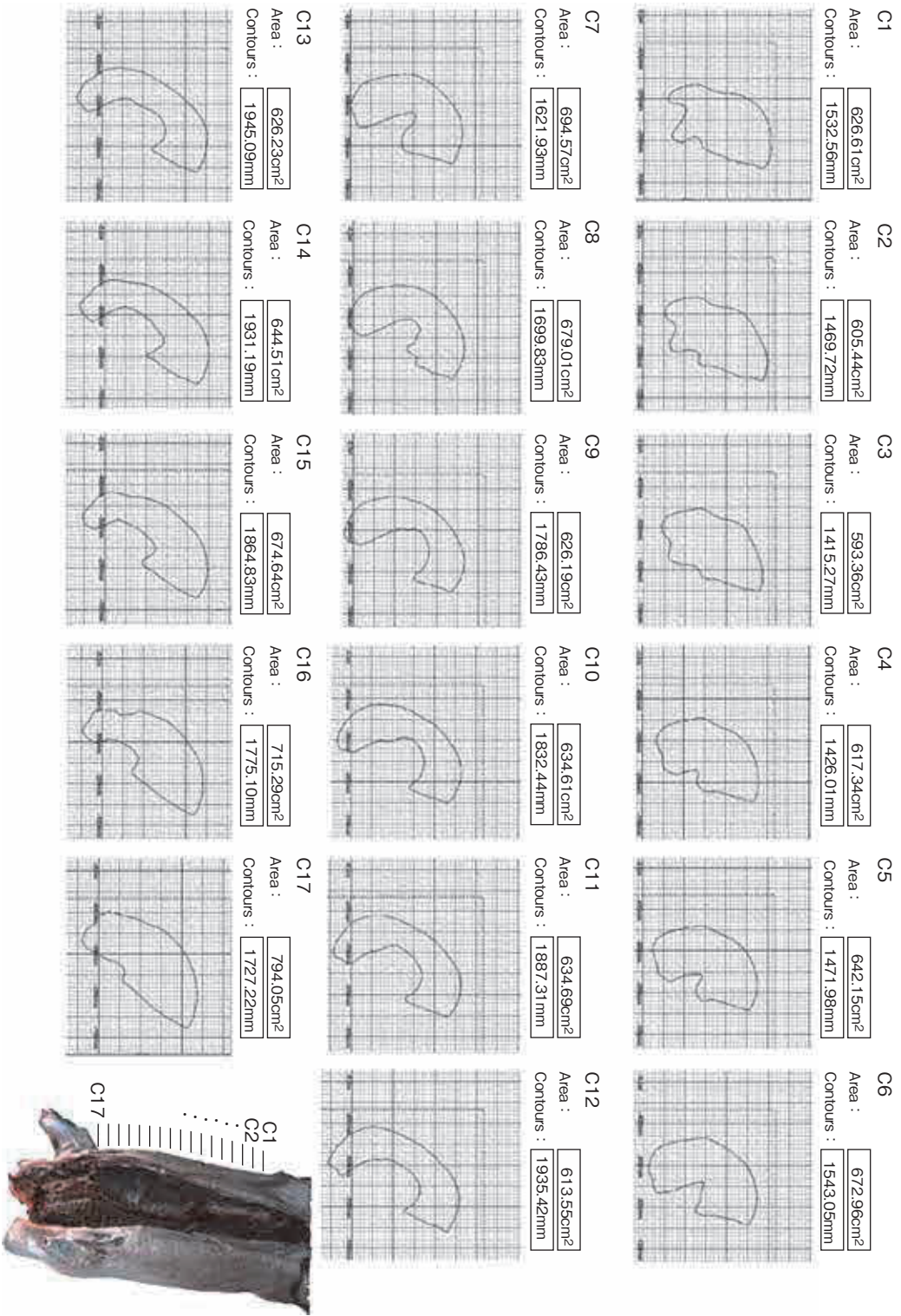


Fig. 4 Cross sections of the 3D graphic (left-side half carcass, 17 sections), section area and contours at the positions of rib, fillet, loin and shoulder loin.



#### 4. 要 約

枝肉の3Dグラフィック作製のための計測を瞬時に可能とする装置のプロトタイプを製作した。枝肉を静止させる必要がないため、生産ラインの流れに干渉せずにデータを取得することが初めて可能となった。食肉センターでの試用により、カメラとレンズのスペックやシャッタースピード、カメラの配置、照明等の適切な条件を明らかにすることができた。また、得られた3Dグラフィックより、これまで数値化が難しかった枝肉断面形状の数値化が可能となり、新しい価値創造につな

がると考えられた。今後、本プロトタイプを基に実用機の製作を行い、Fig. 1に示したような枝肉の3Dグラフィックの利活用を目指す。

#### 謝 辞

株式会社栃木県畜産公社、栃木県畜産酪農研究センターおよび公益社団法人日本食肉格付協会のご協力に感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) 本山ら, 特願 (2019年2月28日)
- 2) 本山ら, 特願 (2020年2月28日)

## ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果と そのメカニズムの解明（Ⅱ）

Clarification of the enhancement mechanism of “*ko*ku attributes” by lipids  
in pork sausages (II)

西村 敏英・力石 麗奈  
(女子栄養大学栄養学部)

Toshihide Nishimura and Reina Chikaraishi  
(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University)

It is well known that pork sausage is very popular as one of delicious foods. Recently, it has been shown that pork sausage gives us *Koku* attributes such as mouthfulness and lingeringness in the flavor sensation. However, the clarification of factors involved in its *Koku* attribute has not been carried out yet.

In the previous research, the addition of umami compounds or fats was shown to enhance the intensity and lingeringness in the flavor sensation of pork sausage, resulting that umami compounds and fats contribute to “*Koku* attribute” of pork sausages. Furthermore, the analyses of aroma compounds of smoked and non-smoked pork sausages showed that common aroma compounds were clarified to be  $\beta$ -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, and Methyl eugenol. In addition, the amounts of aroma compounds released from the sausages containing fats was much lower than that non-containing fats, indicating that fats in sausages are holding aroma compounds, and make the lingeringness of *Koku* attribute stronger. Therefore, in this research, the mechanisms for the release of aroma compounds in oral cavity was examined.

GC/MS analyses have shown that the amount of aroma compounds released from the sausages containing fat minced with saline was 2-4 times larger than that from the sausages without fat minced with saline. This indicates that saliva can release aroma compounds holding with fats in sausages during biting sausages.

GC/MS and GC-O analyses clarified that some of the key compounds contributing to the commercial smoked pork sausages were 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone, Hexanoic Acid, 2-Methoxy-4-ethylphenol, Guaiacol, *m*-Cresol, Eugenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1,2,4-Trimethoxybenzene. The aroma re-constituted with these aroma compounds was similar with that of the commercial smoked pork sausages in smoky aroma, but not in spicy and meaty aromas.

The flavor wheel for smoked pork sausages was made by sensory evaluation. The dominant aroma groups were smoky and spicy aromas, and weak honey and ammonia aromas were also observed. The precise flavor wheel will be made by using more panelists.

## 目 的

近年、多くの食品にコクという言葉が表示され、おいしさの代名詞のように使用されている。しかし、コクには、これまでにきちんとした定義がないため、それぞれの製造者が独自の基準で評価して、表示しているのが現状である。そこで、我々は、コクを「味、香りならびに食感のすべての刺激で形成される総合感覚であり、多くの刺激で形成される「複雑さ」、その刺激が口腔内で膨らむ「広がり」ならびに、それが持続する「持続性」の3つの要素（基本コク）で形成されるものである」と定義した<sup>1~5)</sup>。また、食べ物の複雑さは、熟成、発酵、加熱などの処理により形成される。その複雑な刺激の広がり持続性を増強する物質として、うま味物質と脂質が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた<sup>6~9)</sup>。さらに、コクのある食べ物としてよく知られている食品に関して、コクの形成・増強因子とその形成メカニズムを研究している。

ポークソーセージは、食べ物の中でもとりわけ美味な食べ物の1つであり、食肉加工製品の中で最も消費量が多い。そのおいしさは、うま味、独特の香りならびに食感によることはよく知られている。これまでの食肉製品の香気に関する研究から、塩漬肉特有のフレーバーは、亜硝酸塩の脂質酸化抑制作用による香りであるとの報告があるが、完全に解明はされていない。また、Mottram<sup>10)</sup>やRamarathnam<sup>11)</sup>の報告により、硝酸アルキル、ベンゾニトリル、フェニルアセトニトリル、4-メチル-2-ペンタノン、2-ブチル-2-オクタナールなどの香気成分が亜硝酸塩を添加したのから多く検出されることが明らかとなっているが、食肉製品の食味性との関連での研究は、ほとんどなされていない。

我々はポークソーセージの食味性に関する研究

を手掛けた。まず、ポークソーセージの製造では、調味料としてうま味物質を添加すると同時に、適量の脂肪を添加していることから、これらの物質によるコク形成・増強メカニズムに焦点を当てて研究を実施している。先の研究<sup>12~15)</sup>において、ポークソーセージの食味性を官能評価で解析し、ポークソーセージの官能特徴として、うま味、持続感、濃厚な味、広がりのある味、深みのある味、香ばしい、後をひく香り、広がりのある香り、スモーキー、スパイシーな香り、弾力、歯ごたえ、ジューシー、プリプリなど、全部で22項目の用語を見出し、ポークソーセージの食味性には、コクに当てはまる感覚が存在することを明らかにした<sup>12)</sup>。また、ソーセージに添加されているうま味物質は、ポークソーセージの口中香を強く感じさせると同時に、風味の複雑さや味の持続性を強く感じさせることから、コク増強物質であることが判明した。さらに、スモークドポークソーセージとノンスモークドソーセージから抽出した香気成分を臭いかぎガスクロマトグラフィー (GC-O) と質量分析ガスクロマトグラフィー (GC/MS) で解析し、ポークソーセージの特徴的な臭いに寄与する候補成分を特定した<sup>14)</sup>。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、GC/O分析を用いたAEDA法により、16成分のうち、 $\beta$ -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Acetic acid, Copaene, Methyl eugenol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。スモークソーセージでは、これらに加えて、燻煙由来のポークソーセージを特徴付ける香気成分として

*p*-Cresolと2,6-Dimethoxy-phenolの存在が明らかとなった。このように、ポークソーセージが、特徴のある香

りを有する複雑さを持ち、味わいに広がりや持続性を有するコクのある食品であることを明らかとしてきた。また、ソーセージの製造時に添加する脂肪が、ソーセージの食味性に与える影響を調べ、添加する脂質含量を増やすと、うま味や塩味を増強するだけでなく、風味の広がりや持続性を強め、コクを増強することが明らかとなり、脂質がソーセージの香気成分保持していることが推察された<sup>9,15)</sup>。

そこで、本研究では、ポークソーセージを喫食した時に、放出される香気成分を解析し、香気成分が脂質に保持されていることを解明することを目的とした。また、ポークソーセージの香りの再構成ならびに、フレーバーホイールの作成を試みた。

### 1 咀嚼されたソーセージからの香気成分の放出

我々が、ポークソーセージを咀嚼している時の状態を模倣し、その際に放出される香気成分が脂肪の有無で変化するか否かを調べた。

#### 実験方法

##### (1) 供試試料

脂肪通常添加および脂肪無添加の smoked ポークソーセージ (ウインナーソーセージ) を伊藤ハム米久ホールディングス (株) 中央研究所に製造していただいた。冷凍保存しておいたソーセージを袋ごと流水にかけて解凍し、試料として用いた。

##### (2) Mono Trap (シリカモノリス捕集剤)

###### による香気成分の捕集

各ソーセージの中心部を採取し、生理食塩水と混合しながらすり潰した後、10 g を取り、40 ml のバイアル瓶に入れたものを 60°C、30 分間ウォーターバスで湯煎した。その後、60°C で 2 時間加熱した。この間に揮発したヘッドスペース香気成分を Mono Trap (シリカモノリス捕集剤: GL Sciences (株)) で捕集した。Mono Trap からジ

エチルエーテルで捕集香気成分を抽出した。これを分析試料とした。

##### (3) GC/MSによる香気成分の比較・同定

Mono Trap から得られた試料を、以下の条件で分析した。

昇温条件は、40°C (10min) → (5°C/min) → 240°C (20min)、計70分のプログラムを用いた。検出器には、MS (250°C) を使用した。GC/MSは、GCMS-QP2010 (島津製作所(株)) で、TC-wax (長さ30m × 内径0.25mm i.d., 膜厚0.25 μm, 使用温度上限260°C) (GL Sciences(株)) を使用した。注入量は、2 μl (スプリットレス) で、内部標準として Dimethyl phthalate を用いた。また、各成分の量的な変化は、サンプルに添加した内部標準物質で補正した後、比較した。

#### 結果および考察

脂肪無添加および脂肪添加 smoked ポークソーセージからは、主な香気成分として、① β-Pinene, ② 3-Carene, ③ D-Limonene, ④ Caryophyllene が検出された (Fig. 1)。これらは、いずれも我々の先行研究で、smoked ポークソーセージおよび nonsmoked ソーセージのいずれからも検出された香気成分である<sup>14)</sup>。また、これらの成分の放出量は、脂肪添加製品では、脂肪無添加物製品よりも少ないことが明らかとなっており、ソーセージに添加された脂肪が香気成分を保持していると推察されている<sup>15)</sup>。

そこで、本研究では、我々が口腔内でソーセージを咀嚼した時に、唾液の存在により香気成分が放出されることを考え、脂肪無添加 smoked ポークソーセージと脂肪添加 smoked ポークソーセージの中心部分の肉に生理食塩水を添加した時の香気成分の放出量を測定した。Fig. 1 で検出された4つの成分は、いずれも脂肪添加製品からの放出量が、脂肪無添加製品からのものより約2~4倍多いことが判明した (Fig. 2)。ソーセージ製品

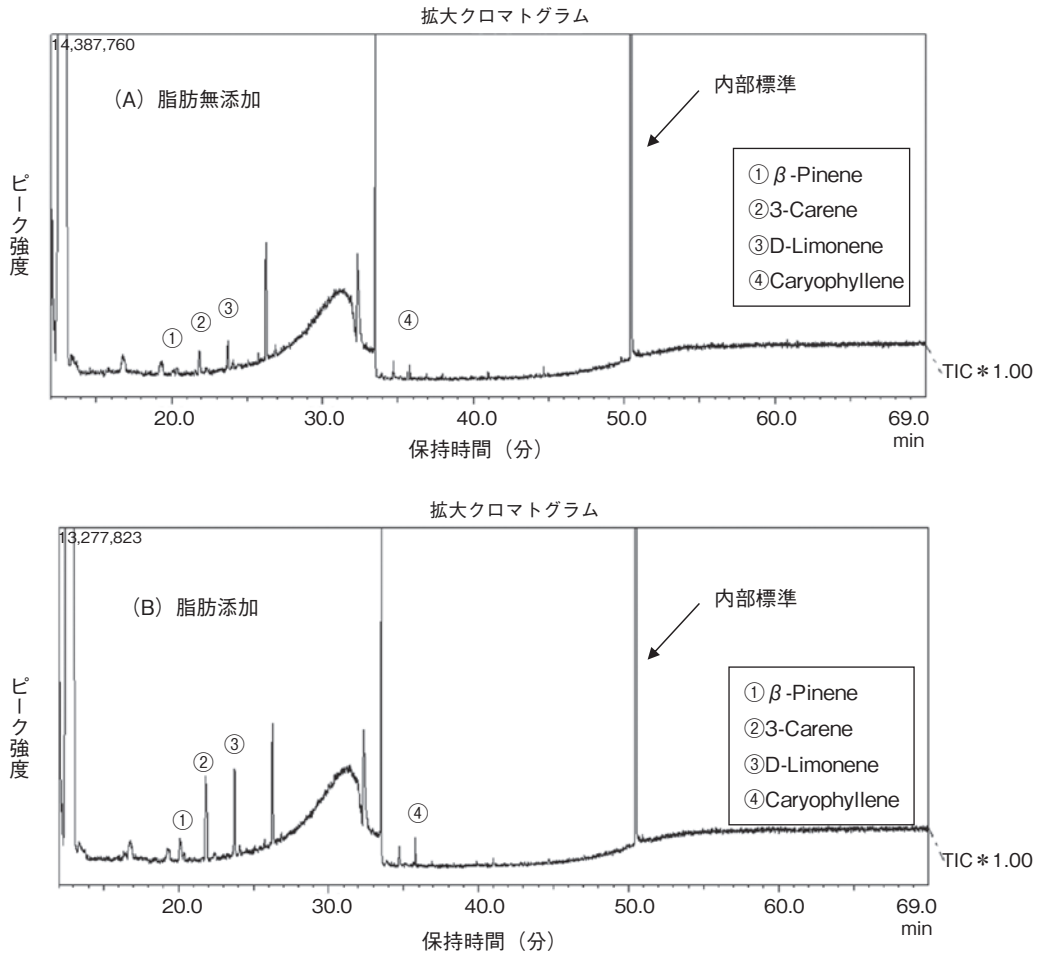


Fig. 1 GC/MS chromatogram of aroma compounds released from smoked pork sausages non-containing (A) and containing (B) fats

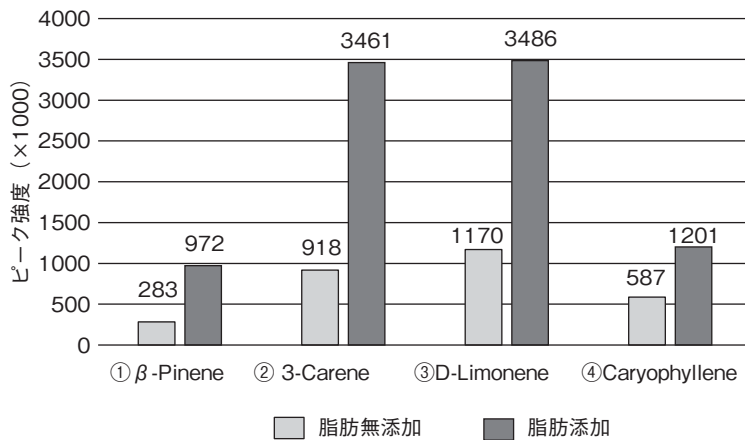


Fig. 2 Comparison of amount of aroma compound released from sausages non-containing and containing fats

では、添加されている脂肪がこれらの香気成分を保持しているが、生理食塩水存在下では、放出されることが明らかとなった。これらの結果は、我々がソーセージを喫食した時に、脂肪が添加されているソーセージからは、脂肪無添加のものとは比べてより多くの香気成分が放出され、味わいや持続性をより強く感じられることを示していると推定した。

以上の結果から、ポークソーセージに添加されている脂肪は、香気成分を保持することで味わいの持続性を強くし、コク増強に寄与していることが裏付けられた。

## 2. スモークドポークソーセージの香りに寄与する成分の分析

先の研究でスモークドポークソーセージの香気成分を解析したが、香りへの寄与を検討するには至らなかった。そこで、本研究では、再分析し、寄与度の高い香気成分の再構成を実施し、香りの形成に重要な香気成分を特定することを試みた。

### 実験方法

#### (1) 供試材料

A社が販売しているスモークドポークソーセージを用いた。

#### (2) SAFE蒸留

ソーセージの中心部を乳鉢ですり潰した後、25gを精秤し、100mlのジエチルエーテルを添加して香気成分を抽出した。その後、SAFE蒸留し、香気成分の捕集を行った。捕集した原液を無水硫酸ナトリウムで脱水後、窒素ガスを吹き付けて9倍に濃縮し、AEDAおよびGC/MSの分析試料とした。

#### (3) AEDA法

窒素濃縮試料をジエチルエーテルで2倍ずつ16倍まで段階的に希釈し、各希釈試料をAEDA試料とした。これを用いて匂い嗅ぎを行い、メモ用

紙に言葉出しをした。これは、2名体制で行った。

#### (4) GC/MSによる香気成分の同定

1. (3) GC/MSによる香気成分の同定の手順と同様である。注入量は2  $\mu$ lとした。

#### (5) 匂いの再構成

2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone, Hexanoic Acid, 2-Methoxy-4-ethylphenol, Guaiacol, m-Cresol, Eugenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1,2,4-Trimethoxybenzeneは、東京化成工業(株)より購入した。それぞれの純度は最低97%から99%であった。香気成分をエタノールで100倍希釈後、クロマトグラムのピークの高さに基づいて混合した。

混合した香気成分を匂い紙(ムエット)に滴下し、スモーキー、スパイシー、肉らしいに関して、スモークドソーセージとの類似性を官能評価で調べた。パネリストは、嗅覚テストにて同一3段階濃度の香りが識別できる者が選定され、延べ6名で評価を行った。

### 結果および考察

#### (1) スモークドポークソーセージの香りに寄与する成分の分析

スモークドポークソーセージの香気成分をSAFE蒸留法で抽出し、それを濃縮後、GC/MSで分析した。その結果、多数の香気成分が検出された。同じ試料を用いて、GC-Oで検出された香気成分の香りの特徴を調べた。Fig. 3には、Table 1に示されている香気成分を含めて、22個の成分が同定された。これらには、先行研究<sup>14)</sup>で明らかとなったいくつかの成分が検出された。

次に、AEDA法により、ポークソーセージの香りに寄与する重要な候補物質として、8成分が推定された。具体的には、2倍希釈試料では21成分が、4倍希釈試料では14成分が、8倍希釈試料では11成分が、そして、16倍希釈試料では8成分が検出され、同定された。FD=16の値まで匂い



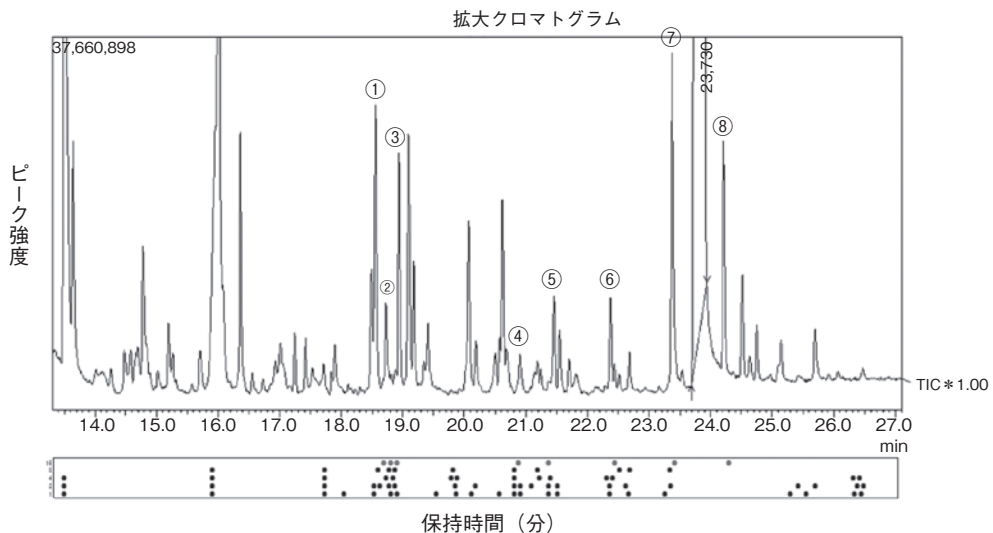


Fig. 3 Aroma-gram of aroma compounds in commercial smoked pork sausages measured by GC/MS and GC-O

Table 1 Candidate aroma compounds in commercial pork sausages identified by GC/MS and GC-O

	保持時間 (分)	候補化合物	ピークの高さ ( $\times 10^7$ )	GC-Oで感じた匂いの特徴 (FD=16)
①	18.56	2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone	3.1	カフェラテ
②	18.73	Hexanoic Acid	1.1	正露丸
③	18.94	2-Methoxy-4-ethylphenol	2.6	カフェラテ
④	20.90	Guaiacol	0.6	スモーキー
⑤	21.46	<i>m</i> -Cresol	1.2	めんま
⑥	22.38	Eugenol	1.1	ソース
⑦	23.34	2,6-Dimethoxyphenol	3.5	正露丸
⑧	24.21	1,2,4-Trimethoxybenzene	2.6	線香

嗅ぎを行い、FD値と保持時間に基づいてアロマグラムの作成をした。

Table 1の結果より、絞り込まれた香気成分は必ずしもピークが大きいわけではなく、含まれている量は少なくともソーセージの匂いへの寄与が大きい成分が存在するということが分かった。今回は2名体制で匂い嗅ぎを行ったが、今後は、匂い嗅ぎの人数を増やし『確かにこの時点で匂いを感じた』という確かな匂い嗅ぎができれば、もっと精度の高い匂い嗅ぎができるのではないかと考えられた。

また、スモークソーセージに特徴的な匂いに寄与する成分として、2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone, Hexanoic Acid, 2-Methoxy-4-ethylphenol, Guaiacol, *m*-Cresol, Eugenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1,2,4-Trimethoxybenzeneの8成分に絞りこむことができた。これらは必ずしもピークが大きいわけではなく、含まれている量は少ないが、ソーセージの匂いへの寄与が大きい成分であると推察された。

## (2) スモークドポークソーセージの寄与候補物質による再構成

前項で明らかとなったソーセージの香りに寄与する候補物質の標準試薬を用いて、スモークドソーセージの香りを再構成した。この再構成品の香りと市販のスモークドポークソーセージの鼻先香および口中香とを比較した。スモーキーな香りは6名中4名が似ていると答えたが、スパイシーな香りは2名、肉らしい香りは1名しか似ているとしなかった。具体的なコメントでは、「絵の具、焼き芋様のスモーク臭がある」、「再構成品の香りのスモーク臭が弱い」、「似ているが、再構成品の香りのほうが弱い」、「スパイシーさが弱い」、「肉らしい香りがなかった」があった。今回の実験では、ポークソーセージの匂いを完全に再現することはできなかったが、今後は、香気成分の捕集方法を検討し、ソーセージのスモーキーな匂いや肉らしい香りに寄与する成分を探索していきたい。

## 3. スモークドポークソーセージのフレーバーホイールの作成

### 実験方法

市販のスモークドソーセージ（ウィンナーソーセージ）の中心温度が60℃以上になるよう、電子レンジ（600W, 30秒）または湯煎（沸騰後5分）で供試試料を袋ごと加熱した。ソーセージを試食後、鼻先香（アロマ）、口中香（フレーバー）、味を区別して、言葉出しを行った。この際、スパイス（ホワイトペッパー、ブラックペッパー、ナツメグ、オールスパイス、コリアンダー、セージ）とナッツ（アーモンド、マカダミアナッツ、カシューナッツ）、アロマフレーズ一覧を参考資料として使用した。

パネリストには、味覚テストにて味の濃度差が識別できる者を選定し、延べ3名で評価を行った。

## 結果および考察

Fig. 4より、ソーセージの匂いは、大別すると、燻煙臭とスパイス臭に分けられることが明らかとなった。その他の匂いとして、メープル臭やアンモニア臭なども観察された。また、鼻先香では燻煙臭が、口中香ではスパイス臭やその他の香りが見出された。特に、スパイス臭は鼻先香では感じられなかったが、咀嚼することによってその匂いを感じる事ができた。これは、ケーシングに包まれた原料肉に香辛料の香りが閉じ込められていることから、鼻先香が感じにくかったと推定された。また、市販のソーセージには約30%の脂肪が添加されていることから、先行研究や本研究で明らかになったように、香気成分は添加されている脂肪に保持されており、咀嚼により口腔内の唾液と混じり、ソーセージの本来の香りが感じられたと推察された。

今回は、パネリスト3名と少人数で行ったが、パネリストを増やすことでソーセージのアロマホイールをより充実させることができると考えられた。

## 要 約

ポークソーセージは、美味しい食品の1つであり、コクのある食品である。一昨年度の研究において、ポークソーセージの製造時に添加された脂肪が、ソーセージの特徴を示す香気成分を保持し、味わいの広がりや持続性を強めていることが明らかとなり、添加された脂肪がソーセージのコクの増強に寄与していると推察された。

本研究では、咀嚼を模倣し、すりつぶしたソーセージの肉に生理食塩水を添加した時の香気成分の放出量が、脂質の添加によって変化するか否かを調べた。その結果、脂肪無添加および脂肪添加スモークドポークソーセージからは、主な香気成分として、①  $\beta$ -Pinene, ② 3-Carene, ③





Fig. 4 Flavor wheel of commercial smoked pork sausages

D-Limonene, ④Caryophylleneが検出された。両ソーセージに含まれている肉をすりつぶし生理食塩水を添加した時の香气成分の放出量を測定した結果、4つの成分は、いずれも脂肪添加製品からの放出量が、脂肪無添加製品からのものより約2～4倍多いことが判明した。ソーセージ製品では、添加されている脂肪がこれらの香气成分を保持しているが、生理食塩水存在下では、放出されることが明らかとなった。

市販のスモークドポークソーセージの香气成分をSAFE蒸留法で抽出し、それを濃縮後、GC/MSで分析した。22個の成分が同定されたので、AEDA法により、ソーセージの香りに寄与する成分を特定した結果、2-Hydroxy-3-methyl-2-

cyclopentenone, Hexanoic Acid, 2-Methoxy-4-ethylphenol, Guaiacol, m-Cresol, Eugenol, 2,6-Dimethoxyphenol, 1,2,4-Trimethoxybenzeneが重要な候補物質であると推定された。これら8成分から構成する香りは、スモーク臭とスパイシーな香りが強く、市販のソーセージの燻煙臭と似たものが得られたが、完全には再現できなかった。今後は、捕集方法を検討し、本物に近い匂いの再構成成分を構築したい。

市販のスモークドソーセージを用いて、官能評価方法でフレーバーホイールを作成した。スモーク臭とスパイシーな香りに大別された。それ以外に、ハチミツの香りとアンモニア臭が観察された。今後は、パネリストを増やし、より正確なフ

レーバーホイールを作成したい。

## 謝 辞

脂肪含量の異なるスモークドポークソーセージを製造して下さった伊藤ハム米久ホールディングス(株)中央研究所の皆様に、心から感謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Nishimura, T. : Definition of “*Koku*” Involved in Food Palatability (*Koku* in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.), 1~16, Springer Nature, Singapore, 2019.
- 2) 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.
- 3) 西村敏英：食品のおいしさを改善するコク増強物質のチョイ足し技術, 月刊フードケミカル, 2017-9, 23~27, 2017.
- 4) 西村敏英：コクの要素と寄与成分を活かした食品開発, 食品と開発, 53(6), 20~23, 2018.
- 5) 西村敏英：食品のコクとおいしさへの活用, 醤油の研究と技術, 45(3), 161~168, 2019.
- 6) 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.
- 7) Nishimura, T., Egusa, S. A., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., Noshio, Y. : Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a *koku* attribute, *Food Chemistry*, **192**, 724~728, 2016.
- 8) 西村敏英：食肉のおいしさを引き出すうま味物質の役割, 食肉の科学, 57(2), 177~180, 2016.
- 9) Nishimura, T., Saiga, A. : Umami Compounds and Fats Involved in *Koku* Attribute of Pork Sausages (*Koku* in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.), 47~58, Springer Nature, Singapore, 2019.
- 10) Mottram, D. M. : Organic Nitrates and Nitriles in the Volatiles of Cooked Cured Pork, *J. Agric. Food Chem.*, **32**, 343~345, 1984.
- 11) Ramaratnam, 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.
- 12) 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, 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.33, 101~108, 2015.
- 13) 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, 72~80, 2016.
- 14) 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3), 平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.35, 31~39, 2017.
- 15) 西村敏英：ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割, 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.36, 59~67, 2018.

## 次世代畜産学のための培養肉技術の開発

Cultured clean meat technology for next generation livestock science

福田 智 一

(岩手大学理工学研究科)

Tomokazu Fukuda

(Graduate School of Science and Technology, Iwate University)

The meat production is mainly depend on the animal growth and reproduction. However, based on the global warming, the development of meat production in vitro becomes key technology for our next generation. The major problem of cultured meat is the cost of the cell expansion process. To decrease the cost for the cell culture, the rapid cell growth within the short time period would contribute to reduce the cost for the production. Based on this idea, we introduced the mutant cyclin dependent kinase 4 and Cyclin D, and telomerase reverse transcriptase to primary chicken myoblasts. The introduced cells showed smaller size in cell morphology and showed transient acceleration of growth speed. However, the introduced cells halted cell proliferation after passage 3.

Furthermore, we also introduced the mutant cyclin dependent kinase 4 and Cyclin D, cyclin dependent kinase 1 and Cyclin B. However, new cell also stopped cell proliferation after three passages. These results indicate that cell cycle basic machinery is not evolutionally conserved among mammalian and avian. Although the detailed difference how diversity has developed between mammalian and avian, our findings would be the first report about the species difference of cell growth and cell cycle control.

### 1. 目 的

食肉生産は家畜の生産および成長に依存していると言える。しかし家畜の生産は環境への負荷が大きいことも近年の研究によって指摘されている。具体的には反芻動物や動物の排泄物から発生するメタンガスは畜産由来の割合が37%と指摘されている。さらにメタンガスは二酸化炭素の25倍の地球温暖化係数を持っている。このことから従来の森林を切り開き、牧草地を作り、家畜を食肉生産のために家畜を飼育することは困難になりつ

つある。

一方、欧米では培養肉と言われる産業に注目が集まっている<sup>1)</sup>。欧米では具体的な事業化に向けてすでに大型投資が行われている。培養肉技術は組織培養の大型版であると言える。具体的には、動物の小さな筋肉組織を元に培養を行い、大量の筋肉細胞へ拡大する。培養による細胞の拡大は排泄物も発生しないうえ、メタンガスも発生しない。さらに培養を実施した場合、最初に使用する組織に関して検査体制を整えれば、感染症のリスクは低くなることが期待される。また、飼料作物

を得るための牧草地、そして森林伐採を必要としない。このような良いことづくめに見える培養肉産業であるが、培養にかかるコストが最も問題となっている。培養コストを上昇させている原因は、培養肉の培養に必要となる期間が長いこと、加えて培養に使用される血清を含む培養液と増殖因子である。研究代表は細胞増殖を効率よく加速することができれば、コストの削減が可能になると発想した。

研究代表者は牛、豚<sup>2)</sup>、サル<sup>3)</sup>、スイギュウ<sup>4)</sup>、アメリカ平原ハタネズミ<sup>5)</sup>、ラット<sup>6)</sup>、オオコウモリ<sup>7)</sup>、ネコ<sup>8)</sup>、ウミガメ<sup>9)</sup>にいたるまで、変異型サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) およびサイクリンD遺伝子の発現によって元の細胞の性質を保存したまま、無限分裂できることを示した<sup>7)</sup>。特筆すべきことは、多くの動物種の細胞において元の染色体パターンを保持したまま無限分裂が可能になった点である。従来のSV40ラージT抗原などの癌遺伝子産物を用いた無限分裂方法では高頻度に染色体異常が発生することが報告されている<sup>10)</sup>。我々の用いた無限分裂方法の特徴は、変異型CDK4およびサイクリンD遺伝子のアミノ酸配列が動物の進化上、高度に保存されていることを利用している。具体的には、ヒト-サル間ではCDK4のアミノ酸配列は99%保存されている。このことは細胞分裂の基本的な仕組みは哺乳動物や爬虫類において動物進化を超えて保存されていることを示している。

本研究では鳥類の胎児由来筋芽細胞へ変異型CDK4およびサイクリンDを導入し、培養肉として拡大培養する段階で細胞増殖を加速し増殖効率を高めること、コストの削減を目的とした。本研究は鳥類由来の細胞を効率よく無限分裂させ、培養肉の効率を高めることを試みた。鳥類由来の細胞においてこのような細胞増殖を制御した報告はまだまだ存在せず、新たな試みである。

## 2. 方法

細胞周期に関連する遺伝子群のタンパク質コード領域を化学的に合成した。近年、化学合成技術の発達によって、従来不可能であった遺伝子全域を化学合成することが可能になっている。化学合成の利点は長鎖であっても任意に研究者のデザインしたとおり合成できる点にある。サイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4)、サイクリンD 1 遺伝子、テロメラーゼ逆転写酵素 (TERT)、サイクリン依存性キナーゼ1 (CDK1)、サイクリンB 遺伝子、サイクリン依存性キナーゼ2 (CDK2)、サイクリンE 遺伝子、Aurora B遺伝子に関して開始コドンから停止コドンにいたる領域のDNAを化学合成した。合成したコード領域のcDNAをレンチウイルスプラスミドである、CSII-CMV-EGFPのマルチクローニングサイトへ制限酵素切断と結合を介して組み換えレンチウイルスを作製した (Fig. 1)。293T細胞へ、各遺伝子を搭載したレンチウイルスプラスミド、そしてパッケージングプラスミドとして、HIV-gpおよびpCAG-VSVG-Rsv-Revプラスミドをリポフェクション法にて導入した。パッケージングプラスミドは理化学研究所バイオリソースセンターより分与を受けた。導入後48時間目に培養上清を回収し、0.45  $\mu\text{m}$ のフィルターにて濾過し、パッケージング細胞を除去した。さらにポリエチレングリコール6000を主成分としたウイルス濃縮溶液を添加し、30倍の濃度へ濃縮した。得られたウイルスを鶏胎児由来初代筋芽細胞へ暴露した。なお、おおよその遺伝子導入効率を推定するために、オワンクラゲの蛍光タンパク質 (EGFP) を産生するレンチウイルスを使用した。遺伝子導入は48時間行い、その後基礎培地に戻した。鶏胎児由来初代筋芽細胞は、鶏胎児を24匹使用し、胸筋にあたる部分を切除、筋芽細胞のみ得られるようにサンプリング

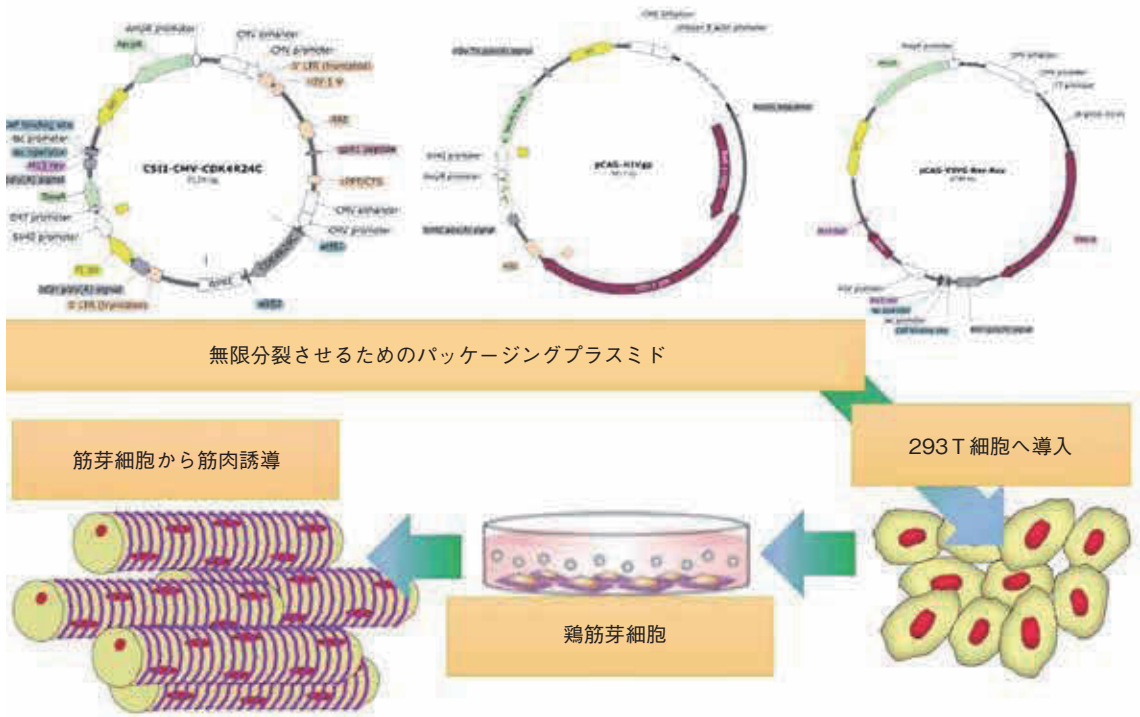


Fig. 1 Experimental flow of the study.

を行った。得られた組織は37℃、トリプシン存在下で細胞集団が得られるように処理し、35mmプラスチックシャーレ上で培養を行った。初代培養細胞において細胞融合および筋管形成能力を持つことを確認した。得られた初代培養細胞はコラーゲン処理を行った細胞培養用35mmディッシュ中で維持した。培養には199基礎培地に10%の牛胎児血清、ペニシリンおよびストレプトマイシンを添加した。

### 3. 結果および考察

実験に用いた鶏胎児由来筋芽細胞を初代培養したところ、従来の結果に合致し、細胞密度が増加するにつれ、細胞融合が生じ筋管形成していることが確認された。

EGFPを発現するレンチウイルスを導入後の鶏筋芽細胞の細胞像をFig. 2に示す。コントロール

である無処理の鶏筋芽細胞ではまったく蛍光が検出されなかった一方、EGFPを導入した筋芽細胞においてはおよそ70%の細胞が陽性を示し、高い導入効率が得られた。同様の条件にて、まず、従来のCDK4およびサイクリンDを導入した筋芽細胞を得た。これらの細胞を今後、K4D細胞と記述する。K4D細胞は哺乳類においては劇的に細胞増殖を加速することが判明している。一方、鶏筋芽細胞においては一時的な細胞増殖の亢進が見られた。Fig. 2の中央に細胞の形態を示すが、野生型細胞と比較して極度に小型化した細胞が認められた。これは細胞分裂が大幅に加速された細胞の特徴である。形態変化を示し、細胞増殖が一時的に加速したK4D細胞であるが、3世代の細胞継代操作で増殖を停止した。この実験データを我々は鳥類の細胞においては哺乳類と異なる細胞増殖制御が行われている結果と解釈した。研究代表者は



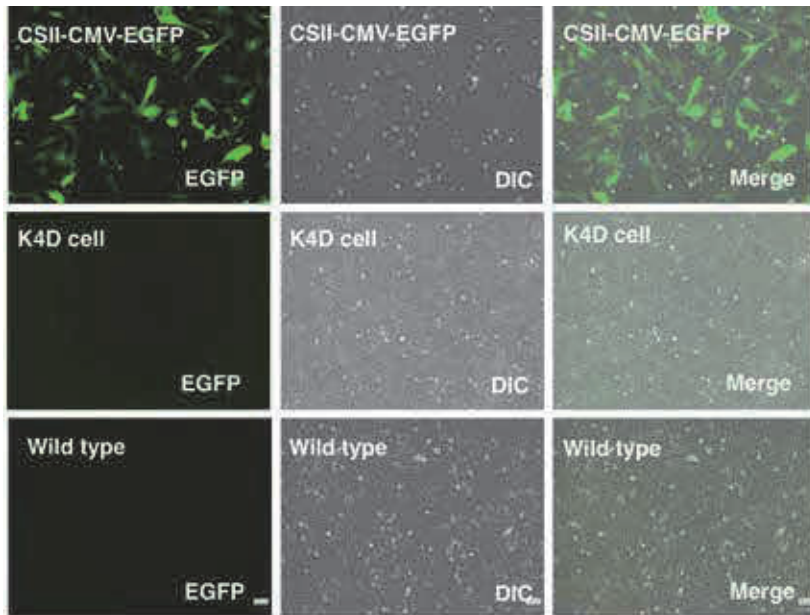


Fig. 2 The chick derived myoblasts infected with EGFP expressing lentivirus and mutant CDK4 and Cyclin D. Upper panels, EGFP expressing cells, Middle panels, Myoblasts expressing mutant CDK4 and Cyclin D (K4D cell) . Note that cell size becomes much smaller than wild type cells. Lower panels, wild type check derived myoblasts.

細胞周期調節因子，特にCDK4およびサイクリンDによって細胞増殖が制御されている共通のメカニズムであることを爬虫類から哺乳類に至るまで実験的に証明した<sup>2-9)</sup>。一方で本研究実験結果は細胞周期を制御する遺伝子群が，爬虫類から鳥類に変化した段階で変化したことを意味する。

我々はさらにCDK4およびサイクリンDに加えてCDK1およびサイクリンBを加えた4種の遺伝子を導入し，細胞増殖への効果を検討した。この4種の遺伝子を選択した理由は，マウスにおいてこの4種の遺伝子を導入すると心臓由来の筋肉細胞においても分裂再開が可能である報告があったことに由来する<sup>11)</sup>。導入した遺伝子の末尾の文字からK4DK1B細胞と記述する。鶏筋芽細胞由来のK4DK1B細胞は，先のK4D細胞と同様に3世代の継代操作を行った後に細胞分裂を停止した。このことから，我々は鳥類の場合，哺乳類と大きく異

なる細胞分裂制御が行われていると考察した。

我々はさらに，鳥類の細胞周期制御遺伝子として，CDK2およびサイクリンE遺伝子，Aurora B遺伝子に着目した。特にCDK2およびサイクリンEは細胞周期のDNA合成期から分裂期へと橋渡しする重要な分子群である。また，Aurora Bタンパク質は細胞分裂の完了に関与し，細胞質分裂が終了する際に生まれる細胞質の切れ目に局在することが知られている<sup>11)</sup>。これらのCDK2およびサイクリンE遺伝子，Aurora B遺伝子を発現するレンチウイルスを293T細胞において作成し，鶏筋芽細胞に導入を行った。現在，細胞継代の実験を進行中である。今後，哺乳類の細胞のように元の細胞の性質を保持したまま，細胞分裂を効率よく加速できる操作技術の開発が鳥類の細胞において開発が必要である。それらの細胞増殖を加速する技術によって，培養肉生産のコストの低下が

可能になると考えられる。

#### 4. 要 約

本研究では、培養肉技術を低コスト化することを目的に、細胞増殖速度を加速させることを目的に、鶏胎児由来の筋芽細胞へサイクリン依存性キナーゼ4 (CDK4) およびサイクリンD遺伝子を導入した。細胞増殖速度は一時的に加速されたが、3回の継代の間に細胞分裂が停止した。このことは爬虫類から鳥類へ進化する動物の進化の過程で細胞周期を制御する基本メカニズムが変化したことを意味する。細胞周期を調節する遺伝子群であるCDK1およびサイクリンBを発現する細胞も同様に3回の細胞継代の後に分裂を停止した。鳥類においても、効率的に細胞増殖を制御するため、新たにさまざまな遺伝子発現システムを構築している。研究代表が見出した、爬虫類から鳥類の細胞制御のメカニズムの変化は動物の分子進化の謎を解くために重要な発見である。

#### 文 献

- 1) Bodiou, V., Moutsatsou, P., Post, M. J. : Microcarriers for Upscaling Cultured Meat Production, *Frontiers in Nutrition*, **7**, 10, 2020.
- 2) Donai, K., *et al.* : Bovine and porcine fibroblasts can be immortalized with intact karyotype by the expression of mutant cyclin dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase, *J. Biotechnol.*, **176**, 50~57, 2014.
- 3) Kuroda, K., *et al.* : Establishment of cell lines derived from the genus macaca through controlled expression of cell cycle regulators, *J. Cell. Biochem.*, **116**, 205~211, 2015.
- 4) Fukuda, T., *et al.* : Cellular conservation of endangered midget buffalo (Lowland Anoa, *Bubalus quarlesi*) by establishment of primary cultured cell, and its immortalization with expression of cell cycle regulators, *Cytotechnology*, **68**, 1937~1947, 2016.
- 5) Katayama, M., *et al.* : Establishment of an immortalized cell line derived from the prairie vole via lentivirus-mediated transduction of mutant cyclin-dependent kinase 4, cyclin D, and telomerase reverse transcriptase, *Exp Anim*, **65**, 87~96, 2016.
- 6) Katayama, M., *et al.* : Rat-derived feeder cells immortalized by expression of mutant CDK4, cyclin D, and telomerase can support stem cell growth, *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1866**, 945~956, 2019.
- 7) Tani, T., *et al.* : Establishment of immortalized primary cell from the critically endangered Bonin flying fox (*Pteropus pselaphon*), *PLoS One*, **14**, e0221364, 2019.
- 8) Gouko, R., *et al.* : Efficient immortalization of cells derived from critically endangered Tsushima leopard cat (*Prionailurus bengalensis euphilurus*) with expression of mutant CDK4, Cyclin D1, and telomerase reverse transcriptase, *Cytotechnology*, **70**, 1619~1630, 2018.
- 9) Fukuda, T., *et al.* : Expression of human mutant cyclin dependent kinase 4, Cyclin D and telomerase extends the life span but does not immortalize fibroblasts derived from loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*), *Sci. Rep.*, **8**, 9229, 2018.
- 10) Fukuda, T., *et al.* : Efficient Establishment of Pig Embryonic Fibroblast Cell Lines with Conditional Expression of the Simian Vacuolating Virus 40 Large T Fragment, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **76**, 1372~1377, 2012.
- 11) Mohamed, T. M. A., *et al.* : Regulation of Cell Cycle to Stimulate Adult Cardiomyocyte Proliferation and Cardiac Regeneration, *Cell*, **173**, 104~116.e12, 2018.

# 官能特性をベースとした分光分析による赤身肉 評価装置の開発

Development of meat evaluation system by spectroscopic analysis based  
on sensory score for red meat

口田 圭吾<sup>1</sup>・阿佐 玲奈<sup>1</sup>・小林 健一<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>帯広畜産大学, <sup>2</sup>一関工業高等専門学校)

Keigo Kuchida<sup>1</sup>, Reina Asa<sup>1</sup> and Ken-ichi Kobayashi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>2</sup>National Institute of Technology, Ichinoseki College)

Near infrared spectroscopy is an easy-to-use, low-cost measurement device. Furthermore, spectroscopy can be non-destructive and objectively evaluated. For estimating the oleic acid content in the cross section of beef carcass using a portable spectroscopic sensor, the absorbance of intermuscular fat in beef carcass was measured. Seventy-eight (78) crossbreds cow slaughtered in Hokkaido from August to October 2019 were used. A portable spectroscopic sensor was appressed to the intermuscular fat area of the carcass cross-section. The spectrum (1,100 to 1,350 nm) was shifted in 1nm wavelength, and their absorbance spectra were collected from 251 wavelengths. The near-infrared spectroscopic sensor used for the spectroscopic measurement is the NM module of SPECTRAL ENGINES. In the fatty acid analysis, the oleic acid percentage was measured by gas chromatographic analysis. Oleic acid percentage was estimated by PLS regression analysis using the absorbance spectrum, and the relationship between the measured value and the estimated value was investigated. The average value and standard deviation of the oleic acid percentage obtained by gas chromatographic analysis were  $55.51 \pm 3.80$  %. The coefficient of determination between the measured value and the estimated value using the absorbance spectrum from 6 to 15 seconds was high ( $r^2 = 0.87$ ).

## 1. 目 的

牛肉の品質評価は、市場での取引価格や消費者が牛肉を購入する際に影響を与える。肉質は牛枝肉取引規格で定められた項目に従って、格付員の目視によって評価されており、現在では画像解析により客観的に評価する技術が開発され、実用化が進んでいる。一方で、脂質はおいしさに深く関与していることが知られており<sup>1)</sup>、肉質の評価と

同様に脂質を評価する試みも進められている。おいしさを評価する従来の方法には、ワーナーブラッツラー剪断力を用いた食感の測定や訓練された官能パネルを使用した官能分析などがあり、これらは高価な装置を用い、牛肉を少量であるが切り取らなければならないため破壊的で、時間がかかる。

牛肉の品質に関する情報の取得や提供は消費者の嗜好性に沿った牛肉を流通するにあたって重要



な試みである。近赤外分光法は、従来の品質評価方法と比較し、使いやすく低価格な測定装置であることに加え、非破壊的かつ客観的な評価ができる。われわれは平成30年度に可視・近赤外分光放射計 (Advanced Spectral Devices) を用い、十勝若牛<sup>®</sup>における消費者嗜好性をベースとした分光分析による赤身肉に関する研究を実施した。その結果、食味試験での香りの評価値ならびにオレイン酸割合の推定が可能であるのではないかという結果が得られた (それぞれ、 $R^2=0.53$ ,  $R^2=0.68$ )。しかしながら、同装置は、据え置き型であり、枝肉冷蔵庫内での利用は不可能である。

そこで本研究では、ポータブルな分光センサーを用いた牛枝肉の食味性評価ならびに横断面のオレイン酸割合の推定を目的とし、枝肉冷蔵庫内での近赤外分光センサーの実用化に向け、牛枝肉を用いた測定時間および測定方法を検討し、筋間脂肪の吸光度測定を行い、今回は、オレイン酸割合の推定可能性を検討した。

## 2. 方 法

分光測定には2019年8月から10月にかけて北海道内の食肉センターで処理された交雑牛78頭を用い、枝肉横断面の筋間脂肪部分のスペクトルを

1,100から1,350nmの間を1nm間隔で251波長分測定した。スキャン時間は20秒であった。分光センサーはSPECTRAL ENGINESのNMモジュールを用いた (Fig. 1)。測定した同一箇所から、長さ6cm、幅2.5cmのポリエステル板を用いて、まんべんなく10mg程度の脂肪サンプルを削りとり、脂肪サンプルを採取した。分析までの間、チャック付きのプラスチック製の袋に入れ、 $-20^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。脂肪サンプルを5%の塩酸を含むメチルアルコール3mlが入った試験管に入れ、 $100^{\circ}\text{C}$ で3時間加熱しメチル化した。その後ヘキサンを3ml加え、1分間振とうし、分離した上層をバイアル瓶に移してガスクロマトグラフィー (GC2010; 島津製作所, 京都) で分析した。分析にはキャリアーガスとしてヘリウムを用い、流量は毎分1.4mLとした。キャピラリーカラム (ULBON HR-SS-10,  $0.25\text{mm} \times 25\text{m}$ ; 信和化工社, 京都) を用い、分析開始時温度は $140^{\circ}\text{C}$ 、昇温は $210^{\circ}\text{C}$ まで毎分 $5^{\circ}\text{C}$ とし、その後10分の保持時間を設けた。インジェクター、検出器の温度は $250^{\circ}\text{C}$ とした。各脂肪酸の同定には標準試料のメチルエステルキット (GLサイエンス社, 東京) を分析し、脂肪酸のピーク面積を数値化することで脂肪酸割合を算出した。同定した脂肪酸はミリ



Fig. 1 Small size module used for spectroscopic analysis and installation of this module to MIJ camera available in a carcass chiller room

スチン酸 (C14:0), ミリストレイン酸 (C14:1), パルミチン酸 (C16:0), パルミトレイン酸 (C16:1), ステアリン酸 (C18:0), オレイン酸 (C18:1) およびリノール酸 (C18:2) の7種類であり, 同定した7種類の脂肪酸に占めるオレイン酸の割合をオレイン酸割合として計算した。なお, 同定した脂肪酸以外の脂肪酸も少量認められたが, ここでは同定した脂肪酸濃度の合計を100%として各脂肪酸の濃度を算出した。

理化学的に分析したオレイン酸割合をターゲット値とし, 分光分析により測定されたスペクトルを用いてPLS回帰分析を行った。78頭から得られた一頭につき20本のスペクトルのうち, 吸光度が比較的安定していた6秒以降の計1,170本のスペクトルを用いた。

推定に用いたスペクトルは, すべて測定時に吸光度計算がされているabsorbance (吸光度) データから用いた。同一のオレイン酸ならびにMUFA割合の実測値が多数存在するため, n-Fold Cross-Validationを行った。

### 3. 結果と考察

用いた材料牛の筋間脂肪におけるオレイン酸割合は,  $55.51 \pm 3.80\%$ であった。牛の筋間脂肪中脂質および脂肪酸組成に対する品種, 性および蓄積部位の影響<sup>2)</sup>より, オレイン酸割合の品種間における差は, 黒毛和種 (57.3%) がホルスタイン種 (50.3%) よりも高く, 交雑種 (53.4%) は両品種の中間値をとる傾向を示したと報告されている。本研究で用いた供試牛は肥育月齢の少し長い (平均34か月齢) 交雑牛であり, 一般的な交雑牛よりも若干オレイン酸割合等が高い値となったと推察した。また, 脂肪酸組成は種雄牛により有意な差があることが認められており<sup>3)</sup>, 本研究で測定されたオレイン酸割合における最小値と最大値のば

らつきの要因の一つも種雄牛の違いによるものと考えられる。

PLS回帰分析によって個体ごとの平均スペクトルを用いて推定されたオレイン酸と近赤外分光センサーで測定可能な251波長において, およそ1,170および1,240nmの波長で相関が高い傾向がみられた。さらに測定された吸光度スペクトルである測定波長範囲の1,100~1,350nmのなかで, 1,230nm付近の吸光度スペクトルが下にシフトした。Pullanagariら<sup>4)</sup>は, 脂肪酸のC-H結合が行われる1,100~1,400nmは, 牛肉風味特性の正確な予測が可能なスペクトル領域であると報告した。また, 田中ら<sup>5)</sup>は, 近赤外画像において, オレイン酸割合が高い試料ほど近赤外スペクトルは下にシフトする傾向にあると報告しており, 本研究においては1,230nm付近が, 脂肪酸中のC-H結合由来の波長帯であることが示唆された。

ガスクロマトグラフ分析によって測定されたオレイン酸割合の実測値と, PLS回帰分析によって近赤外分光センサーより得られた6秒から20秒の吸光度スペクトル1,170本から推定されたオレイン酸割合の推定値との相関をFig.2-aに示した。推定モデルを作成せず, すべてのスペクトルを訓練データとして用いたため, ガスクロマトグラフ分析による実測値とPLS回帰分析による推定値における決定係数は高くなった ( $r^2 = 0.91$ )。6秒から15秒の吸光度スペクトル702本を用い, PLS回帰を実施した場合のオレイン酸割合実測値と推定値との関連性をFig.2-bに示した。決定係数は, 0.87であり, 一頭当たりの測定時間を15秒まで短縮できる可能性が示唆された。

今回使用した分光センサーは, 非常に小型であり, 今回の測定においては, 冷蔵庫内にて温度を安定化させるための静置をすることなく, 即時に使用した。また, 同装置はコンピュータのUSB端子に接続し, 専用のソフトウェアをインストール

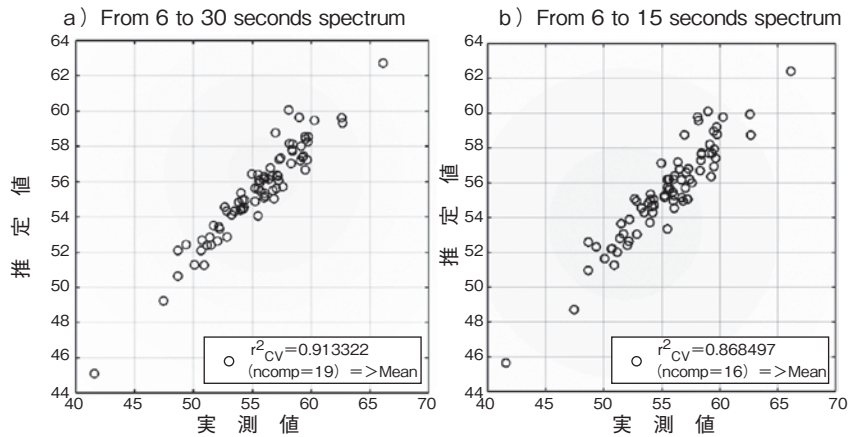


Fig. 2 Relationship between measured and spectroscopically predicted oleic acid content of intermuscular fat in Crossbred

すると、利用できるものであるため、例えば、一般社団法人ミート・イメージ ジャパンが開発したMIJ-30などのUSB端子を持つ枝肉カメラとの親和性も高く、食肉流通の現場で活用する次世代の格付システムとして大きな期待が持たれる。

#### 4. 要 約

ポータブルな分光センサーを用いた牛枝肉横断面のオレイン酸割合や食味性の推定を目的とし、牛枝肉の筋間脂肪の吸光度測定を行い、今回は、オレイン酸割合の推定可能性を検討した。供試牛として北海道内の食肉センターで処理された交雑牛78頭を用いた。枝肉横断面の筋間脂肪部分のスペクトルを1,100~1,350nmの間を1 nm間隔で251波長分測定した。スキャン時間は20秒であった。分光測定に用いた近赤外分光センサーはSPECTRAL ENGINESのNMモジュールである。

ガスクロマトグラフ分析によってオレイン酸割合(実測値)を測定した。PLS回帰分析によって吸光度スペクトルを用いたオレイン酸割合の推定を行った。オレイン酸割合(実測値)の平均値と標準偏差は、 $55.51 \pm 3.80\%$ であった。オレイン酸割合の実測値と推定値との決定係数は、6秒から15秒の吸光度スペクトルを用いた時で、その決定係数は0.87と高かった。

#### 文 献

- 1) Wood, J. D., Richardson, R. I., Nute, G. R., Fisher, A. V., Campo, M. M., Kasapidou, E., Sheard, P. R., Enser, M. : *Meat Science*, **66**, 21~32, 2004.
- 2) Yoshimura, T., Namikawa, K. : *Japanese Journal of Zootechnical Science*, **56**, 122~129, 1985.
- 3) 井上慶一, 平原さつき, 撫年浩, 藤田和久, 山内健治 : 日本畜産学会報, **73**, 381~387, 2002.
- 4) Pullanagari, R. R., Yule, I. J., Agnew, M. : *Meat Science*, **100**, 156~163, 2015.
- 5) 田中等幸, 丸山新, 棚橋英樹 : 肉用牛研究会報, **91**, 2~7, 2011.

## 枝肉の異臭クレーム防止のためのと畜場における 最適な冷却温度管理法の開発

Development of an appropriate method of cooling temperature control for prevention of bone taint of beef carcasses in slaughterhouses

猪 島 康 雄

(岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)

Yasuo Inoshima

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Failures of carcass chilling at slaughterhouses can cause severe quality damage or bacterial proliferation. Currently, in many slaughterhouses, the surface temperature and the core temperature of carcasses (surface temperature, core temperature) are rarely measured in daily operation. Whereas, the temperature in the chilling room (room temperature) is measured over time and automatically. In this study, development of an appropriate method was conducted to statistically estimate the surface and core temperatures from room temperature.

First, a causal analysis of factors affecting carcass temperature was performed by using graphical modelling generated from daily business reports provided by chilling operators. Next, the surface and core temperatures were measured under the conditions most likely to fail from the result of causal analysis, with the consent of stakeholders. All model equations were calculated by the least square method. Finally, the confidence limit of room temperature was calculated by considering defrosting inevitable in the chilling process. A simplified reference table based on the model formula was created.

The analysis revealed that the factor that mostly affected carcass temperature was the number of carcasses loaded in the chilling room. The surface and core temperatures were represented by a logistic curve and an exponential curve, respectively. The confidence limit of room temperature was indicated by a modified Gompertz curve.

Since the correlation which is charted and recognizable, it may help chilling operators to understand the causality. Understanding of the causality may lead to immediate correction in case of chilling failures. With the model formulas, approximate core temperature can be grasped approximately from the room temperature in various situations of carcass loading. The values in the simplified reference table can be applied as the upper limit of the room temperature. These methods are adaptable to actual operation, easy to use, and based on statistical evidence.

## 1. 目 的

異臭クレーム肉はと畜場併設の食肉処理場でも大腿骨の脱骨時に検出されることがあり、と畜処理後の枝肉の緩慢な冷却時間が原因と考えられている<sup>1)</sup>。大腿骨周辺部位の異臭肉については*Clostridium*属菌に起因する異臭(ボーンテイント)が古くから知られており<sup>2,3)</sup>、その抑制には枝肉深部温度を24時間以内に15℃以下に下げることがJamesらによって推奨されている<sup>4)</sup>。欧州規則853/2004(Regulation EC No 0853/2004)では深部温度7℃未満とされ<sup>5,6)</sup>、欧州安全機関(European Food Safety Authority ; EFSA)による科学的意見書も公表されている<sup>7)</sup>。我が国では厚生労働省の食品製造におけるHACCP(Hazard Analysis and Critical Control Point)入門のための手引書(と畜・食肉処理編)において冷却工程の管理基準(Critical limit ; CL)を作業終了後24時間以内に枝肉表面温度10℃以下を一例としてあげている<sup>8)</sup>。しかし、10℃に達するまでの「時間の規定」はない。また、その管理はと畜業者等が負うが、冷却中あるいは出庫時に数百頭すべての温度を計測することは現実的に不可能である。深部温度の計測については、温度計刺入による品質劣化を危惧する食肉関係団体の抵抗もある。さらに、食のグローバル化等を背景に、2018年6月13日に公布された食品衛生法の一部を改正する法律は2020年に施行され、猶予期間の1年を経て、2021年にはHACCPによる衛生管理が義務化される。

そこで、以下について解析し、牛枝肉の新しい冷却温度管理法を開発することとした。

1. 枝肉の温度の推移に影響する因子の因果関係の統計学的解析
2. 冷却室の庫内温度と保管場所の違いによる牛枝肉の表面および深部温度変化の解析

## 3. 冷却室の経時的温度変化の早見表作成

## 2. 方 法

### 2.1 枝肉の温度の推移に影響する因子の因果関係の統計学的解析

と畜場における2016年度の管理記録データを原因(外部気温、外部湿度、と畜頭数)、中間特性(入庫終了時刻、庫内設定温度、と畜当日16:30の庫内温度)、結果(冷却室から保管庫への移動日の8:00の庫内温度、同時点の枝肉表面温度)の3層に分け、統計解析ソフト(StatWorks, JUSE)のグラフィカルモデリング(Graphical modelling ; GM)に供した。適合度指数を0.9以上として、共分散選択の閾値を0.1から開始、標本集団での偏相関を順次切断し、母集団の相関係数を算出、相互関係を示すパス図を描画した。これにより最も枝肉が冷えにくい条件を導き出した。

### 2.2 冷却室の庫内温度と保管場所の違いによる牛枝肉の表面および深部温度変化の解析

2.1の結果から得られた、枝肉冷却に最も負荷のかかる条件下(冷却室への最大格納容量)において、以下の2つの調査を行った。

#### 2.2.1 配置場所による枝肉温度差の調査

冷却室の四隅と中央の5群(1群3頭)の15頭について、異臭(ボーンテイント)のクレームが多発する大腿骨近傍の深部温度を測定した。測定は肉用温度計(サーモミート、佐藤計量器製作所)を用いて観測者と記録者の2名体制で冷却開始から1時間ごとに8時間、経時的に測定した。統計解析ソフト(JMP, SAS)を用いてLeveneの検定により等分散性を調べ、等分散ならTukey-Kramerの検定を、等分散でなければKruskal-Wallisの検定より群間比較を行った。

#### 2.2.2 冷却室の庫内温度と枝肉温度の相関の調査

最も冷えにくいと判明した配置場所の1群(中



中央群)において、庫内温度ならびに表面および深部温度を測定した。庫内温度の測定には枝肉冷却室温度の監視装置(デマンド監視装置、三菱電機)を用い、枝肉温度にはロガー(表面温度:サーモクロンGタイプ、KNラボラトリーズ、深部温度:データロガー記憶計本体およびセンサー、佐藤計量器製作所)を用いて冷却開始から出庫までの48時間、経時的に測定した。JMPを用いて庫内温度から表面および深部温度を推定するためにモデル式を非線形最小二乗法により算出した。

### 2.3 冷却室の経時的温度変化の早見表作成

庫内温度から枝肉温度の制御を可能とするため、以下の解析を行った。

#### 2.3.1 庫内温度の信頼限界の算出

冷却には霜取りが不可避であるため、一時的な冷却の中断が生じる。この霜取りの影響を小さくするため、通常、冷却装置は2系統で構成されているが、それでも一時的な庫内温度の上昇は避けられない。そこで、霜取りによる一時的な庫内温度の上昇を信頼限界の上限とし、信頼限界のモデル式を算出した。

#### 2.3.2 日報報告時における庫内温度管理限界の早見表の作成

実際の運用は、と畜場管理者が任命する冷却工程管理の責任者が行うため、専門知識が不要で、

誰でも簡便に利用可能である必要がある。そこで、日報報告時刻における庫内温度の信頼限界を把握するための早見表を作成した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 枝肉の温度の推移に影響する因子の因果関係の統計学的解析

GMによる因果解析は工業品の製造分野では用いられているが、食品の製造分野では国内外ともに報告がなく、本調査が初の試みである。項目間で得られた相関係数の符号と現場の実情との間に相違があった場合、その項目間に看過されている潜在因子が存在することを意味する。潜在因子として、搬入家畜数の季節変動、と畜作業の効率および冷却設備の性能が存在することが示唆された(Fig. 1)。また、枝肉温度に最も影響を及ぼすのは入庫枝肉数であることが明らかとなった。実際に、過去の品質クレームは、従来注意が払われてきた気温の高い夏季ではなく、入庫枝肉数の多い場合に生じている。気温については細菌増殖への影響と混同されてきたものと思われた。

### 3.2 冷却室の庫内温度と保管場所の違いによる牛枝肉の表面および深部温度変化の解析

#### 3.2.1 配置場所による枝肉温度差の調査

20時間経過時で中央群が最も冷却状態が悪かった(分散分析にて $p = 0.0132$ ) (Fig. 2)。

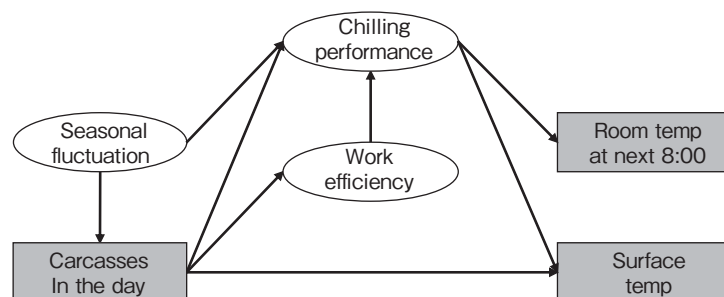


Fig. 1 Causality hypothesis by graphical modelling among affectors of chilling processes for beef carcasses. Gray boxes show the data recorded. White ovals indicate the estimated lurking factor. Arrows show causality.



3.2.2 冷却室の庫内温度と枝肉温度の相関の調査

庫内温度の変化に伴い、表面温度はロジスティック式 (A)、深部温度は指数式 (B) で表すことができた (Fig. 3)。

$$Y = Y_{min} + (Y_{max} - Y_{min}) / (1 + \exp(-b * (X - X50))) \dots \dots \dots (A)$$

$$[Y_{min} = 0.78, Y_{max} = 15.20, b = -0.63, X50 = 9.32]$$

$$Y = Y_{inf} - (Y_{inf} - Y_0) * \exp(-b * X) \dots \dots \dots (B)$$

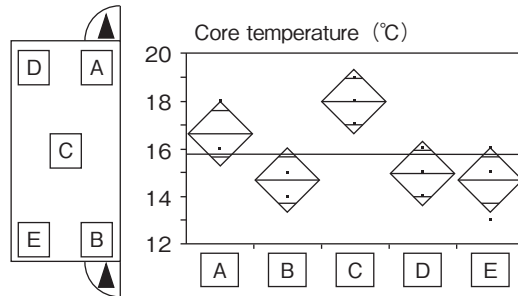


Fig. 2 Comparison of core temperature of beef carcasses among five groups in different position at 20 hours chilling. Diamond indicates 95 % confidence interval of population mean. Center horizontal line indicates overall average.

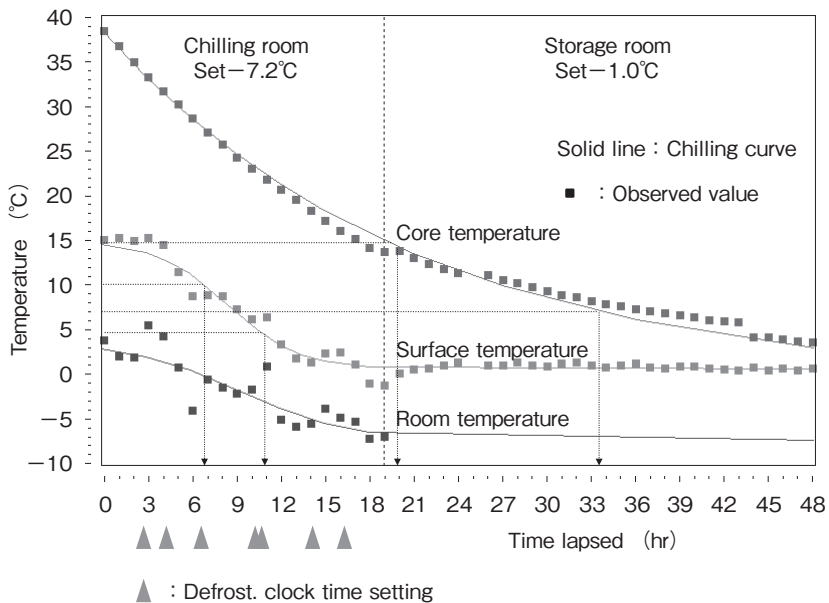


Fig. 3 Modelling of chilling curves by least squares method. When the model formula was applied to the observed values, the error was minimized in the case of the exponential formula for the core temperature and in the case of the modified Gompertz for the surface and the room temperatures. According to the modelling of chilling curves, the surface temperature 10°C notified by the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan was 7 hours later, the surface temperature 4.4°C of the Federal Regulations before revision was 11 hours, and the core temperature 15°C of bone taint suppression proposed by James et al. within 24 hours, it reached after just 20 hours, and the core temperature 7°C of the European regulations reached after 34 hours, and all conditions were satisfied.

[Yinf=39.72, Y0=2.14, b=0.057]

表面温度において初期値の維持が見られるが、一方の深部温度については冷却開始直後から低下している。その理由は、最終洗浄後の枝肉表面には水切り後であっても薄い水の膜ができており、表面の気化熱変換にいたるまでは一定であるためと考えられる。

3.3 冷却室の経時的温度変化の早見表作成

3.3.1 庫内温度の信頼限界の算出

庫内温度の信頼限界上限は次の修正ゴンベルツ式 (C) で示された (Fig. 4)。

$$Y = Y0 + (Yinf - Y0) \cdot \exp(-\exp(-b \cdot (X - X50))) \dots\dots\dots (C)$$

[Yinf= -2.5, Y0=7.5, b=0.373, X50=8.03]

3.3.2 日報報告時における庫内温度管理限界の早見表の作成

上述の式をもとに、早見表を作成した (Table 1)。

HACCPでは全枝肉についてモニタリングを行

う必要があるが、仮に、枝肉の深部温度でなく表面温度を対象に非接触式の赤外線放射温度計あるいは赤外線サーモグラフィカメラで測定としても、すべての枝肉温度を計測あるいは監視を行うためには新たに人員を配置しなければならない。しかし、いずれのと畜場においても配置できる余剰人員はないため、全枝肉についてモニタリングを実施することは困難である。本研究により得られた早見表を用いれば、全枝肉の温度を測定しなくても、庫内温度から枝肉温度を適正に管理することができる。新たな設備投資、人員配置および手技は不要である。どのと畜場にも配置されている庫内温度の監視装置を使用するため、と畜場管理者の負担や、食肉の小売り価格への影響もなく、早期に、かつ容易に導入できる。また、枝肉温度の適正管理により、ポーンテイント等のクレーム肉発生を低減できる。同じ手法を用いることで、全国のさまざまな規模のと畜場に導入が可能である。

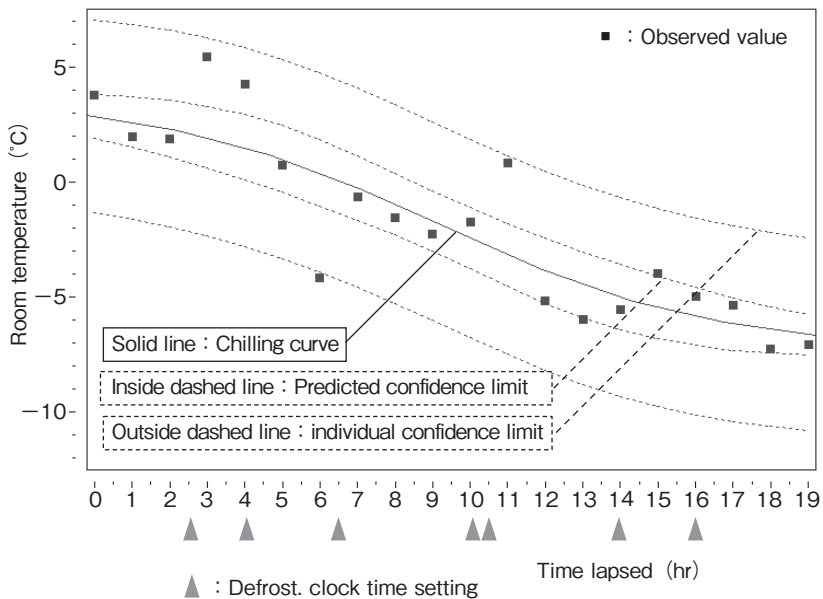


Fig. 4 Confidence limit of room temperature. Temporary temperature rise appears immediately after defrosting. Since defrost is set on a clock time basis, the operation timing varies depending on the work end time.

Table 1 Simplified table for critical limit.

Chilling start Clock time	Critical limit (°C)	
	The day of slaughter 16 : 30	The next day 8 : 00
13 : 00	6.0	-2.4
13 : 10	6.1	-2.3
13 : 20	6.2	-2.3
13 : 30	6.2	-2.3
13 : 40	6.3	-2.2
13 : 50	6.4	-2.2
14 : 00	6.4	-2.2
14 : 10	6.5	-2.1
14 : 20	6.5	-2.1
14 : 30	6.6	-2.0
14 : 40	6.6	-2.0
14 : 50	6.7	-1.9
15 : 00	6.7	-1.9
15 : 10	6.8	-1.8
15 : 20	6.8	-1.8
15 : 30	6.9	-1.7
15 : 40	6.9	-1.7
15 : 50	7.0	-1.6
16 : 00	7.0	-1.6
16 : 10	7.0	-1.5
16 : 20	7.1	-1.4
16 : 30	7.1	-1.4

Chilling operators can apply the values in the table as the upper limit of the room temperature. By checking of air circulation, number of carcasses and the distribution in the chilling room when the room temperature continuously exceeded the upper limit twice, deviation of carcass temperature can be prevented before happens.

今後は、微生物増殖について検証を行う予定である。具体的には、食のグローバリズムに対応できるサンプリングプランを検討し、その方法にて冷却前および後の指標菌の増減を検証する。

#### 4. 要 約

と畜場での枝肉の冷却工程の逸脱は深刻な品質劣化や細菌増殖を引き起こす。現在、多くのと畜場では日々の運用において枝肉の表面温度および深部温度（以下、表面温度、深部温度）は恒常的には計測されていない。一方で、冷却室内の庫内温度（以下、庫内温度）は多くのと畜場で経時的かつ自動的に計測されている。そこで本研究では、現場の運用実態に適合し、簡便で、統計的根

拠に基づいた冷却工程管理法を開発することとした。

まず、冷却担当者の日々記録されている冷却工程管理日報の記録から最新の多変量解析法であるグラフィカルモデリング（GM）を用いて枝肉温度に影響する因子についての因果解析を行った。

次に、因果解析で判明した最も温度管理の逸脱の起こりやすい条件下において関係団体の合意のもと表面温度および深部温度を測定し、庫内温度から表面温度および深部温度を推定するためモデル式を最小二乗法にて算出した。最後に、冷却工程に不可避である霜取り作動を考慮した庫内温度の信頼限界を算出した。冷却開始時刻は当日のと畜処理状況によって異なるため、日報報告時刻にお

ける庫内温度の管理限界をただちに把握できるように早見表を作成した。

その結果、枝肉温度に最も影響を及ぼすのは、入庫枝肉数であることが明らかとなった。表面温度についてはロジスティック式、深部温度については指数式で表すことのできるモデル式が得られた。霜取り作動も考慮した庫内温度の信頼限界については修正ゴンベルツ式でのモデル式が得られた。

GMでは因果関係が視覚的に示されるため、冷却担当者が冷却工程の因果関係を包括的に把握しやすく、温度管理の逸脱の防止、予測および是正措置を的確に実行できる。モデル式ではさまざまな入庫状況において庫内温度からおおよその深部温度を把握することができ、庫内温度管理限界早見表を冷却担当者はただちに運用できることから、ポーンテイント低減が可能となった。

#### 引用文献

- 1) Nychas, E. G.-J., Skandamis, N. P., Tassou, C. C., Koutsoumanis, P. K. : *Meat Science*, **78**, 77~89, 2008.
- 2) Kamenik, J. : *Maso International*, **1**, 3~10, 2013.
- 3) De Lacy, K. M., Broda, D. M., Bell, R. G. : *Food Microbiology*, **15**, 583~589, 1998.
- 4) James, S. J., James, C. : *Meat Refrigeration*, 13~14, CRC Press, Boca Raton, 2002.
- 5) Regulation (EC) No 0853/2004 : Official J EU, EN ed. **47**, L139/55, 2004.  
<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=OJ:L:2004:139:TOC>
- 6) Food Standards Agency : Meat Industry Guide, **Chap.10**, 12-13, 2015.  
<https://www.food.gov.uk/business-guidance/meat-industry-guide>
- 7) EFSA panel on Biological Hazards (BIOHAZ) . : *European Food Safety Authority Journal*, **12**, 3601, 2014.
- 8) 厚生労働省 : 食品製造におけるHACCP入門のための手引書 (と畜・食肉処理編)  
<https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-11130500-Shokuhinanzenu/0000098996.pdf>

## 地鶏肉の美味しさの決定要因の解明（Ⅲ）

Identification of the main factor determining the taste of Jidori meat（Ⅲ）

本田 和久

（神戸大学大学院農学研究科）

Kazuhisa Honda

（Graduate School of Agricultural Science, Kobe University）

Jidori is one of tasty and popular meats in Japan. However, the main factor determining the taste of Jidori meat have not been identified. In the present study, we compare the insoluble collagen ratio and share force value of skeletal muscles of breast and thigh muscle of broiler and Jidori chicken in order to identify the candidate index indicating the palatability of Jidori meat. The insoluble collagen ratio of *biceps femoris* of Hyogo ajidori was higher than that of broiler meat. The share force value of *biceps femoris* of Hyogo ajidori meat was higher than that of broiler meat. The share force values of *biceps femoris* of Hakata Jidori, Hinai jidori, Miyazaki Jidokko, Nagoya, and Tamba Kurodori meat was higher than that of broiler meat. There is no significant difference in the concentration of amino acids and nucleic acid-related components in these meats. These findings suggest that share force value of *biceps femoris* of Jidori meat is the common main factor of the taste of Jidori meat.

### 1. 目 的

地鶏肉は我が国が誇る優れた食味の食材であり、その美味しさは我が国鶏肉市場の約9割を占める安価な若どり（ブロイラー）の肉とは一線を画す。しかしながら、地鶏肉は鶏肉としては高価格であるにも関わらず、牛肉の肉質等級のような品質を保証し得る評価基準が確立されていない。そのため、平成11年に地鶏肉のJAS規格が決定されて以降も、地鶏肉とブロイラー肉との美味しさの違いが十分に消費者に認識されず、その市場拡大が思うように進まない状況が続いている。このような状況下、地鶏肉の価格低下による需要増加を目的として、地鶏の品種改良による増体性の改

善が進められているが、地鶏肉の美味しさの決定要因が明らかにされないまま、増体性のみによって地鶏の品種改良が進められれば、地鶏肉の価格低下は達成されても、その美味しさが損なわれてしまうことが懸念される。それゆえ、地鶏肉の美味しさの決定要因を明らかにすることは急務と言えるが、これまでの主に「むね肉」を用いた化学分析や官能検査の結果からは、その決定要因を明らかにすることはできなかった。

地鶏肉の美味しさは、「適度な菌ごたえ」や「うま味」という言葉で表現される。このうち、「うま味」を形成するとされているアミノ酸および核酸関連物質については、地鶏肉とブロイラー鶏肉の抽出液に含まれるアミノ酸や核酸関連物質

の含量には大きな違いは見られないことが報告されている<sup>1-3)</sup>。一方、「適度な歯ごたえ」は骨格筋の筋線維組成の相違に基づくものであることが示唆されており<sup>4)</sup>、日齢<sup>5, 6)</sup>、あるいは飼育方法<sup>7)</sup>により影響されることが報告されている。また、比内地鶏においては雌のみが鶏肉生産用に供されており、雄の食味を改善するべく効率的な去勢方法も検討されている<sup>8)</sup>。ここで、食肉の歯ごたえは不溶性コラーゲン含有率の上昇によって増加することが知られている<sup>9)</sup>。我々は、これまで鶏肉の高需要部位でありながら、構成する骨格筋の多様性から均一な試料を調製することが困難であった「もも肉」の官能検査法を確立し、地鶏肉の美味しさは一般的なうま味成分であるアミノ酸や核酸関連物質の含量の増加によるものではなく、骨格筋繊維の質、すなわち食感の違いによる可能性を示した<sup>10)</sup>。さらに、兵庫県の地鶏であるひょうご味どりの美味しさは、不溶性コラーゲン含有率の上昇に基づく食感の改善に基づくことを示唆した<sup>11)</sup>。しかしながら、浅胸筋のみから構成されるむね肉とは異なり、多様な骨格筋の組み合わせによって構成されるもも肉の、どの骨格筋が食感を決定づけているのか不明である。

本研究では、種々の地鶏肉の不溶性コラーゲン含有率と剪断力価との関係を明らかにするとともに、我が国を代表する種々の地鶏肉の物性を明らかにすることにより、地鶏肉の美味しさの決定要因を確定する。

## 2. 方法

### 2.1 剪断力価測定部位の決定

0日齢の雄の地鶏（ひょうご味どり）およびブロイラー（ROSS308）を、それぞれ97日齢および42日齢まで飼育した。12時間絶食後、炭酸ガス麻酔下で安楽死させ、脱羽後、むね肉およびもも肉を24時間冷蔵保存後、特徴的な筋線維組成を示

す骨格筋（Ⅰ型、ⅡA型、およびⅡB型筋繊維からなる縫工筋、ⅡA型筋繊維からなる大内転筋、ⅡB型筋繊維からなる浅胸筋、ⅡAおよびⅡB筋繊維からなる大腿二頭筋、およびⅢ型筋繊維からなる長内転筋）を減圧包装後、 $-30^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。各骨格筋の総コラーゲン含有率および可溶性コラーゲン含有率はLiuらの方法<sup>9)</sup>に従い測定した。剪断力価は、測定日に凍結保存した骨格筋を解凍後、その中心部から最も長い辺が筋線維に平行になるように、 $1.5\text{cm} \times 1.0\text{cm} \times 0.5\text{cm}$ のブロック状の肉片を切り出した。肉片を減圧包装し、 $80^{\circ}\text{C}$ の温浴中で10分間加熱した。氷上で冷ました後、Warner-Bratzler剪断力価計（イマダ、FR-NB-80, ZTA-DPU, mx2-500N）を用い、剪断力価を測定した。なお、肉片は剪断速度 $60\text{mm}/\text{秒}$ で筋線維の向きに垂直に剪断した。

### 2.2 種々の地鶏肉の大腿二頭筋と浅胸筋の剪断力価の測定

ブロイラー、はかた地どり、比内地鶏、みやざき地頭鶏、名古屋コーチン、および丹波黒どりを購入し、大腿二頭筋および浅胸筋の剪断力価を2.1と同様の方法で測定した。

### 2.3 アミノ酸および核酸関連物質の分析

2.2で購入したもも肉から大腿二頭筋に含まれる遊離アミノ酸をワコーパック<sup>®</sup>ワコーシル<sup>®</sup>-PTC4.0（和光純薬工業株式会社）を用いて、核酸関連物質をAtlantis<sup>®</sup> dC18 Column（日本ウォーターズ株式会社）を用いて、それぞれ解析した。

### 2.4 統計解析

2群間の比較はスチューデントのt検定により、多重比較はブロイラーを対照としたDunnett法により、それぞれ統計解析した。

## 3. 結果と考察

ブロイラーとひょうご味どりの浅胸筋、大腿二頭筋、縫工筋、および長内転筋の不溶性コラーゲ



ン含有率と剪断力価の測定を行った結果、ブロイラーと比較して、ひょうご味どりの大腿二頭筋と縫工筋の不溶性コラーゲン含有率が高い傾向にあること (Table 1), 大腿二頭筋の剪断力価が有意に高い値を、縫工筋の剪断力価が高い傾向を、それぞれ示すこと (Table 1) が明らかになった。これらの結果から、ブロイラーと地鶏肉のもも肉の食味の違いに影響する骨格筋は大腿二頭筋であり、その指標として剪断力価を用いることができることが示唆された。また、ブロイラーとひょうご味どりの浅胸筋の不溶性コラーゲン含有率には有意差が認められないものの、剪断力価はひょうご味どりのほうが有意に低い値を示したことから、むね肉の柔らかさが地鶏肉の新たな特徴として提案できる可能性が示された。

ひょうご味どりの大腿二頭筋と浅胸筋で認められた剪断力価における特徴が、その他の地鶏でも認められる可能性について明らかにする目的で、

はかた地どり、比内地鶏、みやざき地頭鶏、名古屋コーチン、および丹波黒どりと、ブロイラーの大腿二頭筋と浅胸筋の剪断力価を比較した。その結果、ブロイラーと比較して、調べたすべての地鶏肉の大腿二頭筋の剪断力価が有意に高い値を示した (Table 2)。一方、浅胸筋の剪断力価については、比内地鶏と丹波黒どりのみが、ブロイラーの値よりも有意に低い値を示した (Table 2)。Sasakiらは、薩摩地鶏の大腿二頭筋の剪断力価はブロイラーのそれに比べ高いことを報告している<sup>12)</sup>。これらの結果から、地鶏においては、剪断力価がその品質を示す指標になることが強く示唆された。鶏肉の物理学的特性は鶏種<sup>13-15)</sup> だけではなく、飼育方法にも影響を受ける。例えば、屋内よりも屋外で飼育された鶏の肉は歯ごたえや多汁性に富むことが報告されている<sup>16)</sup>。本研究においては、市販の地鶏肉を購入し、その物理学的特性を調べたが、今後、大腿二頭筋の剪断力価の高さ

Table 1 Comparison of unsoluble collagen ratio and share force value of skeletal muscles between broiler and Hyogo ajidori

Skeletal muscles	Unsoluble collagen ratio (%)		Share force value (N)	
	Broiler	Hyogo ajidori	Broiler	Hyogo ajidori
<i>Pectoralis major</i>	70.6 ± 6.2	72.5 ± 6.8	10.93 ± 1.4	5.63 ± 1.0*
<i>Biceps femoris</i>	72.0 ± 3.4	79.7 ± 1.8†	6.19 ± 1.1	8.57 ± 1.2*
<i>Adductor longus</i>	75.6 ± 5.6	78.6 ± 3.7	6.14 ± 1.2	7.27 ± 2.1
<i>Sartorius</i>	66.3 ± 5.0	78.5 ± 3.7†	6.41 ± 1.4	8.60 ± 1.1†

Values are means ± SE of 4~6 pieces.

† and \* indicate significant difference between broiler and Hyogo ajidori meats (†,  $p < 0.1$ ; \*,  $p < 0.05$ )

Table 2 Comparison of share force value of *Biceps femoris* and *Pectoralis major* of different kind of chickens

Chickens	<i>Biceps femoris</i>	<i>Pectoralis major</i>
Broiler	5.87 ± 0.60	9.98 ± 0.79
Hakata jidori	10.49 ± 0.95*	6.38 ± 0.90
Hinai jidori	12.80 ± 2.08*	4.61 ± 1.02*
Miyazaki jidokko	11.01 ± 1.22*	6.55 ± 1.01
Nagoya	12.19 ± 1.09*	9.94 ± 2.39
Tamma kurodori	10.94 ± 1.92*	4.24 ± 0.52*

Values are means ± SE of share force value (N) of 5~8 pieces.

\* indicates significant difference between broiler and Jidori meats ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** Comparison of amino acids and nucleic acid-related components of *Biceps femoris* extract of different kind of chickens

	<i>Broiler</i>	<i>Hakata jidori</i>	<i>Hinai jidori</i>	<i>Miyazaki jidokko</i>	<i>Nagoya</i>	<i>Tamba kurodori</i>
Amino acids (nmol/ml)						
As p	59.3 ± 20.1	119.0 ± 51.7	25.2 ± 5.7	56.0 ± 4.8	73 ± 62.9	62.2 ± 26.8
Glu	23.0 ± 2.7	62.6 ± 14.9	26.8 ± 7.3	26.7 ± 9.5	59 ± 17.2	60.2 ± 36.5
Ser	6.9 ± 2.2	11.1 ± 4.8	8.4 ± 3.2	4.5 ± 0.2	34 ± 18.0	11.5 ± 3.1
Gly	5.1 ± 1.0	6.1 ± 2.6	4.9 ± 2.2	8.1 ± 5.9	27 ± 23.9	18.0 ± 13.0
His	9.1 ± 2.5	21.0 ± 10.5	7.7 ± 1.4	11.7 ± 6.9	45 ± 17.7	18.7 ± 13.4
Ala	14.5 ± 7.5	79.5 ± 17.8	24.8 ± 7.7	13.8 ± 12.8	74 ± 71.5	3.8 ± 1.4
Pro	59.1 ± 36.9	254.3 ± 191.2	8.0 ± 5.6	3.4 ± 2.0	114 ± 110.8	9.5 ± 7.6
Tyr	26.0 ± 21.5	24.5 ± 6.7	3.5 ± 1.3	3.4 ± 2.1	9 ± 5.4	10.0 ± 8.3
Val	15.0 ± 11	16.9 ± 7.6	3.0 ± 0.8	1.6 ± 0.7	10 ± 7.2	4.5 ± 3.4
Met	11.2 ± 4.3	21.9 ± 7.1	2.5 ± 0.0	6.3 ± 3.4	8 ± 3.3	6.7 ± 4.1
Cys	11.2 ± 7.4	22.7 ± 5.4	5.2 ± 1.3	5.5 ± 2.5	11 ± 1.6	6.8 ± 4.6
Ile	12.2 ± 3.8	32.9 ± 21.2	15.3 ± 6.6	4.7 ± 2.8	10 ± 4.5	11.9 ± 11.0
Leu	18.9 ± 11.9	61.2 ± 26.8	2.5 ± 0.7	3.3 ± 0.8	12 ± 9.7	36.5 ± 32.4
Phe	6.6 ± 4.2	14.3 ± 6.0	4.2 ± 0.5	3.7 ± 1.9	19 ± 14.7	6.3 ± 4.9
Lys	20.8 ± 7.1	21.7 ± 4.5	15.7 ± 3.3	27.4 ± 5.8	35 ± 2.2	35.7 ± 9.2
Nucleic acid related components (nmol/ml)						
Inosinic acid	48.9 ± 19.5	99.8 ± 46.7	112.9 ± 34.4	53.8 ± 6.5	85.7 ± 37.2	74.6 ± 39.1
Inosine	126.3 ± 6.7	158 ± 12.3	124 ± 25.3	126.1 ± 14.2	122.8 ± 21.3	71.8 ± 24.3*
Hypoxanthine	158.7 ± 27.9	124.5 ± 11.4	76.9 ± 9.6	183.9 ± 21.2	128 ± 10.9	63.5 ± 19.8

Values are means ± SE of 3 pieces. \* indicates significant difference between broiler and Jidori meats ( $p < 0.05$ ).

を地鶏肉のゆるぎない特長として訴求するためには、その特長が、飼育環境に関わらず認められることを確認する必要があると考えられた。

アミノ酸および核酸関連物質の値には、丹波黒どりのイノシンを除いて有意な差は認められなかった (Table 3)。これらの結果から、アミノ酸や核酸関連物質は地鶏肉に共通性の高い特長にはならないことが示唆された。しかしながら、アミノ酸および核酸関連物質の含有率については解体前の生体の生理的条件と、解体後の流過程における熟成が大きく影響する。それゆえ、本実験においても鶏種間だけでなく同鶏種の個体間でも大きなばらつきが見られた。今後、分析サンプルの増加や同じ条件下における飼育実験の実施など、複数の都道府県の協力による研究の推進が必要と判断される。

これらの結果から、地鶏肉の美味しさを決定す

る要因として、大腿二頭筋の剪断力価の高さが示された。今後、非侵襲的な剪断力価の測定法を開発することによって、地鶏肉の肉質評価基準が構築されることが期待された。

#### 4. 要 約

本研究では、地鶏肉の美味しさの決定要因を明らかにする目的で、地鶏肉とブロイラーの種々の骨格筋における不溶性コラーゲン含有率および剪断力価を比較した。その結果、種々の骨格筋の中で、もも肉を構成する主要な骨格筋である大腿二頭筋の剪断力価がブロイラーのそれに比べて高いこと、その特徴は、種々の地鶏肉に共通の特徴であることが明らかになった。アミノ酸組成および核酸関連物質の組成に有意な違いは見られなかった。これらの結果から地鶏肉の美味しさの決定要因は、大腿二頭筋の剪断力価の高さにあることが

示唆された。

#### 文 献

- 1) 尾関教生, 吉田行夫, 加藤貞臣, 河村孝彦, 伊藤孝夫, 申七郎: 名古屋コーチン(名古屋種)鶏肉の食品組織学的特性(第1報)もも肉の結合組織について, *調理科学*, **25**, 301~305, 1992.
- 2) 山田未知, 山田幸二: 市販の会津地鶏肉における遊離アミノ酸と脂肪酸組成について, *日本食生活学会誌*, **24**, 177~182, 2013.
- 3) 松石昌典, 加藤綾子, 石毛教子, 堀剛久, 石田雄祐, 金子紗千, 竹之中優典, 宮村陽子, 岩田琢磨, 沖谷明紘: 名古屋コーチン, プロイラーおよび合鴨肉の食味特性の比較, *日本畜産学会報*, **76**, 423~430, 2005.
- 4) Fujimura, S., Koga, H., Takeda, H., Tone, N., Kadowaki, M., Ishibashi, T.: Chemical compositions of pectoral meat of Japanese native chicken, Hinai-jidori, and broiler of the same and marketing age, *Animal Science and Technology*, **67**, 541~548, 1996.
- 5) 岩本久雄: 鶏骨格筋の構造と産肉生理, *西日本畜産学会報*, **50**, 7~13, 2007.
- 6) 嶋澤光一, 荒木勉: 飼育形態が特産肉用鶏の肉色と筋線維特性に及ぼす影響, *日本家禽学会誌*, **36**, 371~376, 1999.
- 7) 仁木隆博, 佐伯祐里佳, 家入誠二, 米田一成, 荒木朋洋, 芝田猛: 飼育形態が特産肉用鶏の成長, 産肉性および脂肪蓄積に及ぼす影響, *日本暖地畜産学会報*, **55**, 157~166, 2012.
- 8) Rikimaru, K., Takahashi, H., Nichols, M. A.: An efficient method of early caponization in slow-growing meat-type chickens, *Poultry Science*, **90**, 1852~1857, 2011.
- 9) Liu, A., Nishimura, T., Takahashi, K.: Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles, *Meat Science*, **43**, 43~49, 1996.
- 10) 本田和久: 地鶏肉の美味しさの決定要因の解明(I), 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 公益財団法人伊藤記念財団, **36**, 8~12, 2017.
- 11) 本田和久: 地鶏肉の美味しさの決定要因の解明(II), 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 公益財団法人伊藤記念財団, **37**, 10~14, 2018.
- 12) Sasaki, K., Motoyama, M., Tagawa, Y., Akama, K., Hayashi, T., Narita, T., Chikuni, K.: Qualitative and quantitative comparisons of texture characteristics between broiler and Jidori-niku, Japanese indigenous chicken meat, assessed by a trained panel, *The Journal of Poultry Science*, **54**, 87~96, 2017.
- 13) Da Silva, D. C. F., de Arruda, A. M. V., Gonçalves, A. A.: Quality characteristics of broiler chicken meat from free-range and industrial poultry system for the consumers, *Journal of Food Science and Technology*, **54**, 1818~1826, 2017.
- 14) Mueller, S., Kreuzer, M., Siegrist, M., Mannale, K., Messikommer, R. E., Gangnat, I. D. M.: Carcass and meat quality of dual-purpose chickens (Lohmann Dual, Belgian Malines, Schweizerhuhn) in comparison to broiler and layer chicken types, *Poultry Science*, **97**, 3325~3336, 2018.
- 15) Wattanachant, S., Benjakul, S., Ledward, D. A.: Composition, color, and texture of Thai indigenous and broiler chicken muscles, *Poultry Science*, **83**, 123~128, 2004.
- 16) Stadig, L. M., Rodenburg, T. B., Reubens, B., Aerts, J., Duquenne, B., Tuytens, F. A.: Effects of free-range access on production parameters and meat quality, composition and taste in slow-growing broiler chickens, *Poultry Science*, **95**, 2971~2978, 2016.

# 非加熱食肉製品における生理活性発現に關与する 微生物の解明

Investigation of microorganism for expression of bioactivity in the  
uncooked meat products

竹田 志郎<sup>1</sup>・水野谷 航<sup>1</sup>・内山 淳平<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>麻布大学獣医学部動物応用科学科, <sup>2</sup>麻布大学獣医学部獣医学科)

Shiro Takeda<sup>1</sup>, Wataru Mizunoya<sup>1</sup> and Jyunpei Uchiyama<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>School of veterinary medicine, Department of animal science and biotechnology,

<sup>2</sup>Department of veterinary medicine, Azabu University)

We investigated the antioxidant activity and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in ten types of uncooked pork meat products. According to our results, the Coppa and Milano salami demonstrated the high antioxidation and ACE inhibitory activities among the tested samples. However, a correlation between the high activities of Coppa and Milano salami and their total peptide levels was not observed. The levels of carnosine and anserine, which are the functional peptides in meats, also did not correlate with the high antioxidation and ACE inhibitory activities. Our results indicate that these meat products possibly have the specific bioactive substances.

The Coppa and Milano salami which demonstrated high antioxidation and ACE inhibitory activities, and the Jamon Serrano and Italiano prosciutto which had the low antioxidation and ACE inhibitory activities, were subjected to pH, and total bacterial and lactic acid bacteria (LAB) counts estimation. We observed that the total bacterial and LAB counts of Coppa and Milano salami were significantly higher than those of Jamon Serrano and Italiano prosciutto. Further, no significant differences were observed between the Coppa and Milano salami. Notably, the pH value of Milano salami was significantly lower than the other tested products. We further assayed the species of isolated LABs from Coppa and Milano salami and our results showed that the *Lactobacillus sakei* and *Pediococcus pentosaceus*, which are known as the LAB starter in meat products, were present more frequently in Coppa and Milano salami, respectively. Thus, our results suggest that the expressions of antioxidation and ACE inhibitory activities of the uncooked pork meat products is related to their bacterial counts and types. Further studies are required to identify the major bacterial genera that contribute to the high antioxidation and ACE inhibitory activities in the meat products.

## 1. 目 的

近年、食品による保健機能への関心が高まって

おり、生理活性物質に関する研究が盛んに行われている。食肉の保健機能性としては、血圧調整に關連するアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE)

阻害活性や活性酸素の働きを抑える抗酸化活性が報告されており、我々もこれまでに研究成果として報告した<sup>1, 2)</sup>。これら機能性の発現には、食肉から生じてくるペプチドとの関連性が高い。

非加熱食肉製品とはイタリアのプロシュート・ディ・パルマやスペインのハモンセラノハムといった非加熱(生)ハムやドライソーセージ、セミドライソーセージといった製品のことである<sup>3)</sup>。これらの製品は海外の食肉製品として知名度が高く、国内においても高付加価値食肉製品として普及されている。非加熱食肉製品は発酵または熟成工程により、食肉タンパク質由来ペプチドが産生され、それらの中には、ACE阻害活性や抗酸化活性を示すものが報告されている<sup>4)</sup>。

我々の過去の研究においては、乳酸菌スターターにより調製した非加熱食肉製品(発酵ソーセージ)にACE阻害活性や抗酸化活性が認められ、これらの発現には乳酸菌の発酵との関連性が示唆された<sup>5)</sup>。しかしながら、スターター未添加タイプの非加熱食肉製品のACE阻害活性や抗酸化活性の発現については、発酵または熟成に関与する主要な微生物等についての研究が十分行われていないため、それら発現機構の解明に向けた微生物学的な検討が必要である。

本研究では、スターター未添加タイプの非加熱食肉製品からACE阻害活性や抗酸化活性を示す製品を選抜した。機能性発現に関与する微生物として、過去に報告した乳酸菌に着目し、生理活性を有する非加熱食肉製品の乳酸発酵性と主要乳酸菌種の検討を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 供試非加熱食肉製品

本研究で使用する非加熱食肉製品はハモンセラノ9か月熟成(スペイン, サンプル番号1)、ブラックフォレストハム(ドイツ, サンプル番号

2)、イタリアンプロシュート24か月熟成(イタリア, サンプル番号3)、パンチェッタ(イタリア, サンプル番号4)、コッパ(イタリア, サンプル番号5)、ミラノサラミ(イタリア, サンプル番号6)、パルマサラミ(イタリア, サンプル番号7)、トリュフサラミ(イタリア, サンプル番号8)、ロンガニーザ(スペイン, サンプル番号9)、フェスライス(スペイン, サンプル番号10)を使用した。各製品は一般社団法人日本生ハム協会を通じて購入した。

各製品10gを採取し、40mLの滅菌蒸留水を加え、無菌的にホモジナイズおよび肉片残渣をろ過した水抽出液を作製し、試料として各試験に用いた。

### 2.2 抗酸化活性

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。すなわち、400  $\mu\text{mol/L}$  DPPH, 200mmol/L MES buffer pH6.0, 20% エタノールを同量ずつ加え、混合液を作製した。なお、サンプル濃度はペプチド濃度1 mM (Gly-Leu換算値)に調整し、必要に応じ、希釈したものを供試した。混合液を20分間室温で反応させた。その後、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、0.2mmol/L Troloxをスタンダードとして測定し、検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。

### 2.3 ACE阻害活性

ACE阻害活性の測定は、蛍光検出法を用いて評価した。すなわち、50  $\mu\text{L}$  サンプル, 100  $\mu\text{L}$  0.01U/mL ACE溶液, 20  $\mu\text{L}$  25mmol/L Hip-His-Leu溶液を混合し、96wellプレートで37°C, 40分間インキュベートした。なお、サンプルの濃度はペプチド濃度1 mmol/L (Gly-Leu換算値)に調整し、必要に応じ、希釈したものを供試した。その後、100  $\mu\text{L}$  1 N NaOH, 10  $\mu\text{L}$  0.2% o-phthalaldehyde (OPA), と15  $\mu\text{L}$  3.6mol/Lリン酸を加え蛍光強度



を測定した。蛍光プレートリーダーは360nm励起波長、460nm蛍光波長の条件で測定し、ACEの阻害活性を算出した。試料濃度を横軸、阻害活性を縦軸としたプロットにおいて、直線的に阻害活性が減少する範囲で、ACE活性阻害率が50%を示すときの反応液中の試料添加量・試料濃度を $IC_{50}$ 値とした。

#### 2.4 ペプチド濃度の測定

試料中のペプチド量はOPA法に従い、OPA試薬を調製し吸光度340nmを測定した。Gly-Leu溶液をスタンダードとして用い、得られた値からペプチド濃度（Gly-Leu換算値）を算出した。

アンセリンとカルノシン濃度の測定はHPLCを用いて分析した。試料を限外ろ過後、一定量に合わせ、 $0.45\ \mu\text{m}$ のフィルターでろ過したものを分析用試料とした。移動相は200mmol/Lリン酸二水素アンモニウム、100mmol/Lペンタンスルホン酸ナトリウム、4%アセトニトリル、pH2.0溶液（塩酸で調整）を使用した。分析条件は検出器220nm、カラムオープン30°C、流量0.8mL、注入量20 $\mu\text{L}$ で行った。

2.5 pH測定および細菌検査と検出菌株の同定  
試料中のpHはpHメーターにより測定した。試

料中の細菌検査として一般生菌数および乳酸菌数を標準寒天培地ならびにBCP加プレートカウント寒天培地を使用し評価した。また、乳酸菌については分離同定を行うため、変法GYP培地も使用し細菌検査を行った。変法GYP培地上に形成されたコロニーについて、純化後、DNAの抽出を行い、16S r-DNAを標的としたPCRならびにシーケンス解析を行った。得られたシーケンス配列は生命情報・DDBJセンターのBLAST解析を用いて菌種を同定した。

### 3. 結果と考察

非加熱食肉製品の中には、活性酸素の働きを抑える抗酸化活性ならびに血圧調整に有効と知られるACE阻害活性を有する製品があることが報告されている<sup>4)</sup>。豚肉を原料とする非加熱食肉製品10種が有する抗酸化活性ならびにACE阻害活性を調査した。その結果、コッパ、ミラノサラミ、およびフエスライスにおいて高い抗酸化活性値が確認され、いくつかの製品と比べ有意差を示した（Fig. 1）。一方、ACE阻害活性について、 $IC_{50}$ 値を調査したところパンチェッタ、コッパおよびミラノサラミにおいて低値を示した（Fig. 2）。コッ

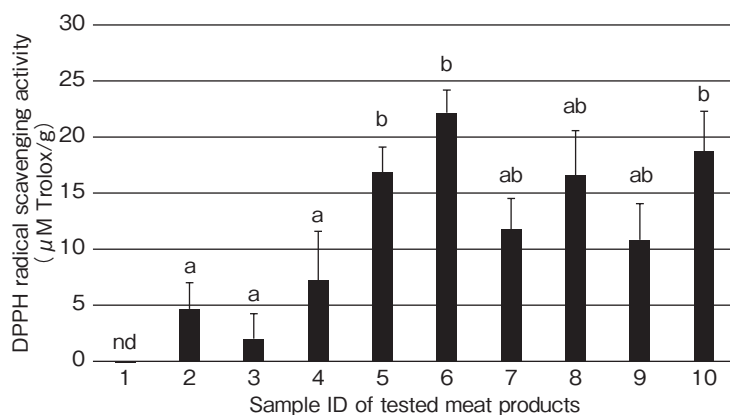


Fig. 1 DPPH radical scavenging activities of the tested uncooked pork meat products 'nd' means not detected. The bars show the standard deviation. The each tested meat products and sample ID are described in the method section. The different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).



パのIC<sub>50</sub>値はもっとも低値であり、いくつかの製品と比べ有意に低い値を示した。抗酸化作用およびACE阻害活性を示さなかった製品として、ハモンセラノ、ブラックフォレストハム、イタリアンプロシュットがあげられた。したがって、各非加熱食肉製品が有する抗酸化活性ならびにACE阻害活性は、各製品において異なることが認められた。本研究では、コッパ、ミラノサラミに高い抗酸化作用およびACE阻害活性が認められ、生理活性成分を含んでいることが示唆された。

食肉製品の抗酸化作用およびACE阻害活性の活性成分として、食肉由来のペプチドが知られている。Table 1 に各非加熱食肉製品由来水抽出物のペプチド濃度を示した。その結果、ハモンセラノ9か月熟成製品やイタリアンプロシュット

24か月熟成製品のペプチド濃度が高い値を示した。一方、抗酸化作用およびACE阻害活性を示したコッパとミラノサラミは10.37mMと8.26mMであり、供試試料の中で、著しく高いまたは低い値ではなかった。食肉由来の機能性ペプチドとしてカルノシンやアンセリンが知られており、抗酸化作用およびACE阻害活性を有することが知られている<sup>6,7)</sup>。各製品由来水抽出物のカルノシンとアンセリン濃度を調べたところ、コッパとミラノサラミのカルノシン濃度は0.18mMおよび0.15mMであり、著しく高いまたは低い値ではなかった。また、アンセリンは各製品において検出されなかった。したがって、コッパとミラノサラミの抗酸化作用およびACE阻害活性の発現と総ペプチド濃度、カルノシン・アンセリン濃度との

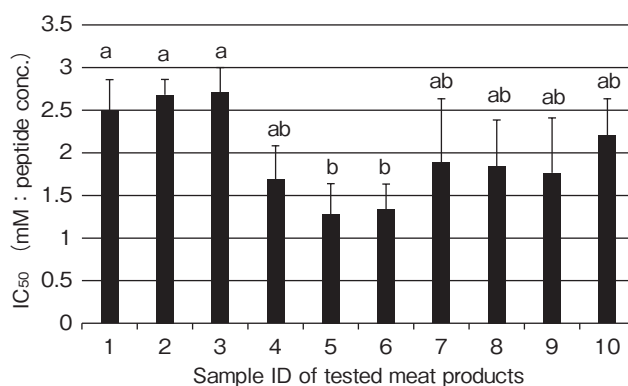


Fig. 2 ACE inhibitory activities of the tested uncooked pork meat products  
The bars show the standard deviation.  
The each tested meat products and sample ID are described in the method section.  
The different letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

Table 1 Peptide levels of the tested uncooked pork meat products

	Sample ID of tested products									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Total peptide (mM : Gly-Leu relative conc.)	21.25	8.12	27.71	4.96	10.37	8.26	6.86	6.75	6.05	5.21
Carnosine (mM)	0.12	0.19	0.20	0.21	0.18	0.15	0.17	0.17	0.14	0.08
Anserine (mM)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

'nd' means not detected.

The each tested meat products and sample ID are described in the method section.

間に関連性は認められなかった。これらの製品の抗酸化作用およびACE阻害活性の発現には、独自に含まれる成分が寄与していると考えられた。

我々は、非加熱食肉製品である発酵食肉製品において、抗酸化活性およびACE阻害活性の発現には乳酸菌の発酵が関与していることを報告した<sup>5)</sup>。本研究で使用した非加熱食肉製品は、乳酸菌スターターの使用はないとされる製品であるが、製品ごとに製造条件は異なるものの熟成工程があるため、微生物による影響を受けていると推察される。また、食肉の熟成に関与する細菌群の1つとして乳酸菌があげられる<sup>8)</sup>。乳酸菌は食品の加工でしばしば使用され、プロバイオティクス効果をもたらす有用細菌である。そこで、抗酸化活性およびACE阻害活性を示した製品（コッパおよびミラノサラミ）と活性を示さなかった製品（ハモンセラノおよびイタリアンプロシュット）について、培養法により総生菌数と乳酸菌生菌数について調べた（Table 2）。コッパおよびミラノサラミ間に総生菌数と乳酸菌生菌数（BCP寒天培地使用）に有意差は認められなかった。しかし、コッパおよびミラノサラミ製品中の総生菌数と乳酸菌生菌数はハモンセラノおよびイタリアンプロシュットの菌数に比べ、有意に高い値であった。コッパおよびミラノサラミ製品中に含まれる主要な乳酸菌種を調べるため、乳酸菌選択培地で

ある変法GYP培地上で形成されたコロニーをランダムに10個釣菌し、菌種の同定を行った。その結果、コッパでは10株中8菌株が*Lactobacillus sakei*に属し、その他2株は*Enterococcus faecalis*に属した。一方、ミラノサラミにおいては10株中すべてが*Pediococcus pentosaceus*に属する乳酸菌株であった（Table 3）。さらに、各製品のホモジネート中のpHについて調べたところ、ミラノサラミのpHは他の製品と比べて有意に低い値を示した。抗酸化活性およびACE阻害活性を示したコッパおよびミラノサラミには総生菌数および乳酸菌生菌数の高い値が認められたため、コッパおよびミラノサラミにおける抗酸化活性およびACE阻害活性の発現には製品中の細菌または微生物による関与が考えられた。ミラノサラミにおいては他の製品と比べpHの低下が認められたため、乳酸菌による発酵が進んでいると推察された。一方、コッパにおいては総生菌数と乳酸菌生菌数の増加が認められたものの、pHの低下は認められなかった。コッパとミラノサラミから出現した乳酸菌種において違いが推察されたことから、各製品で形成されている乳酸菌細菌叢だけでなく、他の細菌叢もまた異なることも考えられた。食肉の発酵熟成に関与する細菌として、乳酸菌の他に*Staphylococcus carnosus*や*Staphylococcus xylosus*といったコアグラージェ陰性のブドウ球菌類や

Table 2 Bacterial counts and pH of the tested uncooked pork meat products

	Sample ID of tested products			
	1	3	5	6
Total bacterial counts ( $\log_{10}$ CFU/g)	2.21 $\pm$ 0.29 <sup>a</sup>	3.75 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	4.61 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	4.48 $\pm$ 0.36 <sup>c</sup>
Lactic acid bacteria counts ( $\log_{10}$ CFU/g)				
BCP agar plate	2.27 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	3.95 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	4.21 $\pm$ 0.31 <sup>c</sup>	4.66 $\pm$ 0.08 <sup>c</sup>
GYP agar plate	nd	nd	3.67 $\pm$ 0.70 <sup>a</sup>	4.63 $\pm$ 0.30 <sup>b</sup>
pH	6.05 $\pm$ 0.13 <sup>a</sup>	6.07 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	6.70 $\pm$ 0.12 <sup>b</sup>	5.74 $\pm$ 0.09 <sup>c</sup>

'nd' means not detected.

The each tested meat products and sample ID are described in the method section. Date shown are means  $\pm$  SD.

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

Table 3 Lactia acid bacterial species isolated from the Coppa and Milano salami samples

Isolated strain number	Coppa	Milano salami
1	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
2	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
3	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
4	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
5	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
6	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
7	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
8	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
9	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>
10	<i>Lactobacillus sakei</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>

*Micrococcaceae*科, *Kocuria* spp.に属する細菌が知られている<sup>9)</sup>。したがって、コッパとミラノサラミの抗酸化活性およびACE阻害活性の発現には、乳酸菌の他にも関与している細菌群の存在が推測された。今後、非加熱食肉製品の生理活性の発現に関与する微生物について、乳酸菌の菌叢の詳細な解析ならびに乳酸菌に属さない細菌類についての検討を進めることで、食肉の生理活性発現に関与する微生物の解明が期待される。

#### 4. 要 約

豚肉を原料とする非加熱食肉製品10種の抗酸化活性ならびにACE阻害活性を調査したところ、イタリアのコッパとミラノサラミに高い活性を認めた。これら製品の抗酸化活性とACE阻害活性の発現には総ペプチド濃度やカルノシン・アンセリン濃度との関連性は認められなかったため、製品独自の生理活性成分の存在が考えられた。コッパとミラノサラミの発酵性を評価したところ、総生菌数と乳酸菌数に違いは認められなかったが、pHは著しく異なった。また、主要乳酸菌種も異なることが推察された。したがって、非加熱食肉製品の生理活性の発現は異なり、それに寄与する

製品独自の乳酸菌をはじめとする微生物群の関与が考えられた。

#### 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、非加熱食肉製品の入手にご協力いただいた一般社団法人 日本生ハム協会理事長 桜岡盛一様に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 竹田志郎, 久保田大樹, 竹之山愼一, 河原 聡, 六車三治男: 暖地畜産学会報, **58**, 103~108, 2015.
- 2) 坂田亮一, 竹田志郎, 時田昇臣: 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **36**, 118~122, 2018.
- 3) 若松純一: 乳肉卵の機能と利用, アイケイコーポレーション, 食肉製品の種類と製造法, 207~219, 2011.
- 4) Gallego, M., Mora, L., Escudero, E., Toldrá, F: *Int J Food Microbiol.*, **276**, 71~78, 2018.
- 5) Takeda, S., Matsufuji, H., Nakade, K., Takenoyama, S. I., Ahhmed, A., Sakata, R., Kawahara, S., Muguruma, M.: *Anim Sci J.*, **88**, 507~516, 2017.
- 6) Hou WEN-CHI, Chen HSIEN-JUNG, Lin YAW-HUEI: *J Agric Food Chem.*, **51**, 1706~1709, 2003.
- 7) Hipkiss, A. R.: *Adv Food Nutr Res.*, **57**, 87~154, 2009.
- 8) Juárez-Castelán, C., García-Cano, I., Escobar-Zepeda, A., Azaola-Espinosa, A., Álvarez-Cisneros, Y., Ponce-Alquicira, E.: *Meat Sci.*, **150**, 7~13, 2019.
- 9) Laranjo, M., Potes, M. E., Elias, M.: *Front Microbiol.*, **10**, 853, 2019.

# 神経細胞保護効果を有する畜産物由来タンパク質の探索研究

The study of protective effect on neuronal cell by animal product protein

糸井 亜弥・吉川 豊

(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)

Aya Itoi and Yutaka Yoshikawa

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

Major neurocognitive disorder is a decline in mental ability severe enough to interfere with independence and daily life. The patients of Japan was 4620 thousand peoples in 2012. In this study, we challenged the treatment used animal products, globin or liver extracts. We have concluded that protein derived from animal products has a protective effect on glycation stress on nerve cells from in vitro experiments or in vivo experiments with streptozotocin diabetes mellitus mice. In particular, the effect was remarkable in a study of SH-SY5Y neuronal cells. In addition, it was found that the short-term memory abnormalities caused by a glycation stress model animal due to diabetes mellitus was improved by administration of a protein derived from animal products. In this experiments, we did not elucidate these detailed mechanisms, but found that it has a definite protective effect on neuronal cells. In conclusion, we found that it is worth pursuing research on animal-derived proteins in fields related to memory such as major neurocognitive disorder.

## 1. 目的

日本国内において、高齢者人口の急増とともに認知症患者数も増加しており、厚生労働省の発表によると、2012年時点で約462万人、予備軍も合わせると約900万人と推計されている。また、2025年には認知症患者だけで700万人前後に達すると見込まれている。一方、世界の認知症人口も、2015年は4,680万人と推定されているが、2050年までには1億3,150万人に到達すると予測されている。認知症は、神経変性（神経細胞死）に起因し、アルツハイマー病（AD）がその中の代表例であり、ADをはじめとする認知症が第三の糖尿

病（DM）とも指摘され、生活習慣の中に深く根付いていることが最も懸念すべきことである。また、これらの疾患に罹患すると、患者だけでなく、その周囲の家族への影響も甚大であるため、早急に予防法や治療法を確立しなければならない。

このような背景の下、多くの研究者が認知症治療可能な治療薬やサプリメント開発、神経細胞死を予防する物質の探索研究を行っている。かねてより、畜産物由来ペプチドには、骨粗しょう症改善、血圧上昇抑制、コレステロール低下などの生体調節機能を有することが報告されており<sup>1)</sup>、畜産物由来タンパク質に注目が寄せられている。特に近年、脊椎動物の神経細胞に特異的に発現し可

逆的な酸素結合が可能なタンパク質であるニューログロビン (Ngb) が発見され<sup>2)</sup>, そのうちの哺乳類Ngbには, 酸化ストレスに伴う細胞死を抑制する働きを持つことが示唆されている<sup>3)</sup>。また, 最近では, Ngbがアポトーシスやインスリン抵抗性などを解除し, 脳内のアミロイドβ (Aβ) の蓄積を抑制することから認知症に対してプラスに働くというデータの蓄積もある<sup>4)</sup>。そこで本研究では, 「畜産物由来のグロビンやレバーエキスによる神経細胞保護効果」を評価することにより, サプリメント素材として手軽に入手しやすい食材で, 認知症予防効果に繋げられるかを明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 畜産物由来タンパク質の抗酸化作用の評価

本実験は, 藤田らの文献に基づいて行った<sup>5)</sup>。各サンプル, DPPH/エタノール混液を試験管に添加し攪拌したのち室温にて30分放置した (A)。同時に, 各反応ブランクとしてDPPH/エタノール混液の代わりにエタノールを添加したものを調整した (B)。コントロールとして, エタノール, DPPH/エタノール混液を添加したものを調整し (C), 同時に反応ブランクとして, エタノールを添加したものを調整した (D)。30分経過後, 分光光度計を用い, 波長517 nmにて吸光度を測定し, 下式から, DPPHラジカル消去活性を算出した。

$$\text{DPPHラジカル消去活性 (\%)} = \frac{[(C - D) - (A - B)]}{(C - D)} \times 100$$

### 2.2 畜産物由来タンパク質の抗糖化作用の評価

本実験は, 堀らの文献に基づいて行った<sup>6)</sup>。0.1 Mリン酸緩衝液 (pH7.4), ヒト血清アルブミン溶液, 2Mグルコース溶液, Elix水を添加し, ボル

テックスミキサーで攪拌した。糖化反応阻害剤であるアミノグアニジン (AG) または, 各サンプルを添加し, 総量を 1 mlとし, 60℃で40時間インキュベーションした (A)。同時に, 各反応ブランクを用意した (B)。リファレンスとして, 各サンプルまたはAGを添加しない試料を調整した (C)。反応ブランクとして, グルコース溶液の代わりにElix水を添加したものを用意した (D)。糖化反応終了後, 反応液の終末糖化産物 (AGEs) 由来蛍光 (励起: 370 nm, 検出: 440 nm) をプレートリーダーで測定した。次いで, 下式を用いて, リファレンスに対するAGEs生成阻害率を算出した。

$$\text{蛍光性AGEs生成阻害率 (\%)} = \{1 - [(A - B)/(C - D)]\} \times 100$$

### 2.3 畜産物由来タンパク質の神経細胞保護効果の評価

AGEs中間体物質であるメチルグリオキサール (MG) やグリオキサール (GO), グリセルアルデヒド (GA) をSH-SY5Y細胞に作用させると神経細胞死を誘導する。細胞を播種し, 37℃, 5% CO<sub>2</sub>インキュベータで培養を行い, 96時間後の培地交換の際に1%のFBSとベニシリンーストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液をDMEMに混合調製したものを1%培養液として使用した。その際, 各濃度に調製したサンプルと終濃度2 mMになるように調製した各神経細胞死誘導物質をそれぞれ全体量の1/10量添加し, 5時間培養後, 細胞の形態変化を観察・撮影した。さらに, テトラゾリウム塩を用いて生細胞数を計測し, AGEs中間体物質による神経細胞死に対する保護効果を細胞生存率から評価した。

### 2.4 *in vivo*実験における認知症予防効果の評価

16週齢のC57BL/6Jマウスに, ストレプトゾトシン (50 mg/kg/day) を5日間連続腹腔内投与



し、投与開始1週間後、採血を行い、血糖値が200 mg/dL以上のマウスを、糖尿病モデルマウスとして実験に供した。糖尿病発症後に、生理食塩水とAG (50 mg/kg・BW) は週6日間、腹腔内投与し、グロビン (400 mg/kg・BW) は毎日給水瓶から72日間投与した。糖化反応阻害剤であるAGの投与は、AGEs, A $\beta$ の蓄積評価の対照群として用いた。解剖時には、マウスの全脳を採取し、免疫染色による解析を実施した。なお、動物実験では、健常動物のノーマル群 (N群)、生理食塩水を投与したDMコントロール群 (C群)、AG投与群 (A群)、グロビン投与群 (G群) の4群で行った。

免疫染色では、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて組織を固定し、脱水、置換、パラフィン包埋後に、厚さ7  $\mu$ mの連続切片を作製した。切片を脱パラフィン後、10 mMクエン酸ナトリウム緩衝液にて121°C、20分間処理し、抗原を賦活化した。さらに室温で30分間0.3%過酸化水素水に反応させ、PBSで洗浄した後、続けて5分間Protein Block (abcam) に反応させ、PBSで洗浄した。抗体は、抗ウサギA $\beta$ 抗体 (GeneTex)、抗ウサギAGEs抗体 (Bioss) を使用した。一次抗体として抗ウサギA $\beta$ 抗体は100倍、抗ウサギAGEs抗体は200倍に希釈して切片に載せ、4°Cで一晩反応させた。二次抗体として、VECTASTAIN Elite ABC Kit (VECTOR) を用い、PBS-Tで希釈して免疫反応を行った。発色はDAB染色で行った。冠状断で薄切りした切片スライドの海馬のCA1からCA2, CA3あたりが切片スライドにのっているものを選んで脳全体を染色し評価した<sup>7)</sup>。

行動的学習能力の変化は、自発的交替行動を短期記憶として評価するのに適しているY迷路装置を用いた。この迷路は、高さが25 cm、幅が10 cm、長さが35 cmのアーム3本からなり、評価

方法は、「120° Y字迷路での連続試行型の実験モデル」で行い、8分程度の探索を許し、どの走路をどのような順番で選択したかを記録した (総アーム進入回数; SLA)。3回連続で異なる走路に入った数 (交替行動数; SWM) が総アーム進入回数中どれだけの割合であったかを交替行動率 (Alterations, %) とし、短期記憶の指標とした。なお、計算式はSarnyaiらの報告に従い、下記の式から求めた<sup>8)</sup>。

$$\text{交替行動率 (\%)} = \frac{\text{交替行動数}}{(\text{総アーム進入回数} - 2)} \times 100$$

すべての実験において、群間の有意差は、Microsoft Excel 2016を用い、Excel統計2012により、Dunnett法、もしくは、Tukey-Kramer法を用いて検定した。

なお、本実験は、神戸女子大学動物飼育室利用内規に従い、神戸女子大学動物実験倫理委員会の承認を得たうえで実施した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 畜産物由来タンパク質の抗酸化作用への影響

グロビン、レバーエキスについて、 $3.5 \times 10^{-2}$ %の濃度で測定した。グロビンについては低値ではあるが抗酸化作用を示したが、レバーエキスはほとんど示さなかった (Fig. 1 [A])。グロビンには高い抗酸化力があり、さらに、グルコースおよびアラビノースによって糖修飾されたグロビンでは抗酸化性が増大するといった研究報告があり<sup>9)</sup>、今回の結果はこの報告を支持するものである。本実験にてグロビンには抗酸化作用が認められたが、糖修飾したグロビンについてのDPPHラジカル消去活性の測定を行うことができれば、本実験で得られた結果よりも高い抗酸化作用が認められるのではないかと推定した。



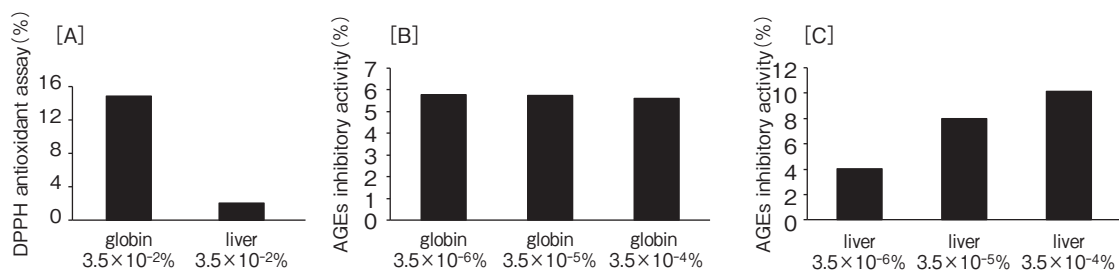


Fig. 1 DPPH radical scavenging activity of globin or liver extract [A]. Inhibitory effect of globin [B] or liver [C] extract on HSA-derived fluorescent AGE formation.

### 3.2 畜産物由来タンパク質の抗糖化作用への影響

グロビンおよびレバーエキスについて $3.5 \times 10^{-3}$ 以上の濃度では自家蛍光が強く発生し、本実験では測定することができなかった。そのため、本実験では $3.5 \times 10^{-6}\%$ ~ $3.5 \times 10^{-4}\%$ の濃度で測定を行った。このように低濃度しか使用できなかった点、また、グロビン、レバーエキスはともにFe含有物質であり、硫酸鉄(II)七水和物がAGEs生成を促進するため、高濃度では糖化促進作用が働いているのではないかと考えた。その予想どおり、グロビンでは各濃度とも約6%程度の阻害率、レバーエキスでは、4-10%程度の阻害率であり(Fig. 1 [B] [C])、AGEs生成抑制作用は弱い結果となった。また、グロビンはグルコースおよびアラビノースと強く糖化反応を示すという報告もあり<sup>9)</sup>、そのため、本実験ではグロビン自身がグルコースと糖化反応を起こし、結果として、AGEs生成促進作用をほとんど示さない結果となったのではないかと結論付けた。

### 3.3 畜産物由来タンパク質の神経細胞保護効果

#### 3.3.1 形態変化による評価

2 mM MGと各濃度のレバーエキス添加時の中で一番生細胞数の多い濃度の様子(Fig. 2 [A])と、グロビンエキス添加時の中で一番生細胞数の

多い濃度の様子を示した(Fig. 2 [B])。MG単体曝露時よりもMGと同時にサンプル含有時の写真のほうが、多く生細胞がみられた。メカニズムは不明であるが、レバーエキスもグロビンエキスも、細胞死誘導を抑制することができた。

#### 3.3.2 神経細胞死に対する保護効果

テトラゾリウム塩を用いた生細胞数計測結果では、レバーエキスによる神経細胞死誘導物質の無添加時における細胞への影響は、8.8%、4.4%の溶液曝露時において有意な神経細胞増殖活性を認めた(Fig. 3 [A])。また2 mM MGとサンプルを同時曝露した結果、17.5%、8.8%、4.4%の溶液において(Fig. 3 [B])、2 mM GOとサンプルの同時曝露時では、4.4%の溶液において(Fig. 3 [C])、有意な神経細胞保護効果が確認された(Fig. 3 [D])。

またグロビンエキスによる神経細胞死誘導物質の無添加時における細胞への影響は、17.5%、8.8%、4.4%の溶液曝露時において、有意な差ではなかったが、神経細胞増殖活性を認めた(Fig. 3 [E])。また2 mM MGとサンプルを同時に曝露した結果、35%、17.5%、8.8%の溶液曝露時において(Fig. 3 [F])、2 mM GOとサンプルの同時曝露時では、17.5%、8.8%、4.4%の溶液曝露時において(Fig. 3 [G])、同様に2 mM GA曝露時では、17.5%、8.8%、4.4%の溶液において、有

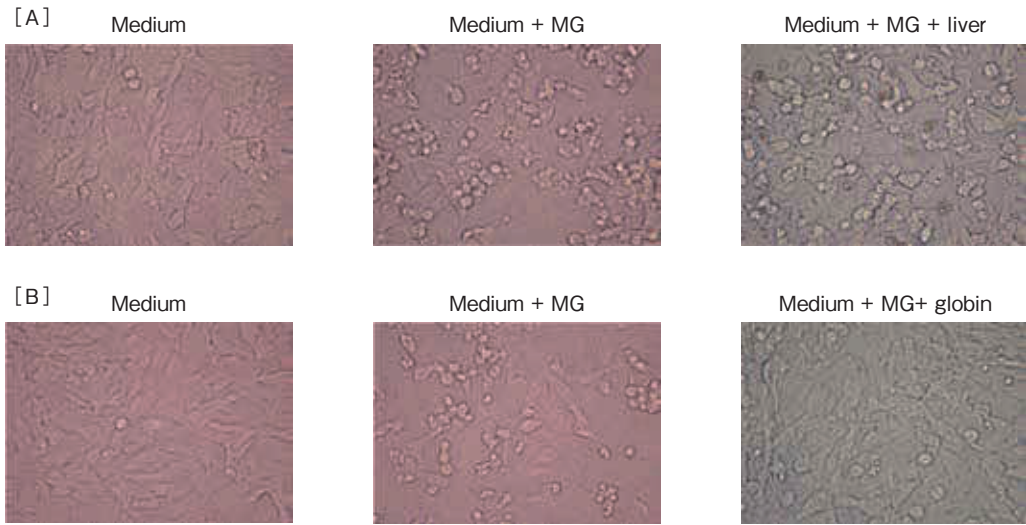


Fig. 2 Cell status by liver extract (88%) exposure [A] or globin extract (17.5%) exposure [B]

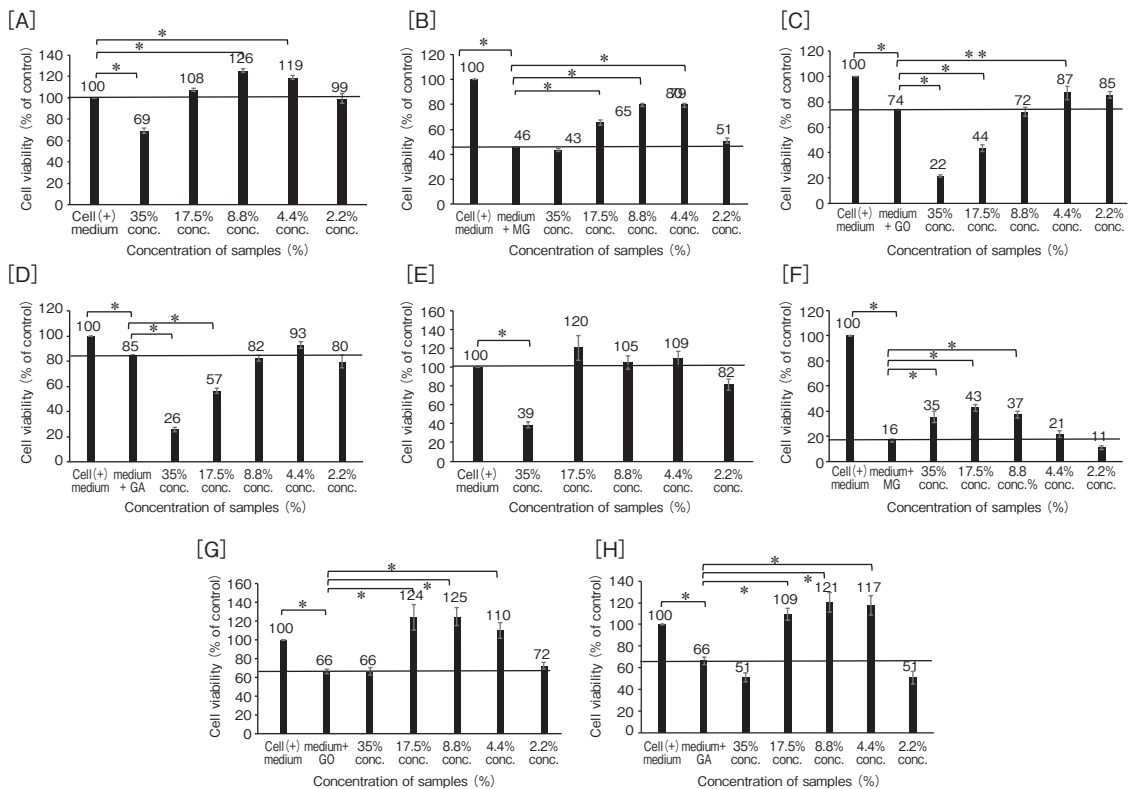


Fig. 3 Viability of SH-SY5Y cells after exposure to liver or globin extract for 5 hours cytotoxicity at each sample concentrations [A] or [E], cytotoxicity at 2 mM MG exposure [B] or [F], cytotoxicity at 2 mM GO exposure [C] or [G] and cytotoxicity at 2 mM GA exposure [D] or [H]. Data are expressed as mean  $\pm$  SDs. Significance \*\*  $p < 0.01$ , \*  $p < 0.05$ .

意な神経細胞保護効果が確認された (Fig. 3 [H])。

両サンプル自身の毒性の有無を確かめるため、細胞にサンプルのみを曝露したところ、いくつかの濃度においてサンプル未曝露の細胞数よりも生細胞は増加傾向にあることを認めた (Fig. 3 [A] [E])。つまり、コントロールの細胞増殖率よりもサンプル曝露時のほうが増殖率は高いことより、細胞増殖活性が上がったことが考えられる。すでに報告されているニューログロビン (Ngb) は、酸化ストレスにより惹起された神経細胞死を保護する作用が報告されている<sup>10)</sup>。レバーエキスやグロビンエキスにおいても、そのような作用を有する可能性があると考えられた。Fig. 3 [B] [C] [F] [G] の結果から、MGとGOによる細胞死誘導毒性からの神経細胞保護作用を示したことより、人の体内にもともと備わっている毒性処理機構のグリオキサラーゼシステムに寄与している可能性も示唆された。

また Fig. 3 [D] [H] より GA と GA 由来の AGEs である Glycer-AGEs の毒性からも一部の濃度によっては、両物質は防御できたと考えられる。Glycer-AGEs は高血圧症、認知症、非アルコール性脂肪肝炎などの多様な疾患にも関与することが示されており、生活習慣病に深く関係しているといわれている物質である。よって、これらの疾患にも両物質は予防や治療に寄与できる可能性がある。

これらの結果より、*in vitro* 実験ではグロビンエキスのほうが総合的に抗糖化効果を有していると判断したため、*in vivo* 実験ではグロビンエキスを使用することとした。

### 3.4 *in vivo* 実験における認知症予防効果

#### 3.4.1 投与期間中の体重の変動

マウスの体重は同じ群間ではほぼ一定であった。摂食量と摂水量は、10日目あたりから N 群よりも DM を併発している群のほうが多く摂取していた (Fig. 4)。

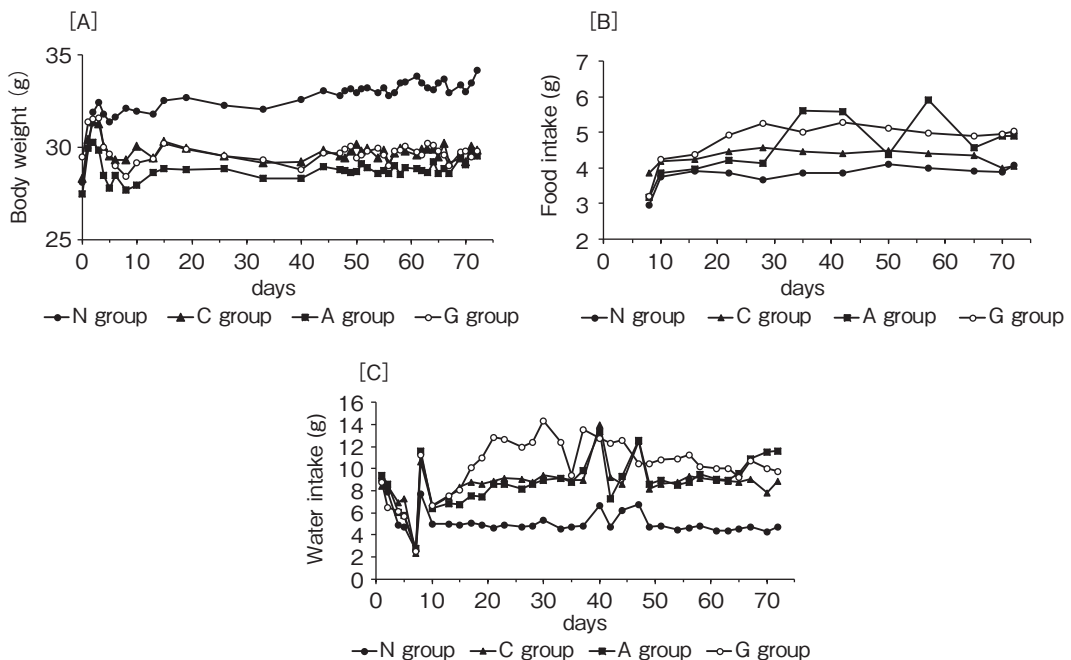


Fig. 4 Changes of body weight [A], food intake [B], and water intake [C] during the administration period.  
N : Normal, C : Control, A : Aminoguanidine, G : Globin.



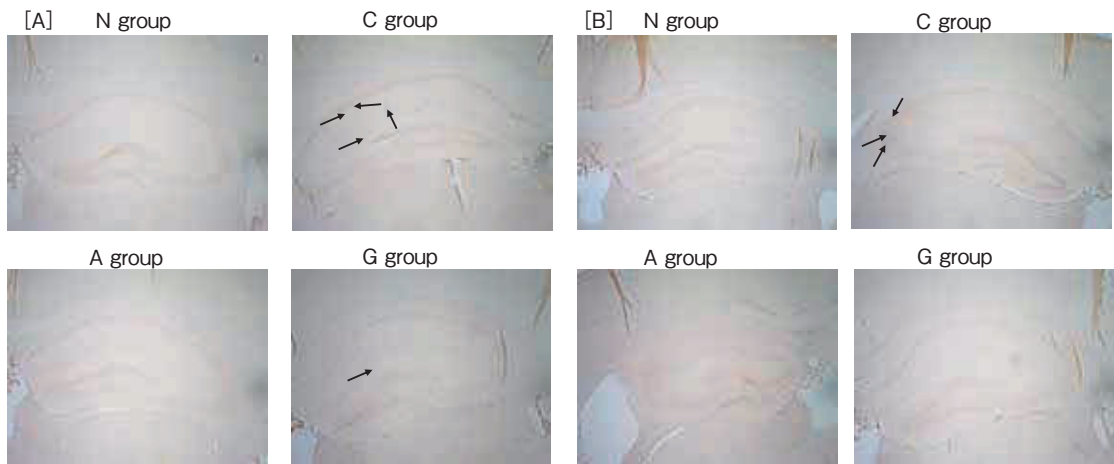


Fig. 6 Immunostaining of A $\beta$  [A] and AGEs [B] around mouse hippocampus ( $\times 400$ )

N : Normal, C : Control, A : Aminoguanidine, G : Globin.

れた (Fig. 5)。

### 3.4.3 免疫染色によるAGEs, A $\beta$ の蓄積評価

A $\beta$ 染色は、シミのような染まり方をしており、その部分を矢印で示した。すべての群においてA $\beta$ はあまり観察されなかったが、C群では他の群より多く見られた (Fig. 6 [A])。

AGEs染色は、錐体神経層の細胞内から樹状突起、軸索、シナプスまで染まっている可能性が高く<sup>11)</sup>、そのように染まっている部分を矢印で指した。AGEs染色は同じ群の中でも個体差が大きかったが、これは高齢マウス(週齢は16週以降である条件以外はバラバラ)を使用したため、飼育開始の週齢やそれまでの環境差も大きかった可能性がある (Fig. 6 [B])。

グロビンエキスによる脳細胞への影響に関しては、まだまだ不明瞭な部分が多いが、本研究結果より竹内が提唱している<sup>12)</sup> AGEs生成経路中のMGO-AGEsやGO-AGEs, Glycer-AGEsの生成抑制に関与したと考えられる。免疫染色では糖化の期間が短かったことやリタイアマウス使用による個体の状態差の問題もあり、AGEsやA $\beta$ の蓄積量に明らかな差がみられなかった可能性もある。

グロビンエキスは血糖値やHbA1cの改善を伴わず、行動試験の結果を改善する結論が得られたため、糖尿病に起因する認知症のみならず、その他の影響による認知機能障害に対しても効果を示す可能性があり、今後の追加試験に期待したい。

## 4. 要 約

抗酸化、抗糖化、細胞、動物の実験を通して、神経細胞への糖化ストレスに対して、畜産物由来タンパク質には保護効果があることが明らかとなった。また、糖尿病に起因する糖化ストレスモデル動物により生じる短期記憶も、畜産物由来タンパク質投与により、改善することが分かった。今年度の研究では、これらの詳細なメカニズムの解明にまでは至らなかったが、神経細胞保護効果に関しては、確実な作用があることが分かったため、今後も認知症をはじめとする記憶に関する分野での畜産物由来タンパク質の研究を進めていく価値があることを、本研究では見いだすことができた。

## 謝 辞

本実験において、グロビンタンパク分解物をご

提供いただいた，ILS株式会社様には深くお礼申し上げます。免疫染色の諸技術に関しましては，姫路獨協大学薬学部の角山圭一准教授にご指導いただきましたこと，また，本実験を進めるにあたり，神戸女子大学大学院健康栄養学研究科，ならびに，神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科の学生諸氏に多くの協力をいただきましたことを深謝いたします。

#### 文 献

- 1) 西村敏英：日本調理科学会誌，**41**，221～226，2008.
- 2) Sun, Y., Jin, K., Mao, X. O., Zhu, Y., Greenberg, D. A., Sun, Y. : *Proc Natl Acad Sci*, **98**, 15306～11, 2001.
- 3) Sun, Y., Jin, K., Peel, A., Mao, X. O., Xie, L., Greenberg, D. A. : *Proc Natl Acad Sci*, **100**, 3497～500, 2003.
- 4) Li, R. C., Pouranfar, F., Lee, S. K., Morris, M. W., Wang, Y., Gozal, D. : *Neurobiology of Aging*, **29**, 1815～22, 2008.
- 5) 藤田修三，山田和彦：食品学実験書 第3版，医歯薬出版株式会社，東京，146～147，2017.
- 6) 堀未央，八木雅之，桒本慶太郎，北野貴大，宮崎亮，米井嘉一：同志社大学理工学研究報告，**52**，223～229，2011.
- 7) Jono, T., Kimura, T., Takamatsu, J., Nagai, R., Miyazaki, K., Yuzuriha, T., Kitamura, T., Horiuchi, S. : *Pathology International*, **52**, 563～571, 2002.
- 8) Sarnyai, Z., Sibille, E. L., Pavlides, C., Fenster, R. J., McEwen, B. S., Toth, M. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 14731～14736, 2000.
- 9) 宮口右二，堤将和，永山精美：日本食品科学工学会誌，**46**，514～520，1999.
- 10) Li, R. C., Morris, M. W., Lee, S. K., Pouranfar, F., Wang, Y., Gozal, D. : *Brain Res.*, **1190**, 159～66, 2008.
- 11) Jono, T., Kimura, T., Takamatsu, J., Nagai, R., Miyazaki, K., Yuzuriha, T., Kitamura, T., Horiuchi, S. : *Pathol Int.*, **52**, 563～71, 2002.
- 12) 竹内正義：J Kanazawa Med Univ, **37**, 141～161, 2012.



## 和牛肉のおいしさを「見える化」する（Ⅱ） 輸入牛肉との比較

Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality (II)

Comparison of Wagyu beef with imported beef

山田 知哉

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター)

Tomoya Yamada

(Central Region Agricultural Research Center, NARO)

In this experiment, we studied the metabolomic analysis of sirloin sample among Wagyu beef, Australasian beef and USA beef to determine the key components associated with Wagyu beef quality. GC-MS analysis detected 83 metabolites in the sirloin samples among three groups. The Principal component analysis (PCA) score plots showed that the metabolomic profile was divided into Wagyu, Australasian and USA groups. Wagyu beef were characterized by the abundance of components such as sugar phosphates and nucleic-acid metabolites. In contrast, Australasian beef and USA beef were characterized by the abundance of components such as amino acids. The present study also showed that the relative amount of inosine monophosphate (IMP) in Wagyu sirloin samples was higher than that in Australasian and USA sirloin samples. These results suggest that the metabolomic analyses is an optimum approach to identify quality-related chemical components of Wagyu beef.

### 1. 目 的

メタボローム解析は、癌の早期発見のための特異的な血中バイオマーカーの同定など、これまで主に医学分野において活用されてきた。これに対し畜産分野では、牛肉のメタボローム解析を行った事例は少なく<sup>1,2)</sup>、特に牛肉品質に影響を及ぼすバイオマーカーに関しては不明な点が多い。我々は平成30年度伊藤記念財団研究助成課題において、和牛肉とホルスタイン種牛肉のメタボローム解析結果を実施した結果、和牛肉は糖類の含量が多く、このことが和牛肉の大きな特徴である肉の「甘み」に影響している可能性を示唆した<sup>3)</sup>。

2018年12月のTPP発効、ならびに2020年1月の日米貿易協定発効によって、特にオーストラリアやアメリカからの牛肉輸入量は急増しており、今後もさらなる輸入量の増加が予想されている。そこで日本国内においてはこれら輸入牛肉と和牛肉の差別化を明確にするため、さらには和牛肉の積極的な輸出によって海外における「和牛ブランド」を確立するため、脂肪交雑以外の和牛肉の特徴を明確にすることが今後重要になると考えられる。

そこで本研究では、黒毛和種とオーストラリア産およびアメリカ産アンガス種牛肉のメタボローム解析結果を比較することにより、和牛肉のおい

しさに影響を及ぼす牛肉中成分を特定することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 サンプル

黒毛和種去勢牛 (n = 4), オーストラリア産アンガス牛肉 (n = 4), アメリカ産アンガス牛肉 (n = 4) の, サーロイン部位サンプルを用いた。黒毛和種サンプルは, 農研機構那須塩原事業所で生産されたものを用いた。オーストラリア産およびアメリカ産牛肉のサンプルは, 食肉販売店で購入したものを用いた。サンプルは分析時までディープフリーザーで冷凍保存した。

### 2.2 メタボローム解析

メタボローム解析は, 既報に基づき実施した<sup>3)</sup>。牛肉サンプルは, 液体窒素下で乳鉢を用いパウダー状に粉碎し, 粉碎したサンプル100mgにメタノールを添加してジルコニアビーズを用いたホモジナイズおよび, 超音波処理を実施後, 遠心分離を行い上清を回収した。上清はMonoSpin C18カラム (GL Science Cat.5010-21701) を用いて精製処理を行った。カラム透過画分は窒素ガス吹付下で濃縮乾固処理を実施後, メトキシ化処理を行った。次に, これらサンプルにトリメチルシリル化誘導化処理を行った。これら誘導化サンプルを用い, GC-MS (QP2010Ultra, 島津製作所) にて網羅的解析を実施した ((公財) かずさDNA研究所)。データ解析は, GC/MSsolution (島津製作所) および GC/MS Metabolite Database Ver.2 (島津製作所) を用いた。

## 3. 結果と考察

和牛, オーストラリア産牛肉, アメリカ産牛肉のGC-MS解析を行った結果, 83の代謝産物が検出された。この結果に対し主成分分析を実施したところ, 3群がそれぞれ分かれてプロットされ

た。PC1軸方向では, 正の方向に和牛肉がプロットされ, アメリカ産牛肉とオーストラリア産牛肉は負方向にプロットされた (Fig. 1)。PC2軸方向では, 正の方向に和牛肉とアメリカ産牛肉がプロットされ, オーストラリア産牛肉は負方向にプロットされた (Fig. 1)。これらの結果から, 和牛肉, アメリカ産牛肉, オーストラリア産牛肉は成分のプロファイルが異なっていることが示された。PC1の因子負荷量上位の代謝物質は和牛肉で高値を示す物質であり, 主に核酸代謝物質と解糖系代謝物質によって構成されていた。これに対し, PC1の因子負荷量下位の代謝物質は和牛肉で低値を示す物質であり, 主にアミノ酸によって構成されていた。これらの結果から, 和牛肉と輸入牛肉を比較した場合, 和牛肉は核酸代謝物質と解糖系代謝物質が, 輸入牛肉はアミノ酸がそれぞれの品種を特徴づける代謝産物であると考えられた。

Fig. 2に, 階層的クラスタリング解析 (HCA) で得られたヒートマップを示した。クラスター1

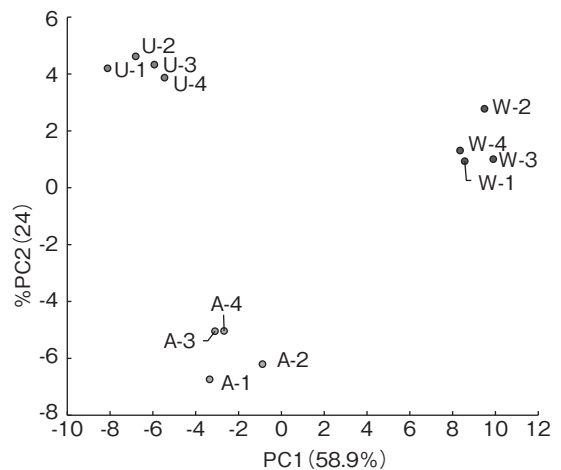


Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of sirloin sample among Wagyu beef, Australasian beef and USA beef.  
W1-W4 : Wagyu beef (n = 4), A1-A4 : Australasian beef (n = 4), U1-U4 : USA beef (n = 4).

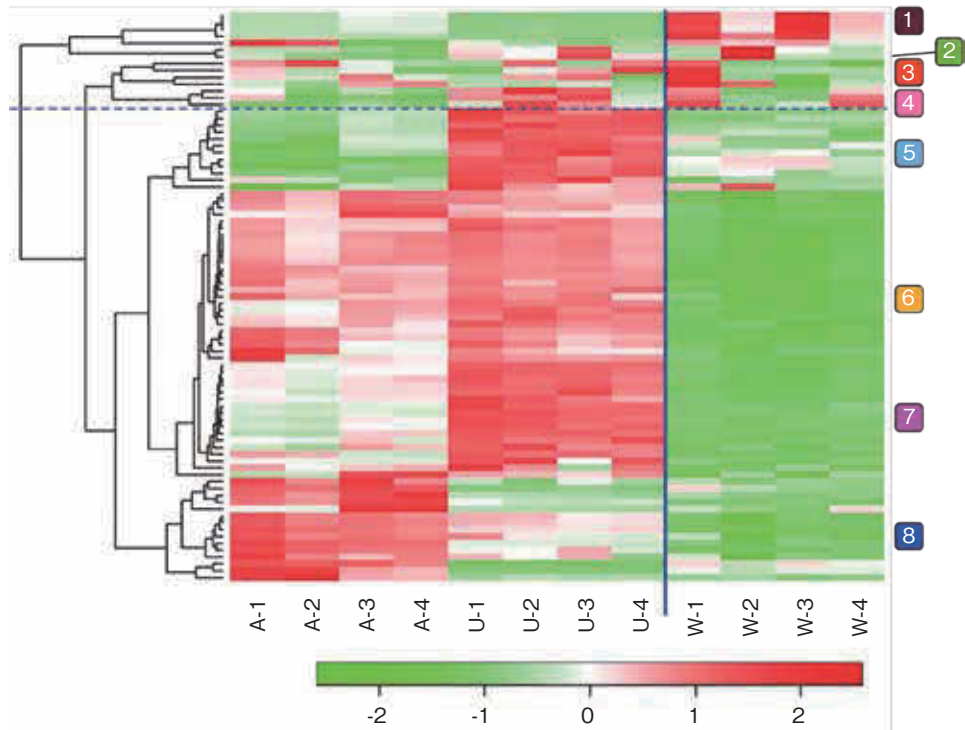


Fig.2 Heatmap for the metabolites of sirloin sample among Wagyu beef, Australasian beef and USA beef.  
W1-W4 : Wagyu beef (n=4), A1-A4 : Australasian beef (n=4), U1-U4 : USA beef (n=4).

は和牛肉に特徴的な代謝産物で構成されており、グルコース-6-リン酸、フルクトース-6-リン酸、イノシン酸 (IMP) が含まれていた。一方、クラスター6はアメリカ産およびオーストラリア産牛肉に特徴的な代謝産物によって構成されており、バリン、ロイシン、メチオニン、ヒスチジン等のアミノ酸が多く含まれていた。これらの結果から、和牛肉成分は糖リン酸と核酸代謝物質、輸入牛肉成分はアミノ酸によって特徴付けられることが示された。

これらの結果から、和牛肉成分は糖リン酸と核酸代謝産物によって、輸入牛肉成分はアミノ酸によって特徴付けられることが明らかとなった。今回GC-MS解析によって検出された和牛肉に特徴的な代謝産物のうち、特に輸入牛肉との比較において重要だと考えられる物質としてIMPがあげられる。IMPはATPの分解によって生成される、

食肉中に含まれる代表的な旨味成分である<sup>4~6)</sup>。そこで、和牛肉、オーストラリア産牛肉、アメリカ産牛肉のIMPを比較した結果、和牛肉中のIMPは輸入牛肉より高い傾向が認められた (Fig.3)。牛肉の官能評価において、オーストラリア産およびアメリカ産牛肉と比較し、和牛肉の旨味が有意に高いことが報告されている<sup>7)</sup>。したがって、和牛肉のIMPが輸入牛肉より高値傾向にあることは、和牛肉の旨味の強さを示す主要な要因であると推察された。

本研究によって、和牛肉と輸入牛肉のメタボローム解析を行った結果、和牛肉と輸入牛肉の代謝成分プロファイルが異なっていること、さらに輸入牛肉と比較した場合の和牛肉に特徴的な牛肉中成分としてIMPが同定された。これらの結果から、今後輸入牛肉との差別化を行い和牛肉のブランドを確立していくうえで、従来強調されてきた

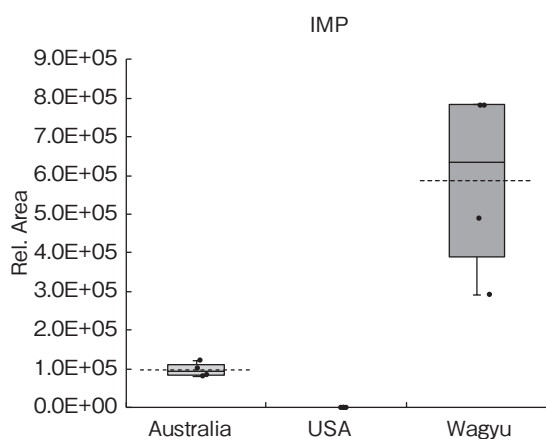


Fig.3 Relative quantity of inosine monophosphate (IMP) in sirloin sample among Wagyu beef, Australasian beef and USA beef.

The middle line in the box plot represents the median, the dotted line indicates the mean value, and the vertical bars indicate the range of data.

脂肪交雑に加え、旨味成分が有効な指標となり得る可能性が考えられた。

#### 4. 要 約

和牛肉と輸入牛肉のおいしさの違いに影響を及ぼしている牛肉中成分を明らかにするため、黒毛和種、オーストラリア産アンガス牛肉、アメリカ産アンガス牛肉を用いてGC-MSによるメタボローム解析を行った。その結果、83の代謝産物が同定された。主成分分析を実施した結果、和牛肉と、アメリカ産およびオーストラリア産牛肉は成分のプロファイルが大きく異なっていることが示された。和牛肉と輸入牛肉を比較した場合、主要な成分として和牛肉は核酸代謝物質と解糖系代謝

物質、輸入牛肉はアミノ酸によって特徴付けられることが明らかとなった。さらに、旨味成分であるIMPを比較した結果、和牛肉中のIMPはアメリカ産およびオーストラリア産牛肉より高い傾向が認められた。これらの結果から、輸入牛肉と比較した和牛肉の特徴として、旨味成分が有効な指標となり得る可能性が考えられた。

#### 文 献

- 1) Muroya, S., Oe, M., Ojima, K., Watanabe, A. : Metabolomic approach to key metabolites characterizing postmortem aged loin muscle of Japanese black cattle, *Asian-Australas. J. Anim. Sci.*, **32**, 1172~1185, 2019.
- 2) Ueda, S., Iwamoto, E., Kato, Y., Shinohara, M., Shirai, Y., Yamanoue, M. : Comparative metabolomics of Japanese black cattle beef and other meats using gas chromatography-mass spectrometry, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **83**, 137~147, 2019.
- 3) 山田知哉：和牛肉のおいしさを見る化する、平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **37**, 38~44, 2019.
- 4) 三上正幸, 木下康信, 三浦弘之：電気刺激した牛肉における核酸関連物質の変化について、日本畜産学会報, **62**, 398~400, 1991.
- 5) 柳原一美, 矢野幸男, 中村豊郎, 中井博康, 田邊亮一：牛肉の長期熟成中における官能評価, 物性および化学成分の変化, 日本畜産学会報, **66**, 160~166, 1995.
- 6) 千国幸一：食肉の特性と利用, 日本調理科学会誌, **40**, 33~36, 2007.
- 7) Sasaki, K., Ooi, M., Nagura, N., Motoyama, M., Narita, T., Oe, M., Nakajima, I., Hagi, T., Ojima, K., Kobayashi, M., Nomura, M., Muroya, M., Hayashi, T., Akama, K., Fujikawa, A., Hokiyama, H., Kobayashi, K., Nishimura, T. : Classification and characterization of Japanese consumer's beef preferences by external preference mapping, *J. Sci. Food Agric.*, **97**, 3453~3462, 2017.

## 低温乳酸発酵ならびに超高温加熱処理を施した筋原線維タンパク質モデル系におけるタンパク質分解と機能性発現に関する研究（Ⅲ）

Retort processing and cold lactic acid fermentation induce protein degradation and functional peptides derivation in myofibrillar protein system (Ⅲ)

林 利哉・長澤 麻央・小川 幸彦\*・芳賀 聖一

(名城大学農学部, \*名城大学農学部附属農場)

Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Yukihiro Ogawa\* and Seiichi Haga  
(Faculty of Agriculture, Meijo University, \*Experimental Farm, Meijo University)

In this study, the expression of food functionality by chilled lactic acid fermentation were investigated using myofibrillar protein fraction as a simple model system of cured meat product, i.e., the differentiation-promoting activity in an osteoblast-like cell culture, and inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme (ACE) and dipeptidyl peptidase (DPP) IV were evaluated. The pH values of myofibrillar protein fractions reached to approximately 5.3 by cold lactic acid fermentation at 4°C. The peptide contents in the myofibrillar protein fractions significantly increased during cold fermentation compared to that of control (70°C-heated). Therefore, we suggest that cold lactic acid fermentation leads to degradation of myofibrillar proteins as a result of cold fermentation at 4°C. The peptide fractions of the fermented myofibrillar protein were found to have a higher ACE and DPP IV inhibition activities than that of control, respectively. Furthermore, alkaline phosphatase and collagen synthesis activities of osteoblast-like cell cultures were also significantly higher in the fermented fractions than the control fraction. These results suggest that chilled lactic acid fermentation may contribute to an improvement in functionalities of cured meat products, such as fermented sausages, rather than compromising their functionalities.

