

平成29年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 36

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栄誉に浴したのですが、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方の下に私は、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、加工等に関する研究又は調査に優れた業績が認められる研究者の表彰
- (4) 食肉の生産、処理、加工等に関する情報の普及及び広報

(事業実績)

年度	研究調査助成		
	第1回	48件	60,000千円
昭和57年度			
58	2	52	54,400
59	3	60	49,800
60	4	62	48,000
61	5	70	53,000
62	6	79	58,900
63	7	95	70,500
平成元年度	8	86	74,250
2	9	79	60,000
3	10	70	50,000
4	11	86	60,000
5	12	81	60,000
6	13	81	60,000
7	14	82	65,000
8	15	81	69,100
9	16	78	59,000
10	17	82	60,000
11	18	67	47,000
12	19	57	41,000
13	20	53	37,000
14	21	58	40,000
15	22	55	41,000
16	23	55	48,000
17	24	56	48,000
18	25	11	10,000
19	26	12	10,000
20	27	15	16,900
21	28	11	10,000
22	29	11	10,400
23	30	12	12,000
24	31	13	13,000
25	32	38	37,000
26	33	58	54,800
27	34	69	66,000
28	35	71	69,000
29	36	74	75,000

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37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36回（平成29年度）助成事業における74件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告とともに、第3回となります伊藤記念財団賞授賞事業の授賞者とその業績概要と学会等事業助成の概要をとりまとめたものであります、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30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 Japanease ; 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.36 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. 2018

Koichi Ito

The chief director

The Ito Foundation



研究助成事業

目 次

薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌効果とメカニズム解析

..... 作道 章一¹・山城 梨沙¹・三沢 達也²

(¹琉球大学医学部保健学科生体代謝学分野,

²佐賀大学大学院工学系研究科電気電子工学専攻) 3

地鶏肉の美味しさの決定要因の解明

..... 本 田 和 久 (神戸大学大学院農学研究科) 8

市販食肉より分離されたリストeriaのストレス応答に関する研究

..... 落合 由嗣・吉川 悠子 (日本獣医生命科学大学) 13

食品加工機器の信頼性と安全性向上のための基礎的研究

..... 小茂鳥 潤 (慶應義塾大学理工学部機械工学科) 19

食肉の高品位熟成に寄与する可食性蓄熱マイクロカプセルの開発

..... 小 林 敬 (京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻) 24

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

..... 根 岸 晴 夫 (中部大学応用生物学部) 31

オリーブ葉抽出液が食肉タンパク質の加熱ゲル物性および嗜好性に及ぼす影響

..... 小川 雅廣・Agus Bahar Rachman・赤澤 隆志

(香川大学農学部応用生物科学科) 37

食肉加工品のコク味増強を可能とするグルタチオンアナログの発酵生産法の開発

..... 伊 藤 智 和 (名古屋大学大学院生命農学研究科) 46

タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの基質認識機構の変改 (Ⅱ)

..... 滝 田 祯 亮 (京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻) 51

ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割

..... 西 村 敏 英 (女子栄養大学栄養学部) 59

ドライエイジング牛肉に特徴的な香氣成分に関する研究

..... 河 原 聰 (宮崎大学農学部) 68

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

..... 山之上 稔¹・趙 姬楠¹・中田 悠介¹・上田 修司¹・

市村 さやか²・吉田 由香²・羽原 正秋³・池崎 秀和³

(¹神戸大学大学院農学研究科、²食肉科学技術研究所、³株式会社INSENT) 74

食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチンの影響（Ⅱ）	市村 さやか・高橋 真佐郎・中村 幸信・ 吉田 由香・猪口 由美・服部 昭仁*	80
霜降り豚肉の香味に寄与する因子に関する研究	松石 昌典・小林 優多郎	(日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科)	89
加熱肉に生じる赤色に対するカルノシンの影響	中村 幸信・江田 芳崇・吉田 由香・猪口 由美	(一般社団法人食肉科学技術研究所)	97
牛心臓由来新規脂質代謝改善ジペプチドを活用した革新的コレステロール代謝改善素材開発のための基礎研究	長岡 利 (岐阜大学応用生物科学部)	104	
食肉タンパク質の抗肥満および脂質代謝促進効果に関する研究	若松 純一 (北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)	107	
肥満に伴うサルコペニア発症予防に対するカルノシン摂取の有用性	後藤 孔郎・正木 孝幸・柴田 洋孝 (大分大学医学部 内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座)	113	
野生動物肉の食料資源としての利用に関する研究：生理活性機能の検討	坂田 亮一・竹田 志郎・時田 昇臣*	(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)	118
機能性畜産副生成物を用いた糖尿病合併高血圧症の改善を目指した開発研究	吉川 豊・糸井 亜弥 (神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)	123	
食肉を中心とする食品由来核酸の腸管保護機能の解析	河合 慶親 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)	129	
低温乳酸発酵ならびに超高温加熱処理を施した筋原線維タンパク質モデル系におけるタンパク質分解と機能性発現に関する研究	林 利哉・長澤 麻央・芳賀 聖一・小川 幸彦* (名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場)	135	
牛経済形質に関わる新規DNA多型の探索	松本 大和 (東海大学農学部応用動物科学科)	140	
リキッドバイオプシーによる非侵襲的牛体外受精胚の遺伝子スクリーニング	杉村 智史 (東京農工大学大学院グローバルイノベーション研究院)	146	
肉用鶏の筋芽細胞を用いた食肉の特性評価に資する遺伝子の探索	高谷 智英・鏡味 裕 (信州大学農学部)	149	

県集団における和牛肉の美味しさに関わる遺伝子マーカーの効果検証 笠嶋 晋史 (神戸大学大学院農学研究科) 155
地鶏の行動的ストレス反応性に関する遺伝的多型の探索 青谷 大希 (秋田県畜産試験場) 162
黒毛和種肥育牛の肥育状態を生体評価する血中バイオマーカーの開発 松橋 珠子 (近畿大学先端技術総合研究所) 166
選抜した黒毛和牛精子の受精能評価 飯田 弘・高橋 秀之 (九州大学大学院農学研究院) 172
牛における卵管上皮細胞を用いた新規精子受精能獲得能評価法の開発および性選別精子の受精能獲得能機能評価 柳川 洋二郎・永野 昌志 (北海道大学大学院獣医学院) 178
長期不受胎牛の受胎率向上に向けた单為発生胚移植の効果 白砂 孔明・岩田 尚孝・濱野 晴三*・柳沼 日佳里*
	(東京農業大学農学部畜産学科, *家畜改良事業団家畜バイテクセンター) 183
抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の解明 武田 久美子・西野 景知*・今井 昭**
	(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門,
	*茨城県畜産研究センター肉用牛研究所, **広島県立総合技術研究所畜産技術センター) 190
肥育前雌牛における卵子の能力不足を解消する培養技術の開発 平尾 雄二・武田 久美子・的場 理子
	(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門) 198
近赤外光照射による牛凍結胚の品質改善効果に関する研究 横尾 正樹・佐藤 勝祥 (秋田県立大学生物資源科学部) 204
胚ゲノム活性化および胚盤胞形成時期における新規代謝プロセスに基づく牛体外受精胚の体外培養法の改善 山田 雅保 (京都大学農学研究科) 209
「豚の一腹産子数を一頭増やす」子宮の免疫調節を担う精漿タンパクの特定 奥山 みなみ (大分大学医学部医学科) 214
牛精液および受精卵の未凍結保存に向けた過冷却促進物質の配合デザイン 星野 由美 (広島大学大学院生物圏科学研究科) 221
アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の妊娠性に及ぼす影響 (Ⅱ) 小林 仁 (宮城大学食産業学群) 226
乳牛の卵胞囊腫における副腎由来ホルモンの関与と卵胞囊腫共存卵胞由来の卵母細胞の正常性 清水 隆 (帯広畜産大学生命・食料科学研究部門) 230

子宮内膜炎罹患牛における特異的脂質メディエーターの同定と新規高感度診断法の開発

..... 大澤 健司・村田 幸久*・北原 豪

(宮崎大学農学部獣医学科産業動物臨床繁殖学研究室,

*東京大学大学院農学生命科学研究科放射線動物科学研究室) 236

新規 DNA メチル化網羅探索法を用いた牛の精液性状の評価法開発

..... 山崎 淳平・永野 昌志(北海道大学大学院獣医学研究院) 243

牛肉の生産性向上に資する安全なマダニ・マダニ媒介感染症防除法の開発

..... 八田 岳士・坪川 大悟(北里大学医学部) 249

牛胸腺器官培養法の確立

..... 脇谷 晶一・保田 昌宏(宮崎大学農学部獣医解剖学研究室) 254

卵巣の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明と診断法の確立

..... 山 下 泰 尚(県立広島大学生命環境学部) 259

鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルス耐性機構の解明: 感染細胞における初期応答の

品種間比較

..... 松 鶴 彩

(鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター) 265

鶏における家畜関連黄色ブドウ球菌の病原遺伝子および病態形成の解析

..... 小 野 久 弥(北里大学獣医学部) 271

鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと共に存する細菌の網羅的な挙動解析

..... 黒木 香澄・竹下 奈知子・吾郷 良輔・渡辺 孝康*・閔崎 勉

(東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター,

*現所属: 日本大学歯学部基礎自然科学分野(化学)) 278

野生動物が保菌する腸管出血性大腸菌の特徴解析とリスク評価

..... 井 口 純(宮崎大学農学部) 285

農場で発生する腸炎にカラス由来のウエルシュ菌はどのように関与しているか?

—MLST法による遺伝学的解析での検討—

..... 上 塚 浩 司(茨城大学農学部) 291

肺エコーとプロカルシトニン値を用いた牛の非定型肺炎と細菌性肺炎の簡易迅速鑑別診断システム

..... 鈴 木 一 由(酪農学園大学獣医学群) 300

鼻咽腔におけるPRRSおよび豚インフルエンザウイルス感染症の病態解析

..... 平 井 卓 哉(宮崎大学農学部) 305

感染性A型インフルエンザウイルスの迅速検出系の確立

..... 小 澤 真(鹿児島大学共同獣医学部) 310

肉用牛生産におけるアシドーシス予防をめざしたルーメン内乳酸代謝性細菌群の特定

..... 福 間 直 希(帯広畜産大学) 317

食肉家畜における原虫感染症の血清診断法の開発と血清疫学的研究	西川 義文・正谷 達謙*
	(帯広畜産大学原虫病研究センター, *鹿児島大学共同獣医学部) 322
心臓あるいは横隔膜を用いたオーエスキーアウイルス抗体検査法の確立	前田 健(山口大学共同獣医学部) 328
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索—より効果的なワクチン接種部位を求めて—	市居 修・中村 鉄平・小千田 圭吾・山下 祐輔・池田 哲平
	(北海道大学大学院獣医学研究院) 332
畜産分野における抗菌剤使用量削減に有効な手段の探索に関する研究 (Ⅱ)	一動物用抗菌剤使用量と農場バイオセキュリティ水準および適正飼養因子との関連—
	杉浦 勝明・松田 真理・磯村 れん
	(東京大学大学院農学生命科学研究所) 337
初乳に含まれる抗菌因子の機能を利用した子牛の下痢症予防	磯部 直樹(広島大学大学院生物圈科学研究所) 344
周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの発症予知と制御	佐藤 繁・櫛引 史郎*
	(岩手大学農学部共同獣医学科, *農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究部門) 350
離乳子豚への飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質(アミノ酸)代謝に及ぼす影響	高田 良三・香川 龍太郎・立原 可南子(新潟大学農学部) 356
黒毛和種仔牛の免疫能を高める機能性飼料の探索	米倉 真一・時田 瞳(信州大学農学部) 362
産褥牛に起きた急性肝ストレス亢進と肝ビタミンE体内動態関連遺伝子発現抑制に対する	<i>Rhizopus oryzae</i> 水抽出物給与の予防効果に関する研究
	芳賀 聰 ¹ ・石崎 宏 ¹ ・狩野 友佳 ² ・鈴木 武人 ²
	(¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門, ² 麻布大学獣医学部) 366
Lactococcus 属乳酸菌を用いて調製した発酵乳給与が離乳子豚の飼料摂取量および	増体成績を改善する要因の解明
	守谷 直子・兼松 伸枝・成田 卓美・木元 広実
	(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門) 372
ビタミンA強化代用乳が黒毛和種子牛の哺育・育成期における生育へ及ぼす影響	小野 晴美(福岡県農林業総合試験場) 378
子牛の強健性と発育能力を高める初期栄養強化プログラムの開発	松崎 正敏(弘前大学農学生命科学部) 384
骨格筋の成長と筋線維型決定におけるストレス応答ホルモンの影響	佐藤 勝祥(秋田県立大学生物資源科学部) 389

亜鉛トランスポーターに着目した亜鉛栄養改善飼料の開発 神戸 大朋 (京都大学大学院生命科学研究科)	394
西南暖地におけるイネ科牧草リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発（Ⅱ） 石垣 元気 ¹ ・荒井 昌和 ² ・福山 喜一 ¹	
	(¹ 宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールド,	
	² 宮崎大学工学部)	400
乳牛における高糖分イネ WCS（ホールクロップサイレージ）多給による高繁殖型飼養管理システムの確立 山口 昇一郎・浅岡 壮平・馬場 武志・川島 千帆*	
	(福岡県農林業総合試験場, *帯広畜産大学フィールド科学センター)	406
ルーメンアシドーシス防除を目指した新規ルーメン幹細胞培養モデルの開発 鈴木 裕 (北海道大学大学院農学研究院)	411
哺乳子牛の下痢を低減する発酵代用乳の開発 庄司 則章 (山形県立農林大学校)	418
ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛における病態解析 猪熊 壽 (帯広畜産大学畜产学部)	425
飼養環境下の牛群における新規「カビ毒（マイコトキシン）防除法」の検証		
一飼料へのフラクトオリゴ糖添加が牛消化管バリア機能に与える臨床的評価 高木 光博・宇野 誠一*	
	(山口大学共同獣医学部, *鹿児島大学水产学部)	430
乳酸菌を用いた多剤耐性菌の抑制と機能性家畜飼料への応用 木下 英樹・原口 梨花・山中 猛・服部 法文・	
	神鷹 孝至・實田 正博・本田 憲昭・森川 充実・	
	金子 博・中野 佑志・浦部 一浩・石田 光晴*	
	(東海大学農学部, *宮城大学食産業学群)	435

CONTENTS

Disinfection of drug-resistant bacteria by gas plasma and analysis of the mechanisms	
Akikazu Sakudo ¹ , Risa Yamashiro ¹ and Tatsuya Misawa ²	
(¹ Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, University of the Ryukyus,	
² Department of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Saga University)	3
Identification of the main factor determining the taste of Jidori meat	
Kazuhisa Honda	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)	8
Studies on stress response of <i>Listeria monocytogenes</i> isolated from retail meats	
Yoshitsugu Ochiai and Yuko Yoshikawa	
(Nippon Veterinary and Life Science University)	13
Basic study on improvement of food processing machine	
Jun Komotori	
(Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University)	19
Preparation of edible thermal storage capsule for the high-quality aging of meat	
Takashi Kobayashi	
(Division of Food Science and Biotechnology, Graduate School of Agriculture, Kyoto University)	24
Study on processing technology and characteristics of fermented meat products produced using lactic acid bacteria cultures for dairy products (III)	
Haruo Negishi	
(College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)	31
Effects of olive leaf extracts on rheological properties and hedonic aspects of meat protein gel	
Masahiro Ogawa, Agus Bahar Rachman and Takashi Akazawa	
(Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University)	37
Development of a fermentative production method of glutathione analogs	
Tomokazu Ito	
(Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)	46
Modification of substrate specificity of microbial transglutaminase by protein engineering (II)	
Teisuke Takita	
(Kyoto University, Graduate School of Agriculture, Division of Food Science and Biotechnology)	51

Contribution of aroma compounds and lipids to “<i>kokku</i> attributes” of pork sausages	
Toshihide Nishimura	
(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University)	59
Study on flavor components of dry-aged beef	
Satoshi Kawahara	
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	68
Intramuscular free fatty acids related to deliciousness of Japanese Black Wagyu beef and its taste-trait analyzed by an electronic taste sensing system, Part II	
Minoru Yamanoue ¹ , Yanan Zhao ¹ , Yusuke Nakada ¹ , Shuji Ueda ¹ , Sayaka Ichimura ² , Yuka Yoshida ² , Masaaki Habara ³ and Hidekazu Ikezaki ³	
(¹ Graduate School of Agricultural Science, Kobe University, ² Japan Meat Science and Technology Institute, ³ INSENT, Inc.)	74
Effect of hypoxanthine on the improvement of taste during postmortem aging of meat (II)	
Sayaka Ichimura, Masao Takahashi, Yukinobu Nakamura, Yuka Yoshida, Yumi Inoguchi and Akihito Hattori*	
(Japan Meat Science and Technology Institute, *Hokkaido University)	80
Studies on factors contributing to taste and aroma of marbled pork	
Masanori Matsuishi and Yutaro Kobayashi	
(School of Food Science and Technology, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University)	89
Effect of carnosine on the red color arising in cooked meat	
Yukinobu Nakamura, Yoshitaka Eda, Yuka Yoshida and Yumi Inoguchi	
(Japan Meat Science and Technology Institute)	97
Basic study of the development of an innovative hypocholesterolemic food materials using a novel hypocholesterolemic dipeptide derived from cattle heart peptide	
Satoshi Nagaoka	
(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	104
Dietary effect of meat protein on anti-obesity and lipid metabolism	
Jun-ichi Wakamatsu	
(Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)	107
Efficacy of carnosine intake on the prevention of sarcopenia related with obesity	
Koro Gotoh, Takayuki Masaki and Hirotaka Shibata	
(Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology, and Nephrology, Faculty of Medicine, Oita University)	113

Study on game meat utilization as a food stuff ; Assessment of the physiological activity of this food stuff	
Ryoichi Sakata, Shiro Takeda and Norio Tokita*	
(School of Veterinary Medicine, Azabu University, *Department of Animal Science, Nippon Veterinary and Life Science University)	118
Improvement effect of natural component derived from animal product on the blood pressure in fructose-induced hypertension rats with diabetes mellitus	
Yutaka Yoshikawa and Aya Itoi	
(Department of Health, Sports and Nutritions, Kobe Women's University)	123
Effects of nucleic acids from meat and other foods on the functions of intestinal cells	
Yoshichika Kawai	
(Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University)	129
Retort processing and cold lactic acid fermentation induce protein degradation and functional peptides derivation in myofibrillar protein system	
Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Seiichi Haga and Yukihiko Ogawa*	
(Faculty of Agriculture, Meijo University, *Experimental Farm, Meijo University)	135
Novel gene polymorphisms identification related to cattle economic traits	
Hirokazu Matsumoto	
(Department of Animal Science, School of Agriculture, Tokai University)	140
Non-visible genetic screening of <i>in vitro</i> fertilized bovine embryos by liquid biopsy	
Satoshi Sugimura	
(Institute of Global Innovation Research, Tokyo University of Agriculture and Technology)	146
Exploration of the genes to assess meat characteristics using skeletal muscle myoblasts from meat-type chickens	
Tomohide Takaya and Hiroshi Kagami	
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)	149
Investigation on the effect of genetic markers on beef quality in prefectural populations of Japanese Black cattle	
Shinji Sasazaki	
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)	155
The search for genetic polymorphisms involved in behavioral stress response in slow-growing meat type chickens	
Daiki Aoya	
(Akita Prefectural Livestock Experiment Station)	162

Identification of microRNA biomarker candidates for assessment of fattening Japanese Black cattle

Tamako Matsuhashi

(Institute of Advanced Technology, Kindai University) 166

Evaluation for capacitation of selected bull spermatozoa

Hiroshi Iida and Hideyuki Takahashi

(Kyushu University, Faculty of Agriculture, Department of Zoology) 172

Novel method for evaluating capacitation ability of bovine sperm using oviductal epithelial cells and evaluation of sex sorted sperm function

Yojiro Yanagawa and Masashi Nagano

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University) 178

The effect of bovine parthenogenesis embryo transfer to previously artificially inseminated cows

Koumei Shirasuna, Hisataka Iwata, Seizo Hamano* and Hikari Yaginuma*

(Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science, * Livestock

Improvement Association of Japan, Inc.) 183

Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of cryopreserved bull semen

Kumiko Takeda, Kagetomo Nishino* and Akira Imai**

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Beef Cattle Institute, *Ibaraki Prefectural

Livestock Research Center, **Hiroshima Prefectural Livestock Research Center) 190

Development of *in vitro* oocyte production systems to optimize oocyte resources residing in ovaries from beef calves before fattening

Yuji Hirao, Kumiko Takeda and Satoko Matoba

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) 198

Effects of near-infrared laser irradiation on frozen bovine embryos

Masaki Yokoo and Katsuyoshi Sato

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University) 204

Improvement of *in vitro* culture of *in vitro* fertilized bovine embryos on the basis of novel metabolic processes during embryonic genome activation and blastocyst formation

Masayasu Yamada

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University) 209

Identification of seminal plasma proteins responsible for regulating immune system in porcine uterus "to increase litter size"

Minami W Okuyama

(Faculty of Medicine, Oita University) 214

The blend design of supercooling facilitating materials for non-cryopreserve of bovine semen and early embryo	
Yumi Hoshino	
(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)	221
Effects of adipokine and insulin resistance on the bovine fertility (Ⅱ)	
Jin Kobayashi	
(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)	226
Involvement of corticosteroid on ovarian cystic follicles and quality of oocyte of follicles coexisting with cystic follicle in dairy cow	
Takashi Shimizu	
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Life and Food Science) ...	230
Identification of specific lipid mediators in the cow with endometritis and development of a novel sensitive diagnostic method	
Takeshi Osawa, Takahisa Murata* and Go Kitahara	
(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, *Department of Animal Radiology, The University of Tokyo)	236
A novel genomic screening system for DNA methylation to evaluate bovine spermatozoa	
Jumpei Yamazaki and Masashi Nagano	
(Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)	243
Development of the safety protective strategy against tick and tick-borne diseases for the improvement of beef productivity in cattle industry	
Takeshi Hatta and Daigo Tsubokawa	
(Kitasato University School of Medicine)	249
Optimization of bovine thymic organ culture	
Shoichi Wakitani and Masahiro Yasuda	
(Laboratory of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	254
Study of reproductive disorders in pigs caused by iron deficiency in the ovary and establishment of its diagnostic methods	
Yasuhide Yamashita	
(Department of Life and Environment Science, Prefectural University of Hiroshima)	259
Elucidation of the resistance mechanisms for highly pathogenic avian influenza virus in chickens-early antiviral response in infected cells	
Aya Matsuu	
(Transboundary Animal Diseases Research center, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)	265

Livestock-associated *S. aureus* in chicken: virulence, resistance and pathogenesis

- Hisaya Ono
 (Kitasato University School of Veterinary Medicine) 271

Comprehensive analysis of the behavior of *Campylobacter* and coexistent bacteria in chicken food chain

- Kasumi Kuroki, Nachiko Takeshita, Ryosuke Ago, Takayasu Watanabe* and Tsutomu Sekizaki
 (Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo, *present affiliation: Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry) 278

Characterization and risk evaluation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* isolated from wild animals

- Atsushi Iguchi
 (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) 285

How the wild crow-derived *Clostridium perfringens* relate to the occurrence of enteritis in domestic animals in farms ? – Genetical characterization of *C. perfringens* strains by MLST analysis –

- Koji Uetsuka
 (Ibaraki University, College of Agriculture) 291

Simply and rapid differential diagnosis system of bovine atypical and bacterial pneumonia using a pulmonary echography and plasma procalcitonin level

- Kazuyuki Suzuki
 (School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) 300

Pathological analysis of PRRS and swine influenza virus infection in the nasopharynx

- Takuya Hirai
 (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) 305

Establishment of rapid detection system of infectious influenza A viruses

- Makoto Ozawa
 (Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) 310

Profiling of lactic acid metabolizing bacterial group in the rumen to prevent from rumen acidosis in beef cattle production

- Naoki Fukuma
 (Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) 317

Development of serodiagnosis system for protozoan parasite infection in food animals and its seroepidemiological study

- Yoshifumi Nishikawa and Tatsunori Masatani*
 (National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) 322

Establishment of serological method against pseudorabies virus using myocardium or diaphragm	
Ken Maeda	
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University)	328
Study of mucosa-associated lymphoid tissues in farm animals – to identify more effective regions for their vaccination –	
Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Keigo Kosenda, Yusuke Yamashita and Teppei Ikeda	
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)	322
Epidemiological analysis of the factors affecting the use of veterinary antimicrobials at farm level in Japanese pig farms – the relationship between veterinary antimicrobial usage, on-farm biosecurity level and animal welfare indicators –	
Katsuaki Sugiura, Mari Matsuda and Ren Isomura	
(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	337
Inhibition of diarrhea in calf by utilizing colostrum antimicrobial components	
Naoki Isobe	
(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)	344
Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy cows	
Shigeru Sato and Shiro Kushibiki*	
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University, *National Institute of Livestock and Grassland Science)	350
Effects of rice feeding on growth performance and protein (amino acids) metabolism of weaning piglets	
Ryozo Takada, Ryutaro Kagawa and Kanako Tachihara	
(Faculty of Agriculture, Niigata University)	356
Screening for functional feeds that enhance the immune function in Japanese Black calves	
Shinichi Yonekura and Hitomi Tokita	
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)	362
Study on the preventive effects of administration of aqueous extracts of <i>Rhizopus oryzae</i> on the puerperal acute hepatic stress and suppression of vitamin E related genes expression in cows	
Satoshi Haga ¹ , Hiroshi Ishizaki ¹ , Yuuka Kanou ² and Takehito Suzuki ²	
(¹ Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, ² School of Veterinary Medicine, Azabu University)	366
Dietary effects of fermented milk prepared with <i>Lactococcus</i> genus on growth performance and fecal microbial community in weaning piglets.	
Naoko Moriya, Nobue Kanematsu, Takumi Narita and Hiromi Kimoto-Nira	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	372

Effects of vitamin A content in calf milk replacer on blood parameters and development of Japanese Black calves	
Harumi Ono	
(Fukuoka Agricultural and Forestry Research Center)	378
Development of intensified neonatal feeding program for improved health and growth in suckling calves	
Masatoshi Matsuzaki	
(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)	384
The effect of stress hormone on the proliferation of myoblast and the determination of muscle fiber type	
Katsuyoshi Sato	
(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University)	389
Studies on a feed for improving zinc nutrition by the use of zinc transporters	
Taiho Kambe	
(Graduate School of Biostudies, Kyoto University)	394
Development of soybean production technique by living multi method with tropical grasses in southwestern Japan	
Genki Ishigaki ¹ , Masakazu Arai ² and Kiichi Fukuyama ¹	
(¹ Sumiyoshi Livestock Science Station, Field Science Education Research Center, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, ² Faculty of Engineering, University of Miyazaki)	400
New system development of high fertility by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice whole crop silage in lactating dairy cows	
Shoichiro Yamaguchi, Sohei Asaoka, Takeshi Baba and Chiho Kawashima*	
(Fukuoka Agricultural Research Center, *Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)	406
Establishment of a novel culture model of bovine rumen epithelial cell using tissue stem cell culture method	
Yutaka Suzuki	
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	411
Development of the fermented milk which reduces the loose bowel of a calves	
Noriaki Shoji	
(Yamagata Prefectural College of Agriculture and Forestry)	418
Analysis for pathophysiology of heterozygous individual with cholesterol deficiency in Holstein cattle	
Hisashi Inokuma	
(Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)	425

Monitoring natural feed contamination of mycotoxins in cattle herd and its prevention-clinical evaluation of protecting effects of intestinal epithelial integrity by supplemented fructo-oligosaccharides

Mitsuhiko Takagi and Seiichi Uno*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, * Faculty of Fisheries, Kagoshima University) 430

Bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria using lactic acid bacteria and development of functional domestic animal fodder

Hideki Kinoshita, Rinka Haraguchi, Takeshi Yamanaka, Norifumi Hattori, Takashi Kotaka, Masahiro Saneda, Kensho Honda, Atsumi Morikawa, Hiroshi Kaneko, Yushi Nakano, Kazuhiro Urabe and Mitsuharu Ishida*

(School of Agriculture, Tokai University, *School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University) 435

伊藤記念財団賞

目 次

須 田 義 人 (宮城大学食産業学部ファームビジネス学科 教授)	
黒毛和種ゲノム DNA メチル化多型と肉質形質との関係に関する研究	451
河 原 聰 (宮崎大学農学部応用生物学科科 教授)	
食肉脂質の食品栄養学的再評価に関する研究	452

学会等事業助成

目 次

日本食肉研究会の平成 29 年度事業助成実施報告

日本食肉研究会会长 根岸晴夫（中部大学応用生物学部） 455

「食肉の安全性に関する公開シンポジウム」—食肉に由来する感染症とその予防—に関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会 代表理事 久和 茂（東京大学） 458

研究助成事業



薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌効果とメカニズム解析

Disinfection of drug-resistant bacteria by gas plasma and analysis of the mechanisms

作道 章一¹・山城 梨沙¹・三沢 達也²

(¹琉球大学医学部保健学科生体代謝学分野, ²佐賀大学大学院工学系研究科電気電子工学専攻)

Akikazu Sakudo¹, Risa Yamashiro¹ and Tatsuya Misawa²

(¹Laboratory of Biometabolic Chemistry, School of Health Sciences, University of the Ryukyus,

²Department of Electrical and Electronic Engineering, Graduate School of Science and Engineering, Saga University)

Recently, the growing risk of disease from drug-resistant pathogens has become a huge public health concern. Drug resistance is possibly due to extensive and indiscriminate use of antibiotics, which leads to the evolution of drug-resistant bacteria. In this study, we investigated whether gas plasma technology is effective as a disinfectant against drug-resistant bacteria. A dielectric barrier discharge (DBD) plasma torch was applied to suspensions of *Escherichia coli*. The results showed that the viable cell count of *E. coli* was reduced to undetectable levels after 2 min of plasma treatment. Furthermore, similar results were observed for *E. coli* transformed with a plasmid encoding an ampicillin-resistant gene, indicating that the plasma is similarly effective against both drug-resistant and non-resistant *E. coli*. In addition, lipopolysaccharide degradation and DNA injury of the *E. coli* cells were detected by Limulus test and polymerase chain reaction, respectively. Taken together, these findings suggest that the mechanism of action of the plasma is unlikely to differ between drug-resistant and normal bacteria. Therefore, this plasma method may be especially useful for eliminating not only normal bacteria but also drug-resistant bacteria.

