

平成25年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 32

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であります。

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であります。

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 acknowledgement of my contributions to the meat industry and improved human nutrition during my career. This illustrious award provided a strong impetus for me to act on my long-standing concern for the future of meat packing industries.

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

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

Denzo Ito, Founder
June 1981

事業のあらまし

(目 的)

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

(事 業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

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

(事業実績)

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

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33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間に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参りつつあります。

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

本書は、第32回（平成25年度）助成事業における38件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

平成26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.32 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. 2014

Koichi Ito

The chief director

The Ito Foundation



目 次

発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究

……………津 田 治 敏（九州栄養福祉大学食物栄養学部）…………… 1

食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明と電解水処理による殺菌法の確立

……………島村 裕子・増田 修一（静岡県立大学食品栄養科学部）…………… 7

食肉製品の客観的嗜好性評価に関する研究（第2報）

……………芳賀 聖一・林 利哉・山口 恭平・小川 幸彦*
（名城大学農学部，*名城大学農学部附属農場）…………… 14

生活習慣病予防効果を有する食肉素材の創出を目指した加工技術の確立

……………好 田 正（東京農工大学大学院農学研究科）…………… 19

牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究（第3報）

……………山之上 稔・西田 昌弘・上田 修司・井原 一高・豊田 淨彦
（神戸大学大学院農学研究科）…………… 27

味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究

……………都 甲 潔・田原 祐助
（九州大学大学院システム情報科学研究所）…………… 34

牛肉に関する健康指標の策定と赤身牛肉の消費者ニーズ調査

……………広 岡 博 之（京都大学大学院農学研究科）…………… 39

豚血液由来抗肥満素材による内臓脂肪蓄積抑制機構の解明

……………上曾山 博（神戸大学大学院農学研究科）…………… 47

食肉の給与が海馬のタンパク質リン酸化および遺伝子発現におよぼす影響

……………豊 田 淳（茨城大学農学部）…………… 53

畜産副産物の中性脂肪改善効果について

……………岡 本 芳 晴（鳥取大学農学部）…………… 57

血糖値と血中アミノ酸，オメガ3脂肪酸，血栓因子の関連に関する研究

……………田中 明・蒲池 桂子・中嶋 克行*・高田 明和**
（女子栄養大学栄養クリニック，*群馬大学大学院保健学科，
**浜松医科大学医学部）…………… 62

冠動脈疾患患者における血中アミノ酸・脂肪酸組成と動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子の関連に関する研究

..... 木庭 新治・小林 洋一・横田 裕哉・田中 明¹
中嶋 克行²・高田 明和³

(昭和大学医学部, ¹女子栄養大学栄養クリニック,

²群馬大学大学院保健学科, ³浜松医科大学医学部) 66

食肉類の摂取と血中アミノ酸, オメガ3脂肪酸及び血栓因子の関連に関する研究

..... 高尾 哲也¹・小川 睦美¹・中嶋 克行²・高田 明和³

(¹昭和女子大学生生活科学部, ²群馬大学大学院保健学研究科,

³NPO法人「食と健康プロジェクト」) 71

畜産物由来ヘム鉄摂取について食事調査における研究

—発育期スポーツ選手の体組成に対する効果—

..... 坂 元 美 子 (神戸女子大学健康福祉学部) 78

牛肉の質に関連する新たな脂肪酸合成経路の探索とバイオマーカーの同定

..... 溝 口 康 (明治大学農学部) 84

牛肉の風味に関与する遺伝子の機能解析

..... 米倉 真一・廣田 翔平 (信州大学農学部) 90

コレシストキニンA受容体遺伝子を指標とした効率的な地鶏生産に関する研究

..... 力丸 宗弘・高橋 大希・大久保 武*

(秋田県畜産試験場, *茨城大学農学部) 96

天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別の可能性の検討

..... 関谷 正男¹・奥村 友美²・都築 政起³

(¹山口県農林総合技術センター, ²独立行政法人家畜改良センター,

³広島大学大学院生物圏科学研究科) 103

ブタ精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子の特定とそれを指標とした新たな

精子受精能評価法の確立

..... 高坂 哲也・井川 彰・皆川 至・柴田 昌利*

(静岡大学大学院農学研究科, *静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター) 108

アポトーシス阻害因子の人為制御による家畜の潜在的卵子救命法の創出

..... 眞 鍋 昇 (東京大学大学院農学生命科学研究科附属牧場) 115

かごしま黒豚における授乳中発情の誘起試験

..... 野口 倫子・生駒 エレナ*・帆保 誠二

(鹿児島大学共同獣医学部, *鹿児島県農業開発総合センター畜産試験場) 120

新規繁殖制御中枢刺激剤が黒毛和種の卵胞発育に与える効果についての研究

..... 松田 二子・大蔵 聡

(名古屋大学大学院生命農学研究科) 125

ウシ胚盤胞のマウス子宮内あるいは体外培養における休眠誘導の可能性	山 田 雅 保 (京都大学大学院農学研究科)	131
牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの開発	ツェンコヴァ ルミアナ・竹村 豪・ジョージ バザール (神戸大学大学院農学研究科)	136
リソソーム酵素活性制御による高温ストレス下でのウシ胚発生改善に関する研究	山中 賢一・阪谷 美樹* (佐賀大学農学部, *九州沖縄農業研究センター)	142
牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発	久米 新一・王 蒙東・谷口 康晴 (京都大学大学院農学研究科)	148
乳肉および反芻家畜体内の抗酸化能を高めうる新飼料の機能評価	小 林 泰 男 (北海道大学大学院農学研究科)	154
食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立のための基礎研究	友 永 省 三 (京都大学大学院農学研究科)	159
地鶏生産における初期栄養操作による免疫能向上に関する研究	太田 能之・白石 純一・西川 薫* (日本獣医生命科学大学応用生命科学部, *三重県畜産研究所)	163
胎仔期のタウリン供給強化によるブタの筋形成促進	勝俣 昌也・石田 藍子 (独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所)	170
肉質を変化させる天然物の探索	内 田 隆 史 (東北大学大学院農学研究科)	176
完全自給粗飼料給与における放牧と未放牧が日本短角種の肉質に与える影響	小笠原 英毅・岡山 和代* (北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター, *北里大学保健衛生専門学院管理栄養科)	180
畜肉生産性向上を目指した分岐鎖アミノ酸強化飼料用ダイズの開発	湯浅 高志・松尾 光弘・井上 真理* (宮崎大学農学部, *九州大学大学院農学研究科)	188
被災地産肉現場の風評被害対策を目的とした放牧地空間放射線量の自動測定システムの実証研究	平田 統一・桃田 優子・齊藤 博之* (岩手大学農学部, *株式会社サイエンススタッフ)	196
腫瘍関連遺伝子発現動態解析による非典型的牛白血病の発症診断法の開発	猪 熊 壽 (帯広畜産大学畜産学部)	203

飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の検証**—尿中ステリグマトシスチン濃度測定法の確立とその臨床応用—**

..... 高木 光博・宇野 誠一*・國師 恵美子*

(鹿児島大学共同獣医学部, *鹿児島大学共同水産学部) 209

肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛医療への応用

..... 帆保 誠二・野口 倫子・安藤 貴朗

(鹿児島大学共同獣医学部) 215

乳牛の病原微生物感染における卵巣機能障害の発症機序の解明

..... 清 水 隆 (帯広畜産大学畜産衛生学研究部門) 222

CONTENTS

Functional peptides derived from fermented meat products

Harutoshi Tsuda

(Faculty of Nutrition, Kyushu Nutrition Welfare University) 1

Elucidating the factors influencing the invasion to the meat inside by food poisoning bacteria and antimicrobiological effect and application of electrolyzed water

Yuko Shimamura and Shuichi Masuda

(School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka) 7

Research on the objective evaluation for palatability of meat products (Ⅱ)

Seichi Haga, Toshiya Hayashi, Kyohei Yamaguchi and Yukihiko Ogawa *

(Faculty of Agriculture, Meijo University, * Experimental Farm, Meijo University) 14

Establishment of processing methods for producing meat products with anti-lifestyle-related disease

Tadashi Yoshida

(Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) 19

Intramuscular free fatty acids related to beef eating quality, PartⅢ

Minoru Yamanoue, Masahiro Nishida, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) 27

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

Kiyoshi Toko and Yusuke Tahara

(Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University) 34

Development of healthy beef index and consumer needs survey for lean beef

Hirokyu Hirooka

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University) 39

Anti-obese action of a porcine blood-derived food ingredient

Hiroshi Kamisoyama

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) 47

Effects of meat supplementation on hippocampal protein phosphorylation and gene expression

Atsushi Toyoda

(College of Agriculture, Ibaraki University) 53

Effect of livestock by-product on serum triglyceride level

Yoshiharu Okamoto

(Faculty of Agriculture, Tottori University) 57

Studies on relationship between blood glucose level and plasma aminoacids, omega 3 fatty acids and thrombotic factors	
Akira Tanaka, Keiko Kamachi, Katsuyuki Nakajima *, Akikazu Takada ** (Nutrition Clinic, Kagawa Nutrition University, * Gunma University Graduate School of Health Sciences Postgraduate School of Medicine, ** Hamamatsu University School of Medicine)	62
Studies on relationship between the composition of blood amino acids and fatty acids and atherogenic lipoproteins and/or thrombotic factors in patients with coronary artery diseases	
Shinji Koba, Youichi Kobayashi, Yuuya Yokota, ¹ Akira Tanaka, ² Katsuyuki Nakajima, ³ Akikazu Takada (Showa University School of Medicine, ¹ Kagawa Nutrition University, ² Gunma University Graduate School of Health Science Postgraduate School of Medicine, ³ Hamamatsu University School of Medicine)	66
Studies on relationship between meat intake level and plasma aminoacids, omega3 fatty acids and thrombotic factors	
Tetsuya Takao ¹ , Mutsumi Ogawa ¹ , Katsuyuki Nakajima ² and Akikazu Takada ³ (¹ Faculty of Life Sciences, Showa Woman's University, ² Graduate School of Health Sciences Gunma University, ³ NPO“Food and Health Project”)	71
Study of the porcine blood heme-iron intake and the nutrition ingestion condition	
— Effect of the heme-iron on the body composition for the growth phase sport player — Yoshiko Sakamoto (Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University)	78
Development of a biomarker of new pathway for the synthesis of fatty acid in bovine intramuscular adipocytes	
Yasushi Mizoguchi (School of Agriculture, Meiji University)	84
Functional analysis of beef flavor-related genes	
Shinichi Yonekura and Shohei Hirota (Faculty of Agriculture, Shinshu University)	90
Study on the effective chicken production by selection for <i>Cholecystokinin type-A receptor</i> gene	
Kazuhiro Rikimaru, Daiki Takahashi, Takeshi Ohkubo * (Akita Prefectural Livestock Experiment Station, * College of Agriculture, Ibaraki University)	96
Possibility of DNA discrimination of a meat-type brand chicken“Chosyu-Kurokashiwa” created from the Kurokashiwa Chicken, a national natural treasure of Japan	
Masao Sekiya ¹ , Yumi Okumura ² , and Masaoki Tsuzuki ³ (¹ Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Livestock Technology Research Department, ² National Livestock Breeding Center, ³ Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)	103

Identification of a key molecule responsible for the structural stability of sperm nuclear chromatin and its application to the assessment of fertility potential of boar sires	
Tetsuya Kohsaka, Akira Igawa, Itaru Minagawa, Masatoshi Shibata *	
(Laboratory of Animal Reproduction & Physiology, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University, * Shizuoka Swine and Poultry Experimental Station)	108
Rescue of potential oocytes in livestock ovaries by artificial control of apoptosis inhibitor	
Noboru Manabe	
(Animal Resource Science Center, The University of Tokyo)	115
Control of lactational estrus in the Kagoshima Berkshire	
Michiko Noguchi, Erena Ikoma * and Seiji Hobo	
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, * Livestock Research Institute, Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development)	120
The effect of a novel reproductive center stimulant to follicle development of Japanese Black beef cows	
Fuko Matsuda and Satoshi Ohkura	
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)	125
Studies on the induction of embryonic diapause of bovine blastocysts in pseudo-pregnant mouse uteri, in which diapause conditions are created, or under <i>in vitro</i> culture conditions	
Masayasu Yamada	
(Laboratory of Reproductive Biology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)	131
Development of rapid and non-destructive diagnostic system for cow's estrus and pregnancy	
Roumiana Tsenkova, Go Takemura, George Bazar	
(Biomeasurement Laboratory, Kobe University Graduate School of Agricultural Science)	136
Study on improvement of bovine embryonic development under heat stress by regulation of lysosomal enzyme activities	
Ken-ichi Yamanaka and Miki Sakatani *	
(Faculty of Agriculture, Saga University, * National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region)	142
Effects of functional components in grass on enhancing immunoglobulin in colostrum	
Shinichi Kume, Mengdong Wang and Yasuharu Taniguchi	
(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)	148
Evaluation of a new functional feed to possibly enhance anti-oxidant activity of milk, meat and other tissues of ruminant	
Yasuo Kobayashi	
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	154

Basic study for the establishment of the method to increase carnosine-related dipeptide levels in meats	
Shozo Tomonaga	
(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)	159
Study on improvement of immunity by early nutritional development in Japanese native chicken production	
Yoshiyuki Ohta, Jun-ichi Shiraishi and Kaoru Nishikawa *	
(Faculty of Applied Bioscience, Nippon Veterinary and Animal Science University,	
* Animal Science Laboratory Mie-prefecture)	163
Promotion of myogenesis by administration of taurine during the fetal stage in the pig	
Masaya Katsumata and Aiko Ishida	
(NARO Institute of Livestock and Grassland Science)	170
Screening for natural product that changes the meat characteristics	
Takafumi Uchida	
(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)	176
Effect of grazing on meat quality of Japanese Shorthorn under complete grass-fed beef production system	
Hideki Ogasawara and Kazuyo Okayama *	
(Field Science Center, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, * Department of	
Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)	180
Improvement of branched chain amino acid contents in soybean for high quality meat production	
Takashi Yuasa, Mitsuhiro Matsuo, Mari Iwaya-Inoue *	
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, * Faculty of Agriculture, Kyushu University)	188
An empirical study of the automatic measurement system of the grazing land space dose of radiation for opposing the damage caused by rumors of a stricken area	
Toh-ichi Hirata, Yuko Momota and Hiroyuki Saito *	
(Faculty of Agriculture, Iwate University, * Science Staff Co. Ltd.)	196
Development of diagnostic methods for atypical bovine leukosis by analysis of tumor-related gene expressions	
Hisashi Inokuma	
(Faculty of Animal Husbandry, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)	203
Field application of urinary sterigmatocystin concentration measurements for monitoring natural feed contamination in cattle herds	
Mitsuhiro Takagi, Seiichi Uno * and Emiko Kokushi *	
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, * Faculty of Fisheries, Kagoshima	
University)	209

**Application of bronchoalveolar lavage to specify offending bacteria of pneumonia to cow
medical treatment**

Seiji Hobo, Michiko Noguchi and Takaaki Andou

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) 215

Mechanisms of ovarian dysfunction by bacterial infection in dairy cow

Takashi Shimizu

(Graduate School of Animal and Food Hygiene, Obihiro University of Agriculture and Veterinary

Medicine) 222

発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究

Functional peptides derived from fermented meat products

津 田 治 敏

(九州栄養福祉大学食物栄養学部)

Harutoshi Tsuda

(Faculty of Nutrition, Kyushu Nutrition Welfare University)

The purpose of this study was to select a lactic acid bacterial strain for use as a starter culture for producing fermented meat products and for evaluating a functionality of the fermented meat products. *Lactobacillus plantarum* JAB2001 was isolated from Japanese traditional fermented food, funazushi. This strain was capable of growth in a ground beef patty, and pH of the fermented patty reached 4.8 after 48 h incubation at 25° C. The extract of the fermented meat patty showed an inhibitory activity against angiotensin I-converting enzyme (ACE). The peptide that inhibited ACE was purified from the fermented meat patty by reverse-phase HPLC and a size-exclusion HPLC.

1. 目 的

乳酸菌は多くの発酵食品に用いられる細菌の一つであり、特に乳製品への利用がよく知られている。プロバイオティクスという概念は1989年、Fuller¹⁾によって提唱され、2002年にはFAO/WHO²⁾によって「食品として適切な量を摂取した場合に宿主に有益な影響をおよぼす生きた細菌」と定義された。このプロバイオティクス細菌の代表が乳酸菌であり、乳酸菌を多く含む食品としてヨーグルトなどの発酵乳製品がある。

近年、プロバイオティクス乳酸菌の運び手食品として発酵食肉製品が注目されている^{3~6)}。発酵食肉製品はヨーロッパ各地で発達し、食塩や亜硝酸塩の添加、原料や環境に由来する微生物の利用

などのいくつかの保存法を駆使した加工食品である。一般に、発酵食肉中の環境は菌の生育にとって厳しく、低水分活性、高塩濃度および低pHなどが重要な生育抑制因子として考えられている⁷⁾。このような環境が一般細菌の生育を抑制し、保存性の向上に寄与している。発酵食肉製品のスターターに利用されている乳酸菌はこうした環境でも生育できる菌株であり、食肉から分離された乳酸菌であることが多い。その他の発酵食品由来の菌の利用も検討されている^{8~10)}が、その場合、何らかの付加価値が最終製品にもたらされることが期待される。すなわち、プロバイオティクス乳酸菌などを応用することによって発酵食肉製品に保健効果を付与することが検討されている。しかしながら、そのような菌株が食肉中で良好な生育

を示すとは限らない。

発酵食肉製品以外にも環境因子として低水分活性、高塩濃度および低pHを有する発酵食品がある。我が国で伝統的に製造されている熟れ鮭（ナレズシ）である。熟れ鮭は乳酸菌を利用した発酵食品であり、特に琵琶湖周辺で製造されている「鮒ずし」は、我が国に現存する熟れ鮭の中では最も古い形態を残していると考えられている¹¹⁾。製造方法は、桶に飯、フナ、飯、フナの順に入れ積み上げた後、竹の皮で蓋をし、重石をする。1～2日間はそのままにし、次に水を表面まで張り、1～2年間漬込み発酵させたものである。発酵食肉製品と同様に、環境因子として低水分活性、高塩濃度および低pHなどが挙げられる^{12, 13)}。このように発酵食肉製品と鮒ずしは微生物の生育環境に共通点を持つが、鮒ずし由来の乳酸菌を利用した発酵食肉製品の検討はこれまでほとんどされていない。

本研究では鮒ずし由来の乳酸菌を利用した発酵食肉製品およびその機能性について検討した。すなわち、発酵食肉製品中での乳酸菌の生育性、ヒトの各種消化液に対する耐性および発酵食肉製品のアンギオテンシン変換酵素阻害活性を測定した。

2. 方 法

2.1 使用菌株

試験には *Lactobacillus plantarum* JAB2001 を用いた。この菌株は琵琶湖周辺の伝統的乳酸発酵食品「鮒ずし」を分離源とするものであり、生理学的諸性質および16S rDNAの解析結果から菌種を同定したものである¹⁴⁾。

2.2 胆汁酸耐性の測定

WalkerとGillilandの方法を参考にして行った¹⁵⁾。MRS液体培地およびoxgall (Difco) を0.3%含むMRS液体培地にそれぞれ接種し37℃で6時間培養後の濁度を620nmで測定し、両者の濁度の比か

ら生育度(%)を求めた。またoxgallの最小生育阻止濃度を求めた。

2.3 人工胃液耐性試験¹⁶⁾

人工胃液耐性試験は、人工胃液耐性試験増殖用培地（市販牛乳98 g、脱脂粉乳（雪印）1.5 g、酵母エキス0.5 g）を用いて37℃、24時間培養した培養液、市販牛乳および4.0%ペプシン（シグマ）溶液を、それぞれ25、74および1の割合で混合し、塩酸を用いてpHを2.5に調整したものを人工胃液混合物とした。人工胃液混合物を37℃に保持し、0、1、2および3時間後の生菌数をMRS寒天培地を用いて測定した。

2.4 人工腸液耐性試験¹⁶⁾

人工腸液基礎培地（市販牛乳97.6 g、脱脂粉乳1.5 g、酵母エキス0.5 g、ウシ胆汁沫0.4 g）、10%トリプシン（和光純薬）溶液およびpH4.0で37℃、1時間培養後の人工胃液混合物をそれぞれ96、1および3の割合で混合したものを人工腸液混合物とした。嫌気ジャー（BBL）を用いて人工腸液混合物を37℃で嫌氣的に保持し、0、6、12および24時間後の生菌数を測定した。

2.5 食肉の発酵

発酵食肉の調製は中江ら¹⁷⁾を参考にした（Table 1）。牛すね肉、豚背脂肪およびタマネギは4 mmのミンチにして用いた。菌体懸濁液は、菌株をMRS液体培地で継代培養したのち遠心分

Table 1 Component of fermented meat

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

離 (1,000×G, 10分) して集菌・菌体洗浄を繰り返したのち等量の水に懸濁したものをを用いた。調製食肉に菌体懸濁液を1%加え25℃, 約80% RHで48時間培養したものを発酵食肉とした。

発酵食肉3gを30mlの滅菌蒸留水に懸濁し、pHを測定した。また、生菌数はこの懸濁液をMRS寒天培地 (pH5.4) に塗抹し、48時間30℃で培養後に形成した集落を計数して求めた。

2.6 ACE阻害活性の測定

ACE阻害活性はCushmanとCheungの方法¹⁸⁾を参考に以下の方法で測定した。アンギオテンシン変換酵素 (ウサギ肺製, SIGMA) 1 unitを2mLの50%グリセロールに溶解せしめ冷凍保存し、使用時にはほう酸緩衝液 (pH8.3, 300mM NaCl, 20 μM ZnCl₂) で5倍希釈した。馬尿酸-ヒスチジルロイシン (SIGMA) 53.688mgを上記ほう酸緩衝液10mLに溶解せしめたものを基質溶液とし冷凍保存した。発酵食肉を5倍量の水に懸濁し70℃で30分間の加熱処理後、遠心分離 (10,000×G, 20分) し、回収した上澄液のpHを8.3に調整したのち、再度遠心分離して得られた上澄液を試料とした。

試料50 μLおよびACE溶液25 μLを混和し、37℃の水浴で10分間反応させたのち、基質溶液50 μLを加え、37℃の水浴で60分間反応させた。その後、反応溶液に反応停止液として0.5N HClを125 μL加えたのち、酢酸エチル 700 μLを加え攪拌した。遠心分離 (1,200×G, 5分) し、上層部 (酢酸エチル層) 500 μLを試験管にとり、濃縮遠心機に20分間かけた。乾固物に1.0mLの蒸留水を加え、この溶液の紫外部吸光度 (228nm) を測定し、溶液中の遊離馬尿酸量を測定した。対照には試料の代わりに未発酵調製肉抽出液あるいは蒸留水を用いた。ブランクには対照にあらかじめ0.5N HCl 125 μLを加えたものをを用いた。

阻害活性 (%) は以下の計算式で求めた。

阻害活性 (%) = (Ec - Es) / (Ec - Eb) × 100
Es, EcおよびEbはそれぞれ試料, 対照およびブランクのOD₂₂₈を示す。

2.7 ACE阻害ペプチドの粗精製

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

試料を逆相液体クロマトグラフィー (L-6200 システム, HITACHI) に供した。カラムはTSKgel ODS-100V (東ソー) を用い、流速1.0 mL/min, 吸光波長215nmで測定した。移動相には0.05% TFA水溶液を用い、0.05% TFAアセトニトリル溶液でグラジエントをかけた。5分毎に分画し、集めた画分を凍結乾燥したのち水に溶解し、ACE阻害活性を測定した。ACE阻害活性を示した画分を上記の条件で再び分画した。ACE阻害活性を示した画分は、同HPLCシステムとサイズ排除カラム (Superdex Peptide HR 10/300 GL) を用いて分画し、ACE阻害活性を示す画分を再び上記の逆相液体クロマトグラフィーに供し、同条件で分画した。

3. 結果と考察

3.1 各種消化液に対する耐性

Lactobacillus plantarum JAB2001 は oxgall を0.3%含む培地における生育率が41%と高い値を示した。また、本菌株のoxgallに対する最小生育阻止濃度は20%であった。

消化管を生きて通過することが求められるプロバイオティクス乳酸菌にとって、胆汁酸に耐性を有する事は必要不可欠である。胆汁酸は十二指腸において分泌され、界面活性効果を有するため細

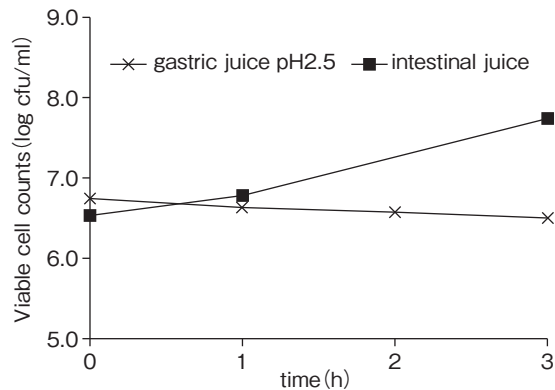


Figure 1 Viable cell counts of *L. plantarum* JAB2001 in simulated gastric juice (pH2.5) and intestinal juice.

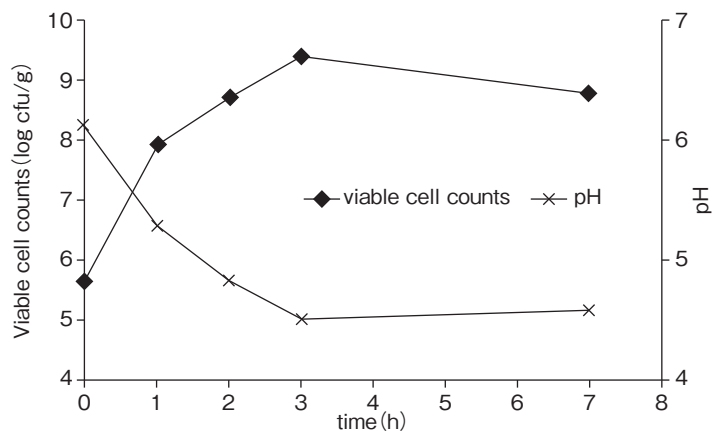


Figure 2 pH values and viable cell counts of *L. plantarum* JAB2001 in the fermented meat patty.

菌の細胞膜を構成する脂質を分解し、殺菌作用を示す。胆汁酸の濃度は食後一時間程度は約2%程度であるが、その後0.3%程度まで低下する¹⁹⁾。本菌株はoxgallが20%でも生育できるため、生きて腸管を通過する可能性が高い。

人工胃液および人工腸液に対する耐性試験の結果を示した。本菌株はpH2.5に調整した人工胃液に3時間晒されても菌数の減少は見られなかった。また、人工腸液中では生育性を示し、菌数は増加した (Figure 1)。

胃液のpHは通常時は約1程度であるが、食後には約3程度にまで上昇する。また、食事成分が胃を通過するには2～4時間程度かかるとされる²⁰⁾。

このことから、pH2.5に調整した人工胃液中で3時間後まで菌数を維持できた本菌株は、経口接種後生きて消化管を通過し、腸液中で生育することができると考えられる。

3.2 食肉の発酵試験

食肉を本菌株で発酵した時のpHおよび生菌数を測定した。食肉のpHは48時間発酵後に4.8程度まで減少しその後ほぼ一定を保った。このときの生菌数は約9 log cfu/gであった。生菌数測定の為に用いた平板培地上の集落を無作為に釣菌し単離したのち、それぞれの生理学的諸性質を調べた結果、いずれも *L. plantarum* JAB2001と同等であった。また、培養時間が進むにつれ平板状に形

Table 2 ACE inhibitory activities of 7 fractions after reverse-phase HPLC, size-exclusion HPLC and reverse-phase HPLC

Fraction*	ACE Inhibitory activity (%)
1	ND*
2	ND
3	ND
4	ND
5	ND
6	ND
7	61.2
8	ND

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

状の異なる集落が現れたが、これらは食肉由来の乳酸菌と考えられた (Figure 2)。

発酵食肉製品における乳酸菌の主な働きの一つは乳酸の生成である。酸度は肉の硬さや色調に大きな影響をおよぼす。すなわち、筋タンパクの結着やニトロソミオグロビンの発色は低pHで進むとされる⁴⁾。ただし、酸度が高すぎる場合には肉のテクスチャーはむしろ悪化し、色調も劣化してくる。そのため、最適なpHはおおよそ5.0付近と考えられる。実際、種々の発酵食肉製品を官能評価した際にpH5.0の製品が最も評価が高いという報告がある²¹⁾。本菌株を用いた場合、およそ36時間でpH5.0に達することができた。これはイタリアンサラミなどの発酵食肉製品と同等の発酵時間²¹⁾であるため、本菌株は発酵食肉製品への応用性が高いと考えられる。

3.3 ACE阻害ペプチドの精製

JAB2001株で調製した発酵食肉製品の抽出液を逆相HPLCに供し、高いACE阻害活性を示した画分をサイズ排除カラムに供試し、最後に再び逆相HPLCに供し、高いACE阻害活性を示した画分をアミノ酸配列解析に供した (Table 2)。その結果、画分7において最も高いACE阻害活性が確認できた。この画分7に含まれるACE阻害ペ

プチドの分子量は、サイズ排除HPLCの結果から300–1,000と推測された。また、現在アミノ酸配列を解析しており、3残基目までの配列がGlu-Lys-Glnである結果を得ている。ちなみに3残基目までの配列でペプチド合成したものではACE阻害活性が見られなかった。

4. 要 約

本研究では鮎ずし由来乳酸菌を応用した機能性発酵食肉製品について検討した。*Lactobacillus plantarum* JAB2001は牛挽肉のパティ中で生育することができ、25℃で36時間培養したときのpHは5.0であった。本菌株は各種消化液に対して耐性を示したため、この菌株で調製した発酵食肉製品を経口摂取した場合、生きて腸内に届き宿主に有益な影響を与えることが期待できる。また、この発酵食肉製品の抽出液はACE阻害活性を示したため、HPLCを用いて阻害ペプチドを単離精製を試みた。このペプチドの詳細なアミノ酸配列は不明であるが、おそらく修飾アミノ酸を含んでいると考えられた。今後はこのペプチドのアミノ酸配列をより詳細に解析していく予定である。

文 献

- 1) Fuller R. : Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.*, **66**, 365–378, 1989.
- 2) FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. London, Ontario, Canada, 2002.
- 3) Pennacchia C., Vaughan E. E. and Villani F. : Potential probiotic *Lactobacillus* strains from fermented sausages: Further investigations on their probiotic properties. *Meat Sci.*, **73**, 90–101, 2006.
- 4) Ammor M. S. and Mayo B. : Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.*, **76**, 138–146, 2007.
- 5) Ruiz-Moyano S., Martin A., Benito M. J., Nevado F. P. and Cordoba M. G. : Screening of lactic acid

- bacteria and bifidobacteria for potential probiotic use in Iberian dry fermented sausages. *Meat Sci.*, **80**, 715~721, 2008.
- 6) De Vuyst L., Falony G. and Leroy F. : Probiotics in fermented sausages. *Meat Sci.*, **80**, 75~78, 2008.
- 7) 森田英利 : 発酵食肉製品における細菌の有用性, 食肉の科学, **38**, 189~203, 1997.
- 8) Sameshima T., Magome C., Takeshita K., Arihara K., Itoh M. Kondo Y. : Effect of intestinal *Lactobacillus* starter cultures on the behavior of *Staphylococcus aureus* in fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.*, **41**, 1~7, 1998.
- 9) Erkkilä S., Suihko M. L., Eerola S., Petäjä E. Mattila-Sandholm T. : Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, **64**, 205~210, 2001.
- 10) Pidcock K., Heard G. M. and Henriksson A. : Application of nontraditional meat starter cultures in production of Hungarian salami. *Int. J. Food Microbiol.*, **76**, 75~81, 2002.
- 11) 藤井建夫, 西 忠嗣, 奥積昌世 : ふなずしの化学成分と微生物相, 山脇学園短期大学紀要, **46**, 90~103, 2008.
- 12) Kubo K.M., Ogawa Y. and Horikoshi M. : The effects of free amino acids, nucleic compounds, and volatile constituents of funazushi (fermented sushi of crucian carp (*Cyprinus auratus*)) on preference. *J. Sci. Food Agric.*, **88**, 1259~1265, 2008.
- 13) An C., Takahashi H., Kimura B. and Kuda T. : Comparison of PCR-DGGE and PCR-SSCP analysis for bacterial flora of Japanese traditional fermented fish products, aji-narezushi and iwashi-nukazuke. *J. Sci. Food Agric.*, **90**, 1796~1801, 2010.
- 14) Tsuda H., Kubota K., Matsumoto T. Ishimi Y. : Isolation and identification of lactic acid bacteria in traditional fermented sushi, Funazushi, from Japan. *Food Sci. Technol. Res.*, **18**, 77~82, 2012.
- 15) Walker D. K. Gilliland S. E. : Relationships among bile tolerance, bile salt deconjugation, and assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Dairy Sci.*, **76**, 956~961, 1993.
- 16) Takiguchi R., Mochizuki E., Suzuki Y., Nakajima I., Benno Y. : Inhibitory effects of *Lactobacillus acidophilus* SBT2062 and *Bifidobacterium longum* SBT2928 on harmful intestinal bacteria. *J. Intest. Microbiol.*, **11**, 11~17, 1997.
- 17) 中江利孝, 片岡 啓, 宮本 拓 : 発酵ひき肉製品の製造と生化学的性状に関する研究, 食肉に関する助成研究調査成果報告書, **5**, 298~304, 1986.
- 18) Cushman D. W. and Cheung H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharmacol.*, **20**, 1637~1648, 1971.
- 19) Noriega L., Gueimonde, M., Sanchez, B., Margolles A., Reyes-Gavilan, C. G. : Effect of the adaptation to high bile salts concentrations on glycosidic activity, survival at low pH and cross-resistance to bile salts in *Bifidobacterium*. *Int. J. Food Microbiol.*, **92**, 79~86, 2004.
- 20) Pennacchia C., Ercolini D., Blaiotta G., Pepe O., Mauriello G. Villani F. : Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. *Meat Sci.*, **67**, 309~317, 2004.
- 21) 沼田正寛 : 発酵食肉製品, 食肉の科学, **35**, 171~180, 1994.

食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子 の解明と電解水処理による殺菌法の確立

Elucidating the factors influencing the invasion to the meat inside
by food poisoning bacteria and antimicrobiological effect and
application of electrolyzed water

島 村 裕 子・増 田 修 一

(静岡県立大学食品栄養科学部)

Yuko Shimamura and Shuichi Masuda

(School of Food and Nutritional Sciences, University of Shizuoka)

Elucidating the factors influencing the invasion of food poisoning bacteria to the meat inside by and antimicrobial effect of combination treatment with alkaline electrolyzed water (AIEW) and strong acidic electrolyzed water (StAEW) on fresh chicken breast meat and beef liver were evaluated in this study. When bacteria attached to the upper surface site of the meat for 1h at room temperature, bacteria invaded internal 1 cm regardless of fiber direction of the meat. Similarly, when bacteria attached to the lower or side surface site of the meat, bacteria invaded internal 1 cm regardless of fiber direction of the meat. Although in the beef liver samples with the thin skin, bacteria did not invade in more than 1 cm, bacteria could invade liver without the thin skin from the upper surface site to 2 cm. These results suggested that the invasion of bacteria is involved in not only the structure of the meat but also the gravity and gravy of the meat. Next, meat samples (each of 1 ~ 10 g) were experimentally inoculated with bacteria, and subjected to dipping combination treatment (20°C for 3 min) with AIEW and StAEW. Dipping combination treatment with alkaline and acidic electrolyzed water significantly reduced the pathogens compared to untreated controls. The reduction of about 1 log CFU/g was achieved by combination treatment. From these results, combination treatments extended the shelf life of chicken meat and beef at 4°C with marginal changes of sensory quality. In the future, we should find more effective washing methods to control microbial pathogens in meat.

1. 目 的

2011年、ユッケで起きた腸管出血性大腸菌 O-111による集団食中毒事件を機に、消費者の食肉の安全性に対する不安が高まっている。食肉に関しては、現在も有効な殺菌方法が確立されてお

らず、大量の食肉に適応できる殺菌技術の確立は緊急課題となっている。野菜類の微生物制御に関して、2002年に微酸性電解水が食品添加物に認定されており、微生物制御に使用されている¹⁾。しかし、酸性電解水は材料中の有機物の存在により殺菌効果が弱まる、また洗浄に使用する装置の金

属が腐食する等の問題点があることから、食肉に対して酸性電解水を使用した具体的な洗浄・殺菌技術に関する研究はほとんど行われていない。また、食肉の食中毒菌における汚染において、食中毒菌が単に表面に付着しているだけでなく、食肉内部にまで侵入した場合、洗浄や表面の加熱のみでは、除去・除菌できない可能性がある。そのため、食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子について明らかにすることは、汚染防御を考える上で重要である。影響する因子としては、食中毒菌の濃度、菌株の種類、食肉の種類や鮮度、温度などが考えられるが、これらに関する知見は少ない。また、食肉に対する微生物の付着機構としては、食肉に含まれる細胞外マトリックスタンパク質（コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン等）に微生物が付着することが報告されている^{2,3)}が、実際の食肉を用いた研究報告は少なく、いまだ不明な点が多い。そこで、本研究では、食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明、アルカリ性・酸性電解水併用処理を用いた食肉の新規殺菌法の確立、電解水併用処理後の食肉の品質評価の3項目について検討し、効果的な食肉の殺菌方法を見出すとともに、と畜後の枝肉の殺菌に適応できる新規技術の確立を目的とした。

2. 方 法

2.1 食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明

切断面の繊維の方向が垂直または平行の鶏むね肉、および薄皮あり、またはなしの牛レバー（縦3 cm×横3 cm×高さ6 cm）の上部表面、側部表面、下部表面（表面積9 cm²）に *Staphylococcus aureus* C-29, *Salmonella enteritidis* NBRC3313 および *Escherichia coli* JCM2449を各々浸み込ませたペーパーディスク（10³～10⁴CFU/100 μL）を置き、室温で5分、

1時間放置した。放置後、汚染面表面、①表面から1 cm、②表面から1～2 cm、③表面から2～4 cm、④表面から4～6 cmに切り分け、各々の部位の菌数を測定した。

2.2 電解水を用いた洗浄・殺菌方法の最適条件の検討

牛レバー、鶏むね肉各10 gに各種食中毒菌を10³～10⁴CFU/gとなるように接種し、100 mLのアルカリ性電解水（ガイアウォーター（株）；ガイア、pH11.5, 20±5℃）に3分間浸漬して表面の有機物を除去した。次いで100 mLの酸性電解水（ガイアウォーター（株）；ACC14±1.5 mg/L, ORP=960±5 mV, pH2.5, 20±5℃）で中和後、さらに100 mLの酸性電解水に3分間浸漬して殺菌処理を行い、100 mLのアルカリ性電解水で中和処理を行った。殺菌処理後、菌を接種した食肉の菌数を測定した。

2.3 各種機器分析による食肉の評価

菌未接種の食肉（鶏むね肉、牛もも肉、牛レバー）を2.1と同様に電解水で処理して4℃で0～7日間保存し、各種機器分析および官能検査を用いて品質を評価した。電解水と同様の処理を滅菌水で行った生肉をコントロールとした。

（1）肉色の測定

肉色の色差の測定は、色差計CR-300（ミノルタ）を使用した。

（2）pH測定

各生肉サンプル5 gに滅菌水45 mLを加え、ミキサーで1分間ホモジナイズした。ホモジナイズ後、2,000×gで20分間遠心分離し、上清の溶液のpHをpHメーター（pH METER F-21; HORIBA）により測定した。

（3）食肉中の脂質酸化度の測定

各生肉サンプル10 gに10%（w/v）トリクロロ酢酸溶液20 mLを加えミキサーで1分間ホモジナイズし、2,300×g、30分間、5℃で遠心分離を行

い、上清をろ過した。ろ液から2 mL採取して20 mMチオバルビツール酸溶液2 mLを加え、混合した後、97°Cの温浴中で20分間加熱した。室温で冷却した後、分光光度計を用いて波長532 nmで測定した。

(4) 遊離アミノ酸組成分析

各生肉サンプル10 gに2 %スルホサリチル酸40 mLを加え、1分間ホモジナイズし、3,000×gで10分間遠心分離を行い、中間層をさらに10,000×gで遠心分離して得られる透明層を試料とした。分析はAmino Acid Analyzer L-8900（日立ハイテクノロジーズ）を用い、カラムは#2622SC-PF（φ4.6 mm x 80 mm；日立ハイテクノロジーズ）で分析した。

2.4 官能検査による食肉の評価

各生肉サンプルについて、9名をパネルとした2点嗜好試験法（両側検定）による官能検査を行った。パネルの内訳は20代男性1名、20代女性5名、30代女性1名、40代女性1名および40代男性1名である。各パネルには、電解水処理肉と未

処理肉（対照区）があることを説明した。それぞれの食肉を対照区と区別して、各評価項目について、優れているか、もしくは劣っているかを5段階評価でアンケート用紙に従い選択してもらった。評価項目は、鮮度、硬さ、腐敗度、臭気、総合評価の5項目で、未処理肉（対照区）と比較して、とても良い（とても硬い）：5点、良い（硬い）：4点、普通：3点、悪い（柔らかい）：2点、とても悪い（とても柔らかい）：1点とした。コントロールは各項目一律3点と指定して、評価してもらった。サンプルを評価する順序はパネルに一任した。

2.5 統計処理

データは各群の平均値および標準偏差を算出し、両群間で等分散性の検定（F検定）を行い、等分散の場合はStudentのT検定、不等分散の場合はAspin-Welchの検定により統計学的有意差検定を行った。なお、有意水準は5 %とし、片側検定で実施した。

Table 1 Elucidating the factors influencing the invasion of food poisoning bacteria to the chicken breast meat inside.

Vertical direction	Bacterial strains	Control	Surface	Surface ~ 1 cm	1 cm ~ 2 cm	2 cm ~ 4 cm	4 cm ~ 6 cm
5 min	<i>S. aureus</i>	$9.0 \times 10^5 \pm 119.0$	$5.9 \times 10^3 \pm 175.4$	$7.0 \times 10^2 \pm 11.4$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$6.1 \times 10^5 \pm 233.5$	$3.4 \times 10^3 \pm 189.0$	$3.2 \times 10^3 \pm 88.6$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$8.2 \times 10^5 \pm 83.0$	$3.7 \times 10^3 \pm 73.6$	$3.6 \times 10^3 \pm 19.0$	>10	>10	>10
1 h	<i>S. aureus</i>	$2.7 \times 10^5 \pm 44.8$	$1.9 \times 10^3 \pm 72.5$	$5.2 \times 10^2 \pm 12.6$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$6.7 \times 10^5 \pm 177.0$	$3.3 \times 10^3 \pm 142.7$	$5.0 \times 10^3 \pm 227.1$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$1.1 \times 10^6 \pm 155.5$	$3.5 \times 10^3 \pm 131.4$	$5.2 \times 10^3 \pm 166.2$	>10	>10	>10
Horizontal direction	Bacterial strains	Control	Surface	Surface ~ 1 cm	1 cm ~ 2 cm	2 cm ~ 4 cm	4 cm ~ 6 cm
5 min	<i>S. aureus</i>	$9.0 \times 10^5 \pm 119.0$	$6.1 \times 10^3 \pm 116.7$	$8.4 \times 10^2 \pm 29.5$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$6.1 \times 10^5 \pm 233.5$	$3.0 \times 10^3 \pm 225.0$	$3.2 \times 10^3 \pm 102.7$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$8.7 \times 10^5 \pm 10.0$	$8.2 \times 10^3 \pm 83.0$	$3.5 \times 10^3 \pm 136.2$	>10	>10	>10
1 h	<i>S. aureus</i>	$2.9 \times 10^5 \pm 41.3$	$1.2 \times 10^3 \pm 10.6$	$1.2 \times 10^3 \pm 98.7$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$5.1 \times 10^5 \pm 64.4$	$2.2 \times 10^3 \pm 42.5$	$2.2 \times 10^3 \pm 94.8$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$1.5 \times 10^6 \pm 298.2$	$9.2 \times 10^3 \pm 145.7$	$5.2 \times 10^3 \pm 69.9$	>10	>10	>10

Values represent the mean $\pm$ SD for six independent experiments.

Table 2 Elucidating the factors influencing the invasion of food poisoning bacteria to the beef liver inside.

Vertical direction	Bacterial strains	Control	Surface	Surface~ 1 cm	1 cm~ 2 cm	2 cm~ 4 cm	4 cm~ 6 cm
5 min	<i>S. aureus</i>	$5.7 \times 10^5 \pm 49.2$	$4.8 \times 10^3 \pm 239.3$	$5.4 \times 10^2 \pm 7.9$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$3.5 \times 10^5 \pm 181.6$	$3.3 \times 10^3 \pm 64.3$	$9.2 \times 10^2 \pm 14.9$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$6.9 \times 10^5 \pm 178.0$	$5.8 \times 10^3 \pm 169.1$	$1.7 \times 10^3 \pm 143.7$	>10	>10	>10
1 h	<i>S. aureus</i>	$7.5 \times 10^5 \pm 486.5$	$7.0 \times 10^3 \pm 358.4$	$3.2 \times 10^2 \pm 11.4$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$7.4 \times 10^5 \pm 543.5$	$2.1 \times 10^3 \pm 46.9$	$2.1 \times 10^2 \pm 22.3$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$1.1 \times 10^6 \pm 480.7$	$7.5 \times 10^3 \pm 342.0$	$6.9 \times 10^2 \pm 13.8$	>10	>10	>10
Horizontal direction	Bacterial strains	Control	Surface	Surface~ 1 cm	1 cm~ 2 cm	2 cm~ 4 cm	4 cm~ 6 cm
5 min	<i>S. aureus</i>	$5.7 \times 10^5 \pm 49.2$	$5.0 \times 10^3 \pm 266.8$	$5.8 \times 10^2 \pm 9.6$	>10	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$3.5 \times 10^5 \pm 181.6$	$3.0 \times 10^3 \pm 123.0$	$1.3 \times 10^3 \pm 20.5$	>10	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$6.9 \times 10^5 \pm 178.0$	$3.8 \times 10^3 \pm 215.4$	$5.1 \times 10^3 \pm 35.5$	$1.3 \times 10^3 \pm 56.3$	>10	>10
1 h	<i>S. aureus</i>	$6.5 \times 10^5 \pm 293.6$	$3.7 \times 10^3 \pm 319.8$	$1.5 \times 10^3 \pm 40.7$	$1.3 \times 10^2 \pm 15.3$	>10	>10
	<i>Sa. Enteritidis</i>	$8.3 \times 10^5 \pm 450.7$	$2.6 \times 10^3 \pm 143.3$	$3.3 \times 10^3 \pm 263.7$	$7.1 \times 10^2 \pm 16.5$	>10	>10
	<i>E. coli</i>	$9.9 \times 10^5 \pm 593.8$	$4.4 \times 10^3 \pm 194.5$	$2.2 \times 10^3 \pm 139.1$	$1.5 \times 10^2 \pm 2.94$	>10	>10

Values represent the mean $\pm$ SD for six independent experiments.

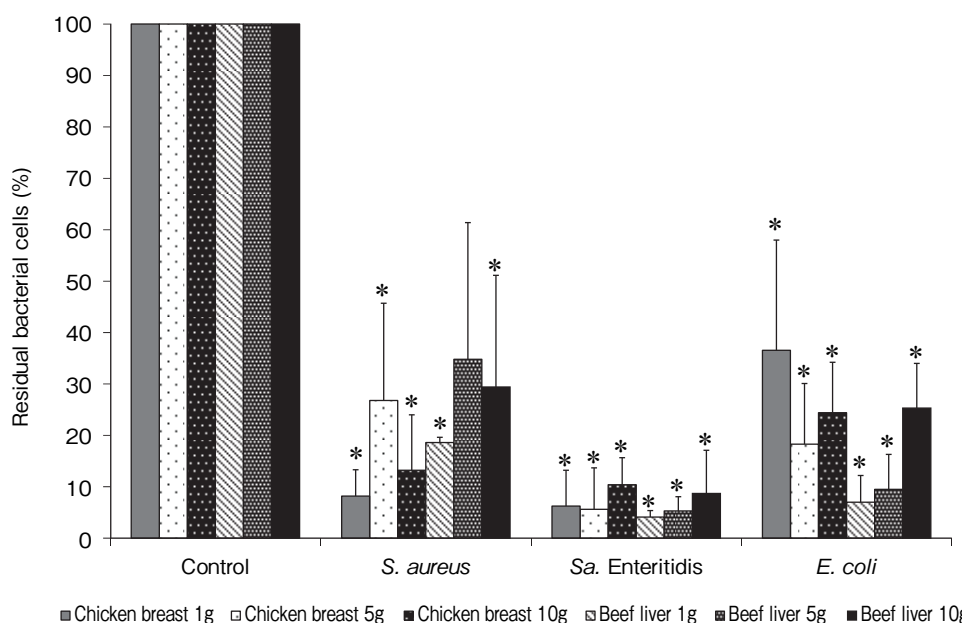


Fig.1 Effect of combination treatment with alkaline and acidic electrolyzed water on sterilization and quality of meat. Values represent the mean $\pm$ SD for six independent experiments. *represents $p < 0.05$, compared to control.

3. 結果と考察

3.1 食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明

線維が平行または垂直に走っている鶏むね肉の上部表面に菌を付着させた場合、5分または1時間ともに内部1 cmまでの侵入に留まった (Table 1)。牛レバーでは、薄皮が付いた面に菌を付着

させた場合、すべての付着時間において、菌は表面～1 cmまでの断片に留まった。一方、薄皮が付いていない面に菌を付着させた場合、5分間では菌は1 cmまでの断片に留まったが、1時間では、上部表面～2 cmまで内部に侵入した (Table 2)。また、食肉の下部または側部表面に菌を付着させた場合、いずれの試料においても菌付着面から内部1 cmまでの断片に菌が留まった。食肉の下部または側部表面に菌を付着させた場合、線維の方向に関係なく、1 cmまでの断片に留まったことから、菌の侵入は、線維の方向だけでなく、重力や肉汁等の物理的要因も関与していることが示唆された。

3.2 電解水を用いた洗浄・殺菌方法の最適条件の検討

電解水併用処理により、各食肉ともに 10^1 CFU/gオーダーの菌数減少が認められ、平均菌減少率は約7～8割程度を示し、電解水併用処理は効果的な殺菌方法であることが明らかとなった (Fig. 1)。しかし、電解水併用処理を行った食肉でも、3～4 log CFU/gの菌が残存しており、肉の表面に存在する脂肪やタンパク質等の有機物が殺菌効果に影響していると考えられた。また、食中毒菌の種類の違いによる影響は認められなかった。今後、さらに電解水併用処理における攪拌方法や温度を変更し、より効果的な殺菌方法を検討してい

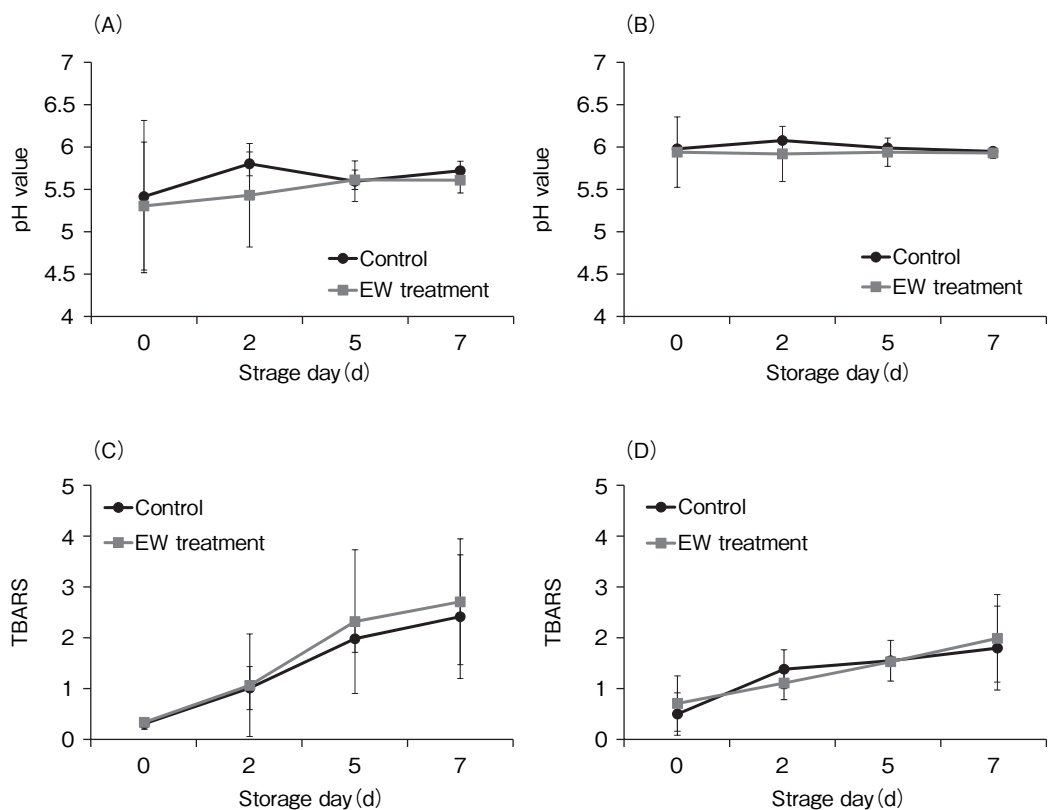


Fig.2 Changes in pH of treated and untreated chicken breast meat (A) and beef liver (B) samples during storage at refrigeration temperature (4°C). Changes in TBARS of treated and untreated chicken breast meat (C) and beef liver (D) samples during storage at refrigeration temperature (4°C). Electrolyzed water (EW) treatment solutions were alkaline electrolyzed water and strong acidic electrolyzed water. Values represent the mean $\pm$ SD for six independent experiments. *represents $p < 0.05$, compared to control.

く必要がある。

3.3 各種機器分析による食肉の評価

色差計を用いた肉色の測定では、電解水併用処理後の鶏むね肉でL*値が有意に高くなったが、その他の肉においては、有意差は認められなかった。電解水併用処理後の各食肉のpH (Fig. 2 (A), (B)), 脂質酸化度 (Fig. 2 (C), (D)) および遊離アミノ酸含有量に有意差は認められなかった。電解水併用処理後の各食肉の硬さは、有意に硬いと評価されたが、鮮度、臭気、総合評価等に有意差は認められなかった (Table 3)。以上の結果より、電解水併用処理により、表面に付着した食中毒菌を殺菌可能であり、食肉の品質劣化は認められないことを明らかにした。

4. 要 約

食肉の安全性を確保し、チルドパックされた食肉のシェルフライフを延長するためには、微生物の制御が不可欠である。本研究では、食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明、アルカリ性・酸性電解水併用処理を用いた食肉の新規殺菌法の確立、電解水併用処理後の食肉の品質評価の3項目

について検討し、効果的な食肉の殺菌方法を見出すとともに、と畜後の枝肉の殺菌に適応できる新規技術の確立を目的とした。

食肉の上部表面に菌を付着させ、1時間放置した場合、食肉の線維の方向 (平行、垂直) に関係なく、内部1 cm以上侵入しなかった。また、薄皮ありの牛レバーでは内部1 cm以上侵入しなかったのに対し、薄皮なしの牛レバーでは、上部表面～2 cmまで内部に侵入した。さらに、食肉の下部または側部表面に菌を付着させた場合、線維の方向に関係なく、内部1 cmまでの侵入に留まったことから、菌の侵入は食肉の構造だけでなく、重力や肉汁等の物理的要因も関与していることが示唆された。アルカリ性および酸性電解水併用処理による食肉の殺菌効果を検討したところ、すべての試料で1 log CFU/g以上の菌数減少が認められた。さらに、電解水併用処理後の食肉の品質を評価したところ、いずれの項目においても食肉の劣化は認められず、電解水併用処理は、食肉の殺菌に実用可能であることが明らかとなった。本研究では、食中毒菌の食肉への付着・侵入機構を明らかにすることで、アルカリ性および酸性電

Table 3 Sensory evaluation of chicken breast meat and beef liver treated with electrolyzed water (EW) during storage at 4°C.

Sensory attributes		Chicken breast meat				Beef liver			
		0 day	2 days	5 days	7 days	0 day	2 days	5 days	7 days
Freshness	Control	2.9±0.4	2.9±1.1	3.0±0.7	2.9±0.3	3.0±0.3	3.0±0.7	3.0±1.0	3.2±0.5
	EW treatment	3.0±0.9	2.9±0.8	2.9±0.7	2.6±0.8	3.0±0.0	3.0±0.8	3.0±0.9	2.7±0.8
Texture	Control	2.9±0.9	2.8±0.7	3.1±0.9	3.2±0.7	2.9±0.5	2.9±0.7	2.9±0.7	3.0±0.5
	EW treatment	3.5±1.1	3.4±1.0*	3.6±0.8*	3.5±1.0	3.5±0.8*	3.5±0.8*	3.8±0.8*	3.5±0.7*
Decay	Control	3.0±0.0	3.1±0.8	3.0±0.5	2.9±0.4	3.0±0.0	3.1±0.8	3.1±0.9	3.3±0.7
	EW treatment	3.3±0.6	3.1±0.6	3.0±0.6	2.8±0.8*	3.1±0.2	3.3±0.8	2.6±0.7	2.9±0.8
Odor	Control	3.0±0.5	3.0±0.5	2.9±0.7	2.9±0.4	3.0±0.8	2.9±0.4	3.0±0.8	3.1±0.3
	EW treatment	2.9±0.6	3.0±0.4	2.8±0.4	2.7±0.6	2.9±0.8	2.8±0.6	2.8±0.6	2.9±0.5
Overall	Control	3.0±0.5	3.0±0.8	3.0±0.6	3.0±0.5	3.0±0.3	3.0±0.7	3.0±0.9	3.2±0.5
	EW treatment	3.2±0.9	3.2±0.8	2.9±0.7*	3.0±0.7	3.0±0.6	3.2±0.9	2.9±0.6	2.9±0.9

Sensory attributes (scores) reported as mean ± standard deviation, n = 2 × 3. *represents $p < 0.05$, compared to control. Sensory scores were based on 5-point descriptive scale, where 1 = poor, 2 = fair, 3 = good, 4 = very good, and 5 = excellent.

解水併用処理を用いた効果的な微生物制御法を見出すとともに、その有効性を明らかにした。今後、電解水併用処理を用いた更なる殺菌効果の向上を検討することで、と畜後の枝肉に適応できる実用スケールの殺菌・洗浄装置が開発されることが期待される。

文 献

- 1) Rahman SM, Ding T, Oh DH. : Effectiveness of low concentration electrolyzed water to inactivate foodborne pathogens under different environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.* , **139**, 147~153, 2010.
- 2) Zulfakar SS, White JD, Ross T, Tamplin ML. : Bacterial attachment to immobilized extracellular matrix proteins *in vitro*. *Int. J. Food Microbiol.* , **157**, 210~217, 2012.
- 3) Zulfakar SS, White JD, Ross T, Tamplin ML : Cultured C₂Cl₂ cell lines as a model for assessment of bacterial attachment to bovine primary muscle cells. *Meat science*, **94**, 215~219, 2013.

食肉製品の客観的嗜好性評価に関する研究（第2報）

Research on the objective evaluation for palatability of meat products (II)

芳賀 聖一・林 利哉・山口 恭平・小川 幸彦*

(名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場)

Seiichi Haga, Toshiya Hayashi, Kyohei Yamaguchi and Yukihiro Ogawa*

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

Evaluation of texture is essential criteria in developing and improving food products. Sensory evaluation and instrumental measurements are normally used in research for food palatability. However, understanding of the relationship between instrumental analysis and sensory analysis is inadequate. In the previous study, we tried to elucidate the correlation between sensory and instrumental parameters obtained from several kinds of model pork sausages, and established texture prediction formula which can speculate palatability from the objective values resulting in instrumental measurements by using multiple regression analysis over the whole parameters. If the formula can express organoleptic evaluation value, it will be very useful for not only food texture research but also food manufacturer.

In the present study, we tried to verify the usefulness of the prediction equation by using instrumental parameters obtained from several kinds of model pork sausages with lactic acid fermentation (2 strains of *Lactobacillus sakei*) and/or with additive (20% pork fat).

The effects of fermentation on the cohesiveness and cooking loss of model pork sausage were analyzed. As a result, both fermented model sausages had significantly lower cohesiveness compared with control sausage ($p < 0.05$), and cooking loss of fermented sausages was considerably and significantly higher than those of control sausage ($p < 0.05$).

The cooking loss was markedly improved by adding fat (20 %) to the fermented sausages. Then we tried to estimate the palatability from the objective values by using the texture prediction formula. Subsequently, the organoleptic evaluation values of the fermented sausages with 20% fat were estimated as higher than that of fermented sausages without fat.

Therefore, it is supported that this formula can presume organoleptic evaluation value from objective data obtained from instrumental measurements.

1. 目 的

著者らはこれまで、食肉加工に関わる様々な加工技術、すなわち乳酸発酵、レトルト加熱、凍結処理等の有用技術が食肉の加工特性に及ぼす影響

について多面的に追究してきた^{1~3)}。その結果、様々な食肉製品が有する特徴的な機能特性が、その組織構造に支配されていることに加え、食感に関わる種々の物性値が構造に基づく視覚的情報によって客観的かつ定量的に説明可能であること等

を見出している^{1, 2)}。

一般に食品のおいしさ評価は官能評価によって行われているが、あくまで個人差を伴う主観的な評価であるため、より客観性を有する評価の確立が求められている⁴⁾。特に食感は、食肉製品において重要な特性の一つであるが、一方で客観的評価がより困難な特性でもある。食感は食品がもつ物性と関連深いとされており、機器測定による客観的物性値で、主観的な官能評価値を表現することができれば、官能評価に頼らずとも嗜好性を推定できる極めて有益な手段となりえる。著者らは前報⁵⁾にて報告した通り、機器測定による物性値と、人による官能評価特性との関連性を明らかにするため、低温乳酸発酵処理を含む種々の加工処理を施した十数種類のモデルソーセージを作製し、これらの物性測定および官能評価を実際に行い、両者の相関性について詳細に検討した上で、重回帰分析により機器測定で得られた物性値から、人による官能評価値を推定しうる有意な推定式を作成するに至っている。

そこで本研究では、前報にて見出した推定式の有用性を検証するため、保水性等の低下を示す発酵モデルソーセージと、物性改良材としての脂肪を添加した高脂肪モデルソーセージを作製し、機器を用いた客観的評価と、その数値と推定式を活用した官能評価推定値を求め、比較検討を行った。

2. 方 法

2.1 モデルソーセージの調製

と殺後3日以内の豚モモ肉の脂肪および結合組織をできるだけ取り除き、約3 cm角のブロック肉に細切した。これに塩漬剤（2.0% NaCl, 0.3% トリポリリン酸Na, 0.02% NaNO₂, 0.05% KNO₃, 0.05% アスコルビン酸Na）、2.0% グルコースの添加および加水（碎水：5%）を行い、60秒間カッティングした後、低温下（4℃）で3日間

塩漬した。低温発酵処理区においてはこの塩漬剤添加の際に各乳酸菌スターターを添加し、低温下（4℃）にて5日間塩漬および発酵させた。塩漬後、スタッファーにて充填（ポリ塩化ビニリデンケーシング、折径：40mm）を行い、75℃恒温槽で中心部温度が63℃に達してから30分間加熱し、加熱後直ちに氷冷した。なお、発酵区については当研究室で保有する低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei* D-1001, No. 2（以下、それぞれD-1001, No. 2と略す）をそれぞれ10⁶ CFU/g肉となるように接種した。

また、物性改良の目的で、カッティング時間を200秒とした以外は同じ要領で20%脂肪添加ソーセージを作製し、さらに同乳酸菌株による20%脂肪を含む発酵ソーセージも作製した。

2.2 モデルソーセージの機器測定と官能評価

物性測定はレオナー（RE2-33005S、株式会社山電）を用いてテクスチャー測定を行い、凝集性を求めた。またこれに加えて、加熱損失率（クッキングロス）も測定した。

官能評価は前報⁵⁾記載の通り、本学学生を対象に嗜好型官能評価を実施した。評価項目は、「断面の色調」、「断面のきめ」、「断面の光沢」、「歯ごたえ」、「ジューシーさ」および「総合評価」の6項目とし、評価方法は基準試料（control）と比べてそれぞれ「好き」か「嫌い」かの、嗜好型で評価する7点尺度法を用いた。評価基準は基準試料（control）を「0」とし、「-3」から「+3」の7段階で実施した。

2.3 データの標準数値化と統計解析

前報記載の通り、controlの値を常に「50」として、各処理区における測定値を「0～100」で表すことで官能評価値、機器測定値のすべてを標準数値化した。

標準数値化した数値を用いて、官能評価値と客観的評価値間の単相関分析を行い、単相関係数の

Table 1 Comparison in the instrumental parameters of various model pork sausages.

	control			D-1001		No. 2		20% fat		20% fat & D-1001		20% fat & No. 2	
cohesiveness	0.38±0.02	a		0.14±0.08	b	0.17±0.10	b	0.37±0.02	a	0.37±0.06	a	0.38±0.05	a
cooking loss (%)	2.79±1.40	a		10.5±1.78	b	13.2±5.10	b	1.29±0.78	c	3.70±1.50	d	4.93±0.86	e

Values in same row with the same letters are not significantly different ($p < 0.05$).

control : 75°C-heated sausage, D-1001 and No.2: fermented sausages with *Lactobacillus sakei* D-1001 and No.2, respectively.

20% fat: high fat sausage

値が高いものを選択し、変数増加型による重回帰分析を行うことで重回帰式を求めた。得られた重回帰式を用いて主観的評価の推定を試みた。なお、統計処理には、Excel多変量解析 (Ver. 3.0, 株式会社エスミ) を用いた⁵⁾。

3. 結果と考察

前報において、人による「断面のきめ」、「歯ごたえ」、「ジューシーさ」、「総合評価」等の官能評価値と、テクスチャー測定や保水性等の機器による客観的評価値の間に高い相関性があること、またそれをもとにした重回帰分析により、「断面のきめ」、「歯ごたえ」、「ジューシーさ」および「総合評価」の4項目において有意性のある重回帰式を得ることができ、さらにこの推定式により、官能評価値を機器測定値から推定できる可能性を併せて報告した⁵⁾。そこで本研究では、本推定式の有用性を検証するため、現象として保水性、結着性等の顕著な嗜好性低下がみられる発酵モデルソーセージと、物性改良を意図した脂肪添加モデルソーセージを作製し、水分保持性やテクスチャー測定等によって得られる客観的物性評価値を求めるとともに、そこで得られた数値を用いて官能評価値の推定を行った。

発酵を施すことにより、客観的評価値の中でも特に著しい変化がみられた凝集性 (cohesiveness) と加熱損失率 (cooking loss) についてまとめたものをTable 1に示した。まず凝

集性についてみると、D-1001, No. 2のいずれの低温増殖性乳酸菌株を接種した場合も有意に値が低下し、一方の加熱損失率も同様に有意な値の上昇がみられ ($p < 0.05$)、発酵によるモデルソーセージの客観的品質低下が示された。次に、物性改良目的で添加した脂肪の影響をみると、20%脂肪を添加することによって、非発酵ソーセージでは凝集性に有意な変化はみられなかったが、加熱損失率が有意に低下し ($p < 0.05$)、脂肪添加による水分保持性の改善がみられた。一方の著しい物性低下がみられた発酵区では、いずれの菌株を接種した場合も脂肪添加によって、凝集性はcontrolに匹敵する値を示し、かつ加熱損失率においては、controlのそれには及ばないものの、脂肪を添加していない発酵ソーセージと比較して、有意 ($p < 0.05$) かつ著しい改善がみられた。

このような発酵や脂肪添加によってもたらされるモデルソーセージの物性変化が、官能評価値にどう反映されるのかについて、前報にて確立した推定式を用いて検証を行った。今回は、「歯ごたえ」と「総合評価」を推定する以下の2式を用い、得られた推定値をFig. 1にまとめた。

「歯ごたえ」

$$y = -0.21 X_4 + 0.20 X_2 + 33.6^{**}$$

(寄与率: 86.1%)

「総合評価」

$$y = 0.25 X_5 + 0.04 X_3 + 0.13 X_1 + 32.7^{**}$$

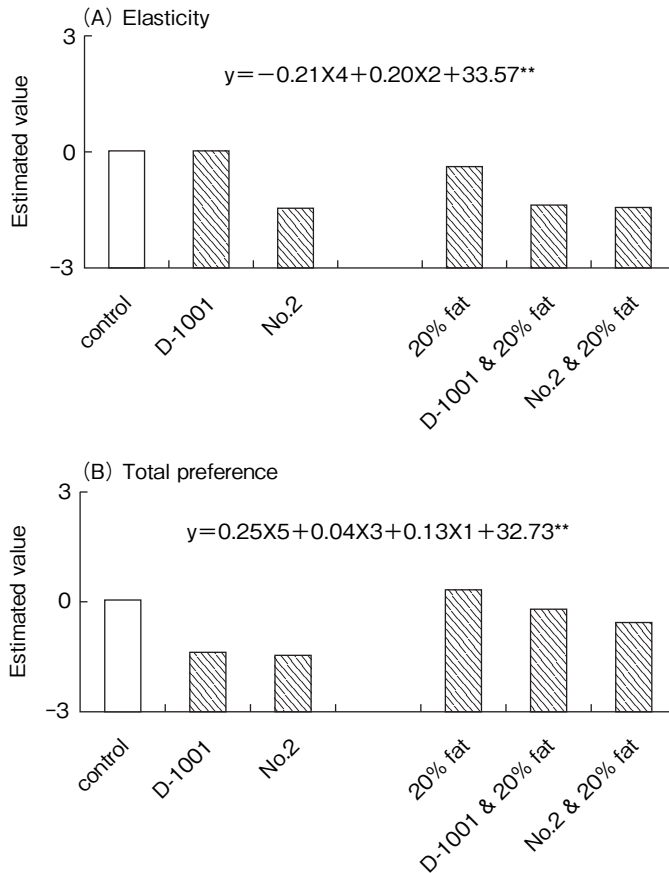


Fig.1 Comparison in the estimated organoleptic evaluation values of various sausages calculated from texture prediction formula for Elasticity (A) and Total preference (B).

control : 75°C-heated sausage

D-1001 and No.2 : fermented sausages with *Lactobacillus sakei* D-1001 and No.2, respectively

20% fat: high fat sausage

[X 1] : Cohesiveness, [X 2] : Gumminess, [X 3] : Retarded viscosity η 1, [X 4] : Cooking loss,

[X 5] : pH, [**] : $p < 0.01$

（寄与率：81.9%）

X 1 : 凝集性 X 2 : ガム性応力

X 3 : 遅延粘性率 η 1 X 4 : 加熱損失率

X 5 : pH

その結果、**Fig. 1 (A)** に示した「歯ごたえ」に関しては、いずれの菌株を接種した場合も発酵によって官能評価推定値の低下がみられ、これに脂肪を添加しても特に大きな変化はみられなかった。一方、「総合評価」では、発酵のみの場合は、「歯ごたえ」同様、著しい評価値の低下がみられ

たが、20%脂肪を添加することによって、controlに匹敵する官能評価値を示すことが明らかとなり、脂肪添加によって発酵ソーセージの嗜好性が向上する可能性が示唆された。この「総合評価」を説明する重回帰式に、発酵や脂肪添加の影響を強く受ける加熱損失率が選択されていないにもかかわらず、両者間に対応がみられたことは、この「総合評価」の推定式が、嗜好性を総合的に推定できていることを意味するものと考ええる。

以上のように本研究において、客観的機器測定

値から主観的な官能評価値を推測することが可能であることが示された。さらには食感改良材としての脂肪添加の影響も官能評価推定値に反映されることが分かり、本推定式の有用性がさらに支持される結果となった。しかしながら著者らは機器測定値からの嗜好性の推定にとどまらず、むしろ構造面からのアプローチも極めて重要であると考えている。今後引き続き検討を続け、食品の嗜好性研究や、実際の商品開発に資する客観的嗜好性評価法の確立に努めたい。

4. 要 約

おいしさ評価は一般に人による官能評価によって行われており、極めて有効な方法ではあるが、あくまでも主観に基づくため、労力を要するとともに客観性に欠けるという問題がある。特に食感は、客観的評価がより困難な特性でもある。そこで昨年度著者らは、客観的評価値である機器による物性測定値と、主観的評価値である人による官能評価を用いた両者間の相関分析、さらに重回帰分析を行うことにより官能評価値の推定式を見出した。

そこで本研究では、保水性低下等の明らかな品質低下を示す発酵処理や、物性改良効果が期待できる脂肪添加処理を施したモデルソーセージを作製し、機器を用いた客観的評価と、その数値と推定式を活用した官能評価推定値を求め比較検討を行った。その結果、発酵処理を施すことにより、加熱損失率は有意に低下し、官能評価推定値（総合評価）も同様に低下した。これに20%脂肪を添加することにより、加熱損失率と官能評価推定値のいずれも大幅な改善がみられ、客観的数値をもとに嗜好性を推定する本推定式の有用性が示唆された。

文 献

- 1) 芳賀聖一, 岩切鉄矢, 水野達也: 名城大学農学部学術報告, **37**, 89~94, 2001.
- 2) 藤田利宗, 林 利哉, 芳賀聖一: 日本食品科学工学会誌, **53** (8), 423~429, 2006.
- 3) 西崎あや, 林 利哉, 小川幸彦, 芳賀聖一: 食肉の科学, **47** (1), 156~160, 2007.
- 4) Mullenet, J-F: *J. Sensory Stud.*, **13**, 77~93, 1998.
- 5) 芳賀聖一, 林 利哉, 山口恭平, 西崎あや, 小川幸彦: 食肉に関する助成研究調査成果報告書 (伊藤記念財団), **31**, 36~41, 2013.

生活習慣病予防効果を有する食肉素材の創出を 目指した加工技術の確立

Establishment of processing methods for producing meat products with
anti-lifestyle-related disease

好 田 正

(東京農工大学大学院農学研究院)

Tadashi Yoshida

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

The number of the patients of life style-related diseases is increasing for recent decades. Recent studies revealed that the chronic inflammation occurred around adipose tissue would play a crucial role in the induction of life style-related diseases. We in this study aimed at demonstrating the anti-inflammatory and anti-life style related-disease activity of food factors, focusing on the glycogen derived from meats. It has been reported, in the previous study, that the immune regulating activity of glycogen depended on the molecular weight of the glycogen. We therefore used the glycogen after treating with sulfuric acid for modulating its molecular weight.

Our results obtained from this study showed that sulfuric acid-treated glycogen, prepared from several origins of meat products, inhibited the production of inflammatory cytokine from *in vitro* cultured murine splenocytes. The activity strongly depended on the period of acid treatment and the origin of meat, suggesting that the activity depended on the molecular weight. The swine liver glycogen that had been treated with sulfuric acid for 2 days showed the strongest activity tested. The activity also depended the stimulation which induced a similar situation with inflammation *in vitro*. The glycogen inhibited the inflammation induced by concanavalin A but did not inhibit it induced by lipopolysaccharide. The swine liver glycogen treated for 2 days also inhibited inflammatory cytokine production when it was orally administered to arteriosclerosis model mice. This result suggests that acid treatment of meat glycogen might be a useful method for preparing an anti-life style-related disease food material.

Unfortunately, we in this study did not show that the anti-inflammatory effect of the swine fillet and liver that had been directly treated with acid. A further study to increase the content of glycogen in those organs is required for development of anti-life style-related meat products.

1. 目 的

本研究では、食肉中に含まれるグリコーゲンの機能に着目し、抗生活習慣病効果を付与する加工技術の確立を通して、食肉の需要拡大と付加価値の創出を実現することを目的とした。

近年、生活習慣病の患者数は増加の一途を辿り、大きな社会問題となっている。食生活の欧米化やライフスタイルの変化による運動不足が一因と考えられているが、それらの要因が将来的に解決される可能性は低く、新たな対応策が望まれている。また、以前はまったく無関係であると考えられていた持続的な炎症が生活習慣病の引き金となっていることが明らかとなってきた¹⁾。そのため、抗炎症作用をもつ薬剤による予防法の確立に期待が寄せられているが²⁾、副作用が認められる等の問題に加え、薬剤を発症前から長期にわたって予防的に摂取し続ける事への抵抗感もある。そこで、食品のもつ抗炎症作用を利用して日々の食事を通して炎症を持続的に抑制することによって生活習慣病の予防が可能であることを実証することができれば、活性の強い抗炎症薬を用いるよりも、安全かつ効果的で国民にも広く受け入れられる方策となることが期待される。

過去の研究において、グリコーゲンに類似した構造を持つ植物性の天然多糖である澱粉が分子量に依存して免疫調節活性を有することを見いだした³⁾。しかも、澱粉由来の活性因子は感染状況下では免疫応答を促進し、平常状況下では免疫応答を抑制することが明らかとなった。これらの結果は、牛や豚など食肉として広く利用されている動物に含まれるグリコーゲンの分子量を最適化するような加工方法を確立することで、抗炎症活性をもつ新たな食品素材を創出することができる可能性を示している。

食肉はタンパク質や脂質、ミネラルを多く含み

非常に栄養価が高く、我が国の食卓に欠かすことのできない食材である。また、嗜好的な側面からも若者を中心に肉料理を好む者は多い。一方で、食肉製品の摂りすぎは肥満や生活習慣病の原因となるという考え方が広く浸透しており、これらの既成概念とは反対に抗生活習慣病効果をもつ食肉素材というこれまでになかった付加価値の創出は社会に大きなインパクトを与えることが期待される。

2. 方 法

2.1 マウス

BALB/cマウス（メス、6週齢）は日本クレア（東京）より購入した。アポリポプロテインE欠損マウス（ApoE KO）はジャクソン研究所より購入し、本学において繁殖させ7～8週齢のオスまたはメスを実験に用いた。全てのマウスは東京農工大学実験動物飼育管理ガイドラインに従って取り扱った。

2.2 グリコーゲンの硫酸処理

ウシ肝臓由来グリコーゲンはシグマアルドリッチ（東京）より購入した。市販の豚およびトリの肝臓からグリコーゲンを抽出した。肝臓は乳鉢ですりつぶした後に、沸騰水中で30分間攪拌加熱した。700×gで10分間遠心した後、上清を回収し5%濃度となるようにトリクロロ酢酸（和光純薬、大阪）を添加して4℃で1晩静置した。700×gで10分間遠心した後、上清を回収し、3倍量のエタノール（和光純薬）を添加した。700×gで10分間遠心した後、沈殿を回収し、純水に溶解し、再び3倍量のエタノールを添加した。遠心後に得られた沈殿を抽出グリコーゲンとして用いた。得られたグリコーゲンを純水に溶解し、フェノール硫酸法により全糖量を求めた。

各グリコーゲンを純水で希釈し（10～100mg/ml）、17%濃度となるように硫酸（和光純薬）を

添加した。37℃で0, 1, 2, 4日間処理した後、6 M NaOHで中和した。

2.3 食肉の硫酸処理

市販の豚ヒレ肉および肝臓を冷凍した後、薄くスライスして17%硫酸溶液に浸漬した。液量は試料が十分浸かる程度とした。37℃で2日間処理し、NaOHで中和した。700×gで10分間遠心した後、沈殿を回収し60℃で3日間乾燥させた。

2.4 細胞培養

BALB/c または ApoE KO マウスの脾臓細胞 (5×10^6 cells/ml) を各グリコーゲン試料の存在下で、コンカナバリン A (Con A; シグマアルドリッチ) $5 \mu\text{g/ml}$ または大腸菌由来リポ多糖 (LPS; シグマアルドリッチ) $1 \mu\text{g/ml}$ によって刺激した。2日後の培養上清中に含まれる IL-4, IFN- γ , TNF- α 産生量を測定した。上清回収後に各ウェル中の生細胞数をトリパンブルー染色により測定した。

2.5 高脂肪食およびグリコーゲンの摂取

ApoE KO マウスに高脂肪食 (High Fat Diet 32; 日本クレア) を4週間自由摂食させた。その間、豚肝臓より抽出して2日間硫酸処理したグリコーゲンを0.5%濃度となるように飲水に溶解して自由摂取させた群を設けた。また、2日間硫酸処理した豚ヒレ肉および肝臓を10%濃度となるように餌に添加した群も設けた。

高脂肪食の開始4週間後に採血して血清を得た。得られた血清中のコレステロール濃度をコレステロール E-テストワコー (和光純薬) を用いて測定した。また、脾臓細胞を2日間培養し、上清中の TNF- α 産生量を測定した。さらに、腹部大動脈の組織切片を作成し (札幌総合病理研究所, 札幌), HE 染色像を観察した。

2.6 サイトカイン ELISA

上清中の IL-4 および IFN- γ 産生量をサンドイッチ ELISA によって測定した。一次抗体には

それぞれ 11B11 および R4-6A2 (BD Pharmingen, CA) を用いた。二次抗体にはそれぞれ BVD6-24G および XMGI.2 (BD Pharmingen) を用いた。TNF- α 産生量は Mouse TNF- α ELISA MAX Deluxe (Biolegend, CA) を用いて測定した。

3. 結果と考察

3.1 硫酸処理グリコーゲンは脾臓細胞からのサイトカイン産生を抑制した

過去の報告により、グリコーゲンが免疫調節活性を有すること^{4,5)}、およびその活性は分子量に強く依存することが明らかにされている⁶⁾。また、我々の研究によってグリコーゲンに類似した構造をもつ植物性多糖である澱粉も分子量に依存して免疫調節活性を発揮することが明らかとなった³⁾。そこで、本研究では食肉よりグリコーゲンを抽出し、グリコーゲンの分子量を変化させるために硫酸処理を行った。豚ヒレ肉と肝臓、およびトリ胸肉と肝臓からグリコーゲンを抽出したが、いずれも肝臓からのみグリコーゲンを得ることができた。得られた豚およびトリの肝臓由来グリコーゲン、および購入したウシ肝臓由来グリコーゲンを図中に示した日数硫酸処理し、BALB/c マウスの脾臓細胞に添加した。細胞を Con A 存在下で培養したところ、サイトカイン産生がグリコーゲンの添加により抑制されることが示された (Fig. 1)。最も効果の高い処理日数はグリコーゲンの由来により異なっていた。この結果は、由来によりグリコーゲンの分子量もしくは硫酸による分解のされやすさが異なっていることを示唆していると考えられる。また、各サイトカイン (IFN- γ , IL-4, TNF- α) に対する抑制効果は同様な傾向を示した。IFN- γ は Th 1 型, IL-4 は Th 2 型, TNF- α は炎症性サイトカインとして知られており、これらすべてが同様に抑制されたことから、グリコーゲンが免疫応答のバランスを変化させず

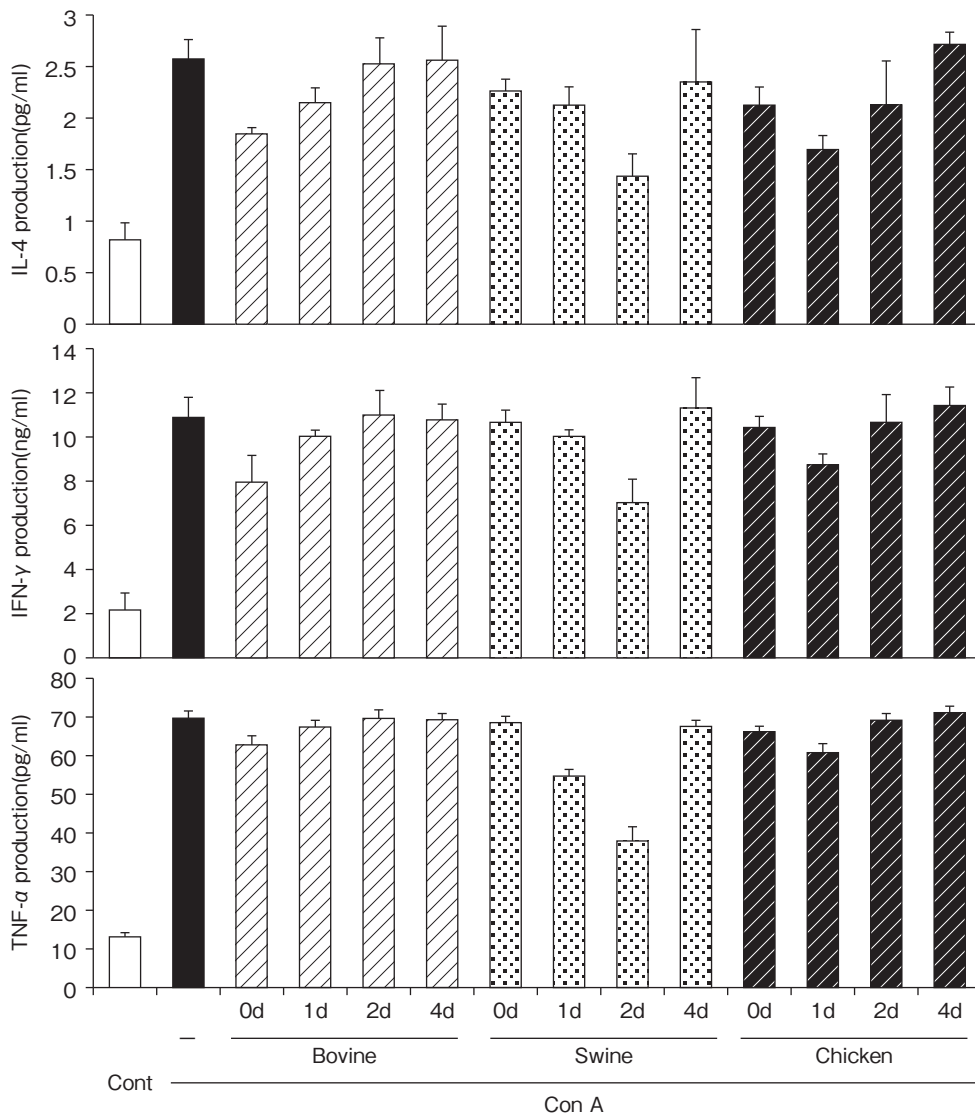


Fig.1 Effect of acid-treated glycogen on cytokine productions from BALB/c splenocytes. Splenocytes from BALB/c mice were stimulated with Con A *in vitro* in the presence of acid-treated glycogens. The supernatant was collected from each well 2 days after stimulation, and the cytokine productions in each supernatant were measured by ELISA.

に応答の強度を全体的に低下させることが示された。

次に、動脈硬化のモデルマウスであるApoE KOマウスの脾臓細胞を用いて、BALB/cマウスで得られた結果を検証した。その結果、BALB/cマウスの場合と同様に、グリコーゲンがCon A刺激した脾臓細胞からのサイトカイン産生を抑制す

ることが示された (Fig. 2a)。一方で、Con Aの代わりにLPSで刺激した脾臓細胞からのTNF- α 産生は抑制しなかった (Fig. 2b)。我々は以前の研究により、硫酸処理した澱粉が刺激の種類に依存して、炎症に対して抑制的に働く場合と促進的に働く場合があることを示しており³⁾、本研究によってグリコーゲンでも同様な結果が得られたと

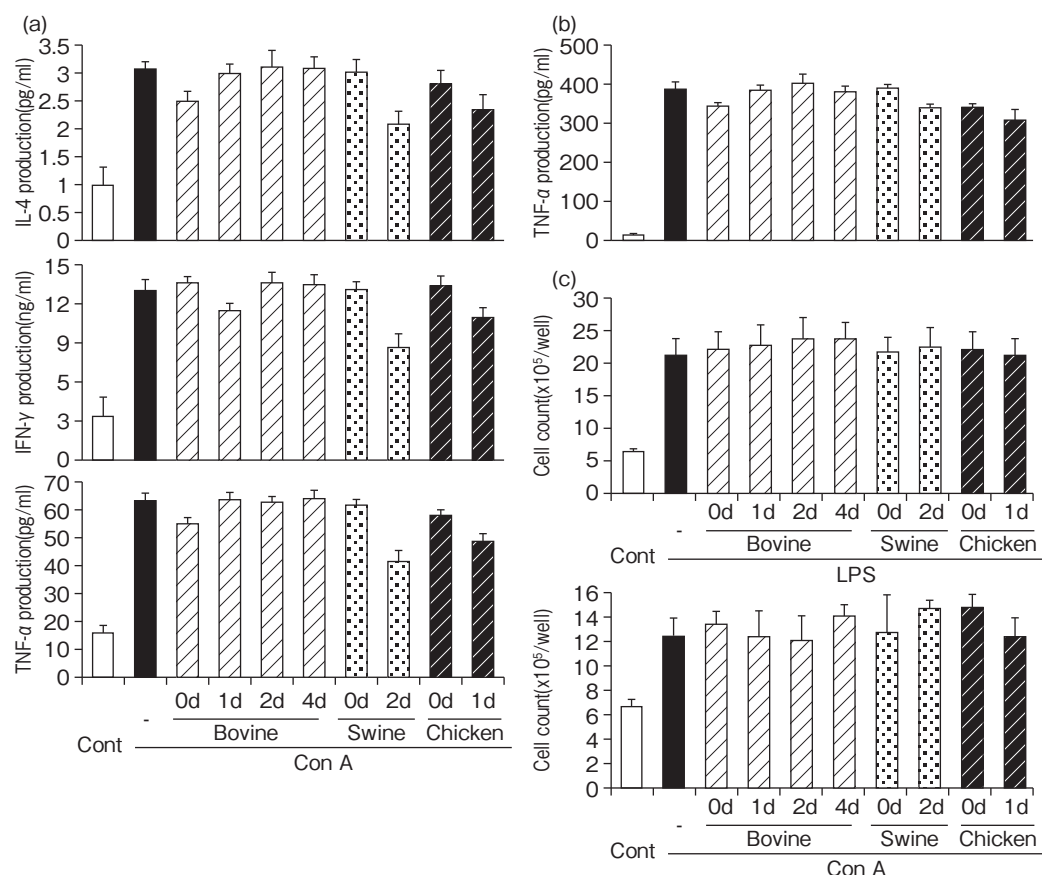


Fig.2 Effect of acid-treated glycogen on cytokine productions from ApoE KO splenocytes. Splenocytes from ApoE KO mice were stimulated with ConA (a, c) or LPS (b, c) *in vitro* in the presence of acid-treated glycogens. (a, b) The supernatant was collected from each well 2 days after stimulation, and the cytokine productions in each supernatant were measured by ELISA. (c) The cell number in each well was counted 2 days after stimulation.

考えている。しかしながら、グリコーゲンはLPS存在下においても炎症を促進するような効果は認められなかった。

また、Con AおよびLPS刺激脾臓細胞のいずれにおいても、グリコーゲンの添加による生細胞数への影響は認められなかった (Fig. 2c)。

3.2 硫酸処理グリコーゲンは動脈硬化モデルマウスにおける炎症を抑制した

上記の結果より、硫酸処理グリコーゲンが慢性炎症を抑制し生活習慣病の発症を予防する可能性が示唆されたので、実際に動脈硬化モデルマウスであるApoE KOマウスに高脂肪食を与えると同

時に、豚肝臓由来グリコーゲンを2日間硫酸処理した標品を経口的に摂取させることにより (各群2頭)、炎症および動脈硬化への影響を検証した。摂取開始から4週間後に脾臓細胞を培養し上清中のTNF- α 産生量を測定した結果、高脂肪食摂取によって増加した産生量が、グリコーゲンの摂取によって低下することが明らかとなった (Fig. 3a)。この結果は、高脂肪食摂取によって誘導される炎症反応は、*in vitro*でLPS刺激によって誘導される炎症反応とは異なり、Con Aによって誘導された炎症と同様にグリコーゲンによって抑制され得ることを示している。また、同じマウスよ

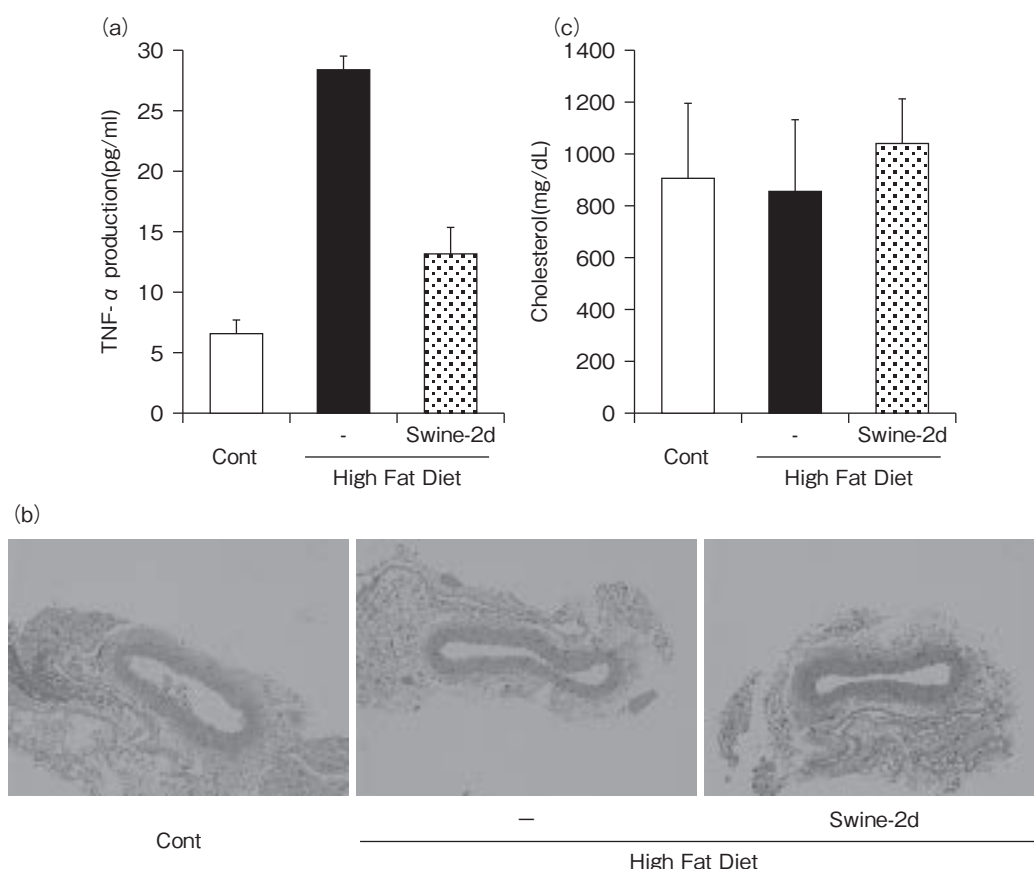


Fig.3 Effect of acid-treated swine glycogen on high fat diet induced inflammation. ApoE KO mice were orally administered with high fat diet and acid-treated swine glycogen. (a) Splenocytes from the mice were cultured for 2 days, and the TNF- α production in each supernatant was measured by ELISA. (b) Histological analysis of abdominal aorta obtained from ApoE KO mice that had been fed high fat diet and glycogen for 4 weeks was performed. (c) Total cholesterol concentration in the sera of ApoE KO mice that had been fed high fat diet and glycogen for 4 weeks was measured.