### 1. 目 的

著者らはこれまで、ソーセージ等の食肉製品の高付加価値化を念頭に、低温性乳酸菌による低温発酵や、レトルト等の高温加熱処理といった食品加工技術が食肉製品の品質に及ぼす影響について継続的かつ多面的に検討してきた<sup>1-3)</sup>。その結果、低温乳酸発酵をソーセージ製造の塩漬工程に導入

することにより、その物性や微細構造が乳酸菌を添加しない対照区と比較して大きく変化し、かつ筋原線維構造の脆弱化やそれを構成する筋原線維タンパク質の分解等も生じることを明らかにしている<sup>1)</sup>。また、120°C以上の高温加熱であるレトルト加熱によっても著しい物性低下が起こるとともに、構成タンパク質の分解もみられ、その結果として遊離アミノ酸や低分子ペプチドが派生するこ



とも併せて見出している<sup>4,5)</sup>。このような低温乳酸発酵や高温加熱に伴う筋原線維タンパク質の分解は、肉塊や肉粒子が良好に結着して得られる食肉製品の好ましい食感の発現を阻害するものと考えられるが、その一方で保健的機能性の発現・向上という観点においては、場合によっては機能性を有する低分子ペプチドが派生してくるという付加価値をもたらす可能性も示すものとする。したがって、低温乳酸発酵やレトルト加熱に伴うタンパク質分解挙動の詳細を明らかにし、かつ機能性発現の有無を評価することは、食肉・食肉製品の高付加価値化を図るうえできわめて意義深いことといえる。これまでに、筋原線維タンパク質に、数種類の低温性乳酸菌*Lactobacillus sakei*を用いた低温乳酸発酵や、120~140℃のレトルト加熱処理を施すことによって、筋原線維タンパク質の分解が昂進し、そのタンパク質分解に伴って、血圧上昇や血糖値上昇の関連酵素であるアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) やジペプチジル・ペプチダーゼ (DPP) IV の阻害活性が高まる傾向にあること等を報告してきた<sup>6,7)</sup>。またそれは、レトルト加熱よりも発酵区においてより顕著であることも同時に示した<sup>7)</sup>。

そこで本研究では、これまでと同様に、食肉の主要タンパク質である筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、既報<sup>6,7)</sup>とは異なる低温性乳酸菌株を用いた低温発酵を施した筋原線維タンパク質における血圧上昇抑制作用の*in vitro*指標であるACEや血糖値上昇抑制剤の標的酵素でもあるDPPIVの阻害活性を評価し、さらに骨形成に関与する骨芽細胞の分化(アルカリホスファターゼ活性とコラーゲン合成能)に及ぼす影響を評価することで、単純モデル系における低温乳酸発酵による機能性発現の有無について検討を加えた。

## 2. 実験材料と方法

### 2.1 試料調製

できる限り脂肪と結合組織を取り除いた新鮮な豚ロース肉から、一部改変したPerry and Grey<sup>8)</sup>、Etlinger<sup>9)</sup>らの方法に準じて筋原線維を調製し、最終的に0.6M-NaCl溶液(pH6.0)に対して透析、遠心分離(35,000×g, 15分, 4℃)して得られた上澄み画分を筋原線維タンパク質試料とした。終濃度を15mg/mlに調整した筋原線維タンパク質溶液にグルコースが2%(w/v)となるように添加し、さらに乳酸菌スターター*Lactobacillus sakei* D-1001 (*L. D-1001*), 同No.1 (*L. No.1*) および同No.3 (*L. No.3*)を同溶液1mlあたり10<sup>6</sup>個レベルとなるように接種し、4℃の低温下で静置したものを発酵区とした。発酵期間中、pHを経時的に測定し、乳酸菌を接種した筋原線維タンパク質溶液のpHが5.3付近に達するまで発酵を続けた後、70℃で30分間の加熱処理を施した。乳酸菌を接種せずに70℃で30分間の加熱処理のみを施したものを対照区とした。いずれの試料も、加熱後速やかに氷冷した。各加熱後試料を遠心分離(35,000×g, 15分, 4℃)して得られた上澄みを、蒸留水に対して透析(Spectra/por CE M.W.500)した後、凍結乾燥したものを試料とした。

### 2.2 ペプチド量の測定

上記凍結乾燥試料を蒸留水で溶解したのに対して等量の4%トリクロロ酢酸(TCA)を加えることにより2%TCA可溶性画分を調製し、三上ら<sup>10)</sup>の方法に準じてペプチド量を測定した。

### 2.3 ACEならびにDPPIV阻害活性測定

ACE阻害活性は、ACE(Sigma-Aldrich)と合成基質Hip-His-Leu(ペプチド研究所)を用い、CushmanとCheungの方法<sup>11)</sup>に準じて測定した。すなわちACEと基質が反応した結果、遊離する



馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、その吸光度（波長：228nm）を測定する方法である。DPPIV阻害活性は、DPP IV（NKMAX）と基質Gly-Pro-NA・p-tosylate（ペプチド研究所）を用い、Ikeharaらの方法<sup>12)</sup>を一部改変して測定した。すなわち、DPPIVと基質が反応した結果、遊離するp-NA量を分光光度計（波長：385nm）で測定する方法である。いずれの活性も、それぞれの酵素活性を50%阻害するのに必要な試料タンパク質濃度（mg/ml）、IC<sub>50</sub>として表した。

#### 2.4 培養骨芽様細胞（MC3T3-E1）を用いた分化指標評価

マウス由来骨芽細胞様株MC3T3-E1（RIKEN Cell Bank：RCB1126）を使用し、4 mL L-Glutamineおよび10%FBS（MultiSer）を含むMinimum Essential Medium Eagle's（ $\alpha$ -MEM）培地（SIGMA）にて継代・前培養等を行った。培養はすべてCO<sub>2</sub>インキュベーター（37°C、5% CO<sub>2</sub>）内で行った。

細胞濃度 $2.5 \times 10^5$  cells/mlに調整したMC3T3-E1を3.5  $\phi$  ディッシュに播種し、増殖培地（10% FBSを含む $\alpha$ -MEM）で3日間培養した。その後、新鮮な $\alpha$ -MEM培地に交換し、タンパク質濃度が1 mg/mlの各試料を培地に対して10%（v/v）になるように添加して、3日間培養を行ったものを以下の実験に供した。

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

アルカリホスファターゼ（ALP）活性は、ラボアッセイALP（和光純薬）を用いて、細胞破砕上清中のp-ニトロフェノール（n mol/ml）量

を測定するとともに<sup>13)</sup>、細胞破砕上清のタンパク質濃度をBCA Protein Assay Kit（PIERCE）を用いて測定し、以下の式を用いてALP活性値（n mol/min/ $\mu$ g protein）を算出した。

$$\begin{aligned} \text{ALP活性値 (n mol/min/mg protein)} \\ = \text{p-Nitrophenol (n mol/ml)} \times 30 \text{ (min)} / \text{細胞} \\ \text{タンパク質量 (}\mu\text{g/ml)} \end{aligned}$$

コラーゲンの定量は、試料添加後3日間培養した後の培養上清中のコラーゲン濃度をSircol Soluble Collagen Assay Kit（Biocolor）によって測定することで行った<sup>13)</sup>。なお、各試料中に含まれるコラーゲン量を考慮するため、10%の各試料を含む $\alpha$ -MEMを本測定のブランクとして用いた。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 低温乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質画分のACEとDPPIV阻害活性

L. D-1001, L. No. 1 およびL. No. 3を接種して低温乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質における降圧薬の代表的標的酵素の一つであるACE阻害活性の発現の有無について検討したところ、既報<sup>7)</sup>で示した低温性乳酸菌（L. No. 7とNo. 9）接種区と同様、対照区と比較して有意に低いIC<sub>50</sub>値、すなわち高い活性を示し、低温乳酸発酵によって、ACE阻害活性が上昇することが確認された（Fig. 1 A）。なかでもL. No. 3接種区が最も高い活性を示したが、接種菌株間の差は有意なものではなかった。一方、高血糖治療の標的酵素の一つであるDPPIV阻害活性についても同様に検討したところ、本指標もACE阻害活性と同様、いずれの菌株接種区においても有意なIC<sub>50</sub>の低下がみられ、特にL. No. 3接種区においてそれが顕著かつ有意であった（Fig. 1 B）。データには示

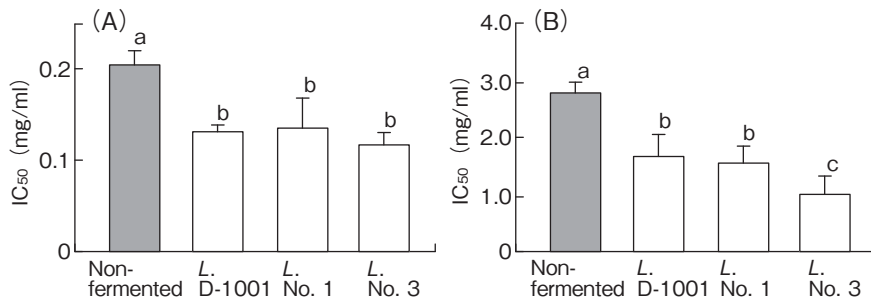


Fig. 1 Inhibitory effect of water-soluble protein fractions from non-fermented and fermented myofibrillar protein on angiotensin I-converting enzyme (A) and dipeptidyl peptidase IV (B) activities. Data represent the means  $\pm$  SD of at least five independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

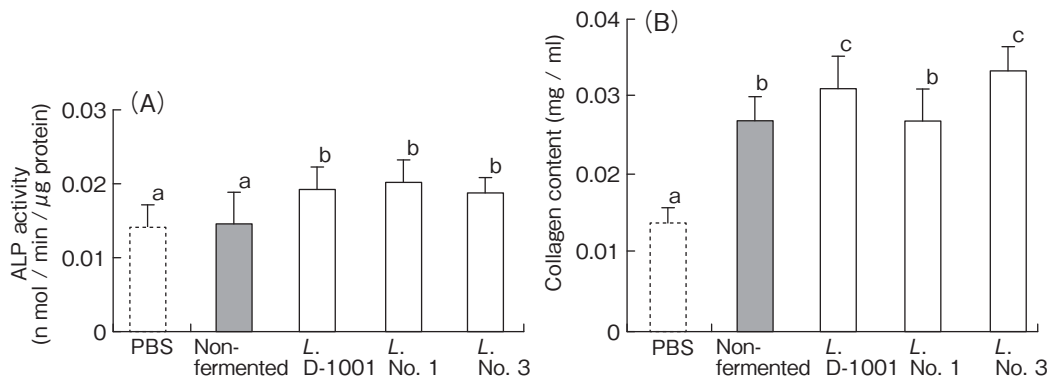


Fig. 2 Effect of water-soluble protein fractions from non-fermented and fermented myofibrillar protein on ALP activity (A) and collagen synthesis (B) in osteoblast-like cell culture, MC3T3-E1 cells. PBS was used as a vehicle control. Data represent the means  $\pm$  SD of at least four independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ( $p < 0.05$ ).

していないが、いずれの菌株接種区においてもペプチド量の有意な増加がみられたことから、これらの活性本体がペプチドであると仮定した場合、系に含まれる活性の総量も増大しているものと推察される<sup>14)</sup>。

### 3.2 低温乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質が骨芽様細胞 (MC3T3-E1) の分化指標に及ぼす影響

骨芽細胞の分化の程度を評価する際に、骨形成時の石灰化に寄与するとされるALP活性や、骨の構成成分であるコラーゲンの生成量が生化学的指標としてしばしば用いられる<sup>13, 15)</sup>。これら

を指標に低温乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質の骨芽細胞分化に及ぼす影響について検討した結果をFig. 2 AとBにそれぞれ示した。まず、対照区である70℃加熱区と各種低温発酵区のALP活性値を比較すると、いずれの菌株接種区も有意に高い活性値を示したが、接種菌株間の差異はみられなかった (Fig. 2 A)。この時、PBS (溶媒対照) 区と70℃加熱区との間には差はなく、低温発酵が筋原線維タンパク質のALP活性発現に寄与する可能性が示された。その活性値は、骨形成に寄与するとされる $\beta$ -クリプトキサンチン ( $10^{-8} \sim 10^{-6}$  M) に相当程度であった<sup>16)</sup>。

一方のコラーゲン量では、対照区である70℃加熱区と各種発酵区を比較すると、L. D-1001とL. No. 3 接種区は有意に高い値を示したが、L. No. 1 接種区はこれら2菌種よりも低値を示し、70℃加熱区とも有意な差がなかった (Fig. 2 B)。本指標においては70℃加熱区がPBS (溶媒対照) 区と比較して、有意に高い値を示したことから、加熱のみを施した筋原線維タンパク質にも骨芽細胞のコラーゲン合成に寄与する成分が存在し、L. No. 1 接種区も同程度であったことが示された。データには示していないが、ペプチド量についてはL. No. 1 接種区が、70℃加熱区ならびにL. D-1001, L. No. 3 接種区と比較して有意かつ最も高い値を示したものの、その傾向と、これらの機能性指標値との対応は必ずしもみられなかった。また、先に述べたACEとDPPIV阻害活性においても、L. No. 3 接種区が最も高い値を示しており、タンパク質分解の程度とは必ずしも一致するものではなかった。

現在、培養骨格筋細胞の成長に及ぼす影響についても試行的に検討を進めており、発酵もしくは加熱処理を施した筋原線維タンパク質が骨格筋細胞の分化促進に寄与する可能性も確認している。それも含めて今後は、これまでにその存在を示してきた筋原線維タンパク質に由来する種々の活性因子の特定を急ぎたい。

本研究の成果は、公益財団法人伊藤記念財団の支援によって得られたものであり、ここに深く感謝申し上げます。また、名城大学農学部食品機能学研究室の学生・院生諸氏に深謝申し上げます。

#### 4. 要 約

食肉の主要タンパク質であり、食肉製品の良好な結着性発現に寄与する筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、低温性乳酸菌を利用した低温発酵処理が、筋原線維タンパク質の機能性

発現に及ぼす影響について調査した。機能性評価には、血圧上昇および血糖値上昇抑制作用の*in vitro*指標であるACE阻害活性、DPPIV阻害活性を用いるとともに、骨形成のモデル細胞である培養骨芽細胞におけるALP活性やコラーゲン合成を指標として用いた。

その結果、ACE、DPPIVのいずれの阻害活性においても、非発酵区である対照区 (70℃加熱区) と比較して有意に低いIC<sub>50</sub>値、すなわち高い阻害活性を示し、低温乳酸発酵によって、これらの酵素を阻害する機能が充進する可能性が示唆された。

低温乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質画分を添加した培養骨芽細胞におけるALP活性は、対照区である70℃加熱区と溶媒対照区であるPBS区と比較して、有意に高い値を示し、低温発酵が筋原線維タンパク質のALP賦活性に寄与する、すなわち骨芽細胞における石灰化を促進させる可能性が示された。一方のコラーゲン量では、対照区である70℃加熱区の値が溶媒対照区よりも有意に高い値を示したことから、筋原線維タンパク質画分そのものに骨芽細胞のコラーゲン合成を賦活する作用が存在する可能性が示唆されたが、低温発酵によってその活性がより強化される傾向も併せて示された。この時、低温乳酸発酵に伴うペプチド量の増大が認められたが、その程度と、各種活性値との間には明瞭な関係性はみられなかった。

以上のことより、低温乳酸発酵処理によって筋原線維タンパク質は分解し、その結果生じた低分子ペプチド群にこれらの機能性を有する因子が存在する可能性が示唆されたが、その分解の程度と活性の強度は必ずしも一致するものではなかった。

#### 文 献

- 1) 芳賀聖一, 林利哉, 大場正春, 坂田亮一: 名城大学総合研究所 総合学術研究論文集, 8, 91~96, 2009.

- 2) 芳賀聖一：ミートジャーナル, 36(1), 107~113, 1999.
- 3) 藤田利宗, 林利哉, 芳賀聖一：日本食品科学工学会誌, 53, 423~429, 2006.
- 4) Hayashi, T., Toyoda, N., Arakawa, M., Haga, S. : *Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, 56, E60, 2010.
- 5) Hayashi, T., Washio, S., Arakawa, M., Taguchi, M., Toyoda, N., Haga, S. : *Int. Cong. Meat Sci. Technol.*, 57, P395, 2011.
- 6) 林利哉, 長澤麻央, 芳賀聖一, 小川幸彦：平成29年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 36, 135~139, 2018.
- 7) 林利哉, 長澤麻央, 小川幸彦, 芳賀聖一：平成30年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 37, 84~88, 2019.
- 8) Perry, S. V., Grey, T. C. : *Biochem. J.*, 64, 184~192, 1956.
- 9) Etlinger, J. D., Zak, R., Fischman, D. A. : *J. Cell Biol.*, 6, 123~141, 1976.
- 10) 三上正幸, 長尾真理, 関川三男, 三浦弘之：日本畜産学会報, 66, 630~638, 1994.
- 11) Cushman, D. W., Cheung, H. S. : *Biochem. Pharm.*, 20, 1637~1648, 1971.
- 12) Ikehara, Y., Ogata, S., Misumi, Y. : *Methods In Emzymology*, 244, pp.215-227, Academic Press, New York, 1993.
- 13) Choi, E. M. : *Biochem. Pharmacol.*, 70, 363~368, 2005.
- 14) 伊部さちえ, 吉田恵子, 熊田薫：日本食品科学工学会誌, 53, 189~192, 2006.
- 15) 芹澤篤, 鳥羽保宏：月刊フードケミカル, 23(3), 24~29, 2007.
- 16) Uchiyama, S., Yamaguchi, M. : *J. Cell. Biochem.*, 95, 1224~1234, 2005.

# 食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究

Study on awareness of consumers about safety of food additives

堀江 正一・渡邊 萌・堀井 千絵

(大妻女子大学家政学部食物学科)

Masakazu Horie, Moe Watanabe and Chie Horii

(Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University)

The current study surveyed students in a dietitian and registered dietitian training course and their parents regarding their attitudes towards the safety of food additives. Results revealed that students and their mothers differed widely in their perceptions of food additives, with mothers being highly concerned about food additives.

An online survey (1,700 individuals) revealed that younger age groups, and especially individuals in their 20s, tended to have less concern about food additives while women in their 40s to 60s were highly concerned. Women in their 40s to 60s heard frequent media reports of food safety incidents in their early childhood, and women in those age groups often purchase ingredients and prepare meals. Presumably women in their 40s to 60s steadfastly perceive food additives as dangerous. Once one is convinced that “food additives are harmful and dangerous,” dispelling that belief is well-nigh impossible, but repeatedly providing accurate information that is easy to understand could lead to a change in one's perception of risk.

## 1. 目 的

食品添加物は、「人の健康を損なう恐れのない場合」のみ厚生労働大臣により使用が認められている。その安全性は科学的な根拠に基づいたものであり、ラットやマウスを用いた動物実験により、無毒と確かめられた量のさらに100分の1以下となるように使用されている。国際的にもFAOとWHOからなる食品規格(CODEX)委員会により科学的根拠に基づき、その使用が認められている。このように、食品添加物の安全性は、科学的な根拠に基づき十分確保されている。しかし、多くの消費者にとって食品添加物は「有害な

もの、危険なもの」と認識されている。そのことは、今まで実施された種々の意識調査や、マスメディアによる報道等でもうかがい知ることができ<sup>1~5)</sup>。なぜこれほどまでに科学的な評価と消費者の認識の間に乖離が見られるのであろうか。しかし、食品添加物のリスク認知について男女別、年齢階層別に詳細に調査した報告はほとんど見られない。そこで、科学的な安全性評価と消費者のリスク認知の大きな乖離を埋めるため、まず男女別、年齢階層別における食品添加物に対するリスク認知状況を調査した。次に、科学的な安全性評価と消費者のリスク認知の大きな乖離を埋める手法として、正しい情報の有用性について検討し



た。本研究は、食品添加物の科学的な安全性評価と多くの消費者が抱えている認識の大きな乖離を埋め、より健全で快適な食生活の営みに寄与することを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 アンケート調査

#### 2.1.1 調査方法

質問紙によるアンケート調査およびインターネット調査

#### 2.1.2 調査対象

①大妻女子大学食物学科2年生に在籍する学生、食安全学の授業開始前（配布数133部、有効回収数128部（有効回収率：96.2%））、および食安全学の授業終了時（配布数130部、有効回収数122部（有効回収率：93.8%））、にアンケート調査を実施した（Table 1）。

②大妻女子大学食物学科2年生に在籍する学生の両親（配布数133部、有効回収数91部（有効回収率：68.4%）、父親33名、母親58名）、にアンケート調査を実施した（Table 2）。

③インターネット調査（GMOリサーチ株式会社に委託；20代、30代、40代、50代、60代、70代以上、男女各141～142名、合計1,700名、（有効回答数1,471名；有効率86.5%））（Table 3）

#### 2.1.3 調査期間

①2019年4月および7月、②2019年4月、③2020年2月

#### 2.1.4 統計解析

調査データの統計解析は、IBM SPSS Statistics ver.26を用いた。

## 3. 結果および考察

### 3.1 質問紙によるアンケート調査

過去に実施されたアンケート調査でも、今回実施したアンケート調査においても消費者の多くが

食品の安全性に不安を抱いており、その要因として今なお食品添加物を上位にあげている<sup>2,3)</sup>。Fig. 1に示すとおり、女子大学生（2年生）とその母親（主に40代から50代）間での食品添加物に対するリスク認知では、母親のほうが食品添加物に対して、より強く不安感を抱いており、有意な差が認められた（ $p < 0.05$ ）。なお、父親の食品添加物に対する不安度は母親に比べると、かなり低く、学生と同程度であった。

今まで報告されている食品の安全性や食品添加物に対する不安度に関する内外の調査では、一般に女性のほうが不安感が高いことが報告されている<sup>3,6~8)</sup>。今回の調査においても、女子学生に比べ50代前後の母親のほうが食品添加物に対して不安感が高かった。家庭においては、食品の購入から調理まで主婦が主に担っている。すなわち、食品の安全を守ることが主婦の役割となっており、このことが、食品の安全性や食品添加物に対する不安感を募らせる主要因の一つになっていると推察される。

次に、「食安全学の講義を受けて食品添加物に対する考え方が変わりましたか？」との問いに多くの学生が「より安全と考えるようになった」と回答している。Fig. 2に食品添加物の安全性について、食安全学の授業前後での調査結果を示した。授業を通して、食品添加物に対する正しい情報を知ることにより、不安感を抱く学生の割合が有意に減少している（ $p < 0.01$ ）。

食品添加物に対して、偏った、間違った虚偽情報に振り回されないためには、正しい知識を学び、自ら考えることが基本である。学生にとって正しい知識を学ぶ機会は、学校教育の中にあり、科学リテラシーを向上させる教育の推進が重要である。一度、脳裏に刷り込まれた「食品添加物を有害なもの、危険なものとする」考えはなかなか拭い去ることができないが、正しい情報を分かり



Table 1

## 食の安全性に関するアンケート調査のお願い

1. 食品の安全性についてどう思いますか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
2. 食の安全性で具体的に何が不安ですか？ (上位3個まで選んでください)  
(1) 食中毒, (2) 遺伝子組換え食品, (3) BSE, (4) 家畜への薬剤投与, (5) 残留農薬,  
(6) 食品添加物, (7) アレルギー, (8) 消費期限, 賞味期限, (9) 外食の安全性,  
(10) 家庭食の安全性, (11) 食品汚染物質 (カドミウム, メルカプト等), (12) 表示違反,  
(13) 放射性物質, (14) 輸入食品, (15) いわゆる健康食品, (16) その他 ( )
3. 食品添加物の安全性についてどう思いますか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
4. 食品添加物は体に悪いと思いますか？  
(1) 思う, (2) ある程度思う, (3) 余り思わない, (4) 思わない, (5) よく分からない
5. 問4で「思う」「ある程度思う」と答えた方にお聞きます。何が体に悪いと思いますか？  
(1) 発ガン性, (2) アレルギー, (3) 奇形, (4) 脳への影響, (5) などとなく
6. 現在, 食品添加物には発ガン性があるものが使われていると思いますか？  
(1) 思う, (2) ある程度思う, (3) 余り思わない, (4) 思わない, (5) よく分からない
7. 食品を購入する時に食品添加物の表示を見ますか？  
(1) 必ず見る, (2) よく見る, (3) 時々見る, (4) 余り見ない, (5) ほとんど見ない
8. 食品添加物が使われている食品について  
(1) 買わない, (2) なるべく買わない, (3) 時々買う, (4) 余り気にしない
9. 食品添加物「無添加」と表示されている食品は, 安全性が高いと思いますか？  
(1) 思う, (2) ある程度思う, (3) 余り思わない, (4) 思わない, (5) よく分からない
10. 食の安全性に関する情報で, 何処の情報を信用していますか？ (複数回答可)  
(1) テレビ, (2) 新聞, (3) 雑誌, (4) 教科書, (5) 授業, (6) 友人, (7) 家族,  
(8) インターネット, (9) 厚生労働省, 保健所等, (10) その他 ( )
11. 食品を購入する際, 重視することはなんですか？ (複数回答可)  
(1) 価格, (2) 鮮度, (3) 安全性, (4) 無添加, (5) 無農薬, (6) 産地, (7) 見た目, (8) おいしさ,  
(9) 栄養, (10) 旬, (11) 生産者, メーカー, (12) その他 ( )
12. 化学物質に対して有害・危険と思っていますか？  
(1) 思っている, (2) ある程度思っている, (3) 余り思っていない, (4) 思っていない

ご協力ありがとうございました。

Table 2

## 食の安全性に関するアンケート調査のお願い

あなたの年齢、性別を教えてください。

年齢：30歳代、40歳代、50歳代、60歳代、70歳代以上

性別：男性・女性

1. 食品の安全性についてどう思いますか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
2. 食の安全性で具体的に何が不安ですか？（上位3個まで選んでください）  
(1) 食中毒、(2) 遺伝子組換え食品、(3) BSE、(4) 家畜への薬剤投与、(5) 残留農薬、  
(6) 食品添加物、(7) アレルギー、(8) 消費期限、賞味期限、(9) 外食の安全性、  
(10) 家庭食の安全性、(11) 食品汚染物質（カドミウム、メチル水銀等）、(12) 表示違反、  
(13) 放射性物質、(14) 輸入食品、(15) いわゆる健康食品、(16) その他（ ）
3. 食品添加物の安全性についてどう思いますか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
4. 食品添加物は体に悪いと思いますか？  
(1) 思う、(2) ある程度思う、(3) 余り思わない、(4) 思わない、(5) よく分からない
5. 問4で「思う」「ある程度思う」と答えた方にお聞きします。何が体に悪いと思いますか？  
(1) 発ガン性、(2) アレルギー、(3) 奇形、(4) 脳への影響、(5) なんとなく
6. 現在、食品添加物には発ガン性があるものが使われていると思いますか？  
(1) 思う、(2) ある程度思う、(3) 余り思わない、(4) 思わない、(5) よく分からない
7. 食品を購入する時に食品添加物の表示を見ますか？  
(1) 必ず見る、(2) よく見る、(3) 時々見る、(4) 余り見ない、(5) ほとんど見ない
8. 食品添加物が使われている食品について  
(1) 買わない、(2) なるべく買わない、(3) 時々買う、(4) 余り気にしない
9. 食品添加物「無添加」と表示されている食品は、安全性が高いと思いますか？  
(1) 思う、(2) ある程度思う、(3) 余り思わない、(4) 思わない、(5) よく分からない
10. 食の安全性に関する情報で、何処の情報を信用していますか？（複数回答可）  
(1) テレビ、(2) 新聞、(3) 雑誌、(4) 教科書、(5) 授業、(6) 友人、(7) 家族、  
(8) インターネット、(9) 厚生労働省、保健所等、(10) その他（ ）
11. 食品を購入する際、重視することはなんですか？（複数回答可）  
(1) 価格、(2) 鮮度、(3) 安全性、(4) 無添加、(5) 無農薬、(6) 産地、(7) 見た目、(8) おいしさ、  
(9) 栄養、(10) 旬、(11) 生産者、メーカー、(12) その他（ ）
12. 化学物質に対して有害・危険と思っていますか？  
(1) 思っている、(2) ある程度思っている、(3) 余り思っていない、(4) 思っていない

ご協力ありがとうございました。

Table 3

## 食の安全性に関するアンケート調査のお願い

性別 1. 男性 2. 女性

年齢 1. 20代 2. 30代 3. 40代 4. 50代 5. 60代 6. 70以上

同居家族の有無 1. 同居家族あり 2. 同居家族なし(単身)

家族構成(複数回答可) 1. 乳幼児がいる 2. 小学生がいる 3. 中学生がいる 4. その他

職業 1. 自営業, 2. 会社員, 3. 公務員, 4. 派遣・パート, アルバイト, 5. 学生, 6. 専業主婦, 7. 無職

職種(専攻) 1. 事務系(文科系), 2. 技術系(理科系)

居住地 1. 町村 2. 市 3. 大都市

1. 食品の安全性についてどう思いますか？

(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない

2. 食品の安全性で具体的に何が不安ですか？(上位3個まで選んでください)

(1) 食中毒, (2) 遺伝子組換え食品, (3) BSE, (4) 家畜への薬剤投与, (5) 残留農薬,  
(6) 食品添加物, (7) 食物アレルギー, (8) 消費期限, 賞味期限, (9) 外食の安全性,  
(10) 家庭食の安全性, (11) 食品汚染物質(ダイオキシン, カドミウム等), (12) 食品偽装表示,  
(13) 放射性物質, (14) 輸入食品, (15) いわゆる健康食品, (16) その他( )

3. 食品添加物の安全性についてどう思いますか？

(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない

4. 食品添加物は体に悪いと思いますか？

(1) 思う, (2) ある程度思う, (3) 余り思わない, (4) 思わない, (5) よく分からない

5. 問4で「思う」「ある程度思う」と答えた方にお聞きます。いつ頃から不安に思うようになりましたか？

(1) 小中学生, (2) 高校生, (3) 大学生, (4) 社会人, (5) よく分からない

6. 問4で「思う」「ある程度思う」と答えた方にお聞きます。何が体に悪いと思いますか？

(1) 発ガン性, (2) アレルギー, (3) 胎児への影響, (4) 脳への影響, (5) なんとなく

7. 食品を購入する際に、食品添加物が使用されているか気に掛けますか？

(1) 常に気に掛ける, (2) 時々気に掛ける, (3) 余りに気に掛けない, (4) ほとんど気に掛けない

8. 食品添加物が使われている食品を購入しますか？

(1) 買わない, (2) なるべく買わない, (3) 時々買う, (4) 余りに気にしない

9. 食の安全性に関する情報は、主に何処から得ていますか？(複数回答可)

(1) テレビ, (2) 新聞, (3) 雑誌, (4) 教科書, (5) 授業, (6) 友人, (7) 家族,  
(8) インターネット, (9) 厚生労働省, 保健所等, (10) 食品安全委員会, (11) その他( )

10. 食品を購入する際、重視することはなんですか？(複数回答可)

(1) 価格, (2) 鮮度, (3) 安全性, (4) 無添加, (5) 無農薬, (6) 産地, (7) 見た目, (8) おいしさ,  
(9) 栄養, (10) 旬, (11) 生産者, メーカー, (12) 天然・自然, (13) その他( )

11. 化学物質と聞くと有害・危険とってしまいますか？

(1) そう思う, (2) ある程度思う, (3) 余り思わない, (4) 思わない

12. 天然と聞くと“安全・安心”，合成と聞くと“危険・不安”と思いますか？  
(1) そう思う，(2) ある程度思う，(3) 余り思わない，(4) 思わない
13. 食品添加物「無添加」，「不使用」と表示されている食品は，安全性が高いと思いますか？  
(1) 思う，(2) ある程度思う，(3) 余り思わない，(4) 思わない，(5) よく分からない
14. 食品は，栄養成分（タンパク質，炭水化物など）を含め，さまざまな化学物質が集まったものです．食品添加物も化学物質の一種ですが，このことについてどの様に思いますか？  
(1) そう思う，(2) ある程度思う，(3) 余り思わない，(4) 思わない，(5) よく分からない
15. 毒性の強い化学物質でも，その摂取量が極微量であれば健康に影響を及ぼさないとされています．このことについてどの様に思いますか？  
(1) そう思う，(2) ある程度思う，(3) 余り思わない，(4) 思わない，(5) よく分からない
16. 食品添加物は，法律により「人の健康を損なう恐れのない場合」のみ，国により使用が認められています．このことについて信用できますか？  
(1) 信用できる，(2) ある程度信用できる，(3) やや信用できない，(4) 信用できない
17. 生野菜を食品添加物，次亜塩素酸ナトリウムにより処理（最終食品に残らない）することにより，食中毒の発生を少なくすることができます．次亜塩素酸ナトリウムの使用は不安ですか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
18. 豆腐を作る時に「にがり」が用いられます．「にがり」も食品添加物の一種ですが，にがりの使用は不安ですか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
19. 癌の主な原因は，タバコ，普通の食べ物や高齢化が大きく影響しており，食品添加物の影響は無視できるレベルとされています．このことについて信用できますか？  
(1) 信用できる，(2) ある程度信用できる，(3) 余り信用できない，(4) 信用できない
20. かつて（40～50年前）危険な添加物も使われていましたが，現在使用されている添加物は国により安全性が確保されており，食生活の中で食品添加物を不安視することはありません．どう思いますか？  
(1) 信用できる，(2) ある程度信用できる，(3) やや信用できない，(4) 信用できない
21. 食品添加物は，使うことにより，消費者にとって利点（保存性や香りを高める）がないと認められません．ご存知でしたか？  
(1) 知っていた，(2) ある程度知っていた，(3) 余り知らなかった，(4) 知らなかった
22. 普段，食事をとる時に食品に含まれる「食品添加物」のことを考えますか？  
(1) よく考える，(2) ある程度考える，(3) 余り考えない，(4) ほとんど考えない
23. 改めてお聞きします．食品添加物の安全性についてどう思いますか？  
(1) 不安である (2) やや不安である (3) 余り不安でない (4) 不安でない
24. 食品添加物に対する不安度はどの程度ですか？  
(1) 非常に強い，(2) やや強い，(3) 余り強くない，(4) 強くない（普段気にしない）

ご協力ありがとうございました。

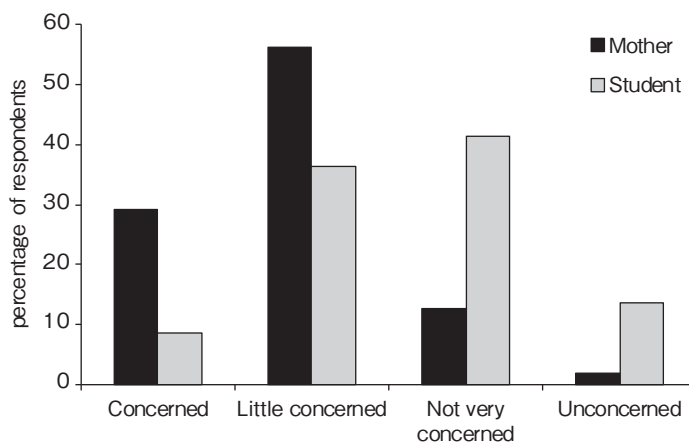


Fig. 1 Attitude of female college students and their mothers about the safety of food additives

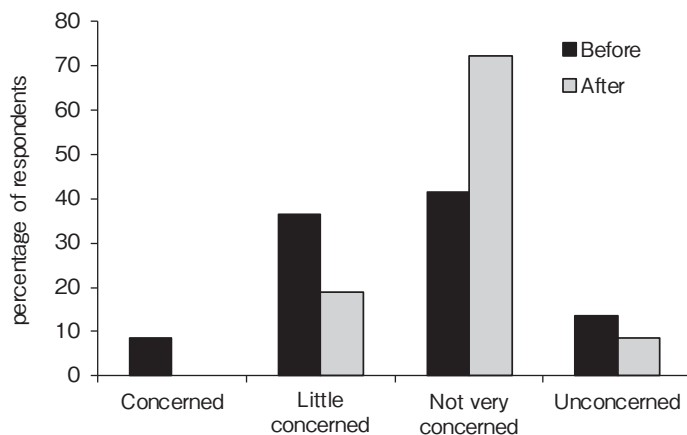


Fig. 2 Attitude survey before and after class on safety of food additives

やすく、かつ繰り返し提供することにより、リスク認知の変容が可能であり、このことが重要と考える。

### 3.2 インターネット調査

食品添加物のリスクは、十分小さく安全と評価されている。しかし、消費者の多くは、食品添加物は危険なもの、発癌性があるものと不安感を抱いている<sup>6)</sup>。食品添加物の安全性に不安感を抱いている傾向は、男性より女性が強く、特に40代から60代の女性に強いことが食品安全委員会や英国・食品基準庁の調査により報告されている<sup>1, 3)</sup>。

そこで、男女別、年齢階層別（20代、30代、40代、50代、60代および70代以上）に分けて、食品の安全性や食品添加物に対する認識を調査した。なお、回答時間が著しく短い回答者221名（回答時間2分以下の回答者；平均回答時間4.75分、なお、同一質問を当大学の学生10名に回答させた時の平均回答時間は4.5分であった）は本調査から除外した（インターネット回答者合計1,700名、有効回答1,471名；有効率86.5%）。

#### 3.2.1 食品の安全性に対する意識について

食品の安全性について、不安の程度を尋ねたと

ころ、男性に比べ、女性のほうが優位に高く、年齢階層別に見ると20代が最も低く、年齢が40～60代と高くなるに従い不安度も高くなり、70代以上になるといくぶん低くなる傾向を示した。食品添加物に対する不安度もほぼ同様な傾向を示した。

食品の安全性で具体的に何が不安ですかという質問（3つまで選択可）に対する調査結果の概要をTable 4に示した。全体では、食中毒（34.2%）、食品添加物（29.1%）、残留農薬（21.4%）、遺伝子組換え食品（19.2%）の順であった。男女とも、不安要因として食品添加物が第2位であったが、男性（24.0%）に対して、女性は34.1%と10ポイント高い値であった。また、50代以上の女性では食品に対する不安要因として、食品添加物が第1位（50代＝36.9%、60代＝41.8%、70代以上＝37.6%）であった。

### 3.2.2 食品添加物の安全性に関する意識について

食品の安全性で具体的に「食品添加物に対する安全性についてどう思いますか?」と尋ねてみた。全体では、非常に不安である15.2%、やや不安である49.5%、あまり不安でない20.6%、不安でない7.6%であった。インターネット調査者の約2/3が食品添加物に対して不安感を抱いていることが分かった。Fig. 3に示すように、50代、60代の女性では、約80%が不安感を抱いていた。

過去に実施されたアンケート調査でも、最近実施されたアンケート調査においても、消費者の多くが食品添加物の安全性に不安を抱いている。食品の安全性に関する各種アンケート調査では、牛海綿状脳症（BSE）や福島原発事故による放射性物質汚染問題のように、食品の安全性に関する事件・事故により報道される記事数は大きく異なり、消費者が抱く具体的な不安項目も事件や事故の影響を強く受ける。しかし、最近食品添加物による問題はほとんど起こっていないのにもかかわ

らず消費者の食品添加物に対する不安感、不信心は根強いものがある<sup>2, 6, 7)</sup>。

### 3.2.3 食品添加物に対する不安感を低減化する方法

食品添加物に対する科学的な安全性評価と消費者のリスク認知の間にある大きな溝（乖離）を埋める手段として、効果的リスクコミュニケーションを通して、消費者の科学リテラシーを高めていくことが必要である<sup>9, 10)</sup>。また、科学リテラシーを向上させる手段として正しい情報を分かりやすく、繰り返して提供することが効果的と考える。今回、「化学物質と聞くと有害・危険とってしまいますか?」、「天然と聞くと“安全・安心”、合成と聞くと“危険・不安”と思えますか?」、「食品添加物「無添加」、「不使用」と表示されている食品は、安全性が高いと思えますか?」、「食品は、栄養成分（タンパク質、炭水化物など）を含め、さまざまな化学物質が集まったものです。食品添加物も化学物質の一種ですが、このことについてどのように思えますか?」、「毒性の強い化学物質でも、その摂取量が極微量であれば健康に影響を及ぼさないとされています。このことについてどのように思えますか?」、「生野菜を食品添加物、次亜塩素酸ナトリウムにより処理（最終食品に残らない）することにより、食中毒の発生を少なくすることができます。次亜塩素酸ナトリウムの使用は不安ですか?」、「豆腐を作る時に「にがり」が用いられます。「にがり」も食品添加物の一種ですが、にがりの使用は不安ですか?」、「癌の主な原因は、タバコ、普通の食べ物や高齢化が大きく影響しており、食品添加物の影響は無視できるレベルとされています。このことについて信用できますか?」、「かつて（40～50年前）危険な添加物も使われていましたが、現在使用されている添加物は国により安全性が確保されており、食生活の中で食品添加物を不安視することは



Table 4 Food safety issues of concern

Food issue	Total	Men							Female						
		M-Total	M-20s	M-30s	M-40s	M-50s	M-60s	M-70+	F-Total	F-20s	F-30s	F-40s	F-50s	F-60s	F-70+
Food poisoning	34.2	33.6	44.0	42.6	36.2	27.7	28.4	24.0	34.7	51.1	42.6	34.8	34.0	23.4	23.4
The use of food additives	29.1	24.0	16.3	21.3	15.6	29.1	26.2	35.9	34.1	26.2	32.6	30.5	36.9	41.8	37.6
The use of pesticides	21.4	17.9	8.5	8.5	11.3	20.6	23.4	35.2	24.8	8.5	19.9	24.1	27.0	37.6	32.6
Genetically modified (GM) foods	19.2	19.2	19.9	11.3	12.8	20.6	27.0	23.9	19.3	9.9	12.1	23.4	21.3	28.4	21.3
Not particularly	17.9	23.5	29.8	22.7	29.1	23.4	22.7	14.1	12.4	22.0	17.7	12.1	7.8	5.0	9.9
Imported foods	16.6	14.7	6.4	15.6	14.9	16.3	13.5	21.8	18.5	9.9	15.6	14.9	26.2	19.9	24.8
Food impersonation label	16.2	15.4	10.6	16.3	10.6	14.2	17.7	23.2	16.9	7.8	9.9	15.6	21.3	17.7	29.8
Hormones, antibiotics in food	13.5	11.4	5.7	5.7	10.6	10.6	18.4	17.6	15.5	9.2	5.7	11.3	15.6	24.8	27.0
Radioactivity in food	11.6	11.2	11.3	13.5	14.2	9.2	10.6	8.5	12.1	4.3	10.6	15.6	14.9	13.5	14.2
Chemicals from the environment	11.5	10.9	5.7	8.5	9.9	10.6	14.2	16.9	12.1	8.5	6.4	11.3	14.2	19.1	13.5
Datelabels (best before, use by)	9.6	9.3	15.6	15.6	7.8	5.7	5.7	5.6	9.9	12.1	10.6	11.3	12.8	7.1	5.7
Food hygiene when eating out	8.9	7.8	5.7	7.1	9.9	5.7	7.1	11.3	10.0	8.5	12.8	9.9	8.5	9.9	10.6
Food allergen	6.6	6.0	7.1	6.4	9.9	7.1	3.5	2.1	7.3	14.9	12.1	9.9	4.3	2.1	0.7
BSE	4.0	3.6	4.3	5.0	2.1	4.3	2.8	3.5	4.4	0.7	2.1	2.8	3.5	7.1	9.9
Food hygiene at home	1.7	1.6	2.8	2.1	0.7	0.0	2.1	2.1	1.8	2.8	4.3	1.4	0.7	0.7	0.7
So-called health food	1.7	1.5	1.4	2.1	0.7	1.4	2.1	1.4	1.9	2.8	1.4	2.8	1.4	2.1	0.7
Others	0.3	0.2	0.0	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	1.4	0.0	0.0	0.7

Which of these food issues are you concerned about, if any? Please select 3 that apply.

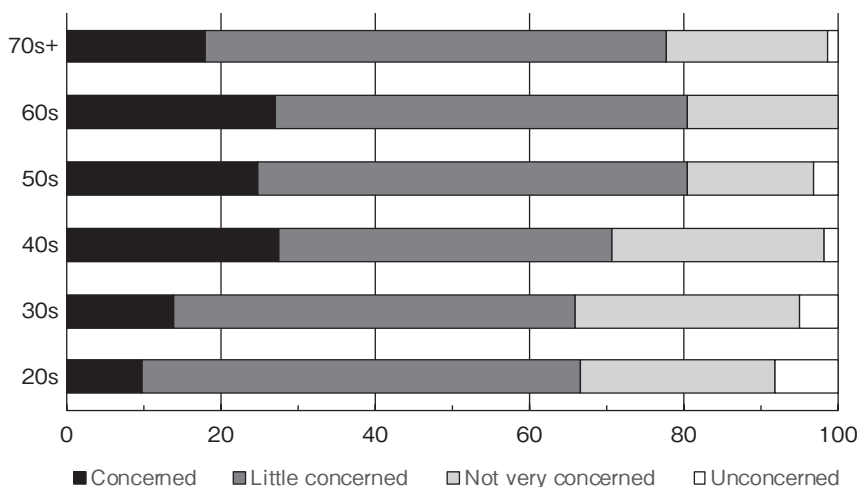


Fig. 3 Differences in women's awareness of the safety of food additives by age  
 age groups : 20s = 20~29years, 30s = 30~39years, 40s = 40~49years, 50s = 50~59years,  
 60s = 60~69years, 70s + = 70over years,

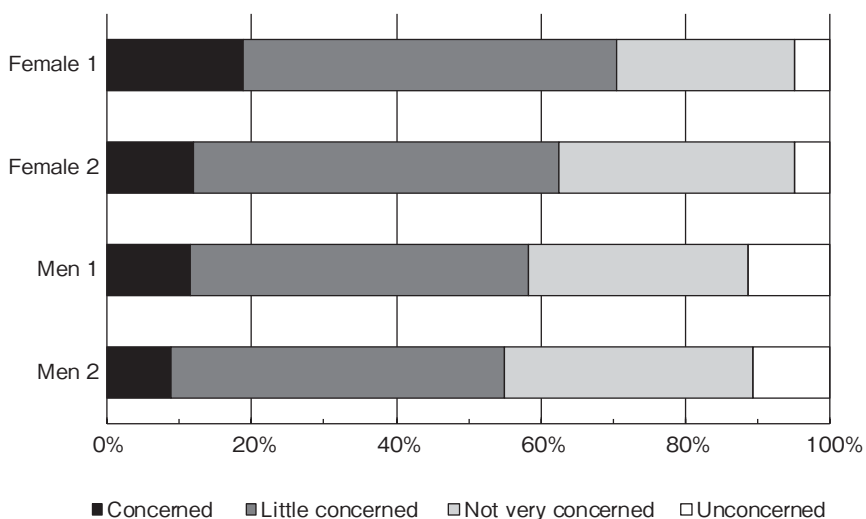


Fig. 4 Effect of correct information on the safety of food additives  
 Female 1 = female, before the lecture, Female 2 = female, after the lecture  
 Men 1 = men, before the lecture, Men 2 = men, after lecture

ありません。どう思いますか?」,「食品添加物は、使うことにより、消費者にとって利点（保存性や香りを高める）がないと認められません。ご存知でしたか?」等の問いに答えてもらった後に、最後に「改めてお聞きします。食品添加物の安全性についてどう思いますか?」と質問を投げかけてみた。その結果の概要をFig. 4 に示す。インター

ネット調査の最初に「食品添加物の安全性についてどう思いますか?」と質問した時に対して、男女とも、「不安である、やや不安である」と答えた割合が5~10ポイント低くなっている。特に、40代以上の女性では、優位な減少を示した ( $p < 0.05$ )。食品添加物に対して不安感を抱く消費者、特に40代以上の女性にとって、正しい情報を知

り、自ら考えることにより、食品添加物に対する不安感を低減化されたと推察された。食品添加物に対するリスク認知を低減する手段として、正しい情報を分かりやすく、かつ繰り返し提供することが、効果的であると考えられる。

#### 4. 要 約

消費者がどのような経緯で食品添加物に対する認識を醸成してきたか、あるいは醸成していくのかを明らかにし、科学的な安全性と消費者の認識の大きな乖離を埋めていくことは重要である。本研究では、栄養士・管理栄養士養成課程に籍を置く学生およびその両親を対象に、食品添加物の安全性に対する意識調査を実施した。その結果、学生と母親の食品添加物に対する認識には大きな相違が見られ、母親の不安度が高いことが認められた。

インターネット調査(1,700名)においても、食品添加物に対する不安感は、40代から60代の女性が高く、20代の若い世代になるほど、低くなる傾向が見られた。食品の安全性に対する事件・事故が頻繁に報道された幼少期を過ごし、かつ食材の購入から調理に携わる機会の多い40代から60代の女性は、食品添加物は危険なものと強く認識していることが推察される。一度、脳裏に刷り込まれた「食品添加物を有害なもの、危険なものとする」考えはなかなか拭い去ることができないが、

正しい情報を分かりやすく、かつ繰り返し提供することにより、リスク認知の変容が可能であると考えられる。

#### 文 献

- 1) 国政モニター課題報告「食の安全性に関する意識調査」：内閣府食品安全委員会, <https://www.fsc.go.jp/monitor/1512kokumoni-houkoku.pdf>
- 2) 東京都平成25年度インターネット都政モニターアンケート：食品の安全性について, <http://www.metro.tokyo.jp/INET/CHOUSA/2013/10/60nat100.htm>
- 3) Public Attitudes tracker Wave 19, Food Standards Agency, <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/public-attitudes-tracker-wave-19-final-report.pdf>
- 4) P. Williams, E., Stirling, N., Keynes, Foodfears : *Asia pacific J Clin Nutr.* **13**, 32~39, 2004.
- 5) Kaptan, B., Kayisoglu, S. : *American Journal of Food Science and Nutrition Research*, **2**, 21~25, 2015.
- 6) 食品に係るリスク認知アンケート調査の結果について：内閣府食品安全委員会, 平成27年5月13日, [https://www.fsc.go.jp/osirase/risk\\_questionnaire.html](https://www.fsc.go.jp/osirase/risk_questionnaire.html)
- 7) 東京都消費者月間実行委員会：食の安全に関する消費者意識と消費行動調査 <http://kurashifesta-tokyo.org/2013/special/pdf/chosahokoku.pdf>
- 8) Flynn, J., Slovic, P., Mertz, C. K. : *Risk Analysis*, **14**, 1101~1108, 1994.
- 9) Zhong, Y., Wu, L., Chen, X., Huang, Z., Hu, W. : *Int J Environ Res Public Health*, **15**, 2394, 2018. <https://doi.org/10.3390/ijerph15112394>
- 10) Kornelis, M., Jonge, J. D., Frewer, L., Dagevos, H., <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1539-6924.2007.00885.x>

# 食材の低温貯蔵履歴が大腸菌O157：H7の凍結損傷回復ならびに低温加熱耐性に及ぼす影響

Effects of storage history of food materials at low temperature on recovery from freezing injury and thermotolerance of *Escherichia coli* O157 : H7

本 城 賢 一・宮 本 敬 久

(九州大学大学院農学研究院)

Ken-ichi Honjoh and Takahisa Miyamoto

(Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University)

Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (STEC) including different serotypes strains such as O157 : H7 were stored by three different low-temperature storage methods, “refrigerated”, “frozen”, and “refrigerated after freezing” and then their heat resistances were investigated. Damages of some strains by heat treatment after storage at low temperature were increased, while damages of the other strains whose damage was suppressed. In particular, EC57, EC69, and EC110 strains, which were stored at low temperatures, suppressed the damages caused by the following heat treatment, thereby improving the heat resistance. Furthermore, EC110 strain was inoculated into beef and subjected to three low-temperature storage methods and following heat treatment experiments. As similar to the above results, low-temperature storage seemed to suppress damages caused by heat treatment. As described above, it was suggested that the heat resistance of EC57, EC69, and EC110 strains could be increased by low-temperature storage. In the future, we will investigate heat resistances of STEC at different temperatures, identify low-temperature-induced genes relevant to heat resistance and find ways to suppress functions of the genes, leading to safer processed meat products.

## 1. 目 的

近年、食品衛生に関する知識が広く普及しているが、食肉を原因食品とした大腸菌O157：H7による食中毒は後を絶たない。これは不十分な加熱処理によるものであると推察されるが、食の現状としては美味しさを追求するローストビーフに代表されるような低温調理が好まれる傾向にある。このような低温調理食品は食品衛生法に則り適切な加熱が行われれば、安全性の問題はないと

考えられるが、消費者のニーズもあってより低温での調理が好まれ、ほとんど生に近い状態で提供され食中毒につながっているケースもある。また、食材に目を向けるとコールドチェーンは発達しているが、貯蔵履歴によっては汚染している菌の耐性や生育挙動も変化していると予想され、食品業界のみならず一般家庭における貯蔵法についても低温調理食品を視野に入れて検討する必要がある。

微生物の凍結損傷や加熱損傷機構に関する研究

はそれぞれにフォーカスを当てた研究は多数報告されているが、この二つを合わせた研究は少ない。実際、一般家庭における調理過程においては貯蔵履歴が異なる原料が用いられることから、想定される貯蔵履歴を再現した研究が必要である。大腸菌O157:H7についても基本的に凍結損傷を受けた菌を加熱処理することで耐熱性が弱められることは十分予想されるが、菌株によって異なる可能性も示唆されている<sup>1)</sup>。また、大腸菌O157:H7に着目した凍結貯蔵後の耐熱性についての研究報告はあるが<sup>2,3)</sup>、他の血清型のSTECや複数の菌株についての研究報告はない。さらに、一般家庭においてよく行われている解凍後の冷蔵貯蔵時に、解凍肉から生じたドリップ中の栄養分が菌の損傷回復を促進し、回復した菌では耐熱性が高まる可能性も十分に考えられる。

食肉を原因とする食中毒事例が多々報告されている大腸菌O157:H7ならびにその他の志賀毒素産生性大腸菌(STEC)の耐熱性に及ぼす低温貯蔵履歴の影響について研究報告が少ないことから、本研究では低温貯蔵された異なる菌株のSTECが、その後の加熱調理時において示す耐熱性に違いがあるのか、また異なる低温貯蔵の違いがSTECの耐熱性に影響するのかを明らかにする

ことを目的としている。

## 2. 方法

### 2.1 供試菌株

本研究に使用した11菌株をTable 1に示した。志賀毒素産生性大腸菌(STEC)として、*Escherichia coli* O157:H7; 7株, *E. coli* O26:H11; 1株, *E. coli* O111:H-; 1株, *E. coli* O103:H2; 1株, *E. coli* O119:H-; 1株を用いた。

### 2.2 培養方法

供試菌株を5 mlのTryptic soy broth (TSB)で37℃、一夜培養した前培養液から遠心分離(2,000×g, 10分間)により集菌後、0.85% NaClで2回洗浄し、OD<sub>600</sub>=0.1 (10<sup>4</sup>cfu/ml)となるように0.85% NaClに懸濁し、次の実験に用いた。

### 2.3 低温貯蔵ならびに加熱処理法

菌懸濁液を2 mlずつ15 ml容プラスチック製試験管に分注し、3つの低温貯蔵処理を行った。①4℃で24時間冷蔵、②-20℃で24時間凍結、③-20℃で24時間凍結し、25℃で5分間融解後、2倍濃度のTSB培地を等量添加して4℃で7日間冷蔵を行った。①~③のいずれかの方法で低温貯蔵されたサンプルを、25℃で5分間インキュベ-

Table 1 STEC strain list used for this study

Strain No.	Source	Serotype	Stx productivity
EC14	Clinical	O26:H11	Stx1
EC38	Clinical	O111:H-	Stx1
EC47	Clinical	O103:H2	Stx1
EC49	Clinical	O119:H-	Stx1
EC55	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC57	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC69	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC75	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC80	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC83	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2
EC110	Clinical	O157:H7	Stx1, Stx2

トして常温に戻したものを未加熱サンプルとした。また、常温に戻した後、57.5℃で10分間加熱処理後、25℃で5分間インキュベートしたものを加熱サンプルとした。なお、①～③の冷蔵貯蔵せずに加熱処理したサンプルをコントロールとした。

#### 2.4 生菌数の測定ならびに減少菌数の算出

前項で得られた未加熱サンプルならびに加熱サンプル（菌懸濁液）を段階希釈し、全生菌（健常菌 + 損傷菌）数測定のためにTryptic soy agar (TSA) 平板培地に100  $\mu$ l 塗布後、37℃で48時間培養後のコロニー数から生菌数を算出した。なお、未加熱サンプルの生菌数 ( $N_0$ )、加熱サンプルの生菌数 ( $N_1$ ) として  $\log N_1/N_0$  を算出し加熱による損傷の程度を表した。

#### 2.5 Amp耐性STECの取得

本実験で低温貯蔵後の耐熱性が高い結果が得られたO157:H7 (EC57, 69, 110) 株を用い、畜肉中の自然汚染菌と識別するために、緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子ならびにアンピシリン (Amp) 耐性遺伝子を有するpGFPベクター (Clontech社) で形質転換を試みた。形質転換されたAmp耐性STECは牛肉の汚染に用いられた。

#### 2.6 STECの牛肉への接種ならびに肉の低温貯蔵

福岡市内のスーパーで購入したオーストラリア産牛肉を20gとなるように成型した。成型した牛肉サンプルを入れたポリ塩化ビニル袋の中に菌懸濁液を1ml添加し、約  $5 \times 10^8$  cfu/piece とし、よく手で揉んで菌液を牛肉サンプルに馴染ませた。15分静置後、真空パック後、前述の①～③の低温貯蔵を行った。その後、袋のまま25℃で5分間インキュベート後、57.5℃で15分間加熱処理し、さらに25℃で5分間インキュベートを行った。その袋の中に9倍容の0.85%NaClを加え1分間ホモジナイズし、段階希釈液を作製し、全生菌数（健常菌数 + 損傷菌数）測定のために終濃度100  $\mu$ g/ml

のAmp添加TSA平板培地に、健常菌数測定のためにCHROMagar O157 (BD社) 平板培地に、100  $\mu$ l 塗抹した。その後、37℃で48時間培養し、コロニー数を測定することで全生菌数ならびに健常菌数を算出した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 試験管レベルでのSTECの低温貯蔵法の違いによる耐熱性への影響

本研究室が保有するSTEC11菌株 (STEC O157:H7, O26:H11, O111:H-, O103:H2, O119:H-) の中から、低温貯蔵（冷蔵、冷凍、冷凍後の冷蔵）によって誘導される耐熱性に变化がある菌株を選抜するために、試験管レベルでの実験を行った。低温貯蔵されたSTECについて57.5℃での加熱処理前後の全生菌数を調べた (Fig. 1)。コントロールサンプルとしては、低温貯蔵を行っていない培養直後の菌を同様の処理に供した。

まず、①の4℃24時間冷蔵処理中にすべての菌株で生菌数が増えることはなかった。しかし、加熱処理後のO119:H-株 (EC49)、O157:H7の4株 (EC69, EC80, EC83, EC110) は、コントロールよりも高い生菌数を示し、冷蔵中に加熱処理に対する耐性が高まることが認められた。この理由としては、STECに関する論文は見当たらないが、非病原性大腸菌の論文<sup>4)</sup>を参照すると、ヒートショック時にも誘導される $\sigma$ 因子である*rpoE*タンパク質が低温処理によっても誘導されることが報告されている。このように熱ストレスに応答するタンパク質が低温貯蔵中に発現し、耐熱性の向上に寄与したためであろうと推察された。

次に、②の-20℃24時間の冷凍後についてであるが、ほとんどのSTECで未加熱サンプルの生菌数はコントロールと比べて低下が認められた。しかし、O157:H7の2株 (EC75, EC83) の生菌



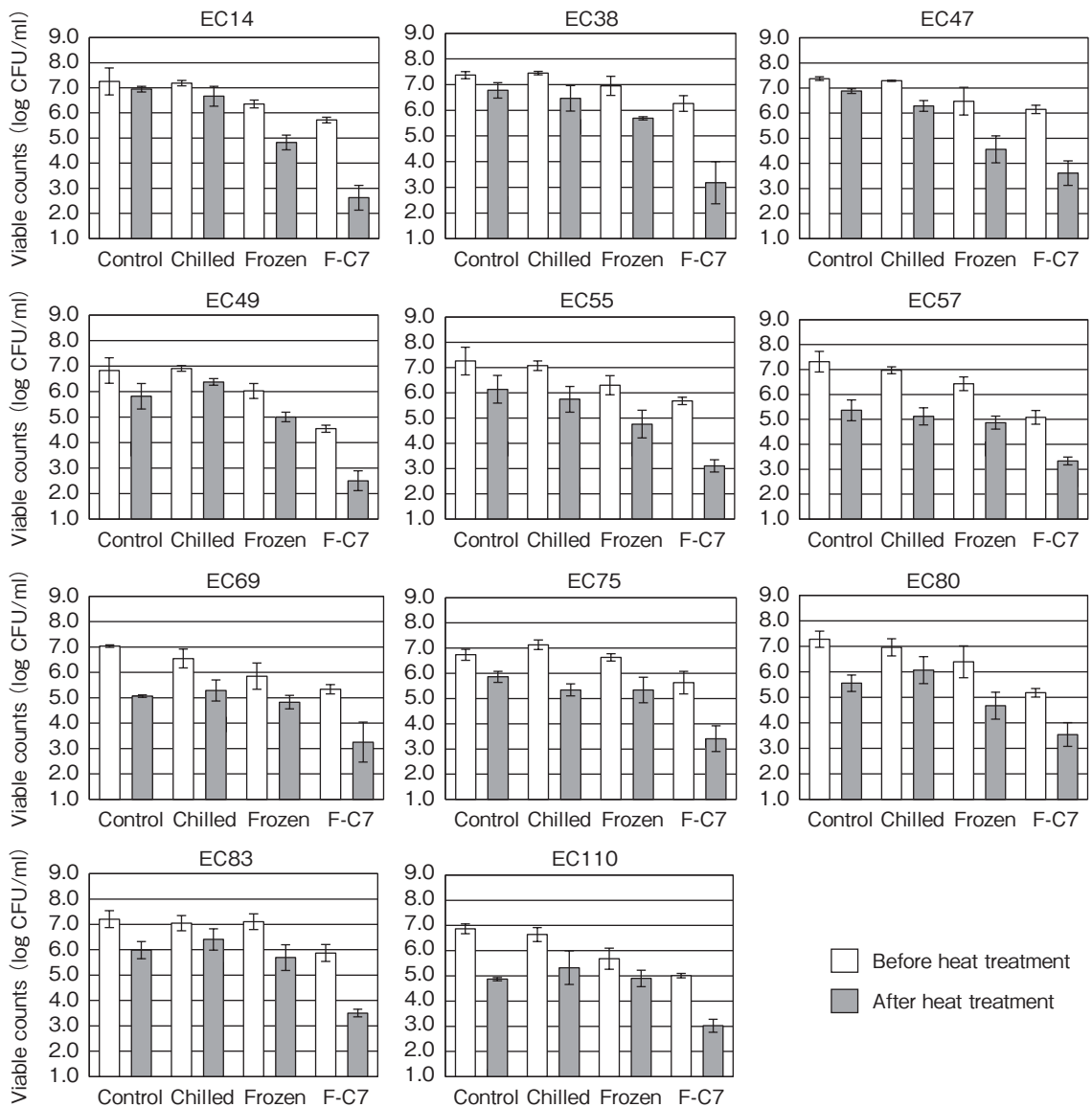


Fig. 1 Viable counts of STEC before and after heat treatment at 57.5°C.

Cell suspensions of STEC were incubated by chilled at 4°C for 24 h, frozen at -20°C for 24 h, or frozen at -20°C followed by chilled at 4°C for 7 d. Then the incubated samples were heat-treated at 57.5°C for 10 min. Then, sequentially diluted samples were spread onto TSA. Colonies were counted after incubation at 37°C for 48 h. Control samples were STEC cells just before incubation at low temperatures. Data are means  $\pm$  standard deviations (SD) (n=3).

数はコントロールの生菌数とほとんど違いが認められず、比較的冷凍に強い菌株であると推定された。さらに、解凍後加熱処理を行ったものでは、ほとんどのSTECの生菌数はコントロールとの差(0.5~2 log程度)が大きい一方、O157:H7の3

株 (EC69, EC83, EC110) はコントロールと比較した差が0.3 log未満と小さく、冷凍処理によって加熱損傷を高めるということは認められなかった。

さらに、③の冷凍24時間と冷蔵7日を組み合わせ

せた低温貯蔵を行った後の生菌数, さらにその加熱処理後の生菌数はいずれも低下していた。加熱後のSTECの生菌数をコントロールと比べると1.8~4.3 logの幅での減少があり, 菌株ごとで違いがあることが認められた。特に, O157:H7の2株(EC69, EC110)とコントロールとの差は最も小さく, 加熱によって受けた損傷の程度が小さいことが示された。このように, 加熱によって受ける損傷の程度にはSTEC菌株間で違いがあると推察された。

そこで, 加熱前の生菌数を  $N_0$ , 加熱後の生菌数を  $N_1$  とし,  $\log N_1/N_0$  を算出して損傷程度として評価した (Fig. 2)。その結果, コントロールを基準として判断したものであるが, O26:H11株 (EC14), O38:H-株 (EC38), O103:H2株 (EC47), O157:H7の2株 (EC55, EC75) のように低温貯蔵されることで加熱による損傷程度が大きくなる傾向にあるグループと, O119:H-株 (EC49), O157:H7の5株 (EC57, EC69, EC80, EC83, EC110) のように低温貯蔵される

ことで加熱による損傷程度が抑えられるグループに分かれることが明らかになった。特に, EC57, EC69, EC110といったO157:H7については冷蔵ならびに冷凍貯蔵によって加熱に対する耐性が誘導され, 損傷程度が抑えられるという結果が得られた。また, 冷蔵と冷凍を組み合わせた貯蔵はSTECにとっても厳しい貯蔵条件と考えられるが, この低温貯蔵後の加熱処理による損傷程度はコントロールと同程度に抑えられていることが明らかになった。

また, ③の冷凍24時間の際にSTECが受けた凍結損傷が, その後の7日間4℃の冷蔵期間中に, 回復するかどうかについて, Fig. 1を基にした考察を行った。加熱処理していない24時間冷凍①のサンプルの生残菌数のものを比較対象とした。O103:H2 (EC47) については24時間冷凍した生残率とほぼ変化はなかったものの, その他の菌株については7日間の冷蔵中に生残菌数が減少していたことから, 7日間の冷蔵貯蔵中のSTECの損傷回復は考慮する必要がないと推察された。しか

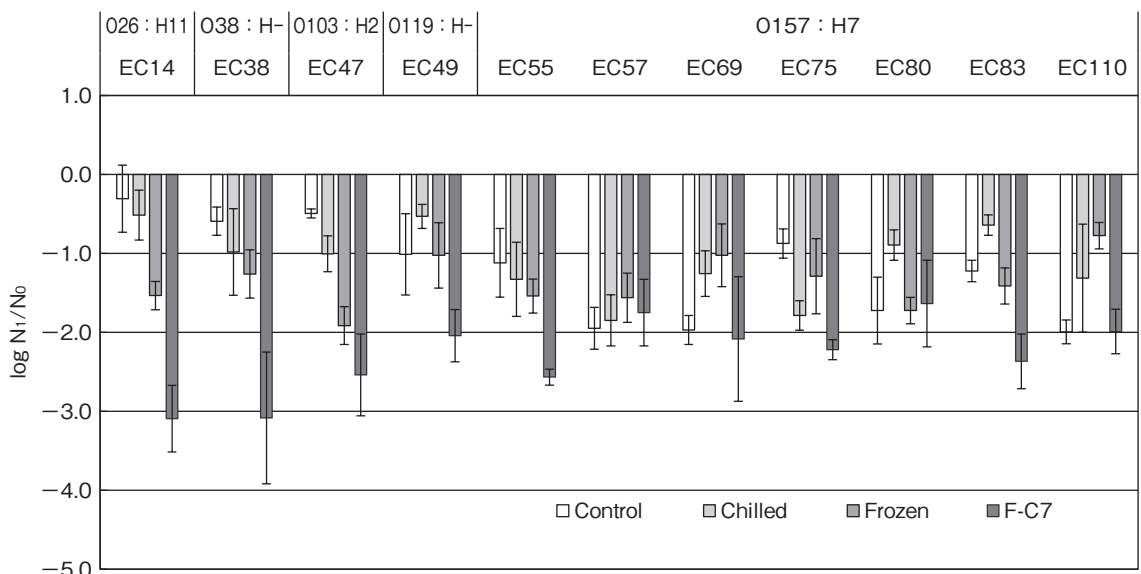


Fig. 2 Damages of STEC caused by heat treatment. STEC were kept under different low temperature storage methods before heat treatment.  $N_0$  and  $N_1$  are viable counts of before and after heat treatments, respectively. For other details, see caption to Fig. 1.

し、肉に接種されたSTECが受ける凍結損傷がその後の冷蔵中に回復するか否かについては別途検討する必要があると考える。

### 3.2 低温貯蔵が汚染牛肉中におけるSTECの耐熱性に及ぼす影響

まず、もともと牛肉を汚染しているSTECの存在を考慮し、それとの識別のために、Amp耐性を有し緑色蛍光タンパク質を発現するSTECの作製を試みた。対象としては低温貯蔵することで加熱による損傷程度が抑えられたEC57, EC69, EC110の3株とし、形質転換を行ったところ、EC110のみGFP発現形質転換体が得られた (data not shown)。そこで、EC110株で汚染した牛肉の低温貯蔵による加熱による損傷程度の違いについて検討した。

前項の実験と同様、EC110で汚染した牛肉を①～③の低温貯蔵後、57.5℃で15分間の加熱処理に供した。Amp添加TSA培地でSTEC (EC110) の全生菌 (健全菌+損傷菌) 数を測定し、CHROMagar培地で健全菌数の測定を行った (Fig. 3)。まず、加熱処理前のデータを比較するとAmp添加TSA

培地で生育した全生菌数では約7 log CFU/gであり、三種類の低温貯蔵法の違いによる影響はほとんどなかった。また、CHROMagar培地で生育した健全菌数は若干の減少は認められたが、損傷程度は低いと判断された。さらに加熱後の全生菌数、健全菌数については未加熱のものとは比べて1～2 log程度の低下が認められた。そこで、試験管の実験と同様に加熱による損傷程度について Fig. 4 で表現した。その結果、全生菌数の減少はコントロールと比較し、冷凍貯蔵することで耐熱性が若干強くなり、冷蔵しても差は小さかった。また、健全菌の割合についても低温貯蔵によって損傷程度が抑えられていることが認められた。

今回の汚染した肉の加熱処理温度は57.5℃で、処理時間は15分間だった。食品衛生法の特定加熱食肉製品の食肉製造基準によると、ローストビーフを調理する際の中心温度の幅は55～63℃であり、温度ごとに処理時間が定められ、57℃の場合は43分以上の時間処理されなければならない。今後、低温貯蔵後のEC110株を含めた低温貯蔵により耐熱性に向上が認められる菌株について、さら

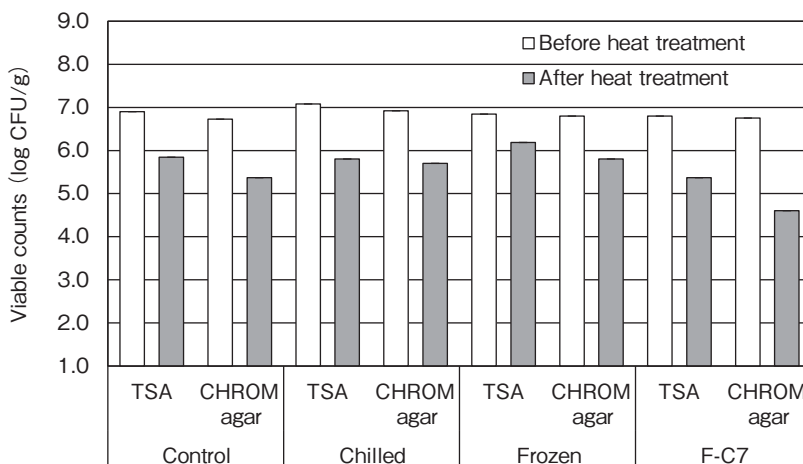


Fig. 3 Viable counts of EC110 inoculated in beef meat before and after heat treatment at 57.5°C.

Beef meats were incubated by chilled at 4°C for 24 h, frozen at -20°C for 24 h, or frozen at -20°C followed by chilled at 4°C for 7 d. Then the incubated samples were heat-treated at 57.5°C for 10 min. Then, samples were homogenized in 9 volumes PBS for 1 min. The suspensions were sequentially diluted and spread onto TSA. Colonies showing green color caused by GFP expression were counted after incubation at 37°C for 48 h.

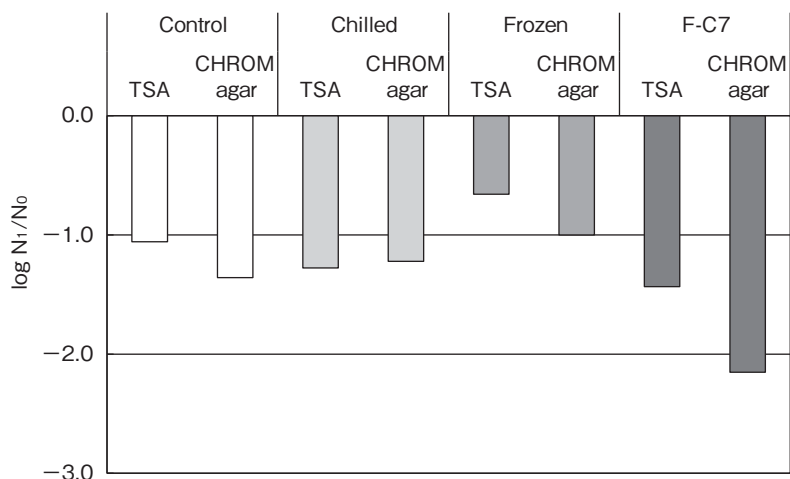


Fig. 4 Damages of EC110, inoculated in beef meats, caused by heat treatment.

Beef meats were inoculated with EC110 and stored using three different low temperature storage methods. N<sub>0</sub> and N<sub>1</sub> are viable counts of before and after heat treatments, respectively. For other details, see caption to Fig. 3.

異なる温度での加熱処理に対する耐性評価を行うとともに、これらの耐性向上に関与する遺伝子の同定を進める。それにより、耐熱性に関わる因子を抑えることがより安全な食品加工方法に結びつくものと考えられる。

#### 4. 要 約

O157:H7を含めた異なる血清型の腸管出血性大腸菌 (STEC) を「冷蔵」、「凍結」、「凍結後に冷蔵」の三つの異なる低温貯蔵法で貯蔵後、加熱処理を行うことで耐熱性の変化について検討を行った。その結果、低温貯蔵によってその後の加熱処理に基づく損傷程度が大きい菌株が認められる一方、その逆に損傷程度が抑えられる菌株が認められた。特に、EC57, EC69, EC110といったO157:H7株は低温貯蔵によってその後の加熱処理による損傷程度が抑えられ、耐熱性が高められ

る可能性が示された。さらに、EC110については牛肉に接種して低温貯蔵ならびにその後の加熱処理を行ったところ、試験管レベルの実験と同様に低温貯蔵されることで加熱処理による損傷程度が抑えられることが明らかになった。このように、EC57, EC69, EC110などの菌株によっては低温貯蔵により耐熱性が高まる可能性が示された。

#### 文 献

- 1) Zhao, T., Doyle, M. P., Kemp, M., Howell, R. S., Zhao, P. : *J. Food Protect.*, **67**, 1760~1764, 2005.
- 2) Manios, S. G., Skandamis, P. N. : *Meat Sci.*, **101**, 25~32, 2015.
- 3) Smith, S. E., Maurer, J. L., Orta-Ramirez, A., Ryser, E. T., Smith, D. M. : *J. Food Sci.*, **66**, 1164~1168, 2001.
- 4) Polissi, A., Laurentis, W. D., Zangrossi, S., Briani, F., Longhi, V., Pesole, G., Dehó, G. : *Res. Microbiol.*, **154**, 573~580, 2003.

# ソーセージに混入する非金属異物の検出技術に関する研究

Study on the detection technology of non-metal extraneous materials in sausages

河野俊夫

(高知大学農林海洋科学部)

Toshio Kawano

(Department of Agriculture, Forestry, Bioresource and Environmental Sciences, Kochi University)

For the detection of undesirable foreign materials accidentally mixed in sausages during its production, diffused reflectance spectra in near infrared region of six commercial sausages, ten non-metal and six bio foreign materials were measured with FT-NIR system. Spectra were collected in the region between  $4,000\text{cm}^{-1}$  and  $12,000\text{cm}^{-1}$ , and after smoothing treatment of Savitzky-Golay method, principal components for sausages and foreign materials were obtained by PCA software. In the PCA space, spectrum points of foreign materials almost gathered near the first principal component axis (PC1) but each type of material made an individual group around the axis. Then, PCA was applied for each type of material and PC1 component vector was obtained. From the component distribution data in original wave number space of the first principal component vector, ten wave numbers for identifying each materials were selected. A neural-network based model, which has ten input neurons, 2 hidden layers and one output neurons, was constructed for estimating whether sausage tested contains foreign materials. Each hidden layer has 30 neurons and output layer brings out two dimensional unit vector (1,0) or (0,1) which means the sausage has undesirable foreign materials or not. After training and validating the model with randomly selected data, trained model was tested with the rest data which had not used for training. As the results, for bio foreign materials such as spiders and moths, the identification rate % of the model reached to ca. 80%, and for non-metal foreign materials such as EPS (used for packing polystyrene), the rate does to 90%. However, cockroaches have common constituents to sausages such as protein, and that made it difficult to detect the bug mixed in the sausage.

## 1. 目 的

日本の食品は品質の良さと安全性の高さが売り物である。ところが昨今、我が国では新聞紙面において、流通する食品に異物が混入する事例をよく見かけるようになった。食品の海外展開を考え

るうえでも、これは大きな問題である。その原因は何なのか。素材調達から製造に至るまでの、メーカーサイドでの異物混入検査では、主として金属類の混入検査がメインであり、非金属・生物系の異物はヒトの目視による検出以外にはない。したがって、表面的に目視確認できなかった内部

混入の異物は、家庭やレストラン等で提供された時点で「消費者による発見」という形で検出されることになる。インターネットの一般化によって消費者は発信者となり、異物発見の情報はメーカーの窓口が届くことなく、瞬時にして社会一般の知るところとなる。このことがメディアによる事例報告の増加につながっているものと思われる。しかし、食品メーカーにとって「消費者による異物の発見」は企業生命を危うくする。現代の食品生産工場では徹底した衛生管理のもとに混入異物を入口の時点で排除する努力はしているが、ソーセージ製品の場合、素材搬入、ミンチ化と混捏（練り込み）作業の各過程で異物混入の可能性がある。ロボット化した生産工場とはいえ、作業機械に含まれる非金属部品の破損や小さな昆虫の侵入はハイテクの網の目をくぐる。こうした非金属異物・生物系異物に対する検出手法の確立が急がれる。

そこで本研究では、製品の非破壊・非接触検査を前提として、光センシングによって非金属異物や生物系異物を検出する原理手法について検討した。検査対象のソーセージに光を照射し、その反射光に含まれる近赤外域のスペクトル情報の中から、非金属異物や生物系異物固有の情報を引き出し、ニューラル・ネットワークを用いたAI（人工知能）型モデルによって、異物の有無やその種類を推定する手法である。これにより、ソーセージ製品の安全性を高め、消費者の信頼を獲得することを目標とした。

## 2. 方 法

異物混入の対象であるソーセージ試料には、2019年での市販品6種（IH社1種（記号GAB）で以下表記）、NH社2種（同、記号OB、SE）、MS社2種（同、記号OR、KS）、PH社（同、記号KK）を用いた。一方、混入異物試料には、異

物混入事例<sup>1)</sup>を参考として、「非金属異物」として、布、発泡スチロール、ガラス片、食品包装用ラップ、紙、プラスチック、ゴム、小石、ティッシュペーパーの9種類を、また「生物異物」としてハエ、蚊、蛾、カメムシ、蜘蛛の5種類を用意した。

ガラス製のシャーレ上に試料を載せ、試料の厚みに相当するスペーサーを橋桁のように両側より立てた上に白色反射版を置き、フーリエ変換赤外分光光度計（日本分光、FT/IR-4100）にInGaAs型高感度近赤外分光センサーを付加したFT-NIR、または近赤外分光器（相馬光学、S-2730、S-2830）と高輝度ハロゲン光源による分離型測定システムを用いて、波数 $4,000\text{cm}^{-1}$ （波長833nm）から $12,000\text{cm}^{-1}$ （波長2,500nm）の近赤外反射分光スペクトル（測定点数8,300点）を取得した。なお、上記の試料を取り除いた場合のスペクトルも同時に測定し、間隙空気や測定系によって生じる試料以外のノイズスペクトルとして試料のスペクトルから控除した。ラップ、ティッシュペーパー、紙、ゴム、布はその厚さを1枚から10枚までの10パターン、発泡スチロールは厚さを2mmから22mmの範囲で8パターン（2, 4, 6, 8, 10, 14, 18, 22mm）、プラスチック（最大径1.2mm）とガラス（同0.93mm）は適当に3つのサイズに粉碎して3パターン、小石は2mm, 4mm, 5.3mmの3パターンのものに対して測定を行った。上記の異物およびソーセージ単体のほか、ソーセージと反射版の間に異物を挟んだ、擬似的異物混入ソーセージ試料についても、同様に近赤外スペクトルを取得した。

## 3. 結果と考察

各試料の近赤外スペクトルは8,300点の波数で構成されるため、測定スペクトルは8,300次元の超空間上の点の集合体として表現される。それぞ



れの試料の特徴的波数がどこにあるかを検討するため、解析ソフト Unscrambler Ver.10.5.1 (CAMO, ノルウェー) を用いて原スペクトルをサビツキー・ゴレイ法でスムージング(平準化)したのち、PCA(主成分)分析した。Fig. 1は、供試した非金属異物および生物系異物のスペクトル全体についてのPCA分析結果(8,300次元で構成されるスペクトルの超空間上の各点を、PCA空間上の主成分第1軸と第2軸で構成される超空間上の平面に射影したもの)である。横軸および縦軸の丸カッコ内の数値は、試料の全スペクトルの超空間上の分散(ばらつき)に対して得られた主成分第1軸(以下PC1軸)および第2軸(以下PC2軸)の寄与率(説明率)である。この図によれば、全データを一括した第1主成分の寄与率は99%を占めており、PC1軸とPC2軸のスケーリングの大きさから判断しても、異物のスペクトルはPC1軸のごく近傍に並んでいることが分かる。しかしさらに細かく見ていけば、重なり部分は一部あるものの、異物の種類ごとに点の集合がグループ化しており、スペクトル情報から異物を類別(識別)するためには、全体一括ではな

く、異物の種類ごとにPCA分析を行ってそれぞれの異物ごとの主成分軸を求める必要があることも同時に分かる。一方Fig. 2は、供試した2019年市販主要4社のソーセージ6種の近赤外スペクトル全データを異物試料と同様にPCA分析した結果である。6種の供試ソーセージともに固有の集合(グループ)は形成せず、市販のソーセージの種類をPCA空間上で類別することは困難である。これは供試ソーセージを構成する素材成分の共通性が高いことを意味しており、逆に言えば、異物が混入する先のソーセージに関して言えば、ソーセージの種類ごとに個別にスペクトルを求めて異物との差異を比較する必要がないことになる。Fig. 2によれば、異物の場合に比較してソーセージの場合は、データ分散のPC1軸寄与率(説明率)は94%であり、残り6%をPC2軸に依存することになるが、ソーセージ製品一般に共通する近赤外スペクトル上の固有波数を定めるうえで、PC1軸のみを分析の対象としても問題はないと考える。

そこで、異物試料とソーセージ試料とを近赤外スペクトルによって識別するため、PC1軸を分

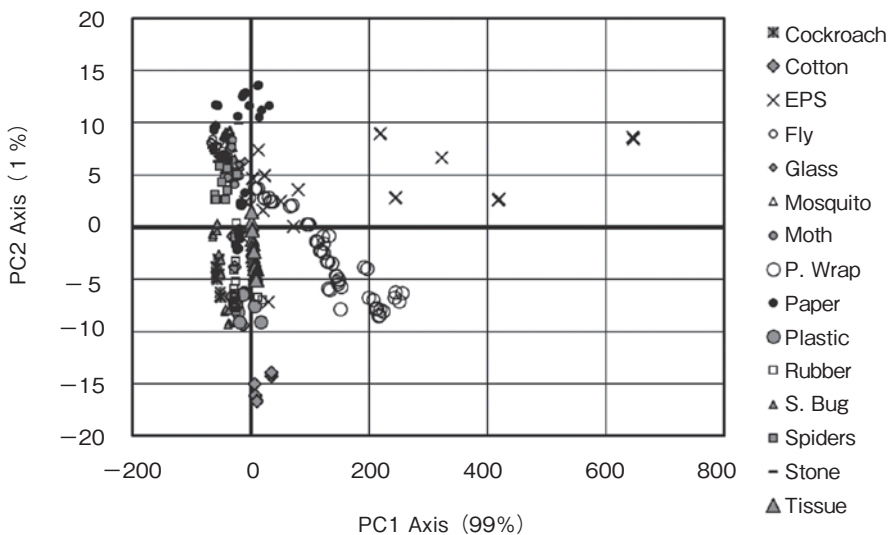


Fig. 1 Spectra distribution of foreign materials in PCA space

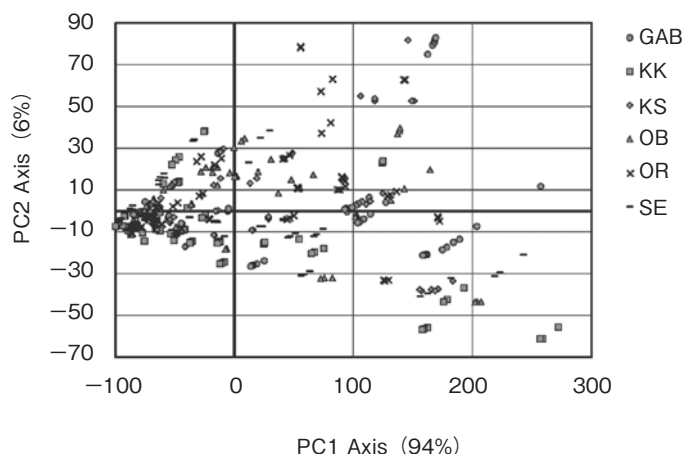


Fig. 2 Spectra distribution of commercial sausages in PCA space

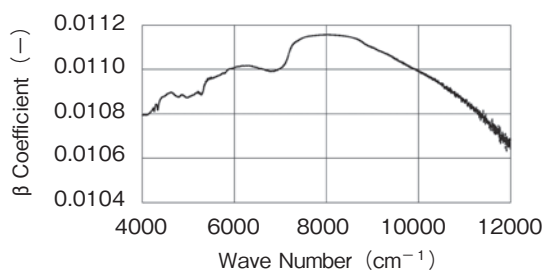


Fig. 3 PC1 vector for moths tested

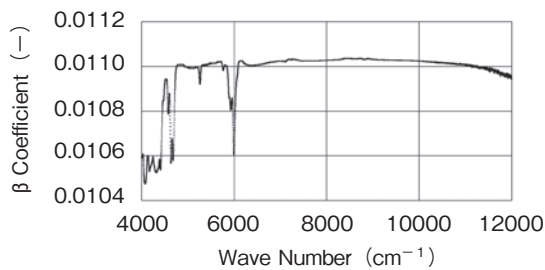


Fig. 4 PC1 vector for plastic pieces tested

析の対象とし、それぞれのPC 1 軸、すなわちPC 1 軸を示すベクトルを構成する元波長の成分(PC 1 軸を示すベクトルの、元波長軸への射影成分で、以下では $\beta$ 係数と呼ぶ)の大きさから識別波数を選び出すことにした。Fig. 3 および Fig. 4 は、それぞれ生物異物試料の「蛾」と非金属異物試料の「プラスチック」について、原スペクトルをPCA分析して得られるPC 1 軸ベクトルを、それを構成する波数とその波数での成分の大きさで表したも(PC 1 軸を元の8,300次元から見たベクトル成分)である。この中から単純に、 $\beta$ 係数の絶対値の大きさのみで識別波数を数十点選び出すと、全体として8,300点あるため、特定の波数のごく近傍だけを抽出することになり、異物とソーセージをPC 1 軸の差異で識別する際にほぼ一点のみで識別する、分析上のピットフォールに

陥ることになる。そこで、波数領域を10分割し、各分割波数領域内での極大波数もしくは最大波数を抽出して、異物やソーセージの識別波数として抽出した (Table 1)。

ソーセージに混入する異物を検出するには、このうち異物の識別波数での異物のスペクトル信号と「ソーセージのスペクトル信号」を用いる。異物の識別波数でのソーセージのスペクトル信号は、異物の場合と異なってそれを特定する信号情報は基本的に少ないはずで、その一方、異物が混入しているソーセージの場合は異物の識別波数でのスペクトル信号に固有の信号強度が期待できるからである。そこで異物の識別波数での原スペクトルの信号強度を入力、異物の有無を出力とするニューラル・ネットワーク・モデル (以下、NNモデル) を構築し、有無判別の精度を確認した。

Table 1 Selected wave numbers for identification of each materials

Target Food (Sausage)	Unit : $\text{cm}^{-1}$				
Sausage	4561.8 7304.1	5494.2 7328.2	5757.4 8394.6	5908.8 8672.3	6333.1 10381.9
Non-metal foreign materials					
Paper	4527.1 5922.3	5030.4 7184.5	5351.5 7349.4	5476.8 7739.9	5793.1 8356.0
Cardboard	4303.4 8411.0	4879.0 8775.5	5238.7 10326.9	6330.2 10741.6	7889.4 11691.3
Tissue Paper	4343.9 6012.0	4497.2 7124.7	4969.7 7374.5	5405.5 8195.0	5781.5 8472.7
Paper	4789.3 7188.4	5192.4 7418.8	5608.9 7483.4	5730.4 8160.3	6271.4 8316.5
Rubber	4330.4 6380.3	4808.6 6892.3	5377.5 7241.4	5519.3 8266.4	6071.8 8594.2
EPS	4409.4 7856.6	4720.9 8217.2	5804.7 8380.2	5846.1 8664.6	7065.9 8935.6
Cotton	4158.7 5928.1	4354.5 6114.2	4536.7 7102.5	5012.1 7326.2	5321.6 8263.5
Plastic	4551.2 6191.3	4826.0 7339.7	5205.9 7446.8	5373.7 8427.4	5732.4 8837.2
Stone	4220.5 6602.1	4535.8 7340.7	5183.7 7514.3	5676.4 8131.4	5958.0 11000.9
Glass	5927.1 7855.6	6374.5 8192.1	6708.2 8567.2	7254.9 8642.4	7342.6 8953.9
Bio foreign materials					
Cockroach	5416.1 7280.0	5479.7 7595.3	6079.5 7742.8	6220.3 8208.5	7246.2 8489.1
Mosquito	4589.8 7406.3	5244.5 7533.6	5410.3 8233.6	6193.3 8612.5	7271.3 8745.6
Fly	4476.9 8662.7	5196.3 8693.5	7235.6 9145.8	7420.7 9415.7	8350.3 11348.1
Spider	5376.6 7245.3	5771.9 7385.1	6292.6 8700.3	6715.9 9413.8	7050.5 9691.5
Stink Bug	5424.8 7999.3	5729.5 8475.6	6034.2 8678.1	7272.2 10196.8	7438.1 10360.7
Moth	4692.9 7549.0	5471.1 7784.3	5851.9 8024.4	6222.2 8332.9	6400.6 8730.2

NNモデル構築には、MATLAB Ver.2019b上のDeep Learning Toolboxを用いた。入力層10点(10波数信号)、隠れ層2層各30点、出力1点(有無)のニューロン構成で、全データをトレーニング用60%、検証用10%、モデル学習に使わない未知データ30%に分割して学習とその判定制度の確

認を行った。その結果、生物異物では蜘蛛や蛾などは80%程度、非金属異物では発泡スチロールが90%程度識別できるなど、良好な結果を得た。しかし一方で、タンパク質などの点でソーセージと似通った成分を含むゴキブリは、今回選定した識別波数では正解率が低かった。

#### 4. 要 約

生産中に偶発的にソーセージに混入した異物を検出することを目的に6種の市販ソーセージ、10種の非金属異物と6種の生物異物の近赤外拡散反射スペクトルをFT-NIR装置で測定した。スペクトル測定は、波数 $4,000\text{cm}^{-1}$ から $12,000\text{cm}^{-1}$ までの範囲で行い、サビツキー・ゴレイ法によるスムージング処理のあと、主成分分析ソフトを用いてソーセージと異物とに分けて主成分を求めた。PCA空間上では、異物のスペクトル点はほとんど主成分第1軸(PC1軸)周辺に集まっていた。しかし、第1主成分軸の回りで異物の種類ごとに個別の集合を形成していた。そこで、異物の種類ごとに改めてPCAを適用し、異物ごとのPC1ベクトルを算出した。このベクトルの元の波数空間での成分分布から、それぞれの異物を特定するための10個の波数を選び出した。ソーセージに異物が混入しているかどうかを推定する10入力ニュー

ロン、隠れ層2層、出力ニューロンで構成するNNモデルを構築した。隠れ層の2層は各30個のニューロンで構成されており、出力層は2次元の単位ベクトル(1,0)もしくは(0,1)(前者は異物混入あり、後者は異物混入なし、を意味する)で結果を出すものである。ランダム抽出したデータによる学習および検証プロセスを経たあと、学習済みのモデルを、学習時に用いないデータ(未知データ)で推定精度を確認した。その結果、蜘蛛や蛾に関しては、特定成功率は約80%、EPS(梱包用に用いる発泡スチロール)のような非金属異物に関しては90%であった。しかしゴキブリは、タンパク質のようにソーセージと共通する成分をもつがために、ソーセージに混入した場合に検出することを難しくしていた。

#### 文 献

- 1) 榎富賢二郎, 真鍋純一, 松永兼充, 穴井元昭, 江川洋: 異物検査事例集-食品中の異物を中心として-, サイエнтиスト社, 2013年.

# 牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響

Molecular basis of novel genetic disorders in cattle and their adverse impact

大和 修・矢吹 映・Md Shafiqul Islam・Phahnaj Pervin

(鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学分野)

Osamu Yamato, Akira Yabuki, Md Shafiqul Islam and Phahnaj Pervin

(Laboratory of Clinical Pathology, Department of Veterinary Clinical Sciences, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

The present study was carried out in order to identify causative mutations in two types of undetermined inherited diseases, which had been found in Japanese Black calves. The whole genome sequencing analysis was performed by a next-generation sequencer using DNA extracted from paraffin-embedded tissue samples of case 1 with lysosomal storage disease and case 2 with congenital spongiform encephalopathy, and a sperm sample of case 1's sire (heterozygous carrier). There was no specific abnormal sequence and alteration in exons and exon-intron junction areas in approximately 60 genes associated with lysosomal storage diseases in case 1 and case 1's sire. In addition, two types of sequence alterations (c.1-151C>T and c.1252-12C>G) were found in introns 1 and 12, respectively, in the bovine *CTSA* gene. Real-time PCR assays with TaqMan minor groove binder probes were developed to know whether these alterations are pathogenic or not. Based on the data of genotyping survey in dozens of clinically healthy Japanese Black cattle, these alterations were demonstrated not to be pathogenic because a number of healthy cattle possessed the alterations homozygously and heterozygously. There was no abnormal sequence and alteration in six genes including *BCKDHA*, *BCKDHB*, *DBT*, *DLD*, *PRNP*, and *ASPA* genes associated with congenital spongiform encephalopathy in case 2, because the quality of case 2's DNA was not good. Further studies are required to identify the causative mutations in these inherited diseases especially using molecular analysis in case 1 and immunohistochemical analysis in case 2.

## 1. 目 的

日本が世界に誇るべき黒毛和種牛は、近年、その受胎率、出生率および生産性の低下が重大な問題となっており、黒毛和種牛の市場に深刻な影響をもたらしている。その原因は多様であると推測されるが、潜在する遺伝的不良形質も主因のひとつ

つであると考えられる。黒毛和種牛においては、現在9種の遺伝的不良形質、すなわち、バンド3欠損症、血液凝固第13因子欠損症、クローディン16欠損症、チェディアックヒガシ症候群、眼球形成異常症、モリブデン補酵素欠損症（正確には、キサンチン尿症Ⅱ型）、IARS異常症、前肢帯筋異常症およびバーター症候群Ⅰ型が、一般財団法人

家畜改良事業団（家畜改良技術研究所）により指定疾患として検査可能であり、種雄牛の遺伝子型が明らかにされている<sup>1)</sup>。なかでも、近年同定されたIARS異常症は、虚弱子牛症候群の主な原因として同定され、現行でも子牛損耗率に大きく関与していることが分かってきており、黒毛和種の生産性にきわめて深刻な影響を及ぼしていることが明らかとなっている。しかし、黒毛和種牛には、さらに多くの遺伝的不良形質が潜在していることは明白であり、それら未同定の遺伝的不良形質が子牛損耗率に与える影響は依然大きいと推定される。

本研究は、過去に黒毛和種新生子で報告された未同定かつ未解明の遺伝的不良形質である2疾患、すなわちライソゾーム蓄積病<sup>2,3)</sup>および海綿状脳症<sup>4)</sup>について、その疾患を同定（確定診断）して分子基盤（原因変異と発症機序）を解明し、これらの疾患が黒毛和種牛の生産性に及ぼす悪影響を明らかにするために実施された。

ライソゾーム蓄積病には、約50疾患（約60種の遺伝子に起因）が存在し、一方、先天性の海綿状脳症には、アスパルトアシラーゼ欠損症（カナバン病）、メープルシロップ尿症（MSUD）、遺伝性クロイツフェルトヤコブ病等が知られている。本研究では、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析を実施し、主に対象となる遺伝子領域のデータを解析し、本研究対象の2疾患の原因遺伝子および原因変異を解明することを目指した。また、遺伝子型検査法を開発して、黒毛和種種雄牛および繁殖牛集団における変異アレル頻度を解明し、本疾患の黒毛和種牛集団への浸潤状況および生産性への悪影響を明らかにすることも、原因変異同定後の目的として実施した。

## 2. 方法

### 2.1 DNAの抽出

研究対象のライソゾーム蓄積病および先天性海綿状脳症を発症したそれぞれの黒毛和種子牛（症例1および2）には、DNA抽出に適した新鮮凍結組織は残されていなかったため、パラフィンブロック組織を用いた。パラフィンブロックをマイクロトームで3~4 μmの厚さで十数枚薄切し、キシレンにてパラフィンを除いた後、純水を加えて超音波式ホモジナイザーで懸濁し、その懸濁液からDNA抽出キット（QIAamp DNA Mini Kit, Qiagen）を用いてDNAを抽出・精製した。また、症例1の父牛（ヘテロ接合体）と想定される凍結精子から、ジチオスレイトールによる還元作用でDNAと核タンパク質プロタミンとのSS結合を切断した後、同様に、超音波ホモジナイザーによる懸濁液から前述のDNA抽出キットにてDNAを抽出・精製した。

### 2.2 全ゲノムシーケンス

上記の3検体、すなわち症例1およびその父牛ならびに症例2のDNAの全ゲノム解析を実施した。アガロース電気泳動およびマイクロチップ電気泳動によるDNA品質確認をした後、ライブラリー調整試薬（TruSeq Nano DNA Library Prep Kit, Illumina）によってライブラリーを作成した。次世代シーケンサー（HiSeq 2500, Illumina）を使って、リード長150bpのペアエンド読取法にて、全長約90Gb（3億リードペア）を解析した。一連の処理およびデータ解析は、北海道システムサイエンス株式会社に依頼して実施した。

### 2.3 リアルタイムPCRを用いた遺伝子型調査

症例1において、原因遺伝子および原因変異候補として、牛CTSA遺伝子の2種類の一塩基置換に対して、TaqMan minor groove binder (MGB) プローブを用いたリアルタイムPCR法を設計し



**Table 1** Characteristics of the primers and TaqMan probes used for genotyping of two types of nucleotide alterations in the bovine *CTSA* gene.

Target	Primer/probe	Reporter	Sequence (5'→3')
c.1-151C>T	Forward primer		GGAGGCTGGAGGCGATC
	Reverse primer		CCGTGCCTCCTCCGT
	Wild-type probe	VIC	CGGGTGGCTCCCG
	Mutant-type probe	FAM	CGGGTGACTIONCCCG
c.1252-12C>G	Forward primer		GCAGGGACAATTAAGATATAGT TACAAGATATGC
	Reverse primer		CCATGACAATCCCAGCCAAATCTT
	Wild-type probe	VIC	TGGGTTTCACGTTGACAG
	Mutant-type probe	FAM	TGGGTTTCACCTTGACAG

VIC, 6-carboxyrhodamine; FAM, 6-carboxyfluorescein.

た。そのプライマーおよびプローブの配列は **Table 1** に示した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 症例1およびその父牛の全ゲノム解析

症例1の父牛の全ゲノム解析データは高品質で明瞭であったものの、症例1のデータはところどころ不明確な領域が存在した。これは、症例1のDNAがホルマリン固定後にパラフィン包埋された組織標本から抽出されたものであり、すでにDNA断片化が進んでいるためであると考えられた。しかし、ライソゾーム蓄積病に関連する約60種の遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン接合部に関しては、症例1においてほぼシーケンスデータは確認可能であった。それらの関連遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン接合部において、父牛はヘテロ接合で症例1がホモ接合の配列異常を検索したが、そのようなタイプの配列異常は認められなかった。したがって、原因変異はイントロンあるいはプロモーター領域に存在するのではないかと強く推測された。

なお、症例1およびその父牛のゲノムに散在する多数のスニップを解析したところ、両者が親子関係であることの矛盾をまったく生じなかった

め、きわめて高い確率で両者が父子関係を有していることが確認できた。

これらのスニップのパターンにおいては、父牛がヘテロ接合であり、症例1がホモ接合である領域が原因遺伝子に強く関連した領域であると考えられるため、そのようなタイプのスニップが比較的多く存在する牛*CTSA*遺伝子に着目して、エクソン近傍のイントロン領域の配列異常を検索した。今回は、同遺伝子のイントロン1および12に存在した一塩基置換を絞り込んだ。イントロン1に存在する置換は第13染色体のg.75,368,422におけるシトシンのチミンへの置換 (c.1-151C>T) であり (**Fig. 1**)、イントロン12に存在する置換はg.75,373,834におけるシトシンのグアニンへの置換 (c.1252-12C>G) であった (**Fig. 2**)。

これらの一塩基置換が、本疾患に関連しているかを判定するために、これらの置換を識別するTaqMan MGBプローブを用いたリアルタイムPCR法を作成した (**Table 1**)。これらの遺伝子型検査法を用いて、国内黒毛和種牛数十頭を調査した結果、両置換は通常健康牛も高頻度に有するいわゆる疾患に関連しないスニップであった。以上の結果から、今回候補にあげた両配列異常は、残念ながら症例1が発症しているライソゾーム蓄

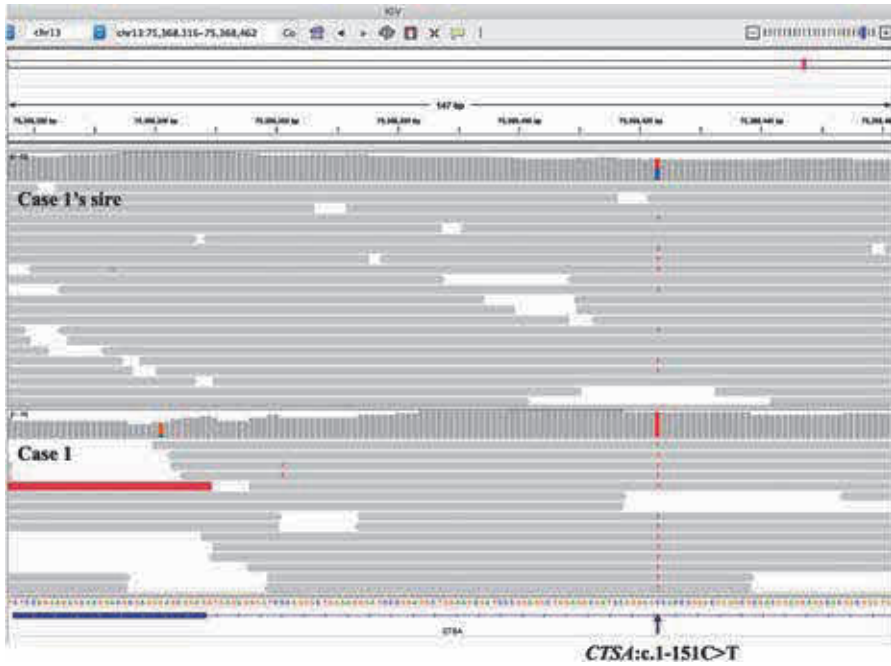


Fig. 1 A part of the whole genome sequence data including a alteration of intron 1 (c.1-151C>T) in the bovine *CTS4* gene in Case 1 and case 1's sire.

The upper sequence (Case 1's sire) heterozygously has the alteration (c.1-151C>T), and the lower sequence (Case 1) homozygously has the alteration.

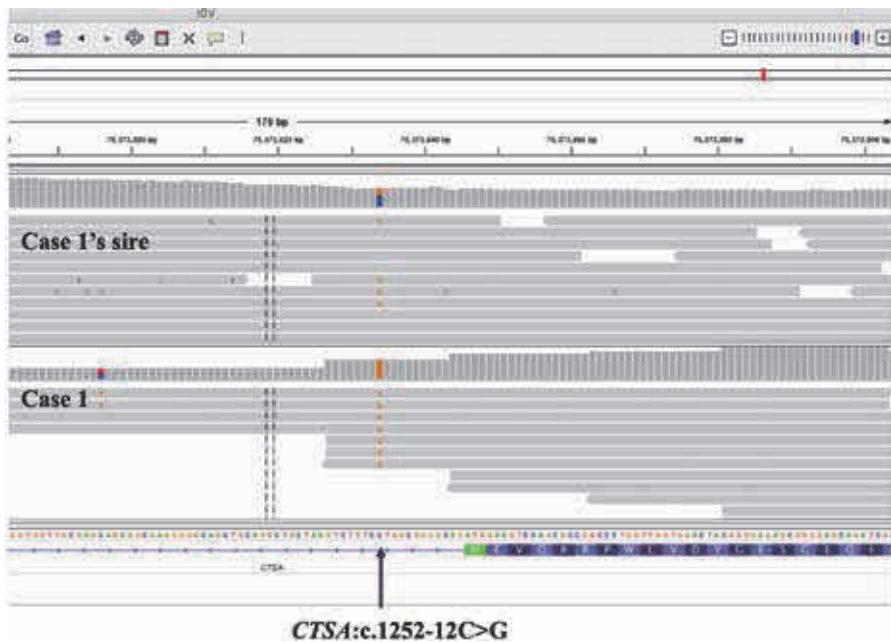


Fig. 2 A part of the whole genome sequence data including an alteration of intron 12 (c.1252-12C>G) in the bovine *CTS4* gene in Case 1 and case 1's sire.

The upper sequence (Case 1's sire) heterozygously has the alteration (c.1252-12C>G), and the lower sequence (Case 1) homozygously has the alteration.

積病とは関連がないことが明らかとなった。

今後は、CTSA遺伝子の他のイントロン領域ならびにその他のライソゾーム蓄積病関連遺伝子のイントロン領域およびプロモーター領域から、配列異常を示す病原性変異候補をあげて、その真偽を牛群スクリーニングによって順次評価していく必要があると考えられた。すでに解析済みである症例1および症例1の父牛の全ゲノムシーケンスデータに基づいて、ひとつひとつ病原性候補をあげて評価・確認することで、確実に本疾患の原因遺伝子(疾患)および原因変異を明らかにすることが可能であると思われた。そのため、現在も継続して解析を実施しているところである。

### 3.2 症例2の全ゲノム解析

症例2の全ゲノムシーケンスデータは、比較的低品質であり、かなりの領域においてデータが欠落していた。これは、症例2のDNAがホルマリン固定後にパラフィン包埋された組織標本から抽出されたものであり、DNA断片化が高率に進んでいたためであると考えられた。

このデータを用いて、MSUDの原因となる*BCKDHA*、*BCKDHB*、*DBT*および*DLD*遺伝子について調査して変異候補を検索した。これに加えて、ヒトにおいて報告されている先天性海綿状脳症に関連する遺伝子(*PRNP*遺伝子)の領域も調査した。また、すでに以前、サンガーシーケンスにてエクソン領域のみ調査したアスパルトアシラーゼ欠損症(カナバン病)の原因となる*ASPA*遺伝子についても、今回のデータで再調査した。しかし、シーケンスが判別できる領域においては、これらの遺伝子のいずれにも原因変異候補にあげるべき配列異常は認められなかった。データの品質から考慮すると、この症例2のみの全ゲノムシーケンスデータだけでは、遺伝子レベルで本疾患およびその原因を解明することが非常に難しいと考えられた。

症例2の解析に関しては、今後は免疫組織学的方法を駆使して、欠損タンパクを明らかにする必要があると思われたため、現在、その解析を進めているところである。

## 4. 要 約

本研究は、過去に黒毛和種新生子で報告された未同定かつ未解明の遺伝的不良形質である2疾患、すなわちライソゾーム蓄積病および海綿状脳症について、その疾患を同定して原因変異を解明することを目的として実施された。ライソゾーム蓄積病を発症した子牛(症例1)のパラフィン包埋組織および症例1の父牛の精子、ならびに先天性海綿状脳症を発症した子牛(症例2)のパラフィン包埋組織からそれぞれ抽出・精製されたDNAを用いて、次世代シーケンサーによる全ゲノム解析が実施された。ライソゾーム蓄積病の解析においては、関連する約60種の遺伝子のエクソンおよびエクソン-イントロン接合部には候補となる配列異常が認められなかった。なお、牛CTSA遺伝子のイントロン領域における2種類の配列異常(c.1-151C>Tおよびc.1252-12C>G)を原因変異候補として見出した。これらが原因変異であるかを判別するために、TaqManプローブを用いたリアルタイムPCR法を作成して、牛群数十頭について遺伝子型調査を実施した。しかし、これらの配列は多くの健康牛も有していたため、病原性変異ではないと証明された。一方、先天性海綿状脳症の解析においては、関連する6種の遺伝子(*BCKDHA*、*BCKDHB*、*DBT*、*DLD*、*PRNP*および*ASPA*遺伝子)について調査したが、DNAの品質不良から原因変異候補となる配列異常は見出すことができなかった。今後は、両疾患解明のため、さらなる分子生物学的かつ免疫組織学的調査を進める必要があると考えられた。

## 文 献

- 1) 黒毛和種の遺伝的不良形質：一般財団法人畜改良事業団畜改良技術研究所. [http://liaj.or.jp/giken/usi\\_gntyp\\_disease\\_kuro.html](http://liaj.or.jp/giken/usi_gntyp_disease_kuro.html)
- 2) Mikami, O., Anjiki, T., Yamato, O., Nakajima, Y. : A case of suspected lysosomal storage disease in a neonatal Japanese black calf. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53(2), 77~80, 2006.
- 3) Masoudi, A. A., Yamato, O., Yoneda, K., Tsuji, T., Mikami, O., Kunieda, T. : Exclusion of *NEUI* and *PPGB* from candidate genes for a lysosomal storage disease in Japanese black cattle. *Anim Sci J*, 80(5), 611~615, 2009.
- 4) Kato, K., Uchida, K., Murakami, T., Tateyama, S. : A neurological disease with spongy degeneration in a newborn Japanese Black calf. *J Vet Med Sci*, 67(10), 1067~1070, 2005.

## 沖縄県の島々の黒毛和種集団の多様性，近交度のゲノムの視点からの評価

Genomic evaluation of genetic diversity and inbreeding of Japanese Black cattle in the Okinawa islands

佐々木 慎 二

(琉球大学農学部)

Shinji Sasaki

(Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

The control of inbreeding and the maintenance of genetic diversity are important for the sustainability of Japanese Black cattle production. To estimate the inbreeding coefficients of Japanese Black cattle in Okinawa, long stretches of consecutive homozygous genotypes (runs of homozygosity ; ROH) from 1,031 dams were evaluated using an SNP array, and ROH-based inbreeding coefficients ( $F_{ROH}$ ) were estimated in 1,031 dams in 10 islands of Okinawa. The results indicate that  $F_{ROH}$  values in dams in Okinawa are equivalent to that found in locations across Japan. However,  $F_{ROH}$  in dams of one island was higher in comparison with the other Okinawa islands. Additionally, for  $F_{ROH}$ , the expected level of homozygosity was higher than expected in 85.5% of cases when compared to pedigree-based inbreeding coefficients ( $F_{PED}$ ). The results indicate that ROH can serve as a useful tool to evaluate inbreeding in Japanese Black cattle.

### 1. 目 的

沖縄県は、約4.26万頭の黒毛和種・繁殖雌牛を有する子牛生産拠点の1つで（全国4位）、子牛の多くは島外に供給され全国の黒毛和種生産を支えている。しかし、島々は1,000kmの距離に点在し移動が制限されるなど、島内で遺伝的な多様性が失われ、近交が高まりやすい地理的特性がある。現在、これらの地域においてもゲノム育種価が実用化されつつあり、枝肉成績に優れたエリート種雄牛と繁殖雌牛を選抜、交配することで育種改良のスピードアップが図られているが、一方で近交が高まり、多様性が低下する危険性が高まっ

ている。近交が高まった集団では、エリート種雄牛が有害変異など生産阻害因子を保因した場合、その子孫で遺伝的不良形質が発生するなど、持続的生産が脅かされることになる。近交の尺度は従来、血縁情報から任意の遺伝子座位の両アレルがともに共通の祖先由来である確率（近交係数）で評価されてきたが、仮定として祖先に関連がなく、染色体のすべての領域が等価に振る舞うことを前提に算出されるなど、家畜集団の実態に即していない部分がある。牛の他品種の解析では、真の近交係数より低く推定されることが報告されており<sup>1)</sup>、遺伝的特徴を正確に捉えているとは言い難い。そこで、本申請では多様性が失われ、近交

が高まりやすい地域の一つとして沖縄県の黒毛和種集団をモデルケースとして取り上げ, SNP情報を使って各個体で連続する比較的広いホモ接合領域 (Runs of Homozygosity : ROH) を特定することで真の近交係数を算出し, また多様性を把握することで, ゲノムの視点から遺伝的特徴を正確に捉える試みを行った。

## 2. 方法

沖縄県内10島の繁殖雌牛1,031頭からSNPチップを用いて得られた30,106個のSNPを解析に用いた。SNP解析のための事前処理として, マイナーアレル頻度<5%, SNPごとの型判定率<5%, 個体ごとの型判定率<5%, 遺伝子型のハーディー・ワインバーク平衡検定 $p$ 値<1%のSNPを取り除いた。次に, 欠損データの補完を行うとともに, 高密度のハプロタイプ情報を得るため, 黒毛和種1,997頭をBovineHD Beadchipで型判定後<sup>2)</sup>, 上記の同じ条件で前処理し得られた573,739個のSNPを用いて, Beagle5.1<sup>3)</sup>で相決定を行った。その後, このSNPデータを参照データとして, 沖縄県SNPデータの補完を行い (インビューテーション), 以降の解析に用いた。ROH解析は, Plink1.9ツール<sup>4)</sup>を用い3 Mbp以上のROHをそれぞれ個体ごとに算出した後, ARS-UCD1.2ウシ参照ゲノム<sup>5)</sup>の常染色体の全長を2,489,385,779bpとし, 近交係数 $F_{ROH}$ を算出した。主成分分析は, SNPデータからゲノム関係行列を作成後, 固有値, 固有ベクトル, 第20主成分までの寄与率を求めた。また, 沖縄県サンプルと他地域との比較検討を行うため, 全国から収集した繁殖雌牛788頭を黒毛和種・繁殖雌牛の一般集団のSNP情報として解析に用いた<sup>2)</sup>。

## 3. 結果と考察

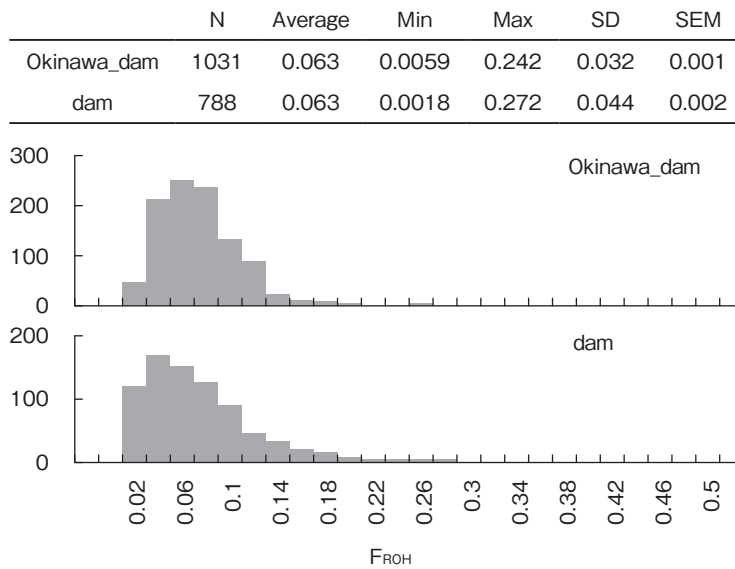
3 Mbp以上の連続するSNPのホモ接合領域で

あるROHを個体ごとに集計し, 常染色体ゲノムに対するホモ接合領域の割合を算出し, 近交係数 $F_{ROH}$ を算出した。沖縄県の繁殖雌牛の $F_{ROH}$ が0.063で, 一般集団の繁殖雌牛と有意差はなかった (Fig. 1)。これらの個体では約157Mbpのゲノム領域がホモ化していることを意味している。また, 最もホモ化が進んだ個体では,  $F_{ROH}$ が0.24とゲノム領域の1/4がホモ化していた。3 Mbp以上の長いROHは, 比較的最近の共通祖先から分離したゲノム領域であると考えられている<sup>6,7)</sup>。そのため, このようなROHを構成する両ハプロタイプ, そしてハプロタイプ領域に存在する変異はともに同祖性である可能性が高く, またすでにホモ接合化していることから致死などに関連する有害な劣性変異が存在する可能性が低いと考えられる。今後, さらに多くの個体でROHを詳細に調べることで, 有益なゲノム領域をホモ化し育種改良を進めるとともに, 有害な劣性変異を効率よく探索・把握できると考えられる。

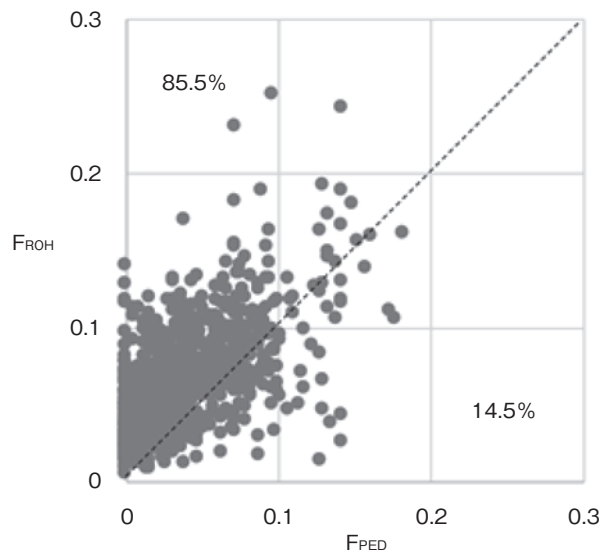
次に, 沖縄県の繁殖雌牛で血縁情報とSNP情報の両方の情報が得られた1,004頭の個体について, 血統情報から求められた近交係数 $F_{PED}$ と $F_{ROH}$ を比較した結果, 相関係数は0.59で有意な中等度の正の相関が認められた。85.5%の個体では $F_{PED}$ は $F_{ROH}$ の値より小さく,  $F_{PED}$ は近交係数を過小評価しているとの既報の結果<sup>1)</sup>と一致していた (Fig. 2)。今後, ゲノム育種価算出の過程で多くの個体でSNP情報の取得が予想されることから, ROH解析による正確な集団の近交係数の評価が可能となると思われる。

沖縄県の島間の近交度の比較評価のため, 沖縄県内10島ごとに繁殖雌牛の $F_{ROH}$ を算出した結果, 1つの島 (Island\_10) で他の9島と比較し $F_{ROH}$ が高い傾向にあり, 1つの島 (Island\_07) に対して有意に $F_{ROH}$ が高いことが明らかとなった (Fig. 3)。今回の調査から, 多くの島は全国の一





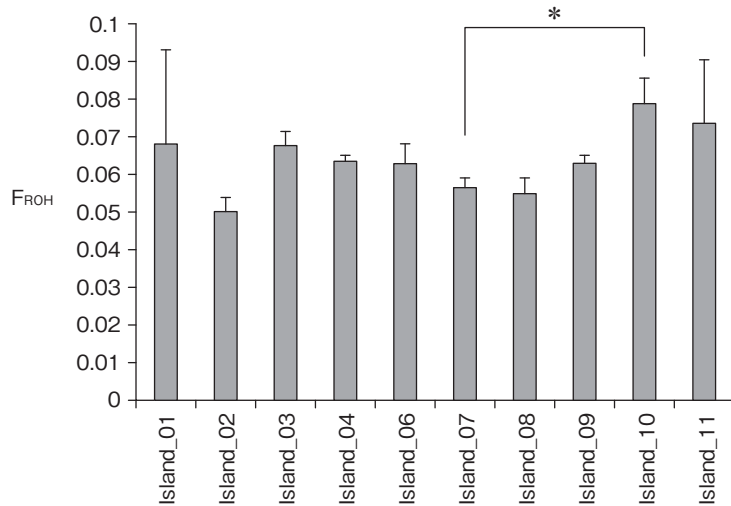
**Fig. 1** Inbreeding estimates derived from runs of homozygosity ( $F_{ROH}$ ) for dams in Okinawa and in locations across Japan  
 (Upper table) Descriptive statistics of  $F_{ROH}$ . (Middle panel) Histogram of  $F_{ROH}$  of dams in Okinawa.  
 (Lower panel) Histogram of  $F_{ROH}$  of dams in locations across Japan



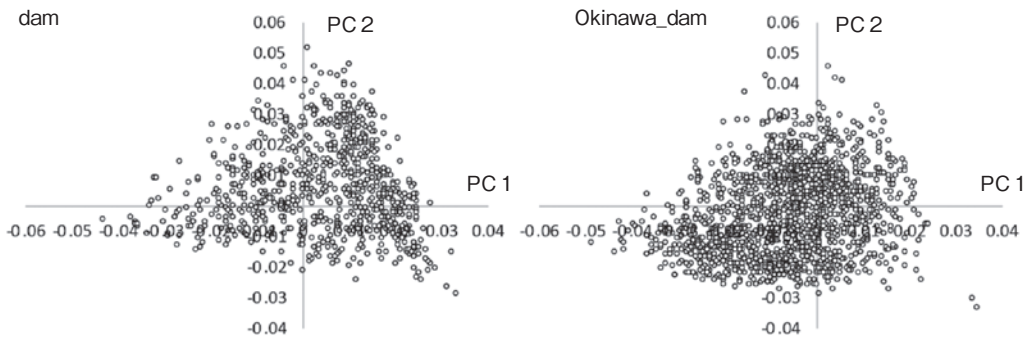
**Fig. 2** Scatter plot between  $F_{ROH}$  and  $F_{PED}$  for dams in Okinawa  
 Scatter plot between  $F_{ROH}$  and  $F_{PED}$  for 1,004 dams in Okinawa. The individuals were plotted in a two-dimensional graph, with the first (x-axis :  $F_{PED}$ ) and the second (y-axis :  $F_{ROH}$ ).

般集団と同等の $F_{ROH}$ であったが、Island\_10の $F_{ROH}$ は他の島より高く、独自の交配戦略が立てられていることが示唆された。今後、経時的に $F_{ROH}$ を評

価することで劣性変異による遺伝的的不良形質が発生しない交配計画を立てる必要があると考えられた。



**Fig. 3** F<sub>ROH</sub> of dams in 10 islands of Okinawa  
 F<sub>ROH</sub> were estimated in 1,031 dams in 10 islands of Okinawa. The values represent the mean ± standard error of mean (SEM). The results were tested using a one-way ANOVA, followed by the Tukey-Kramer test for multiple comparisons. \*  $p < 0.05$ .



**Fig. 4** Principal component analysis of dams and Okinawa dams  
 Principal component analysis of 1,819 Japanese Black cattle including 788 dams and 1,031 Okinawa dams. The individuals were plotted in a two-dimensional graph, with the first (x-axis : PC1) and the second (y-axis : PC2).

主成分分析の結果, 第1成分は3.65%の分散を説明し, 第1から第5までの累積寄与率は約10%, 第1から第20までの累積寄与率は約17%であった。沖縄県の繁殖雌牛と全国から収集した繁殖雌牛(一般集団)を比較した結果, 沖縄県の繁殖雌牛では第1主成分, 第2主成分がともに負に位置する個体が多く存在することが分かったが(Fig. 4), 各主成分の分布は一般集団とはほぼ一致し, 大きな特徴を見いだすことができなかった。

また, 沖縄県内10島間でも特徴を見いだすことはできなかった。

#### 4. 要 約

本研究では, SNPデータを使用しゲノムの視点から沖縄県の島々の和牛集団の多様性, 近交度を把握するためRuns of Homozygosity (ROH) 解析を行い近交係数F<sub>ROH</sub>の算出を行った。今後, 解析頭数を増やし, また個体ごとに個々のROHゲ

ノム領域をさらに詳細に調べることで、沖縄県における和牛の持続的な生産性の基盤となるゲノム技術が開発されることが期待される。

## 謝 辞

本研究は、沖縄県畜産研究センター末澤遼平氏、荷川取秀樹氏の協力のもと行われた。ここに感謝致します。

## 参考文献

- 1) Forutan, M., Ansari Mahyari, S., Baes, C., Melzer, N., Schenkel, F. S., Sargolzaei, M. : Inbreeding and runs of homozygosity before and after genomic selection in North American Holstein cattle, *BMC Genomics*, 19, 98, 2018.
- 2) Sasaki, S., Ibi, T., Watanabe, T., Matsuhashi, T., Ikeda, S., Sugimoto, Y. : Variants in the 3'UTR of General Transcription Factor IIF, polypeptide 2 affect female calving efficiency in Japanese Black cattle, *BMC Genet.* 14, 41, 2013.
- 3) Beagle5.1. <https://faculty.washington.edu/browning/beagle/beagle.html> Accessed 10 Mar 2020.
- 4) Plink1.9. <https://www.cog-genomics.org/plink2> Accessed 10 Mar 2020.
- 5) Bos taurus assembly ARS-UCD1.2. [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF\\_002263795.1/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/assembly/GCF_002263795.1/) Accessed 14 Apr 2020.
- 6) Zhang, Q., Calus, M. P., Guldbbrandtsen, B., Lund, M. S., Sahana, G. : Estimation of inbreeding using pedigree, 50k SNP chip genotypes and full sequence data in three cattle breeds, *BMC Genet.* 16, 88, 2015.
- 7) Zhang, Q., Guldbbrandtsen, B., Bosse, M., Lund, M. S., Sahana, G. : Runsof homozygosity and distribution of functional variants in the cattle genome, *BMC Genomics*, 16, 542, 2015.

# 牛の小型ピロプラズマ病に対する感染抵抗性遺伝子の同定

Identification of genes involved with resistance to small piroplasmosis in cattle

平山 博樹<sup>1</sup>・藤川 朗<sup>2</sup>・和田 健太<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>東京農業大学生物産業学部, <sup>2</sup>北海道立総合研究機構畜産試験場)

Hiroki Hirayama<sup>1</sup>, Akira Fujikawa<sup>2</sup> and Kenta Wada<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture, <sup>2</sup>Animal Research Center, Hokkaido Research Organization)

Cattle that are infested with ticks develop anemia due to tick-borne protozoan. Worldwide, tick-borne diseases have a detrimental impact on cattle production. Genetic variations on the host resistance to tick-borne diseases have been suggested in cattle. In this study, we attempted to find quantitative trait loci for the host resistance to bovine theileriosis with genome-wide association study (GWAS). Genotyping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) was performed with the Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct (GRAS-Di) method using next generation sequencing. We identified 7,146 SNPs in cattle that were experimentally infected by *Theileria sergenti*. Probability principal component analysis indicated that SNPs closely reflect genetic variation between susceptibility breed (Hereford) and resistance breed (Japanese Black) to bovine theileriosis. GWAS indicated that a SNP in chromosome 18 was significantly ( $p < 0.05$ ) associated with minimum hematocrit value in experimental infected animals. Five protein-coding genes and a microRNA were located in surrounding region of the SNP. Four genes of them encoded proteins involved in immunoreaction of leukocytes. These results suggest that the genetic variation on the host resistance to bovine theileriosis may be attributed to polymorphisms in immunologically relevant genes. Further investigations of genetic polymorphisms in the surrounding region of the SNP are needed to determine responsible genes for the host resistance to bovine theileriosis.

## 1. 目 的

ダニ媒介性疾患は家畜の健康被害の原因となる重大な疾患であり、地球上のおよそ80%の牛がそのリスク下にあるとされている<sup>1)</sup>。ピロプラズマ病は、ダニが媒介する *Theileria* 属などの原虫が牛の赤血球に寄生し、発熱、貧血、黄疸および血

色素尿等を引き起こす疾病であり、致死率が高く、世界的に牛の生産性を低下させる重大な問題となっている。

我が国では、育成牛の預託管理のための公共牧場において古くから *Theileria sergenti* (以下TS) による小型ピロプラズマ病が問題となってきた。1980年代以降、牛体への殺ダニ剤投与と牧野整備

により被害は減少したが、現在もTS保有ダニは牧野周辺に浸潤している<sup>2,3)</sup>。全国の放牧牛12.8万頭(H29年度)に対する衛生対策費用は、約10億円と試算されている。本疾病の発症数低下や薬剤投与の労力と費用負担を要因とした衛生対策の中止、放牧地の再林野化などの結果、近年では小型ピロプラズマ病の再興による被害が多発している。

本研究の目的は、本病に対する抵抗性遺伝子の同定と多型選抜に基づく抵抗性個体の増頭による本病の発生低減である。本病は、ホルスタイン種などのヨーロッパ系牛や和牛である日本短角種で発症数が多いのに対し、黒毛和種ではあまり問題にされない。我々は、多大な労力をかけて品種間の実験交配家系の造成と感染試験を実施し、抵抗性遺伝子の同定に迫りつつあるが、その染色体上のマッピングには至っていない。そこで、本研究では次世代シーケンサー解析を活用し、ゲノム全体に対する一塩基置換の網羅的探索を実施した。また、本病に対する抵抗性の責任遺伝子同定を目的にゲノムワイド関連解析を試みた。

## 2. 方 法

北海道立総合研究機構畜産試験場で造成された小型ピロプラズマ病抵抗性に関する実験交配家系より、感受性品種であるヘレフォード種(16頭)、抵抗性品種である黒毛和種(13頭)、それらの交雑種(8頭)およびヘレフォード種による戻し交配個体(107頭)の合計144個体の血液からDNAを抽出した。これらの供試個体(生後3~6ヶ月齢)は、TS寄生赤血球(1もしくは $5 \times 10^8$ 個/体重1kg)を静脈内に接種し、その後3ヶ月間にわたり週3回の採血を行い、平均TS寄生率、最大TS寄生率、平均赤血球数( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )、最小赤血球数( $\times 10^4/\text{mm}^3$ )、平均ヘマトクリット値(%), 最小ヘマトクリット値(%), 平均赤

血球容積(fl)および最大赤血球容積(fl)を調査した。

ライブラリー作製は、2-step tailed PCR法を用いて行った。塩基配列データは、次世代シーケンサー(HiSeqX ten, Illumina社)を用いて実施した。シーケシングは、150bpのペアエンド解析により、1サンプルあたり約100万リードを取得し、Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct (GRAS-Di)専用ソフトウェア(ver1.0.3)を用いてジェノタイプング解析を行った。得られた塩基配列は、Sickle(ver1.33)を用いてクオリティスコアが20未満の塩基を削除した後、20塩基に満たない低品質リードを除去した。得られた高品質リードは、bowtie2(ver2.3.2)を用いて参照配列(ARS-UCD1.2)にマッピングした。マッピングデータの一塩基多型は、Samtools(ver0.1.19)のmpileupとbcftoolsを用いて、それぞれ一塩基多型と挿入欠損を出力した後、vcftoolsを用いて最低品質10, 最低深度10, 挿入欠損削除の条件でクオリティフィルタリングを行った。

取得した一塩基多型マーカー情報のうち、144個体のマーカータイプ判明率が50%以上となった7,146マーカーを用いて確率的主成分分析を実施した。次に、7,146マーカーの多型情報を用い、供試個体の感染試験で得られた赤血球データとのゲノムワイド関連解析により小型ピロプラズマ抵抗性遺伝子のQTL領域を探索した。ゲノムワイド関連解析は、R(version3.6.3)のrrBLUPパッケージを用いて実施した。欠損データの補完はEMアルゴリズムを用いて実施した。

## 3. 結果と考察

次世代シーケンサーを用いたGRAS-Di解析によって、12,933種類の一塩基多型マーカーを取得することができた。それらのマーカーをウシゲノ

ムにマッピングしたところ、全染色体を幅広くカバーする一塩基多型情報が得られていることが示された (Fig. 1)。次に、得られた一塩基多型マーカーから、供試個体144頭のマーカータイプ判明率が50%以上となった7,146マーカーを抽出し、確率的主成分分析を実施した。その結果、得られた一塩基多型マーカーは、小型ピロプラズマ病に感受性のヘレフォード種、抵抗性の黒毛和種、そ

これらの交雑種およびヘレフォードによる戻し交配個体のゲノム配列の差異を非常によく反映していることが確認された (Fig. 2)。

TS感染データのゲノムワイド関連解析の結果、最小ヘマトクリット値を除き有意な関連は検出されなかった (Fig. 3)。最小ヘマトクリット値のゲノムワイド関連解析では、明白なQTL領域は検出されなかったものの、18番染色体の1マ

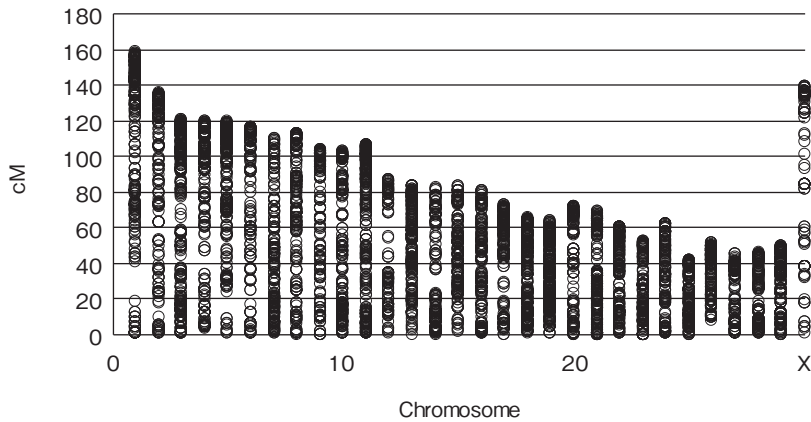


Fig. 1 Single nucleotide polymorphisms identified by the Genotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct method

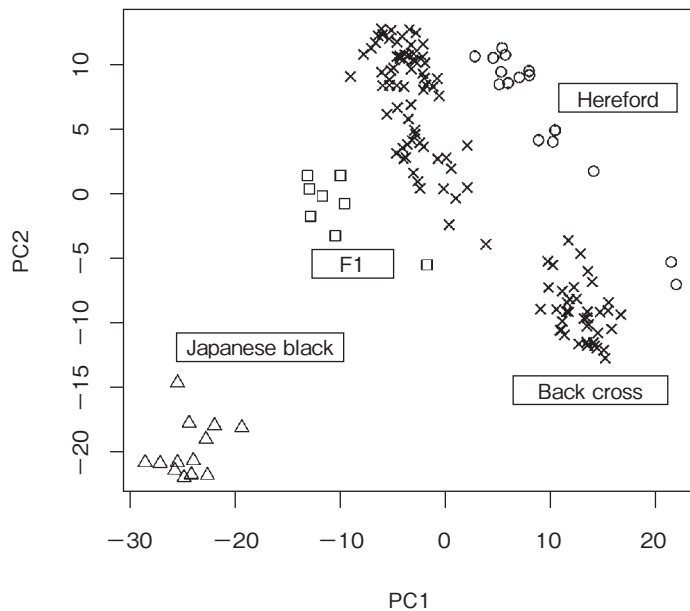


Fig. 2 Probability principal component analysis of single nucleotide polymorphisms



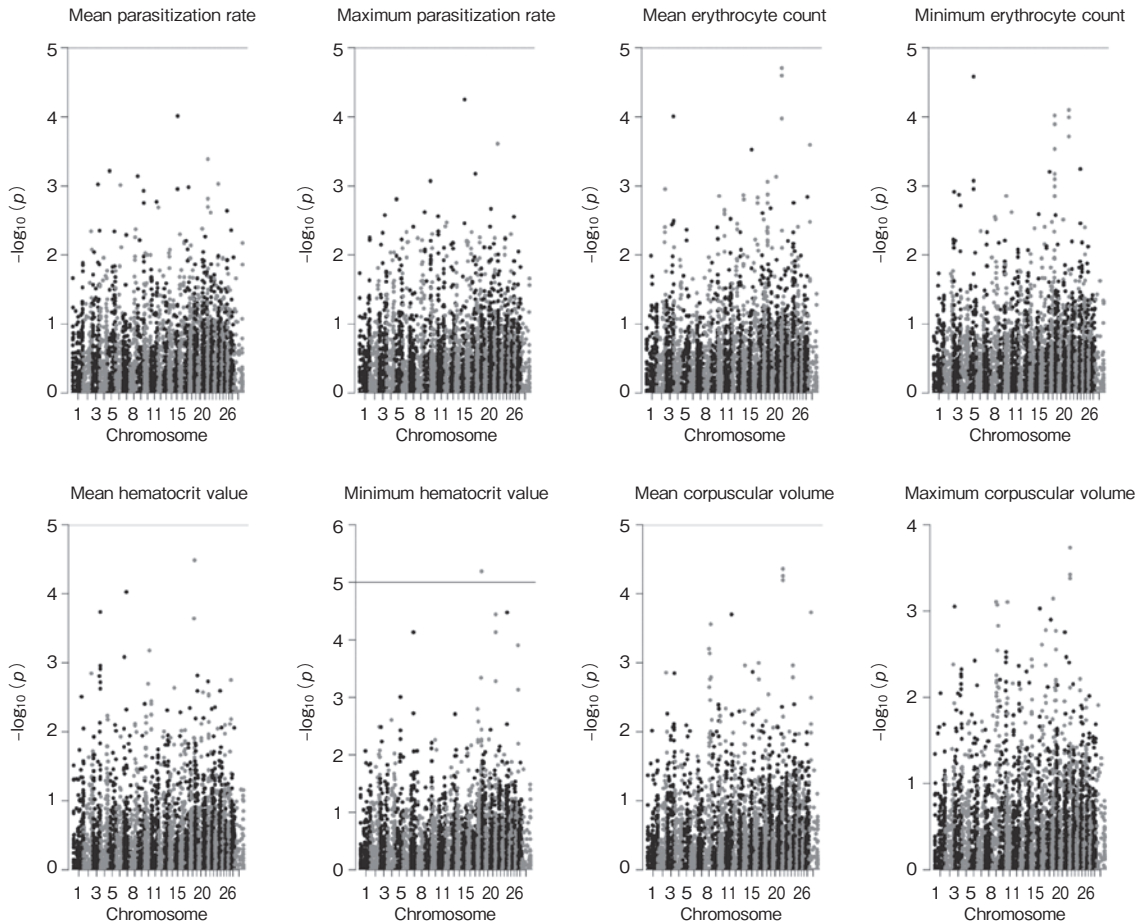


Fig. 3 Manhattan plot of genome-wide single nucleotide polymorphisms associated with hematological data in experimental infection of *Theileria sergenti*

カーで有意 ( $p < 0.05$ ) な関連が認められた。そこで、このマーカーの周囲約400kbpにコードされる遺伝子を検索したところ、5種類の遺伝子および1種類のmicroRNAがリストアップされた。このうち4種類の遺伝子は白血球の関与することが知られる遺伝子であった。小型ピロプラズマ病は、原虫であるTSが赤血球に寄生することで引き起こされる疾患である。北海道立総合研究機構畜産試験場では、TS寄生赤血球をTS未感染子牛に接種する感染試験を実施してきた。これまでに、小型ピロプラズマ病感受性のヘレフォード種では赤血球の平均TS寄生率 ( $3.93 \pm 2.20\%$ ) が黒毛和種 ( $1.30 \pm 0.93\%$ ) および交雑種 ( $1.20 \pm$

0.61%) に比較して有意に高いことが示されている。戻し交配個体の平均TS寄生率は、ヘレフォード種、黒毛和種および交雑種の範囲にばらついており、小型ピロプラズマ病に対する抵抗性遺伝子の分離が認められている。これらの知見から、小型ピロプラズマ病抵抗性遺伝子は、TS原虫の赤血球内への侵入阻止もしくは血液中のTS原虫生存性に関わるタンパク質であることが予想される。本研究でリストアップされた4遺伝子は、細胞性免疫によるTS原虫の排除に関わる可能性が示唆された。

海外でこれまでに実施されたダニ媒介性疾患に対する遺伝学的研究は、体表に付着した吸血ダニ

数を表現型として解析が行われ、ダニ抵抗性に関連する一塩基置換や染色体候補領域が報告されている<sup>4,5)</sup>。しかし、吸血ダニ数は牧野の状況や気候などのさまざまな環境要因の影響を強く受ける。近年は、吸血ダニ数に対するゲノム育種価を用いた選抜技術の開発も進められているが、抵抗性遺伝子の同定は取り組まれておらず、ダニ媒介性原虫の感染メカニズムの解明にもつながっていない<sup>6)</sup>。今後、本研究で同定された5遺伝子およびmicroRNAに関して、品種間の遺伝的多型を探索し、TS感受性との関係について解析を進める必要がある。

#### 4. 要 約

ピロプラズマ病は、ダニが媒介する *Theileria* 属などの原虫が牛の赤血球に寄生し、発熱、貧血、黄疸および血色素尿等を引き起こす疾病であり、致死率が高く、世界的に牛の生産性を低下させる重大な問題となっている。本研究では、北海道立総合研究機構畜産試験場で造成された小型ピロプラズマ病抵抗性に関する実験交配家系を利用し、*Theileria sergenti*感染試験データに対するゲノムワイド関連解析を実施した。供試牛の一塩基多型情報は、次世代シーケンサーを用いたGenotyping by Random Amplicon Sequencing-Direct解析により取得した。本方法で得られた7,146マーカー

の確率主成分分析により、一塩基多型マーカーが供試個体の品種をよく反映していることが確認された。ゲノムワイド関連解析の結果、18番染色体上の1マーカーで、最小ヘマトクリット値との有意な関連が検出された。このマーカーの周辺配列を調査したところ、5種類の遺伝子と1種類のmicroRNAがコードされていた。これらのうち、4遺伝子は白血球の機能に関わることが知られる遺伝子であり、細胞性免疫を介してTS原虫の寄生抑制に関与することが示唆された。今後、これらの遺伝子あるいはmicroRNAの遺伝的多型を探索し、小型ピロプラズマ病抵抗性との関係を調査する必要がある。

#### 文 献

- 1) Shyma, K. P., Gupta, J. P., Singh, V. : *J Parasit Dis*, **39**, 1~6, 2015.
- 2) 前野和利, 松井伸一, 河合孝弘, 鈴木真生, 千葉友行, 横山直明, 猪熊壽 : 産業動物臨床医誌, **7**, 169~174, 2016.
- 3) 佐藤裕太, 前野和利, 斉藤昭, 中瀬愛, 横山直明, 猪熊壽 : 北獣会誌, **56**, 615~618, 2012.
- 4) Neto, L. R. P., Jonsson, N. N., Ingham, A., Bunch, R. J., Harrison, B. E., Barendse, W. : *Immunogenetics*, **64**, 379~388, 2012.
- 5) Mapholi, N. O., Maiwashe, A., Matika, O., Riggio, V., Bishop, S. C., MacNeil, M. D., Banga, C., Taylor, J. F., Dzama, K. : *Ticks Tick Borne Dis*, **7**, 487~497, 2016.
- 6) Junqueira, V. S., Cardoso, F. F., Oliveira, M. M., Sollero, B. P., Silva, F. F., Lopes, P. S. : *J Anim Breed Genet*, **134**, 14~26, 2017.

## 地鶏の行動的ストレス反応性に関与する遺伝的多型の探索（Ⅱ）

The search for genetic polymorphisms involved in behavioral stress response in slow-growing meat type chickens (II)

青谷大希  
(秋田県畜産試験場)

Daiki Aoya  
(Akita Prefectural Livestock Experiment Station)

This study was conducted for two aims : Experiment 1 : To verify the accuracy of frequencies of genetic variants estimated by whole-genome sequencing of bulked DNA samples reported in a previous study; Experiment 2 : To identify behavioral stress response related genes in Jidori based on the results of previous study.

Ten loci were selected for this study from the candidate regions detected in the previous study. In Experiment 1, 61 female Hinai-Jidori chickens used for gene analysis in the previous study were individually genotyped by allele-specific PCR. In Experiment 2, 39 newly hatched female Hinai-Jidori chicks were subjected to behavioral test and subsequent genotyping.

In Experiment 1, the variants frequencies obtained by the two methods showed a significant and strong positive correlation. This result indicates that whole-genome sequencing of bulked DNA sample is practical for estimating the variants frequency in a population. In Experiment 2, no significant association was found between the score of behavioral test and the genotype of the candidate region. Further investigation for other candidate regions is needed to clarify the behavioral stress response-related genes in Jidori.

### 1. 目的

本研究は、地鶏産業における生産性向上に資するため、鶏の行動的ストレス反応性に関与する遺伝子を探索する試みである。

現在、全国各地において、在来種や日本鶏を交配に利用した地鶏が生産されている。地鶏は日本農林規格等の飼養基準によって、平飼いや放し飼いにより飼養することとされており、鶏が自由に運動できることから、歯ごたえのある締まった肉質が評価されている一方で、その育成過程におい

ては圧死事故の発生が大きな問題となっている。

そこで申請研究者は、圧死事故の発生に関与すると考えられる行動的ストレス反応性に着目し、鶏における行動的ストレス反応性の品種間差や生産性との関連について調査を行い、比内地鶏の初生時における行動的ストレス反応性と、その後の発育や悪癖（つつき；feather pecking）の発生との間に有意な関連があることを明らかにした。さらに、初生時のストレス反応性には、遺伝的な要因が大きく影響していると推察されることから、育種への応用を目指し、平成29年度の本財団

助成研究により、鶏の行動的ストレス反応性関連遺伝子のスクリーニング調査を試みた<sup>1)</sup>。その方法と結果について次に示す。

はじめに、これまでに行動反応試験に供した882個体のデータを用いて、行動的ストレス反応性の異なる2つの仮定の調査群 ( $n = 31$ または30) を作出した。続いて、各個体の血液サンプルからDNAを抽出して調査群ごとに等量ずつ混合し、DNAバルクサンプルを調製した。DNAバルクサンプルを、次世代シーケンサーを用いた全ゲノムシーケンス解析に供し、得られたリードをセキショクヤケイのゲノムを参照配列としてマッピングした。情報解析により検出された変異 (SNP: 一塩基多型, 挿入および欠失) のうち、変異の影響度が大きいと推測されたものを抽出し、当該部位における冗長度に占める変異塩基の割合を調査群における変異の頻度と仮定して、カイ二乗検定により、変異頻度のちがいを検定した。その結果として、変異の影響度が大きく、かつ有意に変異頻度が異なる多型が2,732座位検出された。

この先行研究により地鶏における行動的ストレス反応性関連遺伝子に関する基礎的な知見が得られたが、この方法は次世代シーケンス解析における冗長度を利用して両群の変異頻度を仮定したものであり、各群における真の変異頻度をどの程度正確に表しているかは不明である。また、関連遺伝子を特定するためには、遺伝的多型と行動的ストレス反応性との関連について、個体レベルの解析を行う必要がある。そこで本研究では、まず、先行研究により見出した行動的ストレス反応性関連遺伝子候補領域の中から10座位を選定し、先行研究において変異頻度を調査した2つの群について、個体レベルで多型判定を行い、先行研究で用いた手法の精度について検証した。続いて、新規に行動反応試験により行動的ストレス反応性を調

査した個体について多型判定を行い、行動反応試験の結果との関連解析を行った。

## 2. 方法

### 2.1 先行研究において用いた手法の精度の検証

#### 2.1.1 材料

先行研究において集団内遺伝子変異頻度を調査した2つの群のいずれかに選抜された比内地鶏メス61羽の血液サンプルをDNA抽出に供した。

#### 2.1.2 DNAサンプルの調製

各個体の血液サンプルからDNeasy Blood & Tissue Kit (キアゲン ヒルデン ドイツ) を用いてゲノムDNAを抽出した。溶媒は蒸留水 (UltraPure™ DNase/RNase-Free Distilled Water サーモフィッシャーサイエンティフィック ウォルサム アメリカ) とした。抽出したDNAサンプルは濃度を20ng/ $\mu$ lに調整した。

#### 2.1.3 解析する座位の選定

多型判定を行う座位は先行研究の結果をもとにTable 1に示す10座位を選定した。選定にあたっては、両群における変異頻度の比および遺伝子の機能を考慮した。

#### 2.1.4 プライマーの設計

多型の判定はアレル特異的PCR<sup>2)</sup>とアガロースゲル電気泳動により行った。プライマーの設計は株式会社リーゾ (つくば市) に委託した。プライマーの配列ならびにアニーリング温度をTable 2に示す。

#### 2.1.5 アレル特異的PCR

PCR反応液は1ウェルあたり5 units/ $\mu$ l HiDi DNA Polymerase 0.2  $\mu$ L, 酵素添付の10x Reaction Buffer (ともにマイボルスバイオテック コンスタントツ ドイツ) 2  $\mu$ L, 2 mM dNTPs (東洋紡 大阪市) 2  $\mu$ l, 10  $\mu$ Mプライマー各0.4  $\mu$ l, テンプレートDNA 2  $\mu$ l, 蒸留水13  $\mu$ lにより調製した。PCRプロトコルは酵素の標準に従い、初期変

Table 1 Candidate regions for behavioral stress response-related genes in Hinai-Jidori chicken.

Locus	Chromosome	Position	REF	ALT	Change Type	Description
1	7	21292638	C	CT	INS	solute carrier family 4, sodium bicarbonate transporter, member 10
2	27	1510967	A	G	SNP	phospholipase C, delta 3
3	7	16869011	TC	T	DEL	cholinergic receptor, nicotinic, alpha 1
4	4	21658159	GGA	G	DEL	glutamate receptor, ionotropic, AMPA 2
5	1	111309061	T	C	SNP	monoamine oxidase A
6	14	7327125	G	A	SNP	lysine (K)-specific demethylase 8
7	19	170850	C	CT	INS	MLX interacting protein-like
8	4	24073667	G	GGTTT	INS	carboxypeptidase E
9	5	27353663	A	AG	INS	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 9-like
10	9	16482903	C	G	SNP	ATPase, class VI, type 11B

性95℃120秒, 3ステップPCR(変性95℃15秒, アニーリング10秒, 伸長反応72℃30秒)とした。PCRのサイクル数は, 座位1については野生型, 変異型ともに40サイクル, 座位10の変異型については43サイクルとし, その他のプライマーセットでは35サイクルとした。

#### 2.1.6 遺伝子型の判定

PCR後の反応液を2%アガロース(Agarose S ニッポンジーン 千代田区)ゲルで電気泳動し, バンドの有無を確認することにより, 遺伝子型を判定した。泳動バッファーはTris-borate with EDTAバッファー(タカラバイオ 草津市)とした。

標的とした多型に対する各プライマーセットの特異性を確認するため, あらかじめ全ゲノムシーケンズ解析により当該座位の遺伝子型を個々に調査した標準検体を設定した。標準検体の遺伝子型について両者の結果を比較し, 特異性の低かった座位についてはPCR条件を再検討したうえで再試験を行った。

#### 2.1.7 先行研究の結果との比較

本研究によって得られた, 候補領域10座位の各群における真の変異頻度と, 先行研究においてDNAバルクサンプルの全ゲノムシーケンズ結果から仮定した遺伝子頻度について, 無相関の検定ならびに回帰分析を行うことにより, 先行研究

において用いた手法の精度を検証した。統計処理にはエクセル統計(社会情報サービス 新宿区)ソフトウェアを用いた。

### 2.2 新規の試験鶏における候補領域の多型と行動反応試験結果との関連解析

#### 2.2.1 材料

令和元年6月19日にふ化した比内地鶏のメス39羽の行動反応試験結果と血液サンプルを供試した。供試鶏の作出にあたっては, 遺伝的な多様性を持たせるため, 当场で保有する秋田比内鶏20家系のオスから精液を採取し, 混合したものを人工授精して種卵を採取した。

#### 2.2.2 Tonic Immobility試験

行動的ストレス反応性を評価するための行動反応試験として, Tonic Immobility(TI;緊張不動)<sup>3)</sup>試験を用いた。試験は2日齢で行った。TIへの誘導操作は, 先行研究における方法と同一の操作により行い, 不動状態の持続時間は600秒を上限として測定した。なお, 本研究においては持続時間が上限に達した個体は見られなかった。

#### 2.2.3 候補領域の遺伝子型判定

上記2.1における方法と同様にDNAサンプルの調製, アリル特異的PCRおよびアガロースゲル電気泳動によって遺伝子型を判定した。

#### 2.2.4 統計処理

候補領域10座位の相加的遺伝的効果を検証する



**Table 2** Oligonucleotide primers and annealing temperature for allele specific PCR.

Locus		primer sequence (5'-3')	Size (bp)	Annealing (°C)
1	WT	F CCATTAGATGTTTTCCCCCATA	163	55
		R CCTTCTAATGTTTTGTGAAtGg		
	VT	F CCATTAGATGTTTTCCCCCATA	164	55
		R CCTTCTAATGTTTTGTGAACgA		
2	WT	F GGTGTTATGGGACGAGGAGA	197	55
		R TCCATATGGGGACAACCgAt		
	VT	F GGTGTTATGGGACGAGGAGA	197	55
		R TCCATATGGGGACAACCtAc		
3	WT	F CTGTGGGCAGCACGTcaCT	229	62
		R TGCCTACCACATTGATGAGC		
	VT	F CCTGTGGGCAGCACGTaCT	229	62
		R TGCCTACCACATTGATGAGC		
4	WT	F AAGTATCTGTACAGACAGAGgaGA	220	60
		R GACATTGCCAAGGTTTTCTTTT		
	VT	F AAGTATCTGTACAGACAGAGGACT	218	60
		R GACATTGCCAAGGTTTTCTTTT		
5	WT	F TGTGGAGGGTTAAGACTgAt	150	60
		R TGGGGCCAAAAGTTTGACTA		
	VT	F TGTGGAGGGTTAAGACTgAc	150	60
		R TGGGGCCAAAAGTTTGACTA		
6	WT	F GAAAAGGATAAAGCAAACgG	249	55
		R AGGAGCTGGTTTTTCAGTAAT		
	VT	F GAAAAGGATAAAGCAAACgA	249	55
		R AGGAGCTGGTTTTTCAGTAAT		
7	WT	F ATCACCCACAGAGCCTCgTG	181	60
		R CCAGATGCGCAGTATGTTTG		
	VT	F CTGGGAGCAATTGCCTATGT	184	60
		R TGGGATCCGTCCTTCTCgAa		
8	WT	F GAAGGCAGCATCACAGGTAA	171	62
		R AGGTGCTCAGAGTCCTGTCC		
	VT	F GAAGGCAGCATCACAGgttt	175	62
		R AGGTGCTCAGAGTCCTGTCC		
9	WT	F TGTATTTAGCTTCTTGTTATTGcGT	201	60
		R CAAACTGGGACCAGGAGAAA		
	VT	F TTATCACCCCTCTCAGCAGCA	174	60
		R AGAGGACACATTTGTTTTGAAtCc		
10	WT	F GTGCGTCTTCTGTGCATATAcTc	179	51
		R CATCTGTGTCTGGCTGCT		
	VT	F GCGTGTTTCTTCGGTAACCT	171	51
		R GCTTTTACCATGCAAATACAgTc		

WT : wild type. VT : variant type.

Mismatch sites are shown in lowercase character.

ため、各個体の候補領域10座位それぞれにおける変異型アレルの保有数 (0, 1 または 2) を説明変数、TI試験により得られた、TIまでの潜時または不動状態の持続時間を目的変数として重回帰

分析を行った。また、変異型アレルの保有がTI試験の結果に及ぼす影響を検証するため、各個体を候補領域ごとに、野生型ホモのグループと、変異型ホモおよびヘテロのグループに分け、潜時、



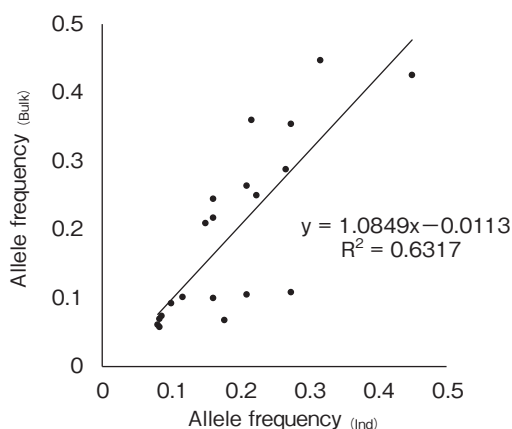


Fig. 1 Linear regression of allele frequency obtained by whole-genome resequencing of bulked DNA sample to that calculated from result of individual genotyping.

持続時間それぞれに関して、マン・ホイットニーのU検定を行った。統計処理にはエクセル統計ソフトウェアを用いた。

### 3. 結果と考察

3.1 先行研究において用いた手法の精度の検証  
先行研究における方法によって仮定した変異頻度を y 座標、本研究により得られた変異頻度を x 座標として、プロットした散布図をFig. 1 に示す。両手法により得られた変異頻度の相関は0.795 ( $p < 0.0001$ ) であり、有意な強い正の相関があることが確認された。また、回帰分析の結果、y の x に対する回帰係数は1.0849 ( $p < 0.0001$ ) と有意であったが、決定係数は0.632と中程度であった。これらの結果から、DNAバルクサンプルの全ゲノムシーケンスによる、集団における遺伝子変異頻度の推定には一定の実用性があることが実証された。

#### 3.2 新規の試験鶏における候補領域の多型と行動反応試験結果との関連解析

本研究において実施したいずれの解析方法においても、今回選定した候補領域の多型と行動反応試験の結果との間には有意な関連は認められな

かった (Data not shown)。今回解析した候補領域は、アノテーションにより遺伝子名が明らかになっていた座位の中から、神経伝達物質の関連遺伝子を選定してのものであったため、今後はそれ以外の遺伝子についても広く解析を進めていく必要がある。また、実験設備の都合で今回は解析対象から除外したが、数塩基から数十塩基の欠損を持つ変異も候補領域の中に存在しており、それらについても検証の余地がある。以上を踏まえて引き続き地鶏の行動的ストレス反応性関連遺伝子の探索を進めていく。

### 4. 要 約

本研究は2つの目的をもって遂行された。第一は、先行研究において実施した、バルクサンプルの全ゲノムシーケンスによる、集団における遺伝子変異頻度の推定について、その精度を検証すること(試験1)であり、第二は、先行研究の結果をもとに、新規に作出した比内地鶏集団を用いて、候補領域と行動的ストレス反応性との関連解析を行い、地鶏の行動的ストレス反応性関連遺伝子を特定すること(試験2)であった。先行研究において検出した候補領域の中から10座位を選定

し、試験1では先行研究において遺伝子解析に供した比内地鶏メス61羽について、試験2では新規にふ化し、2日齢で行動反応試験に供した比内地鶏メス39羽についてアレル特異的PCRにより、個体ごとの多型の判定を行った。

試験1では、先行研究に用いた個体の多型判定により得られた真の遺伝子変異頻度と、バルクサンプルを用いて推定した遺伝子頻度との間には、有意な強い正の相関が認められ、集団における遺伝子変異頻度の推定に、DNAバルクサンプルの全ゲノムシーケンスが有効であることが実証された。試験2では行動反応試験のスコアと候補領

域の遺伝子型との間に有意な関連は認められなかった。今後は、他の候補領域についても解析を進め、引き続き地鶏における行動的ストレス反応性関連遺伝子の探索を進めていく。

#### 文 献

- 1) 青谷大希：地鶏の行動的ストレス反応性に関与する遺伝的多型の探索，平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，36, 162~165, 2018.
- 2) 成澤邦明：Allele Specific PCR (ASPCR) 法，臨床検査 43, 1641~1647, 1999.
- 3) Jones, R. B. : The tonic immobility reaction of the domestic fowl : a review, *W Poultr Sci J*, 42, 82~96, 1986.

## 豚の暑熱ストレス耐性マーカーの開発

Development markers associated with heat tolerance in pigs

佐藤 周史

(千葉科学大学危機管理学部)

Shuji Sato

(Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science)

Heat stress (HS) is one of the limiting factors negatively affecting pig production, health, and fertility. Characterizing responsible genes for variation in HS tolerance would be useful in develop genetic markers that are associated with HS could be used to select for and breed more heat-resilient pigs. The objective of this study was to investigate and compare the effects of HS during lactation period in 60 crossbred sows. Three fragments of heat shock protein genes were amplified in crossbred pigs and eight single nucleotide polymorphisms (SNPs) were identified in the noncoding and untranslated regions of heat shock protein genes. We analyzed the eight SNPs and examined their involvement in HS tolerance in 60 crossbred sows recorded reproductive performance. Sows can be classified into three groups, first was designated in summer season correspond with lactation and then artificial insemination, second and third were before and after month. Each hour, ambient temperature humidity index (THI) was calculated using outside temperature and relative humidity. Plasma was harvested from sows on high THI, before and after, and assayed for concentrations of cortisol. As the results revealed plasma concentration of cortisol was affected by summer high ambient temperature and lactating. It is important to prevent HS through improved cooling devices and management practices for reducing the negative impact on lactating sows during summer season. The one SNP in heat shock protein gene, *HSP90AA1* associated with plasma concentration of cortisol ( $p < 0.01$ ), genotype GA was higher level in summer season than genotype GG. Although this SNP indicated biased allele frequency, further research on this gene would clarify the judgment whether exclude genotype GA from the population. We presume that this SNP may be useful in the future as molecular genetic markers to assisted selection for heat tolerance in pig.