1. 目的

近年、細菌の薬剤耐性化が世界的問題となっている。薬剤耐性化により、細菌は抗生物質に対する抵抗性を獲得する。米国では食肉汚染サルモネラの80%以上が薬剤耐性菌であり、さらに50%以上が多剤耐性菌であると報告されている^{1~3)}。我が国のサルモネラも多くが薬剤耐性菌であるとされる¹⁾。これらの薬剤耐性サルモネラの他に、主な薬剤耐性菌にはメチシリン耐性黄色ブドウ球菌

(MRSA), バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE)などがある⁴⁾。食品に関わるサルモネラなどの薬剤耐性菌が蔓延しているということは、食中毒患者の抗生物質の治療が困難になることを意味する。さらに、食品中に薬剤耐性菌が存在した場合、薬剤耐性遺伝子が腸内の常在細菌に伝播し、耐性遺伝子のリザーバーとなってしまう可能性がある。そして、耐性菌が腸内に生息することで、抗生物質の服用が耐性菌の選択的増殖を引き起こしてしまう。これらのことから、薬剤に頼らない形

での食品の殺菌技術が必要とされている。しかし、我が国では、諸外国では認められている放射線照射による食品の殺菌は、ジャガイモの発芽防止以外の目的には認められておらず、薬剤耐性菌にも有効と考えられる物理的殺菌技術として食品に用いることができるとは、加熱のみである。

最近、申請者らは、物理的処理技術の一つであるガスプラズマを用いて、サルモネラを含む様々な細菌の殺菌に成功した^{5~7)}。しかし、薬剤耐性菌と非耐性菌のガスプラズマ感受性が同じかどうかは分かっていない。

そこで、本研究では、ガスプラズマ処理による薬剤耐性菌と非耐性菌の感受性を比較した。さらに、プラズマ処理が引き起こす生化学変化を解析し、ガスプラズマ耐性菌が出現しうるメカニズムなのかについて考察した。

2. 方 法

2.1 大気圧プラズマトーチ

絶縁体である筒状のセラミックスの周囲を銅板で覆い、筒内部に金属のメッシュを配置したプラズマトーチを用いた⁸⁾。銅板とメッシュ間に電圧10 kV、周波数10 kHzの高周波パルスを印加し、誘電体バリア放電（DBD：Dielectric barrier discharge）によるプラズマを発生させた。生成したプラズマは、エアーポンプ（水作：水心SSPP-2S）を用いて筒先端から3.5 L/minの流量で放出させた。サンプルは時計皿上に20 μL滴下し、筒先端までの距離を20 mmに固定し処理を行った。

2.2 供試細菌と培養

供試細菌として大腸菌*Escherichia coli* (DH5 α Competent Cells, Takara bio) を用いた。プラズマ処理に供するサンプルは、アンピシリン（50 mg/L）を含むもしくはアンピシリンを含まないLB (Luria Broth) 液体培地で37°Cで24時間培養した大腸菌を使用した。プラズマ処理後の大腸

菌の生菌数を計測するため、アンピシリン（50 mg/L）を含むもしくはアンピシリンを含まないLB寒天培地に蒔き、37°Cで一晩培養後にコロニーをカウントしてColony forming unit (CFU) を算出した。

2.3 プラスミド

アンピシリン耐性遺伝子を持つプラスミドである pPRO-EX-HT-CAT (Life Technologies) を使用した。

2.4 トランスフォーメーション

プラスミドの導入（トランスフォーメーション）は常法⁹⁾に従い行った。

2.5 Polymerase chain reaction (PCR) とPCR 産物のDNAシークエンシング

Bacterial 16S rDNA PCR Kit (Takara bio) を用いて、16S rDNAの増幅をインストラクションに従い行った。また、PCR産物はDNAゲル電気泳動後にQIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) を用いてゲル抽出を行った後、ABI PRISM3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用いてダイレクトシークエンシングに供した。

2.6 リムルステスト

リムルスカラーKY テストワコー（和光純薬）を用いてエンドトキシンであるリポポリサッカライド（LPS）の定量を行った。

2.7 統計解析

GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) を用いてNon-repeated ANOVA followed by Bonferroni correctionにより有意差検定を行った。

3. 結果と考察

まず、大腸菌DH5 α にpPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーションし、アンピシリン含有LB寒天培地で一晩セレクション後、コロニーをピックアップした。そのコロニーをLB液体培地に懸濁し、アンピシリン含有LB液体培地および

非含有LB液体培地中で24時間培養した。それから回収した大腸菌に対して大気圧プラズマトナーを用いた処理を行った。その結果、プラズマ処理によりいずれの大腸菌も生菌数が低下し、pPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーションした大腸菌をアンピシリン入りLB液体培地で培養したもののはプラズマ処理前（0 min）の生菌数は 2.4×10^6 CFU/ml（0 min）であったのに対し、1 minのプラズマ処理により 1.4×10^5 CFU/mlと生菌数が低下した（Fig. 1）。一方、この大腸菌をアンピシリン非含有LB液体培地で培養したもののは 2.2×10^6 CFU/ml（0 min）と 1.4×10^5

CFU/ml（1 min）であり、いずれの時間においてもアンピシリン含有培養と非含有培養の間で有意な生菌数の違いは見られなかった（Fig. 1）。また、pPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーションした大腸菌とトランスフォーメーションしていない大腸菌をアンピシリン非含有LB液体培地で培養したものとをプラズマ処理して比較した場合も前者は 2.1×10^7 CFU/ml（0 min）と 1.8×10^4 CFU/ml（1 min）であったのに対し、後者は 2.5×10^7 CFU/ml（0 min）と 7.8×10^4 CFU/ml（1 min）と両群に有意な違いは見られなかった（Fig. 2）。さらに、2 min処理ではいずれの条件

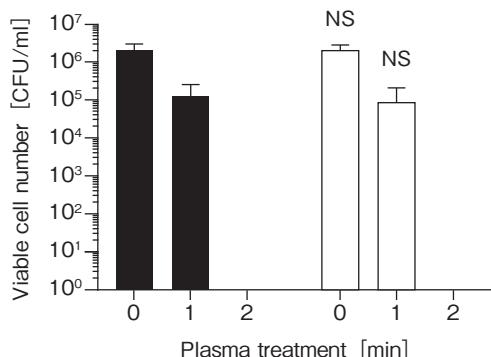


Fig. 1 *E. coli* cells transformed with pPRO-EX-HT-CAT and selected in ampicillin-containing LB agar were proliferated either in ampicillin-containing LB liquid medium (■) or in non-drug-containing LB liquid medium (□), and then subjected to plasma treatment for 0-2 min, and counted.

NS : not significant (■vs□)

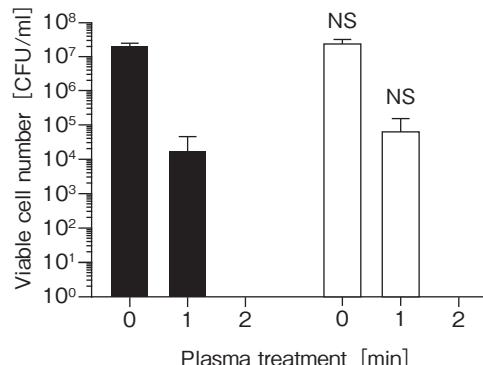


Fig. 2 *E. coli* cells transformed with pPRO-EX-HT-CAT, selected in ampicillin-containing LB agar, and proliferated in non-drug-containing LB liquid medium (■), and non-transformed *E. coli* cells proliferated in non-drug-containing LB liquid medium (□) were subjected to plasma treatment for 0-2 min and counted.

NS : not significant (■vs□).

の大腸菌においても生菌数は検出限界以下となつた (Fig. 1, 2)。

次に、プラズマ処理が大腸菌の構成成分に与える影響を明らかにするために、DH5 α に対して大気圧プラズマトーチを用いた処理を行い、リムルステストによるLPSの解析やPCRによるDNAの解析を行った。リムルステストではプラズマ処理時間に伴い、吸光度が低下したため、LPS lipid Aの分解が確認された (Fig. 3)。これらのことから、プラズマ処理により、大腸菌の細胞壁が分解されるものと考えられた。PCRでは大腸菌にpPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーション

し、アンピシリン非含有LB液体培地で24時間培養後の大腸菌もプラスミドを導入していない大腸菌のいずれもプラズマ処理を行うことで16s rDNAの増幅が抑制されていた (Fig. 4)。このことから、プラズマ処理により、大腸菌のDNAが損傷を受けるものと考えられた。また、このPCR産物のシークエンスは *Escherichia coli* strain DH5 α chromosome, complete genome Genbank Accession Number NZ_CP026085.1と5'→3'方向で $0.9925 \pm 0.0035\%$ ($N = 4$) の相同性があり、3'→5'方向でも $0.9948 \pm 0.0034\%$ ($N = 4$) と高い相同性を示したことから、大腸菌DH5 α の16s

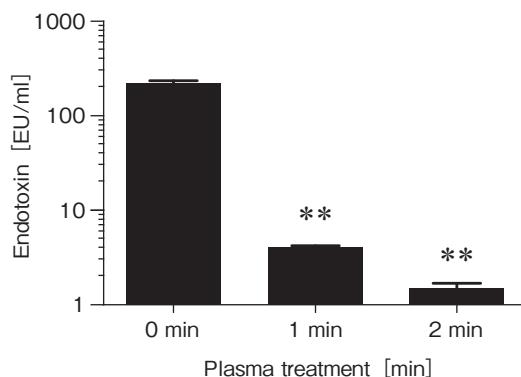


Fig. 3 *E. coli* cells treated with plasma were subjected to the Limulus test. Endotoxin was reduced after plasma treatment for 0–2 min. ** $p < 0.01$ (vs 0 min).

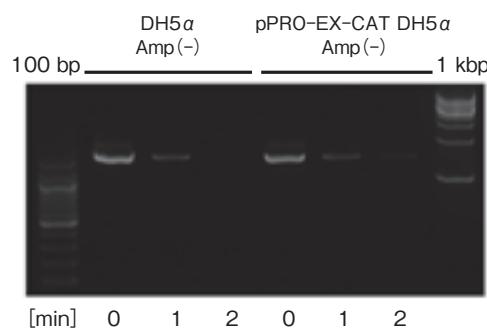


Fig. 4 Non-transformed *E. coli* cells proliferated in non-drug-containing LB liquid medium (DH5 α Amp $(-)$) and *E. coli* cells transformed with pPRO-EX-HT-CAT, selected in ampicillin-containing LB agar, and proliferated in non-drug-containing LB liquid medium (pPRO-EX-CAT DH5 α Amp $(-)$) were subjected to plasma treatment for 0–2 min and PCR for 16S rDNA.

100 bp : 100 bp DNA ladder marker ; 1 kbp : 1 kbp DNA ladder marker

rDNAが増幅されていたことが確認された。

ガスプラズマは活性種（ラジカル等）や紫外線などの複合的効果で酸化ストレス作用をもたらして、殺菌作用を持つものと推測される。したがって、どのような殺菌因子により今回観察されたDNA損傷や細胞壁の分解が誘導されるのかについて、今後詳細に解析することで殺菌メカニズムが明確になるものと考えられる。

4. 要 約

本研究により、ガスプラズマ処理による薬剤耐性菌と非耐性菌の感受性に違いがないことが明らかになった。さらに、細胞壁の成分であるLPSや核のDNAがプラズマ処理により損傷を受けていることが分かった。これらの変化は薬剤耐性の有無とは無関係に生じる変化であるため、ガスプラズマは薬剤耐性菌に対しても有効と考えられた。

文 献

- 1) 伊藤均：薬剤耐性細菌の放射線殺菌効果、食品照射、41(1-2)：9～13, 2006.
- 2) Hofacre, C. L., White, D. G., Maurer, J. J., Morales, C., Lobsinger, C., Hudson, C. : Characterization of antibiotic-resistant bacteria in rendered animal products, *Avian Dis.*, 45(4) : 953～961, 2001.

- 3) Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Bellinger, G. R., Buege, D. R., Hancock, D. D., Ingham, S. C., Morgan, J. B., Reagan, J. O., Smith, G. C. : Sources and extent of microbiological contamination of beef carcasses in seven United States slaughter plants, *J. Food Prot.*, 62(2), 140～145, 1999.
- 4) Calfee, D. P. : Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci, and other Gram-positives in healthcare, *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 25(4), 385～394, 2012.
- 5) Shintani, H., Sakudo, A. : Gas Plasma Sterilization in Microbiology : Theory, Applications, Pitfalls and New Perspectives, Caister Academic Press, Poole, UK, 2016.
- 6) Sakudo, A., Shintani, H. : Sterilization and disinfection by plasma : Sterilization mechanisms, biological and medical applications, NOVA Science Publishers, Hauppauge, New York, 2011.
- 7) Maeda, K., Toyokawa, Y., Shimizu, N., Imanishi, Y., Sakudo, A. : Inactivation of *Salmonella* by nitrogen gas plasma generated by a static induction thyristor as a pulsed power supply, *Food Control*, 52, 54～59, 2015.
- 8) Sakudo, A., Miyagi, H., Horikawa, T., Yamashiro, R., Misawa, T. : Treatment of *Helicobacter pylori* with dielectric barrier discharge plasma causes UV induced damage to genomic DNA leading to cell death, *Chemosphere*, 200, 366～372, 2018.
- 9) Green, M.R., Sambrook, J. : Molecular Cloning : A Laboratory Manual (Fourth Edition), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012.

地鶏肉の美味しさの決定要因の解明

Identification of the main factor determining the taste of Jidori meat

本田和久

(神戸大学大学院農学研究科)

Kazuhisa Honda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

Jidori is one of tasty and popular meats in Japan. However, the main factor determining the taste of Jidori meat have not been identified. In the present study, quantitative analyses were performed on the general biochemical components, free amino acids, inosine 5'-monophosphate (IMP), and proteins in the thigh meat of Jidori and broiler chickens in order to identify the candidate substances influencing the palatability of chicken meat. The paired preference test for boiled thigh meats of Jidori and broiler revealed that Jidori was significantly preferred in Koku and Jizokusei. However, the most of amino acids levels in Jidori chickens were significantly lower than broilers, whereas no significant difference in IMP levels was observed between them. The amino acids and IMP contents are not the causes of characteristic feature of Jidori chicken meat. Further studies are needed to elucidate the relationship between other molecules and the palatability of Jidori chicken meat.

1. 目的

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

いるが、地鶏肉の美味しさの決定要因が明らかにされないまま、増体性のみによって地鶏の品種改良が進められれば、地鶏肉の価格低下は達成されても、その美味しさが損なわれてしまうことが懸念される。ここで、フランスにおいては、国の基準に適合した赤ラベルが貼られた鶏肉（赤鶏）が、高価格にもかかわらずフランス国内の鶏肉市場の3割以上を占める。この事実が示すように、我が国においても、地鶏肉の美味しさを保証する基準が確立され、その基準に応じて市場価格が決定されれば、地鶏肉においても和牛や赤鶏のような確固たる市場が形成される可能性が高いと判断される。そのためには、地鶏肉の美味しさの要因を科学的に明らかにする必要がある。

地鶏肉の美味しさは、「適度な歯ごたえ」や「うま味」という言葉で表現される。このうち、「適度な歯ごたえ」は骨格筋の筋線維組成の相違に基づくものであることが示唆されている¹⁾が、地鶏肉の「うま味」の要因についてはいまだ明らかにされていない。例えば、地鶏肉とプロイラー鶏肉の抽出液に含まれるアミノ酸や核酸関連物質の含量には大きな違いは見られない^{2~4)}。しかしながら、これらの報告は非加熱のミンチ肉の抽出液を分析したものであり、実際に食する鶏肉の呈味成分を分析しているとは言えない。

本研究では、地鶏肉と市販のプロイラー鶏肉を用いて、官能検査による地鶏肉に特徴的な美味しさを明らかにするとともに、そのアミノ酸組成およびもも肉タンパク質の熟成による変化を明らかにすることに基づき、地鶏肉の美味しさの決定要因を解明する。

2. 方 法

2.1 地鶏肉の美味しさの特徴解析

市販の国産プロイラーと地鶏（ひょうご味どり）のもも肉（各10個）の上ももを約1cm幅に2枚スライスし、3倍量の1%食塩水を加えた後、90°C以上で15分間湯煎し、1枚を10名のパネラーを用いた官能検査に供した。評価項目は、[香り（鶏肉らしい香り、獣臭、異臭、全体の強さ）、風味（鶏肉らしい風味、獣風味、異風味、全体の強さ）、食感（咀嚼しやすさ、歯ごたえ、ジューシー感、噛み切りやすさ）、および味（うま味、甘味、酸味、塩味、苦味、異味、コク、脂っこさ、まろやかさ、持続性、全体の強さ）]とし、それぞれの項目について、標準検体を基準値0とした上下3段階（+3、とても強い；+2、強い；+1、やや強い；-1、やや弱い；-2、弱い；-3、とても弱い）で判断させた。また、湯煎した鶏肉の残りの1枚をミンチ後、3倍量の超純水を

加えた後、4°Cで3時間、振とうした。その後、不溶物を濾過して除去して得られた濾液を、アミノ酸分析（ワコーパック®ワコーシル®-PTC4.0、和光純薬工業株式会社）、および核酸関連物質分析（Atlantis® dC18 Column、日本ウォーターズ株式会社）に供した。官能検査結果はマン・ハイットニーのU検定により、他の結果はスクチューデントのt検定により、それぞれ統計解析した。

2.2 熟成に伴う鶏肉タンパク質の変化

0日齢のプロイラーおよび地鶏を購入し、神戸大学の動物飼育室で出荷日齢（プロイラー6週齢、地鶏12週齢）まで市販の飼料を用いて飼育した。炭酸ガスによる麻酔下で安樂死後、右もも肉の大腿二頭筋を速やかに摘出し、液体窒素で凍結後、-80°Cに保存した。左もも肉は冷蔵で48時間保存後、大腿二頭筋を摘出し、液体窒素で凍結後、-80°Cに保存した。凍結組織は冷凍のまま粉碎し、二次元電気泳動（ディスクラン-R、パジェランAce、アト一株式会社）に供した。

3. 結果と考察

官能検査の結果、地鶏肉はコク（+1.0, $p < 0.05$ ）と味の持続性（+0.7, $p < 0.05$ ）に富む鶏肉であることが明らかになった。しかしながら、湯煎鶏肉に含まれるアミノ酸の量はプロイラーの方がむしろ多く、核酸関連物質含量にも有意な差は見られなかった（Table 1）。これらの結果から、地鶏肉の美味しさはコクと味の持続性にあること、その美味しさの決定要因に、熟成等によるアミノ酸含量の増加に基づくものではないこと、およびうま味物質であるイノシン酸も関与しないことが示唆された。

二次元電気泳動の結果、地鶏肉において特徴的なスポット、あるいは熟成により減少するスポットは認められなかったが、解糖系酵素であるエノ

Table 1 Comparison of amino acids and nucleic acidrelated components between Jidori and broiler chicken muscles

	Jidori	Broiler
Amino acids		
Asp	87 ± 6	131 ± 6**
Glu	205 ± 13	282 ± 27**
Ser	194 ± 17	269 ± 26*
Gly	251 ± 15	419 ± 50*
His	154 ± 20	392 ± 42**
Ala	636 ± 22	643 ± 37
Pro	124 ± 6	233 ± 24*
Tyr	50 ± 5	153 ± 17**
Val	88 ± 7	237 ± 25**
Met	26 ± 7	106 ± 13**
Cys	75 ± 7	140 ± 7**
Ile	56 ± 5	108 ± 16*
Leu	78 ± 7	229 ± 29*
Phe	48 ± 5	132 ± 11**
Lys	112 ± 8	283 ± 41*
Nucleic acid-related components		
IMP	119 ± 24	118 ± 21
HxR	446 ± 45	602 ± 82
Hx	195 ± 21	262 ± 36

Values are means ± S.E.M. (nmol/ml, n=5).

*, ** : p<0.05, p<0.01, respectively.