り作製した腹部大動脈切片の組織像を観察すると、高脂肪食の摂取によっても血管の炎症像は観察できなかった (Fig. 3b)。さらに、高脂肪食群にグリコーゲンを摂取させても血管の組織像に影響は認められなかった (Fig. 3b)。なお、解剖直前の血清中の総コレステロール濃度には各群で差異は認められなかった (Fig. 3c)。

次に、豚ヒレ肉および肝臓を直接硫酸処理し、餌に添加することで炎症および動脈硬化への影響を上記と同様に観察した (各群3頭)。その結果、脾臓細胞からのTNF- α 産生量および腹部大動脈

の組織像のいずれにおいても硫酸処理肉の影響は認められなかった (Fig. 4a, b)。豚ヒレ肉および肝臓を投与した群におけるグリコーゲンの推定摂取量を計算すると、最大でもそれぞれ約40 mgおよび100 mg/マウス・4週間となり、飲水に溶解してグリコーゲンを摂取させた実験の約500 mg/マウス・4週間と比較すると少ない摂取量となるため、抗炎症効果が認められなかったと考えられる。なお、豚ヒレ肉および肝臓を硫酸処理する過程で、含まれていたグリコーゲンの一部は上清中に溶出して失われたと考えられるので、実際の

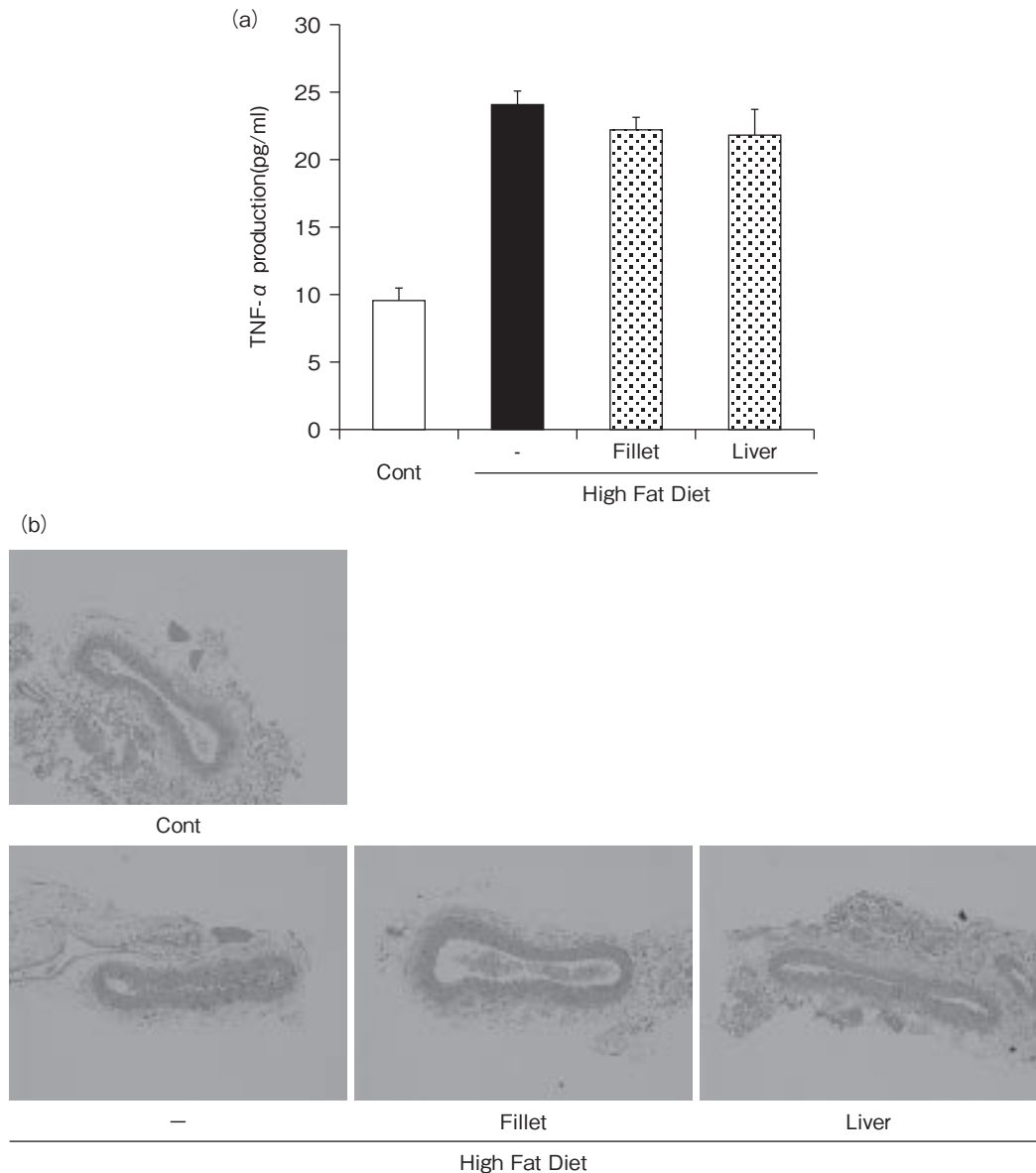


Fig.4 Effect of acid-treated swine meats on high fat diet induced inflammation. ApoE KO mice were orally administered with high fat diet and acid-treated swine fillet or liver. (a) Splenocytes from the mice were cultured for 2 days, and the TNF- α production in each supernatant was measured by ELISA. (b) Histological analysis of abdominal aorta obtained from ApoE KO mice that had been fed high fat diet and acid-treated meats for 4 weeks was performed.

摂取量はさらに少なくなっていたと推察される。

本研究の結果より、食肉由来グリコゲンを硫酸処理することで抗炎症作用を持った食品素材を創出することが可能であることを示した。動脈硬化に対する影響を直接実証することはできなかつ

たが、このような機能を持った食品を日々の食事を通して持続的に摂取すれば生活習慣病だけでなく、アレルギーやガンの発症や症状を抑制することが可能になると期待される。本研究では食肉を直接硫酸処理した場合の抗炎症効果を実証するこ

ともできなかったが、食肉中により多くのグリコーゲンを蓄積させる技術の開発や、廃棄肉等から分離したグリコーゲンを硫酸処理して食肉に添加する等により、食肉に新たな機能性や付加価値を付与することに繋がる研究成果であると考えている。

4. 要 約

近年、我が国における生活習慣病患者の数は増加の一途をたどっており、早急な対策が必要である。生活習慣病の多くは肥満そのものが原因となって発症するわけではなく、肥満に伴って生じる持続的な炎症反応が重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。すなわち、抗炎症効果を有する食品素材を日常的に摂取することによって生活習慣病を予防することが可能であると考えられる。そこで本研究では、食肉中に含まれるグリコーゲンの機能に着目し、抗生活習慣病効果を付与する加工技術を確立し、付加価値の創出と食肉の需要拡大を実現することを目的とした。

本研究の結果より、食肉由来グリコーゲンを硫酸処理することによって、グリコーゲンに抗炎症作用を付与することが可能であることが明らかとなった。また、付与される抗炎症効果の程度は、グリコーゲンの由来および硫酸処理の時間によっ

て異なっていた。さらに、硫酸処理グリコーゲンの抗炎症効果は、炎症を惹起する刺激の種類によって異なることも示された。

豚肝臓由来グリコーゲンを2日間硫酸処理した標品を動脈硬化モデルマウスに摂取させることで、炎症反応が抑制されることが示された。このような効果は、豚ヒレ肉や肝臓を直接硫酸処理した加工肉を摂取させた場合には認められなかったが、今後の研究により食肉中のグリコーゲン含量を増加させることができれば、抗生活習慣病効果を有する食肉素材の開発に繋がる成果であると期待される。

文 献

- 1) Alemany, M. *Nutr. Res.* **33**, 1~11, 2013.
- 2) Harris, RE., Beebe-Donk, J., Doss, H. and Burr Doss, D. *Oncol. Rep.*, **13**, 559~583, 2005.
- 3) Yoshida, T., Takahashi, K. and Hattori, M. *Food Chemistry*, **133**, 1494~1500, 2012.
- 4) Takaya, Y., Uchisawa, H., Ichinohe, H., Sasaki, J., Ishida, K. and Matsue, H. *Marine Biotechnology*, **6**, 208~213, 1998.
- 5) Ryoyama, K., Kidachi, Y., Yamaguchi, H., Kajiura, H. and Takata, H. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 2332~2340, 2004.
- 6) Kakutani, R., Adachi, Y., Kajiura, H., Takata, H., Kuriki, T. and Ohno, N. *Carbohydrate Research*, **342**, 2371~2379, 2007.

牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸について の研究（第3報）

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

山之上 稔・西田 昌弘・上田 修司・井原 一高・豊田 淨彦

（神戸大学大学院農学研究科）

Minoru Yamanoue, Masahiro Nishida, Syuji Ueda, Ikko Ihara and Kiyohiko Toyoda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

The aims of this study were to analyze the amounts and fatty acid composition of free fatty acid (FFA) and taste-traits in water-soluble extract (broth) from Holstein beef after postmortem aging and cooking, and to prove the influence of FFA on beef eating quality by comparing to those results from Japanese Black Wagyu beef. Sample beef slices were taken from carcass cross-section between the sixth and seventh ribs of the Holstein cattle and stored at 4 °C antiseptically. At 7-, 14- and 21-days postmortem, water-soluble extract was prepared from raw and cooked beef samples. The amounts of triacylglycerol (TG) and FFA were measured and the fatty acid composition was determined by GC analysis. As the results, the amounts of TG and FFA in water-soluble extract were not changed significantly during postmortem aging, and cooking caused no significant change in those amounts. Fatty acid composition of FFA was markedly different from that of TG and the ratio was in the order of palmitic acid > stearic acid > oleic acid. The ratio of oleic acid was gradually increased in FFA during postmortem aging of Holstein beef. On the other hand, taste-traits of water-soluble extract measured by an electric sensing system showed that *sourness* was markedly decreased at 21-days postmortem and *acidic bitterness* was increased during storage. The value of *umami* of cooked beef samples at 21-days postmortem was increased slightly but much less than the value of Japanese Black Wagyu beef. It is suggested that better eating quality of Japanese Black Wagyu beef is possible to relate to intramuscular free fatty acid.

1. 目 的

今日一般に市販されている牛肉は、低温で一定期間の熟成を経て利用されている。熟成の進行に伴い軟化、多汁性の回復、風味の向上などの肉質に影響を与える諸要素の改善が起こり¹⁾、牛肉はおいしくなる。牛肉のおいしさには脂肪の影響も

大きく、脂肪交雑として筋内脂肪量が多いことが重要視されてきたが、近年では脂肪を構成する脂肪酸が牛肉のテクスチャーや風味を左右することが示され、注目されている^{2~4)}。

我々は牛肉のおいしさへの筋内脂肪の影響を明らかにするため、主要な肉牛である黒毛和種牛のロース部を材料に、平成23年度にクロロホルムと

メタノールの混液で抽出した総脂質と、総脂質から分画した牛肉の中性脂肪の大半を占めるトリアシグリセロール (TG) や食味との関連が示唆されている遊離脂肪酸 (FFA) について、熟成および加熱に伴う脂質量と脂肪酸組成の変化を調べた⁵⁾。また平成24年度に牛肉中の遊離脂肪酸と咀嚼時の食味性との関係を明らかにするために、黒毛和種牛肉の摂取時の咀嚼中に口腔内に滲出し、呈味物質が溶存する水溶性画分 (肉汁) 中の脂質量や脂肪酸組成が熟成および加熱調理でどのように変化するかを調べ、さらに肉汁の呈味性の変化を客観的測定手法である味覚センサーを用いて調べた⁶⁾。その結果、熟成中に筋内の遊離脂肪酸量が有意に増加し、加熱処理でも変化しないことを明らかにして⁵⁾、肉汁中でも遊離脂肪酸量が増加することを確かめた⁶⁾。また熟成に伴い肉汁の酸味が顕著に減少し旨味および苦味雑味が増加し、これらの呈味性は加熱処理でも変わらないことを示した。さらにホルスタイン種牛肉に比べて黒毛和種牛肉のおいしさが優れているという官能試験結果を得ている。これらの結果から、熟成中に増加する筋内の遊離脂肪酸が脂肪由来の牛肉の食味性に関与する可能性を考えている。

本研究では、両年度で調べた黒毛和種牛肉に比べて食味性の劣るホルスタイン種牛肉の熟成および加熱前後で、肉汁中のTGとFFAの量および組成の変動を調べ、また肉汁の呈味性分析を行った。これらのホルスタイン牛肉肉汁で得られる結果と前年度までに黒毛和種牛肉で得られた結果を比較解析することで、黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸変化と優れた食味性を明確にし、牛肉のおいしさと筋内遊離脂肪酸との関連性を検証した。

2. 方 法

2.1 試薬および牛肉試料

試薬は特に表記してあるものを除き、ナカライ

テスク社もしくは和光純薬工業株式会社の特級試薬を用いた。脂肪酸メチルエステル標準品はシグマ-アルドリッチ社から購入した。牛肉試料は、伊藤ハム (株) 四国センターから購入したホルスタイン種枝肉の第6~7肋骨間のロース部を用いた。

2.2 熟成および加熱処理

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

2.3 肉汁試料の調製

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

2.4 肉汁試料中のTGおよびFFA量の測定

肉汁試料中のTG量は、トリグリセリドE-テストワコーTG測定キット (和光純薬工業) を用いて測定した。測定方法は指示書に従い、トリオレイン酸を標準として波長600 nmの吸光度から検量線を作成した。またFFA量はFree Fat Acid Quantification Kit (Bio Vision) を用いて測定した。測定方法はBio Vision社の指示書に従い、一部希釈した試薬を使用した。パルミチン酸を標準に、波長570 nmの吸光度から検量線を作成した。

2.5 肉汁試料中のTGおよびFFAの分画

肉汁試料中のTGおよびFFAの分画は、前報⁶⁾の方法に準じてスケールダウンして行った。肉汁試料を除タンパク質後シリカゲルカラムで分離し

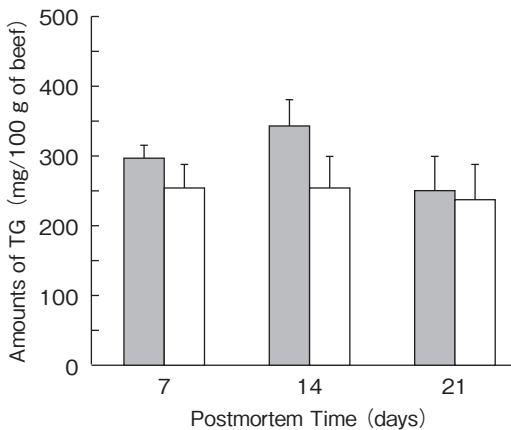


Fig.1 Effects of postmortem aging and cooking (■, raw; □, cooked) on the amounts of TG in Holstein beef broth (n = 8).

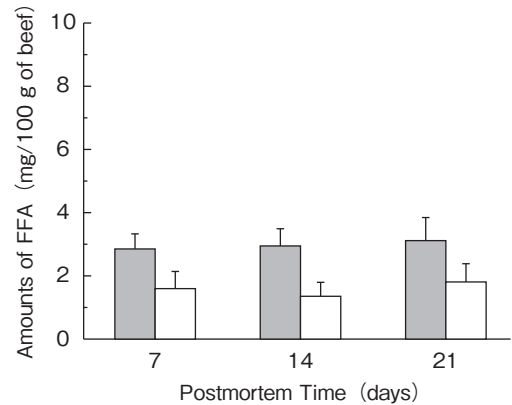


Fig.2 Effects of postmortem aging and cooking (■, raw; □, cooked) on the amounts of FFA in Holstein beef broth (n = 6).

た。分画した脂質クラスを薄層クロマトグラフィ法で展開し、精製度を確認した。

2.6 脂肪酸組成の測定

分画したTGおよびFFAから三フッ化ホウ素-メタノール法で脂肪酸メチルエステル (FAME) を調製した。乾固したFAMEをヘキサンに溶解し、過去に示した方法⁵⁾と同様にガスクロマトグラフ (GC) (島津 GC-2014) で脂肪酸組成分析を行った。

2.7 呈味性評価

肉汁試料からタンパク質を除去後、呈味性を味覚センサー (INSENT) で分析した。使用したセンサーはAAE, CT0, CA0, C00およびAE 1であり、それぞれ旨味、塩味、酸味、苦味雑味、渋味の程度を検出する。

3. 結果と考察

ホルスタイン種牛肉を入手後4℃で熟成し、7日目、14日目、および21日目に肉汁試料を調製し、TGおよびFFAを定量した。Fig. 1に示すように、未加熱牛肉からの肉汁中のTG量は熟成7日目に100 g 牛肉当たり295.2 mgであったのが、14日目

には342.4 mg、21日目には250.3 mgとなり、加熱牛肉からの肉汁では熟成7日目に253.5 mg、14日目に252.3 mg、21日目に235.9 mgといくらかの増減はあるものの熟成中の有意な変化を示さなかった。また前年度に行った黒毛和種牛肉肉汁中のTGの定量値⁶⁾に比べていずれも低値であった。さらに未加熱と加熱の両牛肉試料間におけるTG量に有意差はなく、加熱の影響は認められなかった。

一方、Fig. 2に示すように、肉汁中のFFA量は未加熱試料で熟成7日目は100 g 牛肉当たり2.9 mg、14日目には2.9 mg、21日目には3.1 mgであった。加熱試料では熟成7日目に1.6 mg、14日目は1.3 mg、21日目には1.8 mgとほぼ一定で、ホルスタイン種牛肉肉汁中のFFA量は熟成および加熱処理で大きな変化を示さなかった。これらの結果は、前年度に行った黒毛和種牛肉肉汁中のFFAの定量値⁶⁾に比べていずれも低値であった。また黒毛和種牛肉では肉汁中のFFA量は熟成21日間に増加したが、ホルスタイン種牛肉肉汁のFFA量は熟成期間を通じてほぼ一定で、黒毛和種牛肉と異なっていた。加熱処理は、肉汁中のTG量変

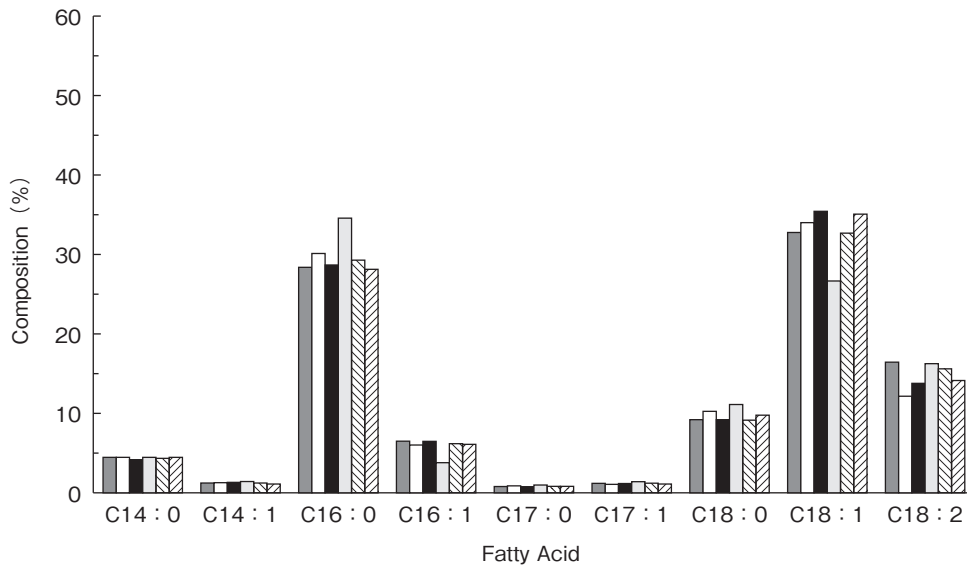


Fig.3 Effects of postmortem aging and cooking on fatty acid composition of TG in Holstein beef broth ($n = 1 \sim 2$). Beef broths were prepared from raw (closed box) and cooked (open box) samples at appropriate postmortem days (7-days, ■ and □; 14-days, ■ and □; 21-days, ▨ and ▩).

化と同様にFFA量に影響を及ぼさなかった。

調製した肉汁試料をシリカゲルカラムで分離し、分画したTGおよびFFAをメチルエステル化後、GCでそれらの脂肪酸組成を分析した。**Fig. 3**に示すように、ホルスタイン種牛肉肉汁中のTGで一番多く含まれている脂肪酸は、未加熱牛肉と加熱牛肉共にオレイン酸 (C18:1) で、次いでパルミチン酸 (C16:0) とリノール酸 (C18:2) であり、それぞれ約35%、約28%、約14%であった。熟成および加熱における影響は認められなかった。ホルスタイン種牛肉における肉汁TGの脂肪酸組成変化は黒毛和種牛肉肉汁における結果と類似していたが、オレイン酸割合が黒毛和種牛肉肉汁の約49%⁶⁾に比べて低い値であった。

一方、ホルスタイン種牛肉肉汁中のFFAでは、一番多く含まれている脂肪酸はパルミチン酸であり、次いでステアリン酸 (C18:0) とオレイン酸であった (**Fig. 4**)。TGと異なり飽和脂肪酸が

多くを占め、TGの脂肪酸組成で同定されたりノール酸は、FFAでは検出されなかった。肉汁においてTGの脂肪酸組成 (**Fig. 3**) がFFAの脂肪酸組成に反映している訳ではなく、また熟成中にステアリン酸割合が減少しオレイン酸割合が増加する傾向にあり、熟成7日から21日目にオレイン酸割合は約10%から約20%へと増加した。ホルスタイン種牛肉肉汁では、熟成および加熱処理によるTG量の変化は認められず (**Fig. 1**)、オレイン酸の相対的な増加は熟成および加熱中のリパーゼ等の作用によるTGからの遊離に原因があるとは考えにくい。牛肉中のリン脂質分解やステアリン酸からオレイン酸への合成を促すステアロイルCoA不飽和酵素⁷⁾の作用など、牛肉中の酵素による可能性が考えられるが、今後この理由についての検討が必要である。

Fig. 5に、ホルスタイン種牛肉肉汁試料の呈味性分析を行った結果を示す。熟成7日の未加熱牛肉から調製した肉汁における分析値に比較したと

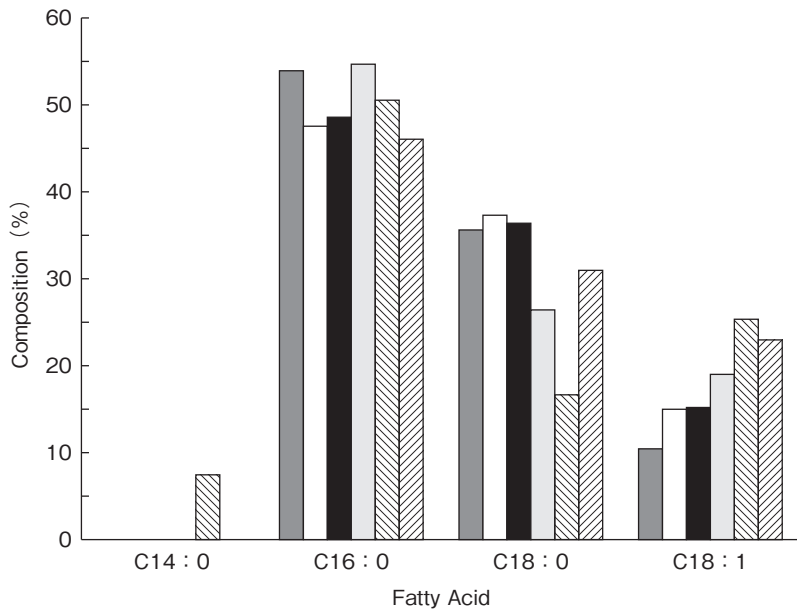


Fig.4 Effects of postmortem aging and cooking on fatty acid composition of FFA in Holstein beef broth ($n = 1 \sim 2$). Beef broths were prepared from raw (closed box) and cooked (open box) samples at appropriate postmortem days (7-days, ■ and □; 14-days, ● and ○; 21-days, ▨ and ▩).

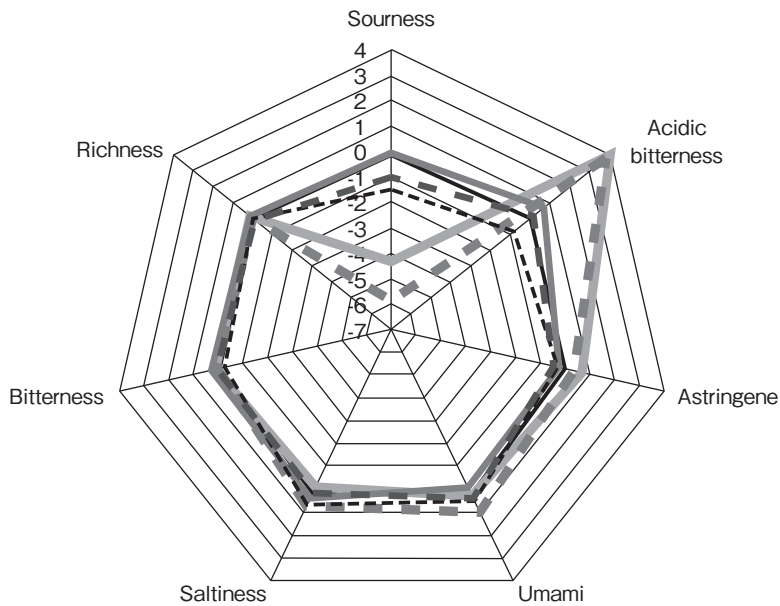


Fig.5 Effects of postmortem aging and cooking on the taste-traits of Holstein beef broth. Beef broth was prepared from raw (solid line) and cooked (broken line) samples at appropriate postmortem time (7-days, —; 14-days, - - -; 21-days, ———).

き、熟成21日目に未加熱と加熱牛肉の両試料で酸味値が顕著に低下し、味に深みを与える苦味雑味値が上昇した。また熟成21日目の加熱牛肉試料で旨味値が上昇した。これらの結果は黒毛和種牛肉肉汁における呈味性変化の結果⁶⁾と同様であったが、旨味値の上昇の程度は黒毛和種牛肉肉汁における結果よりも少なかった。牛肉の酸味は死後に蓄積する乳酸量に関連する⁸⁾が、豚肉では熟成に伴い増加するペプチドによって酸味が抑制される⁹⁾と報告されており、牛肉の熟成中にも同様のペプチド増加は起る¹⁰⁾ので、ペプチド増加による酸味のマスキング効果が生じたのかもしれない。一方、FFA量は苦味と関連する⁸⁾と報告されているが、熟成中にホルスタイン種牛肉肉汁中のFFA量に増加は認められず (Fig. 2)、苦味値が変化しない一方で、苦味雑味値の熟成21日目の増加が認められた。黒毛和種牛肉肉汁の結果では熟成中にFFA量が増加し、苦味雑味値の上昇が認められたことから、FFAと苦味雑味値との関連性については明確ではなかった。

前年度に行った4℃で21日間熟成させた黒毛和種牛肉とホルスタイン種牛肉を加熱調理後の官能検査⁶⁾では、黒毛和種牛肉の食味性がホルスタイン種牛肉に比べて有意に好ましい結果が得られている。今年度のホルスタイン種牛肉における呈味性分析結果でも黒毛和種牛肉の旨味の優位性を示す結果が得られた。熟成に伴う黒毛和種牛肉肉汁中のFFA量およびオレイン酸割合の増加が、ホルスタイン種牛肉肉汁中のそれらに比べて高く、口中の舌上における味の認識への長鎖脂肪酸の影響^{11, 12)}の可能性を示している。前年度から今年度にかけて明らかになった黒毛和種牛肉肉汁中のFFA量およびオレイン酸割合の熟成および加熱に伴う増加が、ホルスタイン種牛肉肉汁におけるそれらの増加よりも顕著である理由を解明することが、黒毛和種牛肉の食味性の良さに対する筋肉

遊離脂肪酸の寄与を明らかにするうえで重要と考えられる。

4. 要 約

牛肉のおいしさへの筋肉脂肪の影響を、牛肉中の遊離脂肪酸と咀嚼時の食味性との関係から明らかにするために、前年度に行った黒毛和種牛肉からホルスタイン種牛肉に材料を変えて熟成および加熱調理で肉汁中の筋肉脂肪量や脂肪酸組成が、また肉汁の呈味性がどのように変化するか調べた。

ホルスタイン種牛肉の第6～第7肋骨間ロース部を4℃で保存し、と畜後7, 14, および21日目にロース芯から筋肉片を採取した。未加熱および加熱処理後、水溶性画分を調製し、肉汁試料としてトリアシルグリセロール (TG) および遊離脂肪酸 (FFA) を定量した。その結果、熟成中にTG量およびFFA量に有意な変化は認められず、加熱試料でも同様であった。それらの脂肪酸組成を調べたところ、TGではオレイン酸割合が高かったが、FFAではパルミチン酸割合が高く、熟成によりステアリン酸割合の減少とオレイン酸割合の増加が認められた。また肉汁試料の呈味性を機器分析したところ、熟成に伴い未加熱と加熱の両試料で味に深みを与える苦味雑味値が上昇した。さらに熟成21日目には両試料で酸味値が顕著に低下し、加熱試料で旨味値が上昇した。

前年度までの黒毛和種牛肉における結果と今年度得られたホルスタイン種牛肉における結果から、黒毛和種牛肉の食味性の良さには熟成中に増加する筋肉遊離脂肪酸量と遊離脂肪酸のオレイン酸割合の寄与が示唆された。

文 献

- 1) Muchenje, V., Dzama, K., Chimonyo, M., Strydom, P.E., Hugo, A. Raats, J.G. : *Food Chem.* , **112**, 279~289, 2009.
- 2) Westerling, D.B., Hedrick, H. B. : *J. Anim. Sci.* ,

- 48, 1343~1348, 1979.
- 3) Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W. Backus, W. R. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 77~87, 1982.
- 4) Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. G. Cambell, C. P. : *J. Anim. Sci.*, **76**, 2619~2630, 1998.
- 5) 山之上 稔, 矢野恵子, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成23年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. **30**, 68~75, 2012.
- 6) 山之上 稔, 大和彩弥香, 上田修司, 井原一高, 豊田浄彦 : 平成24年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. **31**, 42~48, 2013.
- 7) Taniguchi, M., Mannen, H., Oyama, K., Shimakura, Y., Oka, A., Watanabe, H., Kojima, T., Komatsu, M., Harper, G.S. and Tsuji, S. : *Livest. Prod. Sci.*, **87**, 215~220, 2004.
- 8) Chikuni, K., Oe, M., Sasaki, K., Shibata, M., Nakajima, I., Ojima, K. Muroya, S. : *Anim. Sci. J.*, **81**, 600~605, 2010.
- 9) Okumura, T., Ryoji, Yamada, R. Nishimura, T. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **68**, 1657~1662, 2004.
- 10) Muroya, S., Ohnishi-Kameyama, M., Oe, M., Nakajima, I. Chikuni, K. : *Meat Sci.*, **75**, 506~514, 2007.
- 11) Matsumura, S., Mizushige, T., Yoneda, T., Iwanaga, T., Tsuzuki, S., Inoue, K. Fushiki, T. : *Biomed. Res.*, **28**, 49~55, 2007.
- 12) Galindo, M. M., Voigt, N., Stein, J., Lengerich, J., Raguse, J-D., Hofmann, T., Meyerhof, W. Behrens, M., : *Chem Senses*, **37**, 123~139, 2012.

味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究

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

都 甲 潔・田 原 祐 助
(九州大学大学院システム情報科学研究院)

Kiyoshi Toko and Yusuke Tahara
(Graduate School of Information Science and Electrical Engineering, Kyushu University)

The project aim in this study is to establish an objective evaluation technique of quantification and visualization for taste of wagyu using the taste sensor. The taste sensor (or commercially-available Taste Sensing System) comprising lipid/polymer membranes that can evaluate various qualities of taste has been used in food production and quality-control applications. However, the evaluation of beef has been made by removing beef tallow so far, because beef tallow had interference with the functions of the lipid/polymer membranes acting as the receptor part of taste sensor. We evaluated characteristics of the taste sensor membranes at 50 °C (dissolution temperature of beef tallow) and the interaction between beef tallow and the taste sensor membranes, and tried to quantify the taste of beef. The experimental results showed that (i) the taste sensor enables the taste evaluations at 50°C which corresponds to the dissolution temperature of beef tallow, (ii) saltiness, sourness and umami sensor electrodes can be useful to evaluate tastes of beef samples including beef tallow, (iii) the umami intensity of wagyu using the umami sensor shows $A3 > A5 > A2$.

In conclusion, the obtained data suggest the feasibility of the evaluation technique of quantification and visualization for taste of wagyu using the taste sensor. The next step is to evaluate the relationship between the sensor responses and sensory test.

1. 目 的

本研究は、味覚センサ^{1,2)}を応用して、和牛の「味」を客観的に数値化、可視化する評価技術の構築を目的としている。一般的に牛肉の食味は、「味」、「食感」、「香り」等の総合的な要素から成ると考えられている。本研究では、これらの要素の1つである「味」に着目し、味覚センサを用いた和牛の「味」の数値化と可視化技術の構築を行う。

「味」に関する情報は、舌の味細胞に存在する受容体やイオンチャネルで味物質が受容された後に、神経伝達物質の放出によって味神経に伝えられ、最終的に中枢組織である脳の味覚野に到達する。これら生理学的な観点から、味は五基本味と呼ばれる、酸味、塩味、うま味、苦味、甘味から構成されている。渋味も、味細胞及び物理刺激で感じる広義の味として食品の味を構成する重要な味として知られている。



Figure 1. Taste sensor (TS-5000Z, Intelligent Sensor Technology, Inc.)

一方、食品化学において、牛肉は、甘味、うま味、コク等の好まれる味質の他に、苦味、渋味（収斂味）といった味質及び「ばさつき」、「しつこさ」といった好まれない要素がある。本研究では、これらの要素を含む味を客観的に評価するために、味覚センサを用いて、和牛の「味」を客観的に数値化及び可視化する手法の確立を目指す。以前から、官能評価と呈味成分分析の結果が一致しない事は深刻な問題点とされており、そこで本研究では味覚センサを用いる事でこの問題点の解決を試みる。

我々が開発した味覚センサ（Fig. 1）は、「味」を数値化できる世界初の装置として知られている。味覚センサの脂質高分子膜は、味物質の受容部として用いられ、脂質、可塑剤、高分子から構成されている。この脂質高分子膜は、生体の舌の細胞を被う生体膜を模倣したものである。味覚センサはこれまでに、ビール、日本酒、お米、肉類、野菜、果物等種々の食品の味の数値化³⁾に成功しているが、肉類に関しては、脂肪がセンサ応答の感度と脂質高分子膜の耐久性に悪影響を及ぼすために、肉の味に重要とされる脂肪を除去して評価を行っているのが現状である。脂肪は、牛肉の

ジューシーさ、滑らかさ、柔らかさなどの食感に影響するといわれており、近年では脂肪交雑が高まっている⁴⁾。従って、脂肪は牛肉のおいしさにおいて重要な要素を占める。近年、味覚センサは、油脂に関しても応答を示し、高い耐久性を有するまでに至った。従って、本研究は、和牛の味に重要な役割を担う脂肪に関しても脱脂する事無く評価可能な技術の構築を目指すものである。

2. 方 法

2.1 50℃での味覚センサ性能評価

味覚センサの味受容部は、脂質、高分子、可塑剤を混合した脂質高分子膜を用いているが、油脂のような疎水性の高い物質に対して吸着し、脂質高分子膜を汚染してしまうといった問題があった。そのため肉類の分析は、濾過や遠心分離を行って油脂を取り除いたサンプルを測定対象としていた。本研究は、和牛の「味」を対象としており、和牛の「味」に重要な役割を持つ油脂を含有した状態で評価する事が望ましい。油脂全体に占める個体脂の割合を百分率で示した個体脂指数（SFI）によると牛肉油脂において、約50℃以上で大部分が溶解する⁵⁾。従って、味覚センサでの

Table 1 Basic samples used in the taste experiments.

試 薬	組 成
基準液	30 mM KCl, 0.3 mM tartaric acid
塩味サンプル	300 mM KCl, 0.3 mM tartaric acid
酸味サンプル	30 mM KCl, 3 mM tartaric acid
旨味サンプル	30 mM KCl, 0.3 mM tartaric acid, 10 mM monosodium glutamate
苦味サンプル	30 mM KCl, 0.3 mM tartaric acid, 0.01 vol% iso-alpha acid
渋味サンプル	30 mM KCl, 0.3 mM tartaric acid, 0.05 wt% tannic acid
洗浄液	100 mM KCl, 10 mM KOH, 30% EtOH

測定を50℃で行う事が可能か否かを評価した。測定には、味覚センサ（味認識装置TS-5000Z, (株)インテリジェントセンサーテクノロジー）及び、センサ電極として塩味、酸味、うま味、苦味、渋味センサ（(株)インテリジェントセンサーテクノロジー）を使用した。測定サンプルは、ヒトの官能閾値の約10倍の味強度を有する各基本五味サンプル溶液（(株)インテリジェントセンサーテクノロジー）を用いた⁶⁾。用いた基本五味サンプル、基準液、洗浄液をTable 1に示した。温度管理を行うために恒温槽で50℃に調節した水を、測定するサンプル溶液のビーカー周りに循環させた。また、測定中のサンプル溶液の蒸発を防ぐために、センサ電極がサンプル溶液に挿入される時（電位計測）以外は蓋をした。

2.2 味覚センサの牛肉油脂に対する影響

油脂を含んだ状態で牛肉を評価するためには、油脂を含んだ基本五味サンプルに対する味覚センサのセンサ応答や耐久性を確認する必要がある。そこで、基本五味サンプルに、牛肉油脂を10wt%になるように混合し、50℃条件下で味覚センサの測定を行った。味覚センサの測定で使用するエタノール含有洗浄液は、測定回数の増加と共に油脂で汚染されることが考えられるため、測定ごとに新しい洗浄液に交換した。

2.3 味覚センサを用いた牛肉の測定

牛肉の測定には、肉質等級A2, A3, A5（和

牛サーロイン）を用いた。サンプル調整は、以下の通り行った。①牛肉を厚さ1 cm×4 cm×5 cmに切断後、室温で1時間解凍した。②フライパンで牛肉表面を60秒、裏面を90秒加熱した。③処理した牛肉及び等量の味覚センサ基準液をフードプロセッサーで1分間ミキシングして混合した。④ガーゼを用いて固形分を除去した。⑤得られたサンプル溶液を5, 10, 100, 1000倍に基準液で希釈し、これらを測定用サンプル溶液とした。味覚センサの測定は50℃で行い、測定ごとに新しいエタノール含有洗浄液を交換し、センサ電極がサンプル溶液に挿入される時以外はサンプル溶液の蒸発を防ぐために蓋をした。

3. 結果と考察

3.1 50℃での味覚センサ性能評価

センサ電極の各味サンプル溶液に対するセンサ応答をFig. 2に示した。塩味センサ及び酸味センサを用いた塩味及び酸味サンプルの測定では、常温での測定と比較してセンサ応答は増加したが、標準偏差から考察すると再現性の高い測定結果を得ることができたといえる。うま味センサを用いたうま味サンプルの測定では、常温での測定と比較して増加したものの、再現性の高い測定結果を得ることができたといえる。苦味センサを用いた苦味サンプルの測定では、常温での測定と同程度のセンサ応答及び高い再現性が得られた。渋味セ

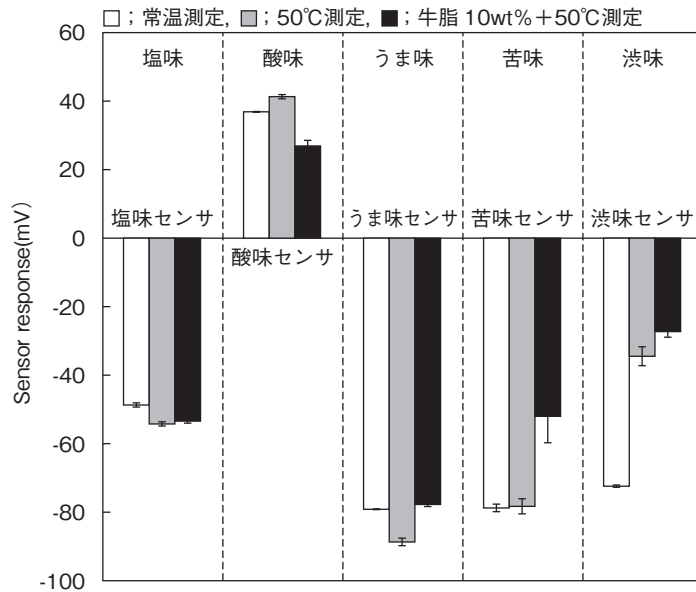


Figure 2 Sensor responses of sensor electrodes to each taste substance.

ンサを用いた渋味サンプルの測定では、常温での測定と比較してセンサ応答が半減した。以上により、味覚センサの50℃での使用は、渋味センサを除いて十分に使用可能なセンサ性能を有する事が示され、油脂を溶解した状態での測定が可能である事が示唆された。また、渋味センサに関しては、センサ応答が半減したものの、温度補正を行う事で使用できると考えられる。

3.2 味覚センサの牛肉油脂に対する影響

牛肉油脂が味覚センサに与える影響を評価するため、基本五味サンプルに牛肉油脂10wt%を添加し、50℃条件下での測定を行い、油脂を含まない50℃での測定と比較した (Fig. 2)。塩味センサを用いた塩味サンプル+牛肉油脂の測定では、センサ応答や安定性に影響を与えないことが分かった。よって、塩味センサは、油脂に影響を受けないといえる。酸味センサを用いた酸味サンプル+牛肉油脂では、標準偏差は低いもののセンサ応答は約35%低下した。うま味センサを用いたうま味サンプル+牛肉油脂では、標準偏差は低いもの

のセンサ応答は約12%低下した。苦味センサを用いた苦味サンプル+牛肉油脂では、標準偏差は高く (変動係数15%) センサ応答は約34%低下した。標準偏差が高かった理由としては、苦味センサの脂質高分子膜の疎水性成分と油脂の疎水性度との相互作用による影響が考えられる。渋味センサを用いた渋味サンプル+牛肉油脂では、標準偏差は低く、センサ応答は約22%低下した。従って、酸味センサと旨味センサは、センサ応答が減少したものの、標準偏差からセンサは安定しているといえ、油脂を含む測定サンプルを測定可能であることが示唆された。また、本測定の終了後、油脂を含まない基本五味サンプルで測定を行った結果、渋味センサ以外のセンサにおいて、センサ応答が回復したことから、油脂に対するセンサの耐久性を確認でき、繰り返し使用可能であることが分かった。

3.3 味覚センサを用いた牛肉の測定

サンプル調整した各肉質等級を基準液で希釈 (5, 10, 100, 1000倍) し、味覚センサの測定を

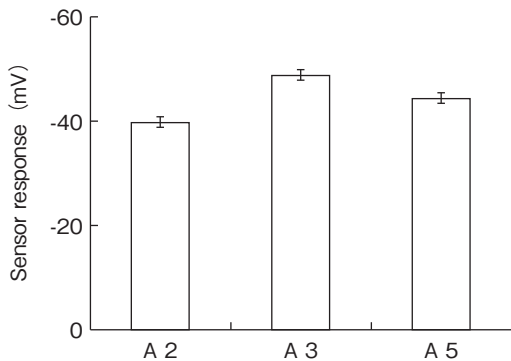


Figure 3 Sensor response of umami sensor to wagyu.

行った結果、5、10倍に希釈したサンプルではセンサ応答が飽和しており、100倍希釈したサンプルにおいて、味覚センサの測定範囲内の応答電位におさまった。従って、味覚センサを用いた牛肉サンプルの評価は、100倍程度希釈する必要がある事が分かった。

塩味、酸味、苦味、渋味センサは、肉質等級によらず数mV程度しかセンサ応答が得られなかった。今後、官能検査を実施し、各味質強度を確認する必要がある。うま味センサのセンサ応答をFig. 3に示した。A 2, A 3, A 5のうま味センサの応答（平均値±標準偏差）はそれぞれ -40.0 ± 1.1 mV, -49.1 ± 1.7 mV, -44.5 ± 0.96 mVであった。従って、うま味強度は、 $A 3 > A 5 > A 2$ という関係であることが示され、牛肉の味評価においてうま味センサが有望なセンサとして用いられることが示唆された。今後は、本結果を確認するために官能検査を実施する必要があると考えられる。また、酸味センサは、サンプルのpHが中性領域において、うま味センサとよく似た結果が得られることが分かっているが、本測定サンプルにおいても、うま味センサと同様のセンサ応答を示した。これは、牛肉に酸味を感じないというヒトの官能から容易に想像できることであると考えられる。

4. 要 約

本研究は味覚センサを利用して、和牛の「味」を客観的に数値化、可視化する評価技術の構築を目的とし、50℃での味覚センサ性能評価、味覚センサの牛肉油脂に対する影響の確認、味覚センサを用いた牛肉の測定を実施した結果、下記3点が明らかとなった。

- ①油脂が溶解する50℃条件において、味覚センサを使用することが可能であること、
- ②牛肉油脂を含むサンプルの測定において、塩味、酸味、うま味センサを使用することが可能であること、
- ③味覚センサの測定において、うま味強度は、 $A 3 > A 5 > A 2$ という関係を有する。

従って、本研究により味覚センサを用いた和牛の「味」の数値化と可視化技術の構築の実現可能性が示された。今後は、牛肉測定のための苦味及び渋味センサのセンサ性能の向上を行う必要があると共に、官能検査を実施し、味覚センサとヒトの官能の相関を確認する予定である。

謝辞

本研究で用いた和牛は、伊藤ハム株式会社様からご提供頂いた。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) K. Toko: Biomimetic Sensor Technology, Cambridge University Press, UK, 2000.
- 2) Y. Tahara, K. Toko: *IEEE Sensors Journal*, 13 (8), 3001~3011, 2013.
- 3) K. Toko (ed): Biochemical Sensors, Pan Stanford Publishing, Singapore, 2013.
- 4) 沖谷 明紘: 栄養学雑誌, 60 (3), 119~129, 2002.
- 5) 兼松 弘, 木下葉子, 新谷 助, 松本太郎: 油化学, 28 (5), 344~347, 1979.
- 6) Y. Kobayashi, M. Habara, H. Ikezaki, T. Chen, Y. Naito, K. Toko: *Sensors*, 10 (4), 3411~3443, 2010.

牛肉に関する健康指標の策定と赤身牛肉の消費者ニーズ調査

Development of healthy beef index and consumer needs survey for lean beef

広 岡 博 之

(京都大学大学院農学研究科)

Hiroyuki Hirooka

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Three types of approaches (carcass data analysis, data analysis of fatty acid profiles and healthy beef indexes, and internet questionnaire-based study) were conducted to investigate the characteristics and consumers' needs of lean beef. Carcass and fatty acid data of ten grass-fed Japanese Brown steers were used as an example of lean beef. The results from carcass data analysis showed that grass-fed steers produced smaller carcass weight and rib eye area, thinner rib-thickness, lower beef marbling standard number (BMS number) than concentrate-fed steers of the same breed kept in conventional farm conditions. About 100 yen cheaper carcass unit price of the grass-fed were predicted from the multiple regression equation derived from carcass data of concentrate-fed steers. Moreover, the dark red meat and yellow fat colors of grass-fed steers may lead to further discount of the price. For fatty acid profiles and healthy beef indexes, grass-fed Japanese Brown steers had a lower n-6 to n-3 fat ration and higher conjugated linoleic acid (CLA) content when compared with other breeds (Japanese Black, Holstein and their crossbreds raised in conventional systems, indicating that beef from grass-fed Japanese Brown steers may have positive impact on human health for the two indicators. In contrast, the atherogenicity index and thrombogenicity index of grass-fed Japanese Brown steers were significantly lower than those of Japanese Black steers, which indicated that there was no advantage of beef from grass-fed Japanese Brown steers on human health for the two indexes. These results revealed diverse impacts of beef from various breeds and production systems on human health. Finally, it was shown from internet questionnaire-based study that consumers in Kumamoto Prefecture (520 respondents) were willing to pay about 1.55 times for purchasing Japanese Brown lean beef as high as beef which they purchase everyday. Further, the payments were influenced by age and classification by perceptions on beef (Japanese Brown oriented, social factor oriented and health oriented) of respondents.

1. 目 的

近年、わが国では、成人病に対する医療コスト

が増大し、その多くが食生活に関係していると考えられている。牛肉をはじめとする畜産物は、戦後、貴重な蛋白源として日本人の栄養向上に大き

く貢献してきたが、最近では、牛肉は相対的に脂肪分が多く、カロリーが高いため、健康に悪い食品と評価されがちである。

熊本県では、大陸からたびたび輸入された韓牛（朝鮮牛）が在来牛として古くから飼養されていたが、これらの在来牛は一般に、粗飼料利用性に優れ、温厚な性質で役牛としては適していたが、体格は小さく後駆が貧弱であった¹⁾。そこで明治中期から大正にかけてシンメンタル種との交配による改良が行われ、その後、褐毛和種は1944年に品種として公式に成立してから現在までも定期的に改良目標の改定を重ねながら、産肉能力の改良が推進されてきた²⁾。

これまでわが国では脂肪交雑を重視した黒毛和種中心の肥育が行われ、枝肉市場では脂肪交雑の優れた黒毛和種の枝肉は高価で取り引きされてきたが、そのような枝肉市場において、褐毛和種の枝肉は、脂肪交雑が劣るため低く評価され、生産農家の収益は少なく、近年、褐毛和種の飼養頭数は大幅に減少してきている。しかし、今後、褐毛和種のような品種に関しては、いたずらに脂肪交雑の向上を期待するよりは、優れた放牧適性を活かして放牧主体の新しい肥育生産体系を構築し、赤身牛肉生産をめざす選択肢もあるのではないかと考えられる。さらに、もしそのような牛肉が人の健康にプラスの影響があると科学的に証明できれば、ヘルシーな牛肉を望む消費者のニーズに応えることができ、新たな市場が生まれることも期待できる。

そこで、本研究では、第1に放牧肥育で生産された褐毛和種牛肉の枝肉市場での評価の可能性を検討し、第2に褐毛和種放牧肥育牛肉の脂肪酸組成およびヘルシー牛肉の指標を他の品種と比較し、第3に、インターネットアンケートを褐毛和種の産地である熊本県で実施し、消費者の赤身牛肉に対するニーズと褐毛和種牛肉へ支払意思額な

どを調べることを目的とした。

2. 方 法

本研究では、以下の3つのアプローチを用いて褐毛和種放牧肥育の可能性を検討した。

2.1 褐毛和種放牧肥育牛の枝肉形質と市場価値

熊本県阿蘇にある熊本県農業研究センター畜産草地研究所において配合飼料給与のもとで通年放牧され、冬場（11月から3月）に乾草を給与された褐毛和種放牧肥育去勢牛10頭の枝肉成績を用いた。本研究では、このような放牧肥育牛の枝肉成績の特徴を明らかにするために、フィールド後代検定用に濃厚飼料中心に舍飼い肥育された294頭の褐毛和種去勢牛の枝肉形質（BMSナンバ、枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚および肉色、脂肪色など）との比較を行った。草地畜産研究所で飼育された褐毛和種放牧肥育牛の枝肉価格は、枝肉市場では得られなかったもので、褐毛和種のフィールド検定成績から枝肉形質から枝肉単価を予測する重回帰式を求め、褐毛和種放牧肥育去勢牛の枝肉形質を用いて枝肉単価を求めた。

2.2 脂肪酸組成とヘルシー指標

2.1で用いた放牧肥育されている褐毛和種去勢牛10頭の枝肉から得たロース部位を磨砕し、ソックスレー法によりエーテル抽出した後に、0.5N水酸化ナトリウムメタノール溶液でケン化後、B-Fメタノール溶液でメチルエステル化し、その後、ガスクロマトグラフにより分析した。得られた脂肪酸組成から、特にオレイン酸（C18：1）、 α リノレン酸（C18：3）、オメガバランス（n-6系脂肪酸／n-3系脂肪酸；ここではリノール酸とリノレン酸の比）、共役リノール酸（CLA）、アテローム生成指標、血栓形成指標に注目し、これらの数値を算出して、すでに我々が

アテローム生成指標 $AIND = (4 \times \text{ミリスチン酸 (C14:0)} + \text{パルミチン酸 (C16:0)}) \div (\text{多価不飽和脂肪酸合計} + 1 \text{ 価不飽和脂肪酸合計})$, **血栓形成指標** $TIND = (\text{ミリスチン酸 (C14:0)} + \text{パルミチン酸 (C16:0)} + \text{ステアリン酸 (C18:0)}) \div (0.5 \times (1 \text{ 価不飽和脂肪酸合計} + n - 6 \text{ 系多価不飽和脂肪酸} + 3 \times (n - 3 \text{ 系多価不飽和脂肪酸合計} + \text{オメガバランス}))$

脂肪酸組成データベースとして収集・蓄積している黒毛和種、ホルスタイン種、交雑種の数値（広岡、未発表）と比較し、褐毛和種放牧肥育牛の脂肪酸組成と健康指標に関する特徴を明らかにした。なお、アテローム生成指標と血栓形成指標は上記の式によって求めた³⁾。

2.3 消費者ニーズ調査

調査はインターネットアンケート会社のマクロミルに依頼し、熊本県に在住の男女を対象に、2013年11月14日から2013年11月18日にかけてインターネットアンケートを実施し、20歳以上の男女520人を性別、年齢層（20歳代、30歳代、40歳代、50歳代、60歳以上）別に、できる限り均等な人数

になるようランダムに抽出した。本研究では褐毛和種の認知度と普段の牛肉の購買価格、放牧赤身肉や褐毛和種牛肉へ支払意思額を聞き、さらに褐毛和種牛肉を食した経験を持つ消費者には褐毛和種牛肉に対する印象を聞いた。

赤身牛肉や褐毛和種牛肉に対する消費者の価値観は、以下に示すプレミアム指数によって数値化した。すなわち、まず普段購買している牛肉の値段（購買価格）について、98円から2000円以上までの16段階（100 g 当たり金額）で回答を得た後、分析対象とする放牧赤身肉や褐毛和種の牛肉の購買に対する支払意思額を聞き取るために、以下のような簡単な説明を行なった。

放牧赤身肉に関する支払意思

日本では従来、牛肉は霜降りが多いほど美味しく、高級である、とされてきました。そのため、現在の牛肉生産では出荷前に牛に多量の脂肪をつけるため、とうもろこしなどの穀物の飼料を給与するのが一般的です。しかし近年では、脂肪分の多い牛肉を食べることによる健康への影響から、霜降り重視の牛肉生産が見直され、赤身肉本来の美味しさが味わえる牛肉の生産に注目が集まっています。また、多量の穀物飼料給与による牛への影響や飼料の生産にかかる費用の問題から、放し飼（放牧）の環境下で牧草を自由に食べさせる牛肉生産をする農家が増えていきます。

上記のような牛肉が販売された場合、いくらまでなら普段購入する牛肉より高くても購入しますか。100 g あたり追加の金額（税込）をお答えください。※購入されない場合は『0円』とお答えください。

● 普段購入する牛肉100 g あたりの金額に追加で

☐ 円、高くても購入する（半角数字）

褐毛和種に関する支払意思

褐毛和種（あか牛とも呼ばれる）という品種の牛が、熊本県を中心に飼養されています。褐毛和種は放牧に適し、性格がおとなしく飼育しやすいという特性を持っています。また、肉質は赤身が多く、適度な脂肪分も含み、赤身肉本来のうま味とやわらかさ、ヘルシーさを兼ね備えています。

上記のような特徴を持つ褐毛和種牛肉が販売された場合、いくらまでなら普段購入する牛肉より高くても購入しますか。

100 g あたり追加の金額（税込）をお答えください。※購入されない場合は『0円』とお答えください。

【必須入力】

● 普段購入する牛肉100 g あたりの金額に追加で

☐ 円、高くても購入する（半角数字）

このような放牧赤身肉と褐毛和種牛肉に対して、いくらまでなら普段購買している牛肉より高くても購入するか（支払意思額）を自由回答（100 g 当たり金額）で質問し、広岡⁴⁾の手法に基づき、以下の式から褐毛和種のプレミアム指数を算出した。

プレミアム指数

$$= (\text{購買価格} + \text{支払意思額}) / \text{購買価格}$$

ここで、たとえばプレミアム指数が1.4ということは、消費者は40%までそのような牛肉を高く購買してもよいという意味を持っていることを表している。

次に褐毛和種を食した経験のある消費者（361名）に、褐毛和種牛肉の印象に関する8種の質問（「ジューシーで柔らかい」、「適度な歯ごたえがある」、「コクのある味わいがある」、「赤身肉本来の旨さが味わえる」、「脂肪が少なく、さっぱりしている」、「ヘルシーである」、「価格が高い」、「なかなか手に入らない」）を行い、各質問項目に関して6段階の評価（「非常にそう思う」から「まったくそう思わない」まで）の回答を得た後に、それらの数値を主成分分析し、主成分スコアを算出した。

最後に、日頃の牛肉購買価格と赤身肉プレミアム指数、褐毛和種プレミアム指数に關与する要因を特定するために、最小2乗分散分析を行った。最小2乗分散分析においては、性別と年齢層を母数効果、個々の主成分因子を共変量として取り上げた。

3. 結果と考察

3.1 褐毛和種放牧肥育牛の枝肉形質と市場価値

Table 1 は、本研究で用いた褐毛和種の放牧肥

Table 1 Comparison of carcass traits between grass-fed and concentrate-fed Japanese Brown steers

	Grass-fed	Concentrate-fed
Number of animal	10	294
Slaughter age (month)	27.1	25.3
Carcass weight (kg)	427.0 ± 28.4	470.0 ± 41.8
BMS number	2.2 ± 0.4	3.2 ± 0.9
Rib-eye-area (cm ²)	42.3 ± 5.6	50.0 ± 6.8
Rib thickness (cm)	6.6 ± 0.5	7.1 ± 0.7
Fat thickness (cm)	2.2 ± 0.2	2.7 ± 0.8
Meat color (BCS)	5.2 ± 0.6	3.9 ± 0.5
Fat color (BFS)	6.0 ± 0.7	2.8 ± 0.4
Carcass unit price (yen/kg)	1058 ± 67 ^a	1159 ± 184

a: Predicted from the multiple regression equation

育牛とフィールド後代検定用の慣行肥育去勢牛の枝肉形質を比較したものである。放牧肥育牛は、出荷月齢が進んでいるにもかかわらず、枝肉重量やロース芯面積が小さく、バラが薄く、BMSナンバーも低いことが示された。また、放牧肥育牛の枝肉単価は求められていないため、慣行肥育牛の枝肉成績から求められた重回帰式（下記に示す）から、枝肉単価を予測したところ、1058円となり、慣行肥育牛よりも100円程度安価になると考えられた。なお、下式でCWTは枝肉重量（kg）、REAはロース芯面積（cm²）、RTはバラの厚さ（cm）、SFTは皮下脂肪厚（cm）、BMSはBMSナンバーを示し、回帰係数のアスタはその係数がゼロであるかどうかの検定結果である。

3.2 脂肪酸組成

Table 2 は、放牧肥育褐毛和種去勢牛の脂肪酸組成および健康指標について、同じ大規模企業体農家で濃厚飼料主体で舎飼い飼養された黒毛和種、ホルスタイン種およびそれらの交雑種の数値と比較した結果である。特に人間の健康と関連性が高いと考えられている項目に関して検討する

$$\text{重回帰式 枝肉単価 (円/kg)} = 966.7 - 1.13^{**}\text{CWT} + 3.90^{*}\text{REA} + 32.66^{**}\text{RT} - 36.16\text{SFT} + 123.95^{**}\text{BMS}$$

Table 2 Comparison of fatty acid composition and healthy beef indicators of grass-fed Japanese Brown steers with steers of other breeds under conventional fattening systems

		Holstein	F 1	Japanese Black	Grass-fed Japanese Brown	
Number of animal		20	9	9	10	
Slaughter Age (days)		647.4	747.3	914.2	828.9	
Carcass weight (kg)		451.4	492.4	518.1	427	
Myristic	C 14 : 0	2.83 ^{ab}	3.20 ^a	2.29 ^b	2.52 ^b	
Pentadecanole	C 15 : 0	1.05 ^b	1.35 ^a	1.11 ^a	0.27 ^c	
Palmitic	C 16 : 0	27.55 ^a	27.83 ^a	23.78 ^b	26.72 ^a	
Palmitoleic	C 16 : 1	3.22 ^b	3.69 ^a	3.84 ^a	2.83 ^b	
Margaric	C 17 : 0	0.81 ^b	0.76 ^b	0.73 ^b	0.75 ^b	
Margaoleic	C 17 : 1	0.64 ^b	0.62 ^b	0.86 ^a	0.49 ^c	
Stearic	C 18 : 0	11.94 ^b	9.83 ^c	9.41 ^c	14.34 ^a	
Oleic	C 18 : 1	44.66 ^b	46.15 ^b	51.49 ^a	44.22 ^b	
Elaidic	t9-C18 : 1	0.22 ^a	0.18 ^{ab}	0.17 ^b	0.21 ^{ab}	
Trans-vaccenic	t11-C18 : 1	0.80 ^b	0.68 ^{bc}	0.55 ^c	1.10 ^a	
Linoleic	C 18 : 2	2.07 ^a	1.85 ^{ab}	1.77 ^{abc}	1.40 ^c	
Linolenic	C 18 : 3	0.13 ^b	0.09 ^c	0.10 ^{bc}	0.27 ^a	
Arachidic	C 20 : 0	0.061 ^b	0.057 ^b	0.056 ^b	0.101 ^a	
lccenoic	C 20 : 1	0.15 ^c	0.26 ^b	0.37 ^a	0.19 ^{bc}	
Saturated fatty acid		SFA	45.46 ^a	44.24 ^a	38.59 ^b	46.40 ^a
Monounsaturated fatty acid		MUFA	50.91 ^b	52.27 ^b	57.88 ^a	49.73 ^b
Polyunsaturated fatty acid		PUFA	2.87	2.62	2.62	2.90
Omega balance		n-6:n-3	17.18 ^a	20.63 ^a	17.76 ^a	5.32 ^b
Conjugated linoleic acid		CLA	0.344 ^b	0.386 ^b	0.384 ^b	0.865 ^a
Atherogenicity index		AIND	0.735 ^a	0.677 ^b	0.565 ^c	0.702 ^{ab}
Thrombogenicity index		TIND	1.574 ^a	1.499 ^a	1.181 ^b	1.648 ^a
Fat content			7.8 ^c	17.0 ^b	34.2 ^a	10.4 ^c
Melting point			35.6 ^a	33.1 ^b	27.6 ^c	37.4 ^a

Comparisons within a row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$

と、褐毛和種放牧肥育牛は共役リノール酸 (CLA) の割合が高く、オメガバランスの数値が低いことから、これらの指標については、人間の健康に対してプラスの影響のあることが示唆された。最近、放牧牛と慣行飼育牛の脂肪酸組成を比較した研究が国内外でいくつか報告されているが、中村ら⁵⁾は、褐毛和種肥育牛のオメガバランスは慣行肥育牛と比べて大幅に低いと報告しており、本研究の結果は、中村ら⁵⁾の結果とよく一致

していた。海外の報告を見ると、Daleyら⁶⁾は、本研究結果と同様に放牧牛は舎飼い牛と比べて共役リノール酸の割合が高く、オメガバランスが低いと報告している。また、最近、Bjorklundら⁷⁾は、乳用種において放牧肥育牛と有機肥育牛、慣行舎飼い肥育牛の牛肉の脂肪酸組成を比較し、放牧肥育牛のオメガバランスは舎飼い肥育牛や有機肥育牛よりもかなり低いと報告している。

他方、褐毛和種放牧肥育牛のアテローム生成指

Table 3 Eigenvectors obtained from principal component analysis for consumers' perception on Japanese Brown beef

Question	PC 1	PC 2	PC 3
Juiciness and tenderness	0.36	0.10	-0.62
Resilient	0.39	-0.05	-0.13
Rich taste	0.42	-0.02	-0.27
Delicious lean	0.42	-0.12	-0.08
Flinty	0.40	-0.28	0.36
Healthy	0.37	-0.24	0.53
Expensive	0.22	0.68	0.10
Difficult to obtain	0.16	0.68	0.32
Proportion	0.52	0.17	0.08
Cumulative proportion	0.52	0.69	0.77

数と血栓形成指数は、ホルスタイン種と同程度で、黒毛和種と比べて数値が高かった。一般に、アテローム生成指数と血栓形成指数は数値が高いほどこれらの疾病に罹患しやすいと考えられているため、褐毛和種放牧肥育牛の牛肉は、黒毛和種の牛肉と比べて健康面で劣ると推察された。このような結果が得られたのは、これらの指数の大きさは計算式の分母の不飽和脂肪酸の割合、特にオレイン酸割合に大きく依存しており、オレイン酸の割合が高かった黒毛和種の牛肉はこれらの指数が低くなったためと考えられた。

3.3 アンケート調査結果

牛肉の購買価格、放牧赤身肉プレミアム指数、褐毛和種牛肉プレミアム指数の平均値はそれぞれ、362円、1.47、1.55で、熊本県の消費者は放牧赤身牛肉および褐毛和種牛肉を日頃購買している牛肉よりもそれぞれ、約47%および55%高く購買してもよいと考えていることが明かとなった。

また、熊本県の消費者520名のうち、褐毛和種牛肉を食した経験のある消費者は361名で、全体の69%であった。年代別にみると、50代までは、年齢が上がるにつれて褐毛和種の牛肉を食した経験のある消費者が増加し、50代では約80%の消費

者が褐毛和種を食べた経験を持っていたが、20代では約60%にとどまっていた。

褐毛和種牛肉を食した経験のある消費者を対象に、食した牛肉に対する印象を主成分分析した結果を示したものがTable 3である。第1主成分はいずれの項目とも正の相関があるため、「褐毛和種高評価因子」と名付けた。すなわち、この主成分のスコアが大きいほど褐毛和種に関する評価が高いと考えた。なお、「高価格」と「入手困難」の2項目はどちらかといえば負のイメージに見えるが、高価格でしかも入手困難とする印象は、希少性を表す意識と考えれば、褐毛和種牛肉を高く評価していると考ええることも可能である。次に、第2主成分は「高価格」と「入手困難」と正の相関を持っており、褐毛和種牛肉の味に関する印象ではなく、いずれも社会的要因と関連するものなので、「社会的要因重視因子」と名付けた。第3の主成分は、ヘルシーさとのみ強く関連していたため、「健康重視因子」と名付けた。これら3種の主成分スコアによって全体のばらつきが76%説明されたため、本研究ではこの3主成分スコアのみを取り上げて後の分析に利用した。

Table 4は、購買価格、放牧赤身牛肉と褐毛和種牛肉のプレミアム指数に対する性別、年齢層および3種の主成分スコアの影響を調べた結果である。いずれの項目に対しても年齢層の効果は有意で、年齢が上がるにつれて、牛肉の購買価格は上昇し、その一方で、いずれのプレミアム指数も低下した。牛肉の購買価格が増加したのは、年齢が上がるにつれて所得が向上し、高い牛肉を購買する割合が増えたためと考えられ、またプレミアム指数の低下は高齢層ほど日頃高価な牛肉を購買しているため、褐毛和種牛肉への支払意思額が相対的に低くなって、結果としてプレミアム指数が低下したのと考えられた。

主成分成分スコアの影響に関しては、第1主

Table 4 Least squares means by the effects on purchased price of beef, premium index ⁺ for lean beef and premium index for Japanese Brown beef

	Purchased price	Premium index for lean beef	Premium index for Japanese Brown beef
Gender	*		
Male	405.1 ^a	1.51	1.62
Female	352.9 ^b	1.46	1.51
Age group	**	**	**
20 s	327.6 ^c	1.65 ^a	1.65 ^a
30 s	313.7 ^c	1.54 ^{ab}	1.54 ^{ab}
40 s	353.0 ^{bc}	1.49 ^{abc}	1.49 ^{abc}
50 s	404.7 ^b	1.33 ^c	1.33 ^c
60s and/or over	495.1 ^a	1.41 ^{bc}	1.41 ^{bc}
Regression coefficient for principle component			
Japanese brown oriented	1.7	0.028	0.043**
Social factor oriented	-28.1**	0.107**	0.072**
Health oriented	-5.7	-0.092*	-0.134**

⁺ : Premium index was obtained as (everyday beef purchased price + willing-to-pay value)/everyday beef purchased price

* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

abc : Comparisons within a row with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$

成分の褐毛和種高評価因子の影響は褐毛和種プレミアム指数のみにおいて有意であった。このことから、褐毛和種牛肉を高く評価する消費者ほど褐毛和種の牛肉を高く購買してもよいと考えていることがうかがえた。第2主成分である社会的要因重視因子に関しては、いずれの項目に対しても有意に影響し、価格や入手の困難さなどの社会的要因を重視する消費者ほど、牛肉を安価で購買し、放牧赤身牛肉や褐毛和種牛肉に対する支払意思の高いことが示された。第3主成分の健康重視因子は、放牧赤身肉と褐毛和種のいずれのプレミアム指数もマイナスの影響を及ぼすことが示された。この結果は予想外で、そもそも、放牧赤身牛肉や褐毛和種の牛肉は人間の健康に良いことを一つの利点として販売しようと考えられていたが、これらの牛肉に対する消費者の意識は、むしろ高付加価値のある牛肉と認識していることが明らかとなった。この結果は、われわれ畜産関係者が考えていることと消費者の意識の乖離を示すもので、

今後、褐毛和種放牧肥育牛の牛肉の販売には、品質のさらなる向上と緻密な経営戦略、消費者への十分な情報伝達の必要なことが示唆された。

4. 要 約

本研究では、褐毛和種放牧肥育の牛肉の市場価値と人間の健康影響および消費者ニーズを調べるために、褐毛和種の放牧肥育牛と慣行肥育牛の枝肉成績の比較、脂肪酸組成に関する他品種との比較およびインターネットアンケート調査データの分析の3つのアプローチを実施した。分析対象として10頭の褐毛和種放牧肥育去勢牛の枝肉成績と脂肪酸組成のデータを用いた。枝肉成績の比較結果から、慣行肥育牛の枝肉成績と比べて、放牧肥育牛は枝肉重量とロース芯面積が小さく、バラは薄く、BMSナンバーが低く、さらに放牧肥育牛の枝肉単価を重回帰式によって枝肉形質から求めたところ、慣行肥育牛よりも100円程度安価になると予測された。しかも、褐毛和種放牧肥育牛の

牛肉は、肉色が濃く、脂肪色が黄色であるため、現実にはさらに安価になる可能性も考えられた。脂肪酸組成と健康指標に関しては、放牧肥育牛はオメガバランス（n-6系脂肪酸とn-3系脂肪酸の比）が低く、共役リノール酸割合が高いことから、これらの指標に関しては人の健康にプラスの影響があると推察されたが、他方、アテローム生成指数や血栓形成指数に関しては、黒毛和種の牛肉と比べて数値が有意に高く、人の健康に対する評価は黒毛和種より劣ることが示唆された。インターネットアンケートの結果、熊本県の消費者は褐毛和種の牛肉に対して、日頃購買している牛肉よりも1.5倍以上高く購買してもよいと考えており、高価でなかなか手に入らない希少性を評価していることがうかがえた。

謝辞

本研究を進めるに当たり、熊本県農業研究センター畜産草地研究所の家入誠二所長と堺久弥氏に貴重な枝肉成績のデータを使わせていただいた。ここに感謝する。

参考文献

- 1) 古賀脩, 岡本悟: 畜産の研究, 39, 116~128. 1985.
- 2) 住尾善彦: 動物遺伝育種研究, 35, 141~146. 2007.
- 3) Ulbricht TLV, Southgate DAT: *Lancet*, 338, 985~992. 1991.
- 4) 広岡博之: 畜産の情報, 276, 57~62. 2012.
- 5) 中村好徳, 金子真, 林義明, 荅博之, 山田明史: 日本暖地畜産学会報, 55 (2), 179~192. 2012.
- 6) Bjorklund EA, Heins BJ, DiCostanzo A, Chester-Jones H: *Journal of Dairy Science*, 97, 1828~1834. 2014.
- 7) Daley CA, Abbott A, Doyle PS, Nader GA, Larson S: *Nutrition Journal*, 9, 10. 2010.

豚血液由来抗肥満素材による内臓脂肪蓄積抑制機構の解明

Anti-obese action of a porcine blood-derived food ingredient

上 曾 山 博

(神戸大学大学院農学研究科)

Hiroshi Kamisoyama

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

It is well known that edible meat products and by-products are notable sources of essential nutrients such as protein, minerals, and vitamins. However, there is little attention to the biological functions of these products. In Japan, blood is not usually used as a food material, and therefore, has been wasted as a by-product. In the present study, we have investigated the effects of dietary heme iron on the lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice. Dietary heme iron tended to increase the relative weight of gastrocnemius muscle and decrease the relative weight of perirenal adipose tissue in high-fat diet-induced obese mice. The plasma levels of triglyceride and nonesterified fatty acid were not affected by heme iron. Dietary heme iron significantly increased the levels of the mRNA of carnitine palmitoyltransferase-1b and uncoupling protein 2 in the soleus muscle. These results suggest that the natural ingredient heme iron promotes fatty acid oxidation in the muscle, which in turn, results in the decrease of abdominal fat in the high-fat diet-induced obese mice.

1. 目 的

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

の「抗肥満」の重要性は更に高まると判断される。

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

Table 1 Composition of experimental diets

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

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

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

の食品素材として用いられてきた豚の血球画分を酵素分解して得られる水溶性ヘム鉄の給与は、高脂肪食肥満マウスの精巣上体周囲脂肪組織重量を減少させる傾向を示す¹⁾。また、その効果は、3 %という低い添加率で認められることから、水溶性ヘム鉄は、鉄分補給用途に加え、抗肥満用途の食品素材としても利用できる可能性があると判断された。しかしながら、その詳細な作用機構については明らかにされていない。

本研究では、畜産副生物である血液の食品素材としての利用法拡大のための一環として、水溶性ヘム鉄の内臓脂肪蓄積抑制機構を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

水溶性ヘム鉄を0 或いは3 %含む高脂肪食飼料 (Table 1) を5 週齢のICRマウス (日本エスエル

Table 2 Primers used for quantitative RT-PCR

RPS17	Forward	5'- CCG GGT CAT CAT CGA GAA GT -3'
	Reverse	5'- GCG CTT GTT GGT GTG GAA GT -3'
FAS	Forward	5'- GAS AGC TTG GCA CAG TGC AA -3'
	Reverse	5'- CAC CCA TGG ATC ACC ACA AA -3'
CPT-1a	Forward	5'- GAA CCC CAA CAT CCC CAA AC -3'
	Reverse	5'- TCC TGG CAT TCT CCT GGA AT -3'
ATGL	Forward	5'- CCT CAG GAC AGC TCC ACC AA -3'
	Reverse	5'- TTG AAC TGG ATG CTG GTG TTG -3'
UCP1	Forward	5'- TGT TCA TTG GGC AGC CTA CA -3'
	Reverse	5'- TGG CTC TGG GCT TGC ATT -3'
CPT-1b	Forward	5'- GTG CAA GCA GCC CGT CTA G -3'
	Reverse	5'- TTG CGG CGA TAC ATG ATC AT -3'
UCP2	Forward	5'- TGA TGT GGT CAA GAC GAG ATA CAT G -3'
	Reverse	5'- CAG TGA CCT GCG CTG TGG TA -3'
UCP3	Forward	5'- TTT TGC GGA CCT CCT CAC TT -3'
	Reverse	5'- TGG ATC TGC AGA CGC ACC TT -3'
HSL	Forward	5'- GGC GAA AAG GCA AGA TCA AA -3'
	Reverse	5'- CAT CGT GCG TAA ATC CAT GCT -3'
LPL	Forward	5'- GAT GGA CGG TAA CGC GAA TG -3'
	Reverse	5'- TAC AGG GCG GCC ACA AGT -3'

シー株式会社)に4週間給与した。試験飼料給与期間中は、摂食量を毎日測定し、体重を毎週測定した。24時間絶食後、イソフルラン麻酔下で腹部大静脈より採血し、血漿を分離後、市販のキット(ラボアッセイ™ NEFA, ラボアッセイ™ トリグリセリド:和光純薬工業株式会社)を用いてトリグリセリド(TG)および遊離脂肪酸(NEFA)の血中濃度を測定した。また、肝臓重量、腹部脂肪(精巣上体周囲脂肪および腎周囲脂肪)重量、褐色脂肪組織重量、腓腹筋重量およびヒラメ筋重量を測定した。さらに、脂質代謝関連臓器組織として肝臓、脂肪組織、筋肉および褐色脂肪組織からセバゾール®RNA I(ナカライテスク株式会社)を用いて総RNAを抽出し、脂肪合成あるいは分解関連遺伝子の発現を7300 Real Time PCR System(アプライドバイオシステムズジャパン株式会社)およびTHUNDERBIRD® SYBR®qPCR Mix(東洋紡績株式会社)を用いたリアルタイムPCRにより解析した。リアルタイムPCRに用いたプライマーはTable 2に示した。統計解析はスチューデントの*t*検定により行った。

3. 結 果

ヘム鉄の給与はマウスの体重、摂食量、肝臓重量、褐色脂肪組織重量、精巣上体周囲脂肪組織重量には影響を及ぼさなかったが、腎周囲脂肪組織重量を減少させ、腓腹筋重量を増加させる傾向を示した(Fig. 1)。血中のTG濃度(対照群 72.4 ± 7.6 mg/100mlに対し、ヘム鉄給与群 61.0 ± 6.41 mg/100ml)およびNEFA濃度(対照群 0.50 ± 0.05 μ Eq/100mlに対し、ヘム鉄給与群 0.47 ± 0.09 μ Eq/100ml)には有意な差は認められなかった。

肝臓において、脂肪酸合成の律速酵素である脂肪酸合成酵素(FAS)、および、脂肪酸酸化の律速酵素であるカルミチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)-1aのmRNA量には、ヘム鉄給

与による有意な差は認められなかった(Fig. 2)。褐色脂肪組織における脂肪酸酸化関連遺伝子である脱共役タンパク質(UCP)1のmRNA量にも有意な差は認められなかった(Fig. 2)。

精巣上体周囲脂肪組織における脂肪分解関連遺伝子である脂肪組織TGリパーゼ(ATGL)、および、脂肪酸の脂肪組織への取り込みの律速酵素であるリボタンパク質リパーゼ(LPL)のmRNA量にはヘム鉄給与による有意な差は認められなかったが、ホルモン感受性リパーゼ(HSL)のそれには増加傾向が認められた(Fig. 2)。

ヒラメ筋においては脂肪酸酸化の律速酵素であるCPT-1b、および、脂肪酸酸化関連遺伝子であるUCP2のmRNA量に水溶性ヘム鉄給与による有意な増加が認められ、骨格筋に特異的なUCPであるUCP3にも増加傾向が認められた(Fig. 2)。

4. 考 察

本実験において、ヘム鉄の給与はマウスの体重当りの腎周囲脂肪組織重量を減少させる傾向を示した。以前の実験においては、ヘム鉄の給与によりマウスの精巣上体周囲脂肪組織重量が減少する傾向を示した¹⁾。この相違の原因については不明であるが、本実験においても体重当りの精巣上体周囲脂肪組織重量はヘム鉄給与群において対照群より低い値を示しており、以前の実験においても体重当りの腎周囲脂肪組織重量はヘム鉄給与群において対照群より低い値を示している。これらのことから、ヘム鉄はマウスの内臓脂肪蓄積抑制作用を有する可能性が示された。

水溶性ヘム鉄添加区において、ヒラメ筋のCPT-1bおよびUCP2のmRNA量が有意に増加し、UCP3のmRNA量も増加する傾向を示した。CPT-1bはミトコンドリアにおける脂肪酸の β 酸化の律速酵素として知られている²⁾。また、UCP

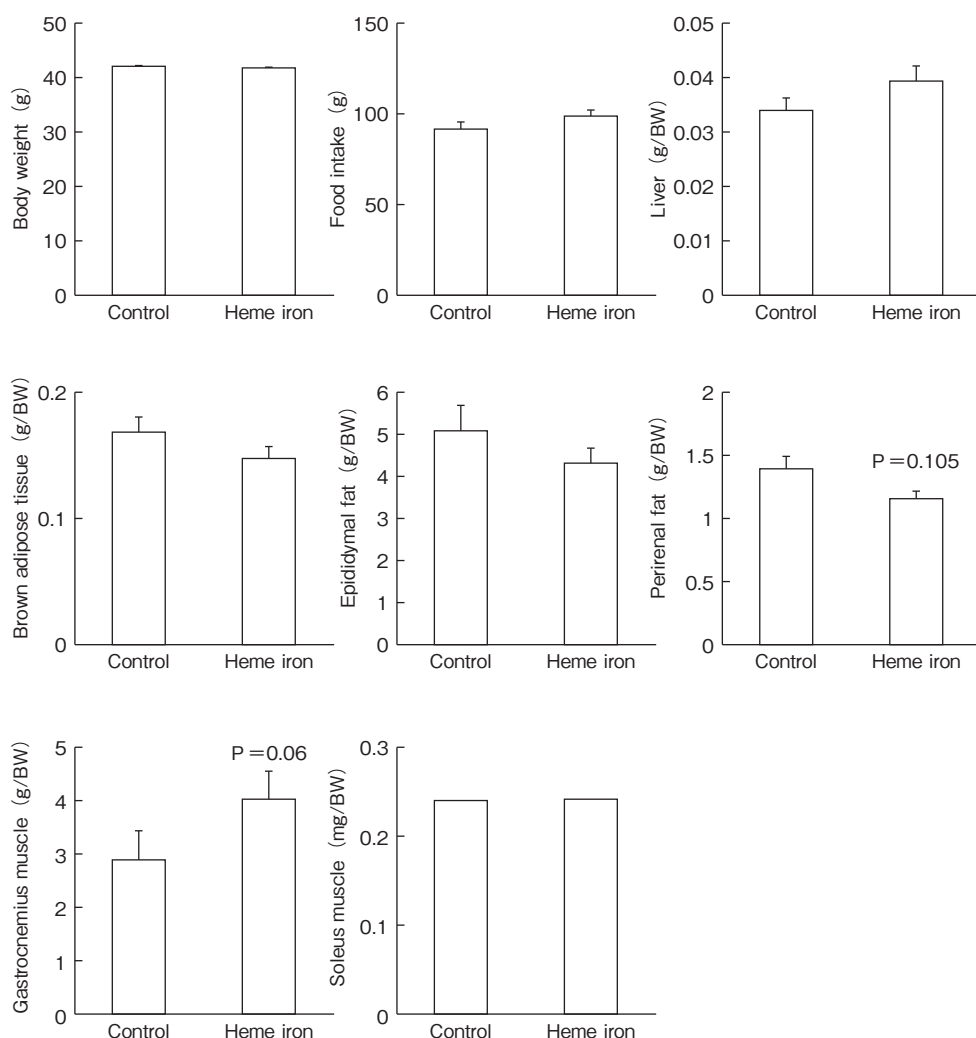


Fig. 1 Effect of heme iron on body weight, food intake, and the relative weight of liver, brown adipose tissue, adipose tissues, and muscles in high-fat diet-induced obese mice. Data represent the mean $\pm$ SEM for eight mice in each group.

2 およびUCP 3は脂肪酸 β 酸化の亢進時にその発現が促進されることが報告されている³⁾。これらの知見と我々の結果から、水溶性ヘム鉄の給与により、骨格筋における脂肪酸 β 酸化が亢進したことが示唆された。

今回、水溶性ヘム鉄の給与により、骨格筋における脂肪酸 β 酸化が亢進したことが示唆されたが、一般に、骨格筋における β 酸化は運動時や絶食時に促進することが知られている。更に、本実験においては、ヘム鉄給与により、体重当りのマ

ウスの腓腹筋重量が増加する傾向を示した。それ故、ヘム鉄給与群においてはマウスの運動量が増加していた可能性があり、このことが、ヘム鉄給与群における腎周囲脂肪組織重量の減少に関与している可能性もある。今後、ヘム鉄給与が、マウスの運動量に及ぼす影響について調べる必要がある。

ヘム鉄給与は、精巣上体周囲脂肪組織におけるHSLのmRNA量を増加させる傾向を示したが、血中遊離脂肪酸濃度には有意な変化が認められな

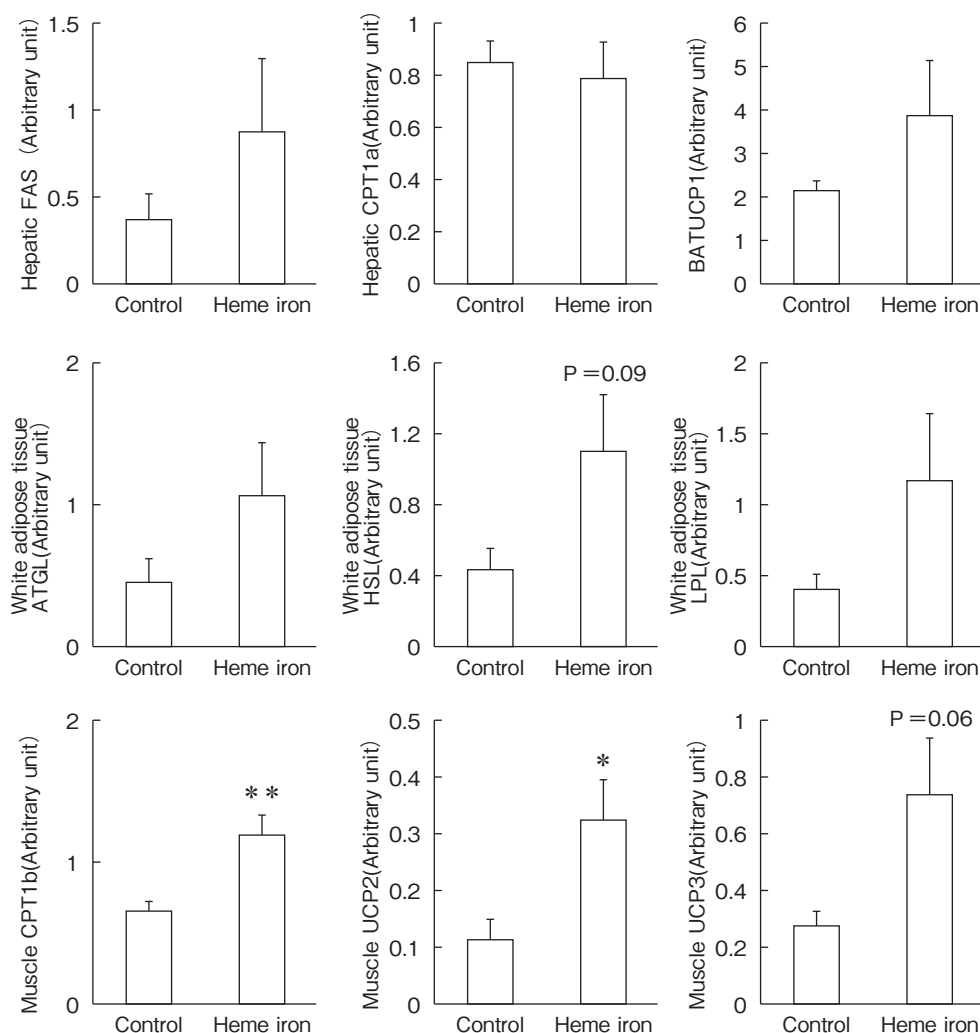


Fig. 2 Effect of heme iron on the mRNA levels of lipid metabolism-related genes of high-fat diet induced obese mice. Data represent the mean $\pm$ SEM for eight mice in each group. *and**, significant with respect to control group ($P < 0.05$ and 0.01 , respectively).

かったことから、脂肪組織における脂肪分解には影響がなかったことが示唆される。HSLによる脂肪の分解は、HSLのリン酸化による活性化、および、脂肪細胞の脂肪滴にHSLが接することを妨げるペリリピンのリン酸化による脂肪滴からの遊離によっても制御される⁴⁾。それ故、HSLのmRNA量は増加したものの、その酵素活性や脂肪滴への接触が進まなかったため、脂肪分解が促進されなかったのかもしれない。

5. 要 約

本研究では、畜産副生物の利用法開発のための一環として、ヘム鉄の抗肥満作用について調べた。ヘム鉄がマウスの脂質代謝に及ぼす影響について調べた結果、ヘム鉄の給与は、マウスの体重当りの腓腹筋重量を増加させ、腎周囲脂肪組織重量を減少させることが明らかになった。また、水溶性ヘム鉄の給与は、ヒラメ筋におけるCPT-

1b, およびUCP 2 のmRNA量を有意に増加させることが明らかになった。これらの結果から、水溶性ヘム鉄は、骨格筋における脂肪酸酸化を亢進させ、その結果として、内臓脂肪蓄積を抑制する可能性が示された。

文 献

- 1) 上曾山博：公益財団法人 伊藤記念財団. 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 31, 6～7, 2013.
- 2) Houten SM, Wanders RJA : A general introduction to the biochemistry of mitochondrial fatty acid b-oxidation. *J. Inherit Metab Dis.* 33, 469～477, 2010.
- 3) Samec S, Seydoux J, Dulloo AG. : Role of UCP homologues in skeletal muscles and brown adipose tissues: mediators of thermogenesis or regulators of lipids as fuel substrate. *FASEB J* 12, 715～724, 1998.
- 4) Zimmermann R, Lass A, Haemmerle G, Zechner R. : Fate of fat: The role of adipose triglyceride lipase in lipolysis. *Biochim Biophys Acta* 1791, 494～500, 2009.

食肉の給与が海馬のタンパク質リン酸化および 遺伝子発現におよぼす影響

Effects of meat supplementation on hippocampal protein phosphorylation
and gene expression

豊 田 淳

(茨城大学農学部)

Atsushi Toyoda

(College of Agriculture, Ibaraki University)

Recently, the number of patients suffering from diseases related to brain dysfunction such as depression and dementia has been increased in Japan. In this study, we aimed to elucidate the chronic effects of meat-containing diet on the molecular function in the brain. Particularly, we focused on the hippocampus which is related to learning ability and mental disorders, and we observed the chronic meat containing diet-induced molecular events in the rat hippocampus comprehensively. Wistar male rats were fed the dried beef-containing AIN93G-based diet (10 g/kg of diet and 100 g/kg of diet) for 4 weeks. Body weight and feed intake were measured, and no difference between the groups was observed. Also, using the antibody microarrays (KINEX™ ANTIBODY MICROARRAY, KINEXUS, Canada), the hippocampal protein expression and their phosphorylation were observed. We found that 29 hippocampal protein expression or phosphorylation were changed with chronic feeding of dried beef meat-contained diet (100 g/kg of diet). Especially, phosphorylation of the tyrosine residue (Y13) of cyclin-dependent protein-serine kinase 6 (CDK6) was enhanced. Conversely, dephosphorylation of the threonine residue (T202) of extracellular regulated protein-serine kinase 1 (Erk1, p44 MAP kinase) and extracellular regulated protein-serine kinase 2 (Erk2, p42 MAP kinase) was remarkably induced with chronic supplementation of beef meat-contained diet (100g/kg of diet). In the future studies, hippocampal events involving gene expression and cell morphology should be elucidated.

1. 目 的

本研究の目的は、食肉、特に牛肉の摂取が、記憶・学習や精神疾患と関係する脳の海馬における影響を、タンパク質、遺伝子レベルで網羅的に解明することである。

近年の日本では、急激な高齢化の進行、また、

雇用環境など社会的ストレスの増加によって、認知症、うつ病などの中枢神経系疾患の患者数が増加している。このような現状に加え、東日本大震災やその後に起こった福島第一原発事故によるうつ病やPTSD患者の増加が懸念されている。これらの疾患への抗うつ剤などの薬剤治療は、長期間にわたることが一般的で、また、重大な副作用

(自殺企図のリスク増加、攻撃性の増加)の報告もされていることから、発症後の治療のみならず、予防対策にも早急に取り組むべきといえる。

私共は、日々の食生活を通して、これらの中枢神経系の失調で発症する疾患(神経疾患、精神疾患)等を予防できないかと考え、食物由来成分で中枢神経系の機能を改善させる可能性のある因子を探索している¹⁾。現在までにもいくつかの農産物および食物由来の機能性因子について、動物実験を中心に研究を行ってきたが²⁾、今回は食肉に含まれる成分が中枢神経系の機能へどのような影響を与えるか、生化学的に解析を行うことにした。

食肉には必須アミノ酸がバランスよく含まれており、それらは脳内で神経伝達物質であるセロトニンやノルアドレナリン等の原料となる³⁾。例えば、中枢のセロトニン神経系のシナプス伝達失調が、うつ病の原因になりうるということがわかっている(モノアミン仮説)⁴⁾。また、ノルアドレナリンは、不安障害やうつ病などいくつかの精神疾患との関連が指摘されている。最近では、海馬における脳由来神経成長因子(Brain-derived neurotrophic factor, BDNF)の発現低下が、うつ病の原因のひとつであるとする仮説も出てきている(BDNF仮説)⁵⁾。このように、うつ病は、様々な生物学的原因により発症することが分かってきており、また、症状も多様であることから、創薬は困難を極めていわれている。抗うつ剤が全く奏効しない難治性うつ病も知られている。このことから、うつ病になりにくい生活習慣を心がけて、うつ病を予防する観点がより重要になってきていると言える。膨張する医療費の抑制という観点からも予防医療に力点を置くべき時代である。食生活の改善でうつ病を予防できたとする研究は、ほとんど知られていないが、最近、赤身を多く含む牛肉は、適正量を摂取することでうつ病や不安障害に対するリスクを減らすことが、オーストラリア

で行われた疫学調査によって明らかになっている⁶⁾。以上より、私共は食肉成分にはうつ病などの中枢神経系疾患に対して予防的な効果を期待できるのではないかと考えた。本研究では、実際に長期間食肉を経口摂取した場合、摂取しない場合と比較して脳内ではどのような分子機構の変化が生じるのか、実験動物(ラット)を用いて詳細に解析することにした。

脳の海馬は、記憶や学習に重要な役割を担っており、てんかんやアルツハイマー型認知症、うつ病、統合失調症などさまざまな中枢神経系疾患に深く関与すると考えられている⁷⁾。本研究では、牛肉の摂取による脳への影響を海馬に絞って解析することで、中枢神経系疾患に対してどのような効果を持つのか、分子レベルで解明することにした。そこで、牛肉を混合した飼料を慢性的に摂取させたときのラット海馬におけるタンパク質発現レベルやリン酸化レベルの変動について、抗体マイクロアレイを用いて網羅的解析を実施した。

2. 方 法

2.1 4週間の牛肉含有飼料の給与試験

真空包装下において、 -30°C で凍結保存した牛肉(大腿二頭筋)を 4°C の冷蔵庫内で解凍した。半解凍の肉をナイフで裁断後、ミンチ器にて粉碎し、再度真空包装し、 -20°C で凍結後、凍結乾燥した。この牛肉乾燥粉末を精製粉末飼料(AIN93G, オリエンタル酵母工業)へ添加して牛肉含有飼料とした。5週齢で動物飼育室へ導入した9頭のラット(ウィスター, オス, チャールズリバー)は、予備飼育期間1週間を経て、上記の牛肉含有飼料の給与を開始した。対照群と牛肉給与群①(10 g/kg diet)、牛肉給与群②(100 g/kg diet)の3群に分けた。試験飼料の給与は、4週間(28日間)続けて行い、対照群にはAIN93Gのみを給与した。給与期間中は、摂食量

を毎日、体重を週一回測定した。なお、動物試験については、すべて茨城大学農学部動物実験委員会規則に沿って行った。予備飼育の時期からラットを個別ケージに収容し、単飼した。水と飼料は自由摂取とし、室温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $45 \pm 5\%$ 、12時間の明暗サイクル（6時点灯、18時消灯）の環境下で飼育した。

2.2 給与試験後の海馬におけるタンパク質発現量およびリン酸化量変化の解析

2.1の給与試験後、ラットを断頭し、脳より海馬を摘出して、ただちに液体窒素で凍結した。凍結後、 -80°C で保存した。海馬の一部を用いてタンパク質抽出液を下記のマイクロアレイ解析法で指定されている緩衝液で調製した。膜タンパク、細胞内キナーゼ、細胞内骨格タンパク、ストレスタンパク、転写因子等、さまざまなタンパクの発現量およびリン酸化量を、抗体マイクロアレイ（KINEX™ ANTIBODY MICROARRAY, カナダKINEXUS社）を用いて網羅的に解析を行った⁸⁾。なお、今回は対照群（ $n = 3$ ）と牛肉給与群②（ 100 g/kg diet ）（ $n = 3$ ）のタンパク質抽出液をそれぞれの群でプールしてアレイに供し、比較することにした。

3. 結果と考察

3.1 牛肉含有飼料の給与がラットの体重と摂食量におよぼす影響

4週間の牛肉含有飼料の給与が、ラットの体重と摂食量におよぼす影響について調べた。対照群、牛肉給与群①（ 10 g/kg diet ）、牛肉給与群②（ 100 g/kg diet ）の3群の一日の平均摂食量（ $\pm$ 標準誤差）は、それぞれ $25.2 \pm 0.3 \text{ g}$ 、 $26.7 \pm 0.2 \text{ g}$ 、 $24.0 \pm 0.3 \text{ g}$ であり、各群間で統計的に有意な差はなかった。また、対照群、牛肉給与群①（ 10 g/kg diet ）、牛肉給与群②（ 100 g/kg diet ）の3群の平均増体重（ $\pm$ 標準誤差）は、それぞれ

$197.6 \pm 8.4 \text{ g}$ 、 $218.8 \pm 5.4 \text{ g}$ 、 $208.5 \pm 13.2 \text{ g}$ であり、各群間で有意な差はなかった。これらの結果から、本研究で調製した牛肉（大腿二頭筋）の乾燥粉末は、10%程度精製飼料に添加しても、ラットの摂食量にはほとんど影響を与えず、また、増体にも影響を与えないことが明らかとなった。

3.2 牛肉含有飼料の給与が海馬のタンパク質発現およびリン酸化量の変化におよぼす影響

4週間の牛肉含有飼料の給与が、ラットの海馬におけるタンパク質の発現量およびリン酸化量の変化におよぼす影響を、抗体マイクロアレイ（KINEX™ ANTIBODY MICROARRAY, カナダKINEXUS社）を用いて解析した。その結果、牛肉含有飼料（ 100 g/kg diet ）の給与で、発現量、またはリン酸化量が顕著に変化した海馬のタンパク質が29個検出されたが、19個は増加し、10個は減少した。特に、Cyclin-dependent protein-serine kinase 6（CDK 6）の13番目のチロシン残基（Y13）のリン酸化が亢進していた。逆に、Extra-cellular regulated protein-serine kinase 1（p44-MAP kinase）、およびExtracellular regulated protein-serine kinase 2（p42 MAP kinase）の202番目のスレオニン残基（T202）の脱リン酸化が顕著であった。対照群（ 0 g/kg diet ）および牛肉給与群（ 100 g/kg diet ）、それぞれ3頭ずつのサンプルを混合し平均化したサンプルの比較のため、統計的な評価は不可能であるが、牛肉の慢性的な経口摂取で、海馬のシグナル伝達系が修飾される可能性は示唆された。CDK 6は酵母*Saccharomyces cerevisiae*のCDC28のホモログであり、細胞周期の制御に関わるタンパク質である⁹⁾。また、CDK 6はCyclin Dと結合することにより、腫瘍抑制タンパク質RBをリン酸化し、細胞周期を進めることが知られている¹⁰⁾。海馬におけるCDK 6の機能についてはほとんど知られていないが、最近の研究では、CDK 6が海馬歯状回

の神経細胞新生に関与することが明らかとなっている¹¹⁾。海馬の神経細胞新生は、記憶・学習能力や、精神疾患発症とも関係していると言われており¹²⁾、今後は、牛肉の摂取が、海馬神経細胞新生やそれに関与する遺伝子発現におよぼす影響が研究の焦点になる。また、海馬のMAPキナーゼカスケードについても、様々な高次機能、精神疾患に関与することが知られているので、牛肉給与したラットやマウスの行動解析や網羅的遺伝子発現解析などを通して、今後、牛肉給与が高次脳機能へあたえる影響等を精査する必要がある。

4. 考 察

近年の日本では、急激な高齢化の進行や社会的ストレスの増加によって、うつ病や認知症などの中枢神経系疾患の患者数が増加している。本研究では、食肉の摂取が脳にどのような影響をもたらしているのか解明することを目的とした。特に、記憶・学習機能や精神疾患発症に関係する海馬に着目し、食肉の摂取が脳の海馬における神経活動へ与える影響を分子レベルで網羅的に解明することにした。今年度は、抗体マイクロアレイを用いて、4週間の牛肉含有飼料の給与が、ラットの体重と摂食量、海馬のタンパク質発現およびリン酸化量におよぼす影響について調べた。その結果、4週間の牛肉含有飼料の給与（10 g/kg dietおよび100 g/kg diet）は、ラットの摂食量、増体には影響を与えなかった。また、牛肉含有飼料の給与（100 g/kg diet）で、発現量、リン酸化量

が顕著に増減した海馬のタンパク質が29個検出され、19個は増加し、10個は減少した。Cyclin-dependent protein-serine kinase 6（CDK 6）の13番目のチロシン残基のリン酸化が亢進していた。逆に Extracellular regulated protein-serine kinase 1（p44 MAP kinase）および Extracellular regulated protein-serine kinase 2（p42 MAP kinase）の202番目のスレオニン残基の脱リン酸化が顕著であった。今後、これらの分子の変動と海馬神経細胞の新生、高次機能等との関連について、精査する必要がある。

文 献

- 1) 茨城大学農医連携プロジェクト <http://iucam-ibaraki.wix.com/iucam>
- 2) Iio W, et al. : *Amino Acids*, 43, 2037~2046, 2012.
- 3) Nagasawa M, et al. : *Animal Science Journal*, 83, 493~498, 2012.
- 4) Berton O, et al. : *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 137~151, 2006.
- 5) Tsankova NM, et al. : *Nature Neuroscience*, 9, 519~525, 2006.
- 6) Jacka FN, et al. : *Psychotherapy and Psychosomatics*, 81, 196~198, 2012.
- 7) Nestler EJ, et al. : *Neuron*, 34, 13~25, 2002.
- 8) KINEXUS社 <http://www.kinexus.ca/>
- 9) Meyerson M, et al. : *EMBO Journal*, 11, 2909~2917, 1992.
- 10) Elizabeth A, et al. : *Nature Reviews Cancer*, 11, 558~572, 2011.
- 11) Beukelaers P, et al. : *Stem Cells*, 29, 713~724, 2011.
- 12) Yamasaki N, et al. : *Molecular Brain*, 1, 6, 2008.