### 1. 目 的

家畜が受ける暑熱ストレスは、乳量の減少、飼料摂取量の減少、顕著な増体低下、繁殖能力の低下および致死など、畜産業にとって経済的な損失

を招く。豚における暑熱ストレスも、生産性、抗病性および繁殖性に影響し経済的損失につながっている。そのため、アニマルウェルフェアの考え方に対応した豚の飼養管理指針では、豚にとって快適な温度域の維持のため、暑熱等対策を講じる

よう示されており、物理的な対策が必要とされている<sup>1)</sup>。また、栄養管理による対策として、飼料摂取低減個体に対する飼料への飼料米添加技術、繁殖能力の低下には酸化ストレスが大きく関与していることから抗酸化物質が豊富な紫黒米を給与する技術などが開発され、増体および繁殖性低下の抑制に利用されている<sup>2)</sup>。

一方、暑熱ストレス反応を遺伝的にコントロールする研究が進められている。暑熱環境下でも増体が優れる個体が選抜され熱耐性の集団が造成されていることから、熱耐性の遺伝的バリエーションは存在する<sup>3)</sup>。そこで、暑熱ストレス反応と関連する遺伝子探索のため、牛、豚などではゲノムワイド関連解析が行われている<sup>4~6)</sup>。それらの結果から、ゲノム上の関連する領域およびその領域内の遺伝子の存在が報告されている。また、ゲノム全体をスキャンする方法とは別に、牛、めん羊および鶏では、暑熱ストレス反応において機能的に候補と考えられる遺伝子が調べられ、暑熱ストレスとの関連が報告されている<sup>7~12)</sup>。

本研究では、豚のゲノムワイド関連解析の報告<sup>6)</sup>に基づき、有意な領域内において、他動物種で報告のある暑熱ストレス反応と関連する3つの遺伝子、*DNAJA4*、*HSP90AA1*および*HSP90AB1*に着目し、遺伝子の多型とストレス指標であるコルチゾールの関連性を調べるとともに、産子数のような繁殖性との関連についても調査する。対象集団における暑熱ストレス耐性マーカーの開発を目的とし、暑熱ストレス反応にかかわる遺伝子を検出、熱耐性の集団が効率的に造成できる技術の確立を目指す。

## 2. 方法

### 2.1 供試動物

千葉県旭市の有限会社Pig Fertilize松ヶ谷にて繋養されているランドレース種と大ヨークシャー

種の交雑種母豚60頭を供試した。試験期間は、2019年7月から2020年2月までとし、この間、母豚の産歴(2~8産)、産子数(総産子数、生存産子数、死産など)を収集した。母豚は、陰圧によるウインドレス式分娩舎、あるいは自然換気による開放式雌豚舎の換気システムが採用されている舎内で管理されている。また、血中コルチゾールの測定および遺伝子型判定のため、尾静脈より2 mL採血し、あらかじめ用意したヘパリンNa注5千単位/5 mL「F」(FujiPharma) 10  $\mu$ l入り遠沈管へ移し、保管した。なお、血液は1頭当たり、3回(不快指数としてtemperature-humidity index: THIを計測し、THIの高い8月、およびその前後の月)採材し、これらの日が母豚の授乳期に当たるよう60頭を20頭ずつ3グループに設定した。具体的には、グループA) 7月に授乳期、グループB) High THIとなる8月に授乳期、グループC) 9月に授乳期の計3群を7月から9月までそれぞれ1ヵ月おきに採血した。各グループについて、その後の人工授精により生産された産子数および各時期の血中コルチゾール濃度を解析に用いた。

### 2.2 コルチゾール測定とTHI

血中のコルチゾールをELISAキット(Cortisol EIA Kit, DetectX, Arbor Assays, United States of America)により測定した。具体的には、1,500rpm10分間の遠心分離で得られた血漿のうち10  $\mu$ lを用いて、Dissociation Reagent 10  $\mu$ l、およびAssay Buffer 280  $\mu$ lと混合し30倍希釈とした後、50  $\mu$ l使用した。以降、キットのプロトコールに沿って進め、マイクロプレートリーダーを用いて、波長450nm OD値を測定し、それら測定値からMyassaysオンラインツール([www.myassays.com/arbor-assays-detectx-cortisol-\(extended-range\).assay](http://www.myassays.com/arbor-assays-detectx-cortisol-(extended-range).assay))によって検量線を作成し、コルチゾール濃度を換算した。なお、各サンプルおよび

スタンダードは2回重複して測定した。

温湿度については、気象庁の千葉県銚子市のデータを用いて、THIを算出した。計算式はCrossら<sup>6)</sup>による。

$$\text{THI (}^\circ\text{C)} = \text{気温} - (0.55 - (0.0055 \times \text{湿度})) \times (\text{気温} - 14.5)$$

THIのカテゴリーとしては、正常 (23.33°C未満)、警戒 (23.33以上26.11°C未満)、危険 (26.11以上28.88°C未満)、および非常事態 (28.88°C以上)の4段階とした。

### 2.3 遺伝子型判定

全血から白血球を回収し、フェノール法によりDNAを抽出した。*DNAJA4*、*HSP90AA1*および*HSP90AB1*のPCR、ダイレクトシーケンシング法により多型を調査した。PCRに用いたプライマー (Eurofins) は、Table 1に示す。酵素は、KOD-FX (ToYoBo) を用い、PCRは、94°C 2分の熱変性後、98°C 10秒、60°C 30秒、68°C 30秒を30サイクルのプログラムとした。

*DNAJ4*のPCR産物は、Exo-CIP Rapid PCR Cleanup Kit (New England Biolabs) により精製し、ダイレクトシーケンシングに用いた。具体的には、PCR産物 5  $\mu\text{l}$ にExo-CIP A 1  $\mu\text{l}$ 、Exo-CIP B 1  $\mu\text{l}$ を添加し、37°C 4分、次いで80°C 1分で失活させた。精製したうちの3  $\mu\text{l}$ は、dGTP BrilliantDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (EdgeBio) により蛍光標識し、Gel Filtration

Cartridge (EdgeBio) で余計な低分子物質などを除去後、ABI3130 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific) により塩基配列を決定した。一方、*HSP90AA1*および*HSP90AB1*のPCR産物は、電気泳動後、ゲルから目的とするフラグメントを切り出し、Nucleospin PCR clean-up Gel extraction (Macherey-Nagel) を用いて精製し、前述同様、塩基配列を決定した。

### 2.4 統計解析

7月から9月に測定したコルチゾール濃度は、各グループにおいて採血時期の有意差検定に分散分析を実施した。また、3つの遺伝子の各遺伝子型とコルチゾール値の関連性は、分散分析とTukeyの多重比較検定を実施した。さらに、繁殖成績とコルチゾール濃度の相関を算出した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 血中コルチゾールとTHIの関連

7月に分娩したグループAの血中コルチゾール濃度は、7月に $24.8 \pm 8.64 \text{ pg}/\mu\text{L}$ と高い状態にあり、9月の $14.9 \pm 4.42 \text{ pg}/\mu\text{L}$ との間に有意差が認められた ( $p < 0.05$ ; Fig. 1)。8月に分娩したグループBでは、8月に $24.2 \pm 17.93 \text{ pg}/\mu\text{L}$ と高い状態にあり、前後の月と比較して高い傾向がみられた。9月に分娩したグループCでは、9月に $26.4 \pm 13.16 \text{ pg}/\mu\text{L}$ と高い状態にあり、7月の $15.8 \pm 5.67 \text{ pg}/\mu\text{L}$ との間に有意差が認められた ( $p <$

Table 1 Primers for comparative sequencing of heat shock protein genes

Gene		Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Size (bp)	Tm (°C)	Acc No.	SNPs	Position
<i>DNAJA4</i>	intron 1	agctcggggagtcagat	tgggtctcctccacatctt	423	60	CU467054	1 SNP	159,124 G>T
<i>HSP90AA1</i>	5' UTR	ttccgagctctgttcacggt	cagcagcttgtacagacctt	549	60	CU633632	3 SNPs	91,753 A>G 91,769 A>G 91,802 G>A
<i>HSP90AB1</i>	5' UTR	ctccccgagattcaagcata	cgtggctctagggaaacagaa	518	60	CT009542	4 SNPs	51,934 A>G 52,039 G>A 52,074 G>A 52,284 A>G

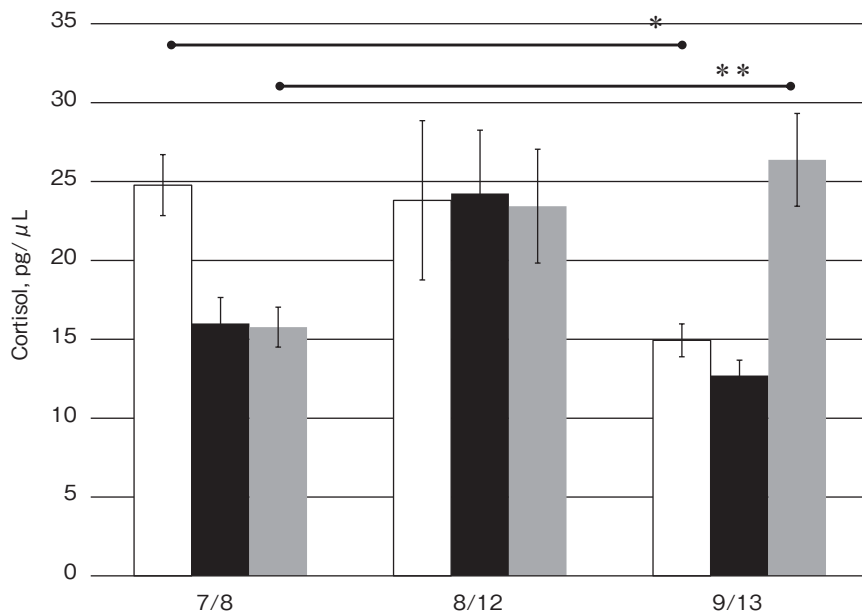


Fig. 1 Concentration of plasma cortisol in hot season (8/12), before (7/8) and after (9/13) corresponding to each group. Group A refers to lactation period in early July, Group B refers to lactation period in early August, and Group C refers to lactation period in early September. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ . Bars = standard error (mean  $\pm$  SE).

0.01 ; Fig. 1)。このように分娩・授乳期を迎える月における母豚の血中コルチゾール濃度が高く、また、THIが上昇した8月では分娩・授乳の有無にかかわらず、すべてのグループで同程度の高い血中コルチゾール濃度が認められた。

THIについて、グループAの授乳期間の各カテゴリ頻度は、正常0.724、警戒0.238、危険0.038であり、グループCの正常0.536、警戒0.257、危険0.103、非常事態0.004と同様な傾向を示す一方、グループBは、正常0.064、警戒0.663、危険0.264、非常事態0.010であり、授乳期間に強い暑熱ストレスも受けていたと考えられた。

### 3.2 THIと母豚の繁殖成績の関連

7月初旬から中旬までは、THIのカテゴリが正常もしくは警戒レベルであったが、7月下旬から8月中旬にかけて、危険レベルに達し、非常事態レベルを示す日も確認された。9月中旬からは、正常レベルに戻ることが確認された (Fig. 2)。各時期で授乳期を経た3グループが人工授

精により交配、分娩した。供試母豚の系統や産次がさまざまであるため、分娩成績には明確な有意差は認められなかったが、グループCの総産子数、生存産子数ともに比較的高い傾向を示した (Fig. 3)。また、母豚の繁殖成績と血中コルチゾール濃度の間には、相関は認められなかった。

### 3.3 遺伝子型と血中コルチゾールの関連

3つのHeat Shock Protein遺伝子、*DNAJA4*、*HSP90AA1*および*HSP90AB1*の多型を調べた結果、1 SNP、3 SNPs、4 SNPsがそれぞれ検出された (Table 2)。そのうち、*HSP90AB1*の3 SNPs (rs332821014, rs326194268, rs340238587) は、連鎖不平衡の関係にあること、また、検出したすべての多型の遺伝子型頻度から、ハーディーワインベルグ平衡にあることも明らかとなった。分散分析の結果、8月の血中コルチゾール濃度が*HSP90AA1*の多型91.802G>Aにおいて有意差が認められた ( $p < 0.01$ )。遺伝子型GAがGGよりも血中コルチゾール濃度が高く、暑熱への感受性を



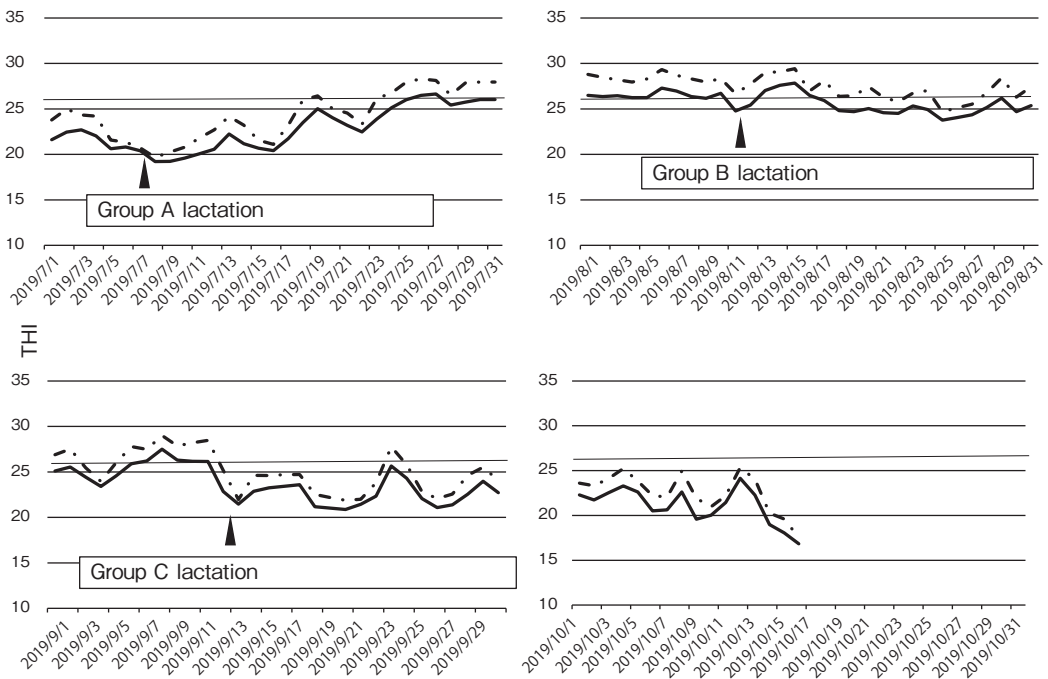


Fig. 2 Plot of temperature-humidity index (THI) from July to October  
 Triangle = sampling. Straight line = THI 26.11, category "Danger". Bold line = average daily THI. Dashed line = maximum daily THI.

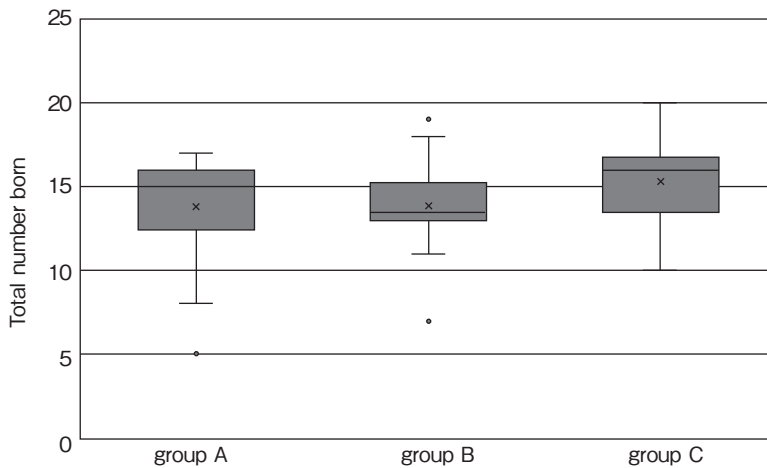


Fig. 3 Boxplot of total number of born piglets in the reproductive season. The minimum, first quartile, median, third quartile and maximum are indicated with the box and whiskers with outliers. The mean is plotted as cross mark.

示したが、遺伝子型GAを保有する個体が1頭のみであり、76.11pg/ $\mu$ Lと高いことに起因する。さらに、この個体は受胎しなかったことで淘汰されており、分娩成績は得られなかった。今後、調査対象を増頭し、遺伝子型GAの効果を明らかに

する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、豚の暑熱ストレスへの耐性マーカーを開発し、強健性と生産性の改善を目指すた

Table 2 Genotype and allele frequencies in each single nucleotide polymorphisms

Gene	SNP		Genotype			Allele frequency		HWE
<i>DNAJA4</i>	rs708056267	G>T	GG	GT	TT	G	T	$p = 0.7-0.5$
			9	23	28	0.342	0.658	
			AA	AG	GG	A	G	
<i>HSP90AA1</i>	CU633632	91,753 A>G	51	9	0	0.925	0.075	$p = 0.9-0.8$
			AA	AG	GG	A	G	
	91,769 A>G	38	20	2	0.8	0.2	$p = 0.95-0.9$	
		GG	GA	AA	G	A		
<i>HSP90AB1</i>	rs332821014	A>G	51	7	2	0.908	0.092	$p = 0.1-0.05$
			AA	AG	GG	A	G	
	rs80867856	G>A	55	5	0	0.958	0.042	$p = 0.95-0.9$
			GG	GA	AA	G	A	
	rs326194268	G>A	51	7	2	0.908	0.092	(LD)
			AA	AG	GG	A	G	
rs340238587	A>G	51	7	2	0.908	0.092	(LD)	

め、暑熱ストレスのゲノムワイド関連解析の研究報告に基づき、有意な領域内において、暑熱ストレス反応と関連する3つの遺伝子、*DNAJA4*、*HSP90AA1*および*HSP90AB1*に着目し、遺伝子の多型とストレス指標であるコルチゾールの関連性を調べるとともに、産子数のような繁殖性との関連についても調査した。また、THI、コルチゾールおよび繁殖性の関連も調査した。

その結果、授乳と暑熱により母豚のコルチゾール濃度が上昇し、ストレスを受けていることが明らかとなった。暑熱期に授乳することになる母豚において、十分な暑熱対策を講じることが必要であり、授乳期間と暑熱期が分散できれば、次の分娩成績の向上が見込まれる。また、血中コルチゾール濃度と関連がみられた*HSP90AA1*は、遺伝子型GAでは暑熱期に血中コルチゾール濃度が非常に高く、暑熱への感受性を示したが、頻度が偏っているため、集団からこの遺伝子型を排除すべきか否か判断するにはさらなる研究が必要である。

#### 文 献

1) 公益社団法人畜産技術協会：アニマルウェルフェ

アの向上を目指して 豚。

- 2) 松本光史, 井上寛暁, 山崎信, 村上斉, 梶雄次：日本養豚学会誌, 49, 109~116, 2012.
- 3) Hoffmann, I. : *Animal Genetics*, 41, 32~46, 2010.
- 4) Dikmen, S., Cole, J. B., Null, D. J., Hansen, P. J. : *Plos One*, 8, e69202, 2013.
- 5) Kim, K-S., Seibert, J. T., Edea, Z., Graves, K. L., Kim, E-S., Keating, A. F., Baumgard, L. H., Ross, J. W., Rothschild, M. F. : *Journal of Animal Science*, 96, 2074~2085, 2018.
- 6) Cross, A. J., Keel, B. N., Brown-Brandl, T. M., Cassady, J. P., Rohrer, G. A. : *Genetics Selection Evolution*, 50, 11, 2018.
- 7) Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A., Bernabucci, U. : *Cell Stress Chaperones*, 16, 441~448, 2011.
- 8) Charoensook, R., Gatphayak, K., Sharifi, A. R., Chaisongkram, C., Brenig, B., Knorr, C. : *Tropical Animal Health and Production*, 44, 921~928, 2012.
- 9) Collier, R. J., Collier, J. L., Rhoads, R. P., Baumgard, L. H. : *Journal of Dairy Science*, 91, 445~454, 2008.
- 10) Marcos-Carcavilla, A., Mutikainen, M., Gonzalez, C., Calvo, J. H., Kantanen, J., Sanz, A., Marzanov, N. S., Perez-Guzman, M. D., Serrano, M. : *Cell Stress Chaperones*, 15, 67~81, 2010.
- 11) Seibert, J. T., Adur, M. K., Schultz, R. B., Thomas, P. Q., Kiefer, Z. E., Keating, A. F., Baumgard, L. H., Ross, J. W. : *Journal of Animal Science*, 97, 4965~4973, 2019.
- 12) Wang, S-H., Cheng, C-Y., Tang, P-C., Chen, C-F., Chen, H-H., Lee, Y-P., Huang, S-Y. : *Theriogenology*, 79, 374~382, 2013.

## 牛の暑熱ストレス耐性を担う *HSP70.1* 遺伝子多型に関する研究 (II)

The study of polymorphism in the bovine *HSP70.1* gene associated with thermotolerance (II)

森 美幸・上田 修二・林 武司・和田 卓也

(福岡県農林業総合試験場)

Miyuki Mori, Shuji Ueda, Takeshi Hayashi and Takuya Wada

(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center)

Single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the partial regions of 5' untranslated regions (UTR) of *Heat Shock Protein 70.1* (*HSP70.1*) gene was detected by cumulus cells, blastocyst, frozen semen in Japanese black and hair roots in Holstein cows. One deletion at base position g.895 and three SNPs (g.1125 A/C, g.1128 G/T, g.1204 T/C) detected in 5'UTR have relation of the linkage disequilibrium by clustering analysis. And then, the effect of heat shock to frozen-thawed in vitro derived blastocyst on survivability, frozen-thawed semen on survivability and sperm motility and conception rate of embryo transfer during summer season was investigated. The survival rate of frozen thawed embryos that have haplotype (g.895 C-, g.1125 AC, g.1128 GT) were lower than that of haplotype (g.895 CC, g.1125 AA, g.1128 GG) and (g.895 CC, C-, -, g.1125 CC, g.1128 TT) by heat shock treatment. The viability of post thawed semen with allele type C- of g.895 was tended to decrease dramatically compared to allele type CC of g.895. The conception rate of cows with haplotype (g.1125 CC, g.1128 TT, g.1204 CC) were tended to higher than other genotypes. This study suggests that these information of *HSP70.1* SNPs (haplotype) may be useful as a genetic marker to evaluation of heat tolerance.

### 1. 目的

暑熱は生体にストレスを与え、国内においても猛暑下では乳牛はもとより肉用牛においても発情微弱化、交配実施頭数の減少、受胎率低下が起ることが報告されている<sup>1,2)</sup>。一方で、現場では夏季の繁殖成績には個体差が認められることがあり、個体の遺伝的差異が高温感受性になんらかの影響を及ぼしている可能性が示唆される。そのため、暑熱による生産性低下という問題を克服する

ためには、耐暑性に優れる個体の選抜や育種という戦略が有効であると考えられる。

熱ショックタンパク質HSP70.1は、細胞質に存在する分子シャペロンタンパク質であり、生命活動を担うさまざまなタンパク質を熱変性から保護、修復する役割を持つ。申請者はこれまでの研究で、夏季の牛子宮内膜上皮細胞における *HSP70.1* 遺伝子の発現増加、着床関連遺伝子の発現低下が起ることを明らかにしている。国外においては、*HSP70.1* 遺伝子多型 (*HSP70.1*-

SNPs) と乳牛の供用年数や交雑種の子牛生産率、直腸温度との関連を示唆する報告がある<sup>3-5)</sup>。これらは、HSP70.1遺伝子多型が母胎や胚の高温感受性に関与することを示唆すると考えられるが、個体の暑熱ストレス耐性や繁殖性との関連については不明な点が多い。また、HSP70.1-SNPsのアレル頻度は品種や生息地域により異なるが<sup>6)</sup>、国内の主要な肉用種である黒毛和種については、これまで明らかにされていなかった。申請者は、黒毛和種のHSP70.1遺伝子の非翻訳領域に複数のハプロタイプを含む多型 (SNPs) が存在すること、末梢血単核細胞を用いた高温負荷試験では、ハプロタイプにより細胞の生存率に違いが認められることを明らかにした<sup>7)</sup>。

本研究では、HSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) と繁殖機能に着目した高温耐性との関連について明らかにするため、胚と精子の生存性と高温耐性、夏季の雌牛の受胎率について調べた。

## 2. 方法

### 2.1 HSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) 情報の取得

#### 2.1.1 黒毛和種卵丘細胞および胚からのHSP70.1-5'UTR配列情報の取得

食肉処理場由来の黒毛和種雌牛卵巢から卵子を採取、周囲の卵丘細胞  $1 \times 10^{6-7}$  個程度を体外受精直前に回収し、 $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した後NucleoSpin Tissue (タカラバイオ) を用いてDNA抽出を行った。また、体外受精胚を凍結保存、融解して高温負荷試験に供試した後、DNAを抽出した。卵巢から個体別に卵子を採取、培養 (個体別培養) あるいは複数の個体から集めた卵子を1ウェルあたり平均50個ずつ培養 (集団培養) し、成熟培養、市販の凍結精液を用いて体外受精後8日目まで発生培養を行った。受精後7あるいは8日目に胚盤胞まで発育した胚を凍結液に浸し、胚移植用スト

ローに封入、プログラムフリーザーを用いて緩慢法にて $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$  で $-30^{\circ}\text{C}$  まで冷却した後、液体窒素中で保存した。凍結保存した胚は融解し、高温負荷試験に供試した後、1個ずつサンプリングし、NucleoSpin Tissue XS (タカラバイオ) を用いてDNAを抽出した。HSP70.1遺伝子の非翻訳領域5'UTR (GenBank accession No M98823.1) の一部配列を特異的プライマー (F: GCCAGGAAACCAGAGACAGA, R: CCTACGCAGGAGTAGGTGGT) を用いてPCR増幅した。増幅産物をExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents (サーモフィッシャーサイエントフィック) で精製後、DNAシーケンス (ユーロフィンジェノミクス株式会社) によりSNPsの検出およびアレル頻度について調べた (Table 1)。

#### 2.1.2 精子からのHSP70.1-5'UTR配列情報の取得

市販の黒毛和種凍結精液1本を $37^{\circ}\text{C}$  の温湯にて融解、DPBSで洗浄した。Buffer GuSXを用いて前処理をオーバーナイトで行った後、Nucleospin Tissueを用いてDNAを抽出した。HSP70.1遺伝子の5'UTR領域のDNA増幅およびDNAシーケンスについては、2.1.1と同様に行った。

#### 2.1.3 毛根からのHSP70.1-5'UTR配列情報の取得

体外受精胚の移植を実施した県内酪農家飼養のホルスタイン種雌牛17頭より毛根50~80本を採取し、NucleoSpin Tissueを用いてDNAを抽出した。HSP70.1遺伝子の5'UTR領域のDNA増幅およびDNAシーケンスについては、2.1.1と同様に行った。

## 2.2 高温耐性評価

### 2.2.1 胚における評価

2.1.1にて個体別あるいは集団培養により体外受精、発生培養、凍結保存した胚盤胞を $30\sim 35^{\circ}\text{C}$

Table 1 Genotype of *HSP70.1*-SNPs at 5'UTR

Position	SNPs	Genotype frequency (%)								
		Japanese Black						Holstein		
		♂ Bull's semen			♀ Cumulus cells or blastocyst			♀ Recipients		
CC	C-	--	CC	C-	--	CC	C-	--		
895	C/Del	30.0	60.0	10.0	42.3	34.6	23.1	23.5	35.3	41.2
983	C/T	80.0	10.0	10.0	84.6	7.7	7.7	-	-	-
1036	C/T	80.0	10.0	10.0	84.6	7.7	7.7	-	-	-
1045	G/A	70.0	30.0	0	63.5	30.8	5.8	-	-	-
1058	A/G	80.0	10.0	10.0	84.6	5.8	9.6	-	-	-
1076	G/A	80.0	10.0	10.0	86.5	5.8	7.7	-	-	-
1096	A/G	-	-	-	86.5	13.5	0	94.1	0	5.9
1117	G/A	50.0	40.0	10.0	50.0	36.5	13.5	94.1	0	5.9
1125	A/C	20.0	40.0	40.0	28.8	28.8	42.3	11.8	23.5	64.7
1128	G/T	30.0	50.0	20.0	34.6	38.5	26.9	17.6	29.4	52.9
1132	A/G	80.0	10.0	10.0	86.5	5.8	7.7	-	-	-
1134	T/C	70.0	30.0	0	67.3	26.9	5.8	-	-	-
1138	C/T	80.0	10.0	10.0	84.6	7.7	7.7	-	-	-
1154	C/G	-	-	-	86.5	13.5	0	94.1	0	5.9
1204	T/C	20.0	10.0	70.0	36.4	36.4	27.3	11.8	11.8	76.5

Shaded SNPs of g.895 C/DEL, g.1125 A/C, g.1128 G/T, g.1204 T/C have relation of the linkage disequilibrium by clustering analysis.

の温湯にて融解し、38.5°C 5%CO<sub>2</sub>で平衡化した回復培地20%牛胎仔血清、100 μMシステアミン添加199に移し、恒温槽 (Major Science) にて38.5°C (対照区) または41.0°C (試験区) で6時間高温負荷処理を行った。処理後は38.5°Cにて融解後48時間まで培養を継続して胚の形態を実体顕微鏡にて観察し、生存率を調査した。

### 2.2.2 精子における評価

凍結精液を37°Cの温湯で融解後、5 mMカフェイン、5 mMテオフィリン加BO液<sup>8)</sup>にて洗浄し、20 × 10<sup>6</sup>個/mlに調整後、20mg/ml BSA、5 μg/mlヘパリン添加BO液にて等量希釈した。恒温槽にて38.5°C (対照区) または41.0°C (試験区) で3時間高温負荷処理を行い、精液性状検査板 (富士平工業株式会社) を用いて0~3時間後におけ

る精子生存率および前進運動率を調査した。

### 2.2.3 受胎調査

2019年7～9月に当场常法にて作出した黒毛和種の体外受精由来凍結胚2個を、県内酪農家飼養ホルスタイン種雌牛に直腸腔法にて移植した。7月1日から9月20日の期間に計17頭に胚移植を実施し、胎膜スリップ法にて妊娠鑑定を実施した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 HSP70.1遺伝子多型 (HSP70.1-SNPs)

黒毛和種の卵丘細胞、胚、精子、ホルスタイン雌牛の毛根から抽出したDNAよりHSP70.1遺伝子5'UTRの多型 (HSP70.1-SNPs) を検出できた (Table 1)。卵丘細胞、精子、毛根からはすべての供試サンプルから配列情報を取得できた。胚については、43個中40個の配列情報を取得できた。黒毛和種の卵丘細胞および胚においては、g.895 (C/DEL), g.983 (C/T), g.1036 (C/T), g.1045 (G/A), g.1058 (A/G), g.1076 (G/A), g.1096 (A/G), g.1117 (G/A), g.1125 (A/C), g.1128 (G/T), g.1132 (A/G), g.1134 (T/C), g.1154 (C/G), g.1204 (T/C) の計15か所、黒毛和種精液10頭からは、そのうちのg.1096 (A/G), g.1154 (C/G) を除く計13か所に多型が検出された。胚移植供試牛であるホルスタイン種雌牛からは、g.895 (C/DEL), g.1096 (A/G), g.1117 (G/A), g.1125 (A/C), g.1128 (G/T), g.1154 (C/G), g.1204 (T/C) の計7か所に多型が検出された。これらをクラスター分析したところ、g.895, g.1125, g.1128, g.1204の4か所については類似度が高く、連鎖不平衡の関係、つまりハプロタイプであると推定された (データ略)。この結果は、平成30年度の黒毛和種雌牛卵巣を用いた解析結果と同様であった<sup>7)</sup>。

### 3.2 HSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) と高温耐性

#### 3.2.1 胚におけるHSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) と高温耐性

本試験では個別培養を行い卵丘細胞から母側、体外受精で用いた精子から父側、そして胚のHSP70.1-SNPs情報の取得を試みた。しかし、個別培養では高温負荷処理の有無に関わらず胚の凍結融解後の生存率が低く、48時間における生存率は試験区で11.1%、対照区で18.8%であり、融解後に一旦生存・回復を確認できても48時間までに死滅する胚が多くを占めた。個別培養では1ウェルで培養する卵子の数が通常の集団培養と比べて少ない。体外受精胚では培養する胚の個数が少ない場合、集団培養と比べて胚発生率が低いという報告がある<sup>9)</sup>。本試験での個別培養での胚発生率は平均16% (データ略) と、凍結融解後の生存率、脱出率ともに当场常法の集団培養で作出した胚と比較しても低いことから、個別培養による胚の高温耐性評価には培養方法の検討や新鮮胚での比較が必要である。一方、集団培養により作出した胚盤胞については母親の遺伝的情報は特定できないが、胚1個からHSP70.1-SNPs情報を取得できたことから (Table 1, 2)、本手法により個々の胚のHSP70.1-SNPsと生存性評価の解析が可能であることが明らかとなった。生存胚が得られた個別培養胚のロットおよび集団培養胚のHSP70.1-SNPsについて、類似度の高いg.895, g.1125, g.1128, g.1204に着目し、ハプロタイプとして胚の生存性との関連を調べた。本試験で作出した胚ではg.1204のアレル頻度にCCホモ型が多く認められた (Table 2)。このことは、体外受精に供試した種雄牛のg.1204のアレルがCCホモ型であったことに起因する。このため、g.895, g.1125, g.1128の3か所あるいは2か所の遺伝子型で分類したハプロタイプA (g.895 CC, g.1125



Table 2 Genotypes of four *HSP70.1*-SNPs at 5'UTR

Breed	Cells	No.	Position			
			g.895	g.1125	g.1128	g.1204
Japanese Black	Blastocyst, control 2)	1	CC	AA	GG	TC
		2	CC	AA	GG	TC
		3	CC	AA	GG	CC
		4	CC	AA	GG	CC
		5	CC	AC	GG	TC
		6	CC	CC	GG	CC
		7	CC	AA	GT	CC
		8	C-	AC	GT	TC
		9	C-	AA	GT	CC
		10	C-	AC	GT	CC
		11	C-	AC	GT	CC
		12	C-	AC	GT	CC
		13	C-	AC	GT	CC
		14	C-	CC	GT	TC
		15	C-	CC	GT	CC
		16	C-	CC	TT	CC
		17	--	CC	GG	TC
		18	--	AC	GT	CC
		19	--	CC	TT	CC
		20	--	CC	TT	CC
Japanese Black	Blastocyst, Heat shock treatment 2)	1	CC	AA	GG	T
		2	CC	AA	GG	Y
		3	CC	AA	GG	Y
		4	CC	AA	GG	CC
		5	CC	AA	GG	CC
		6	C-	AC	GT	TT
		7	C-	AC	GT	TC
		8	C-	AC	GT	TC
		9	C-	AC	GT	CC
		10	C-	AC	GT	CC
		11	--	CC	TT	CC
		12	C-	CC	TT	CC
		13	C-	CC	TT	CC
		14	C-	CC	TT	CC
		15	--	CC	TT	TT
		16	--	CC	TT	CC
		17	--	CC	TT	CC
		18	--	CC	TT	CC
		19	--	CC	TT	CC
		20	C-	CC	GT	CC
Bull (Semen)	1	CC	AA	GG	TT	
	2	CC	AA	GG	TT	
	3	CC	CC	GG	CC	
	4	C-	AC	GT	TC	
	5	C-	AC	GT	CC	
	6	C-	AC	GT	CC	
	7 <sup>1)</sup>	C-	AC	GT	CC	
	8	C-	CC	GT	CC	
	9	C-	CC	TT	CC	
	10	--	CC	TT	CC	
Holstein	Recipients cows (hair roots)	1	CC	AA	GG	TT
		2	CC	AA	GG	TT
		3	CC	CC	GG	CC
		4	CC	CC	TT	CC
		5	C-	AC	GT	Y
		6	C-	AC	GT	Y
		7	C-	AC	GT	CC
		8	C-	AC	GT	TT
		9	C-	CC	GT	CC
		10	C-	CC	TT	CC
		11	--	CC	TT	CC
		12	--	CC	TT	CC
		13	--	CC	TT	CC
		14	--	CC	TT	CC
		15	--	CC	TT	CC
		16	--	CC	TT	CC
		17	--	CC	TT	CC

1) No.7 was used for IVF experiments.

2) Cultured at 38.5°C after thawing as a control.

3) Cultured at 41°C for 6h after thawing.

AA, g.1128 GG), ハプロタイプ B (g.895 CC, C-, --, g.1125 CC, g.1128 TT), ハプロタイプ C (g.895 C-, g.1125 AC, g.1128 GT) を比較した結果, ハプロタイプ C の胚の生存性が低い傾向が認められたが, 今後さらに例数を重ねて検討を行う必要がある (Fig. 1)。

### 3.2.2 精子における *HSP70.1* 遺伝子多型 (ハプロタイプ) と高温耐性

本試験に供試した黒毛和種種雄牛10頭の *HSP70.1*-SNPs (g.895, g.1125, g.1128, g.1204) を Table 2 に示す。供試数が少なく, 同一のハプロタイプを有する複数の個体群が得られなかったため, 以前の報告にて交雑種種雄牛の精液性状や凍結融解後の生存性との相関<sup>10)</sup> が報告されている g.895 (CC型, C-型) について, 高温負荷処理による精子生存性への影響を比較した (Fig. 2)。g.895 C-型は, 融解直後の生存率, 前進運動率が高かったが, 時間の経過に伴う生存率, 全身運動率の低下がCC型と比較して顕著である傾向が認められた。

### 3.2.3 *HSP70.1* 遺伝子多型 (ハプロタイプ) と夏季における受胎性

夏季に胚移植を実施した17頭のうち7頭が受胎し, 受胎率は41.2%であった。供試牛の *HSP70.1*-SNPs (g.895, g.1125, g.1128, g.1204) を Table 2 に示す。うち, 3か所のSNPs (g.1125 CC, g.1128 TT, g.1204 CC) のハプロタイプを持つ個体の受胎率が55.6% (5/9頭) と, その他の型を有する個体の受胎率25.0% (2/8頭) と比較して高い傾向を示した。g.1125 CC, g.1128 TT, g.1204 CC は, 昨年度実施した末梢血単核細胞への高温負荷試験で高温に対する抵抗性が高かったハプロタイプと同じ型であった<sup>7)</sup>。また, g.895についてはC欠損型の乳牛の供用年数や交雑牛の子牛生産率が低いという報告がある<sup>3, 4)</sup>。しかしながら, 本試験ではg.895を完全欠損あるいはヘテロで欠

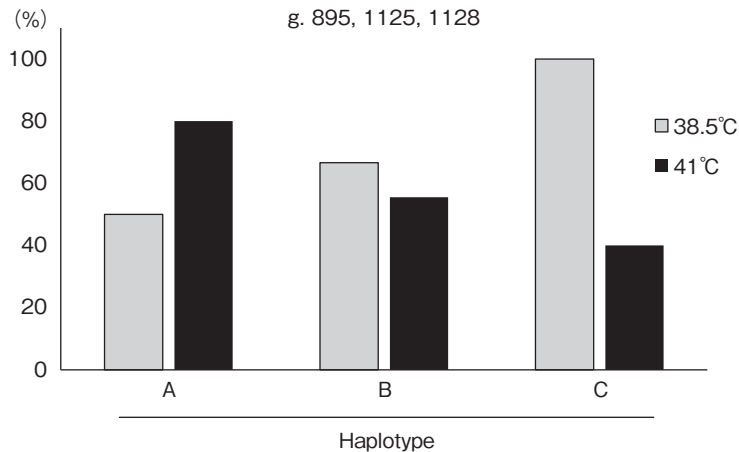


Fig. 1 Comparison of blastocyst survivability after thawing among *HSP70.1*-SNPs haplotype.

Haplotype A (g.895 CC, g.1125 AA, g.1128 GG) : 38.5°C, n=4, 41°C, n=5. Haplotype B (CC or C- or --, CC, TT) : 38.5°C, n=3, 41°C, n=9. Haplotype C (C-, AC, GT) : 38.5°C, n=5, 41°C, n=5.

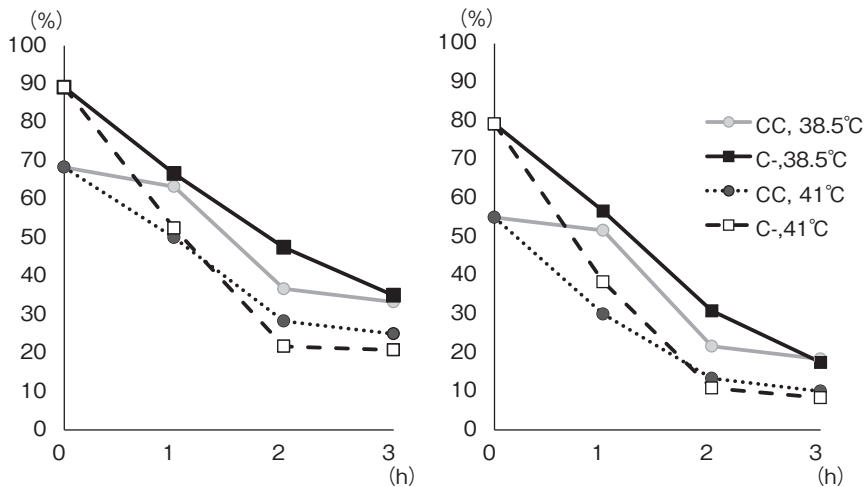


Fig. 2 Effect of heat shock on sperm survivability and mortality after thawing in genotype g.895.

A : Sperm survival rate. B : Sperm mortality. Genotype CC, n=4. Genotype C-, n=6.

損している型を持つ個体の受胎率はCC型より高い傾向であった (Fig. 3)。HSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) と受胎性との関係については、今後もさらに例数を重ねて評価を行って検証する必要がある。

#### 4. 要 約

本研究では、HSP70.1遺伝子多型 (ハプロタイプ) と繁殖面に着目した高温耐性との関連につ

いて、雄側と雌側の両方の視点から解明することを目的に、胚と精子の生存性と高温耐性、夏季の雌牛の受胎率について調べた。黒毛和種の卵丘細胞、胚盤胞、凍結精液、ホルスタイン種雌牛の毛根よりHSP70.1遺伝子の非翻訳領域である5'UTRの多型情報を取得した。高温耐性とハプロタイプとの関係について、類似度の高い4か所のSNPs (ハプロタイプ) に基づき比較したところ、凍結融解後に高温負荷処理した精子の生存率、前進運

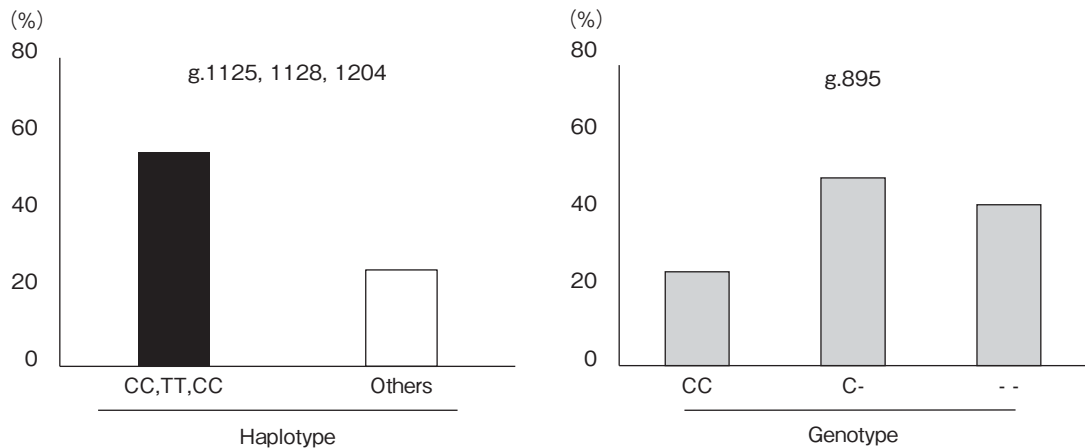


Fig. 3 Conception rate of embryo transfer during summer season.

Haplotype (g.1125 CC, g.1128 TT, g.1204 CC), n=9, Others, n=8, p=0.22 (Fisher's exact test). g.895 (CC, C-, --), n=4, n=6, n=7.

動率、夏季における胚移植の受胎性との関連が示唆されるハプロタイプが認められた。

#### 文 献

- 1) 竹之内直樹, 福重直輝: 発情行動・微弱発情, 日本胚移植学雑誌, 35, 97~108, 2013.
- 2) 阪谷美樹: 暑熱による低受胎, 日本胚移植学雑誌, 35, 109~115, 2013.
- 3) Schwerin, M., Sanftleben, H., Grupe, S.: *Arch Tierz*, 46, 177~185, 2003.
- 4) Rosenkrans Jr. C., Banks, A., Reiter, S., Looper, M.: *Ani Rep Sci*, 119, 178~182, 2010.
- 5) Xiong, Q., Chai, J., Xiong, H., Li, W., Huang, T., Liu, Y., Suo, X., Zhang, N., Li, X., Jiang, S., Chen, M.: *Cell Stress and Chaperones*, 18, 711~718, 2013.
- 6) Oner, Y., Keskin, A., Ustuner, H., Soysal, D., Karakas, V.: *S Afr J Anim Sci*, 47, 424~439, 2017.
- 7) 森美幸: 牛の暑熱ストレス耐性を担うHSP70.1遺伝子多型に関する研究, 平成30年度食肉に関する助成研究成果報告書, 37, 150~156, 2019.
- 8) Brackett, B. G., Oliphant, G.: *Biol Reprod*, 12, 260~274, 1975.
- 9) Donnay, I., Van Langendonck, A., Auquier, P., Grisart, B., Vansteenbrugge, A., Massip, A., Dessy, F.: *Theriogenology*, 47, 1549~1561, 1997.
- 10) Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Sengar, G. S., Alex, R., Das, A. K., Tyagi, S., Raja, T. V., Alyethodi, R. R., Singhi, R., Bhanuprakash, V., Prakash, B.: *J Genet*, 95, 1035~1038, 2016.

## 肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索 (II)

Rapid genetic mapping for egg production and eggshell strength in Nagoya breed for production of meat-type chicken (II)

後藤達彦<sup>1</sup>・力丸宗弘<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>帯広畜産大学, <sup>2</sup>秋田県畜産試験場)

Tatsuhiko Goto<sup>1</sup> and Kazuhiro Rikimaru<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, <sup>2</sup>Akita Prefectural Livestock Experiment Station)

Further improvement of egg production in maternal lines of meat-type chickens is crucial to enhance amount of chicken meat. The purposes of this study are to find genetic loci for egg production rate and to collect information for future breeding of meat-type chickens. We found that Hinaidori breed has 9,853,894 SNPs by using whole genome resequencing technique. By whole genome comparison with high ( $n=8$ ) and low ( $n=8$ ) egg production populations, 65 candidate regions were found on chromosomes 1-9, 11-15, 22-23, and 26-28. These candidate regions are quite high-resolution than those of previous quantitative trait locus (QTL) analyses. Further analyses are planned to reveal that which variants of genes affect egg production rate using a large number of hens in Nagoya breed.

### 1. 目的

鶏卵は栄養価が高く、世界中で最も利用される動物性タンパク源の一つである。卵に関わる特徴(卵形質)は、卵用鶏産業においては、とりわけ重要視される。鶏肉生産用のブロイラー産業や地鶏産業においても、コマーシャル鶏を生産する親世代において、卵形質は重要なものとなる。すなわち、一定期間内に100個の卵を生産する個体と、50個を生産する個体では、受精卵の生産効率が2倍異なる。そのため、より多くのコマーシャル鶏を生産するためには、高い産卵率を示す親鶏が求められる。しかしながら、たとえ2倍の産卵率を示しても、孵化率が低い場合には、そのメリットを最大限に引き出せない。地鶏の種鶏は主に平飼

いで自然交配が行われているため、破卵を防ぐ目的で高い卵殻強度の卵が求められる。また、卵殻質が悪い卵は、孵化率が低いいため、産卵率の上昇とともに、卵殻質の向上も同時に求められる<sup>1)</sup>。つまり、肉用鶏の親鶏において、産卵率および卵殻質のさらなる向上は、世界の鶏肉増産に向けた最重要課題の一つとなる。

北海道の特産品である新得地鶏は、これまでにさまざまな改良がなされ、地域の鶏肉生産を支えている。開発元である北海道立総合研究機構畜産試験場では、継続した改良が行われており、雌系には日本の品種である名古屋種が使われている。名古屋種の卵は、新得地鶏コマーシャル世代を生み出すために重要な働きをしている。現在、名古屋種の雌は、約500個体の規模で継代維持されて

いるが、産卵ピークを含む180日から300日齢の産卵率は、低いもので20%程度、高いもので90%程度と分布の範囲が広く、平均67% (標準偏差16) と大きなバラツキがあるため、今後の改良が強く求められている。これらの鶏肉産業上、重要な形質に関与する遺伝子座が同定できれば、将来、新得地鶏の雌系名古屋種の改良を効率的に行うことに貢献する。

平成30年度の食肉に関する助成研究調査によって、名古屋種の産卵率に関与する候補ゲノム領域を同定した<sup>2)</sup>。名古屋種と同様に、日本の地鶏産業で活躍している比内鶏を対象に、集団ゲノム解析を行うことによって、産卵率に関与する候補ゲノム領域を明らかにすることができれば、広く地鶏産業の親鶏の改良に貢献できるものと考えられる。そこで本研究では、比内鶏の集団を対象に、産卵率の表現型の多様性に関与する遺伝子座を同定すること、地鶏産業の親鶏集団を効率良く改良するための基礎的知見を得ることを目的とした。

## 2. 方 法

秋田県畜産試験場で継代維持されている比内鶏集団の雌 ( $n = 671$ ) を対象に、24週齢から65週齢の産卵率の表現型のヒストグラムを作成し、両極端な位置に存在する個体群 (上位群8個体および下位群8個体) を選定した。集団全体の平均産卵率は  $38.6 \pm 19.8$  標準偏差 (%) であったが、上位8個体では  $65.7 \pm 3.8\%$ 、下位8個体では  $25.8 \pm 7.6\%$  であった (Table 1)。次世代シーケンサー

による全ゲノムリシーケンスより検出される数百万の変異を対象に、これらの集団それぞれが保有する変異のパターンを比較することによって、産卵率に関与する遺伝子座の迅速な探索を行った。

各個体の血液サンプルを収集し、個別にDNAを抽出し、濃度測定および品質管理を行った。次世代シーケンサー (illumina社のHiSeq X Ten) を用いた全ゲノムリシーケンス解析は、受託会社において行った。DNAの断片化を行い、250-350bpのDNAを精製し、ライブラリを作成した。この際、各個体を同定できるように、アダプター配列を付与した。ペアエンドのシーケンスを行い、鶏のゲノムサイズ (約1 Gbp) の5倍のゲノムカバレッジ (約5 Gbp) になるように調整して、次世代シーケンサーの生データ (fastqファイル) を取得した。

生データ取得後のバイオインフォマティクスは、帯広畜産大学後藤研究室のLinux serverを用いて行った。Lawal *et al.* の手法<sup>3)</sup> のように、GATK, BWA, Picard toolおよびSAMtoolsを用いて、fastqファイルを参照配列 (galGal5) にマッピングすることにより、数百万箇所の遺伝的変異 (SNPs) を同定した。VCFtoolsを用いて、全ゲノム領域を約9万の20-KBウィンドウに分けて、産卵率の高/低の集団における変異パターンの違いを、 $F_{ST}$  の指標を基にして比較した。 $F_{ST}$  は遺伝的分化の程度を示し、0に近ければ両集団が近い関係性にあり、1に近ければ両集団が遠い関係性にあることを示す。表現型の高/低の集団間の比

Table 1 Phenotype and genome coverage of high and low groups in egg production

Group	n	Genome coverage	Phenotype
			EP (%)
High_EP	8	4.8 ± 0.3	65.7 ± 3.8
Low_EP	8	5.2 ± 0.4	25.8 ± 7.6

平均 ± SD

較を行うことによって、両集団が遠い関係性にあるゲノム領域を明らかにすることができれば、当該表現型に關与する遺伝子座を含む可能性が高い候補領域として検出できる。本研究では、標準化した $F_{ST}$ である $Z-F_{ST}$ の値がきわめて高い領域( $Z-F_{ST} > 4$ )を高低の集団間において有意に異なる候補領域として検出した。

### 3. 結果と考察

次世代シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンスの結果、比内鶏の雌は、集団として9,853,894SNPsを保有していることが明らかになった。それらのSNPsを、20-KBウィンドウ単位の染色体領域ごとに集計し、各ウィンドウにおいて30SNPs以上が存在する87,564ウィンドウを対象に、遺伝的分化の程度を明らかにする集団ゲノム解析を行った。

24週から65週齢の産卵率が有意に異なる上位群8個体(65.7 ± 3.8%)、下位群8個体(25.8 ± 7.6%)からなる2集団を用いた集団ゲノム解析の結果、産卵率に關与する計65の候補領域が検出された(表2)。これらの候補領域は、第1-9、11-15、22-23および26-28染色体上に存在し、候補領域のサイズは、平均268KB、最小20KB、最大4.1MBであった。候補領域サイズの中央値が50KBであることから明らかなように、ほとんどの候補領域は、20-60KBのサイズであり、1MBを超える候補領域は6つであった。

これまでに多くの研究グループによって、鶏の産卵率に關与する遺伝子座(Quantitative Trait

Locus; QTL)を明らかにする試みがなされてきた<sup>4)</sup>。従来のQTL解析は、遺伝子座の信頼区間が広範囲にわたることから、それぞれのQTL領域に多数の候補遺伝子があげられることが課題点とされてきた<sup>5)</sup>。本研究の結果、産卵率に關与する多くの候補領域のサイズは20-60KBであったことから、従来のQTL解析の結果と比較して、きわめてマッピングの解像度が高く候補領域を検出することができたことが分かる。このことは、今後計画している大規模な集団を対象にした産卵率に關する関連解析を効率よく進めるために有益な情報を与えるものと考えられる。さらなる研究によって、本研究において検出された候補領域が比内鶏に特異的なものであるのか、他の日本鶏においても共通なものであるのかを明らかにするとともに、名古屋種の大規模集団を対象にした関連解析によって結果の妥当性を検証していきたいと考えている。

### 4. 要約

肉用地鶏の雌系において、産卵率および卵殻質のさらなる向上は、鶏肉増産に向けた産業上の最重要課題の一つである。本研究では、産卵率の表現型の多様性に關与する遺伝子座を同定すること、今後の地鶏集団を効率よく改良するための基礎的知見を得ることを目的とした。次世代シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンスにより、比内鶏の雌は、集団として9,853,894SNPsを保有していることが明らかになった。産卵率の表現型に基づき上位8個体および下位8個体の集団

Table 2 Number, size, and chromosomes of candidate genomic regions

Target phenotype	Candidate region ( $Z-F_{ST} > 4$ )					Chromosomes
	No.	Size				
		Median	Min	Ave	Max	
Egg production	65	50 KB	20 KB	268 KB	4.1 MB	1-9, 11-15, 22-23, 26-28



を対象に、集団間の遺伝的分化の程度をゲノムワイドで比較した結果、第1-9, 11-15, 22-23および26-28染色体上に計65の候補領域を検出した。これらの候補領域は、従来のQTL解析の結果と比較して、きわめて高解像度にマッピングされた。今後のさらなる解析によって、どのような遺伝子における変異が産卵形質に関与しているのかを、名古屋種の大規模集団を用いて明らかにする計画である。

#### 文 献

- 1) Goto, T., Fernandes, A. F. A., Tsudzuki, M., Rosa, G. J. M. : Causal phenotypic networks for egg traits in an F2 chicken population, *Molecular Genetics and Genomics*, **294**, 1455~1462, 2019.
- 2) 後藤達彦, 國重享子, 西村健志, 佐藤駿 : 肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索, 平成30年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, **37**, 146~149, 2019.
- 3) Lawal, R. A., Martin, S. H., Vanmechelen, K., Vereijken, A., Silva, P., Al-Atiyat, R. M., Aljumaah, R. S., Mwacharo, J. M., Wu, D. D., Zhang, Y. P., Hocking, P. M., Smith, J., Wragg, D., Hanotte, O. : The wild species genome ancestry of domestic chickens, *BMC Biology*, **18**, 13, 2020.
- 4) Goto, T., Tsudzuki, M. : Genetic mapping of quantitative trait loci for egg production and egg quality traits in chickens : a review, *Journal of Poultry Science*, **54**, 1~12, 2017.
- 5) Andersson, L., Georges, M. : Deciphering the genetics of complex traits, *Nature Reviews Genetics*, **5**, 202~212, 2004.

# OPU-IVPを活用したステーション型牛胚生産システムの構築

Construction of station type bovine embryo production system using OPU-IVP

及川 俊徳<sup>1</sup>・矢島 りさ<sup>1</sup>・沼邊 孝<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>宮城県畜産試験場, <sup>2</sup>みやぎ農業振興公社)

Toshinori Oikawa<sup>1</sup>, Risa Yajima<sup>1</sup> and Takashi Numabe<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, <sup>2</sup>Miyagi Agricultural Development Corporation)

The purpose of this study was the establishment of a station-type bovine embryo production system to transport oocytes collected using the ovum pick-up (OPU) technique on field farms to research facilities for the *in vitro* production of embryos. We investigated a transportation system where the oocytes were stored in tubes in a transportation box, and the gas concentration was controlled with a gas-generating agent. In Experiment 1, the use of AnaeroPack CO<sub>2</sub> (AP) was compared with atmospheric conditions (AIR) to investigate the effect on embryo development in oocytes that were matured *in vitro* in the transport box. Furthermore, the embryo development after *in vitro* fertilization was examined in control (using a drop in the incubator), 4-h (transport box 4 h+incubator 18 h), and 22-h groups (using a tube in the transport box). We found that under AIR, the blastocyst rate on day 8 was significantly lower in the 22-h group than in the control group, but there was no difference in the cleavage rate and cell number of blastocysts. Under AP, the embryo development rate was not significant. In Experiment 2, OPU was performed in the field, and the collected oocytes in the 4-h group were transported under conditions of AP or AIR. Thereafter, the embryo development was examined. There was no difference in embryo development under the AIR and AP conditions. Moreover, the blastocyst-stage embryos were transferred 7-8 days after *in vitro* fertilization, and the pregnancy rates were 50.0% for both groups. In conclusion, the method of culturing for 4 h in a transport box and in a tube is effective for *in vitro* embryo production using OPU.

## 1. 目的

肉用牛では、繁殖雌牛の飼養頭数の減少に伴い、生産される子牛が減少し子牛価格の高騰が続いている。牛肉の需要はやや回復し枝肉価格は上昇傾向にあるものの、子牛頭数の減少に起因する肥育素牛価格の高騰によって肥育農家の経営を大

きく圧迫している。子牛の増頭が求められるなかで、受精卵移植はホルモン製剤を投与した過剰排卵処理による胚生産によって1頭の雌牛から一度に複数の子牛生産が可能となり、黒毛和種の増頭対策に有効な方法と考えられる。

一方で、牛の体外受精技術は食肉処理場由来卵巣を利用することで急速に発展してきたが、近

年、超音波診断装置を用いて生体から卵子を採取する生体内卵子吸引 (OPU) を行い、体外で胚を生産する生体内卵子吸引-体外受精胚生産 (OPU-IVP) 技術が畜産現場でも実施される機会が増えている。OPUはホルモン製剤の投与を必要とせず繰り返し実施可能であり、妊娠牛やホルモン製剤に対する反応が低い牛にも応用できることから、過剰排卵処理に代わる胚生産技術として期待されている。OPU-IVPを活用した体外受精胚の作出によって子牛の増頭が可能となるが、体外受精による胚生産を成功させるためには精子、卵子、受精および胚の発生培養等に関する広範な知識や技術と施設設備が必要である。そのため新規に民間の獣医師が安定して体外受精胚を生産するには多大な労力を必要とし、体外受精専属の技術者の雇用も視野に入れなければならない。しかし、体外受精の技術は、各地域の公設畜産研究施設がすでに保有しており、民間獣医師と公設研究施設が連携することでOPU-IVPを活用したステーション型牛胚生産システムが構築できると考える。すなわち、現場で民間獣医師がOPUにより卵子を採取して公設研究施設に輸送し、それ以降の体外受精は公設研究施設が行う。その後、作出した体外受精胚を民間獣医師に戻して受精卵移植を実施することで、効率的な体外受精胚の生産システムによる子牛の増頭促進が期待できる。

そこで本研究では、OPU後の卵子を安定的に培養施設まで輸送する方法を確立するため、ポリスチレン製試験管 (チューブ) を用いた卵子の輸送と、潜熱蓄熱材を利用した輸送ボックスによる電源不要の保温およびガス発生剤を用いた簡易なガス制御によるIVPについて検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 実験 I 輸送ボックスによる体外成熟卵子の体外受精の検討

現場でOPUにより採取した卵子を培養施設まで輸送することを想定して、食肉処理場由来卵子を利用し、輸送ボックスによる体外成熟 (IVM) が体外受精 (IVF) 成績に及ぼす影響を検討した。卵子のIVMは通常、インキュベーターにより温度およびガス制御を行い、培養液の微小滴 (ドロップ) を作製しオイルカバーされたシャーレを用いて実施されている。本研究では採取した卵子を輸送するため、体外成熟培地を入れたポリスチレン製試験管 (チューブ: FALCON) を使用した。また、温度制御は電源を用いずに潜熱蓄熱材を使用するiP-TEC定温輸送ボックス (輸送ボックス: サンプラテック) で行った。ガス制御は、ガス発生剤としてアネロバックCO<sub>2</sub> (三菱ガス化学) を使用または不使用について検討した。OPU後に卵子を輸送する場合に4時間あれば県内のどこからでも畜産試験場へ輸送可能と想定されるため、試験区は輸送ボックスで4時間保存した後、シャーレに作製したドロップで培養する4時間区、輸送ボックスで22時間保存した後そのまま体外受精に供試する22時間区、対照としてインキュベーターを用いてドロップで約22時間培養する対照区の3区を設定した。IVM終了以降はすべての区で同じ方法で実施した。体外成熟培地は牛胎子血清 (FBS)、上皮成長因子 (Epidermal Growth Factor: EGF)、卵胞刺激ホルモン (FSH)、ピルビン酸ナトリウムを加えたMedium199、体外受精はIVF100 (機能性ペプチド研)、発生培地はFBS添加CR1aaを使用した。輸送ボックス内の温度推移、IVM培地のpH変化、卵子の体外成熟成績、体外受精後8日目まで発生培養を継続し、胚発生成績ならびに胚盤胞の細胞数について調査

した。なお、卵子の体外成熟成績は、IVM（約22時間）後に卵丘細胞を剥離、アセトオルセイン染色を行い卵子の核相を位相差顕微鏡にて確認した。また、胚盤胞の細胞数はPropidium IodideとHoechst33342を用いた二重蛍光染色法を行い計測した。

## 2.2 実験Ⅱ 現場でのOPUによる卵子輸送後の体外受精成績

みやぎ農業振興公社白石牧場で飼養する黒毛和種繁殖牛4頭を用いて、OPUを2週間間隔で反復し、輸送中のガス制御についてアネロパックCO<sub>2</sub>を使用する区（AP区）と何も使用せず大気条件で行う区（AIR区）をそれぞれ3回実施した。採取した卵子は、体外成熟培地を入れたチューブおよび輸送ボックスを用いて畜産試験場まで輸送し、実験Ⅰの4時間区と同様に4時間経過後にシャーレに作製したドロップに移しインキュベーターで培養した。その後の体外受精および体外発生培養も実験Ⅰと同様の方法で実施し胚発生成績を調査した。また、体外受精後7日目または8日目の胚盤胞期胚を発情後7日目の受胎牛に移植し、その受胎成績を調べた。

## 統計処理

胚発生成績のパーセンテージのデータは $\chi$ 二乗検定またはFisherの正確確率検定、細胞数は一元配置分散分析後にTukey-Kramer法により多重検定を行った。統計的な有意差判定に用いたp値は5%未満を有意差ありとした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験Ⅰ

輸送ボックス内および設置した室内の温度推移をFig. 1に示した。室内の温度は開始時23℃から徐々に低下し、15時間後には11.4℃まで低下したが、輸送ボックス内の温度は開始1時間以内に約36.0℃まで上昇し、22時間後も維持された。

IVM中のpHは、大気条件下（AIR）では培養開始から4時間後と22時間後のチューブでpH7.6以上まで上昇したが、アネロパック使用（AP）では大きな変化はみられず、対照区と同様の値を示した（Fig. 2）。

体外受精による胚発生成績は、AIRでのDay 8における胚盤胞率は22時間区が16.8%であり、対照区31.8%と比べて有意に低い成績であったが、

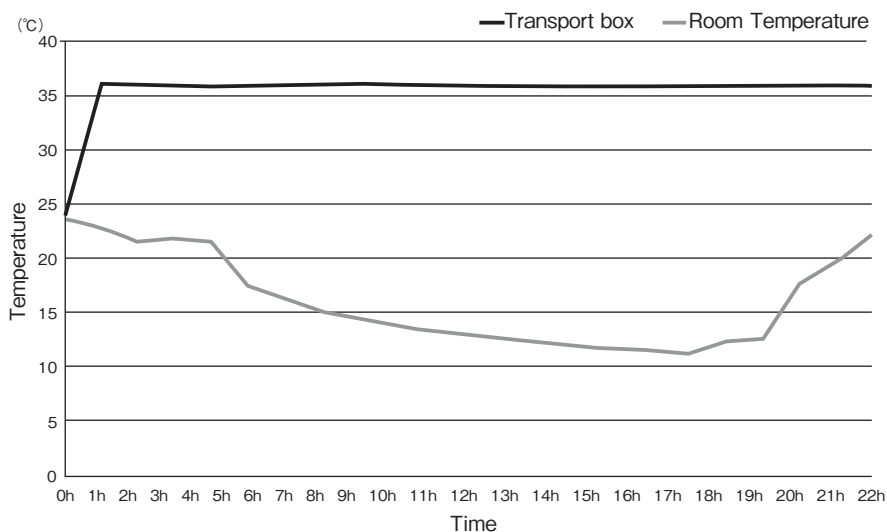


Fig. 1 Hourly changes in temperature in the transport box and in the laboratory

卵割率および胚盤胞の細胞数に差はみられなかった (Fig. 3, 4)。APにおいては、胚発生成績や胚盤胞の細胞数に有意な差は認められなかった。卵子の体外成熟率は、AIRでは有意な差は認められなかったが、APでは4時間区36.2%、22時間区30.4%、対照区43.2%であり、22時間区が4時間区および対照区と比べて有意に低い成績であった。

今回、輸送ボックス使用ではインキュベーター

を用いた従来の方法よりも低い温度であったが、IVM時の温度制御については、牛では36.5℃と38.5℃で比較して卵子の成熟率や胚発生成績に差がなかったとの報告がある<sup>1)</sup>。今回は既報よりもわずかに低く約36.0℃でIVMを行ったが、従来法である対照区と同等の成熟率や胚発生成績を得られることが分かった。

AIRでは対照区に比べ、22時間区で胚盤胞率が低い成績であった。これは体外成熟時のpHが影

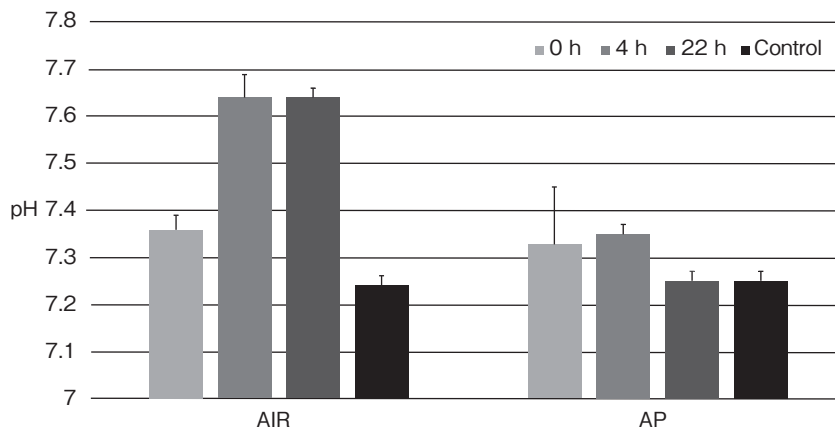


Fig. 2 Effect of atmospheric conditions on the pH of bovine oocyte maturation medium  
Abbreviations : AIR, atmospheric conditions ; AP, CO<sub>2</sub> gas concentration-adjusting agent  
Each column shows the mean  $\pm$  SEM

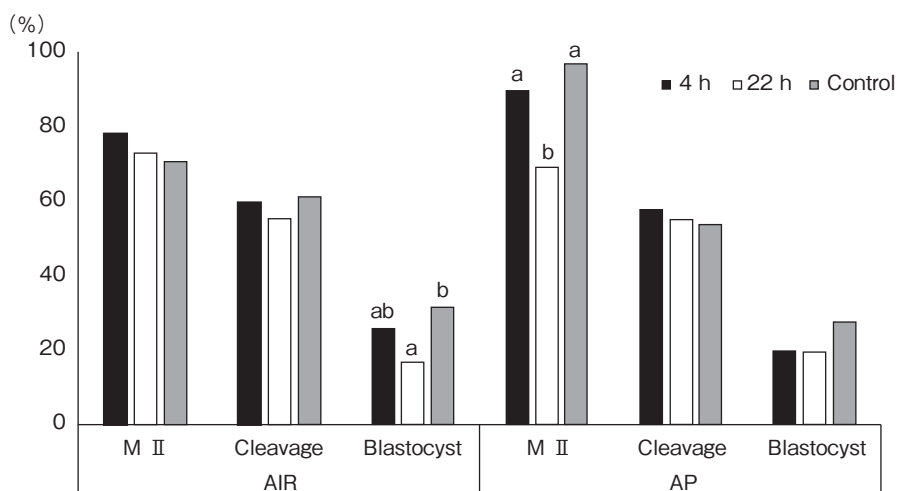


Fig. 3 Effect of oocyte culture conditions on the rate of oocyte maturation and embryo development  
Abbreviations : AIR, atmospheric conditions ; AP, CO<sub>2</sub> gas concentration-adjusting agent, MII, metaphaseII oocytes  
<sup>ab</sup>Different letters indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

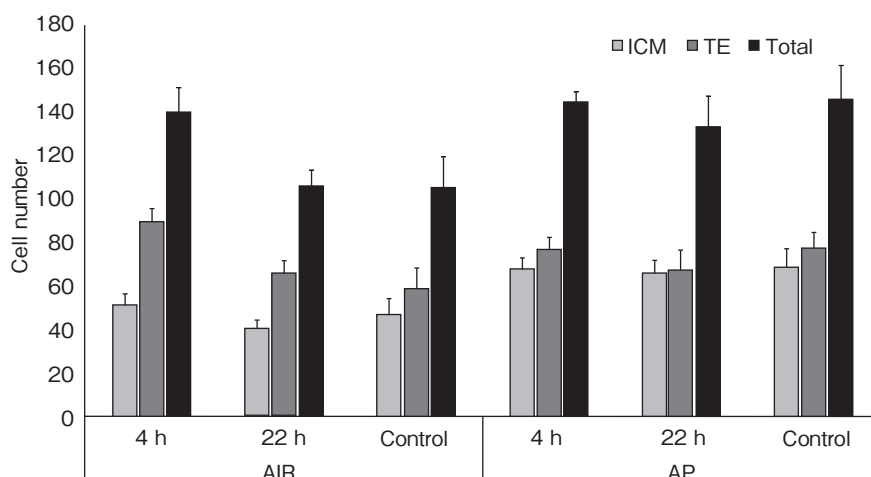


Fig. 4 Effect of oocyte culture conditions of blastocysts on the total number of cells and numbers of inner cell mass and trophectoderm cells

Abbreviations : AIR, atmospheric conditions ; AP, CO<sub>2</sub> gas concentration-adjusting agent

Each column shows the mean  $\pm$  SEM

響していると考えられた。また、APでは5% CO<sub>2</sub>に制御されているためpHに変化はみられず、胚発生成績にも差はみられなかった。細胞外pH7.0~7.4の範囲内では胚の細胞内pHは変化せず、発生に影響を与えないが、この範囲外の環境pHの変動は胚の発生に悪影響を及ぼすことや、牛とヒトは他の動物種と比べて環境pHのアルカリ性に弱いことが報告されている<sup>2)</sup>。さらに、環境pHのわずかな上昇が胚盤胞の発生に影響を及ぼすとの報告もある<sup>3)</sup>。本試験ではAIRにおけるpHは4時間区および22時間区でpH7.6であったが、22時間区では適正pH範囲外とされるpH7.6に長時間暴露されたことで胚発生成績が低くなったと考えた。また4時間区ではIVM開始から4時間でシャーレに移し、それ以降は対照区と同様のpH7.3前後の環境pHとなることから、胚発生成績には大きな影響を及ぼさなかったと推察された。

一方でAPではpHの上昇がみられなかったことから、22時間区でもpHの影響を受けずに他の試験区と同等の成績が得られたものと思われた。成熟率では、4時間区や対照区と比べて22時間区で

有意に低かった。これは、密閉した容器内部のO<sub>2</sub>をCO<sub>2</sub>変換するAPの特性から大気条件よりも酸素濃度が多少低くなるため、4時間区よりも長時間暴露される22時間区で影響が出たのではないかと考えた。4時間区ではO<sub>2</sub>濃度低下にさらされる時間が短いため、APを使用することで高い体外成熟率が得られることが明らかとなった。

### 3.2 実験II

AIR区とAP区で胚発生成績に差はなかった。受胎成績においても両区に差はなく、受胎率はどちらも50.0%であった (Fig. 5)。

実験IIでは実験Iの結果から4時間区の条件で現地での実証試験を行った。AIRとAPどちらの条件も検討したが、ガス制御条件による差はみられず、同等の成績および受胎率であった。搬送中のIVMはチューブを用いることで輸送が容易であり、胚発生成績へのガス制御の影響は少ないと思われた。

以上のことから、今回考案した方法により受胎可能なIVF胚の安定的な作出が可能であり、OPU-IVPを活用することで効率的な子牛生産シ



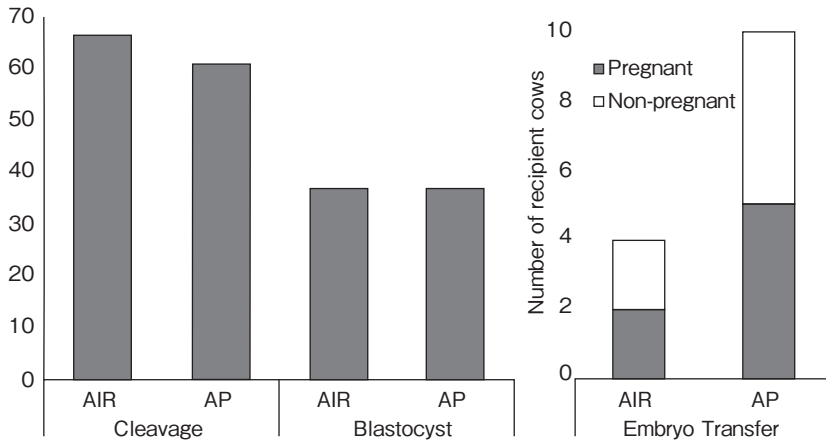


Fig. 5 Results of embryo developmental rate and embryo transfer rate on *in vitro* fertilization using oocytes collected by the ovum pick-up technique

Abbreviations : AIR, atmospheric conditions ; AP, CO<sub>2</sub> gas concentration-adjusting agent

ステムの構築が期待できる。

#### 4. 要 約

受精卵移植技術を活用した子牛の増頭を目的として、現場で生体内卵子吸引 (OPU) により卵子を採取、培養施設に輸送して体外胚を生産するステーション型牛胚生産システムの構築を目指し、体外胚生産 (IVP) について検討した。

実験 I では食肉処理場由来卵子を利用し、輸送ボックスによる体外成熟卵子の体外受精 (IVF) 成績について検討した。卵子はポリスチレン製試験管 (チューブ) にて体外成熟 (IVM) を行い、温度制御は iP-TEC 定温輸送ボックス (輸送ボックス) で実施した。ガス制御はアネロバック CO<sub>2</sub> 使用 (AP) と、アネロバックを使用しない大気条件下 (AIR) を検討した。AIR では胚盤胞率が 22 時間区で対照区と比べて有意に低い成績であったが、卵割率および胚盤胞の細胞数に差はみられ

なかった。AP では、卵割率および胚盤胞率に有意な差は認められなかった。

実験 II では黒毛和種繁殖牛 4 頭を用いて OPU を行い、輸送中のガス制御は AP 区と AIR 区について体外受精成績を検討したが胚発生成績に差はなかった。また、IVF 後 7～8 日目の胚盤胞期胚を受胎牛に移植したところ両区とも 50.0% の受胎率であった。

以上の結果から、チューブおよび輸送ボックスを用いた IVP により受胎可能な胚の安定的な作出が可能であり、OPU-IVP を活用した効率的な子牛生産システムの構築が期待できる。

#### 文 献

- 1) Sen, U. *et. al.* : Asian-Australasian Journal of Animal Science, 31, 827~834, 2018.
- 2) J. E. Swain : Reproductive BioMedicine Online, 21, 6~16, 2010.
- 3) J. E. Swain : Human Reproduction Update, 18, 333~339, 2012.

## 牛の子宮疾患や機能診断に資する子宮内バイオマーカーの検索

Investigation of uterine bio-markers for evaluation of uterine disease and function in cows

田中知己・遠藤なつ美

(東京農工大学農学部)

Tomomi Tanaka and Natsumi Endo

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

The purpose of this study was to evaluate the effects of intrauterine iodine injection on C-reactive protein (CRP) and 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2α</sub> (PGFM) concentrations in collected solution of uterine lavage, to establish a new biochemical examination for diagnosis of uterine disease and function in cows. After administration of the iodine agent, a significant increase in the polymorphonuclear leukocyte (PMN) ratio was observed in the cytological examination, indicating that local inflammation was induced by the iodine agent. Under these conditions, the uterine CRP concentration significantly increased as compared with that of the control. The present results showed that detection of CRP in the uterine lavage fluid could be a useful biochemical marker reflecting the inflammatory status of the uterus. On the other hand, the PGFM concentration did not show any specific change related to the inflammatory condition induced by iodine administration.

### 1. 目的

畜産業にとって繁殖率の向上は経営に直結する重要な要素である。近年酪農業では、分娩後の初回人工授精の前に定期繁殖検診を行って繁殖障害を早期に診断し、適切な治療処置により繁殖成績を向上させる取り組みが盛んに行われている。本研究課題は、獣医臨床における牛繁殖検診の診断精度を向上させる新たな生化学的・子宮疾患・機能診断指針を確立するための基盤的知見を得ることを目的とするものである。

子宮疾患は分娩後の乳牛に多発し、妊娠の成立を妨げる主要な原因の一つである。なかでも潜在

性子宮内膜炎は顕著な臨床症状を示さないため確定診断が困難な場合が多く、原因不明の低受胎牛と診断される症例の多くに潜在性子宮内膜炎罹患牛が含まれていることが推測されている。近年、臨床現場における超音波画像診断技術の普及により子宮画像解析に基づく子宮疾患の診断指針が提唱されつつあるものの、牛の子宮内部の炎症疾患や機能状態を診断する特殊検査技術に関しては、そのほとんどが旧来の臨床細胞学および臨床細菌学的検査法にとどまっており、より精度の高い子宮機能診断技術の確立が望まれる。一方、獣医療やヒト医療における血液生化学検査では、各種臓器の機能を評価するさまざまなバイオマーカー

が同定され、それらの血中濃度の変化が病態の推移を捉えるための貴重な臨床所見の一つとして活用されている。しかしながら、牛を含む家畜において子宮疾患や機能診断に資する生化学的検査法の検討はほとんど行われていない。現在、我々の研究室では、ヒトおよび動物の全身性炎症疾患のバイオマーカーであるC反応性タンパク質 (CRP) に着目し、牛における子宮洗浄回収液中のCRPの検出によって子宮内局所の炎症状態を評価することが可能であるという仮説を提唱している<sup>1)</sup>。

本研究では、子宮洗浄により得られる回収液を検査材料とし、我々の仮説を基に子宮内生化学検査法の確立に向けた基礎データを収集することを目的とする。具体的には、CRPの子宮内炎症マーカーとしての特異性および子宮内膜炎診断基準の設定を行い、子宮内膜機能を評価しうる新たな診断マーカーの検索を試みた。

## 2. 方 法

### 2.1 実験的子宮内炎症誘発時のCRP産生反応調査

臨床現場で多用され子宮内への刺激により炎症を引き起こすことが知られているヨード剤 (2% ポビドンヨード) を炎症誘発薬剤として使用した。分娩後40日以上を経過し、発情周期を回帰するホルスタイン種経産牛に対し黄体期にヨード剤 50ml (ヨード群,  $n = 10$ ) を子宮内に投与した。対照群には生理食塩液 50ml ( $n = 9$ ) を子宮内に投与した。投与翌日、診断的子宮洗浄の要領で、バルーンカテーテルを黄体が存在する側の子宮角に留置し、50mlの生理食塩液を注入して子宮内で還流させた後、注入した液を回収した。回収した液を遠心分離し、上清をCRP測定まで冷凍保存した。また、沈渣からは目視により細胞成分が含まれていると思われる部分を  $2 \mu\text{l}$  程度採取して塗抹染色標本を作成した。

CRP濃度は市販の測定キット (C Reactive Protein ELISA kit, CLOUD-CLONE CORP, アメリカ) を用い測定した。塗抹染色標本については、顕微鏡下で細胞の観察を行い、多形核白血球 (PMN)、リンパ球およびその他の有核細胞数を計測し、全細胞数に対するPMN割合を算出した。

### 2.2 子宮内膜機能評価マーカーの検索

子宮機能を評価する新たなバイオマーカーの候補として、本課題においては、子宮から分泌される重要なホルモンの一つであるプロスタグランジンに焦点を当て検証を行った。我々がこれまでの研究において採取した分娩後早期の乳牛における子宮洗浄回収液サンプル (分娩後3週および6週,  $n = 7$ ) および上記実験にて採取されたサンプルを活用し、プロスタグランジン代謝産物である 13,14-dihydro-15-keto-PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (PGFM) を市販の測定キット (PGFM Enzyme Immunoassay Kit, ARBOR ASSAYS, アメリカ) を用いて測定した。PGFM濃度の推移に基づき、分娩後の子宮修復過程およびヨード剤注入時における子宮内膜のプロスタグランジン分泌能を評価し、子宮内膜機能マーカーとしてのプロスタグランジン代謝産物の測定の有用性を検証した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 実験的子宮内炎症誘発時のCRP産生反応調査

ヨード剤投与前後における子宮洗浄回収液中PMN割合およびCRP濃度をTable 1にまとめた。PMN割合は、ヨード群 ( $55.4 \pm 31.8\%$ ) が対照群 ( $7.9 \pm 21.9\%$ ) に比べて有意に高かった。回収液中CRP濃度はヨード群 ( $58.7 \pm 40.7\text{ng/ml}$ ) が対照群 ( $17.2 \pm 6.0\text{ng/ml}$ ) に比べて有意に高かった。ヨード剤は、子宮内に投与することで子宮内膜に一過性の炎症を起こし、発情を誘起することが知られている。また、乳牛において黄体初期に

**Table 1** Effects of intra-uterine iodine treatment on PMN ratio and CRP concentrations in the uterine lavage fluid in cows

Groups	Cow #	PMN (%)	CRP (ng/ml)
Iodine (n=10)	1	97	12.4
	2	0	40.5
	3	65	40.6
	4	85	56.1
	5	68	36.3
	6	27	20.6
	7	37	120.0
	8	76	47.5
	9	22	77.5
	10	77	135.3
	Mean	55.4 ± 31.8*	58.7 ± 40.7*
Control (n=9)	11	0	27.0
	12	0	12.1
	13	62	16.8
	14	0	22.7
	15	0	19.4
	16	0	18.3
	17	0	13.4
	8-2	1	18.6
	9-2	—	6.8
	Mean	7.9 ± 21.9	17.2 ± 6.0

Mean ± SD

\*, p&lt;0.05 vs control

— : Less than 100 cells were detected.

Cows # 8 and 9 were assigned in iodine and control groups.

ヨード剤を子宮に投与すると、きわめて短時間のうちに粘膜上皮細胞は変性剥離を起こすが、24時間以内にすでに再生が開始され、72時間後にほぼ注入前の状態に復元される<sup>2)</sup>。今回観察されたPMN割合の増加はヨード剤の投与により子宮内膜に炎症が誘発され、炎症細胞の子宮内への遊走が促進されたことによるものと考えられる。本研究ではヨード剤を投与した翌日の子宮洗浄回収液中のCRP濃度が対照群に対して高い値を示していたことから、CRP濃度の上昇はヨード剤投与により生じた子宮内膜上皮の炎症に起因したものであると考えられる。この結果は、我々が提唱している仮説、すなわち子宮内局所の炎症過程の評価指標としての子宮洗浄回収液中のCRP濃度測定が子宮内膜機能を評価しうる新たな診断マーカーとして有用であることを示すものである。我々の先行

研究において、分娩後6週における子宮洗浄回収液中CRP濃度は、 $25.3 \pm 6.6$  ng/ml (n = 6)であることが示されており、対照群で示されたCRP濃度 ( $17.2 \pm 6.0$  ng/ml) はいくぶん低い値であった。本研究での供試牛は分娩後40日以上を経過しており、先行研究で解析された牛に比べて子宮修復がさらに進行している個体が多く含まれているためCRP濃度が低下した可能性が考えられる。これらの結果から、一般に子宮修復が完了し、分娩後の授精開始時期と言われる分娩後40日以降では、子宮内における子宮洗浄回収液中のCRP濃度は10-30ng/mlであることが示唆される。

### 3.2 子宮内膜機能評価マーカーの検索

分娩後3週および6週におけるPGFM濃度をTable 2に、対照群およびヨード群におけるPGFM濃度をTable 3に示した。PGFM濃度は分

**Table 2** PGFM concentrations in the uterine lavage fluid at 3 and 6 weeks postpartum in cows

Cows ID	Weeks postpartum	
	3	6
A	2335.8	1689.2
B	275.0	1205.4
C	4763.8	566.5
D	2120.0	444.8
E	317.4	466.8
F	90.2	201.6
G	991.7	125.9
Mean	1556.3 ± 1676.2	671.5 ± 569.1

Mean ± SD

**Table 3** Effects of intra-uterine iodine treatment on PGFM concentrations in the uterine lavage fluid in cows

Groups	Cow #	PGFM (ng/ml)
Iodine (n=10)	1	421.8
	2	75.6
	3	1536.9
	4	824.8
	5	966.1
	6	196.4
	7	442.4
	8	1185.1
	9	4020.1
	10	441.6
	Mean	1409.2 ± 1551.7
Control (n=9)	11	2869.8
	12	1448.6
	13	1643.3
	14	3637.6
	15	639.9
	16	301.7
	17	1508
	8-2	544.5
	9-2	230.8
	Mean	1424.9 ± 1178.9

Mean ± SD

Cows # 8 and 9 were assigned in iodine and control groups.

娩後3週 (1556.3 ± 1676.2pg/ml) と6週 (671.5 ± 569.1pg/ml) の間およびヨード群 (1409.2 ± 1551.7pg/ml) と対照群 (1424.9 ± 1178.9pg/ml) の間で有意差は認められなかった。また、全群においてPGFM濃度は各個体間のばらつきが大きい

ことが特徴であった。今回、牛の子宮洗浄回収液においてPGFMを検出することができた。プロスタグランジンの中で繁殖機能調節に関与するプロスタグランジンF<sub>2α</sub>は血中においてPGFMに代謝されることが知られている。今回の結果は子宮内においてもプロスタグランジンF<sub>2α</sub>が局所的にPGFMに代謝されている可能性を示すものである。また、子宮洗浄回収液中PGFM濃度は分娩後の週数およびヨード処置において群間で有意な差は認められず、このことには各個体間の濃度のばらつきが大きいことが関与していると思われる。子宮からのプロスタグランジンF<sub>2α</sub>の分泌は発情周期のステージにより変化する。ヨード剤を排卵2日以降の黄体初期および黄体開花期に注入すると、子宮内膜に一過性の炎症が起こり、その炎症の修復過程にあたる処置後3～4日に黄体退行因子が子宮内膜で産生され、それによって黄体が退行する<sup>2)</sup>。また、ヨード剤注入後の黄体退行の時期は発情周期のステージにおける処置の時期に左右されることが分かっている<sup>3)</sup>。対照群においてもPGFM濃度のばらつきが非常に大きくなっていることから、今回検出されたPGFM濃度の違いは発情周期の異なるステージで診断的子宮洗浄を行ったことが反映しているのかもしれない。牛においてプロスタグランジンF<sub>2α</sub>は発情発現の3～5日前に子宮内膜から拍動性に分泌される。今後、発情後日数が特定された牛を用いて処置を行い、さまざまな発情周期のステージにおけるPGFM濃度の変化を検討する必要があるだろう。

#### 4. 要 約

牛の子宮疾患や機能診断に資する新たな生化学的検査法の確立を目的として、ヨード剤子宮内注入が子宮洗浄回収液中CRPおよびPGFM濃度に及ぼす影響を評価した。ヨード剤投与後、有意なPMN割合の増加が認められ、ヨード剤による局

所炎症の誘発が確認された。この条件下において、回収液中CRP濃度は有意に増加した。したがって子宮洗浄回収液中のCRP濃度は子宮の炎症状態を反映する有用な生化学的炎症マーカーとなりうることが示された。一方、PGFM濃度はヨード剤投与による炎症状態と関連した特異的な変化は確認されなかった。

#### 文 献

- 1) 棚井俊介, 遠藤なつ美, 田中知己: 第161回日本獣医学会学術集会講演要旨集, p407, つくば, 2018.
- 2) 金田義弘: プロスタグランジンF<sub>2a</sub>によるウシの発情同期化, 実験生殖生理学の展開 (鈴木善祐編), 303~312, ソフトサイエンス社, 東京, 1982.
- 3) Nakahara, T., Domeki, I., Yamauchi, M.: *Nat. Inst. Anim Hlth. Quart.*, 11, 211~216, 1971.



## 豚における体表温と行動の変化に基づく分娩予測の試み

Farrowing prediction based on changes of body surface temperature and behavior in sows

檜垣 彰吾・吉岡 耕治・鈴木 千恵

(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)

Shogo Higaki, Koji Yoshioka and Chie Suzuki

(National Institute of Animal Health, NARO)

In this study, we proposed two approaches to predict farrowing using a newly developed tail-attached device equipped with a thermistor and a tri-axial accelerometer, and a commercially available low-cost video camera. In the first phase of the study, we developed algorithms to automated classification and quantification of sow postures and posture transitions by the tail-attached device. By setting appropriate thresholding values, laterally lying posture and posture transition were correctly classified with F1 score of 0.945 and 0.754, respectively. In the next experiment, we attached the tail-attached device to 10 pregnant sows and measured tail skin temperature, activity, laterally lying time, and posture transition frequency from  $9.2 \pm 2.0$  days before the expected farrowing day to  $7.3 \pm 3.1$  days post actual farrowing day. The behavior of the sows was also recorded by video camera located 1 m behind and 2 m above the maternity pen. After processing to the binary background subtracted images for analysis, the number of pixels was counted. As the results, substantial changes were revealed in means of data from the tail-attached device and background-subtracted pixel counts before farrowing. Briefly, posture transition frequency significantly increased and skin temperature and lying time tended to decrease. Background-subtracted pixel counts also increased before farrowing. At the last, we evaluated the farrowing prediction ability of three machine learning models based on tail-attached sensor data and a thresholding value for the background-subtracted pixel count. Sensitivities and precisions of the machine learning models and thresholding value for predicting farrowing within the next 24 h were as high as 100% and 90.9%, and 88.9% and 100%, respectively. These results suggest that a tail-attached device and video camera system may have the potential to achieve effective automated farrowing prediction.

### 1. 目 的

養豚の多頭飼育化は急速に進みつつあり、一農場当たりの平均飼養頭数はこの15年間で倍増して

2000頭を超えるまでに至っている<sup>1)</sup>。また、養豚従事者の高齢化と後継者不足も深刻な問題となっており、少人数で効率よく多数の豚を管理可能な技術の開発が喫緊の課題となっている。

現在、豚の分娩時期の予測は従事者の経験に頼る部分が大きく、常に適切なタイミングで分娩に立ち会うことは困難である。さらに、豚は“お産が軽い”ため、多くの農場では従事者の労力面から無看護分娩が基本となっている。しかし、子豚の体温低下や圧死、母豚の難産による損耗を低減させるには看護分娩が有効であり、看護分娩を行った場合、無看護分娩に比べ子豚の生後直死を含む死産率が10%程度低下することが知られている<sup>2)</sup>。また、近年ではダンプレッド、トピックス等の多産系統豚の導入が進んでおり、これまで以上に看護分娩の必要性が増している。したがって、精度の高い分娩予測が可能となれば、妊娠豚の見回りに要する労力が大幅に軽減されるだけでなく、難産や圧死に伴う母豚・子豚の損耗も軽減され、結果として生存子豚数の増加による生産性の向上につながることを期待できる。

そこで本研究では、省力的かつ客観的なデータに基づく分娩予測法を開発するための基礎データとして、申請者らが開発した多機能尾部センサ(体表温と加速度を測定可能)ならびに入手・設置が容易な市販のビデオカメラを用い、分娩前特異的な生理学的あるいは行動学的変化を明らかにすることを目的とした。また、それに先立ち、多機能尾部センサを用いた姿勢判別・姿勢変化検知アルゴリズムを開発するとともに、当該アルゴリズムを用いて得られたセンサデータやビデオデータを基に、分娩時期を感度・精度よく予測可能か検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 多機能尾部センサを用いた姿勢判別・姿勢変化検知アルゴリズムの作成

ストール飼育されているランドレース種(L)2頭と交雑種(ランドレース種×大ヨークシャー種:LW)2頭の計4頭(2.7±1.5歳)を供試した。

尾部センサ(幅20.0mm、長さ26.0mm、厚さ10.0mm、重さ5.4g)は専用のシリコンベルト内に封入した後、温度感知部が尾根部腹側に位置するように、また、動物の左右、上下、前後方向がそれぞれX軸、Y軸、Z軸となるように粘着テープおよび面ファスナーベルトを用いて装着した(Fig. 1)。本試験では、各軸の加速度を5 Hzで計測・データ送信できる尾部センサを用い、各個体につき約24時間連続的に測定した。また、実際の行動や姿勢の変化とセンサデータとを紐づけるため、供試豚の後方からビデオ撮影(VStarcam, C7816, 恵安株式会社)を行った。

加速度センサデータは、突発的な変化を減じるためにロール角の3分間の平均値を算出して解析に用いた。ビデオデータは、Ringgenbergらの報告<sup>3)</sup>に準じ、姿勢を横臥(laterally lying)・伏臥(ventrally lying)・犬座(sit)・起立(stand)の4種類に分類し、3分間ごとの姿勢を記録した。ビデオデータの姿勢の記録を基に、姿勢判別の感度(真陽性/[真陽性+偽陰性])、精度(真陽性/[真陽性+偽陽性])、F1スコア(2×感度×精度/[感度+精度])を算出・比較することで、ロール角の値から姿勢を判別するための至適な閾値の決定を試みた。また、連続する2時点間のロール角の差分と、その2時点間における姿勢変化の有無を比較することで、姿勢変化の検知に適した閾値の決定を試みた。

### 2.2 分娩前後における多機能尾部センサデータおよびビデオデータの採取

人工授精によって受胎した妊娠豚10頭(未經産5頭、経産5頭、2.5±1.4歳:L2頭、LW8頭)を供試した。供試豚は分娩予定日の8~13日前(9.8±1.5日)に分娩ストール(幅50cm、長さ210cm)へ移動し、センサデータおよびビデオデータを収集した。ただし、ビデオカメラの故障により、ビデオデータについては9頭分のみ採取

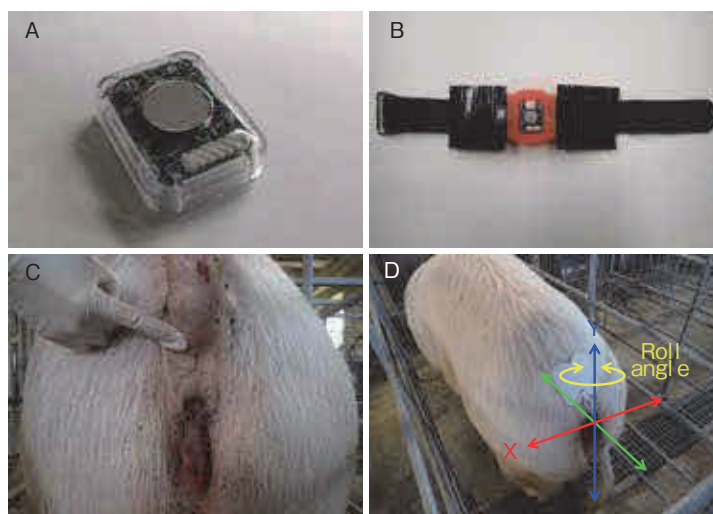


Fig. 1 Shape and usage of the tail-attached sensor

A. Shape of the tail-attached sensor. B. Attachment unit of the tail-attached sensor. C. Attaching position of the tail-attached sensor. D. Attaching direction of the tail-attached sensor.

することができた。

多機能尾部センサを用いた試験では、体表温（3分間隔で測定）、活動量（5 Hzで測定した値の5秒間における最小値の3分間の標準偏差）、ロール角（5 Hzで測定した値の3分間平均値）を計測・データ送信するようにファームウェアを変更した多機能尾部センサを用いた。分娩予定日  $9.2 \pm 2.0$  日前に供試豚の尾根部腹側に多機能尾部センサを装着し、分娩後  $7.3 \pm 3.1$  日までデータを収集した。体表温データは1時間ごとの最高値を抽出後、活動量データは1時間ごとに過去24時間における総活動量を算出後、解析に用いた。ロール角データは上記姿勢判別および姿勢変化検知アルゴリズムを適用後、1時間ごとに過去24時間における総横臥時間および総姿勢変化回数を算出し、解析に用いた。

ビデオカメラを用いた試験では、カメラを分娩ストールの後ろ約1 m、高さ約2 mの位置に設置し、妊娠豚を分娩ストールへ移動後すぐに撮影を開始した。撮影した動画は、昼間は可視光によるカラー画像、夜間はカメラ内蔵の赤外線照明によ

るグレースケール画像であり、可変フレームレート（おおむね10~25fps）であったことから、すべての動画をグレースケール化・5 fpsへの固定フレームレート化を行い、解析に用いた（Fig. 2）。動画の解析にはOpenCVライブラリ<sup>4)</sup>を用い、背景差分処理により変化部分を抽出後二値化し、そのピクセル数を算出した。得られたピクセル数データは、1時間ごとの平均値を算出後、過去24時間の合計値とし、解析に用いた。

多機能尾部センサデータおよびビデオ解析データとともに、最初の産子が娩出された時刻を0時間として、分娩168時間前から分娩121時間前の値を対照とし、分娩120時間前から分娩48時間後の各時点との比較をSteel法を用いて行った。

### 2.3 分娩予測法の開発

多機能尾部センサにより得られた体表温、活動量、横臥時間、姿勢変化回数から、分娩前の変化を表す特徴量を各3個ずつ（計12個）抽出し、分娩予測モデルの作成・評価を行った。具体的には、10頭分のセンサデータから1頭分を除外したデータを教師データとし、機械学習法（ランダム

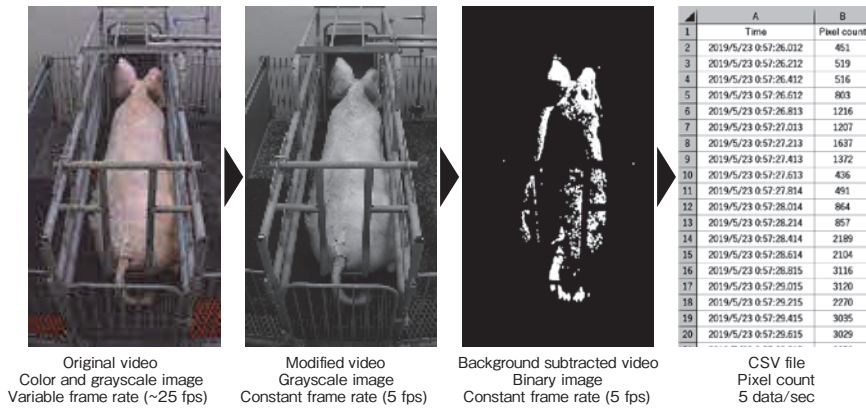


Fig. 2 Workflow of the video data analysis

フォレスト、サポートベクターマシン、ニューラルネットワーク)を用いて分娩24時間以内を予測可能なモデルを作成した。次に、除外しておいた1頭分のデータを試験データとして機械学習モデルで分娩予測を行い、これを頭数分繰り返す(Leave-one-out法)ことで、分娩予測の感度・精度・F1スコアを算出した。ビデオ解析データによる分娩予測法の開発では、さまざまな閾値を用いた際の分娩予測の感度・精度・F1スコアを算出・比較することで至適な閾値の決定を試みた。

多機能尾部センサとビデオ解析データを用いた分娩予測ではともに、分娩前24時間以内のアラートを真陽性、それ以外のアラートを偽陽性、分娩24時間以内にアラートがなかった場合を偽陰性として評価した。

### 3. 結果と考察

各姿勢時におけるロール角および姿勢変化時におけるロール角差分に対し、姿勢判別および姿勢変化検知が可能な閾値の設定を試みた結果、姿勢判別では閾値を $\pm 0.9$ とした場合、横臥を感度92.5%、精度96.7%、F1スコア0.945で判別可能であることが明らかとなった(Table 1)。また、姿勢変化検知の至適な閾値は $\pm 0.2$ であり、感度

80.8%、精度70.7%、F1スコア0.754で姿勢の変化を検知可能であることが明らかとなった(Table 2)。

分娩前後における体表温、活動量(24時間合計値)、横臥時間(24時間合計値)、姿勢変化回数(24時間合計値)の推移をFig. 3に示す。分娩前168~121時間の値(対照)に対し、統計学的に有意な差は認められなかったものの、体表温は分娩前に低下、活動量は分娩に伴い上昇傾向にあった。また、横臥時間は分娩前12時間~分娩後3時間に有意に低値を、姿勢変化回数は分娩前24時間~分娩後17時間に有意に高値を示した。ビデオデータを基に算出したピクセル数(24時間合計値)においても、分娩前14時間~分娩後31時間で有意に高い値を示した(Fig. 3)。

多機能尾部センサデータおよびビデオ解析データに基づき分娩前24時間以内を予測した結果をTable 3に示す。機械学習の手法による違いはあるものの、多機能尾部センサを用いることで、最大で感度100%、精度90.9%、F1スコア0.952で分娩前24時間以内を予測可能であることが示された。また、ビデオ解析データを用いた場合にも、適切な閾値(本試験条件下では1.41)を設定することで、最大で感度88.9%、精度100%、F1ス

**Table 1** Posture estimation efficiency based on roll angle of tri-axial accelerometer included in the tail-attached device

Threshold	Posture	True positive	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Precision (%)	F1 score
±0.9	Laterally lying	1221	42	99	92.5	96.7	0.945
	Others	610	99	42	93.6	86.0	0.896

Total number of observations was 1972 including 1320 laterally lying and 652 other postures based on the videos.

**Table 2** Posture transition detection efficiency based on residual roll angle of tri-axial accelerometer included in the tail-attached device

Threshold	True positive	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Precision (%)	F1 score
±0.2	164	68	39	80.8	70.7	0.754

Total number of posture transitions based on the videos was 203.

**Table 3** Farrowing prediction efficiency based on tail attached sensor and video recording

Data	n	Method	Algorithm	True positive	False positive	False negative	Sensitivity (%)	Precision (%)	F1 score
Tail attached sensor	10	Machine learning	Random forest	7	1	3	70.0	87.5	0.778
			Support vector machine	10	8	0	100	55.6	0.714
			Artificial neural network	10	1	0	100	90.9	0.952
Video	9	Threshold		8	1	0	88.9	100	0.941

コア0.941で分娩予測可能であることが示された。

本研究により、新規多機能尾部センサを用いることで、体表温や活動量だけでなく横臥時間や姿勢変化回数を自動的かつ連続的に評価可能な手法の開発に成功した。また、機械学習法を用いることで、分娩に先立つ体表温や行動学的な変化を検知することで、分娩予測に利用可能であることが示された。さらに、ビデオデータを用いた場合においても、適切な動画処理および閾値の設定を行うことで、分娩予測に利用可能であることが示唆された。今後、さらに多くの妊娠豚を対象とした追加試験が必要であると考えられるものの、本研究で開発した多機能尾部センサやビデオカメラを用いた分娩予測法は、客観的なデータに基づく省力的な分娩予測技術として応用が期待される。

#### 4. 要 約

多機能尾部センサに内蔵される加速度センサを用いることで、高感度・高精度に姿勢の推定ならびに姿勢変化を検知可能なアルゴリズムの作成に成功した。また、このアルゴリズムを内蔵した多機能尾部センサを用いることで、分娩に伴う体表温・活動量・臥位時間・姿勢変化回数の変化を明らかにするとともに、機械学習法を用いることで高感度・高精度に分娩前24時間を予測可能であることが示された。さらに、ビデオデータに対し、適切な動画処理および閾値の設定を行うことで、分娩予測に利用可能であることも示された。



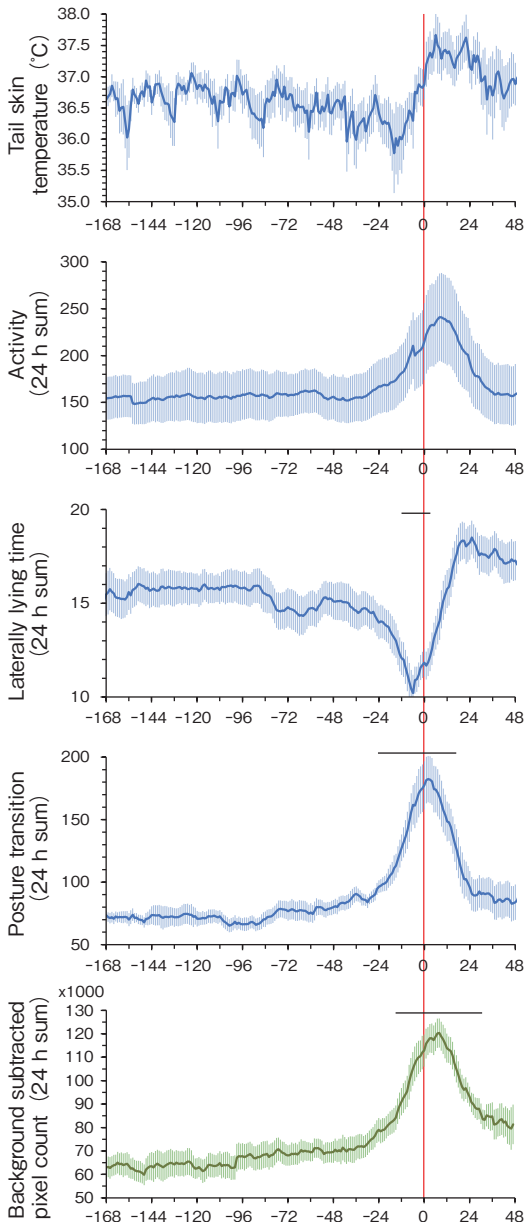


Fig. 3 Tail-attached sensor data and background-subtracted pixel count changes around farrowing. Horizontal lines indicate the periods with differences between values at the indicated time point and the average values from 168 to 121 h before farrowing ( $p < 0.05$ ). Values presented as mean  $\pm$  SD.

## 文 献

- 1) 農林水産省, 畜産統計調査/確報 平成31年畜産統計: [www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500222&tstat=000001015614&cycle=7&year=20190&month=0&tclass1=000001020206&tclass2=000001134566](http://www.e-stat.go.jp/stat-search/files?page=1&layout=datalist&toukei=00500222&tstat=000001015614&cycle=7&year=20190&month=0&tclass1=000001020206&tclass2=000001134566) (accessed : 2020 March 10)
- 2) White, K. R., Anderson, D. M., Bate, L. A. : *Canadian Journal of Animal Science*, **76**, 491~495, 1996.
- 3) Ringgenberg, N., Bergeron, R., Devillers, N. : *Applied Animal Behaviour Science*, **128**, 37~44, 2010.
- 4) OpenCV, Open Source Computer Vision Library : [www.opencv.org](http://www.opencv.org) (accessed : 2019 Aug. 11)



## 牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発

Development of predictive system of chromosomal abnormality on bovine  
in vitro fertilized embryos

杉 村 智 史

(東京農工大学大学院農学研究院)

Satoshi Sugimura

(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture)

Chromosomal abnormalities are one of the causes of low viability of bovine in vitro fertilized (IVF) embryos. This study revealed that > 50% of bovine IVF embryos that reached to blastocyst stage have chromosomal aberrations. The observed chromosomal abnormalities were segmental or mosaic aneuploidy. Interestingly, it was shown that the embryos with chromosomal abnormalities had earlier timing of the first cleavage compared with normal embryos one. Hence, it may be possible to predict non-invasive chromosomal abnormalities by using developmental kinetics as biological biomarkers.

### 1. 目 的

乳用後継牛の激減により、生乳生産量が減少している。他方、和牛繁殖農家戸数の減少により和牛素牛価格が高騰しており、その生産性拡大が急務となっている。そのため、生乳生産を行う雌牛（乳用後継牛）を計画的に確保しつつ、和牛繁殖雌牛や肥育用の和牛子牛（素牛）も増産する必要がある。これらの課題を解決する既存の方法として、乳牛に雌の性選別精液を人工授精して後継牛を生産しつつ、性選別精液を人工授精しない残りの乳牛群には和牛受精胚を移植することで和牛生産する方法が試みられている。これは、農林水産省の「酪農及び肉用生産の近代化を図るための基本方針」にも示されている。現在では受精卵移植による和子牛生産の需要の高まりから、効率的かつ安価に供給が可能な体外受精卵への期待が高

まっている。さらに世界に目を向けると生産されている受精卵の50%が体外受精卵という報告もあり、本邦でも今後は体外受精卵移植が牛生産技術の一翼を担うことが予想される。しかしながら、牛体外受精卵を移植した場合の受胎率は、30—50%にとどまっており、農家の経済的損失の一因となっている。また、国レベルでもその損失は無視できず、受胎率の向上は農林水産研究基本計画の重要目標の一つとなっている。受胎率の向上において、高品質（生育性の高い）な受精卵を確実に選別することが重要であるが、現在、受精卵の品質は国際胚移植学会（IETS）が推奨する主観的な形態観察でのみ評価されている。そのため、高受胎が期待できる受精卵を客観的かつ確実に選別できる技術の開発が渴望されている。これまでに、形態学的に良好と判断した牛IVF胚の中にも核や染色体異常を有するものが約半数で含まれて

いることを明らかにし<sup>1)</sup>、この染色体異常の有無を予測できないことが受胎率が頭打ちになっている最大の原因であることが示唆されている。したがって、この染色体異常の有無を事前に予測することができれば、受胎率の向上が期待できる。一方で、近年、ヒト生殖補助医療の分野では、次世代シーケンサー (NGS) を用いた染色体異数性解析が注目されているが、解析コストがかかるほか、瞬時に結果が得られないこと、さらに、胚の一部をマイクロマニピュレーターを用いて切除する必要があることが課題としてあげられる。そこで、本研究では、染色体異常に関連する新規パラメータをタイムラプスシネマトグラフィ (TLC) を用いて探索することで、NGSを用いることなく牛IVF胚の染色体異常を簡便かつ非侵襲的に予測可能な新技術の開発を目的とする。

## 2. 材料・方法

### 2.1 胚の培養とタイムラプス観察

食肉処理場由来卵巣から卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を採取した。COCsは5%牛血清および0.1IU/ml卵胞刺激ホルモン添加HEPES-TCM199で20–22時間培養した。その後、BO液により6時間の体外受精を行った。前核 (PN) の可視化を可能にするため、培養に先駆け、脂肪適除去を行った。サイトカラシンD添加培地に受精卵を入れ遠心し脂肪適を偏極させた後、マイクロマニピュレーターにより脂肪適を除去した。125  $\mu$ l CR1aa培養液を含むマイクロウェル個別培養ディッシュ (LinKID25, 大日本印刷) に脂肪適を除去した受精卵を入れ、タイムラプスシネマトグラフィ (TLC) 搭載インキュベーターで培養および画像所得を行った。TLC画像は15分間隔8日間撮影し、取得した。TLCでは前核の数、出現および消失のタイミング、第一卵割のタイミング、異常卵割の有無 (ダイレクトクリベージ:

1細胞から直接3–4細胞に卵割する現象)、胚盤胞出現のタイミングを解析した。

### 2.2 受精胚のコピー数多型解析

体外培養後7日もしくは8日の胚盤胞の透明帯を除去し、PVP-PBS 2  $\mu$ l を含むPCRチューブに1個ずつ入れた。SurePlex (illumina) により全ゲノム増幅 (WGA) を施した後、VeriSeq PGS kit (illumina) を用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサーMiSeq (illumina) によるシーケンシングを行った。マッピングにはbostau9を用い、CNV-seqによりCNVを予測した。

### 2.3 統計解析

統計処理はt検定もしくはカイ二乗検定により行った。p<0.05を統計学的に有意とした。

## 3. 結果・考察

### 実験1 牛IVF胚のCNV解析

胚盤胞へ到達した27検体について解析を行った。14検体 (51.9%)、計31個のCNVが性染色体以外で検出され、14番染色体において最も多くのCNVが観察された。検出されたCNVの多くが分節的なものであり、一部でモザイク染色体異数性が検出された。完全な染色体異数性は減数分裂過程で生じるのに対し、分節的もしくはモザイクの染色体異数性は体細胞分裂 (胚発生) 過程で生じることが知られている。今回の研究で、完全な染色体異数性が観察されなかったことから、胚盤胞に到達したIVF胚で生じる染色体異数性は、減数分裂ではなく胚発生過程に起因することが示唆された (Fig. 1)。

### 実験2 発生カイネティクスと染色体異常の関係

2PNを有した胚盤胞19検体を対象に解析を行った。正常胚9検体、染色体異常胚は10検体であった。前核の出現、前核の消失、前核の出現から消失まで、前核の消失から第一卵割まで、胚盤

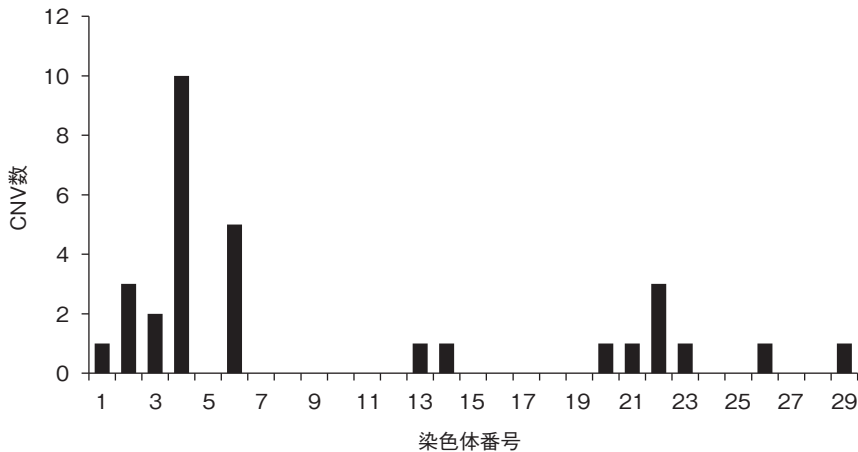


Fig.1 各染色体におけるコピー数多型 (CNV) 出現数

Table 1 染色体異常と発生カイネティクスの関係

	N	前核の出現	前核の消失	前核の出現から消失	第一卵割	前核の消失から第一卵割	胚盤胞の出現	第一卵割から胚盤胞の出現
正常胚	9	10.5 ± 0.9	25.7 ± 2.2	15.2 ± 2.0	28.7 ± 2.0a	3.0 ± 2.5	133.7 ± 12.0	105.1 ± 12.1
染色体異常胚	10	10.6 ± 0.9	24.6 ± 1.4	14.0 ± 1.5	26.3 ± 1.5b	1.7 ± 0.2	131.4 ± 7.8	105.2 ± 7.9

平均値 ± SD (時間), a, b : p < 0.05

胞の出現, 第一卵割から胚盤胞の出現までの時間, いずれにおいても, 2区間で有意差は認められなかった。一方, 第一卵割のタイミングに有意差が認められ, 染色体異常胚でそのタイミングが早かった。細胞分裂のタイミングはスピンドル形成チェックポイント (SAC) によって制御されている。これまでに, SACの阻害剤であるreversineでマウス胚を処理することで, 第一卵割のタイミングが早まり, 染色体分離異常が生じることが報告されている<sup>2)</sup>。したがって, 染色体異常を有した胚では, SACに異常が生じた結果, 第一卵割のタイミングが早まったのかもしれない (Table 1)。

#### 実験 3 前核数と染色体異常の関係

正常受精胚 (2PN) は22検体 (84.6%), 異常受精胚 (1PNもしくは3PB) の4検体 (15.4%) であった。そのうち, 1検体が1PN, 3検体が

3PNであった。染色体異常の出現頻度は有意差は認められなかったものの, 異常受精胚で高い傾向にあった。興味深いことに3PN胚でも染色体異常を有さない胚が確認された。また, 1PN胚では14および23番染色体のモザイクモノソミーが確認された。以上, 必ずしも受精異常によって染色体異常が生じわけではないが, 前核数と染色体異常の関係性が示唆された (Table 2)。

#### 4. 要 約

NGSによる牛胚の染色体異常解析技術を確立した。胚盤胞に到達した胚の多くが染色体異常を有していることが明らかになった。また, 染色体異常を有する胚で第一卵割のタイミングが早まること示された。今後は, 第一卵割速度といった発生カイネティクスを指標とすることで非侵襲的な染色体異常の予測が可能になりうる。

Table 2 染色体異常と前核数の関係

	前核数	N	染色体異常胚	頻度 (%)
正常受精	2	22	10	45.5
異常受精	1	1	1	100.0
	3	3	2	66.7
	合計	4	3	75.0

## 文 献

- 1) Yao, T., Suzuki, R., Furuta, N., Suzuki, Y., Kabe, K., Tokoro, M., Sugawara, A., Yajima, A., Nagasawa, T., Matoba, S., Yamagata, K., Sugimura, S. : Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos, *Sci Rep*, **8**, 7460, 2018.
- 2) Bolton, H., Graham, S. J. L., Van der Aa, N., Kumar, P., Theunis, K., Fernandez Gallardo, E., Voet, T., Zernicka-Goetz, M. : Mouse model of chromosome mosaicism reveals lineage-specific depletion of aneuploid cells and normal developmental potential, *Nat Commun*, **7**, 11165, 2016.

# 牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量 に関する基盤的研究（Ⅱ）

Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle（Ⅱ）

木崎 景一郎・高橋 透

（岩手大学農学部共同獣医学科）

Keiichiro Kizaki and Toru Takahashi

（Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University）

It is very important to develop a new method for early pregnancy diagnosing in cattle for consideration of cow productivity. However, a method for early and reliable diagnosis has not been established. In this study, we focused on circulating blood miRNAs and conducted basic research on its usefulness as a biomarker for pregnancy diagnosis. The results of this study revealed that the kinetics of each candidate miRNA (miR-A, B, C and D) in the blood plasma were stable throughout the estrous cycle, indicating that the measured values of the estrous cycle could be used as diagnostic threshold value around day 21 of pregnancy. On the other hand, we examined miRNA microarray analysis using plasma samples on the day 18 after artificial insemination, no miRNA whose content was different between the pregnant and non-pregnant groups could not be found. Further studies to verify the accuracy of the pregnancy diagnosis and the usefulness of the judgment on days 19 and 20 after artificial insemination are required, and the study lead to the construction of new pregnancy diagnosis technology.

## 1. 目 的

家畜における早期の妊娠診断は生産効率の向上にとって重要である。特に牛では、発情周期回帰の有無、直腸検査、ホルモン測定および超音波による診断が用いられている。しかし、これらの方法は診断手技の熟練度や牛の正常な発情周期21日を過ぎてしまう問題点もあるため、不受胎牛への次回授精の時期が遅れ、繁殖効率の低下につながっている。家畜生産性の向上を考えるうえでは、より早期の妊娠の成否判断が望まれるが、現在のところ早期に、確実に診断する方法は確立されていない。一方、分子生物学的手法を用いた診

断法、特に末梢血白血球における遺伝子発現を指標とした早期妊娠診断が提唱されているが<sup>1-3)</sup>、操作手技等の問題点もあり、必ずしも簡便な手法とは言えない。このようなことから、新たな早期妊娠診断バイオマーカーが求められている。

マイクロRNA (miRNA ; miR) は、短鎖の1本鎖RNAであり、臓器特異的な発現様式を示し、エクソソームに内包され血中に分泌されることが知られている。ヒトでは血中エクソソーム由来のmiRNAを測定することにより、各種のがんを早期発見するプロジェクトが開始されているが、miRNA発現動態情報を妊娠診断に応用し、確定できる手法はいまだ開発されていない<sup>4)</sup>。

本研究では、血中miRNAに着目した牛の早期妊娠診断法の基盤確立を目指す。具体的には、昨年度の伊藤記念財団助成研究の成果をもとに、実際の早期妊娠診断への適用を考慮した基盤的研究として、発情周期牛の血中における標的miRNAの変動を検証した。さらに、現在までに得ている標的miRNA候補は、妊娠21日齢にて受胎群および不受胎群との間で変動が認められた分子種であり、18日齢では受胎群と不受胎群間では差異は認められなかった。したがって、より早期に受胎が判別できるmiRNA分子種が求められる。そこで本研究では、18日齢においても妊娠判別が可能な新たなmiRNA分子種の探索についても実施した。

## 2. 方法

### 2.1 供試材料

人工授精後18日および21日の黒毛和種牛からEDTA・2Na採血管を用いて採血後、遠心分離して血漿を得た。授精後約30日および60日後に超音波検査により妊娠鑑定を実施し、妊娠群 (n = 3) と非妊娠群 (n = 3) とした。発情周期血液試料については、分娩後の黒毛和種牛 (n = 5) を用いて、1発情周期経過後の発情日を0日 (E0) として、発情後20日 (E20) まで一定間隔で採血した。

### 2.2 miRNA抽出と定量的リアルタイムRT-PCR

血漿試料からのmiRNA抽出にはmiRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を使用し、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (TAKARA) を用いて逆転写反応を行い、miRNAからcDNAを合成した。定量的リアルタイムPCRには、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、7300リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) により増幅反応および検出を行った。本実験では、研究代表者の昨年度の助成研究で同定したmiR-A

からDを検証した (現在論文執筆中であることから、ここでは具体名の記載はせず、AからDとした)。なお、リファレンスmiRNA (内在性コントロール) には、同様に先行研究で明らかにしたmiR-2455を使用した。

### 2.3 miRNAマイクロアレイ解析

血漿中のmiRNAの網羅的発現解析には、独自に開発したmiRBase19.0対応の牛カスタムmiRNAマイクロアレイ (アジレント社、755miRNA対応配列搭載) を用い、人工授精後18日の血漿 (妊娠群 n = 3, 非妊娠群 n = 3) から抽出したmiRNAを試料として供した。miRNAマイクロアレイ実験で得られた発現データは、GeneSpring GX (アジレント社) を使用して解析し、階層型クラスター解析はMultiple Experiment Viewer (MeV, The Institute for Genomic Research), 各試料中に含有されるmiRNA分子種の比較ではベンダイアグラム計算プログラム (Ghent University) を用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 発情周期牛の血中miRNA含有量の変動

昨年度の伊藤記念財団助成研究において同定したmiR-AからD (人工授精後21日の非妊娠群と比較し妊娠群で高値を示す) について、定量的リアルタイムRT-PCRにより発情周期中の発現動態を比較した (Fig. 1)。発情0日 (E0), 3日 (E3), 7日 (E7), 14日 (E14), 18日 (E18) および20日 (E20) の各発情日で比較したところ、発情日に高値を示す傾向にあったが、いずれのmiRNAにおいても各発情日間の統計学的な差異は認められず一定の水準で推移した。

牛の発情周期におけるホルモン動態として、プロゲステロン分泌は黄体形成期から増加が始まり、黄体開花期には高い血中濃度を示し、黄体退行期には急激に減少する。一方、エストラジオー



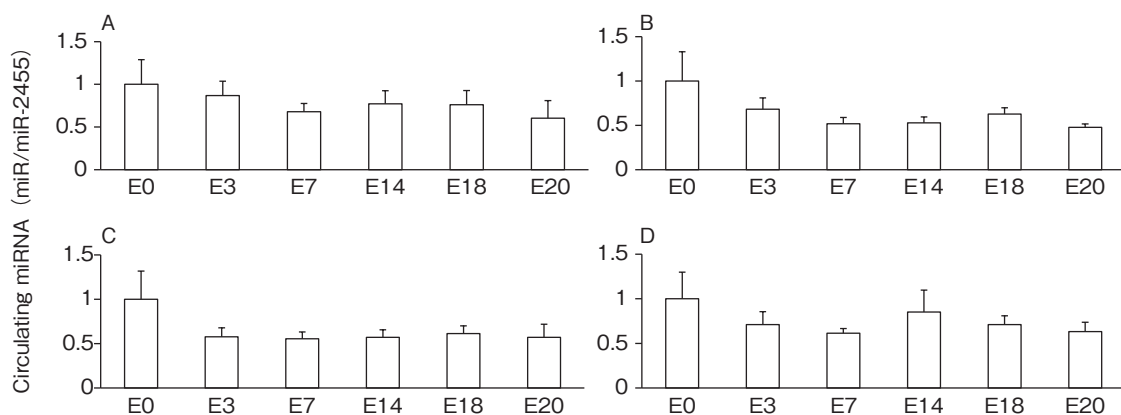


Fig. 1 Abundances of circulating miRNA during the estrous cycle.

Plasma miR-A (A), -B (B), -C (C) and -D (D) quantities were measured by quantitative RT-PCR during estrous cycle. Peripheral blood were collected from cows that displayed a normal estrous cycle throughout the cycle (detection day of estrous designated as Day 0 (E0) as detected by their behavior : E0 to E20). Data are shown as mean  $\pm$  SD.

ル分泌は卵胞期に急激に上昇して黄体形成ホルモンのサージ状分泌 (LHサージ) の誘発および黄体形成期から開花期での増加が認められる。昨年度の研究結果から、妊娠群では人工授精後18日から21日にかけて標的miRNA含有量が増加したことから、血中プロゲステロンによる制御の可能性が考えられたが、少なくとも今回検証した4つのmiRNA分子種の血中含量は、プロゲステロンやエストロゲンといった卵巣由来ステロイドホルモンによる影響を受けないことが明らかとなった。

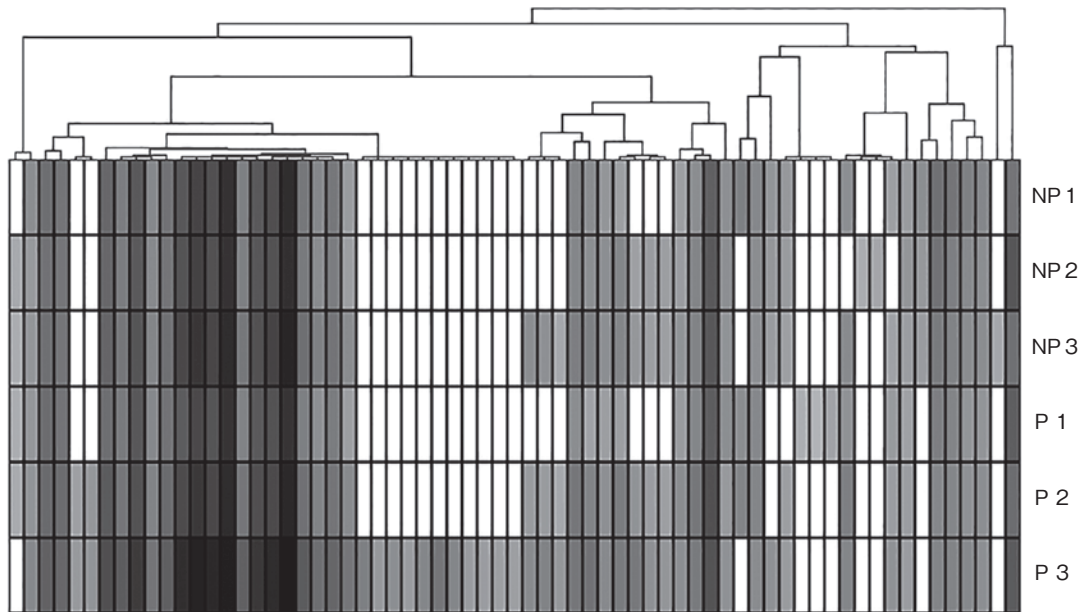
一般的に、検査値を使用した疾患や生理的状態の判定を実施する場合には、ある一定の基準値(閾値)の設定が必要となる。末梢血白血球の遺伝子発現を利用した牛の妊娠診断においては、発情周期牛の測定値が閾値として有用であることが示されている<sup>5,6)</sup>。すなわち、本研究で得られた発情周期の各miRNAの測定値が妊娠判定の基準(閾値)に使用できる可能性がある。

### 3.2 miRNAマイクロアレイを用いた血中miRNAの網羅的解析

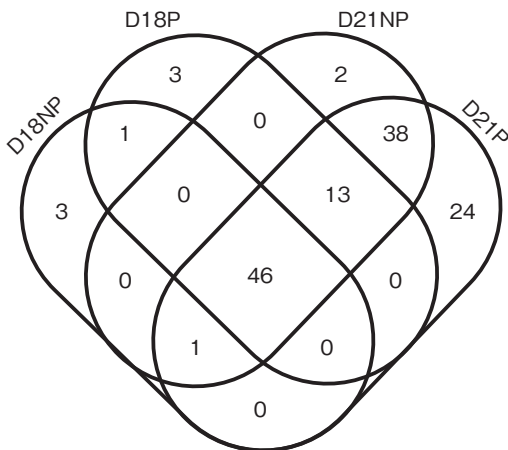
現在までに得ている標的miRNA候補は、人工授精後21日の妊娠群および非妊娠群の網羅的解析

で変動が認められた分子種であり、定量的リアルタイムRT-PCRの結果でも21日齢では有意な差異が認められたが、18日齢では妊娠群と非妊娠群間で差異はなかった。人工授精後の不受胎牛に対する効率良い次回授精の機会を得るためには、妊娠21日齢での診断では遅すぎることになる。したがって、より早期に受胎が判別できるmiRNA分子種が求められる。そこで、18日齢の妊娠群および非妊娠群の血液試料中のmiRNA含有量についてmiRNAマイクロアレイを使用して網羅的に解析し、バイオマーカーとしての新たなmiRNA分子種の抽出を試みた。

網羅的miRNA解析には、牛カスタムmiRNAマイクロアレイを用い、人工授精後18日の妊娠牛(n = 3)および非妊娠牛(n = 3)での比較を実施した。755個の牛miRNAを標的にしたマイクロアレイで検出可能であったmiRNAは、人工授精後18日の妊娠群および非妊娠群において67分子種であった(Fig. 2)。妊娠群と非妊娠群のどちらにおいても含まれているmiRNA分子種間では、その含有量に統計学的な有意差は認められなかった。人工授精後18日の妊娠群(D18P)および非



**Fig. 2** Hierarchical clustering analysis of circulating miRNA detected in pregnant (P) and non-pregnant (NP) cows. Each columns represent miRNA intensities. The gradation from gray to black in the columns indicates the intensity of each miRNA. White column, non-detected miRNA ; Gray, low ; Black, high.



**Fig. 3** Venn diagram of circulating miRNA detected in pregnant (P) and non-pregnant (NP) cows on day 18 and 21 after artificial insemination. Circulating miRNA from day 18 pregnant (D18P), day 18 non-pregnant (D18NP), day 21 pregnant (D21P) and day 21 non-pregnant (D21NP) were analyzed by miRNA microarray. Each values represent number of detected miRNA.

妊娠群 (D18NP) のいずれか一方のみで検出されるmiRNAは、D18Pでは16分子種、D18NPでは4分子種であった (**Fig. 3**)。一方、人工授精後21日の妊娠群 (D21P) および非妊娠群 (D21NP) では、D21Pで24分子種、D21NPでは2分子種だった。D18Pのみで検出された数種のmiRNA分子種について、定量的リアルタイムRT-PCRにより検証したところ、D18PとD18NP間の含有量に有意差は認められなかった (data not shown)。

以上の結果から、今回の研究では妊娠18日齢における妊娠判定のバイオマーカーとしてのmiRNAを同定することはできなかった。妊娠18日頃は受精胚が著しく伸張し、子宮内膜に着床を始める時期であることから、妊娠21日に比べると個体による差も大きく、受胎による血中miRNAの変化、変動も検出が難しい時期である可能性も

考えられた。

### 3.4 今後の展開

今後は、発情周期牛の各miRNAの測定値を閾値として、より例数を増やした解析を実施し、妊娠診断時の精度（陽性適中率、陰性適中率などの解析）を検証する。また、妊娠18日齢における網羅的解析の結果から、適切な妊娠診断バイオマーカーを見出すことはできなかったが、21日齢で有意差が認められた各miRNAについて妊娠21日齢付近（19日および20日）を中心に早期の判定が可能か否かを検討する。

## 4. 要 約

牛の生産性を考えるうえで、新たな早期妊娠診断手法の開発は非常に重要である。しかし、早期、かつ確実に診断する方法は確立されていない。本研究では血中miRNAに着目し、妊娠診断のバイオマーカーとしての有用性に関する基盤的研究を行った。本研究の結果、候補とした各miRNAの血中動態は発情周期を通して安定していることを明らかにし、発情周期の測定値が妊娠21日頃の診断基準値に利用できる可能性を示した。一方、人工授精後18日においては、妊娠群と非妊娠群間で

含有量に差異が認められるmiRNAを見出すことはできなかった。今後は、妊娠診断の精度の検証および人工授精後19日、20日での判定の有用性について検証し、新規妊娠診断技術の構築につなげたい。

## 文 献

- 1) Gifford, C. A., Racicot, K., Clark, D. S., Austin, K. J., Hansen, T. R., Lucy, M. C., Davies, C. J., Ott, T. L. : *Journal of Dairy Science*, **90**(1), 274~80, 2007.
- 2) Green, J. C., Okamura, C. S., Pooock, S. E., Lucy, M. C. : *Animal Reproduction Science*, **121**(1-2), 24~33, 2010.
- 3) Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K. : *Reproductive Biology and Endocrinology*, **11**, 6, 2013.
- 4) Wang, J., Chen, J., Sen, S. : *Journal of Cellular Physiology*, **231**(1), 25~30, 2016.
- 5) Yoshino, H., Toji, N., Sasaki, K., Koshi, K., Yamagishi, N., Takahashi, T., Ishiguro-Oonuma, T., Matsuda, H., Yamanouchi, T., Hashiyada, Y., Imai, K., Izaike, Y., Kizaki, K., Hashizume, K. : *Theriogenology*, **107**, 188~193, 2018.
- 6) Yoshino, H., Kizaki, K., Iga, K., Hirata, T. I., Matsuda, H., Yamanouchi, T., Hashiyada, Y., Toji, N., Ishiguro-Oonuma, T., Takahashi, T., Hashizume, K. : *Animal Reproduction Science*, **214**, 106283, 2020.

## 暑熱ストレスによる牛子宮内膜内分泌機能攪乱への 温度感受性チャンネルの関与

Involvement of temperature sensing channels in disorder of endocrine  
function of bovine endometrium by heat stress

木村 康二

(岡山大学大学院環境生命科学研究科)

Koji Kimura

(Graduate School of Environmental and Life Science, Okayama University)

Recently, the global warming makes a big impact on the livestock industry. Especially, pregnancy rate in cattle dramatically decreases during the summer season. It is known that attenuation of endometrial secretion of *PGF2 $\alpha$*  is necessary for establishment of pregnancy in ruminant species, resulting in maintaining of corpus luteum (CL). However, our previous study showed that heat stress (HS) enhances the secretion of both *PGF2 $\alpha$*  and PGE2 (PGs) in cultured bovine endometrial cells, although the underlying mechanisms of this effect have not been manifested. Cells can sense various environmental stimuli. Transient receptor potential (TRP) channels are ion channels and some of which are involved in temperature sensing of the cell. The present study investigated the role of temperature sensing via TRP channel on the secretion of PGs from bovine endometrial cells.

Firstly, the location of TRP channels (TRPV3, V4, and M2, sensitive to bovine body temperature) in bovine endometrium was examined by immunohistochemistry. Uterine horns ipsilateral to CL at late luteal stage (day 14-17) were fixed and sliced. Each section was immunostained with antibodies against TRPV3, TRPV4, or TRPM2. While TRPV3 was not clearly observed, TRPV4 was slightly detected in luminal epithelial cells. TRPM2 was observed in each region of the uterine tissues, especially in luminal and glandular epithelial cells, which presented stronger signals than stromal cells, myometrium, and endothelial cells.

Next, the effect of inhibition of TRP channels on the production of PGs from endometrial cells under HS was investigated. Endometrial stromal cells were cultured in the presence of each of the antagonists for TRPV3, V4, and M2 (TRPV3 : Icilin, TRPV4 : HC-067047, TRPM2 : 2-APB, respectively) for 34 hours at 38.5 °C (control) or 40.5 °C (HS). After incubation, the concentrations of PGs in the culture media were measured. TRPV3 or TRPV4 antagonists did not affect the enhancement of PGs secretion by HS. Meanwhile, TRPM2 antagonist significantly inhibited the secretion of PGs ( $p < 0.05$ ) under HS.

Temperature-sensing TRP channels were located on the bovine uterine endometrium and TRPM2 might be involved in the increase of PG production of endometrial stromal cells under HS.

## 1. 目 的

肉用牛において子畜の効率的生産は、繁殖農家の経営のみならず、安定的な肥育素牛供給を通して肥育農家にも大きく影響を及ぼしている。ところが近年、我が国の牛の受胎率は低下の一途をたどり、20年前には7割あった人工授精における受胎率が現在は4~5割にまで低下している。この牛の低受胎は現在最も喫緊に解決すべき問題の一つとして捉えられているものの、具体的な解決手段はいまだに得られていない。さらに近年の地球温暖化はこの状況に拍車をかけている。夏季の暑熱環境下において、牛の生殖器官内の温度は40℃以上まで上昇するとされており、この暑熱ストレスによる内分泌機能の攪乱や、卵子の品質の低下が夏季の受胎率の低下を助長していると考えられている。事実、我が国において、夏季の受胎率低下は著しく、子牛生産に多大な影響を及ぼしている。しかしながら、その詳細なメカニズムは定かでなく、牛舎環境の改善やミスト散布などの一時的な対処しか実施されておらず、抜本的な解決に至っていない。

本申請課題では、妊娠の場である、牛の子宮内膜、特にその内分泌機能に着目し、夏季の暑熱ストレスによりその機能攪乱が生じるメカニズムを明らかにすることによって、牛暑熱環境下における受胎率向上をもたらす技術開発の基礎的知見を得ることを目的とする。

## 2. 方 法

実験1 牛子宮内膜組織における温度感受性TRPチャンネルの局在

食肉センター由来牛子宮より子宮内膜を採取し、4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋し、切片を作製した。これに牛体温付近で機能するTRPV3, TRPV4, TRPM2抗体

を4℃で一晩反応させ、さらに2次抗体処理を行った後、蛍光顕微鏡で観察した。

実験2 牛子宮内膜細胞における温度感受性TRPチャンネル阻害剤による暑熱環境下でのPG分泌の変化

これまでの研究の中で暑熱ストレス処理(40.5℃)すると子宮内膜細胞においてプロスタグランジン(PG)分泌が上昇することが明らかとなっている<sup>1)</sup>。本実験では上述の1で検討したTRPのチャンネル阻害剤を添加し、暑熱条件下でのPG分泌の変化について検討した。食肉センター由来の子宮から子宮内膜間質細胞をSakaiらの方法で単離し、暑熱環境下(40.5℃)、TRPチャンネル阻害剤(V3: icilin, V4: HC-06704, M2: 2-APB)存在・非存在状態で培養した。34時間後培養上清を回収し、その中のPG(PGE2およびPGF2 $\alpha$ )濃度を酵素免疫測定法(EIA)により測定した。

実験3 牛子宮内膜細胞における温度感受性TRPチャンネルアゴニストのプロスタグランジン分泌への影響

暑熱環境下における子宮内膜細胞からのプロスタグランジン分泌に温度感受性TRPチャンネルが関与していることをさらに確認するために本実験を実施した。実験1および2の結果からTRPM2のアゴニスト(Salicyl-AMS)を牛正常体温下(38.5℃)で牛子宮内膜間質細胞に添加・48時間培養し、PG分泌が暑熱環境と同様に上昇するかについて検討した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 結 果

実験1 牛子宮内膜組織における温度感受性TRPチャンネルの局在

牛子宮内膜組織におけるTRPチャンネルのタンパク質発現をFig. 1に示した。TRPV3のタンパ



ク質局在は子宮内膜内腔上皮・間質層で強く確認された (Fig. 1A)。一方, TRPV4は子宮内膜において明確な存在が確認できなかった (Fig. 1B)。それに対し, TRPM2は子宮内膜内腔上皮, 間質層, 血管内皮, および腺上皮すべてにおいて局在が確認され, なかでも内腔上皮・腺上皮で発現が強く見られた (Fig. 1C)。

実験2 牛子宮内膜細胞における温度感受性TRPチャンネル阻害剤による暑熱環境下でのプロスタグランジン分泌の変化  
暑熱環境下における各種TRPアンタゴニスト添加によるPG分泌量の変化をFig. 2に示した。

TRPV3およびTRPV4アンタゴニストの添加は牛子宮内膜間質細胞からのPGE2およびPGF2 $\alpha$ 産生に影響を与えず, 暑熱ストレスによって有意に増加した (Fig. 2A, B, C, D:  $p < 0.05$ )。

一方, 暑熱環境下におけるTRPM2アンタゴニスト添加において, HS環境下で牛子宮内膜間質細胞からのPGE2, PGF2 $\alpha$ 分泌を濃度依存的に有意に減少させたが, 常温区では濃度に有意な変化はなかった (Fig. 2E, F:  $p < 0.05$ )。さらに, 0, 10, 50nMの添加区において, HSはPGE2およびPGF2 $\alpha$ 濃度を有意に増加させたが, 100nM添加区では常温区とHS区に有意な差はなかった (Fig.

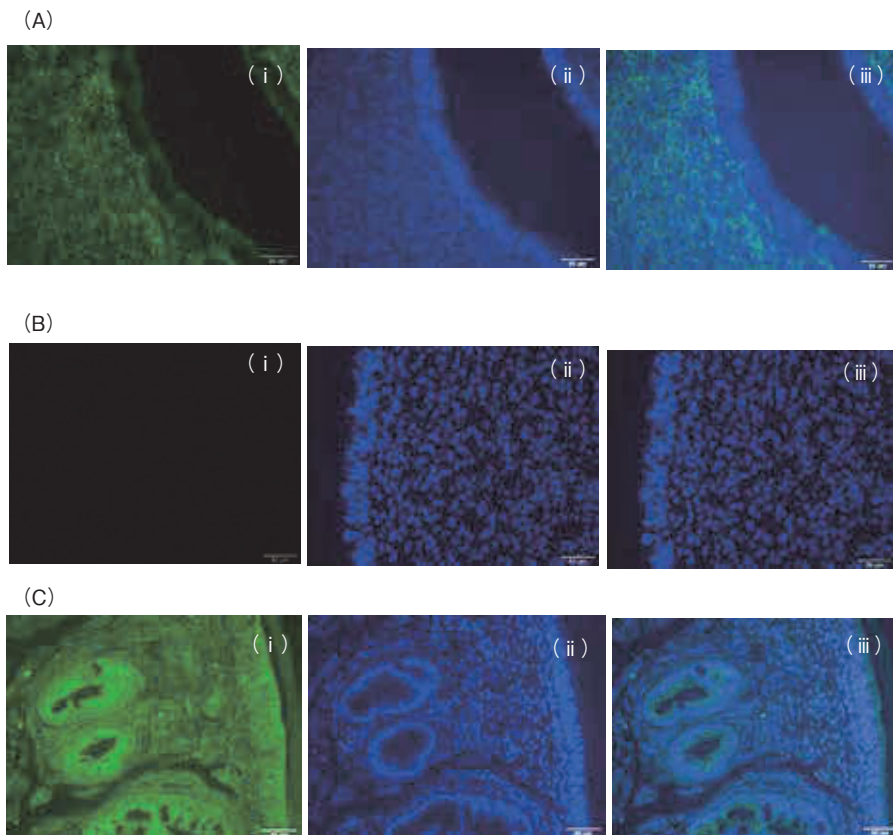
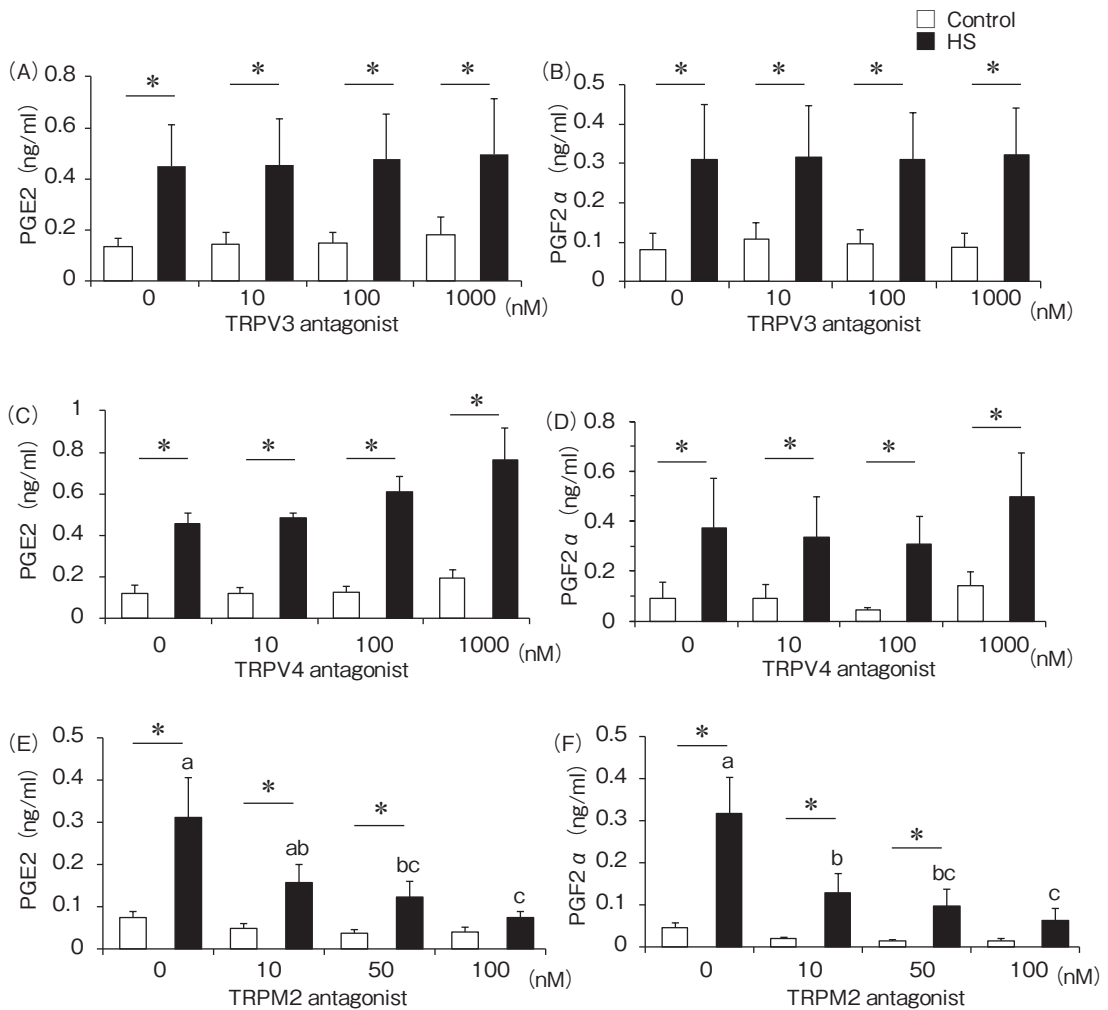


Fig. 1 Representative images for protein localization of TRPV3, TRPV4, and TRPM2 in bovine endometrium in the middle luteal stages by immunohistochemistry ( $n = 3$ ). Immunohistochemistry for (A) TRPV3, (B) TRPV4, and (C) TRPM2. (i) TRPV3, V4, or TRPM2 (green) signal. (ii) DAPI (blue) signal. (iii) the merged images of TRPV3, TRPV4, or TRPM2 and DAPI (i and ii). TRPV3, V4, M2 were visualized by Alexa 488 (green). Cell nuclei were counter-stained with DAPI (blue). Bars indicate 50  $\mu$  m (A, B, and C).





**Fig. 2** The effect of TRP channel antagonists (TRPV3 antagonist : A and B, TRPV4 antagonist : C and D, TRPM2 antagonist : E and F) on PGs secretion in endometrial stromal cells (mean  $\pm$  SEM) under HS (TRPV3 and TRPV4 :  $n=5$ , TRPM2 :  $n=11$ ). Black and white bars indicate 40.5°C (HS) and 38.5°C (control), respectively. Different superscripts (a, b, and c are compared among HS and x, y, and z are compared among control) and asterisks (compared between HS and control on the same concentration of the antagonists) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ), as determined by Tukey's multiple range test following one way ANOVA, or Student's t-test, respectively.

2E, F :  $p < 0.05$ ).

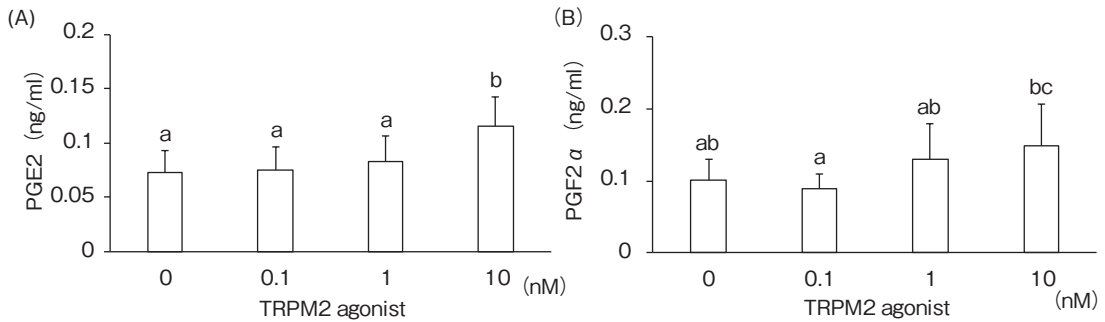
実験3 牛子宮内膜細胞における温度感受性 TRPチャンネルアゴニストのプロスタグランジン分泌への影響

暑熱環境下における TRPM2 agonist 添加による PG 分泌量の変化を Fig. 3 に示した。常温区において TRPM2 agonist を 10nM 添加した場合、0 nM, 0.1nM, 1nM 添加区と比べ PGE2 濃度は有意

に増加した (Fig. 3A :  $p < 0.05$ )。PGF2 $\alpha$  においても TRPM2 アゴニストを 10nM 添加した場合、0.1nM 添加した場合と比べ、PGF2 $\alpha$  分泌量は有意に増加した (Fig. 3B :  $p < 0.05$ )。

### 3.2 考察

本研究において、牛子宮内膜に温度感受性 TRP チャンネルが存在すること、また、TRP チャンネルが HS 環境下での PG 産生に関与していること



**Fig. 3** The effect of TRPM2 agonist on PGs secretion in endometrial stromal cells (mean  $\pm$  SEM,  $n = 8$ ). Different superscripts (a, b, and c) indicate significant differences ( $p < 0.05$ ) as determined by Tukey's multiple range test following one way ANOVA.

が示唆された。

通常、牛の腔内温度は38.0~39.0°Cであり、夏季にHS環境下になると40.5°Cにまで達するため<sup>2)</sup>、子宮内も同程度の温度まで上昇すると考えられる。細胞が温度を感知するセンサーとしてTRPチャンネルが知られており<sup>3)</sup>、いくつかの動物種ではTRPチャンネルの活性化温度閾値も報告されているが<sup>4)</sup>、牛においてTRPチャンネルの温度域は今までに報告されていない。そのため、本研究ではヒトのTRPチャンネル温度域を代用した。ヒトにおいてTRPV3, V4, M2が牛の腔内温度付近で開閉すると報告されているため<sup>4)</sup>、本研究ではTRPV3, V4, M2に着目し、牛子宮内膜におけるこれらの局在を免疫組織化学にて検討した。実験1の免疫組織化学において、牛子宮内膜でのTRPV4の局在は確認されなかったが、TRPV3, TRPM2の局在は確認された (**Fig. 1**)。このため、牛においてTRPV3, M2は子宮内の温度センサーとして機能する可能性が示された。

次にTRPV3, V4アンタゴニストを添加し、牛子宮内膜間質細胞におけるHS環境下でのPG産生への影響を検討した。TRPV4アンタゴニストを添加した際、HS環境下でのPG分泌増加は抑制されなかった (**Fig. 2**)。さらに実験1の免疫組織化学の結果においてTRPV4の局在が確認できな

かったことから、TRPV4は牛子宮内膜には発現しておらず、PG産生に関与しないと考えられる。また、本実験において牛子宮内膜でTRPV3の局在が観察されたにも関わらず、TRPV3アンタゴニストはHS環境下におけるPG分泌増加を抑制しなかった (**Fig. 2**)。鶏やマウスなど他の動物種においてTRPチャンネルの温度域が異なることは報告されており<sup>4)</sup>、牛とヒトではTRPV3の温度域が異なり、牛においてTRPV3は体温付近の温度で機能しない可能性が考えられる。

TRPM2アンタゴニスト (2-APB) は、HS環境下におけるPG濃度を有意に抑制し (**Fig. 2**)、TRPM2アゴニストは38.5°CにおいてもPG濃度を有意に増加させた (**Fig. 3**)。これらの結果より、TRPM2の開閉がPG産生に関連していることが示唆された。また、PG合成は細胞内のCa<sup>2+</sup>濃度上昇によって産生が刺激され<sup>5)</sup>、TRPM2はCa<sup>2+</sup>の細胞外から細胞内流入に関与することが報告されている<sup>6,7)</sup>。以上から、HSによってTRPM2を介して細胞内へのCa<sup>2+</sup>流入が増加しPG分泌量が増加した可能性が考えられる。

本研究から、HS環境下において牛子宮内膜はTRPM2により温度を感知し、内分泌機能に影響を与える可能性が示唆された。牛子宮内膜のPG分泌の異常は夏季の受胎率低下に関与することが

示唆されているため<sup>8)</sup>、今後TRPM2とPG産生の関係についてさらなる研究を進めることができれば、牛の夏季受胎率の向上に貢献できるかもしれない。

#### 4. 要 約

地球温暖化に伴い夏季の牛受胎率の低下が問題視されており、暑熱ストレスによる生殖系内分泌の異常がその一因として考えられている。培養牛子宮内膜間質細胞においてHSがプロスタグランジン (PG) 分泌を促進することが報告されているが、その詳細なメカニズムは明らかにされていない。細胞の温度感受システムとしてTransient Receptor Potential (TRP) チャンネルの関与が報告されている。TRPチャンネルは細胞膜に存在する非選択的なカオチンチャンネルであり、その中でもヒトでは体温付近でTRPV3, V4, M2が機能することが明らかとなっている。本研究では牛子宮内膜においてHS環境下でのPG産生に対するTRPV3, V4, M2の関与について検証した。

牛子宮内膜組織において、TRPV3, V4, およびM2の局在を免疫組織化学により検討するとともに、牛培養子宮内膜間質細胞にTRPV3, V4, M2のアンタゴニストまたはM2アゴニストを添加して40.5℃もしくは38.5℃で34時間培養し、培養上清中のPG濃度をEIAにより測定した。

TRPV3は牛子宮内膜内腔上皮細胞、間質細胞のみで検出されたが、TRPV4は牛子宮内膜において明瞭な発現は観察されなかった。TRPM2は

牛子宮内膜組織の全域に存在し、特に内腔上皮細胞および腺上皮細胞では、間質細胞、子宮筋層、血管内皮細胞よりも強いシグナルが検出された。子宮内膜間質細胞におけるPG産生はHSによって有意に増加するが、TRPV3, V4アンタゴニスト添加はこの増加を抑制しなかった。一方、TRPM2アンタゴニスト添加はHSによるPG分泌増加を有意に抑制した ( $p < 0.05$ )。また、TRPM2アゴニスト添加はPG分泌を有意に増加させた ( $p < 0.05$ )。以上の結果より、温度感受性TRPチャンネルは牛子宮内膜に存在し、その中でも特にTRPM2がHSによる牛子宮内膜間質細胞からのPG分泌上昇に関与する可能性が示された。

#### 文 献

- 1) Sakai, S., Hagihara, N., Kuse, M., Kimura, K., Okuda, K. : *J Reprod Dev*, **64**, 311~317, 2018.
- 2) Sakatani, M., Balboula, A. Z., Yamanaka, K., Takahashi, M. : *Anim Sci J*, **83**, 394~402, 2012.
- 3) Huang, J., Zhang, X., McNaughton, P. A. : *Semin Cell Dev Biol*, **17**, 638~45, 2006.
- 4) Hoffstaetter, L. J., Bagriantsev, S. N., Gracheva, E. O. : *Pflugers Arch*, **470**, 745~759, 2018.
- 5) Asselin, E., Drolet, P., Fortier, M. A. : *Endocrinology*, **138**, 4798~4805, 1997.
- 6) Sullivan, M. N., Earley, S. : *Am J Physiol Cell Physiol*, **305**, C999~C1008, 2013.
- 7) Burns, P. D., Hayes, S. H., Silvia, W. J. : *Domest Anim Endocrinol*, **15**, 477~487, 1998.
- 8) Scenna, F. N., Edwards, J. L., Rohrbach, N. R., Hockett, ME., Saxton, A. M., Schrick, F. N. : *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, **73**, 215~226, 2004.

## 黒毛和種体外受精卵のゲノム選抜技術確立に向けた 割球分離卵凍結保存法の開発

Development of cryopreservation method for bovine demi-blastocysts produced by blastomere separation technique for establishment of preimplantation genomic selection system using *in vitro* fertilized embryos

藤井 貴志

(北海道立総合研究機構畜産試験場)

Takashi Fujii

(Animal Research Center, Hokkaido Research Organization)

Preimplantation genomic selection (PGS) using genomic estimated breeding values based on single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes is expected to accelerate genetic improvement in cattle. Recently, we developed PGS system using *in vivo*-derived embryos in Japanese Black cattle. On the other hand, PGS combined with ovum-pick up-*in vitro* fertilization (OPU-IVF) technology enables cattle genetic improvement to more efficient. However, IVF embryo is sensitive to biopsy using microblade to obtain DNA sample for SNP genotyping, and fertility of biopsied and cryopreserved IVF embryo is extremely low. In this study, therefore, we focused on blastomere separation technique and examined optimal cryopreservation method for bovine separated demi-blastocyst for establishment of PGS system using IVF embryos. In Experiment 1, *in vitro* development of separated blastomeres in well of the well culture dish was examined. The production rates of monozygotic pair blastocysts and pair of blastocyst and embryo developed to 16-cell  $\leq$  were 67.7% and 72.9%, respectively. In Experiment 2, effect of equilibrium time on viability of demi-blastocysts after vitrification-warming was investigated. Demi-blastocysts vitrified by placing them in equilibrium solution containing 7.5% ethylene glycol (EG), 7.5% dimethyl sulfoxide (DMSO), and 20% calf serum (CS) for 2.5 min and vitrification solution containing 15% EG, 15% DMSO, 0.5M sucrose, and 20% CS for 50 sec showed highest viability after warming. In Experiment 3, 6 demi-blastocysts were vitrified based on Experiment 2, and transferred to recipient cows. The conception rate at day 37 of gestation was 50% (3/6). No abortions were observed in any of the pregnant cows until at day 65 of gestation. These results suggest that blastomere separation technique may contribute to practical application of PGS system in bovine IVF embryos.

### 1. 目的

良質な黒毛和種牛肉を安定生産するためには、

雄牛および雌牛両側からの改良を不断に行う必要がある。近年、黒毛和種の育種改良では、DNA上の一塩基多型 (SNP) 情報から各個体の

遺伝的能力(産肉能力)を直接推定するゲノム育種価評価が確立され、育種改良速度を高める手法として活用されている<sup>1,2)</sup>。さらに最近我々は、黒毛和種体内受精卵から一部の細胞を切断採取してSNP解析とゲノム育種価評価を行い、胚移植により高能力個体を選択的に生産する着床前ゲノム選抜技術を開発した<sup>3)</sup>。この着床前ゲノム選抜技術の活用により、黒毛和種改良のさらなる効率化が期待されている。

一方、これまでの牛胚生産方法の主流は、過剰排卵処理を施した供卵牛から体内受精胚を得る方法であったが、近年その効率性から、経膈採卵-体外受精技術(OPU-IVF)を用いたIVF胚生産にシフトしている<sup>4)</sup>。OPU-IVF技術と着床前ゲノム選抜技術を融合することで、黒毛和種改良のさらなるスピードアップと効率化が可能になると考えられる。しかし、IVF胚は、ゲノム育種価評価に必要な細胞の切断採取といったダメージに弱く、凍結保存・移植後の受胎率が低い。そのため、IVF胚を用いた着床前ゲノム選抜技術の実用化は現状困難と考えられる。

割球分離技術は、2-8細胞期胚の割球を分離・再構築して一卵性双子胚/子牛を生産する技術であり<sup>5)</sup>、効率的な種雄牛造成などに活用されてきた<sup>6)</sup>。割球分離技術を利用し、一卵性双子胚の片方をゲノム育種価評価用試料、残りの片方を移植胚とすることで、細胞の切断採取によるダメージとそれに伴う凍結保存・移植後の受胎性低下を回避でき、IVF胚を用いた着床前ゲノム選抜技術を実用化できる可能性がある。また、ゲノム育種価評価のために胚から一部の細胞を切断採取するには、マイクロマニピュレーター等の高価な機材と熟練した技術が必要であるが、割球分離技術ではそれらの必要がなく、着床前ゲノム選抜技術の活用幅を広げることが期待できる。一方、SNP解析には少なくとも数日から数週間の期間を

要するため、割球分離胚を一定期間保存する必要があるが、割球分離胚に適した保存法は確立されていない。

そこで本研究では、IVF胚を用いた着床前ゲノム選抜技術の開発を目的に、割球分離技術により作出した胚盤胞期胚に適したガラス化保存条件について検討し、ガラス化保存した割球分離胚の移植後の受胎性を調査した。

## 2. 方法

### 2.1 体外受精胚の作出

食肉処理場由来の牛卵巢から未成熟卵子を吸引採取し、IVMD101培地(機能性ペプチド研究所)で22時間培養することで体外成熟(IVM)卵子を得た。凍結融解精子を遠心洗浄後、最終精子濃度が $5 \times 10^6$ /mlとなるようIVF100培地(機能性ペプチド研究所)を用いて希釈し、IVM卵子を6時間媒精することでIVF胚を得た。媒精後のIVF胚は、ピペッティングにより卵丘細胞を除去し、BO-IVC培地(IVF Bioscience)で体外発生培養(IVC)を行った。IVMおよびIVFは $38.5^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{CO}_2$ 、IVCは $38.5^{\circ}\text{C} \cdot 5\% \text{O}_2 \cdot 5\% \text{CO}_2$ の気相条件下で行った。

### 2.2 割球分離

媒精開始後24~27時間目に均等分割しフラグメントのない2細胞期胚を供試した。0.5%プロナーゼ(Sigma)を含むmPBS中で2細胞期胚の透明帯を溶解し、その後BO-IVC培地に移して約15分間静置後、ピペッティングにより割球を分離した。分離割球は、個別管理培養ディッシュ(LinKIDmicro25, 大日本印刷株式会社)を用いて、BO-IVC培地内で6日間IVCを行った。割球分離処理をしない2細胞期胚についても、分離割球と同様にIVCを行い、対照区とした。

### 2.3 割球分離胚のガラス化保存

割球分離により作出した胚盤胞期胚を7.5%エ



チレングリコール (EG, Wako), 7.5%ジメチルスルホキシド (DMSO, Wako) および20%子牛血清 (CS, Gibco) を含むTCM199培地 (Gibco) (平衡液) に浸漬した後, 15%EG, 15%DMSO, 0.5Mスクロースおよび20%CSを含むTCM199培地 (ガラス化液) に浸漬して平衡処理を行った。平衡液/ガラス化液での平衡時間が, それぞれ3分/60秒, 2.5分/50秒, 2分/40秒および1.5分/30秒となるように試験区を設定した。平衡処理後の胚は, 微量 (< 1  $\mu$ l) のガラス化液とともにクライオトップ (北里コーポレーション) 上に乗せ, 液体窒素中に直接浸漬してガラス化した。ガラス化保存した割球分離胚の加温は, 37°Cの0.2Mスクロースおよび20%CSを含むPBS中に3分間浸漬することで行った。

#### 2.4 ガラス化保存した割球分離胚の生存性評価

ガラス化-加温後の割球分離胚を, BO-IVC培地内にて38.5°C・5%O<sub>2</sub>・5%CO<sub>2</sub>の気相条件下で24時間培養し, 実体顕微鏡下で再拡張率 (生存率) を評価した。また, 総細胞数および死細胞率を評価した。死細胞核の染色は, LIVE/DEAD Cell Imaging Kit (488/570) (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。死細胞核染色後, 胚を5  $\mu$ g/mlのHoechst33342 (Sigma) を含むエタノールに浸漬し, 4°Cで一晩静置することで総細胞核の染色を行った。蛍光顕微鏡 (Nikon E800) を用いて各胚の写真撮影を行い, Image Jソフトの細胞カウントツールを用いて総細胞数および死細胞数を測定し, 各胚における死細胞率 (死細胞数/総細胞数×100) を算出した。

#### 2.5 胚移植

受胎牛にはアングス種牛を用い, 膈内留置型プロジェステロン製剤 (CIDR1900, ファイザー) およびプロスタグランジンF 2  $\alpha$  類縁体製剤 (レジプロン-C, あすかアニマルヘルス株式会社)

により発情同期化した。ガラス化保存した割球分離胚は, 加温後にBO-IVC培地で3時間培養し, 発情発現後8日目の受胎牛に1胚移植した。胚移植にはYTガン (ヤマネテック) を用いた。受胎牛の妊娠診断は, 受胎牛の発情発現後37日目および65日目に, 超音波画像診断装置を用いて胎児の有無と心拍を確認することにより行った。

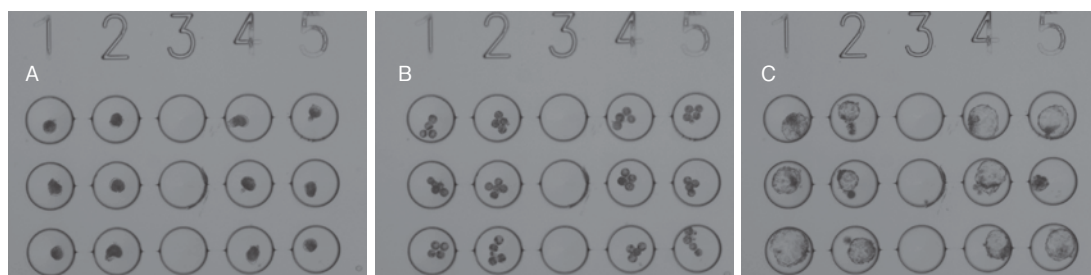
### 3. 結果と考察

#### 3.1 割球分離胚の初期発生

計96個の2細胞期胚から, 192個の分離割球を作出した。割球分離後24時間目における再分割率および1対の分離割球の双方が再分割するペア再分割率は, それぞれ91.7% (176/192個) および84.4% (81/96組) であった。IVF後7日目における胚盤胞期への発生率および1対の分離割球の双方が胚盤胞期へと発生するペア胚盤胞発生率は, それぞれ78.1% (150/192個) および67.7% (65/96組) であった。また, 割球分離胚の片方が胚盤胞期へ発生し, もう片方がSNP解析可能な16細胞期以上の胚へ発生した割合は72.9% (70/96組) であった。対照区 (割球分離処理なし) における胚盤胞発生率は81.4% (79/97個) であり, 割球分離区 (78.1%) と比較して有意差はなかった。

本研究における割球分離胚の胚盤胞発生率およびペア胚盤胞発生率は, 既報<sup>6)</sup>と比較して高い値であった。この要因として, 本研究では均等分割しかつフラグメントのまったくない2細胞期胚のみを実験に供試したことや, IVM・IVF・IVC系の違い等が考えられる。本研究より, 個別管理培養ディッシュを用いることで割球分離胚を効率よく胚盤胞期へ発生させることができ (Fig. 1), 約70%の1対の割球分離胚について, 片方を胚移植に, もう片方をSNP解析用試料に供試できることを確認した。





**Fig. 1** Production of monozygotic twin blastocysts by blastomere separation in well of the well culture dish.  
 A : Separated blastomeres obtained from two-cell embryos (27 h post IVF)  
 B : Re-cleaved blastomeres at 48 h post IVF. C : Separated demi-blastocysts at 168 h post IVF.