ラーゼについて、プロイラーに比べて地鶏できわめて濃いスポットが検出された (data not shown)。この結果は、地鶏肉はプロイラー鶏肉に比べて解糖系の代謝が活発であることを示唆する。卵用鶏の一種である白色レグホンの雄ヒナにおいては、エノラーゼを含むいくつかの解糖系酵素は、遅筋よりも速筋で多く発現することが報告されている⁵⁾。しかしながら、一般に、地鶏肉はプロイラー鶏肉に比べて赤みが強いこと、および赤みが強い肉は遅筋であると認識されている。それゆえ、地鶏肉においては、筋線維型にかかわらず、解糖系の代謝が活発である可能性が示された。これらのことから、地鶏肉においては、解糖系の中間代謝産物の含量がプロイラー鶏肉よりも多い可能性があると考えられることから、今後、解糖系中間代謝産物含量が鶏肉の美味しさに及ぼす影響について明らかにする必要があると考えられた。

これまでの種々の鶏肉の食味比較に関する報告においては、湯煎したむね肉⁶⁾、湯煎した赤身（皮と脂肪を除いたもの）のもも肉スライス³⁾、オーブンで熱処理した皮なしもも挽肉のパティ⁷⁾、オーブンで熱処理した浅胸筋、深胸筋、あるいは大腿二頭筋⁸⁾、オーブンで熱処理したもも肉を冷蔵後、室温に戻したもの⁹⁾が用いられており、実際に食する鶏肉の調理法とは必ずしも一致していない。官能検査に供する検体は均一性が求められることから、このような調理法が用いられているが、我が国においては、むね肉に比べて脂肪分が多く、ジューシーなもも肉の需要が多いことから、本研究では、実際に食する調理法（鍋料理）に近い方法で調製したもも肉を官能検査に供した。また、地鶏とプロイラーの間で肉の呈味成分含量を比較した報告においては、比内地鶏とプロイラーの浅胸筋の一般成分、アミノ酸、無機質、および脂肪酸組成からは肉の食味に影響する成分

は特定できないこと⁴⁾、名古屋コーチンとブロイラーのもも肉から調製したスープ中のアミノ酸の濃度は、ブロイラーの方がむしろ高いこと³⁾、ローストしたもも肉の遊離アミノ酸含量は、名古屋コーチンおよび三河赤鶏に比べてブロイラーの方が多いこと⁹⁾、および会津地鶏、名古屋コーチン、およびブロイラーの皮無むね肉の遊離アミノ酸含量の比較では、多くの遊離アミノ酸がブロイラーで多いこと²⁾が報告されている。本研究においては、これまでの報告で調べられてきた調理前の鶏肉抽出液や鶏肉スープではなく、実際に食する機会の多い湯煎調理した鶏肉に残存する呈味成分としてアミノ酸および核酸関連物質を分析したが、これまでの報告と同様、地鶏肉に多く含まれる呈味成分はなかった (Table 1)。それゆえ、地鶏肉に特徴的な美味しさ（コクと味の持続性）の決定要因は、アミノ酸や核酸以外の要因（例えば、糖代謝や脂質代謝に関連する低分子）による可能性が高いと判断された。

鶏肉の肉質については日齢^{4, 10)}、あるいは飼育形態^{11, 12)}により影響を受けることが報告されている。また、地鶏肉においては雌雄の飼育期間が異なる場合も多く、例えば、本研究に供したひょうご味どりは、雄は90日齢、雌は110日齢まで飼育することが推奨されている¹³⁾。さらに、極端な例としては、比内地鶏においては雄の鶏肉は味が劣ることから、雌しか鶏肉生産用に供されない場合が多い。それゆえ、雄の比内地鶏の食味改善を目的に雄ヒナの効率的な去勢方法が検討されているほどである¹⁴⁾。今回、官能検査に用いた市販の地鶏肉を雌雄鑑別し、そのデータを解析したところ、雄の地鶏は鶏肉らしい香りが強く、雌の地鶏はコク、味の持続性、およびまろやかさが強い傾向が認められた (data not shown)。今後、地鶏肉の性の違いによる美味しさの違いと上述の糖代謝や脂質代謝に関連する低分子等との関連を明ら

かにすることにより、地鶏肉の美味しさの決定要因を明らかにできるかもしれない。

4. 要 約

本研究では、地鶏肉の美味しさの決定要因を明らかにする目的で、官能検査による地鶏肉の美味しさの特徴解析と、そのアミノ酸および核酸関連物質含量との関連、ならびに熟成によるタンパク質含量の変化を調べた。その結果、地鶏肉はコクと味の持続性に富むこと、その美味しさにはアミノ酸および核酸関連物質の含量は関与しないことが示唆された。さらに、地鶏とブロイラーにおいては、解糖系代謝における相違があることから、今後、地鶏肉の美味しさと解糖系中間代謝産物との関連について明らかにする必要性が示された。

文 献

- 尾関教生、吉田行夫、加藤貞臣、河村孝彦、伊藤孝夫、申七郎：名古屋コーチン（名古屋種）鶏肉の食品組織学的特性（第1報）もも肉の結合組織について、調理科学、25, 301~305, 1992.
- 山田未知、山田幸二：市販の会津地鶏肉における遊離アミノ酸と脂肪酸組成について、日本食生活学会誌、24, 177~182, 2013.
- 松石昌典、加藤綾子、石毛教子、堀剛久、石田雄祐、金子紗千、竹之中優典、宮村陽子、岩田琢磨、沖谷明絵：名古屋コーチン、ブロイラーおよび合鴨肉の食味特性の比較、日本畜産学会報、76, 423~430, 2005.
- Fujimura, S., Koga, H., Takeda, H., Tone, N., Kadokami, M., Ishibashi, T. : Chemical compositions of pectoral meat of Japanese native chicken, Hinai-jidori, and broiler of the same and marketing age, *Animal Science and Technology*, 67, 541~548, 1996.
- Lebherz, H. G., Petell, J. K., Shackelford, J. E., Sardo, M. J. : Regulation of concentrations of glycolytic enzymes and creatine-phosphate kinase in "fast-twitch" and "slow-twitch" skeletal muscles of the chicken, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 214, 642~656, 1982.
- Fujimura, S., Muramoto, T., Katsukawa, M., Hatano, T., Ishibashi, T. : Chemical analysis and sensory evaluation of free amino acids and 5'-inosinic acid in meat of Hinai-dori, Japanese native chicken.-comparison with broilers and layer

- pullets, *Animal Science and Technology*, 65, 610～618, 1994
- 7) Kiyohara, R., Yamaguchi, S., Rikimaru, K., Takahashi, H.: Supplemental arachidonic acid-enriched oil improves the taste of thigh meat of Hinai-jidori chickens, *Poultry Science*, 90, 1817～1822, 2011.
- 8) Sasaki, K., Motoyama, M., Tagawa, Y., Akama, K., Hayashi, T., Narita, T., Chikuni, K. : Qualitative and Quantitative Comparisons of Texture Characteristics between Broiler and Jidori-niku, Japanese Indigenous Chicken Meat, Assessed by a Trained Panel, *The Journal of Poultry Science*, 54, 87～96, 2017.
- 9) 小出あつみ, 山内知子, 大羽和子: ロースト鶏腿肉の理化学的特性および嗜好特性, 日本調理科学会誌, 40, 138～145, 2007.
- 10) 岩本久雄: 鶏骨格筋の構造と産肉生理, 西日本畜産学会報, 50, 7～13, 2007.
- 11) 鳴澤光一, 荒木勉: 飼育形態が特産肉用鶏の肉色と筋線維特性に及ぼす影響, 日本家禽学会誌, 36, 371～376, 1999.
- 12) 仁木隆博, 佐伯祐里佳, 家入誠二, 米田一成, 荒木朋洋, 芝田猛: 飼育形態が特産肉用鶏の成長, 産肉性および脂肪蓄積に及ぼす影響, 日本暖地畜産学会報, 55, 157～166, 2012.
- 13) 地鶏銘柄鶏ガイド, www.j-chicken.jp/anshin/sanchi4_28_03.html
- 14) Rikimaru, K., Takahashi, H., Nichols, M. A. : An efficient method of early caponization in slow-growing meat-type chickens, *Poultry Science*, 90, 1852～1857, 2011.

市販食肉より分離されたリステリアのストレス応答に関する研究

Studies on stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from retail meats

落合由嗣・吉川悠子
(日本獣医生命科学大学)

Yoshitsugu Ochiai and Yuko Yoshikawa
(Nippon Veterinary and Life Science University)

Listeria monocytogenes is recognized an important foodborne pathogen. Contamination in meat has been shown to be higher than any other foods. However, the high prevalence of the pathogen in meat remains unclear. We hypothesized that the unique stress response contributes to highly successful colonization of the pathogen in meat processing environments. In the present study, we investigated the survival of *L. monocytogenes* strains following lethal H₂O₂ (60mM) and acid (pH values from pH 2.5 to pH 3.5 adjusted with HCl) exposure. Series of persistent strains isolated repeatedly from pork or chicken over six months were used for the survival analyses. Exposure to H₂O₂ and acid was performed under two temperatures of 20°C and 37°C. The comparative analyses among the groups of persistent strains from pork or chicken showed the differences in the survival following to exposure to lethal H₂O₂ and acid, whereas they were identical serologically and genetically. These findings strongly support the strain-specific variability in stress response of *L. monocytogenes*. The magnitude of the differences in the survival in the group of the persistent strains from pork was likely to be higher than that from chicken, which may reflect the strains from pork in highly variable environments. Notably, we found high susceptibility of the persistent strains from chicken to acid exposure, suggesting that the persistent isolates isolated from chicken have few opportunities to be subjected to acid in their growth environments. Therefore, we propose the usage of acid substance in meat processing environments to control *L. monocytogenes*. In addition, we need further investigation of stress response, including acid tolerance response, of this pathogen isolated from meat to elucidate persistence over extended periods of time in the environments.

1. 目的

食中毒原因菌の*Listeria monocytogenes*（リストリア）は、高齢者などの易感染者には敗血症や髄膜脳炎、妊婦には死流産、健常者には胃腸炎を

引き起こす。欧米諸国ではリストリアによる集団発生が相次いで発生しており、米国では本菌に汚染された食品の廃棄措置によって甚大な経済損失が起きている。日本ではリストリア症の発生率が欧米諸国より低く、ほぼすべてが散発発生であ

る¹⁾。しかし、日本におけるリストリアの食品汚染率は欧米諸国と同等であることが報告されている²⁾。リストリアによる食品汚染の多くは、食品加工施設で発育している菌が汚染源となって起きていると考えられる。またリストリアの中には、生息環境で長期間にわたって発育する特徴をもった「持続汚染株」の存在が知られている³⁾。持続汚染株は、繰り返して食品を汚染する可能性があるため特に問題視されている。

我々は食肉を中心としたリストリアの汚染状況を解析し、食肉が食品の中で高頻度に汚染されていることを明らかにした⁴⁾。さらに牛肉、鶏肉および豚肉における汚染状況の比較解析から、鶏肉が高い汚染率を示すとともに、人から高頻度に分離される血清型1/2 a, 1/2 bおよび4 bによって汚染されていることを見出した。ここで、食肉のリストリア汚染率が高い理由として、食肉由来リストリアが他から分離される菌株とは異なる性状を有することに起因する可能性が考えられた。

リストリアは汚染源の食品加工環境において、様々なストレスに曝露されていると想定される。それゆえ、食肉由来のリストリアは様々なストレスに高い耐性を示し、食肉を取り扱う環境でより多くの菌が生残して汚染率が高くなるという可能性が考えられた。また我々はこれまでに、同一店舗の同じ食肉から半年間にわたって繰り返し分離され、同一血清型および遺伝子型に分類されたことから、持続汚染株と考えられる一連の菌株を得た⁵⁾。このような持続汚染株は特に高いストレス応答能力を有していると考えられたため、本研究では食肉由来持続汚染株のストレス応答性を解析した。ストレスとして、菌の生息環境および宿主内環境で頻繁に曝露されると予測される酸および過酸化水素（H₂O₂）を用いた。また、研究室で多く用いられるEGD-e株がH₂O₂曝露下で曝露温度依存的な生残性を示すことが分かったため⁶⁾、

食品加工環境を想定した20°C、および宿主環境を想定した37°Cの2つの温度条件で曝露解析を行った。

2. 方 法

2.1 用いた菌株

本研究では、1997年12月から1998年6月にかけて同一店舗で購入された市販鶏ひき肉、あるいは豚ひき肉から繰り返し分離された一連の菌株群を用いた。鶏肉由来株は血清型1/2 b、豚肉由来株は血清型1/2 cに分類され、またMulti-virulence-locus sequence typing⁷⁾による遺伝子型別で鶏肉由来株間、あるいは豚肉由来株間で同一の遺伝子型に分類された背景から持続汚染株と示唆された。豚肉および鶏肉由来持続汚染株としてそれぞれ、9株および11株を用いた（Table 1）。さらにリストリア研究で多く用いられるEGD-e株も用いた。

Table 1 Persistent strains used in the present study

Strain	Sampling date or year
Persistent strain isolated from pork	
75 P 1	10 Feb. 1998
76 P 1	10 Feb. 1998
78 P 1	11 Feb. 1998
90 P 5	11 Mar. 1998
92 P 3	12 Mar. 1998
100 P 1	15 Apr. 1998
104 P 4	17 Apr. 1998
114 P 2	22 May 1998
117 P 5	10 June 1998
Persistent strain isolated from chicken	
69 C 3	14 Dec. 1997
72 C 3	9 Feb. 1998
72 C 5	9 Feb. 1998
77 C 1	11 Feb. 1998
87 C 4	10 Mar. 1998
91 C 3	12 Mar. 1998
97 C 5	13 Apr. 1998
99 C 4	15 Apr. 1998
103 C 4	17 Apr. 1998
109 C 1	20 May 1998
116 C 1	10 June 1998

2.2 菌株の培養

-80°Cで凍結された供試菌株をBHI寒天培地に接種し、37°Cで24時間培養した。次いで培地上に形成されたコロニーをBHIプロスに接種し、37°Cで一晩培養した。

2.3 菌株のストレス曝露

ストレス曝露には、上記の培養液を0.6%酵母エキス添加トリプトソイプロスで培養し、OD₆₆₀が0.3（対数増殖期）に達したものを用いた。菌量をおよそ 3×10^7 CFU/mlにしてPBSで洗浄した。得られた菌を致死的濃度である60mMのH₂O₂を添加したPBSおよび塩酸でpH2.5～3.5にした酸性化BHIに曝露した。曝露温度条件は20°Cおよび37°Cとし、160rpmの振とう条件で行った。指定する時間まで曝露した後、10倍段階希釈して寒天培地に接種した。寒天培地として、H₂O₂曝露した菌の培養には1%ピルビン酸ナトリウム・0.6%酵母エキス添加トリプトソイ寒天培地、酸曝露した菌の培養には0.6%酵母エキス添加トリプトソイ寒天培地を用いた。培地上に出現したコロニー数から菌数を求め、生残率を算出した。

3. 結果と考察

3.1 豚肉由来持続汚染株のストレス曝露に対する生残性

豚ひき肉から連続して分離された持続汚染株群の9株およびEGD-e株をH₂O₂および酸に曝露した後の生残性を解析した。

致死的濃度のH₂O₂に対する応答性の解析では、菌株のストレスに対する曝露時間を20°Cおよび37°Cでそれぞれ、120分間および30分間とした。得られた生残率をFig. 1AおよびFig. 1Bに示す。生残率を菌株間で比較したところ、豚肉由来持続汚染菌株群は同一の血清型および遺伝子型に分類された一方で、H₂O₂曝露に対する生残性には著しい多様性が観察された。また、20°Cで相対的に

高い生残性を示した菌株は、37°Cでも高い傾向がみられた。さらに、調査期間の後半に分離された菌株の生残性が低くなる傾向がみられた。

酸に対する応答性の解析では、pH2.5の酸性化BHIに対し、20°Cおよび37°Cでそれぞれ、120分間および15分間曝露した。得られた生残率をFig. 1CおよびFig. 1Dで示す。菌株間で比較したところ、酸曝露に対する生残性にも著しい多様性が観察された。また、H₂O₂曝露における生残性のように、20°Cで高い生残性を示した菌株は37°Cでも高いこと、調査期間の後半に分離された菌株の生残性が低くなる傾向が観察された。ここで統計解析を行ったところ、H₂O₂曝露と酸曝露の生残性に相関性のあることが示された。

3.2 鶏肉由来持続汚染株のストレス曝露に対する生残性

鶏ひき肉から連続して分離された持続汚染株群の11株、およびEGD-e株をH₂O₂および酸に曝露した後の生残性を解析した。

H₂O₂に対する応答性解析では、菌株を致死的濃度のH₂O₂に20°Cおよび37°Cでそれぞれ、150分間および30分間曝露して解析した。得られた生残率をFig. 2AおよびFig. 2Bに示す。菌株間で生残性を比較したところ、20°Cでは、豚肉由来株のように調査期間の後半に分離された菌株の生残性が低くなる傾向が観察された。一方、37°Cでは顕著な多様性が観察されず、すべての菌株が高い生残性を示した。

一方、鶏肉由来持続汚染株群は高い酸感受性を示した。すなわち、37°C、15分間の条件でpH2.5の酸性化BHIに曝露したところ、EGD-e株を含むすべての菌株が寒天培地上にコロニーを形成しなかった。37°C、15分間の条件でpH3.0の酸性化BHIへの曝露では、72C 3株を除くすべての菌株が寒天培地上でコロニーを形成しなかった一方、72C 3株は平均2.6log CFU/mlの減少が観察され

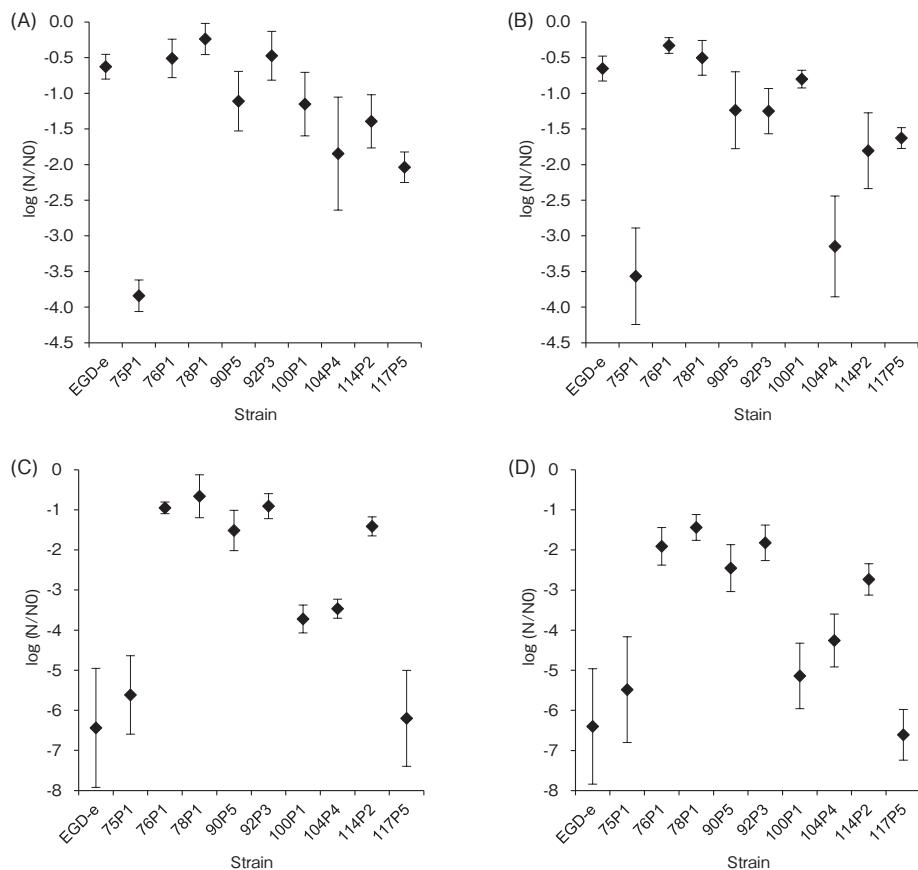


Fig. 1 Survivals of persistent *L. monocytogenes* strains isolated from pork. The strains were subjected to lethal H_2O_2 at 20°C for 120 min (A) or 37°C for 30 min (B), and to acidified HCl adjusted to pH 2.5 20°C for 120 min (C) or 37°C for 15 min (D). Counts of bacterial survival were transformed to logarithmic reduction based on the formula : $\log (N/N_0)$, where N is the bacterial density after time points of stress exposure and N_0 is the initial bacterial density.

たものの、菌の生残が確認された。さらに、72C 3株と同じ鶏肉から分離された72C 5株の酸曝露でも菌の生残が確認された。以上から、鶏肉由来持続汚染株群の間でも酸曝露への応答性に多様性が観察された。次に、37°C、25分間の条件でpH 3.5の酸性化BHIに曝露したところ、菌株すべての生残が確認された (Fig. 2D)。pH 3.0で生残性を示した72C 3株および72C 5株は、pH 3.5でも他の菌株よりも高い生残性を示した。残りの菌株間で比較したところ、豚肉由来株群のように、調査期間の後半に分離された菌株の生残性が低くなる傾向が観察された。また pH 3.0のBHIに

20°C、45分間曝露して得られた生残性を比較したことろ、同様な傾向が観察された。

以上から、鶏肉由来持続汚染株は低い H_2O_2 感受性を示す一方、高い酸感受性を示すことが明らかとなり、 H_2O_2 および酸感受性の間に関連性のない知見が得られた。これは食肉を取り扱う環境状態を反映している可能性がある。酸への曝露機会が多いチーズの製造工程からは、酸に低感受性のリストリアが分離されている⁸⁾。一方、生鮮食肉を取り扱う環境では酸曝露の機会が少ないため、高い酸感受性のリストリアが長期間にわたって持続発育した可能性が考えられる。以上の知見

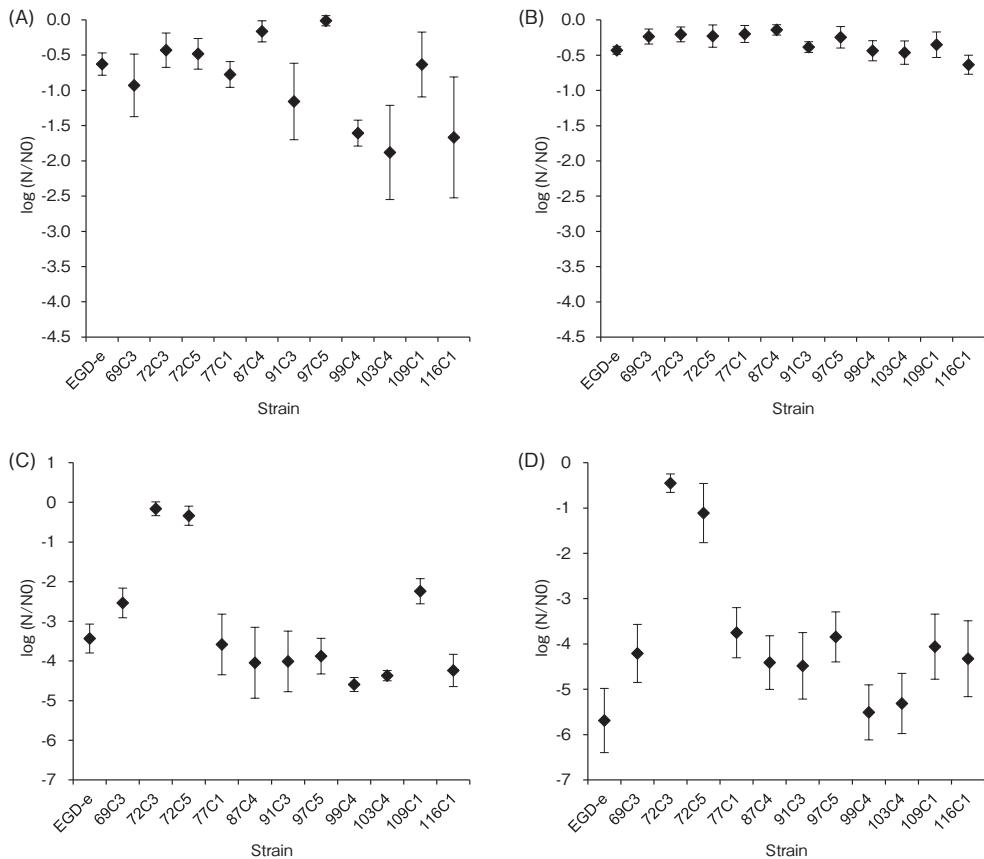


Fig. 2 Survivals of persistent *L. monocytogenes* strains isolated from chicken. The strains were subjected to lethal H_2O_2 at 20°C for 150 min (A) or 37°C for 30 min (B), and to acidified HCl adjusted to pH3.0 20°C for 45 min (C) or that adjusted to pH3.5 at 37°C for 25 min (D).

は、食肉を取り扱う環境における酸の使用がリステリアの制御に有効な可能性を示唆している。しかし、72C3株のような相対的に低い酸感受性を示す菌株の存在は、生息環境が酸に曝露される機会があっても菌が生残できる可能性を示している。しかし本研究では、ごく一部の条件で酸曝露を行ったのみであり、様々な条件での曝露検討が必要である。また、菌をあらかじめ弱酸で処理することで、致死的な酸曝露に対する生残性が増強されるという報告があるため⁹⁾、弱酸処理した持続汚染株のストレス応答性も解析する必要がある。

3.3 食肉由来持続汚染株のストレス応答性の総括

本研究では、共通汚染源に由来すると示唆された持続汚染株群の間でストレス応答性に多様性のあることを示した。このことは、リステリアのストレス応答性において菌株依存的に多様性があるという報告を強く支持している^{10, 11)}。また、特に豚肉由来持続汚染株群のストレス応答性は著しい多様性を示した。以上の知見は、豚肉由来株および鶏肉由来株が生息した環境の違いが影響しているかもしれない。すなわち、豚肉由来株の生息していた環境の変化は著しく、それに伴いストレス応答性の異なる菌株が出現した可能性がある。さ

らに豚肉および鶏肉由来株群とともに、調査期間の後半に分離された菌株が低い生残性がみられたが、この理由については不明である。多様性の獲得機序として、生息環境の変化に伴って菌がストレス応答性を変えた、あるいは汚染源にいる菌の集団が、同一の菌型を示す一方でストレス応答性に多様性のある菌から構成されているなどの可能性が考えられる。

4. 要 約

リストリアによる食肉汚染率は他の食品よりも高いため、本菌による食中毒を予防するために、食肉のリストリア汚染を制御することが有効と考えられる。我々は食肉由来リストリア菌株のストレス応答性が高い汚染率に関与している可能性があると考えた。本研究では、食肉から繰り返し分離され、同一菌型に分類された持続汚染株群のストレス応答性を解析した。豚肉あるいは鶏肉から半年間にわたって繰り返し分離された一連の菌株を致死的濃度のH₂O₂および酸に曝露して生残性を検討した。それぞれの食肉から分離された菌株群間で、ストレス応答性に多様性が観察された。特に豚肉由来株群は、生残性の多様性が顕著にみられた。一方、鶏肉由来株は酸感受性の高く、食肉を取り扱う環境で酸に曝露される機会が少ないことが関連していると考えられた。以上から、食肉を取り使う環境で、酸をリストリア制御のために適用することが有用な可能性を示す一方、酸に対する応答性のさらなる解析が必要と考えられた。

文 献

- 1) Yamane, K., Suzuki, S., Shibayama, K. : Estimation of listeriosis incidence in Japan based on the laboratory data of MHLW's nosocomial infection surveillance (JANIS) in 2008–2011. *Infectious Agents Surveillance Report*, 33, 247~248, 2012.
- 2) Okutani, A., Okada, Y., Yamamoto, S., Igimi, S. :

Overview of *Listeria monocytogenes* contamination in Japan, *International Journal of Food Microbiology*, 93, 131~140, 2004.

- 3) Carpentier, B., Cerf, O. : Review-Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises, *International Journal of Food Microbiology*, 145, 1~8, 2011.
- 4) Ochiai, Y., Yamada, F., Batmunkh, O., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., Ueda, F. : Prevalence of *Listeria monocytogenes* in retailed meat in the Tokyo metropolitan area, *Journal of Food Protection*, 73, 1688~1693, 2010.
- 5) Ochiai, Y., Yamada, F., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., Ueda, F. : Biofilm formation under different temperature conditions by a single genotype of persistent *Listeria monocytogenes* strains, *Journal of Food Protection*, 77, 133~140, 2014.
- 6) Ochiai, Y., Yamada, F., Yoshikawa, Y., Mochizuki, M., Takano, T., Hondo, R., Ueda, F. : Sequential transition of the injury phenotype, temperature-dependent survival and transcriptional response in *Listeria monocytogenes* following lethal H₂O₂ exposure, *International Journal of Food Microbiology*, 259, 52~58, 2017.
- 7) Chen, Y., Zhang, W., Knabel, S. J. : Multi-virulence-locus sequence typing identifies single nucleotide polymorphisms which differentiate epidemic clones and outbreak strains of *Listeria monocytogenes*, *Journal of Clinical Microbiology*, 45, 835~846, 2007.
- 8) Faleiro, M. L., Andrew, P. W., Power, D. : Stress response of *Listeria monocytogenes* isolated from cheese and other foods, *International Journal of Food Microbiology*, 84, 207~216, 2003.
- 9) O'Driscoll, B., Gahan, C. G., Hill, C. : Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes* : isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrates increased virulence, *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1693~1698, 1996.
- 10) Adrião, A., Vieira, M., Fernandes, I., Barbosa, M., Sol, M., Tenreiro, R. P., Chambel, L., Barata, B., Zilhão, I., Shama, G., Perni, S., Jordan, S. J., Andrew, P. W., Faleiro, M. L. : Marked intra-strain variation in response of *Listeria monocytogenes* dairy isolates to acid or salt stress and the effect of acid or salt adaptation on adherence to abiotic surfaces, *International Journal of Food Microbiology*, 123, 142~150, 2008.
- 11) Skandamis, P. N., Gounadaki, A. S., Georaras, I., Sofos, J. N. : Adaptive acid tolerance response of *Listeria monocytogenes* strains under planktonic and immobilized growth conditions, *International Journal of Food Microbiology*, 159, 160~166, 2012.