畜産副産物の中性脂肪改善効果について

Effect of livestock by-product on serum triglyceride level

岡 本 芳 晴

(鳥取大学農学部)

Yoshiharu Okamoto

(Faculty of Agriculture, Tottori University)

We examined effects of degradation product from porcine liver (Liver Hi®) on the improvement of triglyceride and cholesterol using high fat diet fed mouse model. C57BL/6 mice (male, 6 weeks old) were fed high fat diet for 28 days. Mice had been drank diluted water with or without Liver Hi® *ad libitum* during the experimental period. After the experimental period, blood, liver and epididymal fat tissue were taken. Serum blood chemistries including triglyceride and cholesterol were measured. Intakes of Liver Hi® did not influence the changes of body weight and the weight of liver and epididymal fat tissue. Intakes of Liver Hi® decreased the level of low density lipoprotein cholesterol. However, intakes of Liver Hi® did not influence other parameters. Furthermore, intakes of Liver Hi® suppressed liver steatohepatitis. These results indicate that Liver Hi® has a potency as a new functional food for the patients of hypercholesterolemia.

1. 目 的

平成19年の国民健康・栄養調査によると、メタボリックシンドローム患者数は予備軍を含めおよそ2,000万人と推定されている¹⁾。メタボリックシンドロームは、腹部肥満、糖尿病、脂質異常症および高血圧のうち複数をもち合わせている病態である¹⁾。これらの疾患はいずれも代謝異常そのものあるいはそれに続発するものであり、脂質代謝恒常性の重要性が唱えられている²⁾。

その中で、脂質代謝制御における食品の役割は極めて重要であると考えられる。本試験の目的は、豚肝臓抽出物の脂質代謝に与える影響を高脂

肪食負荷モデルにて検討することである。

2. 方 法

マウス (C57BL/6, 雄, 6 週齢, 体重17~20 g) は、日本クレア株式会社 (東京) より購入し、1 週間馴化したものを使用した。なお動物実験は、鳥取大学動物実験委員会の審査・承認のもと、上記委員会の動物実験指針に従い実施した。

豚肝臓分解物 (レバーHi) は、ILS株式会社 (茨城) より提供を受けた。豚肝臓抽出物は、国産レバーを酵素分解した水溶性ペプチド粉末で、分子量3,000以下のペプチドである。実験用飼料は、通常食としてCE-2、高脂肪食としてHigh

Table 1 Effects of the degradation product from porcine liver on body weight change and organ weights

	ND	HFD	HFD + L 2 %	HFD + L 5 %
Initial body weight (g)	21.3 ± 1.1	21.7 ± 1.0	21.8 ± 1.2	21.3 ± 1.2
Final body weight (g)	23.1 ± 1.3	25.9 ± 1.1	25.6 ± 1.2	25.4 ± 1.1
Liver weight (g)	1.0 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1	1.2 ± 0.2
Epididymal fat tissue weight (g)	0.3 ± 0.0	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.3	0.8 ± 0.1

Data represent the mean ± SD in each group (n = 5 ~ 6).

Table.2 Effects of the degradation product from porcine liver on blood biochemistry

	ND	HFD	HFD + L 2 %	HFD + L 5 %
Glu	55.6 ± 5.4	115.0 ± 32.4	109.0 ± 50.1	118.0 ± 52.4
TP	5.0 ± 0.3	5.0 ± 0.2	5.4 ± 0.4	4.9 ± 0.2
ALB	2.7 ± 0.3	2.6 ± 0.2	2.7 ± 0.3	2.5 ± 0.2
AST	58.3 ± 5.6	138.0 ± 133.0	115.0 ± 67.0	72.0 ± 42.1
ALT	27.5 ± 9.8	101.0 ± 129.0	82.2 ± 92.2	31.8 ± 35.6
ALP	405.0 ± 29.0	347.0 ± 26.5*	326.0 ± 37.4*	300.0 ± 26.2**
T-Bil	0.6 ± 0.0	0.5 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.6 ± 0.1
BUN	25.7 ± 1.9	25.8 ± 4.6	26.5 ± 5.2	28.4 ± 4.5
Cre	0.2 ± 0.0	0.4 ± 0.2	0.3 ± 0.3	0.2 ± 0.0

Data represent the mean ± SE in each group (n = 5). **: p < 0.01, *: p < 0.05 compared with the ND group.

Fat Diet32をそれぞれ日本クレア株式会社より購入し、自由採食とした。飲料水は、水道水あるいは水道水にレバーHiを溶解したものを使用した。

マウスは通常食 (ND) 群 (n = 6), 高脂肪食 (HFD) 群 (n = 5), 高脂肪食 + 2 % 豚肝臓抽出物飲水 (HFD + L 2 %) 群 (n = 5) および高脂肪食 + 5 % 豚肝臓抽出物飲水 (HFD + L 5 %) 群 (n = 5) の4群を設定した。マウスには28日間各飼料および飲料水を投与した。29日目には12時間絶食のもと5 % イソフルレン (インターベット, 東京) 吸入下で、腹部大静脈より採血を実施し、その後頸椎脱臼により安楽死処分した。その後、肝臓と精巣周囲脂肪組織を摘出し重量の測定を行った。肝臓組織の一部は、ズダンⅢ染色を実施し、組織学的検索を行った。血液は500 × g, 4℃で15分間遠心分離し、血清を得た。得られた血清で血液生化学検査および血中脂質 (コレステロールおよび中性脂肪) プロファイリング検査

(Lipo Search, スカイライト・バイオテック株式会社, 東京) を実施した。血液生化学検査では、血糖値 (Glu: mg/dl), 総タンパク質 (TP: g/dl), アルブミン (ALB: g/dl), アラニンアミノ基転移酵素 (ALT: U/l), アスパラギン酸アミノ基転移酵素 (AST: U/l), アルカリホスファターゼ (ALP: U/l), 総ビリルビン (T-Bil: mg/dl), 尿素窒素 (BUN: mg/dl), クレアチニン (Cre: mg/dl) を測定した。

結果は、平均値 ± 標準偏差で示した。有意差検定は、一元配置分散分析の後 Tukey Kramer's test にて行った。危険率 5 % 未満を有意差ありとした。

3. 結果と考察

3.1 体重変化ならびに臓器重量

体重変化ならびに臓器重量の結果を **Table 1** に示した。28日目において、HFD群, HFD + L 2 %

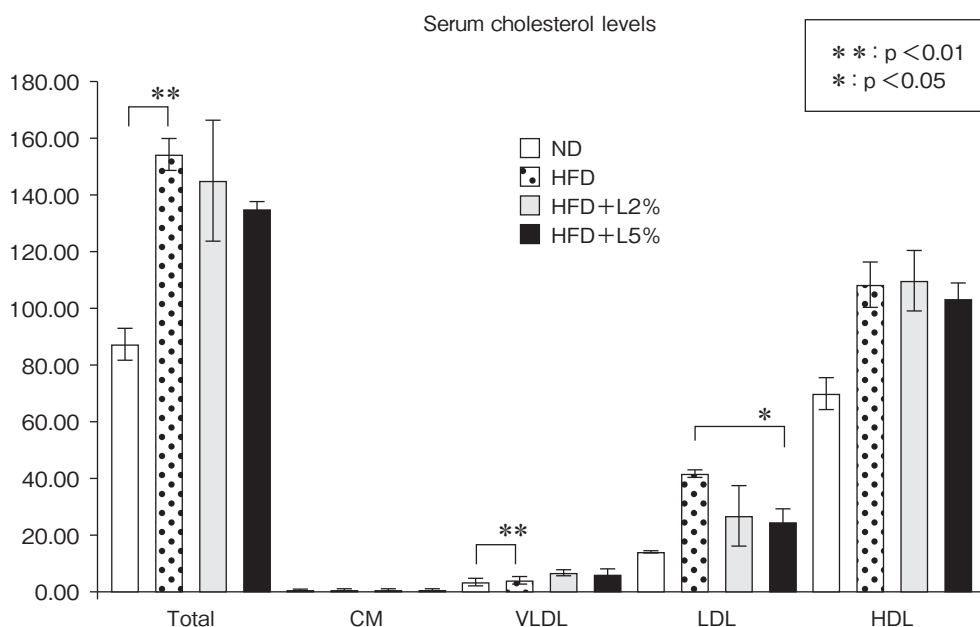


Fig.1 Effects of the degradation product from porcine liver on cholesterol concentration in blood (n = 3) **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$ compared with the ND or HFD group.

群およびHFD + L 5 %群で体重に差異は認められなかった。同様に肝臓および精巣周囲脂肪組織重量も、HFD群、HFD + L 2 %群およびHFD + L 5 %群での差異は認められなかった。

以上より、レバーHiの投与により肝臓、末梢組織への脂肪蓄積量の変化は起こらないことが明らかとなった。

3.2 血液生化学検査

血液生化学検査の結果をTable 2に示した。HFD群においてGlu, ASTおよびALTはND群と比較して上昇傾向が確認された。HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群において、ASTはHFD群と比較して低値を示す傾向が見られた。HFD, HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群において、ALPはND群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.01$: HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群, $p < 0.05$: HFD群)。その他の項目に関しては、4群間に差異は認められなかった。

これまでに、高脂肪食負荷により血清中ALP

が上昇することが報告されているがその具体的な機序は不明である³⁾。この点に関しては、今後詳細な検討が期待される。

3.3 血清コレステロールおよび脂質プロファイル

血清コレステロールプロファイルの結果をFig.1に示した。高脂肪食の投与により、HFD, HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群の総コレステロール濃度は上昇した ($p < 0.05$)。そのうち超低比重リポ蛋白 (VLDL), 低比重リポ蛋白 (LDL) および高比重リポ蛋白 (HDL) は高脂肪食投与により、血清中の濃度上昇が確認された。VLDLおよびHDL濃度は、レバーHi投与による変化は確認されなかった。血清LDL濃度は、レバーHi投与によりHFD群よりも低値を示した。特にHFD + L 5 %群において、HFD群と比較して有意に低値を示した ($p < 0.05$)。カイロミクロン (CM) には変化が確認されなかった。

血清中性脂肪プロファイルの結果をFig. 2に示

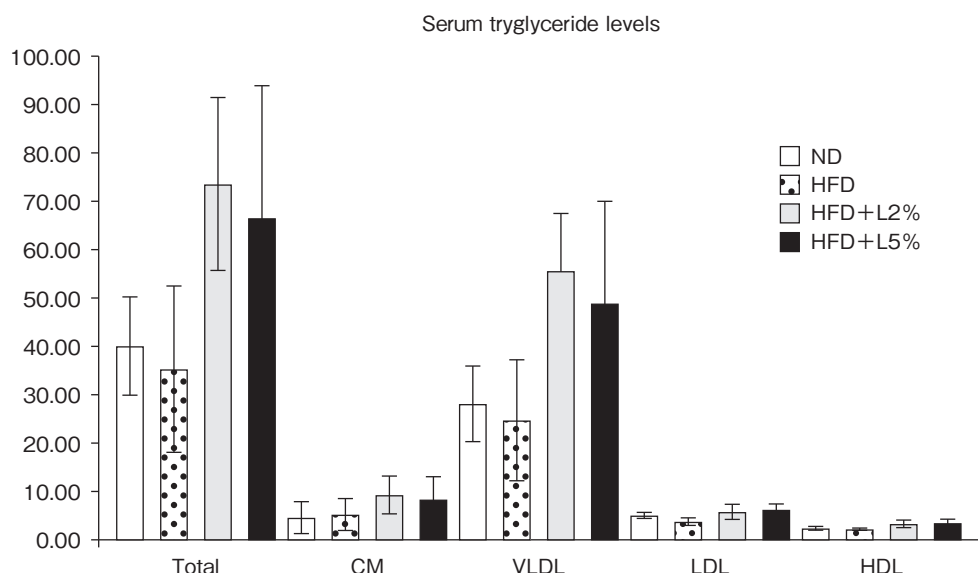


Fig.2 Effects of the degradation product from porcine liver on triglyceride levels in blood
(n = 3)

した。HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群において、血清総中性脂肪およびVLDL濃度がND群およびHFD群と比較し、上昇傾向を示した。しかし、有意差は確認されなかった。LDL, HDLおよびCM濃度は4群間において差異は認められなかった。

生体内におけるコレステロール代謝は、以下のとおりである^{4,5)}。体内のコレステロール代謝は食事、遺伝的要因、コレステロールの吸収、ステロールの合成と排泄により制御されている。食品中に含まれるコレステロールは、小腸から吸収され肝臓に運ばれる。肝臓からはVLDLが血中に分泌され、血中でLDLにまで代謝される。その後、LDLは各組織の細胞膜表面に存在するLDL受容体により細胞の中に取り込まれて末梢組織へと供給され、この機構はフィードバック制御により支配されている。一方、HDLは過剰なコレステロールを末梢組織から肝臓へ輸送し、胆汁酸として排泄する機能がある。LDLは、抹消組織と肝臓にあるLDL受容体により取り込まれ、HDLは肝臓に

あるHDL受容体により取り込まれる。肝臓に取り込まれたコレステロールは胆汁酸に変換されるか、コレステロールのまま胆汁中に分泌される。したがって、今回の結果からレバーHt摂取により末梢組織での取り込みの増加、肝臓での取り込みの増加、肝臓での胆汁酸への変換・分泌促進のいずれかが活発となり、LDL減少がみられたと考えられる。しかしながら、作用機序解明は未だ不十分であり、今後さらなる検討が必要である。

3.4 組織学的観察

ズダンⅢ染色像(光学顕微鏡鏡検下400倍)をFig. 3に示した。ND群において、脂肪滴はほとんど観察されなかった(Fig. 3a)。HFD群では大小多様な脂肪滴(矢印)および、肝細胞の空胞変性、脂肪変性(矢頭)が確認された(Fig. 3b)。HFD + L 2 %およびHFD + L 5 %群では、脂肪滴は観察されるもののその大きさはHFD群と比較して小さかった。また、空胞変性、脂肪変性の程度は軽度であった(Fig. 3cおよびd)。

近年、生活習慣をはじめとする様々な要素が原

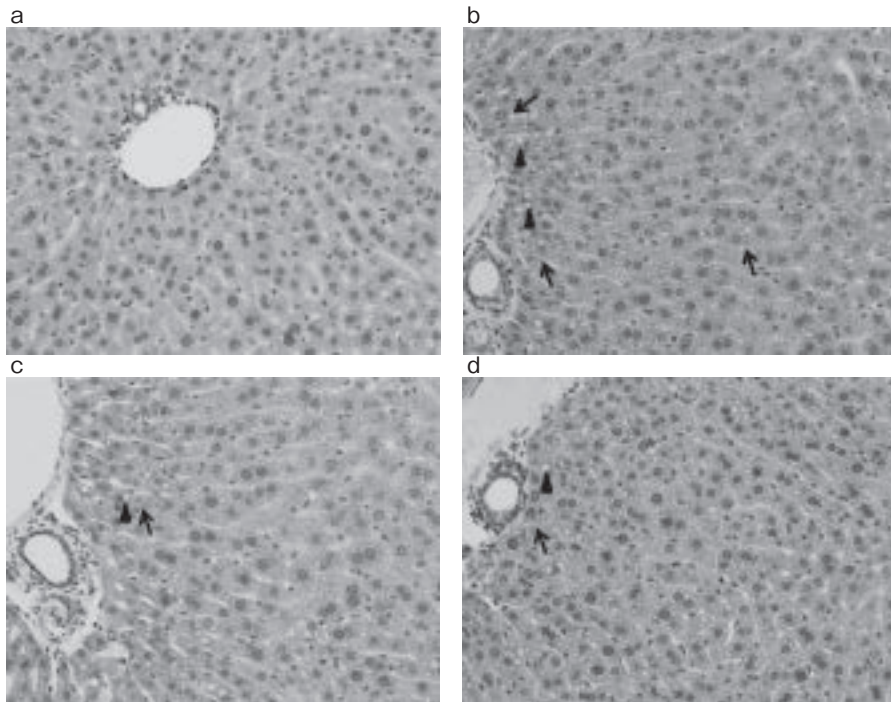


Fig.3 Histopathological findings of the liver

The tissue sections of the colon were stained with Sudan three stain. Data presented are for 1 mouse each from ND (a), HFD (b), HFD + L 2 % (c) and HFD + L 5 % (d) groups. Bar = 200 μ m.

因となる非アルコール性肝障害が問題となっている⁶⁾。高脂肪食の摂取もその原因の1つと考えられており⁷⁾，今回HFD群では確認された脂肪滴および，肝細胞の空胞変性，脂肪変性が確認された。その一方で，レバーHi投与群では，脂肪滴の大きさが小さく空胞変性，脂肪変性は軽度であった。これらの結果は，レバーHiの投与により肝臓での脂肪蓄積の減少が起こったと考えられる。

4. 要 約

本研究では，高脂肪食摂取モデルを用いて豚肝臓加水分解産物の中性脂肪改善効果の検討を行った。豚肝臓加水分解産物摂取により，LDLコレステロール濃度の減少および肝臓での脂肪滴減少，空胞変性・脂肪変性の減少が確認された。これらの結果は，豚肝臓加水分解産物が中性脂肪特にLDLコレステロール値の改善に有効な機能性食

品となりうることを示唆している。しかしながら，その作用機序は未だ不明な点が多く今後の検討が必要である。

参考文献

- 1) 平成19年国民健康・栄養調査報告，厚生労働省，2008.
- 2) 佐藤隆一郎：日本栄養・食科学会誌，**66**，279～285，2013.
- 3) Matsunaga S, Azuma K, Watanabe M, Tsuka T, Imagawa T, Osaki T, Okamoto Y.; *Exp. Ther. Med.*, **7**, 379～382, 2013.
- 4) 佐藤隆一郎：日本栄養・食科学会誌，**56**，127～133，2003.
- 5) 福田伊津子，小土井理恵，久保麻友子，岡本隆志，藤田 剛，芦田 均：生物工学会誌，**87**，129～134，2009.
- 6) Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, Grundy SM, Hobbs HH: *Hepatology*, **40**, 1387～1395, 2004.
- 7) Donnelly KL, Smith CI, Schwarzenberg SJ, Jessurun J, Boldt MD, Parks EJ: *J Clin. Invest.*, **115**, 1343～1351, 2005.

血糖値と血中アミノ酸，オメガ3脂肪酸，血栓因子の関連に関する研究

Studies on relationship between blood glucose level and plasma aminoacids, omega 3 fatty acids and thrombotic factors

田中 明・蒲池 桂子・中嶋 克行*・高田 明和**

(女子栄養大学栄養クリニック，*群馬大学大学院保健学科，**浜松医科大学医学部)

Akira Tanaka・Keiko Kamachi・Katsuyuki Nakajima*・Akikazu Takada**

(Nutrition Clinic, Kagawa Nutrition University,

*Gunma University Graduate School of Health Sciences Postgraduate School of Medicine,

**Hamamatsu University School of Medicine)

The purpose of this study is to clarify the relationship between glucose intolerance, serum remnant lipoprotein cholesterol (RLP-C) levels and plasma amino acids levels. Leucine, isoleucine and tryptophan are reported to decrease serum glucose levels. And nateglinide, inducing substance of amino acid is used as the oral hypoglycemic agent. The increase of serum RLP-C levels is the atherosclerotic risk factor.

Hemoglobin A1c (HbA1c) value is used as the marker of glucose intolerance in the study.

Plasma amino acid levels, HbA1c values and serum RLP-C levels were measured in 17 subjects (2 men and 15 women), who consulted Nutrition Clinic. HbA1c valued between 5.2 and 7.1% (Table 1).

Only plasma tyrosine value showed a significant positive correlation with HbA1c value ($r=0.5501$, $p=0.0271$, Table 2). Tyrosine is the precursor of catecholamine and thyroid hormone, which increases serum glucose levels. This may explain the relationship between plasma tyrosine value and HbA1c value. However, there was not a significant correlation between plasma leucine, isoleucine and tryptophan values and HbA1c value.

Plasma valine and leucine values showed a negative correlation with HbA1c value ($r = -0.4978$, $p = 0.0497$; $r = -0.4330$, $p = 0.0939$, respectively). The branched chain amino acids, valine and leucine, are reported to decrease serum glucose levels and improve the insulin resistance. Serum RLP-C levels are increased in the insulin resistance state. This may explain the negative relationship between the branched chain amino acids and RLP-C.

The subjects investigated in the study were small. However, The study showed the relationship between a part of amino acids (tyrosine and branched chain amino acids) and glucose intolerance, RLP-C.

1. 目 的

本研究の目的は、耐糖能障害と血中アミノ酸と

の関連を明らかにすることである。耐糖能障害の指標はHbA1c値を用い、アミノグラムにより各アミノ酸レベルを測定した。

表1 研究の対象

症例	性別	年齢 (歳)	BMI	HbA1c (%)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	RLP-C (mg/dl)
1	女性	51	27.2	5.6	197	55	4.5
2	女性	58	29.1	5.7	183	55	4.6
3	女性	35	33.9	5.9	138	50	6.8
4	女性	34	28.4	5.4	90	60	2.8
5	女性	56	30.2	5.9	143	49	5.5
6	女性	54	23.6	5.2	129	71	2.4
7	女性	58	31.0	6.0	122	85	4.3
8	女性	65	28.1	7.1	131	59	3.5
9	女性	50	27.5	5.4	176	66	5.0
10	女性	55	28.0	5.4	127	56	3.0
11	女性	60	25.8	5.7	161	63	4.0
12	女性	57	27.7	5.9	107	65	3.7
13	女性	57	45.7	6.7	87	39	2.7
14	女性	50	20.8	5.3	113	77	3.5
15	女性	54	29.1	5.9	131	51	13.5
16	男性	51	24.4	6.4	105	84	3.7
17	男性	47	26.0	6.5	98	45	87.7

アミノ酸は血糖値を下げる可能性が指摘されている。実際、イソロイシン、ロイシン、トリプトファンなどのアミノ酸は視床下部の摂食中枢を抑制して血糖値を下げる可能性が指摘され、トリプトファンは血糖上昇抑制作用が報告されている^{1~4)}。また、糖尿病患者では血中アミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸が低値であることが指摘されている。さらに、アミノ酸誘導物であるナテグリニドは経口血糖低下薬として使用されている。

このようにアミノ酸代謝は糖尿病の病態と強く関連していることが考えられ、アミノグラムにより、すべての血中アミノ酸レベルと耐糖能低下状態との関連を検討した本研究の結果は、アミノ酸による糖尿病診断および治療に役立つ可能性がある。

今回は、血中アミノ酸レベルと血中レムナントリポ蛋白 (RLP) コレステロール値との関連、および耐糖能障害と血中脂肪酸値との関連も検討し

た。

2. 方 法

2.1 対 象

女子栄養大学栄養クリニックを受診した17例の患者 (男性2例, 女性15例) を対象とした。年齢34~65歳, BMI20.8~45.7, HbA1c (NGSP値) 5.2~7.1%, LDLコレステロール値87~197mg/dl, HDLコレステロール39~84mg/dl, RLPコレステロール2.4~87.7mg/dlであった (表1)。

2.2 方 法

アミノグラムにより、39種類の血中アミノ酸レベルを測定した。血清脂肪酸はアラキドン酸, EPA, DHA値, 血中脂質はLDLコレステロール (LDL-C), HDLコレステロール (HDL-C), レムナントコレステロール (RLP-C) を測定した。耐糖能障害の指標としてはHbA1c (NGSP) 値を用いた。

表2 HbA1c値 (%) と各血中アミノ酸量 (nmol/ml) の関連

アミノ酸	HbA1c (NGSP) 値	
	スピアマン相関係数	P 値
グルタミン酸	$r = 0.5257$	$p = 0.0553 +$
アラニン	$r = 0.4638$	$p = 0.0801 +$
イソロイシン	$r = 0.2734$	$p = 0.2433$
ロイシン	$r = 0.2783$	$p = 0.3173$
チロシン	$r = 0.5501$	$p = 0.0271 *$
トリプトファン	$r = 0.0458$	$p = 0.9667$

* $p < 0.05$ + $p < 0.10$

HbA1c 値と各血中アミノ酸値との相関、HbA1c値と血中脂肪酸値との相関、血中RLP-C値と各血中アミノ酸値との関連はスピアマンの相関係数で検討した。

3. 結果と考察

3.1 HbA1c 値 (%) と各血中アミノ酸量 (nmol/ml) の関連 (表2)

HbA1c値と有意相関を認めたのはチロシンのみであった。その他、相関傾向を認めたのはグルタミン酸、アラニンであった。イソロイシン、ロイシン、トリプトファンは関連を認めなかった。

チロシンは、フェニルアラニンから合成されるアミノ酸で、芳香族アミノ酸に分類される。チロシンは、甲状腺ホルモン (サイロキシン、トリヨードサイロニン) やメラニン色素、カテコールアミン (ドーパミン、ノルエピネフリン、エピネフリン) の前駆物質であり、チロシン投与により血中ノルエピネフリンおよびドーパミン値が増加することが報告されている⁵⁾。甲状腺ホルモン、カテコールアミンは血糖上昇作用があり、HbA1c値と血中チロシン値との正相関の原因となる可能性が考えられる。

しかし、今回の検討では、血糖低下作用の指摘されているイソロイシン、ロイシン、トリプト

ファンはHbA1c値との関連を認めなかった。

3.2 血中RLP-C値と各血中アミノ酸量との関連

血中RLP-C値と有意相関を認めたのは、グルタミン酸 ($r = 0.6834$, $p = 0.0035$)、バリン ($r = -0.4978$, $p = 0.0497$) であった。その他、相関傾向を認めたのは、ロイシン ($r = -0.4330$, $p = 0.0939$) であった。

血中RLP-Cの上昇は動脈硬化進展の危険因子として知られている⁶⁾。また、血中RLP-C値は、糖尿病、メタボリックシンドローム、インスリン抵抗性の病態で上昇することが指摘されている⁷⁾。今回、血中RLP-C値と分岐鎖アミノ酸であるバリン、ロイシンと負の有意相関あるいは相関傾向を認めた。分岐鎖アミノ酸は、視床下部の摂食中枢を抑制して血糖値を下げる可能性が指摘され、糖尿病患者では血中アミノ酸、特に分岐鎖アミノ酸が低値であることが指摘されている^{1~4)}。今回の結果から、高RLP-C血症ではインスリン抵抗性、耐糖能障害の増悪を介して血中分岐鎖アミノ酸量が低下していることが推定された。

3.3 HbA1c値と各血清脂肪酸 (アラキドン酸, EPA, DHA) の相関

HbA1c値とアラキドン酸, EPA, DHAとの相関は、それぞれ、 $r = 0.3249$ ($p = 0.2032$)、 $r = 0.0173$ ($p = 0.9474$)、 $r = 0.1113$ ($p = 0.6706$) といずれも有意な関連を認めなかった。

4. 要 約

女子栄養大学栄養クリニックを受診した17例を対象に、アミノグラム分析による血中各アミノ酸量と耐糖能障害および血中レムナント値との関連を検討した。耐糖能障害の指標であるHbA1c値は血糖上昇作用のある甲状腺ホルモンおよびカテコールアミンの前駆物質であるチロシンと有意正相関を認めた。また、血中RLP-C値は血糖低下作

用のある分岐鎖アミノ酸値と負の有意相関を認めた。今回の研究は少数例での検討であったが、チロシンおよび分岐鎖アミノ酸など一部のアミノ酸と耐糖能障害およびレムナント代謝との強い関連性が推定された。

文 献

- 1) Doi M, Yamaoka I, Fukunaga T : *Biochem & Biophys Res Commun*, 312, 1111~1117, 2003.
- 2) 吉沢文昭, 渡辺陽介, 土居雅子 : 必須アミノ酸研究, 175, 1~7, 2006.
- 3) 吉沢文昭 : アミノ酸研究, 1, 9~17, 2008.
- 4) Ikehara O, Kawasaki N, maezono K: *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 31, 469~472, 2008.
- 5) <http://ja.wikipedia.org/wiki/チロシン>
- 6) Akira Tanaka. : Postprandial Hyperlipidemia and Atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb*, 11, 322 ~ 329, 2004.
- 7) Masumi Ai, Akira Tanaka, Keiko Ogita, Masaaki Sekine, Fujie Numano, Fujio Numano, Gerald M Reaven : *J Am Coll Cardiol*, 38, 1628 ~ 1632, 2001.

冠動脈疾患患者における血中アミノ酸・脂肪酸組成 と動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子の関連に 関する研究

Studies on relationship between the composition of blood amino acids and fatty acids and atherogenic lipoproteins and/or thrombotic factors in patients with coronary artery diseases

木庭 新治・小林 洋一・横田 裕哉・田中 明¹・中嶋 克行²・高田 明和³

(昭和大学医学部, ¹女子栄養大学栄養クリニック, ²群馬大学大学院保健学科, ³浜松医科大学医学部)

Shinji Koba, Youichi Kobayashi, Yuuya Yokota, ¹Akira Tanaka, ²Katsuyuki Nakajima, ³Akikazu Takada
(Showa University School of Medicine, ¹Kagawa Nutrition University, ²Gunma University Graduate School of Health Sciences
Postgraduate School of Medicine, ³Hamamatsu University School of Medicine)

Background: Metabolic dyslipidemia is a main feature of coronary artery disease (CAD). Atherogenic lipoproteins such as small dense LDL, oxidative stress, and thrombotic factors play an important role in the development of acute coronary syndrome (ACS). Recent studies suggest that some amino acids and fatty acids regulate key metabolic pathways. The aim of the present study is to examine relationship atherogenic lipids including remnant-like particle-cholesterol (RLP-C) and malondialdehyde-modified LDL (MDA-LDL), and composition of fatty acids and amino acids in patients with ACS.

Methods and Results: The blood samples were obtained by venipuncture on admission. Plasma fatty acids were measured using gas-chromatography and plasma amino acids were by Liquid Chromatograph Mass Spectrometer. Thirty% of 121 patients with ACS had prior history of CAD and 72% and 27% had hypertension and diabetes, respectively. Compared to normal range, ACS patients had higher levels of taurine, asparatic acid, glutamic acid, alanine, cystine, phenylalanine, β -alanine, and ornitine, and lower levels of asparagine, glutamine, tryptophan, and arginine. Diabetic patients had further lower tryptophan levels, which supported previous experimental reports. On the other hand, non-diabetic patients had further lower arginine, a precursor of nitric oxide. Correlation coefficients between glucose-related factors or atherogenic lipids and composition of amino acids or fatty acids showed that glutamic acids were significantly positively associated with non-HDL-cholesterol and MDA-LDL, which supported that glutamic acids induced dyslipemia and oxidative stress. Not eicosapentaenoic acid but arachidonic acid, dehomo- γ linoleic acid, and docosahexaenoic acid were significantly associated with non-HDL-cholesterol, MDA-LDL and RLP-C. No amino acids related to HbA1c and glucose levels on admission.

Conclusion: These suggest that amino acids have important functions in both nutrition and health, and affect diabetes or dyslipidemia related metabolic disorders and atherosclerosis. Further studies are required to compare these results with healthy subjects.

1. 目 的

冠動脈疾患では代謝性脂質異常症を呈する例が多く、その主因である動脈硬化惹起性リポ蛋白がレムナントリポ蛋白やsmall dense LDLである。これらの動脈硬化惹起性リポ蛋白と酸化ストレスや血栓因子との関連が注目されている。代謝性脂質異常症の予防・治療には食事・運動など生活習慣の改善が必須である。しかし、脂肪制限食、炭水化物制限食、蛋白制限食の効果について、未だ議論の余地がある。アミノ酸組成が糖脂質代謝に影響することが指摘されており¹⁾、様々なアミノ酸を含む食肉を制限するべきか否かに関しても不明な点が多い。本研究では急性冠症候群発症時の

アミノ酸組成、脂肪酸組成、動脈硬化惹起性リポ蛋白を測定し、その相互関連を評価した。

2. 方 法

急性冠症候群で入院時に静脈血を採取し、血清と血漿を分離した。血漿中の脂肪酸4分画をガスクロマトグラフィーで、アミノ酸39種類を高速液体クロマトグラフィー質量分析計で測定した。血清レムナント様リポ蛋白コレステロールは免疫吸着法で、small dense LDLコレステロールおよびLDLコレステロールはホモジニアス法で測定した。群間分析は分散分析で、2変量間の相関はSpearmanの順位相関で解析した。

表1 臨床背景

		全例 121例	男性 101例	女性 20例
背景	年齢, 歳	68.6 ± 13.6	67.3 ± 13.9	75.4 ± 8.6
	BMI, kg/m ²	23.8 ± 4.1	24.1 ± 4.3	22.6 ± 3.1
	心筋梗塞の既往	18	18	0
	冠動脈血行再建術の既往	34	29	5
	血液透析実施例	5	3	2
	悪性疾患の既往	15	11	4
危険因子	高血圧	87	69	18
	糖尿病	31	24	7
	喫煙 以前/現在	42/43	42/41	0/2
	脂質低下薬服用	36	30	6
	糖尿病治療薬服用	19	15	4
蛋白	総蛋白, g/dl	7.1 ± 0.7	7.0 ± 0.7	7.3 ± 0.8
	アルブミン, g/dl	4.0 ± 0.6	4.1 ± 0.6	3.9 ± 0.7
糖脂質	HbA1c, %	6.18 ± 1.22	6.15 ± 1.26	6.28 ± 1.01
	Total cholesterol, mg/dl	188.2 ± 45.5	187.4 ± 43.7	192.1 ± 54.7
	Triglyceride, mg/dl	131.8 ± 97.3	132.9 ± 97.3	126.5 ± 99.5
	HDL cholesterol, mg/dl	45.9 ± 12.2	45.0 ± 11.1	50.3 ± 16.4
	LDL cholesterol, mg/dl	117.8 ± 38.7	118.5 ± 38.6	114.3 ± 40.0
	Non-HDL cholesterol, mg/dl	142.3 ± 43.9	142.4 ± 43.4	141.9 ± 47.6
	アポリポ蛋白A1, mg/dl	123.6 ± 24.2	122.2 ± 22.8	131.0 ± 29.8
	アポリポ蛋白B, mg/dl	97.3 ± 27.4	97.4 ± 27.3	96.6 ± 28.2
	Small dense LDL-C, mg/dl	33.1 ± 20.5	33.4 ± 20.5	31.7 ± 21.2
	RLP-C, mg/dl	5.93 ± 4.79	6.15 ± 5.12	4.83 ± 2.21
	MDA-LDL, U/l	153.5 ± 71.6	154.7 ± 72.7	147.4 ± 66.9
	ジホモ-γ-リノレン酸, μg/ml	37.9 ± 14.9	38.3 ± 14.9	35.9 ± 15.4
	アラキドン酸, μg/ml	179.6 ± 52.2	178.8 ± 52.8	183.6 ± 50.0
	エイコサペンタエン酸, μg/ml	68.0 ± 38.5	59.3 ± 36.7	81.8 ± 42.7
	ドコサヘキサエン酸, μg/ml	133.6 ± 51.2	127.2 ± 45.5	165.8 ± 66.0

平均値 ± 標準偏差 Small dense LDL-C = small dense LDL-cholesterol, RLP-C = remnant-like particle-cholesterol, MDA-LDL = Malondialdehyde-modified LDL

表2 異常値を示したアミノ酸と糖尿病の有無による比較

	平均±標準偏差	最小値	最大値	基準値	非糖尿病 (n = 90)	糖尿病 (n = 31)
Taurine	108.8±48.4	32.4	271.1	39.5-93.2	107.3±46.7	113.1±53.5
Aspartic acid	13.2±15.5	2.3	71.0	2.4以下	12.6±14.7	15.1±17.7
Asparagine	44.7±12.7	24.8	99.9	44.7-96.8	44.8±13.3	44.2±10.7
Glutamic acid	102.4±46.2	33.0	264.0	12.6-62.5	98.8±43.6	112.9±52.2
Glutamine	497.8±115.6	112.2	838.7	422.1-703.8	502.4±123.1	484.3±90.8
Alanine	418.3±141.7	162.9	1226	208.7-522.7	417.9±147.8	419.±124.7
Cystine	24.8±13.5	6.0	111.1	13.7-28.3	24.0±13.0	26.9±14.9
Phenylalanine	71.4±20.8	41.3	174.8	42.6-75.7	70.8±21.5	73.3±18.5
β -alanine	40.4±169.2	3.0	1200	(-)	21.4±138.9	90.8±226.5
Tryptophan	41.4±11.4	8.8	73.6	37.0-74.9	42.5±11.6	37.2±10.1*
Ornithine	102.7±34.5	43.4	239.8	31.3-104.7	105.0±36.8	96.1±25.9
Arginine	51.9±24.6	5.0	126.6	53.6-133.6	49.1±23.6	60.0±26.2*

* p < 0.05 vs非糖尿病群

3. 結果と考察

177人の血漿、血清で測定を行ったが、急性冠症候群を否定された症例、重複症例、 ω 3系脂肪酸製剤服用者を除いた121人（男性101人）で解析した。患者背景を表1に示す。

約30%は冠動脈疾患の既往を有し、高血圧は72%、糖尿病は26%で合併していた。Small dense LDL cholesterolとMDA-LDLは過去の自験例や他の報告の一般健康人よりも有意に高値であった。

3.1 アミノ酸と糖尿病の影響

基準値と比較し異常値を示すアミノ酸と糖尿病の有無による比較を表2に示す。

急性冠症候群患者ではTaurine, Aspartic acid, Glutamic acid, Alanine, Cystine, phenylalanine, β -alanine, Ornithine 高値で、Asparagine, Glutamine, Tryptophan, Arginineが低値を示し、糖尿病ではTryptophanがより低値、Arginineは非糖尿病例でより低値を示した。Tryptophanが膵臓の β 細胞機能を保護し、血糖低下作用を有することが報告されている^{2~4)}。急性冠症候群患者

でTryptophanが低値で特に糖尿病例でより低値を示したことは、過去の実験的研究結果を支持した。一酸化窒素の前駆体のArginineは、急性冠症候群で低値を示したが、非糖尿病例でより低値であった。

3.2 年齢の脂肪酸、アミノ酸に及ぼす影響

年齢と有意な負相関をジホモ- γ -リノレン酸（相関係数 ρ -0.293, p =0.001）、アラキドン酸（ ρ -0.212, p =0.02）、Glutamic acid（ ρ -0.23, p =0.011）、に、有意な正相関を、ドコサヘキサエン酸（ ρ 0.224, p =0.013）、Citrulline（ ρ 0.278, p =0.002）、Cystine（ ρ 0.283, p =0.002）、Phenylalanine（ ρ 0.284, p =0.002）に認めた。

3.3 糖代謝マーカーとの関連因子

発症前に糖尿病治療薬を服用していなかった102例において、入院時の血清グルコース、HbA1cに関連する脂肪酸・アミノ酸は認めなかった。

3.4 脈硬化惹起性脂質マーカー（non-HDL-cholesterol, RLP-C, MDA-LDL）との関連因子

全例および発症前に脂質低下薬を服用していな

表3 動脈硬化惹起性脂質マーカーと脂肪酸・アミノ酸との相関 (Spearmanの順位相関係数)

	Non-HDL cholesterol		MDA-LDL		RLP-C	
	全例	未薬物	全例	未薬物	全例	未薬物
総蛋白	0.220**	0.229*	0.254**	0.226*	0.228*	NS
アミノ酸	NS	NS	NS	NS	0.204*	NS
分枝アミノ酸	NS	NS	NS	NS	0.252**	0.339***
Glutamic acid	0.233*	0.378****	0.213*	0.292**	NS	NS
Alanine	NS	NS	NS	NS	0.231*	NS
Valine	NS	NS	NS	NS	0.271**	0.284**
Isoleucine	NS	NS	NS	NS	0.217*	0.406****
Leucine	NS	NS	NS	NS	0.213*	0.242*
ジホモ- γ -リノレン酸	0.598****	0.539****	0.615****	0.574****	0.657****	0.583****
アラキドン酸	0.555****	0.523****	0.495****	0.433****	0.599****	0.591****
エイコサペンタエン酸	NS	NS	NS	NS	NS	NS
ドコサヘキサエン酸	0.355****	0.265*	0.287****	NS	0.246**	NS

* p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001

かった85例で、動脈硬化惹起性リポ蛋白のコレステロールの指標であるnon-HDL-cholesterol、血栓と関連するRLP-C、酸化LDLの指標であるMDA-LDLに影響する脂肪酸・アミノ酸を検討し、結果を表3に示す。

グルタミン酸が、脂質異常と酸化ストレスを惹起することが報告されている^{5~8)}。グルタミン酸が酸化LDLであるMDA-LDLと正相関を示したこと、過去の実験的研究結果を支持した。脂質マーカーとエイコサペンタエン酸以外の不飽和脂肪酸特にジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸が正相関を示したことは、 ω 3系と ω 6系の脂肪酸の違いを示唆した。

本研究結果は急性冠症候群患者における断面調査であり、今後、健康人との比較や血栓因子との関連を検討する予定である。

4. 要 約

動脈硬化惹起性リポ蛋白 (レムナントリポ蛋白やsmall dense LDLなど)、酸化ストレスや血栓因子は冠動脈疾患、急性冠症候群の発症と関連す

る。近年、アミノ酸組成・脂肪酸組成の動脈硬化性糖脂質代謝への影響が指摘されている。急性冠症候群発症時のアミノ酸組成、脂肪酸組成、動脈硬化惹起性リポ蛋白を測定し、その関連を評価した。

急性冠症候群による入院時に静脈血を採取し、血清と血漿を分離した。血漿中の脂肪酸4分画をガスクロマトグラフィーで、アミノ酸39種類を高速液体クロマトグラフィー質量分析計で測定した。血清レムナント様リポ蛋白コレステロールは免疫吸着法で、small dense LDLコレステロールおよびLDLコレステロールはホモジニアス法で測定した。群間分析は分散分析で、2変量間の相関はSpearmanの順位相関で解析した。

121人 (男性101人) で解析した。約30%は冠動脈疾患の既往を有し、高血圧は72%、糖尿病は26%で合併していた。基準値と比較し、急性冠症候群患者ではTaurine, Asparatic acid, Glutamic acid, Alanine, Cystine, phenylalanine, β -alanine, Ornithine 高値で、Asparagine, Glutamine, Tryptophan, Arginineが低値を示し、糖尿病では

Tryptophanがより低値, Arginineは非糖尿病例でより低値を示した。発症前に糖尿病治療薬を服用していなかった102例において, 入院時の血清グルコース, HbA1cに関連する脂肪酸・アミノ酸は認めなかった。

全例および発症前に脂質低下薬を服用していなかった85例で脂質値と関連する因子を検討した。Glutamic acid が non-HDL-cholesterol と MDA-LDLと有意な正相関を示した。エイコサペンタエン酸以外の, ジホモ- γ -リノレン酸, アラキドン酸とドコサヘキサエン酸は, non-HDL-cholesterol, MDA-LDL, RLP-Cのいずれとも正相関を示した。

以上より, アミノ酸は栄養および健康面に重要な機能を有し, 糖脂質代謝や動脈硬化に影響を及ぼす。

文 献

- 1) Wu G *Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. Amino Acids.*, **37** (1): 1~17, 2009.
- 2) Marshall S, *et al*: Amino acid regulation of insulin action in isolated adipocytes. *J Biol Chem* ; **264**, 2037~2042, 1989.
- 3) Traxinger RR, *et al*: Role of amino acids in modulating glucose-induced desensitization of the glucose transporter system. *J Biol Chem.* ; **264**, 20910~20916, 1989.
- 4) Inubushi T, *et al*: L-tryptophan suppresses rise in blood glucose and preserves insulin secretion in type-2 diabetes mellitus rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*, ; **58** (6), 415~422, 2012.
- 5) Park CH, *et al*: Glutamate and aspartate impair memory retention and damage hypothalamic neurons in adult mice. *Toxicol Lett*, ; **115**, 117~125, 2000.
- 6) Singh P, *et al*: Prolonged glutamate excitotoxicity: Effects on mitochondrial antioxidants and antioxidant enzymes. *Mol Cell Biochem.* ; **243**, 139~145, 2003.
- 7) Gobatto CA, *et al*: The monosodium glutamate (MSG) obese rat as a model for the study of exercise in obesity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* ; **111**, 89~101, 2002.
- 8) Kumar P, *et al*: Protective effect of *Trigonella foenum-graecum* Linn. on monosodium glutamate-induced dyslipidemia and oxidative stress in rats. *Indian J Pharmacol.* ; **45** (2), 136~140, 2013.

食肉類の摂取と血中アミノ酸, オメガ3脂肪酸 及び血栓因子の関連に関する研究

Studies on relationship between meat intake level and plasma aminoacids,
omega3 fatty acids and thrombotic factors

高尾 哲也¹・小川 睦美¹・中嶋 克行²・高田 明和³

(¹昭和女子大学生生活科学部, ²群馬大学大学院保健学研究科, ³NPO法人「食と健康プロジェクト」)

Tetsuya Takao¹, Mutsumi Ogawa¹, Katsuyuki Nakajima² and Akikazu Takada³

(¹Faculty of Life Sciences, Showa Woman's University, ²Graduate School of Health Sciences, Gunma University,

³NPO "Food and Health Project")

The subjects, they were over 50 years old, male, not disease, not on medication and no dietary restrictions, were tested for food intake level, blood lipids level, remnants, insulin and amino acids. The average age of the subjects was 62.8 ± 10.2 years old and BMI of the subjects was $24.2 \pm 2.6 \text{ kg/m}^2$. The average energy intake of subjects was $2020.3 \pm 261.8 \text{ kcal/day}$, average protein intake ratio was $17.7 \pm 2.6 \%$, average lipid intake ratio was $27.3 \pm 3.9 \%$, average carbohydrate intake ratio was $46.7 \pm 6.9 \%$. Lipid intake ratio of subjects was slightly greater than guideline level and carbohydrate ratio was somewhat less tendency. The average meat intake ratio of subjects was $180.7 \pm 70.0 \text{ kcal/day}$ and seafood intake ratio was $134.3 \pm 29.7 \text{ kcal/day}$. Meat intake of subjects was significantly higher than seafood intake. The average blood HDL-cholesterol level of subjects was $55.8 \pm 13.4 \text{ mg/dl}$, LDL-cholesterol was $117.8 \pm 32.4 \text{ mg/dl}$, total-cholesterol was $197.9 \pm 33.6 \text{ mg/dl}$, triglyceride was $128.0 \pm 88.8 \text{ mg/dl}$. Blood RLP-cholesterol level that is the important factor as thrombus was $8.5 \pm 11.2 \text{ mg/dl}$. Identically, blood RLP-triglyceride was half of subjects were less than 15 mg/dl . The blood EPA and DHA level, that are ω -3 fatty acid, of subject were $79.8 \pm 41.0 \mu \text{ g/ml}$ and $151.4 \pm 54.8 \mu \text{ g/m}$. The blood dihomo- γ -linolenic acid and arachidonic acid, that are ω -6 fatty acid, of subject were $35.8 \pm 8.5 \mu \text{ g/ml}$ and $187.5 \pm 31.4 \mu \text{ g/ml}$. The insulin level of subjects was $6.5 \pm 3.1 \mu \text{ IU/ml}$. The blood total amino acids level of subjects was $2870.4 \pm 273.7 \text{ nmole/ml}$, each amino acids were 0 to 637.2 nmole/ml . The fasting blood glucose level of subjects was $105 \pm 17.2 \text{ mg/dl}$. There was no strong correlation between the protein intake ratio, meat intake ratio and blood lipids, remnants, insulin and amino acids. From these result, it was suggested that normal meat intake dose not affect blood lipids, remnants, insulin and amino acids.

1. 目 的

食事やその中に含まれる成分は人の健康に様々な影響を与えていると考えられている。しかし日本の壮・高齢者の通常の生活の中での食事内容や

栄養素の摂取と血液性状の状態を定量的に測定し、関連性を解析した研究例は少ない。食事に含まれるたんぱく質は、同一エネルギー量であれば、炭水化物と比較して血糖値の上昇を抑制する事は広く知られている。さらに、摂取たんぱく質

を構成する分岐アミノ酸の一種であるイソロイシン、ロイシン、トリプトファンなどのアミノ酸は視床下部の摂食中枢を抑制して血糖値を下げる可能性が指摘されている。また、最近、血中アミノ酸およびアミノ酸関連物質を測定するアミノグラムが開発され、これにより食事摂取とアミノ酸関連物質との関連を解析する事が容易となりつつある。さらに、血糖値と血栓危険因子であるレムナント、DHA、EPAなどの ω -3脂肪酸との関連も指摘されている。そこで本研究では、被験者の食事内容の状況を、たんぱく質と炭水化物、脂質の摂取状況も把握できる半定量的食事摂取頻度調査票を用いて測定し、血中の脂質類や ω -3脂肪酸、血栓因子であるのレムナント、アミノ酸等を測定した。これらの測定結果を用いて、食事摂取の内容と血液性状との関連性を検討した。

2. 方 法

2.1 被験者

投薬等による治療及び食事制限を行っていない人を健常者とし、このうち50才以上の男性を本研究の被験者とした。被験者の募集は昭和女子大学及びNPO法人「食と健康プロジェクト」により行った。被験者の年齢、身長、体重はアンケートにより把握した。

本研究は昭和女子大学ヒト臨床試験倫理委員会に申請し承認を受けた。

2.2 食事摂取調査

被験者の食事摂取状況を1ヶ月思い出し法による半定量的食事調査票 (FFQ)¹⁾により把握した。調査票により、推定摂取エネルギー量 (エネルギー量, kcal/日), 推定摂取たんぱく質比率 (たんぱく質比率, %), 推定脂質比率 (脂質比率, %), 推定炭水化物比率 (炭水化物比率, %), 推定肉類摂取量 (肉類量, kcal/日), 推定魚介類摂取量 (魚介類量, kcal/日)等を算出した。

2.3 感情の状況調査

感情の状況を、アンケート記入型の気分プロフィール検査方法の一つである日本語版POMS短縮版を用いて測定した。POMS短縮版は30問の設問からなる5段階で回答するアンケート形式の質問用紙で、緊張、抑うつ、怒り、活気、疲労、混乱の6つの感情尺度から気分や感情の状態を測定する事が可能である。

2.4 血中脂質類およびアミノ酸類の測定

10時間以上絶食後、被験者の血液を腕静脈よりの採血により採取した。その後血漿を遠心分離により分画、取得し、測定までの間-80℃に保存した。保存後、以下に示した項目を株式会社エス・アール・エルに委託して測定を行った。

血中脂質類として、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、総コレステロール、トリグリセリド、RLP-コレステロール、RLP-トリグリセリド、ジホモ- γ -リノレン酸、アラキドン酸、EPA、DHAを測定した。同時にインスリンの測定を行った。血中アミノ酸類として、Taurine, Aspartic acid, Hydroxyproline, Treonine, Treonine, Serine, Asparagine, Glutamic acid, Glutamine, Sarcosine, α -Aminoadipic acid, Proline, Glycine, Alanine, Citrulline, α -Aminobutyric acid, Valine, Cystine, Cystathionine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, α -Amino β -hydroxybutyric acid, β -Alanine, β -Amino-isobutyric acid, γ -Aminobutyric acid, Monoethanolamine, Homocystine, Histidine, 3-Methylhistidine, 1-Methylhistidine, Carnosine, Anserine, Tryptophan, Hydroxylysine, Ornithine, Lysine, Arginineの測定を行った。これらの測定結果より、総アミノ酸量、必須アミノ酸量 (EAA)、非必須アミノ酸量 (NEAA)、分岐鎖アミノ酸量 (BCAA)を算出した。

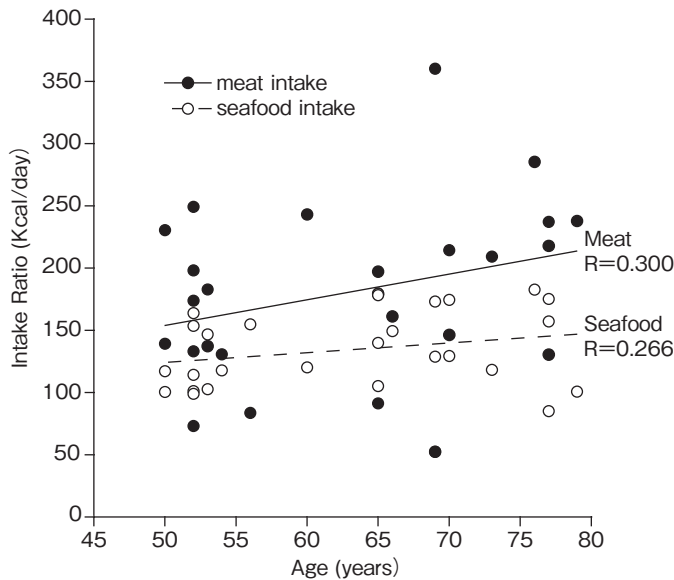


Fig.1 Relationship between age and meat and seafood intake ratio.

2.5 血糖値

血糖値は、10時間以上絶食後、ハンディータイプの血糖度計（メディセーフミニGR-102，テルモ社製）を用いて、被験者自身が測定した。

3. 結果と考察

3.1 被験者

本研究では28名が応募し、26名を被験者とした。被験者の平均年齢は 62.8 ± 10.2 歳で、50～59歳は11名、60～69歳は7名、70歳以上は8名で、最高齢の被験者は79歳であった。被験者の身長は 169.4 ± 7.4 cm、体重は 69.2 ± 9.3 kg、BMIは 24.1 ± 2.6 kg/m²であった。2013年における日本人の60～64歳の平均身長は167.2cm、平均体重は65.3kg、23.3kg/m²である事から²⁾、本研究の被験者は、日本人の平均的な体格に含まれると考えられた。

3.2 食事摂取調査

被験者のエネルギー量は 2020.3 ± 261.8 kcal/日であった。身体活動レベルの低い基準体重65.0kg、50～69歳男性のエネルギー代謝量2,100kcal/日³⁾に比べ、やや低い値であった。た

んぱく質比率 $17.7 \pm 2.6\%$ 、脂質比率 $27.3 \pm 3.9\%$ 、炭水化物比率 $46.7 \pm 6.9\%$ であった。この事から、日本人の食事摂取基準（2010年度版）による脂質の摂取比率が目標量である20%以上25%未満²⁾に比べやや高く、炭水化物の摂取比率が目標量である50%以上70%未満²⁾に比べてやや低い値であった。

肉類量は 180.7 ± 70.0 kcal/日、魚介類量は 134.3 ± 29.7 kcal/日であり、被験者における肉類の摂取量は魚介類の摂取量に比べて有意に高かった。

被験者の年齢とエネルギー量とに弱い正の相関（0.356）を、たんぱく質比率との間に弱い正の相関（0.320）を認めた。また、年齢と肉類量とに弱い正の相関（0.300）を、魚介とに弱い正の相関（0.266）を認めた（Fig. 1）。

3.3 感情の状況調査

感情尺度と年齢、BMI等や肉類の摂取量や魚介類の摂取量といった、食事摂取の状態との間に相関は認められなかった。

3.4 血中脂質類、アミノ酸類および血糖値

被験者のHDL-コレステロールは 55.8 ± 13.4 mg/

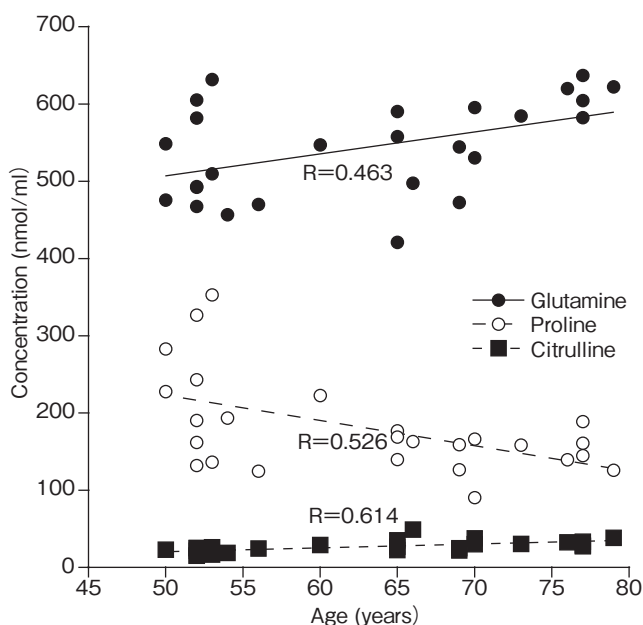


Fig.2 Relationship between age and blood amino acid level.

dl, LDL-コレステロールは 117.8 ± 32.4 mg/dl, トリグリセリドは 128.0 ± 88.8 mg/dl, 総コレステロールは 197.9 ± 33.6 mg/dlであった。HDL-コレステロールは40mg/dl以上, LDL-コレステロールは120mg/dl未満, トリグリセリドは150mg/dl未満, 総コレステロールは200mg/dl未満が正常値とされていることから⁴⁾, 被験者はLDL-コレステロール及び総コレステロールで正常の上限に近い値を示していた。

血栓因子のレムナントとして重要であるRLP-コレステロールは 8.5 ± 11.2 mg/dlであった, 同様のRLP-トリグリセリドでは被験者の半数で15mg/dl以下であった。RPL-コレステロールの基準値は7.5mg/dl以下であることから, 被験者群は基準値を超える値を示していた。被験者のうち基準値を超えたのは30.8%に当たる8名であった。

ω -3脂肪酸であるEPAは 79.8 ± 41.0 μ g/ml, DHAは 151.4 ± 54.8 μ g/mであった。 ω -6脂肪酸であるジホモ- γ -リノレン酸は 35.8 ± 8.5 μ g/ml, アラキドン酸は 187.5 ± 31.4 μ g/mlであった。

被験者のインスリンは 6.5 ± 3.1 μ IU/mlであった。糖負荷を行わない際の基準値は1.84~12.2 μ IU/mlであることから被験者群は基準内であると考えられた。被験者のうち1名がインスリン基準値を上回った。

被験者の血中アミノ酸量はTaurine 79.7 ± 13.1 nmole/ml, Aspartic acid 3.9 ± 0.6 nmole/ml, Hydroxyproline 13.9 ± 3.9 nmole/ml, Treonine 126.2 ± 25 nmole/ml, Serine 100.9 ± 15.9 nmole/ml, Asparagine 44.8 ± 6.0 nmole/ml, Glutamic acid 56.5 ± 18.9 nmole/ml, Glutamine 543.9 ± 62.6 nmole/ml, Proline 181.0 ± 62.7 nmole/ml, Glycine 207.3 ± 29.9 nmole/ml, Alanine 384.5 ± 89.6 nmole/ml, Citrulline 27.2 ± 7.7 nmole/ml, α -Aminobutyric acid 24.3 ± 6.2 nmole/ml, Valine 238.8 ± 33.7 nmole/ml, Cystine 21.8 ± 6.2 nmole/ml, Methionine 27.9 ± 4.4 nmole/ml, Isoleucine 69.8 ± 15.7 nmole/ml, Leucine 131.8 ± 20.5 nmole/ml, Tyrosine 65.1 ± 11.8 nmole/ml, Phenylalanine 60.3 ± 6.9 nmole/ml, β -Alanine 6.8 ± 0.7 nmole/ml, β -Amino-iso-

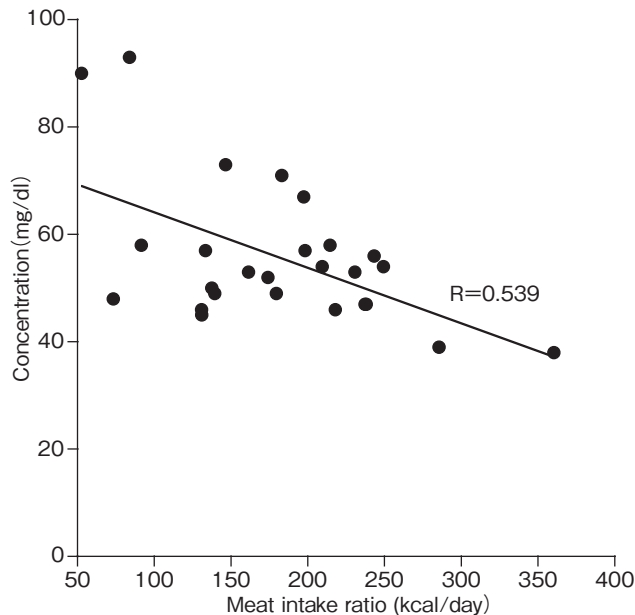


Fig.3 Relationship between meat intake ratio and blood HDL-Cholesterol level.

butyric acid 1.9 ± 2.5 nmole/ml, Monoethanolamine 8.2 ± 1.1 nmole/ml, Histidine 84.2 ± 9.3 nmole/ml, 3-Methylhistidine 1.4 ± 2.2 nmole/ml, 1-Methylhistidine 6.9 ± 9.7 nmole/ml, Tryptophan 60.5 ± 9.1 nmole/ml, Ornithine 59.4 ± 13.5 nmole/ml, Lysine 193.0 ± 23.3 nmole/ml, Arginine 94.6 ± 20.2 nmole/ml であった。Sarcosine 及び α -Aminoadipic acid はトレースとして検出された。Cystathionine, α -Amino β -hydroxybutyric acid, γ -Aminobutyric acid, Homocystine, Carnosine, Anserine, Hydroxylysine は検出されなかった。総アミノ酸量は 2870.4 ± 273.7 nmole/ml, EAA 992.3 ± 98.6 nmole/ml, NEAA 1878.1 ± 213.3 nmole/ml, BCAA 440.3 ± 676.2 nmole/ml であった。

被験者の空腹時血糖値は 105 ± 17.2 mg/dl であった。糖尿病の診断基準である空腹時血糖値 126 mg/dl⁵⁾ を超える被験者は3名であり、2名は50歳代、1名は70歳代であった。

年齢や食事状況と脂質類、レムナント、インス

リン、アミノ酸等との関係を検討した。その結果、年齢と脂質類、レムナント、アミノ酸等との間に相関は認められなかった。年齢とアミノ酸類では Glutamine とにやや強い正の相関 (0.463) を、Proline とにやや強い負の相関 (0.526) を、Citrulline とにやや強い正の相関 (0.614) を認めた (Fig. 2)。

たんぱく質比率と脂質類ではDHAとの間に弱い正の相関 (0.277) を認めた。その他の脂質類やレムナントとたんぱく質比率の間には相関を認めなかった。たんぱく質比率とTryptophan とにやや強い負の相関 (0.414) を認めた。それ以外に強い相関を示すアミノ酸類は認められなかった。

肉類量と脂質類では、HDL-コレステロールとの間にやや強い負の相関性 (0.539) を認めた (Fig. 3)。HDL-コレステロールが基準値の 40 mg/dl⁴⁾ を下回る被験者は2名であった (Fig. 3)。これらの被験者のエネルギー量は各々 2581 kcal/日 および 2262 kcal/日 であり、たんぱく質比率は21%および24%、脂質比率は34%及び30%と被験

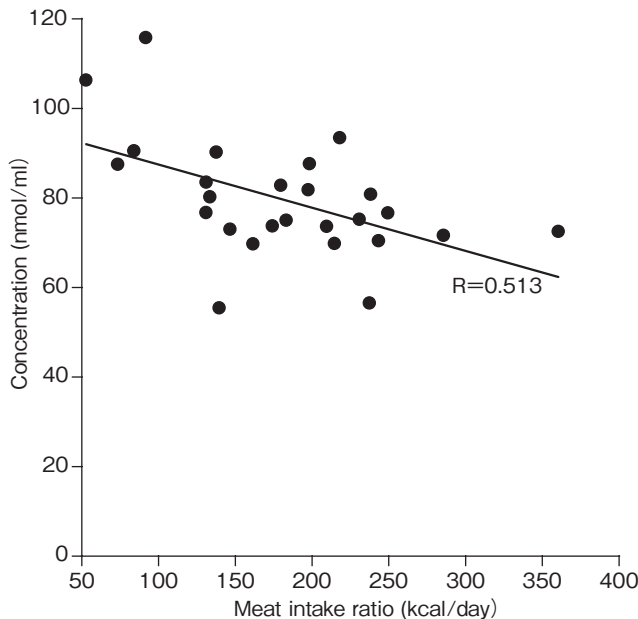


Fig.4 Relationship between meat intake ratio and blood taurine level.

者群の中でも高い値であった。これに対し、炭水化物比率は41%および43%であった。エネルギー量に占める肉類量は13.9%および12.6%となり、この2名を含まない被験者の平均 $8.4 \pm 2.5\%$ に比べて高い値となっていた。肉類量とEPAとの間に弱い負の相関(0.340)を認めた。その他の脂質類やレムナントと間には相関を認めなかった。肉類量とインスリンとの間に弱い正の相関(0.253)を認めた。肉類量とアミノ酸類では、Taurineとにやや強い負の相関(0.513)を認めた(Fig. 4)。それ以外に強い相関を示すアミノ酸類は認めらなかった。

魚介類量とDHAとの間にやや強い正の相関(0.470)を、同様にEPAとの間にやや強い正の相関(0.400)を認めた。魚介類量とその他の脂質類、レムナントおよびインスリンとの間に相関を認めなかった。魚介類量とHistidineとにやや強い負の相関(0.402)を認めた。それ以外に強い相関を示すアミノ酸類は認めらなかった。

肉類の摂取量と血中HDL-コレステロールとの

間にやや強い正の相関を認めたが、肉類の摂取量ばかりでなく、摂取エネルギー量や脂質量等も影響を与えていると推察され、今後被験者数を増やして検討する必要があると考えられる。

以上の様なことから、50歳代以上の年齢の男性において、食事の中のたんぱく質比率や肉類の摂取量は血中脂質類や血栓因子、インスリン、アミノ酸に大きな影響を与えないと推察された。しかし被験者数が少ないことから、今後被験者を増やすと共に、肉類から摂取されて血中に存在するトランス脂肪酸の測定や、糖尿病や循環器疾患患者との比較を行う事により、食肉類の摂取が健康に与える影響をより明確に推察できると考えられる。

4. 考 察

健康な50歳以上の男性26名を被験者として、食事摂取状況と血中の脂質類、 ω -3脂肪酸、 ω -6脂肪酸、血栓因子であるのレムナント、アミノ酸等の関係を検討した。被験者の年齢は 62.8 ± 10.2 歳、BMIは $24.1 \pm 2.6 \text{ kg/m}^2$ であった。被験者の推

定エネルギー摂取量は $2020.3 \pm 261.8 \text{ kcal/日}$ 、推定たんぱく質摂取比率 $17.7 \pm 2.6\%$ 、推定脂質摂取比率 $27.3 \pm 3.9\%$ 、推定炭水化物摂取比率 $46.7 \pm 6.9\%$ であり、脂質摂取比率がやや多く、炭水化物摂取比率はやや少なかった。被験者における肉類摂取量は $180.7 \pm 70.0 \text{ kcal/日}$ 、魚介類摂取量は $134.3 \pm 29.7 \text{ kcal/日}$ であり、肉類の摂取は魚介類の摂取に比べて有意に高かった。被験者のHDL-コレステロールは $55.8 \pm 13.4 \text{ mg/dl}$ 、LDL-コレステロールは $117.8 \pm 32.4 \text{ mg/dl}$ 、総コレステロールは $197.9 \pm 33.6 \text{ mg/dl}$ 、トリグリセリドは $128.0 \pm 88.8 \text{ mg/dl}$ であった。血拴因子のレムナントリポ蛋白として重要であるRLP-コレステロールは $8.5 \pm 11.2 \text{ mg/dl}$ 、RLP-トリグリセリドは被験者の半数で 15 mg/dl 以下であった。 ω -3脂肪酸であるEPAは $79.8 \pm \mu\text{g/ml}$ 、DHAは $151.4 \pm 54.8 \mu\text{g/ml}$ であった。 ω -6脂肪酸であるジホモ- γ -リノレン酸は $35.8 \pm 8.5 \mu\text{g/ml}$ 、アラキドン酸は $187.5 \pm 31.4 \mu\text{g/ml}$ であった。被験者のインスリンは 6.5 ± 3.1

$\mu\text{IU/ml}$ であった。糖負荷を行わない際のインスリン基準値は $1.84 \sim 12.2 \mu\text{IU/ml}$ であることから被験者群は基準内であると考えられた。総アミノ酸量は $2870.4 \pm 273.7 \text{ nmole/ml}$ であり、各々のアミノ酸は $0 \sim 637.2 \text{ nmole/ml}$ であった。空腹時血糖値は $105 \pm 17.2 \text{ mg/dl}$ であった。以上のようなことから、食事の中のたんぱく質比率や肉類の摂取量は、通常の摂取量であれば血中脂質類や血拴因子、インスリン、血中アミノ酸に大きな影響を与えないと推察された。

文 献

- 1) 丹後俊郎ら：，日本公衆衛生学会誌，47，230～244，2000.
- 2) 文部科学省：学校保健統計調査・運動能力調査
- 3) 厚生労働省：日本人の食事摂取基準2010年度版，p 45～117，第一出版，東京，2009.
- 4) 日本動脈硬化学会：動脈硬化性疾患予防ガイドライン2007年版，p 6，日本動脈硬化学会，東京，2007.
- 5) 岩本安彦ら：糖尿病最新の治療，2013～2015，p 47，南江堂，東京，2013.

畜産物由来ヘム鉄摂取について食事調査における研究 —発育期スポーツ選手の体組成に対する効果—

Study of the porcine blood heme-iron intake and the nutrition ingestion condition

—Effect of the heme-iron on the body composition for the growth phase sport player—

坂 元 美 子

(神戸女子大学健康福祉学部)

Yoshiko Sakamoto

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

We have demonstrated that if total energies and various nutrient intakes from the food did not satisfy the reference value, the blood hemoglobin level was decreased. In order to maintain the blood hemoglobin values for the growing athletes, they needed to intake not only the heme iron but also nutrients in regard to hemoglobin metabolism. About the changes in blood hemoglobin values before and after intakes of heme iron supplements, if the total energies from the food of the athletes were deficient, we showed no difference in the effect of the intakes heme iron supplements. On the other hand, if total energies and various nutrient intakes from the food is satisfied and blood hemoglobin level is high, hemoglobin values are maintain or increase depending on the heme iron supplements. We got an indication that regarding the changes in body composition of before and after intake of heme iron supplements, when the athletes implement the suitable nutrient intake, adequate training philosophy, and the supplementation of heme iron, they can increase skeletal muscle mass and protein level, and they can decrease the amount of body fat.

1. 目 的

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

ていない。適切な食事量と栄養摂取ができていない場合、健全な精神と肉体を育てることは不可能になるばかりではなく、成長障害、疲労骨折、鉄欠乏性貧血、摂食障害など様々な障害の要因になる²⁾。特に、激しい運動が原因でおこる貧血はスポーツ貧血と呼ばれている³⁾。スポーツ選手の貧血は、貧血症状と同時に競技能力の低下をもたらす²⁾。通常は貧血の指標が正常値であっても、激しい運動などで急激に赤血球やヘモグロビンが減

少し、貧血の症状を呈することもあり⁴⁾、適切な栄養素の摂取と基礎体力に見合ったトレーニングメニューの作成が必要と考えられる。そこで、本研究は、持続的な能力が必要なスポーツであるサッカー選手の血中ヘモグロビン値と体組成を測定し、消費エネルギーや運動強度に見合った栄養素摂取がなされているかについて栄養調査を行い、貧血予防やスポーツ選手の理想的な体組成と栄養摂取状況との関連を検討することおよび、発育期スポーツ選手の畜産物由来ヘム鉄摂取の必要性を検討することを目的とする。

2. 方 法

調査対象は、京都府の高校サッカー部に所属し、3ヶ月間全ての測定を行うことのできた男子部員トップチーム25名と新入生22名。対象チームは、地区大会では常に上位にあり、全国大会を目標としている比較的高レベルのチームである。

2.1 栄養摂取状況調査

対象者の保護者に、連続した3日間の食事内容を評量法で測定してもらい、自記式記入法で調査用紙に記入してもらう。エネルギー・栄養素摂取量は栄養計算ソフトエクセル栄養君Ver.5（健帛社）を用いて算出する。

2.2 スポーツ貧血調査

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

2.3 エネルギー消費量調査

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

2.4 身体計測

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

試合数が増加し、疲労が蓄積しやすい7月に、研究の目的と内容を説明し、同意を得た上で、食事調査を行い、食事調査と同日の3日間カロリーカウンターを装着しエネルギー消費量を測定する。同時に対象選手の身体計測、ヘモグロビン値測定を行う。7月より畜産物由来ヘム鉄3.5mg／日を、トップチームの25名と新入生の13名に3ヶ月間摂取させ、サプリメントを摂取していない新入生9名とともに約4週間ごとに計4回、血中ヘモグロビン値測定と身体計測を行った。新入生のサプリメント摂取群と非摂取群の抽出は、名簿より無作為抽出で行った。

本研究は、神戸女子大学ヒト倫理審査委員会（承認番号H25-14）の倫理審査承認のうえ、対象者とその保護者に対して、説明書を研究者が配布し説明したのち、被験者は20才未満のため対象者とその保護者、サッカー部の監督および学校長に書面により同意を得たうえで行った。

3. 結果と考察

3.1 エネルギー・栄養摂取状況と血中ヘモグロビン値

トップチーム（以下1群）、新入生サプリメント摂取群（以下2群）、新入生サプリメント非摂取群（以下3群）について、各群のエネルギー消費量、エネルギー・栄養素摂取量と血中ヘモグロビンの3ヵ月後の変化をTable 1に示した。エネルギー・栄養素摂取量についてそれぞれの基準値として、エネルギーは日本人の食事摂取基準（2010年版）¹⁾の対象者と同年代の男性、身体活動レベル3とし、たんぱく質、脂質、炭水化物は基準エネルギー値からP:F:C=15:25:60のエネルギー比率で算出した。その他の栄養素は、日本人の食事摂取基準（2010年版）において推奨量が設定されているものは推奨量を、設定されていないもの（カリウム、リン、マンガン、ビタミンD、

table.1 The energy consumption, energy intake, nutritional intake and changes in blood hemoglobin concentration before and after ingestion of the target person

	Energy consumption	Energy intake	Protein	Fat	Carbohydrate	potassium	Calcium	Magnesium	Iron	Zinc	Copper	selenium
	kcal	kcal	g	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
group1 (n = 25)	2707	2676	92.3	78.7	386.4	2838	559	281	8.7	11.6	1.41	77
SD (±)	307	536	13.7	16.7	96.9	654	240	67	2.2	2.4	0.32	19
group2 (n = 11)	2464	2995	109.4	94.2	410.5	3095	588	318	9.3	13.8	1.80	101
SD (±)	228	558	29.8	27.6	80.5	829	220	84	2.4	3.5	0.72	37
group3 (n = 9)	2342	2415	85.0	80.0	327.5	2335	560	243	7.8	10.7	1.40	72
SD (±)	372	806	37.0	48.2	73.0	938	575	79	2.6	4.7	0.52	28
Reference	3100	3100	116.2	86.1	465.0	2700	800	350	9.5	13.0	0.90	35

	VitaminA	VitaminE	VitaminB 1	VitaminB 2	Niacin	VitaminB 6	VitaminB12	Folic acid	VitaminC	HGB pre	HGB post
	μ gRE	mg	mg	mg	mg	mg	μ g	μ g	mg	g/dl	g/dl
group1 (n = 25)	650	21.2	1.42	1.45	37.80	1.53	7.0	327	148	14.6	14.4
SD (±)	282	5.9	0.39	0.35	6.80	0.39	3.4	82	139	1.0	1.1
group2 (n = 11)	688	9.5	1.70	1.68	23.73	1.71	8.2	380	134	14.9	15.3
SD (±)	176	1.7	0.83	0.44	9.79	0.58	4.1	110	57	0.9	1.3
group3 (n = 9)	481	18.8	1.20	1.31	34.00	1.50	5.9	268	106	14.8	14.5
SD (±)	270	7.4	0.67	0.65	16.00	1.01	3.4	72	61	0.8	0.8
Reference	900	8.0	1.50	1.70	16.00	1.40	2.4	240	100	14.0	14.0

ビタミンE, ビタミンK, パントテン酸) は目安の量とした。

エネルギー充足していたのは2群と3群であったが基準値は満たしていなかった。ビタミンE, ナイアシン, ビタミンCを除く栄養素摂取量において2群が多く摂取していた。銅, セレン, ナイアシン, ビタミンB 6, ビタミンB 12, 葉酸, ビタミンCについては3群とも, カリウムは1群と2群が基準値を満たしていた。たんぱく質, 炭水化物, カルシウム, マグネシウム, 鉄, ビタミンA, ビタミンB 2については3群とも基準値を満たしていなかった。それ以外の栄養素については, 2群のみが基準値を満たしていた。血中ヘモグロビン値は, 2群のみが上昇していた。前年度の報告書において, 1ヶ月間のみの摂取で, 72名中51名の選手が, 血中ヘモグロビンが低下しており, ヘム鉄サプリメントの継続摂取で血中ヘモグ

ロビンの増加の可能性も考察したが, 以上の結果から, 成長期スポーツ選手が血中ヘモグロビン値を維持するためには, ヘム鉄の摂取のみならず, ヘモグロビン代謝に関与する栄養素の基準値を満たす摂取が必要であることが考えられる。また, スポーツをすることによって増加するエネルギー消費量に見合ったエネルギー・栄養素量の摂取が必要であることが示唆された。

3.2 サプリメント摂取前後の血中ヘモグロビン値の変化

トップチームのサプリメント摂取前の血中ヘモグロビン値がスポーツ選手の基準値である14g/dl以上の選手 (以下1-a群), トップチームのサプリメント摂取前の血中ヘモグロビン値が14g/dl未満の選手 (以下1-b群), 新入生サプリメント摂取前の血中ヘモグロビン値が14g/dl以上の選手 (以下2-a群), 新入生サプリメント摂取前の血

table.2 The energy consumption, energy intake, nutritional intake and changes in blood hemoglobin concentration before and after ingestion of the target person

	Energy consumption	Energy intake	Protein	Fat	Carbohydrate	potassium	Calcium	Magnesium	Iron	Zinc	Copper	selenium
	kcal	kcal	g	g	g	mg	mg	mg	mg	mg	mg	mg
group 1-a (n = 19)	2744	2668	91.2	79.4	383.5	2824	550	278	8.5	11.7	1.40	74
SD (±)	264	493	14.7	17.6	83.7	653	254	67	2.0	2.5	0.31	16
group 1-b (n = 6)	2590	2700	96.0	76.5	395.6	2881	586	290	9.4	11.5	1.43	88
SD (±)	371	617	7.2	11.1	123.3	602	161	59	2.5	1.8	0.33	21
group 2-a (n = 9)	2500	3065	110.1	93.6	428.2	3134	594	326	9.5	14.3	1.91	100
SD (±)	235	582	32.6	29.1	78.6	879	241	90	2.6	3.7	0.75	40
group 2-b (n = 2)	2303	2681	106.3	96.8	330.6	2917	564	281	8.6	11.9	1.30	106
SD (±)	59	259	8.5	19.2	10.1	508	59	30	0.3	1.6	0.14	17
group 3-a (n = 7)	2377	2282	81.1	71.2	318.3	2453	598	247	7.5	10.0	1.39	70
SD (±)	167	646	37.0	37.6	61.2	871	606	81	2.5	4.5	0.53	29
group 3-b (n = 2)	1855	2880	98.3	110.8	359.8	2826	427	229	8.5	13.2	1.24	79
SD (±)	294	927	21.4	55.7	83.1	809	113	44	2.4	2.7	0.29	8
Reference	3100	3100	116.2	86.1	465.0	2700	800	350	9.5	13.0	0.90	35

	VitaminA	VitaminE	VitaminB1	VitaminB2	Niacin	VitaminB6	VitaminB12	Folic acid	VitaminC	HGB pre	HGB post
	μgRE	mg	mg	mg	mg	mg	μg	μg	mg	g/dl	g/dl
group 1-a (n = 19)	656	7.6	1.42	1.46	20.1	1.53	6.7	332	166	15.1	14.5
SD (±)	255	1.8	0.41	0.38	5.1	0.39	3.5	84	151	0.5	1.0
group 1-b (n = 6)	630	7.7	1.42	1.44	22.3	1.53	7.7	313	91	13.1	13.9
SD (±)	335	1.0	0.27	0.15	2.5	0.34	2.6	70	32	0.3	1.0
group 2-a (n = 9)	680	9.7	1.76	1.70	24.1	1.76	8.8	383	139	15.2	15.4
SD (±)	192	1.8	0.90	0.49	10.6	0.61	4.3	115	59	0.7	1.2
group 2-b (n = 2)	729	8.5	1.48	1.58	22.3	1.50	5.2	363	110	13.6	15.0
SD (±)	45	0.5	0.28	0.05	4.8	0.42	0.8	83	33	0.0	1.7
group 3-a (n = 7)	440	6.5	1.20	1.19	18.1	1.24	5.7	254	92	15.1	14.8
SD (±)	276	2.5	0.71	0.56	9.6	0.54	3.5	63	40	0.5	0.6
group 3-b (n = 2)	623	8.1	1.22	1.75	21.8	2.49	6.5	320	154	13.7	13.5
SD (±)	27	2.8	0.05	0.61	4.1	1.34	1.7	57	78	0.2	0.4
Reference	900	8.0	1.50	1.70	16.0	1.40	2.4	240	100	14.0	14.0

中ヘモグロビン値が14g/dl未満の選手（以下2-b群）、新入生血中ヘモグロビン値が14g/dl以上の選手（以下3-a群）、新入生血中ヘモグロビン値が14g/dl未満の選手（以下3-b群）について各群のエネルギー消費量、エネルギー・栄養素摂

取量と血中ヘモグロビンの3ヵ月後の変化をTable 2に示した。

エネルギーが充足しており、基準値をほぼ満たしているのは2-a群だけであったが、1-b群、2-b群、3-b群はエネルギーが充足していた。

table.3 The blood hemoglobin concentration and physical situation of the target person

		HGB : g/dl (SD)	Height : cm (SD)	Body weight : kg (SD)	Intracellular water content : ℓ (SD)	Extracellular water content : ℓ (SD)	Skeletal muscle mass : kg (SD)
group1 (n=20)	pre	14.6 (1.0)	171.9 (5.8)	60.9 (5.8)	24.7 (3.8)	14.8 (1.3)	31.0 (2.8)
	post	14.4 (1.1)	172.7 (6.0)	60.9 (6.4)	25.8 (2.4)	14.9 (1.5)	31.6 (3.2)
group2 (n=12)	pre	14.9 (1.0)	170.0 (5.9)	56.9 (4.4)	23.8 (1.8)	14.2 (1.0)	29.1 (2.3)
	post	15.1 (1.4)	171.5 (6.1)	57.8 (4.9)	24.4 (2.2)	14.4 (1.2)	29.9 (2.7)
group3 (n=9)	pre	14.8 (0.8)	166.3 (5.1)	53.9 (5.8)	22.2 (2.4)	13.1 (1.5)	26.9 (3.1)
	post	14.5 (0.8)	167.7 (5.3)	54.5 (6.0)	22.5 (2.4)	13.2 (1.6)	27.3 (3.1)
		Amount of body fat : kg (SD)	BMI (SD)	Body fat percentage : % (SD)	Amount of protein : kg (SD)	Mineral content : kg (SD)	
group1 (n=20)	pre	5.4 (1.9)	20.4 (1.5)	8.9 (2.7)	10.9 (0.9)	3.72 (0.33)	
	post	4.8 (1.7)	20.2 (1.7)	7.8 (2.3)	11.1 (1.0)	3.75 (0.40)	
group2 (n=12)	pre	5.1 (1.6)	20.0 (1.2)	8.9 (2.5)	10.3 (0.7)	3.51 (0.2)	
	post	4.9 (1.5)	19.6 (1.2)	8.5 (2.5)	10.6 (0.9)	3.59 (0.30)	
group3 (n=9)	pre	5.8 (2.1)	19.4 (1.4)	10.6 (3.4)	9.6 (1.0)	3.25 (0.36)	
	post	5.8 (2.1)	19.3 (1.3)	10.5 (3.4)	9.7 (1.0)	3.31 (0.37)	

たんぱく質、炭水化物は全ての群で摂取量が基準値を下回っていたが、どちらも2-a群が最も基準値に近い摂取量であった。脂質は2-a群、2-b群、3-b群で基準値を満たしており、3-b群が最も多かった。カルシウム、マグネシウム、ビタミンAは全ての群で基準値を満たしていなかった。脂質、カルシウム、セレン、ビタミンA、ビタミンB2、ビタミンB6、ビタミンC以外の栄養素は全て2-a群が最も摂取量が多かった。1-a群、3-a群、3-b群で血中ヘモグロビン値が減少し、1-b群、2-a群、2-b群は上昇した。以上の結果から、エネルギー充足に見合う栄養摂取ができていなければ、ヘム鉄サプリメントを摂取しても血中ヘモグロビンの上昇に効果的に働かないことが示唆された。3-b群は、エネルギーは充足しているが、脂質からのエネルギー摂取量が多いことから、エネルギー源栄養素として、たんぱく質と炭水化物の摂取の必要性が示唆された。また、血中ヘモグロビン値が高値であっても、エネルギー充足に見合ったエネルギー・栄養素摂

取ができていれば、ヘム鉄サプリメントを摂取することで維持または、さらに増加させることも可能であると考ええる。

3.3 サプリメント摂取前後の体成分の変化

体成分測定が7月と10月の2回行うことの出来たトップチームの選手18名（以下1群）、新入生サプリメント摂取群13名（以下2群）、新入生サプリメント非摂取群9名（以下3群）について、血中ヘモグロビン値と体組成の変化をTable 3に示した。

1群は体重の増加は見られなかったが、骨格筋量が増加し、体脂肪量が減少した。2群と3群ともに体重、骨格筋量の増加は見られるが、体脂肪量は、2群で減少し、3群では大きな変化は見られなかった。また、体たんぱく質量は1群と2群で増加したが3群では大きな変化は見られなかった。3群間の検定について、一元配置分散分析(Dunnett)を行った結果、危険率5%未満を有意とすると各群間に有意な差は見られなかったが、骨格筋(P値=0.17)について3群よりも2

群のほうが増加傾向にあり、体脂肪量（P 値 = 0.13）と体脂肪率（P 値 = 0.12）において3群よりも1群のほうが減少傾向にあった。また、たんぱく質量（P 値 = 0.18）は3群よりも2群のほうが増加傾向であった。このことから、適切な栄養摂取下でトレーニングを行い、ヘム鉄サプリメントを摂取することで、より効果的に体たんぱく質と骨格筋量を増やし、体脂肪量を減らすことが示唆された。

今回の研究の限界点として、ヘム鉄サプリメント摂取群と非摂取群に分け、摂取前後の変化を見るために群分けをした結果、各群の人数にばらつきが出てしまい、統計解析を十分に行うことができなかった。今後は、対象者数を増やし、各群の人数を同数かつより多くなるように設定し、エネルギー充足と食事摂取状況と、体組成について、畜産物由来ヘム鉄の継続的な摂取が、どのように効果的に働くかについて、より詳細な検討を続けて行う必要があると考える

4. 要 約

エネルギー・栄養摂取状況と血中ヘモグロビン値について、3ヶ月間のヘム鉄サプリメント摂取を行ったが、エネルギー・栄養素摂取量が基準値を満たしていなければ、血中ヘモグロビン値は低下した。成長期スポーツ選手が血中ヘモグロビン値を維持するためには、ヘム鉄の摂取のみならず、ヘモグロビン代謝に関与する栄養素の基準値を満たす摂取が必要であることが考えられる。ま

た、スポーツをすることによって増加するエネルギー消費量に見合ったエネルギー・栄養素量の摂取が必要であることが示唆された。

サプリメント摂取前後の血中ヘモグロビン値の変化について、エネルギー充足に見合う栄養摂取ができていなければ、ヘム鉄サプリメントを摂取しても血中ヘモグロビンの上昇に効果的に働かないことが示唆された。3-b群は、エネルギーは充足しているが、脂質からのエネルギー摂取量が多いことから、エネルギー源栄養素として、たんぱく質と炭水化物の摂取の必要性が示唆された。また、血中ヘモグロビン値が高値であっても、エネルギー充足に見合ったエネルギー・栄養素摂取量ができていれば、ヘム鉄サプリメントを摂取することで維持または、さらに増加することが示唆された。

サプリメント摂取前後の体成分の変化について、適切な栄養摂取下で、トレーニングを行い、ヘム鉄サプリメントを摂取することで、より効果的に体たんぱく質と骨格筋量を増やし、体脂肪量を減らすことが示唆された。

文 献

- 1) 厚生労働省策定：日本人の食事摂取基準〔2010年版〕, p. 118~275, 第一出版社, 東京, 2010.
- 2) 樋口満：公認アスレティックトレーナー専門科目テキスト スポーツと栄養, 財団法人日本体育協会, 48~55, 財団法人日本体育協会, 東京, 2009.
- 3) 鯉川なつえ：日本臨床スポーツ医学会誌, 16 (2), 216~220, 2008.
- 4) 宮崎保：体力科学, 46, 529~534, 1997.

牛肉の質に関連する新たな脂肪酸合成経路の探索 とバイオマーカーの同定

Development of a biomarker of new pathway for the synthesis of fatty acid in bovine intramuscular adipocytes

溝 口 康

(明治大学農学部)

Yasushi Mizoguchi

(School of Agriculture, Meiji University)

Intramuscular fat deposition, known as marbling, and fatty acid composition are economically important factors contributing to the quality of beef. The mechanisms by which acetic acid and glucose are involved in lipid metabolism are unclear. In this study, to understand the molecular mechanism of bovine intramuscular adipogenesis, we examined the effect of acetic acid and glucose on the differentiation of adipose tissue (triglyceride (TG) content and fatty acid composition) and the gene expression levels of fatty acid synthase, stearoyl-CoA desaturase and glucose transporter 4 using a clonal bovine intramuscular preadipocyte (BIP) cell line. The BIP cells were harvested at six days after adipogenic stimulation. The gene expression levels were validated by quantitative real-time PCR. Lipids were extracted as TG according to the Bligh and Dyer method, and the amount of TG was measured by enzyme method. Treatment of the BIP cells with 100 mM acetic acid significantly increased the expression levels of three genes, compared to 10 mM acetic acid treatment ($P < 0.05$). TG content significantly increased with elevated both acetic acid and glucose concentrations ($P < 0.05$). Saturated fatty acid proportions were significantly higher in 1.0g/L D-glucose than in 4.5g/L D-glucose ($P < 0.05$), whereas those of monounsaturated fatty acid were significantly higher in 4.5g/L D-glucose than in 1.0g/L D-glucose ($P < 0.05$). These results indicate that acetic acid and glucose is essential for fatty acid synthesis and accumulation in bovine intramuscular adipogenesis.

1. 目 的

ウシ脂肪交雑は筋肉組織内に脂肪が沈着する現象であり、枝肉評価の中で重要な形質である。脂肪交雑割合の高い肉は高値で取引される。近年、消費者は牛肉に「おいしさ」・「安全」・「健康」を求めるようになり、時代のニーズに対応した牛肉

生産技術の開発が求められている。おいしい牛肉は、脂肪交雑の要因だけではなく脂肪の質にも大きく影響している。脂肪酸は、大きく分けて2種類存在する。炭素間に二重結合を含まない飽和脂肪酸 (Saturated Fatty Acid : SFA) と炭素間に二重結合を1つ含む不飽和脂肪酸 (Monounsaturated Fatty Acid : MUFA) である。

牛肉の不飽和脂肪酸含量は風味・食感・うま味に影響している。不飽和脂肪酸の中でもオレイン酸は風味や食感に影響を与え、オレイン酸はうま味に関連する¹⁾。また、各種脂肪酸の機能性成分に関する研究もおこなわれている。オレイン酸は動脈硬化の予防作用があること、飽和脂肪酸であるステアリン酸はLDLコレステロールの減少効果があること、共役リノール酸は抗腫瘍作用・体脂肪の低減効果があること、多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は認知症予防効果があることなど、様々な報告がある^{2,3)}。このように牛肉の質は、「おいしさの向上」・「機能性成分としての効用」が期待されている。

動物は摂食による脂肪吸収するだけでは不十分であるため、体内で新規合成を行っている。反芻動物であるウシは脂肪酸合成において主に揮発性脂肪酸（酢酸・酪酸・プロピオン酸）をエネルギー源として用いている。グルコースが筋肉内脂肪細胞の脂肪合成に大きく貢献していると報告されている⁴⁾が、ウシ脂肪細胞分化に揮発性脂肪酸がどのような影響を与えているかについては不明な点が多い。そこで本研究は、黒毛和種の胸最長筋にある筋肉内脂肪から樹立された細胞株であるウシ筋肉内脂肪前駆細胞株 (Bovine Intramuscular Pre-adipocyte (BIP))⁵⁾ の分化を脂肪交雑モデルと捉え、揮発性脂肪酸の中でも単純な構造をもつ酢酸およびグルコースの濃度依存的变化が脂肪酸合成および脂肪蓄積に関連する遺伝子の発現量・トリグリセリド (TG) 含量・脂肪酸組成への影響を調べた。

2. 方 法

2.1 細胞培養

BIPの継代・分化誘導の方法と条件は常法に従った⁵⁾。分化誘導培地は、低グルコース濃度 (1.0g/l) および高グルコース濃度 (4.5g/l)、酢酸

濃度 (0 mM・10mM・100mM) に調整した。遺伝子発現量・TG含量・脂肪酸組成解析は、分化誘導後6日目に実施した。

2.2 遺伝子発現量の測定

グアニジウム法により培養細胞の全RNAを回収し、DNase I 処理で混在しているDNAを分解した。その後フェノール・クロロホルム処理で蛋白質を除去し、全RNAを抽出した。cDNAは全RNAを鋳型としrandom hexamerを用いて逆転写反応を行い合成し、定量的 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) を用いて遺伝子発現解析を実施した。解析方法は相対定量Taq Manプローブを用い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により数値化した。定量で使用する内在性のコントロールには、ハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド3-リン酸脱水素酵素 (GAPDH) を用いた。解析対象遺伝子は、Fatty acid synthase (FASN), Stearoyl-CoA desaturase (SCD), Glucose transporter type 4 (GLUT 4) の3遺伝子とした。

2.3 TG含量と脂肪酸組成の測定

TG抽出はBligh and Dyer法⁶⁾によって抽出した。TG含量測定はtriglyceride E-test kit (Wako, Japan) を用いた酵素法によって決定した。脂肪酸組成はガスクロマトグラフィー解析により測定した。ミリスチル酸 (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), リノール酸 (C18:2), リノレン酸 (C18:3), 飽和脂肪酸 (SFA), 一価不飽和脂肪酸 (MUFA) 割合を算出した。

2.4 統計解析

統計解析はSASによって行った。各遺伝子の mRNA 発現量とTG含量における酢酸とグルコースの影響はGLM法を、脂肪酸組成におけるグル

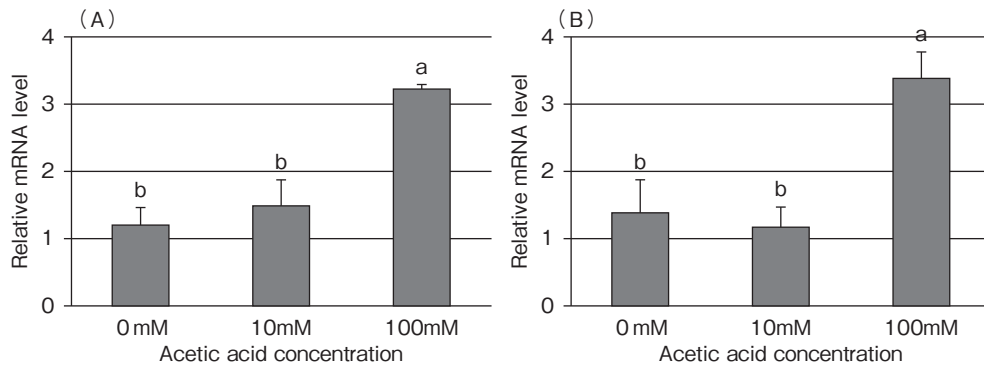


Fig.1 FASN messenger RNA expression levels by treating with 0, 10 and 100 mM acetic acid at day 6 after adipogenic stimulation in BIP cells. These cells were cultured with 1.0 (A) g/l and 4.5 g/l (B) D-glucose. Different letters indicate significant differences ($a > b$, $P < 0.05$).