**Table 1** Effect of equilibrium time on viability of separated demi-blastocysts after vitrification-warming.

Experimental Group	Equilibrium time		No. of embryos	No (%) of viable* embryos
	Equilibrium sol (min)	Vitrification sol (sec)		
Blastomeres separation	3	60	20	18 (90) <sup>ab</sup>
	2.5	50	20	19 (95) <sup>ab</sup>
	2	40	20	18 (90) <sup>ab</sup>
	1.5	30	20	14 (70) <sup>b</sup>
Control	3	60	20	20 (100) <sup>a</sup>

\*Re-expanded blastocyst after 24 h culture post warming.

Experiment were replicated six times.

Equilibrium sol : TCM-199 containing 7.5%EG, 7.5%DMSO, and 20% calf serum

Vitrification sol : TCM-199 containing 15%EG, 15% DMSO, 0.5M sucrose, and 20% calf serum

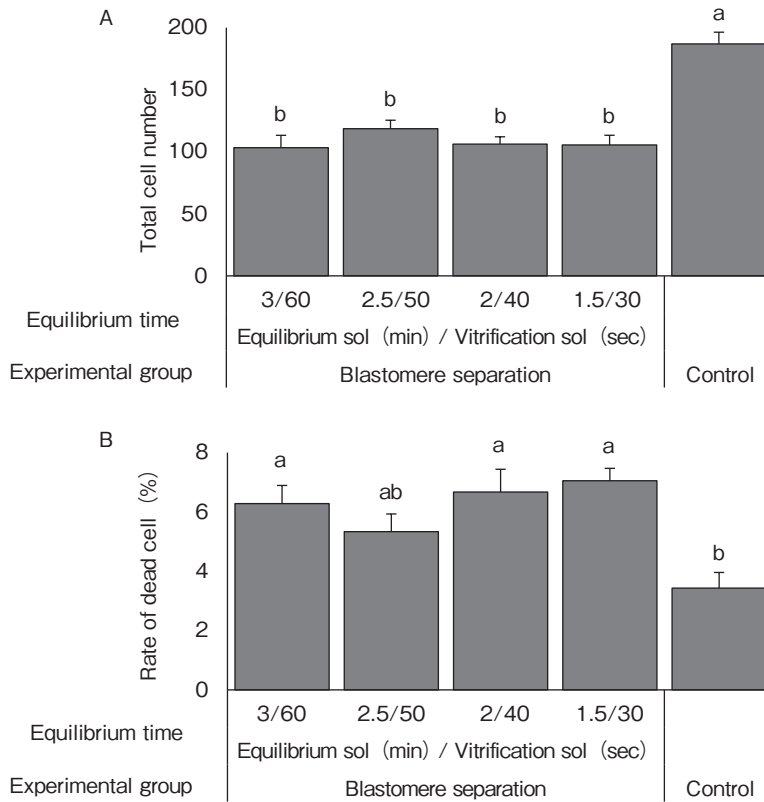
Different superscripts indicate a significant difference ( $p < 0.05$ )

### 3.2 ガラス化保存液中での平衡時間が割球分離胚の加温後の生存性に及ぼす影響

割球分離胚のガラス化-加温後の培養成績を **Table 1** に示した。割球分離区の平衡液1.5分/ガラス化液30秒区における再拡張率は、対照区と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に低かった。その他の割球分離区と対照区との間に差はなかった。ガラス化保存した割球分離胚の加温培養24時間後の総細胞数を **Fig. 2A** に示した。対照区における総細胞数は、割球分離区のすべての試験区と比較して有意 ( $p < 0.001$ ) に多かった。割球分離区の各試験区の総細胞数に差はなかったが、平衡液2.5分/ガラス化液50秒区の総細胞数が最も多かった。また、ガラス化保存した割球分離胚の加温培養24

時間後の死細胞率を **Fig. 2B** に示した。割球分離区の平衡液3, 2および1.5分/ガラス化液60, 40および30秒区における死細胞率は、対照区と比較して有意 ( $p < 0.05$ ) に高かった。一方、割球分離区の平衡液2.5分/ガラス化液50秒区と対照区の間には有意差は認められなかった。

割球分離由来の胚盤胞期胚は、通常の胚盤胞期胚と比較して、胚全体のサイズや細胞数が半分程度となる。耐凍剤による細胞毒性の影響を考慮すると、割球分離胚をガラス化する場合、平衡液やガラス化液中での平衡時間は、通常の胚盤胞期胚よりも短いほうが良いと考えられる。本研究では、その仮説のとおり、平衡時間が対照区よりも短い平衡液2.5分/ガラス化液50秒区においてガ



**Fig. 2** (A) Mean total cell number in blastocysts in blastomere separation group and in control group after 24 h culture post vitrification-warming. (B) Rate of dead cell in blastocysts in blastomere separation group and in control group after 24 h culture post vitrification-warming. Blastomere separation : Blastocysts were vitrified by placing them in equilibrium solution and vitrification solution for 3 min and 60 sec (3/60, n=17), 2.5 min and 50 sec (2.5/50, n=18), 2 min and 40 sec (2/40, n=18), and 1.5 min and 30 sec (1.5/30, n=13), respectively. Control : Blastocysts were vitrified by placing them in equilibrium solution and vitrification solution for 3 min and 60 sec (n=20). Columns and bars indicate mean value and SE, respectively. Different superscripts indicate a significant difference ( $p < 0.05$ ).

ラス化加温培養後の生存性が最も良好であった。以上より、牛割球分離胚のガラス化条件として、現状では平衡液2.5分／ガラス化液50秒で平衡処理する方法が好適と考えられた。

### 3.3 ガラス化保存した割球分離胚の移植試験

3.2で最適化した条件（平衡液2.5分／ガラス化液50秒）でガラス化した割球分離胚6個を1胚移植し、3頭を受胎させることに成功した。すべての受胎牛について、初回（Day37）の妊娠診断から2回目（Day65）の妊娠診断までの妊娠喪失はなかった（Table 2）。これまでに、割球分離胚1

胚を新鮮移植した場合、その受胎率は50%（8/16）であったとの報告がある<sup>6)</sup>。今後さらなる追加試験が必要であるが、本研究結果から、ガラス化保存した割球分離胚についても、ガラス化過程における平衡時間を調節することで新鮮移植と遜色ない受胎率が得られることが示唆された。

本研究の結果から、割球分離技術を活用した牛IVF胚の着床前ゲノム選抜技術の実用可能性が示された。今後は、ゲノム評価用の割球分離胚由来DNAを用いたSNP解析と算出されたゲノム育種価の精度を確認するとともに、OPU-IVF胚を用

**Table 2** The conception rate following embryo transfer of vitrified demi-blastocyst produced by blastomere separation.

No. of blastocysts* transferred	No. (%) of cows pregnant	
	Day 37	Day 65
6	3 (50)	3 (50)

\* Blastocysts were vitrified by placing them in equilibrium solution for 2.5 min and vitrification solution for 50 sec.

いた試験を行い、技術の実装につなげたい。

#### 4. 要 約

本研究では、黒毛和種体外受精胚を用いた着床前ゲノム選抜技術を確立することを目的に、割球分離技術により作出した牛胚盤胞期胚に適したガラス化保存条件について検討し、ガラス化保存した割球分離胚の移植後の受胎性を調査した。ガラス化保存液中での平衡時間が割球分離胚の加温培養後の生存性に及ぼす影響を調査したところ、平衡液2.5分／ガラス化液50秒で平衡処理してガラス化した割球分離胚の生存性が最も良好であることが示された。最適化した条件でガラス化保存した割球分離胚を1胚移植したところ、その受胎率は50% (3/6) であり、実用可能な数値が得られた。本研究の結果から、割球分離技術を活用することで、黒毛和種体外受精胚を用いた着床前ゲノ

ム選抜技術を実用化できる可能性が示された。今後は、移植試験の例数を増やすとともに、OPU-IVF胚を用いた試験を行い、技術の実装につなげたい。

#### 文 献

- 1) Ogawa, S., Matsuda, H., Taniguchi, Y., Watanabe, T., Sugimoto, Y., Iwaisaki, H. : *Anim Sci J*, **87**, 1106~1113, 2016.
- 2) Watanabe, T. : *The Journal of Animal Genetics*, **44**, 3~10, 2016.
- 3) Fujii, T., Naito, A., Hirayama, H., Kashima, M., Yoshino, H., Hanamura, T., Domon, Y., Hayakawa, H., Watanabe, T., Moriyasu, S., Kageyama, S. : *J Reprod Dev*, **65**, 251~258, 2019.
- 4) Joao Viana. : *Embryo Technology Newsletter*, vol 36, No.4, 7~25, International Embryo Technology Society, 2019.
- 5) Tagawa, M., Matoba, S., Narita, M., Saito, N., Nagai, T., Imai, K. : *Theriogenology*, **69**, 574~582, 2008.
- 6) Hashiyada, Y. : *J Reprod Dev*, **63**, 527~538, 2017.

# 卵胞由来生理活性ペプチドによる牛の卵巣機能調節 メカニズムの解明

The role of a bioactive peptide derived from follicular cells on cattle  
ovarian function

松田 二子<sup>1</sup>・大蔵 聡<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院農学生命科学研究科, <sup>2</sup>名古屋大学大学院生命農学研究科)

Fuko Matsuda<sup>1</sup> and Satoshi Ohkura<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Agricultural and Biosciences, The University of Tokyo,

<sup>2</sup>Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

The present study aimed to clarify the role of the Peptide A, which is expressed in bovine ovarian granulosa cells, in the reproductive function of domestic ruminants. mRNA expressions of Peptide A and Peptide A receptor were detected in bovine granulosa cells of tertiary follicles and caprine hypothalamic tissues. The amount of Peptide A was suggested to be larger in granulosa cells of smaller tertiary follicles both at mRNA and peptide levels. In addition, the amount of Peptide A in follicular fluids showed similar tendency to granulosa cells in tertiary follicles. The single intracerebroventricular injection of Peptide A into female goats suppressed the plasma gonadotropin levels, while failed to affect the activity of the center of reproduction in the hypothalamic arcuate nucleus. Taken together, our results suggested that Peptide A has an effect to inhibit the secretion of gonadotropin into plasma, which may lead to suppress follicular development. It is also suggested that Peptide A and Peptide A receptor signaling in ovaries may have role(s) to control ovarian function, such as follicular growth and selection. Further studies are necessary to determine the provider and the direct target of Peptide A that suppresses the gonadotropin secretion, as well as the detailed mechanism of granulosa cell-derived Peptide A to regulate the follicular function.

## 1. 目 的

日本における動物性タンパク質の消費量は平成18年に畜産物が水産物を上回り、その差は年々広がりがつつある。また、中国をはじめとする新興国においても経済発展により食肉等の畜産物消費量が急増している。すなわち、国内外において畜産物の効率的増産がますます求められている。その一方、牛の受胎率は年々低下しており、生産上最

も大きな問題のひとつとなっている。受胎率低下を引き起こす牛の繁殖障害のうち30%前後を占めるのが卵胞発育障害である。卵胞発育が十分でないと、卵子が排卵されない、卵子が未熟なまま排卵され胚発生に至らない、性ホルモン分泌が不足し発情が鈍化する、等の障害が起こる。哺乳類の卵巣機能は視床下部と下垂体から分泌されるホルモンによって制御されており、これらのホルモン製剤が卵胞発育障害の治療に使われているが、効

果が不十分な場合も多く、新たな技術開発が求められてきた<sup>1)</sup>。

我々は最近、牛の卵胞においてある生理活性ペプチド（ペプチドA）が多く産生・分泌されていることを発見した。ペプチドAと卵巣機能との関連についてはほとんど報告がないことから、本研究はペプチドAが牛の卵胞発育において果たす役割を明らかにすることを目的とした。ペプチドAの卵胞発育促進作用あるいは抑制作用が明らかになれば、そのメカニズムを利用した新たな卵胞発育促進剤の開発につながる。さらに、牛の繁殖技術として近年重要性が増している過排卵誘起法の効果を高める新たな薬剤の開発にもつながると期待できる。

卵胞由来ペプチドAの作用点として、視床下部、下垂体あるいは卵巣の可能性が考えられる。本研究では牛卵巣におけるペプチドAとその受容体の局在を調べることで、ペプチドAの卵巣に対する作用を明らかにすることを目的とした。さらに、牛のモデル動物である山羊を用いて、ペプチドAが視床下部の繁殖制御ニューロンの活動に与える影響を解析し、ペプチドAの視床下部に対する作用を明らかにすることも目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 牛卵巣におけるペプチドAの局在

食肉処理場にて卵胞期であることを確認した牛卵巣を採取し、直径4 mm以上の三次卵胞からそれぞれ顆粒層細胞を分離して全RNAを抽出し、cDNAを合成した。同時に卵胞液も採取した。卵胞からのサンプリングの際、卵胞直径を測定した。顆粒層細胞におけるペプチドAおよびペプチドA受容体のmRNA発現を、RT-PCRによって調べた。また、卵胞液中に分泌されたペプチドA量をEIA（酵素抗体測定法）によって測定した。卵巣全体を固定・包埋後、組織切片を作製し、牛

卵巣におけるペプチドAのmRNA局在を*in situ* hybridizationにて確認した。さらに抗ペプチドA抗体を用いて免疫染色を行い、ペプチドレベルでの局在を調べた。

### 2.2 ペプチドAの視床下部繁殖制御中枢活動および性腺刺激ホルモン分泌に対する作用の解析

山羊の視床下部組織を採取し、全RNAを抽出後、cDNAを合成した。ペプチドAおよびペプチドA受容体のmRNA発現をRT-PCRにて調べた。

視床下部の神経活動（MUA）を記録可能な山羊（ $n = 4$ ）を用いて<sup>2,3)</sup>、繁殖制御中枢へのペプチドAの作用を調べた。MUA記録用電極を卵巣除去雌山羊の視床下部弓状核に留置し、脳室内にペプチドA（5 nmol）または生理食塩水を投与した。投与開始2時間前から9時間後の間、繁殖中枢活動の記録と血中性腺刺激ホルモン（黄体形成ホルモンLH）濃度測定を同時に行った。投与により繁殖中枢のMUAおよびLH分泌のパターンに変化が見られれば、ペプチドAが視床下部の繁殖中枢の活性化/抑制作用を持つことを明らかにできる。

さらに、卵胞由来のペプチドAが視床下部に作用して繁殖活動に影響を与えているのであれば、性周期の間、血中ペプチドA濃度が周期的に変化していると予測される。そこで、牛の性周期中に1日1回採血を行い、EIAにより血中ペプチドA濃度変化を特定した（ $n = 4$ ）。

## 3. 結果と考察

### 3.1 牛卵巣におけるペプチドAの局在

牛卵巣顆粒層細胞において、ペプチドAとペプチドA受容体のmRNAが発現していることをRT-PCRにて確認した。牛卵巣におけるペプチドAの*in situ* hybridizationでは、顆粒層細胞において強いmRNA発現が認められた（Fig. 1A）。三

次卵胞の大きさごとに顆粒層細胞での染色を比較したところ、直径が小さいものは強く、直径の大きい主席卵胞では弱い傾向が認められた。免疫染色の結果、mRNAと同様に、ペプチドレベルでもペプチドAは顆粒層細胞に多く局在し、直径が小さい卵胞ほど顆粒層細胞での局在が多い傾向が認められた。

牛卵胞液中のペプチドA量をEIAにて測定した結果、卵胞直径とペプチドA量に負の相関が

ある傾向が認められた (Fig. 2)。

以上の結果から、牛卵胞顆粒層細胞においてペプチドAが発現し、卵胞液中に分泌されていることが示された。顆粒層細胞ではペプチドA受容体の発現も認められ、顆粒層細胞から分泌されたペプチドAがオートクライン的に、あるいは近傍の卵胞の顆粒層細胞に作用する可能性が示された。直径の小さい卵胞で多く発現・分泌される傾向が認められたことから、ペプチドAが発育初期の三

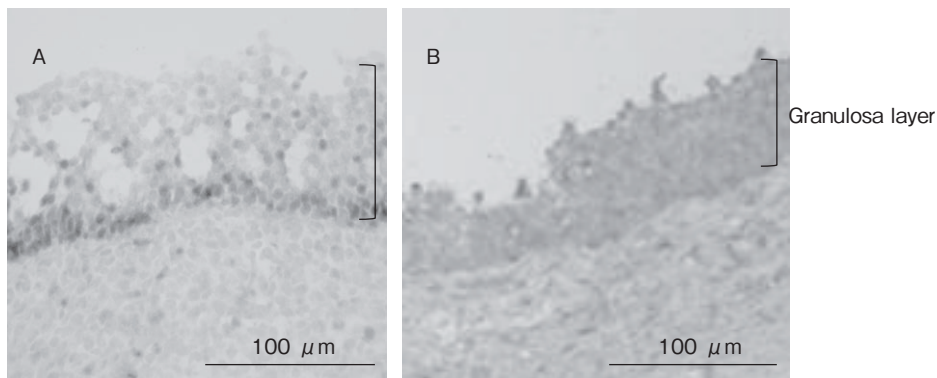


Fig. 1 Localization of Peptide A in bovine tertiary follicles.

(A) Peptide A mRNA was detected by *in situ* hybridization. The signal was observed in granulosa cells.

(B) Peptide A was detected by immunohistochemistry. The signal was observed in granulosa cells.

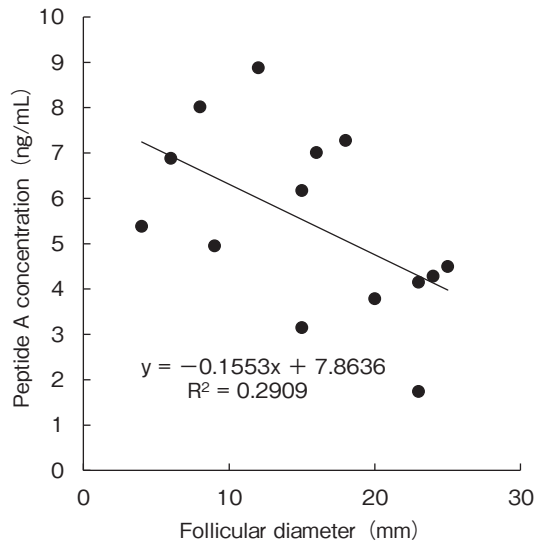


Fig. 2 The concentration of Peptide A in follicular fluid and follicular diameter of bovine tertiary follicles. Negative correlation between Peptide A concentration and follicular diameter was suggested.



次卵胞において顆粒層細胞の分化・増殖に関与する可能性や、次席卵胞や主席卵胞への卵胞選抜に関与する可能性が考えられる。卵巣におけるペプチドAの機能を解明するため、今後はペプチドA受容体の詳細な局在解析や、卵胞細胞の初代培養等による解析を実施する必要がある。

### 3.2 ペプチドAの視床下部繁殖制御中枢活動および性腺刺激ホルモン分泌に対する作用

山羊視床下部において、ペプチドAとペプチドA受容体のmRNAが発現していることをRT-PCRにて確認した。このことから、反芻動物の視床下部内においてペプチドAとその受容体のシグナル伝達系が機能している可能性が示唆された。

山羊脳室内へのペプチドA投与によって、視床下部弓状核の繁殖制御中枢の活動は変化しなかった。一方、血中LH濃度は抑制される傾向が認められた。この結果から、ペプチドAは血中へのLH分泌を抑制する作用を持つことが示され、その結果、反芻動物の卵胞発育を抑制する機能を持つ可能性が示唆された。その際のペプチドAの作用部位として、弓状核の繁殖中枢ではなく、視床下部の別の繁殖制御ニューロン、あるいは下垂体の性腺刺激ホルモン産生細胞である可能性が考えられる。

牛の性周期中における血中ペプチドA濃度を測定したところ、明確な周期的変化は認められなかった。今後精査を要するものの、卵胞から分泌されたペプチドAは血中に移行して血中濃度を変化させるまでには至らず、卵巣内での局所的な作用が主要な機能であるのかもしれない。

以上より、ペプチドAが性腺刺激ホルモン分泌の抑制を介して卵胞発育を抑制する作用を持つことが示唆された。さらに、顆粒層細胞からペプチドAが分泌され、卵巣局所において卵胞発育制御等の機能を持つ可能性が示された。今後、下垂体からのLH分泌を抑制するペプチドAの由来と直

接の作用部位、顆粒層細胞が分泌するペプチドAの卵胞機能に対する具体的な作用を含めた詳細な解析が必要である。

## 4. 要 約

本研究は、牛の卵胞顆粒層細胞で発現するペプチドAの繁殖機能における役割を明らかにすることを目的として実験を行った。牛顆粒層細胞と山羊視床下部においてペプチドAとその受容体のmRNAが発現していることを確認した。顆粒層細胞では、mRNAおよびペプチドレベルの両方で、直径の小さい三次卵胞ほどペプチドA発現量が多い傾向があり、卵胞液中のペプチドA量も同様の傾向が認められた。雌山羊の脳室内にペプチドAを投与したところ、視床下部弓状核の繁殖制御中枢の活動は変化しなかった一方、血中LH濃度は抑制される傾向が認められた。以上より、ペプチドAが性腺刺激ホルモン分泌の抑制を介して卵胞発育を抑制する作用を持つこと、および卵巣局所において卵胞発育制御等の機能を持つことが示唆された。今後、下垂体からのLH分泌を抑制するペプチドAの由来と直接の作用部位、顆粒層細胞が分泌するペプチドAの卵胞機能に対する具体的な作用を含めた詳細な解析が必要である。

## 文 献

- 1) 松田二子, 前多敬一郎, 大蔵聡, 上野山賀久, 東村博子: 中枢からのアプローチ: 新たな神経内分泌メカニズムを利用した繁殖制御, 35(7), 98~101, 2017.
- 2) Ohkura, S., Takase, K., Matsuyama, S., Mogi, K., Ichimaru, T., Wakabayashi, Y., Uenoyama, Y., Mori, Y., Steiner, R. A., Tsukamura, H., Maeda, K. I., Okamura, H.: Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat, *Journal of Neuroendocrinology*, 21, 813~821, 2009.
- 3) Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V. M., Clifton, D. K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K., Steiner, R. A., Okamura, H.: Neurokinin B and dynorphin A in kisspeptin

neurons of the arcuate nucleus participate in generation of periodic oscillation of neural activity driving pulsatile gonadotropin-releasing hormone secretion in the goat, *Journal of Neuroscience*, 30, 3124~3132, 2010.

## 移植可能な牛伸長胚培養系評価法の検討

Evaluation of culture system to elongate and transplant in bovine embryos

細江実佐・林 憲悟

(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)

Misa Hosoe and Ken-Go Hayashi

(Institute of Livestock and Grassland Sciences, NARO)

In order to evaluate culture condition to reproduce the normal process of epiblast and trophoblastic cell differentiation in bovine embryos *in vitro*, we attempt to analyze the RNA expression of cell differentiation marker proteins of embryos, and to validate the lipophilic dye staining of embryos before transfer to recipient cows. Day 7 bovine blastocysts developed in conventional medium were cultured further in embryonic stem (ES) cell medium with GSK inhibitor (+i), with GSK and MEK inhibitor (+2i) or without inhibitors (control) until D10. The expression levels of *NANOG* mRNAs in embryos cultured with GSK inhibitor were significantly higher than those in embryos cultured without inhibitors. The expression levels of *SOX17*, *CDX2* and *IFNtau* mRNAs in embryos cultured with GSK inhibitor were no significant difference with those in embryos cultured without inhibitor. The expression levels of *SOX17* mRNAs in embryos cultured with GSK and MEK inhibitor were significantly lower than those in embryos cultured without inhibitors. Day 9 IVF embryos were stained by DiI (control) or DiO (+i) and transferred to a recipient cow once, and after 6 days, Day 16 embryos were collected by non-surgical uterine flushing. When 30 embryos were transferred to recipient, 17 embryos were collected, and the embryos were able to classify by colors of fluorescence staining. These results suggest that the evaluation methods of this research are effective for improvement of embryo culture conditions.

### 1. 目 的

牛胚は、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。胚の伸長は受精後10日目ごろから顕著になるが、これは主に胎盤の構成組織となる栄養膜細胞の増殖によるものである。この時期、将来胎子へ発生する胚体外胚葉（エピプラスト）においても、内部に生じた腔が開裂して胚表面で平板

化した胚盤となり、さらに羊膜腔が形成されるなど、大きな形態変化が起きる。通常受精卵移植には、受精7日目前後の胚盤胞を用いるため、伸長胚が繁殖技術研究の対象になることはなかったが、2014年、木村らが、14日目前後の伸長胚（長さ0.5-15mm）を子宮から回収し、その一部を切り取って（バイオプシー）性判別などの診断をした後に再び子宮に戻して産仔を得る技術を開発した<sup>1)</sup>。さらに2017年、藤井らが受精14-16日目の

伸長胚のバイオプシーでSNPチップ解析が可能であること、また、少数例ながら、緩慢凍結した受精14日目の胚を融解・移植して産仔を得ることに成功したことを報告した<sup>2)</sup>。これらの技術をさらに発展させ、体外受精胚から直接移植可能な伸長胚を作成することができれば、新たな繁殖技術の開発となり、家畜改良にかかる期間とコストを削減できる。我々はこれまでに、胎盤形成を体外で再現するモデル系として体外伸長胚培養系を構築し、胚盤胞を約20日間安定して生存させ、一部の栄養膜細胞 (TE) が胎盤特異的な二核細胞に分化すること、この細胞が二核細胞特異的因子であるプラセンタルラクトジェン (PL) の遺伝子やタンパク質を発現していることを確認した<sup>3)</sup>。しかしながら、本培養系では、将来胎子になる内部細胞塊 (ICM) は早い段階から退行あるいは栄養膜細胞特異的遺伝子であるインターフェロントウ (IFNT) を発現し、胚盤の形成は確認できないなど、移植して産仔を生産できる胚培養系の確立には至っていない。本課題では、胎子への生育能力のある伸長胚を体外で作製するため、これまで開発してきた伸長胚培地にICM維持効果が期待できる分化阻害剤を加え、胚盤形成の指標となるマーカー分子の遺伝子発現量を比較するとともに、体外で受精9-10日目まで培養した胚を子宮に移植後5-6日目に回収して胚盤形成を調べることで改良効果の評価が可能かを検証する。

## 2. 方法

### 2.1 胚培養および遺伝子発現解析 (定量的 RT-PCR)

牛卵母細胞の体外成熟、体外受精、発生培養は既報に準じて行った<sup>3, 4)</sup>。7日目以降の培養は、10%牛胎子血清、2 mM GlutaMAX- I、1% MEM非必須アミノ酸、10.5 mM モノチオグリセロール (Wako)、20 ng/ml LIF を含む KO-MEM

培地に、分化阻害剤である MEK 阻害剤 (分裂促進因子活性化プロテインキナーゼキナーゼ: 10  $\mu$ M PD0325901, フナコシ) と GSK 阻害剤 (グリコーゲン合成酵素キナーゼ阻害剤: 6  $\mu$ M CHIR-99021, フナコシ) (2 i 区) もしくは GSK 阻害剤のみ (i 区) を加えて培養10日目まで行った。培養10日目まで発生させた胚の一部は常法により固定、包埋し、組織切片を作成後、H-E 染色して形態を比較した。また、10日目まで発生させた体外培養胚を内部細胞塊 (ICM) と栄養膜細胞 (TE) に分けて、これらの細胞から RNA を抽出 (RNeasy micro kit, Qiagen) して分化関連マーカータンパク質 OCT3/4, NANOG (未分化細胞マーカー), CDX2, IFNT (栄養膜細胞マーカー) の遺伝子発現を定量的 RT-PCR (qRT-PCR) により調べて分化阻害剤添加の影響を比較解析した。一方、内胚葉マーカーである SOX17 については、ICM と TE を分けず、胚盤胞をそのまま解析した。qRT-PCR は既報<sup>3)</sup> に準じて行い、GAPDH 発現量を内部標準として、OCT3/4, NANOG, CDX2, IFNT および SOX17 の各遺伝子の相対発現量を算出した。

### 2.2 胚染色・胚移植・胚回収

実験区と対照区で培養した胚を同一子宮内で発育させて発生を検証する手法として、細胞膜をラベリングする脂溶性カルボシアニン色素のマーカーの有効性を調べるため、培養後10日目の胚を、血清無添加の培地で洗浄後、5  $\mu$ M DiI あるいは DiO (Vybrant Multicolor Cell-Labeling Kit, V22889, Thermo Fisher) で20分間染色し、3回洗浄後、培養を継続し、その後の胚発生と染色を観察した。また、体外で培養した伸長胚が、移植後、子宮内で発生を継続させられるかどうかを検証するために、阻害剤添加区あるいは対照区で培養した体外受精後9日目の胚を染色して、発情同期化した2頭の受胎牛に DiI で染色した対照区

とDiOで染色したi区の胚を各15個混ぜて、1頭につき30個を黄体側に移植し、移植後6日目に熟練者が伸長胚用に穴を大きくしたバルーンカテーターを用いて子宮全体を灌流し、受胚牛から回収できた胚の染色状態、数、回収胚の大きさ、回収胚における胚盤形成を調べた。

### 3. 結果と考察

培養10日目までの胚の生存率と孵化率は、対照区(阻害剤無添加区)と比較して、i区、2i区で差はなかったが、胚の直径は、2i区で有意に小さかった(Fig. 1)。胚組織のH-E染色により、培養10日目の胚を観察したところ、対照区ではICMの核が壊れて断片化している像が多くみられたのに対し、i区、2i区の胚ではICMが丸く塊状で、i区ではICMとTEの内側に内胚葉への分化細胞の形成がみられた胚もあった(Fig. 2)。

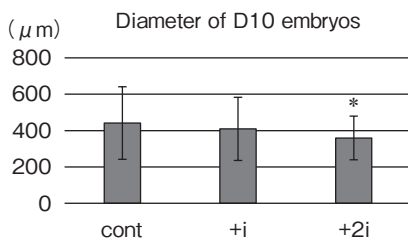


Fig. 1 Dimeter of D10 embryos cultured with or without GSK and/or MEK inhibitor. \*  $p < 0.05$  (vs. control). Error bar shows means  $\pm$  SD.

一方どの胚においてもTEの細胞は扁平化していた。ICMにおけるOCT3/4の遺伝子発現量およびTEにおけるCDX2の発現量は、どの区でも有意差がなかった。ICMにおけるNANOGの遺伝子発現量は、対照区と比較してi区で有意に高く、IFNtの発現は、対照区、i区では確認されたが、2i区では検出されなかった。TEにおけるIFNT発現量および胚のSOX17の発現量は、2i区で有意に低かった(Fig. 3)。これらのことから、阻害剤の添加は未分化細胞の維持に有効であるが、2i区では内胚葉分化や栄養膜細胞への分化阻害が顕著であるのに対し、i区では内胚葉および栄養膜への分化阻害なく、ICMも維持される可能性が示唆された。阻害剤を添加しない培養液で培養10日目の胚にDiIおよびDiO染色を施し、20日目まで培養を継続したとき、胚の生存性と大きさは、染色していないものと差がなかった。1頭につき30個の胚を移植した受胚牛からは、それぞれ17個と14個の生存胚が回収できた。1頭の受胚牛から回収されたDiIで染色された胚は9個、DiOで染色された胚は8個であった(Fig. 4)。そのうち、3個と2個に胚盤が確認でき、GSK阻害剤の添加が胚の生存率や胚盤形成に及ぼす影響は確認できなかった。胚の長さは、対照区のDiI染色胚で $3.5 \pm 2.9$ mm、i区のDiO染色胚で $1.3 \pm 0.7$ mmで、i区で小さい傾向がみられ( $p < 0.1$ )、GSK阻害剤の添加が移植後の胚の栄養膜細胞の

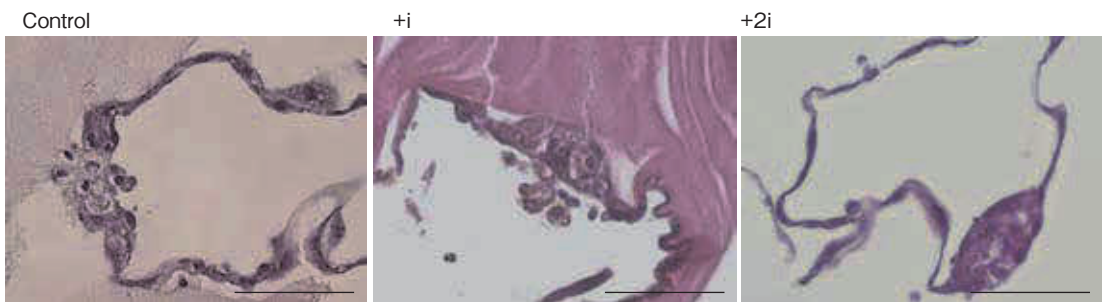


Fig. 2 Staining image of D10 embryos cultured with or without GSK and/or MEK inhibitor. Scale bar indicates 50  $\mu$ m.

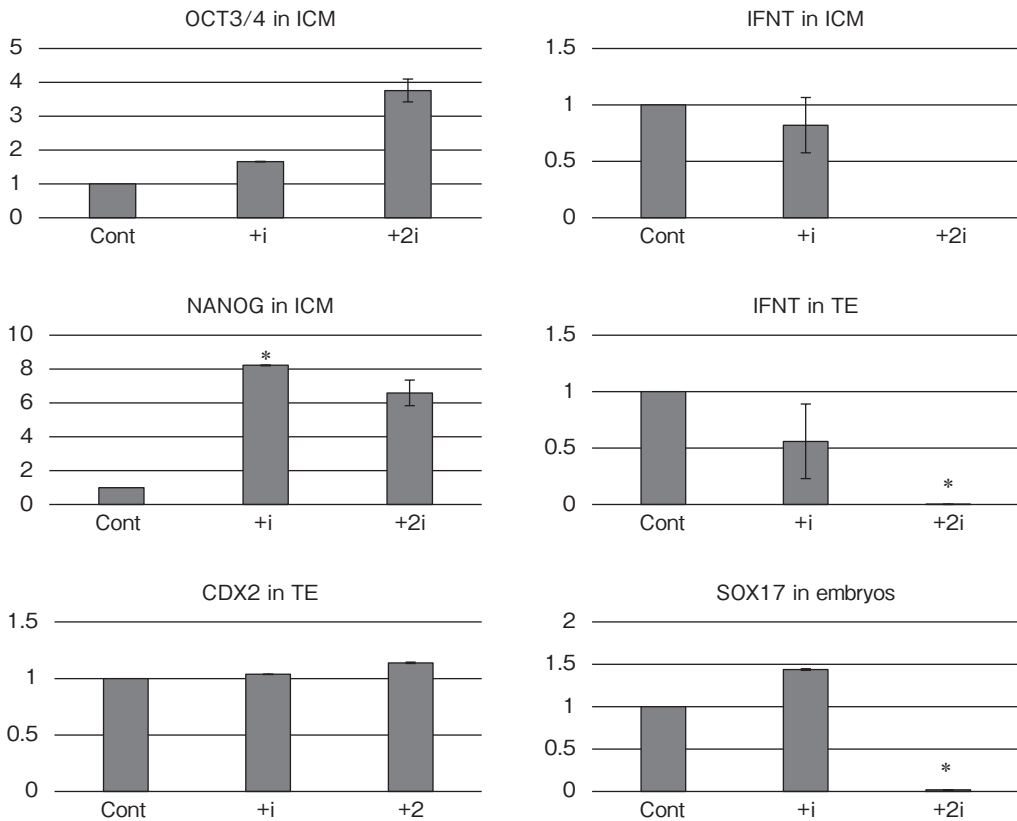


Fig. 3 Expression analysis of cell differentiation marker genes in ICM, TE or whole embryos cultured with or without GSK and/or MEK inhibitor. Values are shown as relative values of GAPDH. \* $p < 0.05$  (vs. control). Error bar shows means  $\pm$  SD.



Fig. 4 Fluorescent staining image of D16 embryos collected from recipient transferred D10 embryos cultured with (DiO : Green) or without (DiI : Red) GSK inhibitor. Scale bar indicates 500  $\mu$ m.

増殖に関係する可能性が示唆された。ただし、例数が少ないため、今後のさらなる検討が必要である。一方、別の1頭から回収された胚14個のうち

7 mm以下の大きさの4個はDiIおよびDiOの染色が確認されたが、これら以外の大きく伸長した胚(2-8 cm)では、蛍光が観察できなかった。これらのことから、1頭の受胎牛に移植した培養条件の異なる胚を、回収後に蛍光色素により選別することは可能であるが、移植・回収時期に注意が必要であることが示唆された。

#### 4. 要 約

胎子への生育能力のある牛伸長胚を体外で作製するための、培養系の評価法を検証した。体外受精後7日目以降の胚の培養系に、分化阻害剤であるMEK阻害剤とGSK阻害剤を添加して3日後に胚のqRT-PCR解析を行い、分化マーカーの遺伝



子発現を比較した。阻害剤を添加した区では、ICMにおける未分化細胞の分化マーカーの発現が高く、形態的にも退行が抑制されていた。一方で、2種類の阻害剤を両方添加して発生させた胚では、内胚葉や栄養膜細胞の分化マーカーがほとんど発現しておらず、胚発生に伴う正常な分化も阻害されると考えられた。GSK阻害剤のみを添加して発生させた胚では、未分化マーカーのNANOGが対照区の胚よりも有意に高く発現しており、内胚葉および栄養膜細胞マーカーは、対照区と発現量の差がなかった。10日目の培養胚を脂溶性カルボシアニン色素で染色したところ、その後の生存性に影響を及ぼすことなく、胚をトレースすることが可能であった。培養系の評価法として、染色した胚を受胎牛の生体内に移植し、回収後に生存

性等を比較する方法は、有効である可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Kimura, K., Matsuyama, S. : *J Reprod Dev*, **60**, 210~215, 2014.
- 2) Fujii, T., Hirayama, H., Naito, A., Kashima, M., Sakai, H., Fukuda, S., Yoshino, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sugimoto, Y., Matsuyama, S., Hayakawa, H., Kimura, K. : *J Reprod Dev*, **63**, 497~504, 2017.
- 3) Hosoe, M., Furusawa, T., Hayashi, K-G., Takahashi, T., Hashiyada, Y., Kizaki, K., Hashidume, K., Tokunaga, T., Matsuyama, S., Sakumoto, R. : *Reprod Fertil Dev*, **31**, 1157~1165, 2019.
- 4) Hosoe, M., Shioya, Y. : *Zygote*, **5**, 371~376, 1997.
- 5) Furusawa, T., Ohkoshi, K., Kimura, K., Matsuyama, S., Akagi, S., Kaneda, M., Ikeda, M., Hosoe, M., Kizaki, K., Tokunaga, T. : *Biol Reprod*, **89**, 1~12, 2013.

## 抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の 解明（Ⅲ）

Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of  
cryopreserved bull semen（Ⅲ）

武田 久美子・緒方 和子・木村 和輝\*・佐藤 伸哉\*\*・今井 昭\*\*

（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，\*茨城県畜産研究センター肉用牛研究所，

\*\*広島県立総合技術研究所畜産技術センター）

Kumiko Takeda, Kazuko Ogata, Kazuteru Kimura\*, Nobunari Sato\*\* and Akira Imai\*\*

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, \*Beef Cattle Institute, Ibaraki Prefectural Livestock Research Center,

\*\*Hiroshima Prefectural Livestock Research Center)

It is known that spermatozoa suffer various damages by freezing. It is thought that excessive reactive oxygen species (ROS) induces oxidative stress and increases DNA damage in sperm during the manufacturing process of frozen semen. The aim of this study was to clarify the efficiency of supplementation of bull spermatozoa during freezing with antioxidants, such as reduced glutathione (GSH), astaxanthin (Ax) and Coenzyme Q10 (COQ10) to improve fertilization ability. The quality of bovine cryopreserved semen was assessed by sperm motility, DNA fragmentation index (DFI), viability, acrosome integrity, and the developmental ability of embryos after in vitro fertilization (IVF). Addition of GSH to semen improved the penetration and subsequent embryo developmental rates in samples characterized with poor embryo development. However, in some ejaculates, it dramatically increased the frequency of DNA damage in spermatozoa. Further studies are required to clarify this phenomenon. The blastocyst-stage embryos obtained from GSH-treated sperm appeared healthy and could develop to normal offspring. When Ax was dissolved in tetrahydrofuran (THF) and added to the semen extender, the motility of the spermatozoa increased slightly when incubated at 37 °C. However, the motility decreased when stored at 4°C. Similarly, for COQ10 dissolved in THF, the motility increased when the temperature was kept at 37°C; however, it decreased when stored at 4°C. When Ax-rich egg-yolks were used for cryopreservation extender, the sperm motility was not improved. It was concluded that the effect of antioxidant addition to improve sperm quality is bull-dependent. Further studies are needed to clarify the effects of antioxidant supplementation to spermatozoa.

### 1. 目 的

凍結により精子はさまざまなダメージを受けることが知られており、受胎率の向上を目的とした

精液凍結技術の飛躍的な改良を進める必要がある。凍結融解後の牛精液は活力が凍結前の25-75%に低下し、DNAダメージを受け、機能が低下することが知られている。凍結精液の製造過程

もしくは利用時に過剰な活性酸素種 (ROS) が酸化ストレスを惹起するため、精子の成熟、先体反応、運動性などに影響を及ぼすとともにDNAダメージを増大させると考えられている。近年、家畜においてもDNAダメージを軽減する手法のひとつとして抗酸化物質の添加が試みられており、還元型グルタチオン (GSH) やコエンザイム Q10 (COQ10) 等の添加が精子の品質を改善し、胚発生率に寄与したとの報告がある<sup>1,2)</sup>。本研究課題では、GSHの実用性を明らかにするとともにアスタキサンチン (Ax) 等の脂溶性抗酸化物質の利用方法とその効果について検討を行い、これら抗酸化物質の利用により牛凍結精液の品質を向上させることを目的とした。昨年度まで我々は、GSHの添加効果は体外受精発生率の劣る牛精液に対してみられるが、精子のDNAダメージが増大する可能性を確認した。また、Axの希釈液への添加方法として最も有効であると考えられるAx高含有卵黄 (Ax/E) を用いた凍結方法について精子運動性や体外受精後の胚発生率向上効果を調査したが、その効果は一定ではなかった。本年度も引き続き、抗酸化物質添加による凍結精液品質向上効果について詳細な検討を行った。

## 2. 方法

### 2.1 GSH添加した精子の運動性および品質評価

材料として2頭の種雄牛 (N 1, N 2) より採取した新鮮精液を用いた。GSHを凍結時最終濃度が1, 5, 10mMとなるよう一次希釈液に添加し、新鮮精液と混合した。37℃で1時間および3時間保温したものを、ゆるやかに4℃に平衡化したものについて、精子運動解析装置 (SMAS) を用いて運動性を計測した。計測項目として、総運動精子率 (TM), 前進運動精子率 (PM), 直線速度 (VSL), 曲線速度 (VCL), 平均速度 (VAP),

直進性 (STR), 直線性 (LIN), 曲線性 (CUR), 頭部振幅 (ALH), 頭部振動数 (BCF) を調査した。

また、4頭の種雄牛 (N 1, N 2, H 1, H 2) より採取した新鮮精液を用い、上記のタイミングでGSHを添加し、常法に従って凍結を行った。凍結融解後の精液についてSMASを用いて運動性を計測した。精子核DNAダメージの評価は、DNA断片化を蛍光標識する方法 (TUNEL法) を用い、DNA断片化指数 (DFI) 値を求めた<sup>3)</sup>。精子生存率および先体膜変化の評価には、死細胞を染色するPropidium Iodide (PI) と先体の内膜を染色するPeanut Agglutinin (PNA) を組み合わせた蛍光 (PNA/PI) 染色を行った。

### 2.2 GSH添加した精子由来体外受精胚の品質評価

広島県立総合技術研究所畜産技術センターにおいて、2頭の種雄牛 (H 1, H 2) の射出精液 (各3ロット) についてGSH添加処理のタイミングを凍結融解前後で行ったものについて体外受精試験を行った。また、凍結融解後に5mMのGSH処理を施した精子を体外受精に用いた際の前核形成率について調査した。さらに、凍結融解後にGSH処理を施した精子由来体外受精胚盤胞期胚について移植試験を行い、その受胎性を検証した。

精液へのGSH添加によりDFI値が増大する場合の体外受精胚発生能や胚の正常性へ与える影響を解明するため、当該精液を用いた体外受精による胚盤胞期胚の品質評価を、PIおよびYOPRO-1の2重染色による死細胞・アポトーシス細胞検出およびTUNELによるDNAダメージ検出により行った。

### 2.3 アスタキサンチン等難溶性抗酸化物質を添加した精子の運動性および品質評価

2頭の雄牛 (N 1, N 2) より採取した新鮮精液を用いて、テトラヒドロフラン<sup>4)</sup> (THF) に溶

解したAx (Ax/T) の添加が運動性へ与える影響を調査した。1%もしくは4%の濃度で溶解したAx/Tを一次希釈液に1  $\mu$ L/mL, 5  $\mu$ L/mL, 10  $\mu$ L/mL添加した。それぞれの区を37°Cで1時間あるいは3時間保温後、ゆるやかに4°Cへ冷却後、および4°Cで一晩置いたものについて精子運動性をSMASで測定した。次に難溶性抗酸化物質であるCOQ10も10mMとなるようTHFに溶解し(COQ/T), 一次希釈液に5~10  $\mu$ L/mLとなるよう添加し、同様に運動性への効果をSMASで測定した。

#### 2.4 アスタキサンチン含有卵黄の使用した凍結精液の運動性および品質評価

茨城県肉用牛研究所にて製造したAx/Eを用いた凍結精液のうち3頭の種雄牛3ロットずつについて、融解直後および37°C 1時間保温後の精子運動性をSMASで測定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 GSH添加が精子の品質に与える影響

N1, N2, H1, H2の新鮮精液にGSHを添加し凍結した場合、融解後の精子は添加濃度に伴ってTMおよびPMが減少した (Table 1)。また、N1-1, N1-2, H2-1の精液はGSHの添加濃度に伴って著しいDFI値の上昇がみられた。H1, H2の凍結精液について、GSHの添加による生存率および先体正常率の差はみられな

かった (Table 1)。

以上の結果から、GSHの添加が精子凍結融解の際の運動性を低下させること、ロットによってはDNAダメージを増大すること、生存率および先体正常性にはあまり影響しないことが示唆された。GSHの添加は解凍後の精子の質を高め、受精能力を高めるとの報告が数多くあるが、今までにGSH添加によるDNAダメージ率が增大する可能性があることの報告はなく、詳細な検討はされていない。GSHの添加により精子にどのような作用を及ぼすかは、今後さらに検討する必要がある。

#### 3.2 GSH添加が体外受精後の胚の品質に与える影響

2頭の射出精液3ロットずつについて体外受精試験を行った結果、H2精液の2ロットでGSH添加のタイミングが凍結融解前と後で共通して胚発生率の改善効果が認められた。また、体外受精に用いた場合の前核形成率を調査したところ、H2はGSH処理により前核形成率が改善された ( $p < 0.01$ )。このことから、H2雄牛の精液で体外受精胚生産効率が改善したのは受精および正常な前核形成までの段階が改善するためと考えられた。GSH添加後に精子のDFI値の高くなる凍結精液を用いて作成した体外受精由来胚の品質を調査するため、顕微鏡下で正常とみられる拡張胚盤期胚を選んで、死細胞検出およびDFI評価を行ったところ、品質の差異は検出されなかった。さら

Table 1 Effects of different concentration of GSH in the extender of bull spermatozoa (N1, N2, H1, H2) on the quality parameters after freezing and thawing.

GSH	0mM	1mM	5mM	10mM	n
Viability (%)	71.3 ± 11.6	72.6 ± 19.8	70.9 ± 20.1	79.1 ± 10.7	5
Acrosome integrity (%)	80.2 ± 16.8	81.3 ± 4.6	80.4 ± 5.4	77.2 ± 5.3	5
DFI (%)	3.9 ± 4.2	7.4 ± 6.1	14.7 ± 22.5	18.0 ± 25.2	9
TM (%)	57.3 ± 19.5 a	52.0 ± 20.2 a	43.2 ± 18.9 b	35.8 ± 23.2 b	10
PM (%)	37.3 ± 21.9 a	33.6 ± 19.6 a	24.1 ± 17.8 b	19.0 ± 20.3 b	10

Different letters indicate differences at  $p < 0.05$  among groups. DFI : DNA fragmentation index, TM : total motility, PM : progressive motility, n : the number of ejaculates. Values are means ± SD.

に、凍結融解後に5 mM GSH処理を行ったH 1精子由来体外受精胚の移植試験を実施したところ、GSH処理を行わない対照区で3頭中2頭(66.7%)、GSH処理区で5頭中2頭(40%)が受精し、それぞれ正常分娩した。GSH処理精液由来体外受精産子は、2頭とも、黒毛和種正常発育曲線を上回る発育であった。

### 3.3 アスタキサンチン等難溶性抗酸化物質添加が精子の運動性に与える影響

4%のAx/Tを卵黄含有希釈液に1  $\mu$ L/mLもしくは5  $\mu$ L/mL添加したところ、1  $\mu$ L添加の場合(0.004%)に37°Cで保温した際の運動性がよくなる場合がみられた(Fig. 1A, B)。しかし、4°Cで冷却後の運動性は改善されなかった(Fig. 1A)。また、静置後に不溶アスタキサンチンとみられる沈殿が生じた。一方で、1%のAx/Tを添加した場合は希釈液全体が赤みがかり、水溶性アスタキサンチンを用いた場合に近い状態で溶解したものと考えられた。しかし、1%のAx/Tを添加した場合に必ずしも運動性は改善されな

かった(Fig. 1B)。

N 1およびN 2の精液にCOQ10/Tを添加後、37°Cで3時間保温した場合にTMが無添加区より高くなる傾向がみられた。しかし、4°Cで保存した場合は添加精子の運動性は悪くなる傾向がみられた。

市販のAx/Eを用いた場合、一次希釈液におけるAx濃度は0.0004%、凍結時におけるAx最終濃度は0.00013%となる。THFに溶解したAxを1  $\mu$ Lの添加でAx/Eと同等の濃度のAxを添加するためには、0.4%濃度のAx/Tストック溶液を一次希釈液に1  $\mu$ L/mL添加(濃度0.0004%)する方法が適当と考えられた。AxをDMSOで溶解するには400  $\mu$ g/mL(0.04%)濃度が限界となるため、脂溶性抗酸化物質を添加する場合に溶解性の非常に高いTHFを利用する価値は高いと考えられた。添加効果については、今後さらに検討を要する。

### 3.4 アスタキサンチン高含有鶏卵の利用が凍結精液の運動性に与える影響

3頭の種雄牛の測定値(n = 9)をとりまとめ

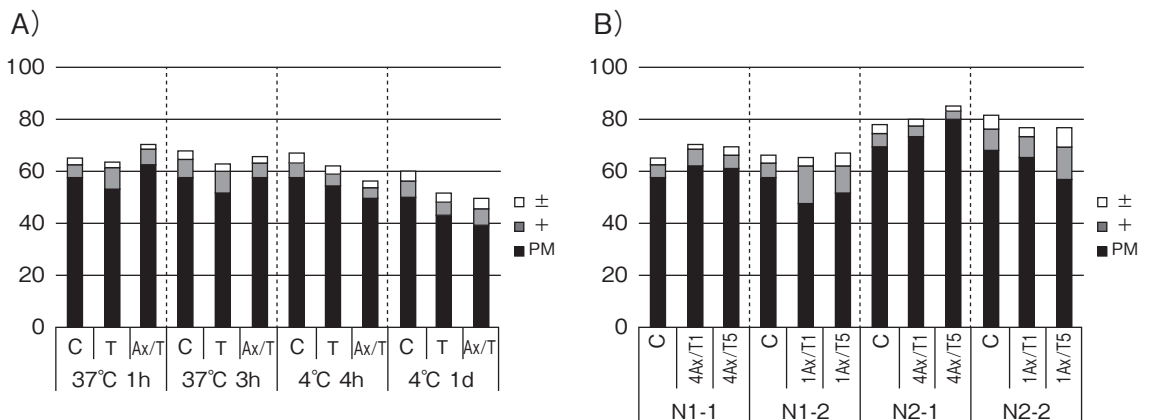


Fig. 1 Motility of fresh ejaculated spermatozoa supplemented with astaxanthin dissolved in THF (Ax/T) measured by SMAS. A) Motility of spermatozoa (N1) measured at 1 hour (h) and 3 h after incubation at 37°C, 4h and 1day after storage at 4°C. Semen diluted by egg yolk-Tris extender (ETE, C), ETE supplemented with 1  $\mu$ L/mL of 4% Ax/T, ETE supplemented with 1  $\mu$ L/mL of THF (T). B) Motility of spermatozoa (N1-1, N1-2, N2-1, N2-2) measured at 1h after incubation at 37°C. C: ETE, 4Ax/T1: supplemented with 1  $\mu$ L/mL of 4% Ax/T, 4Tx/T5: supplemented with 5  $\mu$ L/mL 4% Ax/T, 1Ax/T1: supplemented with 1  $\mu$ L/mL 1% Ax/T, 1Ax/T5: supplemented with 5  $\mu$ L/mL 1% Ax/T.



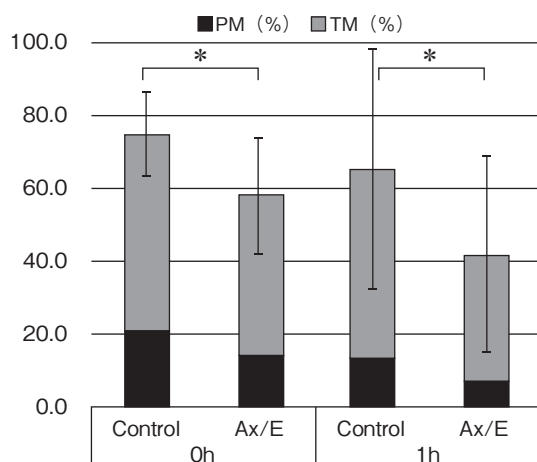


Fig. 2 Total motility (TM) and progressive motility (PM) of freezing and thawing semen using control egg yolk or Ax/E egg yolk (mean  $\pm$  SD). Each motility was measured immediately after thawing (0h) and then kept at 37°C for 1 hour (1h).

たところ、Ax/Eを使用の場合は通常卵の場合より、TMは低下した ( $p < 0.05$ ) (Fig. 2)。また、CURはAx/Eを使用の場合は通常卵の場合より上昇した ( $p < 0.05$ )。凍結融解直後には有意差はみられなかったが、1時間保温後にはVCL、VAP、ALHおよびBCFが低下した ( $p < 0.05$ )。種雄牛ごとに調査した結果、種雄牛I1で融解後1時間のTMが低下し ( $p < 0.05$ )、また、種雄牛I3で融解直後のSTR、LIN、CURが有意に増加した ( $p < 0.05$ )。

#### 4. 要 約

本研究は、牛凍結精液の製造過程で抗酸化物質をあらかじめ添加することで、凍結融解時に精子が受ける酸化ダメージを低減させ、受精能を改善することが目的である。我々は、牛凍結精液希釈液への水溶性抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) や脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチン (Ax) やコエンザイム Q10 (COQ10) の添加による精子の運動性、DNAダメージ率 (DFI)、体外受精による胚発生率等、凍結精液の

品質や受胎性向上効果について検討を行った。その結果、GSH処理により前核形成までの段階が改善し、体外受精成績の低い精液に改善効果があることが示唆された。一方でGSH処理により精子のDFI値が非常に高くなる場合のあることが示唆された。GSH処理した精子の生存率および先体正常性に影響はみられず、体外受精由来胚盤胞期胚の品質への影響も特にみられなかった。また、体外受精胚を移植したところ正常な産子が得られた。難溶性抗酸化物質の希釈液への添加方法としてテトラヒドロフラン (THF) に融解する方法が有効と示唆された。AxおよびCOQ10添加により精子の運動性は37°C保温で若干上昇するが、4°C保存下では低下するなど添加効果は限定的であった。一方でAx高含有卵黄を利用して凍結した精子の運動性の明確な改善効果はみられなかった。以上の結果から、抗酸化物質の添加による精子の品質向上効果については、雄牛ごとの精子の特徴に影響されうること、難溶性抗酸化物質については溶媒に影響されることが明らかとなり、その効果的についてさらに検討していく必要がある。

#### 文 献

- 1) Gangwar, C., Saxena, A., Patel, A., Singh, S. P., Yadav, S., Kumar, R., Singh, V.: Effect of reduced glutathione supplementation on cryopreservation induced sperm cryoinjuries in Murrah bull semen, *Anim Reprod Sci*, **192**, 171~178, 2018.
- 2) Gualtieri, R., Barbato, V., Fiorentino, I., Braun, S., Rizos, D., Longobardi, S., Talevi, R.: Treatment with zinc, d-aspartate, and coenzyme Q10 protects bull sperm against damage and improves their ability to support embryo development, *Theriogenology*, **82**, 592~598, 2014.
- 3) 武田久美子: 精子核DNAダメージを利用した牛凍結精液品質評価の試み, *日本胚移植学雑誌*, **38**, 71~74, 2016.
- 4) Boesch-Saadatmandi, C., Rimbach, G., Jungblut, A., Frank, J.: Comparison of tetrahydrofuran, fetal calf serum, and Tween 40 for the delivery of astaxanthin and canthaxanthin to HepG2 cells, *Cytotechnology*, **63**, 89~97, 2011.



## 分娩後の空胎期間短縮をもたらす新規卵巣機能賦活化技術の開発研究

Development of novel method for reactivation of ovarian function in postpartum period that achieves shortening the open period

山 村 崇・阪 谷 美 樹

(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)

Takashi Yamamura and Miki Sakatani

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

The duration from parturition to first postpartum ovulation is directly associated with reproductive efficiency in domestic animals. Insufficient gonadotropin-releasing hormone (GnRH) /luteinizing hormone (LH) pulses due to the suckling stimulus and negative energy balance cause anovulation and incomplete development of the dominant follicle in cows in the early postpartum period and prolongation of calving intervals. Recent emerging evidence suggests that neurokinin B and its receptor, neurokinin-3 receptor (NK3R), plays a pivotal role in generating GnRH/LH pulse. Central and intravenous administration of NKB or NK3R-selective agonist, senktide, stimulates pulsatile LH secretion. Here we aimed to develop of a novel method for reactivation of ovarian function in postpartum period cows using a sustained release vaginal senktide capsule containing a mixture of mucoadhesive polymer and silicone fluid. The administration of 0.9 g senktide capsule for 24 h gradually augmented LH secretion during 0 to 4 h sampling period in lactating beef cows. Ultrasonography diagnosis of ovaries was performed to identify the first postpartum ovulation in senktide-administered lactating cattle. The interval from calving to first postpartum ovulation was 20 days in cattle treated with senktide capsule at 6 days postpartum, while it was 43 and 83 days in cattle treated with it at 10 days postpartum. Taken together, although doses, the duration and period of administration of NK3R agonist should be investigated in the future study, the results implicate that NK3R agonist via vaginal route may hold promise for noble therapeutic applications to achieve shortening open period in lactating cattle.

### 1. 目 的

家畜生産において、受胎率低下や分娩間隔の延長などにより、生産性が低下している。牛の分娩間隔は特に乳用牛で年々延長傾向にあり、牛群能力検定成績によると平成元年に平均410日程度で

あった分娩間隔が平成29年の時点で433日程度と約1ヶ月も延長している。肉用牛に関しては平均410日程度で推移しているものの、家畜改良増殖目標では分娩間隔を380日にすることが目標となっており、繁殖サイクルを短縮することが求められている。分娩間隔の延長の一因として、空胎

期間の延長があげられている。分娩後の吸乳刺激や負のエネルギーバランス状態になることにより、子宮修復や初回排卵の遅延、発情微弱・無発情等の繁殖障害を抱える個体は少なくなく、これらが空胎期間の延長に大きく寄与していることが考えられる。その中で、初回排卵の遅延には卵巣の卵胞発育の遅延や排卵障害が関与しており、これらの改善が生産性向上に向けての課題となっている。

ほ乳類において、繁殖機能は視床下部-下垂体-性腺軸によって制御されている。脳の視床下部で産生された性腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)は下垂体門脈血中へ放出され、下垂体に運ばれ黄体形成ホルモン(LH)などの放出を促進し、これらが卵巣などに作用することにより繁殖機能が制御されている。GnRHおよびそれに続くLHの分泌は、数十分ないし数時間の周期でパルス状に変動することが知られており、このパルス頻度が卵巣の活動を制御していると考えられている。乳牛では、優性卵胞はLHパルスが0.6~0.75回/時間で排卵するが、0.3回/時間では閉鎖することや、分娩後に授乳している肉牛ではLHパルス頻度が0.2回/時間程に抑制されていることが示されている<sup>1,2)</sup>。よって、LHパルスの頻度を人為的に制御することで、卵巣の機能を高めることができることが考えられた。

近年、脳の弓状核に存在し、GnRH/LHパルスを上位から制御していると考えられるKNDyニューロンが発見された。山羊を用いた電気生理学的手法を用いた試験により、KNDyニューロン近傍で周期的な神経発火活動の上昇が起き、それがLHのパルス状分泌と一対一で対応していたことから、その神経活動がGnRH/LHのパルス状分泌を制御している可能性が示されている<sup>3)</sup>。さらに、KNDyニューロンを構成する因子であるニューロキニンB(NKB)がこの神経活動を誘

起することが明らかにされている<sup>4)</sup>。加えて、分娩後の泌乳期である牛へNKB受容体作動薬(センクタイト)を血中持続投与すると、投与直後からパルス状LH分泌が亢進し、その後の初回排卵が15~25日程度早まることが示された<sup>5)</sup>。これらのことから、NKB受容体作動薬を用いることにより分娩後の卵巣機能を高め、卵胞発育や排卵を促進することにより分娩後の初回排卵に至るまでの期間を短縮できる可能性が示された。

本研究は、これらの成果をさらに発展させ、牛の分娩後の空胎期間の短縮を達成するため、分娩後の牛の卵巣機能を賦活化し初回排卵を促進するための最適なNKB受容体作動薬の投与条件を決定し、さらに簡便な投与方法の開発研究を行うことを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 供試牛

農研機構那須塩原事業場で飼養している分娩後の授乳中の黒毛和種4頭を供試した。冬期に実施した。いずれも初産であり、分娩時の月齢の平均は $32.0 \pm 2.9$ であった。母牛は分娩7日前に分娩房へ移動し、分娩後10日間は子牛同居の元で分娩房にて管理した。温度、明暗調節は行わず、自然条件下の屋内で自由飲水とし、給餌は1日2回(1回:濃厚飼料1.0kg, 乾草4.0kg)行った。分娩10日目以降は屋外のコンクリートパドックに移し、自由採食(乾草)、自由飲水条件で、集団の親子飼育を離乳時期(約90日まで)継続した。すべての試験は、農研機構動物実験等実施規則に則り行った。

### 2.2 NKB受容体作動薬徐放性製剤

NKB受容体作動薬としてセンクタイト(WuXi AppTec)を用いた。簡便な投与経路として腔内投与を検討し、山羊を用いた予備実験において腔内から血中への移行性が9割程度と推測でき、牛

においては50nmol/分でセンクタイトを血中持続投与するとLHパルスが亢進することを確認していることから、これを24時間投与するとし、0.9gのセンクタイトを用いた。また、センクタイトを徐放的に作用させるためシリコーンを基材とした徐放製剤とセンクタイトを混合し、000号ゼラチンカプセル2個に封入した。

### 2.3 投与具

センクタイトカプセルを腔内で安定的に維持するための投与具を用いた。投与具はシリコーン製で薬剤装填部位と前進駆動部からなり、投与具の先端が薬剤装填部位となっている。投与具は陰門より腔浅部に挿入し、挿入後は腔の脈動と投与具の構造により投与具が自ら前方に進み腔深部に滞留する仕組みとなっている。

### 2.4 分娩後の牛へのセンクタイト徐放製剤の投与試験

分娩日を0日とし、分娩後6～10日目に試験を行った。試験日前日に採血用のカテーテルを頸静脈の片側に留置した。センクタイトカプセルを投与具に装填したものを試験日の13:30に腔内へ挿入し、24時間後に抜去した。挿入日および抜去日の9:30～17:30(8時間)に12分おきに採血を行い、血漿を遠心分離により採取し、測定まで

-30℃で保存した。また、センクタイト投与後は2～3日おきに、排卵の指標となる血中プロゲステロン濃度測定のための採血と、初回黄体形成確認のため直腸検査ならびに超音波検査を行った。血中LH濃度測定は放射免疫測定法にて行い、血中プロゲステロン濃度測定は株式会社ビー・エム・エルに委託した。

## 3. 結果と考察

NKB受容体作動薬が経腔投与により卵巢機能を刺激しているかどうかの指標として、投与前後の血中LH濃度を観察した。投与前は低い数値で推移していた血中LH濃度が、投与後に徐々に上昇していった (Fig. 1A)。また、投与終了直前には、その上昇は収まっていたものの、パルス状のLH分泌が確認された (Fig. 1B)。これらのことから、牛においてもNKB受容体作動薬は腔内投与でも血中投与と同様LH分泌を刺激することが明らかとなった。作動薬として用いたセンクタイトは分子量842と比較的小さく、他のステロイド製剤と同様腔壁から吸収され作用したものと考えられる。作用部位に関しては、血液循環によりセンクタイトが脳の弓状核のKNDyニューロンを刺激した結果、GnRH/LH分泌が誘導されたものと推

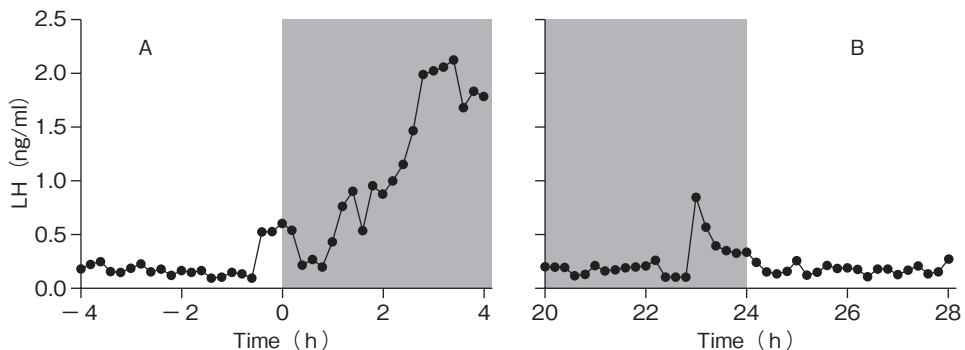


Fig. 1 Effects of 24-h infusion of the NKB receptor-selective agonist, senktide, on LH secretion in postpartum cows. A representative profile of LH concentrations in postpartum cows from -4 to 4 hours (A) and from 20 to 28 hours (B) after administration. The shaded area represents a period of administrations.

**Table 1** Effects of the NKB receptor-selective agonist, senktide, on the first postpartum ovulation in lactating cows

Cow No.	Treatment	Age of month	Treatment days after parturition	Days of animals showing corpus luteum	Days of plasma progesteron levels above 1 ng/ml
1	Senktide	26	6	20	26
2	Senktide	31	10	83	80
3	Senktide	44	10	43	NA

測されるが、ヒトにおいては卵巣顆粒膜細胞においてステロイド産生に関わるCYP11AとCYP19A1遺伝子発現を増加させる作用を持つことが知られている<sup>6)</sup>ことから、卵巣へ直接作用している可能性も排除できず、今後の研究が待たれる。投与後に徐々に血中LH濃度が上昇していることから、薬剤が徐放的に作用しており、徐放性製剤が有効であることを示している。抜去直前にLHパルスが確認されたが、これがセンクタイド刺激由来のものか自発的なものかの判断はつかないが、抜去後に投与具に装填した薬剤がすべて消失していたことから、薬剤が想定よりも早く溶け切り、効果が24時間続いていないことが考えられたため、今後は徐放性製剤の粘度を調整し、効果の持続性を高める必要があると考えられる。

センクタイド徐放性製剤投与による分娩後初回排卵を示す結果をTable 1にまとめた。分娩後初回排卵の指標として、超音波検査により黄体形成と血中プロジェステロン濃度を測定し、その濃度が1 ng/mlを超えた日を確認した。まず、本研究で用いた個体と同時期に分娩した同牛群 (n = 11) における平均初回排卵日は分娩後33.4 ± 8.5日 (平均 ± SE) であった。Cow No. 1においては、分娩後20日に黄体形成確認および26日にプロジェステロン濃度の上昇を確認し、早期の排卵を確認できた。一方、Cow No. 2とNo. 3においては、初回黄体確認日が83および43日であり、特にCow No. 2において排卵が牛群平均と比較しても遅れていることが分かった。これらの効果の表れ方の違いに関して、投与時における分娩後日数の違い

が影響していることが考えられた。排卵促進が見られた個体の試験日は分娩後6日であったのに対し、そうでなかった個体の試験日は分娩後10日であった。わずかな数日の違いではあるが、分娩後の肉牛では新しい卵胞波の出現が分娩後2週間程度で表れるとされ、分娩後10日の投与がこの卵胞波や初回優性卵胞の出現に悪影響を与えた可能性が考えられた。また、上記のとおり、薬剤が想定よりも強く作用している可能性が考えられ、予期せぬ反応が起きたことも考えられた。これらのことから、薬剤量や濃度だけでなく、投与時期が初回排卵日に及ぼす影響を検討し、確実に初回排卵を促進できる条件を決定する必要がある。

分娩後初回排卵促進において、GnRHやそのアナログを用いた方法が試みられているが、分娩後10～15日目の単回投与で排卵が見られたり見られなかったりとその効果が明確ではないが、これは投与時の優性卵胞の状態に左右されているものと考えられる。また、単回投与では卵胞発育よりも排卵への刺激となっており、卵胞が十分に発育していない質の良くない排卵となっていることが考えられる。本研究はセンクタイドにより卵胞発育を促すことにより正常な排卵を早期に誘起することを目的としており、適切な投与期間や量、タイミングを模索することで、従来の方法よりも優れた方法になることが期待される。

#### 4. 要 約

牛の分娩後の空胎期間短縮を達成するために、GnRH/LH分泌を促進する作用を持つNKB受容体

作動薬を経膈持続投与し、卵巢機能を賦活化させることによる、分娩後の初回排卵の促進効果を検討した。その結果、初回排卵が促進する個体があった一方、遅延する個体もあり、処置するタイミングや投与濃度が影響していることが示唆され、今後適切な投与量や投与時期を検討することで、新たな卵巢機能賦活法として利用できることが期待される。

#### 文 献

- 1) Beams, S. W., Bulter, W. R. : *Biol Reprod*, **56**, 133~142, 1997.
- 2) Canfield, R. W., Butler, W. R. : *Domest Anim Endocrinol*, **7**, 323~330, 1990.
- 3) Wakabayashi, Y., Nakada, T., Murata, K., Ohkura, S., Mogi, K., Navarro, V. M., Clifton, D. K., Mori, Y., Tsukamura, H., Maeda, K. I., Steiner, R. A., Okamura, H. : *J Neurosci*, **30**, 3124~3132, 2010.
- 4) Yamamura, T., Wakabayashi, Y., Ohkura, S., Navarro, V.M., Okamura, H. : *J Reprod Dev*, **61**, 20~29, 2015.
- 5) Nakamura, S., Wakabayashi, Y., Yamamura, T., Ohkura, S., Matsuyama, S. : *Biol Reprod*, **97**, 81~90, 2017.
- 6) Qi, X., Salem, M., Zhou, W., Sato-Shimizu, M., Ye, G., Smitz, J., Peng, C. : *Endocrinol*, **157**, 3355~3365, 2016.



# ホルモンおよび成長因子の複合添加培地を用いた 賦活培養による牛体外受精由来胚の着床能力向上 に関する研究

Study on improvement of implantation potential in bovine embryo derived  
from IVMFC by combined treatment with hormone and growth factor

高崎 久子・宍戸 容子・湯澤 裕史・松本 浩道\*・福井 えみ子\*・関澤 文夫\*\*

(栃木県畜産酪農研究センター, \*宇都宮大学, \*\*関沢アニマルクリニック)

Hisako Takasaki, Yoko Shishido, Hirohumi Yuzawa, Hiromichi Matsumoto\*, Emiko Fukui\*  
and Fumio Sekizawa\*\*

(Tochigi Prefectural Livestock & Dairy Experimental Center, \*Utsunomiya University, \*\*Sekizawa Animal Clinic)

The reduction in the number of Japanese black cattle means the technical development of efficient production using bovine embryos derived from *in vitro* Matured, fertilized and cultured (IVMFC) is a pressing need. The purpose of this study was to examine the effects of embryo development and implantation of bovine embryos cultured in culture medium (PEC) containing prolactin (PRL), epidermal growth factor (EGF), and 4-hydroxyestradiol (4-OH-E2) after IVMFC. The results of this study suggest that this medium of PEC restrain the early development of the bovine embryo. Compared with the control division, the number of cells in the morula or blastocyst stage increased. Moreover, when these embryos were transplanted, the conception rate tended to be higher than that with the control division.

## 1. 目 的

近年、和牛繁殖農家の戸数減少などにより子牛生産基盤の弱体化が見られ、生産頭数の減少による素牛価格の高騰が続いており、和牛子牛の増産技術の開発が求められている。その一つとして、と体卵巢を活用し、体外受精技術により作出された胚を用いて借腹移植により和牛子牛を生産する方法は、肥育素牛を低コストで増産する技術として注目されている。しかし、体外受精によって作出された胚は、体内胚に対し凍結保存時の耐凍能が劣り、受胎率も低い傾向が見られる（体内胚移植受胎率：新鮮卵50%，凍結卵49%，体外胚移植

受胎率：新鮮卵36%，凍結卵37%，平成27年度農林水産省調べ）ことから、子牛の増産技術として活用するためには、受胎成績の改善が必要である。

ところで、胚が着床する過程で、子宮内では多くの成長因子が作用し、胚の発達を促進させる。これまで、胚盤胞への成長を促成する多くの因子が同定され、栄養膜細胞の分化調整に対する細胞内シグナルに関する作用が報告されている<sup>1)</sup>。また、体外胚の受胎率は、胚盤胞の品質が低いことが着床に大きく影響していると言われており<sup>2)</sup>、胚の成長促進を働きかけることによって受胎率の改善が図られると考えられる。松本らは、哺乳類胚の着床に関する研究分野において、マウス胚の



着床能力獲得過程におけるタンパク質の発現や分解の制御機構に関する報告<sup>3)</sup>を行っており、この研究成果の一つとして、胚盤胞期胚をプロラクチン (PRL)、上皮成長因子 (EGF)、4ヒドロキシエストラジオール (4-OH-E<sub>2</sub>) の3つの成長因子を複合添加 (PEC処理) した培養系により賦活化し、着床能力に影響する遺伝子を活性化して関連するタンパク質の発現を促進させ、母体由来のシグナルに対する応答能力を高めることで、移植時の胚の着床能力を高める手法を構築している<sup>4)</sup>。

本研究では、牛体外胚の受胎能力を向上させるため、松本らがマウス胚に対して実施したPEC処理による成長因子の賦活処理を牛体外胚の作出時に応用し、胚の発生状況や遺伝子の発現を解析することで胚の発生および着床能力に対する効果の検討を行った。また、処理胚を実際に受胎牛に移植し受胎率の検証を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 体外受精卵の作出

#### 2.1.1 と場由来卵巣を用いた体外胚作出

と場由来卵巣より採取した卵子を5% (v/v) 牛胎児血清 (FBS)、0.02AU/mlFSH (共立製薬) および10 $\mu$ g/mlゲンタマイシン (SIGMA) を添加したTCM-199 (Thermo Fisher Scientific) 培養液を用いて38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>気相にて20時間の体外成熟を行い、その後IVF100媒精液 (機能性ペプチド研究所) で希釈した凍結融解精液 (1.0 $\times$ 10<sup>7</sup>/ml) とともに38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>気相で5時間媒精した。

#### 2.1.2 OPU (Ovum Pick-Up) による生体由来卵子からの体外胚作出

発情周期の任意の時期に未成熟卵をOPUにより採取した。センター飼養黒毛和種繁殖雌牛を供試し、供試牛は梓場に保定してキシラジン塩酸塩 (セラクター注2%, バイエル薬品) 10mgおよ

びプロカイン塩酸塩 (動物用塩プロ注「KS」、共立製薬) 100mgの尾椎硬膜外麻酔を行った。OPUは10MHzの経膈プローブを接続した超音波診断装置 (MyLabOneVET, Esaote Europe B.V. 社) と吸引装置 (FV 6, 富士平工業) に接続した17G $\times$ 540mmの採卵針 (アロカタイプ, ミサワ医科工業) を用いて一定の陰圧 (120mmHg, 20–25ml/分) で行った。超音波ガイド下にて採卵針を卵巣に誘導し、卵胞液とともに卵胞内卵母細胞を吸引した。回収液には10IU/mlヘパリンナトリウム (ヘパリンNa注10,000単位, 持田製薬), 0.1% (v/v) 子牛血清および抗菌薬を添加した乳酸加リンゲル液 (ハルゼンV注射液, 日本全薬工業) を用いた。

採取した卵子はと場由来卵巣からの卵子と同様の方法で体外受精を行った。

### 2.2 胚のPEC処理

PEC処理の効果および処理の最適な時期を検討するために、体外受精により発生した胚をPEC処理区と対照区の2群に分け、次の3つの添加実験を行った。なお、対照区は無添加 (実験1, 2および3) とした。

#### 2.2.1 発生培養初期 (Day 0) および後期桑実胚期 (Day 6) 添加区 (実験1)

媒精終了直後 (Day 0)、胚を卵丘細胞から完全に除去し、試験区はSOF-BE 1基礎培地へPEC処理して38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で24時間培養後、Day 1にSOF-BE 1基礎培地 (無添加) にて38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で5日間培養し、さらにDay 6に後期桑実胚まで発生している胚をSOF-BE 1基礎培地へPEC処理して38.5 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で24時間培養した。

#### 2.2.2 発生培養初期 (Day 0) 添加区 (実験2)

媒精終了後 (Day 0)、胚を卵丘細胞から完全に除去し、試験区はSOF-BE 1基礎培地へ、PEC

処理して、38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で24時間培養後、Day 1にSOF-BE 1基礎培地（無添加）にて38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で5日間培養した。

### 2.2.3 後期桑実胚期（Day 6）添加区（実験3）

媒精終了後（Day 0）、SOF-BE 1基礎培地にて38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で6日間培養し、Day 6に桑実胚期以上の発育ステージの胚を試験区と対照区に区分し、試験区はSOF-BE 1基礎培地へPEC処理して24時間培養し、Day 7および8に胚盤胞期胚を得た。

対照区（実験1、2および3）は媒精終了後（Day 0）、SOF-BE 1基礎培地（無添加）にて38.5℃、5%CO<sub>2</sub>、5%O<sub>2</sub>気相で7—8日間培養し、Day 7および8に胚盤胞期胚を得た。

なお、OPUによる採取卵についても、体外受精後に実験3と同様の処理を行った。

### 2.3 EGFRおよびBRCA 1の発現分析

実験3で胚盤胞期胚まで発生した胚の一部について、免疫蛍光染色法によりEGFRおよびBRCA 1の発現に関する分析を行った。胚はInternational Embryo Technology Society (IETS) マニュアルで定められている基準に従って評価し、発生培養7日目にcode 1と評価した胚盤胞期胚を分析に用いた。免疫蛍光染色は既報<sup>3,4)</sup>に従った。Ca<sup>2+</sup>およびMg<sup>2+</sup>を含まないダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS）で調整した3.7%ホルムアルデヒド液で胚を30分間固定し、0.25% Tween20のD-PBSで5分間透過処理し、免疫蛍光染色に供するまで4℃で保存した。BRCA 1に特異的な一次抗体（Santa Cruz Biotechnology）D-PBSで数回洗浄した後、胚を室温でFITC標識（MP Biomedicals）MP二次抗体とともに室温で1時間反応させた。次いで、胚を室温で5 μg/mlのヘキスト33342（SIGMA）で1時間染色し、洗浄

し、ガラスボトムディッシュ（日本ジェネティクス）に載せ、共焦点レーザー走査顕微鏡（Leica TCS SP8, Leica Microsystems）で観察した。

### 2.4 胚移植および妊娠診断

実験3で胚盤胞期胚まで発生した胚のうち、code 1と評価され発現解析に用いたもの以外の胚について移植を行った。受胎牛にはホルスタイン種を用いて、発情から6—8日後に黄体側の子宮角に新鮮胚を1個移植した。移植には牛受精卵深部注入カテーテルYTガン（ヤマネテック）を用いた。移植後、発情から40—60日後に直腸検査法による妊娠診断を行った。

## 3. 結果と考察

実験1、実験2および実験3を比較しPEC処理の効果と最適時期を検討した。実験1のPEC処理区では68個の卵子を体外受精し媒精終了直後（Day 0）およびDay 6の2回PEC処理を行ったが、対照区で76個の卵子に対しDay 6の時点で17個（22.4%）の桑実胚を得たのに対し、PEC処理区は桑実胚まで発生したものは0個（0.0%）であり、その後の発生も認められなかった。実験2の媒精終了後（Day 0）のみPEC処理を行った区でも、実験1と同様にPEC処理区では桑実胚以上の発生は認められなかった。また、実験2では対照区と比較してPEC処理区では有意に分割率が低かった（Table 1）。

これに対し、実験3では、Day 6の後期桑実胚期に24時間のPEC処理を行った処理区において、Day 7に胚盤胞まで発生した胚数が対照区よりも多い結果であり（Table 2）、また、細胞数においても有意差は認められないものの対照区と比較してPEC処理区で細胞数が多い傾向が見られた（ $p < 0.18$ ）（Table 3）。

なお、OPUは延べ5頭の黒毛和種繁殖雌牛に対し実施し72個（平均14.4個）の培養可能卵子を

**Table 1** Effect of 3-factor composite addition in vitro development of the early bovine embryos

Day		Day 0	Day 2	Day 6	Day 7	Day 8
Treatment		No. of embryos	No. of cleaved embryos	No. of morulae	No. of blastocysts	No. of blastocysts
Exp. 1	Control	68	36 (52.9%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	PEC	76	50 (65.8%)	17 (22.4%)	7 (9.2%)	15 (19.7%)
Exp. 2	Control	42	5 (11.9%) a	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)
	PEC	45	18 (40.0%) b	8 (17.8%)	7 (15.6%)	9 (20.0%)

a, b Values with different superscript letters within a column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 2** Effect of 3-factor composite addition in vitro development of bovine embryos (Exp. 3)

Day	Day 0	Day 2	Day 6	Day 7	Day 8
Treatment	No. of embryos	No. (%) of cleaved embryos	No. of morulae	No. of blastocysts	No. of blastocysts
Control	386	228 (59.1)	54 (28.0)	31 (16.1) a	32 (16.6)
PEC			54 (28.0)	20 (10.4) b	24 (12.4)

a, b Values with different superscript letters within a column differ significantly ( $p < 0.05$ ).

**Table 3** Blastocysts cell number on Day 7 and 8 (Exp. 3)

Day	Day 7		Day 8		total	
	No. of blastocysts	cell number	No. of blastocysts	cell number	No. of blastocysts	cell number
Control	10	121.7 ± 13.2	5	119.0 ± 38.2	15	120.8 ± 15.5
PEC	16	148.5 ± 11.6	2	55.5 ± 3.2	18	138.2 ± 12.4

得た。これを体外受精した結果、Day 2において2細胞以上に発生が進んだ胚は17個(23.6%)にとどまり、Day 7—8で胚盤胞まで発生したのは0個であった。今回、OPUにより採取した卵子からの胚の発達が悪かった点については、今後培養方法も含め検討する必要があると考える。

以上の結果から、PEC処理による牛体外胚への効果は次のとおり考察される。今回用いた3因子複合添加剤のうちの1因子であるEGFにおいては、卵胞液や雌生殖器に存在することが知られており<sup>5,6)</sup>、培地に添加することで胚盤胞発生率の向上や細胞数増加効果があると報告されている<sup>7-9)</sup>。

このEGFは細胞表面の受容体に結合し、受容体に備わるタンパク質チロシンキナーゼ活性を刺激し、これによりシグナル伝達カスケードを開始して、最終的にDNA合成、細胞増殖などに関与する<sup>10)</sup>。これまでの報告でも、EGFの培養液への

添加は卵子から胚盤胞への発生率を有意に高める<sup>7,8,11)</sup>と報告されている。このような報告から実験1および2においてもPEC処理区の発生率が高まることが期待されたが、今回の実験では胚盤胞への発生が認められなかった。このことから、初期胚においてはPRLまたは4-OH-E<sub>2</sub>が、もしくは3因子の複合添加が発生に抑制的に働く可能性があると考えられる。しかし、実験3においてはDay 7における胚盤胞数がPEC処理区で有意に多く、細胞数の多い胚盤胞胚が多く得られる傾向があったことから(Fig. 1)、胚盤胞期のPEC処理は胚の発生を促進している可能性があると思われる。今後は、さらに牛胚培養時における最適な添加濃度の検討も課題であると考えられる。

また、得られた胚盤胞胚のEGFRおよびBRCA1の発現について分析したところ、PEC処理区と対照区で差は認められなかった。マウスにおいて

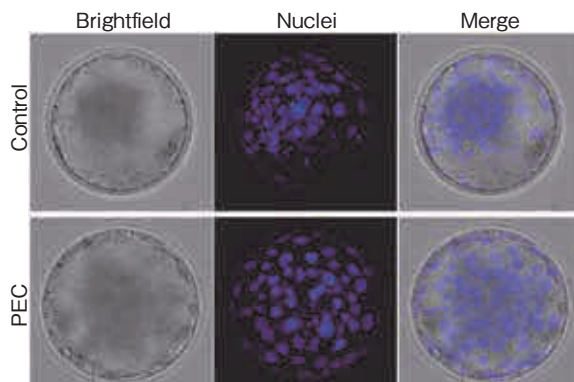


Fig. 1 Morphology and nuclear stain in bovine blastocysts derived from IVMFC. Blastocysts obtained by control and PEC were examined on day 8 and day 7, respectively.

は胚盤胞をPRL, EGF, 4-OH-E<sub>2</sub>を複合添加した培養系により, 着床能力に影響する遺伝子を活性化して, 関連するタンパク質の発現を促進させ, 母体由来のシグナルに対する応答能力を誘導し, 移植時の胚の着床能力を高める手法が報告されている<sup>4)</sup>。3つの因子とも, マウス胚盤胞の栄養外胚葉において, BRCA 1の発現を促進させるが, それぞれ単独では異なるタンパク質の発現を促進させる。PRLとEGFはともにEGF受容体の発現を誘導させるが, PRLはEGFRの発現に作用するのに対し, EGFはEGFRとERBB 4の発現を賦活化させる。一方で4-OH-E<sub>2</sub>は基底膜の構成成分であるTINAGL 1の発現を賦活化させる。しかしながら牛胚におけるPRLや4-OH-E<sub>2</sub>の作用については未解明な点が多い。牛体外受精由来胚の着床能力を向上させる手法を構築するために, 今後は牛胚における3つの因子の作用機序の解析を進める方向性が示唆された。また, 本試験では得られた胚盤胞胚のうち良質胚を移植試験に用いており, 免疫蛍光染色法による分析は一部胚に限って実施したことから, 今後は検体を集積し十分に精査していく必要があると考えられた。

得られた胚盤胞胚の受胎性評価について, ホル

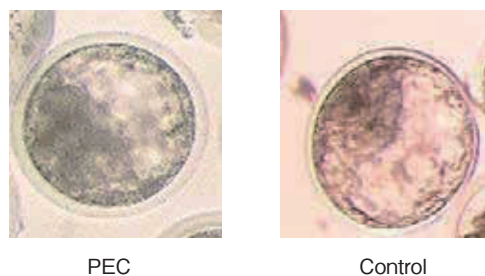


Fig. 2 Transplanted blastocyst

スタイン雌牛にPEC処理区と対照区のそれぞれの胚 (Fig. 2) を移植し受胎率を調査した。受胎率はそれぞれ37.5% (5/8), 0.0% (0/5)であり, 有意差は認められないもののPEC処理区のほうが高い傾向であった ( $p < 0.12$ )。しかし, 胚移植の受胎率に関する要因は胚の品質だけではなく, 受胎牛の状態や移植手技も関連することから<sup>12)</sup>, さらに検体を集積することで精査していきたい。

#### 4. 要 約

本研究では, 牛体外胚の受胎能力を改善させるため, 体外胚を, 着床に重要な基底膜形成等の成長促進因子やホルモンなどであるPRL, EGFおよび4-OH-E<sub>2</sub>の3因子複合添加した培養系で処理し, 胚の発生および着床能力に対する効果の検討

を行った。初期胚において3因子の培地への複合添加は発生に抑制的に働くことが示唆された(実験1, 2)が, 桑実胚期~胚盤胞期胚における3因子の複合添加は, 細胞増殖が促進され, 細胞数の増加や胚盤胞への発育速度が速まる可能性が示唆された(実験3)。また, これらの処置を施した胚の移植では無添加区と比較して, 受胎率が高い傾向があった。

しかし牛体外胚におけるPRLや4-OH-E<sub>2</sub>の作用については未解明な点が多く, 着床能力を向上させる手法を構築するために, 今後は牛体外胚における3つの因子の作用機序を解析するとともに添加剤の牛胚における最適濃度の検討も課題であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Yoshinaga, K. : *Am J Reprod Immunol*, **63**, 413~424, 2010.
- 2) Urman, B., Yakin, K., Balaban, B. : *Reprod Biomed Online*, **11**, 371~381, 2005.
- 3) Saito, K., Furukawa, E., Kobayashi, M., Fukui, E., Yoshizawa, M., Mastumoto, H. : *Mol.Hum.Reprod.*, **20**, 384~391, 2014.
- 4) Takeuchi, M., Seki, M., Furukawa, E., Takahashi, A., Saito, K., Kobayashi, M., Ezoe, K., Fukui, E., Yoshizawa, M., Mastumoto, H. : *Mol.Hum.Reprod.*, **23**, 557~570, 2017.
- 5) Ohtani, S., Okuda, K., Ohtani, M., Yamada, J. : *J Vet Med Sci*, **58**, 1211~1217, 1996.
- 6) Katagiri, S., Takahashi, Y. : *Theriogenology*, **62**, 103~112, 2004.
- 7) Lonergan, P., Carolam, C., Langendonck, A. V., Donnay, I., Khatir, H., Mermillod, P. : *Biol Reprod*, **54**, 1420~1429, 1996.
- 8) Sirisathien, S., Brackett, B. G. : *Mol Reprod Dev*, **65**, 51~56, 2003.
- 9) Sirisathien, S., Hernandez-Fonseca, H. J., Brackett, B. G. : *Anim Reprod Sci*, **77**, 21~32, 2003.
- 10) Graham, C., Stanley, C. : *J Biol Chem*, **14**, 7709~7712, 1996.
- 11) Yang, B. K., Yang, X., Foote, R. H. : *Theriogenology*, **40**, 521~530, 1993.
- 12) 小林大誠, 久保田尚, 千葉耕司, 山下秀幸 : 千葉畜七研報, **13**, 15~20, 2013.



## 分娩後のプロスタグランジン製剤投与が牛子宮修復の促進およびその後の繁殖機能に及ぼす影響

Stimulatory effects of prostaglandin administration on bovine uterine involution and its subsequent effects on reproductive function

伊 賀 浩 輔

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター畜産飼料作研究領域)

Kosuke Iga

(Division of Livestock and Forage Research, Tohoku Agricultural Research Center, NARO)

The aim of the present study was to evaluate the effects of dinoprost on uterine involution in Japanese black cows and its subsequent effects on fertility after parturition, and the effect of physiological uterine function recovery on 35 and 40 days after parturition using oxytocin\_(OT)\_challenge test. Administration of dinoprost on 14 days after parturition had no effect shortening the days of morphological uterine involution and first ovulation but showed a tendency ( $p < 0.07$ ) to promote the elimination of lochia. The days of standing heat, first artificial insemination (AI) and embryo transfer (ET) also had no shortening effect. In addition, the conception rate after the first AI or ET showed a higher value (75.0%) than the control group (50.0%), but there was no significant difference. On the other hand, in the physiological uterine function recovery at 35 days after parturition, the prostaglandin F metabolite (PGFM) production rate from 15 min after OT load was significantly higher ( $p < 0.05$ ) than that at 0 minutes with and without administration of dinoprost. The PGFM production rate after administration of dinoprost tended to be higher ( $p < 0.06$ ) than that in the control group. At 40 days after parturition, the PGFM production rate from 15 min after OT load tended to be higher ( $p < 0.09$ ) than that at 0 minutes. A similar transition pattern was shown regardless of whether dinoprost was administered or not. Based on these findings, in Japanese black cows under natural feeding after normal parturition, administration of dinoprost on 14 days after parturition promotes the elimination of lochia during the uterine involution process, and it was suggested that physiological uterine function may be recovered to normal condition at 35 days after parturition. By establishing a more effective administration method in the future, it is expected that the uterine involution will be promoted and that the fertility will be recovered early, and then the delivery interval will be shortened.

### 1. 目 的

近年、牛肉や乳製品の国内需要の増加への対応と輸出の一層の拡大のため、畜産・酪農の生産基

盤強化が行われている。和牛・乳用牛の増頭対策として、輸出に適した優良な黒毛和種増産のため、繁殖雌牛の増頭や受精卵の増産が進められている。子畜の生産性向上のためには繁殖雌牛の効



率的な利用が必須となることから、分娩後に早めかつ正常に卵巣と子宮を回復させ、遅滞なく繁殖技術を適用する必要がある。

牛の子宮修復は飼養環境や分娩に伴う疾病の有無により完了する時期は変動するが、正常分娩後30～45日の生理的空胎期間を経て形態的な子宮修復が完了する。分娩直後に高濃度な内因性のプロスタグランジンF<sub>2</sub>α (PGF<sub>2</sub>α) は日数経過に伴い急激に減少し、その後低値を推移する。PGF<sub>2</sub>αは平滑筋収縮作用を有することから、分娩後の持続的な子宮収縮に伴い後産や悪露の排出を促すとともに、妊娠により拡張した子宮や子宮動脈を妊娠前の状態へと修復する。

自然哺乳下の黒毛和種において、分娩後0日の内因性PGF<sub>2</sub>α濃度が高い牛群は悪露の排出も早く、分娩後40日には子宮修復が完了し、さらに、生理的な子宮機能の一部がすでに回復していることを明らかにしている<sup>1)</sup>。また、Nakaoら<sup>2)</sup>は胎盤停滞を発症したホルスタイン種において、持続型のPGF<sub>2</sub>α製剤(フェンプロスタレン)の投与が子宮修復、卵巣周期の再開およびその後の繁殖性の改善に効果があることを報告している。これらの結果から、PGF<sub>2</sub>αは分娩後の子宮修復を促す重要な因子であることが考えられる。

そこで本研究では、正常分娩した自然哺乳下の黒毛和種を供試し、分娩後の子宮修復過程における天然型のPGF<sub>2</sub>α製剤(ジノプロスト)の投与が子宮修復や生理的な子宮機能の回復やその後の繁殖性に及ぼす影響を明らかにし、牛の繁殖サイクルを維持しながら生理的空胎期間内に子宮修復、卵巣周期の再開および子宮機能の回復を促し、1年1産を達成するための分娩間隔短縮技術の開発へと繋げることを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与がその後の形態的な子宮修復、悪露の排出、初回排卵、初回発情、初回人工授精あるいは受精卵移植日およびその後の受胎率に及ぼす影響

正常分娩後、自然哺乳下の黒毛和種経産牛8頭を供試し、分娩後14日に子宮修復を促すため4頭にジノプロスト(パナセランHi, Meiji Seikaファルマ(株))を30mg筋肉内投与(ジノプロスト区)し、4頭は無投与(対照区)とした。いずれの試験区においても、分娩後0から40日まで5日ごとに超音波画像診断装置を用い、形態的な子宮修復の完了(左右の子宮角中央部直径が同等となる日)、悪露の排出、初回排卵(排卵あるいは黄体形成の有無)の時期を調べた。初回発情の発見は朝夕2回30分程度の目視による観察および発情発見補助具(エストロテクト:野澤組)による乗駕行動を確認し発情日を確定した。また、初回発情を確認した供試牛については、人工授精(AI)あるいは発情後7日に受精卵移植(ET)を実施し、AI後30日、あるいはET後28日に超音波画像診断装置を用い妊娠診断(妊娠腔および胎子心拍の確認)を行い、分娩後14日でのジノプロストの投与がその後の受胎率に及ぼす影響を調べた。なお、本研究では、休薬期間の設定されている持続型のPGF<sub>2</sub>α製剤であるdl-クロプロステノールではなく、休薬期間がなく、用法に子宮平滑筋の収縮作用による産後疾患の治療が記載されている天然型のPGF<sub>2</sub>α製剤であるジノプロストを用いた。

### 2.2 分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与がその後の生理的な子宮機能の回復に及ぼす影響

分娩後35および40日にオキシトシン(OT)負

荷による子宮からの一過性のPGF $2\alpha$ 産生促進作用を指標とした機能評価法を用い、分娩後14日でのジノプロストの投与がその後の生理的な子宮機能の回復に及ぼす影響を調べた。頸部静脈より100単位OT（動物用アトニン-O，あすかアニマルヘルス株）を投与し負荷を行い、負荷後0，15，30，60および90分にヘパリン加真空採血管を用い頸部静脈より採血した。血液サンプルは遠心分離（1930x g，4℃，60分）後に血漿層を採取し、PGF代謝産物（PGFM）の測定まで-35℃で保存した。血漿中のPGFMは、エーテル抽出・乾固後、1%牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液で調整し測定サンプルとした。測定は酵素免疫測定法を用いPGFM濃度を測定した。OT負荷後15から90分のPGFM濃度は0分の濃度に対する百分率に換算し、PGFM産生割合の推移より子宮機能の回復を評価した。

### 3. 結果と考察

3.1 分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与がその後の形態的な子宮修復，悪露の排出，初回排卵，初回発情，初回人工授精あるいは受精卵移植日およびその後の受胎率に及ぼす影響

ジノプロスト区における分娩後の形態的な子宮修復の完了および初回排卵時期（ $30.0 \pm 0.0$ および

$28.8 \pm 2.4$ 日）は対照区（ $33.8 \pm 2.4$ および $31.3 \pm 2.4$ 日）と比較して短縮されたが，両区に有意な差は認められなかった。しかしながら，悪露の排出時期は対照区と比較して早い傾向（ $p < 0.07$ ）を示した。ジノプロスト区における分娩後の初回発情および初回AI，あるいはET時期（ $49.8 \pm 5.7$ および $56.0 \pm 10.1$ 日）は対照区（ $55.8 \pm 9.7$ および $65.3 \pm 7.0$ 日）と比較して短縮されたが，両区に有意な差は認められなかった。また，ジノプロスト区における初回AI，あるいはET後の受胎率（75.0%）は対照区（50.0%）と比較して高い値を示したが，有意な差は認められなかった（Table 1）。

3.2 分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与がその後の生理的な子宮機能の回復に及ぼす影響

分娩後35日では，いずれの試験区においてもOT負荷後15分以降のPGFM産生割合は0分と比較して有意（ $p < 0.05$ ）に高く，また，ジノプロスト区におけるPGFM産生割合の推移は対照区と比較して高く推移する傾向（ $p < 0.06$ ）が認められた。一方，分娩後40日では，いずれの試験区においてもOT負荷後15分以降のPGFM産生割合は0分と比較して高い傾向（ $p < 0.09$ ）を示し，また，いずれの試験区においてもOT負荷後のPGFM産生割合は同様の推移パターンを示した（Fig. 1）。

**Table 1** Effect of dinoprost administration at 14 days after parturition on the days (mean  $\pm$  SE) of completion of morphological uterine involution, elimination of lochia, confirmation of first ovulation or corpus luteum (CL), first standing heat, first artificial insemination (AI) or embryo transfer (ET) and conception rate in Japanese black cows.

Ex. group	n	Completion of morphological uterine involution	Elimination of lochia	Confirmation of first ovulation or CL	First Standing heat	First AI or ET	Conception rate (%)
Control	4	$33.8 \pm 2.4$	$38.8 \pm 2.4^a$	$31.3 \pm 2.4$	$55.8 \pm 9.7$	$65.3 \pm 7.0$	50.0
Dinoprost	4	$30.0 \pm 0.0$	$32.5 \pm 1.4^b$	$28.8 \pm 2.4$	$49.8 \pm 5.7$	$56.0 \pm 10.1$	75.0

Dinoprost (30 mg) was administered intramuscularly at 14 days after parturition.

<sup>a, b</sup>:  $p < 0.07$

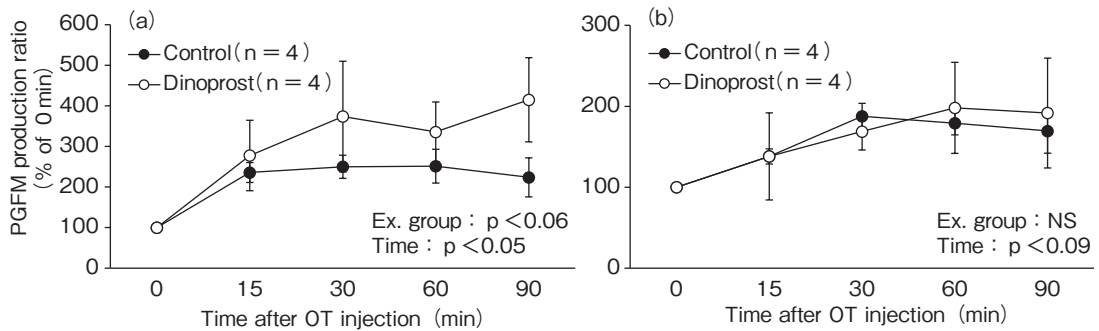


Fig. 1 Effects of dinoprost administration on 13,14-dihydro-15-keto prostaglandin  $F_{2\alpha}$  (PGFM) production rate after oxytocin (OT) challenge test at 35 (a) and 40 (b) days after parturition. Dinoprost (30 mg) was administered intramuscularly at 14 days after parturition. Meanwhile, 100 iu OT were administered intravenously for oxytocin challenge test.

本研究の結果から、分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与により、子宮修復過程における悪露の排出が促され、分娩後35日には生理的な子宮機能は回復し、OT負荷に対する反応性も高いことが示唆された。乳用牛において、分娩後の初期にPGF  $2\alpha$  の単回投与により子宮修復を促し、受胎可能な卵巣周期の回復を早めることが報告されている<sup>3,4)</sup>。また、分娩後14~28日でのジノプロストトロメタミンの単回投与により初回AI後の受胎率は向上する<sup>5)</sup>。この向上効果は、特に、ジノプロストトロメタミン投与時の血中プロゲステロン濃度が0.5ng/ml未満の牛群に見られることから、ジノプロストトロメタミンによる黄体退行の効果ではなく、子宮筋の収縮により子宮修復が促進された効果であることが示されている<sup>5,6)</sup>。これらのことから、本研究においても、機能性黄体が存在しない分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与により、子宮筋が収縮し悪露の排出が促された結果、初回AI、あるいはET後の受胎率も高くなった可能性が推察される。一方、OTは黄体退行調節機構に重要な役割を果たし、子宮からのPGF  $2\alpha$  分泌を促進することが知られている。OT負荷後、子宮からのPGF  $2\alpha$  分泌は発情周期の時期で異なり、その差違は卵巣ス

テロイドホルモン環境の変化に伴うOT受容体の発現に関与することが報告されている<sup>7,8)</sup>。OT負荷を利用した分娩後の子宮機能の回復評価においては、形態的な子宮修復完了前後から機能回復は進行し、少なくとも分娩後40日には回復することが示されている<sup>1)</sup>。これらのことから、分娩後14日の黒毛和種へのジノプロストの投与により、分娩後35日には形態的な子宮修復や悪露の排出は完了し、初回排卵も生じていることから、臨床所見からも子宮は妊娠前の状態へと回復していることが十分に考えられる。これに対して、対照区においては、悪露の排出は完了しておらず妊娠前の状態へと回復途中であることがうかがえる。いずれの試験区においてもOT負荷に対するPGFM産生の有意な反応は有するが、子宮内環境の回復状況の違いからPGFM産生割合の推移パターンに違いが生じたものと推察される。今後、さらに効果的な投与時期や量などを確立することで、分娩後の子宮修復を促し、早期の繁殖機能の回復や分娩間隔の短縮が期待できる。

#### 4. 要 約

本研究では、正常分娩後の自然哺乳下の黒毛和種経産牛を供試し、分娩後14日にPGF  $2\alpha$  製剤で

あるジノプロストの投与による子宮修復過程およびその後の繁殖性に及ぼす影響を調べるとともに、分娩後35および40日に生理的な子宮機能の回復状況をOT負荷後のPGFM産生割合の推移を指標とした機能評価法で調べた。その結果、形態的な子宮修復の完了および初回排卵時期は対照区（無投与）と比較して有意な差は認められないが、悪露の排出時期は早い傾向（ $p < 0.07$ ）を示した。分娩後の初回発情および初回AI、あるいはET時期においては、対照区と比較して有意な差は認められなかった。また、初回AI、あるいはET後の受胎率においては、対照区（50.0%）と比較して高い値（75.0%）を示したが有意な差は認められなかった。一方、生理的な子宮機能の回復状況において、分娩後35日では、OT負荷後15分以降のPGFM産生割合は0分と比較して有意（ $p < 0.05$ ）に高く、また、ジノプロストの投与によるPGFM産生割合の推移は対照区と比較して高く推移する傾向（ $p < 0.06$ ）が認められた。分娩後40日では、35日と同様にOT負荷後15分以降のPGFM産生割合は0分と比較して高い傾向（ $p < 0.09$ ）を示すとともに、ジノプロスト投与の有

無に関わらず同様の推移パターンを示した。以上のことから、正常分娩後の自然哺乳下の黒毛和種において、1) 分娩後14日にジノプロストの投与により子宮修復過程における悪露の排出が促されること。2) 分娩後35日には生理的な子宮機能は回復し、OT負荷に対する反応も高いことが示唆された。今後、さらに効果的な投与法を確立することで、分娩後の子宮修復を促し、早期の繁殖機能の回復や分娩間隔の短縮が期待できる。

#### 文 献

- 1) 伊賀浩輔：日本胚移植学雑誌 35, 117~122, 2013.
- 2) Nakao, T., Gamal, A., Osawa, T., Nakada, K., Moriyoshi, M., Kawata, K. : *J Vet Med Sci*, 59, 791~794, 1997.
- 3) Lindell, J. O., Kindahl, H. : *Acta Veterinaria Scandinavica*, 24, 269~274, 1983.
- 4) Young, I. M. : *Vet Rec*, 124, 511~512, 1989.
- 5) Young, I. M., Anderson, D. B., Plenderleith, R. W. : *Vet Rec*, 115, 429~431, 1984.
- 6) Garcia-Villar, R., Marnet, P. G., Laurentie, M. P., Toutain, P. L. : *Theriogenology*, 28, 467~480, 1987.
- 7) Mayer, H. H., Mittermeier, T., Schams, D. : *Acta Endocrinol*, 118, 96~104, 1988.
- 8) Goff, A. K. : *Biol Reprod*, 71, 11~16, 2004.

## 繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響（Ⅱ）

Effect of nutrition control on superovulation response and the number of recovered embryo in heifer（Ⅱ）

林 武司・深水 大・上田 修二・磯崎 良寛

（福岡県農林業総合試験場畜産部）

Takeshi Hayashi, Dai Fukamizu, Shuji Ueda and Yoshihiro Isozaki

（Department of Animal production, Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center）

The purpose of this study was to examine the effect of controlling nutritional status (low to high nutrition) on the number of small and medium follicles in the ovaries, the response to superovulation, and the number of normal fertilized oocytes in Japanese Black cows. Nine Japanese Black cows were fed for 2 weeks in a low nutritional state (TDN : 90% , CP 105%) for 2 weeks, and changed to a high nutritional diet (TDN : 115% , CP : 160%), and after one week, CIDR was inserted. Thereafter, superovulation treatment was performed, and periodic artificial insemination and uterus flush were performed. The control group was fed the standard nutrients (TDN : 106% , CP : 140%) for the same period as the test group. There was no difference between test group and the control group in body weight change during the test period. After the change to high nutrition, BUN increased in test group. Although the number of small and medium follicles did not change during the low nutrition period, the number of small and medium follicles in the test group increased numerically after changing to high nutrition. However, the number of large follicles due to superovulation was not different between the two groups. About uterus flush results, there was no difference in the number of oocytes obtained by embryo collection, but the number of normal fertilized embryos was higher in test group, although there was no significant difference. The number of non-fertilized oocytes was significantly higher in the control group. As a result, pre-superovulatory nutritional control in Japanese Black cows increases small-medium follicle but does not affect follicular development responsiveness after superovulation. On the other hand, it was suggested that pre-superovulatory nutritional control may reduce the rate of non-fertilization and increase the number of normal fertilized embryos.

### 1. 目 的

家畜の生産性向上のために、畜産農家では牛群能力の改良が随時行われている。一般的には人工授精による雄側からの改良と、過剰排卵処置によ

る体内受精胚の採胚による雌側からの改良である。しかしながら、過剰排卵処置におけるホルモン投与に対する卵巣の反応性は個体差が大きく、採胚成績は安定していないのが現状である。

過剰排卵処置と卵巣内卵胞数の関係性について



福田らは処置前の小卵胞数と処置後の大卵胞数と相関が高いことを明らかにしている<sup>1)</sup>。また山之内らは乳牛未経産牛において給与飼料を低TDNからの高TDNへの切替えは卵巣内の小中卵胞数を増加させることを報告している<sup>2)</sup>。これらの報告から、申請者は昨年度黒毛和牛雌牛（経産牛）を用い、低TDN（92%）を2週間給与後、高TDN（120%）に切り替えるとともにCIDR挿入を行い、6日後にFSHの漸減投与等の過剰排卵処置を実施し、卵胞数の推移、採胚成績等を調査した<sup>3)</sup>。その結果、高TDNへの切替え後6日目で小中卵胞数の増加傾向がみられたが、その後過剰排卵処置による大卵胞数の増加にはつながらなかった<sup>3)</sup>。これらは低TDNから高TDNへの切替えが急激であること、また高TDNへの移行から過剰排卵処置までの期間が短いことが原因ではないかと考えられた。そこで本年度では栄養コントロール方法について低TDNから高TDNへ切替えからCIDR挿入までに1週間期間を設置し、さらに高TDNの値を見直した（昨年度：高TDN120%、本年度：高TDN115%）。この新しい栄養コントロール方法が卵胞数や採胚成績に及ぼす影響について調査した。

## 2. 方法

### 2.1 栄養コントロールと試験開始のタイミング

栄養コントロールと、試験開始のタイミングについてFig. 1に示した。試験開始前に試験牛体重を測定し、必要養分量を計算したうえで、試験牛の標準栄養量（TDN：106%、CP：140%）、低栄養量（TDN：90%、CP：105%）、高栄養量（TDN：115%、CP：160%）を設定した。試験開始1週間前から標準栄養量の飼料を給与し馴致期間を設けた。試験開始から試験区では2週間低栄養量を給与した後、高栄養量に変更した。さらに変更から1週間後にCIDR挿入を行い、採胚による試験終了まで高栄養量状態を維持した。対照区は基準栄養量を試験期間中給与した。

### 2.2 試験牛の頭数および体重測定・血液検査

試験牛は福岡県農林業総合試験場において飼養されている黒毛和種雌牛9頭を用い、試験区と対照区を反復して試験を実施した。過剰排卵処置からの回復期間として、各試験の反復間は2ヵ月以上の休止期間を設けた。体重測定および血液分析用の採血は飼料給与から2時間後とし、試験開始から1週間ごとおよび採胚日に実施した（D0、D7、D14、D21、D28、D35、D38）。体重に

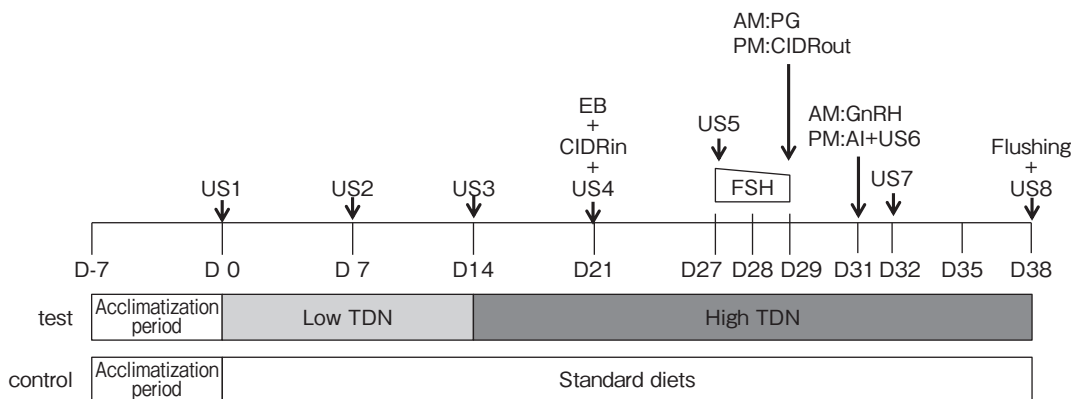


Fig. 1 Schematic illustration of the superovulation protocol and diets stage in embryo donors



については個体差の影響を除外するために、試験開始時を起点として、体重増減について記録した。

### 2.3 過剰排卵処置および採胚、採取胚の処理

過剰排卵処置についてFig. 1に示した。試験開始をD 0として、D 21にCIDR (Zoetis)を挿入しCIDR挿入後6日目 (D 27) からFSH (アントリンR: 18AU) (共立製薬株式会社)を漸減投与した。CIDR挿入後8日目 (D 29)の朝にPGF<sub>2α</sub> (ダルマジン) (共立製薬株式会社)を3ml筋肉注射し、同日の夕方にCIDRを除去した。PGF<sub>2α</sub>投与から48時間後 (D 31)にGnRH (エストマール) (インターベット) 4ml投与し同日の夕方に人工授精を行った。人工授精から7日目 (D 38)の朝、バルーンカテーテルを用い非外科的な子宮灌流を実施し胚を回収した。回収した胚は実体顕微鏡下でInternational Embryo Technology Society (IETS)のマニュアルに従って分類し、採胚成績として記録した。回収胚のうち、Code 1胚を凍結可能胚として、プログラムフリーザを用いて緩慢凍結後、胚移植に供試した。

### 2.4 卵胞数の観察

卵胞観察のタイミングについてFig. 1に示し

た。卵巣の観察は超音波画像診断装置 (MyLabOne Vet)を用い、卵胞の発育を調査した。試験開始の2週間前にPGF<sub>2α</sub>を4ml投与し試験牛の発情周期をそろえたうえで観察を開始した。試験開始からCIDR挿入までの4週間は1週間ごと (D 0: US1, D 7: US2, D 14: US3, D 21: US4), CIDR挿入後はFSH投与前 (D 27: US5), 人工授精時 (D 31: US6), 人工授精翌日の排卵確認日 (D 32: US7), 採胚時 (D 38: US8)に超音波画像診断装置を用いて観察し、小中卵胞数、大巨卵胞数を記録した (小卵胞: 2~4mm, 中卵胞: 5~8mm, 大卵胞: 9~19mm, 巨卵胞: 20mm以上)。

## 3. 結果および考察

### 3.1 体重変動および血中BUN・Glu・BUN/Glu

試験期間中の体重変動および血中成分についてFig. 2に示した。試験区は低栄養状態に置かれた2週間後にやや体重を減少させたが、高栄養飼料に切り替えると増加に転じた。ただし、対照区 (control) との差は認められなかった。申請者は

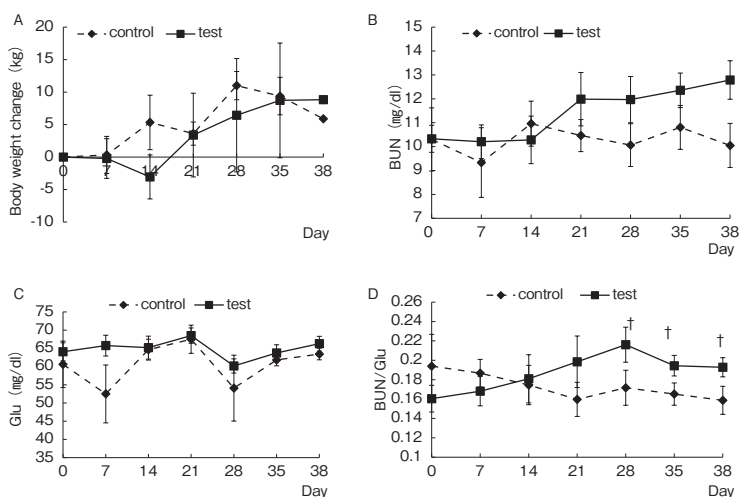


Fig. 2 Relationship between change in feed content and (A) Body weight change, (B) BUN, (C) Glu, (D) BUN/Glu (mean ± SEM)

低TDN (92%) から高TDN (120%) に切替え後、体重の増加が進み、切替えから17日後には有意に体重が増加することを報告している<sup>3)</sup>。このことは本試験に比べて増減の栄養コントロールが急激で、かつ栄養増量時に与えるTDNは120%と高かったためと考えられる。本試験では栄養増時のTDNを115%に抑え増減を緩やかにしたことから、過肥を防ぐことができたと考えられる。血中BUNについて、試験区は低栄養時には対照区と同等であったが、高栄養切替え後、有意差はないものの数値的には試験区が高くなり、採胚時 (D38) には有意に試験区は対照区よりも高くなった。栄養増による血中BUNの増加については、申請者の平成30年度の報告と同様に本試験の栄養コントロールでも低栄養状態では変化せず、高栄養状態に移行後、増加することが確認された<sup>3)</sup>。また、BUN/Gluについて、試験開始から低栄養状態および高栄養状態切替え1週間後 (D21) までは差は認められないが、過剰排卵処置開始時 (D28) 以降は試験区が高い傾向にあった。

### 3.2 卵胞数推移と採胚成績

試験期間中の卵胞数の推移についてFig. 3に示した。小卵胞、中卵胞は小中卵胞として集計した。

試験開始時および低栄養時には試験区および対照区に差は認められない。一方で、試験区において高栄養になると、有意差はないものの小中卵胞の増加が観察された。しかしながら、FSH投与後、AI時 (D31) の大卵胞数では対照区と試験区はほぼ同数であった。その後排卵確認時 (D32)、採胚時 (D38) においても両区の卵胞数に差は認められなかった。低栄養から高栄養への切替えによる小中卵胞の増加は山之内の報告<sup>2)</sup>、および申請者らによる平成30年度の報告と同様である<sup>3)</sup>。

採胚結果についてTable 1にまとめた。回収の結果得られた卵子数は対照区および試験区において大きな差は認められなかった。一方で正常受精卵、ランク1受精卵数は試験区が高く、未受精卵数は対照区が有意に高かった。このことについて短期間の低栄養状態は小中卵胞数の増加および生産胚の品質を高めることが報告されている<sup>4)</sup>。また細川らは給与飼料濃度差によって過剰排卵処置時にBUN/Gluが低くなり、そのことが採胚時の正常受精卵率を増加させると報告している<sup>5)</sup>。本試験では過剰排卵処置以降のBUN/Gluは対照区に比べて高い傾向にあり、細川らの報告とは異なる結果が得られた。本試験の結果から低栄養状

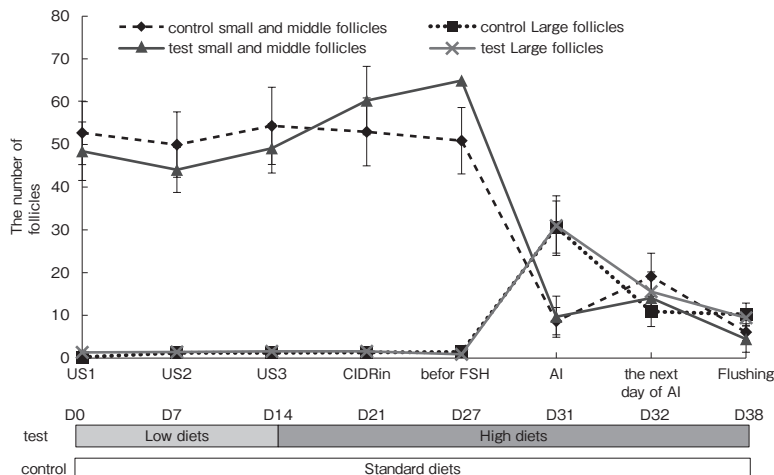


Fig. 3 Relationship between change in fed content and number of follicles (mean ± SEM)

Table 1 Embryo production of bovine that was fed test or control diets

	total embryos	the number of code 1 embryos (%)	the number of normal embryos (%)	the number of unfertilized oocytes (%)
control	19.3±5.47	4.8±1.73 (24.9)	5.4±2.23 (28.0)	12.3±3.8 (63.7)
test	16.7±3.82	10.6±3.0 (63.5)	11.1±3.31 (66.5)	3.4±1.43 (20.3)
p value	0.694	0.114	0.175	0.044

Date are represented as mean ± SEM

態で維持された後高栄養へ切り替えるとBUNが増加するが、血中Gluは変化しない (Fig. 2)。このことによりBUN/Gluは試験区が高くなったと考えられる。一方で短期間の低栄養状態は小中卵胞数の増加および生産胚の品質を高めるという報告があり<sup>4)</sup>、本試験でも過剰排卵前の低栄養状態により正常受精率が向上した可能性がある。

これらの結果から、2週間の低栄養から高栄養への切替えにより卵胞中の小中卵胞数の増加が促されるが、引き続き行われる過剰排卵処置の反応性については影響が少ないことが明らかになった。また栄養コントロールを実施することにより正常受精率向上の可能性、未受精卵の減少が示された。今後は小中卵胞増加が過剰排卵処置による大卵胞数増加につながらなかった原因を明らかにすることで、過剰排卵処置によって得られる正常受精胚のさらなる増加につなげたい。

#### 4. 要 約

本研究は過剰排卵処置に用いる黒毛和種雌牛に対し、栄養状態の切替え(低栄養→高栄養)を行い卵巣内の小中卵胞数、過剰排卵処置の反応性や正常受精卵数への影響を調べたものである。黒毛和種雌牛9頭を用い、低栄養(TDN:90%, CP:105%)で2週間維持し、高栄養(TDN:115%, CP:160%)に切り替えたのち、1週間経過後にCIDRを挿入した。その後、過剰排卵処置を実施し定時人工授精後に採胚を行った。対照区は基準栄養量(TDN:106%, CP:140%)を

試験区と同等の期間給与した。試験期間中の体重変動には試験区、対照区に差はなかったが、採胚時には試験区が有意に高くなった。試験期間中の卵胞数について、小中卵胞数は低栄養期間中、変化がなかったが、高栄養に切り替わると有意差は認められないものの試験区の小中卵胞は数値的には増加した。しかしながら、過剰排卵処置後の大卵胞数は両区で差は認められなかった。採胚成績について、採胚により得られた卵子数は、差は認められなかったが、正常受精胚数および高品質胚数については、有意差はないものの試験区が高くなった。また未受精卵数は対照区が有意に高かった。これらの結果から、黒毛和種雌牛に対する過剰排卵前の栄養コントロールは卵胞内小中卵胞を増加させるが、過剰排卵処置後の卵胞発育の反応性には影響しない。また一方で過剰排卵処置前の栄養コントロールは未受精率を低下させ正常受精胚数を増加させる可能性があることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 福田卓己, 大澤健司, 打座美智子, 鷹岡々々恵, 遠藤保, 大井隆弘, 荒屋幸一, 下村紀夫, 広沢悠子, 居在家義昭: 家畜臨床誌, 31, 137~142, 2008.
- 2) 山之内忠幸, 吉岡一, 橋谷田豊, 今井敬: 日本繁殖生物学会, p133, 2013.
- 3) 林武司, 深水大, 上田修二, 稲田淳: 平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 37, 250~254, 2019.
- 4) Nolan, R., O'Callaghan, D., Duby, R. T., Lonergan, P., Boland, M. P.: *Theriogenology*, 50, 1263~74, 1998.
- 5) 細川泰子, 福成和博, 吉川恵郷, 佐藤洋一, 菊池雄: 日獣会誌, 61, 699~704, 2008.

## 黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査（Ⅱ）

Survey of the low durability of motile sperm in the frozen semen of  
Japanese Black cattle（Ⅱ）

星 野 洋一郎

（京都大学大学院農学研究科附属牧場）

Yoichiro Hoshino

（Kyoto University livestock farm）

We investigated the tendency of the change of the sperm motility of Japanese Black cattle, and the genetic factors that thought to be associated with the sperm motility. In addition to the data of the sperm motility of 37 bulls from prefecture A that were analyzed in last year, we analyzed the motility of frozen semen from 26 bulls from prefecture A and 22 from prefecture B, and examined the correlation between birth date of bulls and sperm motility and sperm motility durability score. There was no difference in the sperm motility between prefecture A and B, although there was a downward trend in the motility of sperm from young bulls. The sperm motility durability score was higher in the semen of the bulls from prefecture B than from prefecture A, and there was a tendency that the recent bulls were divided into the high durability group that was higher than 2.5 in sperm motility durability score and the rest low durability group. The genome association study between SNP type of bulls and sperm motility durability score showed a significant association in two SNPs. These SNPs were different from the SNPs those were thought to have associations in the study last year. Although expressions of candidate genes that thought to be associated with sperm motility in the study of last year were investigated by the RT-PCR of RNA in the sperm and the testis and immunohistochemistry of the seminiferous tubule, correlation of sperm motility and gene expressions were remain unclear. RT-PCR revealed that LOC101907140 was not expressed in both testis and sperm, therefore LOC101907140 might not associate with sperm motility. Immunohistochemistry revealed that GABABR2 and KCTD8 were not localized in the spermatid. Further studies are required to investigate the role of GABABR2 during spermatogenesis.

### 1. 目 的

平成30年度伊藤記念財団助成研究において、牛人工授精受胎率に影響する要因として、凍結精液精子の運動性が維持される時間に着目し、その指

標となる精子運動持続性スコアの算出方法を開発した。A県の黒毛和種種雄牛56頭の凍結精液の精子運動性を解析したところ、製造時年齢が8歳以上の時に運動精子率が低下したため、製造時8歳以上の37頭の凍結精液の生年月日と運動精子率お

よび精子運動持続性の相関を調べた。その結果、両者に増加・減少傾向は見られなかったことから、育種改良過程における凍結精液の運動性の変化はないと考えられたが、種雄牛によって精子運動持続性の個体差が大きかった。そこで、精子運動持続性と種雄牛のSNP型との相関を調べたところ、1つのSNP (ARS-BFGL-BAC-16113) について有意な相関が見出され、それは機能未知の長鎖ノンコーディングRNA (lncRNA) LOC101907140上にあった。精子ではRNAの転写は起こらないが、精子内にもRNAが存在することが報告されており<sup>1)</sup>、牛では精子運動性や受胎率と精子内mRNA量に相関があることが報告されている<sup>2,3)</sup>。その後、新たに2つの近接するSNP (ARS-BFGL-NGS-116332,118302) で有意な相関が見出され、それらはKCTD8のイントロン領域に存在した。KCTD8を含むKCTDファミリーはGABAB受容体サブユニット2 (GABABR2) の補助サブユニットである。ラットでは精子上にGABAAおよびGABAB受容体があり、先体反応の誘起に関わっているという報告がある<sup>4)</sup>。また、KCTD8下流近傍にあるGuf1は、ミトコンドリアタンパク質の合成に関わる遺伝子であり、精子の運動性に関与する可能性がある。

本研究では、平成30年度研究の発展として、A県種雄牛の精子運動性解析頭数を増やすとともに、B県の種雄牛の精子運動性も解析し、種雄牛のSNP型と精子運動持続性との相関を再検討した。さらに、LOC101907140, KCTD8, KCTD12, GABABR2, Guf1の精子および精巣における発現を調べた。

## 2. 方 法

### 2.1 凍結精液の体外培養

凍結精液はA県研究機関が製造・保管していた黒毛和種凍結精液の提供を受けた。平成30年度の

調査で製造時年齢が8歳以上であったため集計から除外された種雄牛のうち、5頭の製造時8歳以下の精液を再解析した。さらに、近年の種雄牛21頭(2011年5月~2018年生)の凍結精液を解析した。また、B県研究機関から22頭の黒毛和種凍結精液の提供を受けた。

凍結精液ストローを37℃の温水に浸漬して融解し、ストロー1本につき200 $\mu$ lを48wellプレートの1wellに入れ、38℃の培養器(高湿度、空気の気相)内で培養した。融解直後(0時間)から1時間ごとに4時間後まで動画を撮影し、精子運動性解析を行った。

### 2.2 精子運動性の動画解析

精液2 $\mu$ lを精子検査用チャンバー(Leja, 8検体用)に注入し、倒立顕微鏡に設置した37℃のマイクロウォームプレート上に置き、顕微鏡に接続したデジタルカメラを用いて約3秒間の動画(1920 $\times$ 1080, 秒間60フレーム)を撮影した。自作の精子運動性解析プログラムを用い、動画中1秒間(60フレーム)の精子運動軌跡を解析した。精子の軌跡の最も遠い二点の距離が20 $\mu$ m以上であった精子を、運動精子と判定した。動画中で解析した全精子に占める運動精子の割合を運動精子率とした。特に0時間における運動精子率を、融解時運動精子率とした。精子運動持続性スコアは、運動精子率が融解時の1/2になるまでの時間を運動精子率の経時データから推定した値とした。

### 2.3 黒毛和種種雄牛集団における精子運動持続性の調査

種雄牛48頭(A県:再検査5頭,新規21頭, B県:新規22頭)の凍結精液について、融解時運動精子率と精子運動持続性スコアを解析した。これらのデータを前年度解析のA県37頭と合わせた85頭の種雄牛の生年月日と、融解時運動精子率および精子運動持続性スコアとの相関を調べた。



## 2.4 精子運動に関わる遺伝的要因の探求

種雄牛のSNP情報は、各県と（公社）畜産技術協会との共同研究によって得られたSNP情報を使用した。各種雄牛において、34481個のSNPがタイピングされているが、ハーディー・ワインベルグ平衡検定のp値が0.001以下、およびマイナーアレル頻度5%以下のSNPは除外した。85頭のSNPデータを用い、ゲノム相関解析ソフトPLINKを用いて相関解析を行った。

## 2.5 精子運動持続性関与候補遺伝子の牛精巣および精子における発現

### 2.5.1 牛精子および牛精巣組織のサンプリング

SNP型の異なる4頭の種雄牛の凍結精液（AG-CC, GG-AC, AA-AC-1, AA-AC-2：各名前はBAC-16113とNGS-116332のSNP型を表す）を、下層90%、中間層45%のパーコール密度勾配遠心によって分画し、45%下部（運動性低）、および90%下部（運動性高）の精子を各500 $\mu$ l分採取した。それぞれをSP-TALP液で2回洗浄し、精子約10<sup>8</sup>個分を集め、1000Gで遠心後上清を除去し、-80℃で凍結保存した。

牛精巣組織は、A県研究機関において23ヶ月齢で去勢された雄牛の精巣から採取した。精巣実体の小片を切り出し、一部はブアン液で24時間固定し、残りは液体窒素上で急速凍結し、-80℃で保存した。

### 2.5.2 牛精子および精巣組織における遺伝子発現量調査

凍結保存した牛精子、および精巣組織から、TRIzol (Thermo Fisher) を用いてRNAを抽出し、ReverTra AceR (TOYOBO) を用いてcDNAを合成した。リアルタイムPCR (RT-PCR) によってGABABR2, KCTD8, KCTD12, Guf1, LOC101907140の発現を調べた。

## 2.6 牛精巣におけるGABABR2, KCTD8の局在

ブアン液で固定した精巣実体小片をパラフィン包埋し、5 $\mu$ m厚の切片を作製した。Anti-GABA B Receptor 2 Polyclonal AntibodyおよびAnti-KCTD8 Polyclonal Antibody (Bioss Inc.) を用いて、免疫蛍光染色により、精細管断面におけるGABABR2とKCTD8の局在を調べた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 種雄牛生年月日と融解後運動精子率および精子運動持続性スコアの関係

融解直後の運動精子率と種雄牛生年月日との相関をFig. 1Aに示す。融解時運動精子率は若干の低下傾向となった。新規解析した2011年以降の種雄牛は現場後代検定に供した牛であるため、若齢時に精液を採取していることが精子運動性の低下傾向として現れている可能性がある。新たに解析したB県22頭の精液の融解後運動精子率は、A県と差は見られなかった。

精子運動持続性スコアと種雄牛生年月日との相関をFig. 1Bに示す。A県のスコアよりB県のスコアが高い傾向が見られた。また、近年においてスコアが高い種雄牛と低い種雄牛に二分される傾向が見られた。2007年以降生まれの種雄牛集団の精子運動性持続性スコアをk-means法で2群に分割したところ、スコア2.5を閾値として上位群と下位群に分かれることが分かった。

### 3.2 種雄牛のSNP型と精子運動持続性との相関解析

これまでに精子運動持続性と有意な相関がある3つのSNPが見出されたが、これにA県26頭のデータを加えて相関解析を行ったところ、いずれのSNPも有意な相関が見られなかった。新規解析した種雄牛は同じ父牛の産子が多く、遺伝的に偏りがあるため、これらのデータを加えたことに



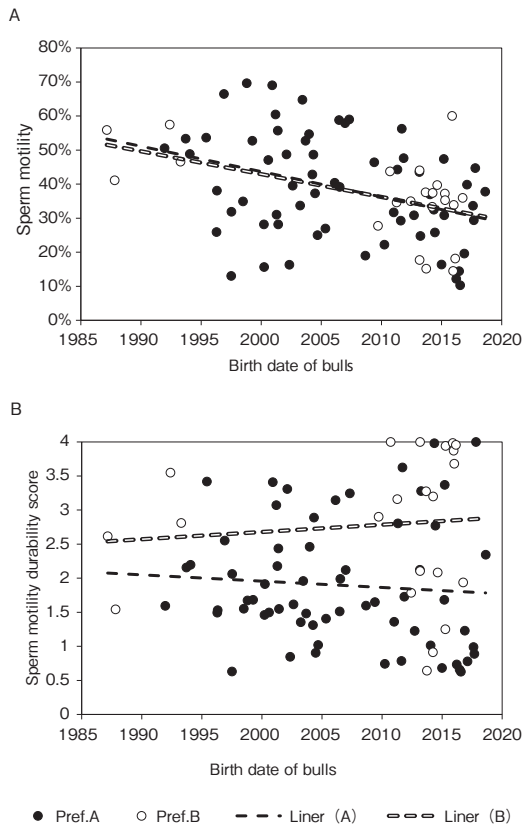


Fig. 1 Correlations between the birth date of bulls and (A) sperm motility or (B) sperm motility durability score.

Table 1 Regional difference of genotype frequency of the SNPs associated with sperm motility durability score.

SNP	Chr.	p-value*	Genotype	Pref.	Genotype frequency			Average score of genotype			Neighboring genes
					AA	AC AG	CC GG	AA	AC AG	CC GG	
ARS-BFGL-NGS-75342	5	0.01493	AA/AG/GG	A	68%	32%	0%	1.87	1.94		CSNK1E KCNJ4
				B	18%	36%	45%	1.32	2.99	3.20	
ARS-BFGL-NGS-31729	19	0.0262	AA/AC/CC	A	63%	35%	2%	1.70	2.19	3.14	PRKCA
				B	41%	36%	23%	1.91	3.34	3.46	

\*Bonferroni single-step adjusted p-values

よって相関が弱まった可能性が考えられる。

B県22頭のデータを加え、精子運動持続性スコアが2.5以上を陽性とした相関解析を行ったところ、2つのSNP: ARS-BFGL-NGS-75342と31729において有意な相関が見られた。これらのSNPはA県とB県では遺伝子型頻度が異なってお

り、A県では持続性スコアが高い遺伝子型(GG/CC)がないか、きわめて低かった(Table 1)。このようなSNPは、A県の解析だけでは相関が検出できなかったと考えられる。SNP: 31729はPRKCA(プロテインキナーゼC $\alpha$ )遺伝子をコードする領域に含まれているが、PRKCAは牛

精子の受精能獲得に対して抑制的に働くという報告があり<sup>5)</sup>, 精子運動持続性に関与する可能性が考えられる。

### 3.3 精子内RNA量にSNP型および精子運動性との相関が見られるか

精子および精巣のRT-PCRの結果, KCTD8と同ファミリーに属するKCTD12, およびこれらを

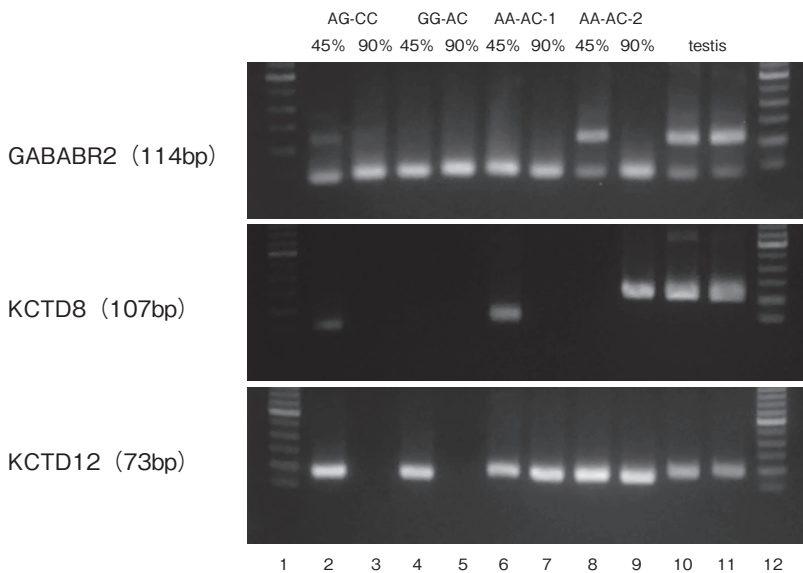
補助サブユニットに持つGABABR2の精子内mRNA量をRT-PCRによって調べ (Table 2), さらに精子PCR産物と精巣PCR産物を電気泳動で比較した (Fig. 2)。GABABR2は各区で増幅が確認されたが, 電気泳動の結果, 目的のバンド(114bp)が得られたのは2区 (AG-CC 45%, AA-AC-2 45%)のみであり, 他はプライマー

**Table 2** Relative quantity of cDNA in sperm from the bull of different SNP type and different motility.

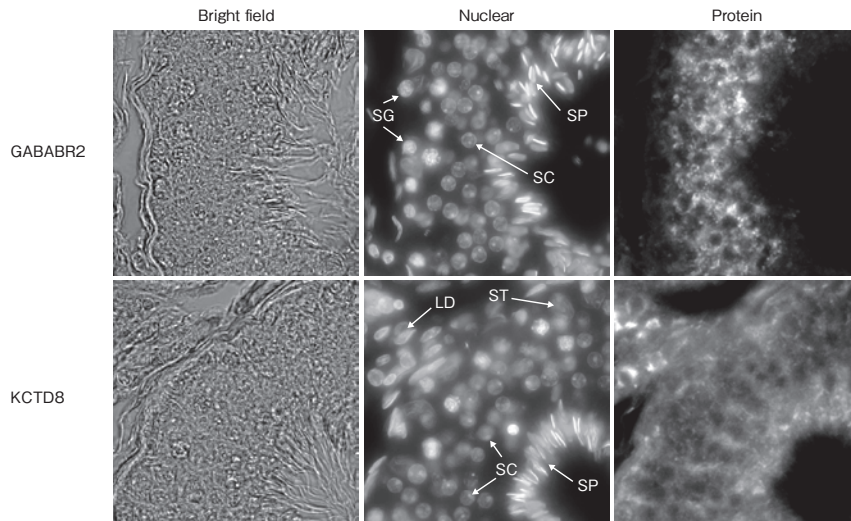
Bull (SNP Types)	AG-CC		GG-AC		AA-AC-1		AA-AC-2	
	Percoll 45%	Percoll 90%	Percoll 45%	Percoll 90%	Percoll 45%	Percoll 90%	Percoll 45%	Percoll 90%
GABABR2	1	0.33	0.036	0.549	0.228	0.461	0.02	0.181
KCTD8	1	-	-	-	2.433	-	-	1.826
KCTD12	1	-	0.712	-	1.062	1.725	0.673	3.127
GUF1	-	-	-	-	-	-	-	-
LOC101907140	-	-	-	-	-	-	-	-

Numbers are the relative quantities of cDNA of each gene compared with the reference sample (AG-CC, Percoll 45%).

Hyphens (-) means no amplification were detected.



**Fig. 2** Agarose gel electrophoresis of RT-PCR products of GABABR2, KCTD8 and KCTD12 from frozen semen of 4 bulls fractionated by percoll (45% and 90%) and a bull testis. Lane 1 and 12 : 50bp DNA ladder, lane 2 and 3 : semen of AG-CC in 45% and 90% percoll fraction, lane 4 and 5 : semen of GG-AC in 45% and 90% percoll fraction, lane 6 and 7 : semen of AA-AC-1 in 45% and 90% percoll fraction, lane 8 and 9 : semen of AA-AC-2 in 45% and 90% percoll fraction, lane 10 and 11 : testis.



**Fig. 3** Localization of GABABR2 and KCTD8 in the bull seminiferous tubule. Nuclei : fluorescence of nuclei with Hoechst 33342, Protein : immunohistochemistry of GABABR2 and KCTD8. SG : nucleus of spermatogonia, SC : nucleus of spermatocyte, SP : nucleus of spermatid, ST : nucleus of sertoli cell, LD : nucleus of leydig cell.

ダイマーと見られる非特異的増幅であることが分かった。KCTD8は3区で増幅が見られたが、目的のバンド(107bp)が得られたのは1区(AA-AC-2 90%)のみであった。KCTD12ではプライマーダイマーは見られず、6区で目的のバンド(73bp)が得られた。LOC101907140は精子、精巣のいずれにおいても発現が見られなかった。また、Guf1は精巣では発現が確認されたが、精子ではmRNAの増幅が見られなかった。

精子内にもRNAが存在し、mRNAは精子形成過程における遺伝子発現を反映していると考えられているが、本研究のリアルタイムPCRでは正常なcDNAの増幅が見られず、遺伝子発現量を推定するのは困難であり、精子のSNP型および精子運動性分画(45%, 90%)との関連は分からなかった。また、各遺伝子と近接するSNPと精子運動持続性の相関が再解析により見られなくなったため、精子運動性に関与する可能性は低くなった。特にLOC101907140は、精子内だけでなく精巣においてもRNAの存在が確認されなかったため、

精子運動持続性には関与していないと考えられた。

### 3.4 牛精巣におけるKCTD8およびGABABR2の局在

牛精巣の精細管におけるGABABR2とKCTD8の免疫蛍光染色の結果をFig. 3に示した。GABABR2は精母細胞に局在しており、精原細胞および精子には見られなかった。KCTD8はライディヒ細胞と基底膜およびセルトリ細胞に局在しており、精子には見られなかった。これらの結果から、KCTD8とGABABR2が精子上に存在し、KCTD8の多型がGABABR2の機能に影響することにより精子運動性に関与している可能性は低いと考えられた。GABAは牛精子ではGABAA受容体を介して先体反応を誘起するが、GABAB<sub>C</sub>受容体は作用しないという報告があり<sup>6)</sup>、本研究の結果はこれと一致する。一方、GABABR2は精原細胞で見られず精母細胞で発現していることから、精子形成に関与している可能性がある。しかし、KCTD8は精母細胞でなくセルトリ細胞に局在していると見られ、

GABABR 2 の補助サブユニットとして機能していない可能性がある。GABABR 2 の精巣における働きについては、他のKCTDファミリーの精巣における局在も含め、今後の研究が必要である。

#### 4. 要 約

黒毛和種凍結精液の精子運動性の変化傾向と、関与する可能性のある遺伝的要因について調査した。昨年度に解析を実施したA県37頭に加え、A県26頭、B県22頭の種雄牛の凍結精液の運動性解析を行い、種雄牛の生年月日と融解後運動精子率および精子運動持続性の相関を調べた。融解後運動精子率は若齢の種雄牛で低下傾向が見られたが、A県とB県の間に差は見られなかった。一方、精子運動持続性はA県よりB県の種雄牛の精液が高く、また近年の種雄牛では持続性スコア2.5以上の高持続性グループと、それ以外の低持続性グループに分かれる傾向が見られた。種雄牛のSNP型と精子運動持続性の相関解析を行ったところ、平成30年度の解析で有意な相関が見られた3つのSNPは相関がなくなり、新たに別の2つのSNPで有意な相関が見られた。昨年度の研究で精子運動性と関連する可能性が考えられた候補遺伝子の発

現を精子や精巣RNAのRT-PCRおよび精細管の免疫組織染色で調べたが、精子運動性と遺伝子発現の相関は不明であった。RT-PCRの結果、LOC101907140は精巣、精子ともに発現していないことから、LOC101907140は精子の運動性と関連していないと考えられた。免疫組織染色の結果、GABABR 2 とKCTD 8 は精子には局在していないことが分かった。精子形成におけるGABABR 2 の役割を調べるために、さらなる研究が必要である。

#### 文 献

- 1) Jodar, M., Selvaraju, S., Sendler, E., Diamond, M. P., Krawetz, S. A. : *Reproductive Medicine Network, Hum. Reprod. Update*, 19(6), 604~624, 2013.
- 2) Bissonnette, N., Lévesque-Sergerie, J. P., Thibault, C., Boissonneault, G. : *Reproduction*, 138(1), 65~80, 2009.
- 3) Arangasamy, A., Kasimanickama, V. R., DeJarnettec, J. M., Kasimanickama, R. K. : *Theriogenology*, 76(3), 570~577, 2011.
- 4) Hu, J. H., He, X. B., Wu, Q., Yan, Y. C., Koide, S. S. : *Arch. Androl.*, 48(5), 369~78, 2002.
- 5) Rotman, T., Etkovitz, N., Spiegel, A., Rubinstein, S., Breitbart, H. : *Reproduction*, 140(1), 43~56, 2010.
- 6) Puente, M. A., Tartaglione, C. M., Ritta, M. N. : *Anim. Reprod. Sci.* 127(1-2), 31~7, 2011

## 周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの 発症予知と制御（Ⅲ）

Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy cows

佐藤 繁

(岩手大学農学部共同獣医学科)

Shigeru Sato

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)

The objectives of the project were to clarify the pathogenesis of subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows using radio transmission pH measurement system, and further, to control and predict the postpartum SARA in advance of parturition. Eighteen dry period and multiparous Holstein cows were used, and were categorized in the SARA ( $n = 9$ ) or healthy ( $n = 9$ ) cows depending on whether they developed SARA during the 2 weeks after parturition. Rumen fluids were collected at 3 weeks pre-partum and 2, and 6 weeks post-partum for analysis of VFA, ammonia, and lactic acid, LPS activity, and bacterial community by next generation sequencing method. Furthermore, liver tissues were biopsied at 3 weeks pre-partum, 2, and 6 weeks post-partum for analysis of liver transcriptomic dynamics by microarray method during the periparturient period.

As a result, the ruminal pH was depressed postpartum in both groups, whereas depression was more severe in the SARA group simultaneously with significantly longer duration of time (for  $\text{pH} < 5.6$  and  $5.8$ ). No significant changes was observed in the composition of major bacterial phyla or genera during the periparturient period, but the non-SARA group had a significantly higher Simpson diversity index in the postpartum. In the microarray data analysis, PCA plots showed no close similarity within and between groups during the periparturient period, but were clustered into two separated cluster those irrelevant to the groups and periparturient periods. From these findings, postpartum predicted functional pathway analysis may indicate the underlying mechanisms causing SARA in Holstein cows during the periparturient period. Further, analysis of liver transcriptomic dynamics may reveal the relationship between the occurrence of SARA, and it can provide the rapid prediction of SARA after parturition at the pre-partum stage in dairy cows.

### 1. 目 的

乳牛の泌乳量は栄養管理や育種改良の進展によって飛躍的に増加してきた。一方で泌乳量を維

持・向上させるために濃厚飼料が多給され、その結果、潜在性第一胃アシドーシス（SARA）が増加している。SARAは粗飼料の不足と濃厚飼料など易発酵性飼料の多給により、揮発性脂肪酸

(VFA) の産生量と吸収量のバランスが崩れて第一胃液pHが低下し、グラム陰性菌が死滅して細胞壁由来のリポポリサッカライド (LPS) 産生が増加する病態である<sup>1)</sup>。分娩後の濃厚飼料多給に伴って発生するSARAは、種々の代謝病 (生産病) の発生と密接な関連のあることが示唆されており、農家経営に多大な影響を及ぼす代謝障害リスクである。

本研究の目的は、申請者らが開発した無線伝送式pHセンサ<sup>2~5)</sup>を用いて、乳牛の分娩後に多発するSARAの病態を明らかにし、さらには分娩前の段階で分娩後SARAの発症予知と制御を目指すことである。これによって、乳牛の周産期に発生する種々の生産病を予防し、乳牛の健康を維持して食品としての牛乳と食肉の安全確保に貢献することが最終的な目標である。具体的には、分娩前後の乳牛における前胃液pHや第一胃液の発酵産物 (VFA, 乳酸, LPS), 細菌叢構成を解析し、分娩後にSARAを発症した牛 (SARA群) と発症しなかった牛 (非SARA群) における各性状の差異を検討して、細菌叢構成を考慮したSARAの予防・軽減方策を検討する。また、分娩前後の乳牛における肝組織の網羅的遺伝子発現を解析し、SARA牛の分娩前における遺伝子発現の特徴を明らかにして、分娩前におけるSARA発症予知の可能性について検討する。

## 2. 方 法

### 2.1 供試牛群および供試牛

試験は、前年度と同様、移行期の給与飼料内容や飼養管理状況が明らかな3牛群を対象とし、乾乳期の経産牛18頭 (A牛群・8頭, B牛群・6頭, C牛群・4頭) を用いて行った。分娩後にSARAを発症した牛9頭 (SARA群: 分娩後2週間に1日3時間以上にわたって前胃液pH<5.6を示す日が3日以上出現) と発症しなかった牛9頭

(非SARA群) に区分した。なお、供試したすべての牛において分娩前後に臨床的異常は認められなかった。

### 2.2 採 材

第一胃液はカテーテルを用いて分娩前3週, 分娩後2週および6週の計3回, 経口的に採取した。また、肝組織は生検 (自動生検針エースカット14G×115mm 22mmタイプ, タスク (株), 栃木) により分娩前3週と分娩後2週および6週の計3回採取した。

### 2.3 検査項目および方法

#### 2.3.1 胃液pHと第一胃液VFA, アンモニア態窒素および乳酸濃度

前胃液pHは無線伝送式pHセンサ (山形東亜DKK (社)) を用いて分娩前3~2週から分娩後6~8週までの間, 10分間隔で連続測定した。第一胃液VFA濃度の測定はガスクロマトグラフィ (HITACHI-163型, 日立, 東京) を用いて、アンモニア態窒素濃度の測定は窒素自動蒸留装置 (ケルティックオート1035型, アクタック, 東京) を用いた水蒸気蒸留法, また、乳酸濃度の測定は市販の乳酸測定キット (Fキット, D-/L-乳酸, R-Biopharm, ドイツ) を用いて行った。

#### 2.3.2 第一胃液LPS活性値

LPS 活 性 値 は LAL (Limulus ameobocyte lysate) 試薬 (パイロクロム, 生化学工業, 東京) を用いたカイネティック比色法により測定した。

#### 2.3.3 第一胃液の細菌叢解析

細菌叢解析は第一胃液の洗浄, 溶菌, 抽出および精製の後, 次世代シーケンシング法により16S Metagenomic Sequencing Library Preparation (Illumina, USA) に従って実施した。すなわち, 抽出したDNA溶液を16S rRNAのV3-V4領域で増幅, Nextera XT Index Kit (Illumina, USA) を用いて反応液を調整後, プロトコールに従ってPCRを行った。アガロースゲル電気泳動



を行い、均一濃度および330bp付近のバンドを確認した。その後、次世代シーケンサー (Illumina MiSeq, Illumina, USA) によるシーケンスを行った。

#### 2.3.4 肝組織の網羅的遺伝子解析

肝組織の遺伝子解析は、総RNAを抽出した後、マイクロアレイ法により行った。マイクロアレイ法は約15,000のウシ遺伝子を搭載したウシ・オリゴDNAマイクロアレイ (Agilent Technologies, USA) を用いて実施した。RNAサンプルからのcDNA合成、cDNAからのCyanine3 (Cy3)-CTP標識cDNAの合成、標識cRNAの精製、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンおよびデータ解析は、既報<sup>6)</sup>と同様に行った。

#### 2.4 統計解析

次世代シーケンズ法の結果はMOTHURプログラム (version 1.41.1; University of Michigan; <http://www.mothur.org/wiki/Schloss>) により解析した。SARA群と非SARA群の比較は、正規分布している場合は対応のない *t* 検定、正規分布していない場合はMann-Whitney U-testにより解析し、いずれも  $p < 0.05$  を有意差ありとした。また、マイクロアレイ法のデータは、DESeq2package (R projectソフトウェア) を用いて解析し、その後、Gene Spring GX12.0 (Agilent Technologist, USA) を用いて主座標解析 (PCoA) を行うとともに、同採材日のSARA群で非SARA群に比べて発現量に有意差 ( $p < 0.05$ ) があり、Fold change (FC) の絶対値が1.5以上の遺伝子をIngenuity Pathway Analysis (IPA, Ingenuity System, USA) を用いて解析した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 SARA群と非SARA群における前胃液pHおよび第一胃液性状

前胃液pHの24時間平均値は、両群とも分娩後

は分娩前に比べて低下し、SARA群では非SARA群に比べて分娩前に差異がみられなかったが、分娩後5, 6, 8, 9および10日に有意または有意傾向な低値を示した (Fig. 1)。その後は分娩後2週にかけてpHが徐々に回復し、分娩後11日以降は両群間に有意な差がみられなかった。また、前胃液pH < 5.8あるいは < 5.6を呈する24時間あたりの時間は、いずれもSARA群で非SARA群に比べて分娩後に有意な高値を示した (Fig. 2)。

SARA群では非SARA群に比べて、第一胃液総VFAおよび酢酸濃度は分娩後に低値傾向、プロピオン酸濃度は分娩後6週に有意な低値を示し、LPS活性値は分娩前3週に低値傾向を示した。

#### 3.2 SARA群と非SARA群における第一胃液の細菌叢構成

両群とも分娩前後にBacteroidetes門、Firmicutes門およびProteobacteria門の割合が多く、これら3細菌門で全体の約90%を占めていた。また、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前3週にBacteroidetes門が低値傾向、Actinobacteria門が有意な高値を示した (Fig. 3)。一方、両群とも分娩前後における細菌属構成では、*Prevotella*属、未分類のLachnospiraceae科および未分類のRuminococcaceae科の割合が多く、これら3細菌属で全体の約50%を占めていた。また、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前3週に*Prevotella*属が有意な低値、未分類のLachnospiraceae科、*Barnesiella*属などが有意な高値を示した。さらに、分娩後2週に*Prevotella*属が有意な低値、*Barnesiella*属が有意な高値を示した。

SARA群で非SARA群に比べて、*Prevotella*属の構成比が分娩前3週と分娩後2週に有意な低値を示したことは、分娩後SARA牛では、長期SARA誘発牛と同様、*Prevotella*属が低値を示し、デンプン分解能が低下している可能性のあることを示している。また、SARA群で非SARA群に比

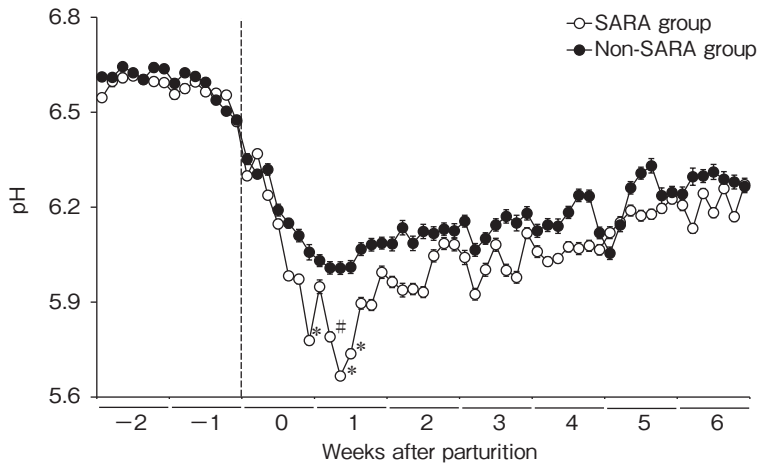


Fig. 1 The 24-h mean reticulo-ruminal pH in Holstein cows diagnosed with SARA (SARA group, n = 9) and in cows without SARA (non-SARA group, n=9) at 2 weeks after parturition. \*and# denote significant differences ( $p < 0.05$  and  $< 0.10$ , respectively) between the SARA and non-SARA groups at each sampling time. Values represent the mean  $\pm$  SE.

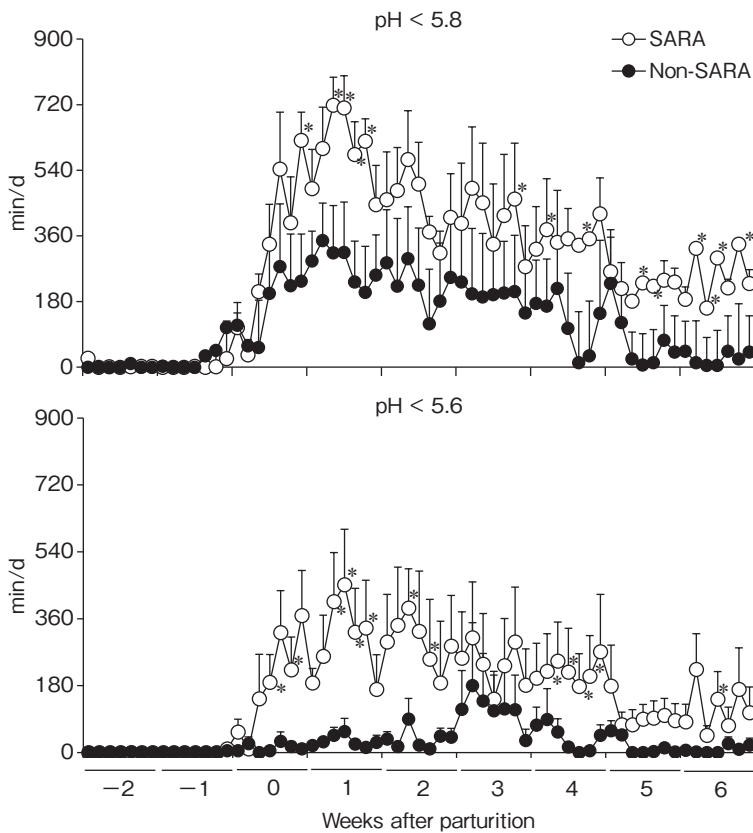


Fig. 2 The duration of time where pH was < 5.6 and 5.8 in Holstein cows diagnosed with SARA (SARA group, n = 9) and in cows without SARA (non-SARA group, n=9) at 2 weeks after parturition (gray square). \*Significant difference ( $p < 0.05$ ) between the SARA and Non-SARA groups. Values represent mean  $\pm$  SE.

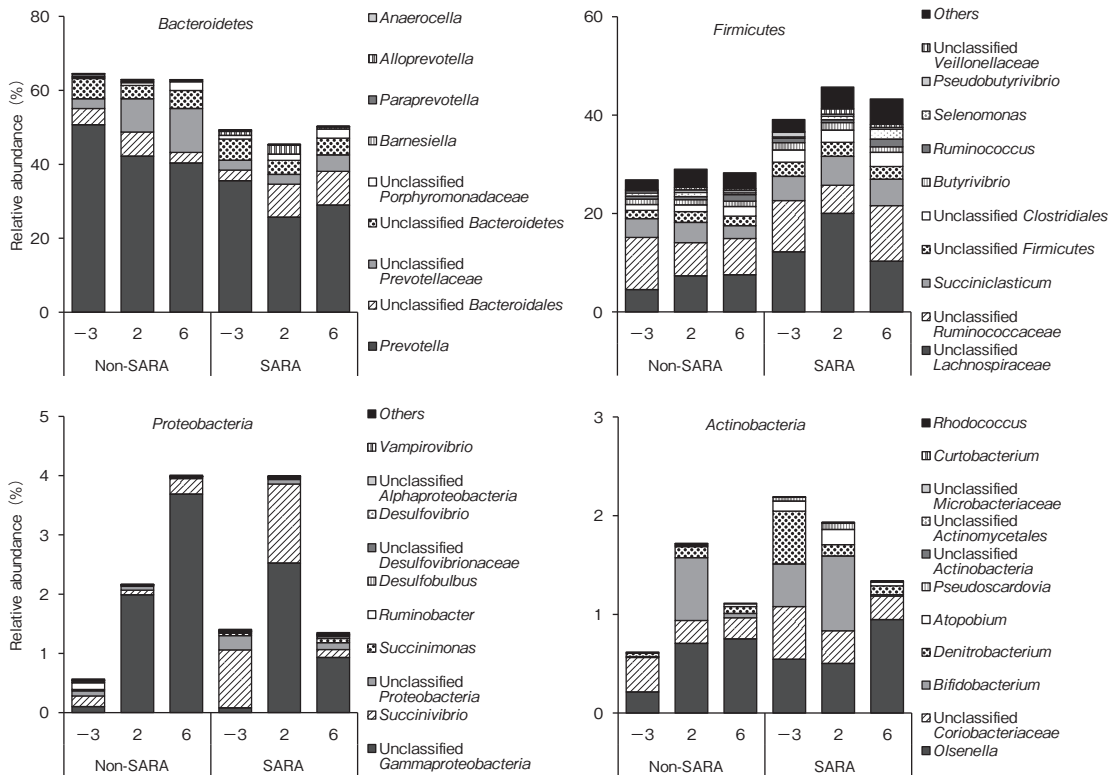


Fig. 3 Relative abundances of the four major bacterial phyla and genera in Holstein cows diagnosed with SARA (SARA group, n = 7) and those without SARA (non-SARA group, n = 8) at 2 weeks after parturition. Data are shown as a percentage of the total identified sequences per sampling period in each group (SARA and non-SARA).

べて、分娩前3週と分娩後2週に *Prevotella ruminicola* が有意な低値を示したことは、*P. ruminicola* がタンパクの分解、ペプチドの取り込みおよび発酵に重要な細菌であることから、分娩後SARA牛におけるタンパク分解能の減少は線維分解能の減少と関連する可能性がある<sup>7, 8)</sup>。これらのことから、SARA群では分娩前後における *P. ruminicola* の減少により、第一胃内の線維分解能とタンパク分解能が低下しており、これには給与飼料による前胃液pHの低下や第一胃液LPS活性値の増加が関与している<sup>9)</sup> ことが示唆された。

### 3.3 SARA群と非SARA群における肝組織中の遺伝子発現

分娩前後における肝組織中の主要な発現変動遺

伝子について、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前3週には *CPAI1*, *LOC780933* および *KLK12* を含む349遺伝子がUp-regulate, *GPC3*, *CXCL3* および *SEPX1* を含む16遺伝子がDown-regulateした。分娩後2週では *CYP2B6*, *PDYN* および *SOCS2* を含む156遺伝子がUp-regulate, *MYOM1*, *APOD* および *JUN* を含む364遺伝子がDown-regulateした。また、分娩後6週では *STEAP4*, *GPX3* および *CCL24* を含む395遺伝子がUp-regulateし、*AKRIB10*, *APOA4* および *HMGSC1* を含む87遺伝子がDown-regulateした。

発現変動遺伝子の機能とネットワーク解析の結果、分娩前と分娩後およびSARA群と非SARA群における遺伝子発現に有意な差異は認められな

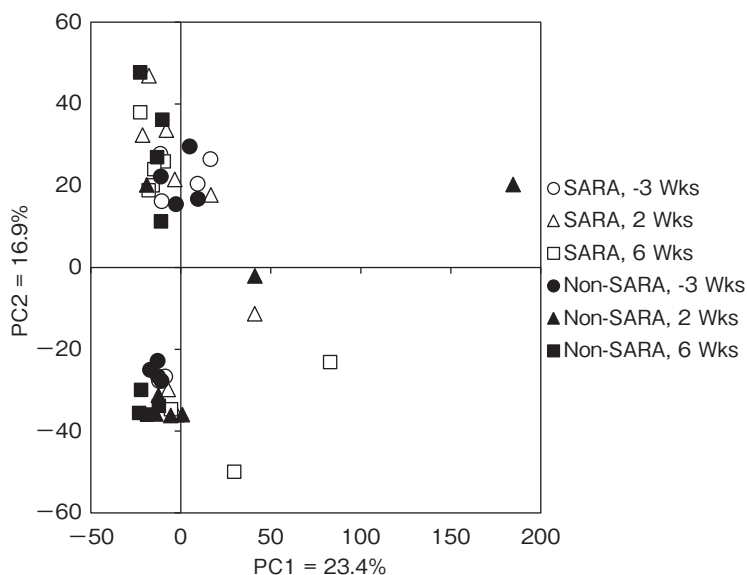


Fig. 4 Principal component analysis plots generated from normalized microarray data in Holstein cows diagnosed with SARA (SARA group,  $n=7$ ) and in cows without SARA (non-SARA group,  $n=8$ ) at 2 weeks after parturition. PC1 and PC2 represent principal components 1 and 2, respectively.