食品加工機器の信頼性と安全性向上のための基礎的研究

Basic study on improvement of food processing machine

小 茂 鳥 潤

(慶應義塾大学理工学部機械工学科)

Jun Komotori

(Department of Mechanical Engineering, Faculty of Science and Technology, Keio University)

Atmospheric-controlled induction-heating fine particle peening (AIH-FPP) using Cr and Mo shot particles in a N₂ atmosphere was introduced to improve the electrochemical characteristics of AISI 316 austenitic stainless steel used for food processing machine. The surface microstructure of the AIH-FPP-treated specimen was characterized using scanning electron microscopy (SEM) and energy dispersive X-ray spectrometry (EDX). AIH-FPP can be used to form transferred and diffused layers of shot particles on the surface of austenitic stainless steel. The thickness of the diffusion layers of Cr shot particles tended to increase with the heating time in the AIH-FPP process, whereas the Cr concentration at the surface tended to decrease. Electrochemical polarization tests were performed in 3 wt% NaCl + H₂SO₄ and 20 wt% NaCl environments at 343 K using a three-electrode electrochemical cell connected to a computer driven potentiostat to examine the corrosion resistance of austenitic stainless steel treated with AIH-FPP. The pitting potential of the AIH-FPP-treated specimen was higher than that of the untreated specimen. In particular, there was clear improvement in the pitting potential of austenitic stainless steel by AIH-FPP with Cr shot particles following peening with Mo shot particles. AIH-FPP using Cr and Mo shot particles in a N₂ atmosphere is an effective method of improving the electrochemical characteristics of austenitic stainless steel.

1. 緒論

食肉の流通には、その加工プロセスの効率化を追求する必要はあるが、安全性の確保が最も重要な課題と言える。とくに、我々消費者は、レトルト食品など最近では加工された商品をよく手にする。したがって、この製造プロセスの安全性確保が重要と言える。

最近では『食の安全』という言葉を耳にすることがあるが、この一語には、多くの意味が含まれ

ていると思われる。我々の口に運ばれる食品の製造過程は、厳密に管理され十分な安全性が確保されるということは、消費者の立場からは当然と考えていることである。しかしこの当たり前と考えられている事柄に関しても、これを実現するためには、製造者側は多大なる努力を払っているものと申請者は考えている。本申請は、我々の有する技術シーズを活用することで、その一助になることを期待して企画・立案したものである。

本研究では、食品加工機械に用いられる、圧延

ローラやカッターを想定して、それに適した金属表面の改質プロセスを提案することを目的とした基礎研究を実施する。具体的にはまず、加工機械の現状における問題点を、実際に機械を製造する会社とユーザーである食品会社を訪問して聞き取り調査を実施しながら明確にする。なお、現状ではすでに述べたとおり、耐食性、耐摩耗性および耐疲労性のさらなる向上が必要と考えている。つぎに、実際カッターや圧延ローラに利用されている金属素材に対する表面改質を実施する。

微粒子ピーニング (FPP : Fine Particle Peening) は、圧縮残留応力の付与^{1, 2)} や、結晶粒の微細化^{3, 4)} が可能なことに加え、投射粒子の一部を被処理面に移着^{5, 6)} させることができるために、材料表面の化学組成を変化させる簡便な表面処理技術としても注目を浴びている。近年、工業分野では新しい表面処理技術の開発への期待が高まってきており、このFPPについても、既存の装置に対して種々の改良が行われている。とくに最近提案された⁷⁾、処理雰囲気を制御し、かつ被処理材を加熱した状態でFPPを施すことが可能な雰囲気制御高周波誘導加熱微粒子ピーニング (AIH-FPP : Atmospheric-controlled Induction-Heating Fine Particle Peening) は、酸化スケールの形成を抑制しつつ、被処理面に粒子移着層および拡散層を形成させることができる。本申請では、このAIH-FPPを用いて、金属製素材の表面改質を行い、それを食品加工機器に利用することを想定して基本特性の評価を行う。ここでは、Cr, Mo粒子を用いたAIH-FPPが炭素鋼の耐食性に及ぼす影響について明らかになった事柄を報告する。

2. 実験方法

被処理材には、機械構造用炭素鋼 (S45C), オーステナイト系汎用ステンレス鋼 (SUS316) を用いた。同材をφ5mm, 厚さ4mmの円盤型試

験片に機械加工した後、一方の端面を#320～#1200のエメリ紙により研磨した。この試験片をIHコイルの内側に設置した後、粒子噴射ノズル（内径6mm）からN₂ガスを供給し、チャンバー内の雰囲気置換を行った。設置した酸素濃度計（測定公差±0.3%）の数値が0.0%となったことを確認した後、Fig. 2に示す熱サイクルでAIH-FPPを施した。以後、AIH-FPPを施した試験片のシリーズ名を投射粒子-基材番号で呼称する。

Cr粒子を用いたAIH-FPPがステンレス鋼の耐食性に与える影響を調べるため、処理温度1100°C、投射時間30s、粒子投射後の加熱保持時間0, 25, 60, 100sで処理した試験片を準備した。なお、粒子投射は投射圧力0.5MPa、粒子供給量0.2g/sの条件で行った。

つぎに、Cr, Mo粒子を用いたAIH-FPPがステンレス鋼の耐食性に与える影響を調べるため、処理温度1100°C、各粒子の投射時間を30sとして、一つの試験片に対して二度AIH-FPPを行った。投射比はCr:Mo=9:1, 8:2とし、各投射比につき粒子投射の順番を変えた試験片を作製した。

またCr, Mo粒子を用いたAIH-FPPが炭素鋼の耐食性に与える影響を調べるため、処理温度1100°C、各粒子の投射時間を30sとし、投射比Cr:Mo=8:2でAIH-FPPの2段階投射を行った。

作製した試験片に対しては、電界放射型走査型電子顕微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope : FE-SEM), エネルギー分散型X線分光装置 (Energy Dispersive X-ray spectrometer : EDX), X線光電子分光装置 (X-ray photoelectron spectroscope : XPS), 光学顕微鏡および微小硬さ計を用いた分析を行った。被処理面の結晶構造分析には、X線回折 (X-ray diffraction : XRD) 装置を用い、X線入射角度10°, X線源CuKa (波



Fig. 1 Macroscopic view of AIH-FPP treated surface

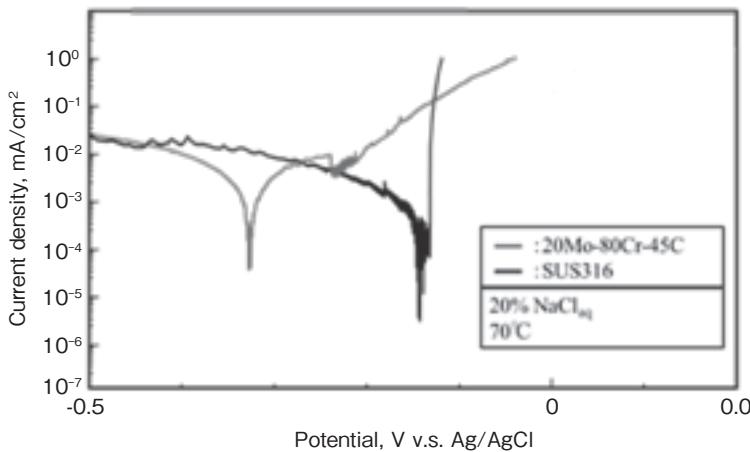


Fig. 2 Anodic polarization curves

長0.154nm), 電圧40kV, 電流40mA, $2\theta = 20 \sim 90^\circ$ の条件で行った。表面改質層の腐食特性の評価は、3電極法によるアノード分極試験により行った。参照電極には、飽和カロメル電極(Saturated Calomel Electrode : SCE)を、対極としてはプラチナ電極を用いた。分極試験は、70°Cの20%NaCl溶液中で行った。

3. 実験結果および考察

前項の結果から、CrおよびMo粒子を用いたAIH-FPPによってステンレス鋼の耐食性が大幅に向上することが明らかとなった。そこで本項では、同処理を炭素鋼に対して適用し、耐食性に及ぼす影響を調べることとする。

前項のステンレス鋼の結果から、最も安定した

不動態域が得られた20%Mo-80%Crの投射比を投射条件として設定した。Fig. 1に各粒子投射後の試験片のマクロ観察結果を示す。どちらの試験片でも粒子が移着している様子が分かる。また、炭素鋼はステンレス鋼と比べ耐酸化性に劣る。そのため酸化の影響に敏感であり、2段階投射による試験片への影響が懸念されたが、同図より、Mo酸化物やCr酸化物に特有の緑がかった色は見受けられなかった。

Fig. 2に作製した試験片の腐食試験結果を示す。同図より、2段階投射を施した炭素鋼の動電位分極曲線は、安定した不動態域や明確な孔食電位を示しておらず、電流密度が緩やかに上昇し続けていることが分かる。そのため、腐食の初期の段階から隙間腐食が進展し続けた可能性が考えら

れる。一方で急激な電流密度の立ち上がりがなかったことは、試験終了時まで、試験片表面の崩壊が起きず、Crの再不動態化が進んでいたことを示している。ステンレス鋼が不動態を維持できない腐食環境下でも、隙間腐食が進展しきらなかったことから、ステンレス鋼と比べて耐隙間腐食性能に劣る一方で、Cr不動態化能力に優れていることが明らかとなった。

つぎに、隙間腐食がどのように進展したのかを調べるために、光学顕微鏡による断面観察を行った。Fig. 3にその結果を示す。断面はこれまでと同様、ナイタールによるエッチングを施した。同図より、基材最表面で拡散層の破壊が見られるほか、拡散層直下で隙間腐食が進行していることが分かる。このことから、CrとMoの2段階投射を用いてAIH-FPPを施した炭素鋼は、Cr粒子のみを用いたAIH-FPPを施した炭素鋼と比べ耐食性

は向上するものの、耐隙間腐食性能に課題を残す結果となったことが明らかとなった。

つぎに、粒子の投射ごとの断面の変化を追うため、SEMおよびEDXによる断面観察を行った。Fig. 4にその結果を示す。同図より、1段階目の処理後の断面観察結果より、Mo粒子が基材表面に移着していることが分かる。また、この時点ではMoの基材への拡散は進んでいないことが分かる。一方で、2段階目の処理後の断面観察結果より、基材表面近傍の20 μm程の範囲にわたって、CrおよびMoの両方が含まれる層が創製されたことが分かる。

つぎに、この改質層についてより詳細な検討を加えるため、改質層のある範囲で基材表面から深さ方向へのポイント分析を行った。Fig. 5にその結果を示す。同図より、FeおよびCrの濃度が深さ方向へと傾斜的に推移していることが分かる。



Fig. 3 Optical micrographs of corroded region

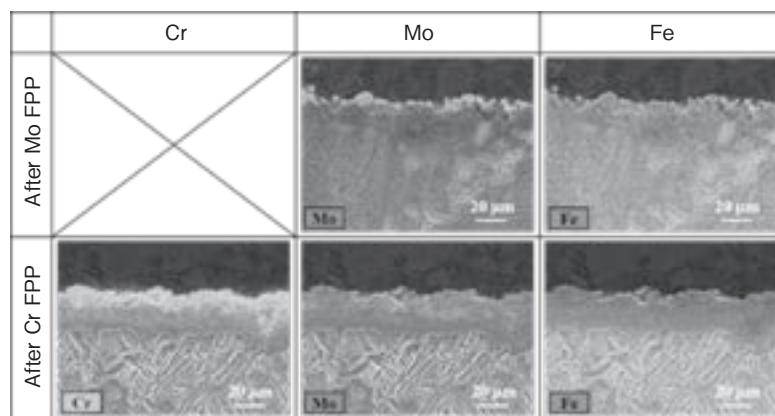


Fig. 4 EDX maps analyzed at the longitudinal sections of the specimens

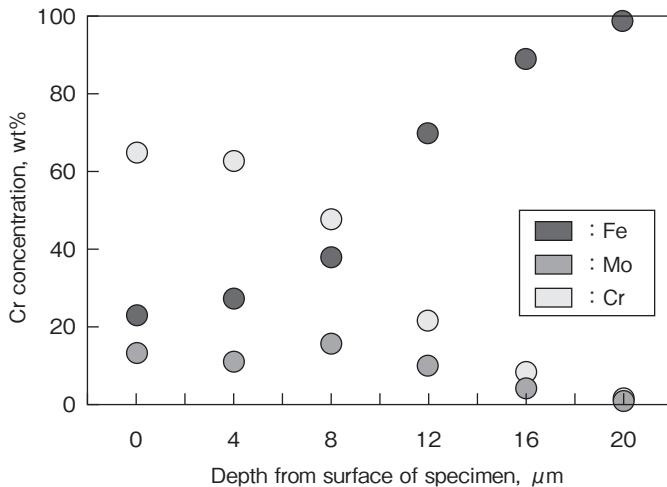


Fig. 5 Depth-directional element concentration

のことからAIH-FPPによって、Cr元素が基材表面から拡散していることが分かった。またMoは、Crのような傾向はみられないことが分かる。ここでマッピングの結果から、Crが基材最表面に、Moが基材最表面からやや下部を中心として分布していることが分かった。そのため、2段階投射の影響により、移着したMo粒子の一部が、Crの衝突とともに基材と折り畳み変形を繰り返し内部へと押し込まれた可能性が考えられる。

4. 要 約

本研究では、CrおよびMo粒子を用いたAIH-FPPにより炭素鋼およびステンレス鋼の耐食性を改善することを試みた。また、主に耐食性の観点から検討・考察を加えた。その結果、CrおよびMo粒子を用いたAIH-FPPによって、炭素鋼にCrおよびMoの拡散層が形成されたことが明らかとなった。形成された拡散層により、基材のCr再不動態化力はステンレス鋼を上回る可能性があることが明らかとなった。これらの結果は、申請者らが提案したAIH-FPP処理により耐食性の高い鋼の実現を示唆するものである。

文 献

- Shiozawa, K., Lu, L.: Fatigue & Fracture of Engineering Materials & Structures, 25, 813~822, 2002.
- Ko, H. N., Itoga, H., Hasegawa, T., Kagaya, C., Nakajima, M.: Transactions of the Japan Society of Mechanical Engineers (series A), 68, 484~490, 2002.
- Takagi, S., Kumagai, M.: The Japan Society for Precision Engineering, 72, 1079~1082, 2006.
- Todaka, Y., Umemoto, M., Watanabe, Y., Tsuchiya, K.: Journal of the Japan Institute of Metals, 67, 690~696, 2003.
- Kameyama, Y., Komotori, J., Shimodaira, E.: Journal of Material Testing Research Association of Japan, 48, 53~56, 2003.
- Kameyama, Y., Komotori, J.: Journal of Materials Processing Technology, 209, 6146~6155, 2009.
- Ito, T., Kikuchi, S., Kameyama, Y., Komotori, J., Fukazawa, K., Misaka, Y., Kawasaki, K.: Journal of the Japan Institute of Metals, 74, 533~539, 2010.
- Fukuoka, T., Ujiie, Y., Komotori, J., Fukazawa, K., Misaka, Y., Kawasaki, K.: Effects of Processing Parameters on Characteristics of Surface Modified Layers Generated by Atmospheric Controlled IH-FPP System, Procedia Engineering, Vol.10, 1503~1508, 2011.

食肉の高品位熟成に寄与する可食性蓄熱 マイクロカプセルの開発

Preparation of edible thermal storage capsule for the high-quality aging of meat

小 林 敬

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)

Takashi Kobayashi

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

Heat storage microcapsule containing oil would be a candidate for the improvement of the aging process of meat. To select the best oil for the thermal storage, the differential scanning calorimetry (DSC) analysis of various plant oils (olive, coconut, palm kernel, and palm oils) was performed. DSC analysis of coconut oil showed that peak for freezing was ca. 3.3°C, indicating the best thermal storage of the aged meat would be coconut oil. The microcapsule containing coconut oil was prepared using a rotor-stator homogenizer through complex coacervation by mixing coconut oil with gelatin and gum arabic at various oil contents. The microcapsule was then crosslinked by transglutaminase. The scanning electron microscopy (SEM) of the prepared samples showed that the microcapsules with maximum diameter of 20 µm were formed by coacervation. Coconut oil in each microcapsule showed higher freezing point (ca. 11°C) than the pure one (3.3°C) by the DSC analysis. It would be due to the effect of wall material (gelatin and gum arabic). Because the sticky property of the microcapsule with higher oil contents hindered well-handling, the highest oil content was practically 67%. The heat storage capacity of the microcapsule was evaluated using a pseudo meat model in an environmental test apparatus. The capacity was much higher when the oil content was higher. In addition, microcapsule also played a role as a thermal insulator due to the low heat conductivity of the wall material. When the ambient temperature changed between -8 to 28°C, the microcapsule exhibited its heat storage capacity, and the temperature of the pseudo meat was kept between 5 to 23°C. Although the temperature range was relatively higher, this result indicates the applicability of the edible microcapsule to the heat storage.

1. 目 的

近年、熟成肉が注目されるようになってきた。高品位な熟成肉を製造するためには、厳密な温度管理が重要となる。一方、加工や流通過程におい

て、温度は常に変化しうる。この温度変化を最小限にすることは、低成本で高品位な熟成肉を提供することに貢献できる。蓄熱材を利用すると、温度変化を小さくすることができるが、現状では、食品用蓄熱材の開発は道半ばである。

蓄熱材の主成分である相変化材料は、塩類などを含む無機系と、有機系材料に分類できる。有機系材料としては、パラフィン類などのアルカンが頻用されている^{1~3)}。パラフィンは毒性が低く、炭素鎖長に応じて広い温度範囲で利用できる、過冷却度が小さい、安価であるなどの利点を有しており、服飾や建築系材料における相変化材料としては非常に適している⁴⁾。これらの相変化材料をマイクロカプセルとして用いることで、融解時の漏出などが防止できる。マイクロカプセルを作製する際には、ポリスチレン⁵⁾、アクリル樹脂^{6,7)}やシリカゲル⁴⁾などが包括剤として用いられる。

一方、パラフィンの毒性は低いものの、食品用途として利用することはできない。また、上述の包括剤も可食性とは言いがたい。そこで、動植物油を用いた相変化材料を可食性包括剤により包括化することで、食品加工用途に適した可食性マイクロカプセルの製造につながると考えられる。

ゼラチンとアラビアガムを用いることで複合コアセルベートが形成される⁸⁾。複合コアセルベートは強固な表面を持つ微粒子（マイクロカプセル）であり、ゼラチンを含む場合には、トランスグルタミナーゼによって架橋を形成し、粒子の強度を改善できることが期待される。コアセルベートに油脂を封入すれば、可食性物質のみからなるマイクロカプセルを作製することができると考えられる。本研究では、これらの材料を包括剤として利用することで、蓄熱マイクロカプセルの作製を試みた。さらに、作製したマイクロカプセルの蓄熱性能の評価もあわせて実施した。

2. 方 法

2.1 材 料

ゼラチンおよびアラビアガムは和光純薬（大阪）から購入した。オリーブ油、ココナッツ油、パーム油、およびパーム核油はカフェ・ド・サボ

ン（山梨）から購入した。トランスグルタミナーゼ（Activa TI, 味の素）は、Modernist Pantry (Eliot, ME, USA) から購入した。そのほかの試薬は和光純薬またはナカライテスク（京都）から購入した。

2.2 示差走査熱量（DSC）分析

油脂またはマイクロカプセルを示差走査熱量分析（DSC）に供した。DSCパンに1~8 mgのサンプルを入れ、クリンパによりシールした。これを次の条件によりDSC分析した。油脂の種類が多いため、分析開始温度および最低温度は油種に応じて変化させた。20~60°C（油脂に依存）→-30~-50°Cへ-2°C/minで降温；-30~-50°Cで3分間保持；-30~-50°C→20~60°Cへ2°C/minで昇温。

2.3 マイクロカプセルの調製

ゼラチン13 gに247 mLの水を加え、約40°Cに加熱して溶解し、5 wt%のゼラチン溶液を調製した。別途、アラビアガム13 gを247 mLの水に溶解した。40~50 gのゼラチン水溶液にココナッツ油を2.5~40 g添加し、ゼラチン量の1~20倍量のココナッツ油が含まれる液を調製した（ゼラチン：ココナッツ油=1:1, 1:2, 1:3, 1:5, 1:10, 1:20の各サンプルを用意した。以下、1:1マイクロカプセルなどと表記する）。この液をローターステーター型ホモジナイザー（ポリトロン）を用いて、16000 rpmで2分間攪拌し、エマルジョンを調製した。ここで得られたエマルジョンを攪拌しつつ、等重量（40~50 g）のアラビアガム水溶液を徐々に添加した。次いで、0.1 mol/L HClを徐々に添加し、攪拌しながらpH4.0に調整した。室温で30分間攪拌を続けた後、4°Cに冷却した。これにより、複合コアセルベートとした。

コアセルベートにトランスグルタミナーゼを1%の終濃度となるように添加した。この懸濁液

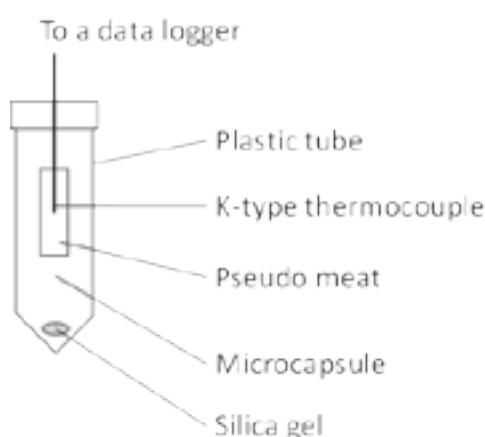


Fig. 1 Schematic diagram for the evaluation apparatus of the heat storage microcapsule.

を4°Cで一晩攪拌した。また、架橋剤の影響を評価するために、トランスグルタミナーゼの代わりに1%のグルタルアルdehyドを懸濁液に添加し、4°Cで一晩攪拌した。

これらの処理により得られた懸濁液を-30°Cで凍結させた。次いで、凍結乾燥機を用いて、懸濁液を凍結乾燥させた。得られた乾燥物をワンダークラッシャー（大阪ケミカル）を用いて粉碎し、マイクロカプセルを得た。

なお、必要に応じて、油脂を添加しないコアセルベートも調製し、ココナッツ油の有無による影響の評価に使用した。

2.4 マイクロカプセルの蓄熱性能評価

K型熱電対をエポキシ樹脂に封入して約2.4 gの疑似肉片（35mm × 9 mm φ）を作製し、蓄熱性能の評価に供した（Fig. 1）。疑似肉片を50mL容のプラスチック製遠心チューブに入れ、チューブ内を12.3～33.0 gのマイクロカプセルで充填した。なお、チューブ内に2 gのシリカゲルを入れ、吸湿を防ぐとともに、充填の際には約5 mmの高さから50回以上タッピングを行い、密に充填した。

プラスチックチューブ内にマイクロカプセルを充填せず、疑似肉片のみを入れたものを対照

（control）とした。さらに、ココナッツ油を含まないコアセルベートを1:0マイクロカプセルとして、コアセルベート自体の影響の検証用とした。また、1:20マイクロカプセルはべつきが大きいため、本検討の対象からは外した。

マイクロカプセルを充填したプラスチックチューブを環境試験器（SH-642, ESPEC）に入れ、温度を変動させ、それに伴う疑似肉片の温度変化をデータロガー（GL242, グラフテック）で記録した。温度プログラムの設定は以下のとおりとした。15°Cで保持（2時間）、30°Cへ昇温、30°Cで保持（30分間）、-10°Cへ降温、-10°Cで保持（30分間）、30°Cに昇温。次いで、降温と昇温を再度繰り返した。最終的には、15°Cの設定温度を保持させた。実際の庫内温度は、データロガーで記録した。

3. 結果と考察

3.1 油脂のDSC測定

オリーブ油、ココナッツ油、パーム油、およびパーム核油の融点および凝固点をDSCにより測定した（Fig. 2）。オリーブ油は-40°C付近に凝固ピークを有し、-7°C付近で融解ピークを示した。一方、その他の油脂は-5～20°Cの間に凝固による発熱ピークが観測された。また、融解による吸熱ピークは、ココナッツ油およびパーム核油については20°C付近に、パーム油については-20～40°Cの広い範囲でなだらかな吸熱ピークが観測された。これらの結果を合わせると、肉の熟成に適した温度帯である1°C前後に発熱ピークを有する油脂としてココナッツ油が適していることが示唆された。そこで、ココナッツ油を用いたマイクロカプセルの調製を試みた。

3.2 マイクロカプセルの特性

粉碎前のマイクロカプセルをSEM観測した。トランスグルタミナーゼ処理およびグルタルアル

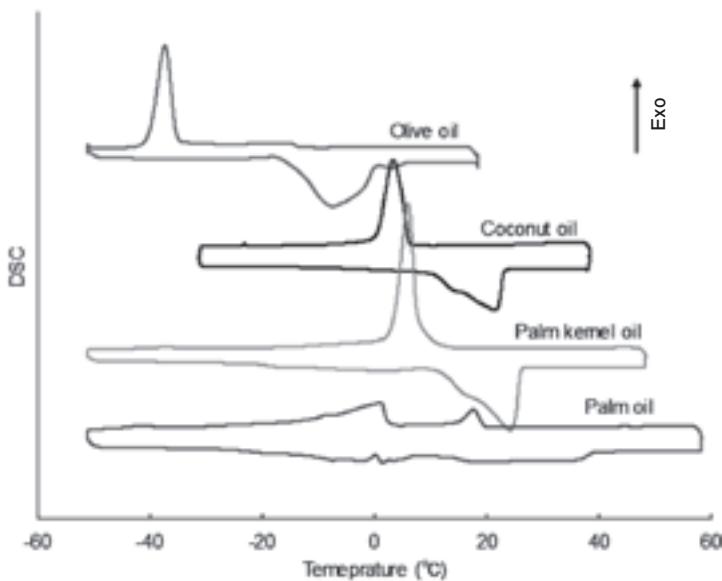


Fig. 2 DSC thermograms for various plant oils and fats.