Table 1 Fatty acid composition by treating with 1.0g/land 4.5g/1D-glucoseat day 6 after adipogenic stimulation in BIP cells.

Fatty acid composition	Low glucose	High glucose
C 14 : 0	7.23 ± 2.1	4.96 ± 2.4
C 14 : 1	0.41 ± 0.47	0.23 ± 0.1
C 16 : 0	59.36 ± 2.32	59.65 ± 3.1
C 16 : 1	0.67 ± 0.36	1.14 ± 0.45
C 18 : 0	26.21 ± 3.26 ^a	16.37 ± 2.39 ^b
C 18 : 1	6.11 ± 1.95 ^b	15.68 ± 0.67 ^a
C 18 : 2	0	1.93 ± 0.76
SFA	92.8 ± 2.68 ^a	81.0 ± 1.70 ^b
MUFA	7.12 ± 2.68 ^b	17.07 ± 0.91 ^a

Values within a row without a common superscript are different ($P < 0.05$)

コース濃度の影響はStudent's t-testによって実施した。結果は平均値 ± 標準誤差で表し、 $P < 0.05$ の時に統計学的に有意であると判断した。

3. 結果と考察

低グルコース濃度時のFASN遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較して100mMは2.2倍 ($P < 0.05$) 増加した (Fig.1 A)。高グルコース濃度時のFASN遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較して100mMは2.9倍 ($P < 0.05$) 増加した (Fig.1 B)。FASNは長鎖脂肪酸合成を調節し、ア

セチルCo-AやマロニルCo-Aから炭素数16の脂肪酸合成を触媒する⁷⁾。低・高グルコース濃度におけるFASN遺伝子発現量 (Data not shown) およびC 16 : 0 割合に差はなかった (Table 1)。以上のことから、FASN遺伝子発現は酢酸濃度に依存し、C 16 : 0 割合に影響を及ぼす可能性があると考察した。

低グルコース濃度時のSCD遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較して100mMは6.9倍 ($P < 0.05$) 増加した (Fig.2 A)。高グルコース濃度時のSCD遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較し

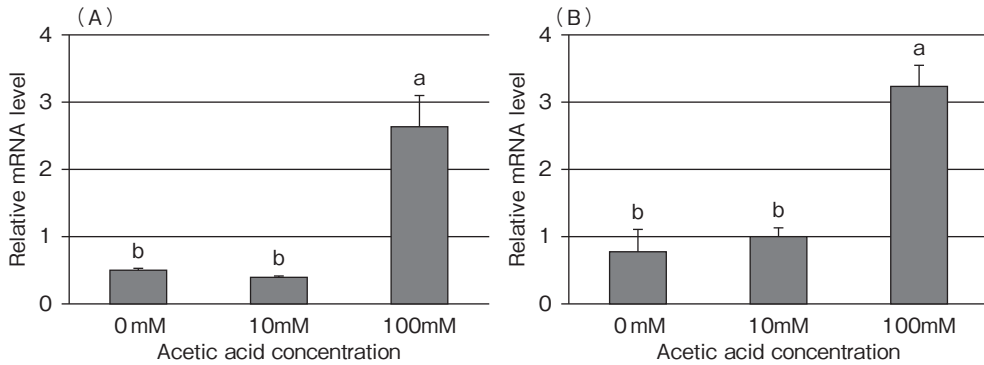


Fig.2 SCD messenger RNA expression levels by treating with 0, 10 and 100 mM acetic acid at day 6 after adipogenic stimulation in BIP cells. These cells were cultured with 1.0 (A) g/l and 4.5 g/l (B) D-glucose. Different letters indicate significant differences ($a > b$, $P < 0.05$).

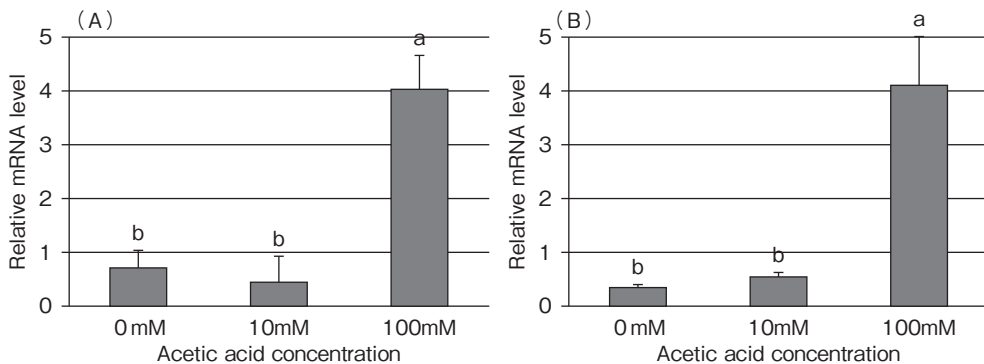


Fig.3 GLUT4 messenger RNA expression levels by treating with 0, 10 and 100 mM acetic acid at day 6 after adipogenic stimulation in BIP cells. These cells were cultured with 1.0 (A) g/l and 4.5 g/l (B) D-glucose. Different letters indicate significant differences ($a > b$, $P < 0.05$).

て100mMは3.3倍 ($P < 0.05$) 増加した (Fig.2 B)。低・高グルコース濃度におけるSCD遺伝子発現量の差はなかった (Data not shown)。しかしながら、MUFA割合は低グルコース濃度よりも高グルコース濃度の方が有意 ($P < 0.05$) に高かった (Table 1)。SCDは飽和脂肪酸を一価不飽和脂肪酸に変換する酵素である。グルコースによるMUFA割合の増加に関して、SCD遺伝子発現量結果と異なることから、SCDタンパク質発現量に違いがあると考察した。

低グルコース濃度時のGLUT 4 遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較して100mMは9.0倍 (P

< 0.05) 増加した (Fig.3 A)。高グルコース濃度時のGLUT 4 遺伝子発現量は、酢酸濃度10mMと比較して100mMは7.1倍 ($P < 0.05$) 増加した (Fig.3 B)。GLUT 4 遺伝子は主に脂肪細胞や骨格筋で特異的に発現しグルコースの取り込みに重要な役割を担っている^{8, 9)}。通常GLUT 4は細胞質に存在しているが、インスリンの刺激により、細胞質から細胞膜へトランスポーケーションし、細胞内へのグルコースの取り込みを増加させる¹⁰⁾。インスリン刺激によるグルコース取り込みの増加は細胞全体のGLUT 4 量が増加するのではなく、GLUT 4の細胞膜へのトランスポーケーションに

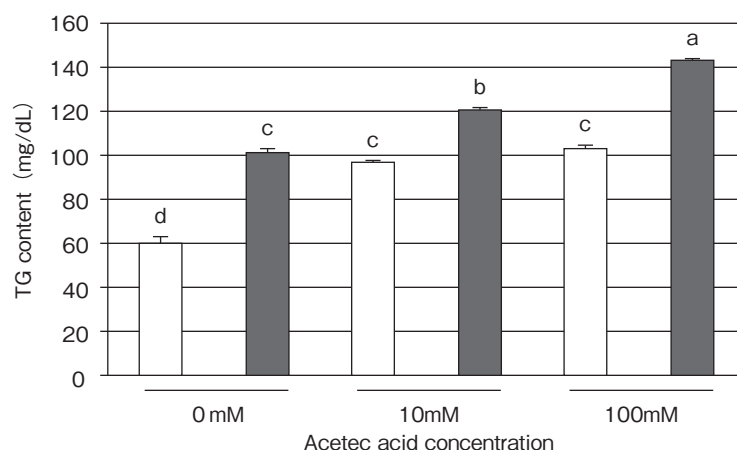


Fig.4 Triglyceride levels by treating with 0, 10 and 100 mM acetic acid at day 6 after adipogenic stimulation in BIP cells. These cells were cultured with 1.0 (white) g/l and 4.5 g/l (black) D-glucose. Different letters indicate significant differences ($a > b > c > d$, $P < 0.05$).

よるものだと考えられている¹¹⁾。黒毛和種筋肉内脂肪前駆細胞株 (BIP) を用いた研究では、GLUT 4 は発現していないと報告されている⁵⁾。本研究において、グルコース濃度による GLUT 4 遺伝子の発現量の差はなかった (Data not shown)。しかしながら、酢酸は GLUT 4 遺伝子発現量を増加した (Fig.3 A, B)。このことから、GLUT 4 遺伝子発現はグルコースよりも酢酸に大きく影響を受けると考察した。

低グルコース濃度時の TG 含量は、酢酸濃度 0 mM と比較して 10 mM では約 1.6 倍 ($P < 0.05$) に 100 mM では約 1.7 倍 ($P < 0.05$) に増加した (Fig. 4)。4.5 g/L D-glucose を与えられた時の TG 含量は酢酸濃度 0 mM と比較して 10 mM では約 1.2 倍 ($P < 0.05$) に 100 mM では約 1.4 倍 ($P < 0.05$) に増加した (Fig. 4)。酢酸濃度を 0 mM・10 mM・100 mM に固定し、グルコース濃度を低および高に変化させたとき、TG 含量は低濃度よりも高濃度で有意 ($P < 0.05$) に増加した (Fig. 4)。以上のことから、酢酸およびグルコースの TG 含量への影響は相乗効果があることを示した。脂肪酸組成に与えるグルコース濃度の影響を Table 1 に示

した。低濃度時の SFA 割合は、高濃度時と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。一方、高濃度時の MUFA 割合は、低濃度時と比較して有意に増加した ($P < 0.05$)。これは主に C18:0 と C18:1 の増減によるものであると考察した。C16:0 割合はグルコース濃度に影響しなかった。TG 含量は酢酸濃度依存的に有意に増加した。ウシの肝細胞において高濃度の酢酸を投与することで、TG 含量が減少したという報告がある¹²⁾。このことからウシ肝細胞と筋肉内脂肪細胞の間では脂肪酸合成メカニズムが異なることを示唆した。過去に *In vivo* において、グルコースは筋肉内脂肪組織にあるアセチルユニットの 50~75% を占めていると報告されている⁴⁾。本研究において、グルコース濃度依存的に TG が増加したこと (Fig. 4) から、BIP においてグルコースの代謝から脂肪酸合成が活発に起こっていると考察した。

4. 要 約

反芻動物の脂肪酸合成の主要前駆体は揮発性脂肪酸であるのに対して、単胃動物はグルコースである。本研究は、揮発性脂肪酸の一種である酢酸

とグルコースがウシ筋肉内脂肪細胞分化にどのような影響を与えるかを、脂肪酸合成関連遺伝子発現およびトリグリセリド (TG) 蓄積により検討した。BIPを用いて、酢酸濃度 (0 mM・10mM・100mM)、グルコース濃度 (1.0g/l・4.5g/l) の2×3群に分け、脂肪細胞分化誘導を行った。分化誘導後6日後にサンプルを抽出した。脂肪酸合成関連遺伝子 (FASN・SCD・GLUT 4) の発現解析をReal Time-PCRによって実施した。TGはBligh and Dyer法を用いて抽出した。TG含量は酵素法により、脂肪酸組成はガスクロマトグラフィーにより測定した。FASN・SCD・GLUT 4 遺伝子発現量は、酢酸濃度依存的に増加し、TG含量は酢酸およびグルコース濃度依存的に増加した。グルコースは、C 18 : 1・MUFA割合を増加させた ($P<0.05$)。以上のことから、脂肪酸合成とその関連遺伝子発現には酢酸とグルコースの両方が重要であると考察した。

文 献

- 1) 広岡博之 (編集) : ウシの科学, 192~197. 朝倉書店, 東京, 2013.
- 2) 財団法人日本食肉消費総合センター : 牛肉の魅力, 20~36. 平成21年度社団法人日本食肉協議会補助事業, 東京, 2009.
- 3) 財団法人日本食肉消費総合センター : 牛肉の魅力, 38~64. 平成21年度社団法人日本食肉協議会補助事業, 東京, 2009.
- 4) Smith SB, Crouse JD : *J Nutr*, **114** : 792~800. 1984.
- 5) Aso H, Abe H, Nakajima I, Ozutumi K, Yamaguchi T, Takamori Y, Kodama A, Hoshino F, Takano S : *Biochem Biophys Res Commun*, **213** : 369~375. 1995.
- 6) Iverson SJ, Lang SLC, Cooper MH : *Lipids*, **36**, 1283~1287. 2001.
- 7) Chakravarty B, Gu Z, Chirala SS, Wakil SJ, Quijcho FA : *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**, 15567~15572. 2004.
- 8) Abe H, Kawakita Y, Hodate K, Saito M. : *J Vet Med Sci*, **63**, 1071~1075. 2001.
- 9) Carvalho E, Schellhorn SE, Zsoltotny JM, Martin S, Tozzo E, Peroni OD, Houseknecht KL, Mundt A, James DE, Kahn BB : *J Biol Chem*, **279**, 1598~1605. 2004.
- 10) Fujimoto, M., Masuzaki, H., Yamamoto, Y., Norisada, N., Imori, M., Yoshimoto, M., Tomita, T., Tanaka, T., Okazawa, K., Fujikura, J., Chusho, H., Ebihara, K., Hayashi, T., Hosoda, K., Inoue, G., Nakao, K : *Biochim Biophys Acta*, **1745**, 38~47. 2005.
- 11) Kanai F, Nishioka Y, Hayashi H, Kamohara S, Todaka M, Ebina Y : *J Biol Chem*, **268**, 14523~14526. 1993.
- 12) Li X, Chen H, Fuan Y, Li X, Lei L, Liu J, Yin L, Liu G, Wang Z : *PloS One*, **8**, e67880. 2013.

牛肉の風味に関与する遺伝子の機能解析

Functional analysis of beef flavor-related genes

米 倉 真 一・廣 田 翔 平

(信州大学農学部)

Shinichi Yonekura and Shohei Hirota

(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

The fatty acid composition of adipose tissue in beef has been recognized as an important trait because of its relationship with beef quality, including favorable beef flavor and tenderness. Previous report suggested that polymorphisms of FABP4 (adipocytes-type fatty acid binding protein) I74V might be genetic factors in part associated with palmitoleic acid, indicating that I/I homozygote exhibited 0.5 % higher percentage than V/V homozygote. In this study, we explored how FABP4 could potentially affect fatty acid composition in cattle and used bovine intramuscular preadipocytes (BIP). As BIP cells have the capacity to proliferate and differentiate into mature adipocytes, they may be useful in studying the mechanism of lipid metabolism. Firstly, we established FABP4 (I/I) or (V/V) overexpressing BIP cells and confirmed that I/I homozygote exhibited significantly higher unsaturated fatty acid composition compared to V/V homozygote. FABP4 have been proposed to play a role in the transport of lipids to specific compartments in the cell. In the next, therefore, we examined the subcellular localization of FABP4 (I/I) and (V/V) during intracellular lipid droplet formation. Although FABP4 (V/V) tended to move into the nucleus, FABP4 (I/I) was mainly localized the lipid droplet. Because FABP4 is thought to govern the transcriptional activities of their ligands by targeting them in the nucleus, we examined the stearoyl-CoA desaturase (SCD) and liver X receptor α (LXR α) mRNA expression levels of both FABP4 (I/I) and (V/V) overexpressing BIP cells. SCD and LXR α were identified as responsible genes associated with fatty acid composition. However, there were no difference between FABP4 (I/I) and FABP4 (V/V) overexpressing BIP cells. These results indicate that the difference of fatty acid composition may result from the difference of trafficking among FABP4 polymorphisms.

1. 目 的

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。体脂肪の質は肉

の食味性に影響し、脂肪の色、光沢、脂肪酸組成などは枝肉評価に重要な役割を持つため、肉用牛を改良する上で重要な因子として注目されている。中でも、「風味」に関係するものとして脂肪酸の質が影響しているといわれており、脂肪が融

ける温度が下がるため不飽和脂肪酸の割合が多くなると口の中で脂肪の風味が広がりやすくなることにつながる¹⁾。また、不飽和脂肪酸は牛肉の熟成期間中に芳香物質となり、「風味」に対する指標となり、さらに、飽和脂肪酸の過剰摂取は血中コレステロールの増加をまねくことから、不飽和脂肪酸含有量が多いことは健康にも良いとされている。肉質を向上させる技術として筋肉内脂肪中の不飽和脂肪酸含量を上昇させる技術が有効であると考えられるが、反芻動物である牛では、ルーメン内微生物により飼料中の不飽和脂肪酸は飽和化されるため餌による制御が非常に困難である²⁾。

近年、分子遺伝学分野の進展と共に、FABP 4をはじめLXR α 、SCD、SREBP-1など複数の脂肪代謝関連遺伝子の多型がウシ筋肉内脂肪中の不飽和脂肪酸含量の違いを生み出すことが、大規模なウシ個体群調査から明らかとなった^{3~5)}。例えばFABP 4にはI74Vの多型が存在し、FABP4I/I型の肉はFABP4V/V型のものに比べ、不飽和脂肪酸含量が高いことが知られている³⁾。しかし、これらの遺伝子多型がどの様に不飽和脂肪酸含量の違いを生み出すのか、その全貌は未だ不明である。この脂肪代謝メカニズムの解明は、牛肉のさらなるおいしさ向上への重要な基礎的知見となることが期待される。よって本研究では、ウシFABP 4多型に着目し、如何にして不飽和脂肪酸含量の違いが生まれるのか、そのメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

本研究では黒毛和種牛（12カ月齢、去勢牛）の胸最長筋部位より樹立した脂肪細胞株であるbovine intramuscular preadipocyte (BIP)を用いた⁶⁾。この細胞にGFPまたはRFPを付加したFABP4 I/I及びFABP4 V/V発現ベクターを導入し、FABP 4各発現細胞間の違いを検討した。

2.1 BIPの培養・分化

BIPは10%FBS含有DMEMで培養する限り、脂肪細胞には分化しない。理想密度 0.85×10^4 cells/cm²でBIPを培養した。コンフルエントになった細胞は分化培地（培養培地に50ng/mlインスリン、5 mMオクタン酸、10mM酢酸、0.25mMデキサメタゾンを無菌的に添加）に置換し、分化誘導刺激を行った。

2.2 FABP 4 発現ベクターの作成

FABP4 I/IおよびFABP4 V/VのcDNA全長をpEGFPおよびpRFPベクター（Clontech社）に導入し、FABP 4各遺伝子型の発現ベクター（GFP-FABP4 I/I, GFP-FABP4 V/V, RFP-FABP4 I/I, RFP-FABP4 V/V）を作成した。

2.3 形質転換

BIPへのベクター導入にはリポフェクション法を用いた。手法はLipofectamine 2000（Invitrogen社）のプロトコルに準拠した。BIPのトランスフェクションには8割コンフルエントの細胞を使用し、分化誘導する細胞はトランスフェクションした翌日、コンフルエントに達したことを確認し、分化培地に置換した。なお一回のトランスフェクションに用いたプラスミド量は $1.0 \mu\text{g/dish}$ とした。

2.4 脂肪酸組成の解析

分化4日目のFABP 4各遺伝子型の発現細胞を用意し、ここから有機化学的処理を施してメチル化した脂肪酸を抽出し、ガスクロマトグラフに添加した。得られたデータは飽和脂肪酸量に対する不飽和脂肪酸割合で算出した。

2.5 蛍光観察

分化2日目および4日目のFABP 4各遺伝子型の発現細胞を4 %PFAで固定した。脂肪量に比例して脂肪滴を緑色蛍光に染める性質を持つBODIPY 493/503および核染色を目的としてDAPIを処理した後、共焦点レーザー走査型顕微

Table 1

No.	Genes	size (bp)	Forward	Reverse
1	SCD	100	tctgtgtgtgtgtgttcctcatcc	ggcataacggaataaggtggc
2	LXR α	170	gaccgactgatgttccaag	acagaagacacggaggagga
3	GAPDH	204	aatggaaaggccatcaccatc	gtggttcacgcccatcaca

鏡で画像を取得した。

2.6 トータルRNA抽出とリアルタイムPCR

トータルRNA抽出にはTRIzolを使用した。1 dishに対しTRIzol 1mlを使用した。BIPの分化過程0, 2, 4, 6, 8日目とFABP 4各発現細胞の分化2日目及び4日目からトータルRNAを抽出し、使用時まで -80°C で冷凍保存した。TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time) の手順に従い、cDNAを作成した。PCR反応試薬にはTaKaRa SYBR Premix ExTaq (Perfect Real Time) を用い、リアルタイムPCRを行った。なお本研究で用いたプライマーの塩基配列はTable 1に記載した。

2.7 統計学的解析

ガスクロマトグラフィーの結果とリアルタイムPCRの結果には、スチューデントのT検定を用いて有意差を求めた ($n = 3$, $p < 0.05$)。またリアルタイムPCR (BIP分化過程における不飽和脂肪酸合成関連遺伝子の発現挙動) の結果は分化0日目に対する有意差 ($n = 3$, $p < 0.05$) を求めた。

3. 結果と考察

3.1 FABP4 I/I及びV/V発現細胞の不飽和脂肪酸割合の比較

はじめにFABP4 I/I及びFABP4 V/Vを分化前のBIP細胞に導入して、FABP 4各遺伝子型を発現する過剰発現細胞をそれぞれ作成した。これらに分化誘導刺激を加え、FABP 4各発現細胞の分化4日目における不飽和脂肪酸割合を比較する実験をおこなった。分化4日目のFABP 4各発現細胞

胞に対し、有機化学的処理を加え脂肪酸を遊離し、ガスクロマトグラフィーで解析したところ、飽和脂肪酸量に対する不飽和脂肪酸割合の実測値はFABP4 I/I発現細胞では 3.4 ± 0.027 となり、FABP4 V/V発現細胞の 3.25 ± 0.08 に比べ、有意に高いことが明らかとなった。

過去に234頭の黒毛和種における脂肪酸組成とFABP 4各遺伝子型との相関性を解析した研究が行われている。その結果からFABP4 I/I型の個体はFABP4 V/V型のものに比べ、脂肪組織中に一価の不飽和脂肪酸であるパルミトオレイン酸の含有量が有意に高いことが報告されている³⁾。今回得られた結果は*in vivo*の結果に非常に近く、本研究に用いたFABP 4各遺伝子型の発現細胞は、FABP 4の多型が不飽和脂肪酸含量に及ぼす影響を*in vitro*で解析するのに適したモデルであることが証明された。しかしながらFABP 4の多型がオレイン酸やリノール酸等を含めた全不飽和脂肪酸の含有量に有意差を生み出すという報告はなく、*in vivo*と*in vitro*では若干の違いがあるのかもしれないと考えられる。

3.2 FABP 4各遺伝子型の細胞内局在の観察

FABP 4は細胞内に取り込まれた脂肪酸を核や脂肪滴に運搬する役割を担うと考えられる輸送タンパク質である。本実験ではFABP 4の遺伝子型の違いによって、核と脂肪滴への移行に変化が生じるかを調べた。BIPにGFP及びRFPを付加したFABP 4各遺伝子型の発現ベクターを導入し、FABP 4の各遺伝子型をBIPに過剰発現させた。その後、分化誘導刺激を行い、分化過程における各遺伝子型の細胞内局在を観察した。すなわち、

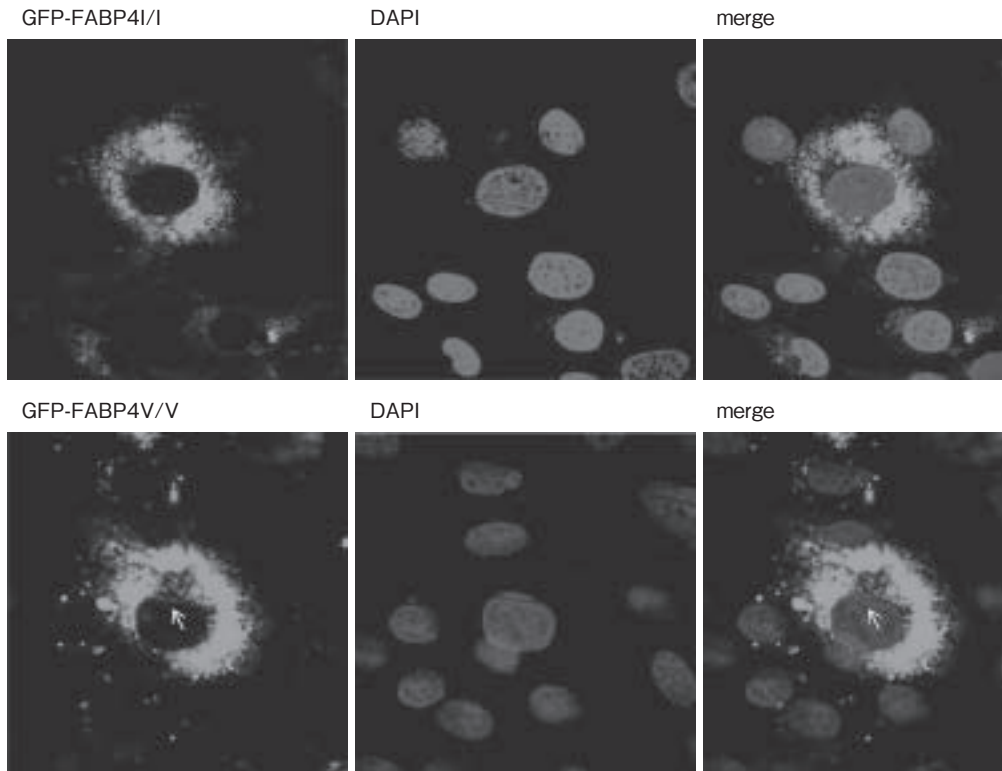


Fig.1 Subcellular localization of FABP4 in differentiating BIP cells 2 days after stimulation.

BIP cells were transfected with GFP-FABP4 I/I or GFP-FABP4 V/V. These cells were treated for 2 days with adipogenic factors and, after fixation with 4 % PFA, stained with DAPI. Although FABP4 I/I was not localized in nucleus, FABP4 V/V was (arrow).

GFPおよびRFPの局在を検討することにより FABP 4 の遺伝子型の細胞内局在を知ることができる。その結果、FABP 4 は分化過程に関わらず、両遺伝子型とも細胞質中に多く局在するが、一部が核や脂肪滴にも移行しており、その移行度合いには遺伝子型の違いが関連していることが明らかとなった。核への移行は、分化刺激前では両遺伝子型ともほとんど見られないが、分化刺激後2日目において核への移行が確認され、FABP4 V/V型はFABP4 I/I型に比べ移行度合いが高いことが明らかとなった (Fig. 1)。

FABP 4 の核への移行に関し、過去にFABPs がPPARsのリガンドに及ぼす転写活性制御機構を調べた研究において、COS-1細胞にトランスフェクションされたFABP 4 は、PPAR α のリガ

ドが存在する場合にのみ核内へと移行し、リガンドが存在しない場合では、核内への移行が見られないという報告がある⁷⁾。ウシにおいても何らかの因子がFABP 4 の局在に影響を及ぼしているのではないかとされる。

FABP 4 の脂肪滴への移行は、分化4日目においてFABP4 I/I型はFABP4 V/V型に比べ脂肪滴への移行度合いが高いことが分かった (Fig. 2)。

FABP 4 は細胞内において脂肪酸を細胞内の各所に運搬する輸送タンパク質である。現在までにFABP 4 が核へ脂肪酸を運搬することが解明されているが、脂肪滴へ脂肪酸を運搬するという知見は今のところ無い。しかし、FABPファミリーの働きや代謝疾患との関わりについて述べた論文では、FABPファミリーの働きとして、脂肪滴への

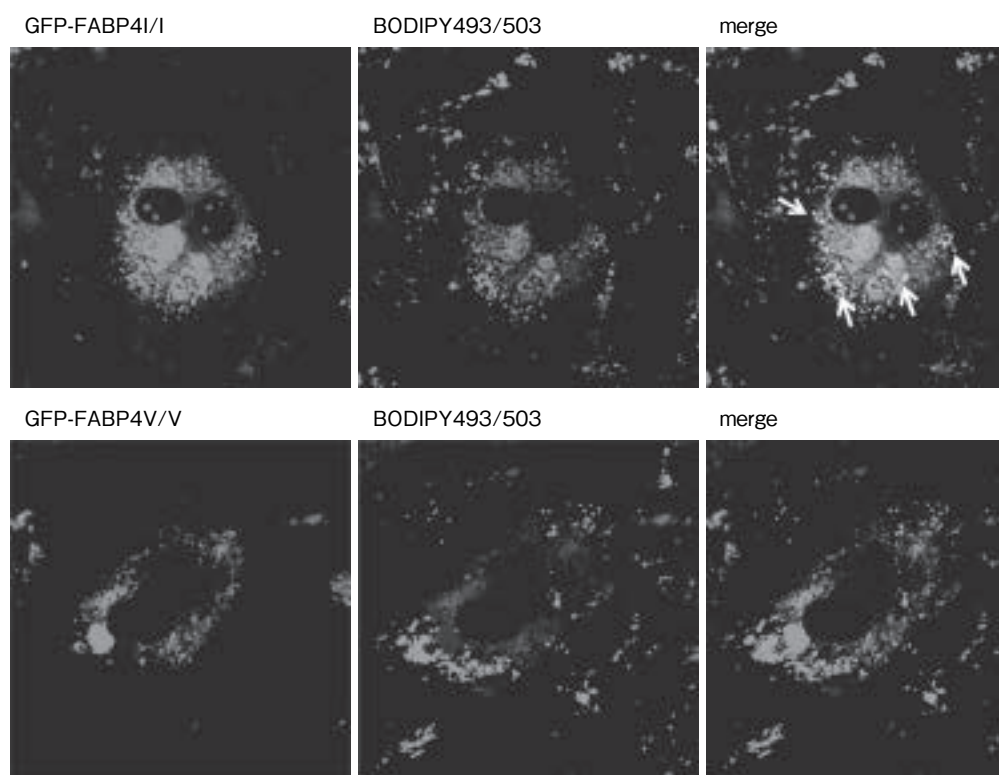


Fig.2 Subcellular localization of FABP4 in differentiating BIP cells 4 days after stimulation.

BIP cells were transfected with GFP-FABP4 I/I or GFP-FABP4 V/V. These cells were treated for 2 days with adipogenic factors and, after fixation with 4 % PFA, stained with BODIPY 493/503. Although FABP4 V/V was not localized in lipid droplet, FABP4 I/I was (arrow).

脂肪酸輸送に関わっている可能性が述べられている⁸⁾。FABP 4も脂肪細胞において、脂肪酸を脂肪滴へ運搬し、蓄積に関与しているかもしれない。ここから、分化4日目におけるFABP 4各遺伝子型の脂肪滴移行度合いの違いが、脂肪滴へ運搬される不飽和脂肪酸量に差を生みだし、結果、不飽和脂肪酸含量に変化が生まれた可能性が考えられる。

3.3 FABP 4各発現細胞における不飽和脂肪酸合成関連遺伝子の発現量比較

FABP 4の遺伝子型の違いが、不飽和脂肪酸合成関連遺伝子 (LXR α , SCD) の転写に与える影響を検討するため、各発現細胞における遺伝子発現量を比較した。はじめに両発現細胞の比較時期検討のため、BIP分化過程における各遺伝子の

発現挙動を解析した。その結果、LXR α , SCD共に、分化2日目以降で発現量の急激な上昇が認められた。分化前の発現量を1とした時、LXR α は分化2日目で発現量 (1.7 ± 0.02) がピークに達し、その後4日目： 1.6 ± 0.2 , 6日目： 1.5 ± 0.1 , 8日目： 1.6 ± 0.2 で推移した。SCDでも分化2日目で発現量 (8.7 ± 0.1) がピークとなり、その後は4日目： 3.3 ± 0.4 , 6日目： 2.4 ± 0.3 , 8日目： 3.0 ± 0.6 で推移した。そこで両遺伝子の発現量増加が著しかった分化2日目および4日目に着目し、FABP 4各発現細胞における両遺伝子の発現量を比較した。しかし分化2, 4日目とも、各発現細胞におけるLXR α とSCDの発現量に、どちらも違いは認められなかった。

本研究では分化2日目においてFABP 4遺伝子

型の違いにより核移行度合いに変化が生じた。またFABP 4は長鎖脂肪酸と高い親和性を持って結合し、脂肪滴や核内へ輸送に関与する輸送タンパクであり、核内へ運ばれた長鎖脂肪酸は転写因子を介して何らかの遺伝子の転写を制御していると考えられている⁷⁾。このためFABP 4遺伝子型の違いによる核移行度合いの差が核への脂肪酸運搬量の差を生み、その結果、転写因子の活性に差が生じることでLXR α およびSCDの発現量を制御し、不飽和脂肪酸含量の違いを生み出すと予想したが、こうした可能性を導くことはできなかった。もちろんFABP 4多型がLXR α とSCD以外の不飽和脂肪酸合成関連遺伝子の発現に影響を与えている可能性は否定できない。しかし現時点ではFABP 4多型が不飽和脂肪酸含量の違いを生み出すメカニズムには不飽和脂肪酸合成関連遺伝子は関与しないと考えられる。

4. 要 約

霜降り肉のおいしさを決定する要因の一つに不飽和脂肪酸含量が関係している。ウシFABP 4の持つI74V多型は脂肪酸組成に関連し、FABP4 I/I型の個体はFABP4 V/V型のものに比べ、不飽和脂肪酸含量が高いことが明らかとなっている。本研究はFABP 4多型が生み出す不飽和脂肪酸含量の違いを分子レベルで解明することを目的とした。本実験ではウシ筋肉内前駆脂肪細胞株にFABP 4各遺伝子型を導入した細胞モデルを用いた。本細胞モデルを用いて不飽和脂肪酸割合を調べた結果、FABP4 I/I発現細胞はFABP4 V/V発現細胞に比べ有意に不飽和脂肪酸割合が高く、本細胞モデルの有効性が確認された。分化過程にお

けるFABP 4各遺伝子型の細胞内局在を観察した結果、FABP4 V/V型はI/I型に比べ、核への移行度合いが高いことが明らかとなった。またFABP4 I/I型はV/V型に比べ、脂肪滴への移行度合いが高かった。核移行度合いに差が見られることから、FABP 4各発現細胞間で不飽和脂肪酸合成関連遺伝子 (LXR α , SCD) の発現量に違いがあるのか比較検討を行ったが、両細胞間に差は認められなかった。以上から、FABP 4多型は不飽和脂肪酸合成経路には影響を与えず、多型による脂肪滴移行度合いの違いが、不飽和脂肪酸含量の違いを生み出すと考えられた。今後、FABP 4各遺伝子型の黒毛和種牛由来の初代脂肪細胞で検討する必要があると考える。

文 献

- 1) Melton SL, Amiri M, Davis GW, Backus WR : *Journal of Animal Science*, **55**, 77~87, 1982.
- 2) Zembayashi M, Nishimura K, Lunt DK, Smith SB. : *Journal of Animal Science*, **73**, 3325~3332, 1995.
- 3) Hoashi S, Hinenoya T, Tanaka A, Ohsaki H, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H. : *BMC genetics*, **84**, 1471~2156, 2008.
- 4) Taniguchi M, Utsugi T, Oyama K, Mannen H, Kobayashi M, Tanabe Y, Ogino A, Tsuji S. : *Mammalian Genome*, **14**, 142~148, 2004.
- 5) Hoashi S, Ashida N, Ohsaki H, Utsugi T, Sasazaki S, Taniguchi M, Oyama K, Mukai F, Mannen H. : *Mammalian Genome*, **39**, 62~70, 2007.
- 6) Aso H, Abe H, Nakajima I, Ozutsumi K, Yamaguchi T, Takamori Y, Kodama A, Hoshino FB, Takano S. : *Biochemical and Biophysical Research Communication*, **213**, 369~375, 1995.
- 7) Tan NS, Shaw NS, Vinckenbosch N, Liu P, Yasmin R, Desvergne R, Walter W, Noy N. : *Molecular and Cellular Biology*, **22** (14), 5114~5127, 2002.
- 8) Furuhashi M, Hotamisligil GS. : *Nature Reviews Drug Discovery*, **7** (6), 489~503, 2008.

コレシストキニンA受容体遺伝子を指標とした 効率的な地鶏生産に関する研究

Study on the effective chicken production by selection for *Cholecystokinin type A receptor* gene

力 丸 宗 弘・高 橋 大 希・大 久 保 武*

(秋田県畜産試験場, *茨城大学農学部)

Kazuhiro Rikimaru, Daiki Takahashi, Takeshi Ohkubo*

(Akita Prefectural Livestock Experiment Station, *College of Agriculture, Ibaraki University)

To examine the effects of *cholecystokinin type A receptor* gene (*CCKAR*) polymorphism (A/C) on the growth traits of Hinai-jidori chickens, the feeding trial and the analysis of the mRNA expression of *CCKAR* gene on expression sites were conducted. Twenty individuals of each three genotype (A/A, A/C and C/C) were raised until 23 weeks of age. The data showed that body weight at 23 weeks of age and average daily gain between 4 and 23 weeks of age of A/A individuals were significantly superior to those of C/C individuals. As for feed conversion ratio, A/A individuals were superior to A/C and C/C individuals though there was no significant difference in the feed intake among the genotypes. Expression level of *CCKAR* mRNA in the pancreas, duodenum and liver tended to be high in the A/A individuals, and this might lead to improve digestibility of nutrients and growth. A/A individuals also tended to be heavier than C/C individuals in the field tests. These results suggest that it is possible to produce chickens which are well grown efficiently by selection for *CCKAR* gene.

1. 目 的

近年、景気の低迷から国内における地鶏の生産羽数は減少している。また、配合飼料価格の高止まりにより、収益が減少し、厳しい生産活動を余儀なくされている。地鶏はブロイラーと比較して発育が遅いため、飼育期間が80日以上と長い日数を要する。地鶏の生産コストの大部分は飼料費が占めていることから、生産現場では、より効率的な生産による飼育コストの削減が喫緊の課題となっている。

我々は、これまで、ニワトリの発育形質に影響

する遺伝子を特定するため、比内鶏のF₂交雑家系を用いて発育形質に関する量的形質遺伝子座(QTL)解析を行い、ニワトリの食欲と関連すると予測される候補遺伝子として、満腹感を司る神経情報伝達を担うペプチドホルモンとして知られているコレシストキニンA受容体遺伝子(*CCKAR*)と発育形質との関連性を明らかにした¹⁾。また、F₂交雑家系における*CCKAR*遺伝子の特定の一塩基多型(SNP)(A/C)と発育形質との関連性について解析した結果、Aアリルは体重や日増体重を高める効果を持つことを明らかにした²⁾。さらに、異なる*CCKAR*遺伝子のSNP型

Table 1 PCR primers for amplification of g.420 C > A polymorphism in the *cholecystokinin type A receptor* gene

Primer set	Primers (5'→3')	Product (bp)	Target position	PCR amplification genotype	
				A	C
CCKAR-Hinai 1	GAATGTGTGTCTGCGTGCTT	225	g.420 C>A	+	—
	GGATCCACAGGTTAGCTGCgAt				
CCKAR-Hinai 2	GAATGTGTGTCTGCGTGCTT	225	g.420 C>A	—	+
	GGATCCACAGGTTAGCTGCgAg				

The underlined bases shown in lower case represent induced mismatches. The bases shown in lower case only at the 3' end represent the target single nucleotide polymorphism (SNPs). The genotypes that could and could not be amplified by PCR are shown as "+" and "—", respectively.

を持つ比内地鶏を材料として、発育・飼料摂取量・飼料要求率の比較・解析を行った結果、AA型を有する個体は他の遺伝子型（AC型、CC型）個体よりも発育が優れ、飼料要求率が改善されることを確認した。これらの成果から、CCKAR遺伝子を指標とした効率的な地鶏生産の可能性が見えてきた。しかしながら、CCKAR遺伝子の特定のSNP型が、なぜ、発育に良い結果を示すのか、その分子機構は明らかとなっていない。

そこで本研究では、CCKAR遺伝子情報を用いた効率的な地鶏生産の実用化を目指すため、コマーシャル鶏として流通する「比内地鶏」を用いて、異なるCCKAR遺伝子のSNP型を持つ比内地鶏を作出し、CCKAR遺伝子のSNP型が比内地鶏の発育等に及ぼす影響を明らかにするとともに、CCKAR遺伝子のmRNA発現量の比較を行い、CCKAR遺伝子のSNP型が発育形質に及ぼす分子機構について検討を行った。

2. 方 法

2.1 供試鶏および試験設計

秋田県畜産試験場で同日にふ化した比内地鶏の雌を発育試験に用いた。下記に示した方法でCCKAR遺伝子のSNP型を判定後、4週齢にSNP型（A/A、A/C、C/C）ごとに20羽ずつ分けた。

2.2 遺伝子型判定

比内地鶏各個体におけるCCKAR遺伝子のSNP型判定はRikimaru *et al.*²⁾の方法で行った。簡単に論述すれば、1種類のフォワードプライマー（5'-GAATGTGTGTCTGCGTGCTT-3'）と2種類のリバースプライマー（Aアリルプライマー：5'-GGATCCACAGGTTAGCTGCgAt-3'、およびCアリルプライマー：5'-GGATCCACAGGTTAGCTGCgAg-3'）を組み合わせて、AおよびCアリルを検出するPCR反応液を調製した（Table 1）。

PCR反応液は、フォワードプライマー 2 pM、4 μl の 2 × PCR ミックス（EmeraldAmp：タカラバイオ、大津、日本）、DNA 溶液 1 μl、滅菌蒸留水を混合し、最終容量 9 μl に調整した。PCR サイクルは、熱変性（98℃、10秒間）、アニーリング（65℃、30秒間）、伸長反応（72℃、30秒間）のサイクルを30回繰り返した。PCR反応後、AアリルおよびCアリルを検出するPCR反応液各 2 μl を 1 × TAE バッファーを使用した2.0% アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、臭化エチジウム染色して、PCR増副産物を検出した。各個体の遺伝子型判定は、飼育試験を開始する4週齢までに行った。

2.3 飼養管理

各SNP型の比内地鶏を4週齢から出荷時期である26週齢まで運動場が付随したパイプハウスで飼

Table 2 Comparison of the g.420 C > A genotype of *cholecystokinin type A receptor* gene between the phenotypic values for growth traits of the Hinai-jidori chickens¹

Traits	Genotype		
	A/A	A/C	C/C
	n = 20	n = 20	n = 20
BW-4 week (g)	335.6 ± 25.0	335.6 ± 24.8	355.6 ± 21.0
BW-10 week (g)	1,108.6 ± 127.5	1,114.1 ± 121.8	1,177.4 ± 156.3
BW-14 week (g)	1,730.5 ± 127.9	1,718.6 ± 140.2	1,762.5 ± 175.8
BW-18 week (g)	2,320.1 ± 130.3	2,197.9 ± 179.0	2,265.1 ± 176.1
BW-23 week (g)	2,873.2 ± 214.8 ^a	2,743.9 ± 199.0 ^{ab}	2,703.4 ± 174.1 ^b
ADG 4-10 week (g/day)	18.4 ± 3.2	18.5 ± 2.9	20.0 ± 3.8
ADG 10-14 week (g/day)	22.2 ± 3.0	21.6 ± 2.8	20.9 ± 2.6
ADG 14-18 week (g/day)	21.1 ± 3.4 ^a	17.1 ± 3.7 ^b	18.0 ± 3.2 ^b
ADG 18-23 week (g/day)	15.8 ± 4.4 ^a	15.8 ± 4.1 ^b	12.8 ± 2.5 ^b
ADG 4-23 week (g/day)	19.1 ± 1.6 ^a	18.1 ± 1.5 ^{ab}	17.8 ± 1.3 ^b

BW-4 week, BW-10 week, BW-14 week, BW-18 week, and BW-23 week: body weight measured at 4 weeks, 10 weeks, 14 weeks, 18 weeks and 23 weeks of age. ADG 4-10 week, ADG 10-14 week, ADG 14-18 week, ADG 18-23 week, and ADG 4-23 week: average daily gain between 4 and 10 weeks, between 10 and 14 weeks, between 14 and 18 weeks, between 18-23 week, and 4 and 23 weeks of age.

^{ab}Means within a row with no common superscript differ statistically ($P < 0.05$). ¹Values are mean ± SD.

Table 3 Comparison of the g.420 C > A genotype of *cholecystokinin type A receptor* gene between the feed intake and feed conversion of the Hinai-jidori chickens

Traits	Genotype		
	A/A	A/C	C/C
Feed intake (g/day)			
4 ~ 10 weeks of age	73.1	72.8	72.2
10 ~ 14 weeks of age	102.4	102.9	97.4
14 ~ 18 weeks of age	100.1	87.8	92.9
18 ~ 23 weeks of age	135.3	135.4	127.4
4 ~ 23 weeks of age	105.0	102.4	100.1
Feed conversion			
4 ~ 10 weeks of age	3.97	3.93	3.60
10 ~ 14 weeks of age	4.61	4.77	4.66
14 ~ 18 weeks of age	4.76	5.13	5.17
18 ~ 23 weeks of age	8.56	8.68	10.18
4 ~ 23 weeks of age	5.50	5.65	5.62

育した。飼料は以下の4つの市販飼料を給与した：1) 4週齢まで幼雛用飼料 (CP22% ; ME3,000kcal/kg) ; 2) 10週齢まで中雛用飼料 (CP18% ; ME2,850kcal/kg) ; 3) 14週齢まで大

雛用飼料 (CP15% ; ME2,800kcal/kg) ; 4) 23週齢まで仕上げ用飼料 (CP16% ; ME2,900 kcal/kg)。飼育期間中、水と飼料は自由摂取とし、照明時間は自然日長とした。

2.4 測定項目

(1) 発育成績

4週齢以降, 10, 14, 18, 23週齢に体重, 飼料摂取量の測定を行った。4~10, 10~14, 14~18, 18~23, 4~23週齢における平均日増体重は各週齢における体重, 飼料要求率(4~10, 10~14, 14~18, 18~23, 4~23週齢)は飼料摂取量と平均日増体重から算出した。

(2) *CCKAR*遺伝子のmRNA発現量

*CCKAR*遺伝子のmRNA発現量の測定には, 飼育試験とは別にふ化した比内地鶏の雌を用いた。4および10週齢時にSNP型ごとに10羽ずつと殺し, 肝臓, 脾臓, 十二指腸を採材した。得られた組織より, Trizol (インビトロジェン, カリフォルニア, アメリカ)を用いて総RNAの抽出を行った後, さらにDNase I (プロメガ, 東京, 日本)処理を行い, 逆転写用のRNAを調製した。1 μ

gの各総RNAをOligo-dT17プライマーとReverTra Ace (東洋紡, 大阪, 日本)を用いて42℃で45分間の逆転写反応に供した。*CCKAR*遺伝子のmRNA発現は, 得られた逆転写産物を鋳型とし, 特異的プライマー, 5'-ACAACAACAGCACAGCCAAC-3' (フォワード) および 5'-TATGAGCAGCAGGAAGGTGT-3', を用いたリアルタイムPCRにより解析した。PCRは95℃ 5秒, 60℃ 30秒を1サイクルとする反応を40サイクルとした。*CCKAR*遺伝子のmRNA発現は β -アクチンmRNA発現に対する相対値で表した。

(3) 現地調査

県内で比内地鶏を生産している農家を5戸選択し, 出荷時に採血および体重測定を行い, 比内地鶏の発育成績と*CCKAR*遺伝子のSNP型との関連性について調査を行った。

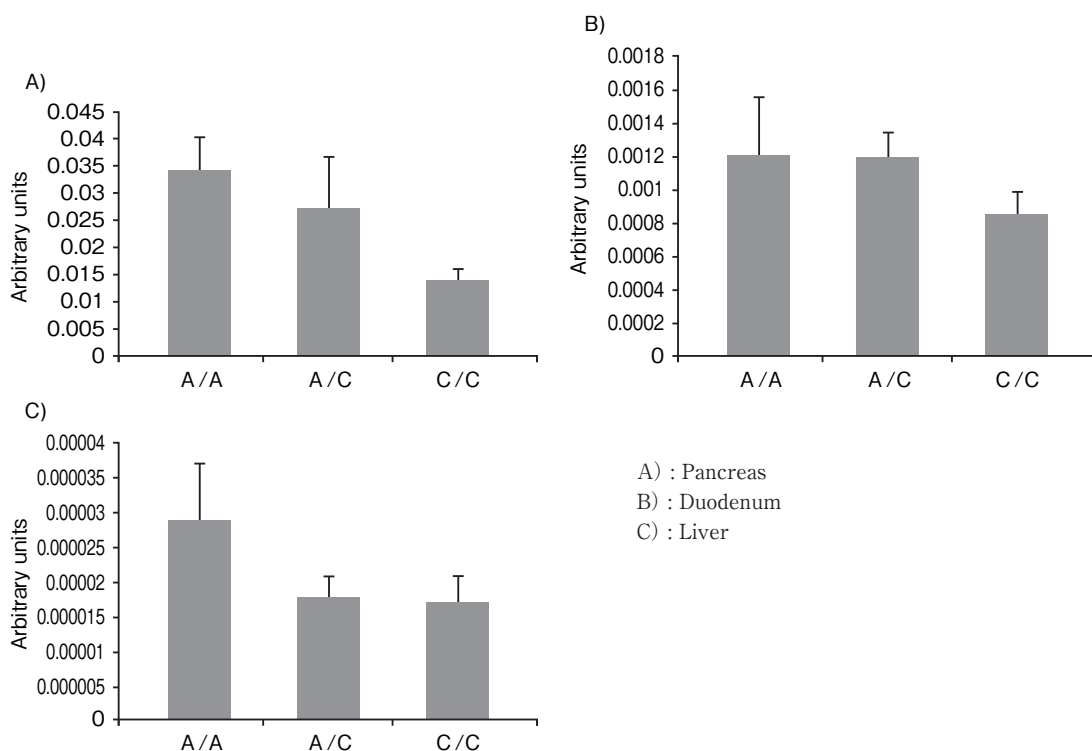


Fig. 1 Effect of the g.420 C>A genotype of *Cholecystokinin type A receptor* gene on *CCKAR* mRNA expression in the pancreas, duodenum and liver in the Hinai-jidori chickens at 4 weeks-of-age.

2.5 統計処理

統計解析については、測定形質ごとに分散分析を行い、有意な項目についてはTukeyの多重検定によりSNP型間の比較を行い、 P 値が0.05未満の時に有意とした。

3. 結果と考察

3.1 CCKAR遺伝子のSNP型と比内地鶏の発育成績の比較

CCKAR遺伝子のSNP型と比内地鶏の発育成績の比較をTable 2に示した。18週齢まで各SNP型間で体重に有意な差は認められなかったが、23週齢ではA/A型個体がC/C型個体より体重が有意に ($P<0.05$) 重かった。14週齢までの平均日増体重に有意な差は認められなかったが、A/A型個体は14～18週齢においてA/C型個体およびC/C型個体、18～23週齢においてC/C型個体より平均日増

体重が有意に ($P<0.05$) 優れていた。その結果、A/A型個体は4～23週齢における平均日増体重がC/C型個体より有意に ($P<0.05$) 優れていた。この結果は、飼育期間の後半における増体がSNP型によって異なることを示唆している。A/A型個体が他のSNP型個体より増体が優れていることは、我々が以前に比内鶏を用いた結果²⁾とも一致していた。飼料摂取量を比較すると、期間全体の飼料摂取量にほとんど差は認められなかったが、18～23週齢においてC/C型個体はA/A型個体やA/C型個体より飼料摂取量がやや少ない傾向を示した (Table 3)。また、飼料要求率はA/A型個体が一番優れていた (Table 3)。これらの結果から、CCKAR遺伝子のSNP型は比内鶏のみでなく、コマーシャル鶏である比内地鶏の発育にも影響を及ぼすことが示唆された。しかしながら、比内鶏では4～14週齢の平均日増体重においてSNP型間に

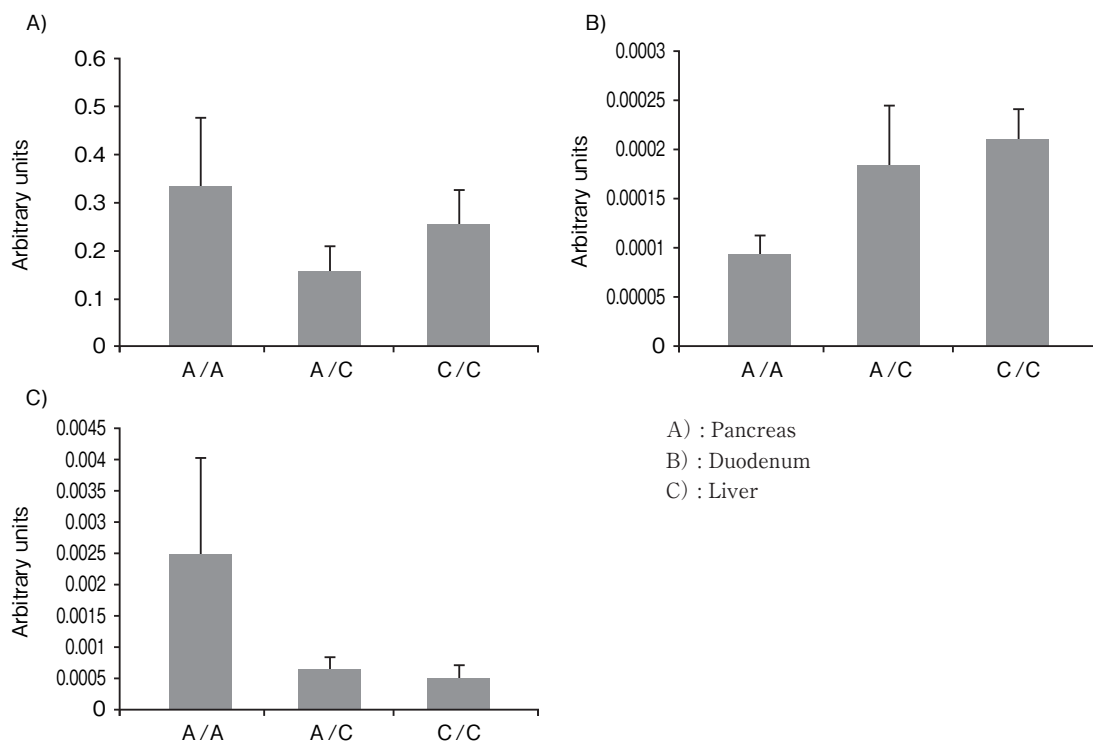


Fig. 2 Effect of the g.420 C>A genotype of *Cholecystikinin type A receptor* gene on CCKAR mRNA expression in the pancreas, duodenum and liver in the Hinai-jidori chickens at 10 weeks-of-age.

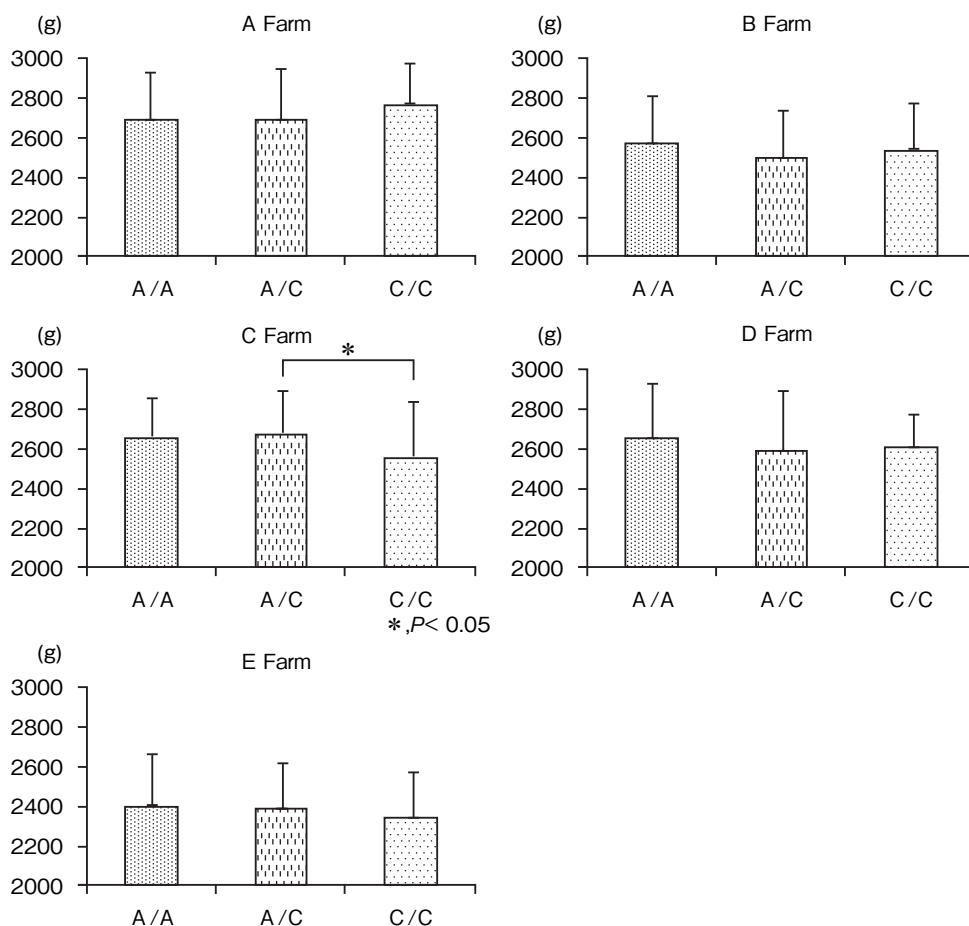


Fig. 3 Comparison of the g420 C>A genotype of *Cholecystikinin type A receptor* gene between the marketing body weight of the Hinai-jidori chickens at the field

差が認められたのに対し、比内地鶏では4～14週齢に差は認められず、14週齢以降に差が認められた。このことから、*CCKAR*遺伝子のSNP型はニワトリの発育形質に影響を及ぼすが、ニワトリの品種や系統によって発育形質に影響を及ぼす時期が異なると考えられる。

3.2 *CCKAR*遺伝子のSNP型と比内地鶏の主要発現部位におけるmRNA発現量の比較

4週齢では、膵臓、十二指腸、肝臓のいずれの組織においても、*CCKAR*遺伝子のmRNA発現量はA/A型がC/C型に比べて高い値を示した (Fig 1)。ニワトリではCCKは膵外分泌にほとんど影

響しないとされているが³⁾、アヒルではアミラーゼ分泌を刺激する⁴⁾。また、CCKは十二指腸の運動を活発化させる⁵⁾。したがって、遺伝子型による*CCKAR*遺伝子のmRNA発現量の違いは、消化・吸収機構に影響を与え、成長改善に作用する可能性があると考えられる。しかしながら、10週齢では、膵臓と肝臓のmRNA発現はA/A型がC/C型に比べて高くなったが、十二指腸では逆にC/C型がA/A型に比べて高い値を示した (Fig 2)。これらのことから、*CCKAR*mRNA発現は、組織および時期特異的に複雑な制御を受けている可能性が示唆された。

3.3 生産現場におけるCCKAR遺伝子のSNP型と比内地鶏の出荷体重の比較

生産現場におけるCCKAR遺伝子のSNP型と比内地鶏の出荷体重の比較をFig 3に示した。C農場においてA/C型がC/C型より有意に体重が重かった。また、A農場を除いてA/A型はC/C型より体重が重い傾向を示した。生産現場におけるCCKAR遺伝子のSNP型と出荷体重については、畜産試験場の結果と同様にSNP型間に有意差は認められなかった。この違いは、飼育密度、規模、環境等の影響によるものかもしれない。しかしながら、生産現場においてもA/A型はC/C型より体重が重い傾向を示したことから、CCKAR遺伝子のSNP型は比内地鶏の発育形質の改良に有効であると思われる。

以上の結果から、CCKAR遺伝子を指標として種鶏を選抜することによって、発育が優れる地鶏を効率的に生産できることが示唆された。

4. 要 約

コレシストキニンA受容体遺伝子 (CCKAR) の一塩基多型 (SNP) が比内地鶏の発育等に及ぼす影響を明らかにするため、異なるSNP型を持つ比内地鶏を作出し、発育試験および主要発現部位におけるCCKAR遺伝子のmRNAの発現量の比較を行った。4週齢時にSNP型 (A/A, A/C, C/C) ごとに20羽ずつ分け、23週齢まで飼育した。A/A型個体はC/C型個体より23週齢体重が有意に重

く、4～23週齢の平均日増体重も有意に優れていた。飼料摂取量にほとんど差は認められなかったが、飼料要求率はA/A型個体が一番優れていた。脾臓、十二指腸、肝臓のCCKAR mRNA発現は、4週齢においてはA/A型で発現量が高い傾向を示し、消化・吸収に影響を与えて成長を改善する可能性が示唆された。生産現場においてもA/A型はC/C型より体重が重い傾向を示した。以上の結果から、CCKAR遺伝子を指標として、効率的に発育が優れる地鶏を生産できることが示唆された。

文 献

- 1) Rikimaru K, Komatsu M, Suzuki K, Uemoto Y, Takeda H, Takahashi H : Association between cholecystokinin type A receptor haplotypes and growth traits in Japanese Hinai-dori crossbred chickens. *Mol. Bio. Rep.* 39, 4479~4484. 2012.
- 2) Rikimaru K, Takeda H, Uemoto Y, Komatsu M, Takahashi D, Suzuki K, Takahashi H : Effect of a single-nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits in the Hinai-dori chickens breed. *J. Poult. Sci.* 50, 206~211. 2013.
- 3) Furuse M : Release and endogenous actions of the gastrin/cholecystokinin (CCK) family in the chicken. *J. Exp. Zool.*, 283, 448~454. 1999.
- 4) Xiao R, Cui ZJ : Mutual dependence of VIP/PACAP and CCK receptor signaling for a physiological role in duck exocrine pancreatic secretion. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 286, R189~198. 2004.
- 5) Martinez V, Jimenez M, Goñalons E, Vergara P : Mechanism of action of CCK in avian gastroduodenal motility: evidence for nitric oxide involvement. *Am. J. Physiol.* 265, G842~G850. 1993.

天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別の可能性の検討

Possibility of DNA discrimination of a meat-type brand chicken “Chosyu-Kurokashiwa” created from the Kurokashiwa Chicken, a national natural treasure of Japan

関 谷 正 男¹・奥 村 友 美²・都 築 政 起³

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

Masao Sekiya¹, Yumi Okumura², and Masaoki Tsuzuki³

(¹Yamaguchi Prefectural Agriculture and Forestry General Technology Center, Livestock Technology Research Department,

²National Livestock Breeding Center, ³Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

In the present study, we genotyped 54 microsatellite markers to examine the possibility for DNA discrimination of a meat-type brand chicken “Chosyu-Kurokashiwa” created from the Kuro-Kashiwa breed, a National Natural Treasure of Japan. Allele sizes were compared among two native Japanese chicken breeds [Kuro-Kashiwa (KRK) and Japanese Game (JG)], a foreign breed [Rhode Island Red (RIR)], and two kinds of crossbreds [F_1 (KRK ♂ × RIR ♀) and JG ♂ × F_1 (KRK ♂ × RIR ♀) ♀] using 272 blood samples. As a result, the Kuro-Kashiwa breed was revealed to have private alleles at seven loci on the Z chromosome (*ABR0608*, *ABR1002*, *MCW0258*, *ABR1008*, *ABR0376*, *MCW0128*, and *ABR0289*). Therefore, DNA discrimination of “Chosyu-Kurokashiwa” would be possible by establishing a parent stock that has the private alleles of the Kuro-Kashiwa.

1. 目 的

山口県農林総合技術センターでは、天然記念物「黒柏鶏（くろかしわ）」をもとにロードアイランドレッド（RIR）、軍鶏、ホワイトプリマスロック（WPR）を交配した四元交雑鶏を閉鎖群育成し、地鶏用雄系種鶏「やまぐち黒鶏（くろどり）」（在来種由来血液百分率50%）を作出した（関谷ら、2009）¹⁾。

山口県の養鶏専門農協では、この「やまぐち黒鶏」をRIRに交配したものをコマーシャル地鶏とし、「長州黒かしわ」と命名して最高級ブランド

に位置付け、平成21年から生産・販売を開始している（商標登録5328087号、2009）。

「長州黒かしわ」は山口県初のオリジナル地鶏として関係者の期待が大きく、平成22年度には県内の肉用鶏の生産団体、県養鶏協会及び県で構成する「山口黒かしわ地どり振興協議会（現・黒かしわ地どり振興協議会）」が設立されるとともに平成25年5月には山口県初の統一ブランド「やまぐちブランド」として認証されるなど、県を挙げての地鶏振興体制を整備し、首都圏や県内に販路を広げている。また、平成25年度には4万羽の生産体制が整備され、今後については、当面は5万

羽, 将来は8万羽を目指して関係者が一丸となって取り組んでいる。

生産羽数の増加に伴い準備しておかなければならない項目の一つとして, 比内地鶏等の有名ブランド地鶏で行われている, 地鶏肉のDNA識別方法の確立が挙げられる (Rikimal and Takahashi²⁾, 2007; 特許第4721053号, 発明の名称: 「名古屋コーチン識別用プライマーセット, 検出キット及び名古屋コーチンの識別方法」)。

「黒柏鶏」には黒柏鶏特有のマイクロサテライトマーカー (DNAマーカー) が存在することが明らかになっているが (Osman et al. 2006)³⁾, 「長州黒かしわ」は「黒柏鶏」の他に3つの品種を交配した交雑鶏であるため, 「長州黒かしわ」のDNA識別にこのマーカーの応用が可能か確かめる必要がある。また, 「やまぐち黒鶏」は, まず, 「黒柏鶏」の雄を「RIR」の雌に交配して「二元交雑鶏」を作出し, 次に, 「軍鶏」の雄を「二元交雑鶏」の雌に交配して「三元交雑鶏」を作出し, 最後に「三元交雑鶏」の雄を「WPR」の雌に交配して作出した「四元交雑鶏」を改良固定化したものであることから, 性染色体 (Z染色体) 上に黒柏鶏特有のマーカーを有している可能性がある。そのため, 比内地鶏のDNA識別と同様に, Z染色体上に「黒柏鶏」と他の鶏との違いを見出すことができれば「長州黒かしわ」のDNA識別へ応用できる可能性がある。

以上のことから, 本研究では, 「長州黒かしわ」のDNA識別を可能にするため, 「長州黒かしわ」における黒柏鶏特有のDNAマーカーの存在の有無について確認することを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試鶏

本研究では, 山口県農林総合技術センター畜産技術部で保有している黒柏鶏 (雄30羽), ロード

アイランドレッド (86系統: 雌28羽), 軍鶏 (833系: 雄16羽), 黒柏鶏の雄をRIRの雌に交配させ作出した黒柏二元交雑鶏 (雌30羽), ならびに軍鶏 (833系) の雄を黒柏二元交雑鶏の雌に交配させ作出した黒柏三元交雑鶏の第2世代 (雄40羽, 雌128羽) を用いた。

2.2 DNA抽出, PCR反応, マーカータイピング

供試鶏の血液からフェノールクロロホルム法 (Sambrook and Russell, 2001)⁴⁾ により抽出し 20ng/ μ l に調整したDNAをテンプレートに用い, Osman et al. (2006) および Rikimal and Takahashi (2007) を参考にして, Table 1 に示した54マーカーをPCR法により増幅した。

PCRに際してはフォワードおよびリバースプライマーをそれぞれ6.25pmol, dNTPを0.2mM, $MgCl_2$ を 2 mM, BIOTaqTM HS DNA polymerase (Bioline, Taunton, MA, USA) を 0.375 Uとし, 合計15 μ l で反応させた。PCR反応条件は, 熱変性を94℃で10分, その後95℃を30秒, アニールを55℃で30秒, 伸張反応を72℃で30秒を35サイクル繰り返し, 最後に72℃で5分間保持した。PCR後, 自動DNAシーケンサー (ABI3130, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いて各マーカーのタイピングを行った。

3. 結果と考察

黒柏鶏30羽において観察された, 3つのDNAマーカー (LEI0092, LEI0096, MCW0330) 座位におけるアレルサイズをTable 2 に示した。LEI0096およびLEI0092におけるアレルサイズは, Osman et al. (2006) と異なる結果であった。MCW0300で検出されたアレルサイズは, 274bp または286bpであり, Osman et al. (2006) の結果と完全に一致していなかった。これは, 今回供

Table 1 Microsatellite markers used in the current study

marker	chr	Locus (Mb)	bp	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (3'→5')	References
LEI0096	2		200	GATCAGATTGGTTCCCTGTG	TGGGTGAAGTTTCTCTGTA	Osman et al. (2006)
LEI0092	6		210	GATCTACATTGTGTCAGTGTC	TCCTTGGTCTGACTCTCCATG	Osman et al. (2006)
MCW0330	17		280	TGGACCTCATCAGTCTGACAG	AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	Osman et al. (2006)
MCW0292	Z	4.2	90-130	GGAGGCTCTGGGTGTTC	CAGCAGATGGGGCTGAGAG	
ADL0022	Z	4.5	140-170	GCATCAGAGGAGAAGGAAA	GGTCAAGGAAATCATAGAAA	
ABR0608	Z	8.8	218	GCAGGAAGGTTACAGAAAG	TTGGCAATAGCTTCAAAACA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0331	Z	12.5	213-224	CAGAGCAGCTGGAGATGTAAAG	AGAGGGTAAGAAATCCTGCTG	
ABR1001	Z	13.0	328	TTGAGATGTTGATGTGAAAACG	CAAGAAGGTGAGGAGACAAGGA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1002	Z	13.1	347	TAGGAAAGATGCCGATAGAAA	CAAGGTTGGGAATGTAGTA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0633	Z	13.5	266	AGTATGTTATTGCCTGTGGC	TTTGGGAGAAGGAATGTTGT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0588	Z	18.3	130	ATACAATCCAGCATCTCACA	CCCATTATTCGTTATTCTTACTT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0055	Z	18.3	182-196	TTTGTAGTTACCTGGTACTGA	GTTTGCAATTGCTACAGCTCCTTG	
ABR0080	Z	20.6	147	TTGCCCTGGGCAGAACACG	CAACAGCTTTCGACGAGACGG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0112	Z	21.8	230	TACTTTTATCCTGCTTCTCA	GCTTGTAGGGTAATCCAATG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0258	Z	21.8	139-162	TTCTTAGTCCTTGCCAGAGGC	CTGCAGGAGGATGTGCTCTAG	
ABR1003	Z	23.0	160	AGAGGTAGGCGATGGACCAA	ATGCACCAAGTGACCAAGGAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0620	Z	23.7	265	GCCAGCTTCAGGGAACAAA	TGAAACGCCAAATCAACGGA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ADL0273	Z	25.1	135-146	GCCATACATGACAATAGAGG	TGGTAGATGCTGAGAGGTGT	
ABR1005	Z	28.4	218	GTAACACTTCACATTCAAGAGGCAT	AACCAGCATTTCTTTCAGCAA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1006	Z	28.6	188	GCATCGCATTTAGGGTAAGTAT	AGTTTCACTACGGGAGTTTTA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
LEI0171	Z	28.7	350-376	GAGTGTAGACAGTAGTGTATC	CTCAGGGCACCATTTTCACTG	
ABR1007	Z	28.9	230	GTCCCTCCCCTTTGCCACAAC	TGCTGAAGACAGACTGCTGATAG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1008	Z	29.4	267	GGGCTCTTTAGGACAATCAC	ATCAATATGAAGCAGTTACAAGA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0082	Z	29.5	221	TCCTGAATTTCCAAATAAGTTTTA	TAATCACAGCCCAAAATCAAAG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0089	Z	29.5	221	ATAATCACAGCCAAATCAA	CCTGAATTTCCAAATAAGTTTTA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1004	Z	30.2	216	TGTACTCAACTAAGACGGGATT	TGTTATGTGATGTGAAACCTGA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1014	Z	31.4	139	GGACAGCCAGTTGCTAGCCTTG	TGCTGCTTGACCACAAACCAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0311	Z	31.6	214	CCTAAAAGCAGGAAGGCAGAA	TTGGAGCATTTGTGGAGAAG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1013	Z	31.4	138	GAACAAGGTAGAAGTCGTCGGT	TGCTCGGGGAAGTATCACAAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0505	Z	32.1	226	TTATTTATGGCACTCCACTG	TATTCCTTGTTTGTCTTGA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1012	Z	32.1	267	CACCAGGATCTTTCCCTTTA	AACAATCTTTTCCCCCATAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ADL0201	Z	32.3	130-150	GCTGAGGATTGAGATAAGAC	AATGGCTGACGTTTTCACAG	
ABR1011	Z	32.4	220	TATCACTGTGACTGAGGCATT	CTTGAGAGATTTTTTGGAAAGC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1010	Z	32.7	268	CTGCTTCAGCCAGTCTCAGTAT	CTTTTCACAAGTTTTCCTTTT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1009	Z	33.6	202	GCATTTGATTAAGTGTGCTC	CAGGTAAGTGTGATGGTTGG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0598	Z	34.5	303	CAGGTCCTTTGCTACTTACA	GTACTCCGACAGACTTTCACT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0241	Z	34.5	268-281	AACCAAGTTGTTAATCATCAGC	ATTGGAGTTGGTACCATACTC	
LEI0229	Z	35.6	200-303	CAGTTTCCAAAGGCAAGTCAGG	CGGTTAGGTTTGAAGTGCAATG	
MCW0154	Z	35.9	168-193	GATCTGTTTTATCACACACAC	CCATTTCCTTTGTTATCAGGC	
ABR1015	Z	36.6	319	CATCGCACCACATCCACCTT	TGCATAAAGCCTGCTATGACC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR1016	Z	36.7	134	CCTGAACAGAAAGCAGGTGG	TCGTGGAAAACATGAGATGGC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ADL0250	Z	37.0	168	AAGCCGTACTGAGAAGCACT	CAGGCACAGTAGAAAAGAAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0246	Z	37.0	230-238	TCATAAGGCAGAGAATTCATC	TTTCCATTGAGACAACAAGGC	
ABR0254	Z	38.3	323	TTTGGTAAGTGAAGTAATAGC	ACTTTGTAGGAAATGGACTT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0621	Z	40.6	372	ACTTTCCTCTTGCTGGACT	GTTGGCATGACTTTGTTGCT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
LEI0254	Z	42.5	70-110	AGACCAGTGGTCCAACTC	GTCTGGAAGTATCCTTTCATC	
ABR0376	Z	43.2	166	AGGGTATGGATGTCTTACTA	CACAAGATTCTGATAATAA	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0294	Z	43.9	304-320	ACTGAACAGAAACAGTCTTCC	CTTCTCTAGATGTCCACTACC	
ABR0241	Z	48.4	102	ATACACTCGGCAAGCCAGAC	CCCGATCAGCTCATAAAGAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
LEI0111	Z	49.3	95-135	CCCACAAAAGAGACACCGTGG	CCTGTTTCCCGTACACTTGGC	
LEI0121	Z	50.7	280	TTGACGTCTGGATAGATTAC	ATTATCCAGAACTAACATCAAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
LEI0144	Z	51.1	255-275	GATCAGTTATCAATGGCTGGC	CAGTGAAGTCTTCTAGATGAG	
ABR0524	Z	58.9	276	TCCTACCGAAGGCAACAGAA	GGCCCACTTAGCAGATGGAGAAT	Rikimaru and Takahashi. (2007)
MCW0128	Z	58.9	166-178	CACATCCTTCTTAGCAGTCAC	CTGATGAAAAATTGTCCAAGTAG	
ABR0657	Z	64.6	197	CAGCAACAAACAAATACAAA	AGTAAGGTATCATCAGAGGG	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0289	Z	64.6	274	TTCTCAAAGTGTAAAGTCCAC	AACTCCCACTCCACCACAAC	Rikimaru and Takahashi. (2007)
ABR0651	Z	78.6	193	TGGGAAAAGTCAGTAGAACA	TGCATTATTACATCCCATCT	Rikimaru and Takahashi. (2007)

Table 2 Allele sizes (bp) at three autosomal microsatellite

loci in the Kurokashiwa chicken		
Marker	allele size (bp)	(Osman et al. 2006)
LEI0096	223 or 240	244
MCW0330	274 or 286	286
LEI0092	245 or 270 or 287	263

Table 3 Allele frequencies at each locus on the Z chromosome in each chicken population

Name and size of alleles (bp)	Kuro-Kashiwa	RIR	JG	KRK ♂ × RIR ♀	JG ♂ × (KRK ♂ × RIR ♀) ♀
ABR0608					
203	0	0	0.500	0	0.333
213	0	0.103	0	0.017	0
220	1.000	0	0	0.615	0.482
222	0	0.897	0.500	0.368	0.185
ABR1002					
256	0	0	0	0	0.019
348	1.000	0	0	0.615	0.484
353	0	1.000	0.094	0.385	0.115
356	0	0	0.781	0	0.242
358	0	0	0	0	0.134
359	0	0	0.125	0	0.006
MCW0258					
148	0	0	0.341	0.000	0.326
150	0	0.749	0.659	0.285	0.189
154	1.000	0	0	0.619	0.485
158	0	0.251	0	0.097	0
ABR1008					
279	0	0.240	0	0.143	0
281	0	0.760	0.523	0.237	0.448
285	1.000	0	0	0.619	0.436
290	0	0	0.477	0	0.116
ABR0376					
156	1.000	0	0	0.600	0.419
164	0	0.237	0.400	0.149	0.266
168	0	0.763	0.600	0.251	0.315
MCW0128					
160	0	0	0	0	0.006
166	0	0.862	0.281	0.374	0.238
170	0	0	0.719	0	0.405
172	0	0.138	0	0	0
174	1.000	0	0	0.626	0.351
ABR0289					
271	0	0.683	0.397	0.328	0.212
273	0	0.172	0.061	0.008	0.133
283	0	0	0.542	0	0.294
287	0	0.145	0	0.035	0
289	1.000	0	0	0.629	0.361

RIR = Rhode Island Red, JG = Japanese Game, KRK = Kuro-Kashiwa

試した個体はOsman *et al.* (2006) が調査した黒柏鶏群の子孫にあたるものの、彼らが用いた個体の直系の子孫ではないためであると考えられた。

黒柏鶏、軍鶏、RIRについて、Z染色体上の51のDNAマーカー座位におけるアリルサイズを比較したところ、7マーカー (*ABR0608* (220 bp), *ABR1002* (348 bp), *MCW0258* (154 bp), *ABR1008* (285 bp), *ABR0376* (156 bp), *MCW0128* (174 bp), *ABR0289* (289 bp)) において黒柏鶏特有のアリルを確認した (Table 3)。また、黒柏三元交雑鶏においてこれらの黒柏鶏特有のアリルをすべて有しているのは雄2羽、雌15羽であった。

以上の結果から、この7マーカーにおいて黒柏鶏由来のアリルを保有する雄系種鶏「やまぐち黒鶏」を造成した場合、「長州黒かしわ」のDNAを識別できる可能性が示された。今後、他の鶏種についても同様にアリルサイズを比較し、実用性を確かめる必要がある。

4. 要 約

天然記念物「黒柏鶏 (くろかしわ)」をもとに開発された地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別を

可能にするため、黒柏鶏特有のDNAマーカーの存在の有無について、黒柏鶏、RIR、軍鶏を比較したところ、7マーカー (*ABR0608*, *ABR1002*, *MCW0258*, *ABR1008*, *ABR0376*, *MCW0128*, *ABR0289*) 座位において黒柏鶏特有のアリルが確認された。今後、このアリルを保有する種鶏を造成することにより、「長州黒かしわ」のDNA識別技術が確立される可能性が示された。

引用文献

- 1) 関谷正男, 岡崎亮, 宮本和之, 野村利定, 藤本和正, 福坂一利: 黒柏を活用した県産オリジナル地どりの開発 (第1報) —雄系種鶏「やまぐち黒鶏」の造成と実用地どりの開発—, 山口県畜産試験場研究報告第24号, 47~60. 2009.
- 2) Rikimaru K, Takahashi H: A Method for Discriminating a Japanese Brand of Chicken, the Hinai-jidori, Using Microsatellite Markers. *Poultry Science*, **86**, 1881~1886. 2007.
- 3) Osman SAM, Sekino M, Kuwayama T, Kinoshita K, Nishibori M, Yamamoto Y, Tsudzuki M.: Genetic Variability and Relationships of Native Japanese Chickens Based on Microsatellite DNA Polymorphisms-Focusing on the Natural Monuments of Japan. *The Journal of Poultry Science*, **43**, 12~22. 2006.
- 4) Sambrook J, Russell DW: Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Springs Harbor Laboratory Press. New York. 2001.

ブタ精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子の特定とそれを指標とした新たな精子受精能評価法の確立

Identification of a key molecule responsible for the structural stability of sperm nuclear chromatin and its application to the assessment of fertility potential of boar sires

高坂 哲也・井川 彰・皆川 至・柴田 昌利*

(静岡大学大学院農学研究科・*静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター)

Tetsuya Kohsaka, Akira Igawa, Itaru Minagawa, Masatoshi Shibata*

(Laboratory of Animal Reproduction & Physiology, Graduate School of Agriculture, Shizuoka University,

*Shizuoka Swine and Poultry Experimental Station)

The prediction of male fertility is an important aspect of livestock production. We recently developed a useful procedure for diagnosing subfertility in boars, and demonstrated that the structural stability of sperm nuclear chromatin significantly decreased in subfertile boars compared to fertile boars. However, it remains unknown what factor (s) actually rules the chromatin stability. Therefore, we identified the key factor (s) responsible for the stability of sperm nuclear chromatin, and established a novel procedure for assessing the fertility potential of boar sires using the factor. Using frozen semen from both fertile and subfertile boars, we succeeded in defining free thiols (SH) as a key molecule which rules the stability of sperm nuclear chromatin, and provided a clear-cut evidence that a decreased chromatin stability led to the increase in free sperm SH content and substantially decrease in the ratio of disulfide bonds in subfertile boars. Furthermore, we successfully established a novel method for evaluating the fertility potential of boar sires based on free sperm SH groups. The application to freshly ejaculated semen from the genetic conservation program was found to be quite satisfactory; that is, the assessment was well reflected in conception rate, which was extremely low in the semen having high levels of sperm SH content. These data suggest that the decreased stability of sperm nuclear chromatin in subfertile boars compared with fertile boars is associated with incomplete oxidation of the sperm SH groups and that the levels of free sperm SH groups correlated most strongly and negatively with fertility potential of boar sires.

1. 目 的

豚の人工授精の普及率は年々高まり、平成21年度には約44%にまで増加している¹⁾。普及率向上の要因には、精液の保存および利用技術の改良に

加え、疾病の蔓延防止等への有効性が認識されたこと、宅配便の利用により精液性状を良好に維持しながら全国に輸送できることなどが挙げられ、ブタ人工授精のボトムアップに拍車を掛けてきた。しかし一方で、精子の活力や形態は正常である

が、受胎成績の極めて悪い精液（以下、低受胎精液と呼ぶ）の事例も少なくない。これは現行の精液検査（精子活力、濃度、形態検査など）では、正常精液の範疇に入ってしまう、検出することは困難である。そのため、低受胎精液の問題は受胎率低下を加速させる深刻な雄側要因の一つである。従って、このような精液を早期に判定できる診断技術の開発や低受胎要因の特定に期待が持たれてきた。

これまでに、我々は上記の診断技術の開発に取り組む、アクリジンオレンジ（AO）を用いてブタ精子核クロマチンの構造安定性を顕微鏡レベルで簡便に判定できる評価法を開発した²⁾。すなわち、低受胎精液ではその構造安定性が著しく低下し、受精率との間で正の相関のあることが分かった。しかし、精子核クロマチンの構造安定性の違いが何によって決定付けられるのか、その鍵を握る物質の正体は不明であった。しかしもし鍵分子を特定できれば、それを指標とした正確な精子受精能評価法が構築でき、受胎成績の悪いブタ精子の生産や流通の未然防止につながるものと期待できる。

本研究では、精子核クロマチンを構成するDNA—プロタミン複合体やプロタミン分子内のジスルフィド結合（SS結合）の素材となる遊離チオール基（SH基）に焦点を当て、それらが受精能の良好なブタ精子における核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子であることを立証すると共に、それを指標とした新たなブタ精子受精能評価法を確立した。

2. 方 法

2.1 ブタ精液

ブタ精液には、凍結および新鮮射出精液を用いた。凍結精液は当研究室で液体窒素中に保存しておいたデュロックまたはランドレース種の正常精

液と低受胎精液である。一方、新鮮射出精液は静岡県中小家畜研究センターで系統造成中のデュロック種より手圧法で濃厚部精液を分画採取し、モデナ液で等量希釈した後、15℃に保持して実験に供した。

2.2 精子塗抹標本の作製

凍結および新鮮射出精液は37℃に暖めておいたTNE緩衝液（0.01 M Tris-HCl, 0.15 M NaCl, 1 mM EDTA, pH7.4）で遠心洗浄し、同緩衝液で 1×10^7 cells/mlに懸濁後、スライドガラスに塗抹した。

2.3 AOを用いた精子核クロマチンの構造安定性評価

精子核クロマチンの評価は高坂らの方法で行った²⁾。すなわち、精子塗抹標本を低pH・界面活性剤に浸漬してDNA変性負荷処理を施した後、AO染色（Sigma, St. Louis, MO, USA）を行い、蛍光顕微鏡下（励起波長：460～490nm, 吸収波長：515nm）で観察し、精子核DNAの変性率より精子核クロマチンの構造安定性を評価した。

2.4 精子の遊離SH基含量の測定

凍結および新鮮射出精液をTNE緩衝液で遠心洗浄し、同緩衝液で精子懸濁液（精子濃度： 1×10^7 cells/ml）を調製した後、遊離SH基含量を求めた。遊離SH基の定量は2-ニトロ安息香酸法で行った³⁾。

2.5 精子核における遊離SH基の分布と蛍光強度

精子核における遊離SH基の検出には、モノプロモビマン（mBBBr；Sigma, St. Louis, MO, USA）を用いた⁴⁾。新鮮射出精液を対象に、BTS（Beltsville thawing solution）⁵⁾で再懸濁した後、mBBBr（終濃度0.2mM）を添加して、37℃で15分間反応させた。遠心洗浄後、スライドガラスに塗抹し、蛍光顕微鏡下（励起波長：395～425nm, 吸収波長：450nm）で精子頭部の遊離SH基の分

布を調べた。さらに、蛍光強度はBZ-9000オールインワン蛍光顕微鏡 (Keyence, 大阪) で測定した⁶⁾。

2.6 精子核におけるSS結合の算出

精子核におけるSS結合の割合は以下の式により算出した。すなわち、2.5で求めた蛍光強度を基に、SS結合 (%) = (全精子SH基 - 遊離SH基)

／全精子SH基より算出した。なお、全精子SH基は還元処理を施した精子にmBBRを反応させたときの蛍光強度とした。

2.7 精子運動解析装置 (CASA) を用いた精子能の解析

精子運動能は新鮮射出精液を対象にCASAで解析した⁷⁾。すなわち、精子を37℃に暖めておいた

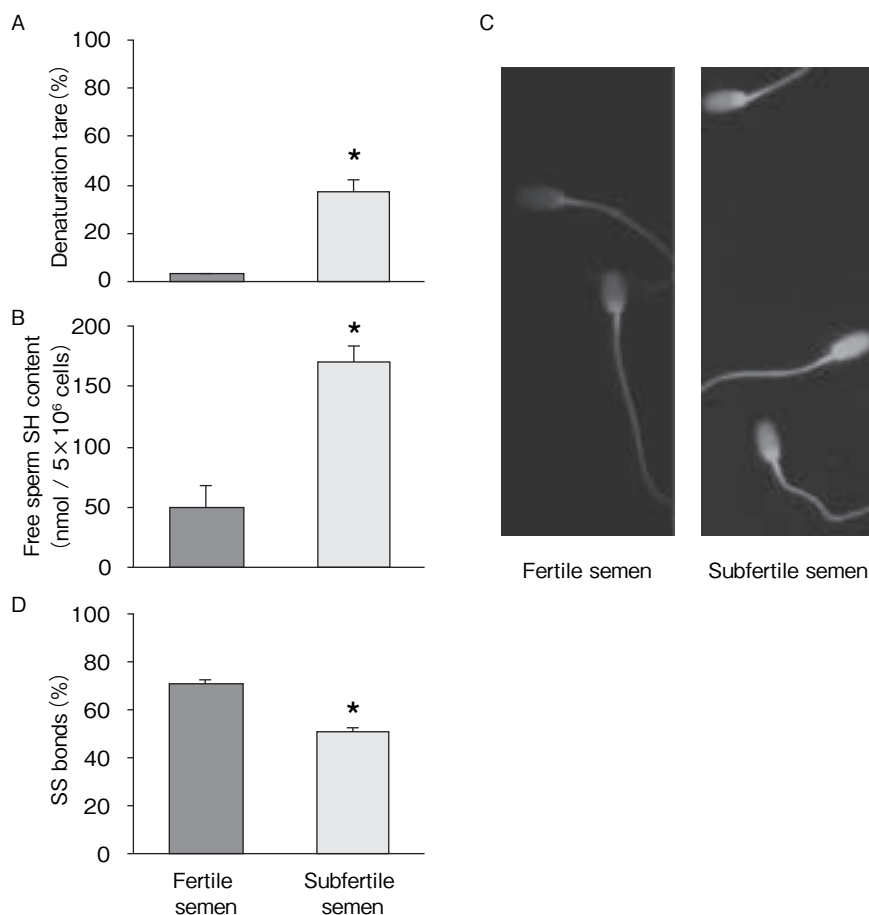


Fig. 1 Identification of free thiols (SH) as key molecules that rule the stability of sperm nuclear chromatin in boar frozen semen. A) Stability of the sperm nuclear chromatin as revealed by acridine orange (AO) staining. Denaturation rate of sperm nuclear chromatin in the subfertile semen was significantly higher than that in the fertile semen, revealing a decreased structural stability of sperm nuclear chromatin in the subfertile semen. The data was from Kohsaka et al 2). B) The levels of free sperm SH groups. The levels were significantly higher in the subfertile semen than in the fertile semen. C) Distribution of the free SH groups in the spermatozoa with the permeable mBBR. When staining intensity of free SH groups was compared between fertile and subfertile semen, the intensity in sperm head seemed to increase in the subfertile semen compared to the fertile semen. D) Cytochemical quantitation of disulfide bonds (SS bonds). The ratio of SS bonds was significantly lower in the subfertile semen than in the fertile semen. Values are the means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.01$).

受精培地m-BOで希釈した後(精子濃度: 1×10^7 cells/ml), 2 X-CEL チャンバー (Hamilton thorne, Beverly, USA) に導入し, 37℃の加温板を装着した位相差顕微鏡下でビデオ撮影を行い, CASAの解析に供した。

2.8 受胎成績

雄ブタの種付け頭数当たりの受胎頭数を受胎成績として表した。

2.9 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で表した。有意差の検定はGB-Statを用いて, FisherのLSD法およびt検定で行った。

3. 結果と考察

一般に正常精子では, 精巣上体で起こる精子成熟過程で核蛋白プロタミンに存在する多数の遊離SH基が酸化されてSS結合を形成し, 精子核クロマチンの構造安定性をもたらす。精子核の凝縮を引き起こすことが知られている⁸⁾。さらに, その強固な精子核の凝縮は卵子透明帯の侵入に必要であることが以前から指摘されてきた⁹⁾。これまでに, 我々はブタ低受胎精液において, 精子核クロマチンの構造安定性が著しく低下していることを見出し, その要因がプロタミンのSS結合の不均一性または減少による可能性を示唆した²⁾。

本実験では, 精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子が遊離SH基ではないかと考え, 正常精液と低受胎精液を用いて立証した。低受胎精液では, 精子核DNAの変性率が有意に高く, 核クロマチンの構造安定性が著しく低下していることを既に明らかにしている (Fig.1 A)²⁾。そこで, 遊離SH基含量を調べたところ, 低受胎精液では, 正常精液に比べて, 精子の遊離SH基含量が有意に高いことが判明した (Fig.1 B)。次に, 遊離SH基と特異的に結合する膜透過性蛍光プローブmBBrに着目し, 精子における遊離SHの分布を調

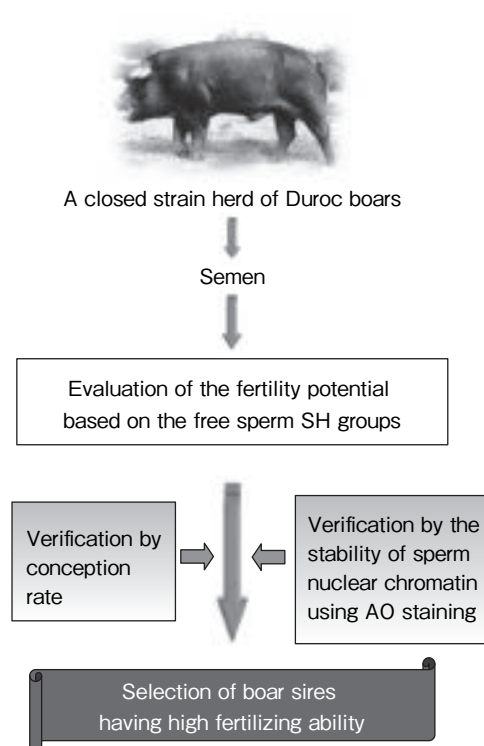


Fig. 2 Establishment of a novel method for assessing the fertility potential of boar sires based on the sperm free SH groups.

べた。その結果, 低受胎精液では, 遊離SH基の存在を示す蛍光が精子核で明らかに強いことがわかった (Fig.1 C)。さらに, 顕微蛍光測光解析によりmBBrと結合した遊離SH基の蛍光強度を測定し, SS結合の割合を算出した結果, 低受胎精液では精子核のSS結合の割合が著しく低下していることが明らかとなった (Fig.1 D)。

これらの結果は, 何らかの要因でブタ精子の遊離SH基の酸化が不完全になると, DNA—プロタミン複合体やプロタミン分子内のSS結合の形成が不十分となり, その結果, 核クロマチンの構造安定性が低下し, それにより受精能不良を引き起こすことを示唆する。事実ヒトでは, 不妊患者の精子は妊孕性のある正常なそれに比べて遊離SH基含量が有意に高く, DNAの変性率も高いことが指摘されている³⁾。従って, 本研究で得られた

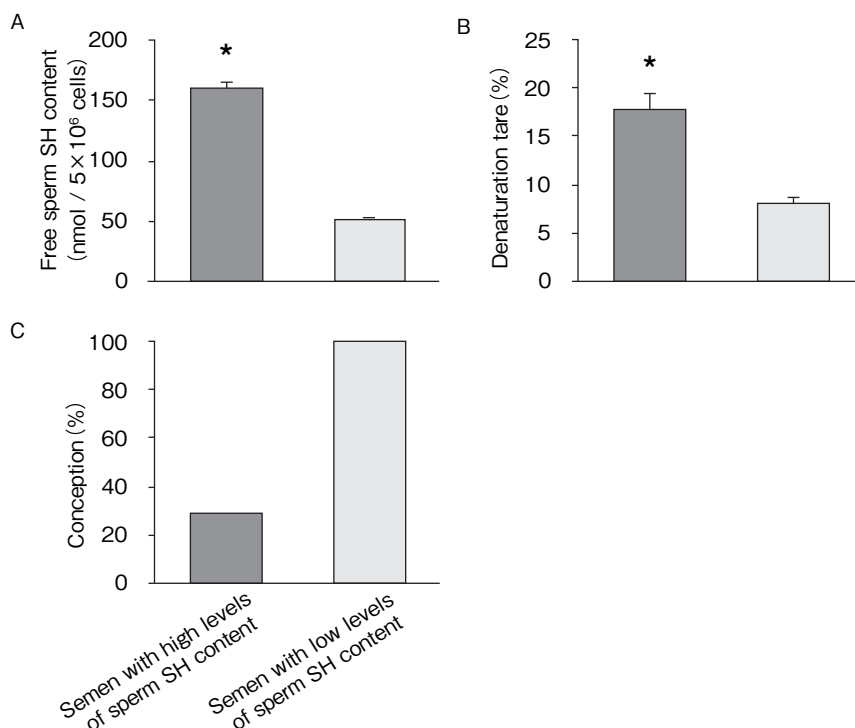


Fig. 3 Free sperm SH content and nuclear chromatin stability in freshly ejaculated boar semen from a genetic conservation program. A) Boar semen assigned to high and low levels of free sperm SH content. B) Stability of sperm nuclear chromatin as revealed by AO staining. The chromatin stability significantly decreased in the semen having high levels of sperm SH content. C) Conception rate. The conception rate was extremely low in the semen having high levels of sperm SH content. These data suggest that the levels of free sperm SH content correlated most strongly and negatively with fertility potential of boars. Values are the means $\pm$ SEM. Asterisks indicate significant difference ($P < 0.01$).