かった (Fig. 4)。しかし、SARA群では非SARA群に比べて、分娩前2週にサイトカインシグナルの活性化、分娩後2週にLPS関連経路とサイトカインシグナルの抑制、分娩後6週にLPS関連経路と炎症応答の活性化および脂質代謝機能の低下に関連する遺伝子の発現が変動することが認められた。このことから、分娩後SARA牛の肝組織では、分娩前後における脂質代謝機能に影響する炎症応答やサイトカインシグナル抑制機構に関連する遺伝子の発現が変動しており、これら遺伝子群は分娩前におけるSARA発症の予知に応用可能であることが示唆された。

#### 4. 要 約

乳牛の分娩後におけるSARAの病態および分娩前の段階でのSARA発症予知の可能性を明らかにする目的で、分娩後SARAの発症牛(9頭)と非発症牛(9頭)を対象とし、前胃液pH、第一胃液の各性状と細菌叢構成および肝組織の遺伝子発

現を検討した。

その結果、分娩後SARAの発症牛では非発症牛に比べて、分娩前から第一胃液の細菌叢構成が異なり、分娩後には細菌叢の多様性が低下することから、分娩前の細菌叢構成は分娩後のSARA発症と関連があり、SARAによる前胃液pHの低下は細菌叢の多様性低下に影響することが示唆された。分娩前の第一胃液細菌叢構成に差異がみられた原因は不明であるが、細菌叢構成は分娩前後の給与飼料のほか乾乳前後の飼養管理や以前のSARA発症の有無も関与している可能性がある。一方、肝組織中の遺伝子発現解析の結果、SARA牛では分娩前にサイトカインシグナルの活性化が認められたが、分娩前後およびSARA発症の有無によって遺伝子発現に有意な差異がみられなかったことから、分娩後のSARA発症は分娩前後の給与飼料と第一胃発酵状態が主要因であることが示唆された。

なお、本研究の成果は文献<sup>10)</sup>に公表した。

## 文 献

- 1) Sato, S. : *Anim Sci J*, doi : 10.1111/asj. 12415, 2015.
- 2) Sato, S., Mizuguchi, H., Ito, K., Ikuta, K., Kimura, A., Okada K. : *Prev Vet Med*, 103, 274~279, 2012.
- 3) Sato, S., Kimura, A., Anan, T., Yamagishi N., Okada, K., Mizuguchi, H., Ito, K.; *Vet Med Commun*, 36, 85~89, 2012.
- 4) Sato, S., Ikeda, A., Tsuchiya, Y., Ikuta, K., Murayama, I., Kanehira, M. Okada, K., Mizuguchi, H. : *Vet Med Commun*, 36, 85~89, 2012.
- 5) Nagata, R., Yo-Han Kim, Ohkubo, A., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *J Dairy Sci*, 101, 1~13, 2018.
- 6) Kim, Y. H., Toji, N., Kizaki, K., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *Physiol Genomics*, 48, 803~809, 2016.
- 7) Nakamura, S-I., Yo-Han Kim, Takashima, K., Kimura, A., Nagai, K., Ichijo, T., Sato, S. : *J Amin Sci*, doi : 10.2527/jas2017-1431, 2017.
- 8) Yo-Han Kim, Nagata, R., Ohkubo, A., Ohtani, N., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *BMC Vet Res*, 14 : 310, doi.org/10.1186/s12917-018-1637-3, 2018.
- 9) Chang, G., Zhuang, S., Seyfert, H-M., Zhang, K., Xu, T., Jin, D., Guo, J., Shen, X. : *Oncotarget*, 6, 38578~38590, 2017.
- 10) Tsuchiya, Y., Chiba, E., Sugino, T., Kawashima, K., Hasunuma, T., Kushibiki, S., Yo-Han Kim, Sato, S. : *J Dairy Sci*, 103, 4702~4716, 2020.

## 消化管寄生性コクシジウム, *Eimeria kriegsmanni*に おける発育休止期の解析 (II)

Analysis of the resting stage in the life cycle of the intestinal coccidian  
parasite, *Eimeria kriegsmanni* (II)

松尾智英

(鹿児島大学共同獣医学部寄生虫学分野)

Tomohide Matsuo

(Laboratory of Parasitology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

*Eimeria* spp. are intestinal coccidia and cause serious damages especially in cattle and poultry worldwide. Their infection is known to be self-limited and hosts can acquire resistant against secondary infection. However, we clarified that only 2nd generation meronts were remained in the epithelial cells of the caeca after end of oocyst shedding in a mouse intestinal coccidium, *Eimeria kriegsmanni*. In the present study, in order to investigate effect of secondary infection, we performed infection experiments in immunocompetent (BALB/c) mice with artificial immunosuppression by the dexamethasone and innate immunodeficient (nude and SCID) mice. All mice were inoculated twice (day 0 and day 21). As the results, oocyst shedding status were almost similar to the results of experiments only with primary infection. That is, the number and duration of oocyst shedding increased and extended in all experimental groups. It is suspected that parasites were supplied by challenge infection but oocyst shedding status were not affected because zoites from primary infection of *E. kriegsmanni* also survived in the epithelial cells of the ceca. On the other hands, it was reported that the number of shed oocysts increased by challenge infection with immunosuppression in poultry eimerian species. Survival of zoites after primary infection has not been known in poultry species, so only zoites from challenge infection might be able to develop normally by immunosuppression treatment. Furthermore, cytokine assay clearly indicated move of host immune system with their infection in immunocompetent mice. In addition, including antibody titer and intestinal IgA assay in progress, detailed correlation between these host immune response and development of *E. kriegsmanni* will investigate in near future.

### 1. 目的

世界中に分布し、特に牛および鶏において大きな被害をもたらしている*Eimeria*属原虫は宿主の消化管上皮に寄生し、激しい下痢症によって宿主

を衰弱させることで生産性を低下させ、また時に致死となるコクシジウム症を引き起こす<sup>1, 2)</sup>。

これらに対しては一定の効果のある治療薬や一部の鶏寄生種に対するワクチンはすでに存在し<sup>3, 4)</sup>、重篤な場合は死に至るケースがあるものの、軽症



ならば一定期間で自然治癒する一過性の感染と考えられてきた。そのため新たな研究が停滞しているのが現状である。しかしながら、治療薬・ワクチンの安全性やコストはもちろん、薬剤耐性株の出現など新たな問題も知られるようになってきた<sup>5,6)</sup>。そしてなにより*Eimeria*属原虫はいまだ各地で蔓延しており、これらによるコクシジウム症を制圧したとは言い難い現状である。

一方、*Eimeria*属原虫は*in vitro*培養によって生活環を完全に再現できず、また牛のような大型動物を用いた感染実験は現実的に困難であるため、申請者はマウス寄生性*Eimeria kriegsmanni*<sup>7,8)</sup>を感染モデルとして基礎研究を続けてきた<sup>9-12)</sup>。その結果、これまで*Eimeria*属原虫感染は「オーシストの経口摂取→無性生殖ステージ→有性生殖ステージ→オーシスト排泄」という生活環を経て、オーシスト排泄終息後には虫体は宿主体内から排除される一過性のものであると信じられてきた常識を覆す新知見を得た。すなわち、無性生殖期の1ステージ、第2代メロントの虫体のみがオーシスト排泄終息後も長期間、寄生部位にとどまっていることを確認した<sup>10)</sup>。このステージの虫体は宿主が感染を耐過して抵抗性を獲得した後だけでなく、オーシスト排泄を完全に抑制することのできる治療薬の投薬下でも残留していることが確認されている<sup>12)</sup>。このことは、これまで「治癒」したと考えられていた宿主において感染が継続していることを意味し、宿主の健康状態悪化によって症状が再発する可能性を示唆する。すなわち、この潜在的な感染を抑制する新たな防除法が必要となる。そこで、この潜在的な感染の意義と特定のステージの虫体が残留を可能にするメカニズム解明の第一歩として、免疫抑制下または先天性免疫不全マウスにおいて感染が再発もしくは長期継続することを、昨年度の本助成の成果として報告した。本研究においては、引き続き、初感染を耐

過し抵抗性を獲得した宿主において虫体が生存し、再発源となり得るのかを明らかにするため、再感染時の感染様態をさらなる感染実験によって精査した。さらに、これらの現象と宿主免疫との相関を調べるため、感染中の宿主免疫の「動き」を、網羅的なサイトカイン解析および血中抗体価、腸管IgA検査によって明らかにすることを試みた。

## 2. 方法

### 2.1 実験動物と寄生虫

5週齢、雌のBALB/cマウス、免疫不全モデルであるSCIDマウスおよびnudeマウスが供試された。供試された*Eimeria kriegsmanni*は鹿児島大学共同獣医学部寄生虫病学研究室にてマウスを用いて継代維持されている。オーシストは感染マウスの糞便から集められ、25℃、2%重クロム酸カリウム水溶液中でスポロゾイトを形成させた後、使用まで4℃で保管した。なお、本動物実験は鹿児島大学における所定の認可の下で行われた。

### 2.2 免疫抑制実験

再感染による虫体が免疫抑制下または先天性免疫不全宿主において、どのような感染動態を示すか調べるため、感染実験を行った。単回感染実験同様、免疫抑制剤としてデキサメタゾンを使用し、これを滅菌水に1 mg/mlとなるよう懸濁し、100  $\mu$ l/匹/日で皮下投与を行った。デキサメタゾン投与日程により次のように実験群(各5匹)を設定した：感染2日前から第2代メロントの宿主盲腸上皮内における存在が確認されている最長の期間である感染後56日目まで(-2-56 DXM群)、感染2日前から感染後一度オーシスト排泄が終了する15日目まで(-2-15 DXM群)、感染後15日目から感染後56日目まで(15-56 DXM群)、および宿主が抵抗性を獲得し、再感染を行ってもオーシスト排泄に至らないことが明らかな初感染後21日

目から感染後56日目まで (21-56 DXM群)。加えて、免疫不全モデルであるSCIDマウスの群 (SCID群) とnudeマウス群 (nude群), コントロールとして感染前2日から感染後56日目まで100  $\mu$ l滅菌水を皮下投与した群 (DW群) も設定した。以上のすべての実験群において, 2回目の感染は初感染後21日目に接種された。さらに, 昨年度の研究で結果が得られなかった, 感染後, 完全に抵抗性を獲得したあとも残留虫体が再発源になるのかを調べるための感染実験も追加した。すなわち, 免疫正常のまま初感染を耐過した感染後28日から14日間, デキサメタゾンを1 mg/匹/日で投与して免疫抑制を施すことによって, 残留虫体の発育が再開し, オーシスト排泄が再発するかを調べる単回感染実験の追加試験を行った。

### 2.3 感染の評価

すべての感染は $2.0 \times 10^2$ 個/匹のオーシストを経口的に接種した。感染状態はオーシスト排泄数 (OPG: oocysts per gram of feces) を毎日計測して評価した。

### 2.4 サイトカイン解析

BALB/cマウスにおいて, 感染直前 (day 0), 感染後7日 (day 7), 14日 (day 14), 21日 (day 21), 28日 (day 28), 35日 (day 35), 42日 (day 42) にそれぞれ採血し, その血清をサイトカイン解析に供試した。解析はLuminex System<sup>®</sup>を用いたタンパク発現量解析 (ジェネティックラボ: 札幌市) によって実施した。

## 3. 結果と考察

各免疫抑制および先天性免疫不全モデルマウス実験群のオーシスト排泄数の推移をFig. 1に示した。*Eimeria*属原虫は, 宿主体内において無性生殖ステージと有性生殖ステージを経てオーシストを形成する単一宿主性の発育環をもつ。無性生殖ステージでは, 経口摂取されたオーシストに内包

されるスポロゾイトが寄生部位である腸管上皮細胞に侵入し, メロゾイトの増殖過程であるメロントを形成, それが崩壊し放出されたメロゾイトが他の細胞に再び侵入するというサイクルを, 種によって規定の回数繰り返す。*E. kriegsmanni*は盲腸上皮細胞に寄生し, 第4代メロントまで形成していた<sup>7, 10)</sup>。この無性生殖ステージ後の有性生殖ステージを経てオーシスト排泄に至る生活環により, *Eimeria*属原虫の感染はこれまで「一過性の自己治癒する感染」と信じられてきた。また, 初感染耐過後は獲得免疫を得て再感染に対して抵抗性を示すことはよく知られ<sup>13, 14)</sup>, *E. kriegsmanni*においても再感染への抵抗性は確認されており<sup>5)</sup>, 本研究のコントロール群 (DW群) でも再現されている。

免疫抑制下および先天性免疫不全宿主においても, 昨年度の単回感染に類似した結果が得られた。すなわち, 宿主免疫の低下または不全状態によって, オーシスト排泄数は増加し, 排泄期間も延長した。単回感染との明らかな差が認められなかったことは, 再感染によって接種された虫体の影響はほとんどなかったことが強く示唆され, 明らかに潜在的長期感染の影響のためであろう。虫体の残留が確認されている*E. kriegsmanni*においては初感染由来の虫体がすでに存在しており, 再感染によって感染虫体は「補充」されたが, オーシスト排泄には大きな影響が現れなかったことが推察される。一方, 鶏寄生種を用いた実験では, 免疫抑制によって再感染後のオーシスト排泄の変化が認められている<sup>15)</sup>。免疫機構の異なる哺乳類と鳥類とを単純に比較することはできないが, 鶏寄生種では虫体の残留は確認されておらず, 初感染を耐過して虫体が一度排除された後, 免疫抑制状態の宿主において, 再感染によって侵入した虫体が初感染同様に発育できたことが推察される。

一方, 昨年度の本助成研究において, 単回感染

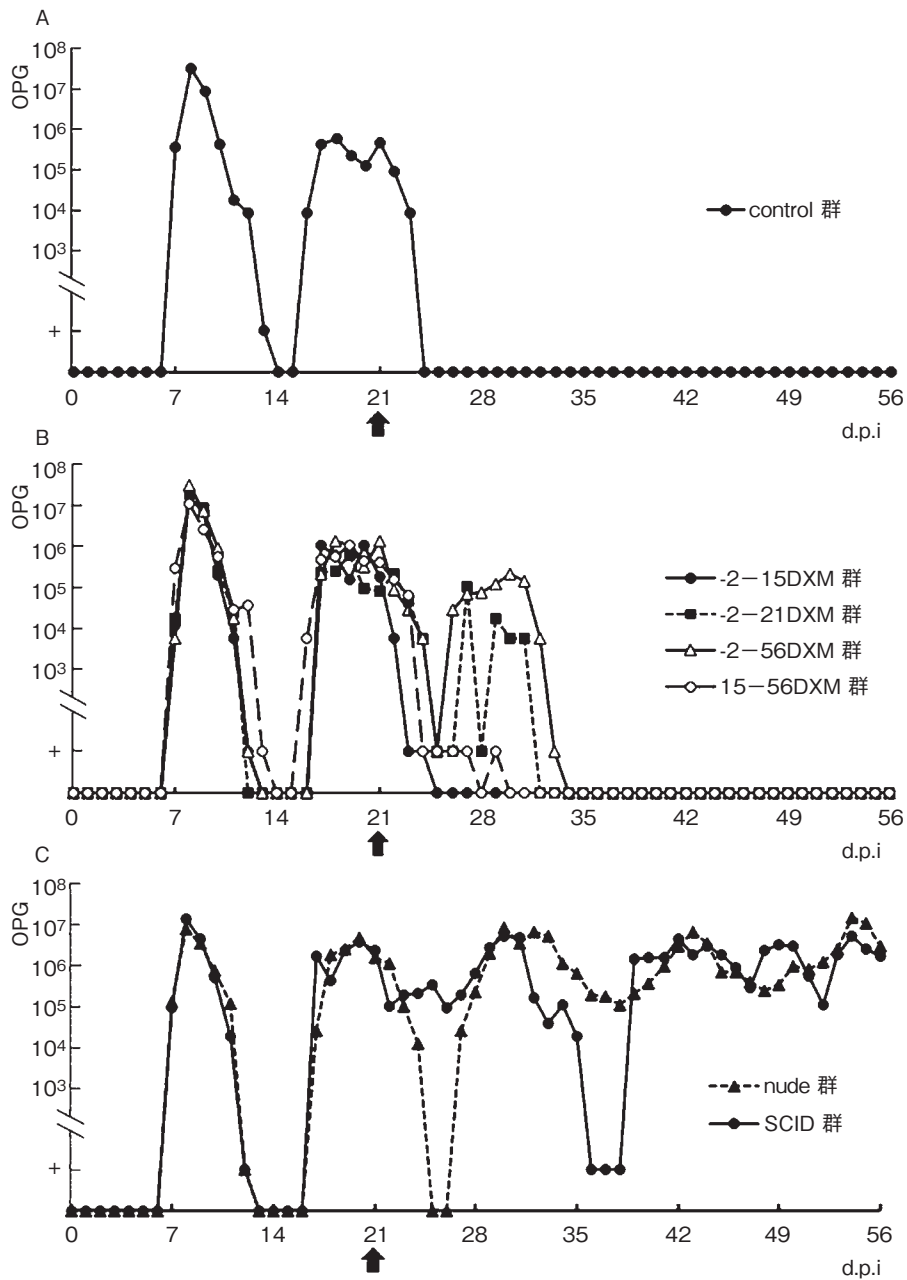


Fig. 1 Oocyst shedding of DW group (A), 4 groups treated by DXM (B), and immunodeficient (SCID and nude mice) group (C). All mice were inoculated twice on day 0 (primary infection) and day 21 (challenge infection) (arrows). (A) Twice oocyst shedding periods were confirmed. (B and C) The number and duration of oocyst shedding increased and prolonged in DXM, SCID and nude groups. + : Oocyst positive by sugar flotation method. OPG : oocysts per gram of feces : d.p.i., days post infection.

後、完全に耐過した後の免疫抑制によって残留虫体の再発育が誘導され、オーシスト排泄が起こるのかという問題が未解決であった。これはデキサ

メタゾンの投与量や投与方法などの条件設定に問題があったと考えられた。本研究では、初感染後約3週間でオーシスト排泄が収束し、宿主が再感染

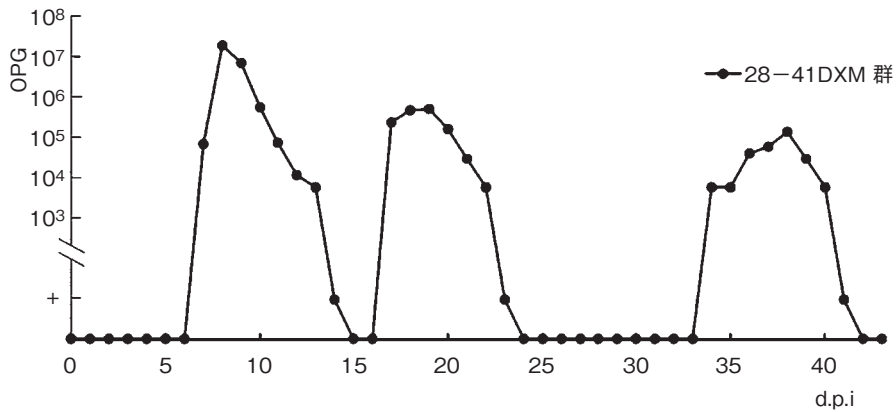


Fig. 2 Oocyst shedding in mice treated by DXM from day 28 to 41 after only primary infection. Oocyst shedding clearly recurred from day 34 to day 41. + : Oocyst positive by sugar flotation method. OPG : oocysts per gram of feces ; d.p.i., days post infection.

に対する抵抗性を獲得したことが明らかで、残留虫体の発育も停止している初感染後28日から2週間、比較的高用量のデキサメタゾンを投与することにより、明らかなオーシスト排泄が認められた (Fig. 2)。これにより、免疫学的に感染を防御できるはずの宿主においても虫体が生存でき、さらにはそれが再発源になり得るとということが明確に証明されたことになる。

今回、免疫正常BALB/cマウスにおいて解析を行った32種中10種の、明確に「動き」が確認されたサイトカインの結果を示した (Fig. 3)。本種感染におけるサイトカインごとの詳細な評価は今後行っていく予定であるが、少なくともこれらのサイトカイン解析結果によって、感染に伴って正常に宿主免疫が反応していることは明らかにされた。解析が完了せず本報告では結果を示せなかったSCIDマウスにおけるサイトカイン解析、および免疫正常および免疫不全マウスにおける血中抗 *E. kriegsmanni* 抗体価、腸管IgAの解析も進行中である。抵抗性を獲得した免疫正常宿主においてさえも特定の発育ステージにある虫体が生存することによって起こる、これら潜在的感染延長現象と宿主免疫との相関を明らかにし、本助成の成果

として論文発表する予定である。

感染症の制圧にはワクチンをはじめとする予防法と治療薬の開発は必須の課題である。これまでの本種における成果により、当然のことながら、まず宿主の免疫状態の変化により、虫体の再発育が起これ、オーシスト排泄が惹起されることは明らかである。他方で、すべての感染マウスで認められた1回目と2回目のオーシスト排泄期の分割、および免疫不全モデルマウスで認められた長期のオーシスト排泄期において、一定間隔で発育の休止と再開を繰り返す現象は、宿主免疫の影響ではなく、虫体の独自の発育周期によるものではないかと予想される。これら感染延長を可能とするのは、宿主免疫や薬剤にさえも抵抗性であると推測される第2代メロントの「生存」という特殊な性状であろう。したがって、この抵抗性ステージの虫体を排除することなくコクシジウム症の対策は完了しないであろう。今後、この特殊なステージにある虫体をより詳細に調べ、これらを排除するメカニズムを明らかにすることは、これまでとは戦略の異なる新たな予防法や治療法の開発に貢献する重要な情報となる。本助成で得られた知見を基に、*Eimeria*属原虫の感染に対する宿主

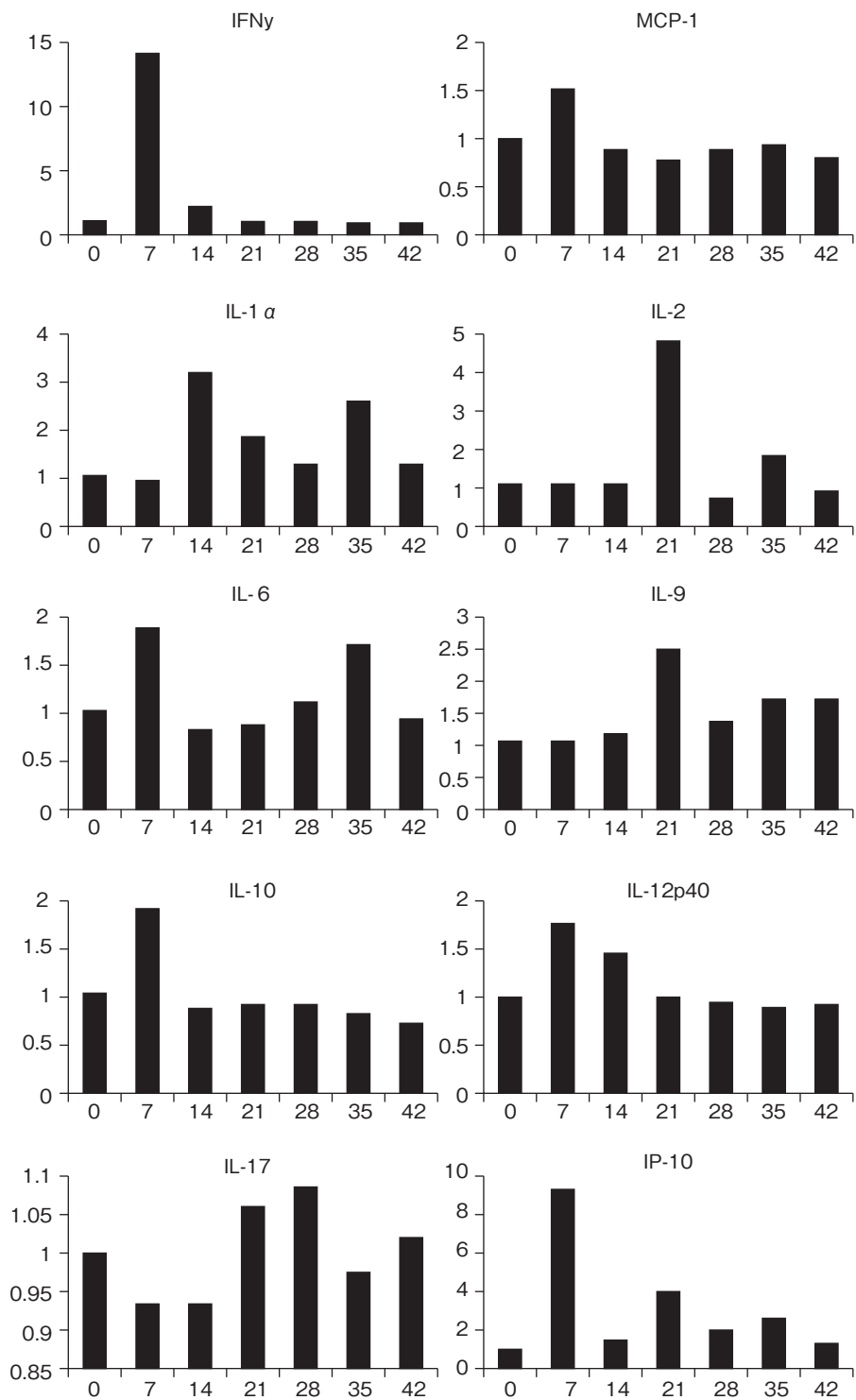


Fig. 3 Analysis of 10 cytokines on days 0, 7, 14, 21, 28, 35 and 42 after primary infection in BALB/c mice. Data were shown as relative values to that of day 0, respectively. All cytokines were clearly moved with time after infection.



免疫および特殊な虫体の詳細な性状解析を継続していく予定である。

#### 4. 要 約

*Eimeria*属原虫は、主に脊椎動物の消化管に寄生するコクシジウム類で、特に鶏や牛において世界中で多大な被害をもたらしている。*Eimeria*属原虫の感染は一過性で自己治癒し、また宿主は初感染を耐過すると再感染に抵抗性を獲得することも知られている。しかしながら、我々のこれまでの研究により、マウスを宿主とする*E. kriegsmanni*において、第2代メロントがオーシスト排泄終了後も寄生部位である盲腸上皮細胞に存在し続けているということが明らかになった。本研究では、再感染の影響を調べるため、免疫正常のBALB/cマウスおよび先天性免疫不全 (nudeおよびSCID) マウスにおいて、デキサメタゾンによる免疫抑制下において感染実験を実施した。すべてのマウスに対して2回の接種 (day 0 および day 21) が行われた。その結果、オーシスト排泄状況は初感染のみの実験とほとんど同様の結果が得られた。すなわち、すべての実験群において、オーシスト排泄数および排泄器官になんらかの増大と延長が認められた。このことは再感染由来の虫体が補充されたものの、本種においては初感染由来の虫体が生存しているため、オーシスト排泄に影響しなかったことが推察された。一方、鶏寄生種を用いた免疫抑制再感染実験では、再感染後のオーシスト排泄が認められている。鶏寄生種では初感染後の虫体の生存は知られておらず、そのため再感染で接種された虫体が免疫抑制処置によって正常に発育した結果ではないだろうか。さらに、免疫正常マウスにおけるサイトカイン解析によって、宿主免疫の明らかな動きが示された。加えて、進行中の血中抗体価および腸管IgAの解析と併せて、これら宿主免疫反応と*E.*

*kriegsmanni*虫体の発育との相関をより詳細に調べていく予定である。

#### 文 献

- 1) Dauguschies, A., Najdrowski, M. : Eimeriosis in cattle : current understanding, *Journal of Veterinary Medicine*, **52**, 417~427, 2005.
- 2) Williams, R. B. : A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry, *International Journal for Parasitology*, **29**, 1209~1229, 1999.
- 3) Philippe, P., Alzieu, J. P., Taylor, M. A., Dorchies, P. : Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan®) and toltrazuril (Baycox bovis®) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves, *Veterinary Parasitology*, **206**, 129~137, 2014.
- 4) Wallach, M. : Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis, *Institute for the Biotechnology of Infectious Diseases*, **26**, 382~387, 2010.
- 5) Chapman, H. D., Jeffers, T. K. : Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production, *International Journal for Parasitology*, **4**, 214~217, 2014.
- 6) Wnderlich, F., AI-Qurasishy, S., Steinbrenner, H., Sies, H., Dkhil, M. A. : Towards identifying novel anti-*Eimeria* against : trace elements, vitamins, and plant-based natural products, *Parasitology Research*, **133**, 3547~3556, 2014.
- 7) Matsui, T., Fujino, T., Kobayashi, F., Morita, T., Imai, S. : Life cycle of *Eimeria kriegsmanni*-like coccidium in the mouse (*Mus musculus*), *Journal of Veterinary Medical Science*, **68**, 331~336, 2006.
- 8) Takeo, T., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Maeda, H., Kusakisako, K., Matsui, T., Mochizuki, M., Matsuo, T. : Molecular and phylogenetic characterizations of an *Eimeria kriegsmanni* Yakimoff & Gouseff, 1938 (Apicomplexa : Eimeriidae) mouse intestinal protozoan parasite by partial 18S ribosomal RNA gene sequence analysis, *Parasitology International*, **63**, 627~630, 2014.
- 9) Hashimoto, K., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Endo, K., Umemiya-Shirafuji, R., Matsui, T., Matsuo, T. : Host specificity and *in vivo* infectivities of the mouse coccidian parasites *Eimeria kriegsmanni*, *Acta Parasitologica*, **59**, 337~342, 2014.
- 10) Ono, Y., Matsubayashi, M., Kawaguchi, H., Tsujio, M., Mizuno, M., Tanaka, T., Masatani, T., Matsui, T., Matsuo, T. : Course of induced infection by *Eimeria kriegsmanni* in immunocompetent and immunodeficient mice, *Parasitology Research*, **115**,



- 211~215, 2016.
- 11) Takeo, T., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Tsujio, M., Umemiya-Shirafuji, R., Tsuji, N., Fujisaki, K., Matsui, T., Matsuo, T. : Evaluation of *Eimeria kriegsmanni* as a murine model for testing the efficacy of anti-parasitic agents, *Acta Parasitologica*, **61**, 195~200, 2015.
  - 12) Inoue, K., Tsujio M., Matsubayashi, M., Inoue, R., Hatai, H., Andoh, M., Abe, K., Matsui, T., Matsuo, T. : Susceptibility to various coccidiostats in the murine coccidian parasite *Eimeria kriegsmanni*, *Acta Parasitologica*, **64**, 418~422, 2019.
  - 13) Mesfin, G. M., Bellamy, J. E. C. : Effects of acquired resistance on infection with *Eimeria falciformis* var. *pragensis* in mice, *Infection and Immunity*, **23**, 108~114, 1979.
  - 14) Rose, M. E., Wakelin, D., Hesketh, P. : Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice, *Infection and Immunity*, **57**, 1599~1603, 1989.
  - 15) Isobe T., Lillehoj, H. S. : Dexamethasone suppresses T cell-mediated immunity and enhances disease susceptibility to *Eimeria mivati* infection, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **39**, 431~446, 1993.

## 豚インフルエンザウイルス国内分離株の抗原性解析

Antigenic analyses of swine influenza viruses isolated in Japan

小澤 真

(鹿児島大学共同獣医学部)

Makoto Ozawa

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Since the influenza pandemic in 2009, the causative agent, the so-called “A(H1N1)pdm09 virus” has been circulating in both human and swine populations. Although phylogenetic analyses of the hemagglutinin (HA) gene segments have revealed broader genetic diversity of swine influenza viruses (SIVs) compared with human viruses, it remains unclear whether the genetic diversity is reflected in their HA antigenicity. To assess the impact of the genetic diversity in the HA gene segments from A(H1N1)pdm09 virus-related SIVs on their HA antigenicity, we characterized the HA antigenicity of our 12 SIV Japanese isolates in microneutralization assays with ferret antiserum and 20 mouse monoclonal antibodies raised against early A(H1N1)pdm09 virus isolates. The HA antigenicity characterized with the ferret antiserum revealed that five out of the 12 SIVs were significantly different in their HA antigenicity from that of the early A(H1N1)pdm09 viruses. The HA antigenicity characterized with the mouse monoclonal antibodies revealed that the HA antigenicity of the 12 SIVs varied each other. By using the artificial generation technique of influenza viruses, a single amino acid substitution found in one of the 12 SIVs, a serine-to-arginine substitution at position 190 (the H1 numbering) in HA, was demonstrated to be a critical determinant of the HA antigenicity. These results indicate that the genetic diversity in the A(H1N1)pdm09 virus-related SIVs is reflected in their HA antigenicity. These results also imply the importance of SIV surveillance not only for swine production, but also for public health.

### 1. 目 的

豚インフルエンザウイルスは、養豚産業に経済被害をもたらすだけでなく、ヒトへ伝播して人獣共通感染症も引き起こす。そのため、家畜衛生と公衆衛生の両面において重要な病原体であり、その特性の解明や制御方法の確立は社会的命題の一つに位置づけられる。とりわけ、2009年に豚イン

フルエンザウイルスを起源とするA(H1N1)pdm09ウイルスがヒトの間で世界的な大流行—パンデミック—を引き起こして以来、豚インフルエンザウイルスの制御へ向けた研究の重要性は高まっている。A(H1N1)pdm09ウイルスは、パンデミック発生以降もヒト社会で冬季の流行を繰り返しており、現在では季節性インフルエンザの原因ウイルスのひとつに分類されている<sup>1)</sup>。さらに

A(H1N1)pdm09ウイルスは、世界各地で飼養される豚からも相次いで分離されており<sup>2-6)</sup>、われわれも国内でA(H1N1)pdm09ウイルスまたはA(H1N1)pdm09ウイルス由来のHA遺伝子分節を有する豚インフルエンザウイルスを分離してきた<sup>7,8)</sup>。

インフルエンザウイルスのウイルス粒子表面に発現するヘマグルチニン(HA)タンパク質は、宿主細胞への付着・感染を担う糖タンパク質で、その遺伝子情報はHA遺伝子分節にコードされている。ウイルス感染やワクチン接種によって宿主体内で産生される抗体がHAタンパク質に結合すると、ウイルスの細胞への感染が阻害—中和—される。そのため、各ウイルス分離株が有するHA遺伝子分節の遺伝子解析や、HAタンパク質と抗体との反応性—抗原性—の解析は、ウイルス学および免疫学的に重要で、ワクチン株の評価・選定などに不可欠な知見をもたらす。

これまで実施されたA(H1N1)pdm09ウイルス・ヒト分離株の解析は、HA遺伝子分節の遺伝的特性およびHAタンパク質の抗原性に関して、他の季節性インフルエンザウイルスと同様で、経年的な変化は確認されるものの多様性はきわめて乏しく、単一方向へ変異・進化していることを示している。一方、近年われわれが豚から分離したA(H1N1)pdm09ウイルスは、同系統のヒト分離株よりも高い遺伝的多様性を示した<sup>7,8)</sup>。約30年前に実施された研究<sup>9)</sup>において、インフルエンザウイルスの豚における変異速度はヒトにおける変異速度よりも遅いことが示されて以来、この知見は当該研究領域において広く支持されてきた。しかしわれわれの研究結果は、従来の知見に対する再考の必要性を示唆している。

本研究では、A(H1N1)pdm09ウイルス国内豚分離株に認められたHA遺伝子分節の遺伝的多様性が、HAタンパク質の抗原性に与える影響を評

価することを目的として、豚インフルエンザウイルス12株の抗原性を、パンデミック初期分離株を抗原として調整されたフェレット抗血清ならびにマウスモノクローナル抗体を用いた中和試験により解析した。

## 2. 方法

### 2.1 細胞とウイルス

犬腎臓由来 $\alpha$ 2,6結合シアル酸過剰発現AX4細胞<sup>10)</sup>(東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与)は5%新生子牛血清含有MEM培地で、ヒト胎児腎臓由来HEK293T細胞(河岡義裕教授より分与)は10%牛胎児血清含有DMEM培地で、それぞれ5%CO<sub>2</sub>・37℃条件下において継代培養した。またインフルエンザウイルスを感染させたAX4細胞は、TPCK処理トリプシン(0.5  $\mu$ g/ml)を添加した0.15%牛血清アルブミン含有MEM培地で培養した。

A(H1N1)pdm09ウイルス由来のHA遺伝子分節を有する豚インフルエンザウイルス国内分離株12株(Fig. 1, 灰色ハイライト)のほか、リバーシジェネティクス法(2.2参照)で作出したパンデミック初期分離株A/California/04/2009(H1N1)(CA04株)の野生型、ならびにHA遺伝子分節に特定のアミノ酸変異を導入したHA変異体を使用した。各ウイルス株はAX4細胞へ接種して増殖させ、その培養上清を回収・分注して-80℃で凍結保存した後、AX4細胞を用いた50%組織培養感染量(TCID<sub>50</sub>)アッセイによりウイルス力価を測定した。

### 2.2 リバーシジェネティクス法

プラスミドを用いた遺伝子組換えウイルス人工作出技術、いわゆるリバーシジェネティクス法<sup>11)</sup>により、CA04株の野生型ならびにHA変異体を作出した。CA04株に由来する8本の遺伝子分節に対応した8種類のウイルス遺伝子発現プラスミ

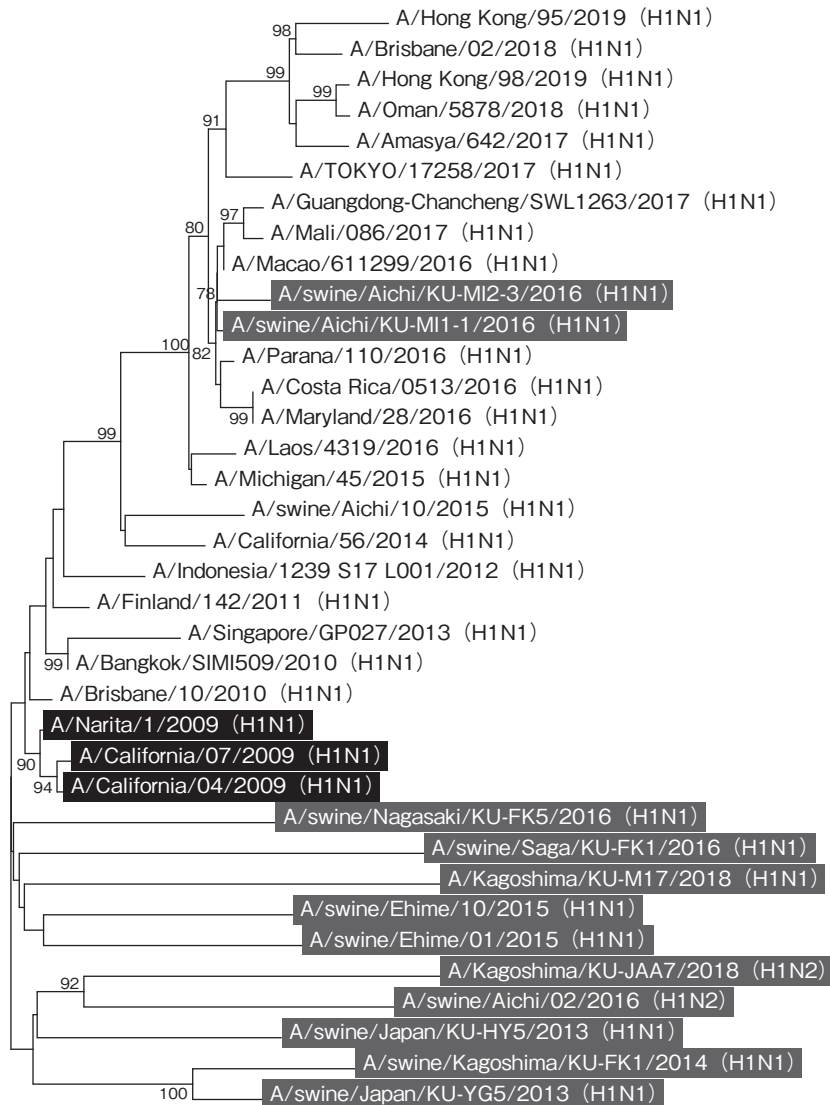


Fig. 1 Phylogenetic tree of the HA gene segments from A(H1N1)pdm09 viruses. The nucleotide sequences of the A(H1N1)pdm09 virus-related HA gene segments from swine isolates used in this study (highlighted in gray) and early isolates of the 2009 influenza pandemic (highlighted in black) were phylogenetically analyzed with counterparts from the representative human isolates by using the maximum likelihood method with a bootstrapping set of 1,000 replicates. Bootstrap values of >70% are shown at the nodes.

ド<sup>12)</sup> (河岡義裕教授より分与) およびウイルス遺伝子 (マイナス鎖RNA) の転写・複製を担う4種類のウイルスタンパク質の発現プラスミド<sup>12)</sup> (河岡義裕教授より分与) を混和し, TransIT-293 Reagent (Mirus社) を用いて HEK293T細胞へ導入した。2~3日間培養した

後に, 上清へ産生された各ウイルス株を回収した。野生型ウイルスの作出には先行研究で調整されたCA04株野生型HA遺伝子分節の発現プラスミド<sup>12)</sup> を使用し, HA変異体の作出には, 野生型HA遺伝子分節の発現プラスミドを鋳型に任意のアミノ酸変異を導入した変異HA遺伝子分節の発

現プラスミドを調製して使用した。

### 2.3 抗体

パンデミック初期分離株A/California/07/2009(H1N1)を免疫抗原として調製されたフェレット抗血清(国立感染症研究所・渡辺真治室長より分与)、およびパンデミック初期分離株A/Narita/1/2009(H1N1)に対して中和活性を示し、そのエピトープも同定されている20クローンのマウスモノクローナル抗体(北海道大学・高田礼人教授より分与)を使用した。なお、CA04株を含めたこれら3株のパンデミック初期分離株は、そのHAタンパク質の抗原性に明確な差異はないことが先行研究<sup>13)</sup>により確認されている。

### 2.4 中和試験

フェレット抗血清ならびにマウスモノクローナル抗体を、RDE(II)「生研」(デンカ生研社)で処理して非特異的ウイルス感染阻止因子を除去し10倍希釈液とした後、さらに0.15%牛血清アルブミン含有MEM培地を用いて、U底96穴プレート上に2倍階段希釈列を作成した(30 $\mu$ l/穴)。この抗体希釈列へ120TCID<sub>50</sub>/30 $\mu$ lに調製した試験ウイルス株30 $\mu$ l/穴を加えてよく混和し、37°Cで1時間静置した。調製した抗体-ウイルス混合液のうち50 $\mu$ l/穴(100TCID<sub>50</sub>のウイルスを含む)を、あらかじめPBSで2回洗浄し0.15%牛血清アルブミン含有1 $\mu$ g/ml TPCK処理トリプシン添加MEM培地(50 $\mu$ l/穴)を満たした96穴プレート上のAX4細胞へ接種した。この接種細胞を5%CO<sub>2</sub>・37°C条件下で3日間培養し、顕微鏡下で確認した細胞変性効果を基にして、フェレット抗血清ならびにマウスモノクローナル抗体ごとの各試験ウイルス株に対する中和抗体価を決定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 フェレット抗血清を用いた中和試験

フェレットは、インフルエンザウイルスの感染に伴う症状や免疫応答が最もヒトに近い実験動物のひとつで、その抗血清は古くから野外ウイルスの抗原性やワクチン株の有効性の評価に利用されてきた。そして、あるフェレット抗血清の試験ウイルス株に対する中和抗体価が、免疫抗原ウイルス株に対する中和抗体価(ホモ血清抗体価)と比べて8倍以上低い場合、「その試験ウイルス株と免疫抗原ウイルス株のHAタンパク質の抗原性は有意に異なる」とみなされる<sup>14)</sup>。

HA遺伝子分節を対象とした分子系統解析により、これまでわれわれが国内で分離してきた豚インフルエンザウイルスのうち、A(H1N1)pdm09ウイルス由来のHA遺伝子分節を有する12株の多くは、A(H1N1)pdm09ウイルスのヒト分離株と遺伝的に遠縁であることが分かっている<sup>7,8)</sup>(Fig. 1)。これらの豚インフルエンザウイルス12株について、パンデミック初期分離株とのHAタンパク質の抗原性の差異を明らかにするため、A/California/07/2009(H1N1)を免疫抗原として調製されたフェレット抗血清の各試験ウイルス株に対する中和抗体価を、AX4細胞を用いた中和試験により決定した(Table 1)。CA04株に対する中和抗体価は640倍で、多くの豚インフルエンザウイルス国内分離株が同程度の中和抗体価を示した。その一方で、A/swine/Japan/KU-YG5/2013(H1N1)、A/swine/Japan/KU-HY5/2013(H1N1)、A/swine/Kagoshima/KU-FK1/2014(H1N1)、A/swine/Kagoshima/KU-M17/2018(H1N1)、A/swine/Aichi/KU-JAA7/2018(H1N2)の5株に対する中和抗体価は80倍と8倍低かった。以上の結果は、これら5株とパンデミック初期分離株のHAタンパク質の抗原性が有意に異なることを示

Table 1 Microneutralization titer against A(H1N1)pdm09 virus-related viruses.

Virus strain	ferret antiserum	Microneutralization titer of : mouse monoclonal antibody clone :																			
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T
A/California/04/2009(H1N1)	640	160	320	160	2560	160	640	80	640	640	80	320	40	1280	640	10	40	80	80	80	160
A/swine/Japan/KU-YG5/2013(H1N1)	80	160	<10	5120	160	80	<10	<10	40	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	80	640	2560	2560
A/swine/Japan/KU-HY5/2013(H1N1)	80	10	<10	20	160	40	<10	<10	80	<10	<10	<10	<10	<10	20	<10	80	10	<10	<10	<10
A/swine/Kagoshima/KU-FK1/2014(H1N1)	80	10	<10	5120	80	160	10	<10	40	<10	20	320	320	<10	80	<10	20	80	640	5120	5120
A/swine/Ehime/01/2015(H1N1)	320	20	<10	80	40	40	<10	<10	20	<10	10	<10	<10	<10	40	<10	20	20	640	5120	1280
A/swine/Ehime/10/2015(H1N1)	320	320	<10	320	160	320	5120	1280	80	40	640	1280	160	2560	1280	320	1280	320	1280	1280	1280
A/swine/Nagasaki/KU-FK5/2016(H1N1)	2560	10	10	640	160	160	1280	5120	2560	2560	5120	1280	160	2560	1280	40	320	160	1280	5120	5120
A/swine/Aichi/KU-MI2-1/2016(H1N1)	2560	10	10	2560	40	160	40	<10	160	20	160	40	20	80	5120	640	2560	1280	2560	5120	5120
A/swine/Aichi/KU-MI-3/2016(H1N1)	2560	80	<10	2560	40	160	20	<10	80	20	160	40	20	160	5120	640	5120	1280	2560	5120	5120
A/swine/Aichi/02/2016(H1N2)	160	10	<10	10	80	160	160	20	80	20	40	10	10	10	<10	80	<10	160	320	40	160
A/swine/Saga/KU-FK1/2016(H1N1)	640	160	10	5120	5120	5120	5120	10	320	20	320	160	80	320	5120	5120	5120	2560	5120	40	160
A/swine/Kagoshima/KU-MI7/2018(H1N1)	80	320	80	40	40	160	20	<10	160	320	160	640	20	2560	160	<10	20	40	20	<10	<10
A/swine/Aichi/KU-JA7/2018(H1N2)	80	20	<10	320	320	160	40	<10	160	160	<10	<10	<10	<10	160	<10	40	10	<10	<10	<10

している。

### 3.2 マウスモノクローナル抗体を用いた中和試験

A(H1N1)pdm09ウイルス由来のHA遺伝子分節を有する豚インフルエンザウイルス12株のHAタンパク質の抗原性についてさらに詳しく解析するため、パンデミック初期分離株A/Narita/1/2009(H1N1)に対して中和活性を示し、そのエピトープも同定されている20クローンのマウスモノクローナル抗体を用いて、上述のフェレット抗血清と同様の手順で、各試験ウイルス株に対する中和抗体価を決定した (Table 1)。試験ウイルス12株の中に、20クローンのモノクローナル抗体の示した中和抗体価が同一となる組み合わせは1組もなかった。以上の結果は、すべての試験ウイルス株のHAタンパク質の抗原性が互いにバラバラであることを示している。さらにこれらの結果は、国内で流行する豚インフルエンザウイルスが、HA遺伝子分節の遺伝的特性だけでなく、HAタンパク質の抗原性においても多様性を備えていることを示している。

### 3.3 HAタンパク質の抗原性を規定するアミノ酸の同定

A(H1N1)pdm09ウイルスのHAタンパク質の抗原性を規定するアミノ酸を同定するため、パンデミック初期分離株との優れた抗原性の差異が認められた豚インフルエンザウイルス5株のHAタンパク質のアミノ酸配列を詳しく解析した。20クローンのマウスモノクローナル抗体が認識するエピトープ全9カ所のアミノ酸残基を、CA04株を含むA(H1N1)pdm09ウイルスのヒト分離株と比較した結果 (Table 2)、豚インフルエンザウイルス5株はHAタンパク質141位 (H1ナンバリング<sup>15)</sup>、183位、および190位の3カ所に、ヒト分離株には見られない6種類のアミノ酸残基を有していることが分かった。



**Table 2** HA amino acid residues unique to antigenically-distinct A(H1N1)pdm09 virus swine isolates.

Virus strain	Amino acid residue* at position (H1 numbering) :								
	125	141	153	154	155	156	163	183	190
Human isolates	N	A	K/E/N	K	G/E	N/D	K/Q/I	S	S
A/swine/Japan/KU-YG5/2013(H1N1)	N	A	K	K	E	N	K	S	<u>T</u>
A/swine/Japan/KU-HY5/2013(H1N1)	N	<u>E</u>	K	K	G	N	Q	<u>P</u>	<u>N</u>
A/swine/Kagoshima/KU-FK1/2014(H1N1)	N	A	K	K	E	N	K	<u>T</u>	<u>T</u>
A/swine/Kagoshima/KU-M17/2018(H1N1)	N	A	K	K	G	D	K	<u>P</u>	S
A/swine/Aichi/KU-JAA7/2018(H1N2)	N	<u>E</u>	N	K	E	N	I	<u>P</u>	<u>R</u>

\*HA amino acid residues that are not found in A(H1N1)pdm09 viruses isolated from humans are shown in bold and underlined.

**Table 3** Microneutralization titer against CA04 HA mutants.

Virus strain	Microneutralization titer of :		
	ferret antiserum	mouse monoclonal antibody clone :	
		N	Q
wild-type CA04	640	640	80
A141E	640	NT*	NT
S183P	640	NT	NT
S183T	640	NT	NT
S190T	640	NT	NT
S190N	320	NT	NT
S190R	80	80	10

\*NT, not tested.

そこでCA04株の人工作出技術を基に、豚インフルエンザウイルス5株に特有の3ヵ所6種類のHAタンパク質アミノ酸置換—141位のアラニン—グルタミン酸置換 (A141E), S183P, S183T, S190N, S190T, およびS190R—を個別に有する遺伝子組み換えウイルス (HA変異体) を作出して、フェレット抗血清との反応性を中和試験により調べた (Table 3)。フェレット抗血清は、ほとんどのHA変異体に対してCA04株と同程度の中和抗体価を示したが、S190Rを有するHA変異体に対する中和抗体価は80倍と、CA04株に対する中和抗体価 (640倍) と比べて8倍低かった。さらに、190位のセリンをエピトープとする2クローンのマウスモノクローナル抗体—クローンN

およびQ—の当該HA変異体に対する中和抗体価を決定した (Table 3)。抗体クローンNおよびQのCA04株に対する中和抗体価は640倍および80倍だった一方で、これら抗体の当該HA変異体に対する中和抗体価は80倍および10倍と、いずれも8倍低かった。以上の結果は、HAタンパク質190位のアミノ酸残基が、A(H1N1)pdm09ウイルスのHAタンパク質の抗原性を規定する要因のひとつであることを示している。さらにこれらの結果は、独自に変異・進化を重ね多様性を示す豚インフルエンザウイルスの中に、ヒト流行株とは抗原性の異なるウイルスが含まれていることを示唆している。

以上の研究結果は、A(H1N1)pdm09ウイルス

国内豚分離株の、遺伝子だけでなくHAタンパク質の抗原性における多様性を示すだけでなく、豚インフルエンザサーベイランスの家畜衛生と公衆衛生の両面における重要性を示唆している。

#### 4. 要 約

2009年にインフルエンザのパンデミックを引き起こしたA(H1N1)pdm09ウイルスは、その後ヒトと豚の両方で流行を続けている。これまでの同ウイルス系統のHA遺伝子分節の遺伝的解析により、豚分離株はヒト分離株よりも高い遺伝的多様性を示すことが明らかとなっているが、ウイルス学および免疫学的により重要な「抗原性」との関連性は解明されていない。本研究では、A(H1N1)pdm09ウイルス系統の国内豚分離株に認められたHA遺伝子分節の遺伝的多様性が、HAタンパク質の抗原性に与える影響を評価することを目的として、豚インフルエンザウイルス12株の抗原性を、パンデミック初期分離株を抗原として調整されたフェレット抗血清ならびにマウスモノクローナル抗体を用いた中和試験により解析した。試験ウイルス12株のうち5株のHAタンパク質が、パンデミック初期分離株とは有意に異なる抗原性を示した。また試験ウイルス12株の中に、HAタンパク質の抗原性が一致する組み合わせはなく、互いにバラバラであった。さらに、インフルエンザウイルスの人工作出技術を用いて、試験ウイルスのひとつに見られたHAタンパク質の1カ所のアミノ酸置換が、その抗原性を規定していることを明らかにした。これらの研究結果は、A(H1N1)pdm09ウイルス系統の国内ブタ分離株が、HAタンパク質の抗原性においても多様性を備えていることを示すだけでなく、豚インフルエンザサーベイランスの家畜衛生と公衆衛生の両面における重要性を示唆している。

#### 文 献

- 1) WHO : Review of the 2013-2014 winter influenza season, northern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec.* **89**, 245~256, 2014.
- 2) Howden, K. J., Brockhoff, E. J., Caya, F. D., McLeod, L. J., Lavoie, M., Ing, J. D., Bystrom, J. M., Alexandersen, S., Pasick, J. M., Berhane, Y., Morrison, M. E., Keenlside, J. M., Laurendeau, S., Rohonczy, E. B. : An investigation into human pandemic influenza virus(H1N1)2009 on an Alberta swine farm, *Can Vet J.* **50**, 53~61, 2009.
- 3) Pereda, A., Cappuccio, J., Quiroga, M. A., Baumeister, E., Insarralde, L., Ibar, M., Sanguinetti, R., Cannilla, M. L., Franzese, D., Escobar Cabrera, O. E., Craig, M. I., Rimondi, A., Machuca, M., Debenedetti, R. T., Zenobi, C., Barral, L., Balzano, R., Capalbo, S., Risso, A., Perfumo, C. J. : Pandemic (H1N1)2009 outbreak on pig farm, *Argentina. Emerg Infect Dis.* **16**, 304~307, 2010.
- 4) Song, M. S., Lee, J. H., Pascua, P. N., Baek, Y. H., Kwon, H. I., Park, K. J., Choi, H. W., Shin, Y. K., Song, J. Y., Kim, C. J., Choi, Y. K. : Evidence of human-to-swine transmission of the pandemic (H1N1)2009 influenza virus in South Korea, *J Clin Microbiol.* **48**, 3204~3211, 2010.
- 5) Welsh, M. D., Baird, P. M., Guelbenzu-Gonzalo, M. P., Hanna, A., Reid, S. M., Essen, S., Russell, C., Thomas, S., Barrass, L., McNeilly, F., McKillen, J., Todd, D., Harkin, V., McDowell, S., Choudhury, B., Irvine, R. M., Borobia, J., Grant, J., Brown, I. H. : Initial incursion of pandemic(H1N1)2009 influenza A virus into European pigs, *Vet Rec.* **166**, 642~645, 2010.
- 6) Holyoake, P. K., Kirkland, P. D., Davis, R. J., Arzey, K. E., Watson, J., Lunt, R. A., Wang, J., Wong, F., Moloney, B. J., Dunn, S. E. : The first identified case of pandemic H1N1 influenza in pigs in Australia, *Aust Vet J.* **89**, 427~431, 2011.
- 7) Ozawa, M., Matsuu, A., Yonezawa, K., Igarashi, M., Okuya, K., Kawabata, T., Ito, K., Tsukiyama-Kohara, K., Taneno, A., Deguchi, E. : Efficient isolation of Swine influenza viruses by age-targeted specimen collection, *J Clin Microbiol.* **53**, 1331~1338, 2015.
- 8) Okuya, K., Matsuu, A., Kawabata, T., Koike, F., Ito, M., Furuya, T., Taneno, A., Akimoto, S., Deguchi, E., Ozawa, M. : Distribution of gene segments of the pandemic A(H1N1)2009 virus lineage in pig populations, *Transbound Emerg Dis.* **65**, 1502~1513, 2018.
- 9) Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y., Donatelli, L., Guo, Y. J., Webster, R. G. : Evolution of influenza A virus nucleoprotein genes : implications for the origins of H1N1 human and classical swine viruses, *J Virol.* **65**, 3704~3714,

- 1991.
- 10) Hatakeyama, S., Sakai-Tagawa, Y., Kiso, M., Goto, H., Kawakami, C., Mitamura, K., Sugaya, N., Suzuki, Y., Kawaoka, Y. : Enhanced expression of an alpha2,6-linked sialic acid on MDCK cells improves isolation of human influenza viruses and evaluation of their sensitivity to a neuraminidase inhibitor. *J Clin Microbiol*, **43**, 4139~4146, 2005.
- 11) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., Kawaoka, Y. : Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9345~9350, 1999.
- 12) Li, C., Hatta, M., Burke, D. F., Ping, J., Zhang, Y., Ozawa, M., Taft, A. S., Das, S. C., Hanson, A. P., Song, J., Imai, M., Wilker, P. R., Watanabe, T., Watanabe, S., Ito, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Russell, C. A., James, S. L., Skepner, E., Maher, E. A., Neumann, G., Klimov, A. I., Kelso, A., McCauley, J., Wang, D., Shu, Y., Odagiri, T., Tashiro, M., Xu, X., Wentworth, D. E., Katz, J. M., Cox, N. J., Smith, D. J., Kawaoka, Y. : Selection of antigenically advanced variants of seasonal influenza viruses. *Nat Microbiol*, **23**, 16058, 2016.
- 13) Matsuzaki, Y., Sugawara, K., Nakauchi, M., Takahashi, Y., Onodera, T., Tsunetsugu-Yokota, Y., Matsumura, T., Ato, M., Kobayashi, K., Shimotai, Y., Mizuta, K., Hongo, S., Tashiro, M., Nobusawa, E. : Epitope mapping of the hemagglutinin molecule of A/(H1N1)pdm09 influenza virus by using monoclonal antibody escape mutants. *J Virol*, **88**, 12364~12373, 2014.
- 14) Skowronski, D. M., Janjua, N. Z., De Serres, G., Sabaiduc, S., Eshaghi, A., Dickinson, J. A., Fonseca, K., Winter, A. L., Gubbay, J. B., Krajdien, M., Petric, M., Charest, H., Bastien, N., Kwindt, T. L., Mahmud, S. M., Van Caesele, P., Li, Y. : Low 2012-13 influenza vaccine effectiveness associated with mutation in the egg-adapted H3N2 vaccine strain not antigenic drift in circulating viruses. *PLoS One*, **25**, e92153, 2014.
- 15) Caton, A. J., Brownlee, G. G., Yewdell, J. W., Gerhard, W. : The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell*, **31**, 417~427, 1982.

## 食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の 開発・評価（Ⅱ）

Development and evaluation for determination of number of antimicrobial-resistant bacteria in meats（Ⅱ）

石原 加奈子<sup>1</sup>・Shwe Thiri Maung Maung Khin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>東京農工大学農学研究院, <sup>2</sup>日本獣医師会)

Kanako Ishihara<sup>1</sup> and Shwe Thiri Maung Maung Khin<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology, <sup>2</sup>Japan Veterinary Medical Association)

Antimicrobial resistance arising from antimicrobial use is of global concern. The WHO and OIE require programs to monitor antimicrobial resistance in zoonotic bacteria, animal pathogens and commensal bacteria. *Escherichia coli*, one of coliform bacteria, found in the commensal fecal flora of animals and contaminates meats such as chicken. It has been widely used as indicator bacteria for monitoring of antimicrobial resistance. In order to estimate the number of coliform bacteria harbored antimicrobial resistance genes contaminated chicken meats, combined method of most probable number method (MPN) and PCR (MPN-PCR) were applied in our previous study. To evaluate the MPN-PCR, amplified antimicrobial resistance genes by MPN-PCR were confirmed by sequencing in this study.

The *bla*<sub>TEM</sub> detected by the MPN-PCR method in chicken meats were identified to mainly *bla*<sub>TEM-1</sub> (59/68, 86.8%), and three types of mutants of *bla*<sub>TEM-1</sub> (five (7.4%), two (2.9%) and two samples (2.9%), respectively) were observed. It was also confirmed that ampicillin-resistant coliform bacteria isolated from chicken meats harbored *bla*<sub>TEM-1</sub> (8 isolates) and the same three types of mutants (two, one and one isolates, respectively). Therefore, the estimated number of *bla*<sub>TEM</sub>-harboring coliform bacteria by MPN-PCR was considered to be reliable. Detected *bla*<sub>CMY-2</sub> by MPN-PCR was identified to *bla*<sub>CMY-2</sub> (4 samples), *bla*<sub>CMY-34</sub> (3 samples) and other novel mutant (1 samples). It was considered possible to estimate the number of *bla*<sub>CMY-2 group</sub>-harboring coliform bacteria by MPN-PCR. Among 59 cefazolin-resistant coliform bacteria isolated from chicken meats, *bla*<sub>CTX-M</sub> was not detected. On the other hand, MPN-PCR method could detect *bla*<sub>CTX-M</sub> in 5 samples out of 120 chicken samples (4.2%) in our previous study. The detection sensitivity of MPN-PCR method to detect *bla*<sub>CTX-M</sub> is higher than that in the conventional method of isolation of bacteria and antimicrobial susceptibility test. However, MPN-PCR method targeting *bla*<sub>CTX-M</sub> needed determination of the DNA sequence to confirm *bla*<sub>CTX-M</sub> or others.

## 1. 目 的

食用動物への抗生物質の使用が選択した薬剤耐性菌による人の健康危害が危惧される<sup>1)</sup>。食用動物や食肉を中心に薬剤耐性菌の保菌・汚染割合が報告されている<sup>2)</sup>。食肉中の薬剤耐性菌の菌数が多いほど、薬剤耐性菌が加熱調理後も、食肉に生残しやすく、調理過程で他の食品を汚染しやすい。また、人の腸管内に定着しやすく、他の細菌に耐性遺伝子を伝達するリスクも高い。しかし、食品中の薬剤耐性菌の菌数を測定した報告はほとんどない。そこで先行研究で、最確数法 (Most Probable Number Method, MPN法) に、耐性遺伝子を検出するPCR法を組み合わせた“MPN-PCR法”により、鶏肉120検体中の *tetA*, *tetB*, *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>CTX-M</sub>* および *bla<sub>CMY-2</sub>* の保有細菌数を推定した<sup>3)</sup>。MPN-PCR法で検出した *tetA* および *tetB* の塩基配列は、既報の該当遺伝子と一致した。MPN-PCR法で鶏肉28検体中5検体から検出した *bla<sub>CTX-M</sub>* は、*bla<sub>CTX-M-36</sub>* および *bla<sub>CTX-M-2 group</sub>* と同定できたが、鶏肉23検体から検出した遺伝子は、同じクラスAのβラクタマーゼ遺伝子ではあるが、*bla<sub>CTX-M</sub>* とは異なる *bla<sub>OXY</sub>* 等と同定された。そこで、本研究では、先行研究で検出した *bla<sub>TEM</sub>* および *bla<sub>CMY-2</sub>* を再度増幅して、塩基配列を決定し、目的の耐性遺伝子が検出されているかを確認し、MPN-PCR法の評価を行った。

## 2. 方 法

### 2.1 被検菌および被検DNA検体

先行研究で、鶏肉から分離した大腸菌群117株およびMPN-PCR法に用いた鶏肉培養液から抽出したDNA806検体から、検査項目に応じて菌株およびDNA検体を選んで以下の検査に供試した<sup>3)</sup>。

### 2.2 *bla<sub>TEM</sub>* の増幅

鶏肉から分離した大腸菌群のうち、アンピシリ

ン耐性株を中心に67株を選び、*bla<sub>TEM</sub>* を保有しているかPCR法で確認した。また、先行研究で *bla<sub>TEM</sub>* を検出したDNA176検体のうち、鶏肉1検体ごとにDNA1検体を選び、DNA73検体から *bla<sub>TEM</sub>* を増幅しなおした。MPN-PCR法では、効率的に耐性遺伝子を検出するため、マルチプレックスPCR法を用いたが<sup>4)</sup>、本研究では、*bla<sub>TEM</sub>* のほぼ全長を増幅した<sup>5)</sup>。

### 2.3 *bla<sub>CMY-2</sub>* の増幅

先行研究で *bla<sub>CMY-2</sub>* を検出したDNA26検体のうち、鶏肉1検体ごとにDNA1検体を選び、DNA14検体から *bla<sub>CMY-2</sub>* を増幅しなおした。*bla<sub>TEM</sub>* と同様に、*bla<sub>CMY-2</sub>* のほぼ全長を増幅した<sup>5)</sup>。

### 2.4 *bla<sub>CTX-M</sub>* の増幅

鶏肉から分離した大腸菌群のうち、セファゾリン耐性株を中心に59株を選び、*bla<sub>CTX-M</sub>* の保有をPCR法で確認した<sup>6)</sup>。

### 2.5 塩基配列の決定

増幅できた薬剤耐性遺伝子は、GEL/PCR Purification Mini Kit (株式会社チヨダサイエンス, 東京, 日本) で精製し、株式会社ファスマック (神奈川, 日本) に塩基配列の決定を依頼した。決定した塩基配列は、遺伝子情報処理ソフトウェア GENETYX ver.15 (株式会社ゼネティック, 東京, 日本) を用いて、Blastn検索および既報の耐性遺伝子の塩基配列と比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 *bla<sub>TEM</sub>* の検出および塩基配列の決定

先行研究<sup>3)</sup> で *bla<sub>TEM</sub>* が検出されたDNA73検体中68検体 (93.2%) から *bla<sub>TEM</sub>* の全長が増幅でき、塩基配列を決定できた。DNA68検体のうち、59検体から検出された遺伝子は、*bla<sub>TEM-1</sub>* と同定された。*bla<sub>TEM-1</sub>* と比べ、T396Gの1塩基変異が5検体、C665Tの1塩基変異が2検体ならびにT396GおよびT539Cの2塩基変異が2検体から検出された。



アンピシリン耐性大腸菌群67株中12株から *bla*<sub>TEM</sub> を検出した。12株のうち8株が保有する遺伝子は *bla*<sub>TEM-1</sub> と同定された。他の株が保有する *bla*<sub>TEM</sub> には、*bla*<sub>TEM-1</sub> と比べ、T396Gの1塩基変異が2株、C665Tの1塩基変異が1株ならびにT396GおよびT539Cの2塩基変異が1株で認められた。

鶏肉から分離した大腸菌群が保有する *bla*<sub>TEM</sub> およびMPN-PCR法で検出した *bla*<sub>TEM</sub> はいずれも、*bla*<sub>TEM-1</sub> が主要で、前述の3つの変異型が共通して認められ、MPN-PCR法による *bla*<sub>TEM</sub> 保有細菌数の推定は信頼性が高いと考えられた。

### 3.2 *bla*<sub>CMY-2</sub>の検出および塩基配列の決定

先行研究<sup>3)</sup>で *bla*<sub>CMY-2</sub> を検出したDNA14検体中8検体 (57.1%) から、*bla*<sub>CMY-2</sub> の全長が増幅でき、塩基配列を決定できた。そのうちDNA4検体および3検体から検出された遺伝子は、それぞれ *bla*<sub>CMY-2</sub> および *bla*<sub>CMY-34</sub> と同定された。*bla*<sub>CMY-34</sub> は、*bla*<sub>CMY-2</sub> と比べ、C373A, G437C および G933A の3塩基変異が認められる遺伝子型である。残るDNA1検体から検出された遺伝子は *bla*<sub>CMY-2</sub> と比べ C373T, G381T, G437C および T822C の4塩基変異が認められた。この変異型は、NCBI (The National Center for Biotechnology Information) に登録されておらず、新たな遺伝子型であった。

再増幅できた検体数が先行研究の約半数であったことについては、再検討が必要であるが、増幅できた遺伝子は、*bla*<sub>CMY-2</sub> またはその変異型で、いずれもCMY型酵素の遺伝子であった。MPN-PCR法により *bla*<sub>CMY-2 group</sub> 保有細菌数の推定が可能と考えられた。

### 3.3 *bla*<sub>CTX-M</sub>の検出

鶏肉から分離したセファゾリン耐性大腸菌群59株の *bla*<sub>CTX-M</sub> 保有をPCR法で確認したが、2株でのみ遺伝子の増幅が認められた。陽性数が少なかったため、別の研究で分離したセファゾリン耐

性の鶏の糞便由来または乳房炎由来の大腸菌群も追加して、*bla*<sub>CTX-M</sub> 保有を調べ、増幅が認められた場合、塩基配列を決定・解析した。これら分離株からの増幅遺伝子に加え、先行研究<sup>3)</sup>で鶏肉培養液から検出し、決定した塩基配列および既報の *bla*<sub>CTX-M</sub> 等を含め作成した系統樹をFig. 1に示す。鶏肉から分離した大腸菌群2株から増幅された遺伝子は、*bla*<sub>OXY-2</sub> および *bla*<sub>OXY-6</sub> で、*bla*<sub>CTX-M</sub> は認められなかった。*bla*<sub>CTX-M</sub> 保有細菌および *bla*<sub>OXY</sub> 保有細菌の抽出DNAを用いて、特異性の高いPCR法を検討する予定であったため、その検討はできなかった。2株が保有していた *bla*<sub>OXY-2</sub> および *bla*<sub>OXY-6</sub> は、先行研究<sup>3)</sup>のMPN-PCR法でも、それぞれ鶏肉1検体由来DNA3検体および鶏肉8検体由来DNA9検体から検出された遺伝子であり、先行研究で用いた鶏肉を汚染していた大腸菌群に多く認められた耐性遺伝子であることが示唆された。

鶏肉から分離した大腸菌群からは *bla*<sub>CTX-M</sub> を検出できなかったが、先行研究<sup>3)</sup>では、鶏肉5検体の培養液の抽出DNA検体から、*bla*<sub>CTX-M-1 group</sub> である *bla*<sub>CTX-M-36</sub> および *bla*<sub>CTX-M-2 group</sub> が検出され、検体から分離した細菌の薬剤感受性や薬剤耐性遺伝子を調べる従来の方法より、MPN-PCR法の検出感度が高いと考えられた。

国内のプロイラーに関する *bla*<sub>CTX-M</sub> 保有細菌の報告を見ると、2004年から2009年に分離された糞便由来大腸菌では、*bla*<sub>CTX-M-2</sub> (6株) が最も多く<sup>7)</sup>、2010年の国産鶏肉由来大腸菌では、*bla*<sub>CTX-M-2</sub> (11株)、*bla*<sub>CTX-M-1 group</sub> の *bla*<sub>CTX-M-15</sub> (5株) および *bla*<sub>CTX-M-1</sub> (4株) が多かった<sup>8)</sup>。2012年3月に、広域セファロsporin抗生物質の適用外使用が自主的に中止され、その後、プロイラーにおける広域セファロsporin耐性大腸菌は減少したと報告されている<sup>9)</sup>。しかし、2015年から2016年の国産鶏肉の約40%から、基質拡張型βラクタマーゼ (ESBL) 産生大腸菌が分離され、その大



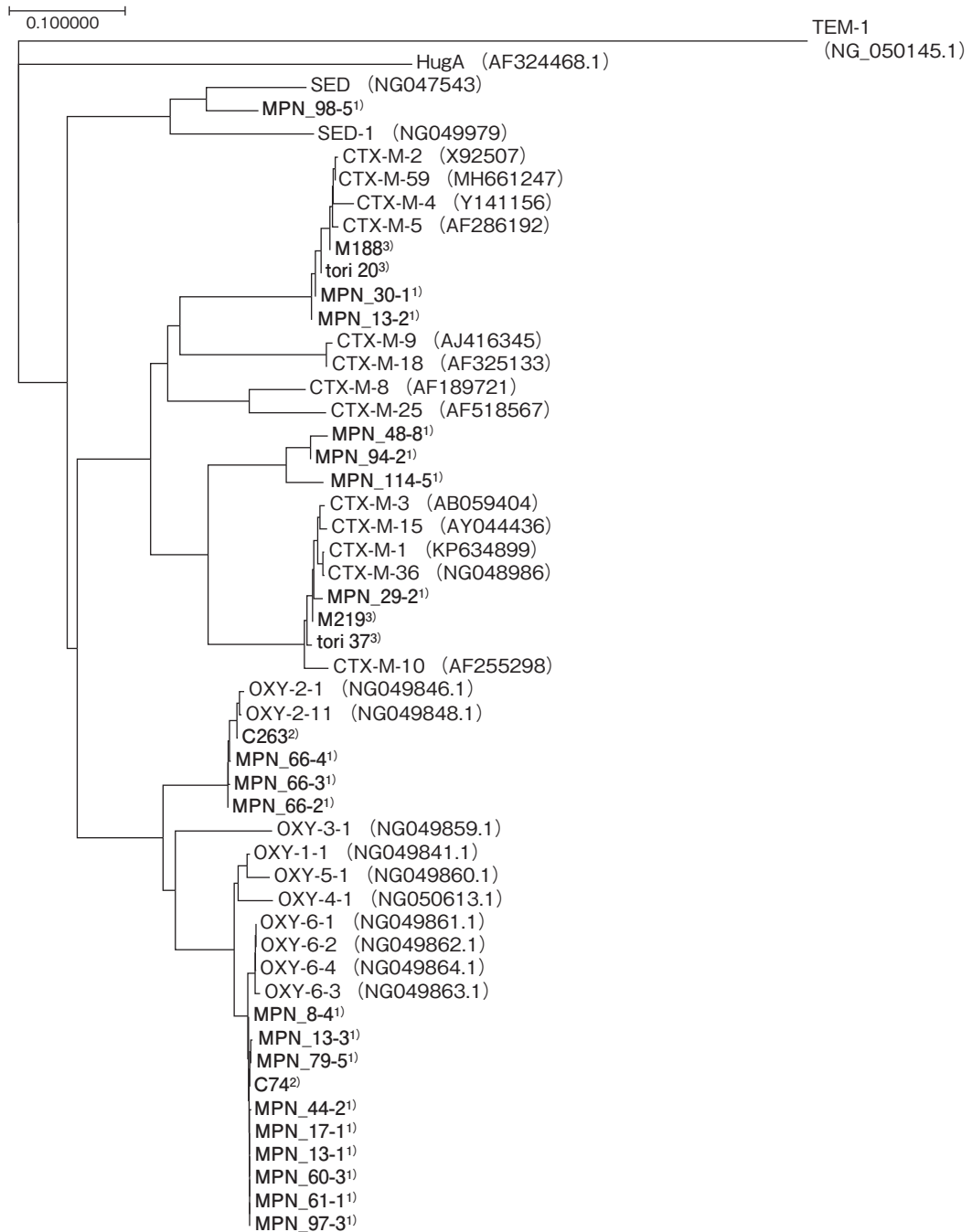


Fig. 1 Phylogenetic tree based on *bla* gene sequences of using the neighbor-joining method with GENETYX-tree (Genetyx Corp., Japan).

1) The sequences of 19 genes detected by MPN-PCR in the previous study, 2) 2 genes of bacterial isolates obtained from chicken meats and 3) 4 genes of bacterial isolates from fecal (tori20 and tori37) or mastitis samples (M188 and M219) were used for phylogenetic trees (bold type). The remaining sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information database [enzyme name and accession number (in parentheses) are shown].

腸菌では *bla*<sub>CTX-M-14</sub> (17株) および *bla*<sub>CTX-M-2</sub> (10株) が多かった<sup>10)</sup>。日本のプロイラーが保菌または鶏肉を汚染する大腸菌が保有する主要な *bla*<sub>CTX-M</sub> の型は, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2 group</sub> および *bla*<sub>CTX-M-14</sub> を含む *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub> が中心であった。先行研究<sup>3)</sup>でも, *bla*<sub>CTX-M-1 group</sub>, *bla*<sub>CTX-M-2 group</sub> および *bla*<sub>CTX-M-9 group</sub> が検出されており, 本法で用いたプライマー<sup>6)</sup>は, 標的としていない *bla*<sub>OXY</sub> 等を増幅してしまう欠点もあるが, 多様な *bla*<sub>CTX-M</sub> を検出でき, 塩基配列の決定を併用することで, *bla*<sub>CTX-M</sub> 保有細菌数を推定することが可能と考えた。塩基配列の決定により, *bla*<sub>OXY</sub> 等を識別すると同時に, *bla*<sub>CTX-M</sub> の型も決定でき, 医療上問題となる *bla*<sub>CTX-M</sub> との比較も可能となる。

#### 4. 要 約

鶏肉中の耐性遺伝子保有細菌数を推定するため, 最確数法 (Most Probable Number Method, MPN法) に, 耐性遺伝子を検出するPCR法を組み合わせた“MPN-PCR法”により検出した薬剤耐性遺伝子の塩基配列を決定し, 目的の耐性遺伝子が検出されているかを確認し, MPN-PCR法の評価を行った。

MPN-PCR法で検出した *bla*<sub>TEM</sub> は, *bla*<sub>TEM-1</sub> が主で (59/68, 86.8%), そのほかに3つの変異型が認められ (各5検体 (7.4%), 2検体 (2.9%) および2検体 (2.9%)), 鶏肉から分離した大腸菌群が保有する *bla*<sub>TEM</sub> とも一致し, MPN-PCR法による *bla*<sub>TEM</sub> 保有細菌数の推定は信頼性が高いと考えられた。MPN-PCR法で検出した *bla*<sub>CMY-2</sub> は, 当該遺伝子またはその変異型で, MPN-PCR法に

より *bla*<sub>CMY-2 group</sub> 保有細菌数の推定が可能と考えられた。鶏肉由来大腸菌群のうち, セファゾリン耐性耐性株を中心に *bla*<sub>CTX-M</sub> の検索を行ったが, 検出されなかった。一方で, MPN-PCR法では, 鶏肉120検体中5検体から *bla*<sub>CTX-M</sub> が検出されており, 検体から分離した細菌の薬剤感受性を調べる従来の方法より, MPN-PCR法の検出感度が高いと考えられた。ただし, *bla*<sub>CTX-M</sub> を標的としたMPN-PCR法には, 塩基配列の決定を併用する必要があった。

#### 文 献

- 1) WHO : Antibiotic resistance, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistances>, 2018.
- 2) 動物医薬品検査所 : <http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/h27cyousakekkagaiyou.pdf>
- 3) Ishihara, K., Nomura, S. : 平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 37, 269~274, 2019.
- 4) Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Jardine, C. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 75, 559~566, 2009.
- 5) Kojima, A., Ishii, Y., Ishihara, K., Esaki, H., Asai, T., Oda, C., Tamura, Y., Takahashi, T., Yamaguchi, K. : *Antimicrob. Agents Chemothe.*, 49, 3533~3537, 2005.
- 6) Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. : *Antimicrob. Agents Chemothe.*, 47, 3724~3732, 2003.
- 7) Hiki, M., Usui, M., Kojima, A., Ozawa, M., Ishii, Y., Asai, T. : *Foodborne Pathog. Dis.*, 10, 243~249, 2013.
- 8) Kawamura, K., Goto, K., Nakane, K., Arakawa, Y. : *Foodborne Pathog. Dis.*, 11, 104~110, 2014.
- 9) Hiki, M., Kawanishi, M., Abo, H., Kojima, A., Koike, R., Hamamoto, S., Asai, T. : *Foodborne Pathog. Dis.*, 12, 639~643, 2015.
- 10) Hayashi, W., Ohsaki, Y., Taniguchi, Y., Koide, S., Kawamura, K., Suzuki, M., Kimura, K., Wachino, J., Nagano, Y., Arakawa, Y., Nagano, N. : *Int. J. Food Microbiol.*, 284, 98~104, 2018.

## 牛呼吸器病症候群（BRDC）発症機序の解明

Breakthrough of pathogenic mechanism of bovine respiratory disease complex (BRDC)

帆保誠二・石川真悟

(鹿児島大学共同獣医学部)

Seiji Hobo and Shingo Ishikawa

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

The purpose of this study was to investigate the viruses and bacteria associated with bovine respiratory disease complex (BRDC) by clinical examinations, blood examinations, and bronchoalveolar lavage fluid examinations on Japanese Black cattle introduced from the calf auction market. In April and December, we examined 20 Japanese Black cattle (April introduction group, December introduction group; 10 each) introduced from the calf auction market. The December induction group was examined twice on days 6 and 11 after induction. The results of clinical examinations showed that patients with a fever of 40 °C or higher and respiratory symptoms had developed BRDC and could be treated. In addition, the results of bacterial isolation from bronchoalveolar lavage fluid were not necessarily associated with the development of BRDC, but the positive bovine respiratory syncytial virus (BRSV) genetic test was more likely to develop BRDC. Previous studies have shown that *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* are strongly involved in the chronicity of BRDC. However, these bacteria are not necessarily involved in the initial pathology of BRDC, but viruses such as BRSV infect the airway mucosa, reduce the resistance of the airway to infection, and the overall condition and feeding of subsequent cases. It was presumed that various factors including the environment were involved in the development and worsening of BRDC.

### 1. 目的

肺炎は、牛の死因の上位に位置する疾患であり、獣医療において最も重要な感染症のひとつである。牛肺炎の病態は牛呼吸器病症候群（BRDC）として捉えられ注目されている<sup>1,2)</sup>。BRDCは、さまざまなストレスによる感染防御能、いわゆる免疫力の低下、ウイルス感染、細菌感染を主体と

した複合的な要因が絡まりあって発症することが知られている<sup>1,2)</sup>。しかし、その初期病態については不明な点が多い。特に、セリ市場導入後の肥育素牛が、どの時期に、どのような病態でBRDCを発症するかはほとんど不明である。さらに、従来のBRDC発症時の病態解明については、鼻腔ぬぐい液の解析が実施されてきた程度であったため、BRDCの主要発症部位である気管支肺胞領域

の情報についてはまったく不明であった<sup>3, 4)</sup>。

牛医療においては、特に子牛が肺炎を発症するとその成長が著しく停滞し生産性に大きく影響することから、生産現場においては肺炎発症のコントロールとともに、早期かつ確実な診断法および治療法の開発が急務であった。そこで申請者は、これまでに伊藤記念財団の研究助成を受け、牛における気管支肺胞洗浄法を確立するとともに、慢性期の肺炎の病態にあると診断された牛に対して気管支肺胞洗浄を実施し、それぞれの真の肺炎原因菌を特定した<sup>5, 6)</sup>。その結果、*Pasteurella multocida*および*Mycoplasma bovis*がBRDC病態の慢性化に強く関与していることが明らかとなった。しかし、8~10ヶ月齢の肥育素牛のセリ市場導入直後のBRDC発症機序に関する情報がないため、BRDCの予防法や治療法は確立されていない。この時期の病態を解明できれば導入牛の生産性をさらに向上できることが期待される。

本研究は、セリ市場で導入された肥育素牛に対して臨床検査、血液検査および気管支肺胞洗浄液検査を実施し、BRDC発症に関連するウイルスや細菌を特定することを目的とした。

## 2. 材料と方法

### 2.1 供試材料

4月および12月にセリ市場から導入された肥育素牛20頭（4月導入群、12月導入群；各10頭）を供試した。供試牛は、南九州のセリ市場から牛輸送専用車両による約1時間の輸送後、セリ当日に飼育場所に導入された。4月導入群は導入後8日目に、12月導入群は導入後6日目および11日目の2回の検査を実施された。

### 2.2 方法

供試牛に対して、臨床検査、血液検査および気管支肺胞洗浄液検査を実施した。

臨床検査：体温（直腸温：BT）計測後、心拍

数（HR）、呼吸数（RR）を聴診器により計数した。その後、鼻漏の有無を肉眼的に観察するとともに、聴診上の異常所見の程度を気管の腹側部および胸部で聴取し、相対的に4段階（-：正常、+：軽度、++：中等度、+++：重度）で評価した。なお、本研究では39.6℃以上の体温を発熱と判断し、呼吸器症状を伴う試供牛をBRDC発症牛と診断した。また、子牛導入日から2ヶ月間において、臨床獣医師がBRDCを対象とした治療を実施した日数（治療日数）を計数した。

血液検査：抗凝固剤（EDTA）を含有した真空採血管を用いて頸静脈から採血し、一般血液検査（白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（Hgb）、ヘマトクリット値（Ht））を実施した。

気管支肺胞洗浄液検査：殺菌消毒液に浸漬した滅菌綿花を用いて鼻孔周辺を清拭した後、ビデオエンドスコープを供試牛の鼻孔から挿入した。ビデオエンドスコープにより鼻腔および咽喉頭部を観察後、塩酸リドカインによる気道粘膜の表面麻酔を実施しながら気管および気管支内腔を観察した。ビデオエンドスコープ上の異常所見は、滲出液の相対量により4段階（-：正常、+：少量、++：中等量、+++：多量）で評価した。続いて、ビデオエンドスコープを滲出液が観察される場合は当該気管支へ、観察されない場合は肺炎発症の可能性が最も高い肺葉である中葉の気管支へと進め楔入した。楔入部位に滅菌生理食塩水30mlをビデオエンドスコープのチャンネル経由で注入し、即座に回収する操作を2回連続で繰り返すことにより気管支肺胞洗浄液（BALF）を得た。得られたBALF検体を微生物学的に解析した。

微生物学的検査：本研究においては、*Mannheimia haemolytica*、*P. multocida*、*Histophilus somni*および*M. bovis*を主要分離・同定対象細菌とし、その他の分離細菌はその他細菌とした。

BALF検体は、5%馬血液含有コロンビア寒天培地(BA培地)およびマッコンキー寒天培地(MAC培地)に接種し、BA培地は微好気条件(5%CO<sub>2</sub>)下および嫌気条件下で、MAC培地は好気条件下で培養(37℃)した。培養後のBA培地から主要な細菌を分離し、純培養後にグラム染色検査および細菌同定検査(飛行時間型質量分析法: Time of Flight Mass Spectrometry: TOF-MS), Loop-Mediated Isothermal Amplification(LAMP)検査あるいはPCR検査により菌種を同定した。マイコプラズマ分離検査は、細菌分離検査と同様の検体をマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し、微好気条件下で7日間培養(直接培養)するとともに、マイコプラズマ増菌培地に接種し微好気条件下で2日間培養(増菌培養)することにより増菌した。その後、増菌培養液は、1白金耳をマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し、微好気条件下で7日間培養した。培養後のマイコプラズマ分離用寒天培地は、実体顕微鏡で観察するとともに、培地上の目玉状のコロニーについてTOF-MS, LAMP検査あるいはPCR検査により菌種を同定した。一方、ウイルス遺伝子検査は、牛の肺炎発症に関連すると考えられている牛RSウイルス(BRSV), D型インフルエンザ(FluD), 牛パラインフルエンザ3ウイルス(BPIV3), 牛ヘルペスウイルス1型(BHV-1)をRT-PCR法あるいはPCR法により実施した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 臨床検査および血液検査

供試牛の平均直腸温は4月導入群では39.4℃, 12月導入群では導入6日後の検査時は39.7℃, 導入11日後の検査時は39.5℃であり、健常牛に比較し軽度に高体温であった(Table 1, 2)。このうち、39.6℃以上の発熱を4月導入群では3頭(供試牛の30%), 12月導入群の導入6日後の検査時

では6頭(同60%), 導入11日後の検査時では3頭(同30%)で認め、それぞれ3頭(No.7, 8, 9), 4頭(No.14, 15, 17, 20), 3頭(No.11, 15, 18)をBRDC発症牛と診断した。また、40℃以上の発熱を認めた症例ではBRDCに対する治療が臨床獣医師により実施されていたが、40℃未満の発熱の症例では治療との関連性は認められなかった。このように、臨床所見からは発熱の有無とBRDCに対する治療日数との間には明らかな関連性は認められなかったが、40℃以上の発熱があり呼吸器症状が観察される症例ではBRDCを対象とした治療が行われることが示された。

末梢血中白血球数は4月導入群では平均7,410/ $\mu$ l, 12月導入群では導入6日後の検査時では平均7,3210/ $\mu$ l, 導入11日後の検査時では平均8,140/ $\mu$ lであり、他の血液検査項目も含めおおむね正常範囲内であった(Table 1, 2)。

これらのことから、導入後間もない時期の子牛の臨床検査においては、40℃以上の発熱と呼吸器症状がBRDC発症の可能性を示唆することが示された。しかし、一般的な血液検査ではBRDCの病態を捉えることは困難であると思われた。

#### 3.2 ビデオエンドスコープ所見

供試牛のほとんどで気管内腔や気管支内腔に滲出液の増量が観察されたが、発熱の有無、臨床所見および治療日数との間には明らかな関連性は認められなかった(Table 1, 2)。これらのことから、導入後間もない時期の子牛のビデオエンドスコープ検査において、気管内腔や気管支内腔における滲出液の増量は、必ずしもBRDCの発症には関連しないものと思われた。

#### 3.3 細菌分離検査およびウイルス遺伝子検査

細菌分離検査では、*P. multocida*が4月導入群では8頭から、12月導入群では導入6日後および11日後の検査時にそれぞれ4頭から分離されたが、分離細菌数とBRDCに対する治療日数との間



**Table 1** Clinical examinations, blood examinations, endoscopy findings and days of treatment in the group introduced in April.

No.	Sex	Clinical examinations						Blood examinations				Videoendoscopic findings				Days of treatment <sup>c</sup>
		BT	HR	RR	Nasal discharge	Tracheal breath sounds	Vesicular breath sounds	WBC	RBC	Hgb	Ht	Nasal passage	Larynx	Trachea	Bronchus	days
		°C	/min	/min	grade <sup>a</sup>	grade <sup>a</sup>	grade <sup>a</sup>	×10 <sup>2</sup> / μL	×10 <sup>4</sup> / μL	g/dL	%	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	
1	gelding	39.2	82	30	+	-	-	74	947	12.1	36.1	+	-	-	-	6
2	gelding	39.1	102	34	+	+	-	77	982	12.4	35.3	+	+	+	+	3
3	gelding	39.3	106	32	-	+	-	62	802	10.2	29.2	-	-	+	+	0
4	gelding	39.4	102	44	+	+	-	51	856	10.8	31.5	++	+	++	++	0
5	gelding	39.4	108	36	+	+	+	73	906	10.5	31.8	++	+	++	+	0
6	gelding	39.2	102	32	+	++	+	104	1120	12.1	37.2	-	-	+	+	0
7	gelding	39.8*	88	36	+	+	±	78	940	10.1	30.3	-	-	-	-	3
8	gelding	39.6*	104	36	+	++	-	79	944	10.7	31.7	-	-	++	+	0
9	gelding	39.7*	96	38	+	++	±	75	926	10.1	30.5	-	-	++	+	0
10	gelding	39.0	120	34	-	-	-	68	836	10.2	29.9	-	-	-	-	0

BT : Body temperature, HR : Heart rates, RR : respiration rates

grade<sup>a</sup> : - (Normal), + (Slight), ++ (Moderate), +++ (Massive)grade<sup>b</sup> : Exudate volume; - (Normal), + (Small amount), ++ (Moderate amount), +++ (Large amount)Days of treatment<sup>c</sup> : Number of treatment days for two months after introduction.

\*BRDC affected cow.

**Table 2** Clinical examinations, blood examinations, endoscopy findings and days of treatment in the group introduced in December.

No.	Sex	Clinical examinations						Blood examinations				Videoendoscopic findings				Days of treatment <sup>c</sup>
		BT	HR	RR	Nasal discharge	Tracheal breath sounds	Vesicular breath sounds	WBC	RBC	Hgb	Ht	Nasal passage	Larynx	Trachea	Bronchus	days
		°C	/min	/min	grade <sup>a</sup>	grade <sup>a</sup>	grade <sup>a</sup>	×10 <sup>2</sup> / μL	×10 <sup>4</sup> / μL	g/ dL	%	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	grade <sup>b</sup>	
11-6 <sup>d</sup>	gelding	39.0	66	36	-	-	-	49	813	9.8	28.3	-	+	++	+++	3
12-6	gelding	39.6	124	24	-	-	-	81	975	12.6	36.7	-	-	-	-	0
13-6	gelding	39.6	90	24	-	-	-	75	920	11.6	34.6	+	+	++	-	0
14-6	gelding	39.7*	128	36	-	+	-	85	811	9.5	28.5	+	+	+	-	0
15-6	gelding	39.7*	90	36	-	+	+	67	1012	10.4	32.1	+	+	+	+	0
16-6	gelding	39.5	120	42	+	+	-	43	878	10.5	31.2	-	-	++	-	3
17-6	gelding	40.0*	120	42	+	+	-	96	989	12.0	36.5	++	++	+	+	5
18-6	gelding	39.5	96	36	-	-	-	72	852	9.5	29.5	-	+	++	+	2
19-6	gelding	39.5	112	30	-	-	-	75	859	11	31	-	-	++	-	0
20-6	gelding	40.7*	128	48	+	+	+	89	921	12.4	35.4	+	+	++	+	5
11-11 <sup>e</sup>	gelding	41.0*	90	66	+	+	+	102	897	10.6	30.5	-	+	+++	+++	
12-11	gelding	38.7	132	24	-	-	-	98	934	11.7	34.6	-	-	-	+	
13-11	gelding	38.9	90	30	+	+	+	81	975	12.2	36.6	+	+	+++	+	
14-11	gelding	39.0	86	36	+	+	+	78	823	9.5	28.6	+	+	+++	+	
15-11	gelding	39.8*	128	48	+	+	+	91	927	11.2	33.7	+	-	+++	++	
16-11	gelding	39.3	16	30	+	-	-	53	829	9.7	28.7	-	-	+	+	
17-11	gelding	39.5	120	30	+	+	+	98	1009	12.1	36.2	++	-	++	+	
18-11	gelding	40.2*	90	36	+	+	-	78	912	9.9	30.8	-	-	+	+	
19-11	gelding	39.0	96	36	-	+	+	71	894	11.2	32.3	-	+	++	+	
20-11	gelding	39.5	96	44	+	+	+	64	881	11.8	33.6	+	+	+++	+	

BT : Body temperature, HR : Heart rates, RR : respiration rates

grade<sup>a</sup> : - (Normal), + (Slight), ++ (Moderate), +++ (Massive)grade<sup>b</sup> : Exudate volume; - (Normal), + (Small amount), ++ (Moderate amount), +++ (Large amount)Days of treatment<sup>c</sup> : Number of treatment days for two months after introduction.[No.-6]<sup>d</sup> indicates 6 days after introduction.[No.-11]<sup>e</sup> indicates 11 days after introduction.

\*BRDC affected cow.



**Table 3** Bacterial isolations and genetic tests in the group introduced in April.

No.	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	Other bacteria	BRSV	FluD	BPIV3	BHV1
	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	Culture <sup>f</sup>	Culture <sup>f</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	PCR <sup>g</sup>
1	0	0.4	0	nd	nd	nd	D	nd	nd
2	0	0.4	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
3	0	0	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
4	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
5	0	10	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
6	0	4	0	nd	nd	nd	D	nd	nd
7*	0	6	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
8*	0	5,000	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd
9*	0	5	0	D	nd	nd	nd	nd	nd
10	0	0.2	0	nd	nd	nd	nd	nd	nd

*M. haemolytica* : *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida*, *Pasteurella multocida*, *H. somni* : *Histophilus somni*

Culture<sup>f</sup>, RT-PCR<sup>g</sup> or PCR<sup>g</sup>; D : detected, nd : not detected

BRSV : bovine respiratory syncytial virus, FluD : influenza D virus, BPIV3 : bovine parainfluenza 3 virus, BHV1 : bovine herpesvirus 1  
\*BRDC affected cow.

**Table 4** Bacterial isolations and genetic tests in the group introduced in December.

No.	<i>M. haemolytica</i>	<i>P. multocida</i>	<i>H. somni</i>	<i>Mycoplasma bovis</i>	Other bacteria	BRSV	FluD	BPIV3	BHV1
	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	x10 <sup>3</sup> CFU/mL	Culture <sup>f</sup>	Culture <sup>f</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	RT-PCR <sup>g</sup>	PCR <sup>g</sup>
11-6 <sup>d</sup>	0	25	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
12-6	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
13-6	0	0	0	D	nd	D	nd	nd	nd
14-6*	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
15-6*	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
16-6	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
17-6*	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
18-6	0	0.5	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
19-6	0	0.1	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
20-6*	0	50	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
11-11*	0	25	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
12-11	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
13-11	0	0.3	0	D	nd	D	nd	nd	nd
14-11	0	25	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
15-11*	0	10	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
16-11	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
17-11	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
18-11*	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
19-11	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd
20-11	0	0	0	nd	nd	D	nd	nd	nd

*M. haemolytica* : *Mannheimia haemolytica*, *P. multocida*, *Pasteurella multocida*, *H. somni* : *Histophilus somni*

Culture<sup>f</sup>, RT-PCR<sup>g</sup> or PCR<sup>g</sup>; D : detected, nd : not detected

BRSV : bovine respiratory syncytial virus, FluD : influenza D virus, BPIV3 : bovine parainfluenza 3 virus, BHV1 : bovine herpesvirus 1  
[No.-6]<sup>d</sup> indicates 6 days after introduction.

[No.-11]<sup>e</sup> indicates 11 days after introduction.

\*BRDC affected cow.

には関連性は認められなかった (Table 3, 4)。また, *M. bovis*が4月導入群および12月導入群で

それぞれ1頭ずつ認められたが, 分離結果とBRDCに対する治療日数との間には関連性は認め

られなかった (Table 3, 4)。一方、ウイルスの遺伝子検査では、BRSV陽性が4月導入群では1頭で、12月導入群では全頭で認められた (Table 3, 4)。

これらのことから、気管支肺胞洗浄液中のBRSV遺伝子が高率に陽性である群では、発熱の割合が高くなり、BRDCの病態を発症する可能性が高いことが示された。しかし、気管支肺胞洗浄液中の*P. multocida*や*M. bovis*が関連する重度の肺炎へ移行するには、感染抵抗性や飼養環境をはじめとしたさまざまな要因が関与することが推察された。一方、導入後のBALF検査は一般的には困難であるので、導入前後におけるBRSV対策が重要であると思われた。

これまでの我々の研究では、BRDCの慢性化には、*M. bovis*や*P. multocida*が強く関与していることが示された。しかし、BRDCの初期病態では必ずしもこれら細菌が強く関与するのではなく、BRSVのようなウイルスが気道粘膜に感染し、気道の感染抵抗性を減弱させ、その後の牛の全身的な状態や飼養環境をはじめとしたさまざまな要因が関与して、BRDCの発症や重症化を引き起こすことが推察された。

#### 4. 要 約

本研究は、セリ市場で導入された肥育素牛に対して臨床検査、血液検査および気管支肺胞洗浄液検査を実施し、BRDC発症に関連するウイルスや細菌を特定することを目的とした。4月および12月にセリ市場から導入された肥育素牛20頭 (4月導入群, 12月導入群; 各10頭) を供試し、4月導

入群は導入後8日目に、12月導入群は導入後6日目および11日目の2回検査を実施した。その結果、臨床検査では40℃以上の発熱があり呼吸器症状が認められる症例ではBRDCを発症しており、治療対象となることが示された。また、気管支肺胞洗浄液からの細菌分離結果はBRDC発症と必ずしも関連しないが、BRSVの遺伝子検査が陽性的場合には、BRDCを発症する可能性が高いことが示された。これまでの我々の研究では、BRDCの慢性化には、*M. bovis*や*P. multocida*が強く関与していることが示された。しかし、BRDCの初期病態では必ずしもこれら細菌が強く関与するのではなく、BRSVをはじめとしたウイルスが気道粘膜に感染し、気道の感染抵抗性を減弱させ、その後の牛の全身的な状態や飼養環境をはじめとしたさまざまな要因が関与して、BRDCの発症や重症化を引き起こすものと推察された。

#### 文 献

- 1) Snowder, G. D., Van Vleck, L. D., Cundiff, L. V., Bennett, G. L. : *J. Anim. Sci.*, **84**, 1999~2008, 2006.
- 2) Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., Stoltman, G. : *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 932~944, 2012.
- 3) Angen, O., Thomse, J., Larse, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P. M., Enemark, J. M. : *Vet. Microbiol.*, **28**, 165~171, 2009.
- 4) Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J., Janzen, E. D. : *J. Vet. Intern. Med.*, **25**, 772~783, 2011.
- 5) 帆保誠二, 野口倫子, 安藤貴朗: 公益法人伊藤記念財団平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **32**, 215~221, 2014.
- 6) 帆保誠二, 野口倫子: 公益法人伊藤記念財団平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **33**, 189~193, 2015.

# 天然化合物による牛白血病ウイルス感染制御を目指した基礎的研究

Basic research for controlling infection of bovine leukemia virus

紙透 伸治・村上 裕信・藤野 寛・佐藤 礼一郎

(麻布大学獣医学部)

Shinji Kamisuki, Hironobu Murakami, Kan Fujino and Reiichiro Sato

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Bovine leukemia virus (BLV) is the etiological agent of a lethal infectious disease, enzootic bovine leukosis (EBL). The BLV infection results not only in EBL development but also in reductions in lifetime milk production, reproductive efficiency, and lifespan. The BLV infection leads to significant economic losses in livestock industry because the prevalence of BLV infection is high in several regions worldwide including Japan. The controlling of the spread of BLV infection is important of reducing the economic losses. However, useful and feasible countermeasures have not been developed. Thus, development of antiviral drug would be useful for controlling of the infection. The aim of study is analysis of a compound with antiviral activity for development of antiviral drug. The screening of chemical library revealed that Compound A had an antiviral activity. In addition, the compound did not show cytotoxicity. An integration of viral genome into host genome could not be inhibited by the compound while virus production was inhibited by it. In addition, the compound could reduce the expression level of viral proteins in cells. The reporter assay revealed that the compound inhibited the viral transactivation through interaction between viral protein, Tax, and viral promoter region, 5'LTR. These results showed that the identified compound inhibited viral transactivation via impairing Tax function. Because the compound target would be viral protein, Tax, it is suggested that the antiviral activity of the compound is specific to BLV replication. In addition, because Tax protein promote expression of viral production and associated with leukemogenesis, the compound would be useful for an inhibitor against viral spread and EBL-development. Taken together, the identified compound, Compound A, could be useful a lead compound for development of anti-BLV drug.

## 1. 目 的

牛白血病ウイルス (BLV) は牛に地方病性牛白血病 (EBL) を誘発する。牛がBLVに感染すると、ウイルスは終生、持続感染するが、約70%は不顕性感染となり、約30%が持続性リンパ球増

多症となり、数%がB細胞性白血病や全身のリンパ肉腫を発症し、死の転機をたどる<sup>1,2)</sup>。EBLを発症した牛は全部廃棄の対象となり、経済的に大きな損失を招く。我が国におけるBLV感染率は30~40% (約120~160万頭) に達しており、30年前と比較して30倍以上に拡大している。EBLによ

る経済的損失は20億円と試算されており、今後も拡大することが予想されており、有効なBLV対策を確立することが望まれている。通常家畜のウイルス感染症を制御するためにはワクチンが主に用いられるが、現在のところ有効なワクチンの開発にはいたっていない。そこで本研究では低分子有機化合物を用いたアプローチによりBLV感染の制御を最終目標とし、BLVの増殖を特異的に阻害する化合物を探索した。さらに得られた抗ウイルス物質の作用機序を解明することを目的として研究を行った。

## 2. 方法

### 2.1 天然化合物ライブラリー

日本各地で採取した真菌を単離し、Potato Dextrose Brothで培養した。培養液を有機溶媒で抽出後、シリカゲルクロマトグラフィーや逆相HPLCにより化合物を精製し、天然化合物ライブラリーを作成した<sup>3)</sup>。

### 2.2 ウイルス液の調製

BLV持続感染細胞のFLK-BLV細胞（ヒツジ胎子腎臓細胞由来）を用いた。コンフルエント状態のFLK-BLV細胞の上清を回収して、遠心後、その上清をフィルター（0.45  $\mu\text{m}$ ）で濾過した。この濾液を増殖培地で2倍希釈し、ポリブレンを加えてウイルス液とした。

### 2.3 ウイルス感染価の測定（シンシチウムアッセイ）

96ウェルプレートにCC81細胞（ネコ腎臓細胞由来）を播種して24時間培養後、ウイルス液および化合物を添加してさらに48時間培養し、シンシチウムを形成させた。培養上清を除去し、100%メタノールで固定後にギムザ溶液で染色した。光学顕微鏡でシンシチウム数（Syncytium-Forming Units ; SFU）を測定した。シンシチウムは細胞当たり5個以上の核を持つものを、ウイ

ルス陽性のシンシチウムとした。

### 2.4 プロウイルスDNAおよびウイルスRNAの精製とqPCRによるゲノム数の定量

感染細胞からゲノムDNAをWizard Genomic DNA Purification Kit（Promega）を用いて、抽出、精製した。また、感染細胞内で発現しているウイルスRNA（vRNA）はISOGEN II（富士フィルム和光純薬）を、培養上清中のvRNAはMagExtractor-Viral RNA-（東洋紡）を用いて抽出、精製した。得られた精製vRNAは、ReverTra Ace<sup>®</sup> qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡）を用いて、cDNAに逆転写した。

精製したDNAおよびcDNAを鋳型として過去に報告された方法によりプロウイルスコピー数およびvRNAコピー数を測定した<sup>4,5)</sup>。

### 2.5 ウェスタンブロット

化合物を添加して培養したFLK-BLV細胞を回収し、Laemmli sample Bufferを加え、100°Cで熱変性させた。そのタンパク質をSDS-PAGEで分離後、PVDF膜に転写した。PVDF膜をブロッキング後、抗BLV-gp51抗体（BLV2）（Veterinary Medical Research & Development（VMRD）；1：2000）、抗BLV-p24抗体（BLV3）（VMRD；1：2000）あるいは抗 $\beta$ -Actin抗体（beta Actin Monoclonal Antibody（Invitrogen）；1：5000）とともに4°Cで一晩、感作した。メンブレンを洗浄後、二次抗体HRP-conjugated anti-mouse IgG（Jackson Immuno Research；1：5000）とともに室温で1時間、感作した。そのメンブレンを洗浄後、Clarity Western ECL Substrate（Bio-Rad）を用いて、ウイルスタンパク質を検出した。

### 2.6 遺伝子転写活性の測定（ルシフェラーゼアッセイ）

96ウェルプレートに293T細胞（ヒト胎児由来腎臓上皮細胞由来）を播種して24時間培養後、pBApo-Pur-5'LTR-Luc、CAGGS-Tax-Flag、

pRL-TKをFuGENE HD (Promega) を用いてトランスフェクションし6時間培養後、増殖培地で希釈した化合物を添加した。化合物添加してから42時間後に細胞を回収し、Pikka Gene Dual Assay Kit (Toyo Ink) を用いて、ホタルルシフェラーゼとウミシイタケのルシフェラーゼの活性を測定した。ウイルスの転写活性は、ホタルルシフェラーゼ値をウミシイタケルシフェラーゼ値で標準化した。

### 2.7 統計処理

統計解析はソフトウェアR (Ver.3.6.2) を用いて一元配置分散分析 (Bonferroniの多重比較) および *t* 検定を行った<sup>6,7)</sup>。

## 3. 結果と考察

### 3.1 BLVの増殖を抑制する化合物の同定

シンシチウムアッセイによって細胞から産生される感染性BLVの量を測定することで、抗BLV物質のスクリーニングを行った。173種類の化合物についてシンシチウムアッセイを行った結果、シンシチウム形成数が最も低値を示したのは化合物A (特許出願済み, 未公開) であった (Fig. 1A)。次に、化合物AによるBLVのシンシチウム形成抑制効果が、化合物の添加濃度に依存するかを調べた。その結果、シンシチウム形成は1.25  $\mu$ Mから有意に抑制され、その作用は濃度依存的であった (Fig. 1B)。また、化合物Aの50%阻害濃度 (IC<sub>50</sub>) は8.4  $\mu$ Mであった。

シンシチウム形成の抑制は、化合物による抗ウイルス効果ではなく、化合物そのものによる細胞毒性に起因することも考えられる。化合物Aのシンシチウム形成抑制効果が、抗ウイルス効果によるものか、あるいは細胞毒性によるものかを確認するために、CC81細胞を用いてWST-1アッセイを行った。その結果、CC81細胞では50  $\mu$ Mであっても細胞毒性は見られなかった (Fig. 1C)。

### 3.2 化合物Aの吸着からプロウイルスの挿入までの過程に与える影響

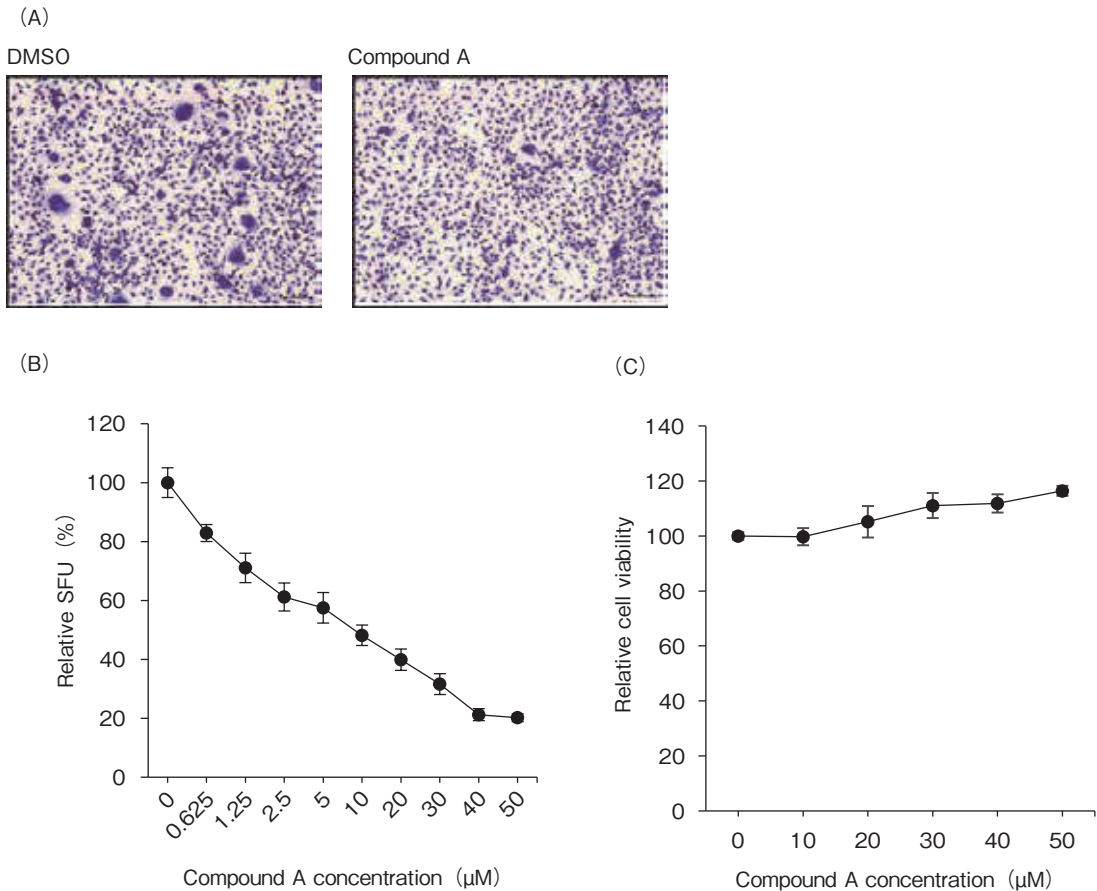
BLVを含むレトロウイルスの増殖サイクルは大きく2つのステップに分けられる。前半は細胞受容体への吸着、侵入、脱殻、逆転写、宿主染色体へのプロウイルスの挿入までの過程で、後半はvRNAの転写、翻訳、集合、出芽、放出の過程である。本実験では、化合物Aの抗ウイルス効果がウイルス増殖サイクルの前半に作用するのか、後半に作用するのかを調べた。

まず、吸着からプロウイルスの挿入までの過程に影響を与えるかを調べた。CC81細胞を化合物Aで前処理した後、培地を除去し、ウイルス液を添加した。その後再度上清を除去して、増殖培地と置換した。この細胞を24時間培養後、細胞ゲノムDNAを抽出して、細胞の染色体に組み込まれているプロウイルスのコピー数をqPCRにより定量した。その結果、細胞ゲノムに組み込まれたプロウイルスコピー数は化合物Aで処理しても変化しなかった (Fig. 2)。以上の結果から、化合物AはBLVの増殖サイクルの前半には作用しないことが明らかになった。

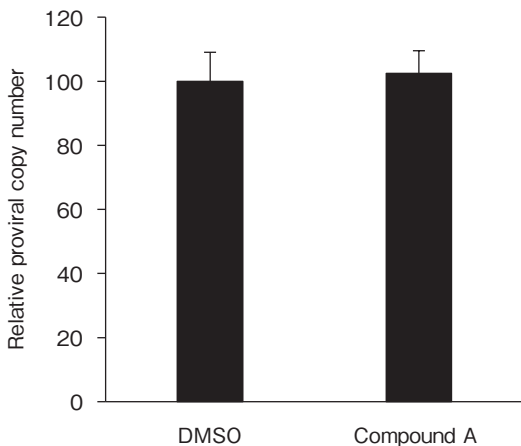
### 3.3 化合物Aのプロウイルスの転写からウイルス放出までの過程に与える影響

次に化合物AがBLVのプロウイルスの転写からウイルス放出までの過程に影響を与えるかを、BLV持続感染細胞であるFLK-BLV細胞を用いて調べた。FLK-BLV細胞を化合物Aで処理し、その培養上清中のvRNA量をqRT-PCRを用いて定量した。その結果、感染細胞を化合物Aで処理することによって、培養上清中のvRNA量は有意に減少した (Fig. 3A)。さらに、化合物A処理でウイルスタンパク質であるp24およびgp51のタンパク質量が変化しているかをウェスタンブロットによって調べた。その結果、化合物Aを添加することによりp24およびgp51のタンパク質量が低





**Fig. 1** Estimation of antiviral activity in Compound A. (A) Inhibition of syncytium formation by Compound A. The bar shows 100  $\mu\text{m}$ . The left and right panel show treatment of DMSO and Compound A, respectively. (B) Antiviral activity in a dose-dependent manner. (C) Cell viability in Compound A-treated cells. Means  $\pm$  SE.



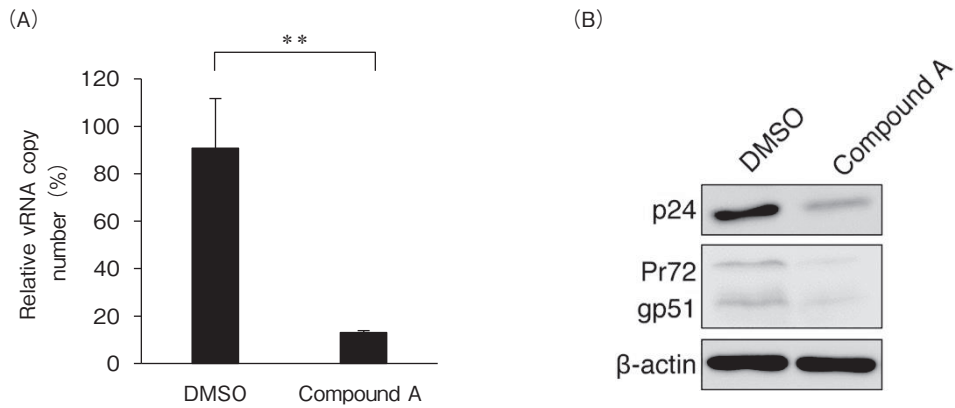
**Fig. 2** vRNA copy number in supernatant of Compound A-treated CC81. The bar graph with an error bar indicates the mean value and standard error.

下することが分かった (**Fig. 3B**)。以上の結果から、化合物AはBLVの増殖サイクルの後半を抑制していることが明らかとなった。

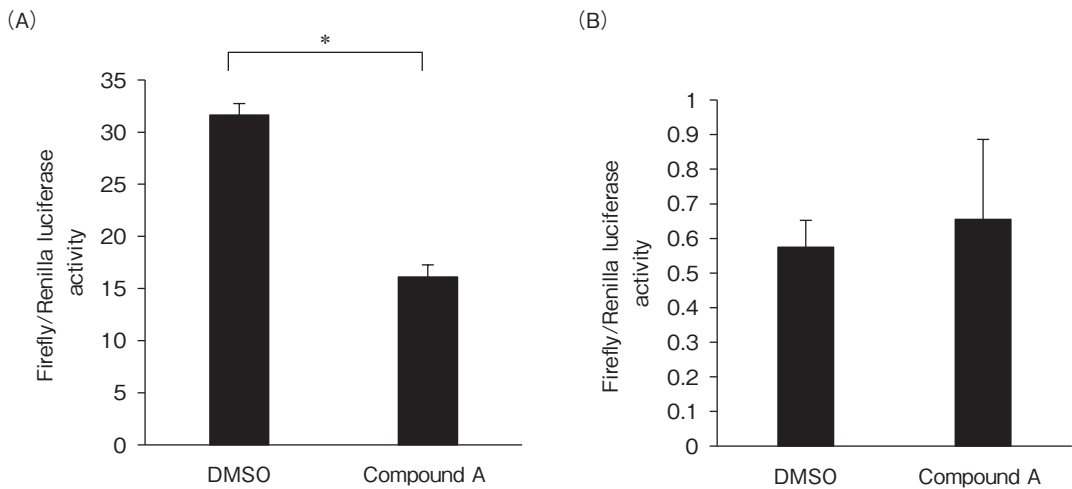
### 3.4 化合物Aのウイルスタンパク質Taxによる転写活性化への影響

BLV遺伝子のプロモーターは5'-long terminal repeat (5'-LTR) であり、ウイルスタンパク質であるTaxが5'-LTRに結合することにより、BLV遺伝子の転写を強力に促進する。化合物AがTaxによる転写活性化に及ぼす影響を調べるために、発現プラスミド系を用いてウイルス転写活性への抑制効果の有無を調べた。293 T細胞に





**Fig. 3** Effect of Compound A on viral replication after viral genome integration. (A) Relative vRNA copy number in supernatant of Compound A-treated FLK-BLV. The bar graph with an error bar indicates the mean value and standard error. Significant difference is indicated by double asterisk ( $p < 0.01$ , Student's *t*-test). (B) Analysis of viral protein, p24 and gp51, in Compound A-treated FLK-BLV.



**Fig. 4** Effect of Compound A on viral transactivation. Viral transactivation in the presence (A) and absence (B) of Tax. The bar graph with an error bar indicates the mean value and standard error. Significant difference is indicated by single asterisk ( $p < 0.05$ , Student's *t*-test).

pCAGGS-Tax-FlagとpBApo-Pur-5'LTR-Lucを共トランスフェクション後、化合物Aを添加し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、化合物A処理によりルシフェラーゼの発現が有意に減少した (Fig. 4A)。一方、pCAGGS-Tax-Flag非存在化でpBApo-Pur-5'LTR-Lucのみをトランスフェクションした時は、化合物A処理でルシフェ

ラーゼの発現は変化しなかった (Fig. 4B)。以上の結果から、化合物Aによるウイルス転写の抑制はTax依存的事であることが分かった。以上の結果から、化合物Aはウイルスタンパク質であるTaxの機能を特異的に抑制することによって、ウイルスの転写を抑制することが明らかとなった。

#### 4. 要 約

牛白血病ウイルス (BLV) は、致命的な感染症である地方病性牛白血病 (EBL) の病原体である。BLV感染は、EBLの発生だけでなく、生涯の乳生産、生殖効率、および寿命の短縮の原因となる。日本を含む世界中のいくつかの地域でBLV感染率が高いため、BLV感染は家畜産業に大きな経済的損失をもたらす。そのため、BLV感染の拡大抑制は、経済的損失の軽減に重要である。しかし、実現可能な簡便な対策は存在しないため、抗ウイルス薬の開発は感染の抑制に有用である。本研究では、抗ウイルス薬の開発のために、抗ウイルス活性を持つ化合物の探索を試みた。最初に、微生物二次代謝産物由来の化合物ライブラリーのスクリーニングを行い、化合物Aが抗ウイルス活性を有することが明らかになった。さらに、この化合物は細胞毒性を示さなかった。化合物Aによりウイルス生産が阻害された一方で、ウイルスゲノムの宿主ゲノムへの組み込みは阻害されないことも明らかとなった。また、この化合物は細胞内のウイルスタンパク質の発現レベルを低下させることが示唆された。さらにレポーターアッセイにより、この化合物がウイルスタンパク質Taxおよびウイルスプロモーター領域5'LTR間の相互作用を介したウイルス転写活性を阻害することが明らかとなった。これらの結果は、同定された化合物が、Tax機能の障害を介してウイルス転写活性を阻害したことを示した。化合物Aの標的はウイルスタンパク質Taxであるため、化合物

の抗ウイルス活性はBLV複製に特異的であることが示唆された。さらに、Taxタンパク質はウイルス生産の発現を促進し、EBL発症と関連しているため、この化合物はウイルスの感染拡大やEBLの発症に対する阻害剤として有用と考えられる。これらのことから、同定された化合物Aは、抗BLV薬の開発に役立つリード化合物となりうることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Schwartz, I., Levy, D. : Pathobiology of bovine leukemia virus, *Veterinary Research*, **25**, 521~536, 1994.
- 2) Aida, Y., Murakami, H., Takahashi, M., Takeshima, S. : Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus, *Frontiers in Microbiology*, **4**, 328, 2013.
- 3) Kanno, K., Tsurukawa, Y., Kamisuki, S., Shibasaki, H., Iguchi, K., Murakami, H., Uchiyama, J., Kuramochi, K. : Novel neuroprotective hydroquinones with a vinyl alkyne from the fungus, *Pestalotiopsis microspora*, *Journal of Antibiotics*, **72**, 793~799, 2019.
- 4) Murakami, H., Asano, S., Uchiyama, J., Sato, R., Sakaguchi, M., Tsukamoto, K. : Bovine leukemia virus G4 enhances virus production, *Virus Research*, **238**, 213~217, 2017.
- 5) Murakami, H., Uchiyama, J., Nikaido, S., Sato, R., Sakaguchi, M., Tsukamoto, K. : Inefficient viral replication of bovine leukemia virus induced by spontaneous deletion mutation in the G4 gene, *Journal of General Virology*, **97**, 2753~2762, 2016.
- 6) R Core Team (2019). R : A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 7) Kanda, Y. : Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics, *Bone Marrow Transplantation*, **48**, 452~458, 2013.

## 産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索（Ⅲ） —より効果的なワクチン接種部位を求めて—

Study of mucosa-associated lymphoid tissues in farm animals (Ⅲ)  
—to identify more effective regions for their vaccination—

市居 修・中村 鉄平・小千田 圭吾・山下 祐輔・池田 哲平  
(北海道大学大学院獣医学研究院)

Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Keigo Kosenda, Yusuke Yamashita and Teppei Ikeda  
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

In recent years, the development of a mucosal vaccine is progressing rapidly and has been put to practical use in respiratory diseases of chickens, such as highly pathogenic avian influenza. These methods target to mucosa-associated lymphoid tissues, in particular the role of “eye-associated lymphoid tissue (EALT)” would be important for the achievement of effective ophthalmic vaccination. In the previous study, we clarified the histological characteristics of EALT in cow and pigs (miniature pigs). Further, in the genital organs of both species, we also found the genital organ-associated lymphoid tissue (GOALT) of their vaginal vestibule. In this study, we morphologically investigated the uptake of mimic antigens in GOALTs by using goats. The investigated goats possessed the diffused or follicular GOALTs in the vaginal vestibules, and they tended to localize around the external urethral orifice or fossa clitoridis. The exposed mimic antigens were detected in a few cells composing GOALTs, and they were also localized to the deep inguinal lymph nodes, but they were scarce. Although further studies were needed to clarify the mechanism and dynamics of antigen uptake, these the mucosa associated lymphoid tissues have the possibility of future development of local mucosal vaccination to induce a host mucosal immunity in these animal species. In further study, we would continue to focus on the possibility of mucosa-associated lymphoid tissue to realize the efficient immunity induction in farm animals.

### 1. 目 的

産業動物獣医療において、全身免疫を誘導する注射型ワクチンが感染症予防の主体となっている。一方、全身免疫誘導は病原体侵入後の防御・回復に有効であるが、多くの産業動物感染症では、眼、消化器、呼吸器および生殖器等の粘膜が病原体の侵入門戸となる。そのため、我々はIgA

を主役とする局所粘膜免疫誘導による感染防御がより効果的であると考え、本研究を進めている。近年、粘膜免疫を誘導して粘膜への病原体侵入を未然に防ぐ“粘膜型ワクチン”の開発に大きな関心が寄せられている。

粘膜局所では、粘膜関連リンパ組織（MALT）が主役となり、外界に接する上皮細胞と下層の免疫細胞が密接に関連する。特に、ワルダイエルの

咽頭輪に存在する扁桃や鼻咽頭関連リンパ組織 (NALT)、腸管関連リンパ組織 (GALT, パイエル板) が教科書でもよく知られている。鶏では、特にNALTを標的とした経鼻ワクチンが開発され、ヒトでも経鼻インフルエンザ生ワクチン“フルミスト”が有名である。2015年に牛ではTSV2 (牛伝染性鼻気管炎と牛パラインフルエンザ3型) 経鼻ワクチンが実用化され、豚では回虫抗原を応用した粘膜免疫が検討されてきた。さらに近年、点眼ワクチンの開発も日進月歩であり、高病原性鳥インフルエンザ等、鶏の呼吸器疾患で実用化されている。粘膜型ワクチン接種には高価な医療器材や高度な技術を必要とせず、開発途上国への応用という面からも新たな技術として期待されている。

我々は、牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及を想定し、研究を進めている。昨年度までの研究において、ワクチンを接種しやすい粘膜免疫誘導部位として“眼と腔”に注目し、特に両動物種の眼球結膜部分にMALTが存在することを明らかにした (結膜関連リンパ組織 (CALT) や涙道関連リンパ組織 (LTALT) を併せて眼関連リンパ組織 (EALT) と呼ぶ)。口や直腸も外界接するため、ワクチン接種候補部位となるが、前者は食渣に、後者は糞便に邪魔されるだろう。また、眼と腔の所属リンパ節を考慮に入れると、眼は上部気道疾患に、腔は付近の尿生殖器や乳房等への免疫誘導に有用であると考えられる。MALTには特徴的な濾胞被蓋上皮が存在し、特に抗原取り込み能を有する“M細胞”が重要である。M細胞は基底膜側に樹状細胞等を集簇させ、外来抗原に対する粘膜免疫誘導に重要な役割を果たす。

これまでの研究において、両動物種ともに結膜および第三眼瞼にEALTを具備すること、また、牛のEALTにおけるT細胞、B細胞、

Cytokeratin18陽性細胞 (M細胞マーカー) の局在を明らかにした。また、両動物種の腔前庭に散在性および濾胞性のリンパ組織を発見し、生殖器関連リンパ組織 (GOALT) と命名した。本年度は、これらMALTの機能解析のため、山羊のGOALTをモデルとして模倣抗原を暴露し、その動態を組織学的に探索した。

## 2. 方法

### 2.1 動物実験倫理および供試動物

本研究のすべての過程において、北海道大学ならびに同学獣医学研究院における動物実験ガイドラインに従って実験を行った (承認番号19-0097、本研究院の動物実験プログラムはThe Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internationalによる認証を受けている)。1歳齢の雌山羊 (ザーネン種、4頭) を用い、未処置あるいは模倣抗原として墨汁を染み込ませた綿を腔前庭に留置した。留置後1時間および24時間後に麻酔前投与薬としてセラクター (1.5ml/100kg体重) を筋肉内注射し、全身麻酔薬としてペントバルビタールナトリウム (500mg/kg) を静脈内に投与し、その後飽和塩化カリウム溶液を10ml/100kg体重以上を投与して安楽死させ、腔前庭を採取した。またその付近のリンパ節として、浅鼠径リンパ節、深鼠径リンパ節、内側腸骨リンパ節、仙骨リンパ節および腸骨下リンパ節を採取した。

### 2.2 組織解析

上記のように採取した臓器を10%中性緩衝ホルマリン/0.1Mリン酸緩衝液で24時間以上室温固定した。生殖器のホールマウント標本観察のため、固定組織を流水洗後、マイヤーヘマトキシリン液 (武藤化学, 東京, 日本) に浸漬し、塩酸アルコールで脱色しながら観察した。肉眼観察後、すべての組織を階段希釈アルコール系列で脱水

後、定法に従いパラフィン包埋組織を作成した。パラフィンブロックから3  $\mu\text{m}$ 厚の組織切片を作成後、無染色あるいはヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施して、観察した。

### 2.3 画像解析

組織スライドグラスについて、BZ-X710(キーエンス, 大阪, 日本)で撮影,あるいはNano Zoomer 2.0-RS(浜松ホトニクス, 静岡, 日本)でバーチャルスライド化することで組織画像を得た。

## 3. 結果と考察

### 3.1 結果

ホールマウントヘマトキシリン標本観察において、これまで明らかにした牛やミニ豚と同様、山羊の膣前庭粘膜にはヘマトキシリンに濃染する小円構造が散在性に認められた(Fig. 1A, B)。このような小円構造は、外尿道口周囲や陰核窩周囲に高率に認められた(Fig. 1C, D)。小円構造のパラフィン包埋組織を作製し、その組織切片を観察したところ、上皮下に散在性および濾胞性のリンパ組織が見られ、GOALTであることが示された(Fig. 1E, F)。濾胞性GOALTの直上では、粘膜上皮が欠損し、リンパ組織が一部粘膜面に露出していた(Fig. 1F)。

Fig. 2に墨汁暴露後1時間の解析結果を示す。標本を流水で水洗後、茶褐色領域が膣と膣前庭の境界部ならびに膣前庭の遠位部分に認められた(Fig. 2A, B)。一方、茶褐色領域とヘマトキシリン陽性小円構造の局在は必ずしも一致しなかった(Fig. 2C)。次に膣前庭粘膜の組織像を示す(Fig. 2D-F)。膣前庭粘膜上皮の直下には、多数の赤血球が認められ(Fig. 2D)、ホールマウント標本で見られた茶褐色領域は出血部位であることが示唆された。また、上皮が一部欠損し、その上皮間に赤血球が見られた(Fig. 2E, F)。少数の墨汁取

り込み細胞が、リンパ組織内あるいは上皮内に観察された(Fig. 2G, H)。墨汁取り込み細胞は、探索したリンパ節では稀であり、深鼠径リンパ節にわずかに存在する程度だった。

### 3.2 考察

これまでの予備実験ならびに昨年度の解析から、牛、馬、猫、豚(ミニ豚)およびマウス<sup>1)</sup>のEALT(結膜関連リンパ組織)ならびに牛と豚(ミニ豚)のGOALTを発見しているが、本研究において、山羊の膣前庭部分にもGOALTが存在することを明らかにした。山羊のGOALTは外尿道口付近に多く、外界からの経尿路感染を防ぐための免疫学的関門を形成していると考えられた。近年、尿路に関連するリンパ組織がヒトやマウスで見られている<sup>2)</sup>。陰核窩周囲GOALTの存在意義は不明だが、当該部位は外界に近い粘膜部であるため、GOALTを配備しているのかもしれない。

解析に供したヤギの膣前庭粘膜に出血巣が観察された。これは綿栓による圧迫や摩擦あるいは性周期による生殖器粘膜の形態変化<sup>3)</sup>を示している可能性もある。後者の可能性検証については、今後の実験で発情同期化後の採材等が必要であると考えられた。また、GOALTにおける墨汁取り込み細胞は少数であり、所属リンパ節における検出も深鼠径リンパ節においてのみ見られた。今後は、より分子量や粒子径の小さい蛍光標識タンパク・ビーズの投与<sup>4)</sup>でGOALTの抗原取り込みを評価する必要がある。

将来の粘膜型ワクチン投与部位候補として、これまで動物のEALTとGOALTを明らかにしたが、作業性と動物福祉・愛護的な側面から、膣前庭へのワクチン投与のほうが現実的かもしれない。また、膣前庭粘膜の組織像から、粘膜摩擦(上皮剥離)によるGOALTへの抗原塗布が粘膜型ワクチン投与に有用であろう。今後も既存のワクチン接種部位よりも効率的な免疫誘導を実現する可



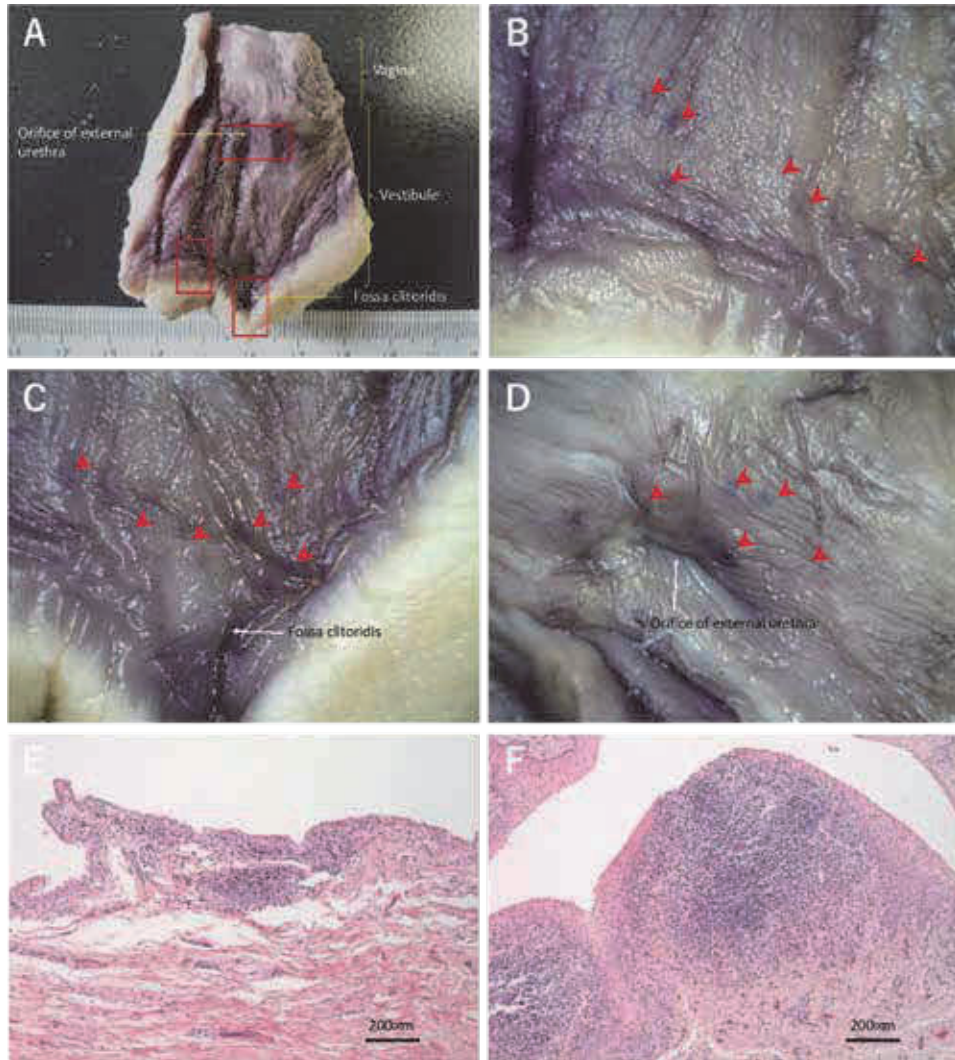


Fig. 1 Morphology of genital organ-associated lymphoid tissue (GOALT) in goat.

- A) Whole-mount specimens of genital organs stained by hematoxylin.  
 B) High magnified area of mucosa in vaginal vestibule.  
 C) High magnified area of mucosa around fossa clitoridis.  
 D) High magnified area of mucosa around external urethral orifice. Arrowheads indicate the GOALTs.  
 E) Histological image of diffuse GOALT.  
 F) Histological image of follicular GOALT. HE staining

能性に着目したい。

#### 4. 要 約

近年、粘膜型ワクチンの開発は日進月歩であり、高病原性鳥インフルエンザ等、鶏の呼吸器疾患で点眼ワクチン実用化されている。これらは粘

膜関連リンパ組織 (MALT) を標的としており、特に点眼ワクチンでは“眼関連リンパ組織 (EALT)”の役割が重要である。我々はこれまで牛や豚のEALTの組織構造を明らかにしてきた。また、これらの動物種の生殖器、特に腔前庭に生殖器関連リンパ組織 (GOALT) を発見した。本



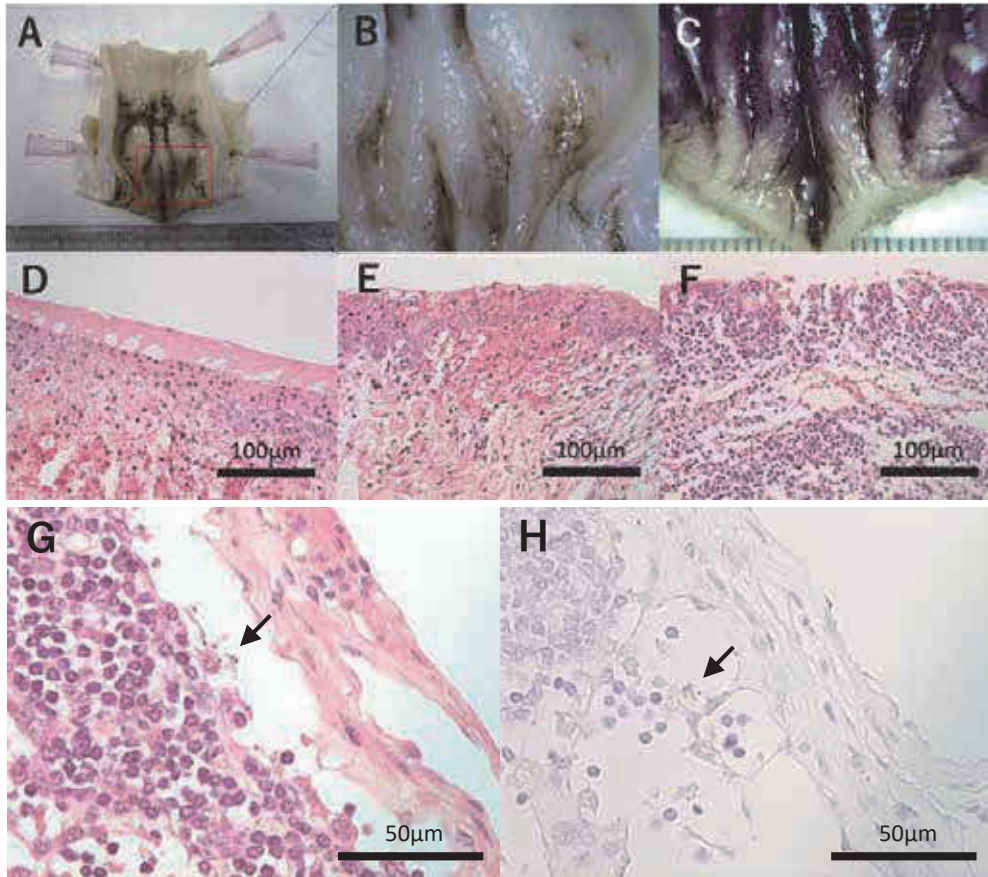


Fig. 2 Morphology of genital organ-associated lymphoid tissue (GOALT) in goat after expose of mimic antigens.

A) Whole-mount specimens of genital organs.

B) High magnified area of mucosa in vaginal vestibule.

C) High magnified area of mucosa in vaginal vestibule after staining by hematoxylin.

D-F) Histological images of GOALT. HE staining.

G and H) Histological images of GOALT. Arrows indicate the incorporation of mimic antigens. Hematoxylin staining

研究では、山羊をモデルとして、GOALTからの模倣抗原取り込みを形態学的に評価した。牛や豚と同様、山羊の膣前庭には散在性および濾胞性GOALTが存在し、特に外尿道口や陰核窩の周囲に認められた。膣前庭粘膜に暴露された模倣抗原は少数のGOALT形成細胞に取り込まれ、また、付近のリンパ節では深鼠径リンパ節に模倣抗原取り込み細胞がわずかに局在した。抗原取り込み機構・動態についてさらなる解析が必要だが、膣前庭のMALTは牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及への可能性を有しており、今後

もこれらを利用して効率的な免疫誘導を実現する可能性に着目したい。

#### 文 献

- 1) Kosenda, K., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y., Kon, Y. : *Clin Exp Ophthalmol*, 41, 788~797, 2013.
- 2) Ligon, M. M., Wang, C., Jennings, Z., Schulz, C., DeJong, E. N., Lowder, J. L., Bowdish, M. D. E., Mysorekar, I. U. : *bioRxiv*, 749200, 2019.
- 3) Hamilton, W. J., Harrison, R. J. : *J Anat*, 85, 316~324, 1951.
- 4) Elewa, Y. H. A., Mizoguchi, T., Ichii, O., Nakamura, T., Kon, Y. : *PLoS One*, 13, e0201330, 2018.

## 豚赤痢菌の全ゲノム系統解析および薬剤耐性機序の解明

Whole-genome phylogenetic analysis and investigation of drug resistance mechanism of *Brachyspira hyodysenteriae*

岩田 剛敏

(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)

Taketoshi Iwata

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

*Brachyspira hyodysenteriae* is known to be a cause of swine dysentery. In Japan, tylosin, lincomycin, and the pleuromutilins tiamulin and valnemulin are officially accepted as veterinary drugs for treatment of swine dysentery. Some previous studies revealed that multidrug-resistant *B. hyodysenteriae* have emerged since early 2000s in Japan, however, the detail characteristics of *B. hyodysenteriae* distributed in Japan remain unknown. In this study, we tried to perform a phylogenetic analysis of 86 isolates of *B. hyodysenteriae* obtained in Japan between 1985 and 2019 using whole-genome sequencing data. Eighty-six *B. hyodysenteriae* isolates were divided into 28 sequence types (STs) by multilocus sequence typing (MLST) method. Of the 28 STs, 25 STs were novel types in *Brachyspira* MLST Databases. In addition, 20 of 86 *B. hyodysenteriae* isolates were pleuromutilin resistance gene, *tvaA* positive. Of the 20 *tvaA* positive isolates, 17 were pleuromutilin resistant, but 3 were sensitive. All *tvaA* negative isolates were sensitive to pleuromutilins. We compared the levels of *tvaA* expression between pleuromutilin sensitive (Bh57) and resistant (Bh64) isolates. The *tvaA* expression level of pleuromutilin resistant Bh64 isolate was significantly higher than that of sensitive Bh57 isolate in exponential growth phase ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ ). This study suggested that TvaA plays an important role in pleuromutilin resistance of *B. hyodysenteriae* distributed in Japan, and the expression level of TvaA also strongly affect the level of the drug resistance.

### 1. 目的

豚赤痢は *Brachyspira hyodysenteriae* (以下, Bh) により引き起こされる粘血性下痢便の排泄を主徴とする急性または慢性の腸管感染症で、わが国においては家畜伝染病予防法の届出伝染病に指定されている。本症は品種、性別に関係なく発病するが、離乳後の肥育豚での発生が多い。保菌

豚の導入をきっかけとして養豚場全体に蔓延することが多く、一度常在化した場合、その根絶は困難である。

本症は発育遅延および飼料効率の低下をもたらすため、その経済的損失は大きい。Bhは問題を起こしているごく一部の養豚場にのみに分布するわけではなく、実際には国内に広く浸潤していることが示唆されている。それら養豚場の多くでは

典型的な豚赤痢の症状は認められないが、水腫性大腸炎を原因とした生産性の低下およびと畜場における腸管廃棄率の上昇により、潜在的な経済損失を被っている可能性が指摘されている。

農場における細菌性疾病の治療と予防、清浄化対策において、強力な資材となるのが抗菌性物質である。現在、わが国では、豚赤痢を適応症とする抗菌性物質としてタイロシン (TS)、リンコマイシン (LCM)、チアムリン (TML) およびバルネムリン (VML) の4剤が認可されているが、近年、これらへのBhの耐性化が進んでいることが懸念されている。これまでの疫学調査により、1980年代からTSおよびLCMに対するBhの耐性率は非常に高いことが明らかとなっており<sup>1)</sup>、過去には認められなかったTMLおよびVMLといったプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性株が2000年以降に確認され<sup>2)</sup>、近年ではその耐性率が上昇していると報告されている<sup>3)</sup>。すなわち、豚赤痢を適応症とする4薬剤すべてに耐性を示すBh株の分布が拡大している可能性があり、このままでは本症への治療・予防に使用できる有効な抗菌性物質がなくなる恐れがある。

また、海外では2018年にABC-Fタンパク質の一種 (TvaA) がプレウロムチリン系抗菌性物質と23S rRNAの結合を防ぐことでBhの耐性化に関与することが報告されており<sup>4)</sup>、申請者が国内で分離されたBhについてこれまで調査した結果、当該薬剤に耐性の全株が*tvaA*遺伝子を保有することが明らかとなっている。しかし、TvaAの役割についてはまだ不明な点が多いのが現状である。

耐性菌に対する有効な対策を確立するためには、その遺伝的背景や薬剤耐性機序を把握することが欠かせないが、これまで国内では、Bhの分子疫学解析や薬剤耐性機序の検討を行った報告は見当たらない。そこで本研究では、過去30年間に国内で分離されたBh株を対象として全ゲノム解

析を行い、その情報に基づき系統解析を実施することで、国内に分布するBhの遺伝的背景を詳細に明らかにすることを目的とした。また、薬剤耐性機序についても検討し、遺伝学的系統との関連性についても明らかにすることを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 Bhの全ゲノム解析

1985~2019年の間に21都道府県の豚から分離されたBh86株 (北海道・東北地方10株、関東地方11株、中部地方9株、近畿地方3株、四国・中国地方2株、九州・沖縄地方51株) から市販キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen) を用いてDNAを抽出し、次世代シーケンサー (Illumina HiSeq) による全ゲノム解析を実施した。取得した全ゲノム塩基配列から、本菌の主要な分子疫学解析手法であるMultilocus sequence typing (MLST) において対象となる7遺伝子 (*adh*, *alp*, *est*, *gdh*, *glpK*, *pgm*, *thi*) の配列を抽出し、これをもとに系統樹を作成した。また、ゲノムデータベースからBh14株が保有する*tvaA*遺伝子の塩基配列情報を取得し、相同性検索により当該遺伝子の保有状況を調べた。

### 2.2 *tvaA*遺伝子を保有するBh株の比較解析

本研究で解析を実施したBh86株のうち、*tvaA*遺伝子を保有していたBh20株について、*tvaA*遺伝子および23S rRNA遺伝子の塩基配列を比較した。また、Bhが1コピー保有することが明らかとなっている*rpsJ*遺伝子をコントロールとしてリアルタイムPCRを行い、*tvaA*遺伝子のコピー数を算出した。

### 2.3 *tvaA*遺伝子の発現解析

プレウロムチリン系抗菌性物質の感受性が大きく異なる2株 (Bh57およびBh64) を対象に、リアルタイムRT-PCRにより*tvaA*遺伝子の発現量を比較した。供試菌は37℃、嫌気条件で振盪培養

(100rpm) し、RNAの抽出は培養28, 44, 52, 68時間で行った。

### 3. 結果と考察

本研究に供試したBh86株は、MLSTでは28の遺伝子型 (ST) に型別され、そのうち3つの型 (ST124, 129, 197) のみがデータベース (<https://pubmlst.org/brachyspira/>) にすでに登録されており、他の25の型は新規のSTであった (Fig. 1)。2020年4月現在、データベースには263のSTがBhにおいて登録されているが、本研究により、わが国では諸外国に分布していないユニークなSTが広く分布している可能性が示唆された。さらに、現在までのところ、ゲノムデータベースに完全長ゲノム配列が登録されているBhは3株と非常に少ない。このため、今後、本研究によって得られた国内Bh株の全ゲノム塩基配列をもとに高精度系統解析を実施するためには、少なくとも数菌株について第3世代シーケンサーを用いた解析により参照配列を得る必要があると考えられる。

国内に分布するBhのSTと分離地域には関連が認められ、地域によっては特定のSTが1990年代から現在に至るまで分布していることが明らかとなった。それらのSTでは、2000年以前には認められなかったプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性株が2010年前後から確認され、そのすべてが *tvaA* 遺伝子を保有していた。今後、全ゲノム塩基配列をもとに高精度系統解析を行うことで、国内に分布するBhがどのように *tvaA* 遺伝子を獲得し、プレウロムチリン系抗菌性物質に耐性となったか明らかとなることが期待される。

*tvaA* 遺伝子を保有していた20株についてまとめた結果をFig. 2に示す。*tvaA* 遺伝子保有株のうち、3株 (Bh57, Bh74, Bh78) を除く17株は寒天平板希釈法による薬剤感受性試験でプレウロムチ

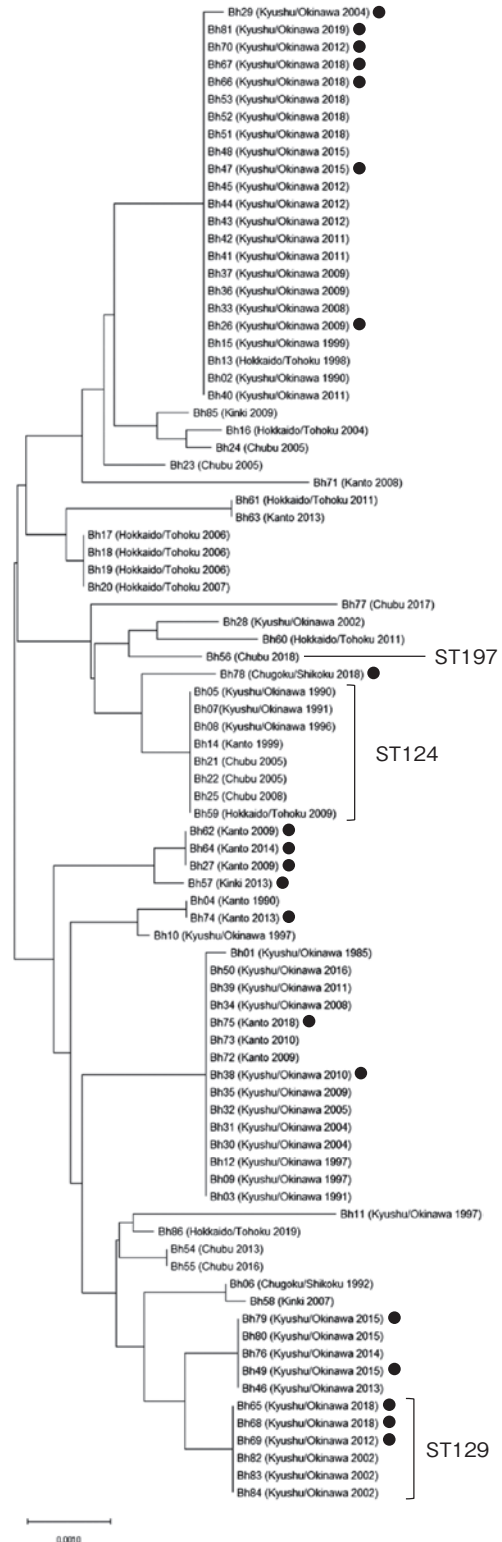


Fig. 1 A phylogenetic construction of *B. hyodysenteriae* 86 isolates in Japan. Black circles mean *tvaA* gene positive.



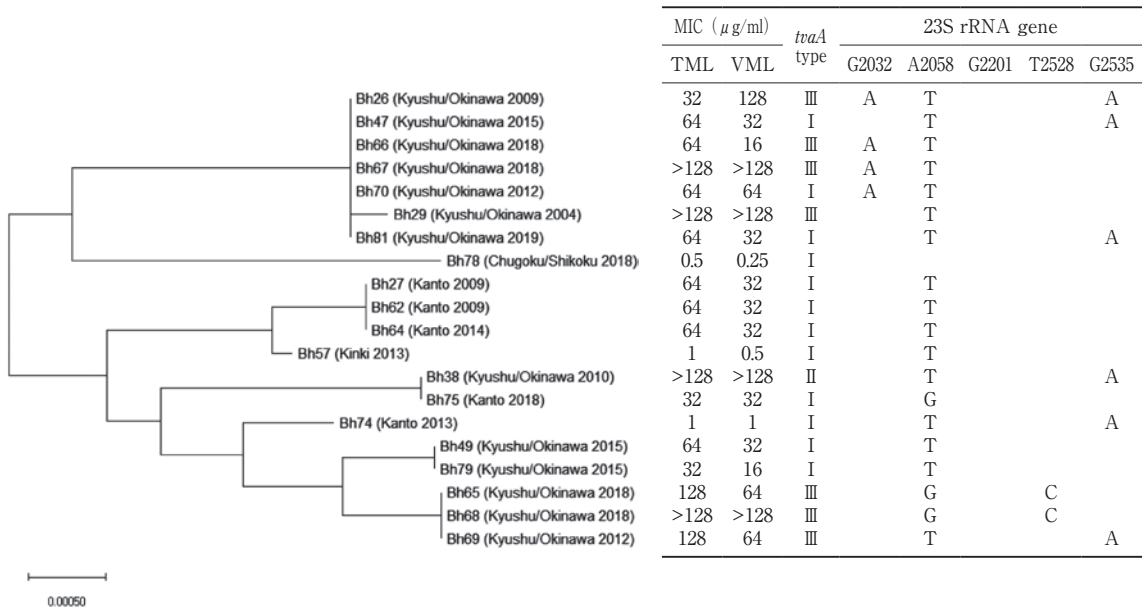


Fig. 2 Summary of the 20 *B. hyodysenteriae* isolates harboring a *tvaA* gene.

リン系抗菌性物質 (TMLおよびVML) に耐性と判定された。また, *tvaA* 遺伝子の塩基配列比較の結果, 大きく3つの異なる配列 (タイプ I ~ III, 類似度はそれぞれのタイプの間で90~94%) が確認された。*tvaA* 遺伝子のコピー数は20株の間で有意差を認めず, 約1コピーであった (data not shown)。Fig. 2に示す*tvaA* 遺伝子保有株のうち, Bh57およびBh27, 62, 64は, MLSTが対象とする7遺伝子中6遺伝子の配列が完全に一致しており, *tvaA* 遺伝子の配列が完全に一致していた。また, これらの株間ではBhのプレウロムチリン系抗菌性物質の耐性に関与すると報告<sup>4, 5)</sup>される23S rRNA 遺伝子の部位 (G2032, A2058, G2201, T2528, G2535) に差を認めなかった。*tvaA* 遺伝子について2018年にはじめて報告したCardら<sup>4)</sup>は, *tvaA* 遺伝子を保有するBh株にはプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性が高度なものと, 中程度のものが認められ, 両者の差は23S rRNA 遺伝子における変異の蓄積の差によると推察している。しかしながら, 本研究において遺伝的に近縁で,

プレウロムチリン系抗菌性物質への感受性が大きく異なる*tvaA* 遺伝子保有株を確認し, 両株の間で*tvaA* 遺伝子および23S rRNA 遺伝子の配列に差を認めなかったことから, Bhのプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性化には未解明の機序があると思われた。

以上のことからまず, Bhのプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性と*tvaA* 遺伝子発現量の関連について検討するため, 耐性株 (Bh64) と感受性株 (Bh57) の間で*tvaA* 遺伝子の発現量を比較した (Fig. 3)。プレウロムチリン系抗菌性物質に耐性のBh64は, 感受性のBh57と比較して, *tvaA* 遺伝子の発現量が対数増殖期から定常期初期にかけて有意に高く, 定常期後期にかけて低下していた。これにより, *tvaA* 遺伝子保有株では, 遺伝子のコピー数を原因としない, 対数増殖期における当該遺伝子の高発現がプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性のレベルに大きな影響を与えることが示唆された。そこで*tvaA* 遺伝子の周辺配列についても両株の間で比較したところ, 当該

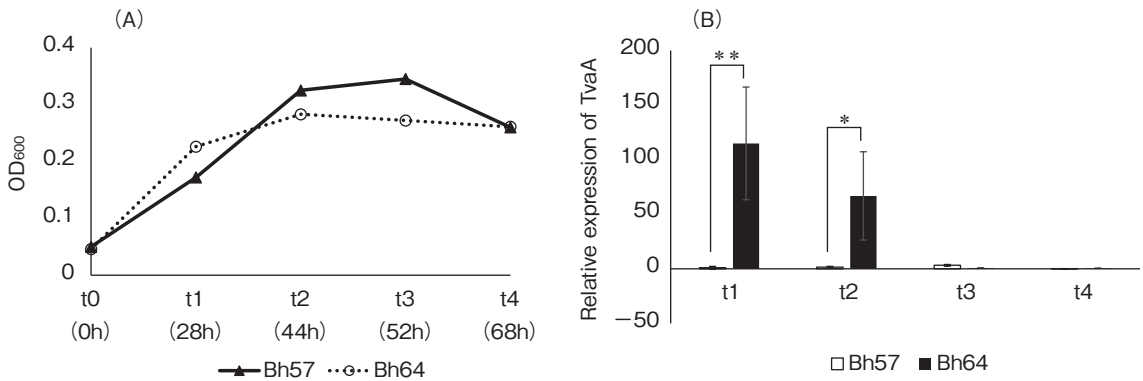


Fig. 3 Comparison of *tvaA* gene expression between pleuromutilin sensitive (Bh57) and resistant (Bh64) isolates. (A) Growth curves of Bh57 and Bh64 isolates. (B) Relative mRNA expression of TvaA. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

遺伝子の発現に大きく影響するような差は確認されなかった。Bhは発育が非常に遅く、培養材料からの分離から薬剤感受性試験の結果を得るまで早くとも1週間以上かかる。Bhのプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性機序の解明は、耐性菌を迅速に検出可能な遺伝子学的検査法の確立につながるため、今後、さらなる詳細な解析を進めていく予定である。

#### 4. 要 約

本研究では、過去30年間に国内で分離されたBh86株を対象として全ゲノム解析を行い、その情報に基づき高精度系統解析を実施することで、国内に分布するBhの遺伝的背景を詳細に明らかにすることを目的とし、薬剤耐性機序についても検討した。Bh86株は、MLSTでは28のSTに型別され、うち25がデータベースに登録されていない新規のSTであった。このため今後、全ゲノム塩基配列を対象とした高精度系統解析を実施するためには、複数株の参照配列を得る必要があると考えられる。また、STと分離地域には関連が認め

られ、地域によっては特定のSTが約30年にわたり分布していることが明らかとなった。それらSTにおいて2000年以降、特に2010年前後からプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性株が確認され、すべての耐性株が*tvaA*遺伝子を保有していた。また、*tvaA*保有株を対象とした解析の結果、遺伝子のコピー数によらない、対数増殖期における当該遺伝子の高発現がプレウロムチリン系抗菌性物質への耐性のレベルに大きな影響を与えることが示唆された。

#### 文 献

- 1) 内田幸治, 原田良和, 塚口誠: 日獣会誌, **36**, 21~24, 1983.
- 2) Ohya, T., Sueyoshi, M.: *J. Vet. Med. Sci.*, **72**, 1651~1653, 2010.
- 3) 黒田まほ, 高橋紗野香: *Brachyspira*, **6**, 3~10, 2016.
- 4) Card, R. M., Stubberfield, E., Rogers, J., Nunez-Garcia, J., Ellis, R. J., AbuOun, M., Strugnell, B., Teale, C., Williamson, S., Anjum, M. F.: *Front. Microbiol.*, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01183>, 2018.
- 5) Mahu, M., Pasmans, F., Vranckx, K., Pauw, N. D., Vande Maele, L., Philip Vyt, Tamara Vandersmissen, Martel, A., Haesebrouck, F., Boyen, F.: *Vet. Microbiol.*, **207**, 125~132, 2016.



## 豚高親和性乳酸菌を用いた新規経口ワクチンの開発

Development of novel oral vaccine using genome editing lactic acid  
bacteria with high affinity for pigs

大 松 勉・堤 椋 哉

(東京農工大学農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター)

Tsutomu Omatsu and Ryoya Tsutsumi

(Research and Education Center for Global Infectious Diseases of Animals, Department of Agriculture,  
Tokyo University of Agriculture and Technology)

Vaccine is one of the most effective measures against infectious diseases. In recent years, mucosal vaccine has attracted attention as a new vaccine administration method, and oral vaccine using lactic acid bacteria is one of candidates. In this study, in order to implement an oral vaccine for swine using lactic acid bacteria, we will proceed with the development of an oral vaccine expressing Japanese encephalitis virus antigen, and search for and identify *Lactobacillus* spp. with high affinity for swine M cells. To identify the bacteria, we tried to develop an expression system for porcine uromodulin.

In the production of Japanese encephalitis virus antigen-expressing *Lactobacillus acidophilus*, a fusion gene containing the antigen sequence of Japanese encephalitis virus envelope domain III into SlpA of *L. acidophilus* was amplified and inserted into pTRK892, an expression vector for Lactobacillus, to develop recombinant protein SlpA-Ejev expression vector. Then, the produced expression vector was introduced into *L. acidophilus* NCFM by electroporation, and the expression of Japanese encephalitis virus antigen was confirmed by Western Blotting. As a result, although a band reacting with the anti-Japanese encephalitis virus antibody was confirmed, its expression level was extremely low.

In the identification of lactic acid bacteria with affinity for swine M cells, total RNA was extracted from porcine kidney and amplified the uromodulin gene and the sequence including ORF with 1,929 bases was identified. Then, in order to obtain the porcine uromodulin protein, gene amplification using a His-Taq addition primer was performed, and the gene was introduced into an expression vector. Although the expression vector was introduced into *E. coli* Stbl2 by the heat shock method and amplification was attempted, amplification of the target expression vector was not confirmed so far. To obtain porcine uromodulin, additional approaches have to be developed.