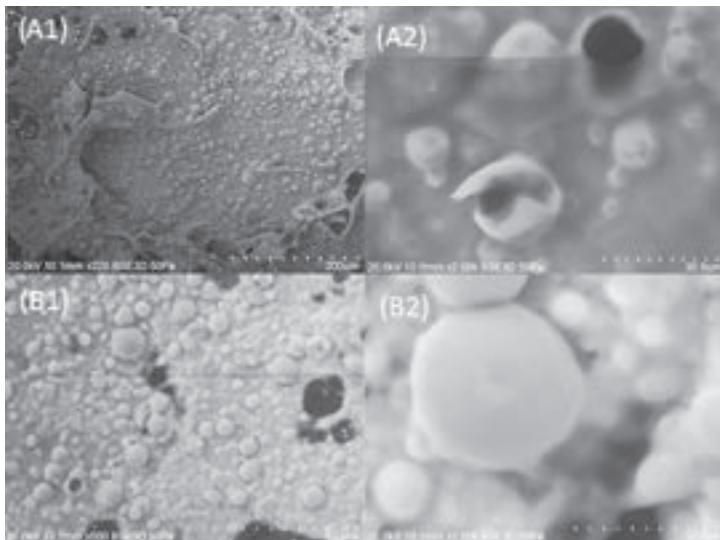


Fig. 3 Scanning electron microscope (SEM) images for the prepared microcapsules before milling. Images for microcapsule crosslinked by transglutaminase at (A1) $\times 220$ and (A2) $\times 2.00k$; and those by glutaraldehyde at (B1) $\times 500$ and (B2) $\times 2.50k$.

デヒド処理を施したマイクロカプセルのいずれにおいても、球状の粒子が観測され、粒径は最大で $20\ \mu\text{m}$ 程度であった (Fig. 3)。そして、架橋処理の方法による明確な影響は認められなかった。また、SEM観測の際に、真空下における粒子の破

裂が確認された (Fig. 3 A2)。これは、真空下におけるココナッツ油の蒸発に起因するとみられ、マイクロカプセルが生成している証拠の1つと言える。

粉碎前にはいずれのマイクロカプセルからも油

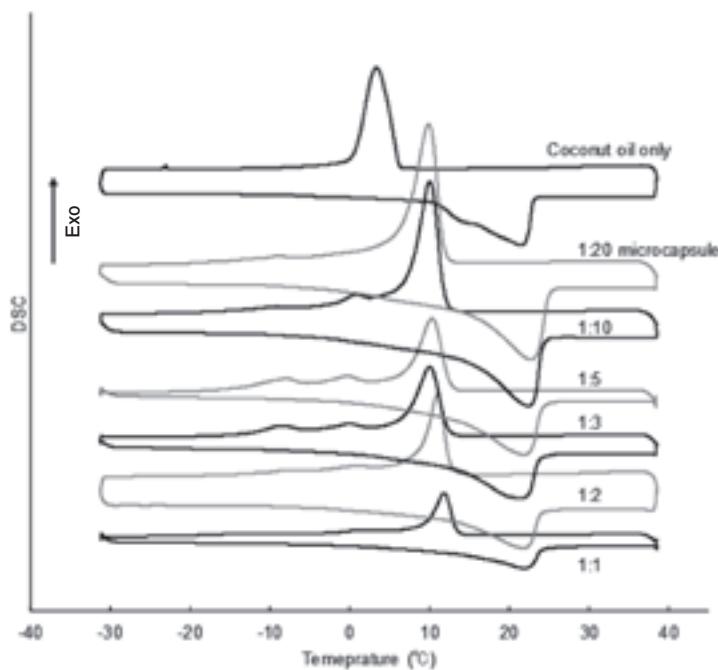


Fig. 4 DSC thermograms for various microcapsules with different coconut oil contents.

脂の漏出は確認できなかった。また、粉碎後においても、1:1, 1:2, 1:3, 1:5の各マイクロカプセルについては、油脂の漏出は認められなかった。この場合、マイクロカプセルの含油率は最大で67%であった。1:10および1:20マイクロカプセルには80%以上の油脂が含まれており、粉碎により、油脂の漏出が起こった。その結果、マイクロカプセルがべとつき、付着性の高い粉体となったことから、67%（1:5マイクロカプセル）が実用的な含油率と言える。そして、67～80%の間に粉碎により油脂の漏出を招かない、最大含油率が存在することになる。

3.3 マイクロカプセルのDSC分析

ココナッツ油を含むマイクロカプセルのDSC分析を実施した (Fig. 4)。対照として、ココナッツ油のみも分析したところ、3.3°C付近で凝固に伴う発熱ピークが観測され、凝固エンタルピーは102J/gであった。一方、1:1マイクロカプセル

では、11.9°Cまで凝固ピーク温度が上昇した。含油率が上昇するに従い凝固ピーク温度は低下し、1:20マイクロカプセルでは、10.2°Cで凝固ピークが観測された。このことから、包括剤であるゼラチンあるいはアラビアガムがココナッツ油の凝固における過冷却に影響を及ぼすことが示唆された。

3.4 蓄熱性能の評価

マイクロカプセルの蓄熱性能を評価するためには、空気中での疑似肉片 (control) およびココナッツ油を含まないコアセルベート (1:0マイクロカプセル) 中での疑似肉片の温度変化もあわせて測定した。Fig. 5に各マイクロカプセルの蓄熱性能を示す。空気中 (control) においても疑似肉片の有する熱容量の関係から、温度変化に遅れが出た。また、1:0マイクロカプセルを用いた場合の結果ではさらに、温度変化が小さくなつた。一般に、蓄熱材などの相変化材料は熱伝導率

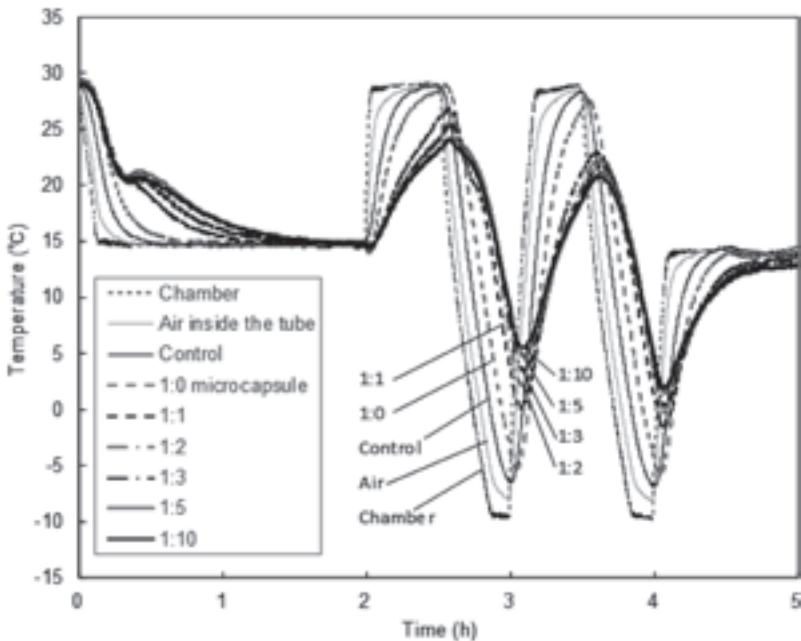


Fig. 5 Evaluation of the heat storage capacity of various microcapsules.

が小さい^{4, 9)}。これは、マイクロカプセルの熱伝導率が小さく、その断熱能が現れた結果であると考えられる。

ココナッツ油を含むマイクロカプセルを蓄熱評価に供したところ、測定開始後25分付近で、約21°Cでの油脂の凝固による発熱が観測された。これは、蓄熱能が発揮されたことを示唆している。一方、DSC分析より得られた結果(10°C付近)よりも大幅に高い温度での凝固開始が観測されたことにもなる。これは、蓄熱マイクロカプセルの断熱能が、ココナッツ油の凝固と複合して現れた結果であると思われる。

また、マイクロカプセル中の含油率が高いほど温度変化は遅くなり、温度の振れ幅も小さくなつた。1回目の加温、冷却ステップ(2~3.5 h)では、28~-8°Cの範囲でcontrolは変動した。一方、1:5および1:10マイクロカプセル中の温度振幅は小さく、23~5°Cの範囲に収まつた。2回目のステップ(3.5~5 h)では、

controlが28~-8°Cの範囲で変動したが、マイクロカプセル中では20~2°Cの範囲に収まつた。このことから、蓄熱マイクロカプセルは融解、凝固に伴う潜熱の出入りと、断熱能を兼ね備えることで、食肉の温度変化を小さくすることに寄与できると考えられる。一方、マイクロカプセル化に伴い、油脂の凝固点が上昇した。熟成肉の温度保持には、より融点の低い油脂を用いることが望ましく、今後の課題と言える。

4. 要 約

ココナッツ油およびゼラチン、アラビアガムを用いてコアセルベートを形成させ、それをトランスクルタミナーゼで架橋することにより、蓄熱マイクロカプセルを作製できた。このマイクロカプセルは相変化に伴う潜熱の出入りと断熱能を併せ持つておあり、含油率が高いほど蓄熱能は高く、温度変化を小さくできた。その結果、本研究で検討したマイクロカプセルの作製方法は、可食性蓄熱

マイクロカプセルの供給手段として有用なもので
あった。

文 献

- 1) Farid, M. M., Khudhair, A. M., Razack, S. A. K., Al-Hallaj, S. : A review on phase change energy storage : materials and applications, *Energy conversion and management*, 45 (9), 1597~615, 2004.
- 2) Zalba, B., Marín, J. M., Cabeza, L. F., Mehling, H. : Review on thermal energy storage with phase change : materials, heat transfer analysis and applications, *Applied thermal engineering*, 23 (3), 251~83, 2003.
- 3) Pielichowska, K., Pielichowski, K. : Phase change materials for thermal energy storage, *Progress in materials science*, 65, 67~123, 2014.
- 4) Zhang, H., Wang, X., Wu, D. : Silica encapsulation of n-octadecane via sol-gel process : a novel microencapsulated phase-change material with enhanced thermal conductivity and performance, *J Colloid Interface Sci*, 343 (1), 246~55, 2010.
- 5) Döğüşcü, D. K., Altıntaş, A., Sarı, A., Alkan, C. : Polystyrene Microcapsules with Palmitic-Capric Acid Eutectic Mixture as Building Thermal Energy Storage Materials, *Energy and Buildings*, 2017.
- 6) Chaiyasat, P., Noppalit, S., Okubo, M., Chaiyasat, A. : Innovative synthesis of high performance poly (methyl methacrylate) microcapsules with encapsulated heat storage material by microsuspension iodine transfer polymerization (ms ITP), *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 157, 996~1003, 2016.
- 7) Alkan, C., Sarı, A., Karaipekli, A., Uzun, O. : Preparation, characterization, and thermal properties of microencapsulated phase change material for thermal energy storage, *Solar Energy Materials and Solar Cells*, 93 (1), 143~7, 2009.
- 8) Xing, F., Cheng, G., Yang, B., Ma, L. : Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins, *J Appl Polym Sci*, 91 (4), 2669~75, 2004.
- 9) Li, M., Wu, Z., Kao, H., Tan, J. : Experimental investigation of preparation and thermal performances of paraffin/bentonite composite phase change material, *Energy conversion and management*, 52 (11), 3275~81, 2011.

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

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

根 岸 晴 夫

(中部大学応用生物学部)

Haruo Negishi

(College of Bioscience and Biotechnology, Chubu University)

We have studied about the application of lactic acid bacteria (LAB) for yogurt into fermented meat products, i.e. fermented pork jerky. The present study was conducted to elucidate the effect of co-cultivation with other LABs on fermentation rate of the selected *Lactobacillus* single strains. The selected 11 strains of *Lactobacillus* groups were evaluated during incubation for 12 h in MRS broth or for 5–6 h in 10% skim milk at 37°C. The stimulation of growth of *Lb. mucosae* (ME-470) or *Lactobacillus* (*Lb.*) *pentosus* (ME-480) was observed by the co-cultivation with other strains of *Lactobacillus* group in MRS broth. The fermentation rate of 11 single strains of *Lactobacillus* group was generally promoted by co-cultivation with *Streptococcus* (*St.*) *thermophilus*. Especially, the co-cultivation of *Lb. casei* (ME-462), *Lb. salivaricus* (ME-465), *Lb. zae* (ME-466) or *Lb. pentosus* (ME-480) with *St. thermophilus* were effective in enhancement of fermentation rate in 10% skim milk. These strains are good candidates for investigation in meat to utilize as starter for the fermented pork jerky.

1. 目 的

乳酸菌の働きとして、有害菌の抑制作用のほか、整腸、アレルギー症状の緩和、および免疫賦活などの生体調節作用が報告されている¹⁾。近年、乳酸菌の利用は乳製品、野菜飲料、チョコレート、医薬品などのほか、歯磨きなど非食品分野へも拡大している。一方、食肉製品の分野では発酵ソーセージに限定され、新たな食肉加工品への利用はみられない。一般に発酵ソーセージに利用される乳酸菌スターとして、*Lactobacillus* (*Lb.*)

sakei, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum*, *Pediococcus* (*Ped.*) *acidilactici*, *Lb. brevis*, *Lb. alimentarius*, *Lb. casei*, *Lactococcus lactis*, *Ped.* *Pentosaceus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*などのホモ発酵型乳酸菌、および*Staphylococcus* (*Staph.*) *carnosus*, *Staph.* *xylosus*, *Staph.* *saprophyticus*, *Staph.* *equorum*などのグラム陽性およびカタラーゼ陽性球菌である²⁾。発酵ソーセージでは、乳業界で汎用される乳酸菌の利用は少なく、プロバイオティクス機能への研究は進展していない。

本研究では、食肉加工への乳酸菌の利用技術を

開発するために、典型的なヨーグルト用乳酸菌である*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*と*Streptococcus (St.) thermophilus*を利用した食肉の発酵技術について研究を進めている^{3~5)}。平成27年度の本助成研究では、再構成肉発酵ポークジャーキーの加工技術の開発とその特徴について報告した。平成28年度⁷⁾は再構成発酵ジャーキーの品質に及ぼす乳酸菌の作用として、高齢者にとっても食べやすいテクスチャーとするために、タンパク質分解活性の高い乳酸菌の検討、および発酵ジャーキーの栄養成分の特徴を明らかにした⁶⁾。今年度は、昨年度の検討でタンパク質分解活性が比較的高い*Lactobacillus*属乳酸菌11種を選択し、食肉における発酵性や菌数を向上させることを目的として、発酵速度に及ぼす共培養効果について検討を行った。

2. 方 法

2.1 乳酸菌

Table 1 の11種類の*Lactobacillus*属乳酸菌について検討した。これらの乳酸菌株は前報同様の方法に従って処理をして使用した。すなわち、*Lactobacilli* MRS broth (Difco Laboratories Inc.) で嫌気的に賦活培養 (37°C, 18時間) 後に菌体を回収し、10%脱脂乳培地に懸濁し、使用時まで

みやかに -80°C に冷凍保管した。

*St. thermophilus*は、前報で示したように、再構成肉発酵ジャーキーに使用した乳酸菌スターの*Lb. bulgaricus/St. thermophilus*混合乳酸菌末 (DVS YC-380; Christian Hansen) から分離して上記手順で凍結保存した。

凍結菌株の賦活は次の手順で行った。凍結乳酸菌株を解凍し、その1白金耳を15ml ppチューブのMRS液体培地に接種した。37°Cのインキュベーターに18時間培養した後、培養したMRS brothの菌体を懸濁してから、その1白金耳を5 ml MRS 培地に接種し、37°Cのインキュベーターで18時間培養して賦活した。

2.2 乳酸菌の培養試験

上記2.1で調製した乳酸菌含有MRS brothを未使用のMRS brothまたは10%脱脂乳培地に10%の割合で添加して培養した。MRS brothの場合は37°C, 12時間培養し、2時間ごとに培養中のMRS brothの濁度を600nmで測定した。10%脱脂乳培地の場合は37°C, 5—6時間培養し、培養開始2時間後、その後は1時間ごとに培養中の脱脂乳のpHと酸度を滴定法で測定して滴定酸度として算出した。

2.3 乳酸菌の生育速度と発酵速度の評価

MRS brothまたは10%脱脂乳で培養中の乳酸菌

Table 1 11 different species of *Lactobacillus* groups used for the experiment

Species	Strains	Species	Strains
<i>Lactobacillus</i> groups			
<i>Lb. gasseri</i>	ME-459	<i>Lb. fermentum</i>	ME-467
<i>Lb. casei</i>	ME-462	<i>Lb. helveticus</i>	ME-468
<i>Lb. plantarum</i>	ME-463	<i>Lb. mucosae</i>	ME-470
<i>Lb. rhamnosus</i>	ME-464	<i>Lb. parabuchneri</i>	ME-478
<i>Lb. salivarius</i>	ME-465	<i>Lb. pentosus</i>	ME-480
<i>Lb. zaeae</i>	ME-466		
<i>Streptococcus</i> groups			
<i>St. Thermophilus</i>	ST		

の生育速度と発酵速度は、pHと酸度の経時的変化によって評価した。

(1) pH測定

pHメーター (SevenEasy : Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland) で培養液に直接電極を挿入して測定した。

(2) 酸度測定

100mlビーカーに試料9g, 蒸留水9mlを採取し、フェノールフタレン溶液を指示薬として加え、0.1N NaOH溶液で滴定を行った。滴定の終点は試料の微紅色が30秒ほど保たれる点を限度とし、酸度は滴定量から次式により算出した。滴定終了時のpHは8.4程度である。

$$\text{酸度} = \frac{\text{試料の滴定量 (ml)} \times 0.009 \times 100}{\text{試料量 (g)}}$$

2.4 乳酸菌数の測定

乳酸菌数の測定は、BCP加プレートカウントアガール（日本製薬、東京）を使用し、35—37°C, 72±3時間培養して、形成した黄変集落を乳酸菌数として計測した。

3. 結果と考察

3.1 Lactobacillus属乳酸菌8種間の共培養効果
昨年度に検討した26種類の*Lactobacillus*属の中から、10%脱脂乳培地および10%豚ひき肉/0.5%グルコース/0.5%酵母エキス懸濁液中において生育性が良好であった8種類の乳酸菌株ME-462, 463, 464, 465, 466, 470, 478, 480について、それぞれ2種類を共存させたときの生育性に及ぼす効果を調べた。MRS broth培養中の菌数変化は600nmでの濁度測定により行った。

その結果、*Lb. mucosae* (ME-470) (Fig. 1 (a)) と *Lb. pentosus* (ME-480) (Fig. 1 (b)) は他の7種類の*Lactobacillus*属乳酸菌と共存させることにより生育性の向上効果が認められ、その効果の程度はME-480で大きかった。一方、残り6種類

の*Lactobacillus*属乳酸菌株には共培養による生育性の向上効果はみられなかった（図省略）。

3.2 *Lactobacillus*属乳酸菌11種類と*St. thermophilus*との共培養効果

Lb. delbrueckii subsp. *bulgaricus* と *St. thermophilus*との共生効果はよく知られており、*Lb. bulgaricus*が产生するペプチド、アミノ酸を*St. thermophilus*が利用して代謝が促進され、一方、活発になった*St. thermophilus*から生成されるギ酸、二酸化炭素が*Lb. bulgaricus*に供与される関係にあり、それぞれの単株による培養よりも発酵速度は大きく高まる。この二つの菌の共生関係は典型的なヨーグルトの製造に利用されている。そこで*Lactobacillus*属乳酸菌11種類と*St. thermophilus*との共培養効果について検討を行った。Table 1 で示したように、前述3.1で使用した8種類の乳酸菌に*Lactobacillus*属3菌種 (ME-459, 467, 468) を追加して培養試験を行った。発酵速度の評価は酸度の測定によって行った。

その結果、Fig. 2 (e)-(m) に示したように、いずれの*Lactobacillus*属乳酸菌も*St. thermophilus*との共生効果がみられた。特に共培養効果が顕著であった*Lactobacillus*属乳酸菌としては、*Lb. casei* (ME462), *Lb. salivaricus* (ME465), *Lb. zae* (ME466)、および*Lb. pentosus* (ME480) であった。この4菌種は単株で使用するよりも*St. thermophilus*と共生させた方が、効率よく酸度が上昇し発酵速度が速くなることが明らかになった。これら*Lactobacillus*属乳酸菌と*St. thermophilus*との共培養の機構については不明であるが、*Lb. bulgaricus*と*St. thermophilus*との共生関係と類似した機構が考えられる。

今後、豚肉の系における4菌種の*Lactobacillus*属乳酸菌の発酵性を検討し、発酵ポークジャーの乳酸菌スターの候補として開発を進めよう。

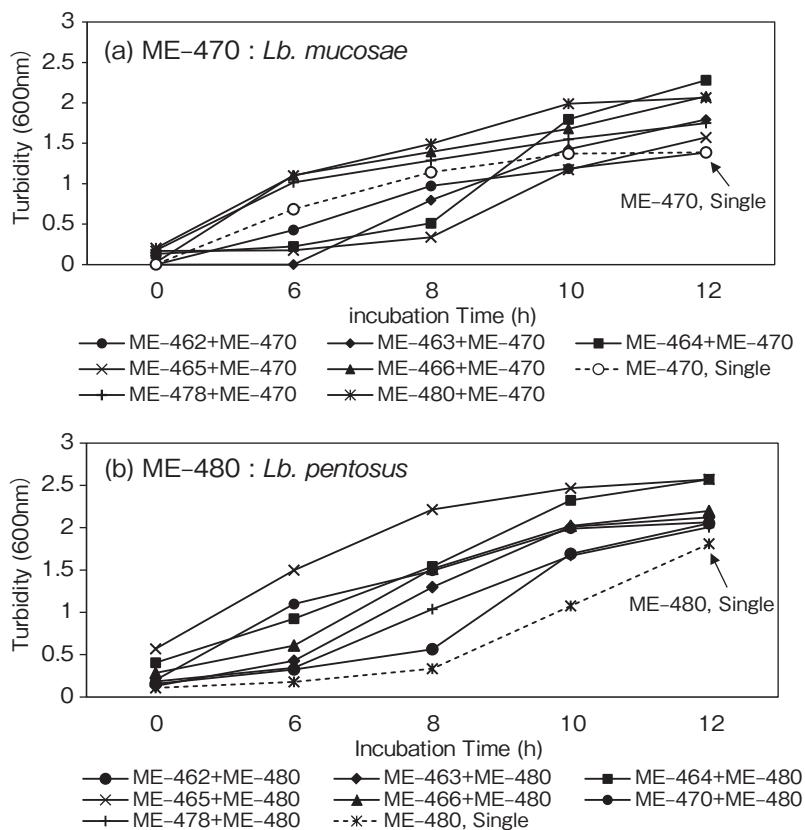


Fig. 1(a), (b) Effect of co-culture with *Lactobacillus* groups on the growth rate of *Lactobacillus* single strain

(a) *Lb. mucosae* (ME-470) single strain, (b) *Lb. pentosus* (ME-480) single strain

3.3 培養中の乳酸菌数の変化

共培養の効果が大きかった*Lb. casei* (ME462)

と効果が小さかった*Lb. helveticus* (ME-468)について、*St. thermophilus*と共に培養させた際の脱脂乳培地内の乳酸菌数の変化と酸度の変化について測定した (Fig. 3 (n), (o))。培養を始めてから酸度は経時に上昇して行くが、いずれの菌についても菌数レベルには大きな変化は認められず、酸度が0.7%に達した時期に菌数が約10倍に増えた。以上より、酸度の上昇は菌数の増殖と必ずしもパラレルの関係にはないが、乳酸菌による乳酸発酵の代謝は進行していることが示唆された。

4. 要 約

本研究では、食肉加工への乳酸菌の利用技術を開発するために、典型的なヨーグルト用乳酸菌である*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*と*St. thermophilus*を利用した食肉の発酵技術について研究を進めている。食肉中での乳酸菌の発酵性や菌数を向上させることを目的として、発酵速度に及ぼす共培養効果について検討を行った。8種類の*Lactobacillus*属乳酸菌から2種類を組み合わせた共培養の場合、*Lb. mucosae* (ME-470) と*Lb. pentosus* (ME-480) は他の7種類の*Lactobacillus*属乳酸菌との組み合わせによって共生効果が観察された。11種類の*Lactobacillus*属乳酸菌と*St. thermophilus*と

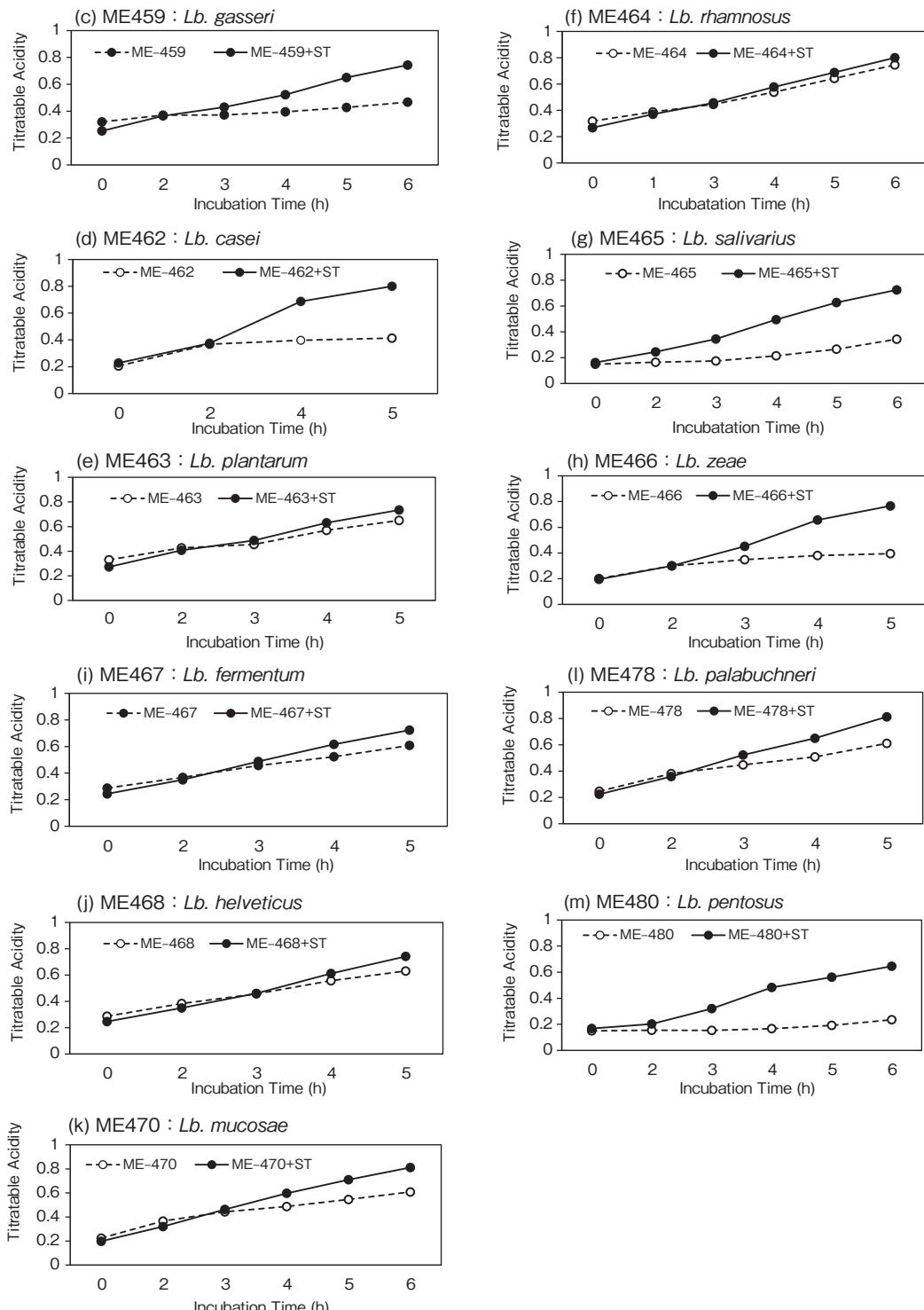


Fig. 2(c)–(m) Effect of co-cultivation with *St. thermophilus* (ST) on the fermentation rate of *Lactobacillus* single strains
 (c) *Lb. gasseri* ME-459, (d) *Lb. pentosus* ME-462, (e) *Lb. plantarum* ME-463, (f) *Lb. rhamnosus* ME-464, (g) *Lb. salivarius* ME-465, (h) *Lb. zeae* ME-466, (i) *Lb. fermentum* ME-467, (j) *Lb. helveticus* ME-468, (k) *Lb. mucosae* ME-470, (l) *Lb. palabuchneri* ME-478, (m) *Lb. pentosus* ME-480