ブタの知見やこれまでのヒトの見解を考え合わせると、精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子は遊離SH基であるといえることができる。

次に、系統造成中の雄ブタ精液を対象に、遊離SH基を指標とする新たな精子受精能評価法の構築を検討した (Fig. 2)。まず、精子の遊離SH基含量を指標に、その含量が高い精液と低い精液の2群に分けた (Fig. 3 A)。予想通り、SH基含量の高い精液では、精子核クロマチン構造安定性が有意に低下していることが分かった (Fig. 3 B)。次に、雄ブタの受胎成績のデータと照らし合わせた結果、精子遊離SH基含量の高い精液では、受胎率が著しく低いことが判明した (Fig. 3 C)。これ

に対して、精子活力はCASAによる運動解析からも明らかなように、運動精子率、速度、直線性、頭部振幅値 (ALH) などの精子運動パラメーターに差異が認められなかった (Fig. 4)。このことから、遊離SH基を指標とする新たな精子受精能評価法の適応は、受精能の高いブタ精液の選抜を可能にし、受胎成績の悪いブタ精子の生産や流通の未然防止につながるものと期待できる。

受精能の不良な精子において、なぜ遊離SH基からSS結合の変換がスムーズに行われないのか不明である。しかし、精子成熟過程でのプロタミンのSH基の酸化機構に問題があると考えられる。SH基酸化との関連が推測される過酸化酵素の一つ

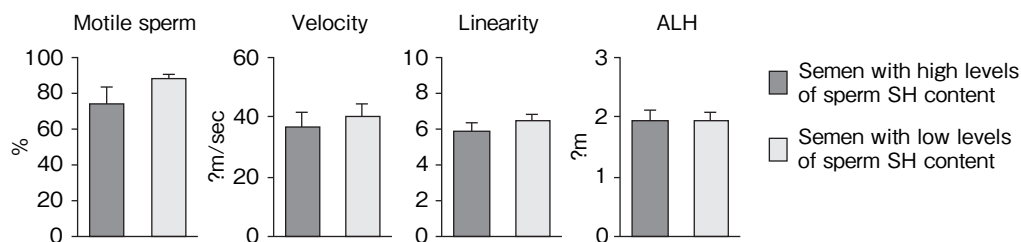


Fig. 4 Comparison of sperm motility characteristics between semen with high and low levels of free sperm SH content. There is no significant difference between semen groups in the motility parameters, such as the percentage of motile sperm, velocity (VCL: $\mu\text{m/s}$), and linearity, amplitude of lateral head distance (ALH: μm). Values are the means $\pm$ SEM.

に、グルタチオンペロキシダーゼ (GPx) がある。最近の研究から、精巣上体で発現する GPx1, GPx3, GPx 4 および GPx 5 や、精子で特異的に発現する GPx 4 が見出されてきた¹⁰⁾。さらに、ノックアウトマウスによる研究より、精子で発現する GPx 4 は SH 基の酸化や精子受精能への関与が指摘されている¹¹⁾。現時点で、ブタ精子に GPx 4 が存在するとの証拠はないが、本実験で見出したブタ精子核クロマチンの構造安定性の低下がプロタミンの SH 基酸化の不具合によって起こり、精子受精能を低下させる事実を考え合わせると、GPx 4 はブタ精子の SH 基酸化の主要な制御因子となり得る可能性は大である。従って、今後はこの SH 基酸化機構の早急な解明が不可欠で、それにより SH 基の酸化制御が可能となり、低受胎精液の根本的な解決につながるものと考ええる。

他方、暑熱との関係にも注視しなければならない。すなわち、ブタは夏場の高温多湿の影響で一時的な造成機能の減退や精子受精能の不良による受胎率の低下を招く夏季不妊症になりやすいことが知られている²⁾。夏季不妊は豚肉の安定供給を脅かす深刻な問題でもある。しかし、夏季不妊に伴う受精能の不良な精子の発症メカニズムについてはよくわかっていない。そのため、今後は暑熱の影響も視野に入れた SH 基酸化機構の解明に取り組む必要があるものと考ええる。

以上、本研究ではブタ精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子はプロタミンの SH 基であること、その酸化の不具合がクロマチンの構造安定性を低下させ、精子の受精能不良を引き起こすことを明示した。

4. 要 約

本研究では、精子核クロマチンを構成する DNA—プロタミン複合体やプロタミン分子内の SS 結合の素材となる遊離 SH 基に焦点を当て、それが受精能の良好なブタ精子の核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子であることを明らかにした。さらに、この知見を基に遊離 SH 基を指標とする新たな精子受精能評価法を確立できた。本法は生産現場で問題となっている受胎成績の悪いブタ精液の未然防止策に使用でき、受精能の良好なブタ精液のみを選別できる革新的な検査法になり得るものと考ええる。

文 献

- 1) 日本養豚協会：平成21年度 養豚基礎調査全国集計結果、1～33、2009。
- 2) 高坂哲也、王 軍、藤井栄治、皆川至、桑原康、番場公雄、柴田昌利：平成24年度食肉に関する助成研究調査成果報告書、31：58～63、2013。
- 3) Zini A, Kamal KM, Phang D: *Urology*, 58, 80～84, 2001。
- 4) Huang TT, Kosower NS, Yanagimachi R: *Biol Reprod*, 31, 797～809, 1984。

-
- 5) Bamba K, Cran DG : *J Reprod Fertil*, **82**, 509～518, 1988.
- 6) Minagawa I, Sagata D, Pitia AM, Kohriki H, Shibata M, Sasada H, Hasegawa Y, Kohsaka T : *J Endocrinol*, **220**, 247～261, 2014.
- 7) Sasaki Y, Kohsaka T, Kawarasaki T, Sasada H, Ogine T, Bamba K, Takahara H : *Int J Androl* , **24**, 24～30, 2001.
- 8) 高坂哲也：繁殖生物学（日本繁殖生物学会編），初版，41～60，2013.
- 9) Bedford JM, Calvin HI : *J Exp Zool*, **188**, 137～156, 1974.
- 10) Noblanc A, Kocer A, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Conrad M, Drevet JR : *J Androl*, **32**, 641～650, 2011.
- 11) Noblanc A, Peltier M, Damon-Soubeyrand C, Kerchkove N, Chabory E, Vernet P, Saez F, Cadet R, Janny L, Pons-Rejraji H, Conrad M, Drevet JR, Kocer A : *PLoS One*, **7**, e 38565, 2012.

アポトーシス阻害因子の人為制御による家畜の 潜在的卵子救命法の創出

Rescue of potential oocytes in livestock ovaries by artificial control of
apoptosis inhibitor

眞 鍋 昇

(東京大学大学院農学生命科学研究科附属牧場)

Noboru Manabe

(Animal Resource Science Center, The University of Tokyo)

Many primordial follicles are present in livestock ovaries, which are discarded without being effectively used in the slaughterhouse. The aim of the present study is to save the oocytes with excellent genetic traits in the ovaries, which are discarded without being effectively used.

Less than 1% of primordial follicles are developed and ovulated, and the remainders are eliminated *via* atresia. The endocrinological mechanisms involved in follicular development and growth have been characterized, but the precise mechanisms involved in the regulation of follicle selection remain unknown. Recent our studies suggest that apoptosis in follicular granulosa cells plays a crucial role in the oocyte selection. Notably, death ligand and receptor systems and their intracellular signaling are the key mechanisms regulating granulosa cell apoptosis. In this study, I revealed the mechanisms of granulosa cell apoptosis regulated by death ligand and receptor systems and their signaling pathways. Moreover, the roles of apoptosis inhibitory factors (cellular FLICE-like inhibitory protein, X-linked inhibitor of apoptosis protein and decoy receptor 3), which are useful to assess the damaged and/or healthy oocytes and save the oocyte including the follicle, were revealed. We have developed a method to save the oocyte with the help of these inhibitors.

1. 目 的

我われは20年以上にわたって哺乳類の卵子が休眠後減数分裂を再開して発育成熟する過程で99.9%以上を選択的に死滅させてしまうことで不都合な卵子を取り除く分子機構の解明研究を進め、排卵に至る健常な卵胞と閉鎖されて消滅する卵胞との判別の指標となる可能性が高い分子を挙げるができるようになってきている^{1, 2)}。本

研究は、卵胞とそれに内包される卵子を選択して死滅させる分子制御機構を解明する研究の成果を活用して、死滅すべき卵胞とそれに内包される卵子、すなわち品質が劣るものを判定して排除し、残りの排卵に至る卵胞に内包される高品質の卵子を積極的に救命して動物発生工学や生殖医療に供する技術システムを開発しようとするもので、学術的に独創的であり、かつ社会に貢献する意義深いものである。

2. 方 法

アポトーシス阻害因子 cellular FLICE-like inhibitory protein (cFLIP) 発現の調節因子探索とその分子制御機構の解明研究を進めた。健康に发育している卵胞の顆粒層細胞に高発現している cFLIP-l が急速に消滅して卵胞閉鎖が誘導されるのだが、この消滅を調節している機構は未だに未解明である。cFLIP-l mRNA を up regulate あるいは down regulate する因子の探索の最初のステップは、ブタ顆粒層細胞が不死化したものであるが、形質転換はしておらず、様々な顆粒層細胞の特性を保持している JC-410 細胞を用い、この細胞と卵胞に対して成長因子・生存因子としてはたらくサイトカイン、性腺刺激ホルモン、ステロイドホルモン、アクチビン、インヒビン、フォリスタチン、増殖因子、プロスタグランジン類、血管新生因子類、一酸化窒素などを添加して培養し、これらのなかから候補物質の絞込を進めた。なおブタやウシなどの完全性周期動物の卵胞顆粒層細胞では TNF α が増殖・生存因子として働いていること、これがアポトーシス・シグナルを伝達することができずに細胞増殖シグナルを伝達する TNF 2 型受容体のみが発現していることに起因すること、しかし齧歯類ではアポトーシス・シグナルも伝達できる TNF 1 型受容体が発現していること、培養細胞を用いた実験では TNF α が cFLIP の発現を up regulate すること、そして TNF α の発現は interleukin-6 (IL6) によって up regulate されていること等を見出しているの^{1, 2)}、これらの知見を道しるべにしてアポトーシス・シグナル阻害因子 cFLIP の発現を支配的に制御しているマスター因子の同定を目指した。cFLIP-l と cFLIP-s がスプライシングバリエーションであることを確認したが、スプライシング過程がどのように巧みな調節を受けて 2 種のバリエーション

産生されているのか不明であるので、ブタゲノムの cFLIP 遺伝子の 5'-側の転写開始コドンから上流にむかって順次核酸配列を読み進め、転写制御ドメインの解析を進め、予備的に FOXO3a などの転写因子が転写制御していると思われる成績を得た²⁾。次いで上記 IL6-TNF α 軸がアポトーシス・シグナル阻害因子 cFLIP の転写を up regulate する場合、あるいは未探索な因子が down regulate する場合にどのような転写制御因子およびその複合体が働いているのか解明を進めた。

次いで、アポトーシス・シグナル阻害因子 cFLIP の発現を人為的に調節することで卵子の救命が可能か否かを確認することで、阻害因子の生理作用の確認を行った。卵子の品質を評価するマーカーとして役立つのみならず、cFLIP の発現を人為的に up regulate することで食肉処理場で日々廃棄されている卵巣内の卵子（潜在的卵巣内卵子）の救命に役立つと考えられる。すなわち、食肉処理場で採取した家畜卵巣のうちで 1 次卵胞を豊富に含む皮質部を細切してガラス化凍結した。この凍結保存した卵巣組織を融解後、重症免疫不全マウス腎臓膜下に異種移植し、このマウスの血管内に cFLIP-l 遺伝子をアデノウイルス由来遺伝子導入ベクターの β -actin enhancer と CMV promoter の下流に cFLIP-l 遺伝子と EGFP 遺伝子を組み込んだものを投与することで遺伝子導入を行い、cFLIP-l を強制発現させた。この処置の後 2 週間バイオハザードベンチ内でマウスを飼育して異種移植した家畜卵巣における卵胞の发育を調べた。なおあらかじめ 2 週間培養することで卵胞腔をもつ 3 次卵胞にまで发育することは確認したので、実験期間を 2 週間とした。このようにして 2 週間培養した後、腎臓から卵巣組織を回収して卵胞发育ステージを判定した。引き続いて 3 次卵胞から卵子を取り出して体外成熟培養に供した。卵核胞崩壊、第一極体の放出を指標として成

熟した卵子に体外受精を施した。このようにして卵子の発生能と受精能を評価した。受精した初期胚を体外で培養して2細胞, 8細胞, 桑実胚, 胚盤胞までの発生と各ステージの胚の形態異常の判別およびハッチング能の有無を確認することで, 発生能が正常か否か評価した。

3. 結果と考察

哺乳類卵巣では胎児期に第一減数分裂前期のディプロテン期で停止した卵母細胞が顆粒層細胞に包まれた原始卵胞の状態では休眠しており, 性周期毎に一定数が発育する。卵胞内では顆粒層細胞が卵母細胞を保育し排卵に至るが, 99.9%以上が閉鎖する^{1, 2)}。

重要な家畜であり完全性周期動物であるブタを用いて卵胞閉鎖過程を形態学的に精査し, 極初期に誘起される顆粒層細胞のアポトーシスが閉鎖の調節に深く関わっていることを示し, この分子制御機構の解明を進めた。二次卵胞以降の顆粒層細胞にはtumor necrosis factor (TNF) familyに属するリガンド (TNF α , TRAIL, FasL) とTNF受容体 (TNFR) familyに属する受容体 [TNFR-II, TRAIL受容体 (DR 4, DR 5, Ⅲ受容体 1), FasL受容体 (Fas, Ⅲ受容体 3, 可溶性Fas), リガンド不明受容体 (PFG-5)] が発現していること, TNF α /TNFR-II系は細胞増殖の亢進を担っていることを明らかにした。これら細胞死リガンドと受容体は, 閉鎖卵胞のみならず発育している健常卵胞の顆粒層細胞でも発現していたので, 細胞死阻害因子が存在すると考え, その探索を行った結果, 顆粒層細胞はミトコンドリアを介してシグナルが伝わるII型アポトーシス細胞であることが分かるとともに2種類の細胞内阻害因子の存在が判明した^{3~7)}。

リガンドと結合した活性化受容体とアダプタータンパク (FADDやTRADD) が互いのdeath

domainを介して結合すると, アダプタータンパクのdeath effector domainを介してカスパーゼ8前駆体 (カスパーゼは特異性の高い蛋白分解酵素で, 下流の蛋白を分解してシグナルを伝達する) が結合し, 前駆体が分解されて活性化する。免疫系等の多くの細胞では活性化カスパーゼ8が下流のカスパーゼ3前駆体を直接分解するが, 顆粒層細胞ではカスパーゼ8がミトコンドリア外膜の透過性を調節するBidを活性化してミトコンドリアからチトクロームCを放出させ, このチトクロームCがApaf-1およびカスパーゼ9前駆体と結合してapoptosomeを形成し, ここでカスパーゼ9が活性化されてカスパーゼ3前駆体を分解し, 活性化したカスパーゼ3がcaspase activated DNase (CAD) を活性化させ, 活性化CADが核内に移行して遺伝子DNAを分断することでアポトーシスが実行されることを明らかにした。

健常卵胞顆粒層細胞ではFADDと結合してカスパーゼ8前駆体との結合を阻害するcFLIPおよびカスパーゼ9とカスパーゼ3前駆体間のシグナル伝達を妨げるX-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) が発現しており, これらがアポトーシスを阻止していることを示した。顆粒層細胞由来細胞で阻害因子を過剰発現させた場合, 受容体依存性アポトーシスが阻害され, 逆にRNA silencing法で発現を停止させると細胞は死滅した。阻害因子は, TNF α とinterleukin-6によって亢進することが分かった。加えて, リガンド・受容体結合を阻害するⅢ受容体が発現して細胞死を防いでいることも分かった。阻害因子は卵母細胞の品質を評価する指標として有用であることも分かった。

凍結保存が難しいブタ卵巣組織細片を凍結保存後融解し重症複合免疫不全マウスに移植し, この時にアポトーシス阻害因子を卵胞顆粒層細胞に過剰発現させることで, 卵胞発育を可能とすること

ができた⁸⁻¹⁰⁾。さらにこの卵胞から卵母細胞を調製して体外受精し、受精に成功した胚の体外培養も可能となった。いまだブラッシュアップが必要な諸点の改良が残るものの、概ね当初立案したプロトコルに従えば、これまで困難であった卵巣内潜在的卵母細胞を救命し、それを有効利用することが可能となったと考えられる。

哺乳類の卵巣に潜在する数十万の原始卵胞の1%以下が排卵に至り、残りは選択的に閉鎖する。これら無為に死滅する卵母細胞を救命することは重要な課題であるが、アポトーシス阻害因子の卵胞顆粒層細胞における発現レベルが卵母細胞の健全性の指標となることが推察され、著しく低い場合には無理に人為的に発現を調節して救命してまで産仔生産にまで供さないことが望ましいと思われた。しかし、著しく低くない場合には、アポトーシス阻害因子の発現を人為的に調節して救命する意義があると考えられる。すなわち、食肉処理場にて廃棄されている優良な雌性遺伝子資源である潜在的卵母細胞を救命することに意義があると思われた。卵母細胞の選択的死滅に関わる多くの内分泌学的研究が行われてきているが、選択調節機構には未解明な点が多く、顆粒層細胞における細胞死リガンド・受容体系と細胞内シグナル伝達が調節の鍵であることが分かってきたことを基盤として、調節機構をより一層精査することでアポトーシス・シグナル阻害因子cFLIP, XIAP, DcR3などの制御機構を理解し、卵子品質判定の指標および卵母細胞救命の鍵因子として有効に利用できるようにしていくことやこれらを人工的に制御して卵胞とその中の卵子の救命に活用できるシステムを確立することが肝要である。

4. 要 約

食肉処理場では、優れた形質の雌家畜の卵母細胞が無為に廃棄され続けている。本研究によって

卵子の品質を評価し、それを調節している細胞死阻害因子を人工的に制御することで卵胞とその中の卵子を救命する手法の開発がすすめられ、無為に廃棄されている卵子の有効利用の路が開かれた。これによって、雌家畜側からの高効率の育種改良が期待される。加えて、家畜のみならず、人間では、担癌患者の卵母細胞を救命できる基盤的技術が整ったこととなる。このように本研究は農学や医学等の広領域を介して社会に貢献することが期待される。

文 献

- 1) Noboru Manabe, Fuko Matsuda-Minehata, Yasufumi Goto, Akihisa Maeda, Yuan Cheng, Shoma Nakagawa, Naoko Inoue, Kannika Wongpanit, Hua-Zi Jin, Hiroshi Gonda, Jun-You Li. : Role of cell death ligand and receptor system on regulation of follicular atresia in pig ovaries. *Reproduction in Domestic Animals*, **43**, 268~272, 2008.
- 2) Fuko Matsuda, Naoko Inoue, Noboru Manabe, Satoshi Ohkura. : Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*, **58**, 44~50, 2012.
- 3) Takafumi Sai, Yasufumi Goto, Ryosuke Yoshioka, Akihisa Maeda, Fuko Matsuda, Miki Sugimoto, Kannika Wongpanit, Hua-Zi Jin, Jun-You Li, Noboru Manabe. : Bid and Bax are involved in granulosa cell apoptosis during follicular atresia in porcine ovaries. *The Journal of Reproduction and Development*, **57**, 421~427, 2011.
- 4) Takafumi Sai, Fuko Matsuda, Yasufumi Goto, Akihisa Maeda, Miki Sugimoto, Hong-Mei Gao, Abul Khair Mohammad Ahan Kabir, Jun-You Li, Noboru Manabe. : Effect of RNA interference of Bid and Bax mRNAs on apoptosis in granulosa cell-derived KGN cells. *Journal of Reproduction and Development*, **58**, 112~116, 2012.
- 5) Katsuya Kominami, Jun Nakabayashi, Takeharu Nagai, Yuki Tsujimura, Kumiko Chiba, Haruna Kimura, Atsushi Miyawaki, Tatsuya Sawasaki, Hideo Yokota, Noboru Manabe. : The molecular mechanism of apoptosis upon caspase-8 activation: Quantitative experimental validation of a mathematical model. *Biochimica et Biophysica Acta (Molecular Cell Research)*, **1823**, 1825~1840, 2012.
- 6) Katsuya Kominami, Takeharu Nagai, Tatsuya Sawasaki, Yuki Tsujimura, Kenta Yashima,

- Yasuhiro Sunaga, Masateru Tsuchimochi, Jun Nishimura, Kumiko Chiba, Jun Nakabayashi, Koji Koyamada, Yaeta Endo, Hideo Yokota, Atsushi Miyawaki, Noboru Manabe. : *In vivo* imaging of hierarchical spatiotemporal activation of caspase-8 during apoptosis. *PLoS ONE*, 7 (11), e50218. doi : 10.1371/journal.pone.0050218
- 7) Chie Suzuki, Koji Yoshioka, Manabu Yamada, Michiko Noguchi, Noboru Manabe. : Expressions of tumor necrosis factor α , its receptor I, II and receptor-associated factor 2 in the porcine corpus luteum during the estrous cycle and early pregnancy. *Veterinary Research Communications*, 38, 1~10, 2014.
- 8) Shoma Nakagawa, Naoki Maedomari, Kazuhiro Kikuchi, Takashi Nagai, Takashi Miyano, Josef Fulka Jr., Noboru Manabe. : Rescue of vitrified fully grown and growing porcine oocytes by germinal vesicle transfer. *The Journal of Reproduction and Development*, 57, 335~341, 2011.
- 9) Nguyễn Việt Linh, Kazuhiro Kikuchi, Michiko Nakai, Junko Noguchi, Hiroyuki Kaneko, Thanh Quang Dang-Nguyen, Tamas Somfai, Bui Xuan Nguyen, Takashi Nagai, Noboru Manabe. : Fertilization ability of porcine oocytes reconstructed from ooplasmic fragments produced and characterized after serial centrifugations. *The Journal of Reproduction and Development*, 59, 549~556, 2013.
- 10) Jozsef Rátky, Istvan Egerszegi, Peter Toth, Soukanh Keonuchan, Takashi Nagai, Kazuhiro Kikuchi, Noboru Manabe, : Klaus-Peter Brüssow. Saving genetic resources of native pigs in occidental and oriental countries: Practical examples of the characterization and utilization of native pigs in Hungary and Laos. *The Journal of Reproduction and Development*, 59, 437~441, 2013.

かごしま黒豚における授乳中発情の誘起試験

Control of lactational estrus in the Kagoshima Berkshire

野口 倫子・生駒 エレナ*・帆保 誠二

(鹿児島大学共同獣医学部, *鹿児島県農業開発総合センター畜産試験場)

Michiko Noguchi, Erena Ikoma* and Seiji Hobo

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University,

*Livestock Research Institute, Kagoshima Prefectural Institute for Agricultural Development)

During lactation, sows generally remain anestrus because reproductive hormones in sows are inhibited during suckling. However, development of mature follicles, lactational estrus and ovulation are observed on commercial pig farm and these could be due to management during lactation. We investigated frequency of lactational estrus and effects of spraying boar-pheromone on induction of lactational estrus during lactation in Kagoshima Berkshire of a commercial farm. In the experiment 1, ninety-eight sows were used. Data of reproductive performance (number of piglets, intervals from weaning to estrus and fertility) and sow's body condition during lactation (lactation length and back fat loss) were investigated. Blood samples were collected at weaning from all animals. Follicular development, lactational estrus and lactational ovulation were defined as progesterone and estradiol - 17 β concentration measured by time-resolved fluoroimmunoassay. Intervals from weaning to estrus and fertility were significantly different between summer (August and September) and autumn (November) seasons. Estradiol - 17 β concentrations in November were significantly higher than from during July to October. Lactational estrus was observed in one sow (1.0%) during experimental period. In the experiment 2, pigs were randomly assigned to a control (n = 9) or treatment of boar-pheromone from 14 days after parturition to weaning (n = 10) group. Vaginal electrical residence (VER) measurements were carried out between 14 days after parturition and 7 days after weaning in all sows. Data and blood samples were collected as experiment 1. Lactational estrus was not found both control and treatment groups. There was no difference in values of VER during experimental period between groups. From these results, we determined frequency of lactational estrus in Kagoshima Berkshire is low on a commercial farm at least under management from September to November in Kagoshima. These results also suggest it is difficult to induce lactational estrus by spraying boar-pheromone in Kagoshima Berkshire.

1. 目 的

養豚生産において、「年間1母豚あたりの離乳頭数」は生産性の指標として経済的に重要な指標であり、この項目は「1分娩あたり離乳頭数」と「年間母豚1頭あたりの分娩腹数（母豚回転率）」によって決定される。中でも、分娩から次回妊娠までの日数は、生産性を左右する重要な因子として知られている。

かごしま黒豚は、バークシャー種を基礎とした日本有数の銘柄豚として知られている。かごしま黒豚は、一般的な肉用ブタよりも、筋繊維が細い、旨味成分の含有量が高い、脂肪の融点が高いという特徴を持つため、その肉質が全国的に評価されているが、生産性が低いいためその流通量は少ない。我々は、これまでにかごしま黒豚生産農場（A農場）における生産性向上を目的とし、分娩から初回妊娠までの日数について調査を行ってきた。その結果、A農場における授乳期間は平均31日であり、離乳後7日目以内に発情が認められたブタは、84.0%（539頭／642頭）であった。肉用ブタでは、平均授乳期間は21日であり、離乳後7日目までに発情が認められるブタは94.5%¹⁾となることから、かごしま黒豚の分娩から初回妊娠までの日数の延長が、現実問題として生産性に大きく影響していることを明らかにした。

ブタの授乳期間は、子ブタの吸乳刺激により視床下部の性腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）分泌が抑制されることで、卵胞刺激ホルモン（FSH）および黄体ホルモン（LH）の分泌が抑制され、排卵に至るような大卵胞の発育は抑制される。そのため、一般的に、授乳期間中に発情は認められず、離乳による吸乳刺激からの解放により、排卵に至る大卵胞の発育および発情が出現する。しかし実際には、養豚生産現場において、授乳中に発情および排卵が認められるブタが

目撃されている。ブタの授乳中発情／排卵の原因としては、授乳母豚の栄養状態、哺乳子ブタ頭数および授乳期間などの複数の要因が考えられており、先行研究ではそれらを制御することで授乳中の発情誘起および交配が可能であると報告されている²⁾。

かごしま黒豚において、人工的に授乳中の発情および排卵時期を制御することができれば、分娩から次回妊娠までの日数を減少させることが可能となり、生産性向上に大きく寄与することは明白である。しかし、かごしま黒豚における授乳中発情／排卵の実態については全く調査されておらず、授乳中の卵胞発育制御に関する知見は見当たらない。そこで、本研究では生産現場におけるかごしま黒豚の授乳中発情／排卵の現状調査を行うとともに、授乳中発情／排卵と授乳条件の関係を明らかにすることで、かごしま黒豚の生産性向上につながる技術の開発のための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方 法

2.1 かごしま黒豚生産農場における授乳中発情／排卵の実態調査（試験1）

鹿児島県内のかごしま黒豚生産農場において、2013年7月～2014年3月まで試験を実施した。しかし、2013年12月より、農場においてブタ流行性下痢（PED）が発生したため、本研究の調査対象からは除外し、2013年7～11月のデータを活用した。繁殖母豚100頭（20頭／各月）について、離乳時に採血を行い、その後性腺刺激ホルモン（PMSG、セロトロピン、あすか製薬）を1,000 IU筋肉内投与した。ただし、7月および8月にそれぞれ離乳後淘汰および流産が認められた個体はデータから削除した。得られた血液は、Noguchi *et al.*³⁾の方法に従い、末梢血中プロジェステロンおよびエストラジオール17 β 濃度の測定を行っ

た。また、供試母豚の一般情報（生年月日、分娩日、産歴、授乳期間、離乳後発情発現までの日数および発情持続日数）および供試母豚から生まれた子ブタの一般情報（総産子数、哺乳頭数、離乳頭数、生時体重および離乳時体重）の聞き取り調査ならびに供試母豚の分娩前および離乳時における背脂肪厚の測定を行った。

なお、Noguchi *et al.*³⁾ の報告に従い、末梢血中プロゲステロン濃度が1 ng/ml以上かつエストラジオール17 β 濃度が5 pg/ml以下の個体は、授乳中に排卵がおこった黄体期であると判定した。また、末梢血中プロゲステロン濃度が1 ng/ml以下かつ末梢血中エストラジオール17 β 濃度が5 pg/ml以上の個体は、離乳時にすでに卵胞発育が始まっている発情前期であると判定した。

2.2 オスフェロモンによる人工的刺激が授乳中発情／排卵に及ぼす影響（試験2）

鹿児島県畜産試験場において、繁殖母豚30頭を供試した。供試母豚は無作為に半数に分け、そのうち15頭に対し、分娩後14日目からオスフェロモンプレー（PheroMate, Minitube社）を1日2回鼻に噴霧した（処置区）。15頭のブタは処置を行わない対照区とした。ブタにおいて、深部腔内電気抵抗（VER）値は末梢血中プロゲステロン濃度^{4, 5)} およびエストラジオール17 β ⁴⁾ 濃度と相関が高く、卵巣動態の把握に有用であることが知られている。すべてのブタは、分娩後14日目から少なくとも離乳後5日目までの間、1日1回のVER値測定機器（ブリードテスタ、チヨダエレクトリック社）を用いてVER測定を行った。離乳時には採血を行い、母豚末梢血中プロゲステロンおよびエストラジオール17 β 濃度の測定を行った³⁾。また、供試母豚の一般情報（生年月日、分娩日、産歴、授乳期間、離乳後発情発現までの日数および発情持続日数）および供試母豚から生まれた子ブタの一般情報（総産子数、哺乳頭数、

離乳頭数、生時体重および離乳時体重）の聞き取り調査を行った。さらに、供試母豚の分娩前、分娩後14日目および離乳時における背脂肪厚の測定を行った。

2.3 統計処理

すべての試験において、月（試験1）あるいは処置間（試験2）の授乳中母豚条件、離乳後繁殖成績のデータおよび処置間（試験2）のVER値の変動は、SAS（バージョン9.4）を用いて、多元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合には多重比較検定を行った。なお、P値が0.05以下の場合に有意差があると判定した。

3. 結果と考察

かごしま黒豚生産現場における母豚の授乳条件と離乳後の繁殖成績について、Table 1に示した。試験期間中におけるかごしま黒豚の総産子数、生存産子数および授乳期間は、月間で差を認めなかった。分娩前から離乳時の背脂肪厚の変化についても、月間における差は認められなかった。分娩時子ブタ体重は、月間で差を認めなかったものの、11月の離乳時子ブタ体重は8～10月の成績に比べて有意に上昇した。離乳後発情回帰までの日数は、7月および11月に比べて、8～10月では有意に延長した。11月の離乳後受胎率は、7～9月に比べて有意に上昇した。夏季の暑熱ストレスは、母豚の繁殖成績に悪影響を与える⁶⁾。本研究においても、8～10月のかごしま黒豚の繁殖成績悪化は暑熱ストレスに起因するものと推察された。本研究では、11月に採材した1頭（1.0%）のみ離乳時における末梢血中プロゲステロン（11.2 ng/ml）の上昇が観察された。末梢血中プロゲステロン濃度は月間で差を認めなかったが、11月のエストラジオール17 β 濃度は、他の月の個体に比べて有意に高値を示した。また、離乳時にすでに卵胞発育が始まっている個体は11月に

Table 1 Reproductive performance in Kagoshima Berkshire on commercial farm from July to November in 2013.

	Jul	Aug	Sep	Oct	Nov
n	19	19	20	20	20
Parity	4.6 ± 0.6	4.1 ± 0.5	4.6 ± 0.5	4.3 ± 0.6	4.7 ± 0.6
Total born piglets	9.3 ± 0.8	10.0 ± 0.6	8.6 ± 0.5	8.6 ± 0.8	8.3 ± 0.6
Live born piglets	7.9 ± 0.6	7.7 ± 0.5	7.7 ± 0.5	7.3 ± 0.7	7.0 ± 0.5
Lactation length (day)	27.8 ± 0.2	26.7 ± 0.6	28.2 ± 0.4	27.8 ± 0.5	27.8 ± 0.5
Back fat loss (mm)	0.6 ± 0.6	1.5 ± 0.5	0.9 ± 0.7	0.5 ± 0.7	2.7 ± 0.7
Piglets weight (kg)					
At birth	1.76 ± 0.08	1.75 ± 0.03	1.62 ± 0.06	1.64 ± 0.06	1.62 ± 0.04
At weaning	7.74 ± 0.28 ^{ab}	7.07 ± 0.25 ^b	7.24 ± 0.22 ^b	7.34 ± 0.21 ^b	8.66 ± 0.23 ^a
Progesterone at weaning (ng/ml)	0.34 ± 0.03	0.29 ± 0.03	0.29 ± 0.06	0.23 ± 0.04	1.01 ± 0.54
Estradiol-17 β at weaning (pg/ml)*	0.53 ± 0.10 ^b	0.85 ± 0.08 ^b	0.99 ± 0.11 ^b	0.79 ± 0.13 ^b	3.48 ± 0.99 ^a
Wean to estrus interval (day)	4.03 ± 0.07 ^b	4.84 ± 0.18 ^a	4.75 ± 0.14 ^a	4.58 ± 0.09 ^a	4.00 ± 0.04 ^b
Fertility (%)	57.9 ± 11.6 ^c	68.4 ± 11.0 ^{bc}	65.0 ± 10.9 ^c	90.0 ± 6.9 ^{ab}	95.0 ± 5.0 ^a

^{a-c} Values with different superscripts within a low differ significantly (P<0.05).

Values are presented as means $\pm$ SEM.

4頭認められ、末梢血中プロゲステロン濃度およびエストラジオール17 β 濃度は 0.4 ± 0.1 ng/mlおよび 11.0 ± 2.7 pg/mlであった。ブタでは、授乳期間の子ブタ吸乳刺激により、排卵に至る卵胞の発育および卵胞発育に関わるホルモン分泌は抑制されている⁷⁾。排卵に至る卵胞は、エストラジオール17 β を生産し、その発育に相関する末梢血中エストラジオール17 β 濃度の上昇が観察される³⁾。また、排卵後に形成される黄体の成長により、末梢血中プロゲステロン濃度は上昇する³⁾。すなわち、授乳中の卵胞発育は、授乳子ブタ頭数⁸⁾、オスとの接触⁹⁾および飼養形態¹⁰⁾などに関係することから、少なくとも本研究で観察された飼養条件ではかごしま黒豚において自然に授乳中発情／排卵が起こる確率は非常に低いものと考えられた。一方で、11月では授乳中排卵および離乳時の大卵胞の発育が始まっている個体が複数認められたことから、暑熱ストレスが負荷されていない期間では授乳中発情／排卵が夏季に比べて増加する可能性も示唆された。

総産子数、生存産子数、授乳期間中の子ブタ増

体、授乳期間および背脂肪厚の変化は、区間で差を認めなかった。離乳時のプロゲステロン濃度およびエストラジオール17 β 濃度においても、区間で差は認められなかった。授乳期におけるオスフェロモンスプレー刺激の有無がVER値の変化に及ぼす影響について、Fig. 1に示した。VER値は、ウシ¹¹⁾、水牛¹²⁾およびブタ^{4, 5)}において各種生殖ホルモンの変動と相関が認められるため、卵巣動態および交配適期の指標として用いられている。特に、ブタにおいてはVER値とプロゲステロン濃度 ($r = 0.72 \sim 0.74$) およびエストラジオール17 β 濃度 ($r = -0.50$) との間に有意な高い相関が認められる^{4, 5)}ことから、VER値から黄体の存在と大卵胞の有無が推察できる。平均28～29日間の授乳を行った母豚において、離乳前1週間目から雄豚と接触した繁殖母豚で授乳中発情／排卵が認められる割合(6.3%)は、接触しなかったもの(1.5%)と比べて高い⁸⁾。本研究では、対照区および試験区(授乳期間 27.7 ± 0.3 日)において、離乳前14日間のVER値に有意な変化は認められず、無処置のブタを用いた既報¹³⁾と同様に、

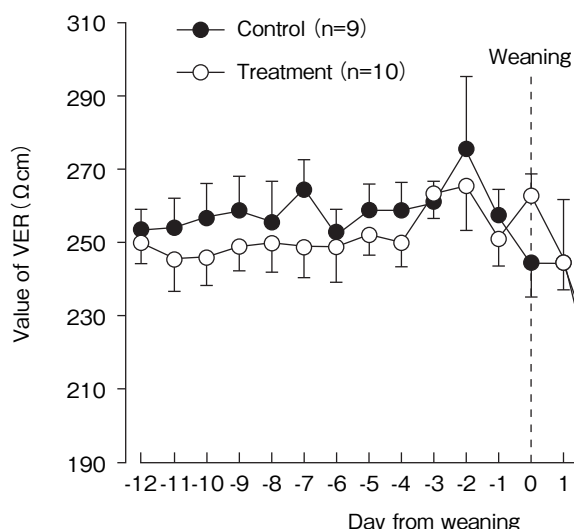


Fig. 1 The mean value of vaginal electrical resistance (VER) before and after weaning in control group (n = 9) and treatment group (n = 10) in Kagoshima Berkshire. Error bars indicate SEM.

離乳後3日目に最低値を示し、その後上昇を認めた。以上のことから、オスフェロモンスプレーによる刺激では、生殖ホルモン分泌の刺激を誘導することができず、授乳中発情／排卵を誘発することはできないことが明らかとなった。

4. 要 約

本研究では、生産現場におけるかごしま黒豚の授乳中発情／排卵の現状調査を行うとともに、オスフェロモンスプレーを用いた授乳中発情／排卵の誘発について検討を行った。離乳時の末梢血中プロゲステロン濃度の上昇が認められたブタの割合は1.0%であったことから、少なくとも本研究の飼養管理下において授乳中発情／排卵が起こる可能性は低いものと考えられる。また、分娩後14日目からオスフェロモンスプレーによる刺激を負荷した豚群においても授乳中発情／排卵は認められなかったことから、フェロモンスプレーによる卵胞発育誘導効果は得られないことが判明した。

文 献

- 1) E. Poleze, M.L. Bernardi, W.S. AmaralFilha, Ivo Wentz, F.P. Bortolozzo : *Liv. Sci.*, **103**, 124 ~ 130. 2006.
- 2) M. Alonso-Spilsbury, L. Mayagoitia, M. E. Trujillo, R.Ramírez- Necoechea, D.Mota-Rojas, *J. Anim. Vet. Adv.*, **3**, 294~305. 2004.
- 3) M. Noguchi, K. Yoshioka, S.Itoh, C. Suzuki, S. Arai, Y. Wada, Y. Hasegawa, H. Kaneko : *Reproduction*, **139**, 153~161. 2010.
- 4) L. Dusza, M. OpaLka, B. Kaminska, T. Kaminski, R. E. Ciereszko : *Theriogenology*, **45**, 1491~1503. 1996.
- 5) S.Yamauchi, S. Nakamura, T. Yoshimoto, T.Nakada, K.Ashizawa, H.Tatemoto : *Anim.Reprod. Sci.*, **113**, 311~316. 2009.
- 6) A.Suriyasomboon, N.Lundehei, A.Kunavongkrit, S.Einarsson : *Theriogenology*, **65**, 606~628. 2006.
- 7) J. S. Stevenson, N. M. Cox, J. H. Britt : *Biol. Reprod.*, **24**, 341~353. 1981.
- 8) W. I. Kuller, N. M. Soede, H. M. G. van Beers-Schreurs, P. Langendijk, M. A. M. Taverne, J. H. M. Verheijden, B. Kemp : *J. Anim. Sci.*, **82**, 405~413. 2004.
- 9) J. S. Walton : *J. Anim. Sci.*, **62**, 9 ~15. 1986.
- 10) F.Hultén, A.Wallenbeck, L.Rydmer : *Reprod. Dom. Anim.*, **41**, 448~454. 2006.
- 11) D. Schams, E. Schallenberger, B. Hoffmann, H. Karg : *Acta.Endocrinol.*, **86**, 180~192. 1977.
- 12) K.A. Gupta, G.N. Purohit : *Theriogenology*, **56**, 235~245. 2001.
- 13) P. Řezáč, I. Krivánek, T. Urban, M. Borkovcová, M. Pöschl : *Anim.Reprod. Sci.*, **114**, 238~248. 2009.

新規繁殖制御中枢刺激剤が黒毛和種の卵胞発育に与える効果についての研究

The effect of a novel reproductive center stimulant to follicle development of Japanese Black beef cows

松 田 二 子・大 蔵 聡

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Fuko Matsuda and Satoshi Ohkura

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

One of the biggest problems of domestic animal husbandry is the decreasing fertility rate in cows, which is now less than 60% in Japan. In this study, we aimed to evaluate the possibility of a novel inhibitor of dynorphin receptor, PF4455242, as a new drug that stimulates reproductive center of cattle. First, we examined the effect of PF4455242 on luteinizing hormone (LH) pulses and follicular growth in mature Japanese Black beef cows. PF4455242 was dissolved in vehicle (distilled water) and then infused via jugular catheter at the concentration of 1 mol/kg/h for 4 hours. As a negative control, vehicle was infused in a same manner as PF4455242. Plasma samples were collected from these animals every 10 min between 8 h before and 12 h after the start of infusion. At the same time, the changes in follicular diameter were monitored every 6 hours between 8 h before and 56 h after the start of infusion. In vehicle-treated cows, LH pulses occurred every 3 to 4 hours before, during and after the infusion. In a cow treated with PF4455242, two LH pulses occurred sequentially soon after the start of infusion. These results suggest that PF4455242 may have effect to increase LH pulse frequency in cows. In PF4455242-treated cow, follicular diameter of 48 h after the start of infusion increased 1.6 times compared with that of the start of infusion, but the difference of the growth rate with vehicle treatment were not clear. Next, we performed immunohistochemistry (IHC) to examine the localization of dynorphin in cattle hypothalamus. Neuronal fibers in the hypothalamic arcuate nucleus were stained by IHC, indicating that dynorphin affects the frequency of LH pulses via kisspeptin neuron that is known to locate in the arcuate nucleus. Further study is needed to confirm the effect of PF4455242 to stimulate cattle reproductive function and its action site.

1. 目 的

日本を含む先進国におけるウシの受胎率は年々低下しており、それに伴う繁殖効率の低下は、畜産農家経営の大きな負担となっている。日本にお

けるウシの人工授精成功率は乳用牛で50%以下、肉用牛でも60%を切り、ウシの生産上最も大きな問題となっている。受胎率低下の重要な原因のひとつが卵胞の発育不全である。卵胞発育が十分でないと、卵が排卵されなかったり、未熟なまま卵

胞が排卵してその後の発生がうまくいかなかったりする。また卵胞発育不全は、性ホルモン分泌不足に伴う発情の鈍化をもたらし、人工授精のタイミングを逸することで受胎率が低下する。

哺乳類の卵胞発育と排卵は、視床下部から分泌される性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) と、それに続いて下垂体から分泌される卵胞刺激ホルモン (FSH) および黄体形成ホルモン (LH) によって調節されている。GnRH/FSH/LH のパルス状分泌は卵胞発育を促すことが知られ、パルス頻度が増加すると卵胞発育が促進される。一方、GnRH/LH の一過性のサージ状分泌は排卵を誘起する。このGnRHによる卵巣機能統御システムを利用したのが、現在繁殖障害の治療に用いられているGnRHアゴニスト (GnRH製剤) である。GnRH製剤は排卵誘起剤としては非常に有効である一方、未熟な卵胞に対しては発育ではなく排卵を誘起してしまうため卵胞発育促進剤としての実用は難しい現状にある。以上の理由から、卵胞発育を促進し、その結果ウシの受胎率を改善する、新規の技術開発が切望されている。

50年以上に渡りGnRHを分泌するGnRHニューロンが繁殖制御の最上位中枢であるとされてきたが、2000年代に入ってGnRH分泌をさらに上位で制御するキスペプチンニューロンが新たな繁殖制御中枢として発見された¹⁾。これまでに、げっ歯類 (マウス, ラット), 霊長類 (ヒト, サル), 家畜動物 (ウシ, ヒツジ, ヤギ, ブタ) を含む多くの哺乳類において、キスペプチンがGnRHの分泌を促進する因子であることが明らかとなってきた。さらに近年、我々の研究グループは、ウシと同じ反芻動物に分類されるヤギをモデル動物とし、キスペプチンニューロンが分泌する神経ペプチド・ダイノルフィンがGnRH/LH のパルス状分泌を抑制することを発見した。卵巣除去した雌ヤギの脳室内にダイノルフィンを投与したところ、

視床下部の神経活動が低下し、血中LH濃度が持続的に減少した。一方、ダイノルフィン受容体阻害剤 (nor-BNI) を同様の手法で投与すると、神経活動は亢進しLHパルス頻度は上昇した²⁾。さらに我々は、2011年に発表された新規ダイノルフィン受容体阻害剤 (PF4455242) を卵巣除去した雌ヤギに静脈内投与し、視床下部神経活動およびLHパルス頻度が増加するデータを得た (未発表)。このことから我々は、PF4455242をウシの繁殖中枢を刺激する卵胞発育促進剤として応用できる可能性に着目した。

本研究では、PF4455242がウシにおいてもLHパルス頻度を増加させるか、さらにウシの卵胞発育を促進する作用を持つかを調べた。また、免疫組織化学によりウシ視床下部におけるダイノルフィンの発現細胞の同定を試みた。さらに、ヤギ視床下部組織を用いて *in situ* ハイブリダイゼーション法によるダイノルフィン受容体発現細胞の同定を試みた。

2. 方 法

2.1 ダイノルフィン受容体阻害剤の投与

名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学教育研究センター東郷フィールドで飼育する、体重436~471kgの黒毛和種成熟雌ウシを用いた。新規ダイノルフィン受容体阻害剤 (PF4455242) を溶媒 (蒸留水) に溶解し、ウシへの投与に使用した。ウシにプロスタグランジン F 2 α を投与して黄体を退行させ、次の排卵を確認してから12日後に投与を行った。PF4455242は、頸静脈内に留置したカテーテルを通して 1 μ mol/kg/時間の濃度で4時間持続投与した。コントロールとして、溶媒 (蒸留水) を同様の方法で投与した。

2.2 卵胞発育の観察と血中LH濃度の測定

超音波画像診断装置を用いてウシの卵巣活動を

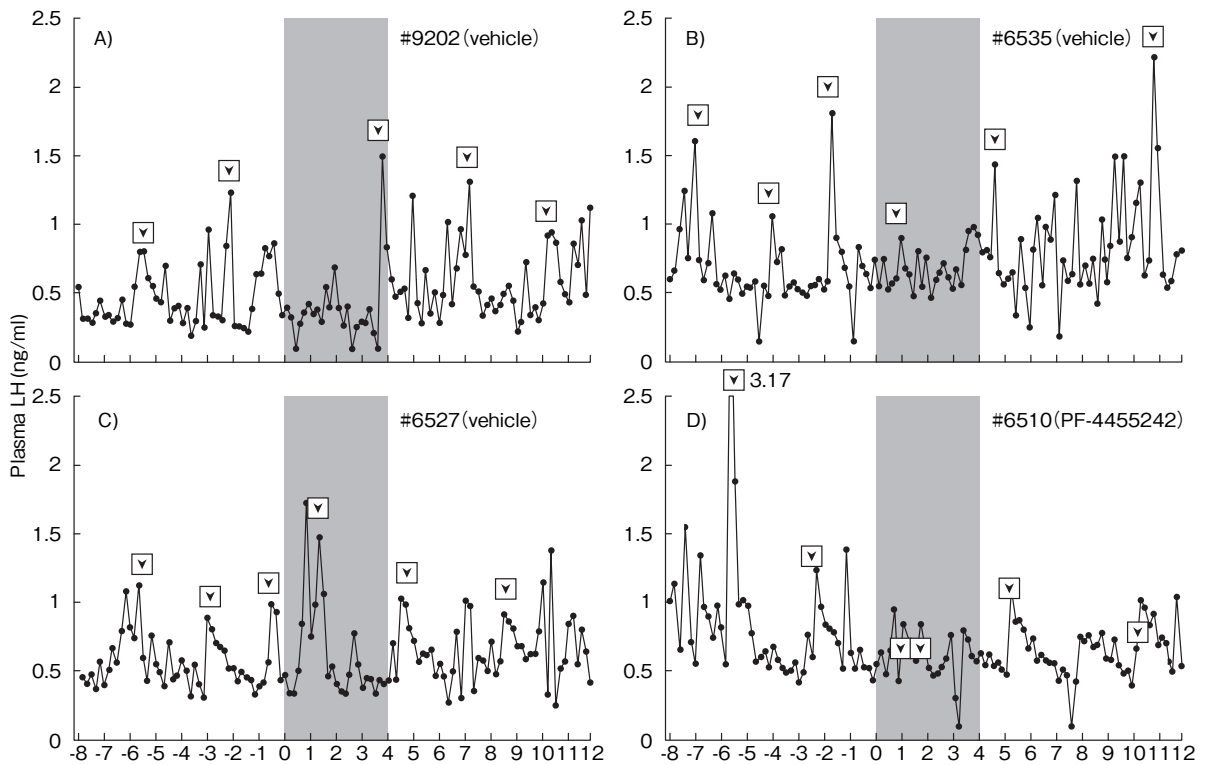


Fig. 1 Effect of i.v. infusion of PF4455242 on luteinizing hormone (LH) secretion in cyclic adult Japanese Black beef cow. A) – C) and D) represent plasma LH profiles of cows infused with vehicle and PF4455242, respectively. Blood samples were taken every 10 min between 8 h before and 12 h after the start of infusion. Shaded periods represent the infusion period. Arrowheads indicate peaks of LH pulses.

モニターし、卵胞の大きさと数を測定した。卵巣の観察は、投与開始前24時間から投与開始後56時間まで6時間間隔で行った。また血漿中LH濃度を測定するため、投与前8時間から投与開始後12時間まで10分間隔で採血した。血漿中LH濃度はラジオイムノアッセイ法により測定した。

2.3 ウシ脳組織の採取、包埋および薄切

卵胞期または黄体期の黒毛和種の成熟雌ウシより脳組織を採取した。ウシを麻酔後、頸動脈よりリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) および固定液 (4%パラホルムアルデヒド) を注入してかん流固定し、脳を取り出した。脳から視床下部を切り出し、固定液に浸漬した。数日間固定液に浸漬した視床下部をクリオスタットにて50 μ mの厚さに薄切し、組織切片を作製した。

2.4 免疫染色によるウシ視床下部のダイノルフィン検出

ウシ視床下部の組織切片をPBSで数回洗浄後、0.3% Triton X-100を含むPBS (PBST) で洗浄し、ブロッキング溶液 (ロシュ) にて90分間インキュベートした。次に切片を抗ダイノルフィン抗体 (1:4000; Phoenix Pharmaceuticals) を含むブロッキング溶液中で4℃, 72時間インキュベートした。PBSTで数回洗浄後、Alexa555結合抗ウサギIgG抗体 (1:200; ライフテクノロジーズ) を含むブロッキング溶液中で室温, 2時間インキュベートした。PBSTで数回洗浄後封入し、蛍光顕微鏡にて観察および写真撮影を行った。

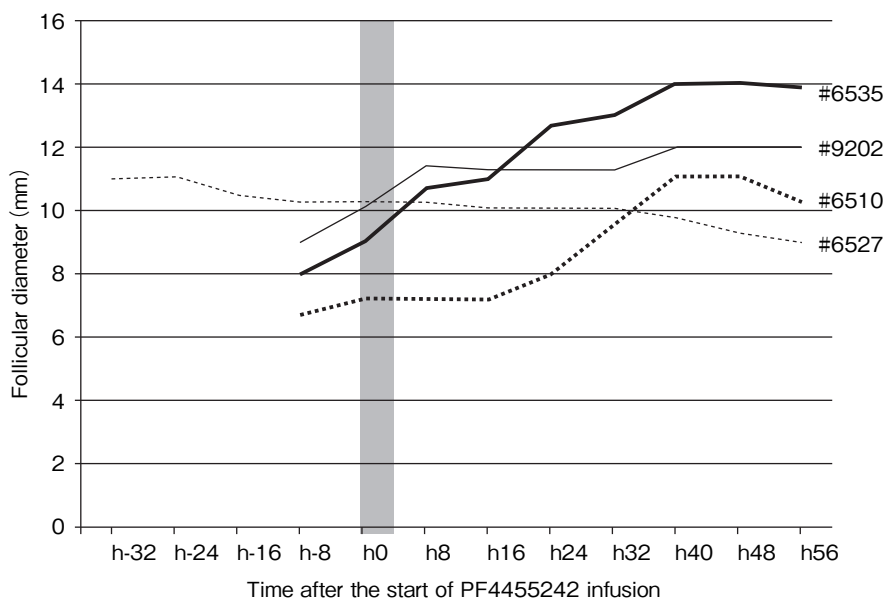


Fig. 2 Effect of i.v. infusion of PF4455242 on follicular growth in cyclic Japanese Black beef cows. Black curve represents the change in follicular diameter of a PF4455242-infused cow (#6510), while the other three curves represent those of vehicle-infused cows (#6527, #6535 and #9202). Follicular diameters were measured every 6 h between 8 h before and 56 h after the start of infusion. Shaded period represents the infusion period.

2.5 *In situ* hybridization法 (ISH) によるヤギ

視床下部のダイノルフィン受容体mRNA検出
ウシの脳組織サンプルは貴重であるため、ヤギ
脳切片を用いてダイノルフィン受容体mRNAの
ISHを実施した。ISHは過去の報告³⁾に記載され
た方法に従って実施した。ヤギの脳切片はウシと
同様の方法で採取・作製した。ヤギのダイノル
フィン受容体mRNA配列をもとにプローブ配列
を設計し、ジゴキシゲニン (DIG) ラベルした
RNAプローブを作製した。切片をプロテアーゼ
K (1 μ g/mL) にて37℃, 15分間処理し、PBS
で洗浄後、ダイノルフィン受容体RNAプローブ
を加えて60℃, 一晚処理した。切片を洗浄後、ブ
ロッキング溶液を加えて37℃, 1時間インキュ
ベートしたのち、抗DIG抗体 (1:1000; ロシュ)
を加えて37℃, 2時間インキュベートした。切片
を洗浄し、発色液 (NBT/BCIP, ロシュ) を加
えて室温, 30分間発色させた。切片を洗浄して発

色を停止させ、封入後、光学顕微鏡にて観察およ
び写真撮影を行った。

3. 結果と考察

3.1 新規ダイノルフィン受容体阻害剤 (PF4455242) がウシの血中LH濃度および 卵胞発育に与える影響

PF4455242を投与した1個体 (#6510), 溶媒
(蒸留水) を投与した3個体 (#6527, #6535,
#9202) の血漿中LH濃度変化をFig. 1に示した。
溶媒を投与した個体では、平均すると3~4時間
に1回のLHパルス (図中矢頭) がみられた。投
与開始前, 投与中, 投与終了後でパルス頻度の変
化は認められなかった。PF4455242投与群では、
投与前と投与後には3~4時間に1回のLHパル
スがみられたが、投与中の4時間に2回のLHパ
ルスが検出された。1個体のみの結果であるが、
PF4455242がLHパルス頻度を増加させる作用を

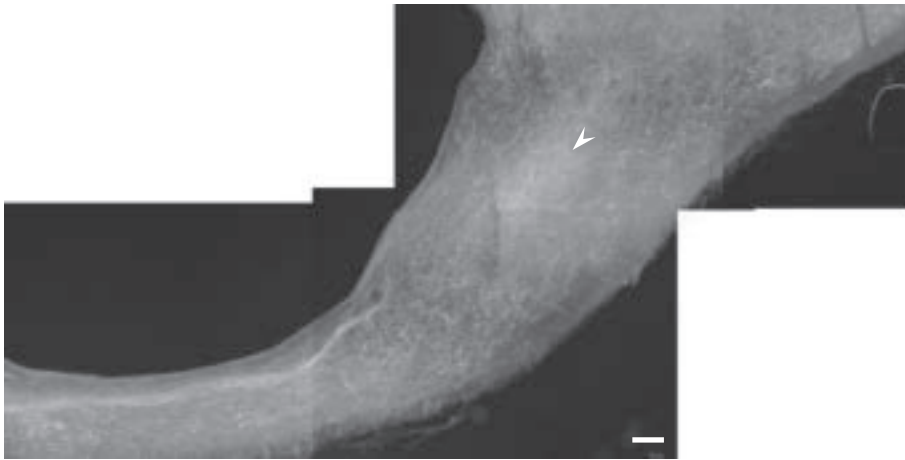


Fig. 3 Localization of dynorphin in the arcuate nucleus (ARC) during follicular phase in cows. A representative photomicrograph of dynorphin immunohistochemistry is shown. Neuronal fibers containing dynorphin were detected in the ARC (white arrowhead). Scale bar = 100 μ m.

持つ可能性が示唆された。今後、投与個体数を増やしてPF4455242の作用を精査していく必要がある。

上記の4個体における、PF4455242投与前後の卵胞直径の経時的变化をFig. 2に示した。PF4455242を投与した個体は、投与中に卵胞直径の変化はなかった。溶媒を投与した個体のうち1個体では投与中に卵胞直径の変化はなく、2個体では投与中に卵胞直径が増加した。投与48時間後と投与前の卵胞直径を比較すると、PF4455242投与個体は1.5倍、溶媒投与個体はそれぞれ0.9倍、1.2倍、1.6倍に増大していた。PF4455242は4時間の薬剤投与中すぐに卵胞を増大させる効果はないが、その後の卵胞発育に促進的に作用している可能性が考えられた。今後、投与個体数を増やすことでPF4455242の卵胞発育促進効果を精査する必要がある。

3.2 ウシ視床下部におけるダイノルフィンおよびヤギ視床下部におけるダイノルフィン受容体の局在

ウシ視床下部におけるダイノルフィン免疫染色結果の代表例をFig. 3に示した。GnRH/LHパルス頻度を促進するキスペプチンニューロンは視床

下部の弓状核とよばれる神経核に局在することが、ヤギを含む多くの哺乳類で明らかになっている。このキスペプチンニューロンにダイノルフィンが共在していることもヤギ、ヒツジ等で報告されている^{2, 4)}。ウシにおいても弓状核にキスペプチンニューロンの細胞体が存在することを我々は最近見いだした(未発表)。本研究結果では、弓状核にダイノルフィンの神経線維の染色が観察され、ウシにおいても弓状核に存在するダイノルフィンがキスペプチン分泌を抑制していることが示唆された。しかし、弓状核周辺にダイノルフィン陽性の神経細胞体は検出されなかったことから、ウシのキスペプチンニューロンにはダイノルフィンが共在せず、ダイノルフィンニューロンが別に存在する可能性も考えられた。今後キスペプチンとダイノルフィンの二重染色を行って、この点を確認する必要がある。

ダイノルフィン受容体ISHの結果、ヤギ視床下部においては非常に薄い染色しか認められなかった。海馬は強く染色されたことから実験系自体は成功していると考えられ、視床下部におけるダイノルフィン受容体mRNA量は本研究で行った手

法の検出感度以下であったと考えられる。ダイノルフィン受容体を含むGタンパク質共役受容体は、一般に発現量が少なく、また互いに相同性が高く検出が難しいとされる。視床下部のダイノルフィン受容体の検出には、より高感度の方法を用いる必要があると考えられる。ヤギで成功した手法を用いて、ウシの視床下部においてもダイノルフィン受容体の局在を明らかにしていく予定である。

4. 要 約

日本においてウシの受胎率は低下の一途をたどっており、ウシの繁殖機能を改善する新たな技術の開発が切望されている。我々は新規ダイノルフィン受容体阻害剤 (PF4455242) をウシの卵胞発育促進剤として応用できる可能性に着目し、以下の実験を行った。黒毛和種成熟雌ウシの頸静脈内にPF4455242 (1 $\mu\text{mol/kg/時間}$) を4時間持続投与し、血中LH濃度と卵胞直径の変化を測定した。薬剤投与群でLHパルス頻度および卵胞直径が増加する傾向が認められたが、溶媒群との差は明瞭ではなかった。免疫染色により、ウシ視床下部弓状核においてダイノルフィンを含む神経線維の局在が認められ、ウシにおいて弓状核に存在

するダイノルフィンがキスペプチン分泌を抑制していることが示唆された。今後さらなる実験によりPF4455242の卵胞発育促進効果とその作用点を明らかにしていく必要がある。

文 献

- 1) Maeda K, Ohkura S, Uenoyama Y, Wakabayashi Y, Oka Y, Tsukamura H, : Okamura H. Neurobiological mechanisms underlying GnRH pulse generation by the hypothalamus. *Brain Res*, **1364**, 103~115, 2010.
- 2) Wakabayashi Y, Nakada T, Murata K, Ohkura S, Mogi K, Navarro VM, Clifton DK, Mori Y, Tsukamura H, Maeda KI, Steiner RA, 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. *J Neurosci*, **30**, 3124~3132, 2010.
- 3) Ohkura S, Takase K, Matsuyama S, Mogi K, Ichimaru T, Wakabayashi Y, Uenoyama Y, Mori Y, Steiner RA, Tsukamura H, Maeda KI, Okamura H. : Gonadotrophin-releasing hormone pulse generator activity in the hypothalamus of the goat. *J Neuroendocrinol*, **21**, 813~821, 2009.
- 4) Goodman RL, Lehman MN, Smith JT, Coolen LM, De Oliveira CV, Jafarzadehshirazi MR, Pereira A, Iqbal J, Caraty A, Ciofi P, Clarke IJ. : Kisspeptin neurons in the arcuate nucleus of the ewe express both dynorphin A and neurokinin B. *Endocrinology*, **148**, 5752~5760, 2007.

ウシ胚盤胞のマウス子宮内あるいは体外培養における休眠誘導の可能性

Studies on the induction of embryonic diapause of bovine blastocysts in pseudo-pregnant mouse uteri, in which diapause conditions are created, or under *in vitro* culture conditions

山 田 雅 保

(京都大学大学院農学研究科)

Masayasu Yamada

(Laboratory of Reproductive Biology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

In the present experiments, we examined whether day 8 blastocysts from bovine *in vitro* fertilized embryos (day 0) could enter into diapause following their transfer into mouse uteri in which diapause conditions were created, or under *in vitro* culture conditions. Seven days after transfer, diapausing bovine blastocysts were not able to recover from the mouse uteri. On the other hand, all of bovine blastocysts cultured in KSOM medium with 0.6% deionized BSA and 10 mM threonine degenerated within 3 days in culture, whereas when cultured in medium with 25 % or 50 % fetal bovine serum (FBS), it appeared that about 40 % or 60 % of the blastocysts remained alive with morphological characteristics of normal expanded blastocyst for 5 days, irrespective of the presence or absence of threonine in the culture medium, respectively. However, it still remains unknown whether such bovine blastocysts in extended period of culture have an ability to develop to term following transfer into bovine surrogate recipients.

1. 目 的

哺乳類の齧歯目や有袋目など約100種類の動物種では、胚盤胞の段階で休眠と呼ばれる“胚の発生を一時的に停止する現象”を引き起こすことが知られている^{1,2)}。この休眠は、哺育に好ましくない母体の栄養状態や気候などの環境下における分娩を避けるために、進化の過程で獲得されたものと考えられている。また、授乳中の母親が妊娠すると、胚盤胞へ発生した胚は子宮内で発生を停

止し、着床せず、子宮内に浮遊した状態を維持する³⁾。このような母体の受けるストレスによっても、胚の休眠は引き起こされ、ストレスから解放されると、休眠胚は、活性化されて子宮への着床を開始する。マウスやラットでは胚盤胞の休眠を実験的に引き起こすことが可能である。妊娠4日目のマウスの卵巣を除去することでエストロゲン分泌を遮断することによって、子宮内に到達した胚盤胞の着床が阻害され、そのような胚は休眠状態に入る。この状態は、術後毎日プロジェステ

ロンを投与することで3週間以上維持することが可能である⁴⁾。また、エストロジェンを投与すると胚は活性化され、着床を開始するようになる⁵⁾。

最近、非休眠動物と考えられてきたヒツジの胚盤胞を、卵巢除去偽妊娠マウスの子宮に移植すると、胚は休眠状態で維持され、1週間後に子宮から回収した休眠胚をヒツジ受容雌へ移植することによって、非休眠胚盤胞の移植よりも高い割合で産仔が得られることが報告された⁶⁾。ウシにおいても同様に胚の休眠が誘導されることがNature誌に紹介された⁷⁾。さらに、①単為発生胚盤胞が子宮内で休眠維持されると、その着床後の発生能が高くなる⁸⁾こと、②休眠胚盤胞にはDNA損傷を修復する能力がある⁹⁾こと、そして③胚性幹細胞が非休眠胚盤胞よりも休眠胚盤胞からより高率に樹立される^{10, 11)}こと、が知られている。これらのことから、休眠による胚盤胞の質的改善と受胎能力の向上が大いに期待される。

胚移植によるウシの生産において、体外受精胚や凍結保存胚などの体外操作胚の低受胎性が重大な問題となっている。しかし、これまでにこの問題の解決に向けての研究が行われてきているが、必ずしも大きく進歩しているわけではないことから、本研究では、ウシ胚盤胞の休眠をマウス子宮内で、あるいは体外培養において誘導・維持することによって、その胚質を改善し、受胎能力を高める新たな技術の開発を目標とし、マウス子宮内あるいは体外培養で体外受精由来ウシ胚盤胞を休眠誘導・維持できるのか、について検討した。

2. 方 法

2.1 卵巢除去あるいは抗エストロジェン投与によるマウス子宮内での胚盤胞の休眠誘導・維持

妊馬血清性腺刺激ホルモン (PMSG, 7.5 IU) を投与し、その48時間後にヒト絨毛性性腺刺激ホ

ルモン (hCG, 7.5 IU) を投与することによって過排卵処理を誘起させたICR系マウスを交配し、臍栓が確認されたマウスの卵巢を妊娠4日目 (day 4, 交配の翌日をday 1とする) に除去し、その後1日毎にプロゲステロン (2 mg) をday10 (6日間の休眠) まで皮下投与した。あるいは、交配したマウスの皮下に抗エストロジェン (fulvestrant, Sigma, 投与量: $50 \mu\text{g}$ $100 \mu\text{l}^{-1}$) をday 3の18:00 hとday 4の8:00 hと9:00 hの間に投与した。いずれの方法においても、day10に子宮内を培養液で還流し回収された胚の数を求め、その形態を観察した。

2.2 抗エストロジェン投与偽妊娠マウス子宮内へのマウスおよびウシ胚盤胞の移植

偽妊娠交配させ、臍栓の観察されたマウスの子宮内にday2.5に体外培養で2細胞期から発生した胚盤胞を移植し、上記の通りに抗エストロジェンを投与した。day10に子宮内を還流し、回収された胚の数 (回収率) を求め、その形態を観察した。

また、ウシ屠体卵巢から採取した卵母細胞を常法により体外成熟・受精させ、8細胞期までBSA添加修正SOFaa培地で培養し、その後5%ウシ血清添加同培地で受精後8日目まで培養することによって発生した胚盤胞、あるいは凍結保存胚盤胞を偽妊娠マウスの子宮内にday2.5に移植し、上記の通りに抗エストロジェンを投与した。移植後7日目に子宮を還流し、回収された胚の数 (回収率) を求め、その形態を観察した。

2.3 ウシ胚盤胞の体外培養

体外受精由来ウシ胚盤胞 (受精後8日目) を①0.6%脱イオン化BSA(dBSA) および10mMスレオニンを添加したmKSOM培地、②種々の濃度の牛胎児血清 (FBS, 10%, 25%, 50%) および10mMスレオニンを添加したmKSOM培地、あるいは③50mMスレオニン添加あるいは無添加50%FBS含有mKSOM培地で7日間37℃, 5% CO_2 気相下

で培養し、胚の形態を経日的に観察した。

3. 結果と考察

妊娠マウスにおける胚盤胞の休眠の誘導・維持方法の検討を行った。まず、卵巣除去による方法を検討した結果、day10に2匹の処置マウスの子宮を還流したところ、平均1匹当たり4.5個の遅延着床胚盤胞（休眠胚）が回収された。しかし、卵巣除去がおそらく不完全であったため、残り3匹のマウスでは、子宮へ着床した胎児が観察された。

次に、卵巣除去の代わりに、抗エストロゲン投与方法について3匹のマウスを用いて検討した。day10にそのマウスの子宮内を還流したところ、全てのマウスから平均1匹当たり4.3個の遅延着床胚盤胞が回収された。従って、遅延着床を確実に誘導するためにも、以降の実験には簡便な抗エストロゲン投与方法を用いることにした。

次に、マウス卵管から回収した2細胞期胚を、0.3%脱イオン化BSA（dBSA）を添加したmKSOM中で2日間培養し、胚盤胞へ発生した胚を、上述の方法によって抗エストロゲンを投与した偽妊娠交配3日後のマウスの子宮内へ移植（移植胚数：1匹のマウス当たり20個）した。移植した胚をday10に子宮還流によって回収した。移植した3匹のマウスから遅延着床胚盤胞が回収され、平均1匹当たり6.0個の休眠胚盤胞が回収された（平均回収率：30%）。

以上の実験から、体外培養で発生した胚盤胞の子宮内移植による休眠誘導・維持を抗エストロゲン投与方法で確実に行うことができることが明らかとなった。そこで、体外受精後8日目に発生した総数48個のウシ胚盤胞を、3匹の抗エストロゲン投与偽妊娠マウス子宮内へ移植し、その7日後に子宮還流によって胚の回収を試みた。その結果、いずれの子宮からも、扁平化した変性胚

（総数9個）のみが回収されただけであった（Fig. 1）。

また、36個の凍結保存ウシ胚盤胞を融解後、3匹の抗エストロゲン投与偽妊娠マウス子宮内へ移植した。融解後の形態から、全ての胚はCランク胚と判定された。移植7日後に子宮還流をした結果、正常な胚盤胞は回収されず、ウシ胚由来と思われる透明帯のみが3個観察された。以上の結果から、抗エストロゲン投与マウス子宮内でウシ胚盤胞の休眠を誘導することはできなかった。

ヒツジおよびウシ胚盤胞を卵巣除去偽妊娠マウス子宮内で高い受胎能を保持した状態で休眠を維持したPtakらの報告⁶⁾を再現することはできなかった。ただ、ウシ胚盤胞の休眠に関しては、Nature誌のNewsで紹介されている⁷⁾だけで、具体的な結果は公表されているわけではない。我々は、Ptakらの方法⁶⁾通り、卵巣除去偽妊娠マウスの子宮内への移植を1度だけ試みたが、正常胚は回収されず、ウシ胚由来と思われる透明帯のみが回収されただけであった。この場合も、上述したように、ごくわずかの卵巣組織が残っていた可能性は否定できない。

休眠を起こさないと考えられていた動物の胚盤胞が休眠動物の子宮内へ移植すると、休眠が誘導されることは、ヒツジやウシだけではなく、過去において休眠を起こさないフェレットの胚が、休眠を起こすミンクの子宮内で数日間生存性を維持し、休眠が誘導されることが報告されている¹²⁾。従って、今後、我々がマウス子宮内でウシ胚盤胞の休眠を誘導できなかった原因を精査し、再度Ptakらのウシの実験結果⁷⁾を再現できるよう繰り返し実験を行う必要性は残されていると思われる。さらに、当初計画していたウシ胚盤胞のマウス胚盤胞との共移植や、マウスよりも子宮腔の容積の大きい卵巣除去あるいは抗エストロゲン投与偽妊娠ラット子宮内への移植を試みることを考

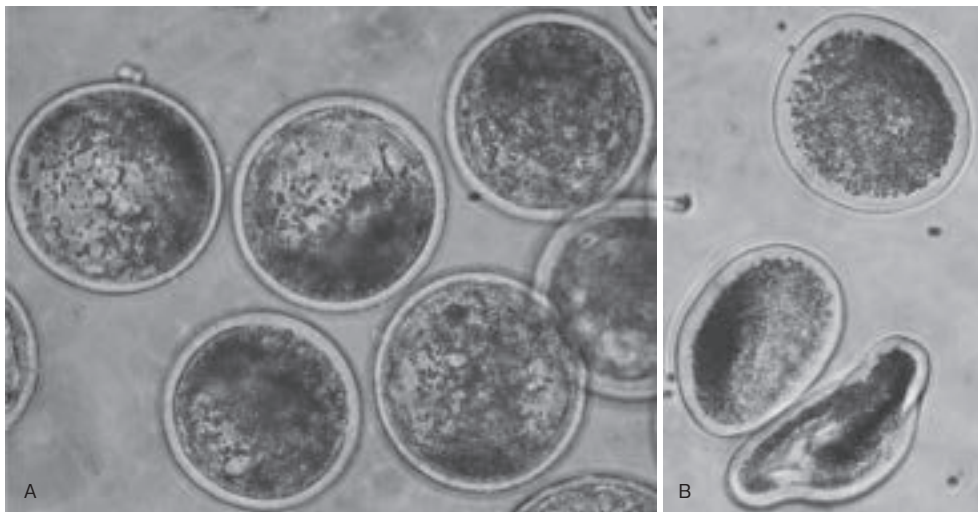


Fig. 1 Morphological observation of bovine blastocysts transferred into pseudo-pregnant mouse uteri in which diapause conditions were created.

A: Blastocysts before embryo transfer

B: Degenerated embryos recovered from mouse uteri 7 days after embryo transfer

えている。

次に、我々はマウス遅延着床胚盤胞を、高い受精能を維持した状態で5日間維持できる体外培養法の開発に成功していることから、ウシ胚盤胞の休眠を誘導する体外培養法の開発に着手することにした。

体外受精由来ウシ胚盤胞 ($n = 30$, 受精後8日目) をマウス遅延着床胚盤胞の培養に有効であった培地 (10mM スレオニン添加0.6% d-BSA 含 mKSOM 培地) で7日間培養した。胚盤胞の形態を経日的に観察した結果、胚盤胞の形態は維持されず、数日後には全ての胚が萎縮し変性した。

そこで、d-BSAの代わりに種々の濃度 (10%, 25% そして50%) のウシ胎児血清を添加した10mM スレオニン含有 mKSOM 培地で培養した結果、10% ($n = 30$) の濃度では、3日後には全ての胚で胞胚腔は萎縮したが、25% ($n = 30$) の濃度では、45%の胚が培養5日目まで変性あるいは逆に伸長することなく拡張胚盤胞としての形態を維持し、さらに50% ($n = 30$) の高濃度では、

63%の胚が胞胚腔を拡張した状態で維持されることが観察された。また、50%血清添加培地からスレオニンを除去した場合、あるいはその培地に50mM スレオニンを添加したいずれの場合においても、胚盤胞の形態維持効果に変化はなかった。

以上の結果から、ウシ胚盤胞の形態および生存性を体外培養で5日間維持できる培養条件が明らかとなったが、このような遅延着床胚盤胞の内部細胞塊数及び試験管内着床能の経日的推移については現在検討中である。

マウス着床遅延胚盤胞の休眠誘導にスレオニンが重要な役割を演じているが、ウシ胚盤胞ではそのような効果はないことが示唆された。マウス遅延着床胚盤胞でのスレオニンの効果は、内部細胞塊のミトコンドリアに局在するスレオニン脱水素酵素 (TDH) によってスレオニンがアセチル CoA とグリシンに代謝されることで発揮される。特に、我々は、TDHによってグリシンとプロピオニル CoA に代謝されるスレオニンの変異体 (hydroxynorvaline) を用いたマウスでの実験か

ら、アセチルCoAの重要性を示唆している。アセチルCoAは、エネルギー源として作用するだけでなく、ヒストンのアセチル化におけるアセチル基供与体でもある。ヒストンへのアセチル基供与体として働くために、アセチルCoAがL-カルニチンによってミトコンドリアから核内へ運搬されることも分かっている¹³⁾。最近、マウス遅延着床胚盤胞のより長期間の形態維持、特に内部細胞塊数の維持にL-カルニチンが有効であることを我々は明らかにしている。また、L-カルニチンは細胞寿命の延長にも関連することから、今後ウシ胚盤胞に対するL-カルニチンや他の細胞寿命延長効果をもつレスベラトロールなどの種々の物質についても着目し、研究を進めていく予定である。

4. 要 約

本研究では、体外受精由来ウシ胚盤胞の休眠をヒツジと同様に偽妊娠マウスの子宮内で、あるいは体外培養で誘導・維持できるのかについて検討した。その結果、マウス胚盤胞の休眠を確実に誘導・維持する抗エストロゲン投与偽妊娠マウス子宮内に受精後8日目の胚盤胞を移植し、7日後に子宮を還流したところ、変性した胚のみが回収され、ヒツジ胚盤胞のようにマウス子宮内でウシ胚盤胞の休眠を誘導・維持することはできないと思われた。一方、受精後8日目のウシ胚盤胞の体

外培養を試みたところ、25%あるいは50%の高濃度のFBSを添加したmKSOM培地で培養すると約40~60%の胚が拡張胚盤胞の形態を5日間維持することが分かった。しかし、このように形態を維持した胚盤胞に着床能力などの機能が保持されているのかについては明らかとなっていない。

文 献

- 1) Mantalenakis SJ, Ketchel MM : *J. Reprod. Fertil.*, **12**, 391~394, 1996.
- 2) Yoshinaga K, Adams C. : *J. Reprod. Fertil.*, **12** : 593~595, 1996.
- 3) Nichols J, Chambers I, Taga T, Smith A. : *Development*, **128** : 2333~2339, 2001.
- 4) Weitlauf HM : *J.Reprod.Fertil.*, **39** : 213~224, 1974.
- 5) Hamatani T, Daikoku T, Wang H, Matsumoto H, Carter MG, Ko MSH, *et al.* : *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **101** : 10326~10331, 2004.
- 6) Ptak GE, Tacconi E, Czernik M, Toschi P, Modlinski JA, Loi P : *PloS One*, **7**: e33027, 2012.
- 7) Nicholls H : *Nature/News*, doi : **10. 1038/nature. 2012**.
- 8) Kaufman MH, Barton SC, Surani MA, : *Nature*, **265** : 53~55, 1977.
- 9) Surani MAH, Fishel SB, : *J.Reprod.Fertil.*, **29** : 159~172, 1981.
- 10) Brook FA, Gardner RL : *T, Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94** : 5709~5712, 1997.
- 11) Evans MJ, Kaufman MH : *Nature*, **292** : 154~156, 1981.
- 12) Chang M, : *J. Exp. Zool.*, **168** : 49~59, 1968.
- 13) Madiraju P, Pande SV, Prentki M, Madiraju SR : *Epigenetics*, **4** : 399~403, 2009.

牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの開発

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

ツェンコヴァ ルミアナ・竹村 豪・ジョージ バザール
(神戸大学大学院農学研究科)

Roumiana Tsenkova, Go Takemura, George Bazar
(Biomeasurement Laboratory, Kobe University Graduate School of Agricultural Science)

The purpose of this research is to develop a system which enables us to diagnose cow's estrus non-destructively, rapidly and easily by means of near infrared spectroscopy (NIRS) and Aquaphotomics proposed as new NIRS analytical method recently. Aquaphotomics is the method that can measure changes of solutes in solution by observing water NIR spectra which is changed by changes of solutes, so this method is very useful to measure changes in bio systems.

This research examine the possibility that NIR spectra of milk and blood serum of a dairy cow can be used to measure sexual hormone (progesterone) which changes just before estrus period. Six cows whose estruses were induced by hormone infusion were used and milk and serum samples' NIR spectra were acquired and measured over the examined period. Sampling period contained planned estrus days in the middle of it. Progesterone concentration of serum samples was measured by enzyme immunoassay which was used as conventional method to measure sexual hormone. With it, the important wavelength ranges which showed changes of progesterone were investigated. From the results of partial least square regression, 1384 ~ 1397 nm, 1409 ~ 1446 nm were found to be very important ranges to show changes of progesterone in milk and serum respectively. In the future, with knowledge acquired, we will try to construct small and cheap NIR sensor for easy and fast estrus detection.

1. 目 的

本研究では近赤外分光法と同法における新たな分析手法であるアクアフォトミクスを用いて、牛の発情・妊娠の診断を非破壊、迅速かつ簡便に行うことのできるシステムの開発を行う¹⁾。

当研究グループでは近年、近赤外分光法を発展させ、アクアフォトミクスという新たな分析手法

を開発している¹⁾。この手法は生体内のホルモン等、水溶液中の溶質の変化が及ぼす水の物理化学的構造変化を近赤外線による水の吸収スペクトルの変化から読み取るものである。あらゆる生体の大部分は水分で構成されるため、この手法で生体の溶質の微量な変化を水の吸収スペクトルを通しての計測が可能となる。

本研究ではこの手法を用いて、牛の発情・妊娠

に関するホルモンの分泌状況から牛の発情・妊娠時に特徴的な近赤外スペクトルパターンを明らかにし、これを非破壊、迅速かつ簡便に検出する診断システムを開発する。将来的にはこのシステムを用いて畜産農家が日々の業務の中で利用できる小型、安価かつ簡易なセンサーを開発することを目指す。

特に本稿では牛の発情について、発情時期の直前に血液や生乳中でその濃度が特異的に変化する性ホルモンであるプロゲステロンの変化を近赤外分光法およびアクアフォトミクスによって捉えることを目的とする。

2. 方 法

牛の発情時期の直前には、血中プロゲステロンの濃度が大きく低下することが報告されている²⁾。また、血清中プロゲステロン濃度の変化は生乳中の同濃度に反映され、高い相関関係があることが分かっている³⁾。従って、本研究では発情時期を含む一定期間、供試牛から血液（分析には血清を精製・利用した）、生乳をサンプルとして採取し、すべてのサンプルの近赤外スペクトルを測定した。

実験は2度行い、第1回目は2013年5、6月に、3頭の供試牛を用いて行った。供試牛は兵庫県立農林水産技術総合センター淡路農業技術センターで飼育されているホルスタイン牛を用い、ホルモン製剤によって発情を誘起した。発情予定日を中間に含む1ヶ月間毎日、午前と午後に生乳を採取した。また、発情予定日を中間に含む8日間毎日血清を採取した。すべてのサンプルは設置型近赤外分光器（XDS, Metrohm社）で近赤外スペクトル（測定波長範囲：400～2500nm、光路長：1mm、測定方法：透過法、反復測定回数：血清6、生乳3）を測定した。一部のサンプルは他の2種の小型分光器によっても近赤外スペクトルを測定

し、将来的にデータ解析を行う予定である。同時に従来の性ホルモン濃度測定法であるエンザイムノアッセイ法（以下、EIA法）を用いて、マイクロプレートリーダー（iMark, BioRad社）で血清中サンプル中のプロゲステロン濃度も測定した。さらに、ポータブル近赤外分光器（NIRGUN, FUNTEC社）を用い、同期間中に牛の乳房および静脈の近赤外スペクトルも測定し、こちらも将来的にデータ解析を行う予定である。

第2回目は2013年10、11月に、第1回目の実験とは異なる4頭の供試牛を用いて行った。内1頭はホルモン製剤処理の行われていない黄体期の牛を選び、コントロール牛とした。他の条件はほぼ第1回目の実験と同様であったが、血清サンプルの採取を8日間に加えて、数日おきに9サンプル多く採取した。また、乳房と静脈の測定に関して、第1回目に用いたポータブル分光器に加えて、さらに小型のポータブル分光器（MicroNIR, JDSU社）によっても近赤外スペクトルを採取し、将来的にデータ解析する予定である。

本稿では2度の実験で、設置型分光器XDSにより得られた血清および生乳の近赤外スペクトルとEIA法によって得られたプロゲステロン濃度の値を用いて、プロゲステロン濃度の変化を血清および生乳のスペクトルの変化から捉えるための解析結果について報告する。解析はすべて、水分子の第一倍音に関する情報を豊富に含む波長領域である1300～1600nmを用いた。また、牛毎に分けて解析を行い、牛乳に関しては乳成分が極端に異なるという理由から、午前と午後を分けて解析した。

3. 結果と考察

3.1 EIA法による血清中プロゲステロン濃度測定

牛の体内プロゲステロン濃度は発情の直前に

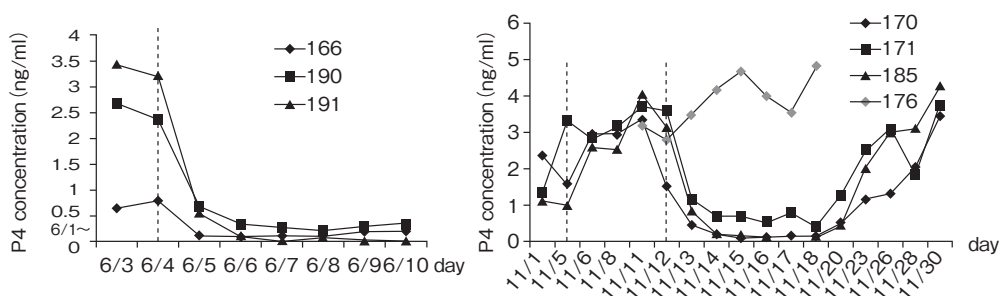


Fig. 1 Concentration of serum samples measured by EIA

(Left : 1st experiment. 3 cows named 166, 190 and 191. Right : 2nd experiment. 4 cows named 170, 171, 185 and 176 (no hormone treatment cow ; control cow). The lines at 6/4, 11/5 and 11/12 are removing of hormone preparation, insertion and removing)

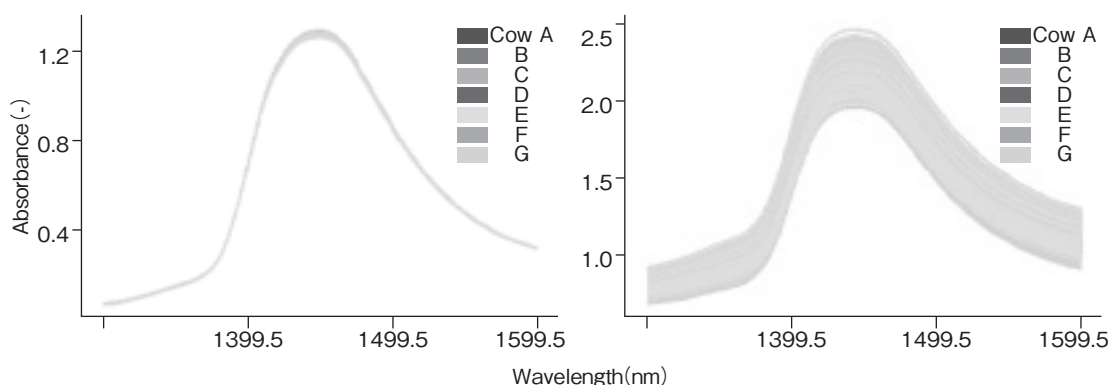


Fig. 2 Raw NIR spectra of serum and milk samples

(Left : Raw NIR spectra of serum. Right : Raw NIR spectra of milk.)

急激に低下することが分かっている²⁾。ホルモン製剤による発情の誘起は、膣内留置型ホルモン製剤 (PRIDもしくはCIDR) を挿入し、人工的に牛の体内プロゲステロン濃度を高い水準に保ち、適当な期間留置した後、製剤を除去することで体内プロゲステロン濃度を人工的に急激に低下させることで行う。

EIA法による血清中プロゲステロン濃度 (ng/ml) を測定した結果、コントロール牛を除くすべての牛で、膣内留置型ホルモン製剤の除去前後でプロゲステロン濃度に大きな高低差が確認され、ホルモン製剤による体内プロゲステロン濃度の操作は成功していたことが確認された

(Fig. 1)。実験に用いた全7頭の牛の血清中プロゲステロン濃度のレンジは4.79 ~ 0.011 (ng/ml) であった。

3.2 PLS回帰分析によるプロゲステロン濃度予測とそれに寄与する波長領域

Fig. 2に設置型近赤外分光器XDSにより得られた生乳および血清サンプルの近赤外スペクトルを示す。本項では、プロゲステロン濃度を予測するために、EIA法による血清中プロゲステロン濃度の測定値を目的変量とし、生乳および血清の近赤外スペクトルを用いて、Partial Least Squares回帰分析 (以下PLS回帰分析) による分析を行った。PLS回帰分析とは、主成分分析に基

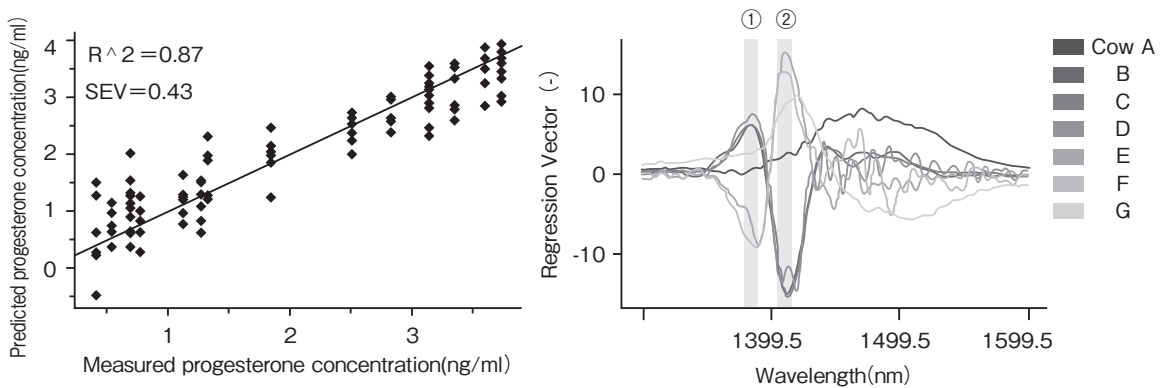


Fig.3 PLS regression Y-fit and regression vector of serum.

(Left : One example of Y-fit (Cow E). Right : Normalized regression vectors of all cows.
The range ① is 1384~1390 nm and ② is 1409~1420 nm.)

づいた回帰分析であり、元々のデータを構成する変量を用いて回帰を行う重回帰分析と類似しているが、PLS回帰分析では主成分分析によって合成された変量を用いて回帰を行う点で、近赤外スペクトルのような多変量データへの適用に適している。

血清におけるPLS回帰分析では、より高精度な結果を得るために、スペクトルの前処理を行った。主に用いた前処理としては、スペクトルに含まれるランダムノイズを低減させる効果のある平滑化、スペクトルに内在するピークを強調することのできる二次微分、スペクトルのベースライン補正効果があるSNV処理、また目的変量に対して回帰を行うのにより適当な変量をあらかじめ選り出す前処理であるOrthogonal signal correction処理（以下OSC処理）があり、これらの組み合わせで最も良い精度が得られた結果を用いた。また、より信頼できる回帰精度を得るために、クロスバリデーションによる精度評価を行った。

PLS回帰分析では、2度の実験における計7頭の牛で、プロジェステロンの平均回帰精度として決定係数 $R^2 = 0.78$ 、バリデーション誤差SEV = 0.45 (ng/ml)であった。また、PLS回帰分析で

スペクトルからプロジェステロン濃度を予測する際に寄与した波長範囲を表す回帰ベクトルから、1384 ~ 1390nmと1409 ~ 1420nmの範囲がプロジェステロン濃度の予測に特に重要な波長であると考えられた (Fig.3)。

一方、血清中のプロジェステロン濃度の変化は生乳中に良く反映され、強い相関関係にあることから、生乳に関しても同様にプロジェステロン濃度を目的変量としたPLS回帰分析を行った。主な前処理は平滑化、SNV、OSC処理であり、クロスバリデーションによる精度評価を行った。生乳のPLS回帰分析では、2度の実験における計7頭の牛で、プロジェステロンの平均回帰精度として午前と午後でそれぞれ、決定係数 $R^2 = 0.85, 0.89$ 、バリデーション誤差SEV = 0.32, 0.25 (ng/ml)であった。また、回帰ベクトルから、午前では1390 ~ 1392nmと1424 ~ 1446nm、午後では1390 ~ 1397nmと1413 ~ 1444nmの範囲がプロジェステロン濃度の予測に特に重要な波長であると考えられた (Fig.4, 5)。

3.3 考 察

上記の結果から、水の第一倍音領域である1300 ~ 1600nmの範囲の近赤外スペクトルを用いるこ

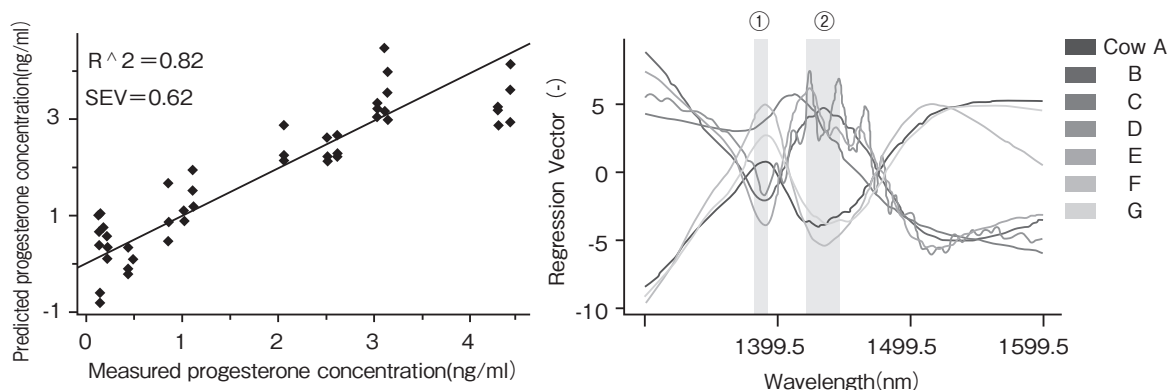


Fig. 4 PLS regression Y-fit and regression vector of milk (am).

(Left : One example of Y-fit (Cow F). Right : Normalized regression vectors of all cows.
The range ① is 1390~1392 nm and ② is 1424~1446nm.)

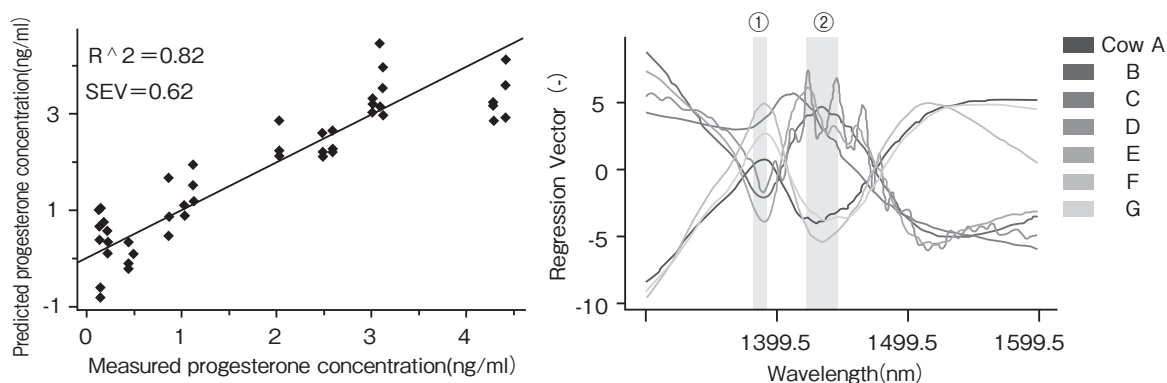


Fig. 5 PLS regression Y-fit and regression vector of milk (pm).

(Left : One example of Y-fit (Cow F). Right : Normalized regression vectors of all cows.
The range ① is 1390~1397 nm and ② is 1413~1444 nm.)

とにより、牛の血清および生乳からプロジェステロン濃度を測定することができる可能性が示唆された。特に1384～1397nm, 1409～1446nmがプロジェステロンの濃度変化に伴って、スペクトル値が大きく変化する領域であることが分かった。本研究で得られた重要な波長領域を用いて、今後はプロジェステロン濃度に基づいた判別分析なども行い、将来的には必要最低限の光のみを照射することのできる小型、安価で簡易なセンサーの開発に着手したいと考えている。

4. 要 約

本研究では近赤外分光法と、近年提唱されている近赤外分光法における新たな分析手法であるアクアフォトミクスを用いて、非破壊、迅速かつ簡便に牛の発情診断を行うシステム開発を目的とする。アクアフォトミクスとは、水溶液中の溶質の変化に伴う水分子の変化を近赤外スペクトルの変化から読み取る手法であり、生体内の変化を診断するのに適している。本研究では牛の生乳や血清中のプロジェステロン（性ホルモン）の濃度変化

を近赤外スペクトルによってとらえることで発情の診断の可能性を検討した。従来の性ホルモン濃度測定法であるEIA法によって、ホルモン製剤によって発情を誘起した計6頭の牛のプロジェステロン濃度の変化を測定し、それを基にプロジェステロン濃度に関する近赤外波長領域を調べた。PLS回帰分析の結果から特に、1384～1397nm, 1409～1446nmの範囲がプロジェステロン濃度の変化に伴って変化を起こす波長領域であるという

ことが分かった。今後は、得られた知見を用いて小型、安価で簡易なセンサーの開発を目指す。

文 献

- 1) R.Tsenkova : *J.Near Infrared Spectrosc.*, **17**, 303～314, 2009.
- 2) 中尾敏彦, 版, 37, 57, 酪農総合研究所, 札幌市, 2000.
- 3) J.B.Roelofs, F.J.C.M Van Eerdenburg, W. Hazeleger, N.M. Soede, B. Kemp : *Animal Reproduction Science*, **91**, 337～343, 2006.