## 1. 目的

感染症の発生は該当農場のみならず地域社会や国内全体の食の安定供給に多大な影響を及ぼす可能性があることから、その対策は非常に重要である。有効な感染症対策の一つにワクチンがある。近年、新たなワクチン投与方法として粘膜ワクチンが注目を集めている。なかでも*Lactobacillus*属などの乳酸菌にウイルス抗原を発現させ経口投与する粘膜ワクチンの研究が進められている<sup>1,2)</sup>。しかし、現在で利用されている菌株はヒトの腸管や食品から分離された乳酸菌であり、マウスにおける抗体誘導能は確認されているものの、どのような菌が豚腸管免疫の誘導に効果的かといった知見は少ない。M細胞は腸管粘膜上皮に存在し、腸管免疫の誘導に必要な抗原の取り込みを行っていると考えられている。近年、*Lactobacillus*属菌の認識にM細胞表面に発現するウロモジュリンが重要な役割を果たすことが明らかにされた<sup>3)</sup>。そこで、本研究では、豚ウロモジュリン遺伝子を同定し、その発現系を利用して豚M細胞に高い親和性を示す乳酸菌を同定するとともに、*Lactobacillus*属菌に養豚業と公衆衛生上問題となる日本脳炎ウイルスの抗原エピトープを発現した組換え乳酸菌を作製することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 動物、細菌株および発現ベクター

国内のと畜場より豚1頭の腎臓の分与を受けた。経口ワクチンのプラットホームとなる乳酸菌として*Lactobacillus acidophilus* NCFM (ATCC, Manassas, VA) を、プラスミド複製には*Escherichia coli* MC1061 (ATCC) およびTOP10 (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) を用いた。*L. acidophilus* NCFMの培養にはMRS培地 (BD, Sparks, USA) を、*E. coli* MC1061およ

びTOP10の培養にはLB培地 (Sigma-Aldrich) を用いた。また、乳酸菌用ウイルス抗原発現ベクターとしてpTRK892 (Addgene, Watertown, MA) を、豚ウロモジュリンタンパク質の発現ベクターとしてpBApo-CMV Pur DNA (TaKaRa, Shiga, Japan) を用いた。

### 2.2 日本脳炎ウイルス抗原発現ベクターの作成

日本脳炎ウイルスに対するウイルス抗原として、日本脳炎ウイルスに対する抗体誘導能の高いエンベロープ (E) のdomain IIIの一部をエピトープ配列として選択した。*L. acidophilus* NCFMの表面タンパク質であるSlpA上に日本脳炎ウイルス抗原を発現するように融合遺伝子 (SlpA-Ejev) を設計し、オーバーラップPCR法により作製した。作製には*L. acidophilus* NCFMからQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Hulsterweg, Netherlands) を用いて抽出したgenome DNAを鋳型に、制限酵素EcoRI (TOYOBO, Osaka, Japan) およびNotI (TOYOBO) 認識領域を含むプライマー (PF-1 : GCT GAA TTC ATG AAG AAA AAT TTA AGA ATC GTT AGC GCT G-3, PR-JEV : CAG TTT GAT TAT CAC TGT TTG TTT TGC AGG GGC CAT CAC TCC CAG AGT AGG AGA GTT C-, PF-JEV : GAA CTC TCC TAC TCT GGG AGT GAT GGC CCC TGC AAA ACA AAC AGT GAT AAT CAA ACT G, PR-1 : AGA GCG GCC GCT TAT CTA AAG TTT GCA ACC TTA AC) でSlpA-Ejevの増幅を行った。増幅をアガロース電気泳動で確認した後、pTRK892に挿入するためにSlpA-EjevおよびpTRK892をEcoRIおよびNotIで処理し、MonoFas<sup>®</sup> DNA精製キット I (GL Science) を用いて精製した。精製したSlpA-EjevおよびpTRK892をDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) で

結合し, *E. coli* MC1061にヒートショック法により導入した。組換え株はエリスロマイシン加LB寒天培地で選択培養し, PCR法にて形質転換を確認後, 発現ベクターの塩基配列をシーケンスにて確認した。得られた組換え株はエリスロマイシン加LB液体培地にて培養し, FastGene™ Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics, Tokyo, Japan) で精製した。

### 2.3 日本脳炎ウイルス抗原乳酸菌株の構築

作製した SlpA-Ejev 発現ベクターを *L. acidophilus* NCFM に Gene Pulser II (Bio-Rad) を用いて導入した。*L. acidophilus* NCFMを培養後, 精製水で3回洗浄し, 発現ベクターとともに0.2cmギャップのキュベットで1,000Ω, 2.5kVの条件下にて導入した。作製した組換え株はMRS液体培地で37°C, 200rpm, 1時間で振盪培養した後, エリスロマイシンを添加し, 2日間培養した。

日本脳炎ウイルス抗原発現はWestern Blotting法により確認した。組換え*L. acidophilus* NCFMを洗浄後, buffer 200 μl (SM尿素, 50mM HCl-Tris) でペレットを溶解し, Maxwell®用イージー・ビーズ (AMR, Gifu, Japan) で1 min×3回ボルテックスした後, 13,000rpm, 2 min遠心分離し, 上清をSDS-PAGEおよびWestern Blottingに用いた。日本脳炎ウイルス抗原の検出には一次抗体としてAnti-envelope protein (Japanese encephalitis virus), Rabbit poly (GeneTex, Irvine, CA) を5,000倍希釈で, 二次抗体としてマウス血清由来のAnti-rabbit Ig horseradish peroxidase linked (Cell Signaling Technology, Tokyo, Japan) を2,000倍希釈で用いた。

### 2.4 豚ウロモジュリン発現ベクターの作成

と畜場より分与を受けた豚腎臓の一部を分取し, RNeasy Mini Kit (QIAGEN) を用いてトー

タルRNAを抽出・精製した。抽出したRNAから SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (ThermoFisher Scientific) を用いてcDNAを合成した。まず, 豚ウロモジュリン遺伝子の塩基配列を同定するために, NCBIより豚ウロモジュリンの予想配列情報 (accession no. XM\_021086524) を基にmRNA増幅用プライマーを設計し, 合成cDNAをテンプレートとして豚ウロモジュリン遺伝子を増幅した。増幅産物をアガロース電気泳動で目的サイズの増幅を確認した上で, MonoFas®DNA精製キット I (GL Science) を用いて精製し, シーケンスを決定した。His-Tag付加ウロモジュリンタンパク質を得るために, His-Taq配列および制限酵素 (XbaIおよびHindIII) 認識領域を付加したプライマー (pUMOD\_pBA\_F1 : TCC TCT AGA ATG AGG TGG CTT TTC TCT CTG CCC TCG ATA, pUMOD\_pBA\_R2 : TCC AAG CTT CTA ATG GTG ATG GTG ATG GTG ACT GCG GAA TCT GGT CCC GGA GCA G) を用いたPCRでウロモジュリン遺伝子領域の一部を増幅した。増幅産物をMonoFas®DNA精製キット I で精製し, pBApo-CMV Pur DNAとともに, XbaIおよびHindIIIで処理したのちにDNA Ligation Kit <Mighty Mix> (TaKaRa) を用いて発現ベクターを作成し, ヒートショック法で導入した*E. coli* TOP10をアンピシリン加LB寒天培地で選択培養を行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 SlpA-Ejev発現ベクターの作製および日本脳炎ウイルス抗原発現乳酸菌の構築

アガロース電気泳動により増幅された融合遺伝子SlpA-Ejevの断片およびオーバーラップPCR法により全長の増幅を確認した (Fig. 1)。また, 増幅したSlpA-EjevおよびSlpA-Ejev発現ベク

ターの塩基配列はシーケンス解析により100%の相同性を確認した。エレクトロポレーションにより作製したSlpA-Ejev発現*L. acidophilus* NCFMおよび元株のタンパク抽出液をSDS-PAGEで確認したところ、タンパク抽出に問題がないことを確認した。さらにAnti-envelope protein (Japanese encephalitis virus) を用いたWestern Blottingの

結果、40kDa付近にバンドが確認された (Fig. 2)。この結果から、本乳酸菌組換えシステムを用いた日本脳炎ウイルスに対する豚用経口ワクチン開発の可能性が示唆された。しかし、確認されたタンパク発現量は非常に低かったことから、今回得られた組換え株では発現ベクター導入によるタンパク発現量が非常に少ない可能性も考えられ

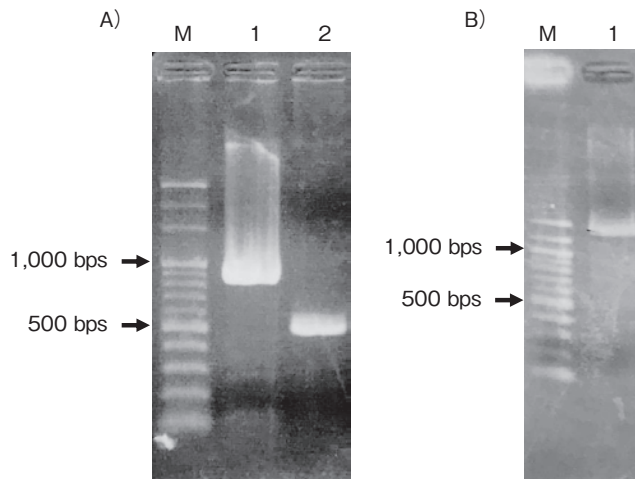


Fig. 1 The results of amplification of *L. acidophilus* SlpA attached with JEV antigen region. A) PCR products of each segment. M : 100bp DNA ladder (WATSON), 1 : PF-JEV and PR-1 (917 bps), 2 : PF-1 and PR-JEV (532 bps). B) Overlap PCR product. M : 100bp DNA ladder (New England Biolabs), 1 : PF-1 and PR-1 (1391 bps).

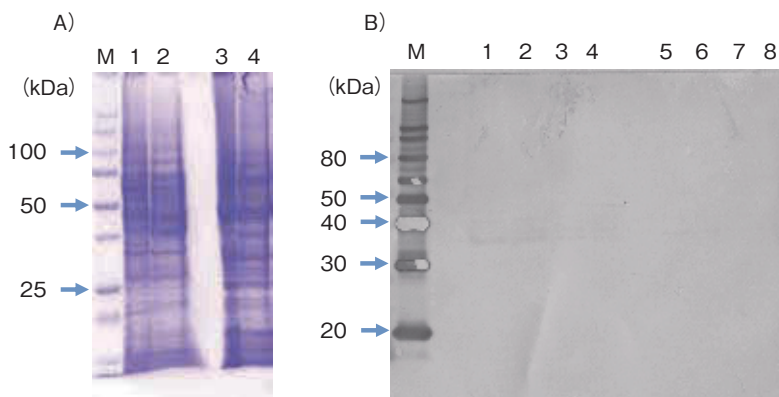


Fig. 2 SDS-PAGE (A) and Western blotting (B) of *L. acidophilus* with and without SlpA-Ejev express vector. A) M : Precision Plus Protein Standards (Bio-Rad), 1, 2 : *L. acidophilus* with SlpA-Ejev vector, 3, 4 : normal *L. acidophilus*, 1, 3 : sample pretreated with 2-ME, 2, 4 : sample non-treated with 2-ME. B) M : MagicMark XP Western Protein Standard (ThermoFisher Scientific), 1~4 : *L. acidophilus* with SlpA-Ejev vector, 5~8 : normal *L. acidophilus*.

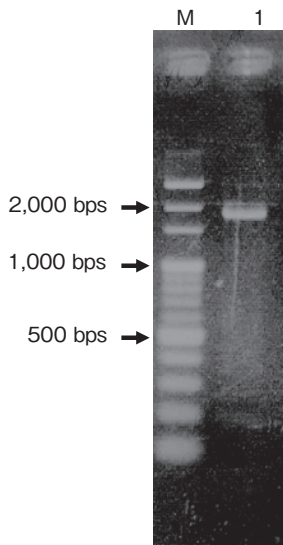


Fig. 3 Amplification of porcine uromodulin. M : 100bp DNA ladder (WATSON), 1 : porcine uromodulin (1,930 bps)

た。今後、他の組換え株についてもウイルス抗原の発現量を確認するとともに、他の抗日本脳炎ウイルス抗体を用いた検出も行い、よりウイルス抗原の発現量の高い組換え株の選定を進める予定である。

### 3.2 豚ウロモジュリンタンパク質発現ベクターの作製

PCR法により約 2 kbps の増幅産物が確認され (Fig. 3), シーケンスの結果、同定された豚ウロモジュリン遺伝子の配列は既報の予想配列と塩基で 5 つ、アミノ酸で 3 つの置換が確認された (いずれも相同性 99%)。His-Taq 付加豚ウロモジュリン発現ベクターの増幅を Stbl 2 を用いてさまざまな条件下で試みたが、目的とする発現ベクターの増幅は確認されなかった。ウロモジュリンは尿路において抗細菌作用を発揮することが知られている<sup>4)</sup>。そのため、ベクター導入後の増幅時に欠損等の遺伝子変異の導入が高頻度で起こってしまう可能性が考えられた。したがって、今後、より耐性の高い菌株を用いた発現ベクターの増幅な

ど、ベクターの増幅方法を改良していく必要があると考えられた。

## 4. 要 約

養豚業で利用可能な乳酸菌を用いた新規経口ワクチンの実用化に向けて、日本脳炎ウイルス抗原を発現する経口ワクチンの開発を進めるとともに、豚M細胞に高い親和性を持つ *Lactobacillus* 属菌の探索・同定に用いる豚ウロモジュリンの発現系の開発を試みた。日本脳炎ウイルス抗原発現乳酸菌の作成に関しては、*Lactobacillus* 用発現ベクターである pTRK892 に *L. acidophilus* の SlpA 内に日本脳炎ウイルスエンベロープ domain III の抗原配列を含む融合遺伝子を組み込んだ発現ベクターを作製し、エレクトロポレーションにより *L. acidophilus* NCFM に導入し Western Blotting により日本脳炎ウイルス抗原の発現の有無を確認した。その結果、抗日本脳炎ウイルス抗体に反応するバンドが確認されたものの、その発現量は非常に少なかった。豚M細胞親和性乳酸菌の同定については、豚腎臓由来 RNA から 1,929 塩基のタンパクコード領域を含む豚ウロモジュリン遺伝子を同定した。次に、豚ウロモジュリンタンパク質発現系の構築を *E. coli* Stbl 2 を用いて試みたが、これまでに目的とする発現ベクターの増幅は確認されなかった。本研究で得られた成果を基に実用化に向けたさらなる研究を進める予定である。

## 文 献

- 1) Kajikawa, A., Zhang, L., LaVoy, A., Bumgardner, S., Klaenhammer, T. R., Dean, G. A. : Mucosal Immunogenicity of Genetically Modified *Lactobacillus acidophilus* Expressing an HIV-1 Epitope within the Surface Layer Protein, *PLoS One*, 10(10), e0141713, 2015.
- 2) LeCureux, J. S., Dean, G. A. : *Lactobacillus* Mucosal Vaccine Vectors : Immune Responses against Bacterial and Viral Antigens, *mSphere*, 2018 May 16 ; 3(3), pii : e00061-18.

- 3) Yanagihara, S., Kanaya, T., Fukuda, S., Nakato, G., Hanazato, M., Wu, X. R., Yamamoto, N., Ohno, H. : Uromodulin-SlpA binding dictates *Lactobacillus acidophilus* uptake by intestinal epithelial M cells, *Int Immunol*, 29(8), 357~363, 2017.
- 4) Becknell, B., Schwaderer, A., Hains, D. S., Spencer, J. D. : Amplifying renal immunity : the role of antimicrobial peptides in pyelone-phritis, *Nat Rev Nephrol*, 11, 642~655, 2015.



## 牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの 実施状況調査（Ⅱ）

A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of  
parasite control program in cattle (Ⅱ)

森 本 素 子  
(宮城大学食産業学群)

Motoko Morimoto  
(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)

Lean meat from pasture grazing cattle has become popular for Japanese consumers as healthy and tasty. However, it is a challenging task to control internal parasites in grazing livestock. When the gastrointestinal nematode infects with the host, intestinal epithelium and innate lymph cells are activated and induce Th2 immune responses. However, it is rare that cattle show extremely severe clinical disease during parasite infection so that many owners fail to recognize the loss of productivity. Ivermectin is a highly effective medication against ticks or nematodes; however, the incidents of anti-parasitic drug resistance increase these days. The field study to investigate an infestation of gastrointestinal parasites has been conducted nationwide in Japan in the 1990s, but not recently.

In this study, the field study was performed to investigate an infestation of gastrointestinal parasites and deworming practice in public pastures in Miyagi. Feces were collected from 10-21 cattle from four pastures and investigated with the modified Wisconsin technique.

In this fiscal year, we carried out a follow-up survey of the four farms that were investigated last year, and compared them with the results of indoor cattle.

Survey 1 : Samples from 10 to 21 cattle were collected from four pastures. Grazing farms with improved deworming programs have improved parasite transmission. On the other hand, the pastures where the program was not changed showed further spread.

Survey 2 : In indoor cattle, there were almost no infected cows, and even if they were, coccidium was only slightly infected, and there were no examples of concern.

The results of this study clarify the importance of an anthelmintic program for grazing cattle.

### 1. 目 的

近年、生産コストの削減や省力化だけでなく、家畜のアニマルウェルフェアや畜産物の付加価値生産を目的とした放牧が注目を浴びている。放牧

牛の赤身肉は健康的で食べ応えがあるとして、消費者にも人気が高まっている。しかし、放牧は感染のリスクを高め、その結果甚大な経済的損失をもたらす場合がある。線虫感染により、腸管粘膜下の免疫細胞が活性化し、上皮に作用して粘液産

生を増し、平滑筋の運動が活発になって蠕動運動が増す<sup>1, 2)</sup>。その結果、腸内細菌叢も変化し、他の病原体に対する免疫応答にも変化をもたらす。しかし一方で臨床に目を移すと、消化管内寄生虫感染では死に至る重篤な病態はまれであり、外観からは家畜のダメージを見きわめるのが難しいことも多い。そのため、寄生虫感染が宿主消化管の生理機能の変化をもたらす、潜在的な損耗を与えていることを見逃しがちである。その結果、生産性を上げることが目的に給与される免疫賦活飼料や生菌剤も、期待される効果を発揮することが困難になる。駆虫薬として、イベルメクチン系の製剤が開発され、効果をあげるようになったが<sup>3-5)</sup>、開発から時間が経ち、近年では適切な駆虫プログラムが行われず、効果が十分得られなかったり、耐性をもつ虫が出現して感染をコントロールできていない例が報告されるようになってきた<sup>6)</sup>。わが国では、1990年代に消化管内寄生虫感染についての全国的な疫学調査が行われた<sup>7)</sup>が、その後は地域限定的に調べられている程度で、まとまったデータはない。そこで本研究では、まず宮城県を中心に、東北圏内の牧場において駆虫プログラムのヒアリングを行うとともに、採糞して虫卵検査を実施し、消化管内寄生虫の浸潤度を調査することとした。本年度は昨年と同じ牧場で採材し、追跡調査を行うとともに、舎飼いの牧場からも採材を行い、放牧牛と比較した。

## 2. 方 法

### 2.1 調査1

昨年度調査を行った宮城県内の4か所（A, B, C, D）の公営放牧場でホルスタイン種または和牛10~20頭から直腸便を採取した。ウイスコンシン変法を用いて虫卵検査を実施し、虫卵数の計測、虫の種類の手定を行った。

同時に、以下の項目についてヒアリング調査を

実施した。

- ① 使用している駆虫剤の種類
- ② 投薬時期および回数
- ③ 放牧の時期
- ④ 駆虫プログラムの継続年数
- ⑤ 消化管寄生虫の感染による家畜への影響についての認識
- ⑥ 駆虫プログラム実施による診療回数の変化

### 2.2 調査2

舎飼いの牧場3か所の5~11頭から採材し、調査1と同様に検査およびヒアリングを行った。

## 3. 結果と考察

### 3.1 調査1：宮城県内の4か所の公営牧場の消化管内寄生虫の浸潤度追跡調査

【A牧場】和牛10頭、ホルスタイン種10頭から直腸便を採取した。消化管内線虫の感染率は前回の29%から15%に半減していた。コクシジウムは依然として高く、感染率は80%だった。ベネデン条虫の感染率は前回の19%から35%に増加していた。前回の調査よりも感染牛の割合も増加しているが、検出される卵数も増加していた。前回から継続して調査を行ったホルスタイン種が1頭確認できた。この牛は前回の調査時から寄生虫感染はほとんどなく、今回の調査でも寄生虫感染は確認されなかった。この牧場では、前回の調査から駆虫薬の見直しを行っていた。2018年度の放牧期間中はイベルメクチンを月に1回の割合で使用していたが、2019年度はバイチコールを新たに採用し月に1回の割合で使用されていた。イベルメクチンは、7月に1回のみ使用に変更されていた。

【B牧場】和牛10頭から直腸便を採取した。消化管内線虫の感染率は前回の50%から70%に増加していた。前回の調査では乳頭糞線虫の感染が見られる牛が2頭確認されたが、今回は乳頭糞線虫に感染している牛は確認されなかった。しかし一般

線虫に感染している牛の数は増加していた。コクシジウムは20%から80%に増加していたが、濃厚感染している牛は確認されなかった。ベネデン条虫は20%から0%に減少していた。前回から継続調査できた牛が1頭いるが、前回の調査では寄生虫に感染していなかったが今回の調査で消化管内線虫に感染していた。駆虫については依然として定期的な駆虫は行われておらず、寄生虫感染の症状が現れたときにイベルメクチンを使用していた。

【C牧場】和牛10頭、ホルスタイン種10頭から直腸便を採取した。消化管内線虫は58%から70%に増加していた。前回調査では乳頭糞線虫に感染している牛が4頭、牛鞭虫に感染している牛が3頭に確認されたが今回は乳頭糞線虫2頭、牛鞭虫0頭と減少していた。しかし、新たに前回調査では検出されなかったネマトジュルスに感染している牛が1頭、毛細線虫に感染している牛が2頭確認された。また、一般線虫感染牛の数と卵数が増加していた。コクシジウムの感染率は95%で前回と同じだった。ベネデン条虫は5%から15%に増加しており、ホルスタイン種での増加が見られた。前回からの継続調査ができた牛は和牛が7頭、ホルスタイン種が4頭と今回調査した牧場4カ所で最多であった。感染している寄生虫種もほぼ同じで変化は見られなかった。使用している駆虫薬もバイチコールで薬剤の使用頻度などに変更はなかった。

【D牧場】和牛10頭から直腸便を採取した。消化管内線虫の感染率は前回の70%から60%に減少していた。前回の調査で確認された毛細線虫、捻転胃虫に感染している牛はいなかったが、乳頭糞線虫に感染している牛がいた。コクシジウムは100%から90%に減少していた。オーシストの数についても、前回の調査では3桁以上の数が検出される牛もいたが、今回の調査では減少が見られた。ベネデン条虫は前回と同様に10%で卵数もほ

ぼ同程度だった。前回からの継続調査ができた牛は3頭だった。感染状況はほぼ同じで卵数もほぼ同じだった。使っている駆虫薬もバイチコールで駆虫薬に変更はなかった (Fig. 1)。

### 3.2 調査2：舎飼い牛の調査

宮城県内の3カ所 (E, F, G) の牧場の和牛またはホルスタイン種より調査1と同様に採材し、糞便検査を行った。

【E牧場】和牛3頭、ホルスタイン種6頭を供試した。駆虫薬はまったく投与していないとのことであった。線虫および条虫は不検出。コクシジウム陽性率は22%だが、オーシストの数はわずかであった。

【F牧場】和牛2頭、ホルスタイン種3頭を供試した。和牛にはアイボメック、ホルスタイン種にはエプリメックスを使用していた。ホルスタイン種の場合経産牛は分娩の1か月くらい前、子牛は分娩後1か月・6か月位、和牛の経産もホルスタイン種同様分娩の1か月前、子牛も同様1か月・6か月、子牛は生後2週間後にバイコックスを経口投与し、コクシジウム対策を行っているとのことであった。検査の結果、線虫、条虫、コクシジウムともに不検出であった。

【G牧場】ホルスタイン種11頭を供試した。駆虫薬はほとんど意識しておらず、バイコックスを投与することがある程度とのことであった。検査の結果、線虫、条虫、コクシジウムともに不検出であった (Table 1)。

宮城県において、昨年度の調査で寄生虫感染が広がっていることが明らかになっているにもかかわらず、適正な処置がとられていない公営牧場があった。新しく導入される預託牛への感染予防のためにも駆虫を実施してもらいたいが、放牧場の管理者に検査結果を伝えるだけでは不十分で、農家の啓蒙が必須と考えられた。また、ベネデン条虫感染はこれまであまり問題視されていなかった

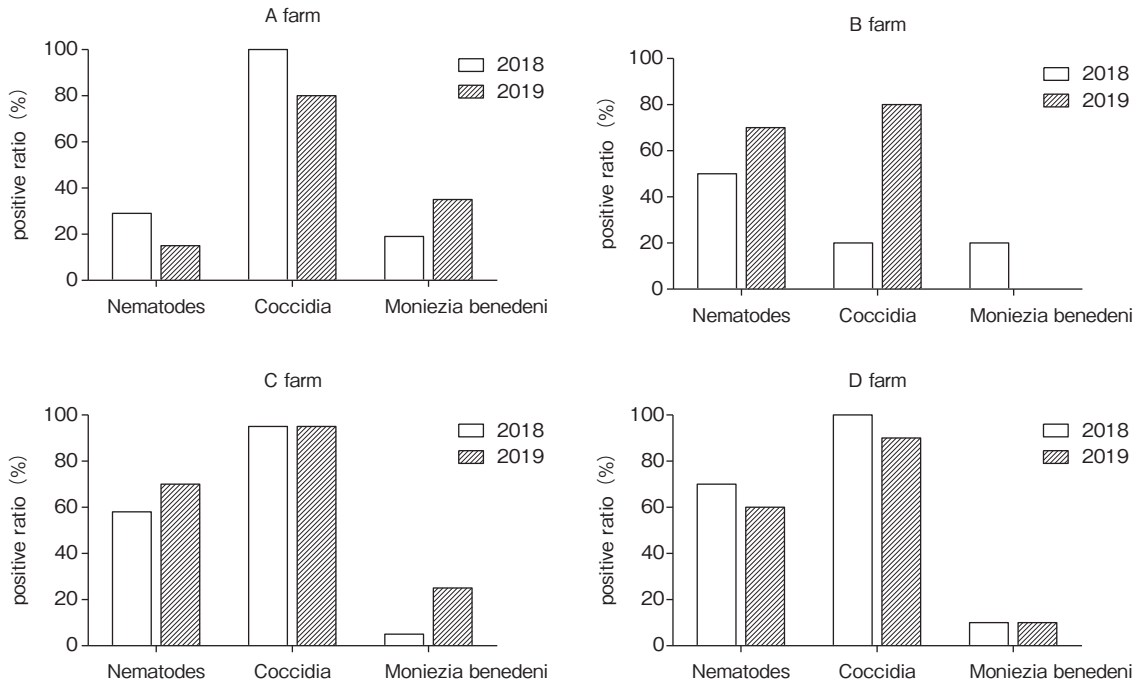


Fig. 1 Changes in infection rates

The changes in ratio of gastrointestinal parasite-infected cattle between 2018 and 2019 on each farm. The positive ratio of nematodes and coccidia in A farm decreased after the change of the deworming program. In addition, the number of eggs also declined in infected cattle in 2019. B, C, and D farm continued the same program as last year. Infection status has not been improved.

Table 1 Infection rate in cattle bred indoors

	<i>Nematodes</i>	<i>Coccidia</i>	<i>Moniezia benedeni</i>
E farm	0	0	0
F farm	0	22	0
G farm	0	0	0

Infection rate in E farm (n=5), F farm (n=9) and G farm (n=11) in 2019.

が、10か月齢以下の放牧乳牛での増体不振が見られたので、今後は注意が必要である。一方、調査した舎飼い牛には感染はほとんど認められず、放牧における課題が明確になった。今後、他の地域でも調査が必要であると考えます。

#### 4. 要 約

近年、生産コストの削減や省力化だけでなく、家畜のアニマルウェルフェアや畜産物の付加価値

生産を目的とした放牧が注目を浴びているが、放牧は感染のリスクを高め、その結果甚大な経済的損失をもたらす場合がある。駆虫薬として、イベルメクチン系の製剤が開発され、効果をあげるようになったが、近年では適切な駆虫プログラムが行われず、効果が十分得られなかったり、耐性をもつ虫が出現して感染をコントロールできていない例が報告されるようになってきた。わが国では、1990年代に消化管内寄生虫感染についての全

国的な疫学調査が行われたが、その後は地域限定的に調べられている程度で、まとまったデータはない。そこで本研究では、宮城県内の4か所の公営牧場において、駆虫プログラムのヒアリングを行うとともに、採糞してウイスコンシン変法により虫卵検査を実施し、消化管内寄生虫の浸潤度を調査した。本年度は、昨年度調査した牧場の追跡調査、および舎飼い牛の調査を行い、放牧牛と比較した。

調査1：4か所の牧場からそれぞれ10～21頭のサンプルを採取した。駆虫プログラムを改良した放牧場では、寄生虫感染が改善された。一方、プログラムを変更しなかった放牧場では、さらに感染が広がっていることが分かった。

調査2：舎飼い牛では、感染牛はほとんどな

く、あってもコクシジウムが軽微に感染している程度で、問題になる例はなかった。

本研究の結果、放牧牛に対する適切な駆虫プログラムの重要性が明らかになった。

#### 文 献

- 1) 森本素子：家畜感染症学会誌, 5, 63～68, 2016.
- 2) Zhao, A., McDermott, J., Urban, J. F. Jr., *et al.* : *J. Immunol.*, 171, 948～54, 2003.
- 3) 及川伸, 川匂文男, 平賀健二, 本川正人, 千葉由見, 小川徹三, 福本真一郎：日獣会誌, 51, 237～240, 1998.
- 4) 高橋俊彦：家畜診療, 50, 339～347, 2003.
- 5) Nagata, T., Roncalli, R. A., Mishiba, T., Yamada, K., Ura, S. : *Jpn. Bull. Animal Hyg.*, 42, 3～7, 1995.
- 6) Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., *et al.* : *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 5, 163～71, 2015.
- 7) 高橋史昭：臨床獣医, 36, 14～20, 2018.

## 鶏を対象としたトキソプラズマ症の抗体検査法の開発

Development of serological tests for *Toxoplasma* infection in poultry

吉田 彩子・長安 英治\*・高島 康信\*\*

(宮崎大学農学部, \*宮崎大学医学部, \*\*岐阜大学応用生物科学部)

Ayako Yoshida, Eiji Nagayasu\* and Yasunobu Takashima\*\*

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, \*Faculty of Medicine, University of Miyazaki,

\*\*Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

*Toxoplasma gondii* is an obligate intracellular protozoan parasite that causes the most common zoonotic parasitic disease worldwide in multiples species of mammals and birds. Free-range chickens may play a role as an important reservoir for *T. gondii*, therefore, it has been suggested that consuming raw or undercooked poultry products can be a risk of toxoplasmosis to humans. However, there is no reliable and commercially available diagnostic test for *Toxoplasma* infection in chickens. In this study, we aimed to develop a novel luciferase-linked antibody capture assay (LACA) for the serodiagnosis of *T. gondii* infection in chickens.

Recombinant nanoluciferase fused- *T. gondii* dense granule antigen 8 (rNluc-GRA8) was applied to LACA assay as a diagnostic antigen. When GRA8-LACA was tested with the sera from uninfected and experimentally infected chickens with *T. gondii* and other parasitic pathogens, *Eimeria tenella* and *Ascaridia galli*, high sensitivity (90.5%) and specificity (95.4%) for toxoplasmosis were validated. Interestingly, *E. coli* lysate expressing rNluc-GRA8 could be applied in GRA8-LACA and gave similar results as using purified rNluc-GRA8 antigen. Then, we applied our diagnostic system to examine 267 free-range and 100 broiler chicken sera collected from the poultry abattoirs. The overall seroprevalence of *Toxoplasma* infection in free-range chickens was 10.1% , while no positive case was detected in broiler chickens.

In brief, GRA8-LACA is a useful diagnostic technique for *T. gondii* infection in chickens and could be a promising diagnostic platform for other animal species and humans as well. Relatively high seroprevalence of *T. gondii* in free-range chickens was observed which warns of a risk of *Toxoplasma* transmission by the consumption of raw or undercooked chicken meat.

### 1. 目 的

トキソプラズマ原虫 (*Toxoplasma gondii*) は猫を終宿主とし、ヒトをはじめ牛、豚、ネズミ、鶏等の多くの動物が感染して中間宿主となる人獣共通寄生虫である。トキソプラズマ原虫がヒトの

胎児に感染した場合は流産や奇形、発達遅延の原因となることが知られており、成人でも抗癌剤投与等により免疫抑制状態にある場合は重症化して死に至ることもある。

ヒトへの感染は、猫の糞便中に含まれるオーシストの経口摂取以外に、食肉に由来する感染、つ



まり、トキソプラズマに感染した中間宿主動物の原虫シストを含んだ筋肉を加熱不十分な状態で摂取することによっても起こり、原因食材としては、豚肉が以前から重要視されてきたが、近年では豚以外の食肉からの感染経路も無視することはできないとして、対策を求める声が高まっている<sup>1)</sup>。

トキソプラズマ症の中間宿主における診断は、宿主体内の原虫の検出が困難なことから、抗体検査による診断が一般的である。食肉家畜を対象としたものとして、わが国では豚用のラテックス凝集反応やELISA法を利用した抗体検出キットが広く利用されてきたが、豚以外の家畜・家禽を対象とした診断キットは流通しておらず、抗体検査の方法も標準化されていない。そのため、これまで行われてきた家畜・家禽における抗体保有状況の調査については、ヒトや豚用の診断キットの転用により実施されてきた<sup>2)</sup>。しかしながら、検査キットを対象外の家畜・家禽に適応する評価法には感度・特異性に問題があるとする報告もあり<sup>3)</sup>、食肉由来の感染リスクを正確に評価するためには新たな検査法の開発と標準化が必須であると考えられる。

本研究では、刺身やたたきといった加熱不十分な状態で喫食される機会の多い鶏肉に注目し、家禽を対象とする Luciferase-linked antibody capture assay (LACA) 法<sup>4)</sup>による抗トキソプラズマ抗体検査法を開発した。さらに、開発した抗体検査法による血清疫学調査を実施し、鶏肉によるトキソプラズマ症の感染リスクを評価した。

## 2. 方 法

### 2.1 抗 原

診断抗原には、ナノルシフェラーゼ・トキソプラズマ GRA 8 融合組換タンパク質 (rNluc-GRA8) を用いた<sup>5)</sup>。rNluc-GRA 8 は、pET100/

D-TOPOベクター (Invitrogen) を発現ベクターとし、BL21 star (DE3) (Invitrogen) を宿主細胞とする大腸菌発現系により、N末端にHis-tagを融合した組換タンパク質として作成した。0.5mMのIPTGで発現を誘導して37℃で2時間培養した大腸菌を超音波で破砕し、10,000 x g, 4℃で30分間遠心分離して上清を回収した。さらに、Ni-NTAカラム (WAKO) を用いて、アフィニティークロマト精製を行った。精製したrNluc-GRA 8 はQubit 4 Fluorometer (Invitrogen) によりタンパク質濃度を測定し、-80℃で保存した。同様に、rNluc, rGRA 8 も作成して検討に用いた。

### 2.2 血 清

$1 \times 10^7$  の TgCatJpG11/TaJ GRA Red strain トキソプラズマ原虫タキゾイトを7日齢または30日齢の雄の交雑鶏10羽に腹腔内接種、または、1,500, 2,000, 3,000個の筋肉内シストを30日齢の雄の交雑鶏7羽に経口接種し、感染後14~42日に翼下静脈より採血を行った。非感染鶏血清は、生後1日齢よりアイソレーター内で飼育した交雑鶏58羽より準備した。また、鶏コクシジウム (*Eimeria tenella*) 実験感染鶏血清2検体、鶏回虫 (*Ascaridia galli*) 実験感染鶏血清5検体を、交差反応性の評価に用いた。

野外サンプルとして、ブロイラー血清100検体、地鶏血清267検体を宮崎県内の食鳥処理場で採材して検討に用いた。血清は、-30℃で保存した。

### 2.3 ウエスタンブロッティング

精製した組換タンパク質はNuPAGE 10% Bis-Trisゲル (Invitrogen) を用いてSDS-PAGEを行い、親水化処理したPVDF膜 (Bio-Rad) に転写した。その後、1% BSA-TBST (1% BSA, 0.1% Tween20加TBS) で、4℃で1晩ブロッキングを行い、400倍に希釈した血清と室温で2時間反応させた。次に、1% BSA-TBSTで洗浄した後、

5,000倍に希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗鶏IgG抗体 (Bethyl Laboratories) と室温で2時間反応させた。さらに洗浄後, Western Blue<sup>®</sup> Stabilized Substrate (Promega) を用いて陽性バンドの検出を行った。

#### 2.4 Luciferase-linked antibody capture assay (LACA) 法

LACA法の原理をFig. 1に示した。0.05M carbonate-bicarbonate (pH9.6) で希釈した抗鶏IgY Fc領域抗体 (Immunology Consultants Laboratory) をアッセイプレート (white OptiPlate-96 HB microplates, PerkinElmer) に4℃で1晩吸着させた。PBST (0.05% Tween20加PBS) でウェルを洗浄した後, 1%カゼインPBSTを加え, 室温で2時間インキュベートしてブロッキングした。1%カゼインPBSTで10倍に希釈した血清を50  $\mu$ l 加え, 37℃で1時間反応させ, その後PBSTで5回洗浄し, さらに, 1%カゼインPBSTで希釈したrNluc-GRA8 (1  $\mu$ g/ml) またはrNluc-GRA8発現大腸菌ライセート (5  $\mu$ g/ml) を加えて37℃で1時間反応させた。PBSTで5回洗浄した後, Nano-Glo-luciferase assay buffer (Promega) で希釈した Nano-Glo

substrate (Promega) を加えて室温で2分インキュベートし, VICTOR<sup>3</sup> Multilabel Plate Reader (PerkinElmer) で発光量 (counts/s = CPS) を測定した。

#### 2.5 統計解析

データはGraphPad Prism 6 (GraphPad Software) を用いて解析した。カットオフ値はROC解析により求めた。感染鶏と非感染鶏血清のGRA8-LACAにおける発光量の比較を, マン=ホイットニーのU検定で行い,  $p < 0.05$  を有意とした。野外サンプルにおける抗トキソプラズマ抗体の保有率は, フィッシャーの正確確率検定により解析し, 95%信頼区間を推定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 rNluc-GRA8の抗原性の確認

ウエスタンブロッティングにより, 実験感染鶏血清5検体, 非感染鶏血清8検体のそれぞれのプール血清を用いて, rGRA8, rNluc, rNluc-GRA8に対する抗トキソプラズマ抗体との反応性を確認した (Fig. 2)。実験感染鶏血清はrGRA8とrNluc-GRA8に対して陽性反応を示したが, rNlucに対しては陰性であった。また, 非感染鶏

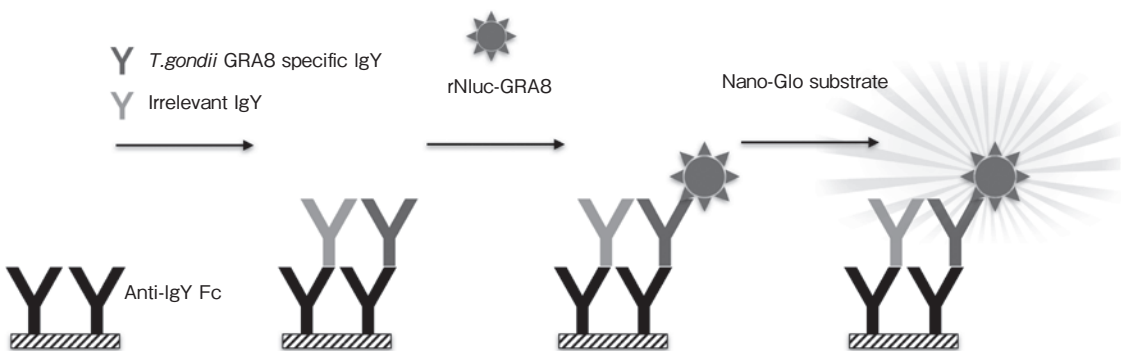
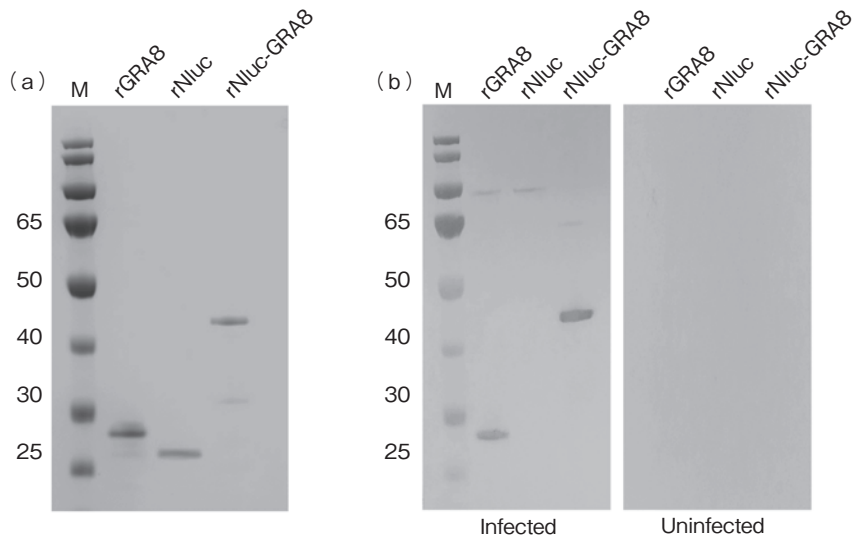


Fig. 1 Schematic concept of LACA using rNluc-GRA8. The anti-chicken IgY (Fc region) was immobilized on the surface of the white solid ELISA plate to capture the chicken antibodies from serum samples. rNluc-GRA8 was used as a target antigen, which binds to the *T. gondii* specific IgY, as well as a bioluminescent reporter when exposed to Nano-Glo substrate. The obtained signals were measured in relative light units (counts/second (CPS)) using the luminometer.



**Fig. 2** SDS-PAGE and Western Blot of rGRA8, rNluc and rNluc-GRA8. (a) SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins which were separated in 10 % Bis-Tris gel and stained by SimplyBlue™ SafeStain. (b) Western Blot of purified recombinant proteins probed with pooled sera from experimentally *T. gondii* infected chickens (n=5) and healthy uninfected chickens (n=8). M, molecular weight maker in kDa.

血清ではいずれの抗原に対しても陽性バンドは検出されなかった。以上より、rGRA8は鶏における抗トキソプラズマ抗体の検出に有用な診断抗原候補分子であり、Nlucが融合していてもその抗原性に変化はないことが示された。

### 3.2 GRA8-LACAによる抗トキソプラズマ抗体の検出

トキソプラズマ感染鶏血清 (21検体)、非感染鶏血清 (58検体)、鶏コクシジウム感染鶏血清 (2検体)、鶏回虫感染鶏血清 (5検体) を用い、rNluc-GRA8を検出抗原としてLACAを実施した (Fig. 3a)。GRA8-LACAのカットオフ値は180.0CSPとなり、鶏コクシジウムや鶏回虫感染血清との交差反応はなく、その感度と特異度はそれぞれ90.5%と95.4%であった。また、検出抗原として未精製のrNluc-GRA8発現大腸菌ライセートを用いてアッセイを実施したところ (Fig. 3b)、カットオフ値は755.0CSPと精製した抗原を使用した場合に比べ高い値となったが、感度

85.7%、特異度96.9%と依然として高い感度と特異度を維持していた。

抗体検査法としてよく用いられるELISA法等において組換タンパク質を抗原とする場合、宿主細胞に発現させた組換タンパク質を分離・精製する必要がある。しかしながら、精製には手間と時間、コストがかかるうえに、大腸菌を用いた組換タンパク質の発現システムではしばしば目的とする組換タンパク質が封入体に局在して不溶性となるため、その精製自体が困難なこともある。本研究において開発したLACA法は、精製した組換タンパク質はもちろんのこと、未精製の大腸菌ライセートを抗原として用いた場合においても高い感度と特異度を示した。このことから、LACA法のプラットフォームは、これまで組換タンパク質を抗原とする血清診断法開発において、しばしばネックとなった抗原の精製ステップを省くことにより、診断抗原の多様化と診断法開発の効率化に寄与することができると考えられた。

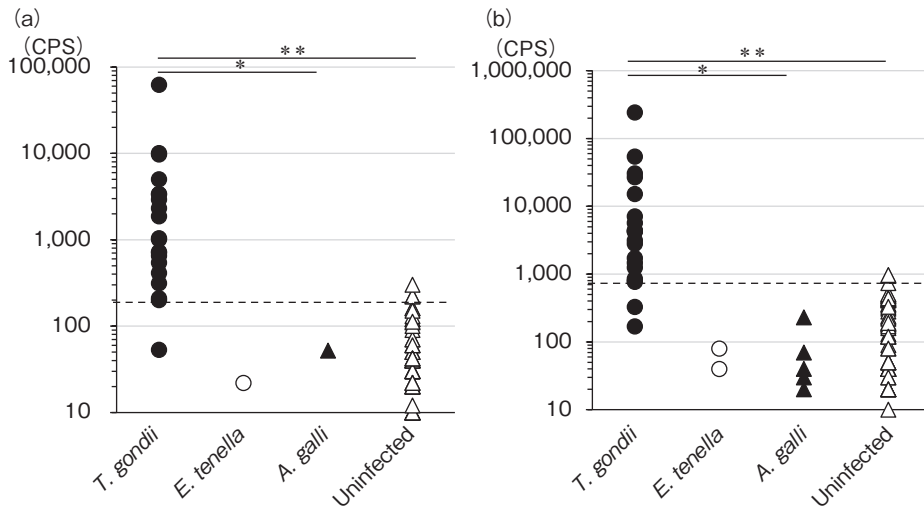


Fig. 3 Diagnostic capability of rNluc-GRa8 antigen and GR8-LACA platform. GRA8-LACA using purified rNluc-GRa8 antigen (a) and unpurified *E. coli* expressing rNluc-GRa8 lysate (b) were performed by *T. gondii*, *E. tenella* and *A. galli* infected and uninfected chicken sera. The y-axis displayed the relative light unit (CPS) obtained from GRA8-LACA. The cut-off lines were determined ROC analysis and were marked by the broken line. The asterisk indicates a significant difference regarding Mann-Whiney's test (\* $p < 0.01$ ; \*\* $p < 0.001$ ).

### 3.3 肉用鶏における抗トキソプラズマ抗体保有状況の検討

rNluc-GRa8を検出抗原とするGRA8-LACAを用いて、ブロイラー血清100検体、地鶏血清267検体について、抗トキソプラズマ抗体の検出を試みた (Fig. 4)。実験感染鶏血清を用いて算出した180.0CSPをカットオフ値としたところ、ブロイラーでは全例が陰性であったが、地鶏では267検体中27検体 (陽性率: 10.1%, 95%CI: 9.9%—10.3%) が抗体陽性となり、ブロイラーに比べ有意に高い抗トキソプラズマ抗体の保有が示された (オッズ比22.98,  $p = 0.0002$ )。

トキソプラズマ原虫の鶏への感染ルートを考えて場合、終宿主である猫の糞便に排出されたオーシストを飼料や水とともに経口摂取することによるルートの可能性が高い。一般にブロイラーは密閉型の鶏舎で飼養されることが多く、出荷にかかる時間も孵化から50日程度と短い。一方で、地鶏は平飼い外環境と接する機会のある環境下で飼

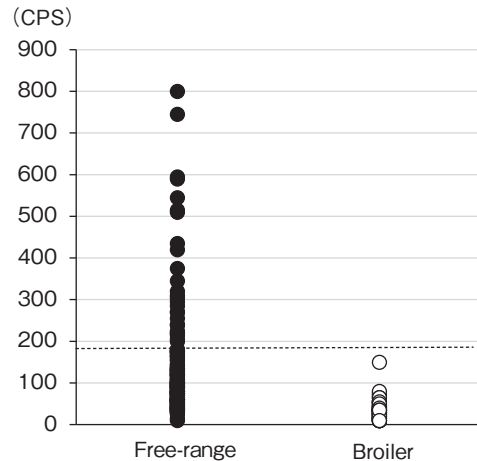


Fig. 4 Distribution of specific IgY in sera of free-range and broiler chickens against *T. gondii* GRA8 antigen. The y-axis displayed the relative light unit (CPS) obtained from GRA8-LACA. Black and open circles represent individual serum samples from free-range ( $n = 267$ ) and broiler chickens ( $n = 100$ ), respectively. The cut-off value was marked by broken line.

育されることも多く、飼育期間も80日以上と長い。このような飼育形態の違いが、肉用鶏におけるトキソプラズマ感染率の違いにつながったのか

もしれない。

今回、鶏肉の中でも生食に供される機会が多い地鶏においては、10%を超える高い抗体陽性率となった。ヒトへの感染は鶏肉に含まれるシストの経口摂取により起こる。本研究において、抗体陽性鶏からの筋肉内シストの検出は実施しておらず、すべての抗体陽性鶏がヒトへの感染源になるかは不明である。しかしながら、ヒトへの感染リスクの低下、そして、動物のQOLの向上といった観点からも、鶏への感染リスクを低減するための飼養管理対策を実施していくべきであり、さらに、肉の生食によるトキソプラズマ感染のリスクを消費者に啓発していく必要があると考えられた。

#### 4. 要 約

食肉からのトキソプラズマ感染のリスク評価については、豚以外の家畜・家禽に関しては確立された検査法がないため、十分な検討が行われていないのが現状である。わが国には牛肉や鶏肉、馬肉などの生食を好む食文化があり、肉の生食がトキソプラズマの感染リスクとなっていることが知られている。本研究では、刺身やたたきといった加熱不十分な状態で喫食される機会の多い鶏肉に注目し、家禽を対象とする抗トキソプラズマ抗体検査法として、rNluc-GRA8を検出抗原とする

GRA8-LACAを開発した。GRA8-LACAは高い感度と特異性を有しており、さらに、組換タンパク質を大腸菌ライセートから精製することなくアッセイに使用が可能であった。このGRA8-LACAにより、肉用鶏における抗トキソプラズマ抗体の保有状況を調査したところ、ブロイラー鶏では全例陰性であったが、地鶏においては10.1%という高い抗体陽性率が確認された。抗体陽性鶏がヒトへの感染源となる筋肉シストを保有しているかは不明であるが、公衆衛生上のリスク管理のためにも鶏への感染リスクを低減するための対策は必須であり、さらに、筋肉シスト保有鶏の検出法開発は今後の重要な課題であると考ええる。

#### 文 献

- 1) Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., Nakata, M., Yasuda, T., Ikenoue, T., Kojima, T. : *Clin Vaccine Immunol*, 19 (3), 365~367, 2012.
- 2) Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., Nagamune, K. : *Parasitol Int*, 63 (4), 638~639, 2014.
- 3) 田中舜, 吉田彩子, Aye, K. M., 長安英治, 西川義文, 野中成晃 : 第160回日本獣医学会学術集会講演要旨集, 336, 2017.
- 4) He, S. X., Song, G., Shi, J. P., Guo, Y. Q., Guo, Z. T. : *Biochimie*, 106, 140~148, 2014.
- 5) Aye, K. M., Nagayasu, E., Baba, M., Yoshida, A., Takashima, Y., Maruyama, H. : *Immunol Methods*, 462, 91~100, 2018.

# 牛ウイルス性下痢ウイルスの準種END<sup>-</sup>は 弱毒生ワクチンになるか？ —より効果的に免疫を誘導するための可能性の追求—

Can END<sup>-</sup>, a quasispecies of bovine viral diarrhea virus, be a live-attenuated vaccine ?

—Pursing the possibility of more effectively inducing immunity—

塩 川 舞

(日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科)

Mai Shiokawa

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

Bovine viral diarrhea virus (BVDV) is an RNA virus classified in the *Pestivirus* genus of the *Flaviviridae* family, which is the same genus to which the classical swine fever virus (CSFV) belongs. BVDV and CSFV are together known to form quasispecies and include at least two quasispecies, namely, the END<sup>+</sup> virus that suppresses the host's innate immune response and the END<sup>-</sup> virus that induces it. Although this ability of the END<sup>-</sup> virus to induce an innate immune response has a disadvantageous effect on viral propagation, it is considered to be a useful property for a live attenuated vaccine. In fact, live attenuated vaccines of CSFV are developed in Japan using END<sup>-</sup> as a seed virus. This study investigated whether BVDV/END<sup>-</sup> could also be applied as a live attenuated vaccine strain.

For attenuating the virus, BVDV/END<sup>-</sup> isolated from rabbit kidney-derived cell lines (Rb/END<sup>-</sup>) was passaged 25 times using rabbit kidney-derived primary cultured (RKp) cells. Rb/END<sup>-</sup> began adapting to RKp cells at approximately 5 passages (P.5) and maintained their propagation until P.25. When the immunological properties of the adapted virus obtained by the viral passages (adapted Rb/END<sup>-</sup> ; aRb/END<sup>-</sup>) were examined, aRb/END<sup>-</sup> was observed to induce an innate immune response in the infected cells. Moreover, it was confirmed that reverse plaques, a characteristic feature of the END<sup>-</sup> virus, were formed in the aRb/END<sup>-</sup>-infected cells.

These results indicated that BVDV/END<sup>-</sup> (Rb/END<sup>-</sup>) adapted to RKp cells and maintained the properties of END<sup>-</sup> after adaptation. This study strongly suggests that aRb/END<sup>-</sup> could be applied as a live attenuated vaccine strain of BVDV that could more effectively confer immunity.



## 1. 目 的

牛ウイルス性下痢ウイルス (Bovine Viral Diarrhea Virus ; BVDV)の持続感染(Persistently Infection ; PI)牛は、自身の分泌液からウイルスを排出し続けるため農場の慢性的な汚染源となる<sup>1)</sup>。PI牛の存在は生産性の低下および経済的損失に繋がるため、PI牛を作らないこと、または、PI牛をいかに早期摘発できるかが食肉生産の安定性やBVDV感染症を制御するうえで重要である。しかし、PI牛を早期に発見できるシステムは未確立であり、ワクチンがあるにもかかわらず発生が後を絶たない。また、BVDVは近縁の豚熱ウイルス(豚コレラウイルス, Classical Swine Fever Virus ; CSFV)とは異なり宿主域が広い<sup>2)</sup>、さらに感染制御を困難にしている。したがって、BVDV感染症の制御においては、まずは高感受性宿主である牛に対する感染を徹底的に予防することがなによりも重要である。

BVDVとCSFVは類似したウイルス学的特徴が多く、その1つとして宿主に対する免疫誘導能が異なる準種を包含している点がある。感染宿主の自然免疫応答を抑制するEND<sup>+</sup>と、それを誘導するEND<sup>-</sup>という2つの準種を包含しており<sup>3,4)</sup>、CSFVの弱毒生ワクチンGPE<sup>-</sup>株は、このEND<sup>-</sup>を種ウイルスとして製造されたものである<sup>5)</sup>。CSFVと同様にEND<sup>-</sup>を準種として包含するBVDVにおいても、このEND<sup>-</sup>を応用することで、既存のものより効果的に宿主の免疫を誘導し、感染を防御できる生ワクチン株を作出できるのではないかと考えた。そこで、本研究では、BVDVのEND<sup>-</sup>を弱毒生ワクチン株として応用できるかを明らかにするために、①病原性を減弱させるための異種動物細胞への馴化、②その馴化ウイルスの免疫学的性状の解明、この2点を目的として研究を行った。

BVDVのワクチンは存在しているが、準種であるEND<sup>-</sup>をもとに製造されたワクチンは国内外を問わず存在していない。BVDV/END<sup>-</sup>がより効果的に免疫を誘導し、感染を確実に防御できる生ワクチン株として利用できれば、今後のBVDVの防疫対策に大きく貢献できるだけでなく、感染が散発している国内の現状を変えることができると考えている。

## 2. 方 法

### 2.1 ウサギ腎由来初代培養細胞 (RKp細胞) と人工的に不死化したiRKp細胞の作出

ペースト状になるまでハサミで処理したウサギの腎臓を、0.25%トリプシン溶液に加えて温めながら約1時間攪拌した。得られた上清に培養液(イーグル最小必須培地, 10%牛血清, 抗生物質含有)を加えてよくピペティングし、細胞培養用フラスコに分注した。培養後にシートした細胞をRKp細胞とし、適宜継代しながら実験に使用した。4回継代したRKp細胞にSV40のlarge T抗原遺伝子を導入し、G418(200 µg/ml)入りの培養液で培養することで、不死化RKp細胞 (immortalized RKp細胞 ; iRKp細胞) も作出した。

### 2.2 ウイルスの継代

ウイルスはウサギ腎由来株化細胞から単離されたBVDV/END<sup>-</sup>であるRb/END<sup>-</sup>を使用した<sup>6)</sup>。RKp細胞に感染多重度が1.0になるようにRb/END<sup>-</sup>を接種し、4~5日間培養した。培養後に得られた感染細胞の上清(P. 1)を接種材料とし、前日に分散してシートしたRKp細胞に接種した。この上清継代をP. 25の上清試料が得られるまで繰り返した。

### 2.3 ウイルスの増殖動態および宿主指向性の解析

継代で得られた上清に感染性粒子が含まれるかウイルスタイトレーションで確認した。タイト

レーションには牛腎由来株化MDBKとiRKp細胞を使用し、宿主指向性の変化も調べた。10倍階段希釈した上清を両細胞に同時接種し、5日間培養した。全BVDV力価を測定する場合には、培養後の細胞を免疫染色法 (Peroxidase-Linked Assay; PLA) に供し、ウイルス力価 (Tissue Culture Infectious Dose; TCID<sub>50</sub>) を算出した<sup>7)</sup>。END<sup>-</sup>ウイルスの力価を測定する場合には、水性口炎ウイルス (VSV) の重感染を阻止する性状を利用した方法 (VSV干渉法) を用いた。

2.4 RKp細胞馴化ウイルス (adapted Rb/END<sup>-</sup>; aRb/END<sup>-</sup>) の免疫学的性状の解析  
馴化ウイルス aRb/END<sup>-</sup> と親ウイルス Rb/END<sup>-</sup> および END<sup>+</sup> を同条件でMDBK細胞に接種し、感染細胞内の自然免疫関連遺伝子 (*bovine ISG15*; *bISG15* および *bMx1*) の継時的な発現をリアルタイムPCRで調べた。得られたCt値をもとに  $\Delta\Delta Ct$  法で両mRNAの発現量を算出した。

#### 2.5 逆ブラック形成アッセイ<sup>8)</sup>

100倍または1000倍に希釈したaRb/END<sup>-</sup> (P. 25) を、6 wellプレートにシートした牛精巢由来

初代BT細胞に1 ml/wellで接種した。1時間ウイルスを吸着させた後、3%メチルセルロースを重層して5日間培養した。培養後にメチルセルロースを除き、VSVを重感染させた。VSVを1時間吸着させた後、2%メチルセルロースを重層し、さらに2日間培養した。培養後、メタノールで細胞を固定し、クリスタルバイオレット溶液で形成された逆ブラックを染色した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 RKpおよびiRKp細胞の作出とその性状解析

RKpとiRKp細胞の作出に成功した (Fig. 1A)。本研究対象であるBVDVは培養細胞や牛血清に迷入する代表因子であるため、実験に供する前にその迷入を確認した。RKp細胞 (P. 0) から全RNAを抽出し、RT-PCR法を用いてBVDV遺伝子 (5'非翻訳領域) の増幅の有無を調べたところ、RKp細胞にBVDV遺伝子が迷入していないことが分かった (Fig. 1B)。両細胞の性状をより明確にするために、iRKp細胞ゲノムへのlarge T抗原遺

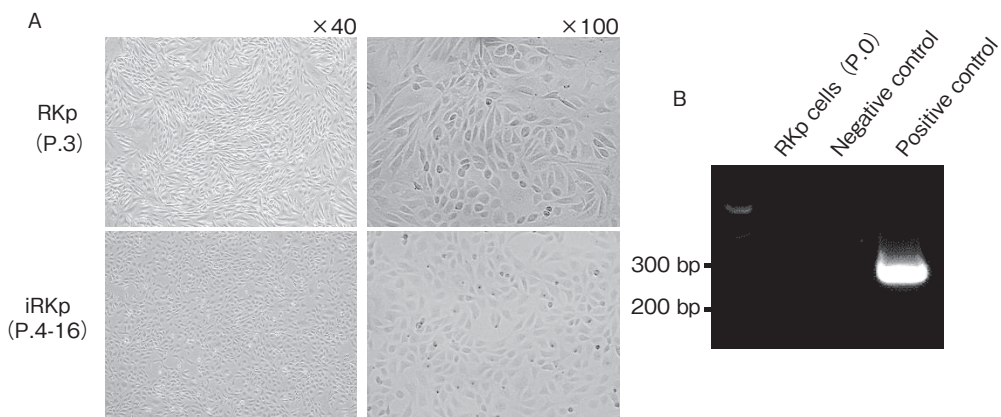


Fig. 1 Establishment of RKp and iRKp cells.

(A) Primary cultured cells derived from rabbit kidney (RKp cells) were established in this study. Artificially immortalized RKp (iRKp) cells were also established by introducing a large T antigen of SV40. (B) BVDV gene (5'untranslated region, 290 bp) was not detected in the RKp cells. The RKp cells are BVDV antigen-free cultured cells.

伝子の挿入の有無も確認した。RKp (P.6) およびiRKp (P.4-15) 細胞からゲノムDNAを抽出し、PCR法でlarge T抗原遺伝子の検出を試みた。その結果、iRKp細胞にのみ目的遺伝子の挿入があることが確認できた(データ未掲載)。また、両細胞の構成細胞種を明らかにするため、上皮系細胞のマーカであるサイトケラチンと間葉系細胞のマーカであるビメンチン抗体を用いて蛍光抗体染色も実施した。いずれの細胞でもサイトケラチンの発現のみが認められ、両細胞が上皮系細胞集団で構成されていることも明らかになった(データ未掲載)。以上より、ウイルス継代に使用するウサギ由来初代培養細胞の作製と、ウイルスタイトレーション等に使用しやすい不死化細胞の作製に成功した。

### 3.2 ウイルスの増殖動態と宿主指向性の変化

RKp細胞を用いたウイルス継代を実施し、5継代ごとに上清を保存した。その上清をMDBKおよびiRKp細胞でタイトレーションし、ウイルス力価を算出した(Fig. 2)。その結果、MDBK細胞では全上清試料からウイルス力価を算出するこ

とができた。一方、iRKp細胞ではP. 1上清試料からウイルスを検出することができなかったが、P. 5以降は $10^{2.97-5.22}$ TCID<sub>50</sub>/mlの間で推移した。MDBK細胞で検出されたP. 1試料中のウイルスは、残存した接種ウイルスを検出している可能性が高いが、両細胞でP. 5以降も継続してウイルスが検出されたことから、Rb/END<sup>-</sup>をRKp細胞に馴化できている可能性が示された。BVDVの自然宿主(牛)ではないウサギ由来細胞に対する指向性を高めるためにRKp細胞で繰り返し継代を実施したが、ウイルス力価はMDBK細胞で測定した場合のほうが高く、ウサギ由来細胞に対する指向性を高められてはいるものの、自然宿主に対する指向性を減弱させることは困難であると考えられた。今後は、宿主に対する指向性と病原性の関連についても詳細な検討が必要であると考えられる。

また、タイトレーションで検出されたウイルスがEND<sup>-</sup>の性状を保持しているか確認するために、END<sup>-</sup>ウイルスが持つVSVの感染を阻止する能力(VSV干渉能)を指標としたタイトレ

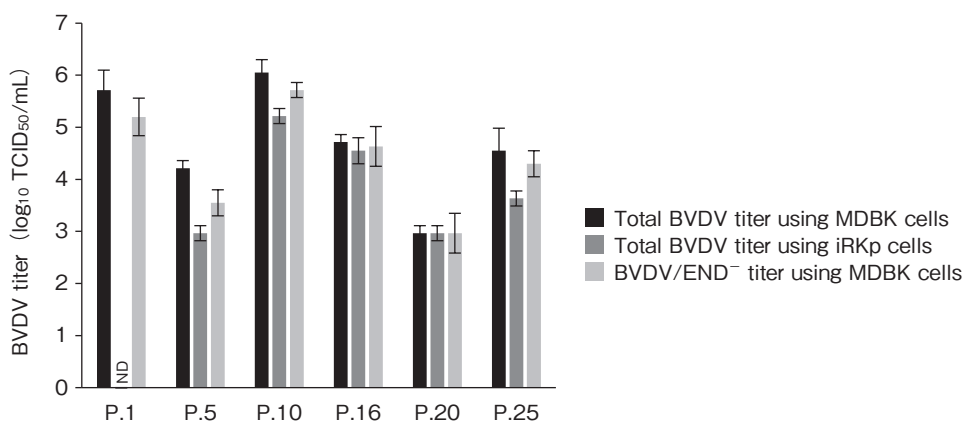


Fig. 2 Viral growth kinetics of Rb/END<sup>-</sup> in RKp cells.

Rb/END<sup>-</sup> was passaged using RKp cells, and the culture supernatants of infected cells were collected for viral titration. Viral titration by peroxidase-linked assay as performed using MDBK and iRKp cells, and the total BVDV titer was calculated. Viral titration by VSV-interference was also performed using MDBK cells, and the BVDV/END<sup>-</sup> titer was calculated. ND implies not detected.

ションも実施した。その結果、上清試料を接種した細胞でVSV干渉が観察され、それによって算出されたウイルス力価も免疫染色法の結果とほぼ一致した。以上から、Rb/END<sup>-</sup>をRKp細胞で維持・培養することに成功し、また、得られたウイルスはEND<sup>-</sup>の性状を保持していることも分かった。

### 3.3 馴化ウイルス (aRb/END<sup>-</sup>) の免疫学的性状の解析

ウイルス継代によって得られた上清を馴化ウイルスとし、adapted Rb/END<sup>-</sup> ; aRb/END<sup>-</sup> と名付けた。このウイルスの免疫学的性状を明らかにするために、培養細胞を用いて自然免疫誘導能を評価した (Fig. 3)。親ウイルス (Rb/END<sup>+</sup> および END<sup>-</sup>) と、aRb/END<sup>-</sup> P.10, 20, 25 を MDBK 細胞に接種し、継時的な *bISG15* (Fig. 3, 左) および *bMx1* (Fig. 3, 右) の発現を調べた。その結果、親ウイルス Rb/END<sup>+</sup> 感染細胞では両遺伝子の発現誘導は認められず、Rb/END<sup>-</sup> 感染細胞では感染 1 日目から強い発現誘導が認められた。aRb/END<sup>-</sup> 感染細胞では、感染後期 (3 日目以降) に両遺伝子の発現が誘導されることが分かった。親ウイルスとは自然免疫関連遺伝子の発

現を誘導するタイミングが異なるものの、aRb/END<sup>-</sup> は感染細胞の自然免疫応答を誘導できることが示された。今回は牛由来 MDBK 細胞を用いて評価を実施したが、ウサギ由来細胞に対する自然免疫誘導能も検討する必要がある。

### 3.4 END<sup>-</sup>ウイルス感染によって形成される逆ブラックの検出

END<sup>-</sup>ウイルスが持つVSV干渉能によって形成される逆ブラックがaRb/END<sup>-</sup>感染でも形成されるかどうか検討を行った。その結果、aRb/END<sup>-</sup>を感染させたBT細胞に複数の逆ブラックが形成され、aRb/END<sup>-</sup>がEND<sup>-</sup>の性状を保持していることが改めて確認できた (Fig. 4)。さらに、形成された逆ブラックの大きさがさまざまであることも分かった。この大きさの違いは、aRb/END<sup>-</sup>集団の中にも自然免疫誘導能 (VSV干渉能) が強いものと弱いものが混在している可能性を示唆している。サイズが大きい逆ブラックからaRb/END<sup>-</sup>を単離することで、より免疫誘導能の強い馴化ウイルスを獲得できる可能性がある。

## 4. 要 約

本申請課題を遂行することで、BVDV/END<sup>-</sup>

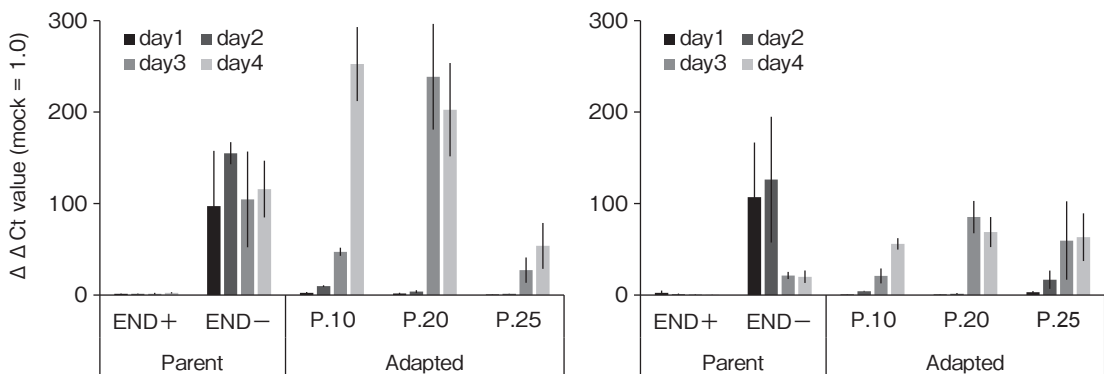


Fig. 3 Expressions of *bISG15* and *bMx1* were induced in MDBK cells by aRK/END<sup>-</sup> infection. MDBK cells were inoculated with aRK/END<sup>-</sup> (P.10, 20, and 25), and the infected cells were harvested at 1-4 days post infection. Total RNA was extracted from the collected cells and used for real-time PCR to detect *bISG15* (left graph) and *bMx1* (right graph).

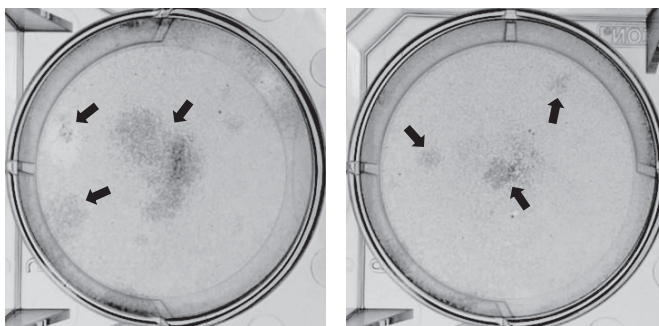


Fig. 4 Reverse plaques were formed in aRK/END<sup>-</sup>-infected cells.

BT cells were infected with aRK/END<sup>-</sup> of P.25 (100-fold dilution ; left, 1000-fold dilution ; right) and incubated for 5 days. The infected cells were superinfected with VSV and were then incubated for an additional 2 days. When the END<sup>-</sup> virus infects the cells, it can block the cytopathic effect of the superinfected VSV, so that the cells survive and are stained as reverse plaques.

(Rb/END<sup>-</sup>) をウサギ腎由来初代RK<sub>P</sub>細胞に馴化させることができた。また、馴化後も感染宿主の自然免疫応答を誘導するEND<sup>-</sup>の性状を保持していることが*in vitro*の実験系から明らかになった。以上より、より効果的に免疫を付与できる可能性を有したBVDVの弱毒生ワクチン候補株を得ることに成功した。

#### 文 献

- 1) Fourichon, C., Beaudeau, F., Bareille, N., Seegers, H. : *Prev Vet Med*, **72**, 177~181, 2005.
- 2) Moening, V. : *Vet Microbiol*, **23**, 35~54, 1990.
- 3) Shiokawa, M., Omatsu, T., Katayama, Y., Nishine, K., Fujimoto, Y., Uchiyama, S., Kameyama, K., Nagai, M., Mizutani, T., Sakoda, Y., Fukusho, A., Aoki, H. : *Virology*, **538**, 97~110, 2019.
- 4) Kozasa, T., Abe, Y., Mitsuhashi, K., Tamura, T., Aoki, H., Ishimaru, M., Nakamura, S., Okamatsu, M., Kida, H., Sakoda, Y. : *J Vet Med Sci*, **77**, 511~518, 2015.
- 5) Suzuki, S. : *Ann Rep Natl Assay Lab*, **38**, 1-10, 2001.
- 6) Muhsen, M., Aoki, H., Ikeda, H., Fukusho, A. : *Arch Virol*, **158**, 753~763, 2013.
- 7) Kärber, G. : *Arch Pharmacol*, **162**, 480~483, 1931.
- 8) Fukusho, A., Ogawa, N., Yamamoto, H., Sawada, M., Sazawa, H. : *Infect Immun*, **14**, 332~336, 1976.



## 筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の 検出法（Ⅱ）

Detection strategy of *Toxoplasma gondii* infected pig and estimation of  
cysts burden in muscles（Ⅱ）

高島 康弘<sup>1</sup>・谷口 裕二<sup>2</sup>・斎藤 大蔵<sup>2</sup>・Duong Duc Hieu<sup>3</sup>・吉田 彩子<sup>4</sup>

<sup>1</sup>岐阜大学応用生物科学部, <sup>2</sup>岐阜大学大学院連合獣医学研究科,

<sup>3</sup>宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科, <sup>4</sup>宮崎大学農学部

Yasuhiro Takashima<sup>1</sup>, Yuji Taniguchi<sup>2</sup>, Taizou Saitou<sup>2</sup>, Duong Duc Hieu<sup>3</sup> and Ayako Yoshida<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Applied Biological Sciences, The United Graduate School of Veterinary Sciences, Gifu University,

<sup>2</sup>Graduate School of Gifu University, <sup>3</sup>Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki,

<sup>4</sup>Faculty of Agriculture, University of Miyazaki

*Toxoplasma gondii* is a zoonotic protozoan that causes pneumonia in pigs and also infects humans via meat products. With the improvement of animal hygiene, the number of cases of swine toxoplasmosis in Japan has decreased drastically in recent years, and “swine toxoplasmosis as economic threat in the pig farming industry” has become to be considered as a thing of the past. However, human toxoplasmosis is still sporadic. In Japan as well, about 5% of pigs are asymptomatic but positive for antibodies, and it is considered that infection of humans via meat products even now. In addition, latently infected pigs do not form lesions at all and are not detected by meat inspection. Subsequently, 800,000 anti-*Toxoplasma* antibody-positive individuals, which account for 5% of the annual number of livestock (about 16 million), are on the market every year as meat. On the other hand, there are few data on the number and position of the parasites contained in the muscles of antibody-positive individuals. Recent study suggested that among experimentally infected pigs that showed antibody positivity, some individuals contained almost no cysts in their muscles. In other words, even for antibody-positive pigs, the risk as a source of infection to humans is not uniform among individuals. In the future, it is necessary to scrutinize not only the presence or absence of antibodies but also the relationship between the number of cysts in the tissue and the type and amount of antibodies produced. Therefore, in this study, we clarified what kind of anti-*T. gondii* antibodies are produced by pigs containing a small number of cysts, and established an experimental system that can easily detect latent cyst in tissues.

### 1. 目 的

トキソプラズマは豚に肺炎を起こすほか、食肉を介してヒトにも感染する人獣共通感染性原虫で

ある。家畜衛生状態の改善とともに、我が国における豚での発症例は近年激減し「養豚業を経済的に脅かす豚の病気」としては過去のものになった感がある。一方でヒトのトキソプラズマ症は今な



お散発的に発症している。わが国でも5%程度の豚が無症状ながら抗体陽性を示しており、食肉を介したヒトへの感染は引き続き起っているものと考えられる<sup>1)</sup>。また潜伏感染豚は病変を一切形成しないため食肉検査で摘発されることもない。すなわち、年間と畜数(約1600万頭)の5%にあたる80万頭の抗トキソプラズマ抗体陽性個体が食肉として毎年市場に出ている<sup>2)</sup>。

一方で抗体陽性個体の筋肉に含まれる虫体の数や位置についてはほとんどデータがない。2018年度の貴財団のご支援で実施した研究により、抗体陽性を示した実験感染豚の中に筋肉中にシストをほとんど含まない個体も存在することが示唆された。つまり、抗体陽性豚といえどもヒトへの感染源としてのリスクは個体ごとに一様ではないということである。今後は単に抗体の有無だけでなく、組織内のシスト数と生産される抗体の種類・量の関係について精査する必要がある。そこで本研究では、組織内に少数のシスト数が含まれる豚においてどのような抗トキソプラズマ抗体の清算が見られるか明らかにするとともに、組織内の潜伏虫体を容易に検出できる実験系を確立するため、近赤外光を発する組換えトキソプラズマ虫体を作成することを目的とする。

## 2. 方 法

### 2.1 実験動物

5-12か月齢のマイクロミニピッグ(富士マイクラ)6頭を用いた。

### 2.2 寄生虫

マウス、豚に対して高い病原性を示すTgCatJpOk 4株<sup>3)</sup>、世界中で研究に広く用いられる弱病原性のPLK株を本研究に用いた。これらの株は7.5% FCSを含むRPMI培地で培養したVero細胞に感染させた状態で継代維持した。

### 2.3 感染

3頭には $10^7$ 虫体のTgCatJpOk 4株タキゾイトを皮下接種した(第1群)。2頭には感染前日から実験終了時までピリメタミン4mg、スルファジメトキシシン36mgを1日1回経口投与したうえで同株タキゾイトを $10^3$ 虫体皮下接種した(第2群)。1頭は感染させないまま飼育した。これらの豚から継時的に採血し血清を得た。

### 2.4 バイオアッセイ

第2群の実験感染豚を感染35日後に安楽殺し、筋肉組織および脳組織を採取して細片したのちトリプシンで消化し0.5mlずつ計35匹のC57BLマウスに腹腔摂取した。接種後に死亡したマウスの脾臓からDNAを抽出しPCRにてB1遺伝子の一部を増幅し、トキソプラズマゲノムDNAを検出した。

### 2.5 抗体の検出

豚血清中に含まれる抗Gra6, Gra7, Gra8およびBag1 IgGをLIPS法にて検出した。検出の方法は既報論文の方法にしたがった<sup>4)</sup>。

### 2.6 組換え原虫の作成と観察

PLK株を親株として、既報の手法により近赤外蛍光タンパク遺伝子をSAG1プロモーター下流に挿入した組換え虫体を作成した。作成した虫体はタキゾイトとしてVero細胞に感染させ、CCDカメラで近赤外線発光の有無を確認した。

## 3. 結果と考察

薬剤投与なしで $10^7$ 虫体を接種した3頭の豚は感染後7-9日目から抗体の産生が確認された。これらの豚は感染7日目ごろから元気消失、頻呼吸などの急性症状を呈し1頭は感染12日目に死亡した。抗Gra6抗体の産生はこれら3頭すべてで確認されたが、抗Gra7抗体は1頭のみで感染11日目から検出されたのみであった。抗Gra8抗体は感染18日目までは確認されなかった。以上の結果から豚において感染後早期に検出できるのは抗

Gra 6 抗体であることが示唆された。類似の条件で実験感染させた豚の血清を虫体粗抗原を用いたウエスタンブロッティング法に供すると、感染後 7-11 日目以降の血清で反応が見られることが報告されており<sup>4)</sup>、今回の実験結果と一致する。以上のことから感染豚の早期検出のためには抗 Gra 6 抗体の検出が有用であることが示唆された。なおこれら 3 頭の豚については途中で死亡した個体を除き感染後 18 日目まで観察したが、潜伏型虫体特異的抗原である Bag 1 に対する抗体は検出できなかった。感染後 18 日では十分な数のシストが組織内に形成されていない可能性がある (Table 1)。

次に抗原虫作用のあるピリメタミンとスルファジメトキシンを投与しながら  $10^3$  虫体を接種した 2 頭のマイクロミニピッグを 35 日間飼育し、感染当日と 35 日後に血清を得た。投与したピリメタミ

ンとスルファジメトキシンの濃度は、生産現場で使用される動物用抗原虫剤とほぼ同等である。これら 2 頭の豚は飼育期間中症状を示すことはなかった。しかし感染 35 日後に安楽殺して筋肉および脳組織を採材し、これをマウスに接種したところ一部のマウスが死亡した。また死亡したマウスのうち 1 頭の脾臓から DNA を抽出し、トキソプラズマ B 1 遺伝子領域をターゲットとする PCR を実施したところ陽性となり、マウスの死亡原因がトキソプラズマ感染によるものであることが確認された。一方これらの豚の筋肉および脳の組織切片からはトキソプラズマのシストが検出できなかった。以上のことから組織内のシスト数はかなり少ないものと思われる。これらの実験結果から、抗原虫剤投与下で少数の虫体に暴露された豚はまったく感染しないのではなく、少数のシスト

Table 1

	Infection dose	Antiprotozoal drug	Sampling date	Antibody Detection			
				anti-Gra6	anti-Gra7	anti-Gra8	anti-Bag1
Pig 1	$10^7$	Non-Administrated	Day 0	-	-	-	-
			Day 7	-	-	-	-
			Day 9	+	-	-	-
			Day11	+	+	-	-
			Day18	+	+	+	-
Pig 2			Day 0	-	-	-	-
			Day 7	+	-	-	-
			Day 9	+	-	-	-
			Day11	+	-	-	-
			Day18	+	-	-	-
Pig 3			Day 0	-	-	-	-
			Day 7	-	-	-	-
			Day 9	+	-	-	-
			Day11	+	-	-	-
			Day18	death			
Pig 4	$10^3$	Administrated	Day 0	-	-	-	-
			Day35	-	-	-	-
Pig 5			Day 0	-	-	-	-
			Day35	-	-	-	-

を組織内に有するようになると考えられる。組織内に存在するシスト数がきわめて少ないことから、このような豚に由来する肉製品からヒトが感染するかどうかは現時点で不明である。しかしバイオアッセイで一部のマウスに感染が成立したことから、決してそのリスクを無視することはできない。そこで、少数のシストを組織内に持つことが示されたこれらの豚の血清を調べたが抗トキソプラズマ抗体(抗Gra6, Gra7, Gra8およびBag1抗体)は検出できなかった(Table 1)。以上の結果から、抗原虫剤接種下では組織内に少数のシストを形成しながらも検出可能なレベルの抗体が血清中に見られない可能性が示唆された。畜産現場で抗原虫剤の飼料添加は禁止されておらず、このような豚がヒトへのトキソプラズマの感染源となるリスクについてさらなる精査が必要であるものと思われる。

以上の結果から、豚において抗体価と体内の潜伏虫体数の相関について精査するには、組織内に少数感染しているシストの定量的評価が不可欠であることが分かる。ところが通常の組織学的手法で豚の筋肉中のシストを検出することは効率が悪い。そこで近赤外線を発する組換え原虫を作成し、シストの存在を簡便に可視化できるシステムの構築を試みた。波長の長い蛍光は組織深部から散乱することなく表層まで届くため、可視光より波長の長い近赤外線は深い部分のイメージングに適している。このような組換え虫体が作成できれば、豚の筋肉断片をイメージングすることで深部に存在する少数のシストまで定量化できる可能性がある。本研究ではPLK株に近赤外線発光タンパクの遺伝子を組み込んだ

組換え虫体を作成し、得られた虫体が近赤外線を発することを確認した(Fig. 1)。今後このような組換え原虫を豚に接種すれば、体内のシスト数や分布状況と抗体価の関係について詳細に理解

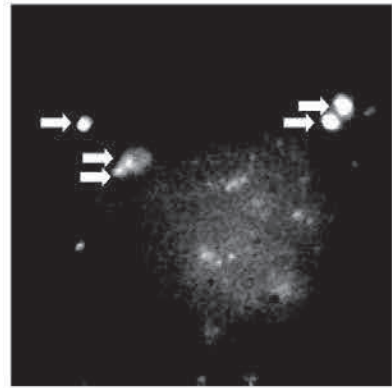


Fig. 1 Recombinant *T. gondii* that emits near infrared rays.

できる可能性がある。

#### 4. 要 約

トキソプラズマは豚に肺炎を起こすほか、食肉を介してヒトにも感染する人獣共通感染症病原体である。近年の家畜衛生環境の向上により豚のトキソプラズマ症の発生件数はわが国では激減しており、「養豚業を経済的に脅かす病」としてはすでに過去のものになりつつある。しかし、ヒトのトキソプラズマ症は現在も散発しており、国内の豚の約5% (約80万頭) は抗トキソプラズマ抗体陽性であると推測される。このため無症状で感染した豚がヒトへの感染源となっている可能性は否定できない。一方で、抗体陽性の豚がどの程度の数のシストをどの組織に有するののかについては知見が少ない。抗体陽性の豚であってもシスト保有数はきわめて少ないとする近年の知見もあり、抗体陽性豚のヒトへの感染源としてのリスクは未知の部分が多い。したがって、豚の抗トキソプラズマ陽性率だけを議論するのではなく、感染豚の個体ごとの抗体の産生状況とシスト数の相関を明らかにする必要がある。そこで本研究では、少数のシストが潜伏感染している豚において、どのような抗トキソプラズマ抗体が誘導されているのか

を調べた。また、組織中の少数のシストを効率的に検出する実験系の確立を試みた。

#### 文 献

- 1) Matuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., Nagamune, K. : *Parasitol. Int.*, **63**, 638~639, 2014.
- 2) 高島康弘 : *All about Swine*, **50**, 16~19, 2017.
- 3) Taniguchi, Y., Yanagihara, I., Nakura, Y., Ichikawa, C., Saito, T., Appiah-Kwarteng, C., Matsuzaki, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Kyan, H., Takasu, M., Kitoh, K., Takashima, Y. : *Parasitol. Int.*, **72**, 101935, 2019.
- 4) Aye, K. M., Nagayasu, E., Baba, M., Yoshida, A., Takashima, Y., Maruyama, H. : *J Immunol Methods*, **46**, 91~100, 2018.
- 5) Appiah-Kwarteng, C., Saito, T., Toda, N., Kitoh, K., Nishikawa, Y., Adenyo, C., Kayang, B., Owusu, E. O., Ohya, K., Inoue-Murayama, M., Kawahara, F., Nagamune, K., Takashima, Y. : *Parasitol Int.*, **69**, 114~120, 2019.

# 網羅的ジェノタイピングによる新規牛白血病抵抗性 遺伝子の同定

Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by  
comprehensive genotyping

目 堅 博 久

(宮崎大学テニュアトラック推進機構)

Hirohisa Mekata

(Organization for Promotion of Tenure Track, University of Miyazaki)

Bovine leukemia virus (BLV) is an etiological agent of fatal B-cell leukemia and malignant lymphoma in cattle which are called enzootic bovine leukosis (EBL). Approximately 35 % of cattle in Japan have been infected with BLV. BLV can cause lifelong infection, and no vaccines or therapeutic procedures are currently available to prevent BLV infection or the development of EBL. Therefore, novel control methods to reduce the incidence of EBL are required from livestock industries. Cattle with higher BLV proviral loads represent a higher risk of both horizontal and vertical transmission. Therefore, development of methods reducing the proviral load in cattle should be effective to protect BLV-free cattle. A genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with BLV proviral load was conducted in this study. The study examined 45 cattle with a low proviral load and 50 with a high proviral load. Single SNP (dpSNP ID : rs210304280) on chromosome 25 showed a colocation with proviral load. The result indicates the SNP might be associated with proviral load. Further study is required to identify the SNPs associated with proviral load. We believe that this study will promote the construction of effective measures to prevent BLV infection and control the spread of BLV.

## 1. 目 的

地方病性牛白血病（牛白血病）は、牛白血病ウイルス（bovine leukemia virus : BLV）の感染を原因とする牛の白血病および悪性リンパ腫である。BLV感染牛の約5%が、感染から数年後に牛白血病を発症して死亡もしくは全廃棄処分となる。BLVは生涯持続感染するうえ、感染や発症に対するワクチンや治療薬はない。そのため、BLV感染を防ぐことが農場でできる唯一の対処

法である。2009-11年に行われた全国規模の調査の結果、日本では約35%の牛がBLVに感染していた<sup>1)</sup>。発症届出数も20年間、増加の一途をたどっており、新しい対策法が求められている（Fig. 1）。

BLVは主に昆虫の吸血活動、血液や体液が付着した器具の使い回し、胎盤や初乳を介して伝播する。感染から半年ほど経過すると、血液中のプロウイルス量は安定するが、その量は個体ごとに大きく異なる（Fig. 2）。我々は12-22ヶ月に及ぶ農場での試験から、500copies/50 ng (of genomic

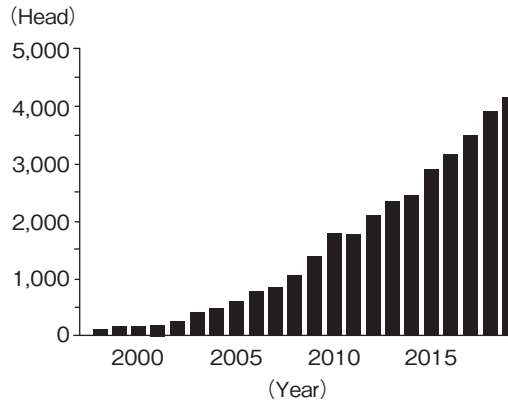


Fig. 1 Year change of the notification number of bovine leukosis in Japan

The figure was made by data from the occurrence of the monitored infectious diseases in MAFF ([https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi\\_densen/kansi\\_densen.html](https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html)).

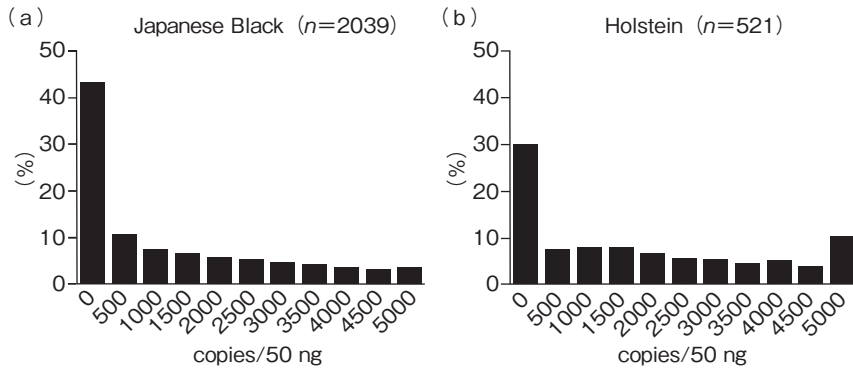


Fig. 2 Histogram of bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black and Holstein cattle.

BLV proviral load in a total of 2,560 BLV-infected cattle are depicted in frequency distributions. The median values were 572.0 and 1,679 copies/50 ng in Japanese Black and Holstein cattle, respectively.

DNA) 以下の感染牛が日本の飼養環境下において、ほぼ感染源とならないことを証明した<sup>2)</sup>。つまり、これまでのすべての感染牛を対象とした牛白血病対策ではなく、プロウイルス量が高い高リスク牛を対象を絞った効率的な牛白血病対策が可能である。感染率が高い農場では、経営を維持するためにも高リスク牛による繁殖が欠かせない。しかし、高リスク牛は約40%の確率でBLVを母子間伝播するため<sup>3)</sup>、新生子牛を新たな感染源としない、すなわち、新生子牛のプロウイルス量を

抑える方法が有効である。細胞表面に発現するMHC class II分子はウイルス由来の抗原ペプチドを免疫担当細胞へと提示し、獲得免疫反応の惹起につなげる。牛のMHC class II遺伝子の一種であるBoLA class II *DRB3\*0902* 遺伝子 (0902 遺伝子) をヘテロもしくはホモで持つ牛は、プロウイルス量が極端に低い<sup>4)</sup>。つまり、高リスクの母牛に0902遺伝子をヘテロで持つ種牛を交配することで、新生子牛を50%の確率で低リスク牛にすることができる。一方で、特定の遺伝子への偏りは、



遺伝的多様性の消失につながり、異なる感染症等に対して重篤な被害をもたらす可能性が否めない。そこで、0902遺伝子以外にもプロウイルス量を制御できる牛白血病抵抗性遺伝子の特定が望まれる。

これまでの調査で、0902遺伝子は6.8%の牛が保有していた<sup>5)</sup>。一方、感染牛の33%は非常にウイルス量が低い。つまり、0902遺伝子以外にも牛白血病抵抗性遺伝子が存在する可能性がある。そこで本研究では、プロウイルス量と宿主遺伝子一塩基多型 (SNPs) とのゲノムワイド関連解析から、新規牛白血病抵抗性遺伝子を同定することを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 検体

2018年4月から2019年8月までに採取したBLV感染牛(黒毛和種, 12ヶ月齢以上, 雌)の血液を使用した。指示書に従いELISA法(牛白血病エライザキット; JNC, 東京, 日本)により抗BLV抗体を検出した。抗BLV抗体陽性の検体については、Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ, マディソン, 米国) もしくはmagLEAD 12gc (プレジジョン・システム・サイエンス, 松戸, 日本) を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAは分光光度計(NanoDrop8000; サーマサイエンティフィック, ウォルサム, 米国) を用いてDNAの純度および濃度を測定した。抽出DNAを鋳型にして既報のプライマー/プローブ配列を用いてリアルタイムPCRを行い、プロウイルス量を定量した<sup>5)</sup>。本研究では、ELISA法とqPCR法とともに陽性の検体をBLV感染とし、以後の解析に用いた。

### 2.2 0902遺伝子を持つ牛の除外

既報のプライマー配列を用いてDRB3 Exon 2の遺伝子配列を増幅後、制限酵素BstYIで切断し、

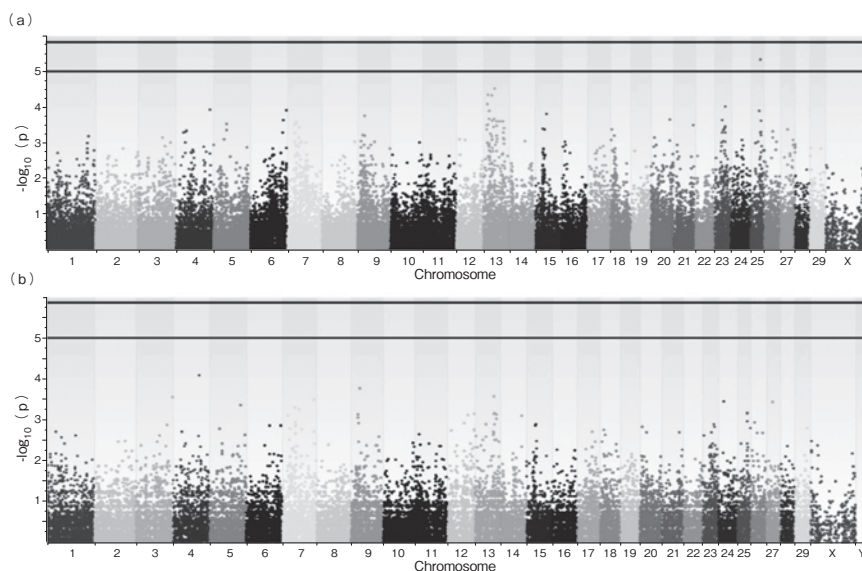
電気泳動をした<sup>6)</sup>。112, 87, 85bpの断片を確認したものは0902遺伝子を保有する可能性があるため、解析から除外した。

### 2.3 SNP Array解析

リアルタイムPCRの結果、3,000copies/50ngを超えた50検体を高ウイルス群、100copies/50ng以下の46検体を低ウイルス群とした。なお、遺伝的な偏りを防ぐため、1農場あたり最大2検体をSNP Arrayに供した。SNP Array (Axiom Bovine Genotyping v3 Array; サーマサイエンティフィック社) はタカラバイオ社(草津, 日本) に受託解析した。データ解析はAxiom Analysis Suite (サーモサイエンティフィック社) およびSNP & Variation Suite (ゴールデンヘリックス社, ボーズマン, 米国) を用いた。サンプルデータのクオリティーチェックはCall rate > 0.95を、ジェノタイピングデータのクオリティーチェックはCall rate > 0.95, Minor allele frequency > 0.01, Hardy Weinberg平衡  $p > 0.001$  を条件とした。本研究では、ヘテロでプロウイルス量に寄与する遺伝子を探索することを目的としたため、優性および劣性モデルによるSNP関連解析を行った。統計解析はカイ2乗検定で行い、 $p < 5.0 \times 10^{-6}$  を有意差あり、 $p < 1.0 \times 10^{-5}$  を傾向ありとした。

## 3. 結果と考察

3検体で112, 87, 85bpのPCRバンドを確認した。そこで、これら3検体は0902遺伝子を保有する可能性が高いためにSNP Arrayには使用しなかった。SNP Arrayに供した96検体のうち、低ウイルス群1検体がサンプルのクオリティコントロールを満たさなかった。そのため、50検体の高ウイルス群と45検体の低ウイルス群を以後の解析に用いた。Axiom Bovine Genotyping v3 Arrayに配置された65,003個の常染色体上のSNPsのうち、40,308個がクオリティコントロールを満た



**Fig. 3** Manhattan plot of a genome-wide association study on bovine leukemia virus proviral load in 95 cattle.

Manhattan plot of dominant (a) and recessive model (b) are depicted. The number of chromosomes and the negative logarithm of the association  $p$  values are displayed along the x-axis and y-axis, respectively. The upper and lower line indicated the  $1.5 \times 10^{-6}$  and  $1.0 \times 10^{-5}$ , respectively.

した。そこで、これらのSNPについてプロウイルス量との相関解析を行った。

マンハッタンプロットに示すように、有意水準である  $p < 5.0 \times 10^{-6}$  を満たすSNPは認められなかった (Fig. 3)。そこで、 $p < 1.0 \times 10^{-5}$  を差がある傾向としたところ、1つのSNP (dbSNP ID: rs210304280) が存在した。rs210304280は25番染色体上31,453,057bpに位置する遺伝子間領域である。今後は、rs210304280とプロウイルス量との相関について検体数を増やしてさらに検討する必要がある。

本研究では、96検体のうち、クオリティコントロールを満たした計95検体をゲノムワイド関連解析に用いた。しかし、プロウイルス量との相関解析において有意な差を持つSNPを特定することができなかった。原因として、解析に用いたサンプル数が充分でなかったことがあげられる。今後は、さらに解析する検体数を増やすことで、新規

牛白血病抵抗性遺伝子の特定につなげることが期待される。

#### 4. 要 約

牛白血病ウイルス (BLV) の感染を原因とする牛白血病は、2008年以降、最も多い牛の監視伝染病である。日本では30-40%の牛がBLVに感染していることから、新たな対策法の開発が必要である。すべての感染牛がBLVの感染源となるのではなく、プロウイルス量が高い牛のみが感染源となる。そこで、プロウイルス量を遺伝学的手法で抑えるアプローチが有効である。牛のBoLA class IIの多型領域は、個体により大きく異なり、それがプロウイルス量の決定に寄与することが明らかとなっている。そこで、それ以外の宿主遺伝子にもプロウイルス量に寄与する遺伝子があるのかを、宿主遺伝子の一塩基多型 (SNP) とのゲノムワイド関連解析から明らかにすることを目的と

した。本研究では、50検体の高ウイルス群と45検体の低ウイルス群をSNP Array解析に用いた。その結果、25番染色体上の1つのSNP (dpSNP ID: rs210304280) にのみ差がある傾向が認められた。rs210304280は25番染色体上31,453,057bpに位置する遺伝子間領域であり、その機能等は不明である。本研究の結果、BLVプロウイルス量に関与する可能性があるSNPを1つ同定することができた。しかし、解析に供した検体数が充分とはいえず、そのことが解析結果に影響したと考えられる。今後はさらに検体数を増やして解析を継続

する必要がある。

#### 文 献

- 1) Murakami, K., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123~1126, 2013.
- 2) Mekata, H., *et al.* : *Jpn. J. Vet. Res.*, **66**, 157~163, 2018.
- 3) Mekata, H., *et al.* : *Vet. Rec.*, **176**, 254, 2015.
- 4) Hayashi, T., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 1552~1555, 2017.
- 5) Takeshima, S.-N., *et al.* : *Arch. Virol.*, **160**, 1325~1332, 2015.
- 6) van Eijk, M. J., *et al.* : *Anim. Genet.*, **23**, 483~496, 1992.

## 豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明（Ⅱ）

Mechanism of progression of sever porcine circovirus associated diseases  
by porcine intestine cell model（Ⅱ）

岡 林 環 樹  
（宮崎大学農学部獣医学科）

Tamaki Okabayashi

(Department of Veterinary Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Post-weaning multi-systemic wasting syndrome (PMWS) has emerged as a major disease that poses a significant threat to the economics of global swine industry. Porcine circovirus type 2 (PCV2) is the causal agent of PMWS in pigs. Furthermore, not only PMWS, some pig diseases (eg ; PDNS, PRDC) are reported with the relation of PCV2 infection and termed it, PCVD (Porcine circovirus diseases). To clarify the pathogenicity of PCV2, it is necessary to establish PCV2 culture system *in vitro*. The PK-15 cells, which is widely used for PCV2 propagation, is not efficient due to contamination with PCV1. To clarify the pathogenicity of PCV2 in vitro, we performed two research as follows : 1. The screening with limited dilution of PK-15 to select the clone that is available to culture PCV2, and 2. The Searching new supplements to promote PCV2 propagation in PK-15.

Our screening with limited dilution showed that clone PK-15-C1 and C2 cell lines were the susceptible to PCV2 infection. The highly viral propagations were confirmed in the clone PK-15-C1 and C2 cell lines. To validate the ability of serum derived from some animals for PCV2 propagation in cell lines, PCV2 in PK-15 cell lines were maintained for 5 days post infection with 5 species animal serum (5% final concentration). After 5 days treatment with sera, viral copy number in cultured supernatant were measured with quantitative PCR. The PCV2 copy number in PK-15-C1 and C2 those were treated one serum derived from animal A were significantly higher than those of were treated derived from animals B, C, and D.

Establishment of the effective culture system for PCV2 in pig cells will useful for resolve the virus propagation and immune reposes in pig. These culture systems will contribute the clarify the pathogenesis of Pig diseases in near future.

### 1. 目 的

肉豚の死亡事故，特に離乳以降肥育初期時に多く淘汰されていく子豚の原因としては，豚の離乳後多臓器性発育不良症候（Postweaning

Multisystemic Wasting Syndrome ; PMWS）と豚繁殖・呼吸障害症候群（Porcine reproduction and respiratory syndrome ; PRRS）による疾患が原因と考えられている<sup>1-5)</sup>。両疾患ともに豚産業界においては新しく認識された感染症であり，

まだその防疫対策は確立されておらず、莫大な経済的被害を及ぼしている。

PMWSの原因が豚サーコウイルス2型ウイルスPCV2であることが明らかになって以降、欧米では90%以上の農場にPCV2の検出が確認された。その後、PCV2がPMWSだけでなく、豚皮膚炎症腎臓症候群、増殖性壊死性肺炎、またダンス病との関連性との関連性が指摘されるようになってきた。これにより、PCV2の感染を原因とするこれらの疾病は豚サーコウイルス関連疾病(Porcine circovirus associated diseases; PCVAD)として取り扱われるようになった。このように潜在的なPCV2の感染は、PRRSやマイコプラズマ症など経済的被害の大きい疾患に関連しており、養豚界においては無視できない状況である。しかしながら、上述のように欧米では90%、日本においても100%近い農場からPCV2が検出され、また、その培養が困難であることから、確実に病原性を明らかにされていない。

平成30年度の本研究助成課題において、申請者は豚の腸管より腸管上皮細胞Porcine intestinal epithelial cell (PIE細胞)を用いて豚サーコウイルス2型(PCV2)の分離に成功した。これによりPCV2の新しい分離方法としてPIE細胞の有用性を見出すことができた。またPCV2が感染した豚腸管上皮細胞に豚流行性下痢ウイルス(PEDV)が重複感染すると、PEDVの増殖性が亢進され、細胞障害性が強く誘導されることを明らかにした。本研究で確立したPIE細胞を用いたPCV2感染モデルが、病原性が明瞭でないPCV2とPEDVやその他の病原体との相互関係により重症化を示唆するような細胞障害、炎症反応を起こすのかを調べるための有用なツールになると考えられた。

しかしながら、PCV2における直接的な病原性解明には至っていない。PCV2の病原性が解

明されない理由の一つとして、PCV2細胞培養系確立の難しさが指摘されている。一般的には豚腎臓上皮細胞列であるPK-15を用いた分離・培養が行われている。しかしながら、American Type Culture Collection (ATCC)で購入できるPK-15にはPCV1やPCV1抗原の検出がなされており、PCV2の培養のためには、購入したPK-15からPCV2培養に適した細胞株の単一化(クローニング)が必要とされる。また、継代を繰り返すことによるPCV2の複製レベルの低下などが問題となる。

そこで今年度の申請課題としては、PCV2が潜在的に感染した状況において、他病原体との相互関係がどのように重症化を誘導しているのかを明らかにするために、十分なウイルス量を獲得するための安定したPCV2培養を行う方法の確立を目指した。

## 2. 方法

一般的にPCV2培養に用いられるPK-15細胞(JCRB9040)をJCRB細胞バンクより購入した。本細胞株はATCC株を起源としており、すでにPCV1の混入があることが明示されていた。培養液にはペニシリン・ストレプトマイシン溶液(シグマ アルドリッチ社、アメリカ)1%添加イーグル最小必須培地(シグマ アルドリッチ社)にトリプトースリン酸ブロス(シグマ アルドリッチ社)を終濃度0.3%、ウシ胎児血清(バイオウエスト社、フランス)を終濃度10%になるよう加え使用した。これらの細胞を、96穴プレートを用いた限界希釈培養を行い、単一細胞クローンの選出を行った。それぞれのクローン由来細胞にPCV2を感染させ、PCV2感染感受性のある細胞を選出した。選出した細胞を十分に増殖させ、これらの細胞からDNAを抽出した。PCV1およびPCV2特異的定量PCRを行い、PCVが感



染していないPK-15細胞であることを確認した。

ウイルスは、平成30年度に本助成を受けて分離したPCV 2を使用した。豚腸管より樹立した腸管上皮細胞Porcine intestinal epithelial cells (PIE細胞)に、PCV 2感染豚血清をPIE細胞に接種し、接種された細胞を1/3継代—7日間培養にて3代繰り返すことで分離に成功したPCV 2を試験に供与した。ウイルス増殖性、細胞障害性、免疫誘導性への影響を比較した。ウイルス増殖性を定量PCR法により解析した。

また、安定したPCV 2の増殖・培養を行うために、各種動物血清を添加剤として加えて比較検討を行った。各種動物血清(豚, 馬, 羊, ウサギ)を購入し、直径穴0.2mmフィルターにて濾過を行い、25-40kGyのガンマ線照射処理を行いPK-15細胞におけるPCV 2培養時に添加し、ウイルス増殖性への影響を比較検討した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 PCV 2感染感受性細胞の樹立

購入したPK-15細胞を増殖させ、限界希釈を行ったPK-15細胞におけるPCV感染性を確認した。親細胞の15%がPCV 2感染性を示した。PCV 2感染性を示した細胞ストックから新たに細胞培養を開始させて、PCV 2感受性PK-15細胞株を樹立した。特にその中でもPCV 2感受性の

高かった2株を選出した。これらの細胞株は定量PCRによりPCV感染のないことを確認した。Fig. 1に、選出されたPK-15細胞株クローン1 (PK-15-C1)、クローン2 (PK-15-C2)におけるPCV 2増殖曲線を、培養上清中DNAを定量PCRにより測定して示した。これらの結果より、親株同様にPCV感染を受けているPK-15ではPCV 2の増殖が抑えられることが明らかとなった。また、PCV 2感染感受性PK-15細胞のクローニングに成功し、PCV 2の安定した培養系の確立に成功した。

#### 3.2 動物血清によるPCV 2増殖性への影響

濾過およびガンマ滅菌した動物血清におけるPCV 2増殖性への影響を検討した。使用した血清からDNA抽出し、PCV1/2特異定量PCRによりPCV1/2の感染がないことを確認した。続いてそれぞれの動物血清(A-D)を、最終濃度5%として培養液に混和させて、PCV 2感染PK-15細胞を培養した。コントロールとしては、「材料と方法」に記載した10%FBSイーグル最小必須培地を用いた。動物血清の添加は、10%FBSイーグル最小必須培地に5%最終濃度として添加している。PCV2の感染量は添加培養5日後に、培養上清からDNAを抽出し、定量PCRにより測定して示した(Fig. 2)。これらの結果より、PK-15-C1株およびPK-15-C2株において、血清Aを5%添加した状態において、PCV 2の増殖性が充進す

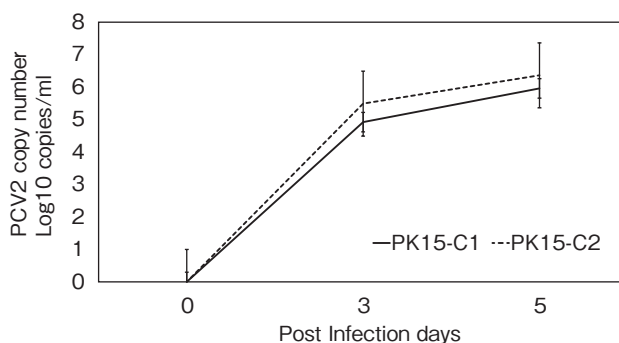


Fig. 1 PCV2 virus yields produced in cloned PK-15 cells



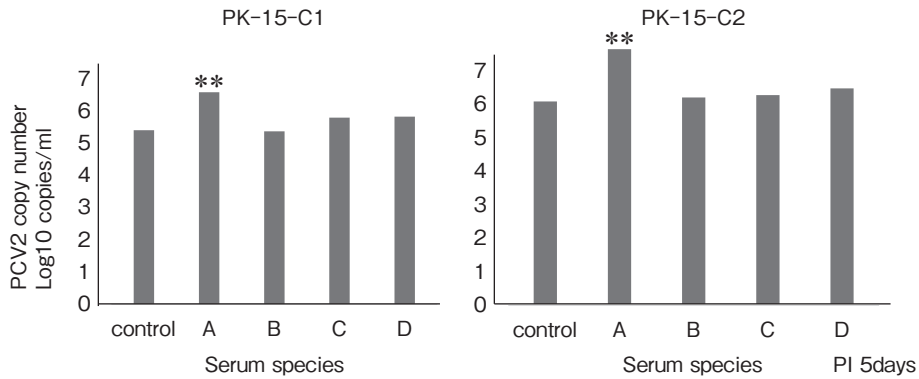


Fig. 2 Difference of PCV2 propagation in PK-15 depend on serum species

ることが明らかとなった。これらの現象は、血清 B, C, D では観察できなかったことから、動物種 A の血清中にはなんらかの PCV 2 増殖に関連する特異的な因子が含まれていることが確認できた。

#### 4. 要 約

豚腎臓細胞である PK-15 を限界希釈法を用いたクローニングにより、PCV 2 感染感受性クローンの選択に成功し、PCV 2 の安定した培養を可能とした。

また、動物種 A の血清を、豚細胞に添加することによって、PCV 2 の増殖が亢進されることが明らかとなった。この動物種 A の血清を添加した PCV 2 の豚細胞における増殖亢進効果は、PCV 2 のみならず豚感染症由来病原体の増殖性を活性化することが期待できる。また、豚生体内における病原性を反映するモデルとしての有用性が考えられる。PCV 2 をはじめとする今まで培養の難しかった豚疾病関連ウイルスの豚細胞における培養系が確立できたことは、今後、これらの実験系が

豚疾病関連ウイルスの細胞感染時におけるウイルス増殖性、免疫誘導性、病態形成を明らかにするのに有用であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Zimmerman, J., Benfield, D. A., Murtaugh, M. P., Osorio, F., Stevenson, G. W., Torremorell, M. : Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Viruses (Porcine Arterivirus). In : Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire S, Taylor DJ (eds), Diseases of Swine, 9th edn. Blackwell Publishing, Iowa, USA, pp 387-417, 2006.
- 2) Cho, J. G., Dee, S. A. : Porcine reproductive and respiratory syndrome virus, *Theriogenology*, **66**, 655-662, 2006.
- 3) Segalés, J., Allan, G. M., Domingo, M. : Porcine circovirus diseases, *Anim Health Res Rev*, **6**, 119-142, 2005.
- 4) Opriessnig, T., Meng, X.J., Halbur, P.G. : Porcine circovirus type 2 associated disease : update on current terminology, clinical manifestations, pathogenesis, diagnosis, and intervention strategies, *J Vet Diagn Invest*, **19**, 591-615, 2007.
- 5) Nodelijk, G., Nielen, M., De Jong, M. C., Verheijden, J. H. : A review of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Dutch breeding herds : population dynamics and clinical relevance, *Prev Vet Med*, **60**, 37-52, 2003.

## 反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索（Ⅱ）

Investigation of the physiological markers indicating 'nausea' in domestic ruminants (Ⅱ)

青山 真人<sup>1</sup>・燕山 由己人<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>宇都宮大学農学部生物資源科学科, <sup>2</sup>宇都宮大学農学部応用生命化学科)

Masato Aoyama<sup>1</sup> and Yukihito Kabuyama<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Agrobiolgy and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University,

<sup>2</sup>Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

**Introduction :** Farm ruminants, such as cattle, sheep and goats, don't possess the emetic reflex, thus there have been no reports investigating the nausea in them. The aim of this study is to find the physiological marker (s) for nausea in goats. In this research, we investigated the effects of administration of cisplatin (CisP), a common emetic agent, on the behavior and blood concentrations of some hormones in goats.

**Methods :** Six adult Shiba goats received intravenous administration of CisP (1.0 mg/0.5 ml saline per kg body weight) or the same volume of saline as the control. The behavior of animals was observed for four hours. The blood samples were collected for the assays of plasma levels of cortisol (Cor), arginine vasopressin (AVP) and cholecystokinin (CCK).

**Results :** At the first 60 - 120 min, CisP administration did little affect behavior in goats, and they started to feed when the new hay was presented at the 60 min after the administration. However, after a while, CisP administrated goats became sick : they stopped feeding within 135 min (average of six goats) and lay down, meanwhile the control goats still continued to feed at the same period. At the 60 min after the administration, plasma Cor levels in CisP administrated goats was slightly higher than those in controls but did not differ those before the administration. At 120 min after the administration, the plasma Cor levels in CisP administrated goats were significantly higher than those in controls or pre-administration, and it became higher at 180 and 240 min after the administration. CisP did not influenced plasma AVP nor CCK levels.

**Conclusion :** CisP induced the remarkable behavioral changes in goats, and these behavioral responses seemed to be induced by the severe stress because the plasma Cor levels were increased. These results indicate that CisP might induce nausea or some similar aversion in goats.

### 1. 目 的

「悪心」（吐き気、気分が悪いこと）は、「痛み」

や「暑さ・寒さ」と同じく代表的な不快感の一つである。人を含めたいくつかの動物種において、悪心によって起こる最も明確な反応は「嘔吐」で

ある。一方、齧歯目、兎、馬など、嘔吐反射を持たず、嘔吐をしない動物種も少なくない<sup>1)</sup>。しかし、齧歯目であるラットやマウスにおいては、嘔吐はしないが悪心は感じると考えられている。これらの動物においては、「異食症」(カオリンという瀬戸物の原料を摂食する異常行動)が嘔吐に代わる悪心の行動学的指標となると考えられている<sup>2,3)</sup>。一方、悪心経験時に特異的に起こる生理学的反応、特に血液中に現れる成分については、いまだ明確な知見が得られていない。

牛や羊、山羊などの反芻動物も嘔吐をしない。そのため、反芻動物における悪心の研究はこれまで皆無に近い。一方、著者は山羊を反芻家畜のモデルとして家畜の輸送ストレスのメカニズムやその軽減法を研究してきた<sup>4,5)</sup>過程から、山羊は嘔吐をしないが、輸送中の様子から乗り物酔いをしている、つまり、悪心を感じているのではないかと考えてきた。家畜が悪心を経験する可能性のある要因は、輸送以外にも、感染症やカビ毒など多く存在する。そのため、反芻家畜が悪心を経験する可能性は確かめておく必要がある。本研究の目的は、反芻動物において悪心の生理学的指標を見つけ出すことである。今年度(令和元年度)は、催吐剤であるシスプラチン(CisP)投与の影響を検討した。CisPは抗癌剤であるが、副作用として強い悪心・嘔吐を引き起こすことが分かっており、その生理学的メカニズムについても研究が進んでいる<sup>6)</sup>。それゆえ、犬やフェレット、ジャコウネズミ(食虫目に属する)など嘔吐する動物を用い、悪心の研究材料として頻繁に使用されている<sup>7~9)</sup>。

## 2. 方 法

### 2.1 実験動物

実験にはシバ山羊(*Capra hircus*) 6頭(オス2頭、メス4頭、2~4歳)を使用した。実験は、

宇都宮大学動物実験委員会の承認(承認No. A18-0008)を得て、同大学動物実験等管理規程に従って行った。餌と水は不断給餌とし、毎日10:00に新しいものに交換した。

### 2.2 シスプラチンの投与

6頭の山羊について、同じ性のペア3組に分けた。9:00に、各ペアのうち一方にはCisP(Cis-ジアミン白金(II)二塩化物:シグマ・アルドリッチ社, P4394)を投与した。投与方法については、CisPを2.0mg/1.0mlとなるように生理食塩水に溶解し、これを山羊の体重1kgあたりCisPとして1.0mgとなる量を静脈内に注入した。もう一方の山羊には、対照として同じ量の生理食塩水を投与した。1~2週間の間隔を空け、各個体の処置を入れ替えて再び実験を行った。

### 2.3 行動観察

山羊の行動を、8:30(投与30分前)から13:00(投与4時間後)まで、ビデオカメラで撮影した。飼料の交換後に、伏臥位姿勢を取るまでの時間(投与からの時間)、伏臥位姿勢であった時間、伏臥位姿勢を取った回数、摂食を停止するまでの時間(投与からの時間)、摂食に費やしていた時間、反芻をしていた時間、について実験区間で比較した。血液採取のため、実験者が房に入った際には山羊の摂食は中断されたが、採血終了後2分以内に再開した場合は、摂食行動は継続していたものとみなした。観察時間中に一度も起こらなかった行動については、それが起こるまでの時間は便宜的に240分(投与から観察時間終了までの時間)とした。

### 2.4 血中成分の分析

8:30(投与30分前)、9:00(投与直前)、10:00(餌交換直前)、11:00、12:00、13:00の計6回、頸静脈より血液を採取した。採取した血液はすぐにヘパリンを込めた遠沈管に移し、その後遠心分離(4℃, 3,000rpm, 10分)で得た

血漿を各成分の測定まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保存した。ストレスの生理的マーカーとして一般に用いられている血中のコルチゾル (Cor), 悪心との関連が報告されているアルギニンバソプレッシン (AVP) およびコレシストキニン (CCK)<sup>1)</sup>の各濃度を測定した。ラットにおいて、悪心との関連が指摘されているオキシトシン<sup>10)</sup>の測定も試みたが、測定系に問題が生じ、正確な結果が得られなかった。血中のCor濃度については6頭すべての山羊で測定したが、AVPおよびCCKについては、3頭 (オス1頭, メス2頭) について検討した。

## 2.5 統計解析

生理食塩水を投与した対照区をSal区, CisPを投与した区をCisP区として、両実験区を比較した。行動については、Wilcoxonの符号化順位検定によって比較した。血中成分については、二元配置 (処置 $\times$ 時間) 反復測定分散分析によって比較した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 行動

投与から給餌 (飼料の交換) までの約60分間については、いずれの実験区においても伏臥位姿勢や反芻が観察できた (特にデータとしては示していない)。また、飼料を交換した直後 (投与から60分後) には、いずれの実験区においても山羊はすぐに摂食を開始した。

Sal区において、飼料交換後は、6頭中4頭は一度も伏臥位姿勢を取らなかった。一方、CisP区においては、6頭すべてが遅くとも投与から157分後に伏臥位姿勢を取った (Table 1, Fig. 1A, B)。伏臥位姿勢を取るまでの時間は、CisP区ではSal区と比較して有意に速かった ( $p < 0.05$ )。また、観察時間中に伏臥位姿勢を取っていた時間は、CisP区において有意に長かった ( $p < 0.05$ )。伏臥位姿勢を取った回数はCisP区のほうが有意

に多かった ( $p < 0.05$ )。

Sal区については、6頭中4頭は飼料交換から観察時間終了まで摂食を継続していた。摂食を中断した2頭についても、観察時間内に再び摂食を開始した、あるいは摂食をしていない時間帯には反芻を行っていた。一方、CisP区においては、すべての個体が98~157分後に摂食を停止した。飼料交換以降に摂食を停止するまでの時間は、CisP区のほうが有意に速く ( $p < 0.05$ )、摂食に費やしていた時間はCisP区のほうが有意に短かった ( $p < 0.05$ )。また、反芻は、Sal区においては6頭中2頭で観察できたが、CisP区においては6頭中いずれの個体においても観察されなかった。

CisP区において、伏臥位を取っている個体は、Fig. 1Cのように瞼を閉じ、顔を下に向けてじっとしている様子が確認できた。また、立位であっても、壁に顔を向けてしばらく動かないでいる様子が頻繁に観察できた (Fig. 1D)。Kenwardら<sup>11)</sup>は犬において、嘔吐以外の悪心に対する行動学的反応として「瞼を閉じる」「顔を下に向ける」「摂食行動の停止」等をあげている。今回、CisPを投与された山羊で観察された様子は、悪心を経験している犬の行動に類似していた。山羊を含む反芻家畜は、摂食後にはたいてい反芻を行うが、CisP区ではこれがまったく観察できなかったことから、CisP投与による伏臥位姿勢は、通常の休息行動ではないことは明らかである。

### 3.2 血中コルチゾル濃度

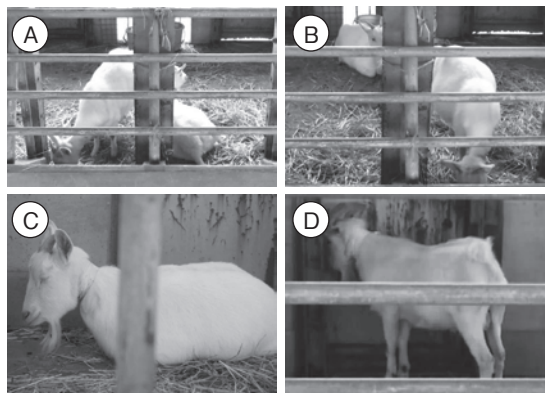
Sal区においては、血中Cor濃度は実験中変化しなかった (Fig. 2A)。一方、CisP区においては、投与60分後にわずかに増加し、同じ時間帯のSal区におけるそれよりも有意に高かった ( $p < 0.05$ ) が、CisP区内の比較においては、投与前との値の間に有意な差はなかった。投与120分後以降にはCisP区の血中Cor濃度は著しく増加した ( $p < 0.01 \sim 0.05$ )。投与180分後以降にはさらに血中Cor濃

**Table 1** The effects of cisplatin administration on lying and feeding behavior in goats

	Treatment	
	Saline (control)	Cisplatin
Latency to lying (min)	222.8 ± 11.3 (176–240)	142.5 ± 9.5* (98–157)
Total time spent in lying (min)	4.4 ± 4.3 (0–26)	51.5 ± 8.7* (24–80)
Frequency of lying	0.5 ± 0.3 (0–2)	6.2 ± 1.5* (3–13)
Latency to stop feeding (min)	220.8 ± 12.2 (176–240)	135.0 ± 11.0* (98–157)
Total time spent in feeding (min)	170.8 ± 8.2 (130–180)	115.2 ± 9.1* (90–144)
Total time spent in rumination (min)	5.0 ± 4.3 (0–26)	0.0 ± 0.0 (0–0)

Each data represents the average ± SE and (minimum value–maximum value) of six goats.

\* : Significant difference from the results in the saline administrated control test (\* :  $p < 0.05$ , Wilcoxon signed rank test).



**Fig. 1** The typical examples of the effects of cisplatin (CisP) administration on behaviors in goats. A : Left or right female goat was given saline (control) or CisP. About 150 min after the administration, the control goat (left) still continued to feed but the CisP administrated goat (right) had stopped feeding and lain down. B : On the next week, each goats in the picture A received the reversed treatment. C : A female goat received CisP. She lay down without ruminating, and facing downward with eyes closed. D : A male goat received CisP. He stood without feeding or ruminating, directed toward the wall.

度が増加し、120分後の値よりも有意に高くなった ( $p < 0.01$ )。著しい血中Cor濃度の増加が観察された時間帯は、上述の行動学的変化が観察された時間帯とほぼ一致していた。Corはストレスに対してその分泌量が多くなることから、血中Cor

濃度は最も一般定に用いられているストレスの指標である。悪心を引き起こす処置によって行動学的な変化とともにCorあるいは類似の糖質コルチコイドの血中濃度が増加することは、犬やラットでも報告されている<sup>11, 12)</sup>。悪心は強いストレスと

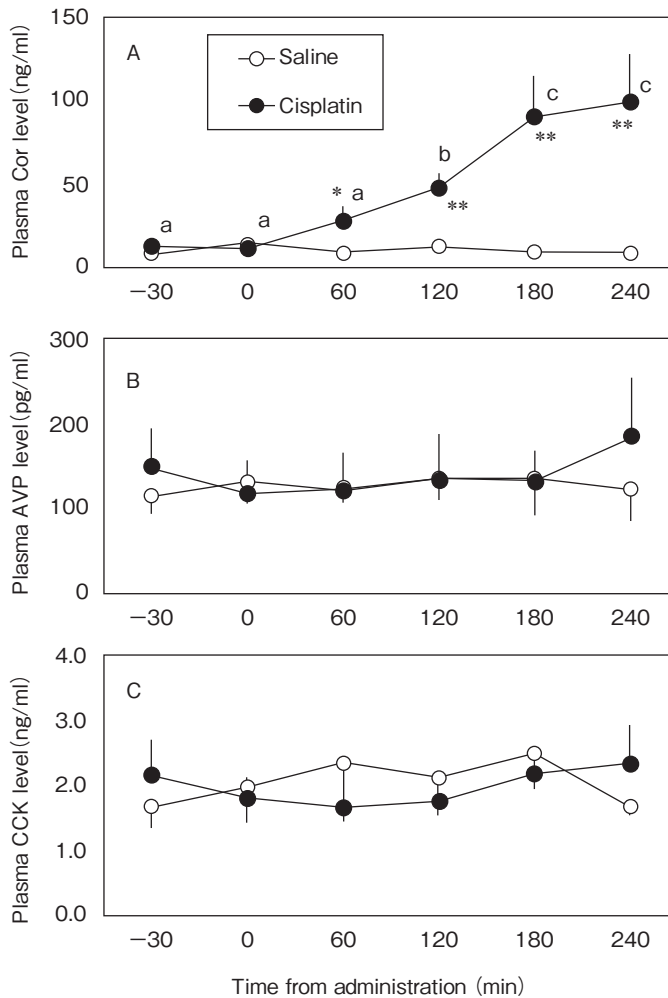


Fig. 2 The effects of cisplatin administration on blood levels of cortisol (Cor) (A), arginine vasopressin (AVP) (B) or cholecystikinin (CCK) (C). The same volume of saline was administrated as the control. Each data represents the average  $\pm$  SE of six (A) or three (B, C) goats.

\*: significantly differed from the results in the saline administrated control at the same period ( $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$ ). 'a, b, c' : Having no same letter represents the significant difference among each time period within cisplatin administrated test ( $p < 0.05$ ) (repeated measures two way ANOVA and Tukey's test).

なることは明らかであり、CisP投与によって山羊に起こる反応は、やはり悪心（少なくとも、それに類似した嫌悪感）であると考えられた。

### 3.3 血中アルギニンバソプレッシンおよびコレスリストキニン濃度

血中AVPおよびCCK濃度については、Sal区とCisP区の間には差は見られず、また、いずれの実験区間内においても、時間帯間に明確な違いは確認

できなかった (Fig. 2B, C)。AVPは嘔吐に伴って血中濃度が増加することが報告されており、悪心の生理学的指標となり得るという説も存在する<sup>1)</sup>。一方、嘔吐をしないラットにおいては、塩化リチウムや硫酸銅の投与（これらも悪心を引き起こす）によって、行動学的な変化が観察されたにもかかわらず血中AVP濃度は増加しなかった<sup>10)</sup>。ラットと同様、山羊においてもCisPによって起こ



る顕著な行動学的反応に、血中AVP濃度の変化は伴わなかった。AVPの主な働きは体内の水分と塩分の調節である。嘔吐は脱水症状を引き起こすことがあり、嘔吐する動物で悪心に伴って血中AVP濃度が増加するのは、嘔吐した結果起こる、あるいは、嘔吐によって起こるであろう脱水症状に備えた反応であって、嘔吐をしない動物には起こらない現象であるのかも知れない。CCKは通常時の摂食行動の調節の他に、悪心の発生にも関与していることが指摘されている<sup>1)</sup>。しかし、少なくとも山羊においては、CisP投与によって変化しなかった。

今回は測定に失敗してしまったが、今後、山羊におけるCisP投与による反応にオキシトシンが関与しているかどうかを確かめる必要がある。前述のようにラットにおいては悪心を引き起こす処置によってオキシトシンの血中濃度が増加することが報告されている<sup>10)</sup>。また、今回は紹介できるような結果はまだ得られていないが、昨年度に引き続き、二次元電気泳動による網羅的な解析の試みを継続している。

#### 4. 要 約

牛や山羊などの反芻動物は嘔吐反射を持たないが、「悪心」(気分が悪いこと)を経験する可能性が否定されているわけではない。本研究では、悪心を引き起こす副作用のある抗癌剤「シスプラチン」を山羊に投与し、その行動学的・生理学的反応を観察することによって、将来的に悪心を評価できる生理学的マーカーの探索を試みた。

シスプラチン投与によって山羊に起こった変化は、1) 伏臥位姿勢を取り、動きが制限される、2) 摂食の著しい抑制、3) ストレスマーカーとなる血中コルチゾル濃度の増加であった。しかし、これまで悪心のマーカーになる可能性が指摘されていたアルギニンバソプレッシン、あるいは

コレシストキニンの血中濃度は変化しなかった。

#### 文 献

- 1) Andrews, P. L. R., Horn, C. C. : Signals for nausea and emesis : implications for models of upper gastrointestinal diseases, *Auton Neurosci*, **125**, 100~115, 2006.
- 2) Takeda, N., Hasegawa, S., *et al.* : Pica in rats is analogous to emesis : an animal model in emesis research, *Pharmacol Biochem Behav*, **45**, 817~821, 1993.
- 3) De Jonghe, B. C., Lawler, M. P., *et al.* : Pica as an adaptive response : Kaolin consumption helps rats recover from chemotherapy-induced illness, *Physiol Behav*, **97**, 87~90, 2009.
- 4) Aoyama, M., Negishi, A., *et al.* : Short-term transportation in a small vehicle affects the physiological state and subsequent water consumption in goats, *Anim Sci J*, **79**, 526~533, 2008.
- 5) 佐怒賀琴美, 青山真人他 : トラック輸送の経験がヤギの輸送に対する反応に及ぼす影響, *Anim Behav Manage*, **52**, 123~133, 2016.
- 6) Hesketh, P. J. : Chemotherapy-induced nausea and vomiting, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2482~2494, 2008.
- 7) Kenward, H., Pelligand, L., Elliott, J. : Assessment of low-dose cisplatin as a model of nausea and emesis in beagle dogs, potential for repeated administration, *Exp. Brain Res*, **232**, 2685~2697, 2014.
- 8) Minami, M., Endo, T., Tamaki, H., Ogawa, T., Hamaue, N., Hirafuji, M., Monma, Y., Yoshioka, M., Hagihara, K. : Antiemetic effects of N-3389, a newly synthesized 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptor antagonist, in ferrets, *Eur. J. Pharmacol.*, **321**, 333~342, 1997.
- 9) Ito, C., Isobe, Y., Kijima, H., Kiuchi, Y., Ohtsuki, H., Kawamura, R., Tsuchida, K., Higuchi, S. : The antiemetic activity of GK-128 in *Suncus murinus*, *Eur. J. Pharmacol.*, **285**, 37~43, 1995.
- 10) Verbalis, J. G., McHale, C. M., *et al.* : Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats, *Behav Neurosci*, **100**, 466~475, 1986.
- 11) Kenward, H., Pelligand, L., Savary-Bataille, K., Elliott, J. : Nausea : Current knowledge of mechanisms, measurement and clinical impact, *The Vet. J.*, **203**, 36~43, 2015.
- 12) Tohei, A., Kojima, S., Ikeda, M., Hokao, R., Shinoda, M. : Effects of cyclophosphamide on the kaolin consumption (pica behavior) in five strains of adult male rats, *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 901~906, 2011.

## 鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと共存する細菌の網羅的な挙動解析 (Ⅲ)

Comprehensive analysis of the behavior of *Campylobacter* and coexistent bacteria in chicken food chain (Ⅲ)

黒木 香澄・仁田 義弘・関崎 勉

(東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター)

Kasumi Kuroki, Yoshihiro Nitta and Tsutomu Sekizaki

(Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo)

Campylobacteriosis is one of major bacterial food-borne diseases mainly caused by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. Colonization of *Campylobacter* in chicken intestines in broiler farms induces the bacterial contamination to chicken meat throughout the food chain from farm to fork. Our previous study showed that the bacterial composition of chicken meat was different at each store, regardless of the season, and suggested contamination of *Campylobacter* in processing factories or processing places in stores via equipment. In this study, we investigated the prevalence of *Campylobacter* on commercial meat including chicken, pork, and beef, and compared the bacterial population structure on commercial meat to examine the fact of cross-contamination in processing factories or stores. First, commercial meat was tested by nested PCR combined with an enrichment culture, and 10–50 % of chicken and pork were found to be *Campylobacter*-positive. *Campylobacter* was not detected from beef. Next, types and abundance of dominant bacterial genera of commercial meat were shown to be different among meat types by 16S rRNA gene-based metagenomic analysis. Diversity indices of mince were higher than cut meat. In addition, those of *Campylobacter*-positive meat were significantly higher than *Campylobacter*-negative meat. Finally, principal coordinate analysis based on unweighted UniFrac distances indicated that overall bacterial compositions were not different between *Campylobacter*-positive meat and -negative meat. These results suggested that *Campylobacter* contamination to commercial meat occurred via multiple sources with high degree of bacterial contamination. However, further study is needed to investigate the fact of cross-contamination of *Campylobacter*.

### 1. 目 的

カンピロバクターは細菌性食中毒の主要な原因菌であり、下痢や嘔吐などを引き起こす。さらに、本菌に感染した場合には致死的な症状を呈するギラン・バレー症候群を発症することもあり、食卓

の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は喫緊の課題である。本菌はヒトには前述の症状を呈する一方で、養鶏場で鶏の腸管に無症候的に定着することが明らかにされている<sup>1)</sup>。すべての養鶏場で鶏へのカンピロバクター汚染を防ぐことができれば、鶏肉が本菌に汚染されるリスクは激減すると

考えられるが、養鶏場での汚染防止策は完全には確立されていないため、現状では難しい。たとえば一つの養鶏場で本菌の汚染を防御できても、食鳥処理場には複数の養鶏場由来の鶏が集まるため、食鳥処理の過程で鶏肉へのカンピロバクター汚染を完全に防ぐことは難しい。平成29, 30年度の研究助成課題で、我々は市販鶏肉の70%以上が本菌に汚染されていたことを示した。さらに、鶏肉の購入時期に関係なく、店舗ごとに鶏肉の細菌叢が類似していたことから、店舗のバックヤードや加工場での加工作業が細菌叢に影響を与えたことが示唆された。つまり、加工器具などの加工環境が鶏肉に付着する細菌の種類に影響している可能性があり、加工時にもカンピロバクターの交差汚染は起きるのではないかと考えた。そこで、本研究では鶏肉以外の豚肉や牛肉などの市販肉についてカンピロバクター汚染状況と細菌叢を明らかにし、店舗や加工場でカンピロバクターの交差汚染が起きる可能性について調査した。

## 2. 方 法

### 2.1 試料の収集

関東の複数の店舗で市販の鶏肉（内臓肉，カット肉，挽き肉），豚肉（内臓肉，カット肉，挽き肉），牛肉（カット肉，挽き肉），牛豚合挽き肉を購入した。市販肉は各試料125 gを計り取り，滅菌ストッカー袋に試料と滅菌生理食塩水を入れ，30秒間手で揉んだ後，液体だけをチューブに移して12,000×gで5分間遠心し，得られた沈殿物を試料とした。

### 2.2 増菌培養

2.1で調整した試料中のカンピロバクターを増菌するため，各試料を液体培地に加えて培養した。具体的にはOxoid™ Bolton Broth Selective Supplement (Thermo Fisher Scientific)を加えたBolton broth (BB) (Thermo Fisher Scientific)

を用い42℃，微好気条件下で48時間培養した。なお，1試料につき，各液体培地が入った試験管を3本用意し，培養した。

### 2.3 増菌培養後の試料からのDNA抽出とnested PCR法によるカンピロバクター遺伝子の検出

培養後の液体培地をチューブに移して12,000×gで5分間遠心後，得られた沈殿物を滅菌生理食塩水で洗浄した。洗浄後の沈殿物から，PureLink™ Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いてメーカーの手順書にDNAを抽出した。

抽出したDNAを*Campylobacter jejuni*の*mapA*遺伝子および*C. coli*の*ceuE*遺伝子特異的なnested PCRに供試し，カンピロバクターDNAを検出した<sup>2)</sup>。PCR増幅産物はアガロースゲル電気泳動後にGelRed™ (Biotium)で可視化し，目的の増幅産物の有無を確認した。なお，増菌培養した3本の試験管由来DNAのうち，1本以上で細菌DNAが検出された場合に陽性と判定した。

### 2.4 16S rRNAメタゲノム解析に使用するDNAの抽出

DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen)を用いて，メーカーの手順書に従い2.1で得られた試料からDNAを抽出した。ただし，菌体破碎はキット付属のビーズではなく，より破碎力の強い直径0.5mmと5mmのジルコニアビーズ（東レ）を用いてBeads Crusher μT-12（タイテック）で破碎した<sup>3)</sup>。

### 2.5 16S rRNAメタゲノム解析

各試料から抽出したDNAを用い，試料中に存在する細菌由来の16S rRNA遺伝子の可変領域（V3-V4）に対してPCR増幅を行った。調製されたPCR増幅産物は，次世代シーケンサーMiSeq (Illumina)に供試した。取得した配列の前処理は複数のソフトウェアを内包するパイプライン

Illinois Mayo Taxon Organization from RNA Dataset Operations (IM-TORNADO) ver.2.0.3.2<sup>4)</sup> を用いて、東京大学ヒトゲノム解析センターのスーパーコンピューターSHIROKANE (<http://sc.hgc.jp/shirokane.html>) 上で行った。精度の低い配列やキメラ配列を削除した後 IM-TORNADO内のmothur<sup>5)</sup> を用いて配列が100%一致していた塩基配列をクラスタリングし、1つの operational taxonomic unit (OTU) とした。OTU配列と97%以上一致する配列の細菌属を Ribosomal Database Project (RDP) データベース ver.11<sup>6)</sup> から検索し、各OTUの細菌分類群を属レベルで推定した。それ以降の解析はMacQIIME ver.1.9.1<sup>7)</sup> を用い、多様性指数の算出や主座標分析を行った。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 市販肉からのカンピロバクター検出率

増菌培養後にカンピロバクター遺伝子を検出した結果、鶏肉では *C. jejuni*、豚肉では *C. coli* の検出率が高かった (Table 1)。ただし豚挽き肉では *C. jejuni* のほうが検出率は高かった。また牛肉からはカンピロバクター遺伝子が検出されず、牛豚

合挽き肉は1試料から *C. coli* が検出された。豚は *C. coli* の保菌率が高いことが知られており<sup>8)</sup>、それが豚肉のカンピロバクター汚染率に影響したと考えられた。また、鶏肉の汚染率は50%未満であり、これまでの我々の成績より低かったが、これは試料数が少ないことや購入店舗が異なることが原因と考えた。

#### 3.2 16S rRNA メタゲノム解析による市販肉細菌叢の特徴

##### 3.2.1 主要な構成細菌

IM-TORNADOで処理後のリード数は17,294~127,741だった。いずれの試料においても Good's coverage 値が0.99以上であったことなどから、データ量は本解析に十分であると考えられた。

平均存在率が5%以上の優占細菌属を比較すると、試料の種類によって構成細菌属の種類や存在率は異なっていた (Fig. 1)。鶏肉は共通して *Pseudomonas* の存在率が高く、*Acinetobacter* の存在率は鶏内臓肉で高かった。また、鶏内臓肉では *Janthinobacterium* が、鶏挽き肉では *Carnobacterium* が多く存在していた。豚内臓肉は豚精肉と比べて *Acinetobacter* の存在率が高かった。また、すべての試料の中で *Streptococcus* の存

Table 1 Prevalence of *C. jejuni* and *C. coli* in commercial meat

Meat type	Number of samples	Number of positive/positive rate (%)		
		<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	
Chicken	- organ meat	7	1 (14)	0 (0)
	- cut meat	5	2 (40)	2 (40)
	- mince	7	4 (57)	2 (29)
Pork	- organ meat	62	21 (34)	30 (48)
	- cut meat	25	5 (16)	11 (44)
	- mince	11	5 (45)	2 (18)
Beef	- cut meat	3	0 (0)	0 (0)
	- mince	2	0 (0)	0 (0)
Beef & Pork	- mince	4	0 (0)	1 (25)
Total	126	38 (30)	48 (38)	

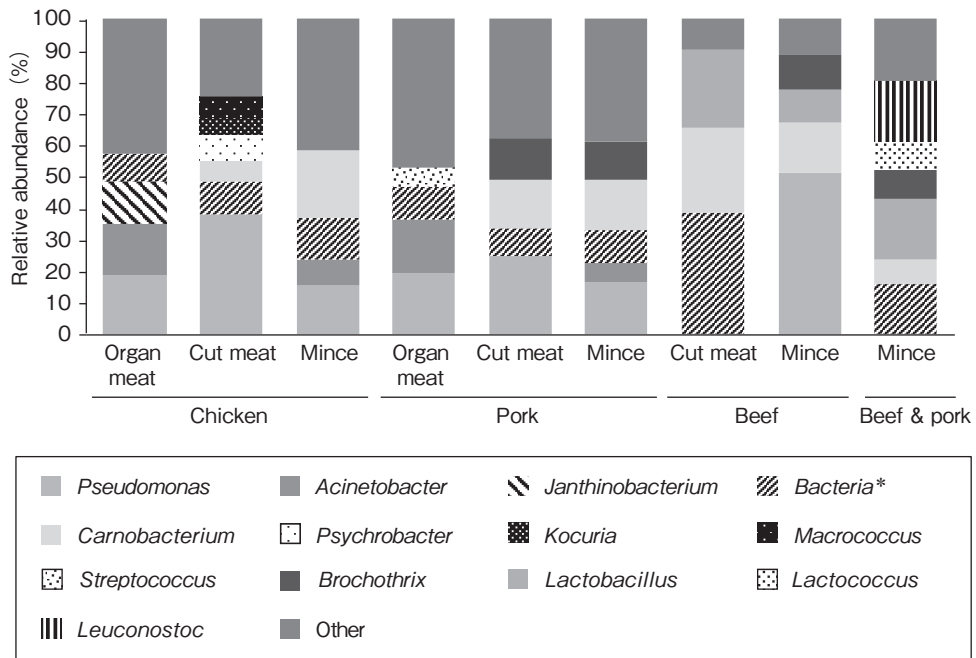


Fig. 1 Averaged bacterial genera of each meat type (relative abundance >5%). \*Bacterial taxa that is not classified as the phylum level.

在率が最も高かった。豚精肉はカット肉、挽き肉ともに*Pseudomonas*, *Carnobacterium*, *Brochothrix*の存在率が高かった。牛肉、牛豚合挽き肉は共通して*Lactobacillus*の存在率が高く、存在率は10%以上だった。

### 3.2.2 多様度指数の比較

試料中に存在する細菌の種類を豊富さを示す多様度指数を比較すると、鶏肉では挽き肉が最も高かった (Table 2)。豚肉では内臓肉が最も高く、挽き肉はカット肉よりも高かった。牛肉でもカット肉よりも挽き肉のほうが、多様度指数が高かった。いずれの肉においても挽き肉の多様度指数が高かったことから、挽き肉に使用された肉が他の肉に比べて細菌汚染の程度が高かったか、挽き肉加工自体が細菌汚染の原因と示唆された。また、鶏肉も豚肉と同様に内臓肉の多様度が最も高いと予想したが、成績は予想に反するものだった。鶏内臓肉の多様度指数を試料ごとにみると、挽き肉

と同程度の試料もあり、店舗によって多様度指数は異なっていたことから、店頭に並ぶまでの工程の違いによって鶏内臓肉の細菌汚染の程度に差が生じた可能性が考えられた。さらに、肉の種類ごとにカンピロバクター汚染試料と非汚染試料を区別し、それぞれ3試料以上あった鶏挽き肉と豚内臓肉、豚カット肉について、多様度指数を比較すると、汚染試料のほうが有意に高かった (Table 3)。このことから、カンピロバクターは細菌による汚染度が高いものを介して、鶏肉や豚肉を汚染すると示唆された。

### 3.2.3 各試料間の関連性の検証

カンピロバクター汚染試料と非汚染試料で多様度指数に有意な差が認められたことから、両者の構成細菌は顕著な違いがあると推測した。そこで、細菌の量は考慮せず、種類だけを考慮する unweighted UniFrac距離を用いて主座標分析を行い、各試料の構成細菌の類似性を比較した



**Table 2** Differences of diversity indices among sample types (average  $\pm$  SE)

Meat type		Simpson	Shannon	Chao1	Observed OTUs
Chicken	- organ meat	0.83 $\pm$ 0.03	3.37 $\pm$ 0.20	85.4 $\pm$ 29.7	76.7 $\pm$ 26.5
	- cut meat	0.83 $\pm$ 0.03	3.59 $\pm$ 0.31	155.3 $\pm$ 17.5	145.8 $\pm$ 15.5
	- mince	0.87 $\pm$ 0.02	4.11 $\pm$ 0.18	200.8 $\pm$ 30.2	178.1 $\pm$ 27.1
Pork	- organ meat	0.87 $\pm$ 0.01	4.24 $\pm$ 0.12	242.4 $\pm$ 14.8	212.7 $\pm$ 12.6
	- cut meat	0.82 $\pm$ 0.02	3.53 $\pm$ 0.18	144.7 $\pm$ 13.9	130.2 $\pm$ 12.8
	- mince	0.86 $\pm$ 0.03	4.36 $\pm$ 0.28	219.3 $\pm$ 32.8	201.4 $\pm$ 31.3
Beef	- cut meat	0.53 $\pm$ 0.04	1.85 $\pm$ 0.21	35.9 $\pm$ 10.0	31.7 $\pm$ 7.8
	- mince	0.81 $\pm$ 0.02	3.15 $\pm$ 0.19	217.8 $\pm$ 16.5	178 $\pm$ 25.0
Beef & Pork	- mince	0.83 $\pm$ 0.01	3.55 $\pm$ 0.11	280.7 $\pm$ 10.5	258.3 $\pm$ 10.5

**Table 3** Comparison of diversity indices between *Campylobacter* positive and negative samples (average  $\pm$  SE)

Meat type		<i>Campylobacter</i>	Simpson	Shannon	Chao1	Observed OTUs
Chicken	- mince	+	0.88 $\pm$ 0.02	4.51 $\pm$ 0.13**	271.4 $\pm$ 21.1**	241.2 $\pm$ 20.8**
		-	0.86 $\pm$ 0.03	3.63 $\pm$ 0.20	116.2 $\pm$ 32.6	102.4 $\pm$ 27.9
Pork	- organ meat	+	0.90 $\pm$ 0.01*	4.59 $\pm$ 0.12**	301.5 $\pm$ 17.5**	262.1 $\pm$ 14.8**
		-	0.84 $\pm$ 0.03	3.88 $\pm$ 0.19	181.2 $\pm$ 17.6	161.4 $\pm$ 15.4
	- cut meat	+	0.86 $\pm$ 0.02	4.02 $\pm$ 0.22**	195.5 $\pm$ 19.1**	175 $\pm$ 18.7**
		-	0.79 $\pm$ 0.03	3.27 $\pm$ 0.23	117.8 $\pm$ 15.4	106.4 $\pm$ 14.0

\* p&lt;0.05 (Welch's t-test)

\*\* p&lt;0.01 (Welch's t-test)

(Fig. 2)。全試料で主座標分析を行うと、カンピロバクター汚染試料はプロット図の左側にプロットされる傾向が認められた (Fig. 2A)。同一プロット図を試料の種類ごとに記号を分けると、汚染試料がプロットされた位置には豚内臓肉が多くあった (Fig. 2B)。しかし、豚内臓肉にもカンピロバクター非汚染試料は複数存在していたことから、豚内臓肉と構成細菌が類似した試料がカンピロバクターの汚染源だとは考えられなかった。鶏肉試料で主座標分析を行うと、カンピロバクター汚染試料はプロット図の右側中央にプロットされる傾向が認められた (Fig. 2C, D)。しかし、内臓肉の多くは左側にプロットされており、カンピロバクターの汚染源は、内臓肉よりもむしろ精肉で

ある場合が多いと推察された。豚肉試料で主座標分析を行うと、カンピロバクター汚染試料はプロット図の右側にプロットされる傾向が認められた (Fig. 2E, F)。しかし、豚肉では概して、汚染試料で明確なクラスターは形成されなかったことから、カンピロバクター汚染肉と非汚染肉の構成細菌の種類に顕著な違いはなかったと考えられた。多様度指数が汚染肉で有意に高かったことも考慮すると、カンピロバクターは細菌汚染の程度が高いものを介して肉を汚染するが、その汚染源は鶏肉では内臓よりも精肉で、豚肉では複数存在する可能性があると考えた。

本研究では複数の店舗から市販肉を収集し、肉の種類ごとのカンピロバクター汚染状況や構成細



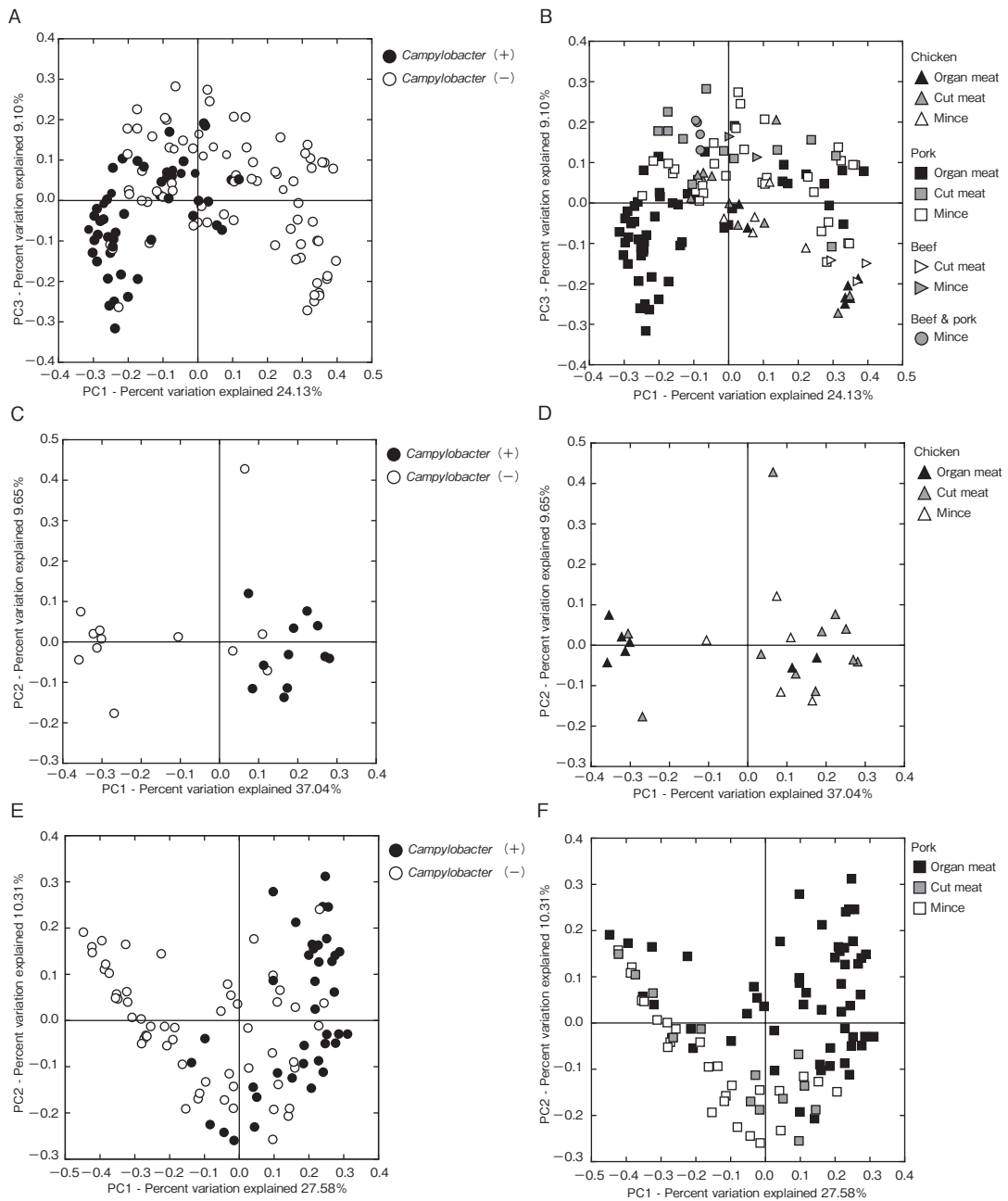


Fig. 2 Comparison of bacterial composition by principal coordinate analysis based on unweighted UniFrac distances. All samples (A, B), chicken samples (C, D), or pork samples (E, F) were used.

菌の特徴を明らかにした。カンピロバクターの汚染源や加工時の交差汚染の実態を明らかにするには、同一店舗で多数の市販肉を収集し調査するなど、さらなる研究が必要だと考えられる。

#### 4. 要 約

カンピロバクター汚染率は鶏肉、豚肉ともに10～50%程度であり、鶏肉では*C. jejuni*、豚肉では

*C. coli*の検出率が高かった。16S rRNAメタゲノム解析で優占細菌属を比較すると、試料の種類によって構成細菌属の種類や存在率は異なることが分かった。多様性指数はいずれの肉においてもカット肉で低く、挽き肉で高かった。また、カンピロバクター汚染試料と非汚染試料と比較すると、汚染試料のほうが多様性指数は有意に高かった。Unweighted UniFrac距離を用いて主座標分析を行った結果、汚染試料で明確なクラスターは形成されなかったことから、汚染試料と非汚染試料の構成細菌の種類に顕著な違いはなかったと考えられた。

#### 文 献

- 1) Newell, D. G., Fearnley, C. : Sources of *Campylobacter* colonization in broiler chickens, *Applied and environmental microbiology*, **69**, 4343~4351, 2003.
- 2) Inglis, G. D., Kalischuk, L. D. : Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces, *Applied and environmental microbiology*, **69**, 3435~3447, 2003.
- 3) Murase, K., Watanabe, T., Arai, S., Kim, H., Tohya, M., Ishida-Kuroki, K., Vō, T. H., Nguyễn, T. P. B., Nakagawa, I., Osawa, R., Nguyễn, N. H., Sekizaki, T. : Characterization of pig saliva as the major natural habitat of *Streptococcus suis* by analyzing oral, fecal, vaginal, and environmental microbiota, *PLoS One*, **14**, e0215983, 2019.
- 4) Jeraldo, P., Kalari, K., Chen, X., Bhavsar, J., Mangalam, A., White, B., Nelson, H., Kocher, J., Chia, N. : IM-TORNADO : a tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries, *PLoS One*, **9**, e114804, 2014.
- 5) Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., Lesniewski, R. A., Oakley, B. B., Parks, D. H., Robinson, C. J., Sahl, J. W., Stres, B., Thallinger, G. G., Van Horn, D. J., Weber, C. F. : Introducing mothur : open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities, *Applied and environmental microbiology*, **75**, 7537~7541, 2009.
- 6) Cole, J. R., Wang, Q., Fish, J. A., Chai, B., McGarrell, D. M., Sun, Y., Brown, C. T., Porras-Alfaro, A., Kuske, C. R., Tiedje, J. M. : Ribosomal Database Project : data and tools for high throughput rRNA analysis, *Nucleic acids research*, **42**(Database issue), D633~D642, 2014.
- 7) Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Donald, D. M., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. : QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nature methods*, **7**, 335~336, 2010.
- 8) Oporto, B., Esteban, J. I., Aduriz, G., Juste, R. A., Hurtado A. : Prevalence and strain diversity of thermophilic campylobacters in cattle, sheep and swine farms, *Journal of applied microbiology*, **103**, 977~984, 2007.

## アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する 疫学研究（Ⅱ）

Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan

杉浦 勝明・芳賀 猛

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga

(Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences,  
Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

With the aim of obtaining information to establish an import risk assessment on African swine fever (ASF) and other transboundary animal diseases (TADs) into Japan, a questionnaire survey was conducted between 1 August and 20 September 2019 on air travellers arriving into Japan from China. There were 248 responses with 2.8% of respondents illegally importing pork products. The quantity imported per traveller varied between 250g and 2kg. Concerning the travellers' perception in regard to the difficulty of importing a pork product in their luggage, 32 respondents (12.9%) considered it very easy or rather easy and 216 (87.1%) very difficult or rather difficult. In regard to the recognition of respondents of the illegality of importing pork products into Japan, seven respondents (2.8%) did not consider this practice to be illegal whilst 241 (97.2%) had some idea of the illegal nature of this behaviour. The regression analysis revealed that the practice of illegal importation of pork products was significantly affected by the level of difficulty perception held by the traveller ( $p < 0.001$ ) and that the difficulty perception is significantly affected by the level of recognition of illegality by the traveller ( $p < 0.001$ ). The result of this study will not only provide useful data in developing a model to assess the probability of introduction of ASF and other TADs into Japan and other countries, but also in monitoring the effect of measures taken by the government to reduce the illegal importation of meat and meat products.

### 1. 目 的

ヒトや物の国際移動の増加に伴い、アフリカ豚熱 (ASF) その他の越境性動物疾病 (TAD) が国境を越えて広がるリスクが高まっている。これらの疾病は一旦侵入すると、畜産だけでなく経済、貿易に大きな影響を及ぼすことがあり、清浄

国は侵入防止のためにさまざまな対策をとっている。しかしながら、多数の国においてTADの侵入が報告されており、その原因として肉製品の違法輸入 (またはその疑い) があげられる。

1997年の台湾への口蹄疫の侵入、1967年および2001年の英国への侵入は、肉または肉製品の密輸によるものと疑われている。同様に、2000年代初

頭の一部のヨーロッパ諸国における豚熱 (CSF) の発生は、イノシシの移動または豚肉製品の違法輸入による可能性が高いとされている。ASFについては、旅行者による豚肉製品の違法輸入、またはASF汚染国から到着した船舶・航空機からの廃棄物の違法処理により清浄国に侵入したケースが多数報告されている (1960年代のスペイン、1970年代のキューバおよびブラジル、最近では2007年のモーリシャス、2007~2008年のコーカサス諸国)。

日本への動物疾病の侵入防止策の検討にあたり侵入リスク評価の実施が定着してきているが、侵入の原因が肉や肉製品の違法な輸入に関連していると認識されているにもかかわらず、肉や肉製品の違法な輸入による疾病の侵入リスクを評価した研究事例は少ない。

肉および肉製品の違法輸入に基づく動物疾病の侵入リスクを検討した過去の研究で畜産物の違法輸入量を定量化することの難しさが主な制約であることが強調されている。一部のリスク評価では、肉および肉製品の違法輸入の確率を税関押収に関するデータに基づいて推定している。ただし、そのようなデータは、肉および食肉製品の違法輸入全体の一部にすぎない可能性がある。

2018年8月に始まった中国でのASFの流行直後に実施された日本への侵入リスクに関する杉浦および芳賀による先行研究<sup>1)</sup>で、特に豚肉製品の違法輸入を介した侵入リスクが最も高いと推定されている。その後、モンゴル (2019年1月)、ベトナム (2019年2月)、カンボジア (2019年3月)、香港 (2019年5月)、北朝鮮 (2019年5月)、ラオス (2019年6月)、フィリピン (2019年7月)、ミャンマー (2019年8月)、韓国 (2019年9月)、インドネシア (2019年9月)、東チモール (2019年9月) でもASFの発生が報告されASFの日本への侵入リスクはさらに高まっている<sup>2)</sup>。中

国と日本との地理的な近接性と動物製品の価格差は、豚肉製品の違法輸入を促進する要因となる可能性がある。訪日旅行者数が増加すると、日本への豚製品の違法輸入も増加し、ASFの日本への侵入リスクが高まる可能性がある。

本研究は、将来の定量的リスク評価モデルの開発に役立てると期待の下、中国から日本への豚肉製品の違法輸入に関するデータを収集することを目的としている。この研究ではまた、日本への豚肉製品の違法輸入に関して、旅行者の行動や認識に影響を与える潜在的要因の特定も試みた。

## 2. 材料と方法

### 2.1 アンケート調査

回答者の属性 (年齢、性別、訪日目的、滞在期間、同行者の人数) に関する質問に続いて、7つの多肢選択質問と1つの記述式質問からなるアンケート調査票を作成した。豚肉製品を持ち込んだと回答した者には追加で製品数、種類、重量および持込みの目的 (自己消費・プレゼント用) を尋ねた。違法性の認識に関する質問については、回答者が「非常によく認識している」、「違法であることをある程度知っている」、「聞いたことはあるがよくわからない」、「聞いたことがない」と回答した場合、それぞれ4、3、2、1のスコアを与えた。同様に、豚肉製品の持込みに関する質問については、「非常に難しい」、「やや難しい」、「やや簡単」、「非常に簡単だ」と回答した場合、それぞれ4、3、2、1のスコアを与えた。

また、アンケート調査票を配布する前に、調査の背景と目的に関する情報を提供し、口頭による同意が得られた回答者にアンケート調査票を配布した。正直な回答を促すために、アンケート結果は調査目的のみに使用し、機密とするとのメッセージを調査票の冒頭に示したうえで、匿名で回答を回収した。

調査対象者については、2019年8月1日～9月20日まで東京大学の本郷キャンパス、秋葉原、浅草、上野、銀座、新宿エリアおよび大阪の難波エリアの中国人旅行者から無作為に選んだ248人の中国人旅行者に配布し回答を回収した。旅行者が家族または知人を伴い訪日していた場合、家族またはグループを代表する者に回答してもらった。

## 2.2 データベース

248人の回答者ごとに回答者の属性、豚肉製品の違法持込みの有無、難易度の認識、違法性の認識に関する回答結果を入力し、データベースを作成した。難易度の認識と違法性の認識に関するデータは、それぞれの回答に与えられたスコアに従って、1～4の値を順序データとして入力した。滞在期間に関する回答も順序データとして入力した。

## 2.3 統計分析

まず、違法持込みの有無を従属変数、豚肉製品の違法輸入という行為に影響を与える可能性のある潜在的要因を独立変数としての単変数二項ロジスティック回帰分析を実施した。次に、難易度知覚のスコアを従属変数とし、不法輸入が困難であると旅行者に思わせる潜在的要因を独立変数として単変数順序ロジスティック分析を実施した。いずれの回帰分析においても、 $p$ 値が0.05未満の独立変数を最終モデルに採用した。統計分析は、BellCurve for Excel ver. 3.00 (Social Survey Research 150 Information Co., Ltd.) をアッドオンしたExcel 2010 (Microsoft Corporation) を用いて行った。

## 3. 結果と考察

248人の回答者の訪日目的および滞在期間別の割合は、Fig. 1のとおりである。豚肉製品の違法輸入の割合については、7人(2.8%)が豚肉製品を違法に持ち込んだ。持ち込まれた製品は、ハ

ム、ソーセージ、ポークジャーキーであり、すべて市販品であった。持ち込んだ製品に関する情報を記入しなかった回答者1人を除き、輸入目的はすべて個人消費であった。持ち込んだ製品の重量は250g～2kgであった (Table 1)。

豚肉製品を持ち込むのが難しいか否かの認識については、32人(12.9%)が非常に簡単またはやや簡単と答え、216(87.1%)は非常に難しいかやや難しいと答えた (Fig. 2A)。豚肉製品の輸入に関する違法性についての認識については、7人(2.8%)が豚肉製品の持込みを違法とは認識していなかった。残りの回答者は違法性についてなんらかの認識を持っていた (Fig. 2B)。

豚肉製品の持込みの有無を従属変数とする二項ロジスティック回帰分析の結果、難易度の認識レベルを独立変数とする有意なモデルが得られた ( $p < 0.001$ ,  $R^2 = 0.49$ ) (Table 2)。また、難易度認識のスコアを従属変数とする順序ロジスティック回帰分析の結果、違法性レベルを独立変数とする有意なモデルが得られた ( $p < 0.001$ ,  $R^2_{cs} = 0.205$ ) (Table 3)。

日本農業新聞が5月中旬から6月上旬に実施したアンケート調査<sup>3)</sup>で中国人旅行者の8%が豚肉製品を違法に持ち込んでいたとの調査結果を考えると、その後の3か月間で違法輸入の割合が大きく減少していることが明らかとなった。おそらく、2019年4月22日以降、航空旅客による食肉および食肉製品の違法輸入に対する措置の強化、ポスターや機内放送を用いた啓発、肉および肉製品の違法輸入者に対する罰則の強化、検疫探知犬の増加など、日本政府がさまざまな措置を導入したことによるものと考えられる。

また、中国でのASFの発生による豚肉の生産量の減少に伴い、中国内での豚肉価格が上昇したことも、豚肉製品を日本に持ち込む経済的優位性を低下させた可能性がある。

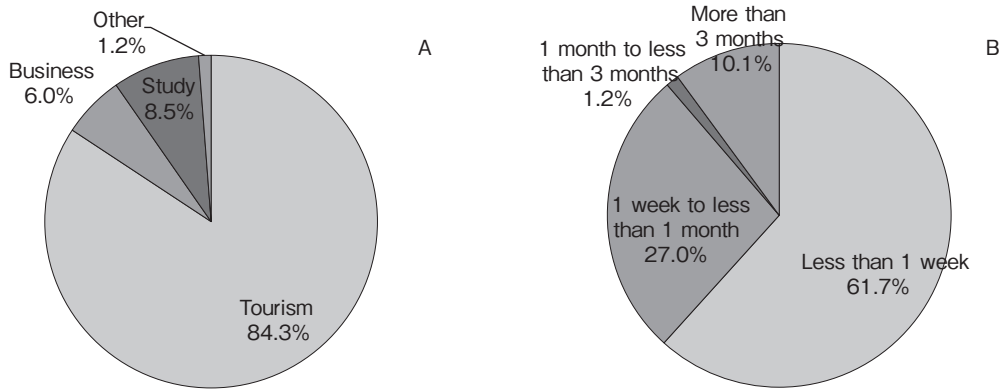


Fig. 1 Proportions of respondents by purpose of visit (A) and duration of stay (B)

Table 1 Details of the pork products illegally imported by Chinese travelers visiting Japan as a result of the questionnaire survey conducted from 1 August to 20 September 2019

Case No.	Purpose of visit	Pork product brought in	Approximate quantity	Use
1	Business	Ham	2kg	Personal consumption
2	Tourism	Ham	-- <sup>a</sup>	-- <sup>a</sup>
3	Tourism	Sausage	500 g	Personal consumption
4	Tourism	Sausage	300 g	Personal consumption
5	Business	Jerky	400 g	Personal consumption
6	Tourism	Jerky	600 g	Personal consumption
7	Tourism	Jerky	250 g	Personal consumption

<sup>a</sup>The respondent did not disclose exact information.