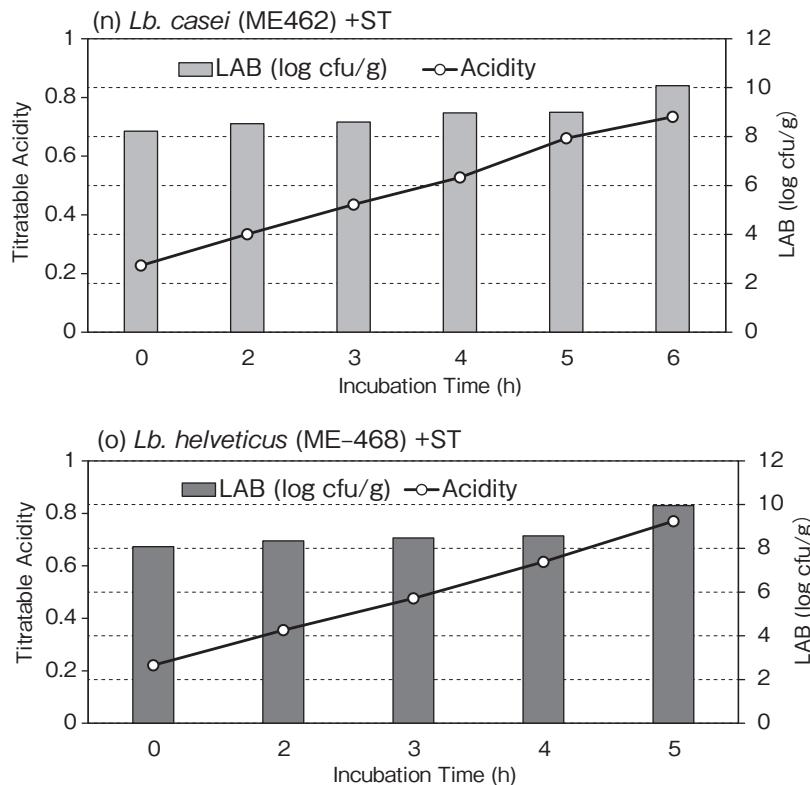


Fig. 3(n), (o) Changes in titratable acidity and LAB counts during co-cultivation of *Lactobacillus* single strains with *St. Thermophilus* (ST) in 10% skim milk.
 (n) *Lb. casei* (ME462) single strain, (o) *Lb. helveticus* (ME-468) single strain

の共培養では、すべての組み合わせで、さらに大きな共生効果が観察された。特に共生効果が大きい*Lactobacillus*属乳酸菌としては、*Lb. casei* (ME462), *Lb. salivarius* (ME465), *Lb. zaeae* (ME466), および*Lb. pentosus* (ME480) であった。現在、この4菌種と*St. thermophilus*との組み合わせについて、発酵ポークジャーキーの乳酸菌スターとして検討中である。

文 献

- 1) 飯野久和, 信田幸大: 乳酸菌とビフィズス菌のサイエンス, 第1版, 京都大学学術出版会, 京都, 495 ~551, 2010.
- 2) Feiner, G., Starter cultures. In "Meat products handbook" (Woodhead Publishing Limited, Cambridge), pp.327~331, 2006.
- 3) 大橋勝太郎, 根岸晴夫: 日本畜産学会報, 82, 53 ~60, 2011.
- 4) 大橋勝太郎, 根岸晴夫: 日本食品科学工学会誌, 59, 447~455, 2012.
- 5) Ohashi, K., Negishi, H.: *Food Science and Technology Research*, 20, 679~685, 2014.
- 6) 根岸晴夫: 平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 34, 23~28, 2016.
- 7) 根岸晴夫: 平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 35, 46~51, 2017.

オリーブ葉抽出液が食肉タンパク質の加熱ゲル物性 および嗜好性に及ぼす影響

Effects of olive leaf extracts on rheological properties and hedonic aspects of meat protein gel

小川 雅廣・Agus Bahar Rachman・赤澤 隆志
(香川大学農学部応用生物科学科)

Masahiro Ogawa, Agus Bahar Rachman and Takashi Akazawa
(Department of Applied Biological Science, Faculty of Agriculture, Kagawa University)

Olive leaf has been reported to contain a large amount of polyphenol which possesses high antioxidant activity. Olive leaf extract (OEx) was prepared from fresh olive leaves, and OEx was applied to chicken breast sausage. OEx contains 13.8% (w/w powder) polyphenol as gallic acid equivalent. Addition of 0.05 to 0.5% (w/w) OEx to minced meat increased the modulus of elasticity, coefficient of viscosity, and breaking stress strain of chicken sausage gel. Those increasing effects were dependent on OEx concentration. 0.5% OEx caused 100% increase in modulus of elasticity, 74% increase in coefficient of viscosity, 67% increase in breaking stress, and 33% increase in breaking strain. OEx also improved water-holding capacity of chicken sausage. Sensory evaluation analysis of OEx-containing sausages showed that sausage with 0.5% OEx is more preferred than control sausage without OEx in terms of flavor, texture and overall impression. Furthermore, OEx was effective to prevent textural deterioration occurring during frozen storage, showing that sausage with OEx exerts high freeze tolerance. The improvement in rheological property of sausage gel was due to interaction between polyphenol derivatives, such as decarboxymethylated form of 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenoic acid dialdehyde (3,4-DHPEA-EDA), named oleacein, and muscle proteins, such as myosin. Decarboxymethylated form of 3,4-DHPEA-EDA have carbonyl groups in the molecule, and those groups may interact with ϵ -amino groups and SH groups of muscle protein; resulting in the enhancement of protein interaction. The above results suggest that OEx can be a potential ingredient to improve the texture of chicken sausage and to prevent textural deterioration of sausage induced by frozen-storage.

1. 目 的

オリーブ（学名：*Olea europaea L.*）はモクセイ科の常緑樹である。我が国におけるオリーブの栽培は香川県を中心西日本各地で行われてい

る。オリーブの産業利用は、果実を圧搾して得られるオリーブオイルや塩漬けしたピクルスが中心である。一方、オリーブの葉っぱの利用は、オリーブ茶や養殖魚（ハマチ）の餌として利用されているものの、果実に比べると利用用途は少ない。オ

リーブの果実と葉っぱの成分を比較すると、果実にはオイルが多量に含まれているのに対し、葉っぱにはポリフェノールが多く含まれている。大山らの報告¹⁾によればオリーブ葉には7.3~8.2% (w/w) のポリフェノールが含まれる。

近年、タンパク質ゲルの物性改良剤として天然物由来のフェノール性化合物の利用が注目されている。具体的には、クロロゲン酸、カテキン、ケルセチンなど植物に含まれるポリフェノールがあげられる。ゼラチン、牛乳、大豆、卵白などの食品タンパク質に対して、クロロゲン酸などのポリフェノールをアルカリ、過酸化水素、酸化酵素を使ってキノン体に変換させてから添加することで、タンパク質分子とタンパク質分子を架橋させタンパク質のもつ乳化安定性、泡沢安定性、ゲル形成性を改善することが報告されている²⁾。ゲル形成性に関しては、没食子酸にポリフェノール酸化酵素（ラッカーゼ）を作用させて作った没食子酸のキノン体をゼラチンゲルに添加するとゲル強度が高くなるとの報告がある³⁾。また、茶葉から作られる緑茶、ウーロン茶、紅茶の抽出物を卵白に加えて加熱した卵白ゲルは無添加のものよりも硬くなることが報告されている⁴⁾。茶葉のなかにはカテキンなどのポリフェノールやその誘導体が多く存在することから、ポリフェノール関連物質がゲルの物性改変に寄与しているものと考えられる。オリーブの葉には、茶葉や他の植物葉には存在しないオリーブ独自のポリフェノールが多量に含まれている。代表的なものにオレウロペイン(Oleuropein)がある。本研究では、oleuropeinなどオリーブ特有のポリフェノールを多量に含むオリーブ葉抽出物（以後、OExと呼ぶ）を物性改良剤として鶏肉ソーセージに添加したときに、ソーセージのゲル物性および嗜好性にいかなる変化が現れるのか調べることを目的とした。

2. 方 法

2.1 オリーブ葉抽出物の調製とポリフェノールの分析法

オリーブ葉を25~40℃の温度で2日間乾燥し、その後粉碎し、オリーブ葉乾燥粉末に対して10倍量 (w/w) の純水を加え、4℃で1時間抽出を行った。この抽出液を遠心分離にかけ、上清を凍結乾燥機にかけて粉末を得た。この粉末をオリーブ葉抽出物 (OEx) として本実験に使用した。OExのポリフェノール含量はFolin-Ciocalteu法で、またOleuropein含量はODSカラム(Shim-pack CLC-ODS)を使ったHPLC分析により調べた。また、OExに含まれる成分の同定は(株)島津製作所製のLC/MS(イオン化法はESI、カラムはshim-pack-CLC-ODS25 CM (M) 4.6×250mm、LC装置はLC-20AD、質量分析計はLCMS2020)で行った。

2.2 ソーセージの作製

鶏むね肉の挽き肉200gに対し、純水40mL、食塩3.6g、ポリリン酸1.0g、ショ糖5.0gを加えミキサーで混合後、0.05~0.5% (w/w) の4種類の濃度のOExを加え、再び混合した。その後、クレハロンPVDCケーシング(Φ17.5mm)につめて、70℃で30分間加熱した。加熱後のソーセージを以後の実験に供した。

2.3 ソーセージの物性測定

ソーセージの物性は、ソーセージを直径17.5mm、高さ10mmの円柱状に切ったものの破断強度測定とクリープ測定により評価した。破断強度測定はゲルに直径3mmの円柱状プランジャーを1.0mm/secの速度で挿入し応力歪み曲線を得た。その曲線から破断応力と破断歪み率を算出した。クリープ測定は、直径30mmの円盤型プランジャーを10mm/secの速度で加圧し2分間かけてクリープ曲線を得て、その曲線より弾性係

数、粘性係数を算出した。

2.4 ソーセージの水分含量、離水率、色調

ソーセージの水分含量は1 gのソーセージを105°Cで恒量に達するまで加熱することによって求めた。離水率は円柱状に切ったソーセージゲルをクリープ測定で使用したプランジャーで上から圧縮したときにゲルから漏れでた水分をろ紙に吸収させ、圧縮前後のゲルの重量を測定して求めた。ソーセージの色調はソーセージの内部をカッターで切断した切り口の色を色差計（カラーライザー色差計TES-135A プラス、佐藤測定器社製）で測り L*, a*, b* 値を求めた。白色度は以下の式から求めた。

$$\text{Whiteness} = 100 - [(100 - L^*)^2 + a^{*2} + b^{*2}]^{0.5}$$

2.5 微細構造観察

ソーセージの微細構造観察用の試料は、まずソーセージをグルタルアルデヒドで固定後、四塩化オスミウムで固定し、エタノールで脱水した。その後凍結乾燥を行った。ソーセージの微細構造の観察は、日本電子（株）の卓上走査電子顕微鏡（JCM-6000）で形態観察（高真空モード、加速電圧：15kV、倍率：1000倍）した。

2.6 ソーセジタンパク質の変性温度

加熱前のソーセージ原料100mgを試料セルに、Al₂O₃100mgをリファレンスセルに加え、示差走査熱量計（Setaram Micro-DSC VII, Caluire, フランス）で、昇温速度1.2°C/minで20°Cから90°Cまで測定した。

2.7 官能検査

パネリスト15名（25～50歳、平均30歳、男女比率=7:8）に、OEx無添加ソーセージ、0.1% OEx添加ソーセージ、0.5% OEx添加ソーセージの3種類のソーセージを、赤色灯を照射した官能検査室で提供した。パネリストには、3種類のソーセージの味、食感、ジューシーさ、総合評価

の4項目を評価してもらった。

2.8 ソーセージの凍結融解

加熱調理したソーセージを-20°Cで1週間冷凍保存し、解凍後にソーセージの物性と色調（白色度）を調べた。この冷凍保存と解凍のサイクルを1サイクルとして、2サイクル、3サイクル、4サイクル行った各ソーセージについても物性と色調（白色度）を調べた。

2.9 天然アクトミオシン（NAM）の調製

鶏むね肉の挽肉から、水溶性タンパク質を除去後、0.6M NaCl-20mM リン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）で抽出を行い、抽出物に10倍量の純水を加えて沈殿させたものを天然アクトミオシン（NAM）試料とした。

2.10 NAMの表面疎水性測定

3.5mg/ml NAM溶液に0.05～0.5%（w/v）OExを添加後、NAMとOExの混合溶液の表面疎水性を、プローブとして1-anilinonaphthalene-8-sulphonic acid (ANS) を使ってBenjakulらの方法⁵⁾に従って測定した。

2.11 NAMの電気泳動

2.10と同様の方法でNAM溶液とOExを混合後、70°C 30分間加熱した。このNAM溶液に、0.48M NaCl、6.4M urea、1 % SDSを加えて凝集したタンパク質を溶解させた。その後、SDS-PAGEを行った。

2.12 天然アクトミオシンのアミノ基およびチオール基の定量

2.10と同様の方法でNAM溶液とOExを混合後、2.11と同様の方法で加熱、溶解を行った。溶解後のNAM試料の一級アミノ基量はオルトフタルアルdehyd法、チオール基量はEllman法で測定した。

2.13 NAMと相互作用するOEx中の成分の特定

5 mg/ml NAM溶液に0.11%（w/v）OExを添加後、70°C 30分間加熱した。NAMとOExの混合液に、トリクロロ酢酸を加えタンパク質を沈殿さ

せた。上清すなわちタンパク質と結合しないOEx画分の成分を、ODSカラム（Shim-pack CLC-ODS）を使ったHPLCにより分析（Abs_{280nm}）し、NAMを混合しなかったOExのHPLC分析結果と比較した。

3. 結果と考察

3.1 OEx添加ソーセージの物性と官能評価

本研究で使用したOExには1 g のOEx粉末当たり没食子酸（GAE）換算で138mgのポリフェノールが含まれていたことから、OExのポリフェノール含量は13.8%（w/w）になる。このOEx粉末を0.05～0.5%添加した鶏むね肉ソーセージを作製した。Table 1に、ソーセージの白色度、水分含量、離水率、弾性係数、粘性係数、破断応力、破断歪み率を示す。白色度はOExを添加すると濃度依存的に低下した。0.5%OExの添加で5%低下した。この白色度の低下は褐色を呈しているOExが加わったことにより生じたものと思われる。水分含量はOExの添加によって増加する傾向を示した。0.5%OExの添加で水分含量が3%増加した。離水率は水分含量の結果とは逆に、OExの添加によって減少した。0.5%OExの添加で13%減少した。このことよりOExを添加することによってソーセージの保水性が高まることが分

かった。弾性係数、粘性係数、破断応力、破断歪み率はいずれもOExの添加濃度を増やすにつれて増加した。弾性係数は0.5%OExの添加で無添加のものの2.0倍になった。粘性係数、破断応力、破断歪み率はそれぞれ74%，67%，33%増加した。水分含量もOExの添加によって若干ではあるが高くなった。通常であればゲルの水分含量が高くなると、ソーセージゲルは柔らかくなるのが一般的である。本研究でOExを添加した場合には水分含量は高くなつたがゲルは柔らかくならなかつた。よって、OExにはソーセージの弾力性を向上させ、粘性も高める作用があると言える。また、破断歪み率も高まつたことから、OEx添加により壊れにくいゲルを作ることができると分かった。また、OExの添加により離水率が低下していたことから、ゲルの保水性も向上することが分かった。

OEx添加ソーセージの微細構造をFig. 1に示す。対照区のOEx無添加ソーセージと0.05%添加ソーセージではそれほど違いは観察されなかつたが、0.1%以上のOEx添加ソーセージでは違いがみられた。特に顕著な違いがみられた0.3%OExと0.5%OEx添加ソーセージでは無添加のものと比べてゲル組織が密になつていることが分かつた。このような物性や微細構造の違いにOExがどのように関わっているのかを知るために、DSCを

Table 1 Water content, expressible moisture, and rheological properties of sausage containing OEx

OEx (%) added	Whiteness (%)	Water content (%)	Expressible moisture (%)	Creep test		Breaking test	
				Modulus of elasticity E_0 (10^4 N/m ²)	Coefficient of viscosity η_N (10^7 Pa·s)	Breaking stress (10^5 N/m ²)	Breaking strain (%)
0.0 (Control)	80.28	68.12±0.29 ^a	12.31±0.50 ^a	2.91±0.16 ^a	1.61±0.12 ^a	3.80±0.21 ^a	43.96±0.81 ^a
0.05	79.86	68.11±0.05 ^a	11.74±0.04 ^b	2.96±0.13 ^b	1.90±0.15 ^b	4.09±0.35 ^b	47.97±0.75 ^b
0.10	78.24	68.51±0.18 ^b	11.20±0.01 ^c	3.53±0.13 ^c	1.98±0.14 ^c	5.39±0.35 ^c	57.74±1.67 ^c
0.30	76.42	69.69±0.18 ^c	10.80±0.21 ^d	4.56±0.13 ^d	2.79±0.09 ^d	5.81±0.75 ^d	57.79±1.01 ^d
0.50	75.29	70.36±0.08 ^d	10.69±0.12 ^e	5.86±0.11 ^e	2.80±0.14 ^e	6.37±0.30 ^e	58.39±0.03 ^e

Data are presented as mean±SD (n=6) and different superscript letters (a-e) indicate significant difference ($P<0.05$).

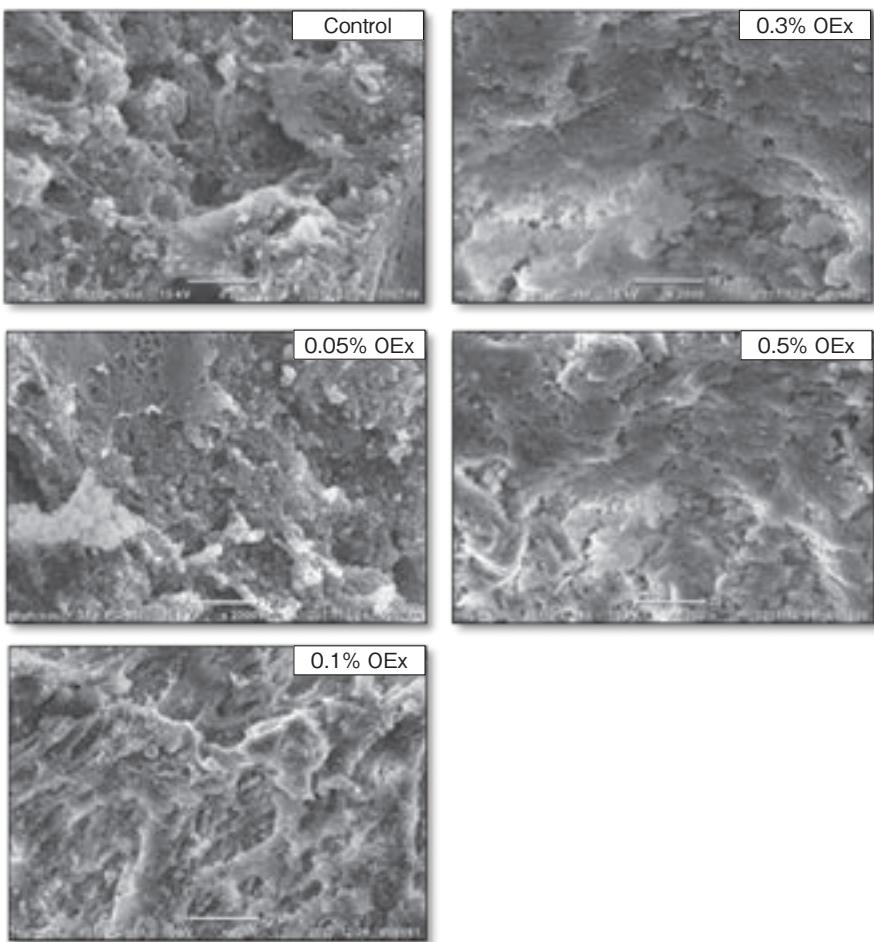


Fig. 1 Microstructure of OEx-containing sausage observed by scanning electron microscopy
The magnification of images was 1000 times.

使って調べた。0.1%OExを含むタンパク質の変性温度は無添加のタンパク質と変わらないが、0.3%，0.5%OExを添加したタンパク質では、53℃付近のピークすなわちミオシンの変性温度が2℃ほど高くなっていた。この変性温度の上昇にはOExのなかの何らかの成分とミオシンとの相互作用が関係していると考えられる。

OEx無添加のソーセージ、0.1%OEx添加ソーセージ、0.5%OEx添加ソーセージの3種類のソーセージの官能検査を実施した。0.1%OExを添加したソーセージは、フレーバー、ジューシーさ、食感（硬さ）が無添加のものよりも好スコアで

あったが、総合評価は若干低かった（Table 2）。一方、0.5%OExを添加したソーセージは、ジューシーさは無添加のものよりも低い傾向がみられたものの、フレーバー、食感の評価が高く、総合評価もよかったです。0.5%OExと無添加のソーセージとで特に大きな差は0.6ポイントの差がみられた食感であったことから、食感の評価が上がって総合評価がよくなったものと考えられる。

3.2 OEx添加ソーセージの冷凍保存性

OExを添加した鶏むね肉ソーセージの長期の冷凍保存性を予測するために、-20℃での凍結融解のサイクルを繰り返して、色調と物性を調べ

Table 2 Sensory evaluation of chicken breast sausage containing OEx

OEx (%) added	Flavour	Juiciness	Texture	Overall impression
Control	3.33 ± 1.11 ^a	3.53 ± 1.12 ^b	3.40 ± 1.24 ^a	4.06 ± 1.03 ^b
0.1%	3.60 ± 0.98 ^b	3.60 ± 0.91 ^c	3.60 ± 0.91 ^b	3.86 ± 0.83 ^a
0.5%	3.86 ± 0.99 ^c	3.46 ± 1.12 ^a	4.00 ± 0.92 ^c	4.20 ± 0.96 ^c

Flavour was asked using a five-scale (1 to 5) with 1 "very-odd" and 5 "very-typical" ; juiciness, with 1 "not-juicy" and 5 "highly-juicy" ; texture, with 1 "very-soft" and 5 "very-firm" ; and overall impression, using a Likert five-scale (1 to 5) with 1 "non-acceptable" and 5 for "highly-acceptable". Data are presented as mean ± SD (n=15) and different superscript letters (a-c) indicate significant difference ($P<0.05$). Photos shown below shows the samples provided to panelists.



た。ソーセージの白色度はOExの添加の有無に関わらず、凍結融解を繰り返すごとに低下していく。また、減少率はいずれのOEx濃度を含むソーセージでもほぼ変わらなかった。凍結融解後のソーセージの破断強度も調べた。OEx無添加のソーセージは4サイクル（4週間で4回）の凍結融解を繰り返すことによって、破断応力が34%減少、破断歪み率が14%減少したのに対して、0.1%OExおよび0.5%OExを添加したソーセージでは、破断応力、破断歪み率の低下はほとんどみられなかった。このことより、OExを添加することで冷凍保存によって起こるソーセージの物性変化を抑制できることが分かった。

3.3 OExとタンパク質の相互作用

OExの添加によって鶏むね肉ソーセージの物性は著しく変化した。この物性の変化にはゲル形成に関わるタンパク質の物理化学的性質の変化が伴っていることが考えられる。そこで、まずOExを加えたNAMの表面疎水性を調べた。OExを加えるとNAMの表面疎水性は著しく向上した。

0.1%OExの添加で表面疎水性は2倍、0.5%OEx添加で約4.5倍に增加了。この表面疎水性の向上にはタンパク質分子間の相互作用も関与していることが考えられる。そこで、OEx存在下でのNAMのSDS-PAGEを行った。SS結合を還元しないままのNAMのSDS-PAGEでは、OEx無添加のNAMはミオシン重鎖（約200kDa）、アクチン（約40kDa）のバンドがみられたのに対し、OExを添加したNAMではミオシン重鎖のバンドがみられなかった（Fig. 2 の – Reducing agent）。また、いずれのNAMにも分離（下層）ゲルの最上部（泳動開始点）にバンドが認められた。泳動開始点のバンドは分子量が400kDa以上の高分子量であることを意味しており、通常はミオシン重鎖の重合体がそこに現れる。この泳動開始点のバンドは、OEx添加NAMの方が無添加のNAMよりも太いことから、OExの添加はミオシン重鎖の重合を促進することが示唆された。

一方、SS結合を還元したNAMでは、非還元のNAMのSDS-PAGEとタンパク質バンドに違いが

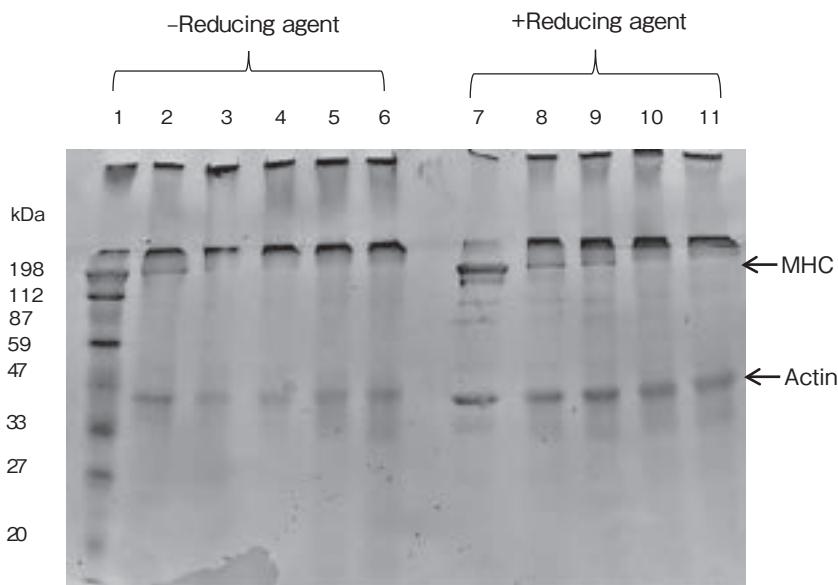


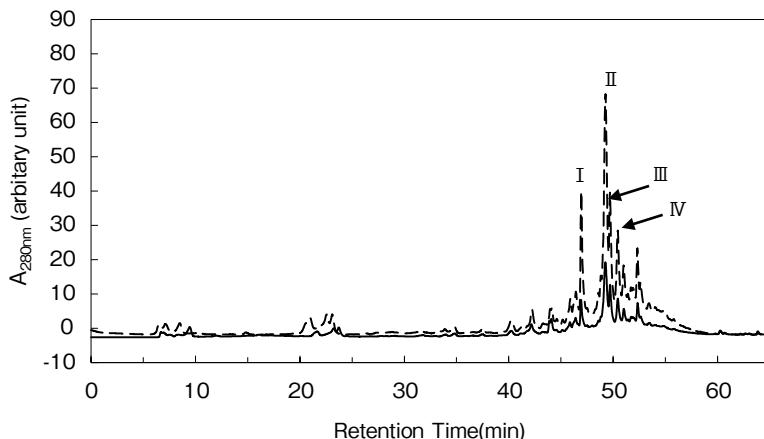
Fig. 2 SDS-PAGE patterns of OEx-containing NAM that was heated at 70°C
Lane 1, molecular weight marker ; lanes 2 and 7, control ; lanes 3 and 8, 0.05 % OEx ; lanes 4 and 9, 0.1 % OEx ; lanes 5 and 10, 0.3% OEx ; lanes 6 and 11, 0.5% OEx. Samples after reduction using β -mercaptoethanol were loaded in lanes 7–11. MHC is myosin heavy chain.