リソソーム酵素活性制御による高温ストレス下でのウシ胚発生改善に関する研究

Study on improvement of bovine embryonic development under heat stress by regulation of lysosomal enzyme activities

山 中 賢 一・阪 谷 美 樹*

(佐賀大学農学部, *九州沖縄農業研究センター)

Ken-ichi Yamanaka and Miki Sakatani*

(Faculty of Agriculture, Saga University, *National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region)

Previous studies have reported that cathepsin B, lysosomal cysteine protease, had a negative correlation with the quality of bovine oocytes and embryos. Cathepsin B increases in poor-quality bovine oocytes and embryos, which is associated with low developmental competence, than in good-quality ones. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of heat stress during fertilization and subsequent embryo development on *in vitro* development and cathepsin B activity of bovine embryos. The developmental rate to blastocyst stage was significantly decreased by heat stress (40.0 °C) during *in vitro* fertilization and *in vitro* culture. Next, intracellular localization of an active form of cathepsin B was observed. The active form of cathepsin B was significantly observed throughout cytoplasm in embryos exposed to heat stress during *in vitro* fertilization and *in vitro* culture. On the other hand, the developmental rate to blastocyst stage of embryo exposed to heat stress was significantly improved by addition to fertilization and culture medium of cathepsin B inhibitor (E-64). Moreover, cathepsin B activity of heat stressed embryos was decreased by addition of E-64, and was similar to that of control embryos. In conclusion, the present results implicate that there is a negative correlation between the developmental competence and cathepsin B activity of bovine embryos exposed to heat stress, and also its developmental competence can be improved by controlling cathepsin B activity.

1. 目 的

我々は、これまで体外生産胚の高品質化を目的として、卵子および胚の品質マーカーとなる候補として、リソソーム内にあるシステインプロテアーゼに属するカテプシンBの活性に着目した研究を行ってきた。その結果、低品質の卵子および胚ではカテプシンBの酵素活性および発現量が有

意に高いことを明らかにした。また、このカテプシンBの活性を阻害剤であるE-64により抑制することで、低品質胚において顕著に起こるアポトーシスを抑制できること、さらには胚の発生率を向上できることを明らかにした^{1, 2)}。これらの結果は、カテプシンBの活性が卵子および胚の品質と負の相関があること、さらに、その活性を制御することで胚の品質を向上させうることを示し

ている。すなわち、これらの知見から高温環境下の生殖細胞においても同様に細胞内のカタプシンB活性が高いレベルにあり、それが引き金となって品質の低下や発生停止を起こしているのではないということが強く予想される。

そこで、本研究では、体外モデルを用いた高温ストレス下での受精、胚発生に対するE-64添加の効果をカタプシンB活性との関係とともに検証することを目的とした。

2. 方 法

2.1 実験デザイン

実験1：

体外受精をコントロール区 (Control) では38.5℃、高温ストレス区 (HS) およびE-64を1, 5および10 μMの濃度で添加した区 (HS + E-64) では40.0℃で行い、培養後10時間で前核形成率、2日で分割率、8日で胚盤胞形成率、胚盤胞期胚の細胞数およびアポトーシス陽性細胞率を算出した。

実験2：

実験1と同様にコントロール区 (Control)、高温ストレス区 (HS) およびE-64を5 μMの濃度で添加した区 (HS + E-64) を設け、体外発生培養後1日目の2～8細胞期の胚を用いて活性型のカテプシンBの局在を調べた。

実験3：

体外発生培養をコントロール区 (Control) では38.5℃、高温ストレス区 (HS) およびE-64を0.1, 0.5および1 μMの濃度で添加した区 (HS + E-64) では培養後1日まで40.0℃でそれ以降は38.5℃で行った。培養後、2日で分割率、8日で胚盤胞形成率および胚盤胞期胚の細胞数を算出した。

実験4：

実験3と同様にコントロール区 (Control)、高温ストレス区 (HS) およびE-64を0.5 μMの濃度で添加した区 (HS + E-64) を設けた。実験2と同様に体外発生培養後1日目の2～8細胞期の胚を用いて活性型のカテプシンBの局在を調べた。

3. 結果と考察

実験1および2では体外受精時の高温ストレスが体外発生能およびカタプシンBに及ぼす影響について調べた。まず実験1の結果から体外受精時に高温ストレスを受けたHS区ではControl区と比較して分割率および胚盤胞の形成率が有意に低下することが明らかとなった (Table 1)。本研究では高温ストレス温度は40.0℃と以前の我々の研究も含め多くの研究で高温ストレス温度として用いられている41.0℃より低い設定であった。それにもかかわらず、顕著な発生低下が認められたことからウシ胚が従来想定されているよりも高温ストレスに対して感受性が高いことが示唆される。一

Table 1 Effect of E-64 on in vitro development of bovine embryos exposed to heat stress during *in vitro* fertilization

Treatment	No. of embryos	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) of blastocysts	Mean no. ± SEM of cells in blastocysts
Control	373	252 (67.6) ^a	42 (16.7) ^a	130.5 ± 5.03 ^{ab}
HS (Heat Stress)	399	170 (44.2) ^c	10 (5.9) ^b	126.2 ± 7.76 ^a
HS + E-64 (1 μM)	288	174 (60.4) ^a	14 (8.0) ^b	137.5 ± 10.45 ^{ab}
HS + E-64 (5 μM)	369	224 (60.7) ^a	41 (18.3) ^a	152.0 ± 8.11 ^b
HS + E-64 (10 μM)	377	194 (51.5) ^b	18 (9.3) ^b	129.0 ± 8.77 ^{ab}

*The percentage is the ratio of blastocysts to cleaved embryos.

^{a-c} Values with different superscripts within same column are significantly different ($P < 0.05$).

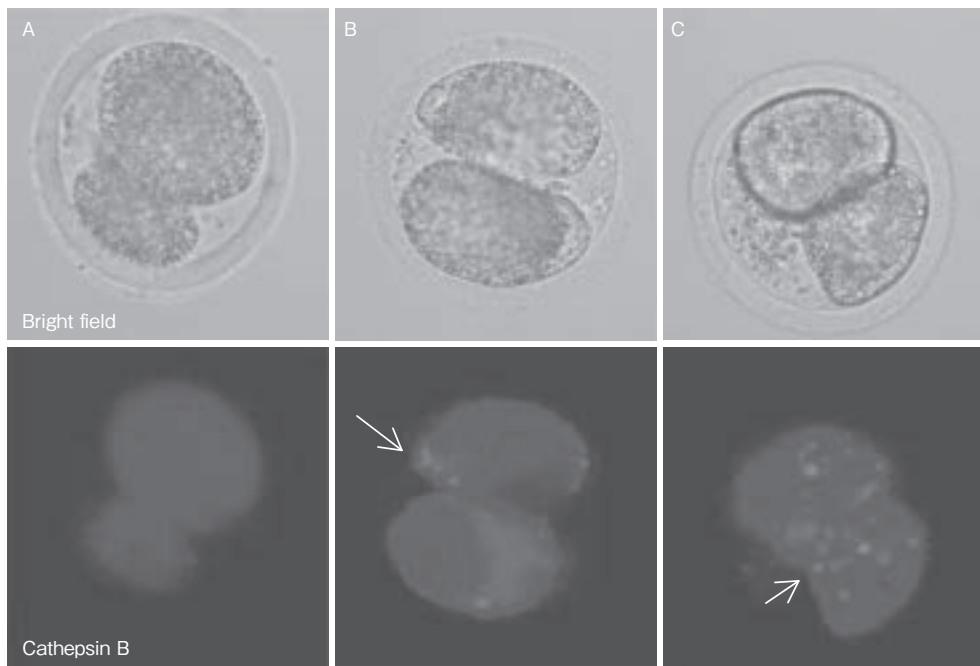


Fig. 1 Micrographs of the active form of Cathepsin B localization in bovine embryos. Intracellular localization of the active form of Cathepsin B was detected as red fluorescent dots (white arrow). The localization of the active form of Cathepsin B was classified into the following three categories: (A), there is no fluorescent dot; (B), several fluorescent dots were partly observed; (C) fluorescent dots were observed throughout cytoplasm.

方、E-64を5 μ M添加した区では高温ストレスを受けても分割率、胚盤胞形成率および胚盤胞期胚の総細胞数がHS区と比較して有意に高く、Control区と同等の成績であった (**Table 1**)。これらの結果は、E-64の添加は体外受精時の高温ストレスを受けた胚の体外発育能を改善するのに有効で、さらに、5 μ Mが最適な添加濃度であるということを示している。また、胚盤胞期胚のアポトーシス陽性細胞の発生率に関しては、Control区、HS区およびHS + E-64 (5 μ M) 区でそれぞれ 11.7 ± 1.0 、 12.6 ± 1.6 および 8.3 ± 1.1 %であり、各区間に有意な差はみられなかった。この理由としては、上述の通り今回の研究で用いた高温ストレス温度が比較的低かったことが考えられるとともに、今後、胚盤胞期より前の発生ステージにおけるアポトーシスの検証が必要と考えられる。また、本実験では前核形成率について調べた

結果、Control区、HS区およびHS + E-64 (5 M) 区でそれぞれ84.0、77.4および82.8%であった。しかしながら、分割率ではHS区で有意な低下がみられたことから、今回設定した受精時の高温ストレス条件では前核形成に影響を及ぼさないが、その後の第一分割までの間に何らかの発生停止を誘起をする機構が働いていることが予想された。一方で、E-64を添加した区においてもControl区と同等の前核形成率が得られたこと、さらに顕微鏡下での観察でも精子の運動性や生存性に対するE-64の悪影響は観察されなかったため、将来的には夏季の受胎率向上のためにE-64の効果を人工授精へ利用できる可能性が示された。

次に実験2では体外受精時の高温ストレスが活性型カテプシンBの細胞質内局在に及ぼす影響についてControl区、HS区、実験1の結果から発生率の高かったHS + E-64 (5 μ M) 区について調

Table 2 Effect of E-64 on the localization of Cathepsin B of bovine embryos exposed to heat stress during *in vitro* fertilization

Treatment	No. of embryo examined	A (%) ^a	B (%)	C (%)
Control	30	16 (53.3) ^a	8 (26.7)	6 (20.0)
HS	36	7 (19.4) ^b	18 (50.0)	11 (30.6)
HS + E-64 (5 μ M)	24	13 (54.2) ^a	7 (29.2)	4 (16.7)

* The localization of the active form of Cathepsin B was classified into the following three categories: (A), there is no fluorescent dot; (B), several fluorescent dots were partly observed; (C) fluorescent dots were observed throughout cytoplasm.

^a, ^b Values with different superscripts within same column are significantly different ($P < 0.05$).

べた。その結果、活性型カテプシンBの局在の違いにより3つのグループ（A：見られない B：細胞質に一部で見られる C：細胞質全体に見られる）に分類することができた（Fig. 1）。この分類に従ってその割合を各区間で比較したところ、HS区では活性型のカテプシンBが細胞質内に見られないAに分類された割合がControl区およびHS + E-64 (5 μ M) 区と比較して有意に低い結果となった（Table 2）。これらのことは体外受精時の高温ストレスが活性型カテプシンBを増加させること、さらに、E-64の添加はそれらを抑制することに有効であることを示している。以上の結果から、体外受精時に高温ストレスを受けたウシ胚における発生能とカテプシンB活性の間には負の相関があることが示された。

実験3および4では体外発生培養中の高温ストレスが体外発生能およびカテプシンBに及ぼす影響について調べた。まず実験3を行う前に体外発生培養のどの時期に高温ストレスを負荷することが有効であるのかについて予備実験を行った。実験区として体外培養後1, 2, 4および6日目まで40.0℃で、その後は通常の38.5℃で培養する区、また、これらとは逆に、培養開始時は38.5℃で培養し、体外培養後1, 2, 4および6日目から40.0℃で培養する区を設け、発生率を比較した。その結果、発生培養開始後1および2日目の発生ステージにある胚は他の発生ステージの胚と比較して高温耐性が有意に低いという結果が得られた

ため、実験3では、体外培養開始後1日目まで40.0℃で培養する条件をHS区とすることとした。その結果、HS区では胚盤胞の形成率がControl区と比較して有意に低かったのに対して、HS + E-64 (0.5 μ M) 区ではControl区と比較すると低い傾向であったが統計的な有意差は認められなかった（Table 3）。一方、HS + E-64 (0.5 μ M) 区はHS区と比較して胚盤胞の形成率が有意に高い結果であった。また、胚盤胞期胚の総細胞に関しては、Control区、HS区およびHS + E-64 (0.5 μ M) 区でそれぞれ 118.8 ± 6.9 , 96.8 ± 12.1 および 109.0 ± 7.2 であり、各区間に有意な差はみられなかった。これらの結果は体外受精時の高温ストレスと同様に体外発生時の高温ストレスに対してもE-64の添加が発生能低下抑制に有効であることを示した。

実験4では、体外発生1日目までの高温ストレスが活性型カテプシンBの細胞質内局在に及ぼす影響について実験2同様にControl区、HS区、実験3の結果から発生率の高かったHS + E-64 (0.5 μ M) 区について調べた。その結果、HS区では活性型のカテプシンBが細胞質内に見られないAに分類された割合がControl区およびHS + E-64 (0.5 μ M) 区と比較して有意に低い結果となった（Table 4）。さらに、活性型のカテプシンBが細胞質全体に見られるCと分類された割合がHS区で他の区と比較して有意に高い結果であった。これらの結果は、実験2と同様に体外発生時の高温

Table 3 Effect of E-64 on *in vitro* development of bovine embryos exposed to heat stress after fertilization

Treatment	No. of embryos	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) * of blastocysts
Control	130	82 (63.1)	18 (22.0) ^a
HS(Heat Stress)	132	80 (60.6)	2 (2.5) ^b
HS + E-64 (0.1 μ M)	125	78 (62.4)	3 (3.8) ^{bc}
HS + E-64 (0.5 μ M)	128	77 (60.2)	9 (11.7) ^{ac}
HS + E-64 (1 μ M)	118	81 (68.6)	7 (8.6) ^{bc}

*The percentage is the ratio of blastocysts to cleaved embryos.

^{a - c} Values with different superscripts within same column are significantly different ($P < 0.05$).

Table 4 Effect of E-64 on the localization of Cathepsin B of bovine embryos exposed to heat stress after fertilization

Treatment	No. of embryo examined	A (%)*	B (%)	C (%)
Control	44	28 (63.6) ^a	13 (29.5)	3 (6.8) ^a
HS	36	13 (36.1) ^b	12 (33.3)	10 (28.6) ^b
HS + E-64 (0.5 μ M)	42	26 (61.9) ^a	12 (28.6)	4 (9.5) ^a

*The localization of the active form of Cathepsin B was classified into the following three categories: (A), there is no fluorescent dot; (B), several fluorescent dots were partly observed; (C) fluorescent dots were observed throughout cytoplasm.

^{a, b} Values with different superscripts within same column are significantly different ($P < 0.05$).

ストレスによっても活性型カテプシンBが増加することを示しており、実験3の結果と併せることでカテプシンBと発生率との間に負の相関があることを示唆している。

カテプシンBはリソソームの細胞内組織タンパク質の分解に重要な役割を果たしており、細胞内の不要なタンパク質の分解・再構成を行っている。しかしながら、ストレスや環境の影響等によりリソソームから漏出することで組織細胞の機能阻害やアポトーシスを引き起こすことが知られている³⁾。我々は近年、体外成熟過程における高温ストレスが卵丘細胞と卵母細胞の両方においてカテプシンB活性を増加させること、さらに、受精後の胚発生能が低下することを報告している⁴⁾。したがって、これらの知見と今回の結果から、卵成熟、受精および初期胚発生過程を通じて高温ストレスによってカテプシンB活性が異常に誘起され、不必要なタンパク質分解が起こり、最終的に発生能や胚の品質低下が引き起こされている可能性が示唆された。また、これらの活性を人為的に

抑制することで、胚の発生能低下を回避することができるとも示された。

以上、高温ストレスを受けたウシ胚における発生能とカテプシンB活性の間には負の相関があり、カテプシンB阻害剤E-64の添加によって胚の発生能低下を改善できると考えられる。また今回は、カテプシンBの活性のみに注目して実験を行ったが、高温ストレスによる胚の発生率の低下には細胞質内で活性酸素種が関与することも報告されており⁵⁾、今後、リソソーム酵素の活性とこれらとの関係についてさらなる研究が必要であると考えられる。

4. 要 約

本研究では、夏季の受胎率低下の解決法への応用を目的として、ウシ体外受精および体外発生時における高温ストレスが卵母細胞および受精胚の発生能と負に相関があることが報告されているカテプシンB活性と体外発生能に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。体外受精時ま

たは体外発生時に高温ストレス（40.0℃）を付加した結果、いずれの場合でも体外発生率はコントロール区と比較して有意に低下した。さらに、細胞質内の活性型カテプシンBの局在を観察した結果、高温ストレスを受けた胚で活性型のカテプシンBが増加することが明らかとなった。一方、カテプシンBの阻害剤であるE-64を添加した場合、高温ストレスを負荷された胚の体外発生率がコントロールと同等にまで改善された。さらに、E-64の添加により活性型カテプシンBの増加も抑制できることが確認された。以上の結果から、高温ストレスを受けたウシ胚における発生能とカテプシンB活性の間には負の相関があり、その活性を制御することによって胚の発生能を改善できることが明らかとなった。

文 献

- 1) Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani, Hegab AE, Zaabel S, Takahashi M : *Molecular Reproduction and Development*, **77**, 439~448, 2010.
- 2) Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Hegab AE, Zaabel S, Takahashi M : *Molecular Reproduction and Development*, **77**, 1031~1039, 2010.
- 3) Vancompernelle K, Van Herreweghe F, Pynaert G, Van de Craen M, De Vos K, Totty N, Sterling A, Fiers W, Vandenabeele P, Grooten J : *FEBS Letters*, **438**, 150~158 1998.
- 4) Balboula AZ, Yamanaka K, Sakatani M, Kawahara M, Hegab AE, Zaabel S, Takahashi M : *Reproduction*, **146**, 407~417, 2013.
- 5) Sakatani M, Kobayashi S, Takahashi M : *Molecular Reproduction and Development*, **67**, 77~82, 2004.

牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリンの改善方法の開発

Effects of functional components in grass on enhancing immunoglobulin in colostrum

久 米 新 一・王 蒙 東・谷 口 康 晴
(京都大学大学院農学研究科)

Shinichi Kume, Mengdong Wang and Yasuharu Taniguchi
(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

Passive immunity is critical to the survival and health of neonates, and colostrum is a source of nutrients and immune components for neonatal calves. An adequate immune system is required to prevent diarrhea in neonates, and colostral IgG and IgA of cows provides protection against microbial antigens. Although β -carotene supplementation has been enhanced the retinoic acid-mediated immune response in neonates, the exact mechanism of β -cryptoxanthin or astaxanthin for enhancing mucosal IgA production in the small intestine and mammary glands is still unclear. The present study was conducted to clarify the effects of supplemental β -cryptoxanthin or astaxanthin in maternal mice during pregnancy and lactation on IgA antibody-secreting cells (ASC) and mucosal IgA induction in the intestine and mammary glands of lactating mice, and to clarify the relationships between fat-soluble vitamins and IgG or IgA concentrations in colostrum of Japanese Black cows. Because supplemental β -cryptoxanthin increased the numbers of IgA ASC in the jejunum and the mRNA expressions of IgA C-region in the jejunum, ileum and mammary glands of maternal mice at 14 days postpartum, supplemental β -cryptoxanthin may be useful for enhancing mucosal immune induction in lactating animals. The concentrations of IgG, IgA, β -carotene, vitamin A and vitamin E in colostrum of Japanese Black cows varied widely. There were positive correlations among fat-soluble vitamins in colostrum, and there was a positive correlation between vitamin A and IgG in colostrum. These results suggest that the improvement of vitamin status in Japanese Black cows is effective to increase colostral IgG concentration.

1. 目 的

わが国の肉用牛経営では規模拡大や生産性向上が急速に進んでいるものの、下痢などによる子牛の損耗増加は黒毛和種繁殖経営に多大な経済的損失をもたらしている。代表研究者らは、農林水産省の実用技術開発事業で「ホエー代用乳を用いた

近畿産ブランド和牛のほ乳期発育改善」を実施し、黒毛和種子牛の発育改善と疾病予防に適した新たな人工哺乳技術を開発した。しかし、黒毛和種子牛には初乳由来の免疫グロブリンG (IgG) と免疫グロブリンA (IgA) が不足して、下痢の発生するケースが多数認められたため、母乳からの免疫成分の移行を高める方法を開発して、下痢

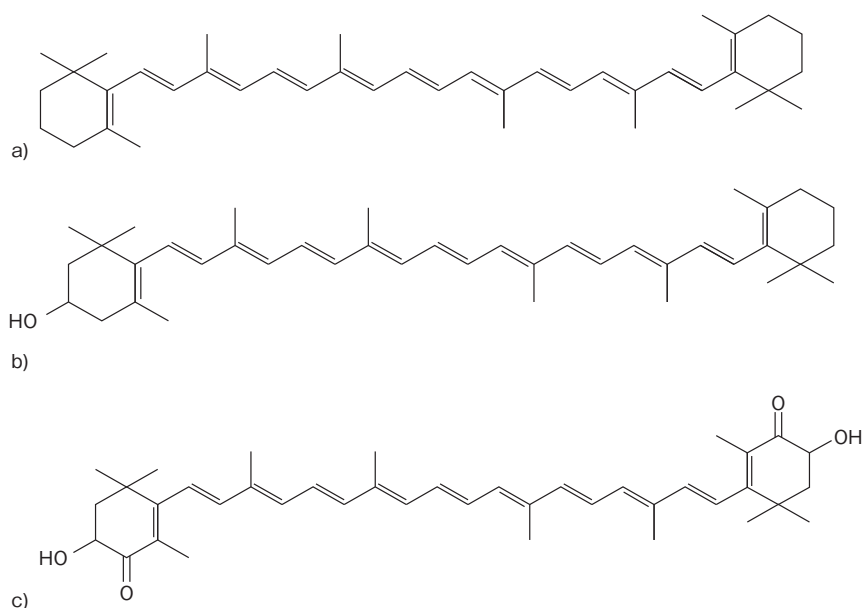


Fig. 1 The structural formulas of β -carotene (a), β -cryptoxanthin (b) and astaxanthin (c).

などの疾病を予防することが重要と考えられた。

飼料中には栄養素だけでなく、家畜の生理機能や免疫機能を高める機能性成分が含まれているため、子牛の下痢予防では飼料中の機能性成分を活用することが効果的である。特に、安全・安心な牛肉生産では抗生物質などの使用量低減が求められるが、機能性成分を活用した下痢などの疾病予防方法の開発は抗生物質の使用量低減を可能にする。また、草食動物である牛は牧草中に豊富に含まれている β -カロテンやビタミンEなどを有効利用して健康を維持しているが、代表研究者らは β -カロテンによる新生子牛の下痢予防効果を見いだした¹⁾。しかし、黒毛和種繁殖牛に良質の牧草が給与されない場合には初乳中の β -カロテンなどが不足して、子牛の下痢発生率を高めることが危惧された。

一方、黒毛和種繁殖牛の初乳中に豊富に含まれている免疫成分はIgGであるが、IgAは子牛の小腸粘膜を保護して病原菌や有害微生物の腸管からの侵入を防ぐため、新生子牛の下痢予防では初乳

中のIgGだけでなく、IgAを増やすことも重要である。しかし、IgGに比較すると、黒毛和種繁殖牛のIgAに関する研究は非常に少ないため、代表研究者らは母乳中のIgA産生における機能性成分の作用機序を詳細に解明するとともに、初乳中のIgGとIgAを同時に高める機能性成分の給与法を開発して、新生子牛の下痢などの疾病を予防することが必要と考えている。

そこで、本研究ではまず妊娠・泌乳マウスを実験モデルとして利用し、それらのマウスに機能性成分を給与して、母乳中のIgA産生の作用機序を詳細に解明するとともに、機能性成分による母乳中のIgGとIgAの改善効果を明らかにする。なお、本研究では β -カロテンと同様な効果が期待されている β -クリプトキサンチンとアスタキサンチンを機能性成分として利用し、 β -カロテンによる疾病予防効果と比較した (Fig. 1)。次に、黒毛和種繁殖牛の初乳を採取して、初乳中のIgG、IgA、 β -カロテン、ビタミンAとビタミンE含量を調べ、初乳中の機能性成分 (β -カロテン、ビ

タミンAとビタミンE)と免疫グロブリン(IgGとIgA)との相関関係などを明らかにして、黒毛和種繁殖牛への機能性成分給与法の開発のための基礎データを得る。

2. 方 法

2.1 β -クリプトキサンチンとアスタキサンチンの給与試験

試験は妊娠マウス(β -クリプトキサンチン給与試験:30匹,アスタキサンチン給与試験:17匹)を機能性成分区と対照区に割り当て、機能性成分区では交配後6.5日目から分娩後14日目まで機能性成分を給与した。なお、この試験ではNishiyamaらの方法^{2,3)}と同様に、胃内容物のIgAを乳由来のIgAとした。

β -クリプトキサンチンは飼料中に50ppm添加して妊娠マウスに給与し、分娩7日後と14日後に泌乳マウスとその仔マウスを安楽死させた。なお、仔マウスは分娩2日後に雌雄各5匹ずつに間引きした。また、アスタキサンチンは飼料中に120ppm添加して妊娠マウスに給与し、分娩14日後に泌乳マウスとその仔マウスを安楽死させた。なお、仔マウスは分娩7日後に雌雄各5匹ずつに間引きした。

妊娠マウスと新生仔マウスの体重と飼料摂取量は毎日測定し、安楽死後に泌乳マウスからは血清、小腸(空腸および回腸)および乳腺を、また新生仔マウスからは血清、胃内容物、小腸および糞を採取した。血清、胃内容物、小腸および糞のIgA濃度とIgG濃度はELISA法で、小腸と乳腺のIgA産生細胞数の計測は免疫染色法で、小腸と乳腺のIgA産生に関連する遺伝子の発現(IgA C-region)はRT-PCR法で調べた。得られたデータはSASのGLMプロシジャを用いて解析した。

2.2 黒毛和種繁殖牛の初乳中免疫グロブリンと機能性成分の関係の解明

京都大学附属牧場で飼養している黒毛和種繁殖牛9頭(平均産次:4.1産,平均妊娠期間:286日)から分娩直後に初乳を約100g採取して、初乳中のIgG, IgA, β -カロテン, ビタミンAおよびビタミンE含量を測定し、初乳中の機能性成分(β -カロテン, ビタミンAとビタミンE)と免疫グロブリン(IgGとIgA)の相関関係などを調べた。また、分娩前の母牛には日本飼養標準の繁殖牛のTDN要求量を満たすように、フスマとイタリアンライグラスサイレージを給与した。

黒毛和種繁殖牛の分娩前後の体重の変動と健康状態、その子牛の分娩時の体重と事故・疾病などの発生状況を調査した。初乳中のIgG含量とIgA含量はELISA法で、また初乳中の β -カロテン, ビタミンAとビタミンE含量は高速液体クロマトグラフ法で測定した。

3. 結果と考察

3.1 免疫グロブリン産生における機能性成分の作用機序の解明

泌乳マウスの増体率および飼料摂取量と新生仔マウスの増体率には β -クリプトキサンチン給与による影響は認められなかった。 β -クリプトキサンチン給与で泌乳マウスの分娩14日後の空腸のIgA産生細胞数が増加した($P<0.05$)が、乳腺および回腸のIgA産生細胞数には β -クリプトキサンチン給与による影響は認められなかった(Fig.2)。また、新生仔マウスの血清、胃内容物、小腸および糞のIgA濃度には β -クリプトキサンチン給与による影響は認められなかった(Fig.3)が、 β -クリプトキサンチン給与で分娩14日後における乳腺、空腸および回腸のIgAのmRNA発現量が有意に増加した。

泌乳マウスの増体率および飼料摂取量と新生仔マウスの増体率は、アスタキサンチン給与による影響は認められなかった。2週齢の新生仔マウス

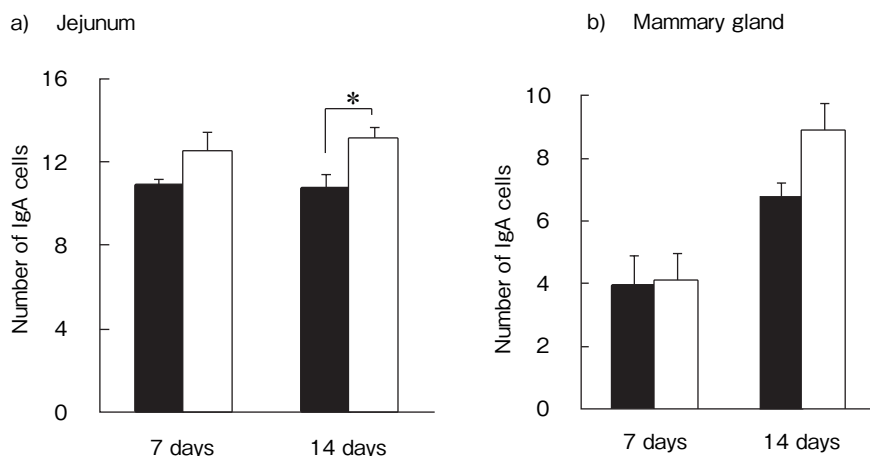


Fig. 2 The numbers of IgA antibody-secreting cells (ASC) in the jejunum and mammary glands of maternal mice of the control (■) and β -cryptoxanthin (□) groups after 7 and 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE). * $P < 0.05$.

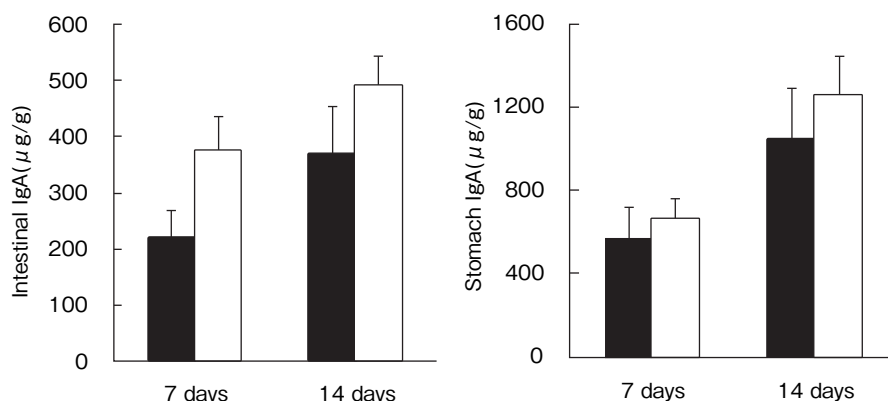


Fig. 3 IgA concentration in small intestine and stomach contents of neonatal mice of the control (■) and β -cryptoxanthin (□) groups after 7 and 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE).

の血清中IgA濃度とIgG濃度は1週齢よりも増加し ($P < 0.001$), またアスタキサンチン給与によって2週齢の新生仔マウスの血清中IgA濃度が増加した ($P < 0.10$) (Table 1)。アスタキサンチン給与によって母体の乳腺におけるIgA産生細胞数が増加した ($P < 0.10$) が, 空腸および回腸のIgA産生細胞数にはアスタキサンチン給与による影響は認められなかった。

β -クリプトキサンチンとアスタキサンチンは β -カロテンと同様にカロテノイドに分類され, 野菜, 果物, 水産物などに含まれていることから,

β -カロテンが不足した場合にはこれらを代替品として利用することが可能である。代表研究者らは泌乳マウスに β -カロテンを給与したところ, 回腸の腸管関連リンパ組織におけるIgA産生細胞数が増加し, 乳腺のIgA産生細胞数と乳中へのIgA分泌量が増加した^{2,3)}ことから, β -カロテンには腸管免疫改善効果のあることが認められた。さらに, β -カロテンは小腸のレチノイン酸受容体を介して小腸のIgA産生細胞数と腸管からのIgAの分泌を増やしたことから, β -カロテンによる腸管免疫改善効果はレチノイン酸を介した効果

Table 1 IgG and IgA concentrations ($\mu\text{g/g}$) in serum of maternal and neonatal mice of the control and astaxanthin groups after 7 and 14 days postpartum (Mean $\pm$ SE).

	Days	Control	Astaxanthin	P
Mother				
Serum IgG	14	651 $\pm$ 186	752 $\pm$ 197	NS
Serum IgA	14	734 $\pm$ 186	916 $\pm$ 198	NS
Neonate				
Serum IgG	7	402 $\pm$ 43	319 $\pm$ 43	NS
	14	730 $\pm$ 95	522 $\pm$ 105	NS
Serum IgA	7	0.5 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	NS
	14	2.5 $\pm$ 0.4	3.5 $\pm$ 0.4	†

† $P < 0.10$, NS, not significant.**Table 2** Correlations between IgG, IgA and fat-soluble vitamins in colostrum of Japanese Black cows ($n = 9$).

	Mean	SD	Min.	Max.	r	
					IgG	IgA
Age, months	63.4	20.0	34.0	110.6	0.51	0.04
Gestation length, days	286.4	5.4	277	294	0.39	0.49
Calf birth weight, kg	33.6	3.2	28.0	39.0	0.71*	0.68*
Colostrum						
β -carotene, $\mu\text{g/dl}$	132.8	54.0	40.0	206.7	0.55	-0.06
Vitamin A, $\mu\text{g/dl}$	409.7	245.1	69.0	849.0	0.67*	0.07
α -tocopherol, $\mu\text{g/dl}$	711.3	324.5	117.0	1129.0	0.64	0.11
IgA, mg/ml	8.8	9.6	1.3	25.6	0.62	—
IgG, mg/ml	128.7	37.7	64.9	168.8	—	—

* $P < 0.05$

であることが推察された⁴⁾。

本研究の結果からは、 β -クリプトキサンチンを泌乳マウスに給与すると乳中へのIgA分泌量への効果は明らかでなかったものの、泌乳後期における空腸のIgA産生細胞数と乳腺、空腸および回腸のIgAのmRNA発現量を増加させたことから、 β -クリプトキサンチンには β -カロテンと類似した腸管免疫改善効果があると考えられた。わが国では β -クリプトキサンチンはみかんに豊富に含まれているため、ミカンジュース粕などの利用によって牛の腸管免疫の改善が期待できる。また、アスタキサンチンも乳を介してIgAをやや移行させる効果のあることが推察された。

3.2 初乳中免疫グロブリンと機能性成分の関係の解明

黒毛和種繁殖牛の初乳中IgG, IgA, β -カロテン, ビタミンAおよびビタミンE含量の平均値 $\pm$ 標準誤差は、それぞれ128.8 $\pm$ 37.7mg/mL, 8.8 $\pm$ 9.6mg/mL, 133 $\pm$ 54 $\mu\text{g/mL}$, 410 $\pm$ 25 $\mu\text{g/mL}$ および711 $\pm$ 324 $\mu\text{g/mL}$ であり、変動が大きかった(Table2)。黒毛和種繁殖牛の初乳中 β -カロテンとビタミンA ($P < 0.05$), β -カロテンとビタミンE ($P < 0.01$) およびビタミンAとビタミンE ($P < 0.05$) 間にはそれぞれ正の相関が認められ、また初乳中のビタミンAとIgG間にも正の相関 ($P < 0.05$) が認められた。しかし、初乳中の脂溶性ビタミン

とIgA間には有意な相関関係は認められなかった。

黒毛和種繁殖牛の初乳中の平均IgG含量(123mg/mL)と比較すると、平均IgA含量は4.15mg/mLと非常に低いことが報告されている⁵⁾が、本試験でもほぼ近似した値であった。しかし、初乳中IgGとIgA含量は変動が非常に大きかったため、低レベルのIgGとIgA含量の初乳を給与している場合には市販されている初乳製剤などを補給することが必要と考えられた。

一方、本研究では初乳中のビタミンAとIgG間に正の相関が認められたことから、黒毛和種繁殖牛のビタミン栄養を改善できると初乳中IgG含量の増加することが示唆された。しかし、本研究では初乳のサンプル数が少ないので、今後は例数を増やして乳中への免疫グロブリンと脂溶性ビタミンの移行のメカニズムをさらに検討することが必要である。

4. 要 約

初乳中のIgGとIgAを同時に高める機能性成分の給与法を開発するために、泌乳マウスに β -クリプトキサンチンとアスタキサンチンを給与して母乳中のIgA産生の作用機序を解明するとともに、黒毛和種繁殖牛の初乳中の脂溶性ビタミンと免疫グロブリンの関係を調べた。その結果、

(1) β -クリプトキサンチン給与で空腸のIgA産生細胞数と乳腺、空腸および回腸のIgAのmRNA発現量が増加したことから、 β -クリプトキサンチンには β -カロテンと類似した腸管免疫改善効果がある。

(2) 黒毛和種繁殖牛の初乳中IgG、IgA、 β -カロテン、ビタミンAおよびビタミンE含量は変動が非常に大きかったが、黒毛和種繁殖牛の初乳中脂溶性ビタミン含量間に正の有意な相関が認められただけでなく、初乳中ビタミンAとIgG間にも正の有意な相関が認められたため、繁殖牛のビタミン栄養を改善できると初乳中IgG含量の増加することが示唆された。

文 献

- 1) Kume S, Toharmat T. : *Livestock Production Science*, **68**, 61~65. 2001.
- 2) Nishiyama Y, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. : *British Journal of Nutrition*, **105**, 24~30. 2011.
- 3) Nishiyama Y, Yasumatsuya K, Kasai K, Sakase M, Nishino O, Akaike M, Nagase T, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. : *Livestock Science*, **137**, 95~100. 2011.
- 4) Nishida K, Sugimoto M, Ikeda S, Kume S. : *British Journal of Nutrition*, **111**, 247~253. 2014.
- 5) Ishikawa H, Serizawa S, Ahiko K, Asai Y, Seike N. : *Animal Science and Technology (Japan)*, **63**, 1153~1156. 1992.

乳肉および反芻家畜体内の抗酸化能を高めうる 新飼料の機能評価

Evaluation of a new functional feed to possibly enhance anti-oxidant
activity of milk, meat and other tissues of ruminant

小 林 泰 男

(北海道大学大学院農学研究院)

Yasuo Kobayashi

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Possible improvement of antioxidant ability of cattle was assessed by feeding cashew nut shell liquid (CNSL) that contains antioxidative phenolics such as anacardic acid. Antioxidant ability was evaluated by superoxide dismutase (SOD) and diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) scavenging activities and also formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). No clear response to CNSL feeding was observed for antioxidant activity of rumen fluid, blood serum, milk and feces of Holstein milking cows. Rumen microbiota and fermentation did not change significantly. Anacardic acid was detected in the rumen at much lower level than other phenolics (cardanol and cardol), suggesting decarboxylation of anacardic acid into cardanol that is much less antioxidative and bactericidal. Thai native cattle and swamp buffaloes showed clear response to CNSL feeding with increased DPPH scavenging activity and decreased formation of TBARS in rumen fluid and blood serum. Rumen bacterial flora apparently changed with CNSL feeding toward higher abundance of *Ruminobacter amylophilus* and *Succinivibrio dextrinosolvens* that are known to be antioxidative. Anacardic acid was detected in the rumen at the level reasonably high enough for exertion of antioxidative and antibacterial actions. From these, it is assumed that CNSL feeding to cattle could improve antioxidant ability when functional anacardic acid is stably present in the rumen. This favorable action is probably accounted for antioxidative property of anacardic acid itself and changes of rumen microbiota and fermentation toward the formation of antioxidative compounds. CNSL would be a functional feed material for reduction of oxidative stress, prevention of metabolic disorder, and even maintenance of animal productivity, if the main phenolic anacardic acid stably functions through the gastro-intestinal tract of cattle.

1. 目 的

近年の夏季の酷暑や多頭高密度飼育といった環境要因で家畜体にストレスがかかり、体内で活性酸素が蓄積することで家畜生産のみならず繁殖成

績においても低下がひきおこされている。この軽減をねらい、飼料経由で抗酸化物質を家畜体内に送り込む手段に注目があつまっている。近年では、ポリフェノール類、特定のオリゴ糖などの抗酸化活性に着目し、家畜に給与することで血液や

生産物の抗酸化活性をひきあげることに成功例がある(Aoki *et al.*, 2010, 2013; Zhong *et al.*, 2012)^{1~3)}。ただし量的確保や製造コストの面で課題も多い。

カシュー殻液 (CNSL) は、カシューナッツ生産の副産物として大量に排出される種実殻の圧搾汁であり、選択的な菌生育阻害作用を有している。この作用をウシなどの反芻家畜に転用し（飼料に混合給与することで）ルーメン菌叢や発酵様式を変え、温暖化ガスとして知られるメタンの低減（20~30%）を導くことが可能なことが報告されている（Watanabe *et al.*, 2010; Shinkai *et al.*, 2012)^{4~5)}。すでに日本国内で「飼料」として認可されているが、カシュー殻液の主成分であるフェノール類（アナカルド酸、カルドールおよびカルダノール）は抗酸化活性を有することが知られている（Trevisan *et al.*, 2006)⁶⁾。したがって、CNSLを給与することで、メタンを低減させ地球環境保全に貢献する一方で、家畜の抗酸化能を改善し健康向上に資するというもうひとつの効果が期待できる可能性がある。

本研究は、ウシにCNSL製剤を給与し、体液中の抗酸化活性への影響を評価するものである。CNSL給与有無の条件下で、定期的にルーメン液や血液試料を採取し、これらの抗酸化活性の変動を複数の手法でモニタリングし、活性値を比べることで、CNSL給与によりウシ体内で抗酸化能の向上がはかれるのか否かについて検討することを主目的とした。ただし、家畜体内で抗酸化活性の上昇があった場合、その理由説明（メカニズムの明示）が必要となる。そのため、CNSLの抗酸化成分であるアナカルド酸、カルドールおよびカルダノールの存在量を定量し、消化管での消長を把握することとした。これにより、家畜体内の抗酸化活性の向上が、①抗酸化成分の直接的な影響か、②消化管微生物や発酵様式の変化を介した間接的な影響か、③あるいはその双方によるもの

か、について検討を試みることにし、この作用機序の把握を2つ目の目的とした。

2. 方 法

2.1 実験1：ホルスタイン種泌乳牛への給与試験

4頭のホルスタイン種泌乳牛（ 612 ± 54 kg）を供試動物として用いた。これらにはTMR（配合飼料、グラスサイレージ、コーンサイレージ、アルファルファヘイキューブ、ビートパルプ）を給与し、CNSLの給与には22%CNSL製剤を用いた。TMRとCNSL製剤は混合し、朝夕の2回に分けて給与した。4頭を2グループに分け、片方は対照期（19日間）→CNSL給与期（19日間）の順序で飼養し、他方はその逆であった。各々最初の2週間を馴致期、そのあとの5日間を本試験期とした。ルーメン液、血液、乳および糞便のサンプルを採取し、抗酸化能の指標としてSOD（スーパーオキシド消去能）、DPPHラジカル消去活性能、TBARS（過酸化脂質生成能）の測定を行った。あわせて、ルーメン液、乳および糞便に存在するCNSL含有フェノール成分の濃度をHPLCにて測定した。

2.2 実験2：タイ在来牛及び沼沢水牛への給与試験

ルーメンカニューレを装着したタイ在来牛4頭（平均体重 412 ± 20 kg）および沼沢水牛4頭（平均体重 491 ± 44 kg）を供試した。キャッサバ、とうもろこし、大豆粕を主原料とする濃厚飼料を毎朝8時に定量給与（1日1頭当たり1kg）し、粗飼料として稲わらを自由採食量の90%レベルで給与した。なお、自由採食量はあらかじめ計測した値に基づいた。試験期間は6週間とし、最初の2週間を対照期、次の4週間をCNSL給与期とした。対照期にはCNSLを含まない空製剤を、CNSL給与期には、CNSL製剤（CNSL22%含有）をCNSL

が原物給与換算で4 g/100kg体重/日となるように給与した。適時ルーメン液と血液のサンプリングを行った。実験1と同様の方法で抗酸化活性ならびにフェノール成分を測定した。対照期とCNSL給与期のルーメン液からDNAを抽出し、真正細菌の16S rRNA遺伝子とメタン生成古細菌のmcrA遺伝子を標的とするクローンライブラリを作成・解析し、ルーメン菌叢構成員について調べた。

3. 結果と考察

泌乳牛各種サンプルの抗酸化活性において、いずれもCNSL給与の影響は明確ではなかった。CNSL含有のフェノール成分は、対照期のルーメン液や糞便では当然ながら検出されず、一方CNSL給与期ではカルダノールとカルドールの含量が高く、本来の主成分であるアナカルド酸の含量は低かった。乳からはこれらフェノール成分は検出されなかった(検出下限0.1ppm以下)。なお、ルーメン発酵や菌叢の変化も、これまでの報告(Watanabe *et al.*, 2010; Shinkai *et al.*, 2012)^{4, 5)}から予想されるものに反し、極めて小さかった

(いずれもデータ示さず)。CNSLにはアナカルド酸、カルダノール、カルドールが各60%、10%、20%の含有率で存在している(Paramashivappa *et al.*, 2001)⁷⁾。この値と比べ、本試験牛のルーメン内のアナカルド酸比率(約15%)ははるかに低い。おそらく特定のルーメン微生物がアナカルド酸を脱炭酸し、カルダノールに転換していると思われる。つまり本試験で期待された抗酸化能の向上や菌叢の変化がみられなかったのは、CNSLに含まれる主要フェノール成分であるアナカルド酸(抗酸化活性ならびに菌選抜効果がとりわけ高い)(Trevisan *et al.*, 2006; Watanabe *et al.*, 2010)^{4, 6)}がルーメンで脱炭酸され、その効力が低下したことによると推察された。

タイ在来牛及び沼沢水牛では、CNSL給与によってルーメン液および血清の抗酸化活性が向上した(DPPHフリーラジカル消去能の増加と過酸化脂質の減少, Fig. 1 およびFig. 2; 増減が明確でないSODについてはデータ示さず)。いずれもCNSL給与4週目よりも2週目で明確である傾向にあった。さらにルーメン細菌叢や発酵パターンは大きく変化した。すなわち、ルーメン内のプロ

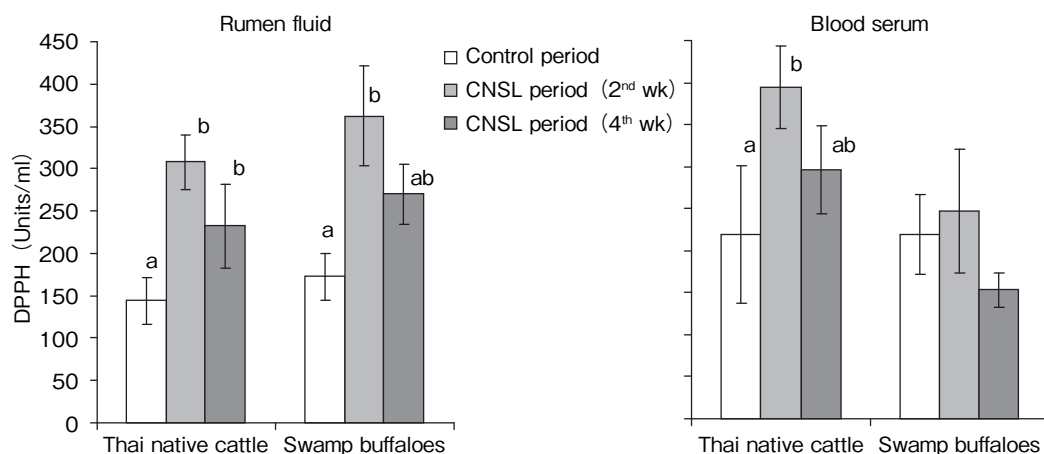


Fig. 1 Effect of cashew nut shell liquid (CNSL) feeding on diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) scavenging activity in rumen fluid and blood serum of Thai native cattle and swamp buffaloes
a, b: Different letter shows statistical significance ($P < 0.05$).

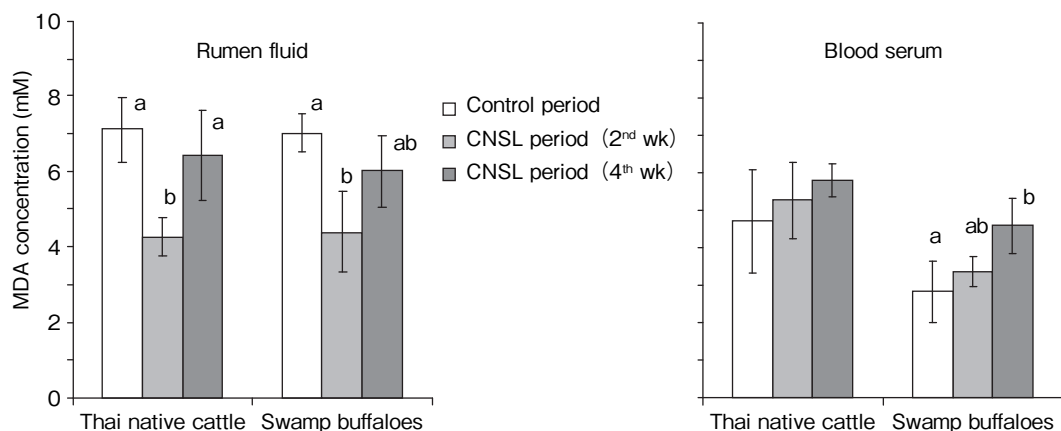


Fig. 2 Effect of cashew nut shell liquid (CNSL) feeding on formation of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in rumen fluid and blood serum of Thai native cattle and swamp buffaloes
a, b: Different letter shows statistical significance ($P < 0.05$).

ピオン酸増加や抗酸化能を持つことが知られている *Succinivibrio dextrinosolvens* や *Ruminobacter amylophilus* (Fulghum and Worthington, 1984)⁸⁾ がCNSL給与期に増加した。菌叢を分類門別にみると変化はより顕著で、タイ在来牛および沼沢水牛とも、CNSL給与により *Firmicutes* が増え (39.3 ~ 40.5% → 61.6 ~ 70.7%), *Bacteroidetes* が減少した (47.6 ~ 49.4 → 21.2 ~ 25.3%)。またCNSL中のフェノール成分においては、カルダノールとカルドールの合計量は1.0~1.1ppmとわずかであり、アナカルド酸がルーメン内で安定的に存在していた (4.6~5.1ppm)。つまり抗酸化および菌選抜効果の主体であるアナカルド酸はタイ在来牛および沼沢水牛の消化管内では、ホルスタイン種泌乳牛で見られたような脱炭酸はおこらず、本来の機能が発揮されたと推察できた。

以上のことから、CNSL含有の抗酸化フェノール成分の主体であるアナカルド酸が分解・修飾をうけず家畜体内に存在すれば、その直接的な抗酸化活性が期待できることに加え、アナカルド酸による消化管内菌叢と発酵の変化にともなう間接的な抗酸化活性向上も期待できることが示唆された。とくに本課題研究の実験2の成果は、上記2

つの要因が複合的に作用して、体液の抗酸化活性向上を導いたことを示唆するものと考えられる。

4. 要 約

抗酸化活性を有するフェノール成分を含むカシューナッツ殻液 (CNSL) をウシに給与し、ウシの抗酸化活性が向上するかについて検討した。ホルスタイン種泌乳牛へのCNSL給与試験では、ルーメン液、血清、乳および糞便の抗酸化活性向上は見られなかった。その際、ルーメン液のフェノール成分はカルドールとカルダノールの割合が高く、最も抗酸化活性の高いアナカルド酸の割合が低かった。さらにルーメン細菌叢の変動も少なかった。このことからこれらのウシのルーメン内でアナカルド酸の脱炭酸が生じ、菌選抜能や抗酸化能が低下していることが推察された。タイ在来牛および沼沢水牛への給与試験では、ルーメン液と血清の抗酸化活性が明確に向上した。ルーメン内細菌叢をクローンライブラリ解析によって調べたところ、真正細菌叢はCNSL給与により有意に変化した。また抗酸化活性を持つとされているルーメン細菌 (*Ruminobacter amylophilus* および *Succinivibrio dextrinosolvens*) が増加していた。

その時、ルーメン内のフェノール成分、特にアナカルド酸は比較的安定に存在していた。これらのことから、CNSLをウシに給与し、CNSL含有の抗酸化・菌選抜効果の高いアナカルド酸が安定的に機能した場合、ウシの抗酸化活性を向上させることが明らかになった。さらにこのメカニズムには、CNSL含有フェノール成分自体の抗酸化能に加えて、ルーメン細菌叢の変化が関わっていることが考えられた。抗酸化活性は酸化ストレスの軽減、疾病の予防、家畜の生産性の維持などの観点から非常に重要な働きであるため、ウシにとってCNSLはその機能性フェノール成分が消化管内で分解や転換を受けないならば、有益な飼料添加物となりうることが示唆された。

文 献

- 1) Aoki, N., Furukawa, S., Sato, K., Kurokawa, Y., Kanda, S., Takahashi, Y., Mitsuzumi, H., Itabashi, H. : Supplementation of the diet of dairy cows with trehalose results in milk with low lipid peroxide and high antioxidant content. *Journal of Dairy Science*. **93**, 4189~4195. 2010.
- 2) Aoki, N., Sato, K., Kanda, S., Mukai, K., Obara, Y., Itabashi, H. : Time course of changes in antioxidant activity of milk from dairy cows fed a trehalose-supplemented diet. *Animal Science Journal*. **84**, 42~47. 2013.
- 3) Zhong, R. Z., Yu, M., Liu, H. W., Sun, H. X., Cao, Y., Zhou, D. W. : Effect of dietary Astragalus polysaccharide and Astragalus membranaceus root supplementation on growth performance, rumen fermentation, immune responses, and antioxidant status of lambs. *Animal Feed Science and Technology*. **174**, 60~67. 2012.
- 4) Watanabe, Y., Suzuki, R., Koike, S., Nagashima, K., Mochizuki, M., Forster, R. J., Kobayashi, Y. : In vitro evaluation of cashew nut shell liquid as a methane-inhibiting and propionate-enhancing agent for ruminants. *Journal of Dairy Science*. **93**, 5258~5267. 2010.
- 5) Shinkai, T., Enishi, O., Mitsumori, M., Higuchi, K., Kobayashi, Y., Takenaka, A., Nagashima, K., Mochizuki, M., Kobayashi, Y. : Mitigation of methane production from cattle by feeding cashew nut shell liquid. *Journal of Dairy Science*. **95**, 5308~5316. 2012.
- 6) Trevisan, M. T. S., Pfundstein, B., Haubner, R., Wurtele, G., Spiegelhalter, B., Bartsch, H., Owen, R. W. : Characterization of alkyl phenols in cashew (*Anacardium occidentale*) products and assay of their antioxidant capacity. *Food and Chemical Toxicology*. **44**, 188~197. 2006.
- 7) Paramashivappa, R., Kumar, P. P., Vithayathil, P. J., Srinivasa, A. R. : Novel method for isolation of major phenolic constituents from cashew (*Anacardium occidentale* L.) nut shell liquid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. **49**, 2548~2551. 2001.
- 8) Fulghum, R. S., Worthington, J. M. : Superoxide dismutase in ruminal bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. **48**, 675~677. 1984.

食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法 確立のための基礎研究

Basic study for the establishment of the method to increase
carnosine-related dipeptide levels in meats

友 永 省 三

(京都大学大学院農学研究科)

Shozo Tomonaga

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

We evaluated three analytical methods to quantify carnosine-related dipeptides (carnosine, anserine and balenine), their constituent amino acids (β -alanine, histidine, 1-methylhistidine and 3-methylhistidine) and taurine levels in meats. We found that two of three methods may be useful to investigate the ways to increase carnosine related dipeptide levels in meats.

1. 目 的

カルノシン (β -アラニル-ヒスチジン), アンセリン (β -アラニル-1-メチルヒスチジン) およびバレニン (β -アラニル-3-メチルヒスチジン) は, カルノシン関連ジペプチド (もしくはイミダゾールジペプチド) と呼ばれ, 動物の筋肉に多く存在する。生体における機能として抗酸化作用¹⁾ や緩衝作用²⁾ などが認められている。摂取による血圧低下効果³⁾, 運動パフォーマンス向上効果⁴⁾ およびストレス反応緩和効果⁵⁾ なども報告されている。植物には存在しないことから動物性食物に特有の有効成分である。一方, 国内の畜産業において, 「畜肉部位の余剰問題」が存在する。中でも家禽産業ではムネ肉がモモ肉に比して嗜好性が低い結果, 市場価格の低迷が問題となっている。この鶏肉における「畜肉部位の余剰問題」の解決に貢献するために, ニワトリのムネ肉にモモ肉よりも多くのカルノシン関連ジペプチドが含有され

ていることに着目して, 我々は以下に述べる研究を遂行してきた。カルノシンもしくはカルノシン関連ジペプチドを高含有するニワトリムネ肉抽出物の経口投与には, ラットにおける抗うつ様行動効果⁶⁾ やマウスにおける学習行動改善効果⁷⁾ があることを見出した。更に, ニワトリにおいてカルノシンとアンセリンの構成アミノ酸である β -アラニンの投与によるムネ肉内のカルノシンとアンセリン含量の増量を試みた結果^{8~10)}, ムネ肉のカルノシン含量がわずかに増える条件があることを見出した¹⁰⁾。以上の研究を遂行した経験から, ニワトリムネ肉だけでなく, 他の様々な畜肉でもこれらジペプチドの増量法を確立することができれば, 畜肉の付加価値向上や, それによる畜肉部位の余剰問題解決につながりうると考えた。

構成アミノ酸の投与による筋肉内カルノシン関連ジペプチド含量の増量法は, ニワトリ以外にも様々な動物種で報告されている。ブタでは, β -アラニンだけでなく, カルノシンのもうひとつの

構成アミノ酸であるヒスチジンを同時摂取させることにより筋肉内カルノシン含量がわずかに増量した¹¹⁾。一方で、ラットでは β -アラニンの投与で顕著に(10倍ほど)筋肉内カルノシン含量が増加した¹²⁾。これら先行研究は β -アラニン単独もしくは β -アラニンとヒスチジンの同時投与による方法であるが、最も増量に効果的な構成アミノ酸投与の諸条件(動物種、系統、畜肉部位、投与時期、投与期間および投与濃度など)の決定には至っていない。更に、カルノシンやアンセリンだけでなくバレニンの含量まで確認している報告は、我々が知る限り存在しない。我々は、構成アミノ酸に着目してカルノシン関連ジペプチド増量を試みる様々な実験条件の中で、バレニン合成系の活性化は起こりうると考える。なぜなら、構成アミノ酸のヒスチジン摂取量を増やす条件では、ヒスチジンを構成アミノ酸として有するカルノシンだけでなく、ヒスチジンからバレニンの構成アミノ酸である3-メチルヒスチジンへの代謝が促進された結果、バレニン合成促進につながる可能性が推測されるからである。以上より、鶏肉、豚肉など様々な畜肉におけるカルノシン関連ジペプチドの増量法を正確に検討するためには、各畜肉部位、品種及び飼養条件がカルノシン関連ジペプチド3種類(カルノシン、アンセリンおよびバレニン)と全構成アミノ酸(β -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよび3-メチルヒスチジン)の含量におよぼす影響を調べることが必要であると判断した。しかしながら、そのために有用な分析系は確立されていない。

近年、超高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計(UHPLC-MS/MS)を用いた高感度、高選択かつ迅速なAccQ-Tag誘導体化アミノ酸分析システムが報告された¹³⁾。本報告では、カルノシン、アンセリン、 β -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよび3-メチルヒスチジン

が検出可能とされている。そこで、我々が使用可能なUHPLC-MS/MSを用いた同方法でこれら成分が検出されるのか確認した。次に、本分析系において先行研究では確認されていないバレニンが検出されるのかを確認した。更に、 β -アラニンの投与により組織内含量が減少する場合があるタウリン^{8~10)}も検出可能であるとされていることからこれも合わせて確認した。以上を踏まえ、畜肉ならびに骨格筋培養細胞における分析を試みた。UHPLC-MS/MSによるEZfaast誘導体化アミノ酸分析法におけるカルノシン関連ジペプチドおよび構成アミノ酸の分析検討も行った¹⁴⁾。最後に、カルノシン関連ジペプチド3種類を網羅的に分析することが必要な場合には、そのコストも考慮する必要があると考えた。そこで、誘導体化試薬を必要としないImtakt Intrada Amino Acid カラム(Imtakt)によるUHPLC-MS/MSを用いた分析系¹⁵⁾において、カルノシン関連ジペプチド3種類が分析できるのか検討した。

2. 方 法

2.1 実験1

UHPLC-MS/MSによるAccQ-Tag誘導体化アミノ酸分析法¹³⁾を用いて、カルノシン、アンセリン、バレニン、 β -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびタウリンの分析が可能なのか検討した。UHPLC-MS/MSは、AQUITY TQD(Waters)を用いたが、以降の実験においても同様である。定量法として内部標準法を用いた。内部標準物質は先行研究を参考にして、L-ヒスチジン(ring 2-13C)、L-グルタミン-2,3,3,4,4-d 5およびグリシン-d 5を採用した。ニワトリおよびブタの各筋肉部位、C2C12筋芽細胞およびC2C12筋管細胞における分析を試みた。

2.2 実験2

UHPLC-MS/MSによるEZfaast誘導体化アミノ酸分析法¹⁴⁾を用いて、カルノシン、アンセリン、バレニンおよび全構成アミノ酸群の分析を検討した。タウリンは誘導体化の特性上検出不可であることが確かめられているので除外した。定量法として内部標準法を検討したが、内部標準物質は分析キットに添付のホモフェニルアラニン、メチオニン-d 3およびホモアルギニンを採用した。

2.3 実験3

上記2つの分析法は、誘導体化試薬を用いた分析であり、高選択・高感度分析に有用である。しかしながら、畜肉に含まれるカルノシン関連ジペプチドを網羅的に分析する場合には、誘導体化試薬の購入コストが問題となる可能性がある。カルノシン関連ジペプチドは畜肉に高濃度に含まれるため、これらジペプチド分析のみ必要な場合は誘導体化なしでも分析できないか検討することにした。そこで、誘導体化なしのアミノ酸分析用カラムであるImtakt Intrada Amino Acid (50×3 mm)¹⁵⁾を用いたUHPLC-MS/MSのカルノシン関連ジペプチド3種類の分析を検討した。

3. 結果と考察

実験1において、先行研究における分析条件そのまま、カルノシン、アンセリン、 β -アラニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよびタウリンが検出可能であることを確認した。バレニンも検出されたが、隣接しているアンセリンとは分離されていることを確認した。ニワトリおよびブタの各筋肉部位における3種のジペプチド、一部の構成アミノ酸群およびタウリンは定量可能であった。C2C12筋芽細胞では3種のジペプチドは検出されなかったが、C2C12筋管細胞のカルノシンは定量可能であった。両培養細胞においてタウリンは定量することができ

た。骨格筋培養細胞に含まれる微量のカルノシンが定量可能であることは、培養細胞を用いた増量法の探索に使えるかもしれない。以上より、本分析系は筋肉内カルノシン関連ジペプチドの代謝研究に有用である可能性が示唆された。

実験2において、カルノシン、アンセリン、バレニン、ヒスチジン、1-メチルヒスチジンおよび3-メチルヒスチジンのピークを検出することができた。しかしながら、内部標準物質すべてを検出することが出来なかったことから、畜肉内含量の定量まで進むことは断念した。今回採用した分析条件が、異なる会社のUHPLC-MS/MSによるものであったことから、機器による最適条件の違いを反映している可能性を推測した。今後、分析条件の更なる検討（特にカラムの種類変更や移動相グラジエント条件）が必要であることが示唆された。

実験3ではカルノシン、アンセリンおよびバレニンの検出を確認し、畜肉内含量分析を行うことができた。実験1ならびに2の分析方法に比べて誘導体化試薬を用いないことから、カルノシン関連ジペプチド含量のみに着目する場合はコストパフォーマンスに優れた分析系として有用であると考えられた。

総括すると、畜肉のカルノシン関連ジペプチド増量を視野に入れてUHPLC-MS/MSによる分析系を3種類評価し、そのうちの2種類に有用性が認められた。両分析系は、目的に応じた使い分けが有効である。たとえば、カルノシン関連ジペプチドのみを網羅的に分析する場合（たとえば、含量が多い畜肉を絞込むとき）は誘導体化試薬を用いない安価な分析系を用いることや、構成アミノ酸代謝に関連した作用機構解明や増量法の評価（培養細胞での検討を含む）には構成アミノ酸も含めた誘導体化による高感度の同時分析系の検討、などである。今後、両分析系の更なる妥当性

検討を踏まえ、両分析系を用いたカルノシン関連ジペプチド増量法確立を視野に入れている。中でも、「畜肉部位の余剰問題」と関連した課題から優先的に取り組む予定である。

4. 要 約

本研究では、超高速液体クロマトグラフータンデム型質量分析計によるカルノシン関連ジペプチド（カルノシン、アンセリンおよびバレニン）、構成アミノ酸群（ヒスチジン、1-メチルヒスチジン、3-メチルヒスチジンおよび β -アラニン）およびタウリンの分析系を3種類検討した。そのうちの2種類の分析系において有用性が認められた。今後、両分析系の更なる妥当性検討を行った後、畜肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立のために用いる予定である。

文 献

- 1) Kohen R, Yamamoto Y, Cundy KC : *Ames BN. Proc Natl Acad Sci U S A.* **85**, 3175~3179. 1988.
- 2) Abe H : *Biochemistry (Mosc).* **65**, 757~765, 2000.
- 3) Niiijima A, Okui T, Matsumura Y, Yamano T, Tsuruoka N, Kiso Y, Nagai K : *Auton Neurosci* . **97**, 99~102, 2002.
- 4) Maemura H, Goto K, Yoshioka T, Sato M, Takahata T, Morimatsu F, Takamatsu K : *Int J Sport and Health Sci.* **4**, 86~94, 2006.
- 5) Li YF, He RR, Tsoi B, Li XD, Li WX, Abe K, Kurihara H : *PLoS One.* **7**, e 33190, 2012.
- 6) Tomonaga S, Yamane H, Onitsuka E, Yamada S, Sato M, Takahata Y, Morimatsu F, Furuse M : *Pharmacol Biochem Behav.* **89**, 627~632, 2008.
- 7) 友永省三 : 栄養生理研究会報. **52**, 37~44, 2008.
- 8) Tomonaga S, Kaji Y, Tachibana T, Denbow DM, Furuse M : *Anim Sci J.* **76**, 249~254. 2005.
- 9) Tomonaga S, Kaneko K, Kaji Y, Kido Y, Denbow DM, Furuse M : *Anim Sci J.* **77**, 79~86, 2006.
- 10) Tomonaga S, Matsumoto M, Furuse M : *J Poult Sci.* **49**, 307~311, 2012.
- 11) Mei L, Cromwell GL, Crum AD, Decker EA : *Meat Sci.* **49**, 55~64. 1998.
- 12) Margolis FL, Grillo M, Kawano T, Farbman AI : *J Neurochem.* **44**, 1459~1464, 1985.
- 13) Salazar C, Armenta JM, Shulaev V : *Metabolites.* **2**, 398~428, 2012.
- 14) <https://solutions.shimadzu.co.jp/glc/techResource/phenomenex/amino/ezfaast01.html>
- 15) <http://www.imtakt.com/TecInfo/TI734E.pdf>

地鶏生産における初期栄養操作による免疫能向上に関する研究

Study on improvement of immunity by early nutritional development in Japanese native chicken production

太田 能之・白石 純一・西川 薫*

(日本獣医生命科学大学応用生命科学部・*三重県畜産研究所)

Yoshiyuki Ohta, Jun-ichi Shiraishi and Kaoru Nishikawa*

(Faculty of Applied Bioscience, Nippon Veterinary and Animal Science University,

*Animal Science Laboratory Mie-prefecture)

In order to establish the method to produce the safety chicken meat without using pharmacy, possibility of improvement in early immune formation using in ovo amino acid administration was evaluated. 20, 24, and 88 Mie-special Jidori breeder eggs were incubated under 37.8 C and over 60% RH condition, and assigned to 2, 2, and 4 treatment groups of each 10, 12, and 22 eggs with same average weights in Experiments 1, 2, and 3, respectively.

In Experiment 1, eggs were administered 5 % sheep red blood cell (SRBC) into the under shell vein on Day 17 of incubation. On Day 18, distilled water or amino acid solution consisted of whole egg protein (WEAA) in Experiment 1, and none or WEAA solution in Experiments 2 and 3 were in ovo injected to each one group. After treatments, eggs were incubated again, and hatched. In Experiment 3, in addition, newly hatched chicks of one residual group were administered WEAA into the crops, and those of another group were injected WEAA into neck subcutaneously. Chicks were fed commercial feed from half day post hatch to 3 days of age, and then they were bled from the heart. After bleeding, they were sacrificed to collect the organs in Experiment 1. In Experiments 2 and 3, chicks were grown up to 18 weeks of age, and they were sacrificed to collect the organs.

Because SRBC antibody titer was increased by in ovo amino acid injection in Experiment 1, immune formation of chicks might be escalated at early period.

On the other hand, body weight gains of female chickens which administered amino acid by all methods were higher than control chickens in Experiments 2 and 3 ($p < 0.05$), and there was no difference in ratio of edible meat to other parts among all chickens.

1. 目 的

重要な蛋白質源である肉のみならず栄養価の高い卵も供給する養鶏産業において、高品質で安全な食品を安く食卓に届けることが重要である。また、環太平洋経済連携（TPP）をにらみ、品質の

良い安全な鶏肉の生産は輸出戦略にも重要な意味を持ち、その中でも日本固有の地鶏を安全に高品質かつ高効率で生産することが求められる。またニワトリの遺伝的形質に依存するばかりでなく、飼育法についても日本独自の方法を確立することが品質やブランドの差別化に繋がるものと考えら

れる。

そのため、今般流行の危険性が見られるインフルエンザ等の疾病に対しては①予防的に損失を防ぎ、飼料原料の高騰に対しては②新飼料原料の開発と同時に飼料の利用性を向上させ、しかも品質と安全性を損なわないこと、さらには③付加価値により消費者に価格を適正と感じさせることが重要である。

家禽の栄養研究は長年これらの問題と対峙し、数々の問題を解決すると同時に今また新しい技術が求められている。近年、卵中の胚発生時および餌付け時は生産の最初の段階であり、品質の高いヒナの高い育成率を達成するために重要な時期であることが認識されるようになった。

この時期については、栄養研究はともかく未だに栄養管理プログラムが示されておらず、この時期の生理的特性を十分に引き出せていないが、近年それに対する答えが示されてきている。地鶏生産においては、抗生物質等の薬剤なしでワクチンの効力を最大限に引き出して健康に育てることが必要である。Ohtaら^{1,2)}は胚発生前にアミノ酸の投与を行うことにより、アミノ酸の利用性を向上させ、早期餌付けにより免疫能を向上させることができる可能性を示した⁴⁾。

そこで本研究では、この技術を用いることで、地鶏において免疫能を向上させ、初期免疫形成時のもっとも疾病に罹患しやすい時期における対策技術を開発することを目的とした。

2. 方 法

試験1、試験2および試験3それぞれ20、24および88個のみえ特産鶏種卵を通常環境（温度37.8℃、相対湿度60%以上）で孵卵した。14日目の検卵後発生が確認された種卵を平均卵重が同じになるように試験1、2および3においてそれぞれ2、2および4区に10、12および22個ずつ割り

当てた。孵卵17日目に試験1では全種卵に5%羊赤血球（SRBC）溶液50 μ Lを卵殻下静脈に投与した。孵卵18日目に試験1ではOhtaら（1999）に基づき1区に蒸留水、もう1区に全卵組成アミノ酸溶液0.5mLを鈍端部より*in ovo*投与し、試験2では1区を無処理としもう1区に試験1同様のアミノ酸溶液を投与し、そのまま孵卵した。試験3では1区を無処理とし、各試験と同様のアミノ酸溶液を*in ovo*投与し、孵化時に残りの2区にそれぞれ同様のアミノ酸溶液をそ嚢内に強制給餌もしくは頸部皮下にワクチネーションと同様に投与した。

試験1は日本獣医生命科学大学動物生産化学教室内において温度32℃で24時間照明下において3日間全てのヒナを同一育雛箱内で群飼した。試験2および3では三重県畜産研究所内の鶏舎において平飼い区画内にてガスブルーダーで保温し、自由摂取自由飲水で群飼した。

試験1では孵化時の体重を記録し、市販飼料を餌付け後3日齢時にSRBCを投与したヒナから採血を行い、頸椎脱臼による安楽屠殺後に肝臓、腸管および卵黄嚢を採取して重量を測定した。血液は血漿分離後SRBC凝集抗体価の測定に供試した。腸はメッケル憩室付近から0.1 g組織を採取し、免疫関連遺伝子発現量を定法によりリアルタイムPCR法にて測定した。

試験2および試験3では孵化したヒナは直ちに飼育区画内で餌付けを行い、自由摂取自由飲水により2週齢時以降から可食適期の18週齢時まで毎週体重を測定して飼育し、体重測定後に可食部（浅胸筋、深胸筋、腿肉、肝臓、筋胃）、腹腔内脂肪および腸管重量を測定した。試験2では腸は上部（十二指腸屈曲部）、中部（メッケル憩室付近）および下部（結腸上部）から0.1 gずつ組織を採取し、免疫関連遺伝子発現量を定法によりリアルタイムPCR法にて測定した。

試験飼料は試験 1 では産卵鶏用餌付け飼料 (ME 3.10 Mcal/kg, CP22%), 試験 2 および 3 では三重県で使用している市販前期用 (ME 3.12Mcal/kg, CP22.5%) および後期用 (ME 3.19Mcal/kg, CP18.5%) を用いた。

得られた結果は分散分析を行った後, Turkey法もしくは t 検定により平均値の差の検定を行った。また SRBC凝集抗体価は 2 倍希釈以上の凝集価が得られた頻度を χ^2 乗検定にて評価した。

3. 結果と考察

Table 1 に試験 1 の結果を示した。試験 1 において, 孵化時体重に有意な差は認められなかったが, 3 日間の増体重はアミノ酸投与区が有意に高かった ($P < 0.05$)。各臓器重量間に有意差は認められなかったが, SRBC凝集抗体価はアミノ酸投与区で有意に高く, また腸管中部の IL 2 において高い値を示す頻度が高くなった ($P < 0.05$)。

Table 1 Effects of in ovo amino acid administration at Day 18 of incubation on early performance and immune response in Japanese native chicken, Kumano-Jidori (Experiment 1)¹

Injection	Control (water)	Amino acids
Initial egg weights (g)	47.4 ± 2.7	47.8 ± 2.3
Body weight of hatched chicks (g)	29.9 ± 2.4	30.2 ± 1.9
Body weight/egg weight (%)	62.9 ± 2.4	63.2 ± 1.5
Body weight gain (g/3 days)	7.9 ± 2.8	10.6 ± 2.8
Intestine weights (g)	1.54 ± 0.17	1.66 ± 0.18
Liver weights (g)	1.13 ± 0.08	1.18 ± 0.10
Yolk weights (g)	0.74 ± 0.51	0.94 ± 0.36
SRBC antibody titer	1.22 ± 0.44	1.90 ± 0.32*
Intestine immune gene expression (/GAPDH)		
TLR-2	1.17 ± 0.19	1.54 ± 0.22
TLR-4	1.21 ± 0.28	1.48 ± 0.37
CD3	0.93 ± 0.11	1.27 ± 0.70
IL-2	1.22 ± 0.41	1.94 ± 0.88

¹ Values are means ± SD for 10 eggs and chicks.

*Significantly different from control ($P < 0.05$).

Table 2 Statistical statements of effects of in ovo, oral, or neck subcutaneous amino acid administration at Day 18 of incubation or 0 day post-hatch on intestinal immune gene expression in Japanese native chicken, Kumano-Jidori (Experiment 3)

		IL 2	CD 3	TLR 4	TLR 2
Fore	Treat	NS	NS	NS	NS
	Sex	NS	NS	NS	NS
	Treat x Sex	NS	NS	NS	NS
Mid	Treat	NS	NS	NS	NS
	Sex	NS	NS	0.05	NS
	Treat x Sex	NS	NS	NS	NS
Hind	Treat	0.05	NS	NS	NS
	Sex	NS	0.10	NS	NS
	Treat x Sex	NS	NS	NS	NS

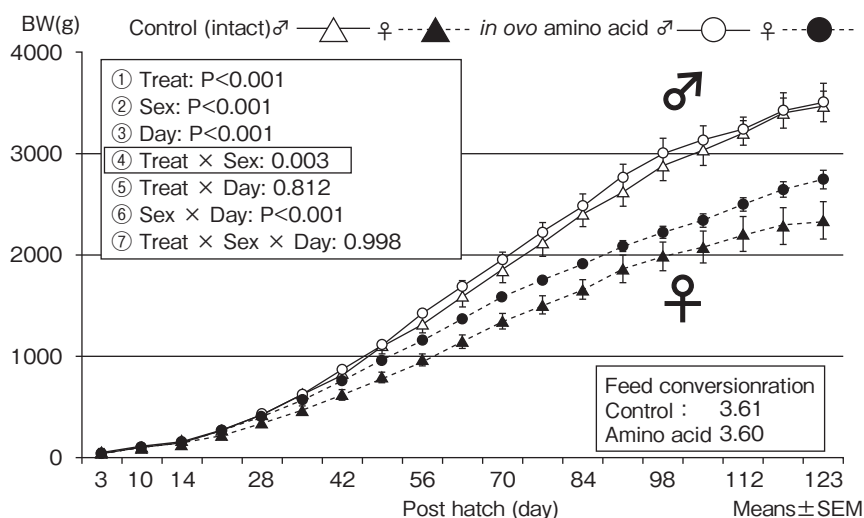


Fig. 1 Effects of in ovo amino acid injection at Day 18 of incubation on growth performance of Japanese native chicken, Kumano-Jidori (Experiment 2)

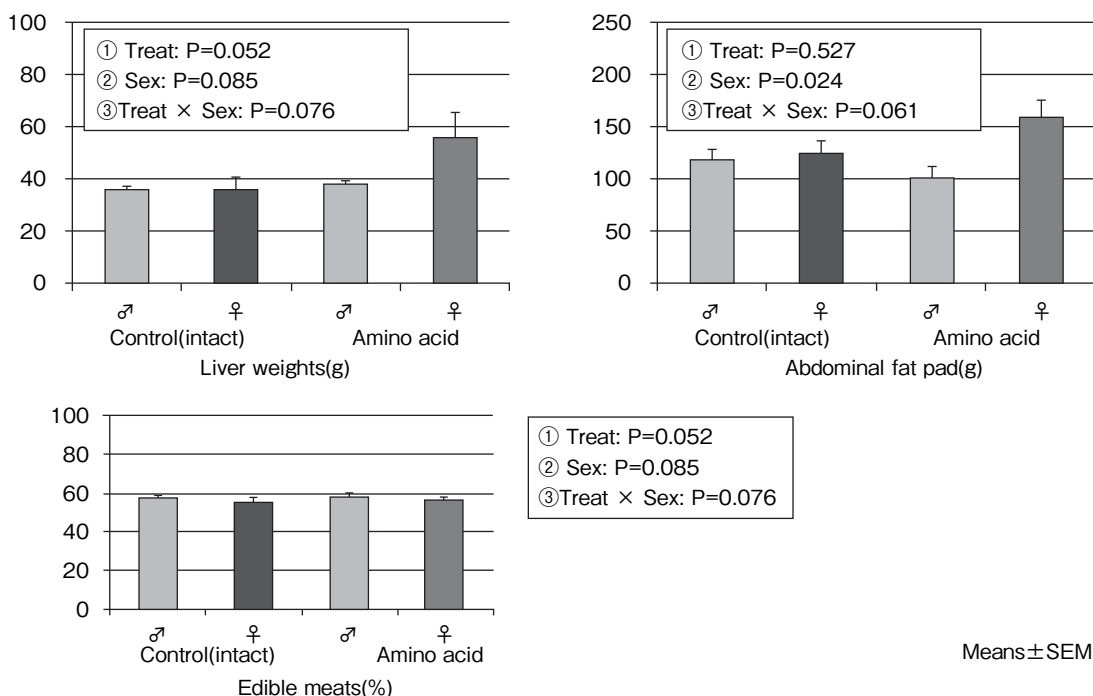


Fig. 2 Effects of in ovo amino acid injection at Day 18 of incubation on carcass quality of Japanese native chicken, Kumano-Jidori 18 weeks of age (Experiment 2)

以上のことからみえ特産鶏においても *in ovo* アミノ酸投与により初期の免疫能を向上できると推察された。

これをもとに生産能の評価を行った試験2の結果をFig. 1 およびFig. 2 に示した。体重と肝臓重量において雌雄とアミノ酸投与処理の交互作用が

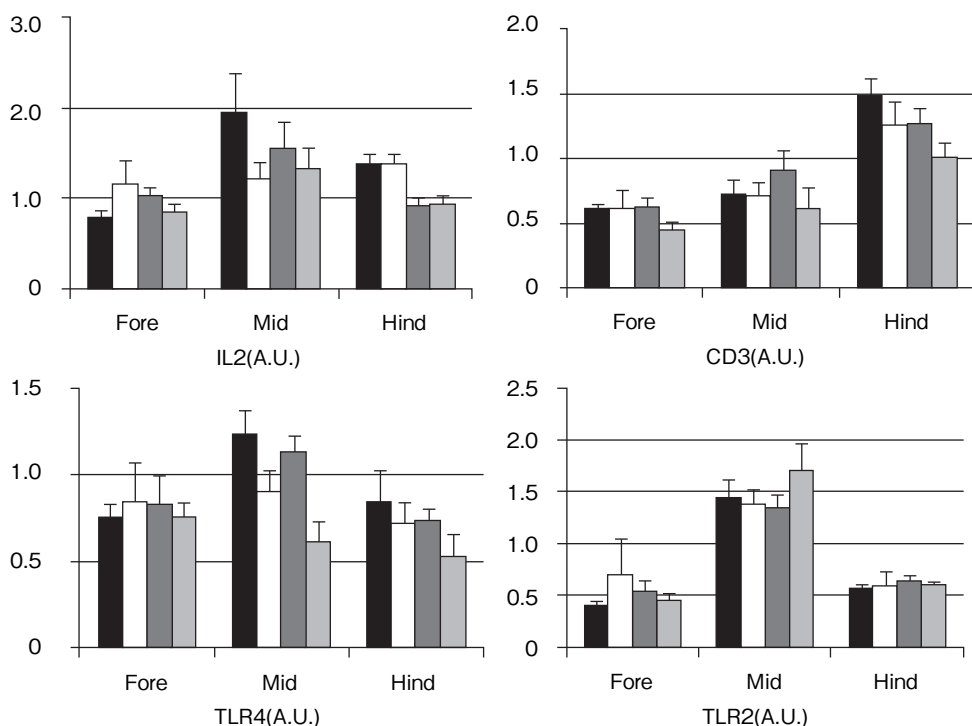


Fig. 3 Effects of in ovo, oral, or neck subcutaneous amino acid administration at Day 18 of incubation or 0 day post-hatch on intestinal immune gene expression in Japanese native chicken, Kumano-Jidori 18 weeks of age (Experiment 2)

認められ、オスにおいては体重や体構成に差は認められなかったが、メスでは*in ovo*アミノ酸投与により有意に体重が大きくなった。また可食部割合は変わらず、体構成そのものは変わらないまま成長が早くなったことが示された。この傾向はブロイラーと白色レグホン産卵鶏の関係と異なり³⁾、みえ特産鶏では血糖値や糖新生、もしくはコルチコステロンとエストロゲン、およびテストステロンといったステロイドホルモン分泌が特異的である可能性が示唆され、みえ特産鶏はこの点をブロイラーと比較することにより、特性を明らかにすることができると推察された。またこれらの知見をもとに適正な飼育が可能になると考えられた。一方、腸管の免疫関連遺伝子において18週齢時にアミノ酸投与の影響が観察されたのは腸管後部におけるIL2の発現で、対照区に比べて有意に低く

なった ($P < 0.05$)。3日齢時には有意ではないがアミノ酸投与区で高い傾向が見られたことから、免疫形成は早くなるが、その後は遺伝子発現が低くなることが示された。単独の免疫指標の高い低い単に免疫能の高低に結びつかないが、その後の形質に影響する効果があると推察された。

さらに投与部位について検討した試験3においては、全てのアミノ酸投与群において15週齢まで対照区より体重が高かった。食餌によるアミノ酸の摂取でも試験2同様の効果が期待できることが明らかにされた。一方で雌雄どちらにおいてもその後は体重が増加せず、18週齢時の体重には差が認められなかった。同じ区域内で飼育されている雌雄間で15週齢以降生殖行動が観察されたこと、試験2が初夏に、試験3が晩秋に行われたことから生殖行動と季節性の2点いずれかが原因と

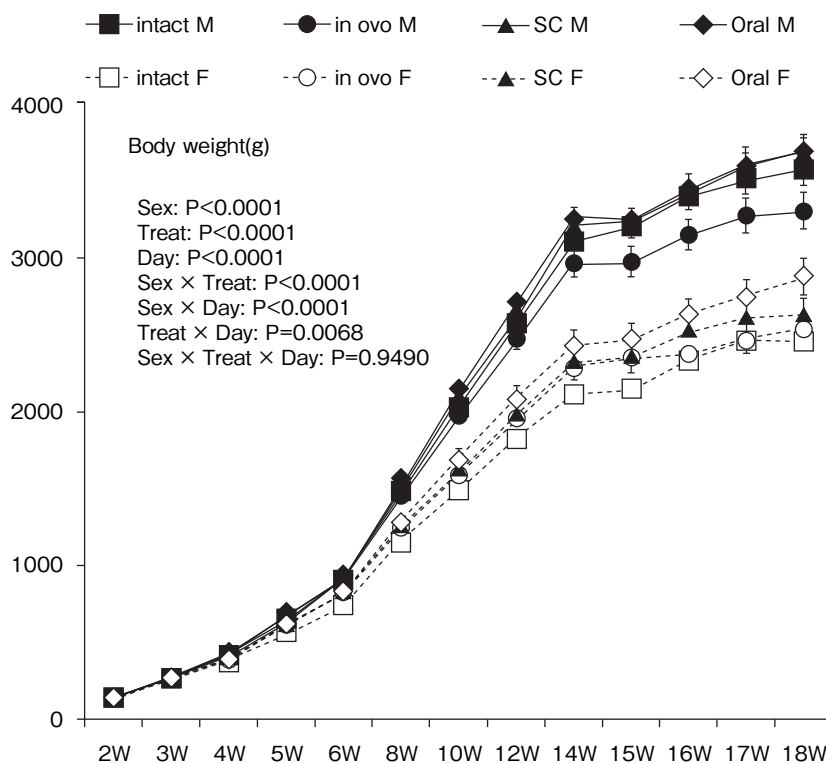


Fig. 4 Effects of in ovo, oral, or neck subcutaneous amino acid administration at Day 18 of incubation or 0 day post-hatch on growth performance in Japanese native chicken, Kumano-Jidori (Experiment 4).

考えられ、今後の検討が必要と思われた。生殖行動については雌雄を別の区画で飼育し、季節性の影響については再現性を確認する必要があると思われた。しかしながら、初期アミノ酸投与がメスのみえ特産鶏生産能を向上させることについては、代償成長に影響されない生産能向上法であると推察され、地鶏飼育において新たな可能性が示された。

4. 要 約

地鶏において薬剤に依存しない生産系を確立するため、*in ovo*を含めた初期アミノ酸栄養改善により孵化初期の免疫形成および生産能の向上が可能か検討した。試験1、試験2および試験3それぞれ20、24および88個のみえ特産鶏種卵を温度

37.8℃、湿度60%以上で孵卵し、平均卵重が同じになるように試験1、2および3においてそれぞれ2、2および4区に10、12および22個ずつ割り当てた。試験1では孵卵17日目に5%羊赤血球(SRBC)溶液50μLを卵殻下静脈に投与した。孵卵18日目に試験1では蒸留水もしくは全卵組成アミノ酸溶液(WEAA)を、試験2および3では無処理もしくはWEAAを投与して孵化させた。さらに試験3ではそ嚢内もしくは頸部皮下にWEAAを投与した。試験1では孵化後半日後に餌付けを行い3日齢まで飼育し、採血後に安楽屠殺し臓器を摘出して重量を測定し、血液はSRBC凝集抗体価を測定した。試験2および3では18週齢まで飼育して安楽屠殺後に可食部と腹腔内脂肪を採取して重量を測定した。

試験1では3日齢時のSRBC凝集抗体価はアミノ酸投与で増加し、免疫形成が早まった可能性が示唆された。一方で試験2および3ではアミノ酸の投与法に関わらず、メスの増体が有意に高くなり ($P < 0.05$)、可食部割合は変化しなかった。以上の結果からみえ特産鶏への胚期から孵化直後のアミノ酸投与は免疫形成を助け、なおかつメスの生産能を向上させることが明らかになった。

文 献

- 1) Ohta, Y., N. Tsushima, K. Koide, M. T. Kidd, T. Ishibashi : Effect of amino acid injection in broiler breeder eggs on embryonic growth and hatchability of chicks. *Poultry Science*, **78**, 1493~1498, 1999.
- 2) Ohta, Y., M. T. Kidd, T. Ishibashi : Embryo growth and amino acid concentration profiles of broiler breeder eggs, embryos, and chicks after in ovo administration of amino acids. *Poultry Science*, **80**, 1430~1436, 2001.
- 3) Ohta, Y., Yoshida, T. Tsushima, N : Comparison between broilers and layers for growth and protein use by embryos. *Poultry Science*, **83**, 783~787, 2004.
- 4) Ohta, Y., M. Takada, K. Yamada, T. Ikeda, M. Sugawara : Effect of timing to start feeding and kinds of feeds on growth and immune performances of newly hatched chicks. *Poultry Sci. J.* **44**, J108~113, 2007.

胎仔期のタウリン供給強化によるブタの筋形成促進

Promotion of myogenesis by administration of taurine during the fetal stage in the pig

勝 俣 昌 也・石 田 藍 子

(独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究所)

Masaya Katsumata and Aiko Ishida

(NARO Institute of Livestock and Grassland Science)

The purpose of this experiment was to test whether adding taurine to diets of sows throughout pregnant and lactation periods would promote myogenesis of offspring. Taurine (1.5%) was added to a commercial diet for pregnant pig and to a commercial diet for lactating pig. Sows were given the diet for pregnant pig from d1 to d105 of pregnant period and thereafter they were given the diet for lactating pig until weaning that was 28 days after farrowing. The control sows were given the same diets without taurine on the same schedule. Piglets were reared under the usual management of NARO Institute of Livestock and Grassland Science. Adding taurine to the diet enhanced plasma free taurine concentrations on d25 of pregnancy ($p < 0.01$). Birth weights of piglets of the taurine given sows were lower ($p < 0.05$) and weaning weights of piglets of the taurine given sows tended to be lower ($p < 0.10$) than those of piglets of the control sows. Adding taurine to the sow's diets did not affect ratio of type I myofiber of longissimus dorsi muscle of the 1 day old piglets. The number of myofiber per area of longissimus dorsimuscle of the 1 day old piglets of the taurine given sows tended to be higher ($p < 0.10$) and those of the 5 weeks old piglets of the taurine given sows were higher ($p < 0.05$) as compared with the piglets of the control sows. Adding taurine to the sow's diet did not affect mRNA expression levels of myosine heavy chain protein isoforms in muscles of offspring. We failed to detect myogenesis promoting effects of taurine in this experiment.

1. 目 的

ブタの筋線維は胎仔期に形成する (Foxcroftら 2006)¹⁾ ので、出生後に筋形成を促進するのは難しくなる。したがって、ブタの筋形成を促進するためには、胎仔期にアプローチするのが有効だと考えられている。

タウリン (2-アミノエタンスルホン酸) には、培養筋芽細胞が筋管に分化する過程を促進する効果がある (Miyazakiら 2013)²⁾。タウリンのこの機能が生体内でも発揮されれば、筋形成を促進できる可能性がある。

本研究は、ブタの筋線維が形成される胎仔期に、母体を介して胎仔へのタウリンの供給を強化

し、産子の筋形成を促進できるかあきらかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 妊娠雌豚の管理

妊娠豚8頭を対照区とタウリン給与区に、4頭ずつ割りふった。対照区には、妊娠1～105日目まで市販の妊娠豚用飼料を給与し、妊娠106日目から離乳までは市販の授乳豚用飼料を給与した。タウリン区には、市販の妊娠豚用飼料にタウリンを1.5%添加した飼料を妊娠1～105日目まで給与し、妊娠106日目から離乳までは市販の授乳豚用飼料にタウリンを1.5%添加した飼料を給与した。妊娠1～105日目までの飼料の給与量は、日本飼養標準・豚（2013年版）に記載されている妊娠豚のエネルギー要求量の算定式にのっとって決定した。妊娠106日目から分娩までは1日あたり2500gの市販の授乳豚用飼料を給与した。分娩から離乳までは（授乳期間中）、供試した繁殖雌豚の飼料摂取量に応じて、1日あたり最大7kgの範囲で給与量を調節した。

2.2 産子の管理

供試した繁殖雌豚の産子は、畜産草地研究所の通常の方法で飼育し、28日齢で離乳した。

2.3 サンプル採取

妊娠豚からは妊娠25日目に血漿を採取した。分娩24時間以内（1日齢）に、各雌豚の産子から雄、雌1頭ずつ選び、血漿、胸最長筋、大腿二頭

筋を採取した。また、5週齢に達した時点で、各雌豚の産子から雄、雌1頭ずつ選び、血漿、胸最長筋、菱形筋、大腿二頭筋を採取した。

2.4 サンプル分析

採取した血漿は遊離タウリン濃度を測定した。

1日齢ならびに5週齢のブタの胸最長筋、菱形筋、大腿二頭筋のミオシン重鎖（MHC）タンパク質の各アイソフォームのmRNA発現量を測定した。さらに、1日齢ならびに5週齢のブタのI型筋線維の割合を免疫染色法で測定するとともに、筋線維数を測定した。

3. 結果と考察

Table 1 は血漿タウリン濃度の結果である。タウリン強化飼料を給与した妊娠25日目の繁殖雌豚の血漿タウリン濃度は、対照区の濃度の6倍の高さで（ $P < 0.01$ ）、タウリン強化飼料の効果を確認した。一方、タウリン強化飼料を給与した母豚から生まれた1日齢の子豚の血漿タウリン濃度の平均値は、差はなかったものの対照区の子豚よりも低かった。ほかの遊離アミノ酸濃度と比較すると、初乳中の遊離タウリン濃度は20～250倍高い（岩澤ら1995）³⁾。岩澤ら（1995）のこの結果は、新生子豚にとってタウリンがきわめて重要だということを示唆している。対照区の母豚であっても体内でのタウリン合成量と乳への移行が高くなっている可能性があり、このことが1日齢の子豚の血漿タウリン濃度に差がなかった理由かもしれない。

Table 1 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on concentrations of plasma free taurine of sows and offspring (nmol/ml).

	Control	Taurine
Sows at 25 th day of pregnant period	83 ± 22	491 ± 22**
Offspring 1 day old	163 ± 38	106 ± 37
Offspring 5 weeks old	216 ± 34	143 ± 33

** : $P < 0.01$

Table 2 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on the number of piglets born, birth and weaning weights of piglets.

	Control	Taurine	SE
The number of piglets born (all)	11.3	12.0	1.9
The number of piglets born (alive)	10.0	10.8	1.5
Birth weight (kg)	1.4	1.0	0.1*
Weaning weight (kg)	9.1	7.8	0.5†

† : P<0.10, * : P<0.05

Table 3 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on the ratio of myosine heavy chain type I myofiber and the number of myofiber in l. dorsi muscle of offspring.

	Control	Taurine
1 day old		
Ratio of type I fiber (%)	5.5±0.8	5.3±0.7
The number of myofiber (number/mm ²)	1799±302	2614±262†
5 weeks old		
Ratio of type I fiber (%)	11.6±1.4	9.9±1.4
The number of myofiber (number/mm ²)	971±72	1242±66*

† : P<0.10, * : P<0.05

い。哺乳期間中の子豚のタウリンの栄養状態を評価するためには、初乳と通常乳の遊離タウリン濃度を測定するとともに、2週齢や離乳時など別のタイミングでも豚の血漿遊離タウリン濃度を測定する必要がある。また、5週齢の産子の血漿タウリン濃度にも差はなかった。

Table 2 は産子数、生時体重、離乳体重の結果である。産子数にはタウリン強化の影響はなかった。一方、タウリンを強化すると生時体重が小さくなり (P<0.05)、離乳体重も小さくなる傾向があった (P<0.10)。タウリンを0.05%添加した飼料を1~42日齢までウズラに給与すると、1~21日齢までは増体がよくなり、全期間でみると飼料効率がよくなった (Wangら2009)⁴⁾。今回の実験結果は、ウズラによる先行研究の結果とは相いれないものになった。その理由については不明な点が多いが、タウリンの添加量が高すぎたのかもしれない。また、この実験では、日本飼養標準・

豚 (2013年版) にもとづいて妊娠豚へのエネルギー (飼料) 給与量を決定したが、可消化エネルギーに換算すると、畜産草地研究所の通常の管理で給与している量よりも、1日あたり300~1000kcal低い給与量になった。そして、この実験で得たタウリン区の生時体重は、対照区だけでなく、著者らの以前の実験で得た生時体重の平均値 (1.3~1.4kg) よりも低かった。著者らの以前の実験では、妊娠25~50日の25日間だけ、日本飼養標準・豚 (2013年版) にもとづいてエネルギー給与量を決定した。以上のことから、タウリンにはエネルギー要求量を高くする効果があるのかもしれない。この点については、エネルギー代謝試験などで確認する必要がある。

Table 3 に産子の胸最長筋のI型筋線維の割合と筋線維数のデータをしめた。I型筋線維の割合に差はなかったが、mm²あたりの筋線維数は、1日齢ではタウリン区が多い傾向にあり (P<

0.10), 5 週齢ではタウリン区が多かった ($P < 0.05$)。胸最長筋の重量や断面積は測定していないが, 生時体重と離乳体重の結果もあわせて考えると, タウリン区のほうが胸最長筋は小さかったと考えるのが妥当だろう。したがって, **Table 3**の結果は, 筋線維数が増えたことによる結果ではなく, 胸最長筋が小さいので個々の筋線維面積も小さくなり, mm^2 あたりの筋線維数は多くなったと説明できる。

Fig. 1 と **Fig. 2** は 1 日齢の産子の胸最長筋と大腿二頭筋のミオシン重鎖タンパク質の mRNA 発現量の結果で, **Fig. 3, 4, 5** は 5 週齢の産子の胸

最長筋, 菱形筋, 大腿二頭筋のミオシン重鎖タンパク質の mRNA 発現量の結果である。いずれの日齢, 筋肉でも, アイソフォームにかかわらず, タウリン強化飼料の母豚への給与の影響はなかった。菱形筋の MHC2b の mRNA 発現量の平均値はタウリン区で低かったが, 誤差が大きく, 有意差とはならなかった。タウリン区のほうが胸最長筋は小さかったと考えるのが妥当と前述した。筋肉が小さくてもミオシン重鎖タンパク質の mRNA 発現量には差がないということであれば, ミオシン重鎖タンパク質の mRNA 発現量を比較しても, 筋肉の大きさまでは評価できないことになる。

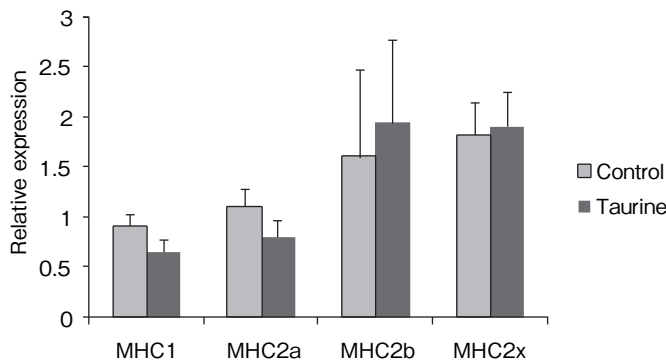


Fig. 1 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on mRNA expression of myosine heavy chain protein isoforms in l. dorsi muscle of offspring of 1 day old. Least square means $\pm$ standard errors.