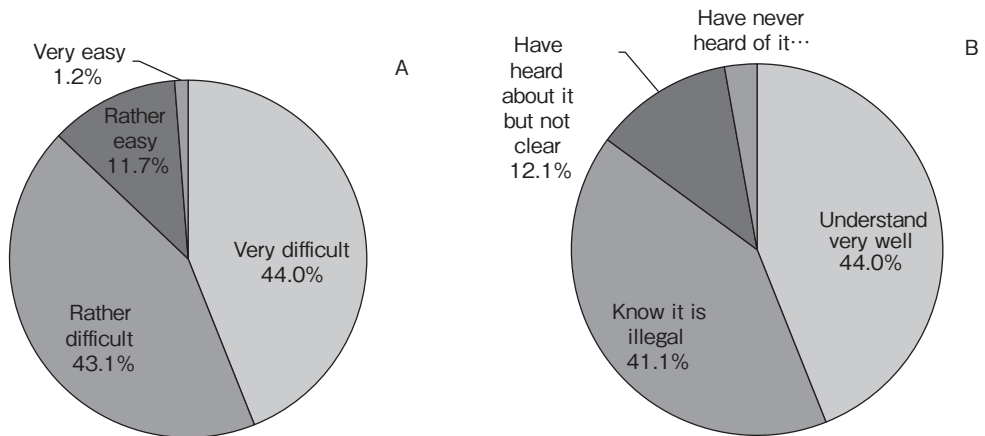


Fig. 2 Proportions of respondents by difficulty perception (A) and illegality recognition (B)

日本農業新聞の調査と今回の調査とで豚肉製品の持込みを難しいとする旅行者の割合が大幅に増加している (69%から87%)。また、豚肉製品の持込みの違法性を認識している旅行者の割合も増

加している (93%から97%)。動物検疫所による啓発キャンペーンが効果的であったことが示唆される。

ロジスティック回帰分析により、旅行者の違法



**Table 2** Result of logistic regression analysis identifying factors that may affect the behavior of illegal importation of pork products using data of 248 Chinese air travelers visiting Japan

Variable	Coefficient ( $\beta$ )	Odds ratio	(95%CI)	p value
Difficulty perception	-3.522	0.030	(0.004—0.221)	<0.001
Constant term	5.199	181.132	(2.746—11947.4)	0.015
Model statistics	p<0.001, R <sup>2</sup> = 0.490			

**Table 3** Result of ordinal logistic regression analysis identifying factors that may affect the difficulty perception using data of 248 Chinese air travelers visiting Japan

Variable	Coefficient ( $\beta$ )	Odds ratio	(95%CI)	p value
Illegality recognition	1.238	3.449	(2.469—4.890)	<0.001
Threshold (Difficulty score 1/2)	-0.902	0.406	(0.093—1.771)	<0.001
Threshold (Difficulty score 2/3)	1.737	5.678	(1.977—16.308)	<0.001
Threshold (Difficulty score 3/4)	4.330	75.958	(23.042—250.393)	<0.001
Model statistics	p<0.001, R <sup>2</sup> <sub>Cox-Snell</sub> = 0.205			

輸入の難易度の認識と行動および難易度と違法性の認識レベルとの間の有意な関連性が明らかになり、旅行者は豚肉製品を持ち込むことの違法性について認識しているほど、豚肉製品を持ち込むことを難しいと認識し、その認識は最終的に違法輸入の実際の行動に反映されていた。アンケート調査に使用された回答者のサンプルサイズが小さかったことから、回帰モデルの統計的検出力は限定的で、いずれのモデルも有意なリスク要因を1つしか特定できなかった。また、順序ロジスティック回帰モデルのR<sup>2</sup>乗値は低く (R<sup>2</sup><sub>CS</sub> = 0.205)、中国の旅行者の違法性の認識を集団として予測できるが、個人ベースでは予測できないことが示された。これらの結果は、航空旅行者による豚肉製品の違法輸入を減らすために、啓発キャンペーンが有効であることを示唆している。中国の旅行者を対象とした啓発キャンペーンの継続・強化の重要性が示された。

中国から日本を訪れる航空旅行者の数 (2018年には約600万人) とこの調査で明らかになった違

法輸入の割合 (2.8%) から、調査対象となった旅行者が一般的な中国人旅行者を代表していると仮定すると、中国からの約17万人の旅行者が毎年違法に肉や肉製品を持ち込んでいる可能性がある。これは、検疫探知犬や税関職員による尋問によって摘発された豚肉製品の違法輸入件数の3.8倍 (2018年42,280件) であり、空港での摘発件数は氷山の一角であることを示している。航空旅客が肉や肉製品を違法に輸入し、その後国内の豚に給与されることで、ASFその他のTADが日本に侵入するリスクが実際にある。飼育豚への曝露に至る経路を特定し、このリスクを定量化するには、追加データを用いたさらなる研究が必要である。

アンケートには、豚肉製品の違法輸入に関する質問が含まれ、反応バイアス (社会的望ましきバイアス) が生じる可能性がある。アンケート調査を実施する際に匿名性と機密性を確保することでこのバイアスを最小限に抑えようとした。しかしながら、本研究結果を解釈する際には、このバイ

アスにより一部の変数が過小または過大評価される可能性があることに留意する必要がある。

#### 4. 要 約

アフリカ豚熱が中国などで発生し、日本への侵入が危ぶまれるなか、2019年8月～9月、中国人旅行者248人を対象に豚肉製品の持込みの実態を把握するためのアンケート調査を実施した。その結果、7人(2.8%)の回答者が豚肉製品を持ち込んでいることが判明し、一人当たり250g～2kgを持ち込んでいた。持込みは「簡単だ」または「少し簡単だ」と考える人は32人(12.9%)、7人(2.8%)は違法性の認識を持っていなかった。回帰分析の結果、違法性の認識が高い人ほど持込みを困難と考え、持込みを控える傾向があることが示された。この研究結果は、肉および肉製

品の違法輸入を最小限にするためにとられた措置の有効性を確認するとともに、日本へのASFその他のTADの侵入リスク評価モデルを開発するのに有用な情報を提供する。

#### 文 献

- 1) Sugiura, K., Haga, T. : A rapid risk assessment of African swine fever introduction and spread in Japan based on expert opinions. *J Vet Med Sci*, **80**, 1743～1746, 2018. <https://doi.org/10.1292/jvms.18-0543>
- 2) World Organisation for Animal Health (OIE) : Situational updates os African swine fever in Asia and the Pacific, 2020. <https://rr-asia.oie.int/en/projects/asf/situational-updates-of-asf-in-asia-and-the-pacific/>
- 3) Obara, H., Sekiyama, H. : Meat products from countries with outbreaks of African swine fever, *The Japan Agri News*, 2019 June 11. <https://www.agrinews.co.jp/p47896.html>

## 牛におけるPTH/PTHrP受容体シグナルの肥満と インスリン抵抗性への関与

Influence of PTH/PTHrP receptor signals for obesity and insulin  
resistance in dairy cows

恩 田 賢・風 間 啓

(麻布大学獣医学部)

Ken Onda and Kei Kazama

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Fat cows in transition period become easy to suffer from many types of periparturient disorders because of fat mobilization, insulin resistance and fatty liver. It is a desirable thing that body condition score of the obese cow decreases, but the skeletal muscle atrophy must avoid in astasia cow. Therefore, at first, we investigated the expressions of amyotrophy related genes in the muscle which is the biggest insulin sensitivity organ in the body. And next, we considered whether RQUICKI (surrogate index of insulin resistance) and kynurenic acid (tryptophan metabolite) were useful for the insulin-resistance evaluation in cows. As a result, the gene expression of FBXO32, which is a responsible gene for amyotrophy, in the quadriceps femoris muscle suffering atrophy of the arthritis calf is higher than that of the healthy cow, and it became clear that the ubiquitin proteasome pathway participated in amyotrophy in the calf. In addition, the value of RQUICKI of fat cow group divided by BCS and BHBA was statistically lower than that of healthy cow group and it supposed insulin sensitivity decreased. However, the rise of serum kynurenic acid concentration was not detected in fat cows (Healthy cows :  $5.31 \pm 1.41$  mM, Fat cows :  $6.10 \pm 1.83$  mM, no significant difference). It is necessary to carry further research out considering specific tryptophan metabolism of the ruminant animals and we need to elucidate the mechanism of obesity and insulin resistance in dairy cows.

### 1. 目 的

乳牛において周産期は最も疾病に罹患しやすい時期であり、その背景には負のエネルギーバランスが大きく影響している。不足したエネルギー分を蓄積した体脂肪から動員する際に、非エステル化脂肪酸 (NEFA) が肝臓や筋肉などさまざまな組織に中性脂肪として沈着する。肝臓に沈着すると牛は容易に脂肪肝となり、II型ケトーシスを発

症する。また、体重の40%を占める筋肉は最大のインスリン感受性臓器であるが、脂肪沈着するとインスリン感受性が低下する。さらに、この時期には筋肉よりアミノ酸を動員して糖新生するため、25%も筋線維が細くなることが知られており、このこともインスリン抵抗性増大の原因となる<sup>1)</sup>。不適切な飼養管理により過肥になった牛ほど脂肪肝の程度は重く、ケトーシスは重篤になり、治療が困難になる。しかし、過肥牛のボディー

コンディションスコア (BCS) を乾乳期に下げることが、より重篤な脂肪肝を引き起こす危険性があり、その対応が非常に難しい<sup>2)</sup>。

カルシウムとリンの代謝には、副甲状腺ホルモン (PTH) と副甲状腺ホルモン関連タンパク質 (PTHrP) が重要な役割を果たしている。近年、両者に共通の G タンパク質結合型受容体である PTH 1 型受容体 (PTH1R) からのシグナルを介して、白色脂肪細胞に脱共役タンパク質 (Ucp1) の発現を誘導し、エネルギーを熱として放散することによって、脂肪細胞が縮小することが報告された<sup>3)</sup>。さらに近年、筋肉におけるカルシウムポンプの負の調節因子であるサルコリピンが発見され、ATP浪費により非ふるえ熱産生を起し、体脂肪を減少することも報告された<sup>4)</sup>。また、PTH1Rからのシグナルはタンパク質合成の刺激因子であるインスリン様成長因子 1 を抑制し、骨格筋におけるタンパク質分解に関与する、ユビキチン・プロテアソーム系とオートファジー系などの経路を刺激することによって、筋萎縮の原因となることが明らかとなった<sup>3)</sup>。

痩せるといっても、肥満牛の脂肪が減少することは望ましいことであるが、起立不能牛の骨格筋減少は、より起立を困難にさせて問題である。そこで本研究ではまず、牛においてもインスリン感受性臓器である筋肉に、非ふるえ熱産生を引き起こすサルコリピン、筋萎縮原因遺伝子とされる FBXO32 (F-box protein 32) の遺伝子発現の有無について検討した。さらに、乳牛においてはインスリン抵抗性の評価方法が確定していないことから、サロゲートインデックスとして医学で用いられる RQUICKI の有用性、さらに近年インスリン抵抗性の指標として注目されている、トリプトファン代謝産物のキヌレン酸が、乳牛においても有用なマーカーになるかを検討した。

## 2. 方法

本研究にかかわる動物実験のすべては、麻布大学動物実験委員会の許可を受け (承認番号: 160616-3)、麻布大学動物実験指針を遵守し計画どおりに行った。

### 2.1 牛の筋肉におけるPTH1Rはじめ代謝関連遺伝子の発現

#### 2.1.1 動物

予後不良と判断された、繁殖障害のホルスタイン種成雌牛 (3 歳齢) と、左側後肢足根関節の関節炎に罹患した F 1 去勢子牛 (2 ヶ月齢) の 2 頭が安楽殺された後、ただちに組織 (大腿四頭筋ほか) を採取し -20°C で保存した。

#### 2.1.2 1 本鎖相補的 DNA (cDNA) の合成と PCR 法による遺伝子増幅

凍結組織を細切し、常法にてトータル RNA を抽出後、逆転写酵素によって 1 本鎖 cDNA を合成した。FBXO32, サルコリピン, PTHrP, PTH1R, GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) のプライマーを作成し (Table 1), PCR 法にて遺伝子の増幅を調べた。

### 2.2 周産期乳牛のインスリン抵抗性の評価

#### 2.2.1 動物

9 酪農場で飼養されていた、分娩後 2 週間以内のホルスタイン種成雌牛 22 頭を実験に用いた。供試牛はボーディーコンディションスコア (BCS) が 4 未満で、かつ血中  $\beta$ -ヒドロキシ酪酸 (BHBA) 濃度が 1.2mM 未満の 12 頭と (健常群)、BCS が 4 以上で、かつ血中 BHBA 濃度が 1.2mM 以上の 10 頭に群分けした (過肥群)。

#### 2.2.2 採材方法

採血は頸静脈から行い、血液の凝固後に遠心分離し、得られた血清は分析するまで -20°C で保存した。血中 BHBA 濃度は採血直後に、プレジジョンエクシード (アボットジャパン, 東京, 日本)

Table 1 Primer sequences used in this experiment.

Primer		(nt)	Sequence (5'to 3')	Product size (bp)	Accession number
Swine Sarcolipin	Forward	271-290	GTCCTTGACGCTGTTTCAGGA	529	NM_001044566.2
	Reverse	799-780	TTGGTTGCTGAGTGTGGGTT		
Bovine FBXO32	Forward	515-539	CAAGAAGAGAAAGAAGGACATGCTG	355	NM_001046155.1
	Reverse	869-845	GGTACATAAGGATGTGTAGAGGGTC		
Bovine PTHrP	Forward	71-95	GTGGTGTGGAAAAACACGGTT	481	AB097837
	Reverse	554-534	TCTTTTCCTGCTCCTTGCGTT		
Bovine PTH1R	Forward	1566-1585	GCGAGGTACAGGCTGAGATC	455	NM_001075332.1
	Reverse	2020-2001	ACTGTCCAACAACCCGTCTC		
Bovine GAPDH	Forward	490-509	ACCACTGTCCACGCCATCAC	453	U85042.1
	Reverse	942-922	TCCACCACCTGTTGCTGTA		

FBXO32 : F-box protein 32, PTHrP : parathyroid hormone-related protein, PTH1R : PTH type 1 receptor, GAPDH : glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase.

を用いて測定した。

### 2.2.3 分析項目

(1) RQUICKIはインスリン感受性の指標であり、その値が低いほどインスリン感受性が低いと考えられている。その算出のために以下の3項目を測定し、計算式に代入して値を求めた。

$RQUICKI = 1 / [\log \text{glucose (mg/dl)} + \log \text{insulin } (\mu\text{U/ml)} + \log \text{NEFA (mM)}]$

①血清グルコース濃度 (Cobas6000, ロシュ・ダイアグノスティック, 東京, 日本)。②血清インスリン活性値 (Bovine Insulin ELISA Kit, Merucodia, Osaka, Japan)。③血清NEFA濃度 (NEFA Test Waco C, 和光純薬, 東京, 日本)。

(2) インスリン抵抗性の指標として、トリプトファン・キヌレニン経路の代謝産物である以下の3項目を測定した。

①血清トリプトファン濃度 (L-Tryptophan ELISA kit, ImmuSmol, Talence, France)。②血清キヌレニン濃度 (L-Kynurenine ELISA kit, ImmuSmol)。③血清キヌレン酸濃度 (Kynurenine Acid ELISA Kit, Cloud-Clone, Texas, USA)。

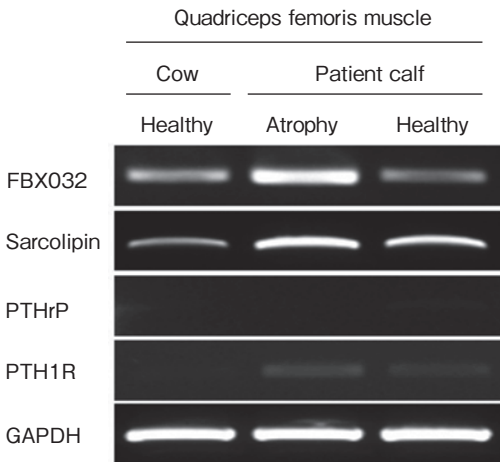
## 3. 結果と考察

### 3.1 牛の筋肉におけるPTH1Rはじめ代謝関連遺伝子の発現

牛の筋肉におけるPTH1Rはじめ筋萎縮や非ふるえ発熱などに関連する遺伝子の発現を検討したところ、FBXO32とサルコリピンは今回用いたすべてのサンプルにおいて遺伝子発現が認められた (Fig. 1)。PTHrPはF1子牛の健康な右側大腿四頭筋のみでわずかな発現を認めたが、他の部位では認めなかった。また、PTH1Rはホルスタイン種成雌牛ではその遺伝子発現が認められなかったが、関節炎F1子牛では認められ、筋萎縮した左側後肢の大腿四頭筋で、右側健康肢よりも発現が多かった。

FBXO32はラット筋萎縮モデルの網羅的解析によって同定された筋萎縮原因遺伝子であり、その遺伝子産物はSCF複合体型ユビキチンリガーゼに属する。癌などの悪液質で骨格筋が萎縮することが知られていたが、これにFBXO32が関与することが明らかとなり、インスリン抵抗性の上昇やサルコペニアの原因になると考えられている。本研





**Fig. 1** Gene expressions of FBXO32 (F-box protein 32), sarcolipin, PTHrP (parathyroid hormone-related protein), PTH1R (PTH type 1 receptor) and GAPDH (glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase) in the quadriceps femoris muscle of a healthy cow and a calf suffering from arthritis. Atrophy : atrophy muscle in the left hindlimb because of arthritis.

究において当初、乳熱やダウナー牛症候群に罹患した成乳牛の筋肉を用いる予定であったが、実験期間中に検体を得ることができなかった。そこで、重度関節炎で予後不良となったF1子牛の大腿四頭筋を用いて、FBXO32の遺伝子発現を検討した。その結果、負重が可能であった右側後肢ではなく、負重不可能で明らかな筋萎縮が認められた左側後肢の大腿四頭筋で、FBXO32遺伝子発現が多いことが明らかになった。このことは、体重や寿命、糖脂質代謝が大きく異なる牛においても、筋萎縮にユビキチン・プロテアソーム系のタンパク質分解が関与している可能性を示したものと見える。

以前は非ふるえ発熱による体温維持と体脂肪の調整についてはUcp1が最も重要とされていたが、現在では筋肉に発現するサルコリピンのほうがより影響が大きいと考えられている。今回は成牛においてはPTH1R遺伝子の増幅が観察されなかったが、子牛においては健康肢でも罹患肢でも

発現が認められ、サルコリピンの発現においても、PTH1R遺伝子発現が観察されない成牛よりも、子牛でやや多いことが分かった。起立不能や筋萎縮は、牛や馬などの大型産業動物においては予後不良の大きな要因であり、PTH1RシグナルがFBXO32とサルコリピンを介してどのように筋萎縮を引き起こすか、メカニズムの解明が期待される。また、子牛では関節炎だけでなく、骨折や脱臼などの運動器疾患も、その後の発育と生産性に大きく関与することから、予後の判断にもPTH1Rシグナルが活用できないか検討したい。

### 3.2 周産期乳牛のインスリン抵抗性の評価

健常群と過肥群の血清グルコース濃度、血清インスリン活性値、血清NEFA濃度を比較したところ、過肥群の血清NEFA濃度が健常群よりも有意に高値を示した (Table 2)。上記3項目からインスリン感受性の指標であるRQUICKIを算出したところ、過肥群で健常群に比べ有意に低値を示し、過肥群のインスリン感受性が健常群に比べて低下していると考えられた (Fig. 2)。分娩後3週間以内の健康な乳牛237頭のRQUICKIが $0.48 \pm 0.15$ という報告と比較しても<sup>5)</sup>、本研究における過肥群のRQUICKIの値は顕著に低値であり、インスリン感受性の低下が推測された。

トリプトファン・キヌレニン経路の代謝産物である、トリプトファン、キヌレニン、キヌレン酸の血清濃度については、キヌレニンにのみ有意差が認められ、健常群に比較して過肥群で高値を示した (Table 3)。血清キヌレン酸濃度において健常群と過肥群の間に有意な差が認められなかったことは、ヒトや実験動物の肥満で知られるような、血清キヌレン酸濃度の上昇に由来するインスリン感受性の低下が牛では認められなかったことになり、過肥群のRQUICKI低値を裏付ける結果とならなかった。トリプトファンからキヌレン酸に代謝される過程において、トリプトファン2,3-



**Table 2** Serum concentrations of glucose, insulin and nonesterified fatty acid (NEFA) in postparturient Holstein dairy cows.

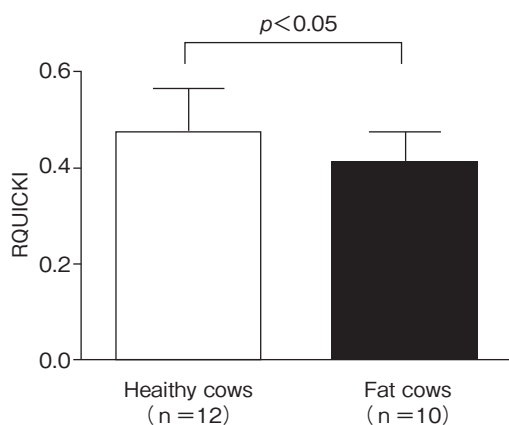
Items	Healthy cows (n = 12)	Fat cows (n = 10)	
Glucose (mg/dl)	61 ± 10	59 ± 17	NS
Insulin (mU/ml)	6.58 ± 1.77	5.89 ± 1.93	NS
NEFA (mM)	0.43 ± 0.18	1.10 ± 0.58	P < 0.05

Healthy cows : BCS < 4 and BHBA < 1.2 mM. Fat cows : BCS ≥ 4 and BHBA ≥ 1.2 mM. BCS : body condition score. BHBA : β - hydroxybutyric acid. NS : not significant. Mean ± SD.

**Table 3** Serum concentrations of tryptophan (TRP), kynurenine (KYN) and kynurenic acid (KYNA) in postparturient Holstein dairy cows.

	Healthy cows (n = 12)	Fat cows (n = 10)	
TRP (mM)	22.2 ± 7.51	16.74 ± 7.19	NS
KYN (mM)	4.82 ± 1.35	5.50 ± 1.66	P < 0.05
KYNA (mM)	5.31 ± 1.41	6.10 ± 1.83	NS

Healthy cows : BCS < 4 and BHBA < 1.2 mM. Fat cows : BCS ≥ 4 and BHBA ≥ 1.2 mM. BCS : body condition score. BHBA : β - hydroxybutyric acid. NS: not significant. Mean ± SD.



**Fig. 2** RQUICKI value in postparturient Holstein dairy cows. Healthy cows : BCS < 4 and BHBA < 1.2 mM. Fat cows : BCS ≥ 4 and BHBA ≥ 1.2 mM. BCS : body condition score. BHBA : β - hydroxybutyric acid. Mean ± SD.

ジオキシゲナーゼ (TDO), インドールアミン 2,3-ジオキシゲナーゼ (IDO), キヌレニンアミノトランスフェラーゼ (KAT) の3つの酵素が関与している。ヒトやマウスでは、TDOは主に肝臓に発現しており、IDOは肺や胎盤、KATは

肝臓、腎臓、および脳で発現している。本研究で得られた牛のキヌレニン酸の濃度は、ヒトの基準値 ( $40.6 \pm 16.1$  nM) よりも非常に高い値だが<sup>6)</sup>、牛は他の動物種と比較し、TDOの酵素活性が低いことが知られている<sup>7)</sup>。肝臓でのTDO活性が低い場合は、IDOによる代謝に依存する傾向があり、IDOが多く存在する肺や胎盤でのトリプトファン代謝量が増加する<sup>8)</sup>。肝臓で代謝されたトリプトファンは最終的に水と二酸化炭素に分解されるが、肺などで代謝されたトリプトファンはキヌレニン酸となり血中に放出される。これらのことから、牛で血中キヌレニン酸濃度が高値を示した要因として、肺や胎盤のIDOに依存したトリプトファン代謝経路の活性化が、血中キヌレニン酸濃度の増加に影響を及ぼしていると推測した。

なお3.2の内容は、第162回日本獣医学会学術集会(令和元年9月11日、茨城県つくば市)で、「周産期ホルスタイン種乳牛におけるキヌレニン代謝産物の特徴」として口頭発表した<sup>9)</sup>。

#### 4. 要 約

不適切な飼養管理により過肥になった牛はインスリン抵抗性が増加するなどして、さまざまな周産期疾患に罹患しやすくなる。肥満牛の脂肪が減少することは望ましいことであるが、起立不能牛の骨格筋減少は避けなくてはならない。そこで本研究ではまず、牛においてもインスリン感受性臓器である筋肉における関連の遺伝子発現について検討し、次いでインスリン抵抗性の評価にRQUICKIとキヌレン酸が有用かを検討した。その結果、関節炎子牛の筋萎縮が認められた大腿四頭筋でFBXO32遺伝子発現が多いことが分かり、牛においても筋萎縮にユビキチン・プロテアソーム系のタンパク質分解が関与していることが明らかとなった。またBCSとBHBA濃度で群分けした過肥群のRQUICKIの値は顕著に低値であり、インスリン感受性の低下が推測されたが、血清キヌレン酸濃度の上昇は認められなかった。今後は反芻動物の特異なトリプトファン代謝の関与も考慮

して、乳牛の肥満とインスリン抵抗性発現のメカニズムを解明したい。

#### 文 献

- 1) Bell, A. W. : *J. Anim. Sci.*, **73**, 2804~2819, 1995.
- 2) Bobe, G., Young, J. W., Beitz, D. C. : *J. Dairy Sci.*, **87**, 3105~3124, 2004.
- 3) Kir, S., Komaba, H., Garcia, A. P., Economopoulos, K. P., Liu, W., Lanske, B., Hodin, R. A., Bruce, M., Spiegelman, B. M. : *Cell Metab.*, **23**, 315~323, 2016.
- 4) Bal, N. C., Maurya, S. K., Sopariwala, D. H., Sahoo, S. K., Gupta, S. C., Shaikh, S. A., Pant, M., Rowland, L. A., Bombardier, E., Goonasekera, S. A., Tupling, A. R., Molkentin, J. D., Periasamy, M. : *Nat. Med.*, **18**, 1575~1579, 2012.
- 5) Holtenius, P., Holtenius, K. : *Acta Vet. Scand.*, **49**, 29~49, 2007.
- 6) Wurfel, B. E., Drevets, W. C., Bliss, S. A., McMillin, J. R., Suzuki, H., Ford, B. N., Morris, H. M., Teague, T. K., Dantzer, R., J B Savitz, J. B. : *Transl. Psychiatry*, **7**, e1115, 2017.
- 7) Badawy, A. A., Evans, M. : *Biochem. J.*, **158**, 79~88, 1976.
- 8) Shibata, K. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo)*, **64**, 90~98, 2018.
- 9) 興梠一成, 小川いづみ, 竹田湊一朗, 風間啓, 佐藤礼一郎, 恩田賢 : 第162回日本獣医学会学術集会・講演要旨集, 45, 2019.

# 離乳育成豚のリジン要求量に関する研究 —飼養成績と免疫能に及ぼす影響—

A study on requirements of lysine in weanling pigs

—Effects on growth performances and immune functions—

勝 俣 昌 也・鈴 木 武 人

(麻布大学獣医学部)

Masaya Katsumata and Takehito Suzuki

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

We conducted this study in order to determine lysine requirements of weanling-growing pigs estimated from their growth performances. Further, we also determined the effects of dietary lysine concentrations on ratios of subclasses of leukocytes in weanling-growing pigs. We prepared four tests diets of which concentrations of lysine were 0.95, 1.20, 1.70, and 1.95%, respectively and fed these diets to 5-week old barrows for 3 weeks. We estimated a lysine requirement of weanling-growing pigs from feed efficiencies during the latter 2 weeks of the feeding trial using broke-line regression analysis; the estimation is 1.69% as the concentration of total lysine in diets. The dietary lysine concentrations did not affect the magnitudes of increase in the ratios of subclasses of leukocytes during the feeding trial. Dietary lysine levels may not affect development of immune functions of weanling-growing pigs.

## 1. 目 的

本研究は、離乳育成豚のリジン要求量を、飼養成績と免疫能、2つの切り口から明らかにすることを目的として実施した。

日本飼養標準・豚(2013年版)<sup>1)</sup>によると、体重10~20kg(期待増体量470g/d)の豚の総リジン要求量は飼料中含量として1.13%である。一方、米国のNRC飼養標準(2012年版)<sup>2)</sup>では、体重11~25kg(同585g/d)の豚の総リジン要求量は1.40%となっている。NRC飼養標準に記載されているリジン要求量のほうが20%以上高い。日本飼養標準では1980年代のデータを使って推定しているのに対し、NRC飼養標準では多産系などタン

パク質蓄積能力が高い豚を視野に入れて新しいデータを採用した。このことが、20%以上のちがいに繋がっている。農林水産省の「豚の改良増殖をめぐる情勢」によると、1980年代の肥育豚の1日平均増体量は749g/dだったのに対し、2010年代になると1057g/dまで改良された。したがって、日本飼養標準・豚(2013年版)<sup>1)</sup>に記載されているリジン要求量を参考にして飼料を調製すると、リジン不足に陥るおそれ大きい。本研究では、日本国内で飼養されている豚のアミノ酸要求量を再検討する一環として、離乳育成豚のリジン要求量を明らかにする。

アミノ酸には、体タンパク質合成の材料となる「栄養素としての一次機能」のほかに、生体制御

や疾病の予防に寄与する「栄養素としての三次機能」がある。デキストラン硫酸ナトリウム投与で大腸炎を誘起したマウスにメチオニンを与えると、大腸炎の症状が緩和され、抗酸化ストレス指標が改善し、大腸の炎症性サイトカイン含量が低下した<sup>3)</sup>。また、分岐鎖アミノ酸が不足した飼料をマウスに給与すると免疫能が低下した<sup>4)</sup>。さらに、飼料に添加するアミノ酸の量を減らすと子豚の増体効率は悪くなるが、清浄度が低い環境では一層効率が悪くなった<sup>5)</sup>。これらのことは、アミノ酸が不足すると免疫能が低くなること、アミノ酸の要求量は飼育環境の清浄度に依存することを示唆している。しかし、アミノ酸の要求量という切り口で、豚の免疫能を詳細に解析した報告はない。本研究では、アミノ酸の要求量と免疫能の関係を解明する第一歩として、飼料中のリジン濃度が離乳育成豚の血液中の白血球サブクラスの割合に及ぼす影響を明らかにすることも目的とした。

## 2. 方 法

本研究は麻布大学動物実験委員会により審査され、承認を受けて麻布大学の豚舎施設で実施した(承認番号190701-4)。4週齢の去勢雄豚(品種名スイートマミー)を株式会社シムコの館山農場から導入した。導入後の1週間は市販人工乳を給与して予備飼育期間とし、その後、総リジンとして0.95%、1.20%、1.45%、1.70%、1.95%の5種類の飼料を給与して3週間飼育した。これらの試験飼料は試験担当者が設計し、一般社団法人科学飼料協会に配合を外注した。なお、試験期間中は1豚房に1頭を収容し、不断給餌、自由飲水、午前7時点灯・午後7時消灯の条件とした。飼育室の気温は制御しなかったが、床暖房とコルツヒーターを使い、床暖房直上の温度は33~34℃になるようにした。試験飼料は、トウモロコシ、大豆粕、魚粉、脱脂粉乳をベースとし、リジンを含めた結

晶アミノ酸を添加して調製した。後半2週間の飼料効率を指標としてSASのNLINプロシジャーで折れ線モデル(ガウス・ニュートン法<sup>6)</sup>)にあてはめ、総リジン要求量を推定した。さらに、飼養試験開始前と終了時に供試豚から採血し、末梢血中の白血球サブクラスを解析した。具体的には、フローサイトメーターで白血球5,000個あたりの各標的細胞数を測定して各標的細胞が全体に占める率を計算した。使用した一次抗体は、ヘルパーT細胞が抗CD4抗体、細胞傷害性T細胞が抗CD8抗体、単球が抗CD14抗体、成熟B細胞が抗CD21抗体、NK細胞が抗CD335抗体であった。さらに、抗CD4抗体と抗CD8抗体の両方に陽性を示す細胞をCD4/CD8両陽性T細胞として測定した。

飼養成績に関する統計処理；反復をブロック、飼料のリジン濃度を要因とし、乱かい法にのっとり1元配置の分散分析をSASのGLMプロシジャーで実施して、飼養成績に及ぼす飼料のリジン濃度の影響を検定した。リジン濃度の影響を検出した飼料効率については、SASのGLMプロシジャーでTukey法により、平均値間の差を検定した。リジン要求量の推定；SASのNLINプロシジャーを使い、ガウス・ニュートン法で折れ線モデルにあてはめて、リジン要求量を推定した。白血球サブクラスに関する統計処理；全供試豚14頭の白血球サブクラスの試験開始前の割合と終了時の割合の差を、サンプルの採取時を固定効果、豚をランダム効果とし、SASのMIXEDプロシジャー上で検定した。反復をブロック、飼料のリジン濃度を要因とし、乱かい法にのっとり1元配置の分散分析をSASのGLMプロシジャーで実施して、各白血球サブクラスの割合が試験期間中に増加した割合に及ぼす飼料のリジン濃度の影響を検定した。なお、京都大学学術情報メディアセンターのスーパーコンピューターを使ってSASによる解析を実

施した。

### 3. 結果と考察

方法に記載したように、総リジン濃度が0.95%, 1.20%, 1.45%, 1.70%, 1.95%の5種類の飼料を調製した。確認のためにリジン濃度を測定したところ、総リジン濃度1.45%として調製した飼料のリジン濃度が、1.20%として調製した飼料と同じ濃度だった。そのためか、1.45%の飼料を給与した供試豚の飼料効率が0.64となり、1.20%の飼料を給与したものより低くなった。また、日増体量は735g/dで0.95%の飼料を給与したものより低くなった。以上のことから、1.45%の飼料は調製に問題があったと判断し、総リジン濃度が0.95%, 1.20%, 1.70%, 1.95%の4種類の飼料を給与した供試豚から得たデータを本報告書に示す。

Table 1 に飼養成績を示す。飼料摂取量に飼料の総リジン濃度の影響はなかったが、0.95%と1.20%の平均値が高かった。飼料のリジン不足を補うために、飼料摂取量を高くすることで、必要とするリジンを摂取しようと供試豚が反応した可能性がある。飼料摂取の影響を受けたためか、日増体量にも飼料の総リジン濃度の影響は検出できなかった。飼料効率は飼料の総リジン濃度の影響を受け ( $p < 0.05$ )、0.95%と1.70%ならびに1.95%の間には差があった ( $p < 0.05$ )。

Table 2 と Fig. 1 に飼料効率を反応指標として折れ線モデルにあてはめた結果を示す。総リジン濃度の要求量は1.27%と推定され、その時の飼料効

率は0.70という推定値を得た。ガウス・ニュートン法による解析では推定値の95%信頼区間が示されており、総リジン要求量の高いほうの値は1.69%であった。要求量の推定値は安全率も考慮する必要があるため、本報告では総リジン要求量の推定値は1.69%を採用する。前述したように、日本飼養標準・豚 (2013年版)<sup>1)</sup>に記載されている体重10~20kg (期待増体量470g/d) の豚の総リジン要求量は1.14%である。本研究の供試豚の飼養試験後半2週間の体重は10~20kgに相当するが、日増体量は745~827g/dだった (Table 1)。仮に期待増体量750g/d, 飼料摂取量1000g/d, 離乳育成豚用の人工乳の回腸末端リジン消化率を90%とし、日本飼養標準・豚 (2013年版)<sup>1)</sup>で採用されている推定式 (1kgの増体に必要な標準化可消化リジンは17.4g) を使って総リジン要求量を計算すると1.45%となる。これはNRC飼養標準 (2012年版)<sup>2)</sup>に記載されている体重11~25kg (期待増体量585g/d) の豚の総リジン要求量 (1.40%) に近い。本研究では供試豚を単飼条件で飼育した。一方で、一般の養豚場では群飼で飼育する。単飼と群飼で日増体量がどのように変化するのか一概には言えないが、群飼した時の飼育密度が高いと日増体量は低くなるという報告が多い (例えば<sup>7)</sup>)。10~20kgの豚の期待増体量を750g/dとするのは高すぎるかもしれないが、470g/dは低すぎると考えるのが妥当であろう。いずれにしても、日本飼養標準・豚 (2013年版)<sup>1)</sup>に記載されている体重10~20kgの豚のリジン要

Table 1 Effects of dietary lysine concentrations on growth performances of weanling-growing pigs.

	0.95%	1.20%	1.70%	1.95%	SE	p value
Feed intake (g/d)	1267	1225	1077	1088	80	0.3229
Daily body weight gain (g/d)	748	827	745	760	62	0.7670
Feed efficiency	0.60 b	0.67ab	0.69 b	0.70 b	0.02	0.0281

n = 3

a, b :  $p < 0.05$



Table 2 Results of broken-line regression analysis.

	Estimation	SE	95% confidence limits		p value
Feed efficiency	0.6950	0.005	0.6315	0.7585	0.0864
Concentration of lysine	1.2673	0.0335	0.8418	1.6928	

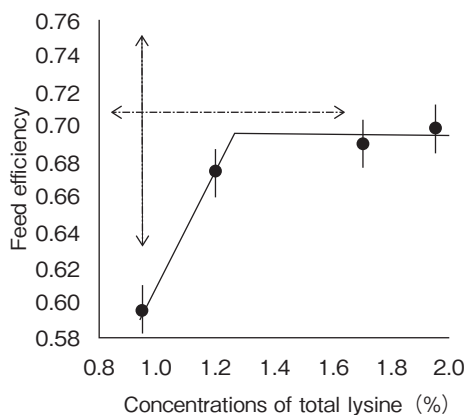


Fig. 1 The linear broken line.

←-----→ 95% confidence limits of concentration of lysine

←-----→ 95% confidence limits of feed efficiency

求量は、日本国内で現在飼育されている豚には低すぎると結論する。

Table 3 は白血球サブクラスの割合の結果である。全供試豚14頭の白血球サブクラスの試験開始前の割合と終了時の割合を比較した。CD4/CD8 両陽性T細胞は試験開始前よりも試験終了時に割合が高くなる傾向があった ( $p = 0.0638$ )。それ以外のサブクラスでは終了時の平均値のほうが開始前よりも低く、細胞障害性T細胞と単球では低くなる傾向があった ( $p = 0.0881$ と  $p = 0.0725$ )。各白血球サブクラスの割合の試験期間中の増加倍率に及ぼす飼料のリジン濃度の影響をTable 4に示した。いずれの白血球サブクラスにも飼料のリジン濃度の影響はなかった。わたしたちは、豚が成長すると各白血球サブクラスの割合が漸次高くなることを観察している<sup>8)</sup>。この現象は、豚の成長に伴い免疫能が発達することを反映したものと考えている。飼料中のリジン濃度が不足すると免

疫能の発達が遅延する——各白血球サブクラスの割合の増加が鈍くなる——と予想して本研究を企画したが、結果は予想を否定した。0.95%と1.20%の飼料摂取量の平均値は1.70%と1.95%の平均値よりも高かった。この現象は、飼料のリジン不足を補うために、飼料摂取量を高くすることで、必要とするリジンを摂取しようと供試豚が反応した可能性があると前述した。実際、リジン濃度には十分な差があるように飼料を調製したにも関わらず、日増体量には飼料のリジン濃度の影響はなかった。栄養素の飼料中の濃度だけでなく、栄養素の摂取量も栄養状態に影響することを考慮すると、各供試飼料のリジン濃度の違いほどは、供試豚の栄養状態に差はなかったのかもしれない。

本研究は3反復が終了したところで、さらに反復数を増やして、リジン要求量の推定精度を高くする必要がある。また、飼料のリジン濃度が豚の腸内細菌叢や小腸のアミノ酸トランスポーターの



**Table 3** Effects of timing of taking blood samples on ratios of each subclass of leukocytes (%).

	Antibodies used	Before*	End**	SE	p value
Helper T cells	CD4	7.2	7.5	0.9	0.7658
Cytotoxic T cells	CD8	7.3	5.2	1.1	0.0881
Monocytes	CD14	28.2	21.1	3.5	0.0725
Mature B cells	CD21	3.7	3.2	0.6	0.4959
Natural killer cells	CD335	3.9	3.5	1.4	0.6647
CD4/CD8 double-positive T cells	CD4/CD8	1.9	2.9	0.3	0.0638

n = 12

\*Before the feeding trial, \*\*At the end of feeding trial

**Table 4** Effects of dietary lysine concentrations on magnitudes of changes in ratios of each subclass of leukocytes during the feeding trial.

	Antibodies used	0.95%	1.20%	1.70%	1.95%	SE	p values
Helper T cells	CD4	1.3*	0.9	1.0	1.7	0.5	0.6574
Cytotoxic T cells	CD8	1.1	0.7	0.9	0.9	0.4	0.8950
Monocytes	CD14	1.2	0.6	1.0	0.8	0.3	0.6345
Mature B cells	CD21	1.7	0.7	0.8	1.4	0.4	0.3941
Natural killer cells	CD335	1.3	1.2	1.7	2.1	0.8	0.8325
CD4/CD8 double-positive T cells	CD4/CD8	2.3	1.0	2.9	2.3	0.6	0.4712

n = 3

\*Indicating ratio of positive cells was 1.3-fold higher at the end of the feeding trial as compared with before the feeding trial.

遺伝子発現に及ぼす影響についても今後の検討課題としたい。

#### 4. 要 約

本研究は、飼養成績を指標とした時の離乳育成豚のリジン要求量を明らかにするとともに、飼料中のリジン濃度が離乳育成豚の白血球サブクラスの割合に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実施した。総リジンとして0.95%、1.20%、1.70%、1.95%の4種類の飼料を5週齢の去勢雄豚に3週間給与した。これまでに3反復の飼養試験を終了している。給与期間の後半の2週間（体重10~20kgに相当）の飼料効率を反応指標とし、折れ線モデルにあてはめてリジン要求量を推定したところ、総リジンとして1.69%を推定値として得た。各白血球サブクラスの割合が試験期間中に

増加した割合に飼料のリジン濃度の影響はなかった。

#### 文 献

- 1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準・豚，2013年版，18，中央畜産会，東京，2013。
- 2) National Research Council of the National Academies：Nutrient Requirements of Swine，11<sup>th</sup> Revised Edition，211，The National Academies Press，Washington，D.C.，2012。
- 3) Liu, G., *et al.*： *Oncotarget*, 8, 44511~44520, 2017.
- 4) Calder, P. C.： *Journal of Nutrition*, 136, 288S~293S, 2006.
- 5) Van der Meer, Y., *et al.*： *Journal of Animal Science*, 94, 4704~4719, 2016.
- 6) Robbins, K. R. *et al.*： *Journal of Animal Science*, 84, E155~E165, 2006.
- 7) Wolter, B. F., *et al.*： *Journal of Animal Science*, 81, 836~842, 2003.
- 8) 鈴木ら：日本畜産学会第123回大会講演要旨集，I 06~04, 2017.

## 暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレイクスルー ：筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化 (不活化)の関与の検証

Breaking-through the heat stress-induced suppression of postnatal muscle growth : possible implication of nitration of myogenic stem cell activation factor HGF

辰巳 隆一・増原 夏海・Mohamed Zakaria Elhussiny・Vishwajit Sur Chowdhury・  
城戸 潤力・今富 奈々・Elgaabari Alaa Magdi Hassanein・  
松吉 祐児・中村 真子・古瀬 充宏  
(九州大学大学院農学研究院)

Ryuichi Tatsumi, Natsumi Masuhara, Mohamed Zakaria Elhussiny, Vishwajit Sur Chowdhury,  
Hirochika Kido, Nana Imatomi, Elgaabari Alaa Magdi Hassanein,  
Yuji Matsuyoshi, Mako Nakamura and Mitsuhiro Furuse  
(Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Hepatocyte growth factor (HGF) is known to be an essential factor that activates quiescent myogenic stem satellite cells to enter the cell cycle and contributes to *postnatal* muscle growth and regeneration after injury. Very recently, we found that recombinant HGF is nitrated by incubation with peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup> : a highly reactive biomolecule generated by reaction of NO and superoxide radicals) to lose the biological activity *in vitro* in a mole-ratio (HGF : peroxynitrite) dependent manner. Here we show that nitration of HGF has clear pH dependence with a maximum range at pH 7.3-7.4 ; the reaction occurs quickly within a few seconds after adding of peroxynitrite to recombinant HGF. These emerging results were obtained by ECL-Western blotting and hence possibly provides strong evidence for physiological significance of HGF nitration that abolishes satellite cell activation and the subsequent cell proliferation. Importantly, nitration of extracellular HGF was detected in pectoralis (breast) muscle of 10-day-old chicks that received acute heat-stress (housing at 37°C for 3 hr), as revealed by comparable direct-immunofluorescence microscopy of control (28°C for 3 hr) and heat-stressed samples stained with monoclonal antibody against nitrated HGF. More results on this novel issue await further study including species (broilers and hens), sex (male and female), housing temperature, duration of heat-stress, muscles (breast and thigh muscles), and fiber-types (slow and fast types), and may help in developing a novel strategy for application in meat production technologies and human sports science.

## 1. 目 的

地球温暖化の進行に伴い、特に家禽産業において、夏季の暑熱環境における肉用鶏の産肉量・肉質低下は経済的損失を招く深刻な問題であり、これを抑制する研究の進展は急務である。暑熱環境下の家禽で生じる代謝反応として、呼吸性アルカローシス、酸化ストレス（活性酸素種の生成）、筋タンパク質分解亢進があげられる。このうち、酸化ストレスと筋タンパク質分解亢進は産肉量や肉質を低下させる要因と考えられているが、それらの作用機構も含めた詳細は依然として不明である。

一方、骨格筋の成長（および肥大、萎縮、再生）は筋幹細胞（衛星細胞）の増殖活性に大きく依存していることが知られている<sup>1-4)</sup>。申請者は、衛星細胞の増殖活性を決定する活性化（休止期からG1期への復帰）と休止化（セルフリニューアル）の制御機構に関する一連の研究の過程で、「筋幹細胞の活性化の抑制機構」の存在を洞察し、その後の研究により、これが活性化因子HGF（肝細胞増殖因子；現在認知されている唯一の活性化因子）のチロシン残基のニトロ化による不活化であることを明らかにしつつある。タンパク質のニトロ化とは、芳香族アミノ酸（主にチロシン残基）にNO<sub>2</sub>が導入される化学修飾であり、生体内においては、NOラジカルと活性酸素の反応により速やかに生成するペルオキシナイトライト（ペルオキシ亜硝酸イオン：高反応性の短寿命の生体内分子）によって非酵素的にニトロ化が起こることが知られている（NOが導入されるニトロソ化とは異なる）。HGFは衛星細胞の増殖も促進するので、家畜・家禽の成長期、特に、衛星細胞のほとんどが増殖期にある肉用雛鶏の初期成長期においては、HGFのニトロ化（不活化）は筋の成長を大きく阻害すると考えられる。また、HGFは

線維芽細胞の増殖を抑制する働きもあるので、HGFのニトロ化（不活化）は筋肉内結合組織の発達を招き、結果として産肉量や肉質が低下すると予想される。

したがって本研究ではまず、HGFのニトロ化による不活化現象をさらに追究するとともに、暑熱ストレスによって上述の衛星細胞活性化・増殖因子HGFがニトロ化（不活化）するかどうかを、新規ツールであるニトロ化HGFに対する特異的モノクローナル抗体（昨年度末に作出済み）を用いて検証した。研究初年度の研究成果を報告する。

## 2. 方 法

### 2.1 HGFのニトロ化のpH・反応時間依存性

マウスリコンビナント精製HGF（R&D Systems社製、キャリアタンパク質不含）にペルオキシナイトライト（Dojindo社製）をモル比1：2000（HGF：ペルオキシナイトライト）で添加し、37°Cで30分間保持した。この際の反応液のpHは生理的値を含む7.1から7.6まで設定した。反応終了後、試料を10%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGE・ECL-Western blottingに供試した。用いた1次抗体は抗ニトロチロシンモノクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology社製）、2次抗体はHRP標識抗マウスIgG抗体（Sigma社製）であり、ECL試薬にて免疫反応を可視化した。また、同一の転写膜をSDS溶液で洗浄し結合した抗体を除去した後、抗HGFポリクローナル抗体（R&D Systems社製）によるECL-Western blottingを行いHGFを可視化した（リブロービング）。

同様に、モル比1：2000（HGF：ペルオキシナイトライト）、pH 7.2の条件下でHGFのペルオキシナイトライト処理を行い、反応開始後（ペルオキシナイトライト添加後）、7.5、45、60、300秒後にSDS処理にて反応を停止させた。先と同様

にECL-Western blottingを行い、HGFのニトロ化の反応時間依存性を調べた。

## 2.2 実験動物（暑熱感作）

室温28℃で育雛した10日齢の雄性肉用雛鶏（チャンキー：*Gallus gallus domesticus*）を湿度60±5%，室温35℃で3時間飼育し暑熱ストレスを負荷した。対照区の飼育温度は28℃とした。頸動脈放血後、浅胸筋を採取した後、マイナス80℃で試料を保存した。常法に従い、厚さ20μmの凍結切片を作成し蛍光免疫顕微鏡法に供試した。使用した抗ニトロ化HGF特異的モノクローナル抗体は、ヒトHGFのクリングルドメイン2のチロシンのニトロ化（ニトロチロシン）を認識するもので、その特異性はWestern blottingとELISAで確認済みである。また、ラット・ニワトリ凍結筋切片の蛍光免疫顕微鏡法により反応性も十分であることも確認済みである（未発表）。この抗体を蛍光物質（ALEXA）で標識し、蛍光免疫顕微鏡法に使用した（2次抗体は必要としない）。

## 2.3 筋幹細胞培養系での暑熱感作

10日齢の雄性肉用雛鶏の胸肉・腿肉からAllenら<sup>5)</sup>の方法に従い衛星細胞を単離し、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（純度95%以上の初代培養系の作出）。10%正常ウマ血清を含むDMEM基礎培地にて24時間培養した後、44℃で3時間暑熱ストレスを負荷した。対照区の培養温度は37℃とした。両群の衛星細胞を、Naldiniら<sup>6)</sup>の方法に従い1M NaCl溶液で10分間処理し、細胞外マトリックスに結合・保持されているHGFを回収した。得られた抽出液を遠心分離し、上澄液を先と同様に抗ニトロ化HGFモノクローナル抗体でECL-Western blottingに供試した。また、抗HGFポリクローナル抗体によるリプロービングを行い、ECL-Western blottingによりHGFを可視化した。暑熱感作後も培養を続け、細胞増殖・分化能を対

照区と比較した（細胞数および細胞融合率の測定）。

## 3. 結果と考察

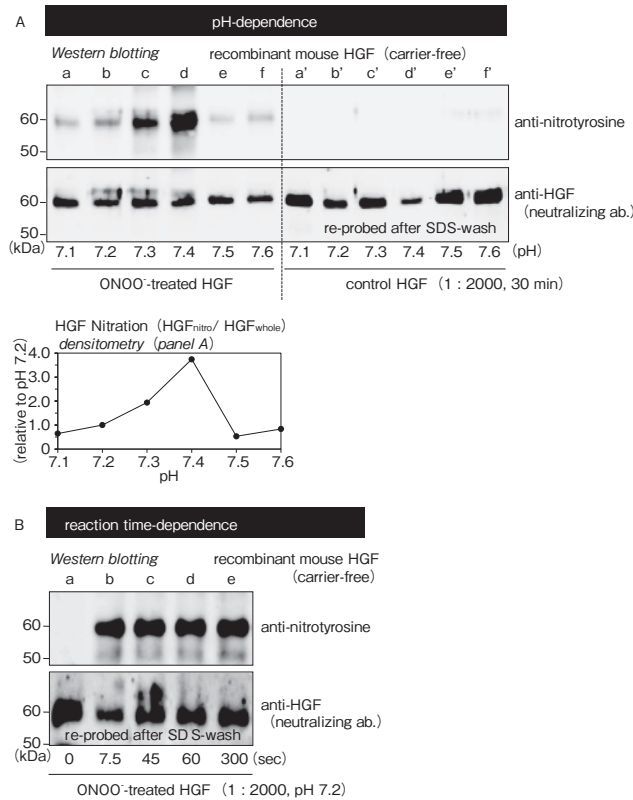
### 3.1 HGFのニトロ化のpHおよび反応時間依存性（*in vitro*実験）（Fig. 1）

種々のpH条件下でリコンビナント精製HGFをペルオキシナイトライトで処理し、ニトロ化誘導に及ぼす影響を調べた。パイロット実験で見出したHGFのニトロ化（不活性化）の生理学的重要性を追究するうえで重要な実験である。Fig. 1AのWestern blotting像が示すように、pH 7.4で最も強いシグナル（ニトロチロシンの生成）を検出した。pH 7.4より酸性側およびアルカリ性側ではシグナルは減少し、特にアルカリ側ではpH変化の影響は大きいことが分かった（Fig. 1Aのデンシトグラム参照）。これらの結果から、HGFのニトロ化反応には、ほぼ生理的pHで極大となる顕著なベル型のpH依存性があることが明らかになった。

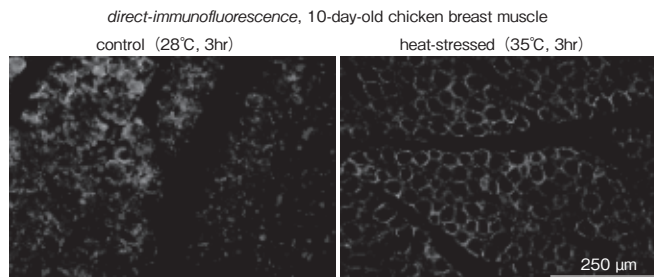
同様にペルオキシナイトライト処理時間を変えてニトロ化誘導に及ぼす影響を調べた（Fig. 1B）。最短の処理時間である7.5秒でも明瞭なシグナルが観察され、その強度は300秒（最長時間）まで大きな違いは認められなかった。したがって、HGFのニトロ化はきわめて短時間で起こる化学修飾反応であり、このことは、ペルオキシナイトライトの短寿命性（37℃、pH 7.2で約2秒）と一致する。生体内においても、ペルオキシナイトライトが生成されると極短時間でHGFのニトロ化が進行すると考えられた。

### 3.2 暑熱感作によってHGFはニトロ化されるか（*in vivo*実験）

10日齢の雄性肉用雛鶏を室温35℃で3時間飼育し暑熱ストレスを負荷した（対照区の飼育温度は28℃）。採取した胸肉（浅胸筋）の凍結切片を蛍



**Fig. 1** Nitration of recombinant HGF by peroxynitrite ( $\text{ONOO}^-$ ). (A) pH-dependence of HGF nitration, as revealed by ECL-Western blotting with anti-nitrotyrosine (upper row) and anti-HGF antibodies (lower row, re-probed image). Densitogram analysis standardized with HGF amount (relative unit). (B) Reaction time-dependence of HGF nitration. Incubated at mole ratio of 1 : 2000 (HGF : peroxynitrite) at  $37^\circ\text{C}$  for 30 min.



**Fig. 2** Heat-stress may induce nitration of extracellular HGF (fluorescence white), as revealed by direct-immunofluorescence microscopy with monoclonal antibody against nitrated HGF. Ten-day-old chicks were heat-stressed by housing at  $37^\circ\text{C}$  for 3 hr and assayed for nitration of extracellular HGF of breast muscle. Control, chicks at  $28^\circ\text{C}$  for 3 hr. Blue, nuclei visualized with DAPI.

光標識抗ニトロ化HGF特異的モノクローナル抗体で染色すると、筋線維の周囲(細胞外マトリックスと考えられる)が陽性反応を示した。その蛍

光強度は対照区に比べて高いことが認められた(Fig. 2;  $n = 3$ /グループ)。同じ胸肉(浅胸筋)であっても、試料を採取する部位によっては上記



の差に大きなばらつきが認められた。したがって、初年度ではまだ、暑熱感作によって細胞外マトリックスに存在するHGF（衛星細胞の活性化因子の供給源）がニトロ化されるかどうかを断言するに至らなかった。試料の採取から再度実施するなど、試料の条件を整備してから再度検討することとした。さらには、暑熱感作温度、時間、鶏の日齢なども含めて、実験条件を至適化する必要があると判断した。

### 3.3 暑熱感作によってHGFはニトロ化されるか（*in vitro*実験）

10日齢の雄性肉用雛鶏から単離・培養した衛星細胞に、前項の*in vivo*実験と同様に暑熱ストレスを負荷した。培養開始後24時間目に細胞外マトリックスに存在するHGFを含む画分を回収し抗ニトロ化HGF特異的モノクローナル抗体を用いてWestern blottingを行った。対照区と明瞭な差は認められなかった。細胞増殖・分化能も対照区と有為な差は観察されなかった。細胞培養系での暑熱感作条件の至適化が必要であることは明白であるが、別のアプローチとして、前項で暑熱感作した個体（筋）から衛星細胞を単離・培養し、同様に抗ニトロ化HGF特異的モノクローナル抗体を用いたWestern blottingにより解析するほうが確実であると判断した。

## 4. 要 約

本研究により、筋幹細胞（衛星細胞）の活性化・増殖因子HGFのニトロ化（不活化）には顕著なpH・反応時間依存性があることが明らかに

なり、この化学修飾反応の生理学的意義がより明確になった。暑熱ストレスによって活性酸素が生成されることは知られているので、衛星細胞の活性化に必要なNOラジカルと反応してペルオキシナイトライトが生成されることは強く予想される。したがって、家畜・家禽に負荷される暑熱ストレスによって衛星細胞の活性化・増殖が阻害され、筋の成長・肥大が抑制されると考えられる。肉用雛鶏を用いた*in vivo*・*in vitro*実験によってその可能性を検証し、それを示唆する結果を得ることができた。新規の研究プロジェクトの初年度に続き、次年度ではさらに実験データを蓄積する必要がある。「筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化（不活化）による筋の成長・肥大の抑制」という新奇作業仮説を実証し、夏季の暑熱環境における産肉量・肉質低下を改善する新しい飼育・管理技術の構築に貢献が期待される。

## 文 献

- 1) Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J., Halevy, O., Allen, R. E. : *Dev. Biol.*, **194**, 114~128, 1998.
- 2) Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Allen, R. E. : *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2909~2918, 2002.
- 3) Tatsumi, R., Allen, R. E. : *Anim. Sci. J.*, **79**, 279~290, 2008.
- 4) Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, **81**, 11~20, 2010.
- 5) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. M. : *Methods in Cell Biol.*, **52**, 155~176, 1997.
- 6) Naldini, L., Vigna, E., Bardelli, A., Follenzi, A., Galimi, F., Comoglio, P. M. : *J. Biol. Chem.*, **270**, 603~611, 1995.



## 骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索（Ⅱ） —質的向上も目指して—

Screening for phytochemicals that induce skeletal muscle hypertrophy  
—Aiming for quantitative improvement—

米 倉 真 一  
(信州大学農学部)

Shinichi Yonekura  
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

So far, we have shown from studies using cultured cells that thermal stimulation induced a fast-to-slow fiber-type shift of C2C12 mouse myoblasts. Thermal stimulation-induced shifting fiber type from fast to slow is through temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) channels present on membranes. Interestingly, not only temperature but also phytochemicals are known as ligands as TRP channels. Therefore, in this study we investigated the direct effects of capsaicin, which is an agonist of TRPV1, on shifting fiber type from fast to slow. In C2C12 cells and muscle satellite cells exposed to capsaicin, mRNA level of myosin heavy chain type I (MyHC I) was increased compared with the control cultures. The mRNA level of MyHC IIb was unaltered in both cells, compared with cells that were not exposed to capsaicin. These results indicated a fast-to-slow fiber-type shift in myoblasts. I also examined upstream signals that might be responsible for the fast-to-slow shift of fiber types. Capsaicin enhanced the mRNA of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) in C2C12 cells and muscle satellite cells. These data suggest that capsaicin induces a fast-to-slow fiber-type shift of myoblasts through PGC-1 $\alpha$ .

### 1. 目 的

世界規模の人口増加や気候変動によって食料危機が叫ばれるなか、良質な動物性タンパク質の安定供給は我が国のみならず、人類の生存にきわめて重要である。また、食肉の品質に対する消費者のニーズは多様であり、消費者を満足させるためにも肉質を自在に制御できる技術が求められている。食肉は家畜骨格筋が由来であることから、家畜1個体当たりの骨格筋量を増加させ、食肉の質も向上させる技術開発が強く望まれている。

食肉を構成する大部分を占める骨格筋は、筋管の集合体である筋繊維と、それを包む筋膜および結合組織から構成されている。筋繊維には、酸素利用や運動性の違いで分類された3つのタイプの繊維が存在しており、I型筋繊維（遅筋繊維）、II a、II b型筋繊維（速筋繊維）がある<sup>1)</sup>。各筋繊維の割合は食肉の嗜好性を左右する。一般的に、豚では、I型筋繊維の割合の多い骨格筋ほど食肉としての嗜好性は高いとされる<sup>2)</sup>。また黒毛和種牛の筋肉内脂肪交雑は、筋肉内のI型筋繊維の割合と正の相関関係を持つことが明らかになっ

ている<sup>3)</sup>。よってI型筋線維を増やすことが食肉の嗜好性向上につながる。

これまで我々は培養細胞を用いた研究から、温度刺激によって筋肥大が促進することを明らかにしている<sup>4)</sup>。具体的には、骨格筋の分化や再生を研究するためのin vitroモデルとして広く利用されているマウス筋芽細胞株C2C12を用いて検討した結果、通常温度(37°C)で培養したC2C12細胞と比べて、マイルドヒート条件下(39°C)で培養した細胞は分化が促進することを明らかにした。また温度刺激による筋肥大は、骨格筋細胞の膜上に存在する温度感受性のTRPV1受容体を介して生じることを見出した。興味深いことに、このTRPV1受容体は温度のみならず植物由来成分を特異的リガンドとする受容体であることが知られている。昨年度の研究により、TRPV1のアゴニストであるカプサイシンは、筋芽細胞同士の融合を促進させることで筋形成能を高める作用を有することを明らかとした。

一方、温度刺激はTRP受容体を介して遅筋繊維(I型筋線維)の発現量増加および遅筋線維への移行も促進することを明らかにしている。昨年度の研究助成の成果と合わせて考えると、TRPV1のアゴニストもまたI型筋線維への移行を促進する効果を有することが考えられる。よって本研究では、肉牛の筋肉量・肉質を向上させる飼養技術開発を目指すうえで、TRPV1のアゴニストとして知られている植物由来成分がI型筋線維への移行を促進する効果を有するのか明らかにすることを目的に検討した。

## 2. 方 法

### 2.1 細胞培養

マウス筋芽細胞株C2C12は、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

ーストレプトマイシン)を1%の濃度になるように添加した増殖用培地を用いて培養した。2% HS (Horse serum) 含有DMEM (分化培地) に置換し、分化誘導刺激を行った。筋サテライト細胞の培養は、マウスのヒラメ筋および前脛骨筋をCollagenase II溶液を用いて単離した後、ダルベッコ変性イーグル培地(DMEM, high glucose)に、胎児由来血清(FBS)を10%、抗生物質(ペニシリンーストレプトマイシン)を1%の濃度になるように添加した増殖用培地を用いて培養した。2% HS (Horse serum) 含有DMEM (分化培地) に置換し、分化誘導刺激を行った。カプサイシンが筋繊維タイプに及ぼす影響の検討には、1  $\mu$ Mのカプサイシンを含む分化培地(コントロールとして溶媒を添加)で分化誘導刺激を行った。

### 2.2 リアルタイムPCR

トータルRNA抽出にはTRIzolを使用した。TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraserの手順に従い、cDNAを作成した。PCR反応試薬にはTaKaRa SYBR Premix ExTaqを用い、リアルタイムPCRを行った。GAPDHを内部標準として相対定量解析を行った。統計解析にはt検討を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 2.3 マウスを用いた評価

マウス前脛骨筋もしくはヒラメ筋にヘビの毒素であるカルディオトキシン(CTX)を10  $\mu$ M注入し、障害に伴う筋再生を誘導した。CTX注入の3日前より毎日1  $\mu$ Mのカプサイシンを注入し、カプサイシン注入後8日目の筋組織を摘出した。RNAを単離後、リアルタイムPCR法を用いて、MyHCアイソフォームおよびPGC-1  $\alpha$  遺伝子の発現量を解析した。統計解析にはt検討を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 カプサイシンがC2C12筋芽細胞の筋繊維タイプに及ぼす影響

C2C12細胞の分化誘導刺激と同時に、TRPV1の代表的なアゴニストとして広く知られているカプサイシン  $1 \mu\text{M}$ を培地に添加し、72時間後の細胞を用いて検討した (Fig. 1)。その結果、カプサイシン処理により遅筋タイプ筋繊維で発現するMyHC I遺伝子の発現量が、未処理群に比べ、有意に上昇していることも明らかとなった。一方、速筋タイプ筋繊維で発現するMyHC IIb遺伝子の発現量には変化が認められなかった。これらの結果より、カプサイシンに筋繊維タイプの遅筋化を促進する作用があることが示唆された。これまでミトコンドリアの生合成に関わる peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) 骨格筋において筋繊維タイプの遅筋化を促す作用があることが報告されている<sup>5)</sup>。続いて、カプサイシン処理によるPGC-1 $\alpha$ 遺伝子発現量の変化を検討した結果、カプサイシン処理によりPGC-1 $\alpha$ 遺伝子の発現量も、未処理群に比べ、有意に上昇していることが明らかとなった。

#### 3.2 カプサイシンが筋サテライト細胞の筋繊維タイプに及ぼす影響

続いて、マウスのヒラメ筋 (遅筋タイプ優位) および前脛骨筋 (速筋タイプ優位) よりサテライト細胞を単離培養し、カプサイシンが筋サテライト細胞の筋繊維タイプに及ぼす影響を検討した。ヒラメ筋由来のサテライト細胞では、カプサイシン処理によりMyHC I遺伝子およびPGC-1 $\alpha$ 遺伝子の発現量は、未処理群に比べ、有意に上昇していることが明らかとなった (Fig. 2A)。またMyHC IIb遺伝子の発現量に変化は認められなかった。一方、前脛骨筋由来のサテライト細胞では、カプサイシン処理によりMyHC IおよびMyHC IIb遺伝子の発現量に変化は認められなかったが、PGC-1 $\alpha$ 遺伝子の発現量は、未処理群に比べ、有意に上昇していることが明らかとなった (Fig. 2B)。これらの結果から、少なくとも遅筋タイプ優位のヒラメ筋由来のサテライト細胞に対して、カプサイシンは遅筋化を促進する作用があることが示唆された。速筋タイプ優位の前脛骨筋由来のサテライト細胞では、カプサイシン処理によりMyHC I発現量に変化が認められなかったことから、遅筋化を促進する作用を見出せなかった。

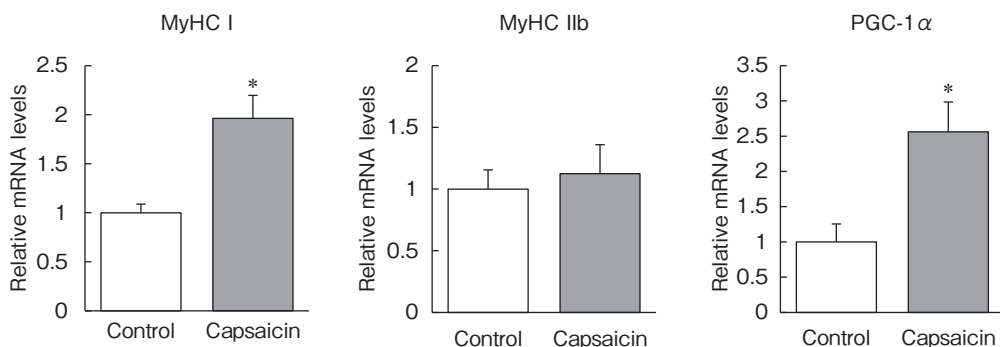


Fig. 1 Capsaicin induces a fast-to-slow fiber-type shift of C2C12 myoblasts. Myofiber-related gene expression in control and  $1 \mu\text{M}$  of Capsaicin-treated C2C12 cells for 72 h, assessed using real-time PCR of MyHC I, MyHC IIb, and PGC-1 $\alpha$  mRNA. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM for three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$  compared with the control, determined using the Student  $t$ -Test.

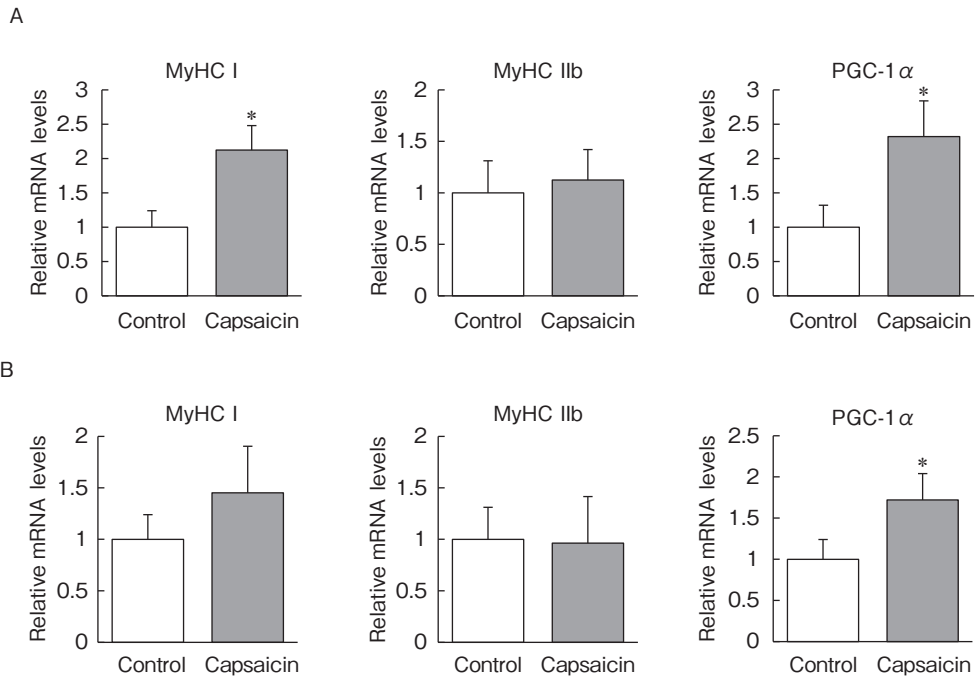


Fig. 2 Capsaicin induces a fast-to-slow fiber-type shift of satellite cells in soleus muscle (A) and tibialis anterior muscle. Myofiber-related gene expression in control and 1  $\mu$ M of Capsaicin-treated satellite muscle cells for 72 h, assessed using real-time PCR of MyHC I, MyHC IIb, and PGC-1 $\alpha$  mRNA. Data are represented as the mean  $\pm$  SEM for three independent experiments. \* indicates  $p < 0.05$  compared with the control, determined using the Student  $t$ -Test.

が、PGC-1 $\alpha$  遺伝子発現量の有意な上昇が見られた。よって現在、異なるカプサイシン濃度と刺激時間による検討を行っているところである。

### 3.3 カプサイシンがマウスの筋再生能に及ぼす影響

培養細胞を用いた実験より、カプサイシンには少なくともヒラメ筋由来のサテライト細胞に対して遅筋化を促進する作用を有することが明らかとなった。続いて、マウスモデルを用いた検証を行った。マウスヒラメ筋にヘビの毒素であるカルディオトキシ (CTX) を10  $\mu$ M注入し、障害に伴う筋再生を誘導した。CTX注入の3日前より毎日1  $\mu$ Mのカプサイシンを注入し、カプサイシン注入後8日目の筋組織を摘出、RNAを単離後、リアルタイムPCR法を用いて、MyHCアイソフォームおよびPGC-1 $\alpha$  遺伝子の発現量を解析

した。その結果、MyHC I、MyHC IIbおよびPGC-1 $\alpha$  遺伝子発現量に変化は認められなかった。現在、より高いカプサイシン濃度を用いて検討中である。

## 4. 要 約

骨格筋の肥大、肉質を制御する飼養技術が強く望まれているものの、骨格筋形成の分子機構はいまだ未解明な点が多く、また筋繊維タイプの制御機構も不明な点が多いことから、筋肥大や筋繊維タイプの制御を促す効果的な作用点が定められていないことが、ボトルネックとなっている。これまで我々は、培養細胞を用いた研究から温度刺激によって筋肥大が促進することを明らかにしており、また温度刺激による筋肥大は、骨格筋細胞の膜上に存在する温度感受性のTRPV 1 受容体を介

して生じることを見出した。また前年度の研究より、TRPV1のアゴニストとして知られているカプサイシンが、筋芽細胞の融合を促進することで、筋形成を促進することを明らかにしている。さらに温度刺激は遅筋繊維（I型筋線維）の発現量増加および遅筋線維への移行も促進することを明らかにしていることから、カプサイシンがI型筋線維への移行を促進する効果を有するのか明らかにすることを目的に検討した。本研究により、カプサイシンは、PGC-1 $\alpha$ 遺伝子発現の上昇を促すことで、遅筋化を促進する作用を有することが明らかとなった。今回の研究では、速筋タイプ優位の前脛骨筋由来のサテライト細胞では、遅筋化を促進する明白な効果が認められなかったことから、その可能性を探ることが重要である。また、動物個体レベルにおいてもカプサイシンに遅筋化を促進する作用を有するのか検討する必要がある。またカプサイシン以外にもギンゲロールやアリシン等、TRPV1の植物由来アゴニストは知られていることから、これら物質の遅筋化促進能を

検討することも、将来、家畜の飼料化を考えるうえで重要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Staron, R. S., Hikida, R. S. : Histochemical, biochemical and ultrastructural analysis of single human muscle fibers, with special reference to the C-fiber population, *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 40, 563~568, 1992.
- 2) 渡邊康一：筋線維型と食肉のおいしさ —反芻動物特異的I型筋線維の産肉論的機能形態学解析—, 東北畜産学会報, 6 (61), 1~6, 2016.
- 3) 衛藤哲次, 篠原孝, 文田登美子, 川畑健次, 阪下邦仁, 大園正陽, 岩元久雄, 後藤貴文：黒毛和牛骨格筋における筋線維型構成と骨格筋内脂肪含量の関係に関する研究, 九州大学農学部附属農場研究報告, 11, 51~55, 2003.
- 4) Hayashi, S., Yonekura, S. : Thermal stimulation at 39°C facilitates the fusion and elongation of C2C12 myoblasts, *Animal Science Journal*, 90(8), 1008~1017, 2019.
- 5) Lin, J., Wu, H., Tarr, P. T., Zhang, C. Y., Wu, Z., Boss, O., Michael, L. F., Puigserver, P., Isotani, E., Olson, E. N., Lowell, B. B., Bassel-Duby, R., Spiegelman, B. M. : Transcriptional co-activator PGC-1 $\alpha$  drives the formation of slow-twitch muscle fibres, *Nature*, 418, 797~801, 2002.

## 黒毛和種繁殖雌牛の放牧行動における群内個体差は 生産成績と関連するか？

Are inter-individual differences in grazing behavior of Japanese Black cows in a herd related with production performance ?

安 在 弘 樹  
(宮崎大学農学部)

Hiroki Anzai  
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Maintenance and social behavior of 12 breeding Japanese Black cows under grazing was measured through a grazing season to find behavioral traits that consistently differ among individual cows across time and situations and to examine the relationships of the behavioral traits with production-related traits of individuals. Time spent grazing and resting, dominance index, actor and reactor frequency of agonistic behavior, activity intensity and traveling distance were consistently differ among the focal cows across the days of the investigation although sward and climate conditions varied across the grazing season. Time spent grazing was negatively correlated with age and body condition score (BCS), and time spent resting was inversely correlated with these traits. Dominance index and actor frequency were positively correlated with age, and reactor frequency was negatively correlated with age and BCS. Time budget, activity intensity and traveling distance were not correlated with traits of reproductive performance. Individual management for cows that spent more time grazing and less time resting than the herd mates will have a potential to maintain BCS of all animals within an appropriate range and consequently improve reproductive performance.

### 1. 目 的

動物における行動の個体差は、気象条件や餌の質と量、捕食者リスクといった日々変化する環境に対する適応能力を制限してしまうため、個体の適応度 (fitness, 生存と繁殖) に影響を及ぼす<sup>1)</sup>。そのため、家畜の場合は成長や繁殖成績などの生産性に直結すると考えられる<sup>2)</sup>。しかしながら、家畜の放牧行動の個体差に着目し、生産成績との関連を検討した研究は限られており、放牧中のような行動が状況や時間の変化によらず群内の

個体間でどの程度一貫した傾向を示し、生産性に関わる指標とどの程度関連するのかについては不明な点が多い。

本研究では、同一牛群に属し、同一の環境下で放牧される黒毛和種繁殖雌牛を対象として、個体の生存や繁殖との関連が大きいと考えられる採食などの主要な維持行動および攻撃性や群内での社会的順位などに関連する社会行動を測定し、状況や時間の変化によらず一貫した個体差を示す行動を探索するとともに、それらの行動間の関連および生産に関わる個体の特徴・指標との関連につい



て検討した。

## 2. 方 法

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内の試験草地 (1.1ha) および休息場 (0.4ha) からなる放牧地において、2019年5～10月の各月に3～5日間、黒毛和種牛群 (成雌牛29～33頭、子牛10～15頭) を、およそ9～10時から16時まで放牧した。放牧期間中に分娩等によって群から離れる予定のない成雌牛12頭を主調査個体とし、放牧中の行動 (採食、休息、反芻、歩行およびその他) を5分間隔で観察するとともに、1日1頭当たり60～90分間、敵対行動を観察した (5～10月、合計11日)。観察個体が敵対行動を起こしたか (Actor)、受けたか (Reactor)、勝敗、相手個体を記録した。群内での優位性を表す指標として、以下の式を用いて各個体のDI (dominance index) を算出した。

$$DI = D / (D + S)$$

ここで、Dはその個体が優勢だと確認された相手の数を、Sはその個体が劣勢だと確認された相手の数を表す。主調査個体に加速度ロガー (GDCD X16-4, Gulf Coast Data Concepts, MS, USA) およびGPSロガー (i-gotU GT-600, Mobile Action, Taipei, Taiwan) を固定した首輪を取り付け、放牧期間中の牛の加速度情報を25Hzで測定し、位置情報を30秒間隔で測位した。加速度データから動的加速度のベクトル和を算出し、放牧時間中の平均値を活動量の指標とした (8, 10月、合計8日間)。また、位置情報の推移から放牧時間中の移動距離を算出した (7, 9, 10月、合計14日間)。

ボディコンディションスコア (BCS) は各月の放牧最終日に3人の観察者が1 (痩せている) ～10 (太っている) で評価し、平均値を当月の値とした。その他の生産関連指標は住吉フィールドの

個体管理データによった。

各行動の時間割合、敵対行動のActorおよびReactorとなった頻度、DI、活動量および移動距離について、調査期間を通じた個体間一貫性をケンドールの一致係数 ( $W$ ) を用いて評価した。また、それらの行動変数と齢、体重、BCS、分娩後日数および繁殖成績 (初産月齢、平均分娩間隔、子牛の生時体重および日増体) の関係をスピアマンの順位相関係数 ( $r_s$ ) を用いて評価した。

## 3. 結果と考察

放牧時間の大半が採食に費やされ、その割合は全調査日の平均で10% (1日当たり約40分) 程度の間で個体によって異なった (Table 1)。また、敵対行動のActorおよびReactorとなる頻度はともに、1時間当たり1回以下から8回以上と個体によって大きく異なった。採食時間割合、休息時間割合、調査日ごとに求めたDI、ActorおよびReactor頻度、活動量および移動距離は調査期間にわたって一貫した個体差を示した (Table 2)。これらの行動時間割合は、放牧季節を通して気象条件や草地の状態が大きく変動したにも関わらず、ある程度一貫して維持された個体差を持つ行動特性であると考えられた。一方で、放牧時間が限られ、採食に多くの時間を割いた本研究の放牧条件下では、歩行および反芻の時間割合は一貫した個体差を持つ行動特性ではないと考えられた。そのため、以降の相関解析からは除外した。社会的優位性は、その長期安定性が報告されており<sup>3)</sup>、安定した個体の性格特性のひとつであると考えられる。Reactor頻度はDIよりもわずかに個体間一貫性が小さかったが、Actor頻度はDIと同程度、状況や時間の変化によらず一貫した個体の行動特性であると考えられた。活動量および移動距離も調査期間にわたって一貫した個体差が見られた。これらの行動変数はその他の行動変数と調査期間

**Table 1** Descriptive statistics of behavioral and production-related variables by cow

Variables	n	Mean	SE	Minimum	Maximum
Proportion of grazing time	12	0.868	0.011	0.807	0.911
Proportion of resting time	12	0.057	0.007	0.024	0.096
Proportion of walking time	12	0.039	0.002	0.030	0.050
Proportion of ruminating time	12	0.017	0.002	0.005	0.028
DI	12	0.62	0.08	0.06	0.93
Actor frequency (/h)	12	4.20	0.76	0.58	9.21
Reactor frequency (/h)	12	3.05	0.61	0.55	8.45
Activity intensity (g)	12	0.28	0.01	0.24	0.38
Traveling distance (m)	12	2076	45	1837	2362
Age (year)	12	10.1	1.1	3.9	15.9
Body weight (kg)	12	485.2	16.0	430.6	633.9
Body condition score	12	5.0	0.6	2.6	8.6
Days after last calving	12	198.9	31.7	88.0	453.0
Age at first calving (month)	12	30.8	1.7	22.9	40.2
Mean calving interval (day)	12	409.8	14.0	367.8	522.0
Mean birth weight of calves (kg)	12	33.9	0.8	29.3	39.5
Mean daily gain of calves (steer)	8	0.84	0.02	0.78	0.98
Mean daily gain of calves (heifer)	11	0.72	0.02	0.57	0.90

Behavioral variables were averaged across days of investigation.

Age and days after calving were at 25th May 2019.

Body weight and body condition score were averaged from May to October 2019.

**Table 2** Inter-individual consistency of behavioral variables among 12 focal cows across days of investigation

Variables	<i>W</i>	Significance
Proportion of grazing time	0.368	***
Proportion of resting time	0.376	***
Proportion of walking time	0.111	NS
Proportion of ruminating time	0.044	NS
DI (on a daily basis)	0.593	***
Actor frequency (/h)	0.601	***
Reactor frequency (/h)	0.493	***
Activity intensity (g)	0.771	***
Traveling distance (m)	0.431	***

*W*: Kendall's coefficients of concordance.

NS  $p \geq 0.1$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

が異なるため比較はできないが、状況や時間の変化によらず一貫した個体の行動特性であると考えられた。

採食と休息の時間割合は、両者の排他的な関係により強い負の相関があった (**Table 3**)。DIはActor頻度との間に強い正の相関が、Reactor頻度との間に強い負の相関があった。これは観察された全敵対行動においてActorの勝率が0.97であ

り、Reactorによる反撃でReactor側が勝ちとなるケースはきわめてまれであったためであると考えられる。敵対行動のReactor頻度は採食時間割合との間に正の、休息時間割合との間に負の相関があったが、Actor頻度およびDIは行動時間割合と有意な相関はなかった。このことから、個体の社会的優位性や攻撃性は採食や休息といった維持行動の割合には大きな影響を及ぼさなかったと考え

Table 3 Spearman's rank correlation coefficients between behavioral variables

	Proportion of resting time	DI	Actor frequency	Reactor frequency	Activity intensity	Daily traveling distance
Proportion of grazing time	-0.965***	-0.462 NS	-0.329 NS	0.622*	0.259 NS	0.231 NS
Proportion of resting time		0.448 NS	0.280 NS	-0.643*	-0.322 NS	-0.224 NS
DI			0.895***	-0.944***	-0.014 NS	-0.364 NS
Actor frequency				-0.762**	-0.077 NS	-0.189 NS
Reactor frequency					0.203 NS	0.413 NS
Activity intensity						-0.014 NS

$n = 12$ .

NS  $p \geq 0.1$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

Table 4 Spearman's rank correlation coefficients between behavioral and production-related variables

	Age	Body weight	Body condition score	Days after last calving	Age at first calving	Mean calving interval	Mean birth weight of calves	Mean daily gain of calves (steer)	Mean daily gain of calves (heifer)
Proportion of grazing time	-0.622*	-0.245 NS	-0.636*	-0.476 NS	-0.182 NS	0.462 NS	0.042 NS	0.359 NS	-0.273 NS
Proportion of resting time	0.615*	0.336 NS	0.734**	0.490 NS	0.210 NS	-0.434 NS	-0.091 NS	-0.261 NS	0.161 NS
DI	0.657*	0.357 NS	0.385 NS	0.469 NS	0.385 NS	-0.601*	-0.035 NS	-0.429 NS	0.152 NS
Actor frequency	0.657*	0.126 NS	0.161 NS	0.189 NS	0.196 NS	-0.538 †	-0.217 NS	-0.639 †	0.225 NS
Reactor frequency	-0.755**	-0.392 NS	-0.594*	-0.657*	-0.462 NS	0.573 †	0.014 NS	0.380 NS	-0.145 NS
Activity intensity	-0.455 NS	0.168 NS	-0.210 NS	-0.273 NS	0.070 NS	-0.112 NS	0.441 NS	0.592 NS	0.225 NS
Daily traveling distance	-0.448 NS	-0.336 NS	-0.210 NS	-0.175 NS	-0.315 NS	0.287 NS	-0.455 NS	-0.150 NS	0.080 NS

$n = 12$  except for mean daily gain of calves (steer,  $n = 8$ ; heifer,  $n = 11$ ).

NS  $p \geq 0.1$ ; † $p < 0.1$ ; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ .

られた。活動量および移動距離は他のどの行動変数とも有意な相関がなかった。これらの変数はいずれも個体の活動性を表し、代謝体重当たりのエネルギー消費の指標となると考えられる<sup>4)</sup>。しかし、同日に取得したデータにおいても、両者の間および採食時間割合との間に相関はなかった。

採食時間割合は、齢およびBCSとの間に負の相関があり、休息時間割合とこれらの変数の関係は、ほぼ逆の傾向を示した (Table 4)。BCSが低い個体は、他個体より長く採食することでエネルギー摂取を補おうとしたと考えられる。行動時間割合と分娩後日数の間に有意な相関はなかったが、BCSと分娩後日数の間で正の相関があった ( $r_s = 0.685$ ,  $p < 0.01$ ) ことから、分娩や泌乳等に伴う一時的な負のエネルギー収支によるBCSの低下も採食時間の増加と休息時間の減少に繋がると

考えられる。BCSが低い状態が続くと繁殖成績の低下を引き起こすと言われている<sup>5)</sup>。本研究では行動時間割合と繁殖成績の間に有意な相関はなかったが、採食時間が他個体より長く、休息時間が短い個体に対して補助飼料の給与などの個体別管理を行うことができれば、群内の個体のBCSを適切な範囲に維持することができ、繁殖成績の改善にも繋がる可能性が示唆された。DIおよびActor頻度は齢との間に正の相関があった。Reactor頻度は齢およびBCSとの間に負の相関があった。以上より、加齢は敵対行動を起こす頻度の増加と受ける頻度の減少によって、社会的優位性に正の影響を及ぼすが、BCSは敵対行動を受ける頻度との関係を通じて、社会的優位性と間接的に関連すると考えられた。DIおよびActor頻度が高く、Reactor頻度が低い個体は平均分娩間隔が

短い傾向にあった。齢とこれらの行動変数との相関を考慮すると、高齢で繁殖成績の優れない個体はすでに群から淘汰されていたためである可能性が考えられる。また、Actor頻度と子牛（去勢）の増体に負の相関の傾向があった。しかし、子牛（去勢）の増体は8頭分のデータしかなく、過去の研究でも優位性と繁殖成績との間に有意な関係は見られていない<sup>6)</sup>ことから、社会的優位性や攻撃性と繁殖成績との関係については今後さらなる検討が必要であろう。活動量および移動距離はいずれの生産関連指標とも有意な相関はなかった。個体へのセンサーの装着に基づくこれらの指標は、長期間にわたって多個体に対するデータ収集が可能である。本研究では全調査個体のデータを収集できた時期と日数が限られたが、今後、より長期的で多くの個体を対象とした行動モニタリングを実施し、放牧牛の行動における群内の個体差と繁殖成績の関連性を詳細に検討することは、個体の繁殖管理や健康管理の精密化に役立つだろう。

#### 4. 要 約

放牧下の黒毛和種繁殖雌牛12頭を対象とし、放牧季節を通して個体の維持や社会性に関わる行動を測定し、状況や時間の変化によらず一貫した個体差を示す行動を探索するとともに、生産に関わる個体の指標との関連について検討した。放牧季節を通して気象条件や草地の状態が大きく変動したにも関わらず、採食時間割合、休息时间割合、DI、敵対行動におけるActorおよびReactor頻度、活動量および移動距離は調査期間にわたって一貫した個体差を示した。採食時間割合は、齢および

BCSとの間に負の相関があり、休息时间割合とこれらの変数の関係は、ほぼ逆の傾向を示した。DIおよびActor頻度は齢との間に正の相関があった。Reactor頻度は齢およびBCSとの間に負の相関があった。行動時間割合、活動量および移動距離と繁殖成績との間に有意な相関はなかった。採食時間が他個体より長く、休息时间が短い個体に対して個体別管理を行うことができれば、群内の個体のBCSを適切な範囲に維持することができ、繁殖成績の改善にも繋がる可能性が示唆された。

#### 文 献

- 1) Smith, B. R., Blumstein, D. T. : Fitness consequences of personality : a meta-analysis, *Behav. Ecol.*, **19**, 448~455, 2008.
- 2) Wesley, R. L., Cibils, A. F., Mulliniks, J. T., Pollak, E. R., Petersen, M. K., Fredrickson, E. L. : An assessment of behavioural syndromes in rangeland-raised beef cattle, *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **139**, 183~194, 2012.
- 3) Foris, B., Zebunke, M., Langbein, J., Melzer, N. : Comprehensive analysis of affiliative and agonistic social networks in lactating dairy cattle groups, *Appl. Anim. Behav. Sci.*, **210**, 60~67, 2019.
- 4) Brosh, A., Henkin, Z., Ungar, E. D., Dolev, A., Orlov, A., Yehuda, Y., Aharoni, Y. : Energy cost of cows' grazing activity : Use of the heart rate method and the Global Positioning System for direct field estimation, *J. Anim. Sci.*, **84**, 1951~1967, 2006.
- 5) Mulliniks, J. T., Cope, E. R., McFarlane, Z. D., Hobbs, J. D., Waterman, R. C. : Drivers of grazing livestock efficiency : how physiology, metabolism, experience and adaptability influence productivity, *J. Anim. Sci.*, **94**, 111~119, 2016.
- 6) Šárová, R., Špinka, M., Ceacero, F. : Higher dominance position does not result in higher reproductive success in female beef cattle, *J. Anim. Sci.*, **95**, 3301~3309, 2017.

## 茎葉多収型飼料用イネの茎部に蓄積する炭水化物の 栄養的意義と生産現場との技術的連携

Nutritional value of carbohydrates accumulated in forage rice with high stem yield, and development of research-based cooperative extension service

近藤 誠・Budi Wardiman・Randi Mulianda

(三重大学大学院生物資源学研究科)

Makoto Kondo, Budi Wardiman and Randi Mulianda

(Graduate School of Bioresources, Mie University)

Whole crop rice silage has been used as feed for dairy cattle in Japan. Indigestibility of unhulled grains in the digestive system of cattle causes an energy loss through excretion. Thus, rice cultivars that produce large shoot biomass with extremely small panicles (small panicle cultivars) have been developed to reduce the energy loss as well as to supply a large quantity of fibers. Last year, we reported that small-panicle cultivars Tachiyaka (TA) and Tachisuzuka (TS) accumulated a higher concentration of sugars and starch in stems during the grain filling period than large-panicle cultivars, Hoshiaoba (HA) and Kusanohoshi (KH) did. Small-panicle cultivars also showed higher fiber digestibility in rumen than large ones. However, these experiments used forage rice at harvesting, and the characteristics on carbohydrates after ensiling are still not clear. Therefore, the present study is aimed at investigating whether panicle size and ensiling affect the nutritional characteristics of carbohydrates in stems of forage rice and ruminal fermentation afterwards. Two large-panicle cultivars, HA and KH, and two small-panicle cultivars (TA and TS) were grown and harvested at 45 days after full-heading stage. These rice plants were cut into 2 ~ 3 cm and ensiled in plastic bags. These silos were stored in a room at 20 ~ 22°C for 45 and 120 days. Stem and leaf parts at harvesting and opening silos were collected and used for chemical analysis and in vitro ruminal fermentation study. As similar to last year, both sugar and starch concentrations were significantly higher in small-panicle cultivars, than in large-panicle cultivars at harvesting. After ensiling, soluble sugars concentration decreased to one tenth of forage rice at harvesting. On the contrary, starch concentration remained even after ensiling. Fiber digestibilities and in vitro ruminal short-chain fatty acids (SCFAs) concentrations of TA, TS were also significantly higher than those of HA and KH both at harvesting and after ensiling. These results indicated that rice plants with small-sized panicles contain a large amount of ruminal fermentable carbohydrate in stems even after ensiling and could supply more energy as a form of SCFAs to ruminants.



## 1. 目 的

水田を活用した国産の飼料の必要性が高まるなか、乳牛や肉牛に対しては、飼料用イネをサイレージとして貯蔵させたイネホールクロップサイレージ (WCS) が利用されている。イネWCS用の品種としては、従来はデンプンを蓄える穂部が大きい品種 (穂重型) が選ばれていたが、牛の消化管内では籾は消化しづらく、未消化のまま籾が排泄されることが判明した。そこで穂が小さく、繊維質に富む茎葉が多いタイプの品種が開発され、「たちすずか」や「たちあやか」などの極短穂型の品種が普及され、乳用牛や肉用牛に給与されている。

我々はこのような茎葉収量が多い極短穂型の品種では、茎部には可溶性糖類に加えて、デンプンが蓄積していることを報告してきた<sup>1,2)</sup>。さらに、これらの品種では茎部の繊維消化性が高いことを示し、それらの結果としてルーメン内で産生される短鎖脂肪酸が高まることをin vitroルーメン内の培養系で明らかにしてきた<sup>2)</sup>。極短穂型の品種は穂重型の品種と比べて茎が太く草丈も高くなりやすいが、質的には消化しやすい炭水化物を含んでいることが推察された。しかし、これらの結果は、実験の便宜上収穫時のイネを使っており、畜産農家で利用されるサイレージとして貯蔵された後の評価は行われていない。サイレージとしての貯蔵過程では、微生物による発酵でイネ中の単少糖類やデンプン、繊維の一部が変化することは予想される。

そこで本研究では、飼料用イネの炭水化物 (単少糖類, デンプン, 繊維) の牛に対する栄養的意義を、イネの品種やサイレージ調製と関連付けて明らかにすることを目的とした。

## 2. 方 法

### 2.1 飼料用イネの栽培とサイレージ調製

イネWCSとして利用される品種として、穂重型のホシアオバ、クサノホシ、極短穂型のたちあやか、たちすずかを用いた。播種後3週目の苗を6月中旬に三重県津市の水田に移植した。各品種、出穂後45日目に地上部の植物体を収穫した。植物体を約3cmに切断した後、ナイロン樹脂を含むポリエチレン製の袋 (横450mm×縦600mm×厚さ0.07mm) に約500g入れ、脱気後にヒートシーラーで密封し、20~22℃の室内に貯蔵させてサイレージとして調製した。また茎葉の一部を60℃で48時間乾燥させて収穫時の試料をとした。サイレージは45日あるいは120日後に開封し、茎葉と穂を分けて、60℃で48時間乾燥させた。

### 2.2 イネ茎葉部に含まれる炭水化物画分の分析とルーメン内消化性の評価

収穫時のイネとサイレージとして貯蔵させたイネの茎葉部を対象に、可溶性糖類やデンプン、繊維含量を測定した。単少糖類はフェノール硫酸法<sup>3)</sup>、デンプンはtotal starch assay kit (Megazyme社) により測定した。繊維 (neutral detergent fiber, NDF) はデタージェント法<sup>4)</sup> により測定した。ついで、ルーメン内消化性を評価するために、めん羊からルーメン微生物を採取し、in vitroのルーメン培養を行った。基質として各品種のイネ茎葉部を加え、48時間後に未消化の培養残渣を回収し繊維消化率を測定した。また、ルーメン微生物が主に炭水乾物を発酵して産生し、宿主である牛のエネルギー源として利用される短鎖脂肪酸 (SCFA, short-chain fatty acids) について、培養上清中の濃度をHPLCにより測定した<sup>5)</sup>。

### 2.3 酪農家が利用するイネWCSに含まれる可溶性糖類およびデンプン含量の調査

イネWCSを生産している農業生産法人を訪問



し、イネの品種と収穫時期を聞き取りした。またそれらのイネWCSが貯蔵された後に酪農家へ搬送された際に一部採取し、上記の方法で可溶性糖類とデンプン含量を測定した。

### 3. 結果と考察

Fig. 1 に飼料用イネ4品種の収穫時(貯蔵0日目)と45日あるいは120日間貯蔵させてサイレージに含まれる可溶性糖類、デンプン、繊維(NDF)含量を示した。収穫時における可溶性糖類は、極

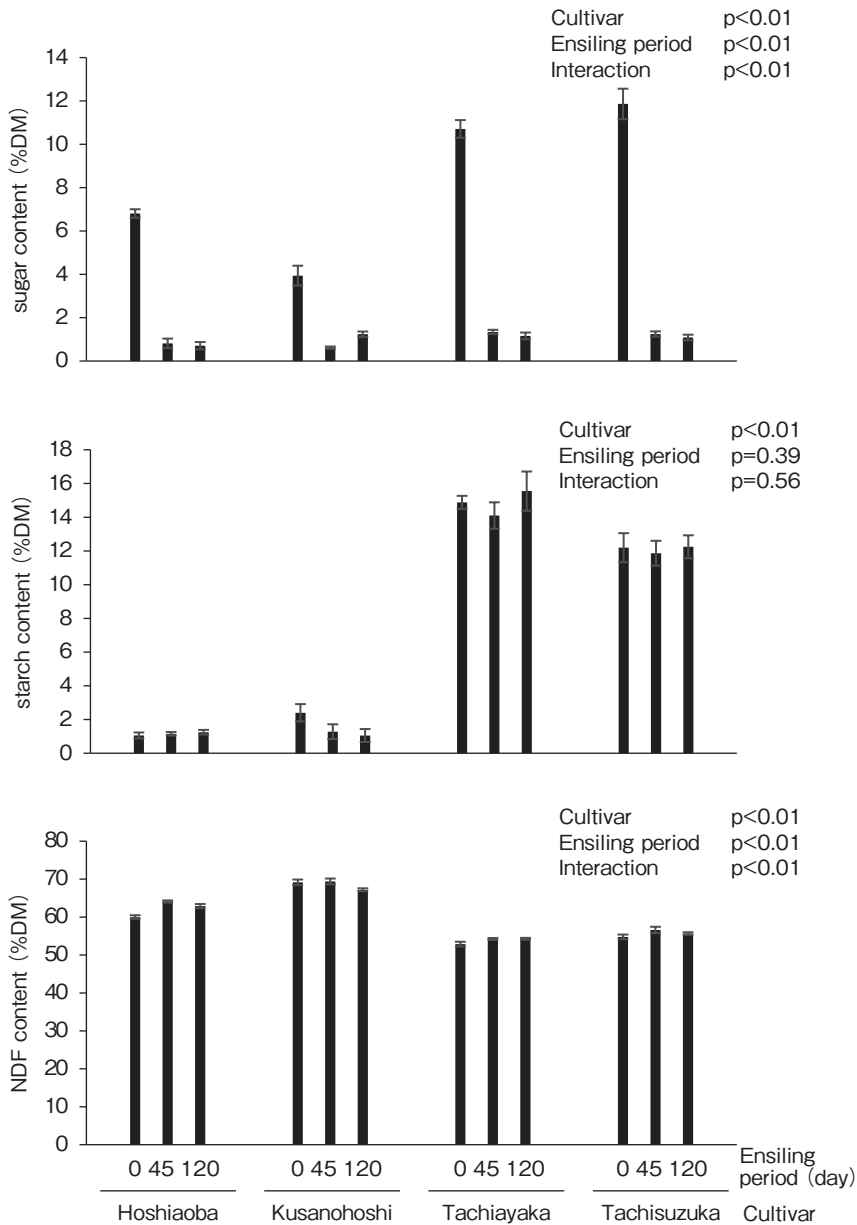


Fig. 1 Sugar, starch and neutral-detergent fiber (NDF) contents in the stem+leaf part of 4 cultivars of forage rice before (day 0) and 45, 120 days after ensiling. Error bars represent SEM.

短穂型品種であるたちあやかとたちすずかでは乾物中で10~12%程度、穂重型品種であるホシアオバとクサノホシでは4~6%程度であり、本研究においても先行研究と同様に極短穂型品種の特徴である高糖性の性質が確認された<sup>6)</sup>。一方、サイレージとして貯蔵した後ではいずれの品種も可溶性糖類の含量は約1%程度と低かった。このことから、高糖性のイネにおいても、可溶性糖類はサイレージ内で発酵に関与する微生物に9割近くは消費され、家畜に給与される時点では多くは残っていないことが示された。草ら<sup>7)</sup>は、たちすずかを対象にした実験室内の小規模サイロの実験にて、収穫時に含まれていたスクロース、グルコース、フルクトースがサイレージの発酵後ではほぼ消費されていることを示しており、本研究の結果を支持している。また、収穫時の飼料用イネ茎葉部に含まれるデンプン含量は品種間で有意に異なり、可溶性糖類と同様に極短穂型品種で多く、穂重型品種で低かった。極短穂型品種の中では、たちあやかのほうがたちすずかより3ポイント近く多く含まれており、昨年の結果と同様であった<sup>2)</sup>。飼料作物の中では、トウモロコシやオオムギのように子実が発達する作物では子実中にデンプンを蓄積するが、我々が行った別の調査ではイネ科やマメ科の牧草類ではデンプンを10%以上と多く蓄積するものはなく、牧草中のその含量も1~2%程度と低い。また、極短穂型のイネでは葉部のデンプン含量は1%程度と低いことから<sup>1)</sup>、本研究で対象とした茎葉部のデンプンもほぼ茎部由来している。これらのことから、たちあやかやたちすずかのように茎部にデンプンを蓄積する飼料作物は稀であり、極短穂型飼料用イネの特徴と言える。このように極短穂型のイネでは、光合成産物の貯蔵器官である穂部が小さくなった一方で、葉部からの光合成は収穫時でも維持されることで、穂部では収容できない光合成産物が可溶性糖類や

デンプンの形で茎葉部に多く含有されると考えられる。本研究ではこれらのイネをサイレージとして貯蔵させた結果、茎葉部のデンプン含量についてはサイレージの発酵による影響は認められなかった。したがって、極短穂型イネの収穫時に茎部に蓄えられていたデンプンはサイレージとして貯蔵した後も残存していることが明らかとなった。サイレージの貯蔵過程におけるデンプン含量の変化についてはトウモロコシを対象にした報告が複数あり、それらの報告では本研究と同様に収穫時と貯蔵後のデンプンの含量は変化が少ない事例や、品種や貯蔵期間によっては減少する事例も報告されている<sup>8,9)</sup>。本研究では実験室内の小規模サイロにて120日間の貯蔵と条件が限定的であったが、生産現場では収穫されたイネはサイレージとして調製された後、屋外で貯蔵され、ほぼ1年近くにわたり順次給与されていく。したがって発酵に関わる温度や貯蔵期間が異なることで、デンプンの残存性に影響をすることが考えられるため、飼料用イネ茎部のデンプンが屋外で長期保管した場合でも残存し、家畜に対して栄養素としての供給に関与するかを明らかにすることが必要である。本研究では飼料用イネの茎葉部に含まれる炭水化物として、可溶性糖類やデンプンに加えて、繊維含量を測定した結果、品種とサイレージとしての貯蔵期間の交互作用が認められた。繊維含量としては特に穂重型であるホシアオバとクサノホシのほうが極短穂型のたちあやかとたちすずかよりも高かった。これは極短穂型では可溶性糖類やデンプンが蓄積することで相対的に含量として繊維が低下するためと考えられた。

続いて、これらの飼料用イネ4品種の茎葉部をin vitroのルーメン内にて消化性の評価を行った。乾物消化率 (dry matter digestibility, DMD)、繊維消化率 (NDF digestibility, NDFD) において、品種とサイレージの貯蔵による交互作用が認

**Table 1** *in vitro* ruminal digestibility, SCFA concentration from stem+leaf fraction of forage rice before and after ensiling.

Treatment	DMD %	NDFD %NDF	SCFA mM
Before ensiling			
Hoshiaoba	50.4	42.6	40.6
Kusanohoshi	44.7	40.9	35.2
Tachiayaka	57.0	45.6	48.4
Tachisuzuka	59.2	48.8	49.5
45d after ensiling			
Hoshiaoba	46.8	41.1	37.5
Kusanohoshi	40.7	38.9	32.4
Tachiayaka	57.7	46.7	47.9
Tachisuzuka	57.6	49.0	48.9
120d after ensiling			
Hoshiaoba	46.8	39.9	38.0
Kusanohoshi	40.8	37.2	33.1
Tachiayaka	55.9	46.8	48.1
Tachisuzuka	57.8	48.1	50.0
Significance			
Cultivar (C)	<0.01	<0.01	<0.01
Ensiling period (E)	<0.01	<0.01	<0.01
C x E	<0.01	<0.01	<0.01

DMD, dry matter digestibility; NDFD, neutral detergent fiber digestibility, SCFA, short-chain fatty acids

められた (Table 1)。乾物消化率は、品種間でその差は大きく、極短穂型品種のたちあやかとたちすずかは穂重型のホシアオバとクサノホシよりも高かった。可溶性糖類やデンプンはルーメン微生物により速やかに利用されやすい栄養素であるため、これらの含量が高い品種では、乾物消化率が高くなったと考えられる。また繊維消化率についても極短穂型品種が穂重型品種よりも高い値を示した。昨年度の研究においても、収穫時のイネで同様の結果を報告しており、2年間繰り返して栽培したイネにより再現性が確認された。さらに、サイレージとして貯蔵された後でも、極短穂型の2品種は、穂重型の2品種と比べて繊維消化率が高く維持されていた。河野ら<sup>10)</sup>ではたちすずかの繊維消化率がクサノホシと比べて有意に高いことを羊と牛を使った*in vivo*の実験により示しており、今回の結果を支持している。また、本研究で行った*in vitro*ルーメンの培養液中の短鎖脂肪酸

濃度は、品種とサイレージ調製の期間による交互作用が認められた。特にイネの収穫時とサイレージ調製後のいずれにおいても、極短型の2品種が穂重型の2品種と比べて高い値を示した。また穂重型の2品種ではサイレージ調製後は短鎖脂肪酸濃度が低下したが、極短穂型の2品種では収穫時と同程度に維持されていた。これらのことから、たちあやかとたちすずかは収穫時のみならず、サイレージとして貯蔵させた後でも、ルーメン微生物により代謝される炭水化物の量が多く、牛へのエネルギー源供給量が多く維持されていることが推察された。可溶性糖類とデンプン、そして可消化の繊維含量の総量を発酵可能な炭水化物含量として算出した値をX軸に、*in vitro*ルーメン内における短鎖脂肪酸濃度をY軸に取った散布図をFig. 2に示した。これらの結果から計算によって求めた発酵可能な炭水化物含量は、ルーメン微生物により産生された短鎖脂肪酸の濃度と正の相関

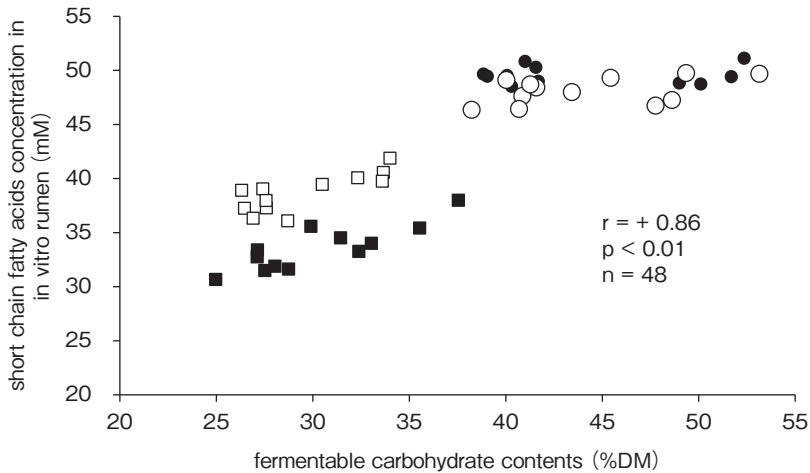


Fig. 2 Correlation between fermentable carbohydrate contents (sum of sugar, starch and digestible neutral-detergent fiber (NDF) contents) and in vitro ruminal short-chain fatty acids concentration in the stem + leaf part of 4 cultivars of forage rice before (day 0) and 45, 120 days after ensiling  
 □, Hoshiaoba ; ■, Kusanohoshi ; ○, Tachiayaka ; ●, Tachisuzuka

( $r = +0.86$ ) が認められた。特に、品種間で比較すると、極短穂型の2品種がグラフ上の右上に分布し、たちあやかとたちすずかはルーメン微生物により利用される炭水化物含量が高いことが確認された。

以上の実験室規模での結果を受け、生産現場の調製されるイネWCSを対象に可溶性糖類やデンプン含量の調査を行った。生産されていたイネWCSの品種はたちあやかとたちすずかで、収穫は9月下旬から10月中旬にかけて行われていた。収穫時に約4, 5 cmに切断され、1ロールが約250kgのロールバールサイレージとして調製されていた。イネWCSは貯蔵2か月後から随時酪農家で給与されていた。調査は貯蔵後7か月目に行い、両品種ともに6ロールずつ、合計12ロールを調査した。その結果、可溶性糖類は両品種ともに平均1.2% (0.8~1.5) と低かったが、デンプンはたちあやかで平均14.1% (11.8~17.4)、たちすずかで平均12.4% (11.6~13.9) であり、生産現場で収穫、調製、貯蔵されたイネWCSでもデンプンが残存していることが確かめられた。

#### 4. 要 約

本研究では、飼料用イネの品種のうち、茎葉多収で穂部割合が小さい(極短穂型)たちあやかとたちすずかには、穂部割合が大きい(穂重型)ホシアオバとクサノホシと比べて、茎葉部に可溶性糖類やデンプンが多く含まれること、さらに、サイレージ調製後には、可溶性糖類は9割近く減少しているが、デンプン含量はほぼ収穫時と同程度に残存していることを明らかにした。さらに、極短穂型の2品種は、収穫時、サイレージ調製後ともにルーメン内における繊維消化率が穂重型の2品種と比べて高いことを示した。また、極短穂型の2品種の茎葉ではサイレージとして貯蔵された後もルーメン内で発酵可能な炭水化物量が多く、牛へ供給可能なエネルギー量が穂重型品種と比べて多い可能性が示された。生産現場で栽培されロールバールサイレージとして長期保管された極短穂型のイネWCSを調査した結果、実験室規模の結果と同様に、可溶性糖類は少なく、デンプンは残存していることが確かめられた。今後、極短

穂型のイネWCSに蓄積するデンプンについて家畜を用いた栄養特性を明らかにすることが必要である。

#### 文 献

- 1) 太田怜奈, 関谷信人, 近藤誠: 日本作物学会講演会要旨集, 111, 2017.
- 2) 近藤誠: 伊藤記念財団平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 37, 449~454, 2019.
- 3) Hall, M. B.: *Anim Feed Sci Technol*, **185**, 94~100, 2013.
- 4) Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A.: *J Dairy Sci*, **74**, 3583~3597, 1999.
- 5) Kondo, M., Shimizu, K., Jayanegara, A., Mishima, T., Matsui, H., Karita, S., Goto, M., Fujihara, T.: *J Sci Food Agric*, **96**, 1175~1180, 2016.
- 6) Matsushita, K., Iida, S., Ideta, O., Sunohara, Y., Maeda, H., Tamura, Y., Kouno, S., Takakuwa, M.: *Breeding Sci*, **61**, 86~92, 2011.
- 7) 草佳那子, 上垣隆一, 木村俊之: 日本草地学会誌, **64**, 7~17, 2018.
- 8) Der Bedrosian, M. C., Nestor Jr. K. E., Kung Jr., L.: *J Dairy Sci*, **95**, 5115~5126, 2012.
- 9) Windle, M. C., Walker, N., Kung Jr., L.: *J Dairy Sci*, **97**, 3053~3060, 2014.
- 10) 河野幸雄, 新出昭吾, 神田則昭, 城田圭子, 福馬敬紘, 塚崎由子: 日本草地学会誌, **60**, 91~96, 2014.

## 養鶏における個体管理と清掃ロボット導入による IoT型食肉生産技術の開発（Ⅱ）

Development of IoT type meat production system to introduce for  
individual management and cleaning robot of poultry farming（Ⅱ）

堀口 健一<sup>1</sup>・Meng Tong<sup>1</sup>・片平 光彦<sup>1</sup>・市浦 茂<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>山形大学農学部, <sup>2</sup>岩手大学大学院連合農学研究科）

Kenichi Horiguchi<sup>1</sup>, Tong Meng<sup>1</sup>, Mitsuhiko Katahira<sup>1</sup> and Shigeru Ichiura<sup>2</sup>

（<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Yamagata University, <sup>2</sup>The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University）

Management techniques for reliable and efficient livestock production is demanded feeding with consideration for the comfort of livestock, maintenance of the hygienic feeding environment and reduction of the burden of its management work. Broiler's chicken production system does not have the less effort technology to manage the individual because of the low profits per broiler. So, we need to develop the less effort technology for broiler management. And it is also required to check the health of broilers. From these backgrounds, we conducted several experiments and obtained the following results. In artificial intelligence learned using broiler's behavior images, Chainer v1.23.0 can classify images, but it is not possible to detect each individual from multiple broilers in image, so it is used to grasp the outline of behavior pattern in a group. In the case of using Darknet - YOLO v3, it was shown that each individual in an image could be detected, and each individual behavior of eating, drinking, and resting could be identified. RFID is effective for broiler individual identification and behavior analysis, and it is necessary to consider how to attach a tag and low-cost small tag. Although the prototype system for body weight measurement and behavior monitoring has some points to be improved, it is possible to acquire growth-related data such as broiler's body weight and behavior in real time. By establishing a monitoring function based on deep learning, this system will be able to realize reduction of monitoring labor and optimization of feeding conditions in broiler farming. The body weight of broiler was determined to the class of correct body weight in 70 - 100% range by artificial intelligence using test images of same individual. It was confirmed that moving cart of assisting robot for chemical spray can travel following an operator with the control system, and can work stably while towing a hose.

### 1. 目 的

消費者ニーズを踏まえた安全・安心な畜産物を  
生産・提供していくうえで、生産現場での家畜の

個体管理は、その重要性が増していくと考えられ  
る。家畜の個体管理において、家畜の快適性を評  
価する情報にもなる飲水や飼料摂取、休息などの  
行動データ、成育状況を把握するための体重デー



タ、それらに関連する飼育環境データとなる温度や湿度などさまざまな情報を総合的に解析して評価することが求められる。これら多くの情報はこれまで観察や個別でのデータ収集にとどまっていたが、もののインターネット (Internet of Things 「IoT」) の促進により、監視カメラによる家畜の各種行動の画像データや各種センサによる家畜の飼育環境データなどを収集して活用できるようになり、高精度なGPUによる深層学習を用いた人工知能 (Artificial Intelligence 「AI」) による解析が可能になっている。しかし、AIの適用については工業面での実装が進んでいるものの、畜産業の現場での実装例は少ないのが現状である。

国内の肉用若鶏 (ブロイラー) の生産において、飼養戸数は小規模の飼養者層を中心に減少傾向にあるものの、飼養羽数は平成20年の102,987千羽から平成30年の138,776千羽へ増加し、出荷羽数50万羽以上の大規模の飼養者層が全体の12.0% (平成30年) を占めており、大規模化が進んでいる<sup>1)</sup>。ブロイラーの飼養管理は、開放型やウンドウレス型などの鶏舎にて、その大半が平飼いの群れ (群飼) で行われており、群飼管理下での生産効率や衛生面などに関する技術開発が不可欠であり、大規模化に合わせた適正な飼育環境下で最適な飼養管理を行うことが重要となる。一方、ブロイラーの生産現場では各種疾病に対応するため、作業施設への立ち入り制限や消毒の徹底などの対策が取り組まれている。鶏の出荷後には防疫の観点から徹底した清掃と消毒を行い、生産施設の衛生管理を厳密に実施している。鶏舎の清掃と消毒には乗用のホイールローダによる敷料の除去、牽引式の散布機による薬剤散布などが行われている。これらの衛生管理は基本的にヒトの立ち入りを制限した条件下において限定された管理作業により実施されている。このような状況下

では管理作業者の負担が増す課題を抱えており、清掃や消毒などの管理作業のロボット化に対する要望が高い。

このような背景から、消費者志向に合致した安全・安心な畜産物生産、家畜の快適性に配慮した飼養、衛生的な飼育環境の整備とその作業の負担軽減などの点を意識した管理技術の必要性が増すと思われる。本研究では大規模飼養が進んでいる養鶏 (群飼管理下のブロイラー) において、衛生的な飼育環境での安全・安心な鶏肉生産を、ヒトの介在を極力減らした管理、限られた人員で労力を軽減できる管理で実現することを目的に、畜産業における家畜の個体管理手法と清掃ロボット開発によるIoT型の食肉生産技術を確立する。

## 2. 方 法

### 2.1 供試動物と飼養管理

供試動物はブロイラー (チャンキーブロイラー) を用いた。飼育実験は山形大学動物実験委員会 (学長) の承認を受けた動物実験飼養施設にて動物実験計画書にしたがって実施した。ブロイラーの雛 (雄) を導入し、3週齢まで同一条件下で管理した。飼育実験のための飼養管理は市販の仕切り板 (メッシュ型) で飼育用の囲いを設置し、給餌器と給水器を配置して不断給餌、自由飲水とし、敷料として糶殻を用いて行った。

### 2.2 鶏の行動識別のための教師データとAI

ブロイラーの飼育スペースを3つに仕切り (各スペースには自由に移動できるよう一部を仕切り)、左右のスペースに給餌器または給水器を置き、監視カメラを用いてブロイラーの行動を撮像し、各行動画像のデータを保存した。撮像した画像については摂食行動、飲水行動、休息行動の特徴的な行動ごとに分類して教師データを作成し、それらをオープンソースソフトウェア<sup>2,3)</sup>を用いて深層学習させ、その特徴抽出を行った。オープ

ソースソフトウェアには、フレームワークのChainer v1.23.0に畳み込みネットワーク構造であるNIN (Network in Network) を組み合わせたものを、フレームワークのDarknetと物体検出アルゴリズムのYOLO v3を、それぞれ使用した。これらの条件下で各行動の画像を用いて学習させたAIにより、それぞれの行動識別を評価した。行動識別の評価は、各行動のテスト画像 (各行動とも20枚、計60枚) を用いて行った。テスト画像は学習画像として撮像した画像から学習画像とは異なる画像を無作為に選んだ。なお、Chainer v1.23.0では、学習画像を行動ごとに1,000~8,000枚、学習回数を50回と500回、Darknet-YOLO v3では、学習画像を行動ごとに50~500枚、学習回数を1,000回、10,000回、30,000回の条件で検討した。

### 2.3 鶏の体重計測・行動撮像システム

群飼管理下でのブロイラーを個体識別しながら体重を計測していくため、RFIDのタグと受信機による体重の計測では試作体重計の構造を見直し、体重データの記録状況を評価しながら実証試験に向けた改良を行った。改良したRFID受信機能内蔵の体重計は、ブロイラーのIDと体重値の各データを連続的に取得するため、動物実験飼養施設内に設置したWiFiルータを介してクラウドサーバに記録した。また、広角の可視光センサの監視カメラ、サーマルセンサと可視光センサが一体化した監視カメラを利用し、ブロイラーの行動や育成に関連するデータを取得した。これらの各種データを総合的に活用できる飼育判断システムの検討を行った。

### 2.4 鶏の体重判別のための教師データとAI

体重区分の明確なブロイラーの体重判別を試みるため、体重を計測した個体の画像を監視カメラで撮像し、これらのデータを利用して作成したAI (Chainer v1.23.0) を用いて評価した。すなわ

ち、ブロイラーの体重を約2,000 g, 3,000 g, 4,000 gの3つのクラスに分け、体重ごとに4羽の学習画像 (個体の姿勢を統一するために座っている状態のもの、1羽当たり60枚) を用い、学習回数を500回としてAIを作成した。このAIによる体重判別の評価はテスト画像を用いて行った。テスト画像については、学習画像の個体 (各体重とも4羽、計12羽) から学習画像とは異なる画像を1羽当たり5枚 (計60枚)、学習画像の個体とは異なる個体から体重ごとに学習画像の体重に近い各3羽 (計9羽) の画像を1羽当たり5枚 (計45枚)、それぞれを無作為に選んだ。

### 2.5 薬剤散布補助ロボット

薬剤散布補助ロボットとしての走行台車は、4輪駆動の移動ロボットに自動運転で使われるLiDARを搭載し、ロボットの制御システムと連携して作業者に追従して動作する機能を組み込んだ。薬剤散布補助ロボットの走行特性としては敷料に見立てた砂丘地での走行性を調査した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 AIによる鶏の行動識別

Chainer v1.23.0を用いて作成したAIにおけるブロイラーの摂食行動、飲水行動、休息行動の識別割合をTable 1に示した。群れでの画像を教師データとしているため、各行動の画像とも複数のブロイラーが存在する条件下での検討結果において、それぞれの学習画像や学習回数で作成したAIは、一部を除き各行動ともおおむね識別できていた。ただ、学習画像4,000枚のAIは、両学習回数とも摂食行動と休息行動において、他の枚数の学習画像で作成したAIより識別が低かった。同様な結果は昨年度もあり、この要因には各AIの行動識別時の閾値が変化していることが考えられる。よって、行動の識別精度を高いレベルで安定させる必要があり、群れ画像を用いてChainer v1.23.0

**Table 1** Recognition percentage of various behavior by artificial intelligence (Chainer v1.23.0) using broiler images.

Number of images	Training times	Recognition percentage (%)		
		Eating behavior	Drinking behavior	Rest behavior
1,000	50	97.57	99.96	51.15
1,000	500	99.53	100	90.84
2,000	50	100	100	100
2,000	500	100	100	100
4,000	50	57.06	100	87.42
4,000	500	53.94	100	87.01
8,000	50	99.99	100	100
8,000	500	99.98	100	100

**Table 2** Detection rate of broiler and accurate rate of detected broiler behavior by artificial intelligence (Darknet-YOLO v3) using broiler images.

Number of images	Training times	Detection rate (%)	Accurate rate (%)
50	1,000	20.8	91.7
50	10,000	35.3	96.7
50	30,000	35.3	98.4
100	1,000	22.0	52.6
100	10,000	35.3	96.7
100	30,000	35.3	98.4
300	1,000	23.7	92.7
300	10,000	35.8	98.4
300	30,000	35.3	98.4
500	1,000	15.0	100
500	10,000	35.8	96.8
500	30,000	35.3	98.4

で作成したAIを利用する場合には、群れの行動パターンの概要を把握するような使い方が有用であると思われた。Chainer v1.23.0を使用して作成したAIは、画像を分類できるが、画像内にいる複数のブロイラーを個体ごとに検出することができない。群れ管理下の画像には複数の行動を含むデータがあり、この点も考慮すべきである。群れ管理下におけるブロイラーの行動を識別するためには同時に複数の個体とその行動を検出できるAIが必要であり、物体検出に特化したDarknet-YOLO v3を用いて検討を行った。その結果をTable 2に示した。テスト画像内にいる複数のブロイラーのうちAIが検出した羽数を示す検出率（各行動の平均値）は、15～36%の範囲にあ

り、学習回数1,000回が他の学習回数よりも低かった。作成したAIはテスト画像内のブロイラーのある行動をほぼ1羽検出していた。これにより検出率が3割程度になったと考えられる。Darknet-YOLO v3を用いて作成したAIにおいて、テスト画像内の1羽のみを検出することが多かった要因としては、AI作成時の学習画像内の1羽のみにラベル付けを行って教師データを作成し、それを用いて深層学習して特徴抽出を行ったことが考えられる。一方、テスト画像内でAIにより検出されたブロイラーの行動が正しく識別された割合を示す正確率（各行動の平均値）は、学習画像100枚で学習回数1,000回のAIを除き、90%以上と高かった。よって、汎用性が高いAIであ

るかを確認するため、まったく別の飼育環境での画像を用いてプロイラーの各行動識別を検証することが必要かと思われるが、群れ管理下のプロイラーの行動識別において、Darknet-YOLO v3を使用して作成したAIは画像内の個体を検出でき、個体ごとの摂食行動、飲水行動、休息行動を識別できることが示された。

### 3.2 鶏の体重計測・行動撮像システムの評価

改良した体重計は、鶏の成長に伴う体重の変化に対応したデータを取得できていることが確認できた。体重計の測定性能を外環境に影響されにくい構造とするため、改良にあたって鶏がのるパネルの部分を金属板で補強した。これにより、体重計は構造を補強できたものの、成育の後半時期に体重計通過時のRFIDタグのデータが記録できない事例が発生した。この要因には、金属板による構造補強で磁束が変化してRFIDタグの受信感度が低下してしまうこと、RFIDタグの取り付け位置が鶏の成長に伴い地面から離れてしまうことが考えられた。これらの点を改良することにより、個体を識別しながらの体重把握が可能であることが確認できた。なお、欠落したID情報があった場合でも、取得できたデータをつなぐことで、個体

ごとに体重の記録を自動的に行う仕組みも確立できた。一方、監視カメラで撮像できた画像データからは、プロイラーの行動や発熱に関するデータが取得できた。行動データの解析・評価は今後の検討となるが、個体の行動だけでなく、群れとして行動パターンの把握も可能ではないかと考えられる。発熱データは個体の特徴（羽の生え方）を示す情報になるのではないかと考えられ、この個体の特徴をAI（Darknet-YOLO v3）で認識できないか調査した（Fig. 1）。その結果、作成したAIは、同じIDのプロイラーを複数検出する「誤検出」、検出できない「未検出」、違うプロイラーを同じIDとする「誤認識」といった事例が認められたものの、すべてのテスト画像で複数のプロイラーを検出でき、群れとしての行動解析に活用できることが示唆された。したがって、本試作システムは、改良すべき点があるものの、プロイラーの体重や行動といった成育関連のデータをリアルタイムで取得することが可能であり、鶏の成育関連情報を取得するうえで、管理者の人手に代わる省力手法として利用できると考えられる。

### 3.3 AIによる鶏の体重判別

AIによるプロイラーの体重の判別結果を

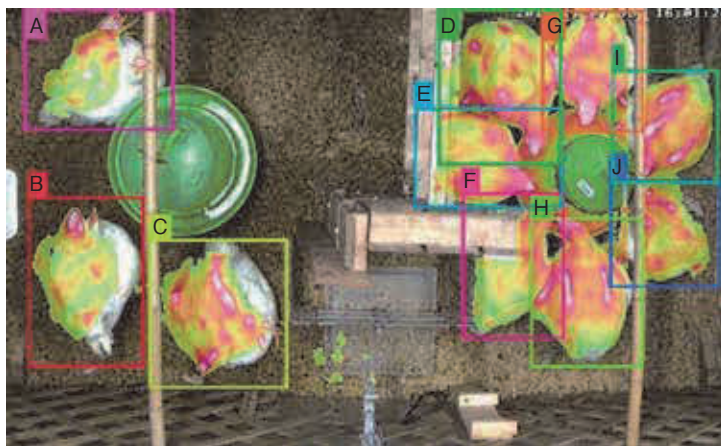


Fig. 1 Individual identification by artificial intelligence (Darknet-YOLO v3) using thermal images of broiler.



**Table 3** Identification percentage of body weight by artificial intelligence (Chainer v1.23.0) using broiler images.

Test image	Identification percentage (%)		
	Class 1 2,010~2,055g	Class 2 3,004~3,064g	Class 3 4,004~4,044g
Same broiler image			
2,010~2,055g	69.46	30.55	0
3,004~3,064g	0.04	99.97	0
4,004~4,044g	0	0	100
Another broiler image			
1,990~2,170g	44.58	55.42	0
2,934~3,098g	0.01	99.56	0.31
3,966~4,136g	16.65	83.35	0

**Table 3** に示した。同個体のテスト画像において、作成したAIは正解となる体重のクラスに70~100%範囲で判別した。AIの学習時に用いた同じ個体の画像による体重判別は可能であることが示唆された。体重2,010~2,055 gのテスト画像では、他のテスト画像の体重判別より正解割合がやや低かった。間違った体重に判別された個体は、首が身体と重なって体の表面が現れていないことが原因として考えられた。また、体重2,000 g前後の個体は、3,000 gや4,000 gの個体より頻繁に動き、羽が生えそろうていなかった。このことから、個体の形状が不安定な学習画像の枚数が増えたことで、画像内の体重に関する情報が複雑になり、体重の判別精度が低くなったと考えられる。一方で、別個体のテスト画像において、体重2,934~3,098 gのテスト画像では正解となる体重のクラスにほぼ判別されたものの、体重1,990~2,170 gのテスト画像では4割程度の判別であり、体重3,966~4,136 gのテスト画像ではまったく判別されず、ほとんどがクラス2 (約3,000 g)の体重に判別された。この結果の要因には次のようなことが考えられる。学習画像には、接触により羽が膨らんだ画像、姿勢を変えることによって鶏の足が映っている個体や映っていない個体といった同

じ個体であっても姿勢や形状等が異なる画像、カメラと個体の距離により画面内の個体が占める割合よりも背景の部分が広い画像などがあった。また、背景を統一するためのブルーシートの青色や台のシートの黒色などさまざまな色が混在した画像となった。これらの画像を学習画像に用いたことにより、画面内の情報が複合的になり、画像から読みとれる体重に関連する特徴が複雑になってしまい、体重の判別精度が低くなったのではないかと考えられる。

#### 3.4 薬剤散布補助ロボットの走行性評価

薬剤散布補助ロボットとして試作した4輪駆動式ロボットでのヒトの追従試験の状況を**Fig. 2**に示した。ロボット台車は、幅800mm、長さ1,004mm、高さ460mm、積載量が100kgであり、昨年度の機体よりも重心が低く牽引力も高い。このベース機体にRiDAR (light detection and ranging: 光による検知と測距)を搭載し、ベース機体の制御システムと連携させた追従試験では、走行性に難のある砂丘地でも安定した走行が可能であり、鶏舎内で薬剤散布用ホースを牽引しながら作業できることが確認できた。



Fig. 2 Moving cart for chemical spray.

#### 4. 要 約

ブロイラーの行動画像を用いて学習させたAIにおいて、深層学習のフレームワークの1つであるChainer v1.23.0では画像を分類できるが、画像内にある複数のブロイラーを個体ごとに検出することができないので、群れの行動パターンの概要を把握するような使い方が有用である。Darknet-YOLO v3を用いた場合には、画像内の複数の個体を検出でき、個体ごとの摂食、飲水、

休息の各行動を識別できることが示された。RFIDはブロイラーの個体識別や行動解析に有効であり、タグの取り付け方法や低コストで小型なタグの検討が必要である。本試作の体重計測・行動撮像システムは、改良すべき点があるものの、ブロイラーの体重や行動といった育成関連のデータをリアルタイムで取得することが可能であり、深層学習による監視機能を確立することで、養鶏における監視労力の軽減や飼育状態の最適化を実現できると考えられる。AIによるブロイラーの体重判別では、同個体のテスト画像において、正解となる体重のクラスに7割以上で判別した。薬剤散布補助ロボットの走行台車は、制御システムで作業員に対して追従する走行が可能であり、薬剤散布用ホースを牽引しながら作業できることが確認できた。

#### 文 献

- 1) 農林水産省生産局畜産部食肉鶏卵課：食肉鶏卵をめぐる情勢，<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/index.html>, 2019.
- 2) Tokui, S., Oono, K., Hido, S., Clayton, J. : Chainer : a Next-Generation Open Source Framework for Deep Learning, Proceedings of Workshop on Machine Learning Systems (LearningSys) in The Twenty-ninth Annual Conference on Neural Information Processing Systems (NIPS) , 2015.
- 3) Joseph, R., Ali, F. : YOLOv3 : An Incremental Improvement, arXiv : 1804.02767, 2018.



## 成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索（Ⅱ）

The search study about myogenic stem cell population which can promote muscular hypertrophy efficiently in adult animals（Ⅱ）

鈴木 貴 弘

（北海道大学大学院農学研究院）

Takahiro Suzuki

（Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University）

Skeletal muscle hypertrophy is greatly dependent on the contributions of myogenic stem cells (satellite cells) in the maturity period. To investigate the mechanisms of efficient myo-hypertrophy, we focus on the myogenic capability differences as “the functional-heterogeneity” of satellite cells during myogenic differentiation stage depending on mice-strains in this study. Here, we performed comparative analysis of the ratio of myotube formation and the expression levels of myogenic regulatory transcription factors (MyoD, myogenin, Myf5, MRF4 and myocyte enhancer factor2 families) among three-mice-strains (ICR, C57BL/6 and BALB/c). Each satellite cells formed myotubes, whereas the myotube fusion index of satellite cells isolated from ICR showed in a lower level than C57BL/6 and BALB/c. Moreover, the expression levels of MyoD, myogenin, MEF2A and C were lower in ICR derived-satellite cells than other two-strains. On the other hand, the expression level of Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFR  $\alpha$ ), which is a key marker for the origins of fibrosis and adipogenesis in skeletal muscles, was higher in ICR satellite cells than C57BL/6 and BALB/c. These results suggested that the satellite cells isolated from matured ICR mice may have the low myogenic capability by highly expressing PDGFR  $\alpha$ . So, we will continue this search study focusing on the inhibitory mechanisms about myogenic capability of satellite cells. These basic scientific knowledges would be beneficial to not only the meat science field but also medical and sports sciences.

### 1. 目 的

家畜の骨格筋は主に食肉の原料となるが、採取できる可食肉量は個体体重の約35%程度にしか至らない。そのため、家畜1個体あたりの骨格筋量が一生を通じて増加し続けることが可能となれば、効率的な食肉生産技術の開発へ寄与できると

期待される。しかし、成熟個体内の骨格筋細胞（細長い構造のために“筋線維”と呼称される）は最終分化しており、自身で増殖することができないため、その数や容積を増加させることは困難である<sup>1)</sup>。一方で、骨格筋には筋再生に重要な役割を担う筋幹細胞（衛星細胞）も局在する。衛星細胞は、筋線維の基底膜と細胞膜の間隙に位置

し<sup>2)</sup>、普段は休止状態にあるが激しい運動や筋疾患などに伴う刺激を受けて活性化状態に入ると<sup>3~5)</sup>、増殖して筋芽細胞へと分化し、細胞同士で互いに融合して新生筋線維(筋管)を形成したり既存の筋線維に融合することで損傷部を修復する<sup>6)</sup>。その際、衛星細胞は筋線維の数や容積を増加させる超再生を通した筋肥大能が備わっているため、本細胞の動態変化を正確に捉えて制御できれば、成熟個体における効率的な骨格筋量の増加が見込まれる。

最近、著者らの研究グループでは、衛星細胞の筋管形成能が単離した骨格筋部位によって異なる“機能的不均一性”を報告した<sup>7)</sup>。つまり、衛星細胞は局在している環境によってmyogenic capabilityに差が生じる細胞集団であることが示唆された。そこで前年度に引き続き本研究では、成熟後においても効率的に筋肥大を誘導できる優れたmyogenic capabilityを有する衛星細胞集団を探索することを目的とした。過去の報告において、野生型マウス系統間では筋再生能に差異があり、特にクローズドコロニー系のSJL/Jマウスは近交系のBALB/cマウスよりも筋再生を開始するタイミングと再生のスピードが速いことが明らかにされているにも関わらず<sup>8)</sup>、以降の研究を通してそのメカニズムについて、衛星細胞に着目したアプローチは見受けられない。よって、成熟した野生型マウスの3系統間(クローズドコロニー系; ICR, 近郊系; C57BL/6およびBALB/c)のそれぞれから単離した衛星細胞の筋管形成能および筋分化能の比較実験を行うとともに、差が生じた要因を検証した。

## 2. 方 法

### 2.1 実験動物

本研究では、8-10週齢のJcl:ICRマウス(ICR; 日本クレア株式会社)、C57BL/6Njclマウ

ス(B6; 日本クレア株式会社)およびBALB/cAJclマウス(C; 日本クレア株式会社)の骨格筋から単離した衛星細胞の初代培養系を使用した。本研究における動物実験(動物実験承認番号: 15-0173)は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づく北海道大学動物実験実施マニュアルに従った。

### 2.2 衛星細胞の初代培養系

本研究では、Allenら(1997年)の方法を参考に、改良した衛星細胞の単離培養方法を採用した<sup>9~12)</sup>。ICR, B6およびCそれぞれのマウス骨格筋(脊柱起立筋群, 大殿筋, ヒラメ筋, 足底筋, 腓腹筋, 長趾伸筋, 前脛骨筋および大腿直筋)を摘出し、37℃に温めたリン酸緩衝生理食塩水(PBS)により洗浄しながら結合組織や脂肪を取り除いた後に、細切した。1.0 mg/mlとなるようPBSに希釈したプロテアーゼ(*Streptomyces griseus*; ストレプトマイシスグリゼウス由来)と細切した骨格筋を37℃の恒温槽内で60分間反応させ、遠心分離(1,700 x g, 25℃, 4分間)した後上清を捨てた。反応後の筋組織に37℃に温めたPBSを加えて懸濁し、遠心分離(190 x g, 25℃, 10分間)を行った後に上清を回収した。本作業は、遠心分離時間を8分間、5分間に変更して繰り返した。集めた上清を遠心分離(1,700 x g, 25℃, 4分間)して、細胞ペレットを回収した。そこに、4℃に冷ました2% FBS-PBS(Wash Buffer)を加えて攪拌した後、100 μmセルストレーナーを通して不純物を除去し、遠心分離(1,700 x g, 4℃, 4分間)を行った。上清を捨て、4℃に冷ました溶血バッファーを3分間反応させた後に、Wash Bufferでメスアップしてから遠心分離(1,700 x g, 4℃, 4分間)を行った。上清を捨て、増殖誘導培養液(20% FBS-F10)を加えて攪拌した後、40 μmセルストレーナーを通して不純物を除去し、遠心分離(430 x g, 5℃, 10

分間)を行った。再度20% FBS-F10を加えてよく攪拌した後、fibronectinコーティングした24 well poly-L-lysine coated multiplateに骨格筋量0.5-1.0 g/mlの濃度となるように調製した細胞懸濁液を500  $\mu$ l/wellで播種し、5% CO<sub>2</sub>、95%大気、37°Cの条件下で各細胞の密度が50%コンフルエントになるまで培養した。その後、分化誘導培養液(5% HS-DMEM)に切り換えて、筋管形成が十分に認められた分化144時間目まで培養した。なお、本法を用いて単離した細胞は、増殖誘導培養液で24時間培養した際、衛星細胞マーカーPax7およびMyoDがそれぞれ90%および95%以上陽性であることを確認している。

### 2.3 培養細胞の蛍光免疫染色

各培養細胞をPBSで洗浄後、4%パラホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞は、0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich)で15分間処理後、3% (w/v)の牛血清アルブミンを添加したtween20含有PBSにより40分間ブロッキングし、同ブロッキング液で希釈した1次抗体溶液中で一晩インキュベーションした。細胞を洗浄後、同様に希釈した蛍光標識2次抗体溶液で1時間インキュベーションした。その後、ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Thermo Fisher Scientific)で封入し、蛍光フィルターキューブを搭載した倒立顕微鏡DMI4000 B (Leica)を用いて観察した。

### 2.4 RNA抽出およびreal-time qRT-PCR

各培養細胞をPBSで洗浄後、RNA抽出試薬(ISOGEN II, ニッポンジーン)により溶解し、メーカー推奨のプロトコルに従ってtotal RNAを抽出した。total RNAの濃度を15 ng/ $\mu$ lに希釈してから、逆転写に供試して(ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO), cDNAを作成した。作製したcDNAを含む逆転写反応液を鋳型とし、TaqMan Probe Assayを用いたreal-time qRT-

PCR (Light Cycler 480 system II, Roche)によって定量的解析を行った。データの分析は、添付のソフトウェアを用いて行った。

### 2.5 タンパク質の抽出およびWestern Blotting

各培養細胞をPBSで洗浄後、Laemmli sample bufferでタンパク質を抽出した。サンプルは10%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEに供試し、泳動後のゲルよりPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、5% (w/v)のスキムミルクを添加したtween20含有トリス緩衝液により30分間ブロッキングし、免疫反応促進試薬 (Can Get Signal, TOYOBO)で希釈した1次抗体溶液中で一晩インキュベーションした。メンブレンを洗浄後、同様に希釈したHRP標識2次抗体溶液で1時間インキュベーションした。その後、ECL Western Blotting Reagents (GE Health care)とメンブレンを反応させ、ChemiDoc™ XRS+システム (Bio-Rad)を用いて化学発光検出を行った。

### 2.6 統計解析

測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。Microsoft Office Excel 2013 (Microsoft)を用いて、各測定値から得られたデータをTukeyの多重比較により有意差検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意であるとした。

## 3. 結果と考察

### 3.1 マウス系統間における衛星細胞の筋管形成能の違い

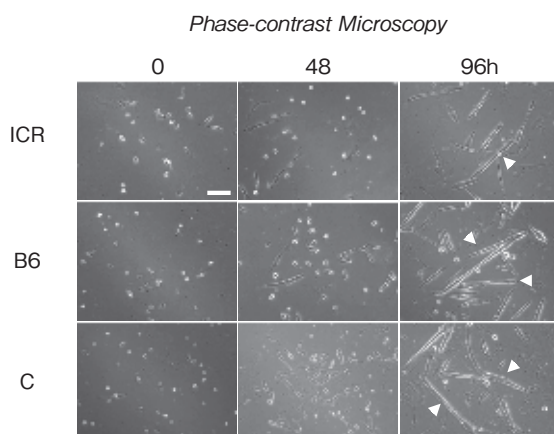
野生型マウスに筋損傷誘導や筋移植などの処置を行うと、系統間では筋再生能に大きな差異を生じることが報告されている<sup>8, 13, 14</sup>)。よって、野生型マウスの系統が異なると衛星細胞のmyogenic capabilityに差が生じる可能性が予想される。そこで本項では、ICR, B6およびCのそれぞれから単離した衛星細胞の初代培養系における筋管形成

能について比較した。まず、位相差顕微鏡像より、3系統の衛星細胞はいずれも分化誘導後の経過時間とともに分化して互いに融合する様子が観察され、96時間目ではどの系統においても筋管の形成が認められた (Fig. 1)。しかし、分化誘導時の細胞密度が同程度にも関わらず、B6およびCでは筋管の形成が盛んに行われたのに対し、ICRでは形成数が少ないように見受けられた。そこで、分化誘導後72時間目における筋管のマーカータンパク質であるミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; MyHC) 陽性の細胞を、蛍光免疫染色法を用いて検出した (Fig. 2)。本免疫染色像においてもい

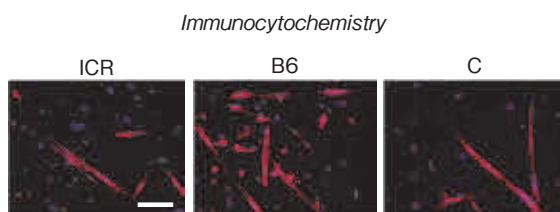
ずれの系統での筋管形成は認められたが、筋管融合率を測定したところ、ICRは $34.7\% \pm 6.56\%$ 、B6は $49.0\% \pm 2.47\%$ 、およびCは $43.2\% \pm 6.13\%$  (平均値  $\pm$  標準誤差) となり、ICRは他の2系統よりも有意に低い値であった。よって、ICRから単離した衛星細胞はB6およびCと比べて筋管形成能が低いことが明らかとなった。

### 3.2 衛星細胞における筋分化の制御に関わる転写因子の発現パターンの比較

本項では、衛星細胞による筋分化すなわち筋管形成能の制御に深く関わる転写因子群myogenic regulatory factors (MRFs ; MyoD, myogenin,



**Fig. 1** Satellite cells isolated from each mouse strain formed myotubes during myogenic differentiation. Satellite cell primary cultures, isolated from the back, buttock, and upper hind limb of each mouse, were maintained in differentiation medium after the induction of proliferation. During differentiation stage, phase-contrast microscopy was taken for observation of aspects about myotube-formation on every 48 h. Upper panels show satellite cells isolated from ICR, middle panels are from B6, and lower panels are from C. White arrowheads indicate myotubes. Scale bar : 100  $\mu$ m.



**Fig. 2** Comparative analysis about the myotube fusion index of satellite cells among three-mice-strains. Satellite cell primary cultures, prepared as shown in Figure 1, were maintained a differentiation medium until 72 h. Immunofluorescence microscopy for total MyHC (red) and DAPI (blue) shows myotubes and nuclei. Scale bar in panel, 100  $\mu$ m. Myotube fusion index was evaluated and defined as the ratio of myonuclei on myotubes containing more than two nuclei.

Myf5 および MRF4) と、MRFs と協調的に作用する転写因子 myocyte enhancer factor 2 ファミリー (MEF2A, 2B, 2C および 2D) に着目し、各系統の衛星細胞における分化誘導後96時間目の発現量を比較した (Fig. 3 および 4)。まず、MRFs において MyoD および myogenin に関しては、ICR に対して B6 および C が有意に高い mRNA 発現量を示すとともに、タンパク質レベルでも同様な発現パターンが認められた (Fig. 3)。続いて MEF2 ファミリーでは、MEF2A および 2C の mRNA 発現量は ICR に対して B6 が有意に高く、MEF2B の mRNA 発現量は B6 に対して C が有意に

高かった (Fig. 4)。よって、ICR から単離した衛星細胞は B6 および C よりも MRFs や MEF2 の各サブタイプの発現量が低く、筋分化が活発に起こらないと予想された。一方で、本研究においても前年度の研究報告と同様に、B6 から単離した衛星細胞は特に MyoD および myogenin のタンパク質発現量が他の2系統よりも相対的に高いことから、筋分化へのスイッチングが盛んに行われたと推測された<sup>15)</sup>。よって、B6 は優れた myogenic capability を有する衛星細胞集団が局在する系統である。

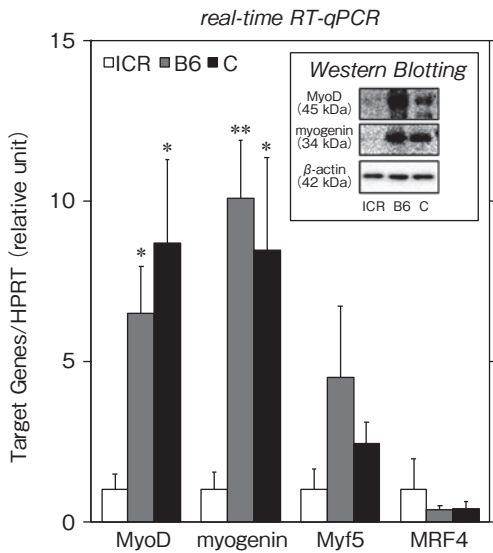


Fig. 3 Comparative experiments about the expression patterns of myogenic regulatory factors (MRFs) in satellite cells isolated from each mouse strain. Satellite cell primary cultures, prepared as shown in Figure 1, were maintained in differentiation medium until 96 h and evaluated for the expression of MyoD, myogenin, Myf5 and MRF4 by real-time RT-qPCR. mRNA expression was normalized to the level of HPRT. Bars depict the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures by relative units as compared to the ICR strain (open bars). Significant differences from the mean of ICR at  $p < 0.05$  and  $p < 0.01$  are indicated by single and double asterisks, respectively. (inset) MyoD and myogenin protein expression by ECL-Western Blotting standardized to  $\beta$ -actin expression.

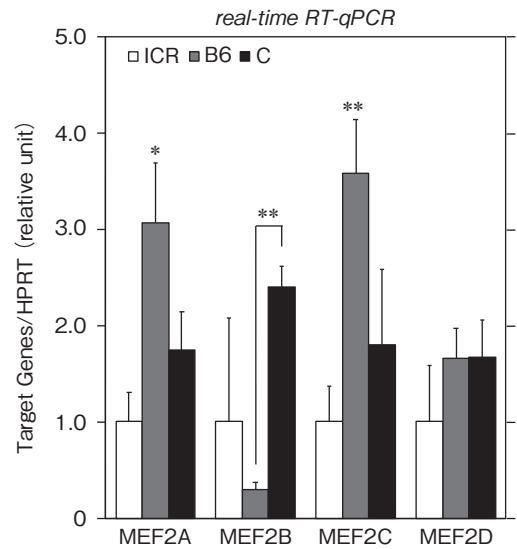


Fig. 4 Comparative analysis about the mRNA expression patterns of myocyte enhancer factor 2 (MEF2) families in satellite cells isolated from each mouse strain. Proliferated satellite cells from each mouse strain were maintained in differentiation medium until 96 h. The cell lysates were evaluated for the mRNA expression of MEF2A, B, C and D by real-time RT-qPCR standardized to HPRT expression. Bars depict the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures by relative units as compared to ICR cultures (open bars). Significant differences among mice strains at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$  are indicated by single or double asterisks.



### 3.3 衛星細胞が非筋系譜へと形質転換する可能性に着目した検証

これまでの結果より、ICRから単離した衛星細胞は筋管形成能および筋分化能が他の系統と比較して低いことが明らかとなったが、本項ではその要因の検証を行った。筋組織内において、血小板由来増殖因子受容体である Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) 陽性の細胞は、組織の線維化や脂肪化の起源となることが報告されている<sup>16, 17)</sup>。そこでICR由来の衛星細胞は、PDGFR $\alpha$ の発現量が相対的に高くなり非筋系譜の細胞へと形質が転換した可能性に着目した (Fig. 5)。分化誘導直後から、いずれの系統の衛星細胞においてもPDGFR $\alpha$ の発現が認められたが、特にICRの発現量は0時間後でCよりも、48時間後ではB6よりもそれぞれ有意に高かった。なお、0時間後においてCはB6よりも有意に発現量が低かった。分化誘導96時間目以降では、系統間における有意な差は認められなかった。以上より、ICRから単離した衛星細胞は分化誘導初期の段階において、PDGFR $\alpha$ を高発現していたために筋管形成能ならびに筋分化能が他の系統よりも低いことが示唆された。しかし、過去の報告では筋組織中のPDGFR $\alpha$ 陽性細胞と衛星細胞は区別されていることから<sup>16, 17)</sup>、本研究結果の妥当性を確かめるためにも、シングルセルレベルでのより詳細な解析を行う必要があるとともに、他の因子にも着目したさらなる要因探索作業を進める必要がある。

## 4. 要 約

成熟個体の筋線維は最終分化しており、かつ自身で増殖することができないため、細胞容積や数を増加させることが難しい。しかし、骨格筋に局在する衛星細胞は増殖能を有するとともに、互いに融合して筋管を形成したり既存の筋線維に融合

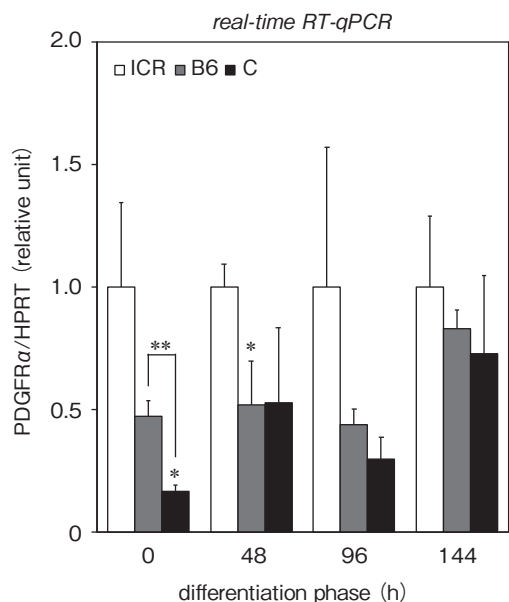


Fig. 5 Comparative experiments about the expression levels of Platelet-Derived Growth Factor Receptor alpha (PDGFR $\alpha$ ) in satellite cell cultures isolated from each mouse strain during differentiation stage. Each satellite cell primary cultures, prepared as shown in Fig. 1, were maintained in differentiation medium after the induction of proliferation and evaluated for the expression of PDGFR $\alpha$  by real-time RT-qPCR. mRNA expression was normalized to the level of HPRT at all time points indicated. Bars depict the mean  $\pm$  SEM of three independent cultures by relative units as compared to the ICR strain (open bars). Significant differences among mice strains at  $p < 0.05$  or  $p < 0.01$  are indicated by single or double asterisks.

することで筋再生を担い、さらには超再生を通した筋肥大にも寄与する。最近では、衛星細胞は局在する環境に応じて機能的不均一性を示すため、myogenic capabilityの異なる細胞集団が存在すると推測され、優れた集団を同定できれば効率的な筋肥大制御メカニズムを明らかにできる。そこで本研究は、野生型マウスの系統間で筋再生能に差異があるという過去の知見に着目し、ICR、B6およびCの3系統のマウスからそれぞれ衛星細胞を単離した初代培養系を用いて、筋管形成能ならびに筋分化能を比較するとともに、差異が生じる要



因の検証を行った。その結果、ICRはB6およびCから単離した衛星細胞よりも筋管形成率ならびに筋分化を制御する転写因子の発現量が相対的に低いことが明らかとなった。一方で、分化誘導初期において、筋組織の線維化や脂肪化に寄与するPDGFR $\alpha$ の発現量がICRでは他の系統よりも高いことが明らかとなった。つまり、ICRはmyogenic capabilityが抑制された衛星細胞集団を有することが示唆された。今後は、系統間における衛星細胞のmyogenic capabilityの差を生み出す要因を、より詳細に解析する予定である。

#### 文 献

- 1) 水野谷航：食肉の科学, 57, 7~17, 2016.
- 2) Mauro, A. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 493~495, 1961.
- 3) Tatsumi, R., Allen, R. E. : *Anim. Sci. J.*, 79, 279~290, 2008.
- 4) Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, 81, 11~20, 2010.
- 5) Hara, M., Tabata, K., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Mizunoya, W., Nakamura, M., Nishimura, S., Tabata, S., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K., Anderson, J. E., Allen, R. E., Tatsumi, R. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 302, C1741-C1750, 2012.
- 6) Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A. : *Physiol. Rev.*, 93, 23~67, 2013.
- 7) 鈴木貴弘：食肉の科学, 59, 33~38, 2018.
- 8) Grounds, M., McGeachie, J. : *Cell Tissue Res.*, 255, 385~391, 1989.
- 9) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. : *Methods in Cell Biol.*, 52, 155~176, 1997.
- 10) 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.
- 11) Suzuki, T., Takaishi, H., Sakata, T., Do, M.-K. Q., Hara, M., Sato, A., Mizunoya, W., Nishimura, T., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, 81, 245~251, 2010.
- 12) Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y., Anderson, J. E., Shibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ojima, K., Nishimatsu, S.-I., 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.
- 13) Grounds, M., McGeachie, J. : *Muscle Nerve*, 13, 305~313, 1990.
- 14) Mitchell, C., McGeachie, J., Grounds, M. : *Cell Tissue Res.*, 269, 159~166, 1992.
- 15) 鈴木貴弘：平成30年度食肉に関する助成研究調査報告書, 37, 441~448, 2019.
- 16) Uezumi, A., Fukada, S., Yamamoto, N., Takeda, S., Tsuchida, K. : *Nat. Cell Biol.*, 12, 143~152, 2010.
- 17) Uezumi, A., Ito, T., Morikawa, D., Shimizu, N., Yoneda, T., Segawa, M., Yamaguchi, M., Ogawa, R., Matev, M. M., Miyagoe-Suzuki, Y., Takeda, S., Tsujikawa, K., Tsuchida, K., Yamamoto, H., Fukada, S. : *J. Cell Sci.*, 124, 3654~3664, 2011.

# ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した 採食可能量の予測モデルの開発

Prediction of feed intake capacity based on dynamic models of fiber  
digestion and passage in the rumen

谷川 珠子<sup>1</sup>・田中 常喜<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場, <sup>2</sup>地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場)

Tamako Tanigawa<sup>1</sup> and Tsuneki Tanaka<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Dairy Research Center,

<sup>2</sup>Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center)

This study demonstrated prediction of dry matter intake (DMI) of total mixed rations (TMR) based on dynamics simulation of neutral detergent fiber (NDF) remain in the rumen. This model was carried by real-time TMR intake data of thirty-two dairy cattle reared in a free-stall on the assumption of the digested and passaged NDF model. The simulation resulted in that NDF remain in the rumen was a mean of  $8.0 \pm 1.2$  kg, and that NDF remain related to traits of dairy cattle such as metabolic body weight, parity, and days in milk. In addition, the simulation showed a periodicity in a day for NDF remain in the rumen. This study developed a framework of DMI prediction model based on the NDF-based dynamics simulation. In addition, results in this study indicated that the approach of NDF-based dynamics simulation could achieve a robust and precise DMI prediction, if parameters in the simulation were optimized by training data from other environments and/or rearing conditions.

## 1. 目 的

飼料の採食量は、反芻家畜の乳肉の生産性に最も影響し、採食量を高めることは生産性向上に重要である。反芻家畜の採食量は、飼料の種類、成分、物理的特性、消化管内での消化速度および通過速度などの飼料側、体重、体型、乳量、乳期および妊娠などの動物側、設備や給与回数などの環境といった多くの要因に影響される。特に飼料側の要因のうち、粗飼料由来の繊維の特性は、採食量に強く影響する要因であることが知られている。これまでの試みの多くは、生産性レベルや給

与飼料中の粗飼料割合などが一定の条件下において採食量の予測が検討されてきた。それにより、採食量に影響する要因は整理されたが、さまざまな条件下での採食量の予測に向けた、多くの要因を含む体系的なモデルの構築には至っていない。

ルーメン内の許容量の把握は、ルーメン内の物理的な膨満に制限される採食量の予測や、ルーメン性状の解析に、有益な情報となり得る。本研究では、採食と、消化および下部消化管への通過による時間経過に伴ったルーメン（第一胃）内の繊維の動態（ルーメン内繊維消化ダイナミクス）に着目し、採食量を予測するためのモデル化を試み

た。具体的には、(i) フリーストールで2群管理された牛群(泌乳前期, 泌乳中・後期)の採食量について、リアルタイムで自動記録されたデータを用い、採食量と、繊維の消化速度および通過速度で表現したルーメン内に滞留する繊維量のモニタリング、(ii) 体重や乳期などから繊維滞留量を規定するモデルの構築を行った。

## 2. 方 法

本研究は、北海道立総合研究機構酪農試験場(北海道中標津町)において、フリーストールで2群管理(泌乳前期, 泌乳中・後期)されたホルスタイン種泌乳牛群の飼養データを用いた。2018年3月1日~2019年6月30日にかけて、個体別に、リアルタイムで自動記録された採食量( $n = 1,994,849$ )を解析対象とし、全126頭中、治療歴が少なく、フリーストールでの滞在が連続した32頭を抽出した(表1)。これら各個体について、産次、搾乳日数、おおよそ1週間おきの体重(kg)、おおよそ1週間おきのボディコンディショ

ンスコア(BCS)、個体別日乳量( $\text{kg day}^{-1}$ )のデータを整理した。体重とBCSは線形補完で日単位の値とし、解析対象とした。給与飼料は、牧草サイレージとトウモロコシサイレージ、大豆粕、圧ペントウモロコシ、乾草、炭カル、第2リンカルを用いて、混合飼料(TMR, Total Mixed Rations)とし、1日1回、午前の搾乳直後に給与した。泌乳前期用のTMR設計は、粗タンパク質(CP)含量で $16.7 \pm 1.2\%$  DM, 中性デタージェント繊維(NDF)含量で $38.6 \pm 1.9\%$  DM, 非繊維性炭水化物(NFC)含量で $34.0 \pm 1.3\%$  DM, 粗濃比で $58.4 \pm 2.2\%$ であった。泌乳中・後期用のTMR設計は、CPで $14.1 \pm 1.1\%$  DM, NDFで $43.5 \pm 2.3\%$  DM, NFCで $30.6 \pm 1.5\%$  DM, 粗濃比で $68.5 \pm 3.7\%$ であった。搾乳は、1日2回、9:00と19:00頃に行った。各種解析は、統計ソフトR(GUN)を用いた。

### 2.1 ルーメン内に滞留する繊維(NDF)量のモニタリング

飼槽の訪問時間、退出時間およびその前後の飼槽の重量差で記録される採食量は、採食開始時刻

Table 1 Summary of thirty-two dairy cattle reared in free-stall during March, 2018 - June, 2019, at Nakashibetsu, Hokkaido

Category	n*	Days †	BW ‡	DMI §	NDF remain	NDFD ¶
Parity						
1st-parity	24	199 ± 86	584 ± 50	18.2 ± 1.7	7.5 ± 0.9	48.2 ± 3.9
2nd-parity	12	155 ± 97	626 ± 40	22.2 ± 1.9	8.6 ± 0.9	48.8 ± 4.3
3rd-parity	5	204 ± 76	730 ± 97	21.6 ± 1.5	9.4 ± 1.0	45.2 ± 2.4
4th-parity	4	182 ± 65	723 ± 52	23.2 ± 1.8	9.3 ± 0.8	49.2 ± 2.6
5th-parity	1	156	729	25.6	11.3	42.0
6th-parity	1	259	723	23.3	9.5	48.4
7th-parity	1	297	678	21.6	9.0	47.1
Days in milk (DIM)						
under 150 DIM	32	133 ± 35	605 ± 72	20.9 ± 3.5	7.6 ± 1.1	52.2 ± 2.5
over 150 DIM	32	152 ± 87	636 ± 76	19.1 ± 2.4	8.5 ± 1.3	44.4 ± 3.9
Total	32	284 ± 96	618 ± 74	19.8 ± 2.7	8.0 ± 1.2	48.3 ± 2.9

Values show the mean ± standard deviation among the cattle.

\* Number of the cattle.

† Averaged rearing period (days) per cow.

‡ Averaged body weight (kg) during rearing period.

§ Dry matter intake of total mixed rations ( $\text{kg day}^{-1}$ ).

|| Mean of neutral detergent fiber (NDF) remain (kg) in the rumen based on the simulation in this study.

¶ NDF digestibility based on the simulation,  $\text{NDFD} = 100 \times \text{digested NDF} / (\text{digested NDF} + \text{passed NDF})$ .