みられた (Fig. 2 の + Reducing agent)。OEx無添加NAMでは、ミオシン重鎖に相当する太いバンドは認められたが、泳動開始点にはほとんどバンドがみられなかった。このことは、非還元NAMにみられた泳動開始点のバンド、すなわちミオシン重鎖の重合体の正体はすべてSS結合を介した架橋であることを示す。一方、OEx添加NAMでは、ミオシン重鎖に相当するバンドのほかに、泳動開始点にも太いバンドが観察された。以上の結果より、OEx添加により形成されたミオシン重鎖の重合体は、一部がSS結合を介した架橋であるが、大部分はSS結合以外の架橋によるものであることを意味している。よって、OExによって引き起こされるタンパク質の相互作用はSS結合以外の架橋結合によると分かった。OExを添加したNAMのSH基と一級アミノ基量を調べたところ、両官能基の含量はOEx無添加のものよ

りも低かった。しかも両官能基の減少量はOExの濃度を増やすほど大きくなり、0.5%OExの添加でSH基は94%，アミノ基は82%減少した。このようにOExによってSH基と一級アミノ基が顕著に減少していたことより、ミオシン重鎖のシテイン残基の側鎖のSH基およびリジン残基の側鎖のアミノ基が架橋に関わっていることが示唆された。

3.4 タンパク質の架橋に関わるOEx成分の特定

OExの添加によって食肉のゲル化因子ミオシン分子（重鎖）と別のミオシン分子（重鎖）が架橋を形成し、重合していることが分かった。そこで、OExに含まれるどの成分がミオシンの重合に関与しているのかを調べた。Fig. 3にNAMを混合する前のOExのHPLCクロマトグラムと、NAMを混合後にNAMタンパク質を除去したOEx画分のHPLCクロマトグラムを示す。NAM



Peak	m/z (negative-ion mode)	Phenolic compound
I	377	Carboxymethylated form of 3,4-DHPEA-EDA
I	403	Oleoside methylester/Elenolic acid glucoside
I	555	Hydroxyoleuropein
II	319	Decarboxymethylated form of 3,4-DHPEA-EDA
III	539	Oleuropein
IV	539	Oleuropein isomer/Oleurosides

Fig. 3 HPLC chromatogram of OEx treated with NAM

Dotted line represents chromatogram of OEx without NAM and solid line, chromatogram of OEx with NAM.

との混合前のOExのクロマトグラム (Fig. 3 の点線)において、最も大きなピークは、49.27minのピークIIであった。このピークの成分は質量分析 m/z 319であったことから、Decarboxymethylated form of 3,4-dihydroxyphenylethanol-elenoic acid dialdehyde (3,4-DHPEA-EDA) (別名: Oleacein)と推定された。二番目に大きかったのは49.69minのピークIIIで、 m/z 539であったことから、Oleuropeinと推定された。三番目に大きかったのは、46.95minのピークIで、 m/z 555, 403, 377をもつ三つの分子イオンピークが認められたことより、Hydroxyoleuropein, Oleoside methylester/Elenolic acid glucoside, Carboxymethylated form of 3,4-DHPEA-EDAの混合物が含まれていると予想される。四番目に大きかった50.44minのピークIVは、 m/z 539であったことからOleuropeinの異性体であると推定される。一方、NAMを混合

後にタンパク質を除去したOEx画分のクロマトグラム (Fig. 3 の実線)をみると、全体的なピークパターンは、NAMと混合前のOExの溶出パターンと類似しているが、全体的にピークの高さと面積は小さかった。最も面積の減少が大きかったのはピークIIであったことより、ミオシンなどNAMタンパク質と最も多く結合するのはピークIIの成分Decarboxymethyl form of 3,4-DHPEA-EDAであると言える。この化合物は脱カルボキシメチル型のオレウロペインアグリコンで、分子内に3つのケトン基をもつ。これらのケトン基がミオシンのリジン残基のεアミノ基やシステイン残基のSH基と反応して、ミオシン重鎖間での重合を引き起こし、その結果、硬くて粘度の高い密なネットワーク構造もったソーセージゲルが形成されたと推察される。

4. 要 約

本研究では、オリーブ葉の水抽出物OExを加えたソーセージの性質を物理化学的手法および官能検査により評価した。OExを添加することにより、白色度は低下したが、水分含量は若干上昇した。物性については、OExを添加することでソーセージは硬くなり、保水性も向上した。官能検査の結果も0.5%OExを添加することで、食感（硬さ）の評価が向上し、その結果として総合評価も向上した。ソーセージを冷凍保存したとの物性を調べたところ、OEx添加ソーセージは無添加のものよりも冷凍保存しても変質しにくいことが明らかとなった。以上のことよりOExの添加は多少の着色をもたらすものの、ソーセージなど食肉ゲル状食品の物性改良剤として有用であり、冷凍ソーセージの品質保持にも役立つことが明らかとなった。

文 献

- 1) 大山憲一, 柴崎博行, 大西茂彦, 柴田英明, 小川雅廣: 香川県産飼料用オリーブ葉のポリフェノール含量に及ぼす保存方法の影響, 日本食品科学工学会誌, **63**, 570~574, 2016.
- 2) Liu, F., Ma, C., Gao, Y., McClements, D.J.: Food-Grade Covalent Complexes and Their Application as Nutraceutical Delivery Systems : A Review, *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, **16**, 76~95, 2017.
- 3) Yan, M., Li, B., Zhao, X., Yi, J.: Physicochemical properties of gelatin gels from walleye pollock (*Theragra chalcogramma*) skin cross-linked by gallic acid and rutin, *Food Hydrocolloids*, **25**, 907~914, 2011.
- 4) Hatanaka, Y., Yamaguchi, A., Kobayashi, O., Muro, T.: Electron Microscopic Analysis of the Effects of Tea Extract on Strength Improvement of Egg White Gels, *Food Science and Technology Research*, **15**, 5~10, 2009.
- 5) Benjakul, S., Seymour, T.A., Morrissey, M.T., An, H.: Physicochemical Changes in Pacific Whiting Muscle Proteins during Iced Storage, *Journal of Food Science*, **62**, 729~733, 1997.

食肉加工品のコク味増強を可能とするグルタチオン アナログの発酵生産法の開発

Development of a fermentative production method of glutathione analogs

伊藤智和

(名古屋大学大学院生命農学研究科)

Tomokazu Ito

(Department of Applied Molecular Biosciences, Graduate
School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

Recently, glutathione analogs are reported to act as *kokumi* substances, which capable of enhancing the intensities of salty, sweet and umami tastes, by binding to the calcium-sensing receptor. These analogs have the potential for use in the food industries as the food taste modifier and/or enhancer. An efficient method for the production of these analogs enable the industrial application of these compounds. In this study, we tried to develop an efficient production method of γ -glutamyl-valyl-glycine (γ -EVG), the most potent *kokumi* substance reported so far. This report shows that an engineered *Escherichia coli* cells that overexpresses mutated γ -glutamyl-cysteine synthase (*gshA*) and glutathione synthase (*gshB*) facilitated the efficient production of γ -EVG.

1. 目的

コク味とは、それ自体は呈味を示さないものの、甘味、塩味、酸味、苦味、うま味の基本5味の「味の持続性」「ひろがり」「厚み」を増強するものと定義される。近年の研究によって、コク味がカルシウム感知受容体 (CaSR) を介して認知されることが見出され、このアゴニストとして、グルタチオン (γ -Glutamyl-cysteinyl-glycine) や、その類縁体の γ -グルタミルペプチドが同定された¹⁾。さらにグルタチオンと比べ、数倍から10倍以上のCaSR活性化能を有する化合物として、 γ -Glutamyl-valyl-glycine (γ -EVG) や、 γ -Glutamyl-2-aminobutyryl-glycine (オフタルミ

ン酸、OA) が報告された。このようなコク味化合物は、食肉加工品を含めた食品の呈味向上に寄与するのみではなく、おいしさを維持したまま、食品中の塩分、脂肪分、糖質の制限を可能にし、また、製造現場においては、品質向上やコストダウンも可能とする。また、減塩やカロリーオフを介して、我々の健康増進、さらには食料問題にも貢献可能な有用な食品添加物質候補であると予想される。

これら化合物を産業用途で利用する際には、化合物の安価かつ安定的な供給が要求される。前述した γ -EVGやOAは、現在市販品が入手可能であるが、きわめて高価である。この要因として、市場規模の問題もあるうと思われるが、現状で化

学合成品のみが利用可能である点があげられる。我々は最近、ある種の*E. coli*欠損株が菌体内にOAを高濃度蓄積することを見出²⁾、同菌をプラットフォームに用いたOA生産法を開発してきた³⁾。本研究では、当該微生物を用いた、他のグルタチオンアナログ、特に γ -EVGの新規な発酵生産法を開発することを目的とし研究を行った。

2. 方 法

γ -EVGの生産には、グルタチオンを含めた γ -グルタミルペプチドの分解能を減弱させ、ValおよびATP生産量を増強させた*E. coli* Δ yggS Δ ggt Δ miaA三重欠損株（ Δ YGM）に、*E. coli*由来GshAの各種変異体およびGshBをpCA24Nベクターによって共発現させた株を用いた³⁾。 γ -EVGは過剰発現させた変異型GshAおよびGshBによってGlu、Val、Glyより菌体内で合成され、培地中へ排出される（Fig. 1）。各種*E. coli*株は、30 μg/mlのクロラムフェニコールを含むLB培地中で一晩培養し、PBSリン酸バッファーで洗浄した後に、1 mMのGlu、Val、Glyおよび0.1 mM IPTGを含むM 9 最少培地中に初期OD₆₀₀が1.0となるように植菌した。30°Cにて24時間振とう培養した後の培地中に生産された γ -EVG濃度をHPLCを用いて定量した。本研究では、GshA、GshB共発現ベクター上のGshAの、 γ -EVのVal側鎖収容に関与すると予想されたI 135とQ144、およびフィードバック阻害および酵素活性に関与すると予想されたS 495に各種変異を導入することで、 γ -EVG生産能の付与、およびその生産性の向上を図った。また、前培養条件等の検証により、GshAおよびGshBの発現量増大法について検証するとともに、M 9 培地中の金属イオンが γ -EVG生産性へ与える影響についても検証した。

3. 結果と考察

3.1 *E. coli*を用いたオフタルミン酸合成系の改良による γ -EVG生産性の付与

申請者らは先行研究によって、*E. coli* Δ yggS Δ ggt Δ miaA三重欠損株（ Δ YGM）にGshA（S495F）およびGshBを共発現させた株を用い、これを1 mMのGlu、2-aminobutyrate、Glyを含んだM 9 培地で培養することで、約0.3 mMのオフタルミン酸が生産法可能となることを報告している³⁾。そこで、オフタルミン酸生産と同様のストラテジーを用い、 γ -EVGの生産が可能か検証した。上記菌株を1 mMのGlu、Val、Glyを含むM 9 培地で培養したが、 γ -EVGの生産は認められなかった。Hibiら⁴⁾によって報告されたGshAの結晶構造の活性中心付近の構造を子細に検証すると、この活性中心には γ -EVのVal側鎖を収容できるだけの十分なスペースがないことが示唆された（Fig. 2）。そこで、活性中心空間の拡張を行った。

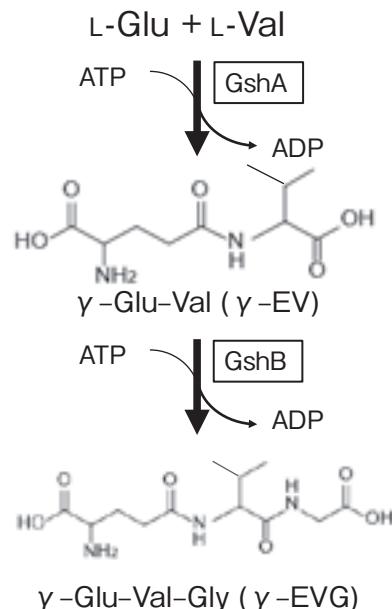


Fig. 1 Synthetic pathway of γ -EVG
The abbreviations are as follows : GshA, glutamate-cysteine ligase ; GshB, glutathione synthase

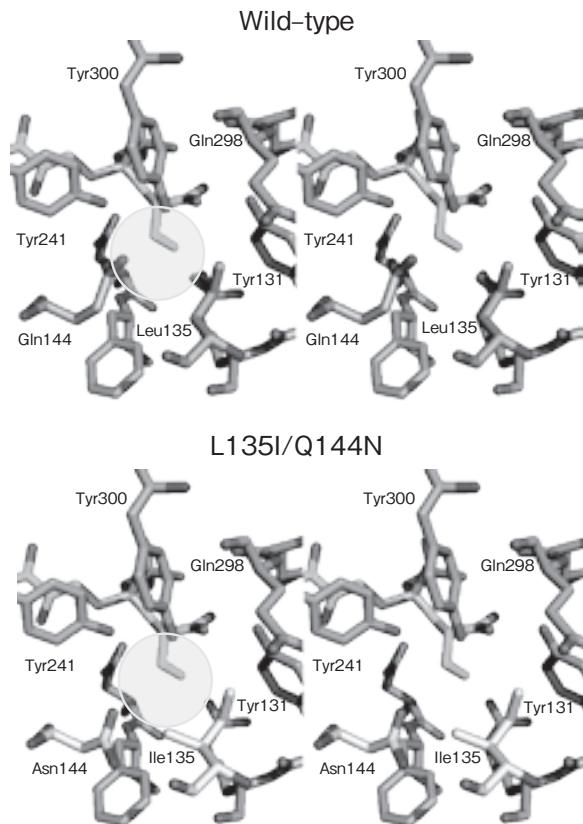


Fig. 2 Stereoview of the residues surrounding the Cys-analog moiety of sulfoximine-based inhibitor of wild-type GshA and the putative structure of L135I/Q144N mutant of GshA. The sulfoximine-based inhibitor was represented in green. Mutated residues were shown in gray. The putative space that accommodate the Val side chain of γ -EV is circled. The pictures were generated by using Pymol software (<http://www.pymol.org>) (PDB ID : 1VA6, see(4))

Table 1 Mutants of GshAs used in this study
The following mutations were introduced into the *gshA* gene of the GshA and GshB co-expression plasmid.

Strain No.	Mutations on GshA
1	S495F
2	L135I/Q144N/S495F
3	L135I/Q144N/S495I
4	L135V/Q144N/S495F
5	L135M/Q144N/S495F
6	L135S/Q144N/S495F
7	L135I/Q144D/S495F
8	L135I/Q144V/S495F
9	L135I/Q144I/S495F
10	L135S/Q144A/S495F
11	L135I/Q144S/S495F
12	L135I/Q144T/S495F

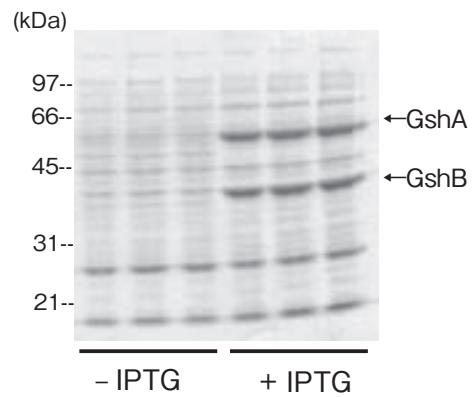


Fig. 3 Effect of cultivation condition on the expression levels of GshA and GshB. The *E. coli* Δ YGM strain harboring pCA24N-GshA (L135I/Q144N/S495F)-GshB were precultured in the LB medium containing Cm in the absence (-IPTG) or presence of 0.1 mM IPTG (+IPTG). IPTG in the preculture significantly induced the expression levels of GshA and GshB.

Table 2 Effect of GshA mutations and medium on γ -EVG productivity

E. coli $\Delta yggS\Delta ggt\Delta miaA$ that harbors mutated GshA and GshB co-expression plasmid were precultured in LB medium in the presence or absence of 0.1 mM IPTG.

The cells were washed with PBS and inoculated to the M9 medium containing 1 mM Glu, Val and Gly and 0.1 mM IPTG. The M9 (Mn^{2+}) indicates the replacement of $MgSO_4$ with $MnCl_2$.

Strain No.	Mutations on GshA	Medium of preculturing	Medium of culturing	γ -EVG productivity (μM)
1	S495F	LB	M9 + E/V/G	N. D.
2	L135I/Q144N/S495F	LB	M9 + E/V/G	10
2	L135I/Q144N/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	87
2	L135I/Q144N/S495F	LB + IPTG	M9 (Mn^{2+}) + E/V/G	240
3	L135I/Q144N/S495I	LB + IPTG	M9 + E/V/G	167
3	L135I/Q144N/S495I	LB + IPTG	M9 (Mn^{2+}) + E/V/G	222
4	L135V/Q144N/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	60
5	L135M/Q144N/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	35
6	L135S/Q144N/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	N.D.
7	L135I/Q144D/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	N.D.
8	L135I/Q144V/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	15
9	L135I/Q144I/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	N.D.
10	L135S/Q144A/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	154
10	L135S/Q144A/S495F	LB + IPTG	M9 (Mn^{2+}) + E/V/G	290
11	L135I/Q144S/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	78
12	L135I/Q144T/S495F	LB + IPTG	M9 + E/V/G	N.D.

目的とし、活性中心を構成する L135およびQ144に、L135IおよびQ144N変異を導入した (Table 1, Fig. 2)。L135I/Q144N/S495F変異を有するGshAおよびGshBの共発現プラスミドを有するΔYGM株は、1 mMのGlu, Val, Glyを含むM9培地で10 μM の γ -EVGを生産した (Strain no.2, Table 2)。L135およびQ144が γ -EVGの生産におけるホットスポットである可能性が示唆された。

しかしながら、この γ -EVGの生産量はほぼ同様のプロトコールによって行われたオフタルミン酸の生産量 (~300 μM , ³⁾) と比べ著しく低かった。この要因を検証したところ、本株において、GshAおよびGshBの発現量が低い可能性が示唆された (Fig. 3, γ -IPTGのレーン参照)。そこで、両酵素の発現量の向上を図る目的で培養条件を各種検証した。その結果、前培養時において、IPTGを0.1 mM添加することでGshAおよびGshBの発現量を顕著に増大可能であることを見出した (Fig. 3, + IPTGのレーン)。この前培養条件を用いることで、前述のL135I/Q144N/S495F変異

を有するGshAおよびGshBの発現株は1 mMのGlu, Val, Glyを含むM9培地で87 μM の γ -EVGの生産が可能となった (Strain no.2, Table 2)。

3.1 L135, Q144, S494の変異による γ -EVGの生産性の増強

前述したようにL135およびQ144が γ -EVGの生産におけるホットスポットである可能性が示唆された。また、先行研究においてS495はGshAのフィードバック阻害に関与し、S495F変異によってその脱感作が可能となることが示されている³⁾。そこで、GshA, GshB共発現プラスミド上のGshAのL135, Q144, S495に各種変異を導入した。なお、今回作成した変異株は前述のL135I/Q144N/S495F変異を含め12種類であり、その詳細はTable 1に記載した。各種変異を有するGshAおよびGshB発現ベクターをΔYGM株へ導入し、これを0.1 mM IPTGを含むLB培地で前培養し、1 mMのGlu, Val, Glyを含むM9培地における γ -EVGの生産量を検証した。その結果、L135I/Q144N/S495I変異を有するGshAおよびGshBを共

発現させた△YGMを用いることで(strain no.3), 167 μMのγ-EVGを、またL135I/Q144A/S495F変異を有するGshAおよびGshBを共発現させた△YGM (strain no.10) によって154 μMのγ-EVGの生産が可能となった (Table 2)。その他変異体を用いた際のγ-EVGの生産性は変わらないか、むしろ低下した (Table 2)。

3.2 培地中金属イオンの置換によるγ-EVG生産性の向上

GshAはMg²⁺またはMn²⁺の存在下でGluと各種のアミノ酸およびATPを基質としてγ-グルタミルジペプチドを生成するが、補因子となる金属イオンが基質特異性に影響する⁵⁾。Mg²⁺存在下ではγ-EV生成活性はV_{max}=59 mol/mg/h, K_m=27.1 mMであるのに対し、Mn²⁺存在下ではV_{max}=95 mol/mg/h, K_m=21 mMであると報告されている。V_{max}/K_mを活性の指標とすれば、Mn²⁺存在下におけるγ-EV生成活性はMg²⁺のそれと比較し約2倍である。今まで用いてきた培養条件(M 9 培地)にはMg²⁺は含まれていたが、Mn²⁺は含まれていなかった。すなわち、今までの検討条件下では、Mg²⁺依存的な触媒反応によるγ-EVの生産性を観察していた。そこで、M 9 最少培地中のMgSO₄をMnCl₂に置換し、その影響を検証した。前項においてγ-EVGの生産量が高かった、3株、すなわちL135I/Q144N/S495F変異、L135I/Q144N/S495I変異、L135I/Q144A/S495F変異を有するGshA発現株(strain no.2, 3, 10)を用いた。その結果、strain no.2, strain no.3, strain no.10を用いることによってそれぞれ、240 μM, 222 μM, 290 μMのγ-EVGの生産が可能となった (Table 2)。

4. 要 約

オフタルミン酸高生産株をプラットフォームとしたγ-EVG生産の可能性およびその生産性の増

強を検証した。GshAにおけるL 135およびQ 144がγ-EVGの生産におけるホットスポットである可能性を見出した。L 135, Q 144, S 495の各種変異型GshA、およびGshBの共発現株を作製し、このうち、L135I/Q144N/S495F変異、L135I/Q144N/S495I変異、L135I/Q144A/S495F変異を有するGshAを用いることで、γ-EVGの生産性が顕著に増大することを見出した。また、前培養条件、および本培養条件における、IPTG添加、およびMg²⁺⇒Mn²⁺への置換がそれぞれγ-EVGの生産性の向上にきわめて効果的であることを示した。最終的に、*E. coli* △yggS△ggt△miaA三重欠損株(△YGM)にL135I/Q144A/S495F変異を有するGshAおよびGshB共発現プラスミドを導入した株(strain no.10)を用い、これをLB+0.1mM IPTG培地で前培養し、1 mMのGlu, Val, Glyを含むMg²⁺⇒Mn²⁺置換M 9 培地で培養することで、290 μMのγ-EVGの生産が可能となった。培地へ添加した各種アミノ酸濃度を基に計算すると約30%の生産効率でγ-EVGを生産可能な新規生産法が確立された。

文 献

- 1) Ohsu, T., Amino, Y., Nagasaki, H., Yamanaka, T., Takeshita, S., Hatanaka, T., Maruyama, Y., Miyamura, N., Eto, Y.: *J Biol Chem.*, 8, 1016~1022, 2010.
- 2) Ito, T., Yamauchi, A., Hemmi, H., Yoshimura, T.: *J Biosci Bioeng.*, 122, 689~693, 2016.
- 3) Ito, T., Tokoro, M., Hori, R., Hemmi, H., Yoshimura, T.: *Appl Environ Microbiol.*, 84, e02806-02817, 2018.
- 4) Hibai, T., Nii, H., Nakatsu, T., Kimura, A., Kato, H., Hiratake, J., Oda, J.: *Proc Natl Acad Sci USA.*, 101, 15052~15057, 2004.
- 5) Kelly, B. S., Antholine, W. E., Griffith, O. W.: *J Biol Chem.*, 277, 50~58, 2002.

タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの基質認識機構の改変（Ⅱ）

Modification of substrate specificity of microbial transglutaminase by protein engineering (Ⅱ)

滝 田 祐 亮

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)

Teisuke Takita

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

To obtain the transglutaminase from *Geobacillus stearothermophilus* (GsTgl) with His-tag, which is soluble and binds to Ni^{2+} affinity gel, I constructed eight expression systems. Of them, two enzymes with His-tag in the C-terminus were purified by the affinity chromatography. In one ($\text{GsTgl}\Delta\text{EX27}(\text{His})_6$), its characteristic C-terminal short extension is eliminated and in the other ($\text{GsTgl}(\text{DS})_5(\text{His})_6$), a (Asp-Ser)₅ linker is inserted between the C-terminus and His-tag. Based on fluorescence resonance energy transfer, I succeeded in measuring the initial rate. I purified fifteen active-site mutants of $\text{GsTgl}\Delta\text{EX27}(\text{His})_6$ and compared their activity. Surprisingly, most of them exhibited higher activity than the wild-type. I introduced both of the N-terminal domain (N-179 or N-195) and C-terminal domain (180-C or 196-C) of TEM1 β -lactamase and $\text{GsTgl}(\text{DS})_5(\text{His})_6$ into a Kanamycin-resistance conferring plasmid. *E. coli* BL21 (DE3) harboring the plasmid that contains N-195, 196-C, and $\text{GsTgl}(\text{DS})_5(\text{His})_6$ was unable to grow on a agar plate containing ampicillin and IPTG at 37°C, while that harboring the plasmid, in which Gln and Lys residue are introduced into N-195 and 196-C (around the breakpoint), respectively, was able to grow. However, the latter was unable to grow when the Gln residue was replaced with Asn or when the catalytic Cys117 of GsTgl was replaced with Ala. These results strongly suggest that in cells, $\text{GsTgl}(\text{DS})_5(\text{His})_6$ catalyzed the crosslinking of the two domains of TEM1 β -lactamase. Thus, I succeeded in construction of an efficient screening systems for GsTgl with substrate specificity altered by random mutagenesis.