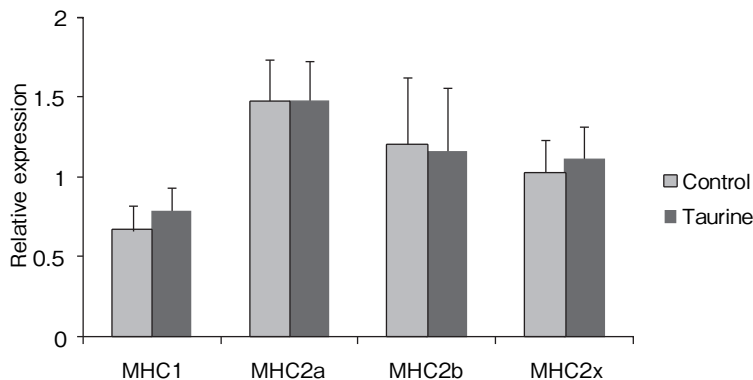


Fig. 2 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on mRNA expression of myosine heavy chain protein isoforms in biceps femoris muscle of offspring of 1 day old. Least square means $\pm$ standard errors.

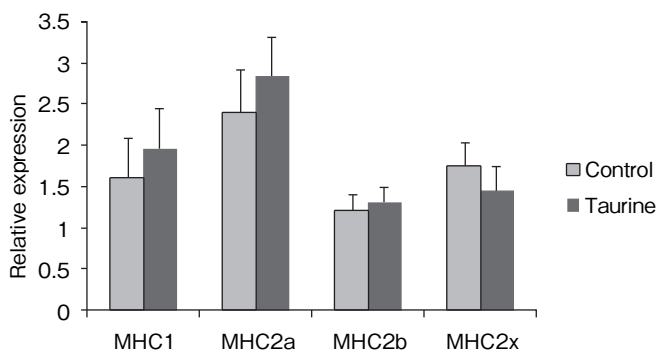


Fig. 3 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on mRNA expression of myosine heavy chain protein isoforms in l. dorsi muscle of offspring at 5 weeks old.

18SRNA expression was used as internal standards. Least square means $\pm$ standard errors.

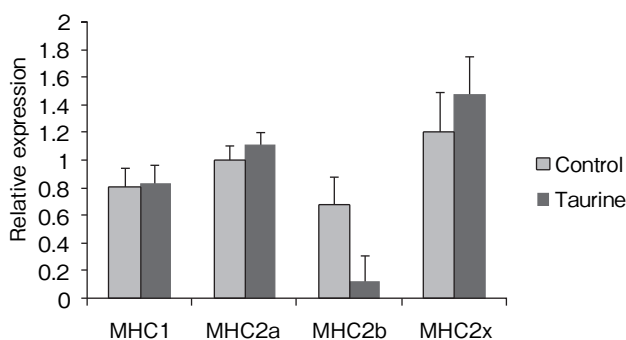


Fig. 4 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on mRNA expression of myosine heavy chain protein isoforms in rhomboideus muscle of offspring at 5 weeks old.

18SRNA expression was used as internal standards. Least square means $\pm$ standard errors.

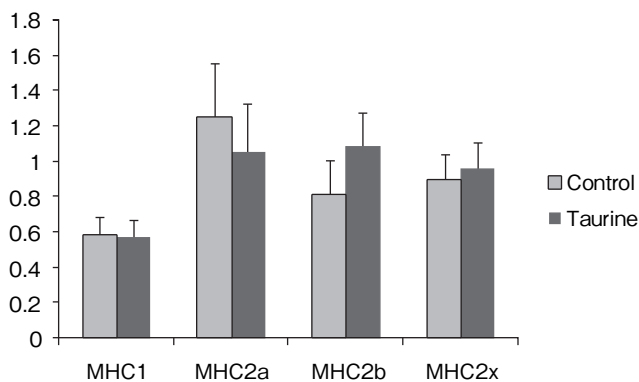


Fig. 5 Effects of taurine supplementation to sow's diet during pregnancy and lactation periods on mRNA expression of myosine heavy chain protein isoforms in biceps femoris muscle of offspring at 5 weeks old. 18SRNA expression was used as internal standards. Least square means $\pm$ standard errors.

4. 要 約

タウリンには筋形成を促進する機能が期待できるので、ブタの筋線維が形成される胎仔期に、母体を介して胎仔へのタウリンの供給を強化し、産子の筋形成を促進できるかあきらかにすることを目的とした。市販の妊娠豚用飼料にタウリンを1.5%添加した飼料を妊娠1～105日目まで給与し、妊娠106日目から離乳までは市販の授乳豚用飼料にタウリンを1.5%添加した飼料を給与した。対照区には、妊娠1～105日目までは市販の妊娠豚用飼料を、妊娠106日目から離乳までは市販の授乳豚用飼料を給与した。分娩後の産子は、畜産草地研究所の通常の方法で飼育した。妊娠25日目の母豚の血漿遊離タウリン濃度は、タウリン強化飼料の給与で対照区の6倍になった ($P < 0.01$)。しかし、タウリン強化飼料を給与した母豚から生まれた1日齢の子豚の血漿タウリン濃度は対照区と差がなかった。母豚の飼料にタウリン

を強化すると生時体重が小さくなり ($P < 0.05$)、離乳体重も小さくなる傾向があった ($P < 0.10$)。産子の胸最長筋のI型筋線維の割合にタウリン強化の影響はなかったが、 mm^2 あたりの筋線維数は1日齢ではタウリン強化で多い傾向にあり ($P < 0.10$)、5週齢ではタウリン強化で多くなった ($P < 0.05$)。1日齢と5週齢の産子の筋肉(胸最長筋、菱形筋、大腿二頭筋)のミオシン重鎖タンパク質のmRNAの発現量は、日齢にかかわらず、どちらの筋肉でも、タウリン強化の影響はなかった。今回の実験では、タウリンの筋形成促進効果を確認することはできなかった。

文 献

- 1) Foxcroft *et al.* : *Journal of Animal Science*, 84 Suppl, E105~112, 2006.
- 2) Miyazaki *et al.* : *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 776, 321~328, 2013.
- 3) 岩澤ら : 日本養豚学会誌, 32, 193~199, 1995.
- 4) Wang *et al.* : *Poultry Science*, 88, 1394~1398, 2009.

肉質を変化させる天然物の探索

Screening for natural product that changes the meat characteristics

内 田 隆 史

(東北大学大学院農学研究科)

Takafumi Uchida

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Our goal is to produce healthy and tasty meat with low fat and high protein. We speculate that some natural compound may help produce healthier meat. In order to identify the compound from natural product libraries, we screened for inhibitors of the peptidyl prolyl *cis/trans* isomerase (PPIase), Pin1, because we found that Pin1 inhibitors might reduce the content of fat in meat.

Pin1 binds to phosphorylated Ser/Thr-Pro motifs in a variety of proteins and catalyzes the *cis/trans* isomerization of peptidyl prolyl bonds. Recently, we found that Pin1 enhances the uptake of triglycerides and the differentiation of mouse embryonic fibroblasts into adipose cells in response to insulin stimulation, and suggested that Pin1 downregulation could be a potential approach to the treatment of obesity-related disorders. Therefore, we designed a screen to discover potential small molecule inhibitors of Pin 1.

In this study, we focus on screening inhibitors from natural compound libraries, because they could be added in feed. As medical drugs, natural compounds have been recognized as evolved and privileged structures with a greater likelihood than many synthetic compounds to exhibit specific bioactivities. For example, 73 % of cancer therapeutics approved to date are either natural products or their derivatives. In spite of these successes, natural resources have not been widely screened as drugs over the past two decades, due in part to persisting difficulties in the systematic isolation and synthesis of such molecules. However, Cyclosporin A (CsA) and FK506, which are in widespread clinical use as immunosuppressant drugs are natural products. Their target molecules are the PPIase subfamilies, the cyclophilins and the FK506-binding proteins (FKBPs), respectively. These facts suggest that natural products represent a good source to screen for additional PPIase inhibitors.

We have established a screening method to efficiently assay for Pin1 inhibitors and applied the method to identify a Pin1 inhibitor from the eatable foods and plants. We found an inhibitor, 974B from seaweed. The crude extract of seaweed showed similar effect to the purified compound 974B, which suggests that feed containing seaweed may reduce the fat in meat. This study was supported by “The Ito Foundation” in addition to a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan, and Science and technology research promotion program for agriculture, forestry, fisheries and food industry.

1. 目 的

我が国では、“さし”の入った、とろけるような霜降り肉が高級牛肉とされ人気も高く、最高級のA5級の肉など庶民にはまず食べる機会もないほど高価である。その一方で、逆に、最近の健康食ブームもあり、脂肪分の少ない赤肉の方を好む人も多くなってきており、消費者の好みは多様化している。

国産牛である短角和牛の肉質は脂肪分が少ないヘルシーな赤肉で、赤身が多いから量を食べても飽きがこなく、かむほどに肉本来の美味しさが広がる。高タンパク質でヘルシーな牛肉として短角和牛はブランド化されつつある。我が国ではあまりなじみがないし一般的になっていないが、北米では脂肪分の少ない高タンパク質の赤肉が多いバイソンの肉も人気が高く、簡単に飼育できるようになればさらに普及すると言われている。すき焼きには霜降り肉、ステーキには赤み肉というように調理方法によってそれぞれの肉質の特徴をいかにすることができるし、どちらもより多く消費されるようになっていくと予測できる。高脂肪の霜降り肉とともに低脂肪で高品質な赤身肉を作成することが望まれる。

我々はこれまでにPin 1という酵素の研究を行ってきた。Pin 1の生体での機能を、Pin 1遺伝子欠損マウスをもちいて解析してきた結果、Pin 1が脂肪細胞の分化に関与していることを見出し¹⁻³⁾、Pin 1を阻害する物質を混入した餌を与えることで脂肪の含有量を低下させた肉を作成することに生かせるのではないかと考え本研究を開始した。

すでにプロリン異性化酵素が脂肪細胞への分化を促進することを見出していた。また、この酵素活性を阻害することで線維芽細胞を脂肪細胞に分化させなくできることを発見していた。これらの技術を応用することで、脂肪分の少ない肉を作成

できるのではないかというアイデアを持つに至った。

広い意味ではPin 1阻害剤を探索することから本研究プロジェクトはスタートしているが、本研究課題は低脂肪の食肉の生産を行うための飼料に添加する物質を探索することを目的にしている。したがって、既に食用になっている天然物を探索源とすること、また、低コストでなければならぬことなどを考慮すると大量に入手可能な天然物が好ましいと予測される。

本助成金を受ける前から広い意味での本研究はすでに進めており、マリンエキスからPin 1活性を抑制する天然物抽出物を発見していた。本研究報告では得られた化合物がまだ少量であること、また作用機構が不明であることから、主に分子・細胞レベルの基礎的な研究を行った。

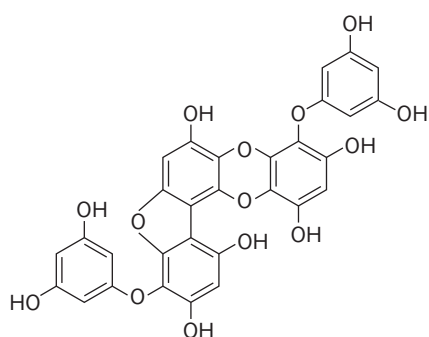
2. 方 法

第一に、微生物培養液、植物抽出物、海藻抽出物などの天然物、さらに市販されている健康食品からの抽出物などからPin 1の酵素活性を阻害する化合物を精製した。化合物の精製方法は既報の通り、メタノール抽出およびカラムクロマトグラフィーを用いる方法で行った⁶⁾。Pin 1の酵素活性を測定するスクリーニングシステムは我々が構築した方法を用いた⁴⁾。

第二に、細胞レベルのアッセイ系として、線維芽細胞の脂肪細胞への分化を検出する方法を用いた。オイルレッドO染色で脂肪を赤色に染色した後、その色素量を濁度測定することで脂肪量を半定量的に測定する方法を用いた¹⁾。

3. 結果と考察

天然物から茶カテキンと海藻抽出物が阻害活性を有することを見出した。茶カテキンのPin 1阻害活性に関しては米国のグループに先を越され報

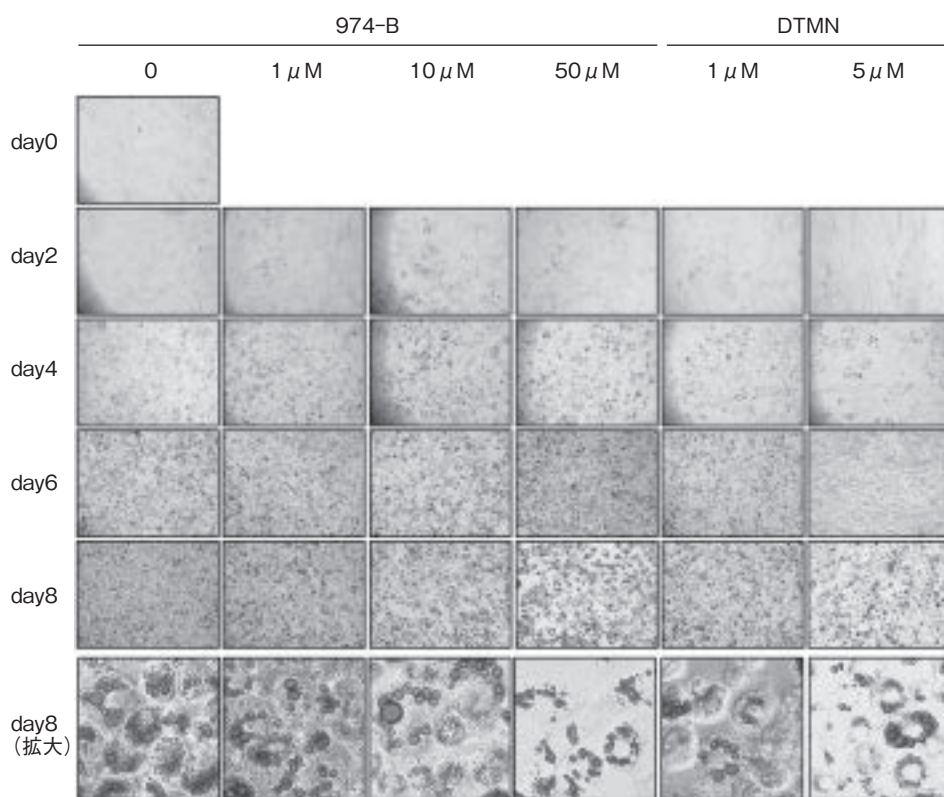
Fig. 1 Sea Weed Pin1 Inhibitor 974-B⁶⁾

告されてしまったが⁵⁾、海藻抽出物に関しては我々が発見した974-B（分子量が974であったことから名付けた）が（Fig. 1）⁶⁾、マウス胎仔線維芽細胞（NIH3T3-L1）やマウス線維芽細胞からの脂肪細胞への分化抑制活性も示した⁷⁾。

本研究課題では、この海藻抽出物974-Bを精製

し、その脂肪細胞への分化抑制作用に関して解析した。我々はこれまでに、1) SiRNAによるPin1の発現抑制や、2) 化学合成化合物によるPin1酵素活性の阻害により、インシュリン刺激による線維芽細胞の脂肪細胞への分化が抑制されることを示した¹⁾。

今研究で、974-Bが線維芽細胞の脂肪細胞への分化を抑制することを明確に示すことができた（Fig. 2）。細胞レベルの実験は、海藻から単離精製した化合物974-Bを培養液に溶解する方法で行ったが、マウスへの投与実験は、海藻からメタノール抽出を行っただけの粗精製物を餌に添加し投与する方法を用いた。阻害剤添加、非添加の餌を1週間連続投与（合計10mg）した後、体重、脂肪量を比較した。両群マウスで体重、脂肪、その他毒性の病理などは認められなかった（データ

Fig. 2 974-Bによる線維芽細胞の脂肪細胞分化抑制⁷⁾

略)。本実験方法では化合物がマウス体内に吸収されていない可能性が否定できない。したがって、個体での974-Bの効果を明確に検出するには血管内への直接投与が必要だと考える。しかし、本研究の目的には、海藻を大量に確保し動物に餌として投与する実証試験を行うことのほうがより重要であり意義があると考えている。

また、コストだけでなく、海藻中には974-B以外にも脂肪を分化させる活性を有する物質があるので海藻を直接餌に混合する方が好ましいと推察している。さらに牛のルーメンには海藻そのものを投与してもセルロース分解できる微生物や酵素も存在しており海藻から化合物成分を抽出しなくても、牛肉生産には海藻そのものを混入させた餌を与えることで脂肪含有量を低下した肉を作成できる可能性がある。さらに、海藻ではなくお茶葉を餌に混合するという選択肢もありうる。お茶に含まれるエピガロカテキンガレートはPin 1を海藻974-Bよりも強く阻害するので^{5, 7)}、より強い脂肪低下効果が期待できる。使用済みのお茶葉が使えるなら、廃棄物を使えるのでコストも安くできる。エピガロカテキンガレートの脂肪細胞分化阻害活性についてはまだ検討していないが、今後期待できる課題である。

4. 要 約

線維芽細胞を脂肪細胞に分化させることを促進するプロリン異性化酵素Pin 1の活性を阻害し、脂肪含有量の低下した肉すなわち赤身の多い肉を生産する基盤について検討した。我々は安全な天然物からPin 1の阻害剤を探索し海藻成分中の974-Bを発見した。この化合物は線維芽細胞の脂肪細胞への分化を阻害した。海藻成分を投与しても体重減少などの急性毒性はなかった。これらの結果は海藻成分を餌に混合することで脂肪分を低

下させた肉を生産できる可能性を示している。海藻またはお茶葉を大量に確保し、動物での実証試験を行う意義はあると考えられる。

文 献

- 1) Uchida T, Furumai K, Fukuda T, Akiyama H, Takezawa T, Asano T, Fujimori F, Uchida C : Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Mouse Embryonic Fibroblast Differentiation into Adipose Cells. *PLoS One*, **7** (3) e31823, 2012.
- 2) Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya A, Zhang J, Ono H, Fujishiro M, Kikuchi T, Fukushima T, Yoneda M, Horike N, Ohno H, Kanna M, Tsuchiya Y, Kamata H, Nishimura F, Isobe T, Ogihara T, Katagiri H, Oka Y, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T : Peptidyl-prolyl cis/trans isomerase NIMA-interacting 1 associates with IRS-1 and enhances insulin actions and adipogenesis. *J Biol Chem*, **286**, 20812~20822, 2011.
- 3) Nakatsu Y, Sakoda H, Kushiya A, Ono H, Fujishiro M, Horike N, Yoneda M, Ohno H, Kamata H, Nishimura F, Ogihara T, Katagiri H, Oka Y, Fukushima T, Takahashi S, Kurihara H, Uchida T, Asano T : Pin1 associates with and induces translocation of CRTC2 to the cytosol, thereby suppressing CRE transcriptional activity. *J Biol Chem*, **285**, 33018~33027, 2010.
- 4) Mori T, Itami S, Yanagi T, Tatara Y, Takamiya M, Uchida T : Use of a Real-time Fluorescence Monitoring System for High-Throughput Screening for Prolyl Isomerase Inhibitors. *J. Biomol Screen*, **14** (4), 419~424, 2009.
- 5) Ursova DV, Shim JH, Kim DJ, Jung SK, Zykova TA, Carper A, Bode AM, Dong Z : Epigallocatechin-gallate Suppresses Tumorigenesis by Directly Targeting Pin1. *Cancer Prev Res*, **4**, 1366~1377, 2001.
- 6) Yamashita YM, Kondo S, Segawa S, Lin YC, Toyohara H, Ito H, Konoki K, Cho Y, Uchida T : Isolation and structural determination of two novel phlorotannins from the brown alga *Ecklonia kurome* Okanura, and their radical scavenging activities. *Mar Drugs*, **11**, 165~183, 2013.
- 7) Mori T, Hidaka M, Ikuji H, Yoshizawa I, Toyohara H, Okuda T, Uchida C, Asano T, Yotsu-Yamashita M, Uchida T : A High-Throughput Screen for Inhibitors of the Prolyl Isomerase, Pin1, Identifies a Seaweed Polyphenol that Reduces Adipose Cell Differentiation. *Biosci, Biotechnol Biochem* (in press)

完全自給粗飼料給与における放牧と未放牧が日本短角種の肉質に与える影響

Effect of grazing on meat quality of Japanese Shorthorn under complete grass-fed beef production system

小笠原 英毅・岡山 和代*

(北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター, *北里大学保健衛生専門学院管理栄養科)

Hideki Ogasawara and Kazuyo Okayama*

(Field Science Center, School of Veterinary Medicine, Kitasato University, *Department of Applied Clinical Dietetics, Kitasato Junior College of Health and Hygienic Sciences)

To further understand the complete grass-fed beef production system, we produced the complete grass-fed beef in Yakumo Experimental Farm, Field Science Center of Kitasato University and investigated the effect of grass-feeding on meat quality of Japanese Shorthorn. We analyzed carcass quality, meat quality, distribution of muscle fiber type, nutrient composition, fatty acid composition, and sensory evaluation of complete grass-fed beef (*M. longissimusthoracis* (LT) and *M. biceps femoris* (BF)) with three different feeding systems (GH: grazing period (Jun-Nov.2011, Jun-Nov.2012), HH: zero-grazing period, HG: grazing period (Jun-Nov.2011, Jun-Nov. 2012, Jun-Nov.2013)).

There was no significant difference in carcass quality and meat quality among the three groups. We found that grass-feeding changed fast skeletal muscle fiber types to slow skeletal muscle type. Furthermore the grass-feeding induced 3-hydroxybutyrate dehydrogenase in slow skeletal muscle fiber types in the LT and the BF muscle ($P < 0.05$). The rate of moisture was increased in the HG managed beef compared to the GH and HH managed beef. While HG management resulted in the reduced rate of the intramuscular fat. We also found that the rate of the intramuscular fat were increased in the HG-managed BF muscle compared to the HG-managed LT muscle and there were differences in fatty acid composition between the muscles. These findings suggest that the grazing make a difference between LT and BF muscle. The flavor and juiciness showed lower scores in of HG-managed beef compared to GH- and HH-managed beef. However, the overall acceptability similar scores among the three groups. In conclusion, the grass feeding-induced change of muscle fiber types didn't affect meat quality and sensory characteristics.

1. 目 的

近年、耕作放棄地の利用など放牧を取り入れた肉牛生産方式が徐々に普及しているが、国内畜産の生産体系は脂肪交雑を重視した牛肉と効率的な

生産が慣行的であるため、輸入穀物飼料の給与が必須であり、自給粗飼料を活用した牛肉生産は未だ確立されていない。北里大学獣医学部附属フィールドサイエンスセンター八雲牧場（八雲牧場）は、夏は放牧、冬は舎飼の自給粗飼料のみで

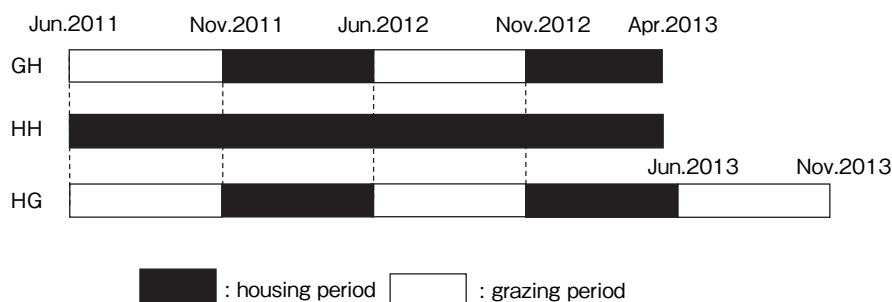


Fig. 1 Feeding systems in this study.

GH : grazing period (Jun-Nov.2011, Jun-Nov.2012).

HH : zero-grazing.

HG : grazing period (Jun-Nov.2012, Jun-Nov.2013).

肉牛生産（北里八雲方式）を実践しており，出荷月齢は約33ヶ月で，生体重は約700kgに達する。その肉質は筋肉内脂肪が少ない赤肉が主体であり，筋組織を構成する筋線維型は機能性成分であるカルニチンを多く含む赤色筋線維（Ⅰ型およびⅡA型）の構成割合が慣行肥育牛よりも多いことが明らかとなっている^{1, 2)}。

北里八雲方式では春から秋まで屋外で飼養されるため，飼養管理上，作業の省力化，景観の保持に関する優位性は明白であるが，放牧が肉牛を生産する上で産肉性および牛肉の「おいしさ」にどの程度，貢献するかは不明な点が多い。「おいしさ」を評価する場合，一般的には理化学的分析と官能評価が用いられる。また，肉質の特性を把握するために筋線維型構成割合を算出するが，最近では筋線維型と食味性に高い相関を持つ報告もある³⁾。我々の研究で一般消費者に行った舎飼期出荷の北里八雲牛の官能調査では，「外観・食味」に関しては高い評価が得られたが，慣行牛と比較して「柔らかさ」に関しては評価が分かれた⁴⁾。しかしながら，北里八雲方式によって生産された牛肉の「おいしさ」を厳密に評価するためには単に穀物給与で生産された牛肉との比較ではなく，北里八雲方式のキーポイントとなる放牧の影響を解析しなければならない。以上のことから，本研究では放牧による筋線維型構成割合の変動と「お

いしさ」への影響に着目し，北里八雲方式である放牧を主体とした自給粗飼料のみでの飼養管理と未放牧（通年舎飼で飼養管理する処理）で自給粗飼料のみでの飼養管理で生産された日本短角種の牛肉特性を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試牛および飼養管理

供試牛は2010年3月～2011年5月生まれの日本短角種雄9頭とし，3～4ヶ月齢時に除角および去勢を行い，6ヶ月齢まで自然哺乳と自給粗飼料（夏期間：放牧草，冬期間：ロールラップおよびグラスサイレージ）のみで飼養され，7ヶ月齢以降，自給粗飼料のみを飽食させた（北里八雲方式）。出荷時の月齢を調整するため，2011年6月に供試牛を3つの牛群に分け，放牧期に放牧，舎飼期に舎飼させ出荷した群（放牧—舎飼区（grazing-housing:GH）：3頭），2ヶ月齢以降，放牧させなかった未放牧群（舎飼—舎飼区（housing-housing:HH）：3頭），舎飼期に舎飼いさせ，放牧後に出荷した群（舎飼—放牧区（housing-grazing:HG）：3頭）とした（Fig.1）。試験開始時の平均月齢はGH, HHおよびHG区でそれぞれ 11 ± 3 , 10 ± 3 , 3 ± 2 ヶ月齢であった。各区の給与飼料はGHおよびHG区では放牧期は放牧草を，舎飼期はグラスおよびロールラップサイ

レーズを自由採食させた。HH区では放牧期は採草地からその都度刈り取った青刈り牧草を、生草重量で日量40kg／頭以上給与し、舎飼期は他の区と同様の給与飼料とした。GHおよびHH区は2013年4月に、HG区は2013年11月に北海道畜産公社十勝工場に出荷し、得られたサンプルを以下の実験に用いた。

2.2 枝肉成績

公益社団法人日本食肉格付協会の発行する牛枝肉格付明細書を基に枝肉成績を解析した。

2.3 組織化学的解析

枝肉断面より最長筋 (*M. longissimus thoracis*)、大腿二頭筋 (*M. biceps femoris*) を採取し、ドライアイスーアセトンにより新鮮凍結サンプルを作製した。その後、10 μ mの凍結切片を作製し、組織構造の解析のため、アザン染色を行った。また、連続切片を作製し、myosin-slow (I型) および fast (II型) 抗体を用いた免疫組織化学的染色で、酵素化学的染色によりミトコンドリアのニコチンアミドアデニンジヌクレオチド脱水素酵素 (nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase : NADH) 活性 (II A型) および 3 - ヒ ド ロ キ シ 酪 酸 脱 水 素 酵 素 (3-hydroxybutyrate dehydrogenase : HBD) 活性 (I D型) を染色し、光学顕微鏡 (OLYMPUS, BX43) で観察した。また、1切片3ヶ所を無作為に選択し、得られた染色像より各筋組織におけるI, I D, II A, II B型の筋線維型構成割合を算出した⁵⁾。

2.4 栄養成分および脂肪酸組成

各試験区の最長筋および大腿二頭筋は適正な条件下でのウェットエージングを14日間行った。分析に用いるサンプルは皮下脂肪を取り除き、赤身部分のみをミンチ状にし、真空状態で分析まで-30℃で保存した。栄養成分分析は熱量、水分、タンパク質、脂質、炭水化物について日本食品機能

分析研究所に委託し、測定した。

脂肪酸組成の分析ではデカン酸 (C10:0)、ラウリン酸 (C12:0)、ミリスチン酸 (C14:0)、ミリストレイン酸 (C14:1)、ペンタデカン酸 (C15:0)、ペンタデセン酸 (C15:1)、パルミチン酸 (C16:0)、パルミトレイン酸 (C16:1)、ペプタデカン酸 (C17:0)、ペプタデセン酸 (C17:1)、ステアリン酸 (C18:0)、オレイン酸 (C18:1)、リノール酸 (C18:2)、リノレン酸 (C18:3)、アラキジン酸 (C20:0)、ベヘン酸 (C22:0)、リグノセリン酸 (C24:0) の17種類について食品分析開発センターに委託し、測定した。脂肪酸組成は各脂肪酸のピーク面積の和を100%とし、各脂肪酸の面積比から算出した。

2.5 官能評価

(1) パネルの選定

官能評価の対象者となるパネルは北里大学保健衛生専門学院の学生 (10~20代) を対象とし、事前に調査項目の説明を行い、同意の得られた被験者のみに4味 (甘味、塩味、酸味、うま味) の濃度差識別テスト⁶⁾を行い、全て識別できた学生のみを官能評価のパネル (33名: 男性7名, 女性26名) とした。

(2) 調理方法

調理は北里大学保健衛生専門学院管理栄養科調理室にて実施し、折目らの報告に従って行った⁷⁾。部分肉の状態でウェットエージングを14日間行った最長筋はステーキカット (約200 g) し、真空包装後、官能評価で使用するまで-30℃で保存した。試験前日に2℃で24時間かけて自然解凍したものを使用した。解凍した牛肉は、調理20分前に常温に置き、2 cm角に整形後、各面を強火 (250℃) で約1分間焼いた。中心温度計 (防滴型 ペン温度計CT-410WR) で肉の中心温度を測定し、52℃になるまで加熱後、紙皿に移し、味付け

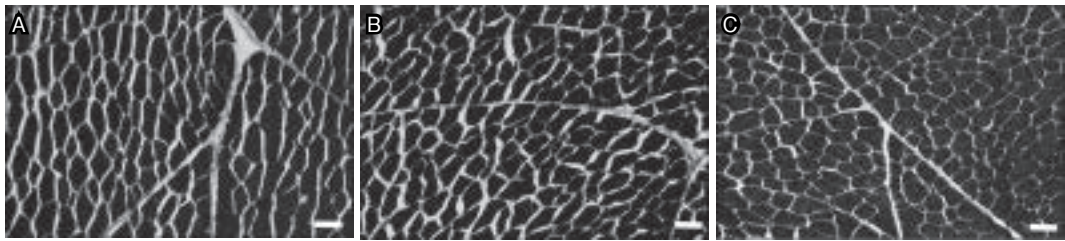


Fig.2 Histochemical analysis of *M. longissimus thoracis* in different feeding systems. Azan stained section of GH (A), HH (B), HG (C). Scale bars = 100 μ m

なしで官能評価を行った。

(3) 官能評価

食肉の官能評価ガイドライン⁶⁾および折目らの方法⁷⁾に従って、官能評価を行った。項目は肉色 (1 : 悪い→5 : 好ましい), 風味 (1 : 弱い→5 : 強い), うまみ (1 : 弱い→5 : 強い), 硬さ (1 : 硬い→5 : 柔らかい), 多汁性 (1 : パサパサ→5 : ジューシー), 総合評価 (1 : 苦手→5 : 好ましい) を含めた6項目を調査した。評価環境は蛍光灯下でクローズドパネル法, 試料コードはA, B, Cとし, 1から5の評価点で評価した。

2.6 統計処理

得られたデータは分散分析とライアンの方法で多重比較検定を行い, Welch's t-testで有意差検定を行った。危険率が5%未満で有意水準とした。

3. 結果と考察

3.1 枝肉成績

完全自給飼料給与を基本とした異なる飼養管理で出荷された日本短角種の枝肉成績を解析した。供試牛の出荷月齢はGH, HHおよびHG区でそれぞれ 34 ± 3 , 34 ± 3 および 32 ± 3 ヶ月齢で, 枝肉重量ではそれぞれ 398 ± 16 , 374 ± 42 , 361 ± 13 kgで有意な差はなかった。皮下脂肪厚ではGH, HHおよびHG区でそれぞれ 2.2 ± 0.5 , 2.5 ± 0.1 , 1.7 ± 0.6 cmで, HG区で他の区よりも薄い傾向が認められたが, ロース芯面積, バラ厚など他項目におい

ても各区に有意な差は認められなかった。また, 各試験区の出荷月齢の違いを考慮し各項目を個体ごとに解析したが, 出荷月齢に連動した枝肉成績への影響は観察されなかった。

3.2 組織化学的解析

各区の最長筋 (*M. longissimus thoracis*), 大腿二頭筋 (*M. biceps femoris*) の組織学的解析では, 各区の組織構造に顕著な差は認められなかった (Fig. 2)。両骨格筋組織の筋線維型構成割合を算出したところ, 最長筋ではHG区でI型筋線維の割合が低く, II A型筋線維の割合が高かった ($p < 0.05$)。また, GHおよびHH区で発現が認められなかったI D型筋線維がHG区では少数観察された。大腿二頭筋では各区でI D型筋線維の発現が認められ, HG区では最長筋よりも高い構成割合であった (Table 1)。I型筋線維の中で3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素 (3-hydroxybutyrate dehydrogenase : HBD) 活性の高い筋線維がI D型筋線維に分類されるため, HG区の両骨格筋におけるI型筋線維の構成割合の減少はI D型筋線維の構成割合の増加に起因する。I D型筋線維に関する報告は少なく, 我々は放牧期の骨格筋組織においてI D型筋線維の構成割合が増加すること, また, その構成割合は姿勢維持など持続的に働く骨格筋組織で高いこと, さらにI D型筋線維は筋線維内に小型の脂肪滴を有することを明らかにしている²⁾。HG区でのI D型筋線維構成割合の増加はこれまでの結果と一致した。IおよびI

Table 1. Comparison of myofibertype distribution in *M. longissimus thoracis* and *M. biceps femoris* among different feeding systems.

Feeding system	<i>M. longissimus thoracis</i>			
	Percentage distribution			
	I	I D	II A	II B
GH (n = 3)	29.8 ± 7.9 ^a	n.d	5.8 ± 4.4 ^{ab}	64.4 ± 11.2
HH (n = 3)	31.3 ± 4.2 ^a	n.d	3.6 ± 1.3 ^a	65.1 ± 4.5
HG (n = 3)	19.8 ± 3.3 ^b	5.2 ± 5.9	10.3 ± 4.6 ^b	64.6 ± 6.1

Feeding system	<i>M. biceps femoris</i>			
	Percentage distribution			
	I	I D	II A	II B
GH (n = 3)	18.5 ± 5.5 ^a	0.8 ± 1.9 ^a	14.3 ± 4.9 ^a	66.4 ± 5.0
HH (n = 3)	21.3 ± 9.6 ^{ab}	3.2 ± 3.9 ^a	8.4 ± 2.7 ^b	67.0 ± 11.1
HG (n = 3)	11.4 ± 2.2 ^b	13.4 ± 2.9 ^b	19.5 ± 8.2 ^a	55.7 ± 9.8

Values are expressed as mean ± SD. n.d: not detected.

^{a, b, c}Values of each myofiber type with same superscript are not significantly different between feeding systems (P<0.05).

Table 2. Nutrient composition of *M. longissimus thoracis* and *M. biceps femoris* among different feeding systems.

<i>M. longissimus thoracis</i>					
Feeding system	energy (kcal/100g)	moisture (%)	fat (%)	protein (%)	carbohydrate (%)
GH (n = 3)	170.3 ± 29.5	68.5 ± 3.1	9.6 ± 3.5	19.1 ± 0.7	1.0 ± 0.4
HH (n = 3)	186.0 ± 16.1	67.0 ± 1.5	11.5 ± 2.0	19.5 ± 0.6	1.0 ± 0.4
HG (n = 2)	130.5 ± 6.4	72.5 ± 0.9	4.9 ± 0.6	20.9 ± 0.3	0.8 ± 0

<i>M. biceps femoris</i>					
Feeding system	energy (kcal/100g)	moisture (%)	fat (%)	protein (%)	carbohydrate (%)
GH (n = 3)	158.0 ± 22.5	69.6 ± 2.1	8.1 ± 2.8	20.2 ± 0.8	1.1 ± 0.3
HH (n = 3)	148.0 ± 21.0	70.4 ± 1.3	6.7 ± 1.3	21.0 ± 0.4	1.0 ± 0.4
HG (n = 2)	190.0 ± 38.2	67.2 ± 3.0	12.5 ± 5.2	18.3 ± 1.5	1.1 ± 0.7

D型筋線維は主として脂肪酸を筋収縮エネルギーとして利用する。放牧飼養では行動量が増加すること、皮下脂肪厚がHG区で薄い傾向にあることから体内の脂肪を分解して筋組織にエネルギー源として動員され、I D型筋線維が増加すると推測された。また、最長筋と大腿二頭筋におけるI D型筋線維の構成割合の違いは大腿二頭筋が最長筋よりも姿勢保持に関わり、運動負荷が高い骨格筋組織であることを示唆する。

3.3 栄養成分および脂肪酸組成

最長筋および大腿二頭筋の栄養成分（熱量、水分、脂質、タンパク質、炭水化物）をTable 2に示す。全ての項目で個体数の関係から有意差が認められなかったが、最長筋ではHG区で水分含量が高く、脂質含量が低いことに連動し、熱量がGHおよびHH区よりも低かった。一方、大腿二頭筋では最長筋とは異なり、HG区で脂質含量が高いことから、熱量がHG区で高かった。分析サンプルは皮下脂肪を除去していることから、皮下脂肪の混入は少なく、HG区における脂質含量の増

Table 3. Fatty acid composition of *M. longissimus thoracis* and *M. biceps femoris*.

<i>M. longissimus thoracis</i>				<i>M. biceps femoris</i>			
	GH (n = 3)	HH (n = 3)	HG (n = 3)		GH (n = 3)	HH (n = 3)	HG (n = 3)
C10 : 0	n.d	n.d	n.d	C10 : 0	n.d	n.d	n.d
C12 : 0	n.d	n.d	n.d	C12 : 0	n.d	n.d	n.d
C14 : 0	2.37 ± 0.83	2.63 ± 1.03	2.73 ± 0.45	C14 : 0	2.27 ± 0.93	2.37 ± 0.85	2.73 ± 0.31
C14 : 1	0.60 ± 0.35	0.70 ± 0.30	0.53 ± 0.21	C14 : 1	0.77 ± 0.55	0.73 ± 0.21	1.13 ± 0.42
C15 : 0	0.53 ± 0.12	0.67 ± 0.21	0.57 ± 0.06	C15 : 0	0.57 ± 0.21	0.43 ± 0.06	0.67 ± 0.06
C15 : 1	n.d	n.d	n.d	C15 : 1	n.d	n.d	n.d
C16 : 0	29.13 ± 2.45	29.60 ± 3.22	28.93 ± 2.16	C16 : 0	26.93 ± 1.78	26.73 ± 2.37	24.70 ± 1.91
C16 : 1	3.43 ± 0.93	3.60 ± 0.80	4.13 ± 0.85	C16 : 1	5.13 ± 1.81	5.03 ± 0.50	7.30 ± 2.78
C17 : 0	1.47 ± 0.06	1.63 ± 0.15	1.70 ± 0.10	C17 : 0	1.67 ± 0.15	1.57 ± 0.06	1.57 ± 0.15
C17 : 1	n.d	n.d	0.07 ± 0.06	C17 : 1	0.10 ± 0	0.13 ± 0.06	0.10 ± 0
C18 : 0	14.40 ± 1.15	14.17 ± 0.95	15.07 ± 3.06	C18 : 0	11.37 ± 1.87	10.87 ± 0.85	10.27 ± 2.70
C18 : 1	44.70 ± 4.70	43.40 ± 5.22	41.93 ± 4.01	C18 : 1	47.20 ± 4.42	47.60 ± 5.28	47.63 ± 2.07
C18 : 2	1.50 ± 0.30	1.60 ± 0.17	2.23 ± 0.25	C18 : 2	1.90 ± 0.36	2.20 ± 0.30	1.97 ± 0.15
C18 : 3	1.10 ± 0.20	1.33 ± 0.15	0.97 ± 0.06	C18 : 3	0.87 ± 0.21	1.07 ± 0.15	0.83 ± 0.06
C20 : 0	0.10 ± 0	0.13 ± 0.06	0.03 ± 0.06	C20 : 0	n.d	n.d	n.d
C22 : 0	n.d	n.d	n.d	C22 : 0	n.d	n.d	n.d
C24 : 0	0.03 ± 0.06	0.03 ± 0.06	0.13 ± 0.06	C24 : 0	0.10 ± 0	0.10 ± 0	0.13 ± 0.06
SFA ¹⁾	46.03 ± 3.43	46.57 ± 4.05	46.90 ± 5.57	SFA	40.67 ± 3.37	40.07 ± 4.04	37.83 ± 4.65
MUFA ²⁾	48.13 ± 4.32	47.00 ± 4.59	46.07 ± 4.84	MUFA	52.33 ± 4.05	52.63 ± 4.83	54.93 ± 4.22
PUFA ³⁾	2.60 ± 0.50	2.93 ± 0.32	3.20 ± 0.20	PUFA	2.77 ± 0.55	3.27 ± 0.45	2.80 ± 0.10

Values are expressed as mean ± SD. n.d : not detected.

¹⁾ Saturated fatty acids : total of C10 : 0, C12 : 0, C14 : 0, C16 : 0, C18 : 0, C20 : 0, C22 : 0, C24 : 0.

²⁾ Monounsaturated fatty acids : total of C16 : 1, C18 : 1.

³⁾ Polyunsaturated fatty acids : total of C18 : 2 and C18 : 3.

加は組織学的解析で明らかとなった大腿二頭筋における I D 型筋線維内に存在する脂肪滴が影響している可能性が示唆された。

最長筋および大腿二頭筋の脂肪酸組成をTable 3に示す。各区の最長筋および大腿二頭筋の各脂肪酸組成に有意な差は認められなかった。一般的に牛肉はオレイン酸の割合が高く、パルミチン酸とステアリン酸の割合が少ないほど風味が良いとされ、オレイン酸の割合と風味の好ましさに正の相関があることが報告されている^{8, 9)}。また、松本らは放牧飼養した黒毛和種において、オレイン酸の割合と多価不飽和脂肪酸 (PUFA) が増加することを報告している¹¹⁾。しかしながら、本試験で

はオレイン酸を含む全ての脂肪酸組成に有意な差が認められず、放牧と自給粗飼料のみで生産する北里八雲方式では給与飼料が同様であるため、出荷時期が異なることや放牧飼養 (運動負荷) によっても牛肉の脂肪酸組成に与える影響は少ないと考えられた。本試験とトウモロコシサイレージを給与して生産された日本短角種の半腱様筋の脂肪酸組成¹⁰⁾を比較すると、最長筋では飽和脂肪酸 (SFA) が高く、一価不飽和脂肪酸 (MUFA) が低かったが、半腱様筋の近部である大腿二頭筋ではSFAおよびMUFAの値に差が見られなかった。大腿二頭筋では脂肪滴を有する筋線維が多く存在するため、この脂肪滴の脂肪酸割合と骨格筋の部

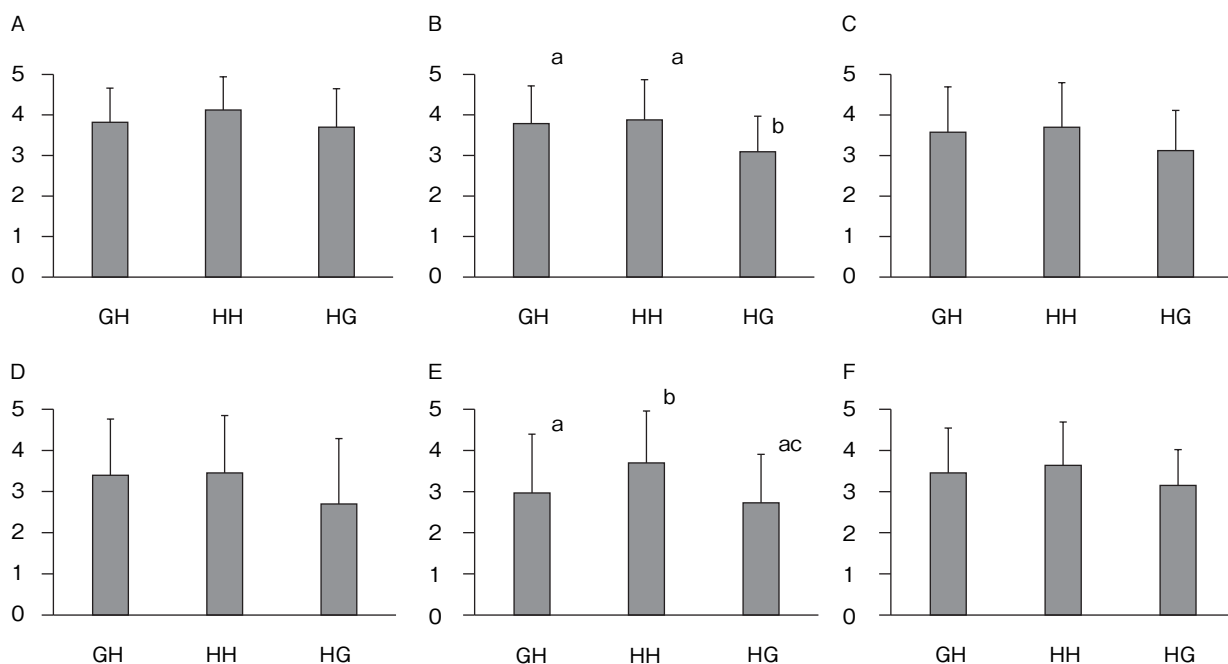


Fig.3 Sensory characteristics of *M. longissimus thoracis* among different feeding systems.

A : meat color. B : flavor. C : umami. D : tenderness. E : juiciness. F : overall acceptability.

Data are expressed mean $\pm$ SD. Data with same superscript are not significantly different between feeding systems ($P < 0.05$).

位の違いによる脂肪酸含量の相違は今後の検討課題である。

3.4 官能評価

最長筋における官能評価をFig. 3に示す。牛肉の外観 (Fig.3A), 風味 (Fig.3B), うまみ (Fig.3C), 硬さ (Fig.3D), 多汁性 (Fig.3E), 総合評価 (Fig.3F) について、パネルに評価させた。風味ではHG区と比較して、GHおよびHH区で有意に高く、多汁性ではHH区と比較して、GHおよびHG区で有意に低い評価であった。その他の項目では各区に有意な差は認められなかったが、硬さにおいてHG区で低い評価の傾向があった (つまり硬い)。一般的に牛肉の硬さは穀物給与のような高栄養で肥育された牛の牛肉では筋間脂肪が入り込み、脂肪組織は筋線維や結合組織よりも脆弱なため、柔らかくなり、放牧飼養は穀物給与と比較して低栄養状態により、脂肪組織の浸潤も少

なく、運動負荷により、筋線維が太くなり硬くなる⁹⁾。風味は筋線維の分解が進むことで強くなるため⁷⁾、組織学的解析では観察されなかったが、運動負荷の強いHG区では風味が低下する要因になるとも考えられた。また、多汁性においても同様の要因が考えられ、栄養成分の結果ではHH区で脂質割合が高く、HG区では低いことから、筋肉内の脂質含量の多さが風味や多汁性に影響した可能性が考えられた。今回の官能評価では事前に4味の濃度差を識別できたパネルを選別したことから、パネルによる味覚の差は影響しないと仮定すると、パネルの約80%が女性であったため、噛む力の違いによる性差の影響も考えられた。しかしながら、今回の結果では骨格筋の部位の違いによる検討課題は残るが、最長筋においては硬さや総合評価で各区に有意な差はないことから、北里八雲方式で飼養される日本短角種では出荷時期

が異なり、さらに2ヶ月齢以降未放牧でも牛肉のおいしさに与える影響が小さいことが示唆された。

4. 要 約

本研究は放牧など自給粗飼料給与による牛肉の持続的生産の確立と向上を目指し、出生から出荷に至るまで完全自給粗飼料のみで生産された日本短角種の牛肉の特性解明を目的とした。

完全自給飼料給与を基本とする異なる飼養管理および出荷時期（GH区、HH区、HG区）で生産、出荷された日本短角種去勢雄、各3頭を供試牛とした。組織化学的解析では各区の最長筋および大腿二頭筋の筋線維型構成割合を算出し、最長筋ではHG区でI型筋線維の割合が低く、IIA型筋線維の割合が高かった（ $p < 0.05$ ）。また、GHおよびHH区で発現が認められなかったID型筋線維がHG区では少数観察された。大腿二頭筋では各区でID型筋線維の発現が認められ、HG区では最長筋よりも高い構成割合であった。栄養成分ではHG区で水分含量が高く、脂質含量が低いことから、熱量がGHおよびHH区よりも低かった。一方、大腿二頭筋では最長筋とは異なり、脂質含量が高いことから、熱量がHG区で高かった。HG区における脂質含量の増加は組織学的解析で明らかとなった大腿二頭筋におけるID型筋線維内に存在する脂肪滴の影響の可能性が示唆された。各区の最長筋および大腿二頭筋の各脂肪酸組成では有意な差は認められなかったが、両骨格筋で脂肪酸組成が異なることから、骨格筋の機能性の違いが脂肪酸組成に影響を与える可能性が示唆された。官能評価では風味でHG区と比較して、GHおよびHH区で有意に高く、多汁性ではHH区と比較して、GHおよびHG区で有意に低い評価であった。しかしながら、今回の結果では硬さや総合評価で各区に有意な差はなかった。

本研究により、北里八雲方式で飼養される日本

短角種の最長筋において放牧ならびに舍飼出荷など出荷時期が異なること、放牧によって筋線維型構成割合が変動することが牛肉の「おいしさ」に与える影響が少ないことが示唆され、放牧など自給粗飼料給与による牛肉の持続的生産方式確立のための基礎的知見が得られた。今後、最長筋以外の骨格筋で同様の試験を行い、放牧など自給粗飼料給与によって生産される牛肉の「おいしさ」を追求する必要がある。

文 献

- 1) 萬田富治, 畔柳正, 中井淳二, 東善行: 日本における放牧畜産の技術的展望, 栄養生理学会報, 49 (2), 27~29, 2005.
- 2) 小笠原英毅, 岡田海渡, 小林美里, 渡邊康一, 麻生久, 寶示戸雅之: 放牧飼養が日本短角種の枝肉成績と筋線維型構成割合に及ぼす影響, 日本畜産学会第117回講演要旨, (118), 2013.
- 3) 渡邊康一, 山口高弘: 食肉とその肉製品の食品組織学, 前編「食肉の科学」, 45 (2), 151~158, 2004.
- 4) Orime A., Yonezawa T., Ogasawara H., Kuroyanagi T., Manda T.: Analysis of preference for domestic grass-fed beef in Japanese youths, *Animal Science Journal*, 83, 268~271, 2012.
- 5) 鈴木惇, 大和田修一, 玉手英夫: 黒毛和種とホルスタイン種の骨格筋における筋線維内脂肪滴の有無と各筋線維型の割合と太さ, 日畜会報: 49 (4), 262~269, 1978.
- 6) 財団法人日本食肉センター: 食肉の官能評価ガイドライン, 独立行政法人家畜改良センター編, 東京, 2005.
- 7) 折目愛, 小笠原英毅, 岡山和代: 平成22年度食肉に関する助成研究調査報告書, VOL.29, 68~74, 2010.
- 8) Mandall IB, Effects of forage vs grain feeding on carcass characteristics, fatty acid composition, and beef quality in Limousin-cross steers when time on feed is controlled, *J. Anim. Sci.* 76, 2619 ~ 2630, 1998.
- 9) Westerling D.B., H.B. Hedrick: Fatty acids composition of bovine lipids as influenced by diet, sex and anatomical location and relationship to sensory characteristics, *J. Anim. Sci.* 48, 1343~1348, 1979.
- 10) 米内光晴, 今成麻衣, 柴伸弥, 樋口幹人, 渡邊彰: 有機認証短角牛肉の脂肪酸組成, 東北畜産学会報, 60 (3), 123~126, 2011.
- 11) 農文協: 最新農業技術, 畜産vol.4, 76, 2012.

畜肉生産性向上を目指した分岐鎖アミノ酸強化 飼料用ダイズの開発

Improvement of branched chain amino acid contents in soybean for high
quality meat production

湯 浅 高 志・松 尾 光 弘・井 上 眞 理*

(宮崎大学農学部, *九州大学大学院農学研究院)

Takashi Yuasa, Mitsuhiro Matsuo, Mari Iwaya-Inoue*

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki; *Faculty of Agriculture, Kyushu University)

Amino acid contents in soybean seed are the most important roles in an aspect of food nutrition. Among amino acids, branched chain amino acid (BCAA) group including leucine and isoleucine and valine, have appeared to have significant effects on cell proliferation, protein synthesis and energy metabolism. BCAA amino transferases are the rate limiting enzymes for BCAA synthesis. It is expected that meat production and quality are improved by feeding meat animals with high BCAA soybean. To increase BCAA content in soybean seed with a genetic method, we focused on BCAA metabolism and *BCAT* genes responsible for BCAA synthesis in soybean. It is necessary to identify *BCAT* genes which are expressed specifically in developing soybean seed because multiple genes of BCAT-related enzymes are expected in soybean genome. Amino acid analysis with OPA/NAC HPLC system indicates that seed BCAA contents transiently increased and peaked at 7 day after reproductive stage 5 (RS5) and then rapidly decrease to the end of the seed filling stage while glutamine content continuously decreased during the seed filling stage. It suggests that high BCAA content accelerated seed cell proliferation at the early seed filling stage and then BCAA and glutamine are converted to seed storage proteins during the late seed filling stage. BLAST search for soybean BCAT homologs in soybean genome on Phytozome ver.8 predicted at least 5 putative BCAT-related genes. RT-PCR shows that *GmBCAT3* expression level was high at the early seed filling stage and then gradually decreased. On the other hand, *GmBCAT4* expression peaked during 14 to 28 day after RS5 and then decreased at the late seed filling stage. RT-PCR and immunoblot with anti-BCAT antibody reveals that sugar starvation treatment on soybean seedling induced *GmBCAT3* mRNA and the protein. The present data indicates that the expression of *GmBCAT3* and *GmBCAT4* are possible candidate of *BCAT* genes responsible for BCAA synthesis in soybean seed and that *GmBCAT3* are regulated by complicated manners along seed developmental stage and nutrient conditions.

1. 目 的

ダイズ子実のタンパク質含有率は約35%と、植物としては非常に高く、栄養価の高い作物として、また健康維持に有効な機能性食品として近年注目されてきた。タンパク質は20種類のL-アミノ酸から構成されており、生体内において各アミノ酸にはそれぞれ異なった多様な生理機能があることが知られている。なかでも疎水性アミノ酸のうちロイシン、イソロイシン、バリンは分岐鎖アミノ酸（BCAA：Branched-chain amino acid）と呼ばれ、特にエネルギー代謝や細胞増殖、翻訳・転写活性を促進する効果がある（Kimball *et al.* 2006）。ダイズの子実におけるBCAA含量を増加することで食品の機能性栄養強化と飼料の畜肉生産効率増大が期待される。

BCAA合成系と分解系のどちらにも関与する重要な酵素として、分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素（BCAT：Branched-chain aminotransferase）がある。合成経路では最終段階で α -ケト酸をアミノ酸に変換する反応を、分解経路では最初の段階でそれぞれのアミノ酸を α -ケト酸へと分解する反応を触媒する。シロイヌナズナ（*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.）では、合成系BCATは葉緑体、分解系BCATはミトコンドリアに局在することが知られている（Diebold *et al.* 2002, Schuster *et al.* 2005）。シロイヌナズナBCATは、6つのAtBCAT遺伝子ファミリーによってコードされ、AtBCAT-1はミトコンドリア、AtBCAT-2,3,5は葉緑体、AtBCAT-4, 6は細胞質に局在する酵素であることが知られている（Schuster *et al.* 2005）。植物におけるBCATの研究は、シロイヌナズナの他に、ホウレンソウ（*Spinacia oleracea* L.）やトマト（*Solanum lycopersicum* L.）などごく少数の植物で行われている（Binder *et al.* 2007, Maloney *et al.* 2010）。近年、BCATやアミノ酸

代謝酵素の遺伝子発現をマスター調節する糖飢餓誘導性bZIP転写因子が報告されており、発生段階や外環境シグナルによりBCATが複雑に制御される可能性が示唆された（Dietrich *et al.* 2011, Kaneko *et al.* 2013）。

ダイズBCATはダイズの栄養機能性に重要な働きをしていることが期待されるものの、その遺伝子発現、細胞内局在や生化学的性質についてはほとんど報告されていない。そこでダイズのBCAA含量増大に向けた遺伝的改良に必要なダイズBCAT遺伝子およびアミノ酸動態に着目し、まず子実肥大期のダイズ子実の分岐鎖アミノ酸含量の変動と、ダイズのBCAT遺伝子の探索および発現レベルの解析を行った。

2. 方 法

2.1 栽培条件

供試作物としてダイズ（*Glycine max* (L.) Merr.）‘フクユタカ’を用い、九州大学貝塚圃場において基肥として苦土石灰と豆化成を1a当り各15kg施し、2012年7月23日に種子深度が3cmになるように2粒ずつ播種し覆土した。播種後、土壤の表面が適度に湿る程度に灌水を行った。灌水と除草、農薬(スミチオン、マラソン)散布は適宜行った。

2.2 摘葉、摘莢処理

ソースーシンクバランスを変化させるために自然条件下で栽培したコントロール区と、処理区として、各本葉において3枚の小葉のうち2枚を切除した摘葉区、節ごとに莢の数が半分になるように莢を切除した摘莢区を設けた。国際的に使用されているダイズの生育時期の表示（Hashimoto 1980）に従い、処理開始は子実肥大始（R5）とし、摘葉区では10月8日に、摘莢区では10月9日に処理を行った（Fig. 1）。

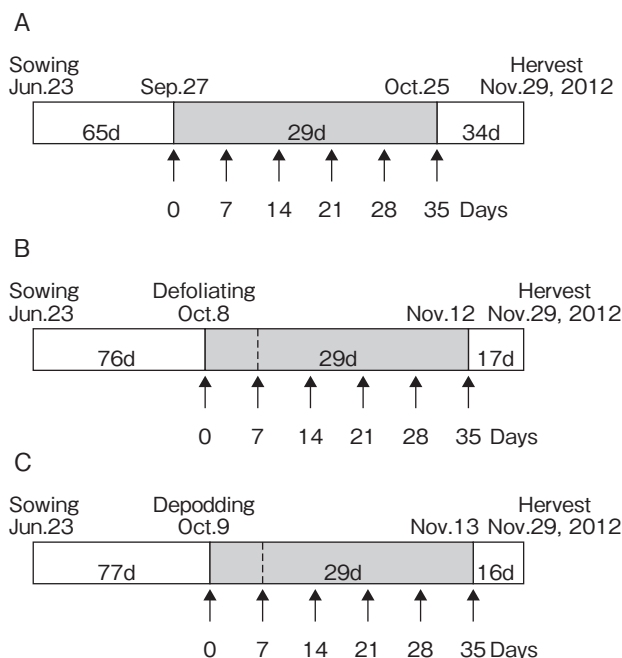


Fig. 1 Treatments and sampling intervals of soybean (A) Control, (B) Defoliation, (C) Depodding.

2.3 サンプリング

子実肥大開始 (R 5) から子実肥大盛 (R 6) の間でサンプリングを行った。子実肥大期に入る前に、成長速度が同じ個体を選抜してラベリングした。粒長が3 mm以上に達した時点の子実肥大開始0日目として、7日おきに計6回、2個体1株を1反復としてサンプリングを行った。コントロール区は5反復、摘葉区と摘莢区はそれぞれ3反復行った。

1株内のすべての莢から種子を取り出し、粒数と粒重を量った後、1粒あたりの重さの平均を算出した (Fig. 2)。その平均値に近い種子をランダムに選んで1 g前後になるように量り取り、素早くアルミホイルでサンプルを覆い、液体窒素で瞬間凍結させ -80°C で保存した。

2.4 全アミノ酸、遊離アミノ酸の調製

滅菌済みの乳鉢を氷上に置き、 -80°C に保存しておいたサンプルと $10\times$ サンプル重量 (mL) の20mMリン酸バッファー (等量の20mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot$

$2\text{H}_2\text{O} + 20\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$) を入れ、液体状になるまで乳鉢で破碎する。破碎液を、2本のフタ付2 mLチューブに0.4mLずつ入れ、一方をTotalアミノ酸分析用、もう一方をFreeアミノ酸分析用の試料とした。0.4mLの破碎液が入ったチューブに、0.6mLの10M HClを加え素早くフタをし、 110°C に設定したインキュベーター内で12時間保温し完全に塩酸加水分解した。12時間後チューブを取り出し、 4°C 、13,000rpm、15分遠心分離した。浮遊物が混入しないように上清を吸い取ってフタ付2 mLチューブに移し、10M NaOHでpH 7付近になるように調節したものを全アミノ酸分析用とした。0.4mLの破碎液が入ったチューブに、0.5mL滅菌水、100% 0.1mLトリクロロ酢酸を加え素早くフタをし、 -4°C で12時間冷却した。12時間後チューブを取り出し、 4°C 、13,000rpm、15分遠心分離した。上清をフタ付2 mLチューブに移し、Totalアミノ酸試料全量の10%量の400mMリン酸バッファーを加え、Totalアミノ酸試料と等量に

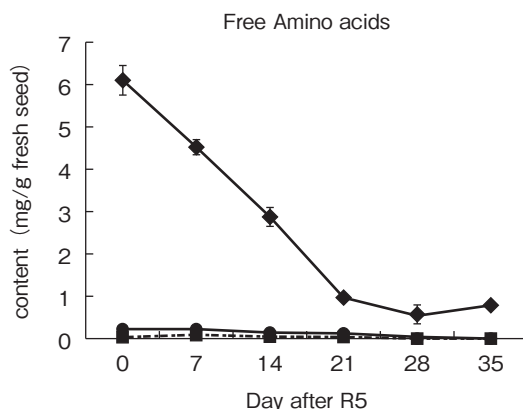


Fig.2 Profiles of free glutamine and free BCAA contents and free BCAA contents in soybean seeds during the seed filling stage (Control). BCAA (Branched chain amino acids) (◆) Glutamine, (●) valine, (■) leucine, (▲) isoleucine.

なるように滅菌水でメスアップした。このとき10M NaOHでpH 7付近になるように調節したものを遊離アミノ酸分析用とした。

2.5 アミノ酸分析

HPLC 機器は、アミノ酸分析システム ACQUITY UPLC(Waters社)を用いた。カラムはODSカラムを使用し、流速は0.25mL/minに設定して、OPA/NAC法によってアミノ酸分析を行った。バイアル(Waters社)にサンプル試料25 μ L, OPA/NACの混合溶液(O-フタルアルデヒド(OPA)とN-アセチルシステイン(NAC)をそれぞれの濃度が16g/L, 20g/Lになるようにメタノールに溶解し、OPA:NAC=1:1の割合で混合した溶液)50 μ L, 0.4M ホウ酸ナトリウムバッファー175 μ Lを入れ、18℃で2分間放置した後、分析機器にセットした、なお標準サンプルとして各1 mMスタンダードアミノ酸mixtureを用いた。

2.6 遺伝子発現解析

AtBCAT 1 と相同性を持つダイズ遺伝子候補を、Phytozome v6.0 (<http://www.phytozome.net>) と DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>) の植物ゲノムデータベースを用

いて検索した。ダイズBCAT候補遺伝子についてCLUSTALW (<http://align.genome.jp/>)を用いてアミノ酸レベルの相同性を比較し系統樹を作製した。発現解析に用いたプライマーはPCR産物が500~600bp程度になるように設計した。プライマーは25~30塩基、 T_m 値60~67℃, %CGを45%前後の範囲で設計した。3'-プライマーは3'-UTRで設計し、特異性がより高くなるようにした(Yuasa *et al.* 2013)。

常法に従いSDS-フェノール-LiCl法によりトータルRNA抽出を行った。鋳型RNA量1 μ gに5 pmolアニーリング後、ReverTra Aceキット(逆転写酵素)(TOYOBO製)によるcDNAを合成した。cDNA、標的遺伝子の5'-プライマーと3'-プライマーとGo Taq Green Master Mix(Promega)およびサーマルサイクラー(PC816, ASTEC)を用いてPCR反応を行った。反応条件は、94℃:2分, [94℃:10秒, 54~58℃:10秒, 72℃:40秒] $\times$ 24~36サイクル, 72℃で5分の温度サイクルプログラムを使用した。増幅されたDNA産物をアガロース電気泳動、臭化エチジウム染色の後、冷却CCD微量光/蛍光分析器AlphaInnotech (ASTEC社)によりDNAシグナ

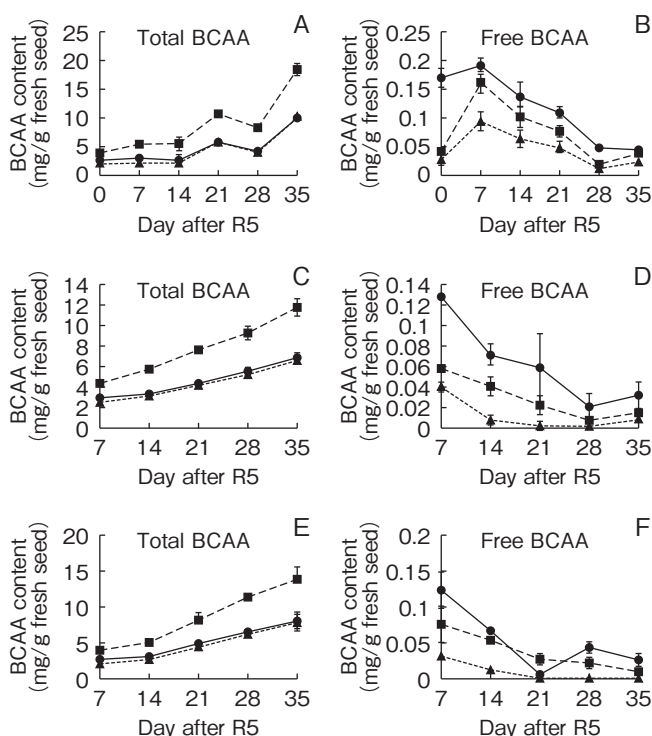


Fig.3 Profiles of total BCAA contents (A,C,E) and freeBCAA contents (B,D,F) in soybean seeds during the seed filling stage. (A,B) Control, (C,D) Defoliation, (E,F) Depodding. (●) valine, (■) leucine, (▲) isoleucine.

ルを解析した。

2.7 免疫化学的解析

BCATの遺伝子発現に加えてダイズBCATの機能を調べるには植物内在BCATタンパク質を検出する方法が必要である。そこで高等植物のBCATのアミノ酸配列を比較した。

その結果, BCATタンパク質において“ H2N -LANKRWVPPPGKGSLYLRP- COOH ”のそれぞれで良く保存された19アミノ酸から成るペプチド配列を見だし, それらを抗原として抗ペプチド抗体を作成した(シグマアルドリッツ)。ダイズ種子発芽後7日間培養した芽生えに対して3%ショ糖処理, 栄養飢餓+プロテアーゼ阻害剤(ロイペプチン, E-64d, キナクリン)処理を行い12, 24, 48時間にそれぞれサンプリングして -80°C 凍結保存した。それらのサンプルを用いて遺伝子発現変

動をRT-PCRで分析すると共にBCATタンパク質レベルの変動をECL法によるイムノプロットによりAlphaInnotechを用いて解析した。

3. 結果と考察

3.1 ダイズ子実肥大期のグルタミンおよびBCAAの全アミノ酸, 遊離アミノ酸の含量の変動

転流アミノ酸の一つとされるグルタミンの含量(遊離アミノ酸含量)を測定した(Fig.2)。その含量は子実肥大初期で最も高い値を示し, 子実肥大開始21日目までは急激に減少し, 21日目以降あまり変化は見られなかった。いずれの処理区においても, 子実肥大に伴ってバリン, ロイシン, イソロイシンの全アミノ酸含量は増加し, 遊離アミノ酸含量は減少傾向にあった(Fig.3B, D, F)。

コントロール区では、BCAAの全アミノ酸含量に着目すると、子実肥大初期ではあまり変化は見られなかったが、子実肥大開始14日目を境より増加が見られた (Fig. 3A)。一方、BCAAの遊離アミノ酸含量は、子実肥大開始7日目を境に増加から減少に転じた (Fig. 3B)。BCAAのそれぞれのアミノ酸種に着目すると全アミノ酸含量としてはどのステージにおいてもロイシンが最も多く、バリン、イソロイシンは各ステージでほぼ同量ずつ含まれることがわかった (Fig. 3A)。一方、遊離アミノ酸含量ではバリンが最も多く、次いでロイシン、イソロイシンとなったが、子実肥大開始35日目には3種のBCAAの遊離アミノ酸含量に有意差はなかった (Fig. 3B)。

それぞれの処理区間で3種のBCAAアミノ酸含量を比較すると、全アミノ酸含量はほとんど差がなく、いずれのアミノ酸においても子実肥大開始35日目ではコントロール区で最も多くなった。遊離アミノ酸含量では、コントロール区では0-7 dayにかけて一過的に上昇した後、徐々に低下したのに対し、摘葉区と摘莢区では0 dayに最大値を示し、徐々に低下した。いずれのBCAAアミノ酸分子種においてもコントロール区で最も含量が多く、子実肥大初期 (0-7 day) での差が最も大きく、子実肥大に伴って差は小さくなった

(Fig. 3B, D, F)。

分岐鎖アミノ酸 (BCAA) は、このグルタミンなどから供給されるアミノ基と、主にショ糖由来の有機酸をもとに子実で合成される。遊離アミノ酸含量は、いずれのBCAAも子実肥大開始7日目を境に、増加から減少へと転じている (Fig. 3B)。このことより、子実肥大開始とともに、葉やその他のソース器官から子実へと供給された転流アミノ酸であるグルタミン、アスパラギンやウレイドを材料に速やかにBCAAの合成が始まり、やがてBCAAはタンパク質合成に使われるため、子実肥大開始7日目以降は遊離アミノ酸含量は減少していると考えられる。加えて、子実肥大開始7日目から子実重の増加が始まり、またいずれのBCAAにおいても子実肥大中期より顕著に全アミノ酸含量が増加していることから、この時期から貯蔵物質であるタンパク質の合成を開始したのではないかと考えられる。

3.2 ダイズ子実肥大に伴うGmBCAT遺伝子の発現変動

コントロール区において、成長ステージごとに子実で4つの候補遺伝子：*GmBCAT2* (Glyma04g05190.1), *GmBCAT3* (Glyma01g40420.1), *GmBCAT4* (Glyma08g06750.1), *GmBCAT5*

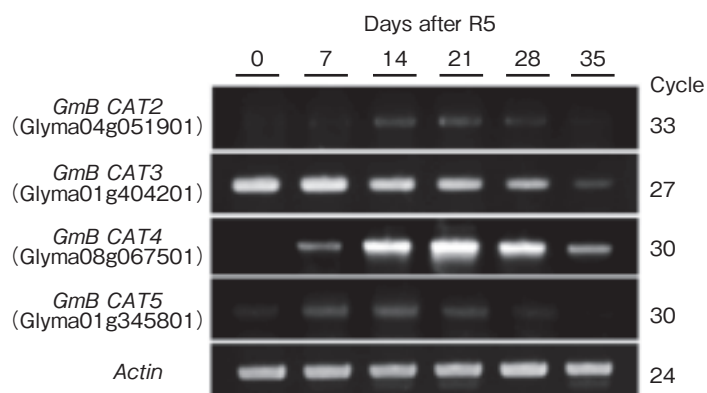


Fig.4 The expression profiles of GmBCATs in soybean seeds during the seed filling stage

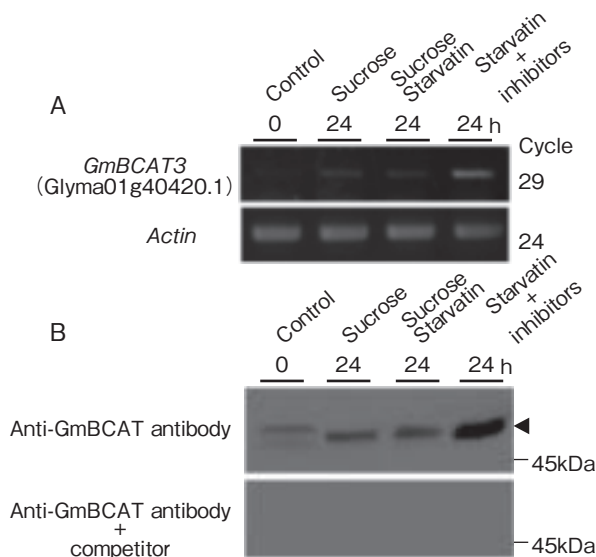


Fig.5 Induction of GmBCAT3 of soybean seedlings in response to starvation treatment. (A) RT-PCR, (B) Immunoblot with anti-BCAT antibody (ECL)

(Glyma 01 g 34580.1) の発現解析を行った (Fig. 4)。その結果、2種類の発現パターンがあることが明らかとなった (Fig. 5)。GmBCAT3は子実肥大初期に最も発現が高く、次第に低くなった。一方、残りのGmBCAT遺伝子は子実肥大開始0日目ではほとんど発現しておらず、子実肥大中期に最も発現が高くなり、その後低くなった。

BCAA含量の結果と子実での遺伝子発現パターンから、まず子実肥大初期にGmBCAT3が働き、葉やその他のソース器官から転流されてくるアミノ酸から盛んにBCAAを合成し、子実内のアミノ酸プールに蓄えられたBCAAは細胞分裂を促進する因子として機能しているのではないかと考えられる。その後タンパク質合成が盛んになり遊離アミノ酸レベルが低下してくるとタンパク質合成が始まると考えられる子実肥大7日目以降、GmBCAT3の働きを補うため残りのGmBCATsが働き始めると考えられる。このことは、Total BCAA含量が子実肥大14日目以降急激に増加していることから説明できる (Fig.3A)。

3.3 栄養飢餓処理に伴うGmBCAT3の遺伝子・タンパク質レベルの変動

栄養飢餓ストレス処理に応答したオートファジー活性化に伴ってダイズ芽生えのBCAA特異的アミノ基転移酵素 (GmBCAT3) が顕著に発現誘導されることが示された (Fig. 5)。このことよりGmBCAT3は栄養飢餓ストレス処理の違いにより転写レベル・タンパク質レベルで複雑な調節を受けることが示唆された。ダイズ子実のBCAA含量調節において子実肥大に伴う発生レベルの調節に加えてソースからシンクへの糖転流シグナルがBCAT遺伝子の発現調節に機能していることが示唆された。

4. 要 約

分岐鎖アミノ酸 (BCAA : Branched-chain amino acid ; バリン, ロイシン, イソロイシン) は、タンパク質の合成やエネルギー源として利用されるだけでなくタンパク質代謝を調節する因子としても知られその機能性が注目されている。そこで

BCAA含量の高いダイズの作出を将来的な研究目標として、本研究ではダイズ子実におけるBCAA合成の制御機構を解明することを目的とした。

まず肥大に伴う子実内のBCAA含量の推移を明らかにするためアミノ酸分析を行った。またBCAA合成を行う重要な酵素とされる分岐鎖アミノ酸アミノ基転移酵素 (BCAT :Branched-chain aminotransferase) について既知のシロイヌナズナBCATの配列をもとにダイズでのBCATホモログをコードする遺伝子を探索した。*AtBCATs*との高い相同性が認められたGlyma04g05190.1 (*GmBCAT2*), Glyma01g40420.1 (*GmBCAT3*), Glyma08g06750.1 (*GmBCAT4*), Glyma01g34580.1 (*GmBCAT5*) の4つを候補遺伝子として選抜し、発現解析を行った。

子実のBCAA含量の推移とBCAT遺伝子発現パターンから、まず子実肥大初期に*GmBCAT3*が発現し、葉やその他のソース器官から転流されてくるアミノ酸から盛んにBCAAを合成していると考えられる。子実を大きくするため細胞分裂が盛んに行われる時期にかけて遊離のBCAA量を増加させていることより、BCAAが細胞分裂を促進するシグナルとして働いている可能性が示唆された。子実内のアミノ酸プールに蓄えられたBCAAはタンパク質合成に使われるため、BCAA供給における*GmBCAT3*の働きを補うため残りの*GmBCAT2*, 4, 5が発現し、種子貯蔵タンパク質の合成が盛んになるにつれ全BCAA量が急激に増加していると考えられる。またダイズ芽生えにおける*GmBCAT3*の遺伝子発現およびBCAT関連タンパク質の解析を行ったところ、栄養飢餓に

応答して顕著に誘導された。このことよりBCAT3はエネルギー供給のためのBCAA分解にも関与していることが示唆された。

文 献

- 1) Binder S, Knill T, Schuster J. : Branched-chain aminoacid metabolism in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **129** : 68~78, 2007.
- 2) Diebold R, Schuster J, Däschner K, Binder S. : The branched-chain amino acid transaminase gene family in Arabidopsis encodes plastid and mitochondrial proteins. *Plant Physiology*, **129**, 540~550, 2002.
- 3) Dietrich K, Weltmeier F, Ehler A, Weiste C, Stahl M, Harter K, Dröge-Laser W. : Heterodimers of the Arabidopsis transcription factors bZIP1 and bZIP53 reprogram amino acid metabolism during low energy stress. *Plant Cell*, **23**, 381~395, 2011.
- 4) Hashimoto K. : ダイズ・アズキ, 転作全書, 農文協, pp. 185, 1980.
- 5) Kaneko A, Noguchi E, Ishibashi Y, Yuasa T, Iwaya-Inoue M. : Sucrose starvation signal mediates induction of autophagy- and amino Acid catabolism-related genes in cowpea seedling. *American Journal of Plant Sciences*, **4**, 647~653, 2013.
- 6) Kimball S, Jefferson L. : Signaling pathways and molecular mechanisms through which branched-chain amino acids mediate translational control of protein synthesis. *Journal of Nutrition*, **136**, 227S~231S, 2006.
- 7) Maloney G, Kochevenko A, Tieman D, Tohge T, Krieger U, Zamir D, Taylor M, Fernie A, Klee H. : Characterization of the branched-chain amino acid aminotransferase enzyme family in tomato. *Plant Physiology*, **153**, 925~936, 2010.
- 8) Schuster, J. and Binder, S. : The mitochondrial branched-chain aminotransferase (AtBCAT-1) is capable to initiate degradation of leucine, isoleucine and valine in almost all tissues in Arabidopsis thaliana. *Plant Molecular Biology*, **57**, 241~254, 2005.
- 9) Yuasa T, Nagasawa Y, Osanai K, Kaneko A, Tajima D, Nang MPSH, Ishibashi Y, Iwaya-Inoue M. : Induction of a bZIP type transcription factor and amino acid catabolism-related genes in soybean seedling in response to starvation stress, *Journal of Botany*, Volume **2013** (2013), Article ID 935479, 2013.

被災地産肉現場の風評被害対策を目的とした放牧地 空間放射線量の自動測定システムの実証研究

An empirical study of the automatic measurement system of the grazing
land space dose of radiation for opposing the damage caused by rumors of
a stricken area

平 田 統 一・桃 田 優 子・齊 藤 博 之*

(岩手大学農学部, *株式会社サイエンススタッフ)

Toh-ichi Hirata, Yuko Momota and Hiroyuki Saito*

(Faculty of Agriculture, Iwate University, *Science Staff Co. Ltd.)

We studied methods for estimating cesium radioactivity in grass and soil, based on radiation measurements, that are more detailed, require less labor and are more automated than conventional methods.

1) Radiation at a height of 1 cm from the ground surface was measured at five locations (A ~ E) in Iwate Prefecture believed to have a characteristic relationship between natural radiation from geological features and radiation from cesium. Three equipment models were used, including a test model developed through this research, to conduct the measurements. Furthermore, NaI scintillation spectrometers were used to measure radioactivity and the gamma-ray energy spectrum of grass (1m²) and soil (5cm depth, 600cm³) collected from these test sites. The correlation coefficients between the radiation dose rate and the grass/soil were 0.71 and 0.97, respectively. This means that soil radioactivity can be estimated based on the radiation dose rate. However, natural radiation (soil types, etc.) at regions with low cesium contamination can influence the radiation measurements. As such, the development of equipment allowing for simple measurements of just cesium radiation was needed. This viewpoint to the experimental model was promising.

2) We also verified the utility of a system in which range cattle were outfitted with radiation dosimeters and GPS equipment allowing for the wireless collection of measurement data. In order to reduce physical stress for the cattle, improvements were made to the test model configurations and durability, and continuous air radiation data was collected at grazing lands and other sites.

1. 目 的

東日本大震災に継発した東京電力福島第一原子力発電所事故の放射性セシウム飛散により、被災

地の畜産業は放牧と採草の停止や多大な風評被害を受けた。放牧や採草の再開のためには土壌や牧草に含まれる放射能を測定し、暫定許容量以下であることを確認する必要がある。現状では、牧草

地毎の土壌や牧草の抜き取りサンプルを特定の測定機関に持ち込み、重い遮蔽ジグの中に設置されたゲルマニウム半導体型検出器やシンチレーションスペクトロメータを用いて放射能を測定している。しかしこの方法では、1) まだらな放射能汚染に対して測定数が少なすぎる、2) 測定結果を得るまでに時間がかかる等の課題があった。また、一度草地を除染した後に生育した牧草であっても、含有放射能が100Bq/kgを超える除染不十分な例が、919圃場の内54圃場(5.9%)あった¹⁾ことから、被災地畜産業の再生には、除染効果を簡易、即時に測定する手法が欠かせない。

そこで本研究では、放牧の再活用など被災地の自給飼料生産基盤の再生、消費者の食肉に対する安全・安心に貢献し、被災地の復興を加速することを最終目的として、1) 草地の空間放射線量率と牧草や土壌中の放射能含量との関係を明らかにするとともに、自然放射線の影響を検討した。また、2) 放牧牛に放射線量計と全地球測位システム(Global Positioning System:GPS)受信機を担荷し、測定データを無線装置で取得することにより、放牧地の放射線量率や個別の牛が浴びた線量を詳細、省力的、自動的に測定するシステムの開発について検討することとした。

2. 方 法

2.1 試験地の選定

日本地質学会のホームページ等に公表されている地質由来の自然放射線量と、緊急時迅速放射線影響予測ネットワークシステム等によるシミュレーションデータによるセシウム汚染の関係に特徴を持つと考えられる岩手県内の5か所の試験地(牧草地)を選定した。また、試験地測定後に測定した放射線データに基づき各試験地は、A試験地は内陸部火山灰土で地質由来の自然放射線が低く、事故由来のセシウム汚染も低い地域であり、

B試験地は火山灰土壌で自然放射線は低いが、ホットスポットがみつかった草地の近隣地点である。C試験地は南部の花崗岩風化土壌で自然放射線が高く、セシウム汚染が比較的高い地域である。D試験地は沿岸部の礫質土壌地域で、自然放射線が比較的高いが事故由来の汚染は低いと考えられた。E試験地は礫質土壌で自然放射線が高く、海越えと内陸からのセシウム汚染も認められる地域である。各試験地内で放射線量率測定および植生と土壌の採材のための地点を、5カ所(B試験地のみ6カ所)設定した。

2.2 放射線量率測定計

放射線量率の測定には、試作機と、ハンディ式のサーベイメーターRadi PA-1100(堀場製作所)、TCS-172B(日立アロカ株式会社)の3機種を同時に用いた(Fig. 1)。試作機は、岩手大学と株式会社サイエンススタッフ(盛岡)、株式会社チノー(東京)らが共同して開発しているもので、東日本大震災後の畜産業の復旧・復興に資するために、セシウム由来放射線量と自然放射線を分別測定できる小型・軽量のスペクトロメーターを基本コンセプトとしており、ヨウ化セシウムシンチレータ、Multi-Pixel Photon Center(MPPC)式放射線量計である。3機種の測定値に差が無いことを確認しており、本報告では試作機の測定値を用いた。

2.3 放射線量率の測定

測定は2013年8月および9月に実施した。1測定地点につき3機種同時に放射線量率を時定数10秒で10回記録した。これを地表面から1cmおよび1mの高さで行った(Fig. 1)。両者間の相関を確認しており、本報告では測定値と土壌放射能との相関係数がより高かった1cmの測定値を用いた。

2.4 土試料採取とその処理

選定した各試験地内測定地点の1㎡区画内で、

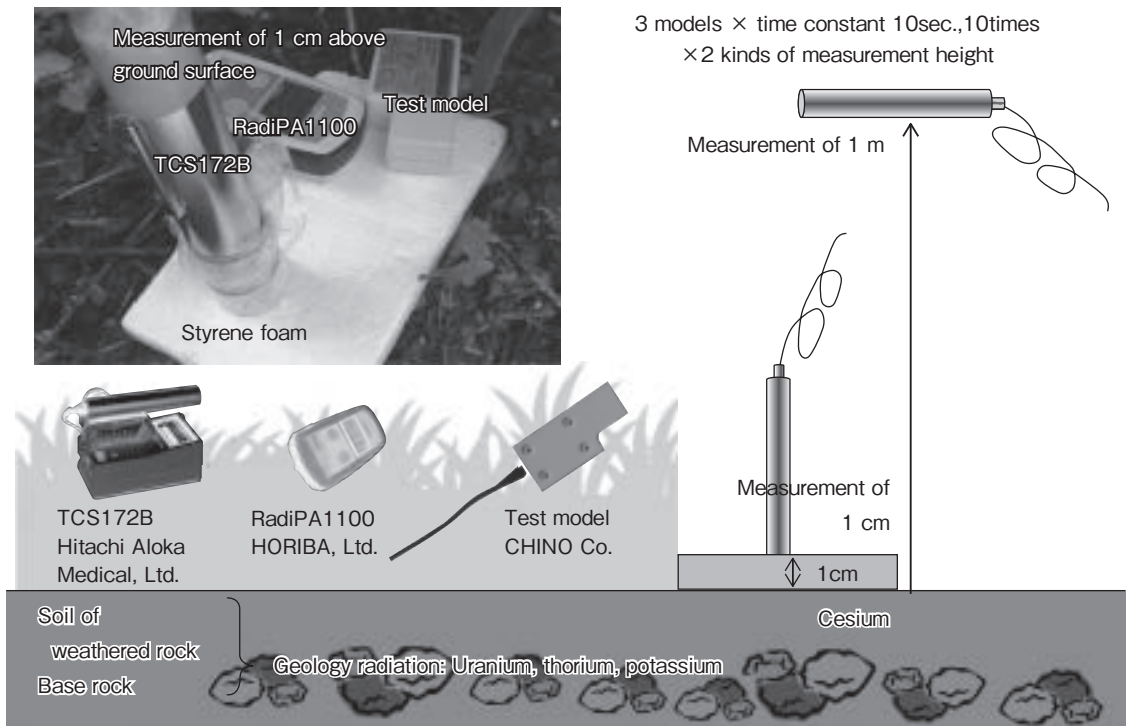


Fig. 1 Dosimeter and radiation measurement method

100cm³の採土管を用いて地表面より5cm深を6カ所採取した。生土の水分量や土密度を測定して解析したが、本報告では、生土放射能について述べた。

2.5 草試料採取とその処理

それぞれの測定地点で1m²の区画の草全量を、ウシが食草する場合を想定し地表面から約5cmの高さで刈り取った。乾草あたりとセシウム吸収量も解析したが、本報告では生草放射能について述べた。

2.6 放射能の測定

土試料はよく攪拌し、500mlマリネリ容器で測定した。草試料は5cm程度に細切しよく攪拌し、1800mlマリネリ容器で測定した。ヨウ化ナトリウム (NaI) シンチレーションスペクトロメータ (EMF211型, EMFジャパン) を用いて、放射能 (Bq) とγ線エネルギースペクトルを取得した。

2.7 エネルギースペクトルの判定

放射線核種のエネルギー帯605および661.7keV付近のエネルギー帯のピークをセシウム134 (¹³⁴Cs) と137 (¹³⁷Cs), 1460.0keVのエネルギー帯のピークをカリウム40 (⁴⁰K) とした²⁾。土あるいは生草試料1kg中の¹³⁷Csおよび¹³⁴Cs由来と考えられるセシウム由来放射能 (土あるいは草CsBq), および⁴⁰K由来の放射能 (土あるいは草KBq) を算出した。

2.8 統計処理

本報告では、試作機による1cm高放射線量率と土CsBq, 土KBq, 草CsBq, 草KBqの各項目と放射線量について基本統計量と相関係数を求めた。

2.9 放牧牛への放射線測定機装着

A試験地の放牧地等および黒毛和種放牧牛を試験に供した。株式会社チノーが試作したGPSモジュール (外形13×10×5cm) 付き放射線計 (外形12.5×12.5×3.5cm, 地上高約50cm) を、群れのリーダー牛の胸部に担荷し、この装置から発

Table1 Correlation coefficient of each statistics value

	soil CsBq	soil KBq	grass CsBq	grass KBq	H 1 cm
soil CsBq	1.000	0.941	0.710	0.603	0.971
soil KBq		1.000	0.691	0.682	0.985
grass CsBq			1.000	0.653	0.708
grass KBq				1.000	0.653
H 1 cm					1.000

信する放射線量率とGPSの位置情報を、アーズ株式会社A試験地内に設置した920MHz無線伝送システムを用いて自動的に取得した。

3. 結果と考察

岩手県内5試験地26地点において、試作機で測定した放射線量（H 1 cm）と草試料中のセシウム放射能（草CsBq）の相関係数は0.708で、放射線量から草中セシウム濃度を正確に推定するには不十分であった（Table 1）。他の決定要因には、土壌から草へのCs移行係数や草種³⁾、傾斜、草の生育状況、測定時期、土壌中カリウム濃度、天候などが影響したと考えられる。

草CsBqと草汚染の主要因である土CsBq⁴⁾の間の相関係数は0.710（Table 1）であり、土CsBqから草CsBqを正確に推定するには不十分と思われる。このような困難さの理由の1つとして、草による土壌セシウム吸収がカリウムと競合する^{4, 5)}ことが考えられることから、土壌成分の影響にも注目する必要がある。本研究において、草CsBqと土KBqの相関係数は0.691（Table 1）であり、全体として高い相関はみられなかったが、試験地Eでは $R = 0.881$ で高い相関がみられたことから、試験地によっては土壌中カリウム濃度が植生によるセシウム吸収に影響した可能性がある。また、草種によってセシウム吸収（移行係数）が異なる³⁾

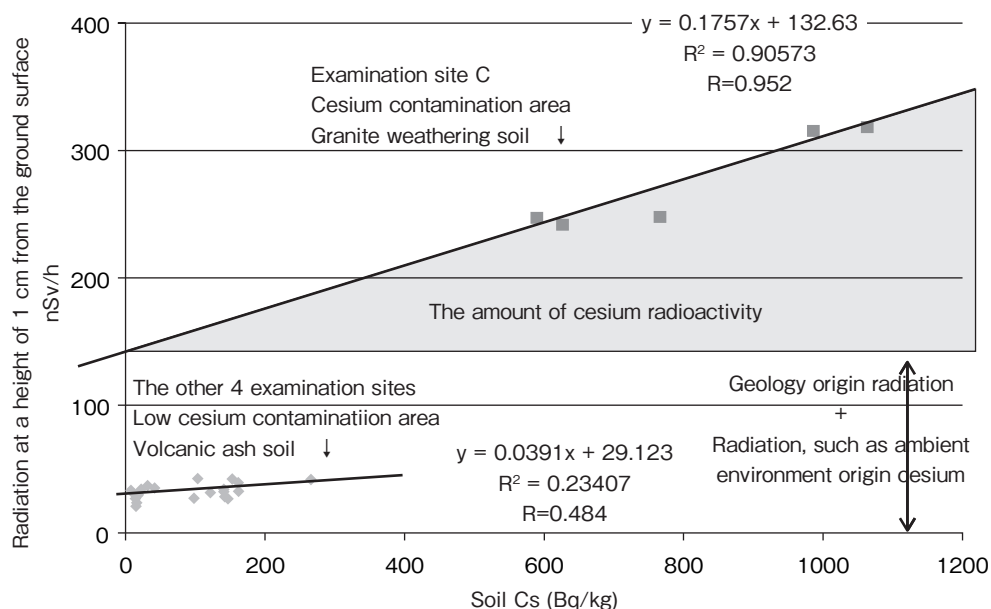


Fig.2 Relationship between radiation dose rate and cesium radioactivity

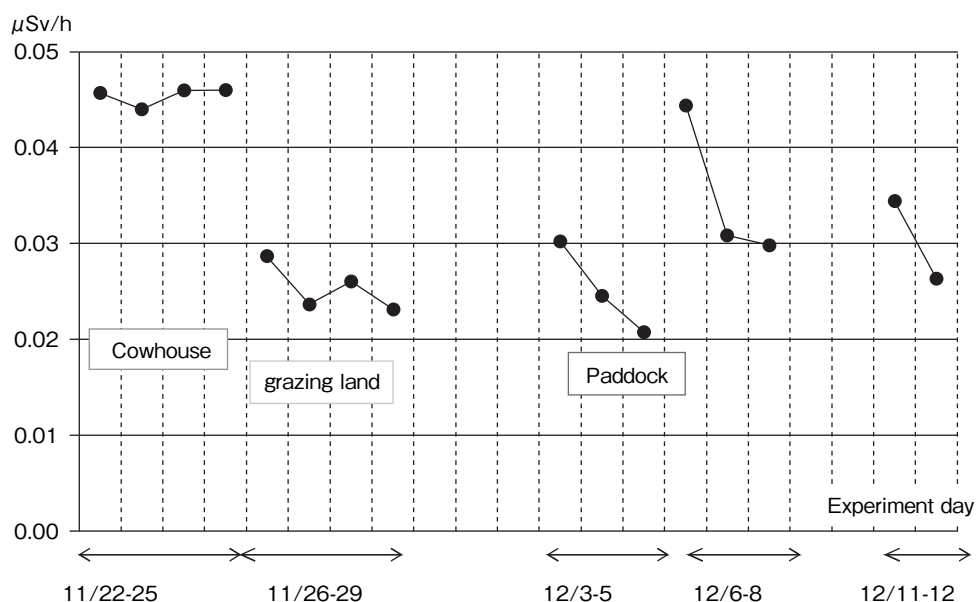


Fig.3 Day by day average value of the dose of radiation measured with the experimental dosimeter which equipped cattle

ことから、試験地の植生の相違が土CsBqと草CsBqの関係に影響した可能性がある。放射能汚染によって利用が制限され、放置された放牧草地の植生は変化する。野草など様々な草種で土CsBqと草CsBqの関係を明らかにする必要があり、土CsBqから草CsBqの推定は困難さを増す。

一方、放射線量率 (H 1 cm) から土CsBqを推定することは十分に可能 ($R = 0.971$, Table 1) であり、遮蔽治具などの工夫でさらに推定精度を向上できると考えられる。セシウム汚染の強弱別にみると、セシウム汚染地のC試験地では両者間に強い相関がみられ ($R = 0.952$) (Fig. 2), 回帰直線は, $y = 0.176x + 132.6$ と推定された。低～中程度汚染の他の4地点を合計した回帰直線は, $y = 0.039x + 29.1$ と推定された (Fig. 2)。仮にセシウム濃度 0 Bqの時の放射線量推定値 (切片) は, C試験地で $0.13 \mu\text{Sv}$, 他の4地点で $0.03 \mu\text{Sv}$ となる。このように地域によって切片 (放射線量) が異なる原因は, 各地域で暴露される岩盤等の自然放射線量や土壌以外の周囲環境から放

射する線量が異なることに起因しているものと思われる。岩盤由来の自然放射線の1つとしてカリウムに着目し各試験地別にみると、礫質土壌のC, D, E試験地では放射線量率と土KBqの間に高い相関があり (それぞれ $R = 0.891, 0.797, 0.864$), 火山灰土壌のA, B試験地では相関がなかった (それぞれ $R = 0.010, 0.110$)。このように, H 1 cmから土CsBqを推定するにあたって土壌の種類が関係し, セシウム汚染が少ない地域で特に影響が大きいことに留意する必要がある。また, 低～中程度汚染の4地点を個別にみると, H 1 cmと土CsBqの間に強い正の相関や逆相関を示す試験地がみられるなどまちまちであり, 牧草の規制基準値 100Bq/kg 付近もしくはそれ以下の地域では, 放射線量率測定値へ自然放射線が影響し, 土CsBqを正確に推測することは困難となる。これらのことから, 風評被害の防止のために新たに開発する放射線計は, セシウム由来放射線を分別測定できる簡易スペクトロメータである必要があり, 本研究で用いた開発機はこのような機能を付

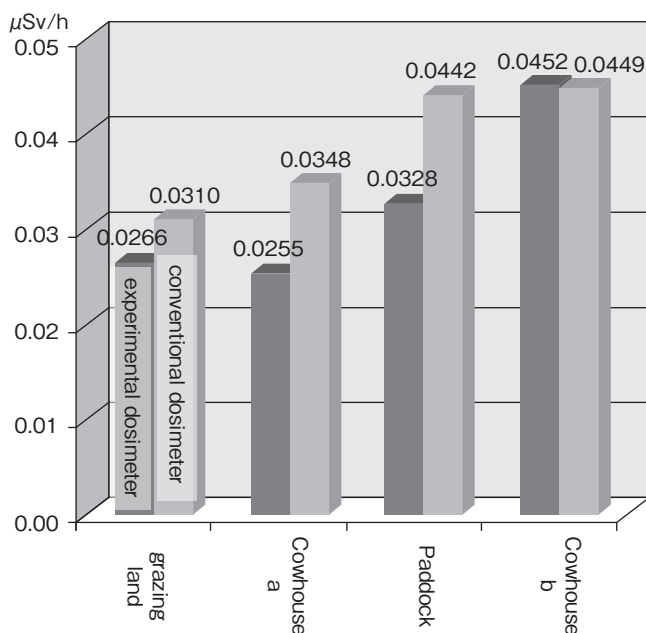


Fig.4 Comparison of the average value of the dose of radiation measured with the experimental dosimeter which equipped cattle and the conventional (RadiPA1100) dosimeter

与できることから有効である。

放牧牛に担荷可能な形状と取付方法、堅牢性などの検証を行った。その結果、①牛体になるべくストレスを与えない薄い形状であること、天候を選ばない防水性を持つこと、③野外環境や牛行動に耐えうる堅牢性をもつこと、④ある一定の放牧期間に稼働し続ける電源を携帯することなどを提案し、試作に反映させた。試験期間中の牛担荷線量計が記録した日平均空間放射線量をFig. 3に示した。次に、試作機の牛担荷時での測定精度の信頼性を、従来の機種での歩行測定と比較することで検証し、試作機は牛担荷時でも有効な精度で測定できることを確認した (Fig. 4)。牛体姿勢の判別や牛体による放射線遮蔽率などの検証すべき課題と、測定指示プログラムの改善で3日間しか稼働しない電池寿命などの改善点が残されたが、汚染斑が存在する広大な放牧地において簡易的な測定システムとして有効であることを示した。

以上の結果から、放牧牛を動くモニタリング装

置として活用し、空間放射線量から草地土壌の汚染（安全）レベルをモニタリングできること、その結果に基づいて必要があれば牧草中のセシウム含量を精密分析するよう指導する2段階の草地モニタリング、清浄化システムを構築できる可能性を示し得た。

4. 要 約

空間放射線量の測定によって、土壌と牧草中のセシウム由来放射能を従来よりも詳細、省力的、自動的に推定する方法について検討した。1) 地質由来の自然放射線量とセシウム由来放射線量の関係に特徴を持つと考えられる岩手県内の5地点 (A～E) の試験地で、本研究で開発中の試作機を含め3機種を用いて地表面から高さ1 cmの放射線量を測定した。また同地点で採取した草 (1 m²) と土 (5 cm深, 600cm³) についてNaIシンチレーションスペクトロメータで放射能とγ線エネルギースペクトルを測定した。放射線量率と草

および土の放射能との相関係数は、0.71および0.97であり、放射線量率から土放射能の推定が可能であった。また、セシウム低汚染地域では、土壌由来の自然放射線が放射線測定値に影響するため、セシウム由来放射線のみ簡易に測定できる本試作機が有効である可能性が示された。2) 放牧牛に放射線量計とGPSを担荷し測定データを無線装置で取得するシステムの実用性を検証した。牛体ストレスを軽減するために試作機の形状と堅牢性を

改善し、放牧地等で連続した空間放射線量データを得た。

文 献

- 1) 岩手県：岩手県牧草地除染マニュアル，第1版，1～2，2012.
- 2) 文部科学省：ゲルマニウム半導体検出器によるガンマ線スペクトロメトリー，3訂，197～200，東京，1992.
- 3) 山口紀子：農環研報，31，75～129，2012.
- 4) Zhu YG, Smolders E.: *J. Experimental Botany*, 51, 1635～1645, 2000.
- 5) RocaMC, Valljo VR.: *J. Environ. Radioactivity*, 28, 141～159, 1995.