(分単位) に採食したとして集計した。摂取した TMR中の各飼料についてルーメン内のNDF残存量を次式により算出し、その合計値をルーメン内NDF滞留量とした： $uNDF_t = pdNDF \times e^{-kd \cdot (t-L_d)} + pdNDF \times e^{-kp \cdot (t-L_p)} + iNDF \times e^{-kp \cdot (t-L_p)}$  (ただし、 $t > L_d$ かつ $t > L_p$ )、ここで、 $uNDF_t$ ：採食  $t$  時間後のルーメン内のNDF量 (kg)、 $pdNDF$ ：潜在的消化NDF量 (kg)、 $iNDF$ ：不消化NDF量 (kg)、 $kd$ ：消化速度定数 (/hr)、 $L_d$ ：消化ラグタイム (hr)、 $kp$ ：通過速度定数 (/hr)、 $L_p$ ：通過ラグタイム (hr)。消化速度定数は、NDF (% DM, 耐熱性  $\alpha$ -アミラーゼ添加, 亜硫酸ナトリウム無添加, 灰分補正あり) と *in vitro* 培養30, 120, 240時間後の未消化NDF含量 (% DM,  $uNDF_{30h}$ ,  $uNDF_{120h}$ ,  $uNDF_{240h}$ ) の分析値を、 $iNDF = uNDF_{240h}$ 、 $L = 5$  として、分解曲線 (次式) に当てはめて算出した： $uNDF_t = pdNDF \times e^{-kd \cdot (t-L)} + iNDF$  (ただし、 $t > L$ )、ここで、 $L$ ：*in vitro* 消化試験における消化ラグタイム。消化ラグタイムは、最小0.5hr～最大6.0hrとなるTMR中のデンプン含量 (% DM, Starch) の応答関数とした： $L_d = 0.5 + (6.0 - 0.5) / \{1 + e^{(22 - \text{Starch}) / 2.5}\}$ 。通過速度定数は、粗飼料と濃厚飼料別に設定した。粗飼料の通過速度は、Krizsan et al. (2010) の推定式を用いた<sup>1)</sup>： $kp = 0.0119 + 0.000879 \times NDFI + 0.00792 \times c\text{-}NDFI / NDFI + 0.0121 \times iNDFI / NDFI$ 、ここで、 $NDFI$ ：体重 (BW) 当たりのNDF摂取量 ( $\text{g day}^{-1} / \text{kg of BW}$ )、 $c\text{-}NDFI$ ：体重当たりの濃厚飼料由来NDF摂取量 ( $\text{g day}^{-1} / \text{kg of BW}$ )、 $iNDFI$ ：体重当たりの不消化NDF摂取量 ( $\text{g day}^{-1} / \text{kg of BW}$ )。濃厚飼料の通過速度は、CNCPS (The Cornell Net Carbohydrate and Protein System, Fox et al. 2004)<sup>2)</sup> の推定式を用いた： $kp = 0.01169 + 0.001375 \times f\text{-}DMI + 0.001721 \times c\text{-}DMI$ 、ここで、 $f\text{-}DMI$ ：体重当たりの粗飼料の乾物摂取量 ( $\text{g}$

$\text{day}^{-1} / \text{kg of BW}$ )、 $c\text{-}DMI$ ：体重当たりの濃厚飼料の乾物摂取量 ( $\text{g day}^{-1} / \text{kg of BW}$ )。通過ラグタイムは、6 hr (固定値) とした。通過速度を算出するための摂取量は、直近6 hr以内の採食量を合計した。通過速度定数を算出後、6分単位に再集計し、ルーメン内に滞留するNDF量 (kg)、NDF消化量 (kg) とNDF通過量 (kg) を算出した。

## 2.2 ルーメン内に滞留する繊維 (NDF) 量のモデリング

ルーメン内NDF滞留量のモデリングは、体重 (kg) あるいは代謝体重 ( $\text{kg}^{0.75}$ )、産次 (初産, 2産, 3産以降)、搾乳日数 (day)、朝の飼料給与からの経過時間 (搾乳作業のため、採食行動が完全になかったAM9:26からの経過時間, min)、日乳量 ( $\text{kg day}^{-1}$ ) を説明変数の候補とし、搾乳日数と朝の飼料給与からの経過時間を平滑化スプライン関数に当てはめた加法モデル、あるいは線形モデルにおいて、赤池情報量規準 (AIC) に基づく変数選択を行った。個体の効果は、いずれのモデルにおいても変量効果として考慮した。モデルの当てはめは、mgcvパッケージ、basicパッケージをそれぞれ用いた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 ルーメン内に滞留する繊維 (NDF) 量とNDF消化率

ルーメン内NDF滞留量は、平均で $8.0 \pm 1.2 \text{kg}$ であり、産次数に伴って増加する傾向が見られた (Table 1)。乾乳牛のルーメン内容物を調査した泉ら<sup>3)</sup> の報告では、朝の給餌直後や2時間後のルーメン内NDF滞留量は7.2～8.8kg、同様に泌乳牛について給餌4時間後に調査したKononoff and Heinrichsの報告<sup>4)</sup> では、7.8～8.2kgであり、本結果の平均値8.0kgとおおむね一致した。TMR設計が変更される搾乳日数150日の前後で、ルーメン

内NDF滞留量が異なり (7.6 vs. 8.5 kg), 搾乳日数150~160日以降に増加する傾向が確認された (Fig. 1 左上)。本研究ではルーメン内NDF滞留量の定常性を前提としているが, TMR設計の変更によってルーメン内NDF滞留量に変化した本研究での結果は, 各設定値の見直しの必要性を示唆し, 特に消化速度定数や消化ラグタイムについて, 検証が必要であると考えられた。日内周期があり, 朝の給餌から600~700分後 (PM20:00頃) に日内ピークが見られた (Fig. 1 右上)。ルーメ

ン内NDF滞留量は, 体重と比例関係にあり (Fig. 1 左下), 乾物摂取量とも正の相関関係 ( $r=0.60$ ) が確認された (Fig. 1 右下) が, 体重当たりのルーメン内NDF滞留量と乾物摂取量の相関は低く, ルーメン内NDF滞留量と乾物摂取量は, それぞれが体重と関連するものと考えられた。

NDF消化量とNDF通過量から算出した消化率は, 泌乳前期用 TMR (under 150 DIM) で 52.2%, 泌乳中・後期用 TMR で 44.4% であった (Table 1)。高泌乳牛の消化率について解析した

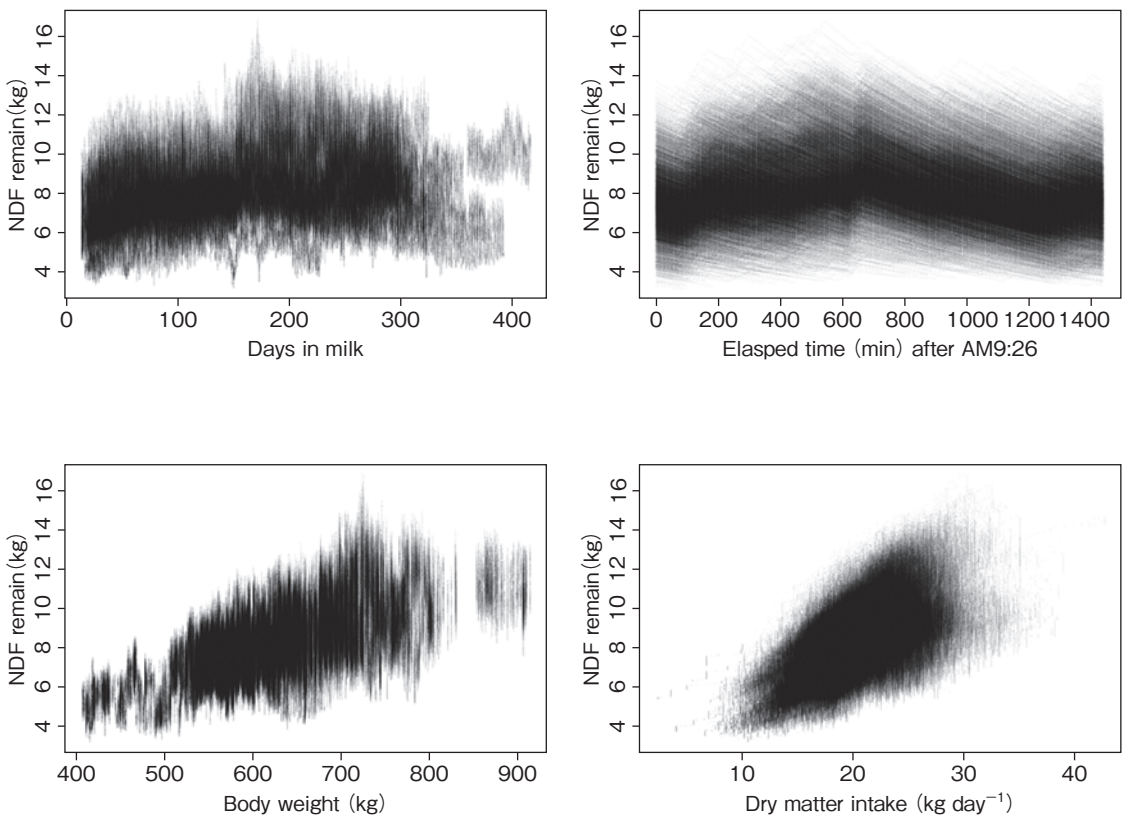


Fig. 1 Relationship between neutral detergent fiber (NDF) remain (kg) in the rumen by dynamic simulation based on a real-time total mixed rations (TMR) intake data and days in milk (upper left), elapsed time after AM9:26 (upper right), body weight (bottom left), or dry matter intake (bottom right). The real-time TMR intake data were collected from thirty-two dairy cattle reared in free-stall during March, 2018–June, 2019, at Nakashibetsu, Hokkaido. The dynamic simulation was carried on the assumption of the follow digested and passed NDF model with a 6-min pitch :  $\text{NDF remain} = \text{pdNDF} \times e^{-\text{kd} (t-\text{Ld})} + \text{pdNDF} \times e^{-\text{kp} (t-\text{Lp})} + \text{iNDF} \times e^{-\text{kp} (t-\text{Lp})}$  ( $t > \text{Ld}$  and  $t > \text{Lp}$ ), where NDF remain is NDF (kg) in the rumen after  $t$  hours after an intake, pdNDF is potential digestible NDF (kg), iNDF is indigestible NDF (kg), kd is digestion rates (/hrs), Ld is lag time (hrs) of degradation, kp is passage rates (/hrs), Lp is lag time (hrs) of passage. NDF were analyzed with thermostable  $\alpha$ -amylase and ash correction without sodium sulfite.



de Souza et al. (2017)<sup>5)</sup> の報告の値 (NDF消化率 = 42 ± 11%, 95%信頼区間19~63%) とおおむね一致した。一方, 体重当たりの乾物摂取量が高く, TMR中のデンプン含量が高く, TMR中の牧草割合が低い泌乳前期では, 泌乳中・後期と比較して, NDF消化率が高かった。これは, de Souza et al. (2017)<sup>5)</sup> の推定式の結果とは一致しなかった。de Souza et al. (2017)<sup>5)</sup> の推定式が NDF消化特性を考慮していないことが一因で, 泌乳前期用TMRは1番草牧草サイレージを利用しているのに対して, 泌乳中・後期用TMRは2番草牧草サイレージを中心に使用していたことが大きな要因であると考えられた。

### 3.2 ルーメン内に滞留する繊維 (NDF) 量に影響する要因

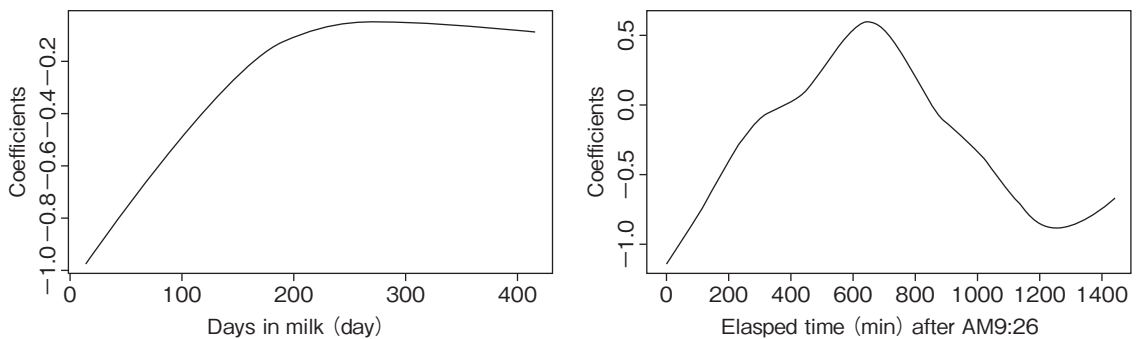
代謝体重 (kg<sup>0.75</sup>), 産次 (初産, 2産, 3産以降), 搾乳日数 (day), 朝の飼料給与からの経過時間 (AM9:26からの経過時間, min), 個体ID (変量効果) を説明変数としたモデルが最適であった (Table 2)。代謝体重を説明変数としたモデルは, 説明変数を体重に置き換えたモデルと比較して, モデル間の分散分析において有意 ( $F = 3.6 \times 10^{12}$ ,  $p < 0.001$ ) に当てはまりが高かった。産次については, 3群 (初産, 2産, 3産以降) と2群 (初産, 2産以降) について比較した結果, 3群に分けたモデルの当てはまりが高く ( $F = 54182$ ,  $p < 0.001$ ), 初産のルーメン内NDF滞留量

**Table 2** The best fit equation for generalized additive model of neutral detergent fiber remain (kg) in the rumen (RMSE\* = 1.08 kg)

Item (fixed effects) †	Unit	Coefficients for fixed effects			Analysis of variance		
		Estimate	SE	p-value	df / edf	F-value	p-value
Intercept		-0.33	0.012	< 0.001			
Metabolic body weight	kg <sup>0.75</sup>	0.0653	0.00010	< 0.001	1	440887	< 0.001
Parity		-	-	-	2	137338	< 0.001
First-parity		0.00	-	-			
Second-parity		1.19	0.002	< 0.001			
Third to Seventh-parity		0.66	0.003	< 0.001			
s(Days in milk)	day	-	-	-	1.442	58526	< 0.001
s(Elapsed time after AM9:26)	min	-	-	-	8.998	48125	< 0.001

\* Root mean square of error in calibration data.

† s( ) means fitting a smoothing spline. The coefficients were shown in Fig. 2.



**Fig. 2** Smoothing spline for days in milk (left) and elapsed time after AM9:26 (right) in the best fit generalized additive model of neutral detergent fiber remain (kg) in the rumen by dynamic simulation based on a real-time total mixed rations intake data (see Table 2).



が低かった。搾乳日数とルーメン内NDF滞留量の関係については、搾乳開始後からルーメン内NDF滞留量が増加し、搾乳日数200日にピークとなる曲線となった (Fig. 2 左)。朝の飼料給与からの経過時間とルーメン内NDF滞留量の関係は、朝の給餌から600~700に日内ピークがある曲線になった (Fig. 2 右)。本研究では、同一の飼養環境(農場)の飼養データを用いた検証にとどまった。より頑健な予測モデルの構築に向けて、給与回数や搾乳回数、TMR設計、乳量水準などが異なる農場のデータによる検証および設定値の最適化が、今後の検討課題として残された。

#### 4. 要 約

本研究では、採食と、消化および下部消化管への通過による時間経過に伴ったルーメン(第一胃)内の繊維(中性デタージェント繊維, NDF)の動態(ルーメン内繊維消化ダイナミクス)に着目し、採食量を予測するためのモデル化を試みた。リアルタイムで自動記録されたデータを用い、採食量と、繊維の消化速度および通過速度から計算したルーメン内NDF滞留量は、 $8.0 \pm 1.2$ kgであり、既報とおおむね一致した。ルーメン内

NDF滞留量は、代謝体重、産次の影響と、日内周期を確認した。搾乳日数の影響も確認され、泌乳中期以降でルーメン内NDF滞留量が高くなり、定常性が確認できなかった。設定値の最適化が必要であると考えられた。本研究は、ルーメン内繊維消化ダイナミクスに基づく採食量予測モデルの骨格を開発することができた。

#### 謝 辞

本研究の実施にあたり、有益なご助言をいただきました酪農学園大学 農食環境学群 循環農学類 泉賢一教授に心より感謝申し上げます。

#### 文 献

- 1) Krizsan, S. J., S. Ahvenjärvi, Huhtanen, P. : *J. Dairy Sci.*, **93**(12), 5890~5901, 2010.
- 2) Fox, D. G., Tedeschi, L. O., Tylutki, T. P., Russel, J. B., Van Amburg, M. E., Chase, L. E., Pell, A. N., Overton, T. R. : *Anim. Feed Sci. Technol.*, **112**, 29~78, 2004.
- 3) 泉賢一, 坂本孝仁, 柴山草太, 辻秀雄 : 日本畜産学会報, **79**(3), 361~368, 2008.
- 4) Kononoff, P. J., Heinrichs, A. J. : *J. Dairy Sci.*, **86**(4), 1445~1457, 2003.
- 5) de Souza, R. A., Tempelman, R. J., Allen, M. S., Weiss, W. P., Bernard, J. K., VandeHaar, M. J. : *J. Dairy Sci.*, **101**(2), 1123~1135, 2017.

# 鶏肉中のイミダゾールジペプチド含量を増やす飼養方法とその活用に関する研究

Feeding methods to increase imidazole dipeptide content in animal meat

久恒 辰博<sup>1</sup>・戸塚 護<sup>2</sup>・江草 愛<sup>2</sup>・青谷 大希<sup>3</sup>・福田 葉<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>東京大学大学院新領域創成科学研究科, <sup>2</sup>日本獣医生命科学大学, <sup>3</sup>秋田県畜産試験場)

Tatsuhiko Hisatsune<sup>1</sup>, Mamoru Totsuka<sup>2</sup>, Ai Egusa<sup>2</sup>, Daiki Aoya<sup>3</sup> and Shiori Fukuda<sup>3</sup>

(<sup>1</sup>Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, <sup>2</sup>Nippon Veterinary and Life Science University,

<sup>3</sup>Akita Prefectural Livestock Experiment Station)

In this study, we focused on imidazole dipeptide, which is a functional ingredient contained in chicken, and establish a method to increase its content by improving the feeding method. Regarding the brain aging prevention mechanism of imidazole dipeptides (carnosine and anserine), the results from Alzheimer's disease model mice and human healthy elderly volunteers have well shown that imidazole dipeptides have a strong scavenging activity to trap hypochlorite (HClO) radical, which is an oxidative radical released from activated neutrophils and microglia. It has been suggested that imidazoledipeptide suppresses the inflammation of the cerebral blood vessels that occur in the capillaries in the brain, and prevents the damage due to the inflammation of the cerebral vascular endothelial cells and pericytes. In order to develop the results of this research and to conduct a human intervention study using chicken meat food itself, this time, we investigated the increase of imidazoledipeptide in meat by improving the feeding method of chicken. Carnosine is synthesized by binding  $\beta$ -alanine and histidine by carnosine synthase in chicken muscle. Furthermore, there is a converting enzyme in chicken muscle, and anserine is produced by methylating the imidazole ring of the histidine residue of carnosine. Therefore, in principle, it is possible to increase the amount of imidazole dipeptide in meat by adding the substrates  $\beta$ -alanine and histidine to the feed. The animals were fed with normal feed or added feed ( $\beta$ -alanine (final concentration 0.5%), histidine (final concentration 0.25%), magnesium oxide (final concentration 0.24%) added to normal feed) for 4-5 weeks. It has been found that the amount of imidazole dipeptide was increased by adding these amino acids, act as substrates of carnosine synthase, and magnesium oxide, as a catalyst thereof.

## 1. 目 的

これまでに行った動物モデル研究ならびにヒト介入試験研究の結果から、食肉に多く含まれるイミダゾールジペプチドに脳の老化や体の炎症性反

応を抑制するはたらきがあることを見出してきた<sup>1~7)</sup>。本研究においては、食肉中、特に鶏肉において、筋組織内のイミダゾールジペプチド（カルノシンとアンセリン）の含量を増やす飼料ならびに飼養方法を確立させることを研究目的とし

た。これまでの研究においては、鶏肉から高度に精製したイミダゾールジペプチド顆粒状食品を用いてヒト介入試験を実施した。記憶機能に対する効果を得るために、1日あたりイミダゾールジペプチドを1g必要とした。高度精製食品を用いたために、最終製品の単価が高価なものとなり、現時点では社会実装できるに至っていない。そこで、鶏肉食品を用いた健康機能性エビデンスの獲得が求められている。

通常のプロイラーでは、ムネ肉中に100g当たり約1000mg(アンセリン750mg, カルノシン250mg), モモ肉中に約400mg(アンセリン280mg, カルノシン120mg)のイミダゾールジペプチドが含まれている。地鶏においては、その種類によって、イミダゾールジペプチドを多く含む。含有量が最も多い系統である比内地鶏においては、ムネ肉100g当たり約1500mg(アンセリン1000mg, カルノシン500mg), モモ肉には約550mg(アンセリン400mg, カルノシン150mg)のイミダゾールジペプチドが含まれている。比内地鶏のムネ肉を利用して試験食品を作成することができれば1日当たりに摂取する肉の量を高齢者の喫食に適した量にすることができると考えられた。そこで、本研究においては、比内地鶏に着目し、イミダゾールジペプチドの増量に適した飼料ならびに飼養方法を開発することを目的とした。

これらのイミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン)は、2つのアミノ酸が結合したジペプチドである。鶏の筋肉中でカルノシン合成酵素により $\beta$ アラニンとヒスチジンがペプチド結合することによりカルノシンが合成される。さらに鶏筋肉中では変換酵素のはたらきにより、カルノシンのヒスチジン残基のイミダゾール環がメチル化されることによって、アンセリンが生成される。したがって、基質である $\beta$ アラニンとヒスチジンを飼料中に添加することにより肉中のイミダ

ゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン)の量を増加させることができる。Kralikらの最近の報告によると、飼料中に $\beta$ アラニンとヒスチジンを添加しさらに酵素活性を高めるMgOを加えることによる飼養方法の改良により、イミダゾールジペプチドの含量を約1.5倍に増加することがプロイラーにおいて確認されている<sup>8)</sup>。イミダゾールジペプチドの含量が多い比内地鶏においても、この飼養方法の改良によりさらにイミダゾールジペプチドの量を増加させることができるのであろうか。この点を検証することが本研究の目的である。鶏肉そのものによる記憶機能改善への効果を調べるにあたり、高齢者が一回あたりに食べる肉量としては、50g程度が妥当であるとの予備的な調査結果がある。そこで本研究では、さらに、比内地鶏のムネ肉を用いて試作食品を製作し、長期の喫食にも適したイミダゾールジペプチド含有食品を開発することが可能であるかについての検討も行った。

## 2. 方 法

比内地鶏の筋肉中のイミダゾールジペプチド(アンセリンとカルノシン)の含有量を増やす飼料・飼養の方法を見出し、これを安定して生産するための生産技術の確立を進めた。本研究においては、すでに予備的検討からイミダゾールジペプチドの含量が多いことが確認されている地鶏である比内地鶏を対象に研究を行った。飼料ならびに飼養の方法として、合成酵素の触媒である酸化マグネシウムを用い、基質である $\beta$ アラニンとヒスチジンとともに仕上げ期の飼料に添加した。

### 2.1 パイロット飼育試験

飼養条件のパイロット検討を行った。10羽の比内地鶏を用いて2区の試験(従来の飼養方法と基質添加の飼養方法)を実施した。日本獣医生命科学大内に設置された鶏舎内において、比内地鶏を

孵化させ、4週齢まで雛用の飼料で飼育した。先行研究であるブロイラーでの場合に合わせて、9週あるいは15週の時点で比内地鶏をと鳥した。最後の5週間は、通常の飼料と添加飼料（ $\beta$ アラニン（添加量0.5%）・ヒスチジン（添加量0.25%）・酸化マグネシウム（添加量0.24%）を通常飼料に添加）で飼育した。そして、ムネ肉とモモ肉に分け分析用の検体とした。各検体中のイミダゾールジペプチド、カルノシンとアンセリンの含有量を定量した。

## 2.2 通常の飼育期間に基づいた比内地鶏の飼育試験

比内地鶏100羽を用いて、7月より22週間にわたる飼育試験を実施した。17週までは通常に飼料で飼育を行った。添加飼料は比内地鶏の仕上げ期にあたる17週から22週の期間に与えた。4区での飼養には、1) 通常の飼料、2) 通常の飼料に酵素活性を高める酸化マグネシウム（添加量0.24%）のみを加えた飼料、3) 通常の飼料に酸化マグネシウムと $\beta$ アラニン（添加量0.5%）を加えた飼料、4) 通常の飼料に酸化マグネシウムとヒスチジン（添加量0.25%）を加えた飼料、5) 通常の飼料に酸化マグネシウム、ヒスチジンと $\beta$ アラニンを加えた飼料を用い、自由摂取とした。22週の時点でと鳥し、先の方法にならって、ムネ肉およびモモ肉中のイミダゾールジペプチド（アンセリンとカルノシン）の量を定量した。

## 2.3 鶏肉そのものを使用したヒト介入試験用の試験食品の開発

比内地鶏の食材を用いてヒト試験に使用する試作食品の開発を行った。これまでのヒト試験では、鶏肉から高度に精製したイミダゾールジペプチド含有顆粒状食品を用いた。この高度精製品を用いたヒト試験結果、1日あたりイミダゾールジペプチドとして1gを摂取する必要がある、最終製品の単価が千円程となり高価すぎて社会実装す

るに至っていない。そこで本研究では、鶏肉そのものの食品を使用してヒト試験を実施するための製造技術の確立を進めた。本研究では、1包装あたり15~30g程度のムネ肉を含む鶏肉食品を製造し、1個あたりにイミダゾールジペプチドが0.3~0.5g含まれるようにした。

## 3. 結果と考察

鶏研究の分野において、飼養期間が短く最も生産量の多いブロイラーに関係した研究が、全世界的に多く実施されている。一方で地鶏に関する研究は、産地である各県の畜産試験場によって研究が進められているが、飼養条件なども産地によって異なっていることから、個別での研究実施が求められている。本研究で研究対象とする比内地鶏は、平飼いであり、通常の飼養期間が160日と長くその期間はブロイラーと比べて3倍以上となる。しかしそれゆえ、肉質が良く、美味であり、消費者のニーズが高い。高価であることから、利益率が高く、潜在的には輸出を含めて、高付加価値なバリューチェーンを構築しやすい。地鶏については、日本各地に産地があり、同じような飼養方法で、新しい需要を拡大していけるものと考えられた。本研究の目的は、ブロイラーにおいて見出された飼養方法が、地鶏においても適応可能であるのか、この飼養方法の改良によって比内地鶏のイミダゾールジペプチド含量を増加させることができるのか、を検証した。

### 3.1 パイロット飼育試験の結果

本試験の実施のための検討研究として、通常の飼料と特別に配合した飼料（ $\beta$ -アラニン、ヒスチジンおよび酸化マグネシウム添加飼料）を用いて9週から15週齢までの間、比内地鶏を飼育し、筋肉中のイミダゾールジペプチド量（アンセリン量とカルノシン量）を分析した。また、このパイロット試験のさらに予備検討として、4週から9

週齢までの間、比内地鶏を通常飼料と特別配合飼料で飼育し、同様にイミダゾールジペプチド量(アンセリン量とカルノシン量)を分析した。なお、イミダゾールジペプチド含量の計測は、MoraらのHILIC-HPLCによるイミダゾールジペプチドの定量方法<sup>9)</sup>に基づいて実施した。Table 1に本パイロット試験の結果を表した。試験区において有意にアンセリンの量が増加することが認められた(18%増量,  $p < 0.05$ )。イミダゾールジペプチドの全体量においても増加傾向(約5%の増量)が認められた。この傾向は、予備的に実施した4週から9週の間試験区と対照区を設けて実施した試験においても観察された(対照区・試験区, 各  $n = 5$ )。プロイラーと同等の9週間の飼育、ならびに15週間の飼育期間において、飼料の改良によりイミダゾールジペプチド、特にアンセリンの増量が可能になることが示された。

### 3.2 通常の飼育期間に基づいた比内地鶏の飼育試験の結果

試験飼料を調製して通常の飼育期間である22週齢まで比内地鶏を飼育し、発育成績や解体成績を評価するとともに、筋肉中イミダゾールジペプチド

の定量分析を実施した。慣行区では中部飼料株式会社製の比内地鶏用前期(～4週齢)、中期(4～17週齢)および仕上げ飼料(17週齢～)を用いた。試験区においては、17週齢より各添加物を仕上げ飼料に混ぜ込み、使用した。混ぜ込みの際に、攪拌操作を行ったために、飼料の粒径が小さくなる傾向があった。なお、飼育条件としては、4週齢までバッテリー式育雛器を使用した。4週齢以降パイプハウスで飼育した。飼育密度は4～17週齢:4.5羽/m<sup>2</sup>, 17週齢～:1.6羽/m<sup>2</sup>とした。自然日長、不断給餌、自由飲水とした。発育調査は、初生時ならびに4,14および22週齢で行った。各群間で、体重などの差異は特に認められなかった。22週齢で解体調査を行った。その後、上述した方法により、筋肉中のイミダゾールジペプチド量を定量計測した。Table 2に本試験の結果を表した。アンセリン量、カルノシン量、ともに各群間( $n = 10$ )で有意な差は認められなかった。むしろ試験区1でわずかに低下している傾向を認めた(アンセリンは3%減、カルノシンは3%減)。通常の飼育条件においては、すでに最適化がなされており、これ以上のイミダゾールジペプチドの

Table 1 Imidazole dipeptide content in chicken breast meat (15-week test)

Test group (n = 5)	Anserine (g/100g)	Carnosine (g/100g)	Imidazoledipeptide (g/100g)
Control	1.02 ± 0.0	0.49 ± 0.1	1.51 ± 0.1
Test (MgO + β Ala + His)	1.20 ± 0.2	0.35 ± 0.0	1.55 ± 0.2

Data was shown by average ± SD

Table 2 Imidazole dipeptide content in chicken breast meat (22-week test)

Test group (n = 10)	Anserine (g/100g)	Carnosine (g/100g)	Imidazoledipeptide (g/100g)
Control	1.15 ± 0.06	0.51 ± 0.06	1.66 ± 0.07
Test 1 (MgO)	1.12 ± 0.08	0.50 ± 0.07	1.61 ± 0.05
Test 2 (MgO + β Ala)	1.10 ± 0.05	0.51 ± 0.04	1.62 ± 0.04
Test 3 (MgO + His)	1.15 ± 0.07	0.48 ± 0.08	1.62 ± 0.05
Test 4 (MgO + β Ala + His)	1.07 ± 0.07	0.55 ± 0.10	1.62 ± 0.05

Data was shown by average ± SD





Fig. 1 Chicken porridge retort food containing imidazoledipeptide  
(Left) Chicken breast meat (15~30g/piece) used for cooking. (Middle) Chicken porridge after regular cooking.  
(Right) Chicken porridge after retort processing.

増量は困難であると考えられた。

### 3.3 鶏肉そのものを使用したヒト介入試験用の食品開発

比内地鶏のムネ肉を使用した食品開発において、高齢者にとって食べやすく、日常的に長期に継続して喫食できる食品を開発することに重きをおいた。まずは、レトルト加工などにより長期保存が可能な食品を念頭に、開発を進めた。また、高齢者だけでなく、幅広い年代にも支持されうる食品を開発することとした。通常の飼育条件で飼養された市販されている比内地鶏のムネ肉を使用した。1回あたりの喫食量(30gを想定)あたり、イミダゾールジペプチドを0.5g摂取できる食品を開発対象とした。予備的に10種類の食品を製作し、高齢者モニターの参加による試作食品検討会を実施し、これらの味と食べやすさの観点で、評価した。この検討会の経験に基づき、鶏かゆを試作食品として設定した。レトルト工場にて、鶏ムネ肉を1パックあたり15~30g入れたかゆ状食品を製造した。

レトルト加工をした後、2週間以上を経過した食品サンプル(Fig. 1)を用いてイミダゾールジペプチドの含量を定量分析した。その結果、15gの比内地鶏ムネ肉から調整したレトルト食品中にアンセリン197mg、カルノシン80mgが含まれて

いることが分かった。ムネ肉100gあたり、アンセリン1313mg、カルノシン533mgとなることが算出された。この量は、Table 2に示した慣行区のデータに比べて同等か、やや高い値であり、食品加工中の損失されるイミダゾールジペプチドの量はきわめて少ないことが推察された。

## 4. 要 約

本研究においては、鶏肉中に含まれる機能成分であるイミダゾールジペプチドに着目し、飼養方法を改良することによってその含量を高める方法を見出すことができた。イミダゾールジペプチド(カルノシンとアンセリン)の脳老化防止機構に関しては、アルツハイマー病モデルマウスや健康高齢者参加研究の結果から、イミダゾールジペプチドには、酸化ラジカルである次亜塩素酸ラジカルを捕捉する強力な作用があり、脳内の毛細血管に生じる脳血管の炎症を抑制し、そして脳血管ペリサイトの炎症による脳組織傷害を抑制することが示唆されている。地鶏であっても、イミダゾールジペプチド合成酵素の基質ならびにその触媒として作用する酸化マグネシウムを飼料に添加する飼養方法によって、さらなるイミダゾールジペプチドの増量が可能となることが分かった。



## 文 献

- 1) Herculano, B., Tamura, M., Ohba, A., Shimatani, M., Kutsuna, N., Hisatsune, T. :  $\beta$ -Alanyl-L-histidine rescues cognitive deficits caused by feeding a high fat diet in a transgenic mouse model of Alzheimer's Disease, *Journal of Alzheimer's Disease*, **33**, 983~997, 2013.
- 2) Rokicki, J., Li, L., Imabayashi, E., Kaneko, J., Hisatsune, T., Matsuda, H. : Daily carnosine and anserine supplementation alters verbal episodic memory and resting state network connectivity in healthy elderly adults, *Frontiers in Aging Neuroscience*, **7**, 219, 2015.
- 3) Hisatsune, T., Kaneko, J., Kurashige, H., Cao, Y., Satsu, H., Totsuka, M., Katakura, Y., Imabayashi, E., Matsuda, H. : Effect of Anserine/Carnosine Supplementation on Verbal Episodic Memory in Elderly People, *Journal of Alzheimer's Disease*, **50**, 149~159, 2016.
- 4) Kaneko, J., Enya, A., Enomoto, K., Ding, Q., Hisatsune, T. : Anserine (beta-alanyl-3-methyl-L-histidine) improves neurovascular-unit dysfunction and spatial memory in aged A  $\beta$  PPsw/PSEN1dE9 Alzheimer's-model mice, *Scientific Reports*, **7**, 12571, 2017.
- 5) Katakura, Y., Totsuka, M., Imabayashi, E., Matsuda, H., Hisatsune, T. : Anserine/Carnosine Supplementation Suppresses the Expression of the Inflammatory Chemokine CCL24 in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Elderly People, *Nutrients*, **9**, 1199, 2017.
- 6) Ding, Q., Tanigawa, K., Kaneko, J., Totsuka, M., Katakura Y., Imabayashi, E., Matsuda, H., Hisatsune, T. : Anserine/carnosine supplementation preserves blood flow in the prefrontal brain of elderly people carrying APOE e4, *Aging and Disease*, **9**, 334~345, 2018.
- 7) Masuoka, N., Yoshimine, C., Hori, M., Tanaka, M., Asada, T., Abe, K., Hisatsune, T. : Effects of Anserine/Carnosine Supplementation on Mild Cognitive Impairment with APOE4, *Nutrients*, **11**, 1626, 2019.
- 8) Kralik, G., Sak-Bosnar, M., Grcevic, M., Kralik, Z. : Effect of Amino Acids on Growth Performance, Carcass Characteristics, Meat Quality, and Carnosine Concentration in Broiler Chickens, *J Poult Sci*, **55**(4), 239~248, 2018.
- 9) Mora, L., Sentandreu, M. A., Toldrá, F. : Hydrophilic chromatographic determination of carnosine, anserine, balenine, creatine, and creatinine, *J Agric Food Chem*, **55**(12), 4664~4669, 2007.

# 豚の未熟産子（ひね豚）の発育遅延をもたらす 生理的要因の解明（Ⅱ）

Factors affecting mortality and growth retardation in runt pigs (Ⅱ)

中島 郁世・谷口 雅章・芦原 茜・荒川 愛作・渡邊 源哉・本山 三知代・佐々木 啓介

(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)

Ikuyo Nakajima, Masaaki Taniguchi, Akane Ashihara, Aisaku Arakawa, Genya Watanabe,

Michiyo Motoyama and Keisuke Sasaki

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

It is widely accepted that low birth weight in piglets ( $\leq 1.0$  kg) correlates with decreased survival and lower postnatal growth rates than those born with normal body weights. The objective of this study was to figure out whether these problems might come from some kind of disordered physiological condition in runt pigs, such as stress, inflammation or malnutrition. Three-way crossbred female pigs originated from 21 litters were categorized in two groups by their birth weights: birth weight of 1.0 kg and under as “runt pig”, and the heaviest weight in the same litter as “normal pig”. Runt pigs exhibited lower postnatal growth performance throughout the experiment compared to normal pigs. At 10 wk-old of age (approximately 30 kg), blood and saliva samples were collected from both fed and fasted conditions. Circulating levels of amino acids and blood metabolites in runt and normal pigs responded similarly when they were fasted. There were significant differences in levels of several essential and limiting amino acids between these two groups, which concentrations were lowered in runt pigs. We also verified that runt pigs had lower amount of serum immunoglobulins than normal pigs. Conversely, the levels of blood cholesterols and alkaline phosphatase (ALP) activity were higher in runt pigs. However, runt pigs did not seem to show any chronic stress and/or inflammatory status by measuring those concentrations of stress hormone and inflammatory cytokines in both serum and saliva. Overall, our data strongly indicate that runt pigs can be characterized by some sort of under nutritional condition and deterioration of its immune system.

## 1. 目 的

養豚業界において、離乳まで十分生存しうる生時体重の子豚をバラツキなく生産することは積年の課題である。近年の大規模養豚農場の種豚は、欧米から導入される驚異的な繁殖成績を示す多産系ハイブリッド種が主流を占め、また農林水産省

の家畜改良増殖目標（平成27年3月）において一腹当たりの生産頭数向上を掲げているように、今後も多産化傾向が続く。他方で総産子数の増加を指標とする改良は、死産子数や未熟産子の割合を増すリスクを伴う。肉質形質に比べて繁殖形質そのものの遺伝率が低いなか、未熟産子や生時体重のバラツキに関する遺伝率はさらに低いことから

育種改良を望むのは非常に困難な形質となっている。

生時体重1 kg以下で生まれる未熟産子(以下「ひね豚」と呼ぶ)は、離乳までの死亡率が40~60%にもなる<sup>1)</sup>。したがって、死亡率の高いひね豚の存在は、一腹当たりの生存産子数および離乳子豚数を低下させるため養豚農場の繁殖成績に直結する。また生存したひね豚は発育が遅いため、出荷までの日数が長期化することからやはり養豚農場の収益に悪影響を及ぼす。さらにひね豚は、平均的な体重の子豚に比べてPRRS(豚繁殖・呼吸障害症候群)に罹患しやすく<sup>2)</sup>、ひね豚の感染をきっかけに養豚農場でPRRSが発生すれば甚大な経済被害をもたらすことになる。

日本養豚開業獣医師協会の生産性評価システムPigINFO(2017/4/7現在)によると、平均的な農場では一腹当たりの総産子数と生存産子数の間に1.1頭、さらに生存産子数と離乳子豚数の間に1.3頭の差があり、分娩してから離乳までに一腹当たり2.4頭損失するとされる。いかに一腹当たりの離乳子豚数を総産子数に近づけられるかが、養豚における生産性向上のための技術開発において重要な要素となる。我々は、まずは一定の割合で娩出されるひね豚を強健化し、平均的な離乳体重に上げることが問題解決上有効であると考えた。しかしながら、ひね豚の死亡率を高めている虚弱性あるいは増体の低さが何に起因するのか不明である。

本研究課題では、ひね豚強健化の第一段階としてひね豚の虚弱性および発育遅延をもたらしている生理的要因を明らかにすることを目的としている。昨年度(H30年度)、同腹のひね豚と正常豚の絶食時と飽食時の血液および唾液中の成分を比較した結果、ひね豚の虚弱や発育不良に関連している要因として「栄養障害」および「免疫機能」の2点に問題がある可能性が示唆された。そこで

今年度(H31年度)は、ひね豚ペアの供試頭数を新たに追加し上記2点についてまず検証する。次いで、栄養代謝の基幹臓器である肝臓に着目し、血液生化学検査や遺伝子発現解析によりひね豚と正常豚では肝代謝機能に違いがあるのか明らかにする。

## 2. 方法

### 2.1 供試豚および材料

今年度(H31年度)、農研機構畜産研究部門にて新たに生産された三元交雑豚(LWD種)11腹から同腹の雌子豚のうち生時体重が1 kg以下の最小の産子(ひね豚)と最大の産子(正常豚)のペアを選出し、昨年度の10腹分と合わせて供試頭数21組とした。子豚は4週齢で離乳後、飽食給餌にて飼養し10週齢(正常豚の目安体重約30kg)でと畜した。採材は、と畜予定の約1週間前に21時間の絶食処理を行い唾液採取および頸静脈より血清用真空採血管を用いて採血を行った(絶食時)。また、と畜前に唾液、と畜時に放血血液(飽食時)、およびと畜直後に肝臓を採取した。細切した肝臓は速やかに液体窒素で凍結した後、-80℃にて保管した。唾液と血液は遠心分離後、上清を回収して各分析に供試するまで-80℃にて保管した。

### 2.2 血清中遊離アミノ酸濃度の測定

飽食時および絶食時の血清を用いて、血清と同量の6%スルホサリチル酸水溶液を加えて除タンパクし、上清を限外濾過膜(倉敷紡績)でろ過した後、高速アミノ酸自動分析計(日立L-8900)により41種類のアミノ酸を解析した。

### 2.3 血清および唾液中ストレス・炎症マーカーの測定

ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法により、ストレスおよび炎症の主要マーカーである血清および唾液中の飽食時および絶食時のC反応

性タンパク(CRP, R&D Systems), インターロイキン(IL)  $-1\beta$  (R&D Systems), IL-6(R&D Systems), 腫瘍壊死因子(TNF)- $\alpha$  (R&D Systems), 免疫グロブリン (Ig) G (Bethyl Laboratories), IgA (Bethyl Laboratories) と IgM (Bethyl Laboratories) の濃度について測定した。コルチゾール濃度については, Beckman Coulter Access 2 PROイムノアッセイシステムを用いて測定を行った。

#### 2.4 血液生化学検査

飽食時および絶食時の血清を用いて, オリエンタル酵母工業株式会社が実施する肝・胆疾患スクリーニングセットに含まれる21項目に尿素窒素(BUN), クレアチンキナーゼ(CK), 遊離脂肪酸(NEFA), グルコース(GLU) およびピルビン酸(PA)を加えた計26検査項目について依頼分析を行った。

#### 2.5 肝臓の遺伝子発現マイクロアレイ解析

約100mgの肝組織から抽出・精製したtotal RNAをバイオアナライザ2100 (Agilent社)にてRNAの品質を確認した後, Cyanine 3を用いて標識し, Agilent社のPig Gene Expression Microarray (4×44K)に1個体/アレイ(計20アレイ)でハイブリダイゼーションを行った。Agilent社のDNAマイクロアレイスキャナ(G2505B)を用いてアレイ上の蛍光シグナルを検出し, Feature Extractionソフトウェア(ver9.5)により検出シグナルを数値化した。

#### 2.6 統計解析

統計解析は, 統計パッケージSAS (ver9.12)プログラムのMIXEDプロシジャを用い, 生時体重による分類と摂食の有無を主効果とした一般線型混合モデルで解析した。最小二乗平均値間の多重比較はTuckey-Kramerの方法で行い,  $p < 0.05$ の場合に差が有意であると判定した。マイクロアレイデータについてはR<sup>3)</sup>のlimma<sup>4)</sup>を利用してデータの補正を行った。補正されたデータは, t

検定の後, Rのp.adjust関数を用いてBenjaminiとHochberg法<sup>5)</sup>による多重比較検定を行った。

### 3. 結果と考察

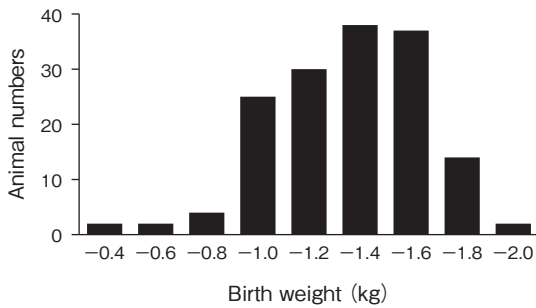
今年度(H31年度)新たに供試した11腹について, 母豚の繁殖成績をTable 1に示した。平均一腹あたりの生存産子数は14頭であり, その平均生時体重は1.33kgとなった。子豚の生時体重は0.4~1.9kgとばらつき(Fig. 1), 生時体重1kg以下の未熟産子(Fig. 2)が生まれる頻度は全体の2割を占めた(Table 1)。そのうち本試験で用いた正常豚(雌子豚の最大産子)の生時体重は1.6kgであったのに対して, ひね豚の生時体重は0.9kgであった。離乳時(4週齢)には正常豚の体重が9.9kgに到達したのに対し, ひね豚の体重は4.9kgであった。最終的にと畜時(10週齢)における正常豚の体重が40kgを超える一方でひね豚の体重は目安の30kgに満たず(26.6kg), 生時から10週齢に至るまで両者の間で体重(Fig. 3A)および平均日増体量(Fig. 3B)が逆転することはなかった。平均日増体量が5週目と7週目で低下したのは, それぞれ1週前に行った離乳および飼料の切り替えが原因と考えられる。

血液および唾液中成分を分析するにあたって, 豚の絶食時と飽食時の両方から採材を行った。飽食時に比べ, 絶食時の血清中NEFA濃度は7倍高値を示しかつ血糖値が4割低下したことから採材試料が絶食状態であることを確認した。摂食の有無による影響は血清中CRP, IgA, コルチゾール, 唾液中IgAとコルチゾール, および多種の血液成分において観察された(Table 2)。摂食による効果が認められなかったアミノ酸はArg,  $\alpha$ -アミノアジピン酸, シスタチオン, ヒドロキシプロリンと3-メチルヒスチジンであり, 血液成分に至ってはわずかにA/G, Fe, LDHとCKのみであった。

**Table 1** Reproductive performance of sows at farrowing<sup>1)</sup>

Traits	
Litter size (born alive), n	14.0 ± 2.2
Total litter weight, kg	18.6 ± 3.1
Average birth weight, kg	1.33 ± 0.13
Average birth weight of females, kg	1.28 ± 0.26
Average birth weight of males, kg	1.37 ± 0.33
Stillborn piglets, n	1.82 ± 1.66
Piglets ≤ 1.0 kg, %	21.1 ± 11.4

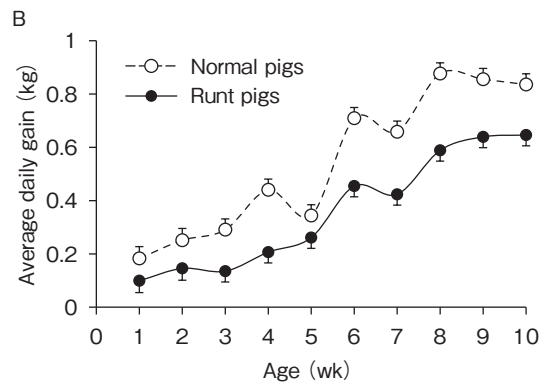
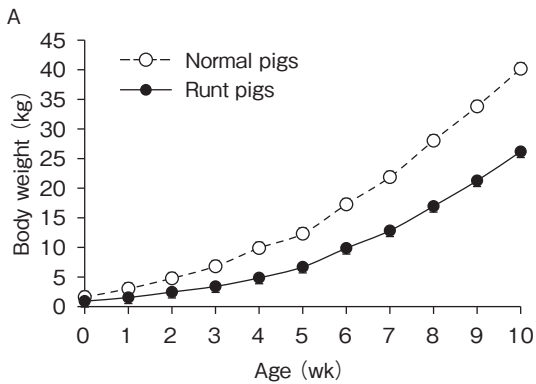
<sup>1)</sup> Values are the mean ± SD. There were 11 sows with a total number of 154 piglets born alive with n = 76 for females and n = 78 for males.



**Fig. 1** Number frequency distribution of piglet birth weight. Histograms are the distribution pattern of 154 piglets from 11 sows.



**Fig. 2** Extremely small-sized piglet (arrowhead) with its littermates.



**Fig. 3** Differences in body weight increase (A) and average daily gain (B) of selected female littermates with the respectively highest (normal) and the lowest (runt) body weight at birth. Values are least square means ± SE from 11 litters.

昨年度 (H30年度) 同様、アミノ酸分析計により血清から検出されたのは計31種類の物質であった。ひね豚ペア21組を用いて比較した結果、11種類のアミノ酸について生時体重の違いによる有意

な効果が認められた。なかでも必須アミノ酸であるHis, PheとTrpはひね豚において血中濃度が低く、特定のアミノ酸不足がひね豚の増体を遅延させている一因である可能性は高いと考えられ

Table 2 Effects of feeding and birth weight difference on blood metabolites

Measurements	p value <sup>1)</sup>		
	Feeding <sup>2)</sup>	Birth weight <sup>3)</sup>	Feeding×BW
A/G	n.s.	n.s.	n.s.
ALP	****	**	n.s.
ALT	****	n.s.	n.s.
AST	*	n.s.	n.s.
BUN	**	n.s.	*
ChE	****	n.s.	n.s.
CK	n.s.	n.s.	n.s.
D-BIL	****	n.s.	n.s.
E/T	**	n.s.	n.s.
E-CHO	****	**	n.s.
F-CHO	****	**	n.s.
Fe	n.s.	n.s.	n.s.
GGT	****	n.s.	n.s.
GLU	****	n.s.	n.s.
HDL-CHO	****	n.s.	n.s.
I-BIL	****	n.s.	n.s.
LAP	*	n.s.	n.s.
LDH	n.s.	n.s.	n.s.
LDL-CHO	****	*	n.s.
NEFA	****	n.s.	n.s.
PA	****	n.s.	n.s.
TBA	****	n.s.	n.s.
T-BIL	****	n.s.	n.s.
T-CHO	****	**	n.s.
TG	****	n.s.	n.s.
TP	****	n.s.	n.s.

1) \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\* p < 0.001, \*\*\*\* p < 0.0001, n.s., not significant. n = 21

2) Asterisks indicate difference between fed and fasted condition.

3) Asterisks indicate low birth weight piglets different from normal birth weight piglets.

た<sup>6,7)</sup>。一方、血液成分については、ひね豚のほうでALPおよびHDLを除くコレステロール群の高値が再確認された（Table 2）。さらに、ひね豚の血清中IgA濃度が正常豚より低いことも再現性が認められた。同様に、炎症性サイトカインであるCRPとIL-6およびストレスマーカーであるコルチゾールは血清・唾液ともに生時体重による影響が認められず、より重度な炎症促進マーカーであるIL-1 $\beta$ およびTNF $\alpha$ については両者ともほぼ検出レベル以下となった。

以上の結果から生時体重の小さいひね豚は、必須アミノ酸の一部が低い「栄養障害」と血中IgA濃度が低い「免疫機能」の両面で問題を抱えていることが明白になった。一方で、ひね豚が生理的

に顕著なストレスおよび慢性炎症の状態にあるわけではない点についても確認が得られた。また、両者でALPおよびコレステロール値に差が認められたことから、ひね豚の代謝制御には肝臓が影響している可能性が示唆された。マイクロアレイを用いた正常豚とひね豚の肝臓の遺伝子発現比較については、現在解析モデルの検討中である。

#### 4. 要 約

生時体重1 kg以下で生まれる未熟産子（ひね豚）は、死亡率が高く、また生存したとしても発育が遅いことから養豚農家の繁殖成績や肥育成績に直結する。本研究では、ひね豚の死亡率を高め、虚弱性あるいは増体の低さが何に起因する



かを明らかにすることを目的として、ひね豚と同腹の正常豚(いずれも雌)を用いて10週齢時(約30kg)の血清および唾液中の成分を比較し、ひね豚がストレス・炎症および栄養障害の状態にあるか否かを検討した。ひね豚として生まれる割合は一腹あたり約2割を占め、10週齢に至るまでひね豚の体重および平均日増体量は常に正常豚のそれを下回った。ひね豚において、正常豚よりも血清中の必須アミノ酸の一部およびIgA濃度が低い一方で、HDLを除くコレステロール類およびALPが高い特徴を認めた。血清および唾液中のコルチゾールや炎症性サイトカインを測定した結果、ひね豚が生理的に顕著なストレスおよび炎症環境に曝露されているわけではないと考えられた。本研究の結果、ひね豚の増体遅延および虚弱性の要因は、栄養障害と免疫機能の両面にあることが強く示唆された。

## 文 献

- 1) 武田浩輝：生時体重の小さい豚、淘汰か？隔離飼養か？, *Pig Journal*, **11**, 14~17, 2008.
- 2) 伊藤貢：ヒネ豚が生じないための飼養管理, *Pig Journal*, **9**, 84~86, 2006.
- 3) Ihaka, R., Gentleman, R. : R : a language for data analysis and graphics, *Journal of Computational and Graphical Statistics*, **5**, 299~314, 1996.
- 4) Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., Smyth, G. K. : limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies, *Nucleic Acids Research*, **43**, e47, 2015.
- 5) Benjamini, Y., Hochberg, Y. : Controlling the False Discovery Rate : a Practical and Powerful Approach to Multiple Testing, *Journal of the Royal Statistical Society : Series B*, **57**, 289~300, 1995.
- 6) Le Floch, N., Gondret, F., Matte, J. J., Quesnel, H. : Towards amino acid recommendations for specific physiological and patho-physiological states in pigs, *Proceedings of the Nutrition Society*, **71**, 425~432, 2012.
- 7) Regmi, N., Wang, T., Crenshaw, M. A., Rude, B. J., Wu, G., Liao, S. F. : Effects of dietary lysine levels on plasma free amino acid profile in late-stage finishing pigs, *Springer Plus*, **5**, 888, 2016.

# 黒毛和種育成牛のアミノ酸要求量に関する研究

Amino acid requirements for growing Japanese Black cattle

寺田 文典

(東北大学大学院農学研究科)

Fuminori Terada

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

In order to clarify the protein and amino acid requirements of growing Japanese black cattle at high daily body weight gain (DG), the relationship between feeding performance and plasma amino acid concentration was examined by three experiments. Experiment 1 examined the effect of increasing the supply of soybean meal on feeding performance, Experiment 2 examined the effect of increasing the supply of roasted soybean meal, and Experiment 3 examined the effect of the rumen degradable protein (RDP)/crude protein (CP) rate by replacing the soybean meal with roasted soybean meal. An effect of treatment on DG was not observed in any of the experiments. In Experiment 1, the blood urea nitrogen concentration significantly increased in the treatment group where the CP intake was increased by 23% ( $p < 0.01$ ). An effect of treatment on the plasma essential amino acid concentrations was not observed in any of the experiments, but in Experiments 1 and 3 the plasma amino acid concentration evidently increased as gaining of month-old. When the relationship between the metabolizable protein (MP) sufficiency rate, plasma lysine, and plasma methionine concentration was analyzed by a single slope, broken-line model, the break point was around 90%, and when the MP sufficiency rate was more than 100%, the deficiency of essential amino acids was not recognized. In addition, the results suggested that when the RDP was more than approximately 11%, there would have been no effect on feeding performance due to the increase in RDP.

## 1. 目 的

和牛肉の生産コストを削減するため、肥育期間を短縮することが課題となっており、現行の出荷月齢29ヶ月を24~25ヶ月とすることが求められている(農林水産省家畜改良増殖目標, 平成27年<sup>1)</sup>)。肥育期間短縮型の飼養管理を実践するためには、8ヶ月齢で体重270kg程度となる素牛を確保する

ことが必須である。このような素牛の育成について3ヶ月の哺育期間を設けることを前提として試算すると、育成期間の増体日量(DG)として1.0~1.2kgが必要となる。この値は従来の育成速度に比べて著しく速く、エネルギー(濃厚飼料)の増給によってこれを実現することは可能であるものの、その場合には過剰な脂質の蓄積が問題となることも多い。そのため、過剰な脂質の体蓄積を

避けて高増体を実現するために、適切なタンパク質給与水準を明らかにすることが求められている。しかし、黒毛和種育成牛の高増体時のタンパク質要求量に関する研究はきわめて少ない。また、過剰なタンパク質給与は窒素排泄量の増加による環境負荷の増大にもつながることから、代謝タンパク質 (MP) あるいは代謝アミノ酸要求量を明らかにし、高増体に必要十分な量を給与することが可能となるよう、適切な飼養基準を設定することが重要である。

本報告では、黒毛和種牛における育成期のDG 1.0kgを超える高増体時のタンパク質およびアミノ酸要求量を明確にするため、粗タンパク質 (CP) 給与水準、MP給与水準あるいは分解性タンパク質割合 (RDP/CP) が異なる飼養成績を用いて、育成期の血漿中アミノ酸濃度との関連について検討した。

## 2. 方 法

血漿中アミノ酸濃度の分析に供試したサンプル

は、次の実験に用いた育成牛 (雄) より採取したものである。

【実験1】 CP給与水準の異なる2群 (大豆粕の給与水準を2水準設定) を設け (Table 1), 3~8ヶ月齢の黒毛和種育成牛26頭を供試した個体管理による飼養試験を2回に分けて実施した。

【実験2】 MP給与水準の異なる2群を設け (加熱大豆粕の給与水準を2水準設定) (Table 1), 4~8ヶ月齢の黒毛和種子牛10頭を供試した単飼または2頭群飼による飼養試験を実施した。

【実験3】 RDP/CPが異なる2群 (大豆粕を加熱大豆粕で置換することで2水準を設定) を設け (Table 1), 4~8ヶ月齢の黒毛和種子牛10頭を供試した単飼または2頭群飼による飼養試験を実施した。

血漿中アミノ酸の分析は、除脂肪除タンパク質操作ののち高速液体クロマトグラフィー (島津製作所HPLC CTO-20AC) を用いて、オルトフタルアルデヒド試薬によるポストカラム蛍光誘導体化法により測定した。

Table 1 Amount and chemical composition of feeds supplied

	Amount of feed supplied (kg/day)		DM	TDN	CP	RDP	RUP
	Control	Treatment	%	-----%DM-----			
Exp.1							
Formula feed	4.20	3.55	86.4	74.1	19.8	68.2	31.9
Soybean meal	-	0.64	88.2	87.0	51.1	75.0	25.0
Bagasse	0.20	0.20	90.4	28.5	1.9	11.8	88.2
Orchard glass hay	2.25	2.25	85.5	60.1	13.0	68.0	32.0
Rice straw	0.30	0.30	83.8	42.9	5.4	51.0	49.0
Exp.2							
Total mixed ration	6.28	5.96	84.5	72.9	15.6	69.5	30.5
Formula feed	0.35	0.33	88	80.8	17.1	65.6	34.4
Soybean meal	0.10	-	88.2	87.0	51.1	75.0	25.0
Rosted soybean meal	-	0.43	89.8	89.7	52.9	55.0	45.0
Exp.3							
Total mixed ration	5.44	5.43	85.4	72.9	15.6	69.5	30.5
Kraft pulp feed	0.54	0.55	86.8	95.7	0.4	69.1	30.9
Soybean meal	0.40	-	88.2	87.0	51.1	75.0	25.0
Rosted soybean meal	-	0.39	89.8	89.7	52.9	55.0	45.0

DM : dry matter, TDN : total digestible nutrients, CP : crude protein, RDP : rumen degradable protein, RUP : rumen undegradable protein.

なお、飼養試験成績におけるMP摂取量およびMP充足率の計算は日本飼養標準肉用牛（2008）<sup>2)</sup> およびNASEM飼養標準肉用牛（2016）<sup>3)</sup>を参考に次のように行った。

- 1) 給与飼料の成分含量および可消化養分総量（TDN）含量は、日本標準飼料成分表（2009年版）<sup>4)</sup>、日本飼養標準肉用牛（2008年版）<sup>2)</sup>、推定値（十勝農協連）および表示値を用いた。
- 2) ルーメン微生物態タンパク質（MCP）量は、 $(42.73 + 0.87 \times \text{TDN 摂取量} \times 100) / 1000\text{kg}$ として、非分解性タンパク質消化率は、粗飼料の場合は0.6、その他の飼料は0.8として計算した。
- 3) 維持に要するMP要求量は、 $3.8 \times (\text{体重} \times 0.96)^{0.75} \text{ g} / \text{日}$ として求めた。
- 4) 増体に要するMP要求量は、 $\text{DG} \times 0.96 \times ((268 - 29.4 \times \text{体タンパク質蓄積$

量 / (DGx0.96)) / 0.492

として求めた。なお、体タンパク質蓄積量は、 $0.0639 \times \text{BW}^{0.75} \times \text{DG}$ として求めた。

統計解析は、JMP Ver.14.0を用い、飼養成績および血漿中アミノ酸濃度については、処理効果と月齢効果を母数効果とし、実験1では個体を、実験2、3では群を変量効果とする混合モデルによって行った。MP充足率と血漿中アミノ酸濃度との関連については折れ線モデルを当てはめることにより検討した。

### 3. 結果と考察

#### 【実験1】大豆粕の増給による効果

大豆粕の増給が飼養成績および血漿中必須アミノ酸濃度に及ぼす影響についてTable 2に示した。CP摂取量（CPI）、MP摂取量（MPI）は、試験区が対照区に比べてそれぞれ23%、11%有意に高い値を示したが、平均体重、DG、DMIのいずれに

Table 2 Effect of increasing soybean meal on feeding performance and plasma essential amino acid concentration (Exp. 1)

	Control group			Treatment group			p value		
							Treatment	Month-old	Interaction
Feeding performance									
Body weight, kg	196	±	7*	207	±	7	0.19	<.01	0.52
Daily body weight gain, kg	1.06	±	0.04	1.13	±	0.04	0.17	0.71	0.58
Dry matter intake, kg	5.30	±	0.11	5.53	±	0.10	0.14	<.01	0.76
TDN intake, kg	3.53	±	0.08	3.75	±	0.07	0.04	<.01	0.73
Crude protein intake, kg	0.87	±	0.02	1.07	±	0.02	<.01	<.01	0.18
Metabolizable protein intake, kg	0.48	±	0.01	0.53	±	0.01	<.01	<.01	0.62
Sufficiency rate of MP requirement, %	102.2	±	2.1	109.4	±	1.9	0.02	<.01	0.80
Plasma amino acid (nM/ml)									
Lysine	105.4	±	4.1	111.7	±	3.7	0.25	<.01	0.07
Methionine	21.9	±	0.7	23.1	±	0.7	0.27	0.01	0.11
Phenylalanine	79.0	±	2.7	81.4	±	2.5	0.41	0.07	0.08
Threonine	102.2	±	4.2	103.9	±	3.8	0.75	<.01	<.01
Tryptophan	69.5	±	1.9	70.8	±	1.7	0.63	0.26	0.78
Valine	486.5	±	170.2	539.0	±	169.6	0.23	0.90	0.14
Isoleucine	141.8	±	4.6	151.4	±	4.1	0.13	<.01	0.01
Leucine	189.1	±	10.2	203.0	±	9.6	0.21	<.01	0.04
Histidin	93.5	±	14.3	97.4	±	14.2	0.43	<.01	0.07
Arginine	116.5	±	7.0	130.7	±	6.6	0.05	<.01	0.21
Plasma Urea nitrogen (mg/dl)	12.2	±	1.5	15.0	±	1.5	<.01	<.01	0.95

\* : Least squares mean ± standard error.

においても有意差は認められなかった。一方、PUNは対照区に比べて試験区が23%高い値を示した。血漿中必須アミノ酸濃度については、全般に対照区に比べて試験区においてやや高い値を示したが、5%水準で有意差が認められた項目はArgのみであった。月齢の効果は顕著であり、Trp, Valを除く他の項目において月齢の進行に伴って血漿中の濃度が増加する傾向あるいは有意差が認められた。

### 【実験2】加熱大豆粕増給による効果

加熱大豆粕の増給による飼養成績および血漿中必須アミノ酸濃度に及ぼす影響についてTable 3に示した。MP摂取量は対照区に比べて試験区において13%多い値を示した ( $p = 0.09$ ) がDGに差は認められず、いずれも1.2kgを上回る値を示した。血漿中必須アミノ酸濃度において、処理間、月齢間のいずれにおいても差は認められなかつ

た。血漿中尿素態窒素 (PUN) 濃度は、個体差が大きく処理間に有意性は認められなかったが、月齢間では有意な違いが認められ、月齢の進行に伴って大きく増加した ( $p < 0.01$ )。

### 【実験3】RDP/CPを抑制することによる効果

RDP/CPの抑制が飼養成績および血漿中必須アミノ酸濃度に及ぼす影響についてTable 4に示した。給与飼料の試験区の平均RDP/CPは66%、対照区は71%であり、試験区のRDP%は10.9% (7ヶ月齢)~11.4% (4ヶ月齢)、対照区11.3% (7ヶ月齢)~12.6% (4ヶ月齢)であった。DGはいずれもの区も1.18kgであり、月齢による違いが認められた (1.05kg (4ヶ月齢)~1.31kg (6ヶ月齢))。血漿中必須アミノ酸濃度に処理区間の差は認められなかったが、月齢による違いはLys, His, Arg, Trp, Phe, Metにおいて有意差あるいは傾向が認められた。PUNにおいても処理区間差

Table 3 Effect of increasing roasted soybean meal on feeding performance and plasma essential amino acid concentration (Exp. 2)

	Control group			Treatment group			p value		
							Treatment	Month-old	Interaction
Feeding performance									
Body weight, kg	197	±	8*	196	±	8	0.95	<.01	0.95
Daily body weight gain, kg	1.29	±	0.07	1.24	±	0.07	0.63	0.20	0.91
Dry matter intake, kg	5.44	±	0.22	5.53	±	0.21	0.78	<.01	0.59
TDN intake, kg	4.00	±	0.16	4.12	±	0.16	0.62	<.01	0.60
Crude protein intake, kg	0.88	±	0.04	1.01	±	0.04	0.08	<.01	0.16
Metabolizable protein intake, kg	0.50	±	0.02	0.57	±	0.02	0.09	<.01	0.50
Sufficiency rate of MP requirement, %	95.5	±	4.3	112.2	±	3.8	0.01	<.01	0.96
Plasma amino acid (nM/ml)									
Lysine	107.2	±	9.4	99.0	±	8.9	0.56	0.28	0.38
Methionine	23.6	±	1.6	21.5	±	1.5	0.40	0.95	0.12
Phenylalanine	74.6	±	6.0	75.7	±	5.9	0.90	0.18	0.55
Threonine	94.0	±	16.6	73.5	±	16.4	0.43	0.89	0.72
Tryptophan	55.6	±	3.3	59.4	±	3.1	0.44	0.34	1.00
Valine	295.5	±	32.2	292.8	±	31.6	0.96	0.98	0.90
Isoleucine	154.6	±	17.0	158.0	±	16.6	0.89	0.88	0.70
Leucine	130.5	±	11.2	131.0	±	10.9	0.98	1.00	0.69
Histidin	91.8	±	12.6	74.4	±	12.5	0.38	0.26	0.47
Arginine	114.6	±	12.2	97.6	±	12.0	0.37	0.60	0.27
Plasma Urea nitrogen (mg/dl)	14.7	±	2.9	11.3	±	2.8	0.42	<.01	0.63

\* : Least squares mean ± standard error.

**Table 4** Effect of the rumen degradable protein /crude protein rate by replacing the soybean meal with roasted soybean meal on feeding performance and plasma essential amino acid concentration (Exp. 3)

	Control group			Treatment group			p value		
							Treatment	Month-old	Interaction
Feeding performance									
Body weight, kg	187	±	11*	184	±	11	0.82	<.01	0.91
Daily body weight gain, kg	1.18	±	0.09	1.18	±	0.09	0.99	0.01	0.90
Dry matter intake, kg	5.20	±	0.20	5.17	±	0.20	0.90	<.01	0.54
TDN intake, kg	3.94	±	0.15	3.93	±	0.15	0.95	<.01	0.56
Crude protein (CP) intake, kg	0.87	±	0.03	0.86	±	0.03	0.92	<.01	0.39
Metabolizable protein (MP) intake, kg	0.48	±	0.02	0.51	±	0.02	0.37	<.01	0.56
Sufficiency rate of MP requirement, %	97.0	±	1.6	101.7	±	1.5	0.12	<.01	0.83
Rumen degradable protein/CP%	70.6			66.4					
Plasma amino acid (nM/ml)									
Lysine	89.3	±	6.9	82.4	±	6.8	0.50	0.01	0.40
Methionine	20.4	±	1.7	17.6	±	1.7	0.32	0.08	0.43
Phenylalanine	69.0	±	3.1	62.8	±	3.0	0.23	0.03	0.30
Threonine	65.7	±	5.3	57.1	±	5.1	0.36	0.18	0.28
Tryptophan	52.5	±	2.9	53.4	±	2.8	0.83	0.01	0.57
Valine	228.6	±	14.0	204.3	±	13.6	0.29	0.17	0.51
Isoleucine	129.4	±	9.7	118.8	±	9.5	0.49	0.11	0.61
Leucine	110.4	±	5.8	103.9	±	5.6	0.46	0.26	0.42
Histidin	83.9	±	7.2	82.6	±	7.1	0.91	<.01	0.40
Arginine	88.9	±	6.1	90.9	±	6.1	0.82	0.01	0.52
Plasma Urea nitrogen (mg/dl)	10.3	±	1.0	10.9	±	1.0	0.69	<.01	0.44

\* : Least squares mean ± standard error.

は認められなかったが<sup>5</sup>, 月齢の進行に伴い有意に増加した (7.9mg/dl (4ヶ月齢)~13.0mg/dl (8ヶ月齢)) (p<0.01)。

#### 【総括】

本実験で供試した育成牛は平均で体重200kg (125~323kg), DG 1.13kg (0.69~1.81kg) の牛群であり, MPIはNASEM飼養標準の要求量<sup>3)</sup>に対する充足率として105%程度であった。実験1では, 大豆粕を増給することでMPI1%の増加を, 実験2では加熱大豆粕を用いてMPIを13%増加させ, 実験3ではMCPとRUP由来MPの割合を変えてMPIの5%増加を認めたが, いずれの実験においても血漿中アミノ酸濃度については処理による明確な差異は認められなかった。これらのことから, 黒毛和種雄牛の育成期におけるDGL0程度の増体を確保するためのMP給与量は, 本実験における対照区程度の給与水準で可能であると

判断された。

一方, 月齢の進行に伴いMP充足率が大きく過剰となり, これに伴い血漿中のPUN濃度が増加し, 血漿中アミノ酸濃度の推移においても実験1, 3において明らかな増加が認められた。また, MP充足率と血漿中Lys, Met濃度の関係を見るといずれもMP充足率の増加に伴い血漿中LysおよびMet濃度が増加することが認められた。さらに両者の関係を折れ線モデルによって解析すると, 変曲点はいずれも90%前後に存在することから (Fig. 1), MP充足率が100%を上回っていた6, 7ヶ月齢時のMP給与量は過剰であったものと推測される。

本実験ではMP充足率の評価を血漿中アミノ酸濃度によって考察することを企図したが, 充足率が大きく不足する状況が認められなかったことから, 明確な結論を得るには至らなかった。しかし,



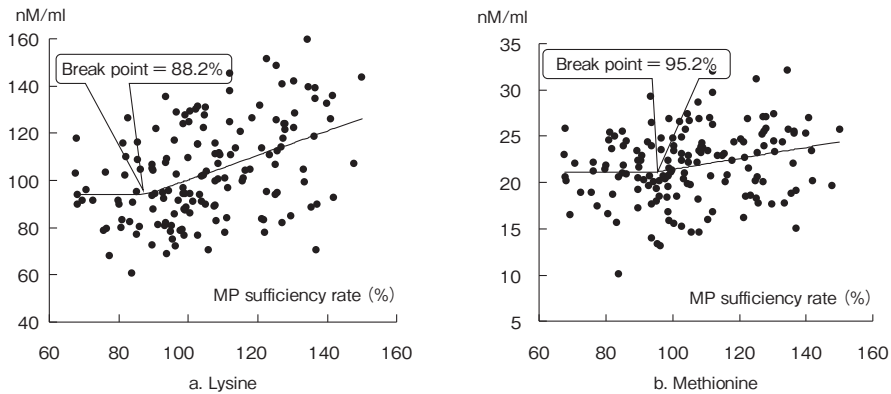


Fig. 1 Relationship between metabolizable protein (MP) sufficiency rate and amino acid concentration

MP充足率と血漿中LysおよびMet濃度の間には有意な回帰係数が認められることから、その有用性については、さらにデータを収集して検討することとしたい。

#### 4. 要 約

黒毛和種育成牛の高増体時のタンパク質（アミノ酸）要求量を明らかにするため、3回の実験成績を用いて飼養成績と血漿中アミノ酸濃度の関連について検討した。実験1では飼養成績における大豆粕の増給効果、実験2では加熱大豆粕の増給効果、実験3では大豆粕を加熱大豆粕で置換することによるRDP/CPの違いによる効果について検討した。いずれの実験においても処理による違いがDGに及ぼす効果は認められなかった。実験1においてはCPIを23%増給した試験区においてPUNの有意な増加が認められた（ $p < 0.01$ ）。血漿中アミノ酸濃度の及ぼす処理効果はいずれの実験

においても認められなかったが、実験1, 3においては、月齢の進行に伴い明らかに血漿中アミノ酸濃度が増加した。MP充足率と血漿中Lys, Met濃度の関係を折れ線モデルによって解析すると、変曲点は90%前後に存在しており、MP充足率100%を基準とした場合、必須アミノ酸の欠乏は認められなかった。また、RDPの適正な水準については、これを11%程度が確保できれば、飼養成績への影響も認められないものと判断された。

#### 文 献

- 1) 農林水産省：家畜改良増殖目標 平成27年。  
[https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l\\_hosin/pdf/h27\\_katiku\\_mokuhyo.pdf](https://www.maff.go.jp/j/chikusan/kikaku/lin/l_hosin/pdf/h27_katiku_mokuhyo.pdf)
- 2) 農業・食品産業技術総合研究機構編：日本飼養標準肉用牛（2008年版），中央畜産会，東京，2009。
- 3) National Academies of Science, Engineering and Medicine：Nutrient Requirement of Beef Cattle, Eighth Revised Edition. National Academy Press, Washington, DC, 2016.
- 4) 農業・食品産業技術総合研究機構編：日本標準飼料成分表（2009年版），中央畜産会，東京，2010。

# 初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性

Colostrum programming of physiological properties related to meat production

松崎 正敏

(弘前大学農学生命科学部)

Masatoshi Matsuzaki

(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)

To investigate the impact of periparturient maternal protein nutrition on colostrum and plasma hormone levels, and on growth and physiological properties of offspring, 3-4 pregnant Suffolk ewes were assigned to one of the 4 treatments in a 2 × 2 factorial design experiment : gestational and lactational protein levels for high (H) or low (L). Ewes were fed on alfalfa pellet, timothy hay and either of isoenergetic concentrate contained 22 or 11% CP. Lamb's birth weight and subsequent growth rates was not affected by gestational and periparturient protein levels, respectively. Glucose tolerance was worse in ewe than ram lambs while periparturient maternal nutritional treatment did not affect any of the parameters measured in insulin and glucose challenges performed at the age of 20wk. Insulin levels in colostrum tended to be higher in the H ewes, however, it was not correlated to any of the offspring's parameters except for a positive correlation to plasma adiponectin levels measured at 20wk.

## 1. 目的

初乳は豊富な栄養素に加えて、母から子への移行抗体の供給源として家畜動物の新生子の受動免疫確立に不可欠である。さらに最近では、初乳中のホルモンその他のメッセージ物質が新生子の成長や生理特性の形成に不可逆的な影響を及ぼすことが明らかにされつつある<sup>1)</sup>。初乳中のメッセージ物質としてIGF-Iやインスリンなどのホルモンが新生子期の急速な成長や腸管の発達、体タンパク質蓄積や糖代謝の活性化に重大な影響を及ぼしていることが明らかにされている<sup>2~4)</sup>。乳中に含まれるその他のホルモン類として、レプチン、

アディポネクチン、グレリン、レジスチンやグルココルチコイドなどが母乳哺育児の成長や発達、さらには食欲やエネルギーバランスの調節に影響して、成人期の肥満の予防に関与することが示唆されている<sup>5~7)</sup>。さらに、母乳中のエクソソームに含まれるメッセージ物質の産子の生理機能の発達や成長に及ぼす影響が研究され始めている<sup>8)</sup>。しかしながら、これらの乳中メッセージ物質の反芻家畜の初乳中含有量に関する知見はきわめて少なく、産子の成長後の生理特性との関連を解析した研究は見あたらない。

そこで、本研究では妊娠末期と哺育中の母めん羊の栄養制御を行った実験モデルを用いて、母畜

の初乳中ホルモンを中心としたメッセージ物質の濃度と産子の成長および生理特性の関連を調べて、反芻家畜の初乳成分による産肉に関わる生理特性の形成に果たす役割を調べるとともに、初乳成分による長期的な代謝的プログラミングの可能性を明らかにすることを目的とする。

## 2. 方 法

同一の種雄畜との自然交配により妊娠したサフォーク種母めん羊を供試して、妊娠末期(交配開始後16週以降)から自然分娩を経て産子が8週齢で離乳するまで個別飼育ペんに収容して飼養試験を実施した。母めん羊はタンパク質含量の異なる配合飼料とアルファルファペレット、チモシー乾草の給与により、高タンパク区(H)あるいは低タンパク区(L)に配置して、妊娠末期および哺育期のタンパク栄養レベルの異なる2×2の4試験区(HH区, HL区, LH区, LL区)の母子めん羊群を作出した。配合飼料のCP含量はH区22%, L区11%とし、TDN含量は75.8%で一定とした。産子は8週齢で離乳させた後、体重比原物2%の配合飼料(CP12%, TDN75%)と体重比1%のアルファルファペレットとチモシー乾草を給与して20週齢まで成長試験を実施した。各区とも3~4腹の産子を得ることができた。分娩直後の母めん羊から乳と血液のサンプルを、20週齢時の産子から血液サンプルを採取した。乳および血

漿サンプル中のインスリン, アディポネクチン, レプチンおよびグレリンの濃度を、市販のめん羊あるいは牛用のELISA測定試薬を用いて測定した。出生時から性成熟期に相当する20週齢までの増体パターンを調査するとともに、経時的な採血, さらに20週齢時にインスリン(0.1IU/kg体重)とグルコース(0.25g/kg体重)の静注負荷試験を実施した。負荷試験時のグルコースならびにインスリンの血中濃度を測定して反応面積(AUC)を算出し、インスリン感受性, 耐糖能およびインスリン分泌能を調査した。初乳中および血漿中のホルモン濃度と生時体重や成長履歴, インスリン感受性や耐糖能との関係を解析した。

## 3. 結果と考察

Table 1に示したように、産子の生時体重や出生後の増体には母めん羊の周産期のタンパク栄養制御の影響は見られなかった。生時体重は、その後の増体速度との間には正の相関が認められた。20週齢時のグルコース負荷後の血中グルコース濃度のAUCは雌で大きい傾向が検出され、耐糖能が雌で雄よりも劣ることが示唆された。一般に、加齢とともに進行する耐糖能の低下と考え合わせると、生理的な加齢は雌の方が速やかに進行することを示す結果とも言えるかもしれない。また、インスリン分泌能は出生後の増体と正の相関を示すことが明らかとなった。しかしながら、20週齢時

**Table 1** Body weights (BW) and average daily gains (ADG) in the lambs born to and nursed by dams subjected to late-gestational and lactational nutritional treatments (average, kg).

Nutritional treatment (Number of lambs)	BW at birth	BW at 8wk	BW at 20wk	ADG 0-4wk	ADG 0-8wk	ADG 0-20wk
HH (n=3 ram, 2 ewe)	4.99	25.93	46.88	0.379	0.374	0.299
HL (n=2 ram, 2 ewe)	5.39	26.13	50.23	0.350	0.370	0.320
LH (n=3 ram, 2 ewe)	5.36	26.59	51.68	0.369	0.379	0.331
LL (n=4 ram, 2 ewe)	5.21	26.52	48.66	0.370	0.381	0.310

HH : gestational and lactational high protein levels, HL : gestational high and lactational low protein levels, LH : gestational low and lactational high protein levels, and LL : gestational and lactational low protein levels, respectively.

**Table 2** Colostral concentrations of insulin, adiponectin, leptin and ghrelin in the dams immediately after parturition.

Nutritional treatment (Number of dams)	insulin, $\mu\text{g/L}$	Adiponectin, $\mu\text{g/mL}$	leptin, $\text{ng/mL}$	ghrelin, $\text{ng/mL}$
H (n = 7)	42.4 ± 16.3	0.17 ± 0.06	2.04 ± 2.28	3.52 ± 3.45
L (n = 7)	28.3 ± 12.0	0.14 ± 0.03	1.41 ± 2.53	9.39 ± 23.02
<i>p</i> -values	0.09	0.31	0.64	0.52

H : gestational high protein level, and L : gestational low protein level, respectively (mean ± SD).

**Table 3** Plasma concentrations of insulin, adiponectin, leptin and ghrelin in the dams immediately after parturition.

Nutritional treatment (Number of dams)	insulin, $\mu\text{g/L}$	Adiponectin, $\mu\text{g/mL}$	leptin, $\text{ng/mL}$	ghrelin, $\text{ng/mL}$
H (n = 7)	2.84 ± 2.82	15.3 ± 1.5	0.37 ± 0.46	6.69 ± 2.98
L (n = 7)	1.32 ± 0.76	17.1 ± 3.1	0.46 ± 0.70	7.48 ± 4.21
<i>p</i> -values	0.19	0.20	0.78	0.69

H : gestational high protein level, and L : gestational low protein level, respectively (mean ± SD).

の負荷試験によって評価した耐糖能、インスリン分泌能およびインスリン感受性といった増体や脂肪蓄積などとも関連するパラメーターには、母めん羊の周産期における栄養制御による影響は認められなかった。インスリン感受性とインスリン分泌能の間には負の相関が認められ、インスリン感受性の低下をインスリン分泌の亢進によって代償しようとする加齢の進行に伴う生理応答が推察されたものの、周産期の母畜の栄養制御による長期的な影響は明らかでなく、初期成長期の栄養条件の違いによる生理特性の修飾は明らかでなかった。

妊娠末期の給与タンパク質レベルを高くすると初乳中インスリン濃度が上昇する傾向が示されたが、その他の初乳中ホルモン濃度には妊娠末期の栄養制御の影響は認められなかった (Table 2)。また、分娩直後の母めん羊の血中のホルモン濃度に比べると、初乳中ではインスリンならびにレプチンの濃度が高く、アディポネクチンは低いことが明らかとなった (Table 2 および 3)。腸管上皮の細胞に存在する受容体群を介してIGF-I やインスリンが、新生子牛の腸管の発達やグルコース代謝の活性化を促すことなどが報告されており<sup>2-4)</sup>、

本研究で観察された妊娠末期高タンパク群における初乳中インスリン濃度の上昇傾向は母畜の栄養制御を通じた産子の生理機能発達の可能性を示す結果として興味深い。初乳中のインスリン濃度は母めん羊の血漿中インスリン濃度と正の相関が認められたことから、妊娠末期のタンパク栄養強化による母めん羊のインスリン合成分泌の亢進とも関連している可能性が考えられる。また、母めん羊の初乳中インスリン濃度と産子の20週齢時における血漿中アディポネクチン濃度との間に正の相関が認められており、初乳中のホルモンと産子の成長後のアディポカイン分泌との関連を示唆するものかもしれない。Kesser (2015) らは、子牛の循環血中アディポネクチン濃度が出生後速やかに上昇することを認めており、代用乳給与に比べて初乳給与時にその上昇が大きいことを報告している<sup>9)</sup>。ホルモンなど初乳中の生理活性物質の腸管からの吸収は否定されてはいるものの<sup>10)</sup>、初乳摂取あるいは腸管上皮への初乳中生理活性物質の接触が出生直後の産子のホルモン分泌などのなんらかの特異的なシグナル伝達に参与する可能性は否定できない。

#### 4. 要 約

妊娠末期の母畜への給与タンパク質レベルを高低2水準として7腹ずつの産子が得られ、さらに哺育期の給与タンパク質を2水準として、周産期のタンパク栄養を制御した4群のめん羊産子で検討を行った。周産期の栄養制御は、産子の生時体重だけでなく、哺育中あるいは離乳後のいずれのステージにおける増体に対しても影響を及ぼさなかった。生時体重など出生後早期の体重がその後の増体と正の相関を示した。20週齢時に実施したインスリンとグルコースの負荷試験の結果から、グルコース負荷後のグルコースのAUCは雌で雄よりも大きく、耐糖能の性差が見られたが、周産期母畜のタンパク栄養制御による影響は認められなかった。妊娠末期のタンパク栄養強化によって初乳中インスリン濃度が高くなる傾向が示され、産子の20週齢時の血漿中アディポネクチン濃度と正の相関が見られたが、増体や生理特性との関連は明らかでなかった。

#### 文 献

- 1) Hammon, H. M., Liermann, W., Fritten, D., Koch, C. : Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and systemic development in calves, *Animal*, 14 : S1, s133-s143, 2020.
- 2) Blum, J. W. : Nutritional physiology of neonatal calves, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 1~11, 2006
- 3) Hammon, H. M., Steinhoff-Wagner, J., Flor, J.,

Schönhusen, U., Metges, C. C. : Lactation Biology Symposium : role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves, *Journal of Animal Science*, 91, 685~695, 2013.

- 4) Ontsouka, E. C., Albrecht, C., Bruckmaier, R. M. : Invited review : growth promoting effects of colostrum in calves based on interaction with intestinal cell surface receptors and receptor-like transporters, *Journal of Dairy Science*, 99, 4111~4123, 2016.
- 5) Savino, F., Liguori, S. A., Lupica, M. M. : Adipokines in breast milk and preterm infants, *Early Human Development*, 86, S77-S80, 2010.
- 6) Eilers, E., Ziska, T., Harder, T., Plagemann, A., Obladen, M., Loui, A. : Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants, *Early Human Development*, 87, 415~419, 2011.
- 7) Hollanders, J. J., Heijboer, A. C., van der Voorn, B., Rotteveel, J., Finken, M. J. J. : Nutritional programming by glucocorticoids in breast milk : Targets, mechanisms and possible implications, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 31, 397~408, 2017.
- 8) Samuel, M., Chisanga, D., Liem, M., Keerthikumar, S., Anad, S., Ang, C. S., Versteegen, E., Jois, M., Mathivanan, S. : Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth, *Scientific Reports*, 7, 5933, 2017.
- 9) Kesser, J., Hill, M., Heinz, J. F., Koch, C., Rehage, J., Steinhoff-Wagner, J., Hammon, H. M., Mielenz, B., Sauerwein, H., Sadri, H. : The rapid increase of circulating adiponectin in neonatal calves depends on colostrum intake, *Journal of Dairy Science*, 98, 7044~7054, 2015.
- 10) Donovan, S. M., Chao, J. C. L., Zijlstra, R. T., Odle, J. : Orally administered iodinated recombinant human insulin-like growth factor-I (I-125-rh IGF-I) is poorly absorbed by newborn piglet, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 24, 174~182, 1997.

# 鶏の飼養管理における労力低減のための距離センサーによる体重推定に関する研究

Research on weight estimation using a distance sensor for reducing labor of bird breeding management

阿野 裕司・伊藤 直弥\*・宇高 優美\*・水上 嘉樹\*\*・木村 裕昭\*\*\*・原田 宏明\*\*\*\*

(地方独立行政法人山口県産業技術センター, \*山口県農林総合技術センター, \*\*国立大学法人山口大学, \*\*\*深川養鶏農業協同組合, \*\*\*\*伊藤忠飼料株式会社)

Yuji Ano, Naoya Ito\*, Yumi Udaka\*, Yoshiki Mizukami\*\*, Hiroaki Kimura\*\*\* and Hiroaki Harada\*\*\*\*

(Local Incorporated Administrative agency, Yamaguchi prefectural Industrial Technology Institute, \*Yamaguchi Prefectural Agricultural Technology Center, \*\*Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Yamaguchi University, \*\*\*FUKAWA Poultry Agricultural Cooperative, \*\*\*\*Itochu Feed Mills Co. Ltd.)

Due to the recent aging of chicken farm workers and the shortage of human resources, it is a heavy labor to carry out breeding management such as measuring the weight of birds, and reducing the labor is an issue that must be solved immediately. The purpose of this study was to automate the weight measurement of birds aged 30 weeks and older, which requires the longest time in the process for raising broiler breeders. We proposed a bird weight estimation method based on bird shape data obtained by using a distance sensor, and evaluated the usefulness of the proposed method using measured data. Six White Cornish males and six White Plymouth Rock females had been bred since July 2019, and bird shape data was acquired using a measurement system composed of a distance sensor and an actuator. We compared two methods for estimating bird weights, that is, a method of estimating the weight using the bird volume and a method of estimating the weight using deep learning. The accuracies of the volume-based estimation method were 6.8% for males and 5.7% for females. On the other hand, the accuracies of the deep learning-based estimation method were 10.7% for males and 7.8% for females. One of the reasons why the deep learning-based estimation method is inferior to the volume-based estimation method is that the amount of the bird shape data is insufficient for the deep learning procedure. As a future work, we would like to improve the estimation accuracy by considering the pose of the bird, that is, whether it is sitting or standing. The amount of bird shape data should be increased by observing more birds in a longer period.

## 1. 目 的

日本国内における鶏肉消費量は、平成24年に豚肉を抜いて1位となり、それ以降鶏は最も消費量

の多い食肉となっている<sup>1)</sup>。また、平成29年度には年間8億羽を超える鶏が処理されており<sup>2)</sup>、養鶏産業の規模も年々拡大傾向にある。しかしながら、近年の農作業従事者の高齢化や人材不足によ



り<sup>3)</sup>、鶏舎環境の最適化や鶏の体重測定など多岐にわたる飼養管理を実施するのは大きな作業負担となっている。さらに、高病原性鳥インフルエンザなどの疾病予防を目的とした「定期的な消石灰散布・消毒薬の交換」、「鶏舎ごとに履物や衣服を交換」、「鶏舎等に持ち込む機材や敷料等の消毒」など、家畜衛生に関する作業工程も加わった結果、飼養管理に関する作業工程の維持はより困難となっており、その労力低減は早急に解決すべき課題となっている。

養鶏産業における肉用鶏の養鶏場は、コマースル鶏の卵を産む種鶏を飼養する「種鶏場」と、コマースル鶏を飼養し、一般流通する鶏肉を生産する「コマースル農場」の大きく2つに分けられる。種鶏場において飼養管理項目の一つである体重は、給餌制限のために用いられており、1~20週齢時は目標体重に到達しているかどうか、20~30週齢時は期待される産卵率を将来達成できるかどうか、30~65週齢時は過肥となっていないかどうかの指標となっているため、毎週行われる体重測定は重要な作業工程といえる。

一方、コマースル農場では、鶏を早く成育させるため体重による給餌制限を実施していないため(不断給餌)、毎週の体重測定を実施していない農場も多いが、成育途中の体重推移を把握できれば効率的な成育につながるため、体重測定に対するニーズはあると考えられる。

一般に鶏は個体でなく群として取り扱うため、体重測定は全数ではなく抽出して行われる。種鶏場では、1棟あたり3,000羽から5,000羽の鶏舎において5%抽出で行われ、雌雄判別、捕鳥、体重測定、帳簿への記録の流れで実施される。しかしながら、1鶏舎当たり3か所以上の場所で捕鳥作業を行うため、相当の手間と時間が必要となる。さらに、捕鳥しやすい鶏ばかり捕鳥してしまい、偏った体重測定となっている可能性がある。また

30週齢以降の雄は大型化し、攻撃性が増すため捕鳥が困難であり、体重測定にかかる作業時間も他の週齢に比べて長く、体重測定時に暴れるため測定値のばらつきも大きい。さらに、実際の測定作業だけでなく測定体重データのPC入力にも膨大な労力が必要となっている。

以上から本研究では、体重測定がより重要視されている種鶏場において、作業時間および飼養期間が最も長い30週齢以降の鶏を対象とする体重測定の自動化を目的とした。具体的には、距離センサを用いて取得した鶏の形状データに基づいた鶏の体重推定手法を提案し、実測データを用いて提案手法の有用性を評価した。なお、目標として実際に種鶏場で要求される相対誤差 $\pm 5.0\%$ 以内の体重推定精度を目指した。

## 2. 方法

### 2.1 実地実験

代表的なコマースル鶏ブロイラーの種鶏であるホワイトコーニッシュの雄とホワイトプリマスロックの雌をそれぞれ6羽ずつ供試鶏とし、雌雄別に開放鶏舎において飼養した。

Fig. 1に鶏の形状データを取得するシステム構成図を示す。床面から約2mの高さの鶏舎天井付近に2次元走査型距離センサ(UBG-04LX-F01:北陽電機製)を設置し、その下に鶏を1羽ずつ配置した。なお、距離センサの走査方向はFig. 1に示すx-z平面であり、角度分解能は $0.36^\circ$ 、測定誤差は測定距離2mで $\pm 20\text{mm}$ である。鶏の形状データを取得するために、アクチュエータ(Dynamixel MX-64T: Best Technology製)を用いて、距離センサと同等の角度分解能 $0.36^\circ$ になるようにx軸を中心として回転させた。

また、鶏の体勢変動によって安定した形状データの取得は困難となるが、暗所では鶏は体勢変動を低減するという習性がある。そこで、自然光が

入り込まない環境（縦横1.8×1.8m）を構築し、環境内の鶏を1日平均3回入れ替えた。さらに、ターゲットとする30週齢以降の鶏の形状データができるだけ早く取得するために、種鶏場の飼養方法よりも6週齢以降の制限給餌量を増やし、早期に30週齢の鶏とみなせる体重に到達するように飼養した。形状データ（点群）と暗視カメラによる撮影画像の一例をFig. 2に示す。四方を壁で囲まれた床上で座位の体勢を取っている鶏の形状が確

認できる。

## 2.2 体重推定手法の検討

Fig. 2に示した形状データを用いて、鶏の体重推定手法の検討を行った。取得した形状データには、鶏のほかに壁や床などの不要な点群データも含まれているため、それらのデータを削除することで、鶏の点群データのみを抽出した。さらにデータ処理を容易にするため、3次元データである形状データを、床面からの鶏の高さ情報を画素値とする2.5次元画像に変換した（Fig. 3）。

体重推定手法として、鶏の体積を求めて体重を線形推定する手法1と、SSD<sup>4)</sup> (Single Shot MultiBox Detector) と呼ばれる画像分類ネットワークを用いて、AIの1つであるディープラーニングによる体重推定を行う手法2の二手法を構築し、体重推定精度の比較検討を行った。Fig. 4に体重推定処理の流れを示す。

手法1の具体的な方法としては、鶏の個体抽出・位置の特定を行った後、特定した鶏の高さ情報から積分処理によって体積を算出し、体積と測定体重から回帰分析によって得られた回帰直線に基づいて体重の推定を行った。

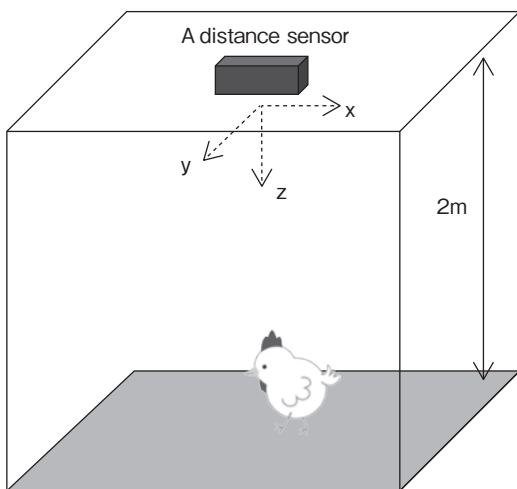
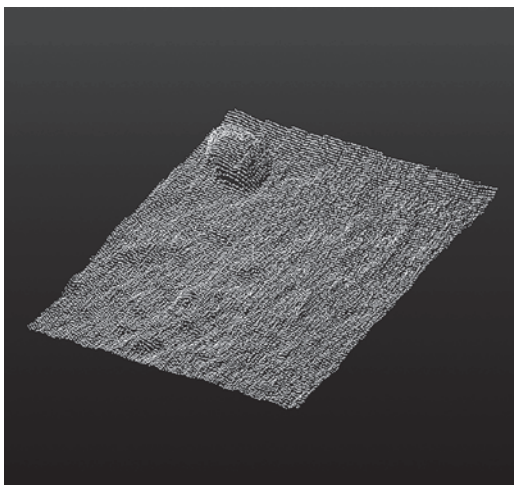
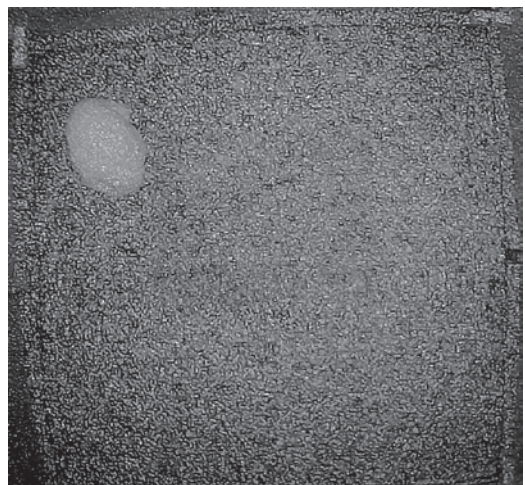


Fig. 1 Bird-shape acquiring system.



(a) Obtained bird shape as a pointcloud.



(b) Image taken by a night vision camera

Fig. 2 Shape and image of a bird.

手法2で用いたSSDはECCV2016 (European Conference on Computer Vision 2016)で発表された画像分類ネットワークであり、広く用いられている物体検出アルゴリズムYOLO<sup>5)</sup>より高速でFaster R-CNN<sup>6)</sup>と同等の高精度な分類が可能とされるディープラーニングの一手法である。使用するデータセットは、Fig. 3に示すような2次元画像と画像上の鶏の位置や測定体重をまとめたものである。今回は100 g単位でのクラス分けを行い、雌雄別々に学習を行った。また、雄は学習用・検証用にそれぞれ3978枚、雌は学習用・検

証用にそれぞれ6591枚の画像を用いた。学習用画像で学習し、検証用画像で学習結果を検証する作業を繰り返すことにより、ネットワークの学習を実施する。なお、学習回数は250回とした。

手法1, 2に共通する条件として、鶏の形状データは10月中旬から12月末までのデータを用いた。また、分析や学習には昼間(7時~18時)のデータを用い、体重の推定には夜間(18時~翌7時)のデータを用いた。さらに、鶏の最上部の高さ情報から鶏の体勢が座位と推定される場合のデータのみを利用した。

### 3. 結果と考察

供試鶏の飼養は2019年7月から開始した。6週齢以降の制限給餌量を増やすことで、14週齢を迎える頃には種鶏場における30週齢の鶏と同等の体重となる個体が現れたため、10月頃から30週齢の鶏とみなして形状データの取得を行った。なお、供試鶏のうち早期に30週齢の鶏と同等の体重に達した雄4羽、雌5羽を解析に用いた。

手法1の鶏の体積を用いた体重推定手法について、Fig. 5に鶏の体積と測定体重の関係の一例を示す。これは、雄の鶏の形状データから求めた鶏の体積と、その時の測定体重の関係を表したもの

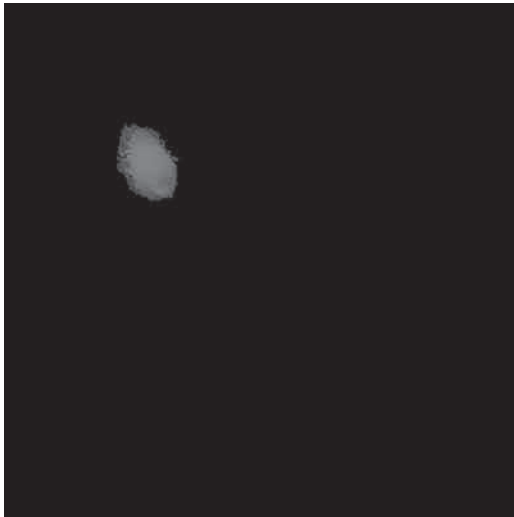
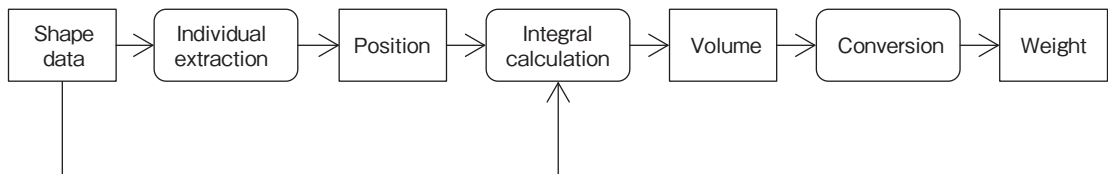
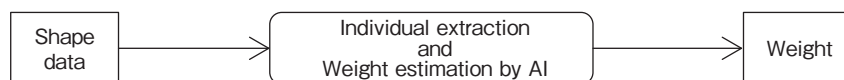


Fig. 3 Converting bird shape to 2.5D image.



(a) Method 1



(b) Method 2

Fig. 4 Processing flows of two weight estimation methods.

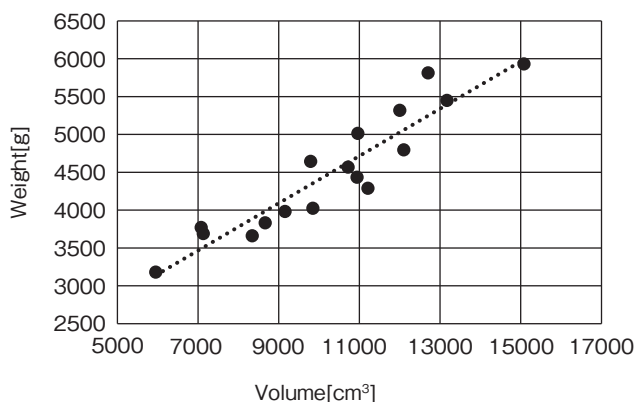


Fig. 5 Correlation between volume and weight.

である。Fig. 5から体積と体重には相関関係があることが確認できる。そこで、雌雄それぞれのデータに対して回帰分析を行い、回帰直線を求めた。求めた回帰直線を式(1)(2)に示す。式(1)は雄の回帰直線で、 $w_m$ が体重、 $v_m$ が体積を表し、同様に式(2)は雌の回帰直線で、 $w_f$ が体重、 $v_f$ が体積を表す。

$$w_m = 0.2866v_m + 1489.9 \quad (1)$$

$$w_f = 0.2376v_f + 1610.9 \quad (2)$$

式(1)(2)より求められる推定体重と測定体重から相対誤差を求め、その平均を求めることで体重推定精度を確認した。結果として、雄が6.8%、雌が5.7%の誤差となった。なお、さらに精度を向上させるための手法として、鶏の座位状態を判定するアルゴリズムの改良があげられる。本手法では、鶏の最上部の高さ情報から鶏の体勢が座位かどうかの判定を行っているが、最上部の高さ情報だけでは正確に座位状態を判定できていない可能性がある。最上部の高さだけでなく、鶏の背部の最大高さを求めたり、Fig. 3における鶏の面積情報も利用したりすることで、さらなる精度向上を実現できると考えられる。

続いて、手法2のディープラーニングを用いた体重推定手法についても、手法1と同様に推定体重と測定体重から相対誤差を求め、その平均を求

めることで体重推定精度を確認した。結果として、雄が10.7%、雌が7.8%の誤差となった。手法1より誤差が大きくなった要因として、ディープラーニングの学習・検証を行うには鶏の画像枚数が少なかったことがあげられる。今回は100g単位でクラス分けを行ったが、画像枚数が少ないため特定のクラスにおいては学習・検証用のデータが存在しないことがあった。さまざまな体重の鶏の形状データを取得し画像枚数を増やすことで、特定のクラスにおけるデータの抜けがなくなり、さらにクラス分けを100g以下に細分化することも可能となるため、体重推定精度の向上が見込める。また、それらを実現するために、より多くの形状データを効率的に取得可能な実験環境を構築することも今後の課題としてあげられる。

手法1, 2ともに、目標とした体重の $\pm 5.0\%$ 以内の体重推定精度には至らなかったものの、想定している精度向上のための手法を加えることで、目標とした体重推定精度に到達できる可能性は高いと考えられる。

#### 4. 要 約

本研究は、体重測定がより重要視されている種鶏場において、作業時間および飼養期間が最も長い30週齢以降の鶏を対象とする体重測定の自動化



を目的とした。具体的には、距離センサを用いて取得した鶏の形状データに基づいた鶏の体重推定手法を提案し、実測データを用いて提案手法の有用性を評価した。体重推定手法としては、鶏の体積を用いた体重推定手法と、ディープラーニングによる体重推定手法の比較検討を行った。

鶏の体積を用いた体重推定手法における体重推定精度は、雄が6.8%、雌が5.7%の誤差となった。さらに精度を向上させるための手法として、鶏の座位状態を判定するアルゴリズムの改良があげられる。

ディープラーニングを用いた体重推定手法における体重推定精度は、雄が10.7%、雌が7.8%の誤差となった。鶏の体積を用いた体重推定手法より誤差が大きくなった要因として、ディープラーニングの学習・検証を行うには鶏の画像枚数が少なかったことがあげられる。さまざまな体重の鶏の形状データを取得し画像枚数を増やすことで、クラス分けを100 g以下に細分化することも可能となるため、精度の向上は可能と考えられる。

今後は、鶏の座位状態を判定するアルゴリズムの改良や、より多くの鶏の形状データ取得のため

の実験環境の構築、クラス分けの細分化等について検討を行い、相対誤差 $\pm 5.0\%$ 以内の体重推定精度の実現を目指す。また、種鶏場だけでなくコマース農場における体重測定の自動化についても検討を行う。

## 文 献

- 1) 農畜産業振興機構：鶏肉が食肉消費の主役に、2017年12月28日  
[https://www.alic.go.jp/koho/mng01\\_000157.html](https://www.alic.go.jp/koho/mng01_000157.html)
- 2) 厚生労働省：と畜・食鳥検査等に関する実態調査の結果について、2018年7月19日  
<https://www.mhlw.go.jp/content/11130500/000335447.pdf>
- 3) 農林水産省：平成22年度 食料・農業・農村白書、2010年5月31日  
[https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w\\_maff/h22/pdf/z\\_2\\_3\\_2.pdf](https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/h22/pdf/z_2_3_2.pdf)
- 4) Wei Liu, Dragomir Anguelov, Dumitru Erhan, Christian Szegedy, Scott Reed, Cheng-Yang Fu, Alexander C. Berg, SSD : Single Shot MultiBox Detector, ECCV 2016, 2016.
- 5) Joseph Redmon, Santosh Divvala, Ross Girshick, Ali Farhadi : You Only Look Once : Unified, Real-Time Object Detection, CVPR 2015, 2015.
- 6) Shaoqing Ren, Kaiming He, Ross Girshick, and Jian Sun, Faster R-CNN : Towards Real-Time Object Detection with Region Proposal Networks, CVPR 2015, 2015.

## 哺育期子牛の消化管機能を強化するための 管理技術の開発

The study on the development of management method to strengthen the  
gut functions in calves

福 森 理 加

(酪農学園大学獣医学群)

Rika Fukumori

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

Our objective was to evaluate the relationship between plasma gut hormone concentration and growth and feed intake in calves during the weaning transition period. In exp.1, 13 Holstein calves weaned at 7 wk of age were used until 13 wk of age in this study. The calves were fed calf starter *ad libitum* until 2.5 kg/d (as fed) and chopped hay *ad libitum*. Based on their body weight at 13 wk of age, calves were divided to 3 groups as HIGH ( $\geq 120$ kg) , MED ( $< 120$ kg, and  $\geq 100$ kg) , and LOW ( $< 100$  kg) and plasma concentrations of hormones and metabolites and feed intake (calf starter and chopped hay) were compared. In exp.2, 32 Holstein  $\times$  Japanese Black bull calves were used in this study. The calves were born in nearby dairy farms and transported into the farm at approximately 40 days of age, and randomly assigned to 2 treatments with or without adaptation housing (treatment and control) . The AD calves were housed in individual cow hatches for 1 wk after the transport and then moved to the group housing (16 head per group) , whereas the CON calves moved to group housing immediately after arrive at the farm, then plasma concentrations of hormones and metabolites were measured temporally related to the day of transportation. In exp. 1, plasma GLP-2 concentrations were higher and starter intake reached 2.5 kg/d earlier for H calves than M and L calves. In exp. 2, calves in the treatment group showed higher serum concentrations of GLP-2 and insulin, and lower serum cortisol concentration and pepsinogen activity. Our results suggest that higher plasma GLP-2 concentration may contribute to growth of calf and management to reduce stress may improve gastrointestinal function in calves.

### 1. 目 的

近年、高栄養哺乳や哺乳ロボットの導入による集団飼育等、子牛の哺育期（哺乳～離乳期）管理方法に変化や見直しがなされている。初生期の発育は、将来の生産性に大きく貢献することから、

高栄養哺乳は哺乳期の増体を高めることを目的としたものであるが、反芻胃の発育が抑制されやすく離乳の移行が難しくなることがデメリットになる。慣例哺乳法は哺乳量を1日4ℓ程度に制限するため、子牛の空腹感による固形飼料（スターター；人工乳）の摂取が哺乳期間中に促され、6



週齢には離乳可能な飼料を十分に摂取できるようになる。一方で、高栄養哺乳では、8~10ℓのミルクを摂取させるため、子牛の満腹感によって哺乳期間中の固形飼料摂取量が少なくなり、離乳直後に摂取量が急増するため、消化性の下痢ならびに成長遅延が生じやすくなる。子牛の哺育期は、消化器官が未熟な時期であり、子牛の消化生理機能に無理のある飼料給与や環境ストレスによって軟便・下痢が容易に引き起こされる。消化吸收機能を早期に発達させることは栄養素の消化・吸収効率を高め発育の向上につながると同時に、離乳の移行がスムーズかつ早まることによって省力化にもつながる。

下部小腸から分泌されるグルカゴン様ペプチド-1や2 (GLP-1/GLP-2) は、出生直後や離乳後に血中濃度が増加し、摂取飼料に対する消化管の適応変化に重要な役割を果たしていることが考えられるが、発育の違いとの関係については明らかにされていない。そこで本研究では、哺育期における血中GLP-1/GLP-2濃度の変化が、固形飼料の摂食行動、消化機能および発育成績と関連しているかについて解析を行うことを目的とした。

## 2. 方法

### 2.1 試験1：哺育期における血中GLP濃度の推移がスターターの摂取量、採食行動および増体成績に及ぼす影響

ホルスタイン種子牛を13頭供試した。子牛は、個別のペンにて飼養され、出生後5日間は初乳および移行乳を給与し、代用乳(粗タンパク質28%、粗脂肪20%)をその後1週齢まで1日4ℓ、2週齢まで6ℓ、3~4週齢まで1日8ℓ給与し、5週齢で6ℓ、6週齢で4ℓに漸減哺乳され、7週齢で離乳された。試験期間中、スターターは現物2.5kgを給与上限とし、チモシー乾草と

もに自由摂取させた。給飼はすべて1日2回行った。子牛は13週齢時の体重によって、発育成績の異なる以下の3群(H群4頭:120kg以上、M群6頭:100kg以上120kg未満、L群1頭:100kg未満)に分け、固形飼料の摂取量、血漿GLP-1およびGLP-2濃度を比較した。

### 2.2 試験2：導入直後の単独飼育による馴致が消化管機能に子牛の消化管機能に及ぼす影響

1軒の肥育農場において、導入された黒毛和種×ホルスタイン種交雑種雄子牛32頭を供試した。当農場では、市場から約40日齢で導入した直後に、ロボット哺乳牛舎(牛床1110cm×680cm)において集団飼育を開始していた。本研究では16頭(導入時平均日齢:37.2日、導入時平均体重:81.6±1.8kg)を対照群として、肥育農場従来の飼養管理を施した。残りの16頭(導入時平均日齢:41日、導入時平均体重:89.5±1.5kg)は馴致群として導入後1週間は個別ハッチ(90cm×180cm)で飼育され、その後対照群同様にロボット哺乳牛舎で集団飼育された。馴致群の子牛は、個別飼育中に毎日9:00と16:00に2回哺乳されたが、その他の条件は対照群と同じであった。子牛は代用乳(粗タンパク質30%、粗脂肪18%)を導入直後から2週間は6.0ℓ/日、3週間は4.5ℓ/日、4週間は3.0ℓ/日、5週間は1.5ℓ/日給与された。固形飼料としてチモシー乾草およびスターターを給与された。農場導入直後、導入後1週間後と2週間後に採血し、血清コルチゾール、ペプシノーゲン活性値、血漿GLP-1、GLP-2、インスリンおよびIGF-1濃度を測定した。成長の指標として、採血と同様に農場導入直後、導入後1週間後と2週間後に胸囲の測定を行った。

各測定値はJMP13.0(SAS Institute Japan, 東京, 日本)のフィットモデルを用いて統計解析された。モデルには処理区が固定効果、個体が変量

効果に含まれた。処理区間の差は $p < 0.05$ で有意差あり、 $p < 0.10$ で傾向ありとした。

### 3. 結果と考察

#### 3.1 試験1

スターター摂取量は、5週齢から増加し始め、離乳後に急速に増加した (Fig. 1)。離乳時点におけるスターター摂取量はH群1.60kg、M群1.55kgに対しL群では0.46kgと少なかった。また、H群はM群に比べて早期にスターター給与上限に達した (58日齢vs. 73日齢)。H群における血漿GLP-1およびGLP-2濃度は2~4週齢から増加し始め、M群と比較して高値を示した ( $p < 0.05$ , なお、L群は1頭のみであったため比較から除外した)。離乳後の増体はスターターから供給される栄養素に依存する。また、離乳後の日増体量は離乳前3日間のスターター摂取量と高い正の相関があり、Stameyら<sup>1)</sup>によると、離乳後に1kgの日増体を実現させるためには離乳前3日間の平均スターター摂取量が1.38kg/日に達していると報告されている。本研究ではH群およびM群では離乳時点でこの基準以上のスターターを摂取しており、離乳後の日増体も良好であった。一方、L群の子牛は哺乳期~離乳時点でのスターター摂取量が他群に比べて低く、これが離乳後の低増体に繋がった。さらに、H群の子牛は離乳後のスターター摂取量の伸びがM群よりも早く、結果として哺育終了時の体重差につながったと考えられる。H群の子牛は、他群に比べて哺乳漸減期以降のGLP-2分泌が大きく増加していることが観察された ( $p < 0.05$ , Fig. 2)。子牛においてGLP-2は消化管への血流を増加させ小腸絨毛の発達を促すことが報告されている (Taylor-Edwards et al<sup>2)</sup>)。また、我々は泌乳牛において、酪酸塩の給与によってGLP-2分泌を高めたところ、乾物および有機物消化率が増加したことを報告している

(Fukumori et al<sup>3)</sup>)。このことから、H群ではGLP-2濃度の高まりによって、消化管が早期に発達していたことが推察される。消化管が発達することによって栄養素の吸収効率が高まると同時に、揮発性脂肪酸などの酸が消化管から除去されることによってルーメンや大腸におけるアシドーシスが緩和され、これが離乳後のスターター食い込みの増加につながったと推察される。

#### 3.2 試験2

馴致群の胸囲は対照群と比較してすべての時期において有意に高値を示した ( $p < 0.05$ , Table 1)。導入時点で子牛の胸囲に差が見られたため、本研究では発育に及ぼす影響を明らかにできなかった。血中の総タンパク質、グルコースおよび非エステル型脂肪酸 (NEFA) 濃度はすべての時期において有意な差は見られなかった (Table 2)。血清コルチゾール濃度は7日目の時点で馴致群が対照群と比べて有意に低値を示しており ( $p < 0.05$ )、輸送によるストレスが馴致群よりも対照群で大きかったと推察された。血漿インスリンおよびGLP-2濃度は、14日目に馴致群において馴致群と比べ高値を示しており ( $p < 0.05$ )、馴致による確実な哺乳給与が子牛の栄養状態の改善に寄与したと考えられた。血漿IGF-1濃度は、7日目では馴致群が対照群と比較して高いのに対し、14日目では馴致群が対照群と比べ低値を示した ( $p < 0.05$ )。血中IGF-1濃度はタンパクやエネルギー摂取量と関連することが知られている。7日目は対照群において、哺乳ロボットに移動して1週間経過した時点であり、施設の移動、群飼、ロボット哺乳への適応過程におけるストレスによって一時的に低下し、その後、環境への適応によって濃度が回復したと考えられる。一方で馴致群における14日目の採材は、哺乳ロボット牛舎に移動して7日目にあたり、対照群同様に施設への適応過程において栄養摂取が一時的にダウンし、

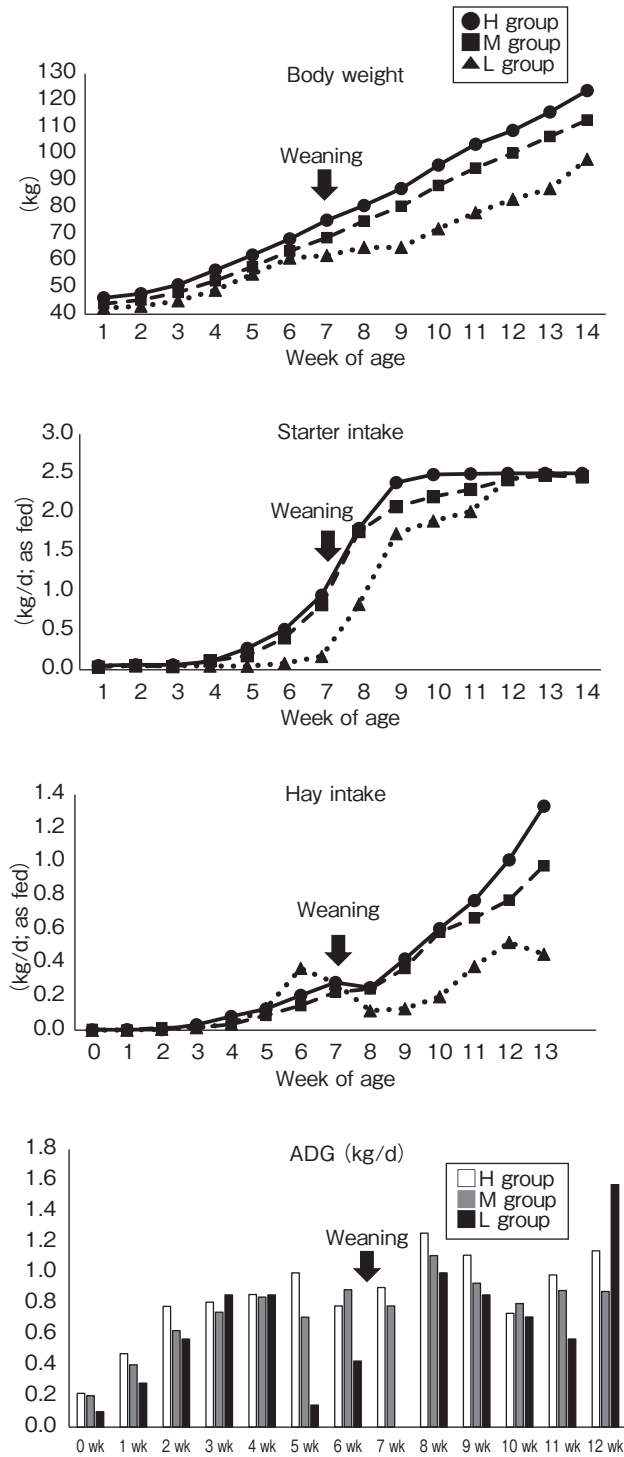


Fig. 1 Summary of body weight, starter and hay intake, and ADG in calves from 0 to 14 week of age. H group : n=4. M group : n=6. L group : n=1.

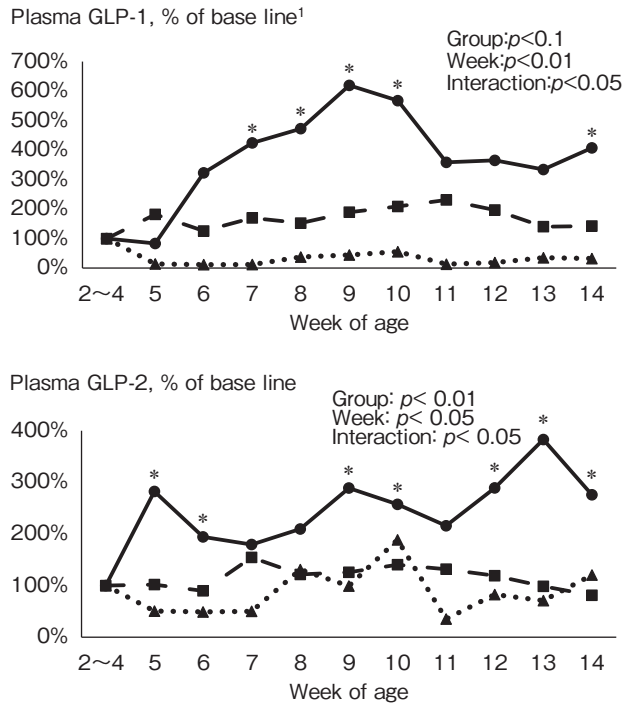


Fig. 2 Changes in plasma concentrations of GLP-1 and GLP-2 in calves around the weaning period. Data were normalized to the baseline (mean concentrations of 2 to 4 week of age) for each calf. \*  $p < 0.05$  compared with the concentration in M group.

Table 1 Heart girth of calves in treatment group and control group (mean  $\pm$  SE)

	Day 0		Day 7		Day 14	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
胸囲 (cm)	99.31 $\pm$ 0.77	106.13 $\pm$ 0.86***	104.50 $\pm$ 0.91	108.31 $\pm$ 0.95**	104.69 $\pm$ 1.03	109.13 $\pm$ 1.08**

Asterisk shows the significant difference between the treatment at each point (\* :  $p < 0.1$ , \*\* :  $p < 0.05$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ).

IGF-1 が低下したのではないかと推察された。血清ペプシノーゲン活性値の変動比率は7日目および14日目において、対照群が馴致群と比べ高値で推移していた (D 7で $p < 0.1$ , D 14で $p < 0.05$ )。血清ペプシノーゲン濃度の増加は、第四胃の損傷を反映していることが成反芻動物では知られているが子牛において詳細は明らかにされていない。哺乳子牛のペプシン分泌は成牛のそれと比べて低

いが、本研究では2群間でペプシノーゲン活性の変動に違いが見られた。対照群においては、導入後直後からの群飼ストレスによって、第四胃の透過性が上昇し、これがペプシノーゲン活性値の増加に反映されているのではないかと考えられた。

#### 4. 要 約

本研究では、哺育期における子牛の消化管発達

**Table 2** Serum concentration of biochemical component, hormones, and pepsinogen activity ration of calves in treatment or control group

	Day 0		Day 7		Day14	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Total protein (g/dl)	5.63 ± 0.10	5.49 ± 0.076	5.58 ± 0.079	5.53 ± 0.064	5.49 ± 0.088	5.56 ± 0.064
Glucose (mg/dl)	108 ± 3.41	115 ± 3.06	97.4 ± 2.58	98.0 ± 3.28	92.8 ± 2.45	88.9 ± 1.62
NEFA (μEq/l)	572.63 ± 43.5	616 ± 94.2	399 ± 37.4	380 ± 48.1	319 ± 32.9	285 ± 29.8
Insulin (ng/ml)	5.00 ± 1.85	3.30 ± 1.85	0.900 ± 0.289	1.35 ± 0.271	0.717 ± 0.0828	1.03 ± 0.0828**
GLP-1 (ng/ml)	0.186 ± 0.050	0.224 ± 0.050	0.342 ± 0.078	0.286 ± 0.075	0.30 ± 0.070	0.328 ± 0.070
GLP-2 (ng/ml)	0.186 ± 0.050	0.224 ± 0.050	1.96 ± 0.356	1.53 ± 0.345	0.629 ± 0.403	1.92 ± 0.0403**
IGF-1 (ng/ml)	178 ± 16.0	161 ± 16.0	90.0 ± 10.2	132 ± 10.2**	111 ± 7.85**	75.4 ± 7.85
Cortisol (μg/dl)	1.64 ± 0.20	1.62 ± 0.24	1.55 ± 0.25**	0.94 ± 0.15	0.64 ± 0.11	0.85 ± 0.15
Pepsinogen activity ratio <sup>1</sup>	—	—	1.30 ± 0.139*	1.05 ± 0.059	1.53 ± 0.156***	0.972 ± 0.0531

<sup>1</sup>Pepsinogen activity ratio was obtained by dividing the value of D7 or D14 by D0 of each calf.

Asterisk shows the significant difference between the treatment at each point (\*:  $p < 0.1$ , \*\*:  $p < 0.05$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ).

や機能と発育の関係性について解析を行った。試験1では、哺育期に発育の良い個体は離乳後のスターター摂取量が順調に伸び、離乳移行期から離乳後にかけて血中GLP-2濃度が大きく増加していたことが明らかにされた。試験2では、子牛の導入ストレスを緩和させるための管理(個別管理による馴致)によって、血清コルチゾール濃度が抑えられ、血清GLP-2およびインスリン濃度の増加、ペプシノーゲン活性値の増加が抑制されたことから管理によるストレスの低減が消化管機能に好適な効果をもたらすことが示された。

## 文 献

- 1) Stamey, J. A., Janovick, N. A., Kertz, A. F., Drackley, J. : K.Influence of starter protein content on growth of dairy calves in an enhanced early nutrition program, *Journal of Dairy Science*, **95**, 3327~3336, 2012.
- 2) Taylor-Edwards, C. C., Burrin, D. C., Holst, J. J., McLeod, K. R., Harmon, D. L. : Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) increases small intestinal blood flow and mucosal growth in ruminating calves, *Journal of Dairy Science*, **94**, 888~898, 2011.
- 3) Fukumori, R., Oba, M., Izumi, K., Otsuka, M., Suzuki, K., Gondaira, S., Higuchi, H., Oikawa, S. : Effects of butyrate supplementation on blood glucagon-like peptide-2 concentration and gastrointestinal functions of lactating dairy cows fed diets differing in starch content, *Journal of Dairy Science*, **103**, 3656~3667, 2020.

## 平成31年度（令和元年度）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（品質・加工，食品的価値，食品安全，遺伝育種，繁殖，動物衛生，家畜飼養・飼料など）

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 a 食肉の品質加工（9件）				
筋肉内間葉系前駆細胞の機能改変による肉質制御技術開発に向けた基礎研究	H30～	山内啓太郎	東京大学大学院農学生命科学研究科	900
微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した食肉加工技術の開発		竹中 慎治	神戸大学大学院農学研究科	1,000
乾塩漬ハム中の亜鉛プロトポルフィリンIXの形成様相と存在形態に関する研究		若松 純一	北海道大学北方生物圏フィールド科学センター	2,000
ドライエイジングビーフの香気に及ぼす真菌の影響		中川 麻衣	一般社団法人食肉科学技術研究所	900
枝肉の3Dグラフィック化システムの製作		本山三知代	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	2,000
ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果とそのメカニズムの解明（Ⅱ）		西村 敏英	女子栄養大学栄養学部	1,200
次世代畜産学のための培養肉技術の開発		福田 智一	岩手大学理工学研究科	1,900
官能特性をベースとした分光分析による赤身肉評価装置の開発		口田 圭吾	帯広畜産大学	940
枝肉の異臭クレーム防止のためのと畜場における最適な冷却温度管理法の開発		猪島 康雄	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	2,000
I b 食肉の食品的価値（5件）				
地鶏肉の美味しさの決定要因の解明（Ⅲ）	H29～	本田 和久	神戸大学大学院農学研究科	1,300
非加熱食肉製品における生理活性発現に関与する微生物の解明	H30～	竹田 志郎	麻布大学獣医学部動物応用科学科	900
神経細胞保護効果を有する畜産物由来タンパク質の探索研究		糸井 亜弥	神戸女子大学健康福祉学部	1,890
和牛肉のおいしさを「見える化」する（Ⅱ） 輸入牛肉との比較		山田 知哉	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター	1,900



低温乳酸発酵ならびに超高温加熱処理を施した筋原線維タンパク質モデル系におけるタンパク質分解と機能性発現に関する研究（Ⅲ）	H29～	林 利哉	名城大学農学部	900
I c 食品安全（3件）				
食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究		堀江 正一	大妻女子大学家政学部食物学科	1,470
食材の低温貯蔵履歴が大腸菌O157：H7の凍結損傷回復ならびに低温加熱耐性に及ぼす影響		本城 賢一	九州大学大学院農学研究院	1,900
ソーセージに混入する非金属異物の検出技術に関する研究		河野 俊夫	高知大学大学院教育研究部自然科学系農学部門	1,900
II a 遺伝育種（7件）				
牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響		大和 修	鹿児島大学共同獣医学部	1,300
沖縄県の島々の黒毛和種集団の多様性、近交度のゲノム視点からの評価		佐々木慎二	琉球大学農学部	1,550
牛の小型ピロプラズマ病に対する感染抵抗性遺伝子の同定		平山 博樹	東京農業大学生物産業学部	1,700
地鶏の行動的ストレス反応性に関する遺伝的多型の探索（Ⅱ）	H29～	青谷 大希	秋田県畜産試験場	1,000
豚の暑熱ストレス耐性マーカーの開発		佐藤 周史	千葉科学大学危機管理学部動物危機管理学科	1,700
牛の暑熱ストレス耐性を担うHSP70.1遺伝子多型に関する研究（Ⅱ）	H30～	森 美幸	福岡県農林業総合試験場生産環境部	1,250
肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索（Ⅱ）	H30～	後藤 達彦	帯広畜産大学	1,000
II b 繁殖（15件）				
OPU-IVPを活用したステーション型牛胚生産システムの構築		及川 俊徳	宮城県畜産試験場酪農肉牛部	1,600
牛の子宮疾患や機能診断に資する子宮内バイオマーカーの検索		田中 知己	東京農工大学農学部獣医臨床繁殖学研究室	1,300
豚における体表温と行動の変化に基づく分娩予測の試み		檜垣 彰吾	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	1,300
牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発		杉村 智史	東京農工大学大学院農学研究院	1,600
牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基礎的研究（Ⅱ）	H30～	木崎景一郎	岩手大学農学部	1,600
暑熱ストレスによる牛子宮内膜内分泌機能攪乱への温度感受性チャンネルの関与		木村 康二	岡山大学大学院環境生命科学研究科	1,500
黒毛和種体外受精卵のゲノム選抜技術確立に向けた割球分離卵凍結保存法の開発		藤井 貴志	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,200
卵胞由来生体活性ペプチドによる牛の卵巣機能調節メカニズムの解明		松田 二子	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,600
移植可能な牛伸長胚培養系評価法の検討		細江 実佐	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	1,600

抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の解明 (Ⅲ)	H29～	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	1,500
分娩後の空胎期間短縮をもたらす新規卵巣機能賦活化技術の開発研究		山村 崇	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	1,500
ホルモンおよび成長因子の複合添加培地を用いた賦活培養による牛体外受精由来胚の着床能力向上に関する研究		高崎 久子	栃木県畜産酪農 研究センター	900
分娩後のプロスタグランジン製剤投与が牛子宮修復の促進およびその後の繁殖機能に及ぼす影響		伊賀 浩輔	国立研究開発法人 農業・食品産業 技術総合研究機構 東北農業研究センター	1,200
繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響 (Ⅱ)	H30～	林 武司	福岡県農林業総合 試験 験 場	1,200
黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査 (Ⅱ)	H30～	星野洋一郎	京都大学大学院 農学研究科附属牧場	1,400
Ⅲ 動物衛生 (19件)				
周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの発症予知と制御 (Ⅲ)	H29～	佐藤 繁	岩手大学農学部	1,600
消化管寄生性コキシジウム, <i>Eimeria kriegsmanni</i> における発育休止期の解析 (Ⅱ)	H30～	松尾 智英	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	1,300
畜産動物用アジュバントの開発		後藤 康之	東京大学大学院 農学生命科学研究科	1,600
豚インフルエンザウイルス国内分離株の抗原性解析		小澤 真	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	1,600
食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の開発・評価 (Ⅱ)	H30～	石原加奈子	東 京 農 工 大 学 農 学 研 究 院	1,300
牛呼吸器病症候群 (BRDC) 発症機序の解明		帆保 誠二	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	1,600
天然化合物による牛白血病ウイルス感染制御を目指した基礎的研究		紙透 伸治	麻布大学獣医学部	1,600
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索 (Ⅲ) —より効果的なワクチン接種部位を求めて—	H29～	市居 修	北海道大学大学院 獣 医 学 研 究 院	800
豚赤痢菌の全ゲノム系統解析および薬剤耐性機序の解明		岩田 剛敏	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	1,200
豚高親和性乳酸菌を用いた新規経口ワクチンの開発		大松 勉	東 京 農 工 大 学 農 学 部 附 属 国 際 家 畜 感 染 症 防 疫 研 究 教 育 セ ン タ ー	1,600
牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの実施状況調査 (Ⅱ)	H30～	森本 素子	宮 城 大 学 食 産 業 学 群	1,200
鶏を対象としたトキソプラズマ症の抗体検査法の開発		吉田 彩子	宮崎大学農学部	1,600
牛ウイルス性下痢ウイルスの準種END <sup>-</sup> は弱毒性ワクチンになるか? —より効果的に免疫を誘導するための可能性の追求—		塩川 舞	日本獣医生命科学 大 学 獣 医 学 部	900
筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の検出法 (Ⅱ)	H30～	高島 康弘	岐 阜 大 学 応 用 生 物 学 部	1,600

網羅的ジェノタイピングによる新規牛白血病抵抗性遺伝子の同定		目堅 博久	宮崎大学 テニュアトラック 推進機構	1,100
豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明(Ⅱ)	H30～	岡林 環樹	宮崎大学農学部	1,600
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索(Ⅱ)	H30～	青山 真人	宇都宮大学農学部	1,600
鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと共存する細菌の網羅的な挙動解析(Ⅲ)	H29～	黒木 香澄	東京大学 日本学術振興会	1,600
アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する疫学研究(Ⅱ)	H30～	杉浦 勝明	東京大学大学院 農学生命科学研究科	1,600
IV 家畜飼養, 飼料など(16件)				
牛におけるPTH/PTHrP受容体シグナルの肥満とインスリン抵抗性への関与		恩田 賢	麻布大学獣医学部	1,400
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究 —飼養成績と免疫能に及ぼす影響—		勝俣 昌也	麻布大学獣医学部	1,400
暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレークスルー: 筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化(不活化)の関与の検証		辰巳 隆一	九州大学大学院 農学研究院	1,900
骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索(Ⅱ) —質的向上も目指して—	H30～	米倉 真一	信州大学農学部	1,600
黒毛和種繁殖雌牛の放牧行動における群内個体差は生産成績と関連するか?		安在 弘樹	宮崎大学農学部	900
茎葉多収型飼料用イネの茎部に蓄積する炭水化物の栄養的意義と生産現場との技術的連携		近藤 誠	三重大学大学院 生物資源学研究所	1,200
養鶏における個体管理と清掃ロボット導入によるIoT型食肉生産技術の開発(Ⅱ)	H30～	堀口 健一	山形大学農学部	1,300
成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索(Ⅱ)	H30～	鈴木 貴弘	北海道大学大学院 農学研究院	1,600
ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した採食可能量の予測モデルの開発		谷川 珠子	北海道立総合研究 機構酪農試験場	1,600
異なる月齢時の輸送が子牛の福祉性および生産性に与える影響		戸澤あきつ	帝京科学大学 生命環境学部	600
鶏肉中のイミダゾールジペプチド含量を増やす飼養方法とその活用に関する研究		久恒 辰博	東京大学大学院 新領域創成科学 科	1,800
豚の未熟産子(ひね豚)の発育遅延をもたらす生理的要因の解明(Ⅱ)	H30～	中島 郁世	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	1,500
黒毛和種育成牛のアミノ酸要求量に関する研究		寺田 文典	東北大学大学院 農学研究科	500
初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性		松崎 正敏	弘前大学 農学生命科学部	1,500
鶏の飼養管理における労力低減のための距離センサによる体重推定に関する研究		阿野 裕司	山口県 産業技術センター	1,800
哺育期子牛の消化管機能を強化するための管理技術の開発		福森 理加	酪農学園大学 獣医学群	1,900
合計	74件			105,000

# 伊藤記念財団賞

---

# 佐々木 啓介

農研機構畜産研究部門畜産物研究領域 ユニット長

## 〔業績の課題名〕

### 食肉の官能特性評価と消費者受容に関する研究

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

消費者が食肉を受容し購入し続けるためには、消費者自身のニーズや品質表示から購入の可否を決定する「食べる前の受容」と、実際に喫食して味、匂いおよび食感、すなわち官能特性を感知し、好ましかどうかを判断する「食べた時の受容」の両面で食肉が受容され続けることが必要である。そこで食肉の「食べる前の受容」「食べた時の受容」を評価解明し、国産食肉の高付加価値化に貢献するため以下の研究を行い、それぞれ成果をあげた。

#### （1）食肉の官能特性評価指標に関する業績

食肉の「食べた時の受容」に直接影響する官能特性を、分析型官能評価を用いて解析し、エコフィードや飼料用米等の新規飼料資源を活用して生産した豚肉について、慣行品との識別性やその違いを表す指標を明らかにした。また、消費者が感じる牛肉の「やわらかさ」には「かみ切りやすさ」「変形しやすさ」の異なる2つの要素が含まれ、これらを分けて評価する必要があることや、「地鶏肉らしい食感」において「弾力性」が有用な指標であることを見いだした。

#### （2）食肉に対する消費者ニーズ・消費者嗜好に関する業績

一般消費者を対象としたアンケートから、「食べる前の受容」としては牛肉に対するニーズが類型化できること、豚肉への「飼料用米利用」表示に対して消費者に割増価格を支払う意思があること、「エコフィード」利用型豚肉に対する消費者イメージの多様性を解明した。また「食べた時の受容」に関しては、嗜好型官能評価を用い、牛肉に対する一般消費者の嗜好性は「和牛嗜好群」「国産乳用種牛肉嗜好群」などに類型化できることを解明した。これらの結果から、食肉の高付加価値化においては、販売対象とすべき消費者群を適切に選択することが有効であることを示した。

#### （3）食肉の官能評価実施条件に必要な情報整備やその普及に関する業績

食肉の官能評価においてはその目的によって適切なサンプル調整方法や評価用語を選択する必要がある。そこで食肉の湿熱調理レシピを収集し解析することで、加熱時間や塩濃度等について標準的な条件を示すとともに、一般消費者および調理従事者に対するアンケート調査から、食肉における官能評価用語選択に活用可能な「食肉の官能評価候補用語集（農研機構式）」を確立した。また、食肉官能評価技術について、平成24年から7年間にわたり、毎年「食肉の官能評価ワークショップ」を開催し、公設試験研究機関への普及に努めた。

# 中島 郁世

農研機構畜産研究部門畜産物研究領域 上級研究員

## 〔業績の課題名〕

### 肉用家畜における脂肪組織の形成・制御機構に関する研究 — in vitro から in vivo まで —

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉は主に筋肉、脂肪および結合組織からなる。中でも脂肪はエネルギー源として重要な栄養素であるだけでなく、その量や質は喫食時の官能特性に影響する。また枝肉取引規格において、牛では筋肉内脂肪の沈着量、すなわち脂肪交雑が、豚では皮下脂肪の被履量が主要な格付項目となっている。したがって、肉用家畜を高付加価値化するためには生産段階で脂肪組織の量と質を適切に制御する技術が必要となる。受賞者はこれまで、肉用家畜の脂肪組織形成およびその制御機構を解明すべく培養細胞から個体レベルに至る幅広い視点から取り組み、顕著な業績をあげてきた。研究成果は以下の3つに大別される。

#### （1）牛筋肉内脂肪組織の形成とコラーゲンの役割

黒毛和種牛の筋肉内結合組織に筋肉内脂肪組織が沈着する際、脂肪前駆細胞から脂肪細胞への分化に伴いコラーゲンははじめとする細胞外マトリックス成分を細胞自ら積極的に産生・分泌し、脂肪前駆細胞時とは異なる細胞外環境を新たに再構築すること、この脂肪細胞自身によるコラーゲン産生が脂肪蓄積に必須であること、また脂肪細胞分化にV型およびVI型コラーゲンの添加が効果的であることを明らかにした。

#### （2）豚皮下脂肪細胞株の樹立とマウス脂肪細胞株との分化特性の違い

豚の培養脂肪細胞モデルとして、クローニングにより豚胎児皮下組織由来の脂肪前駆細胞株PSPAを樹立した。このPSPAは、分化培地に対する応答性、蓄積した脂肪の脂肪酸組成、分化に伴う遺伝子発現が、培養脂肪細胞モデルとして汎用されているマウス由来3T3-L1と異なっており、PSPAの樹立によって、豚とマウスの脂肪細胞で動物種間差が存在することを世界で初めて証明した。

#### （3）品種間比較による豚皮下脂肪組織の発達とアディポネクチン

遺伝的に背脂肪厚が異なる西洋系品種と中国系品種の豚を比較した結果、中国系品種の厚脂の要因が脂肪細胞の肥大であることを突き止めた。この中国系品種に見られる脂肪細胞の肥大化は、皮下脂肪組織における脂肪蓄積・分解能に起因するものでなく、全身のエネルギーバランスによる制御を受けている可能性をアディポネクチン遺伝子の発現量および血液性状の違いから示した。



# 永野 昌志

北里大学獣医学部動物資源科学科 教授

## 〔業績の課題名〕

### 牛卵子の体外発育培養系の開発と卵胞発育機構研究 ：臨床現場における牛胚生産への応用

## 〔業績の概要（受賞理由）〕

牛の体外胚生産技術は、と体卵巣内の小卵胞内から採取された卵子あるいは超音波ガイド下で卵巣内の小卵胞を確認しながら経腔的に採取された卵子を体外で成熟培養し、体外受精を行ったのち、非外科的に移植可能な胚盤胞まで発育させる技術であり、世界中で商業的に行われるほど一般的なものとなっている。しかし、これらの卵子を用いた移植可能胚の作出効率は30～50%程度であり、体内で成熟した卵子より低いことが知られている。牛は1回の発情周期中に1個の卵子を排卵する動物であることから、体外胚生産で利用する卵子の大部分は退行する運命にあることが、体外成熟卵子の発生能が低い原因であると考えられる。卵子が体内で発生能を獲得あるいは失う過程について検討するとともに、体外で卵子を発育させることで卵子の発生能獲得機構について研究し、発生能の高い卵子を産生できる培養系の開発および生体内から発生能の高い卵子を採取する方法について検討を行っている。

近年は、卵子固有の発生能に影響を与える要因として、牛卵巣内の胞状卵胞数に注目した研究を行っている。すなわち、たくさんの胞状卵胞を有する牛の繁殖性が、少ない牛に比べて高くなる要因の一つとして、顆粒層細胞のエストラジオール産生能は卵胞数が多いほど高くその卵胞内で発育する卵子の発生能も高いことを明らかにした。現在は、牛ごとに固有の卵胞数が変化する理由について北里大学附属八雲牧場の日本短角種牛を用いて研究を始めている。また、牛精子が受精能を獲得する機構や近年世界的に広く使用されている性選別精子の性状について精子自身の検査や体外受精技術を用いて詳細に解析している。これらは牛の卵子および精子品質の改善につながる業績であり、食肉生産と供給を安定的に行うことに寄与すると考えられる。

# 学会等事業助成

---

# シンポジウム「食鳥肉検査における日本とアジア諸国の HACCP の現状」に関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会 代表理事 久和 茂（東京大学）

〔日時〕 令和2年2月15日（土）13：00－17：00

〔場所〕 国立大学法人東京大学 弥生講堂

HACCP（Hazard Analysis and Critical Control Point）とは、食品等事業者自らが食中毒菌汚染や異物混入等の危害要因（ハザード）を把握しうえて、原材料の入荷から製品の出荷に至る全工程の中で、それらの危害要因を除去または低減させるために特に重要な工程を管理し、製品の安全性を確保しようとする衛生管理の手法である。本シンポジウムでは、わが国および近隣アジア諸国における食鳥肉検査におけるHACCPの現状を報告していただき、課題と今後の方向性について意見を交換した。一般市民も自由に参加できるように参加費無料の公開シンポジウムとして開催したが、あいにくわが国においても新型コロナウイルス感染症の発生が報告されはじめ、参加者は30-40名と多くはなかった。しかしながら、関東近県で食肉衛生の実務者の参加もあり、活発な意見が交わされた。以下に本シンポジウムのプログラムと各講演の概要を報告する。

## 〔プログラム〕

座長：森田幸雄（東京家政大学）、荻和宏明（北海道大学）

開会挨拶 久和 茂（日本獣医学会理事長）

### 1. 「タイの食鳥，魚介類輸出企業のHACCPの状況」

“HACCP system of food product company exporting poultry and seafood in Thailand”

Dr. Sumalee Boomar, DVM., Ph.D. Walailak University, Thailand.

### 2. 「フィリピンにおける食肉検査システム確立の歴史—食肉関連施設（食鳥処理場，と畜場，食肉加工工場，食肉用冷蔵庫）へのHACCPシステム導入の経緯—」

“A Brief History on the Development of Meat Inspection System in the Philippines leading to Implementation of HACCP system in Meat Establishments (Poultry and Pig Slaughterhouses, Meat Processing Plants, Meat Cutting Plants and Cold Storage Warehouses)”

Dr. Clarita M. Sangcal, DVM. Chief Meat Control Officer, Meat Import Export Division, National Meat Inspection Service, Philippines.

### 3. 「重要管理点（CCP）としての精肉のガス置換包装」

森田幸雄（東京家政大学）

### 4. 「わが国におけると畜場HACCPシステム妥当性検証：その意義と検証法開発」

鎌田洋一（甲子園大学）

総合討論

閉会挨拶 荻和宏明（北海道大学）

## 〔講演内容〕

1. 「タイの食鳥，魚介類輸出企業のHACCPの状況」：タイは冷凍鶏肉や冷凍水産物の輸出が盛んで、タイの食品会社大手であるCharoen Pokphand Foods Public Company Limited (CPF) は有名である。CPFは豚，肉用鶏，採卵鶏，アヒル，エビ，魚などを取り扱い，30か国以上の国々へ輸出している。同社では生産現場から消費者に至るまでのフードサプライチェーンにおける衛生的リスク要因を排除し，生産・販売に関する法令を遵守するとともにコーデックスの国際的基準を適用し，消費者の健康と公正取引を行っている。
2. 「フィリピンにおける食肉検査システム確立の歴史—食肉関連施設（食鳥処理場，と畜場，食肉加工工場，食肉用冷蔵庫）へのHACCPシステム導入の経緯—」：19世紀のフィリピンではスペイン王国の食肉検査システムが実施されていた。食肉検査官が動物の殺処分に立ち会い記録するだけで，病気の動物の摘発などはできなかった。20世紀初頭に米国人がやってきて，米国流の食肉検査システムが導入され，1936年には現代的な手法が法制化された。1972年10月には当時のマルコス大統領が大統領令を発令し，家畜と畜産物の生産を管理する国の食肉検査委員会を設立させた。その後も歴代のアキノ大統領，ラモス大統領らによって食肉・水産物の衛生管理に関する法整備は進み，1998年には動物福祉法も成立した。2004年にはアロヨ大統領によって食肉検査規則が整備された。2013年には食品衛生法が承認され，食品安全の規制システムが強化され，消費者の健康と食品流通に貢献している。
3. 「重要管理点（CCP）としての精肉のガス置換包装」：ガス置換包装（Modified Atmosphere Packaging：以下，MAP）とは，食品の変質を抑制し，食品本来のもつ品質を保持することを目的として，食品の包装内の空気を除去し，二酸化炭素や窒素による不活性ガスや酸素などに置換・充填するもので，細菌の増殖防止効果があることから，米国，欧州連合等の国々では使用が認められている。しかし，わが国では，「食品の鮮度等について消費者の判断を誤らせるおそれがある」との立場からMAPは普及していない。精肉では高濃度酸素MAP（酸素80%，二酸化炭素20%）が世界的に用いられ，ミオグロビンがオキシミオグロビンに変わり，食肉を鮮紅色にすると言われている。しかし，演者らが実施した実験では色調の変化は認められず，食肉の品質，鮮度等について消費者の判断を誤らせるおそれがあるとは言えなかった。高濃度酸素MAPは精肉の一般生菌数，大腸菌数を減少させ，ウェルシュ菌が発育しないことから，わが国での普及を推奨された。
4. 「わが国におけると畜場HACCPシステム妥当性検証：その意義と検証法開発」：平成30年6月13日，食品衛生法のほか，と畜場法等の一部を改正する法律が公布され，令和2年6月から施行し，施行から1年間は猶予期間が設けられ，2021年6月からは完全に義務化される。と畜場は腸管内や体表に腸管出血性大腸菌，カンピロバクター，サルモネラ等を保有する家畜を食肉にする製造施設であり，米国，EU等では，HACCPの妥当性検証法や基準が示され，義務化されている。わが国のと畜場もHACCPが義務化されるにあたり，妥当性検証法の開発が行われている。

## 〔その他〕

新型コロナウイルス感染症（COVID-19）対策として，参加者全員にマスクを配布し，マスクの装着をお願いした。また，会場入り口には消毒液を置き，手指の消毒を推奨した。

# 平成 31（令和元）年度事業実施報告書

## 日本畜産学会第 126 回大会 公開シンポジウム

### 「畜産研究の成果を獣医臨床フィールドへ」

公益社団法人日本畜産学会 理事長 柏崎直巳（麻布大学）

〔日時〕 2019年9月19日（木）13：00～17：15，9月20日（金）9：00～12：00

〔会場〕 第Ⅰ会場（ぼらんホール）

〔主催〕 公益社団法人日本畜産学会

〔共催〕 岩手大学農学部，日本家畜臨床学会

〔プログラム〕

9月19日（木）

I. 13：00～15：00「牛の繁殖：研究と臨床のトピック」

座長：大蔵 聡（名古屋大），高橋 透（岩手大）

講演1. 「家畜における繁殖の神経内分泌学～基礎的知見と臨床応用の可能性～」

松田二子，大蔵 聡（東大院農生命，名大院生命農）

講演2. 「ウシ経膈採卵（OPU）における現場利用と今後の展開」

及川俊徳（宮城県畜産試験場）

講演3. 「黒毛和種繁殖牛の飼養管理が受精卵移植受胎率に及ぼす影響」

渡邊貴之（（独）家畜改良センター）

講演4. 「ウシ黄体血流を指標とした受胎性評価」

金澤朋美（宮城県農業共済組合）

II. 15：15～17：15「肉牛生産と疾病管理の最前線」

座長：岩本英治（兵庫県），一條俊浩（岩手大）

講演1. 「ブランドを支える試験研究」

岩本英治（兵庫県立農林水産技術総合センター）

講演2. 「尿石症の多発要因と予防，治療法の開発」

渡辺大作（北里大獣医）

講演3. 「臨床現場における素牛生産の現状と課題」

松田敬一（宮城県農業共済組合）

講演4. 「独自システムを活用した黒毛和牛一貫生産と販売戦略～外れる生産と外さない生産～」

鳥山 真（鳥山畜産食品株式会社）

9月20日（金）

III. 9：00～11：10「乳牛の飼養管理と疾病制御」

座長：榑引史郎（農研機構），佐藤 繁（岩手大）

講演 1. 「移行期の飼養管理」

杉野利久（広大院統合生命）

講演 2. 「周産期代謝障害の解析と早期診断」

石川 翔（兵庫県農総セ 淡路農業技術センター）

講演 3. 「離乳期子牛のSARAと粗飼料給与の重要性」

竹村 恵（山形庄内家保，筑波大院生命環境）

講演 4. 「コーンサイレージ給与と疾病管理」

加藤淳郎（NOSAI岩手 岩手県南基幹家畜診療所）

IV. 11:20-12:00 総合討論 座長：榑引史郎（農研機構），佐藤 繁（岩手大）

〔開催概要〕

本シンポジウムは、公開シンポジウムとして岩手大学農学部（総合教育研究棟）を会場に、日本家畜臨床学会との共催として実施した。日本家畜臨床学会（会長：酒井淳一）は、昭和44年に前身を東北家畜臨床研究会として、東北地方の臨床獣医師を中心に創設された学会である。現在は北海道大動物臨床研究会、九州沖縄産業動物臨床研究会と連携し、その活動を全国に広げている。

シンポジウムテーマは、繁殖障害を中心にその解決法を提示するものとして「畜産研究の成果を獣医臨床フィールドへ」とした。近年、牛の生殖障害による肉牛、酪農生産に大きな影響が出ている。岩手県は我が国においても有数な畜産業が盛んな地域の一つであり、この臨床上の課題を討議することは、多方面の視点から臨床へ役立つ講演であると考えた。また、岩手大学農学部共同獣医学科および動物科学科の学生の参加を無料とし、次世代の畜産業の担い手を育成、教育するシンポジウムとした。畜産業の担い手不足も問題となっているが、各種畜産研究に関連する機関における優秀な次世代の確保は、我が国の畜産の死活問題である。次世代の育成および畜産現場の問題点を認識できるよう配慮したプログラム構成とした。

参加者は124名で、会員のみならず臨床にたずさわる獣医師、農場関係者の方々、そして多数の学生の参加があった。



# 日本食肉研究会への平成31年度・令和元年度 事業助成実施報告

日本食肉研究会 会長 坂田亮一（麻布大学・明治大学）

## 1. はじめに

標記の事業の項目として、(公財)伊藤記念財団から今回助成を受けたのは、(1)海外派遣事業の補助(国際食肉科学技術会議派遣)、(2)国内における研究会でのセミナー、および(3)第68回国際食肉科学技術会議(2022年、神戸開催)運営の補助である。

ここに、昨年8月に実施された(1)、今年3月に行う予定であった(2)、および昨年度の(3)の組織委員会の活動まで、各項目の実施内容を順次報告するが、これらの助成を受けた「日本食肉研究会」の概要について以下に記す。

## 2. 日本食肉研究会等の概要

本会は昭和34年(1959年)4月に発足し、食肉に関する分野について広く学界、業界、団体関係者がお互いの研鑽の場として、学術と産業の発展を目指し、活動を行ってきた。

本会では毎年、研究会大会(学術講演会)の開催、ならびに会誌として「食肉の科学」を発行している(平成3年に「肉の科学」を改称)。研究会は通常、日本畜産学会大会の開催に合わせて春に実施され、食肉および食肉加工に関連する分野のエキスパートによる特別講演、ならびに会員による研究発表を行い、活発な意見交換がなされている。「食肉の科学」の主な内容として、総説、解説、海外事情、最近の文献紹介、研究会の発表要旨などが満載されている。

設立40周年の1999年に横浜で第45回国際食肉科学技術会議(International Congress of Meat Science and Technology, 通称ICoMST)を開催し、会員相互一体となって運営を行った経緯がある。この国際会議は毎夏に欧州と他の国々で交互に開催されている。その各国代表者会議での話し合いで、2022年(第68回)にわが国で再び開催する運びとなり、このICoMSTの成功に向けて国内受入組織である本研究会は重要な役割を担っている。

昨年は、研究会創設60周年という記念すべき年となり、3月30日の大会で記念式典が開催された。ヨーロッパから2名の招待講演者を迎え、会場となった麻布大学に多くの参加者が詰めかけ、盛大なセレモニーとなった(写真1)。これらの行事に関しても、日本食肉研究会ホームページで紹介している(<http://jmeatsci.org/>)。その詳細は、昨年発行した本財団助成研究報告書<sup>1)</sup>に、また同内容で第60巻「食肉の科学」第1号<sup>2)</sup>にも掲載し



写真1 第60回日本食肉研究会交流会(麻布大学にて)

ている。

今年（2020年）は京都大学農学部で3月28日に大会を行うことになっていたが、新型コロナウイルス感染拡大により、やむなく中止となった。前回は超す演題申し込みと協賛もあっただけに、真に残念な決断であった。この事態が一刻も早く収束することを願い、大会に代えて今秋に特別セミナー開催を企画した。

なお本研究会の会員数は、本年6月30日現在で、正会員（一般）160名（前年156名）、正会員（学生）6名（前年8名）賛助会員7社（前年6社）、特別会員33社（前年31社）、名誉会員9名（前年10名）である。

### 3. 今回の助成結果

#### （1）海外派遣事業の補助

国際食肉科学技術会議派遣助成として、第65回会議に本会から会員4名が参加した。このICoMSTは毎年8月中旬に開催され、本会からは、会長、副会長あるいは常任幹事の中から1名を派遣している。その際、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、内容を会員に周知することが義務づけられている。

昨年は8月4（日）～9日（金）にドイツのポツダムで開催され、本助成により、山之上稔会員（神戸大学農学部）、若松純一会員（北海道大学農学部）、本山三知代会員（農研機構畜産研究部門）の3名が派遣された。

会場は、ポツダム郊外テンプリナー湖の湖畔にあるコンgresホテルで行われ（写真2）、49カ国から560名を超す参加者（北米83名、南米22名、ヨーロッパ238名、アフリカ15名、オーストラリア57名、アジア141名）があり、24題の基調講演、350題以上の一般発表があった。この会議の詳細は、今年の「食肉の科学」第2号の【海外事情】でも報告している<sup>3)</sup>。

前回の開催地メルボルンでもデスクを会場に設置し、2022年日本開催のPRに務めた<sup>4)</sup>が、今回は日本からの参加者が18名（内学生7名）あり、ICoMST2022 in 神戸の広報活動を大に行うことができた（写真3）。

会期中は終日、ミートサイエンスに関する多くのセッションで、テーマごとにセッションが設けられ、基調講演と一般発表（口頭およびポスター）が行われた。

以下に各セッションの概要を記す（一部省略）。

Session 1：消費者行動と倫理：食肉が消費者のwell-beingにどのように貢献するか、や食品選択や摂食拒否をもたらすプロセス等の内容。



写真2 ICoMST2019メイン会場



写真3 日本からの参加者集合写真（Gala dinner 会場）

Session 2：品質と安全性：品質を評価するための基本的概念や食品衛生確保について。

Session 3：食肉の加工品と代替品：食肉加工品および食肉類似食品（植物由来タンパク質）の物性および新規加工技術について。

Session 4：家畜生産：食肉および家畜の生産技術（ゲノム編集，持続可能性等）について。

Session 5：最新技術：デジタル化，と畜技術，ロボット等について。

Session 6：筋生理学と筋代謝：培養肉，メタボロミクス等を含む筋肉生理学について。

以上の学術セッションの合間などに，協賛企業等によるIndustrial Workshopが開催された。ドイツの農家・企業の生の声も聴くことができ，同国の畜産と食肉産業への理解が深まり印象的であった。

2020年のICoMSTは米国が担当し，フロリダ州オーランドで8月3日（月）～6日（木）に開催された。米国内でも新型コロナウイルス感染の拡大にまだ歯止めがかからないが，中止にならずバーチャル方式で実施された。この会議に伊藤記念財団の派遣事業助成により，ICoMST2022組織委員会から多数のメンバーが参加し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した。

また，中国南京で昨年の10月11～13日にアジア-太平洋食肉科学技術会議Asia-Pacific Congress of Meat Science and Technologyが行われ（図1），本研究会から有原圭三副会長（北里大学）が講演招聘を受け日本の食肉研究を紹介した。ICoMSTとの関りも深い会議と判断し，日本食肉研究会代表として坂田が派遣された。その渡航に際し，2022年の日本開催のための情報収集として，本研究助成から補填した。南京での会議内容は，今年の「食肉の科学」第1号に掲載した<sup>5)</sup>。

## （2）国内における研究会でのセミナーの補助

「国際的な食肉研究のトップランナーを海外から招聘し，討論重視型の食肉ワークショップを開催する」という目的で，平成28年度から外国人研究者を日本食肉研究会大会に招聘し，伊藤記念財団から助成を受けこの事業を行っている。第1回目は，2017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ドイツからProf. Schwägele（Max-Rubner Institute, Kulmbach副所長）を招き，食肉中の微量残留物質の基準と分析法の話題を中心にセミナーを実施した。

翌2018年は東京大学農学部本郷キャンパスで第59回日本食肉研究会大会にて，トルコ共和国からDr. Abdulatef Ahhmed（Yıldız Technical University准教授）を招き，「Accreditation of Halal meat products and the diversity of their protein properties」の演題で，ハラールと畜の科学的検証，ならびに食肉とし

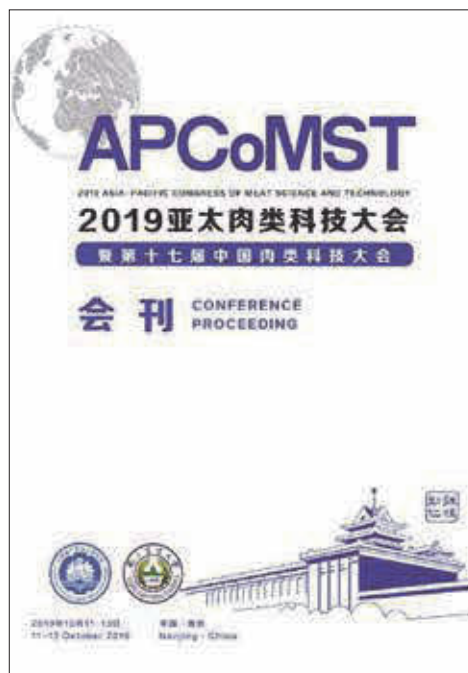


図1 会場で配布された要旨集

での機能性について特別講演が行われた。次に韓国の Dr. Seon-Tea Joo (Gyeongsang National University 教授) により, 「Health implication of consuming highly marbled Hanwoo beef」の演題で, 韓牛の肉質について講演があり, その脂肪酸組成から機能性に富む肉であることが示され, 会場からも和牛との比較についてなど, 活発な討論が行われた。昨年, デンマークから Dr. Lars Hinrichsen (Danish Technological Institute 副所長), ならびにスペインから Dr. Mónica Flores (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia) を本助成事業の一環として招聘した。両者の講演内容の詳細は, 昨年の「食肉の科学」第1号に掲載されている<sup>6)</sup>。

本年は, ロシアの Dr. Irina Chernukha (VM Gorbатов Federal Research Center), アメリカの Dr. Andrew Milkowski (University of Wisconsin-Madison) に講演を依頼し, 前者は『The state of art in Russian functional food science and industry』, 後者は『Recent trends in meat science in the United States』で発表を予定していたが, 残念ながら実施できなかった。なお, 各々の要旨は「食肉の科学」本年度1号に掲載した<sup>7)</sup>。

### (3) 第68回国際食肉科学技術会議運営の助成

2022年, 神戸開催を目指し, 組織委員会を2年前に立ち上げ, 鋭意準備を行っている。昨年8月は, 上記ポツダムでの65th ICoMSTに組織委員会メンバーを派遣し, 情宣活動を実施した。また, 3月, 6月および9月に委員会を行い, 委員の意見を統合し, 農水省, 厚生労働省ならびに各種食肉関連団体, 学会などから後援承諾を得て, 趣意書を作成した(図2)。現在, 関連企業や団体に協賛金の依頼を行っている。

一方で, コロナウイルス感染拡大の中で, 2年後の大会開催のための募金活動の進め方として, 業界の景気状況を考慮し検討中である。

## 4. おわりに

伊藤記念財団からの学会・研究会など学術集団への活動助成は今年で4回目となった。これまで私も招く側は順調に大会を開催し, 外国人研究者招聘を実施することができた。

しかし, 今年は予期せぬ新型コロナウイルスの拡大により, 大会中止に至った。国内外いまだ終息の兆しはなく, 混乱の中にある。この地球規模のパンデミックの前に, 助成項目(2)以外の事業を行えたことは, 今後の食肉研究会を運営する上で, 次に繋がるものと考えられる。国際会議参加, 食肉研究



図2 第68回国際食肉科学技術会議神戸開催の趣意書



会への招聘，2022年神戸での国際会議開催を見据えて諸外国のキーパーソンとの交流など，この海外派遣とセミナーの事業助成効果は確実に上がってきたと判断する。実際，研究会でも年々会員の英語伝達力は目に見えて向上しており，この助成による成果であると感謝する。

2年後の神戸開催が予定通りできるよう，このような混乱の中でもできる限りの準備は食肉研究会として，組織委員会を稼働させ進める方針である。また我が国での国際会議開催の機会に，研究会組織の強化を図るため，学会化を推進する所存である。

ここに，助成をいただいた（公財）伊藤記念財団の皆様に関心から謝意を表し，引き続き本助成の増強を日本食肉研究会として切に希望する次第である。

#### 参考資料

- 1) 坂田亮一：日本食肉研究会への平成30年度事業助成実施報告，平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.37, 521～524, 2019.
- 2) 根岸晴夫，坂田亮一：研究会報告「日本食肉研究会への平成30年度伊藤記念財団事業助成実施報告」，食肉の科学，Vol.60, No.1, 150～152, 2019.
- 3) 坂田亮一，山之上稔，若松純一，本山三知代，参加者13名：海外事情「第65回国際食肉科学技術会議に出席して」，食肉の科学，Vol.60, No.2, 203～217, 2019.
- 4) 松石昌典，有原圭三，若松純一，竹田志郎：海外事情「第64回国際食肉科学技術会議に出席して」，食肉の科学，Vol.59, No.2, 149～157, 2018.
- 5) 有原圭三，坂田亮一：海外事情「2019アジア・太平洋食肉科学技術会議（APCoMST）に参加して」，食肉の科学，Vol.61, No.1, 55～60, 2020.
- 6) Monica Flores, Carmela Belloch, Lars Hinrichsen, Haiyan Wu：特別講演，食肉の科学，Vol.60, No.1, 130～138, 2019.
- 7) Irina Chernukha, Andrew Milkowski：Short Review, 食肉の科学, Vol.61, No.1, 3～9, 2020.

# 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31年度(令和元年度) (Vol. 38)

---

2020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>