腫瘍関連遺伝子発現動態解析による非典型的 牛白血病の発症診断法の開発

Development of diagnostic methods for atypical bovine leukosis by
analysis of tumor-related gene expressions

猪 熊 壽

(帯広畜産大学畜産学部)

Hisashi Inokuma

(Faculty of Animal Husbandry, Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)

Bovine leukosis (BL) is one of the most commonly reported neoplastic diseases of cattle. Clinical diagnosis of BL is generally made based on clinical and clinicopathological findings such as enlargement of peripheral lymph nodes, increased number of lymphocytes, increased number of atypical lymphocytes in peripheral blood, or the presence of abnormal lymphocytes in aspirates from fine needle aspiration cytology of tumorous lymph nodes. However, the aforementioned signs and tests are not always present in or available for cases of bovine leukosis. Thus useful biomarkers are required for accurate diagnosis of onset of bovine leukosis in the field. This study examined the efficacy of certain genes expression as biomarkers for the detection of clinical BL cases. The expression of several genes, including interleukin 2 receptor (*IL2R*), Wilms' tumor 1 (*WT1*), thymidine kinase-1 (*TK1*), cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*) and immunoglobulin associated alpha-1 (*MB1*) were evaluated as potential biomarkers for the clinical diagnosis of bovine leukosis. In this study, the gene expression in the peripheral blood from a total of 37 cattle, including 13 cattle with enzootic bovine leukosis, 15 clinically healthy cattle, and 9 cattle with other diseases were measured by quantitative reverse transcription PCR. Although wide variations of gene expression were found in some clinical cases of enzootic bovine leukosis, 4 and 5 among 13 enzootic bovine leukosis cattle showed higher expression of *IL2R* and *WT1*, respectively. Expression of *IL2R* in peripheral blood cells in enzootic bovine leukosis cattle was statistically increased compared with those of other groups. These results indicate the possible usefulness of *IL2R* and *WT1* genes as biomarkers for the clinical diagnosis of enzootic bovine leukosis.

1. 目 的

牛白血病は最も一般的な牛の腫瘍性疾患であり、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus: BLV) 感染による地方病型牛白血病 (enzootic

bovine leukosis: EBL) と原因不明の散発型牛白血病の2つに分類される¹⁾。牛白血病の臨床的診断は、末梢血液中の持続性リンパ球増多症 (persistent lymphocytosis: PL)、異型リンパ球増加および腫大体表リンパ節中の腫瘍細胞の確認と

Table 1 List of primers used in this study

Gene Name		Forward primers	Reverse primers
Interleukin 2 receptor	<i>IL2-R</i>	cgccatgttcaaggctctc	gttctgcgcatctgtgtgtt
Wilms tumor 1	<i>WT1</i>	ttctcgttcagaccagctca	gctgaagggtctctcacttg
Thymidine kinase 1	<i>TK1</i>	ccaggttgccagctacaagt	tctgcagaactccacaatg
Cytochrome P450, family 1, subfamily B, polypeptide 1	<i>CYP1B1</i>	tgtaaccagtggctccgtga	ttgaaattgcactggtgagc
B-Cell leukemia/lymphoma 2	<i>BCL2</i>	ctgactctctcggcgctac	cggttcaggtactcggctcat
Immunoglobulin associated alpha-1	<i>MB1</i>	ccaagtcagtgatggcaaga	gatatcagccccgaatttca
Actin-beta	<i>ACTB</i>	ctcttcacgcttcttctct	gggcagtgatctcttctgc

いった臨床病理学的所見に基づいて行われる¹⁾。しかし、牛白血病発症例の中には、末梢血液中のリンパ球数が増加せず、異型リンパ球もみられない症例、あるいは体表リンパ節腫大が認められず、触診上検出困難な位置に腫瘍が存在する症例がある²⁾。このような特徴的臨床所見が認められない症例では生前の牛白血病の確定診断が困難である。人医療域では、腫瘍の診断に様々なバイオマーカーが用いられているが、牛白血病の診断マーカーは少ない³⁾。そこで本研究では、末梢血液中の遺伝子発現に着目し、非典型的牛白血病発症診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

2. 方 法

材料として地方病型牛白血病発症牛 (EBL) 13頭、健康牛15頭、および牛白血病以外の疾患牛9頭を用いた。EBL13頭はいずれもBLV抗体陽性で、元気食欲不振等の臨床症状を呈し、腫大した体表リンパ節の生検により腫瘍化リンパ球を認めたことからEBLと診断した。これら13頭はいずれも十勝管内の別の農家に飼養される牛であり、末梢血リンパ球数によりさらに次の2群に分けられた。①末梢血リンパ球増多症を呈する8頭 (EBL + BLV + PL +)、②末梢血リンパ球増多症のない5頭 (EBL + BLV + PL -)。なお、リンパ球数の

評価はBendixenのkeyにより判定した⁴⁾。健康牛15頭は、同一農家に飼養されるもので、BLV感染とリンパ球数により次の3群に分けられた。①BLV抗体陰性でリンパ球増多症の無いもの5頭 (BLV - PL -)、②BLV抗体陽性でリンパ球増多症の無いもの5頭 (BLV + PL -)、③BLV抗体陽性でリンパ球増多症を呈するもの5頭 (BLV + PL +)。これら15頭の健康牛は採材から1年間観察を継続したが、いずれも牛白血病の発症はみられなかった。さらに、牛白血病以外の疾患牛9頭はいずれも慢性感染症の牛であり、それぞれ異なる臨床症状を呈していたが、最終的には病理解剖に供して牛白血病でないことを確認した。

各牛から末梢血2.5mlをRNA分離用チューブ PAXgene™ Blood RNA tubes (PreAnalytiX®, Hornbrechtikon, Switzerland) に採取し、説明書に従って処理した後、total RNAを抽出した (PAXgene™ Blood RNA Kit (QIAGEN, Hombrechikon, Switzerland))。0.5 µg RNAからthermo script system (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を用いた逆転写反応によりcDNAを合成した。さらにSYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.) を用い、StepOnePlus System (Applied Biosystems) による定量的RT-PCRを実施した。

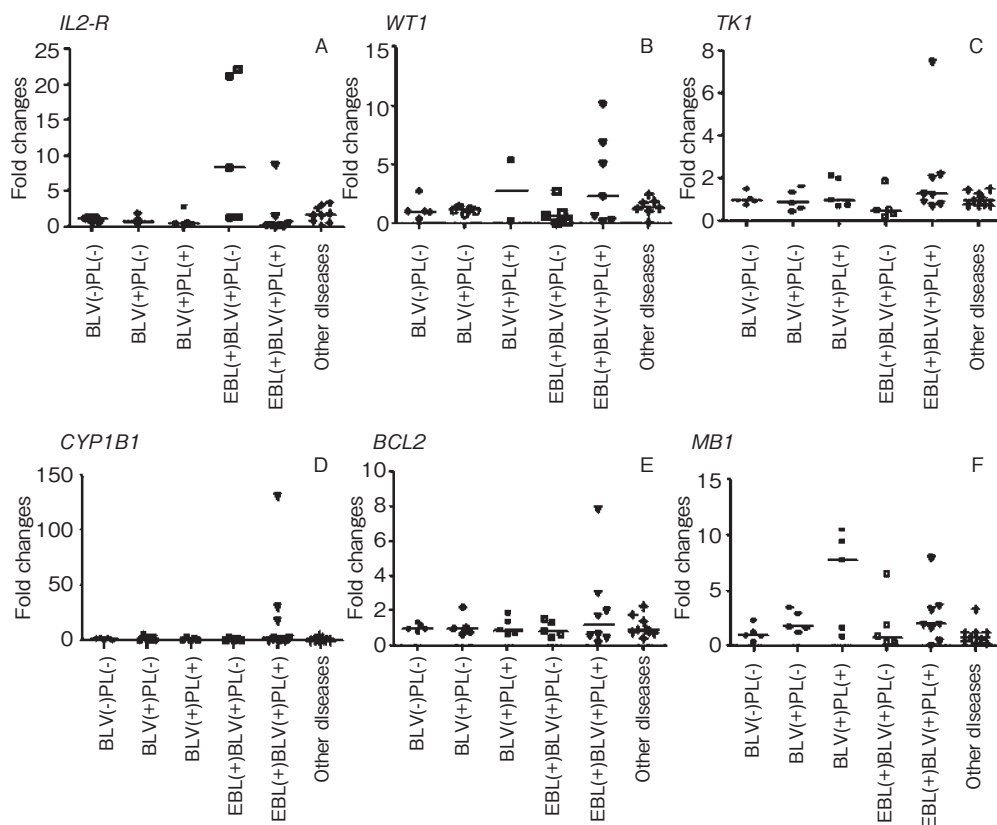


Fig. 1 Messenger RNA expression levels of some genes in peripheral blood of cattle from 6 different groups as measured by quantitative RT-PCR. (A) interleukin 2 receptor (*IL2R*), (B) Wilms' tumor 1 (*WT1*), (C) thymidine kinase-1 (*TK1*), (D) cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), (E) high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*) and (F) immunoglobulin associated alpha-1 (*MB1*). Bar: median value in each group.

検索した発現遺伝子はinterleukin 2 receptor (*IL2R*), Wilms' tumor 1 (*WT1*), thymidine kinase-1 (*TK1*), cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*), immunoglobulin associated alpha-1 (*MB1*)であり, **Table 1** に示すプライマーを用いた。なお, 内在性コントロールとしてはbeta actin (*ACTB*) 遺伝子を用いた。遺伝子発現量は*ACTB*との比較によりCt値として表した。

各群の値はKruskal Wallis testにより検定した。有意水準は0.05とした。

3. 結果と考察

結果を**Fig. 1**に示す。

臨床的健康牛の3群15頭はいずれも, 各遺伝子 (*IL2R*, *WT1*, *TK1*, *CYP1B1*, *BCL2*, *MB1*) の発現は低値を示した。健康牛群のBLV + PL + グループにおける*WT1*以外では, シグナル値は0.278~1.753と低値であった。健康牛の結果から, BLV感染およびリンパ球増多症は, 末梢血におけるこれらの遺伝子発現に影響を与えないことが示唆された。

3.1 interleukin 2 receptor遺伝子 (*IL2R*)

13頭のEBL発症牛のうち4頭 (BLV + PL + グ

ループ3頭とBLV+PLーグループ1頭)が、*IL2R*発現量において8倍以上の高いシグナル値を示した。いっぽう、13頭のEBL発症牛のうち残りの9頭(BLV+PL+グループ7頭とBLV+PLーグループ2頭)の*IL2R*発現量シグナル値は1.6未満と低値を示した。*IL2R*発現量は5群間で統計的に有意な差が認められた($P=0.018$)。EBL発症牛BLV+PL+グループにおける*IL2R*発現量は健康牛および他疾患群の値と比較して有意差はみられなかった。これらの結果は、BLV感染+PL+の非発症牛における*IL2*発現レベルが、PLのない非感染牛と比較して低値を示したという報告⁵⁾と一致するものである。*IL2R*はリンパ球表面に発現しているインターロイキン2受容体であり、レトロウイルスにより直接的あるいは間接的に活性化されるといわれており^{6,7)}、必ずしも発症が*IL2R*遺伝子発現の活性化につながるものではないことが考えられる。しかし、EBL発症牛における*IL2R*遺伝子の高発現は予備的研究においても観察されており⁸⁾、また、*IL2R*遺伝子過剰発現はヒト白血病症例でも報告されている⁹⁾。なお、何頭かの発症牛において*IL2R*遺伝子の発現が弱かった理由については不明であるが、発症後の経過および疾病のステージが関係する可能性も考えられる。以上のことから、末梢血における*IL2R*遺伝子の過剰発現は牛白血病発症のマーカーになりうるが、その特異性および感度については今後検討の余地があると思われた。

3.2 Wilms' tumor 1 遺伝子 (*WT1*)

13頭のEBL発症牛のうち5頭(BLV+PL+グループ4頭とBLV+PLーグループ1頭)では*WT1*遺伝子の発現量が高値を示した。BLV+PL+グループの中央値は、他群に比べて高値を示したが、有意差は認められなかった。*WT1*はジンクフィンガー転写因子をコードする遺伝子で、様々な器官における細胞の成長と分化に重要な役

割を果たしている^{10, 11)}。今回観察された結果は、末梢血における*IL2R*遺伝子の過剰発現が牛白血病発症のマーカーになりうることを示した。しかしながら、臨床応用にあたっては、感度が低いことと、発現量のばらつきが大きいことが問題になると思われる。この遺伝子はヒトの多くの固形癌と急性骨髄性白血病の大部分で高度に発現することが知られている^{12, 13)}。このことは*WT1*遺伝子は牛白血病のより急性ステージにおいて末梢血で過剰発現され可能性を示唆するものである。今後、牛白血病のステージの違いによる*WT1*遺伝子発現量の推移を検索する必要があると考えられた。

3.3 その他の遺伝子

TK1, *CYP1B1*および*BCL*遺伝子の発現では、EBL発症牛13頭のうち各1頭だけが、非常に高い値を示した。しかし、残りの14頭ではいずれもEBL非発症牛と同様に低い遺伝子発現量を示した。*TK1*, *CYP1B1*および*BCL*遺伝子の発現はヒトと動物の悪性肝細胞がんにおけるバイオマーカーとしての有用性が報告されている^{14~23)}。予備的検討においては、牛白血病発症例において*TK1*遺伝子発現の高値が認められてはいるものの²⁴⁾、今回の結果からはこれらの遺伝子発現は牛白血病のバイオマーカーとしては利用可能性が乏しいと思われた。なお、*MB1*遺伝子のmRNAはEBL発症牛の何頭かでは比較的高い値を示したが、健康牛でもより高値を呈するものが認められたため、特異性に問題があると考えられた。

以上、EBL発症症例の遺伝子発現量は個体により大きく差があるものの、13頭中4頭の*IL2R*発現量と5頭の*WT1*発現量が、他群の中央値と比較し著明に高値を示した。また、EBL群の*IL2R*発現量は他群と比べて有意に高かった。これらの結果から、*IL2*および*WT1*の発現はEBL発症診断のためのバイオマーカーとして有用である可能

性が示唆された。ただし、臨床応用にあたっては、さらに特異性と感度について検討を重ねる必要があると思われた。

なお、本研究成果はTawfeeq, M. M., Horiuchi, N., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H. : Evaluation of gene expression as biomarkers for enzootic bovine leukosis. *J. Vet. Med. Sci.* **75** : 1213~1217, 2013. に発表された。

4. 要 約

牛白血病 (BL) は最も一般的な牛の腫瘍性疾患であるが、その臨床診断は、末梢血液中のリンパ球増多症、異型リンパ球増加および腫大体表リンパ節中の腫瘍細胞の確認といった所見に基づいて行われる。しかし、BL発症例の中には、特徴的臨床所見が認められず、生前の確定診断が困難な場合も多い。そこで本研究では、いくつかの遺伝子 — interleukin 2 receptor (*IL2R*), Wilms' tumor 1 (*WT1*), thymidine kinase-1 (*TK1*), cytochrome P450 family 1-subfamily B-polypeptide 1 (*CYP1B1*), high B-cell lymphoma/leukemia protein (*BCL2*), immunoglobulin associated alpha-1 (*MB1*) — の末梢血発現に着目し、BL診断のためのバイオマーカーとしての有用性を検討した。

地方病型牛白血病 (EBL) 症例の遺伝子発現量は個体により大きく差があるものの、EBL症例13頭中、4頭の*IL2R*発現量と5頭の*WT1*発現量が、他群の中央値と比較し著明に高値を示した。また、EBL群の*IL2R*発現量は他群と比べて有意に高かった。これらの結果から、*IL2*および*WT1*の発現はEBL診断のためのバイオマーカーとして有用である可能性が示唆された。

文 献

1) Garry, F. : Rebhun's Diseases of Dairy Cattle,

- 2nd ed. (Divers T. J. and Peek, S. F. eds.), pp. 624-633. Saunders Elsevier, St. Louis. 2008.
- 2) Tagawa, M., Shimoda, T., Togashi, Y., Watanabe, Y., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Ishii, M., Inokuma, H. : *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* **61**: 936 ~ 940. 2008. (in Japanese with English abstract)
- 3) Sakamoto, L., Ohbayashi, T., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. : *J. Vet. Diagn. Invest.* **21** : 871~874. 2009.
- 4) Bendixen, H. : *J. Adv. Vet. Sci.* **10** : 129~204. 1965.
- 5) Amills, M., Ramiya, V., Norimine, J., Olmstead, C. A., Lewin, H. A. : *Virology.* **304** : 1 ~ 9. 2002.
- 6) Nelson, B. H., Willerford, D. M. : *Adv. Immunol.* **70** : 1 ~ 81. 1998.
- 7) Yodoi, J., Uchiyama, T., Maeda, M. : *Blood.* **62** : 509~511. 1983.
- 8) Tawfeeq, M. M., Tagawa, M., Itho, Y., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. : *J. Vet. Med. Sci.* **74** : 1203~1206. 2012.
- 9) Erber, W. N., Mason, D. Y. : *Am. J. Clin. Pathol.* **89** : 645~648. 1988.
- 10) Buckler, A. J., Pelletier, J., Haber, D. A., Glaser, T., Housman, D. E. : *Mol. Cell. Biol.* **11** : 1707 ~ 1712. 1991.
- 11) Sugiyama, H. : *Int. J. Hematol.* **73** : 177~187. 2001.
- 12) Greiner, J., Ringhoffer, M., Taniguchi, M., Li, L., Schmitt, A., Shiku, H., Döhner, H., Schmitt, M. : *Int. Cancer.* **108** : 704~711. 2004.
- 13) Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E. H., Kawakami, M., Ikegame, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., Sugiyama, H. : *Int. J. Cancer.* **100** : 297 ~ 303. 2002.
- 14) Baron, J. M., Zwadlo-Klarwasser, G., Jugert, F., Hamann, W., Rübben, A., Mukhtar, H., Merk, H. F. : *Biochem. Pharmacol.* **56** : 1105~1110. 1998.
- 15) Cory, S. : *Annu. Rev. Immunol.* **13** : 513~543. 1995.
- 16) Dassi, C., Signorini, S., Gerthoux, P., Cazzaniga, M., Brambilla, P. : *Clin. Chem.* **44** : 2416~2421. 1998.
- 17) DiGiuseppe, J. A., LeBeau, P., Augenbraun, J., Borowitz, M. J. : *Am. J. Clin. Pathol.* **106** : 345 ~ 351. 1996.
- 18) Hallek, M., Wanders, L., Strohmeier, S., Emmerich, B. : *Ann. Hematol.* **65** : 1 ~ 5. 1992.
- 19) Kristensen, T., Jensen, H. K., Munch-Petersen, B. : *Leuk. Res.* **18** : 861~866. 1994.
- 20) Lerner, A., Epstein, P. M. : *Biochem. J.* **393** : 21 ~ 41. 2006.
- 21) Shimada, T., Hayes, C. L., Yamazaki, H., Amin, S.,

- Hecht, S. S., Guengerich, F. P., Sutter, T. R. : *Cancer Res.* **56** : 2979~2984.1996.
- 22) Zhang, L., Murray, F., Rassenti, L. Z., Pu, M., Kelly, C., Kanter, J. R., Greaves, A., Messer, K., Kipps, T. J., Insel, P. A. : *Int. J. Cancer.* **129** : 1162~1169. 2011.
- 23) Tawfeeq, M. M., Miura, S., Nakanishi, Y., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Inokuma, H. : Calf form bovine leukosis associated with multiple joint swelling in a Holstein heifer. *J. Vet. Med. Sci.* **74** : 1225~1228. 2012
- 24) Tawfeeq, M. M., Sugimoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. : *J. Vet. Med. Sci.* **74** : 1501~1504. 2012.

飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の検証 — 尿中ステリグマトシスチン濃度測定法の確立とその臨床応用 —

Field application of urinary sterigmatocystin concentration measurements
for monitoring natural feed contamination in cattle herds

高 木 光 博・宇 野 誠 一*・國 師 恵美子*

(鹿児島大学共同獣医学部, 鹿児島大学共同水産学部*)

Mitsuhiro Takagi, Seiichi Uno* and Emiko Kokushi*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, Faculty of Fisheries, Kagoshima University*)

This study had two primary objectives: (1) to better understand the contamination of cattle herds with the fungal toxin sterigmatocystin (STC) by monitoring STC concentrations in feed and urine, and (2) to evaluate the effects of interventions, such as supplementation of feed with mycotoxin adsorbent and replacement of contaminated feed. We used female Japanese Black cattle that received a standard ration containing rice straw. The presence of mycotoxins in their feed was monitored, as was the excretion of mycotoxins or their metabolites in urine as marker for absorption and systemic exposure. The experimental protocol included two treatment groups of animals that received a commercial mycotoxin adsorbent (MA) and a control group. Three groups of six individuals from each herd were assessed: MA1 received mycotoxin adsorbent mixed with concentrate, MA2 received mycotoxin adsorbent topdressed on concentrate, and the control group received no mycotoxin adsorbent. Urine and blood samples were collected at the start of supplementation (Day 0), on the final day of supplementation (Day 14), on the first day that the contaminated feed was replaced (MA1) or at the start of a double volume of mycotoxin adsorbent supplementation (MA2) in Herd 1 (Day 45), and on the final day of sampling (Day 60 for Herd 1 and Day 45 for Herd 2). STC concentrations in urine were measured by tandem mass spectrometry. In Herd 1, the STC concentrations of the feed at each sampling time were 0.15, 0.17, 0.24, and 0.23mg/kg. In Herd 2, STC concentrations were 0.06 and 0.03mg/kg. STC concentrations in urine in the control group within Herd 1 that received no mycotoxin adsorbent were significantly higher on Day 0 (190.3 pg/mg of Crea) and Day 45 (897.6 pg/mg of Crea) than were those (19.8 and 0 pg/mg of Crea) in Herd 2 ($p < 0.05$). A significant decrease in STC concentrations in urine was observed 2 weeks after feed was replaced with new straw in the MA1 group (32.6 pg/mg of Crea) in Herd 1, but no significant effects of mycotoxin adsorbent supplementation were observed on STC concentrations in urine during the intervention period. Monitoring of mycotoxins in urine samples serves as a marker for the systemic exposure of cattle to mycotoxins and allows the exposure of cattle to multiple mycotoxins to be detected. The goal of this study was to assess the effect of supplementation with mycotoxin adsorbents.

1. 目 的

我々はこれまでに、*Fusarium*属真菌由来マイコトキシン (MT) で、エストロジェン類似作用を持つことから家畜に繁殖障害などを引き起こす可能性が示唆されるゼアラレノン (ZEN) に着目し、1) 尿中ZEN濃度を指標とした飼養環境下の牛群におけるMTモニタリングシステムの構築とその有用性¹⁾、2) モニタリング結果を基にした我が国の暫定基準値を超えるZEN自然汚染稲ワラ給与を原因とするMT汚染牛群の初摘発例²⁾、および3) 尿中ZEN濃度を指標としたMT吸着剤添加効果の客観的評価法の確立³⁾などを報告しており、バイオマーカーを用いたMTモニタリングシステムを確立するとともに、飼養環境下の家畜(ウシおよびブタ)におけるMT浸潤動態の検証およびデータベースの蓄積を進めている。

ステリグマトシスチン (STC) は *Aspergillus versicolor* やその他の *Aspergillus* 属真菌などにより産生されるMTであり、動物やヒトに対して強い毒性を持つアフラトキシンB1 (AFB1) 生合成の中間物質の1つとして知られているが、STCそのものの長期曝露による毒性は不明であるために、わが国では飼料、食品ともに現時点で規制値は設定されていない。*A. Versicolor* などのSTC産生真菌は世界中に分布し、日本各地の土壌や穀類、特にコメを汚染することは広く知られているが、これまでに稲ワラを含む粗飼料が給与される牛群における生体由来サンプル(尿)濃度に基づくSTC浸潤動態についての報告は皆無である。

以上のことから、本課題においては、1) 我々が上述の尿中ZENモニタリングにおいて既に確立している、液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) 法を応用した尿中STC濃度測定法を確立すること、2) 1)において確立された尿中STC測定法を用いて、上述の摘発ZEN汚染牛

群由来保存尿サンプルの測定を行い、ZEN汚染稲ワラにおけるSTCとの共汚染の有無を検証することで、臨床応用に向けての基礎データを得ること、以上2点を目的とするものである。

2. 方 法

まず、我々が既に確立しているLC/MS/MS法による尿中ZEN濃度測定法をベースに、尿中STC濃度測定法の確立を目指すこと、次にこれまでに我々が初めて摘発したZEN自然汚染稲ワラ(8 ppm以上)が給与されていた牛群由来保存尿サンプルを用いてSTC測定を行い、ZENとSTCとの共汚染の有無を検証することを目的とした。

2.1 LC/MS/MS法を用いた牛尿中STC濃度測定法の確立

これまでに報告の無い牛尿中STC測定の可否を検証するために、LC/MS/MS法を用いた検出系の確立をはかる。まず、我々が既に尿中ZEN濃度測定で確立している手順、手法を基本に、以下に述べる一連の実験を行った。

① 尿サンプルの調整

経口摂取されたSTCが肝臓でどの程度グルクロン酸抱合されているのかを調べる目的で、尿サンプル前処理時の β -Glucuronidase/arylsulfatase添加の有無によるLC/MS/MS測定を行った。

② STC添加回収実験

尿中ZEN濃度測定に用いたLC/MS/MSの条件設定が、STC測定にも適応出来るか否かを検証するために、STC添加回収実験を行った。試験用尿サンプルに各濃度のSTC標準液を添加して、従来用いているC-18カラムで固相抽出後に、ZEN測定用調整済み条件によるLC/MS/MS測定を行って、STCの回収率を検討した。得られた一連の実験結果をもとに、溶媒濃度や流速などの最適条件を設定し、尿をサンプルとした場合のLC/MS/MSによるSTC測定系の確立を行った。

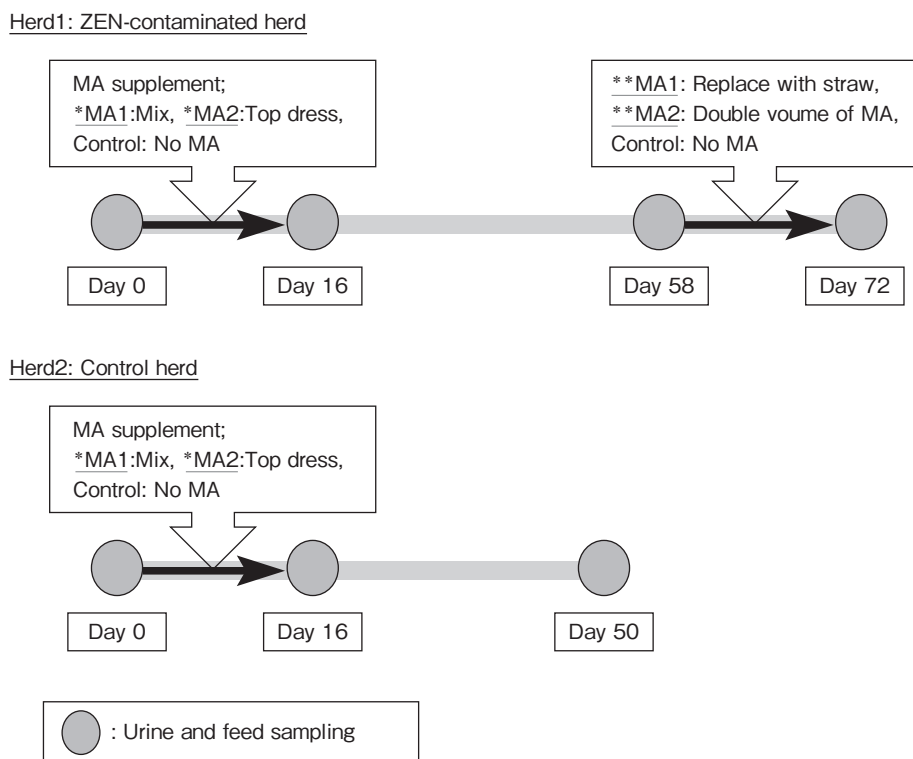


Figure 1 Protocol for mycotoxin adsorbent (MA) supplementation in dietary feeds and sampling of urine and feed samples. * MA1: MA was mixed with dietary concentrate. * MA2: MA was topdressed on the dietary concentrate. ** MA1: The usual straw was replaced by a new lot of straw with less contamination. ** MA2: Twice the volume of MA was topdressed on the dietary concentrate. Control: No MA was provided during the experimental period.

2.2 ZEN自然汚染牛群由来の保存尿を用いたLC/MS/MS法による尿中STC測定

これまでに報告の無い飼養環境下の牛群におけるZENとSTCの共汚染の有無を検証するために、我々が過去に摘発を行ったZEN自然汚染稲ワラ給与牛群（牛群 1），およびZEN非汚染牛群（牛群 2）の2牛群由来の保存尿サンプルを用いて、上記で確立したLC/MS/MS法による尿中STC濃度測定を行った。牛群はともに23ヶ月齢の黒毛和種肥育雌牛で、MT吸着剤添加群（MA 1：飼料と混合，MA 2：飼料へのトップドレス）とMT非添加群（コントロール）の各6頭ずつの3群である。サンプリングに関する詳細はFig 1に示した。尿サンプルの調整は2.1の実験結果をもとに、

β -Glucuronidase/arylsulfatase添加の有無や添加量を決定し、前処理を行った尿サンプルを固相抽出後にLC/MS/MS測定に供した。併せて、尿サンプリング時に採取した給与飼料サンプルについても、LC/MS/MS法による公定法を用いてSTC濃度の測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 LC/MS/MS法を用いた牛尿中STC濃度測定法の確立

① 尿サンプルの調整

尿サンプル前処理時の β -Glucuronidase/arylsulfatase添加の有無によるLC/MS/MS測定を行った結果、添加無の全ての尿サンプルでは

Table 1 STC concentrations in urine (pg/mg of Crea) in cattle herds with and without natural ZEN contamination, and effects of supplementation of mycotoxin adsorbents, as measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry

Samples		Day 0	Day 16	Day 58	Day 72
Herd 1 (ZEN contamination)	STC in straw (mg/kg)	0.15	0.17	0.24	New : 0.04 Old : 0.21
	STC in concentrate (mg/kg)	<0.01	<0.01	<0.01	NT
	STC in urine				
	MA 1	327.3 ± 26.2	208.9 ± 21.6	569.4 ± 110.7	32.6 ± 8.4 ^a
	MA 2	247.3 ± 56.5	238.7 ± 27.5	416.2 ± 61.6 ^c	258.3 ± 33.3 ^b
	Control	190.3 ± 43.2 ^a	181.8 ± 42.6	897.6 ± 96.6 ^{a,d}	354.2 ± 55.5 ^b
Samples		Day 0	Day 16	Day 50	
Herd 2 (no ZEN contamination)	STC in straw (mg/kg)	0.06	0.03	NT	
	STC in concentrate (mg/kg)	<0.01	<0.01	<0.01	
	STC in urine				
	MA 1	67.2 ± 21.8	147.1 ± 39.1	41.7 ± 19.0	
	MA 2	75.5 ± 22.3	85.9 ± 20.8	0	
	Control	19.8 ± 12.6 ^b	61.5 ± 23.2	0 ^b	

a-b, c-d within same row: Significantly different.

NT: not tested

STCの検出は出来なかったが、添加有の同一尿サンプルにおいてはSTC検出が可能であった。これらの結果より、経口摂取された飼料中STCはその大部分が肝臓でグルクロン酸抱合されていることが初めて明らかとなった。本結果から、以降の尿サンプル測定時には全てのサンプルに β -Glucuronidase/arylsulfataseを添加した前処理を行った。

② STC添加回収実験

尿中STC添加回収試験の結果、回収率は85%～120%であり、我々がZEN測定用に確立したLC/MS/MS測定系を基盤にした尿中STCのLC/MS/MS法による測定が十分可能であることが判明した。

3.2 ZEN自然汚染牛群由来の保存尿を用いた

LC/MS/MS法による尿中STC測定

各サンプリング時の両試験牛群における飼料および尿中STC濃度をTable 1に示した。牛群1の

Day 0 (190.3 ± 43.2pg/mg Crea) と Day 45 (897.6 ± 96.6pg/mg Crea) は、牛群2のそれら (Day 0, 19.8 ± 12.6pg/mg Crea; Day 45, 0 pg/mg Crea) と比較して有意に高い尿中STC濃度であった。一方、同一牛群間におけるDays 0, 14, 45の尿中STC濃度はMA 1, MA 2およびコントロール群の間でDay45におけるMA 2群 (416.2 ± 61.6pg/mg Crea) とコントロール群 (897.6 ± 96.6pg/mg Crea) の間以外、有意差は認められなかった。しかし、MA 1群のDay 72 (32.6 ± 8.4pg/mg Crea) における尿中STC濃度はMA 2群 (258.3 ± 33.3pg/mg Crea) とコントロール群 (354.2 ± 55.5pg/mg Crea) と比較して有意に低い濃度であった。

給与飼料中STC濃度については、両牛群における配合飼料中STC濃度は測定検出限界値 (0.01mg/kg) 以下であったが、牛群1における給与稲ワラ中STC濃度は、各サンプリング時にお

いて牛群2と比較して2～5倍高い濃度であった。以上の結果から、LC/MS/MS法による尿中STC濃度測定は可能であり、給与飼料中STC濃度を極めて良好に反映する指標であることが明らかとなった。

STCの摂取が牛の健康に与える影響についてはほとんど知られていないが、過去の報告によれば、*A. versicolor*感染が原因と思われるSTC (8 mg/kg) に汚染された飼料を給与された乳用牛群においては、急性症状としての血便排泄や死亡例が報告されている。今回測定を行ったZEN汚染牛群における飼料中STC濃度は、過去の報告よりもかなり低値であったために、急性の臨床症状が見られなかった可能性があるものと思われた。一般的に、牛に給与される飼料には異なるタイプの真菌が同時に感染し、それらの真菌が産生する複数のMTが同時汚染することが知られている。食品におけるSTCとZENの同時汚染に関する最近の報告によると、アフリカでサンプリングされた挽きトウモロコシ中にはSTC 6 µg/kgとZEN 44 µg/kgのほか、27種類の他のMTとの同時汚染が報告されている。一方、我々はこれまでに牛群1において、Day58からDay72の2週間に渡るZEN非汚染稲ワラ（低STC汚染）給与期間中に、試験牛の便性状が改善されたことを報告している²⁾。従って、多くの要因が試験牛の便性状改善に影響を与えたことが推測されるが、高濃度のZENおよびSTC摂取は、牛の慢性的な下痢症状を引き起こす原因の1つになる可能性が示唆された。

我々はMT吸着剤を飼料に添加することにより、添加後に尿中ZEN濃度が低下することを過去に報告している^{1, 2)}。一方、本試験では、吸着剤投与後に尿中STC濃度の低下は見られなかった。この結果より、我々が確立したLC/MS/MS法による尿中STC測定系は、客観的な吸着剤添加効果の評価に有用な方法であること、および吸着

剤の添加効果には、MTの種類による極めて大きな違いが存在することが初めて明らかとなった。今後、飼養環境下の牛群におけるSTCおよび他のMTとの共浸潤に関するデータベースの蓄積を継続して、牛の健康に対するリスクファクターの詳細な評価を行っていく必要がある。

4. 要 約

我々が既に確立している液体クロマトグラフィー質量分析 (LC/MS/MS) 法を応用した尿中ゼアラレノン (ZEN) 濃度測定法をベースに、新たに尿中ステリグマトシスチン (STC) 濃度測定系を確立するとともに、確立した尿中STC濃度測定法を用いてZEN汚染牛由来保存尿サンプルの測定を行った結果、牛尿中STC濃度測定が可能であること、牛尿中に存在する大部分のSTCはグルクロン酸抱合を受けていること、および本試験において牛に給与されていた飼料中ZENとSTCの共汚染の存在が初めて明らかにされた。さらに、尿中STC濃度を指標としたマイコトキシン (MT) 吸着剤添加効果に関して、本試験で用いた1種類の吸着剤による添加効果は認められなかったことから、用いるMT吸着剤のタイプや対象とする飼料中MT種により、吸着剤添加効果は大きく異なる可能性が示唆された。今後も飼養環境下の牛群における、継続的なMT浸潤動態の検証、およびデータベースの蓄積を継続するとともに、牛の健康に対するリスクファクターの詳細な評価を行う必要があることが示された。

文 献

- 1) Takagi M., Uno S., Kokushi E., Shiga S., Mukai S., Kuriyagawa T., Takagaki K., Hasunuma H., Matsumoto D., Okamoto K., Shahada F., Chenga T., Deguchi E., Fink-Gremmels J.: *J. Anim. Sci.*, **89**, 287~296, 2011.
- 2) Hasunuma H., Takagi M., Kawamura O., Taniguchi C., Nakamura M., Chuma T., Uno S.,

-
- | | |
|---|--|
| Kokushi E., Matsumoto D., Tshering C., Deguchi E.,
Fink-Gremmels J. : <i>J AnimSci</i> , 90 . 1610～1616,
2012. | Kokushi E., Watanabe U., Liu J., Marey M.,
Miyamoto A., Otoi T., Deguchi E., Fink-Gremmels
J. : <i>World Mycotoxin J</i> , 7 , 367～378, 2014. |
| 3) Fushimi Y., Takagi M., Hasunuma H., Uno S., | |

肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛医療への応用

Application of bronchoalveolar lavage to specify offending bacteria of pneumonia to cow medical treatment

帆 保 誠 二・野 口 倫 子・安 藤 貴 朗

(鹿児島大学共同獣医学部)

Seiji Hobo, Michiko Noguchi and Takaaki Andou

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

To minimize the improper use of antimicrobial agents and secure food safety, We have been trying to introduce the use of bronchoalveolar lavage and bronchoalveolar fluid examination to bovine medicine. We aimed to apply the technique we developed, and its clinical uses in equine medical treatment, to bovine medical treatment. Initially, because we needed basic data from a healthy cow to see if it was possible to pinpoint the bacterial causes of pneumonia, we examined a healthy cow's breeding environment and the distribution of bacteria in the bronchoalveolar region. We also investigated the bacterial distribution in the cow's nasal cavity. Next, we performed bronchoalveolar lavage on a cow with chronic bacterial pneumonia and examined the lavage fluid bacteriologically. The bronchoalveolar region of the clinically healthy cow was endoscopically normal and the fluid was aseptic. This meant that any bacterium isolated from the bronchoalveolar fluid of the chronically ill cow was likely to be the true cause of her pneumonia. The principal causative bacterium was successfully isolated from the bronchoalveolar fluid of the sick cow; it was highly likely to have been instrumental in deterioration of the cow's pneumonia.

1. 目 的

肺炎は、動物においてもヒトと同様に死因の上位に位置しており、獣医療において最も重要な感染症のひとつである。肺炎の原因菌については、多くの場合、鼻腔スワブあるいは病理解剖肺から分離された細菌に関する情報をもとに推察されてきた。そのため、真の肺炎原因菌が特定されることは少ない。これは、鼻腔スワブから得られる情報は、多くの場合、肺炎発症領域の情報を反映し

ないこと、また病理解剖は、ほとんどの場合、救命困難な病態に陥ってから実施されるため、急性期の肺炎の病態を反映していないことに起因する。従来、これらの情報をもとに抗菌薬を使用してきたことから、不適切な抗菌薬が長期間に渡って使用されることも多く、耐性菌の出現が危惧されてきた。

気管支肺胞洗浄法は、気管支肺胞領域の様々な情報をダイレクトに得る手法としてヒト医療、馬医療および小動物医療において実施されている^{1~6)}。

特に馬医療においては、肺炎原因菌の特定に留まらず肺炎の治療を目的として気管支肺胞洗浄法が臨床応用され、良好な臨床成績をあげている⁵⁾。しかし、馬以外の産業動物の気管支肺胞洗浄法に関する報告は極めて少ない^{7~10)}。これは手技的に熟練を要することや、一般的に使用される内視鏡よりも細径で長尺の気管支鏡を所有する医療機関が少ないことが主な原因であると考えられる。このような問題点を改善し、馬以外の産業動物に対しても気管支肺胞洗浄法を導入することが、今後の獣医療において極めて重要であると考えられる。馬医療における気管支肺胞洗浄法を応用した肺炎原因菌の特定や治療法の開発は、代表研究者が中心となって行ってきたものである^{1~5)}。その結果、肺炎発症馬に対する診断的かつ治療的な有効性が確認され、競走馬臨床に約20年間にわたって応用され続け、得られた肺炎原因菌や薬剤感受性の情報は、馬の臨床に広く利用されている。一方、牛および豚医療においては、特に幼獣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、その生産現場においても肺炎発症のコントロールとともに、早期診断法および確実な治療法の開発が急務である。

そこで我々は、牛医療に気管支肺胞洗浄法を導入し、肺炎原因菌の特定による適切な抗菌薬の使用法を確立することより、抗菌薬の不適切な使用を低減させ、食の安全の確保に繋げることが重要であると考えた。本研究では、これまでに馬医療において開発・臨床応用してきた気管支肺胞洗浄法に関する手法や知見を牛医療に应用することを以下により目指した。まず、肺炎原因菌を特定するためには健康牛での基礎的なデータが必要であるので、健康牛の鼻腔および気管支肺胞領域における細菌の分布状況を明らかにするとともに、飼養環境中の細菌分布についても調査した。続いて、肺炎発症牛に対して気管支肺胞洗浄を実施

し、細菌学的に検索した。

2. 方 法

2.1 健康子牛の鼻腔および気管支肺胞領域ならびに飼養環境中における細菌の分布状況調査

供試動物：臨床的に健康で気道の内視鏡検査で異常所見を認めないホルスタイン種子牛6頭（雄、14日齢、体重：51.2±3.4kg（平均値±標準偏差）；45.0~56.5kg（範囲））を供試した。

血液検査：試験直前に頸静脈から血液を採取し、血液自動分析装置を用いて末梢血中の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度およびヘマトクリット値を測定した。

呼吸器検体の採取および処理：70%エタノールに浸漬した綿花を用いて鼻孔周辺を清拭した後、培養用綿棒を可能な限り鼻腔内深部まで挿入し、スワブすることにより検体（鼻腔スワブ）を得た。続いて、非鎮静下でビデオスコープを鼻孔から挿入し、鼻腔および咽喉頭部を観察後、必要に応じ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（Fig. 1）。その後、気管支鏡を右中葉あるいは左前葉へとつながる気管支へ進め、気管支直径約5.5mmの気管支に楔入した。楔入部位に37℃に加温した滅菌生理食塩水50mLを気管支鏡の鉗子孔から注入し、即座に回収した。同操作を計2回実施し、混和したものを検体（気管支肺胞洗浄液：BALF）とした。得られた検体は冷蔵状態で検査室へ搬送し、検体採取後3時間以内に各種検査に供した。また、BALFの回収率を計測するとともに、白血球計算盤を用いて常法により細胞数を計数した。

飼養環境中の細菌検索：エアサンプラーを用いて、飼養環境中の細菌分布を調査した。すなわち、エアサンプラーを用いて5%ウマ血液含有コロ

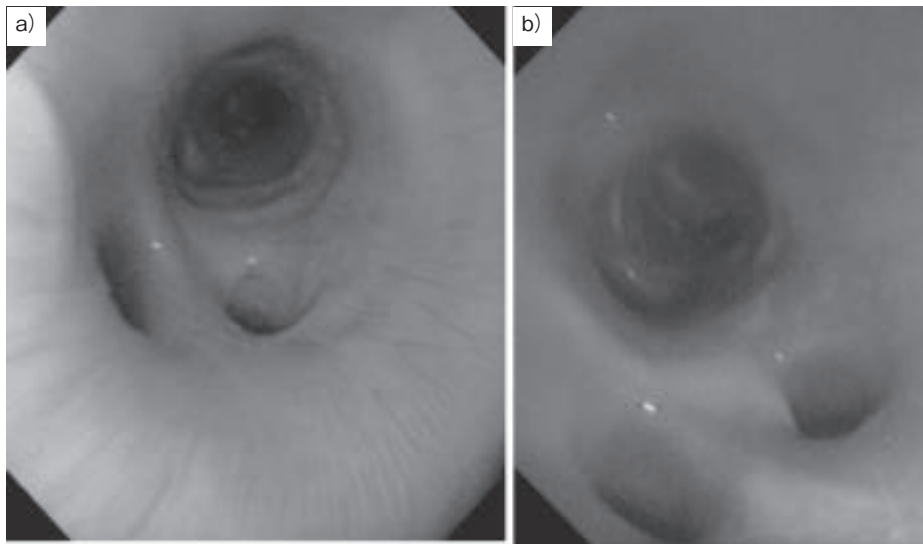


Fig.1 Bronchoscopic findings of the healthy cow and pneumonia affected cow.
a) healthy cow b) pneumonia affected cow

ビア寒天培地（BA培地）に直接、飼養環境中の空気を吹き付け、細菌の分布を調査した。

細菌分離検査：得られた検体のうち、鼻腔スワブは300 μ Lの滅菌生理食塩水に懸濁後、細菌分離検査に供した。また、BALFは遠心操作により100倍に濃縮した後に、沈渣分画を細菌分離検査に供した。検体は、BA培地およびマッコンキー寒天培地（MAC培地）に接種され、BA培地は2種類の培養法（微好気条件下：37℃、5 %CO₂条件下、37℃、嫌気条件下）で、MAC培地は1種類の培養法（37℃、好気条件下）で24～48時間培養された。エアサンプラーにより飼養環境中の空気を吹き付けられたBA培地は、微好気条件下で24時間培養された。培養後のBA培地から主要な細菌を分離し、純培養後にグラム染色検査および細菌同定検査（飛行時間型質量分析法：Time of Flight Mass Spectrometry:TOF-MS）を実施し、菌種を同定した。

マイコプラズマ分離検査：マイコプラズマ分離検査は、細菌分離検査と同様の検体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）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を用いて同定した。

なお本研究においては、*Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Histophilus somni*および*Mycoplasma*属を主要分離・同定対象細菌とした。

2.2 肺炎発症牛への気管支肺胞洗浄法の応用 による肺炎原因菌の特定

供試子牛：慢性化した肺炎発症牛5頭（雄2頭、雌3頭；5.0±1.0月齢（平均値±標準偏差））を供試した。

呼吸器検体の採取および処理ならびに細菌分離検査：先に示した方法と同様に気管支鏡を肺炎発症部位へ進め、罹患肺葉の気管支に楔入し洗浄することにより気管支肺胞洗浄液を得た。他は前述の

Table 1 Findings of the clinical, blood and bronchoalveolar lavage fluid exmermination.

Inspection item	Unit	Result (mean $\pm$ S.D.)
Rectal temperature	($^{\circ}\text{C}$)	39.2 $\pm$ 0.7
Heart rate	(beats/min)	99.0 $\pm$ 7.2
Respiration rate	(times/min)	29.0 $\pm$ 3.1
White blood count in the peripheral blood	($\times 10^2/\text{mm}^3$)	88.7 $\pm$ 12.7
Red blood count in the peripheral blood	($\times 10^4/\text{mm}^3$)	809.2 $\pm$ 72.4
Hemoglobin concentration in the peripheral blood	(g/dL)	10.0 $\pm$ 1.0
Hematocrit in the peripheral blood	(%)	32.0 $\pm$ 2.9
Recover rate in BALF	(%)	54.0 $\pm$ 13.3
Number of cells in BALF	($\times 10^5/\text{mL}$)	3.4 $\pm$ 2.4

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

Table 2 Results of bacterial isolation from nasal swab and bronchoalveolar lavage fluid in healthy cows.

Animal No.	Sample	Bacteria				Mycoplasma bovis	
		<i>P. multocida</i>	<i>M. haemorrhagica</i>	<i>H. somni</i>	<i>Others</i>	Direct culture	Enrichment culture
1	Nasal swab	—	—	—	> 5 species	—	—
2		—	—	—	> 5 species	—	—
3		—	—	—	> 5 species	—	—
4		—	—	—	> 5 species	—	—
5		—	—	—	> 5 species	—	—
6		—	—	—	> 5 species	—	—
1	BALF	—	—	—	—	—	—
2		—	—	—	—	—	—
3		—	—	—	—	—	—
4		—	—	—	—	—	—
5		—	—	—	—	—	—
6		—	—	—	—	—	—

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

P. multocida : *Pasteurella multocida*, *M. haemorrhagica* : *Mannheimia haemolytica*, *H. somni* : *Histophilus somni*

— : Culture negative

とおりである。

3. 結果と考察

3.1 健常子牛の鼻腔および気管支肺胞領域ならびに飼養環境中における細菌の分布状況調査

臨床検査において、供試子牛に呼吸器の異常所見は認められなかった。心拍数は軽度増加

(99.0 $\pm$ 7.2拍/分) していたが、直腸温 (39.2 $\pm$ 0.7 $^{\circ}\text{C}$) および呼吸数 (29.0 $\pm$ 3.1回/分) は正常範囲内であった (Table 1)。心拍数の増加は、試験実施者が供試子牛に触れたり、聴診を実施したりしたことが影響したものと考えられた。

血液検査においては、いずれも測定項目も正常範囲内であった (Table 1)。

BALFの回収率は54.0 $\pm$ 13.3%, BALF中細胞数

Table 3 Results of bacterial isolation from nasal swab and bronchoalveolar lavage fluid in chronic pneumonia affected cows.

Animal No.	Sample	Bacteria				<i>Mycoplasma bovis</i>	
		<i>P. multocida</i>	<i>M. haemorrhagica</i>	<i>H. somni</i>	Others	Direct culture	Enrichment culture
1	Nasal swab	—	—	—	> 5 species	—	—
2		—	—	—	<i>P. a.</i> , > 5 species	—	—
3		+	—	—	> 5 species	—	—
4		+	—	—	> 5 species	+	+
5		—	—	—	> 5 species	—	—
1	BALF	+	—	—	β	+	+
2		+	+	—	β	+	+
3		+	—	—	An	+	+
4		+	—	—	—	+	+
5		+	—	—	β , An	+	+

BALF : bronchoalveolar lavage fluid

P. multocida : *Pasteurella multocida*, *M. haemorrhagica* : *Mannheimia haemolytica*, *H. somni* : *Histophilus somni*

+ : Culture positive, — : Culture negative

P.a. : *Pseudomonas aeruginosa*, β : *beta-hemolytic bacterium*, An : *obligate anaerobic bacteria*

は $3.4 \pm 2.4 \times 10^5$ /mLであった (Table 1)。BALFの回収率および細胞数については、詳細な報告が見当たらないため既報と比較することは困難であるが、他の動物で得られた成績に近似していたことから正常範囲内と判断した。

細菌分離検査においては、鼻腔スワブ、BALFおよびエアサンプラー検体のいずれの検体からも*M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni* および*Mycoplasma*属菌はまったく分離されなかった (Table 2)。鼻腔スワブおよびエアサンプラー検体からは、これら以外の細菌が多数分離されたが、BALFからは細菌はまったく分離されなかった。既報では、健康な子牛においても鼻腔スワブから比較的高率にこれら4菌種が分離されているが、本研究ではまったく分離されなかった。これは、子牛の生産牧場および本学の動物飼養環境中にこれら細菌が多数存在しなかったことに起因すると思われる。

3.2 肺炎発症牛への気管支肺胞洗浄法の応用による肺炎原因菌の特定

細菌分離検査については、鼻腔スワブの2検体およびBALFの5検体から*P. multocida*が、BALFの1検体から*M. haemolytica*が分離された (Fig.1, Table 3)。また、*Mycoplasma bovis*が鼻腔スワブの1検体およびBALFの5検体から分離された。*M. haemolytica*, *P. multocida* および*Mycoplasma bovis*は、牛の肺炎の主要原因菌であり病態の悪化に強く関与していると考えられていることから^{7, 10, 11)}、本研究で分離された細菌も同症例の病態悪化の主因となっているものと推察された。一方、エアサンプラー検体からは*M. haemolytica*, *P. multocida*, *H. somni* および*Mycoplasma*属菌は分離されなかったが、他の細菌が多数分離された。飼養環境中にもこれら主要肺炎原因菌は存在すると考えられるが、他の菌種の絶対量が多かったため分離できなかったものと思われる。今後、選択培地を用いた主要肺炎原因菌の特定も試みたい。

本研究で供試した肺炎発症牛すべての気管支肺胞領域には、肺炎の主要原因菌が存在し、肺炎の悪化に強く関与しているものと考えられた。しかし、鼻腔スワブからの主要原因菌の分離は一部であり、肺炎原因菌が必ずしも鼻腔領域からは分離されないことが証明された。このことは、肺炎原因菌の特定を鼻腔スワブで行っても必ずしも肺炎原因菌を反映しないことを示しており、今後の肺炎原因菌特定は気管支肺胞洗浄液を用いる必要性が示された。しかし、今回は慢性化した肺炎発症牛5頭のデータであったので、今後、様々な臨床ステージにある症例の数を増やして検討することが重要であると考えられた。

本研究において、臨床的に健康で気道の内視鏡検査で異常所見を認めない子牛の気管支肺胞領域は無菌であることが示された。このことから、本来無菌である気管支肺胞領域から細菌が分離された場合、真の肺炎原因菌である可能性が高いことが推察可能となった。また、慢性化した肺炎症例牛の気管支肺胞領域からは、牛の主要な肺炎原因菌が分離され、肺炎病態の悪化に強く関与しているものと考えられた。今後は、様々な臨床ステージの肺炎発症牛の気管支肺胞領域からの細菌分離を行い、その病態との関連性を明らかにすることが重要であると考えられた。

4. 要 約

牛医療に気管支肺胞洗浄法を導入し、肺炎原因菌の特定による適切な抗菌薬の使用法を確立することより、抗菌薬の不適切な使用を減少させ、食の安全の確保に繋げることが重要である。本研究では、これまでに馬医療において開発・臨床応用してきた気管支肺胞洗浄法に関する手法や知見を牛医療に応用することを目指した。まず、肺炎原因菌を特定するためには健常牛での基礎的なデータが必要であるので、健常牛の鼻腔および気管支

肺胞領域における細菌の分布状況を明らかにするとともに、飼養環境中の細菌分布についても調査した。続いて、慢性化した肺炎発症牛に対して気管支肺胞洗浄を実施し、細菌学的に検索した。その結果、臨床的に健康で気道の内視鏡検査で異常所見を認めない子牛の気管支肺胞領域は無菌であることが示された。これにより、本来無菌である気管支肺胞領域から細菌が分離された場合、真の肺炎原因菌である可能性が高いことが推察可能となった。また、慢性化した肺炎発症牛の気管支肺胞領域からは、牛の主要な肺炎原因菌が分離され、肺炎病態の悪化に強く関与しているものと考えられた。

文 献

- 1) Hobo S, Oikawa M, Kuwano A, Yoshida K, Yoshihara T.: Effect of transportation on the composition of bronchoalveolar lavage fluid obtained from horses. *Am. J. Vet. Res.* **58**, 531 ~ 534, 1997.
- 2) Hobo S, Ogasawara Y, Kuroki Y, Akino T, Yoshihara T.: Purification and biochemical characterization of equine pulmonary surfactant protein D. *Am. J. Vet. Res.* **60**, 368~372, 1999.
- 3) Hobo S, Ogasawara Y, Kuroki Y, Akino T, Yoshihara T.: Purification and biochemical characterization of pulmonary surfactant protein A of horses. *Am. J. Vet. Res.* **60**, 169~173, 1999.
- 4) Hobo S, Yoshihara T, Oikawa M, Jones JH.: Surfactant proteins in bronchoalveolar lavage fluid of horses: assay technique and changes following road transport. *Vet. Rec.* **148**, 74~80, 2001.
- 5) Ito S, Hobo S, Eto D, Sato H.: Bronchoalveolar lavage for the diagnosis and treatment of pneumonia associated with transport in thoroughbred racehorses. *J. Vet. Med. Sci.* **63**, 1263~1269, 2001.
- 6) Ito S, Hobo S, Kasashima Y.: Bronchoalveolar lavage fluid findings in the atelectatic regions of anesthetized horses. *J. Vet. Med. Sci.* **65**, 1011 ~ 1013, 2003.
- 7) Allen JW, Viel L, Bateman KG, Rosendal S, Shewen PE, Physick-Sheard P.: The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can. J. Vet. Res.* **55**, 341~6, 1991.

- 8) Angen O, Thomse J, Larse LE, Larsen J, Kokotovic B, Heegaard PM, Enemark JM. : Respiratory disease in calves: microbiological investigations on trans-tracheally aspirated bronchoalveolar fluid and acute phase protein response. *Vet. Microbiol.* **28**, 135~171, 2009.
- 9) Suzuki K, Higuchi H, Iwano H, Lakritz J, Sera K, Koiwa M, Taguchi K. : Analysis of trace and major elements in bronchoalveolar lavage fluid of Mycoplasma bronchopneumonia in calves. *Biol. Trace Elem Res.* **145**, 166~171, 2012.
- 10) Subramaniam R, Herndon CN, Shanthalingam S, Dassanayake RP, Bavananthasivam J, Potter KA, Knowles DP, Foreyt WJ, Srikumaran S. : Defective bacterial clearance is responsible for the enhanced lung pathology characteristic of *Mannheimia haemolytica* pneumonia in bighorn sheep. *Vet. Microbiol.* **153**, 332~338, 2011.
- 11) Maunsell FP, Woolums AR, Francoz D, Rosenbusch RF, Step DL, Wilson DJ, Janzen ED. : *Mycoplasma bovis* infections in cattle. *J. Vet. Intern. Med.* **25**, 772~783, 2011.

乳牛の病原微生物感染における卵巣機能障害の発症機序の 解明

Mechanisms of ovarian dysfunction by bacterial infection in dairy cow

清水 隆

(帯広畜産大学畜産衛生学研究部門)

Takashi Shimizu

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

Exp. 1) Bovine ovaries were collected from a slaughterhouse, and the largest follicles were used (> 8 mm in diameter, $n = 38$). LPS concentration in the follicular fluid was measured using quantitative kinetic assay. Follicular steroidogenesis was evaluated by measuring the estradiol (E2) and progesterone (P4) concentration in follicular fluid and by analysing transcription levels of steroidogenesis-related genes in theca and granulosa cells. LPS concentration detected in follicular fluid ranged from 0.2 to 2.0 EU/mL. In follicles with a high level of LPS (> 0.5 EU/mL, $n = 15$), the concentration of E2 was lower and that of P4 was higher when compared to those in follicles with a low level of LPS (< 0.5 EU/mL, $n = 23$). Furthermore, in follicles with a high level of LPS, transcripts of steroidogenic enzymes such as CYP17 and P450arom were lower.

Exp. 2) Bovine theca cells expressed the LPS receptor gene complex: Toll-like receptor 4 (TLR4), CD14 and MD2. LPS suppressed progesterone (P4) and androstenedione (A4) production with downregulation of steroidogenic enzyme transcripts when theca cells were stimulated with LH. By contrast, LPS did not affect P4 or A4 production when theca cells were stimulated with E2. P4 and A4 production in theca cells was suppressed by LPS as early as at 48 h of culture.

These findings indicate that LPS present in follicular fluid may cause ovarian dysfunction by inhibiting follicular activity.

1. 目 的

本研究は、子宮内膜炎牛の卵巣内の発育途上の卵胞の卵胞液中リポポリサッカライド (LPS) 濃度およびエストラジオール (E2) やプロジェステロン (P4) を同時に測定することによるLPSと卵胞機能との相互連関の検証、また卵胞発育期

にある卵胞構成細胞に特異的な機能であるステロイドホルモン産生に及ぼすLPSの影響に焦点をあて、乳牛の生産性の向上を目指した病原微生物感染における卵巣機能障害の発症機序の解明を目的としている。

2. 方 法

2.1 研究課題1. 子宮内膜炎の牛卵巣内卵胞の各発育段階別の卵胞液中LPS濃度の解析

健康な乳牛の卵巣内には様々な発育段階の卵胞が存在している。子宮内膜炎牛の卵巣においても同様であり、発育途上の卵胞内には感染した病原微生物から放出されたLPSを含有している可能性があるが、卵胞の発育ステージとLPSとの詳細な検討はこれまでにされていない。

そこで本研究では、食肉処理場由来の乳牛の生殖器官を利用し、子宮内膜炎（子宮内に膿が蓄積されている状態、腐敗臭のするものなど）と判断した子宮に付随している卵巣を採取し、各発育段階の卵胞の卵胞液を採集する。卵胞直径算出計算式モデルを利用し、採集した卵胞液の量からその卵胞の大きさを算出する。また採取した卵胞液は、LPS測定キット（Endospecy ES-24S kit, Seikagaku Biobusiness）を用いて測定すると同時に卵胞液中のエストラジオールおよびプロジェステロンも酵素免疫法（EIA）により測定する。

さらに、卵胞液採取時に同時に取れる少量の顆粒層細胞から出来る限りRNAを抽出して、ステロイド産生関連酵素群の遺伝子発現を解析する。

これらの解析により、子宮内膜炎によるLPSとステロイド産生との相関関係が明らかになるとともに、影響を受けやすい卵胞の発育段階および顆粒層細胞への影響が明確になる。

2.2 研究課題2. 卵胞発育過程の卵胞膜細胞のステロイド合成能におけるLPSの影響解析

我々は、これまでの研究で卵胞発育過程の卵胞膜細胞において、LPSの受容体であるTLR-4、MD-2およびCD14の遺伝子が発現していることを明らかにした。このことは、卵胞が発育する時期にLPSが体内に存在すれば、卵胞膜細胞がLPSを受容することができ、LPSが卵胞膜細胞の機能に直接的に影響している可能性を示唆している。そこで、本研究課題では、卵胞発育過程にある卵胞を小卵胞と大卵胞とに分け、それぞれから卵胞膜細胞を分離・採取する。採取した卵胞膜細胞に下垂体から分泌される黄体形成ホルモン（LH）を添加し、同時にLPSも添加した後、卵胞膜細胞から分泌された培地中のプロジェステロンおよびアンドロジェン濃度を測定する。さらに、培養した細胞からはホルモン産生に関与する酵素群の遺伝子発現を定量解析する。これらの研究により、LPSが影響を及ぼす卵胞の発育段階の時期、およびその強度が明らかとなる。

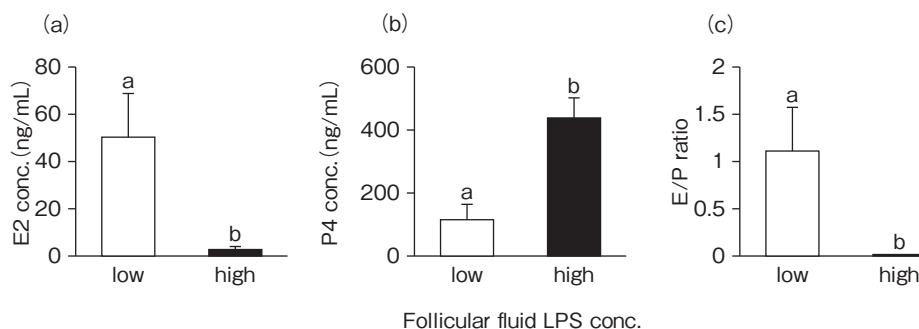


Fig. 1 (a) Estradiol (E2) and (b) progesterone (P4) concentration and (c) the ratio of E2 and P4 production (E/P ratio) in the follicular fluid of large follicles (> 8 mm diameter) from bovine ovary. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as 'low' (white bar, n = 13) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as 'high' (black bar, n = 13). All values are shown as mean $\pm$ SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$).

3. 結果と考察

3.1 子宮内膜炎の牛卵巢内卵胞の各発育段階別の卵胞液中LPS濃度の解析

卵胞液中のLPS濃度が高い卵胞と低い卵胞におけるエストラジオール (E) 濃度およびプロジェステロン (P) 濃度との関係をFig. 1に示した。

卵胞液中のLPS濃度が高い卵胞では低い卵胞に比べ、エストラジオール濃度が低く、プロジェステロン濃度が高かった。また、卵胞の活性状態の指標であるE/P比については、卵胞液中のLPS濃度が低い卵胞は高い卵胞に比べ、E/P比が高かった。これらの結果は、LPSが卵胞のステロイドホルモン産生に影響していることを示している。LPSは、大腸菌を感染させた乳牛の乳汁および血液中¹⁾、および子宮炎の卵胞液²⁾や血液中³⁾に検出された。本研究では、卵胞液中のLPS濃度は、0.2~2.0 EU/ml (0.02~0.2 ng/ml) の範囲で検出された。この卵胞液中のLPS濃度は、分娩後40日から60日の乳牛を用いたHerath et al., ²⁾の研究結果に比べ非常に低い値である。このLPS濃度の不一致は、乳牛の分娩後日数の相異に関連しているかもしれない。本研究では、食肉処理場から採

取した子宮および卵巢を用いているため、分娩後の日数が不明であり、卵巢の状態が正確に判断できない。従って、今後は子宮炎あるいは子宮内膜炎に罹患した乳牛の卵巢内卵胞から卵胞液を採取し、LPS濃度を測定する必要があると考えている。

興味深いことに、本研究における高LPS卵胞は、Herath et al. ²⁾の研究結果と比べ低いにも関わらず、この卵胞のエストラジオール濃度は抑制されていた。卵胞のエストラジオールは、それに内在する顆粒層細胞という細胞によって合成させる。さらに、顆粒層細胞がエストラジオールを産生するためには、もう一つの卵胞構成細胞である卵胞膜細胞が産生するアンドロジェンが重要な役割を担っている。すなわち、顆粒層細胞で産生されるエストラジオールは、卵胞膜細胞で産生されるアンドロジェンの量に依存するため、顆粒層細胞の機能だけでなく卵胞膜細胞の機能も重要である。このようなことから、卵胞膜細胞のアンドロジェン産生に関わるCYP17という酵素の遺伝子発現を解析したところ、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞の卵胞膜細胞で有意に低かった (Fig. 2b)。また、CYP17遺伝子の発現に関与する黄体形成ホルモン (LH) の受容体 (LHr) の発現も解析したと

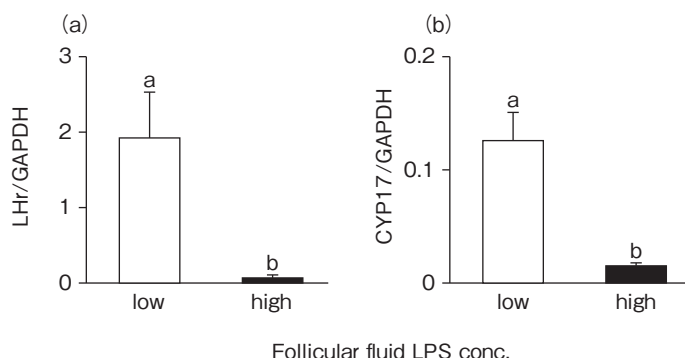


Fig. 2 (a) mRNA expression of LHr (a) and CYP17 (b) in theca cells of large follicles (> 8 mm diameter) from bovine ovaries. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as 'low' (white bar, n = 13) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as 'high' (black bar, n = 13). All values are shown as mean $\pm$ SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$).

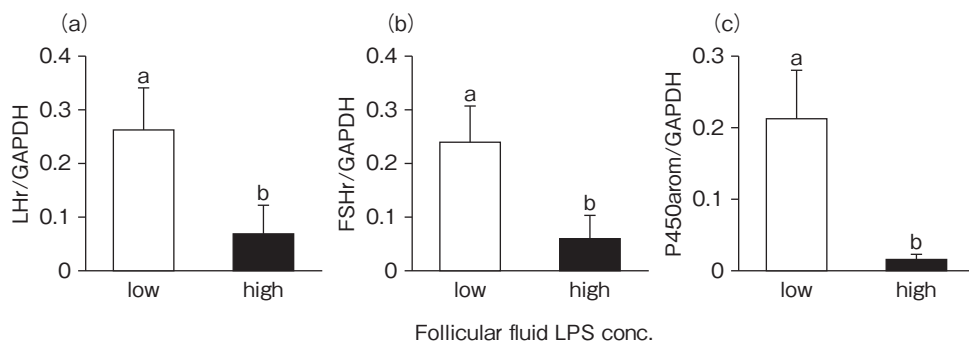


Fig. 3 mRNA expression of (a) LHR, (b) FSHR, and (c) P450arom in the granulosa cells of large follicles (> 8 mm diameter) from bovine ovaries. Cows with a follicular fluid LPS concentration of less than 0.5 EU/mL were categorized as 'low' (white bar, $n = 13$) and those with a concentration greater than 0.5 EU/mL were categorized as 'high' (black bar, $n = 13$). All values are shown as mean $\pm$ SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$).

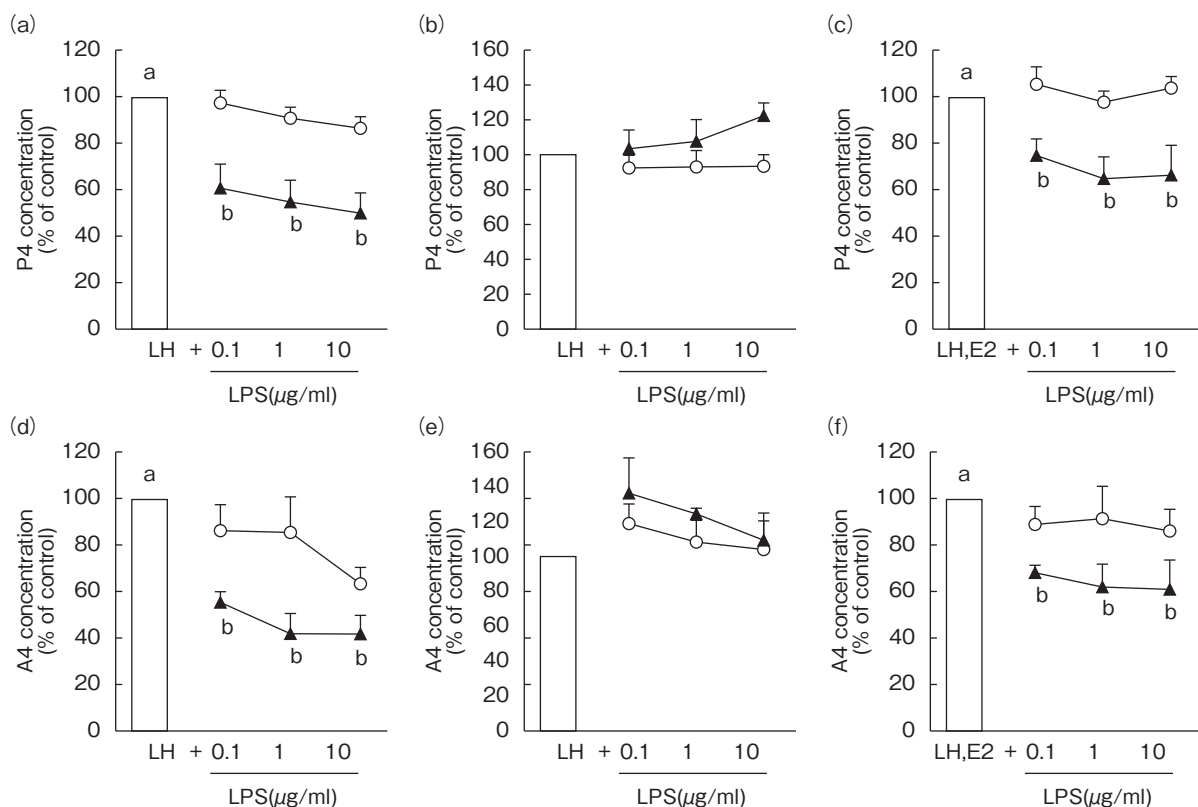


Fig. 4 Effect of LPS on the production of progesterone (P4; a-c) and androgen (A4; d-f) in bovine theca cells from large follicles (>8.5mm) during term 1 (white circles, 0-48h) and term 2 (black triangles, 48-96h). Theca cells were stimulated with 25 ng/ml luteinizing hormone (LH; a, d), 100 ng/ml estradiol (E2; b, e) or LH and E2 (c, f). Data are expressed as the percentage of control (100 %) steroid accumulation in the culture medium. All values are means $\pm$ standard error of the mean of three independent experiments. Values with different letters (a, b) are significantly different between groups ($P < 0.05$).

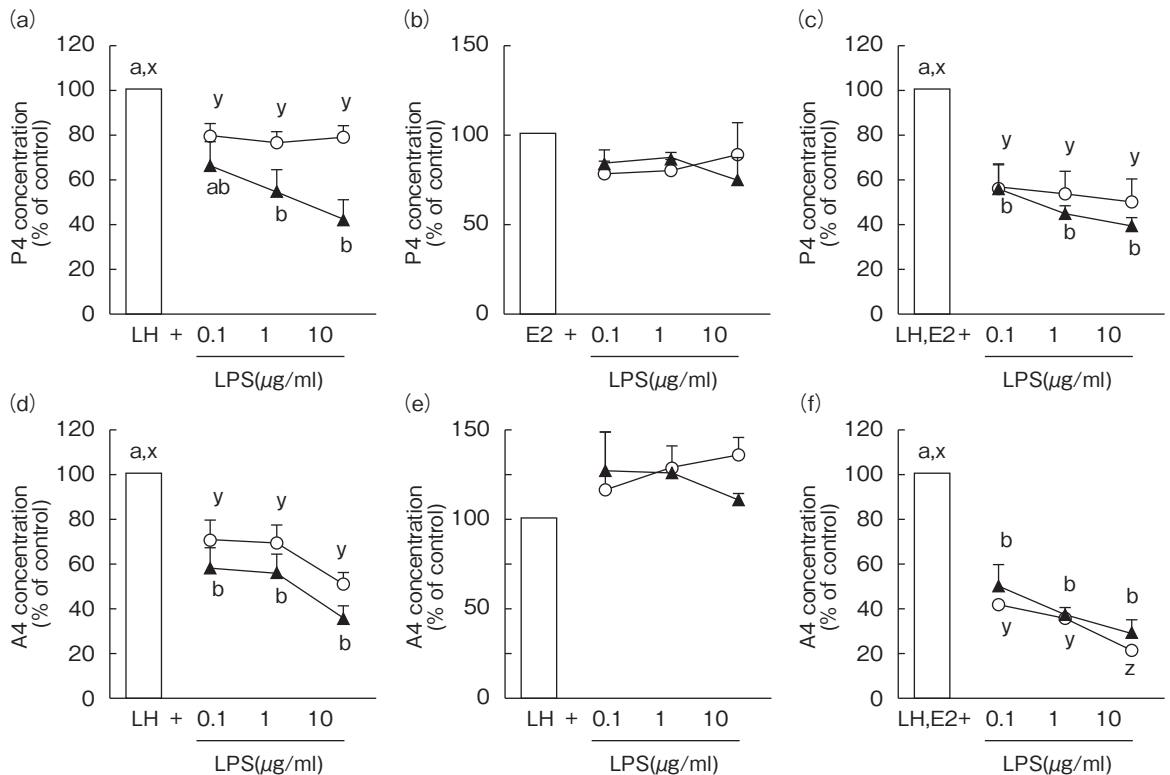


Fig. 5 Effect of LPS on the production of progesterone (P4; a-c) and androgen (A4; d-f) in bovine theca cells from small follicles (<8.5mm) during term 1 (white circles, 0-48h) and term 2 (black triangles, 48-96h). Theca cells were stimulated with 2.5 ng/ml luteinizing hormone (LH; a, d), 100 ng/ml estradiol (E2; b, e) or LH and E2 (c, f). Data are expressed as the percentage of control (100 %) steroid accumulation in the culture medium. All values are means $\pm$ standard error of the mean of three independent experiments. Values with different letters (a, b) are different between groups ($P < 0.05$)

ころ、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞の卵胞膜細胞で有意に低かった (Fig. 2a)。さらに、顆粒層細胞のエストラジオール産生に関わる P450aromatase (P450arom) という酵素の遺伝子発現を解析したところ、低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞で有意に低かった (Fig. 3c)。また、P450arom遺伝子の発現に関与するLHrおよび卵胞刺激ホルモン (FSH) の受容体 (FSHr) の発現も解析したところ、両受容体ともに低LPS卵胞に比べ高LPS卵胞で有意に低かった (Fig. 3aおよび3b)。これらの結果から、LPSは卵胞の顆粒層細胞および卵胞膜細胞のステロイドホルモン産生関連因子の遺伝子発現を抑制することが明らか

となった。LHは卵胞膜細胞のアンドロゲン産生を刺激し、FSHは顆粒層細胞のエストラジオール産生を刺激することが知られている。本研究において、卵胞膜細胞のLH受容体および顆粒層細胞のFSH受容体の発現が、高LPS卵胞で抑制されていたことから、LPSがこれらの受容体の発現を阻害することによってステロイドホルモン産生の抑制に寄与している可能性が示唆された。

3.2 卵胞発育過程の卵胞膜細胞のステロイド合成能におけるLPSの影響解析

前節の研究結果から、高濃度のLPSを含有した卵胞において、顆粒層細胞および卵胞膜細胞のステロイドホルモン産生の機能が低下していること

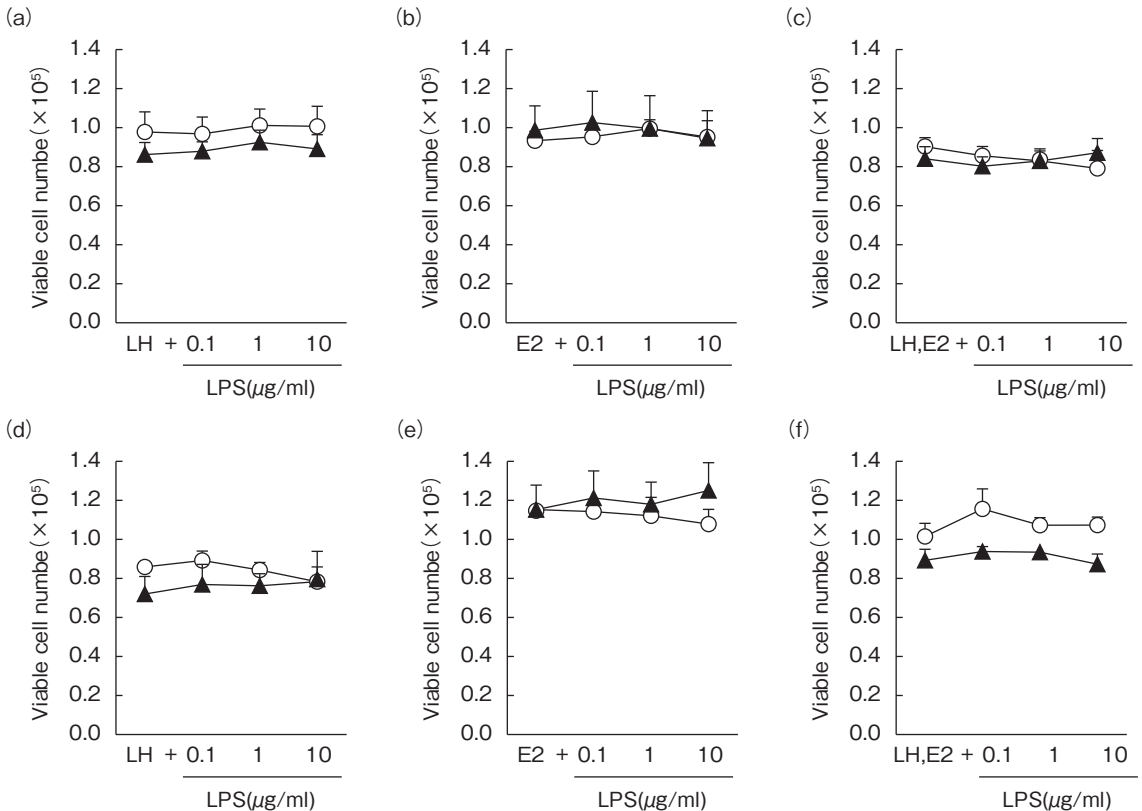


Fig. 6 Effect of lipopolysaccharide (LPS) on number of viable theca cells isolated from large follicles ($>8.5\text{mm}$; a-c) and small follicles ($<8.5\text{mm}$; d-f) during term 1 (white circles, 0-48h) and term 2 (black triangles, 48-96h). Theca cells were stimulated with 25 ng/ml luteinizing hormone (LH; a, d), 100 ng/ml estradiol (E2; b, e) or LH and E2 (c, f). All values are means $\pm$ standard error of the mean of three independent experiments.

が示された。そこで、ステロイドホルモン産生に最も重要な細胞である卵胞膜細胞のアンドロジェンおよびプロジェステロン産生に及ぼすLPSの直接的な影響を観察した結果、LPSは小卵胞および大卵胞から採取した卵胞膜細胞をLH含有培地で培養した場合、アンドロジェンおよびプロジェステロン産生を抑制することが明らかとなった (Fig. 4, Fig. 5)。

興味深いことに、LPSは小卵胞および大卵胞から採取した卵胞膜細胞の生存には全く関係しないことが示された (Fig. 6)。これらの結果から、LPSは細胞の生存には関与しないが、細胞の機能に影響することを示している。

ステロイドホルモン産生におけるLPSの障害メ

カニズムについては、まだよくわかっていない。本研究では、LPSが小卵胞および大卵胞から採取した卵胞膜細胞のステロイドホルモン産生を阻害することが示された。一方、Herath *et al.*²⁾の研究では、卵胞の大きさに関係なく、LPSは卵胞膜細胞のアンドロジェン産生を阻害しなかった。本研究とHerath *et al.*²⁾の研究結果との不一致は、培地中のLH添加の有無によるものと考えられる。LHはサイクリックAMP (cAMP) を介して、ステロイドホルモン産生に関連する酵素の遺伝子発現 (転写) に関与することが知られている⁴⁾。Taylor&Terranova⁵⁾は、LH処理したマウス卵胞膜細胞のアンドロジェンおよびプロジェステロン産生を抑制したことを報告した。また、この研究

では、LPSの効果を阻害するherbimycin Aを処理した卵胞膜細胞において、cAMPの増加が認められたことを報告している。したがって、LPSの抑制効果はLHによって活性化されたcAMPシグナル経路に関与しているかもしれない。

本研究において、卵胞膜細胞のアンドロジェンおよびプロゲステロン産生は、小卵胞から採取した卵胞膜細胞では培養48時で抑制され、大卵胞から採取した卵胞膜細胞では培養96時で抑制されることが分かった。これらの結果は、LPSに対する感受性は小卵胞よりも大卵胞の卵胞膜細胞の方が高いことを示している。LPSの細胞内シグナル伝達には、2つの経路が存在する。すなわち、MyD88に依存的な経路とTRIFに依存的な経路である。MyD88依存的経路はNF- κ Bの早期の活性化に関与し、TRIF依存的経路はNF- κ B活性化の遅延にかんよすることが知られている⁶⁾。したがって、本研究で観察されたLPS感受性の相異はLPSの細胞内シグナル伝達経路と関係しているかもしれない。

4. 要 約

本研究では、子宮内膜炎の疾患度合と卵巣機能との相関関係を明確化するため、生体サンプルを用いて、子宮の炎症を組織学的に評価するとともに卵巣内卵胞のLPS濃度およびステロイドホルモン濃度について同一卵胞で測定を行った。子宮の炎症度合に関わらず、卵巣内卵胞には高濃度のLPSと低濃度のLPSを含有する卵胞が存在することが明らかとなった。また、高濃度LPS卵胞では、低濃度LPS卵胞に比べエストラジオール濃度が低下していること、さらにこのホルモン産生に関わる顆粒層細胞のP450aromおよび卵胞膜細胞のCYP17の遺伝子発現が低下していることが明らかとなった。これらの研究成果をもとに、ステロイドホルモン産生に最も重要な細胞である卵胞膜

細胞のアンドロジェンおよびプロゲステロン産生に及ぼすLPSの直接的な影響を検討した。LPSは小卵胞および大卵胞から採取した卵胞膜細胞をLH含有培地で培養した場合、アンドロジェンおよびプロゲステロン産生を抑制することが明らかとなった。さらに、アンドロジェンおよびプロゲステロン産生に関与するCYP17およびStARという酵素の遺伝子発現を解析したところ、両因子ともにLPSにより抑制されることが明らかとなった。

これらの研究成果から、分娩後の子宮における病原微生物の感染による繁殖障害の要因の一つにLPSが関与していること、またその作用メカニズムは卵胞膜細胞のアンドロジェン産生を抑制することが明らかとなった。これらのことから、卵胞発育における卵胞膜細胞に対するLPSの影響が明確化され、生殖内分泌学におけるLPSの意義が一層明らかになったとともに、分娩後に高頻度に起こる子宮の炎症による卵巣機能障害の原因の一端が明らかとなった。本研究成果は、子宮炎および子宮内膜炎による卵巣機能障害に対する予防および対処法の提案・確立につながり、乳牛の生産性向上に貢献することが期待される。

文 献

- 1) Hakogi, E., Tamura, H., Tanaka, S., Kohata, A., Shimada, Y., Tabuchi, K.: *Veterinary Microbiology*, **20**, 267~274, 1989.
- 2) Herath, S., Williams, E.J., Lilly, S.T., Gilbert, R.O., Dobson, H., Bryant, C.E., Sheldon, I.M.: *Reproduction*, **134**, 683~693, 2007.
- 3) Mateus, L., Lopes da Costa, L., Diniz, P., Ziecik, A.J.: *Animal Reproduction Science*, **76**, 143 ~ 154, 2003.
- 4) Magoffin, D.A.: *Int J Biochem Cell Biol*, **37**, 1344~1349, 2005.
- 5) Taylor, C.C., Terranova, P.F.: *Endocrinology*, **136**, 5527~5532, 1995.
- 6) Kawai, T., Akira, S.: *Immunity*, **34**, 637~650, 2011.

平成25年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉および食肉製品の食品的価値，加工技術及び家畜生産技術の向上に関する研究又は調査

単位：千円

研 究 課 題	継続 年度	代 表 研 究 者		助成金額
		代表研究者名	所 属 機 関	
発酵食肉製品由来の機能性ペプチドに関する研究	H.24～	津田 治敏	九州栄養福祉大学食物栄養学部	800
食肉内部への食中毒菌の侵入に影響を与える因子の解明と電解水処理による殺菌法の確立		島村 裕子	静岡県立大学食品栄養科学部	1,000
食肉製品の客観的嗜好性評価に関する研究（第2報）	H.22～	芳賀 聖一	名城大学農学部	1,000
生活習慣病予防効果を有する食肉素材の創出を目指した加工技術の確立		好田 正	東京農工大学大学院農学研究科	1,000
牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究（第3報）	H.23～	山之上 稔	神戸大学大学院農学研究科	1,000
味覚センサを用いた和牛の味の数値化と可視化に関する研究		都甲 潔	九州大学大学院システム情報科学研究科	1,000
牛肉に関する健康指標の策定と赤身牛肉の消費者ニーズ調査		広岡 博之	京都大学大学院農学研究科	1,000
豚血液由来抗肥満素材による内臓脂肪蓄積抑制機構の解明	H.24～	上曾山 博	神戸大学大学院農学研究科	1,000
食肉の給与が海馬のタンパク質リノ酸化および遺伝子発現におよぼす影響		豊田 淳	茨城大学農学部	1,000
畜産副産物の中性脂肪改善効果について		岡本 芳晴	鳥取大学農学部	1,000
血糖値と血中アミノ酸，オメガ3脂肪酸，血栓因子の関連に関する研究		田中 明	女子栄養大学栄養クリニック	650
冠動脈疾患患者における血中アミノ酸・脂肪酸組成と動脈硬化惹起性リポ蛋白および血栓因子の関連に関する研究		木庭 新治	昭和大学医学部	700
食肉類の摂取と血中アミノ酸，オメガ3脂肪酸及び血栓因子の関連に関する研究		高尾 哲也	昭和女子大学生活科学部	1,200
畜産物由来ヘム鉄摂取について食事調査における研究—発育期スポーツ選手の体組成に対する効果—	H.24～	坂元 美子	神戸女子大学健康福祉学部	1,000
牛肉の質に関連する新たな脂肪酸合成経路の探索とバイオマーカーの同定		溝口 康	明治大学農学部	1,000
牛肉の風味に関与する遺伝子の機能解析		米倉 真一	信州大学農学部	1,000
コレシストキニンA受容体遺伝子を指標とした効率的な地鶏生産に関する研究		力丸 宗弘	秋田県畜産試験場	850
天然記念物「黒柏鶏」の遺伝的特徴を活用した地鶏「長州黒かしわ」のDNA識別の可能性の検討		関谷 正男	山口県農林総合技術センター	800

ブタ精子核クロマチンの構造安定性を司る鍵分子の特定とそれを指標とした新たな精子受精能評価法の確立	高坂 哲也	静岡大学大学院 農 学 研 究 科	1,100
アボトーシス阻害因子の人為制御による家畜の潜在的 卵子救命法の創出	眞鍋 昇	東京大学大学院 農学生命科学研究 科 附 属 牧 場	1,000
かごしま黒豚における授乳中発情の誘起試験	野口 倫子	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	900
新規繁殖制御中枢刺激剤が黒毛和種の卵胞発育に与える 効果についての研究	松田 二子	名古屋大学大学院 生命農学研究 科	1,200
ウシ胚盤胞のマウス子宮内あるいは体外培養における 休眠誘導の可能性	山田 雅保	京都大学大学院 農 学 研 究 科	1,100
牛の発情・妊娠における迅速かつ非破壊診断システムの 開発	ツェンコヴァ ルミアナ	神戸大学大学院 農 学 研 究 科	1,100
リソソーム酵素活性制御による高温ストレス下でのウ シ胚発生改善に関する研究	山中 賢一	佐賀大学農学部	1,100
牧草由来の機能性成分を用いた初乳中免疫グロブリン の改善方法の開発	久米 新一	京都大学大学院 農 学 研 究 科	950
乳肉および反芻家畜体内の抗酸化能を高めうる新飼料 の機能評価	小林 泰男	北海道大学大学院 農 学 研 究 院	1,000
食肉におけるカルノシン関連ジペプチド増量法確立の ための基礎研究	友永 省三	京都大学大学院 農 学 研 究 科	750
地鶏生産における初期栄養操作による免疫能向上に関 する研究	太田 能之	日本獣医生命科学 学 大 学 応 用 生 命 科 学 部	1,000
胎仔期のタウリン供給強化によるブタの筋形成促進	勝俣 昌也	(独) 農業・食品 産業技術総合研 究機構畜産草地 研 究 所	1,000
肉質を変化させる天然物の探索	内田 隆史	東北大学大学院 農 学 研 究 科	1,200
完全自給粗飼料給与における放牧と未放牧が日本短角 種の肉質に与える影響	小笠原英毅	北里大学獣医学 部 附 属 FSC	1,000
畜肉生産性向上を目指した分岐鎖アミノ酸含強化飼料 用ダイズの開発	湯浅 高志	宮崎大学農学部	1,000
被災地産肉現場の風評被害対策を目的とした放牧地空 間放射線量の自動測定システムの実証研究	平田 統一	岩手大学農学部	1,000
腫瘍関連遺伝子発現動態解析による非典型的牛白血病 の発症診断法の開発	猪熊 壽	帯 広 畜 産 大 学 畜 産 学 部	1,000
飼養環境下の牛群におけるマイコトキシン浸潤動態の 検証—尿中ステリグマトシスチン濃度測定法の確立と その臨床応用—	高木 光博	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	500
肺炎原因菌の特定を目的とした気管支肺胞洗浄法の牛 医療への応用	帆保 誠二	鹿 児 島 大 学 共 同 獣 医 学 部	1,000
乳牛の病原微生物感染における卵巣機能障害の発症機 序の解明	清水 隆	帯 広 畜 産 大 学 畜 産 衛 生 学 研 究 部 門	1,100
合	計	38件	37,000

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25年度 (Vol. 32)

2014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——恒心社出版株式会社

< 非売品・無断禁転載 >