1. 目 的

トランスグルタミナーゼ (TG) によるタンパク質の架橋は、食肉の弾力性や食感の改善に大きな効果をもたらす。現在、*Streptomyces mobaraensis* 由来のTGが商品化されている。これまでの研究

から、TGは、アシル受容体 (Lys残基) と異なり、アシル供与体 (Gln残基) に対する認識は厳密であり、Asn残基は、複数のTGにおいて利用されない。この理由として、Gln残基のメチレン基と疎水性残基の相互作用が重要であることが示唆されている¹⁾。TGにより、大きく食肉の弾力性や

食感の改善をもたらすためには、未活用のAsn残基を効率的に利用できる新規なTGの取得が望まれる。最近、*Bacillus subtilis*由来TG (Tgl) の結晶構造と特性が報告された²⁾。Tglは、最小のTGであり、*S.mobaraensis*由来のTGに対し類似性を示さない。

昨年度、申請者は、中等度好熱菌の*Geobacillus stearothermophilus*からTgl (GsTgl) をクローニングし、tagをもたないGsTgl (pET11a-GsTgl) の発現精製に成功し、QuikChange (QC) 法により、14種の変異体を作成した。また、His-tag配列をもつGsTglの発現系も2種構築した：(1) N末端にHis-tag配列 (pET42a(-GST)-(His)₆-GsTgl)；(2) C末端にHis-tag配列 (pET22b-GsTgl((His)₆)。しかし、(His)₆-GsTglは、可溶性発現したが、Niアフィニティー担体に結合しなかった。GsTgl(His)₆は、不溶性であった。両酵素は、変性状態では上記担体に結合した。これらの結果は、C末端に付加したHis-tagが、タンパク質内部に埋もれている可能性を示唆した。C末

端にHis-tagを付加し精製されている*B. subtilis*のTglとの配列比較から³⁾、GsTglのC末端には、27アミノ酸残基の伸長配列 (EX27) があることが明らかになっている⁴⁾。本研究では、部位特異的変異導入およびランダム変異導入により、Asn残基を利用するGsTgl変異体酵素を取得することを目的とする。

GsTglの15種の変異体について (Fig. 1)，酵素反応解析を行う。精製を迅速にするため、可溶性でNiアフィニティー担体に結合するHis-tag配列をもつGsTglの発現系の構築を再度試みる。さらに、GsTglのランダム変異導入ライブラリーから目的の基質特異性をもつものを効率的にスクリーニングできる発現系を構築する。カナマイシン耐性遺伝子を有するpET-42 aを用い、TEM1 β -ラクタマーゼ (TEM1) の2断片 (切断部位周辺にGlnとLys残基を導入) として発現させ、Tglの架橋反応により生じる複合体に起因するアンピシリン分解活性を指標にスクリーニングする系の構築を試みる。

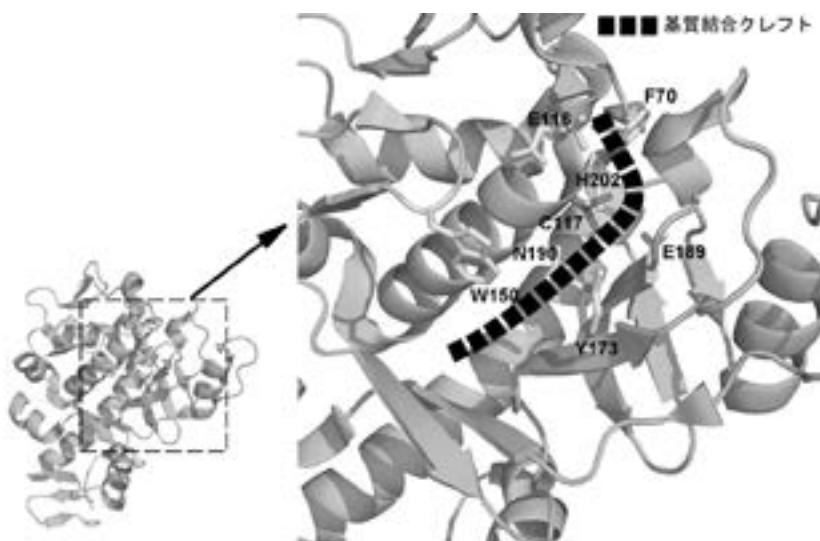


Fig. 1 Active site of *Bacillus subtilis* Tgl.

The site-directed mutations introduced in GsTgl are shown using the structure of *Bacillus subtilis* Tgl (PDB code 4Pa5).

2. 方 法

2.1 His-tagをもつGsTglの発現系の構築

2.1.1 GsTglのC末端とHis-tag配列の間に(Gly-Ser)₄リンカー配列の挿入

pET22b-GsTgl(His)₆のC末端のHis-tag配列の直前には、*Xho*Iサイトが存在する。

本サイトに、リンカーを挿入した(pET22b-GsTgl(GS)₄(His)₆)。

2.1.2 GsTglのC末端とHis-tag配列の間に(Gly-Ser)₅リンカー配列の挿入

pET22b-GsTgl(GS)₄(His)₆を鋳型に、PCRを行った。

PCR断片を、*Nde*Iと*Bam*HIで処理し、pET11aに導入した(pET11a-GsTgl(GS)₅(His)₆)。

2.1.3 GsTglのC末端とHis-tag配列の間に(Asp-Ser)₅リンカー配列の挿入

pET11a-GsTgl(GS)₅(His)₆を、*Sph*Iと*Bam*HIで切斷し、pUC19に導入した。

これを鋳型に、QC法により、(Gly-Ser)₅リンカーを(Asp-Ser)₅リンカーに置換した。

これを*Nde*Iと*Bam*HIで切斷し、GsTgl断片をpET11aに導入した(pET11a-GsTgl(DS)₅(His)₆)。

2.1.3 GsTglのC末端伸長配列(EX27)を除去しHis-tag配列の付加

pET11a-Tglを鋳型に、PCRを行い、EX27を除去したGsTgl断片を得た。

本断片を*Nde*Iと*Xho*Iで切斷しpET22bに導入した(pET22b-GsTglΔEX27(His)₆)。

2.2 GsTglの精製

His-tag付加GsTglの精製は以下の方法で行った。菌体を20mM Tris-HCl(pH 7.4)に懸濁し超音波破碎した。遠心上清(20,000×g, 30min)をProfinity IMAC Ni-Charged Resin(Biorad)に供した。同緩衝液で洗浄し、200 mMイミダゾールを含む緩衝液で溶出した。

2.3 GsTglの酵素活性測定法の検討

Lys-Ala-MCA(KA-MCA)はペプチド研究所から購入した。Z-Asp-Gln-Met-Asp-AFC(Z-DQMD-AFC)は、Bachemから購入した。両ペプチドを、GsTgl(DS)₅(His)₆(2.6 μM)存在下に、37°Cで反応させた(100 μl)。反応後、10 μlに3,000 μlの水を加え、励起波長325 nmで、蛍光強度(FI)を測定した。

2.4 ランダム変異導入のための大規模スクリーニング系の構築

2.4.1 完全長TEM1の発現系の構築

pUC19を鋳型にPCRし、*Sna*BIと*Bam*HIで処理し、pET42a(-GST)に導入した(pET42a(-GST)-TEM1)。

本発現系では、TEM1はN末端に(His)₆をもつ((His)₆-TEM1)。

2.4.2 TEM1断片化のための切断点の決定

TEM1のGlu195とLeu196の間を切断点として得られる2つの酵素断片を用い、タンパク質断片相補アッセイを行った結果、アンピシリン分解活性が回復したという報告がある⁵⁾。上記切断点は、TEM1分子の中心に位置するαヘリックスのC末端側に位置する。そこで、切断点はこのαヘリックスの両端のT179とM180の間とE195とL196の間とした。

2.4.3 TEM1断片のクローニング

N末端側断片(N-179)とC末端側断片(180-C)のクローニングは以下のように行った。pUC19を鋳型にPCRし、*Pst*Iと*Bam*HIで処理し、pUC19に導入した(pUC19_N-179とpUC19_180-C)。

N末端側断片(N-195)とC末端側断片(196-C)のクローニングも、同様の方法で行った(pUC19_N-195とpUC19_196-C)。

2.4.4 TEM1のN末端側断片の発現系の構築

pUC19_N-179とpUC19_N-195から*Sna*BIと*Bam*HIで切り出し、pET42a(-GST)に導入した

(pET42a(-GST)_N-179とpET42a(-GST)_N-195)。本発現系では、TEM1のN末端側断片はN末端に(His)₆をもつ(N-179とN-195)。

2.4.5 TEM1のC末端側断片の発現系の構築

QC法により、pUC19_180-Cに開始コドン(NdeIサイト)を導入した。

続いて、終止コドンを除去しXhoIサイトを導入した。

得られたベクターをNdeIとXhoIで処理し、180-C断片をpET22bに導入した(pET22b_180-C)。pUC19_196-Cを用い、同様の方法で、196-C断片をpET22bに導入した(pET22b_196-C)。

2.4.6 TEM1のN末端とC末端側断片の発現系の構築

QC法により、pET22b_180-CとpET22b_196-CのT7 promoter上流にStuIサイトを導入した。

続いて(His)₆直後の終止コドンの後に、StuIサイトを導入した(pET22b_180-C-(StuI)₂とpET22b_196-C-(StuI)₂)。

pET22b_180-C-(StuI)₂を、StuIで処理し、T7 promoterをふくむ180-C断片を、pET42a(-GST)_N-179のN-179の終止コドン下流のStuIサイトに導入した(pET42a(-GST)_N-179_180-C)。同様に、pET22b_196-C-(StuI)₂のT7 promoterをふくむ196-C断片を、pET42a(-GST)_N-195に導入した(pET42a(-GST)_N-195_196-C)。

2.4.7 TEM1の2断片とGsTglの共発現系の構築

QC法により、pET11a-GsTgl(DS)₅(His)₆のT7 promoter上流にSacIサイトを導入した。

続いて、GsTgl(DS)₅(His)₆の終止コドン直後のBamHIサイトの下流にNotIサイトを導入した(pET11a-GsTgl(DS)₅(His)₆-SacINotI)。

pET11a-GsTgl(DS)₅(His)₆-SacINotIをSacIとNotIで処理し、T7 promoterをふくむGsTgl(DS)₅(His)₆断片を、pET42a(-GST)_N-179_180-C

とpET42a(-GST)_N-195_196-CのそれぞれのC末端断片の終止コドン下流のSacIとNotIサイトに導入した(pET42a(-GST)_N-179_180-C_GsTgl(DS)₅(His)₆とpET42a(-GST)_N-195_196-C_GsTgl(DS)₅(His)₆)。

2.4.8 TEM1の2断片とGsTglの共発現系への変異導入

QC法により、pET42a(-GST)_N-179_180-C_GsTgl(DS)₅(His)₆のN-179にT179Q変異を導入した。

続いて、180-CにM180K変異を導入した(pET42a(-GST)_N-179/T179Q_180-C/M180K_GsTgl(DS)₅(His)₆)。

同様に、pET42a(-GST)_N-195_196-C_GsTgl(DS)₅(His)₆のN-195と196-Cにそれぞれ、E195Q変異とL196K変異を導入した(pET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆)。

また、QC法により、pET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆のN-195にE195N変異を導入した(pET42a(-GST)_N-195/E195N_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆)。

さらに、QC法により、pET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆のGsTgl(DS)₅(His)₆にC117A変異を導入した(pET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆/C117A)。

2.4.9 GsTglとTEM1断片の共発現プラスミドを有する大腸菌のアンピシリン感受性試験

作製したpET42a(-GST)由来ベクターを、大腸菌BL21(DE3)に導入し、カナマイシン(50μg/ml)含有LB培地(5ml)に植菌し37℃で一晩振とう培養した。この培養液1mlをカナマイシン(50μg/ml)と1mM IPTG含有LB培地(5ml)に加え、15℃で12時間、振とう培養した。

この培養液100 μ lを、アンピシリン（100 μ g/ml）とIPTG（1 mM）含有寒天培地に塗布し、37°Cで24時間静置した。

3. 結果と考察

3.1 GsTglの発現

Fig. 2に示すように、培養温度を15—20°Cに下げることで、作製したすべての発現系で、細胞全画分 (Fig. 2 (A)) と可溶性画分 (Fig. 2 (B)) でGsTglが確認された。また、抗His-tag抗体を

用いたWestern blot解析で、すべてのHis-tagをもつGsTglについてバンドが確認された (Fig. 2 (C))。しかし、 Ni^{2+} カラムに結合し精製できたのはGsTgl(DS)₅(His)₆とGsTgl \triangle EX27(His)₆のみであった (Fig. 2 (D))。これらの結果は、昨年度の考察を強く支持した。

3.2 GsTglの酵素活性測定法の検討

Fig. 3に示すように、50 μ M KA-MCAと50 μ M Z-DQMD-AFCを2.6 μ M GsTgl (DS)₅(His)₆存在下に37°Cで反応させ、励起波長325 nmで蛍光

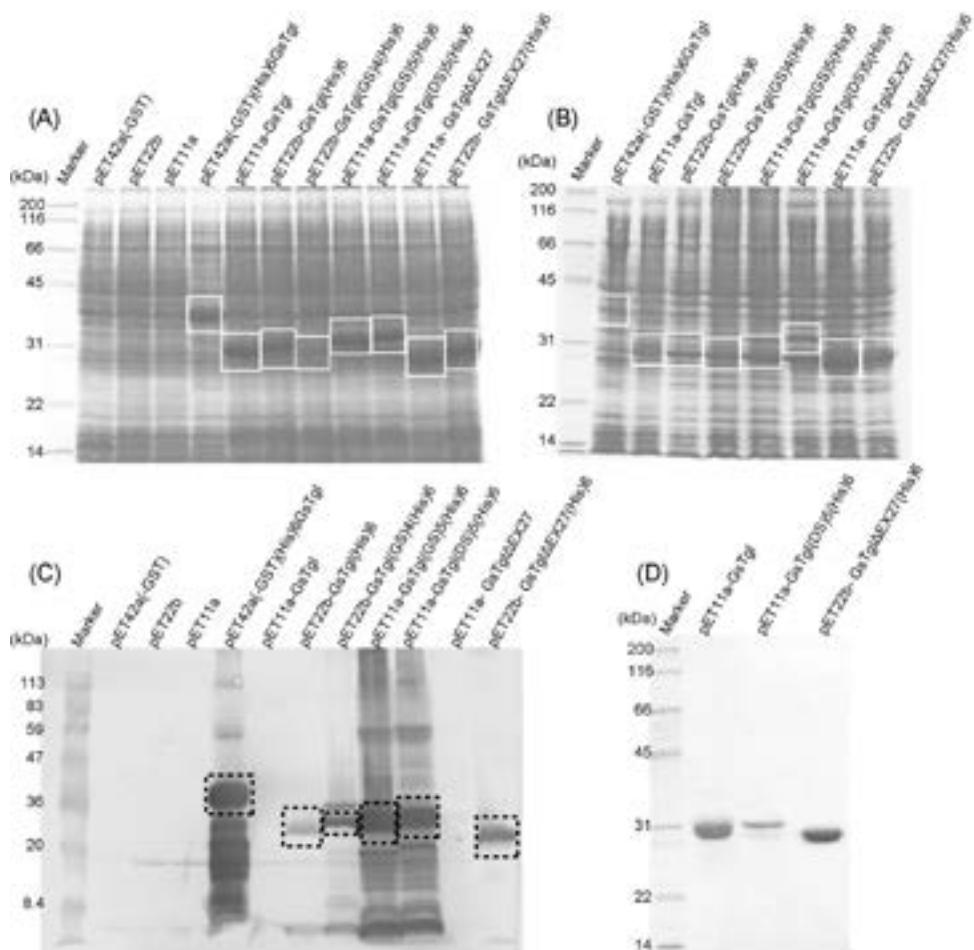


Fig. 2 SDS-PAGE and Western blot analysis of wild-type GsTgl.

(A) SDS-PAGE of cells. (B) SDS-PAGE of the soluble fractions. After sonication of the cells and centrifugation, the supernatants were analyzed by SDS-PAGE. (C) Western blot analysis of the cells. (D) Purified wild-type GsTgl.

スペクトルを測定すると、390 nm付近のピークが減少し、443 nm付近にピークが生じ増加した (Fig. 3 (A))。これは、両ペプチドの架橋に伴う蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) の存在を示唆した。KA-MCA濃度を20—50 μMとし、同様の測定をしたところ、443 nmの蛍光強度 (FI) は KA-MCA濃度の増加とともに増加したが (Fig. 3

(C)), 390 nmのFIは変化しなかった (Fig. 3 (B))。

3.3 GsTglΔEX27(His)₆変異体の精製とFRETによる活性比較

Fig. 4 に示すように、15種の変異体を作成し均一に精製した (Fig. 4 (A))。50 μM KA-MCAと50 μM Z-DQMD-AFCを、酵素存在下に37°Cで反応させ、443 nmのFIの増加から初速度を得た。

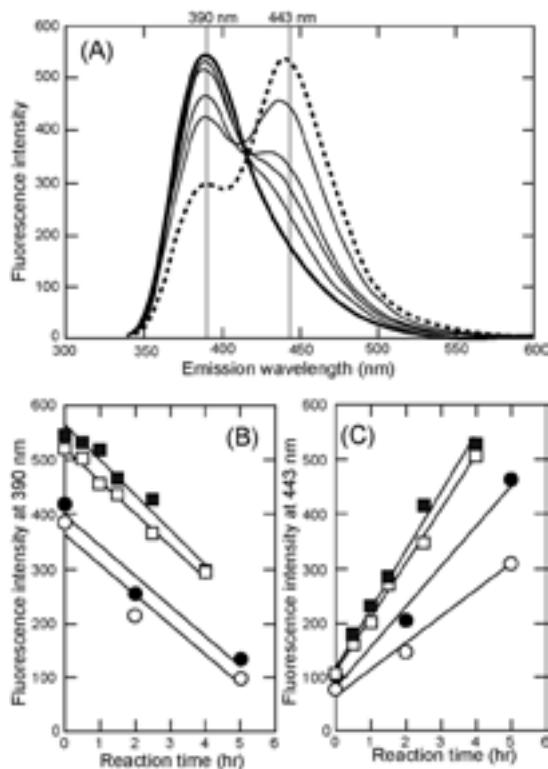


Fig. 3 Measurement of GsTgl(DS)₅(His)₆ activity by FRET.

(A) Time-course of fluorescence emission spectra. The reaction was performed at pH 8.0 and 37°C. [E]₀ = 2.6 μM. [KA-MCA]₀ = 50 μM. [Z-DQMD-AFC]₀ = 50 μM. The reaction mixture (10 μl) was mixed with water (3,000 μl) and, the fluorescence spectra were measured at λ_{ex} = 325 nm. The spectra at 0, 0.5, 1, 1.5, 2.5, and 4 hr after reaction are shown (from top to bottom at 390 nm, respectively). The similar measurements were done with different concentrations of KA-MCA: ○, 20 μM; ●, 30 μM; □, 40 μM; and ■, 50 μM. (B) The fluorescence intensity (FI) change at 390 nm. (C) The FI change at 443 nm.

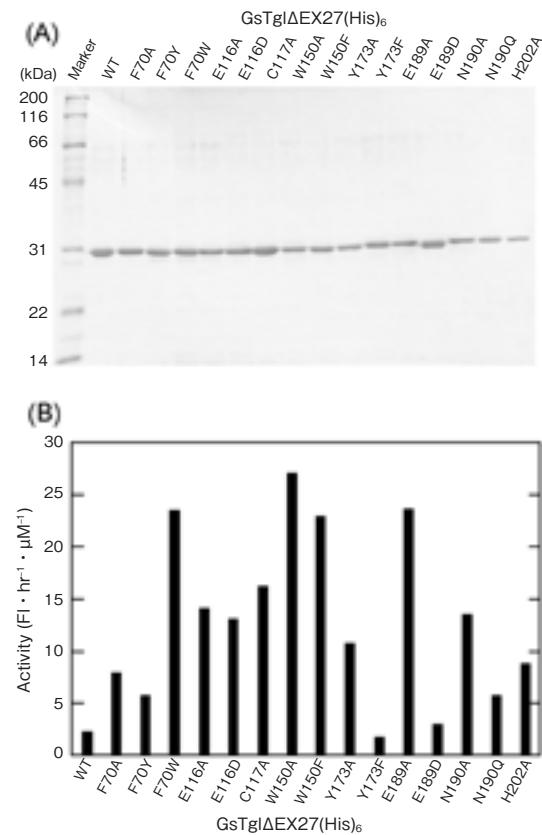


Fig. 4 SDS-PAGE and activity of the wild-type and mutants of GsTglΔEX27(His)₆.

(A) SDS-PAGE of the purified enzymes. (B) Activity of the purified enzymes. The reaction was performed at pH 8.0 and 37°C, and the FI change at 443 nm was measured at λ_{ex} = 325 nm. [KA-MCA]₀ = 50 μM. [Z-DQMD-AFC]₀ = 50 μM. [E]₀ = 1–6 μM. The activity was obtained by dividing the initial rate (FI/hr) by the enzyme concentration.

この値から活性を比較した (Fig. 4 (B))。多くの変異体が、野生型 (WT) に比べ、高い活性を有した。注目すべきことに、触媒残基と推定される Cys117 を Ala に置換した変異体も高い活性を示した。今後は、生成物を HPLC で分取し、構造を決定する必要がある。

3.4 ランダム変異導入のための大規模スクリーニング系の構築

Fig. 5 に、作成した pET42a(-GST) 由来プラスマミド (Fig. 5 (A)) とアンピシリンと IPTG 含有寒天培地での生育結果を示す (Fig. 5 (B))。N-179_180-C(His)₆ と N-195_196-C(His)₆ は、生

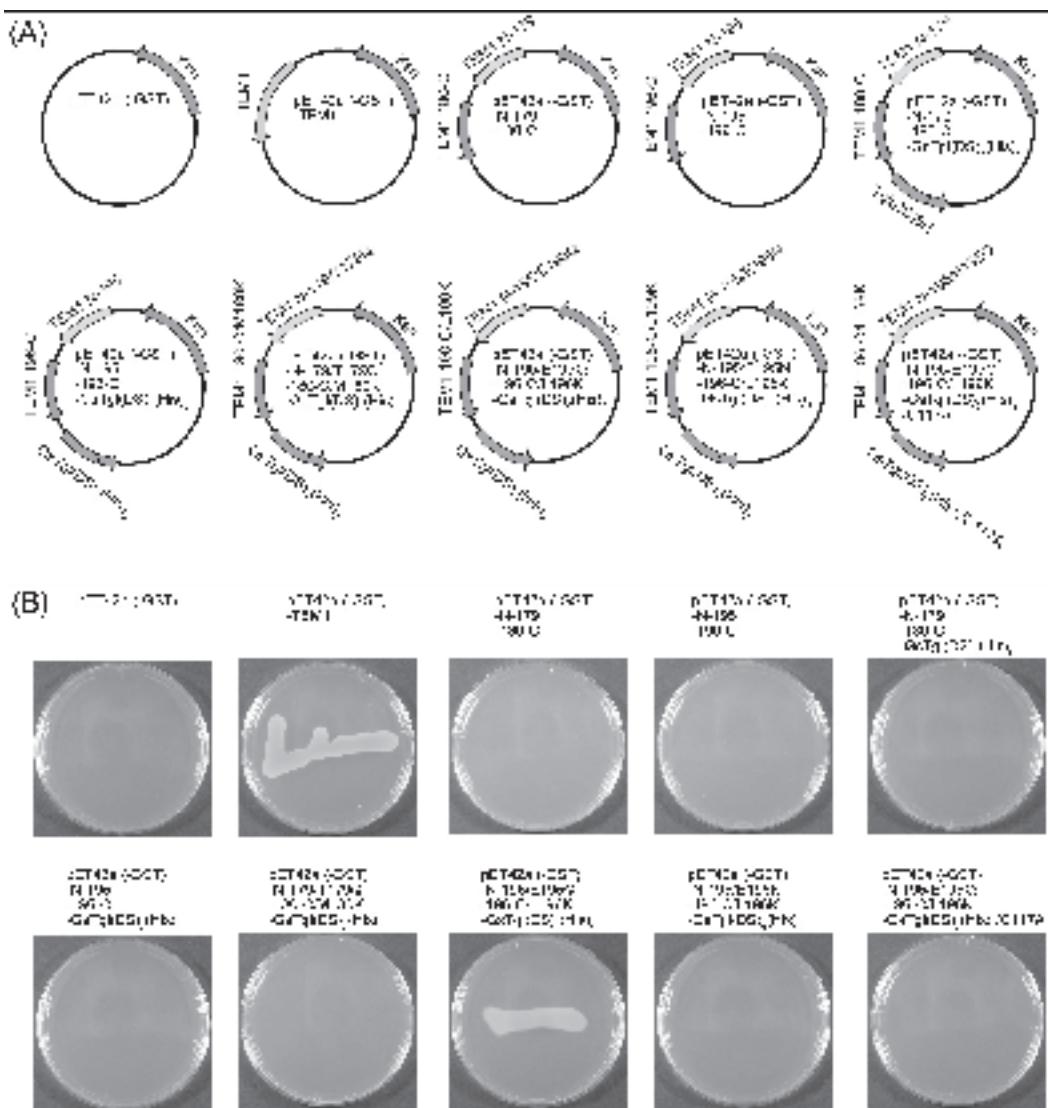


Fig. 5 Construction of screening systems for GsTgl with substrate specificity altered by random mutagenesis.

(A) Plasmids constructed. All plasmids were constructed on the basis of pET-42 a (-GST), which confers Kanamycin resistance and in which the region of glutathione S-transferase is removed. TEM1 β -lactamase or both of the N-terminal domain (N-179 or N-195) and C-terminal domain (180-C or 196-C) domain, and GsTgl(DS)₅(His)₆ were introduced into the plasmid. (B) Ampicillin susceptibility testing. *E. coli* BL21 (DE3) harboring each plasmid was inoculated on a LB agar plate containing 100 μ M ampicillin and 1 mM IPTG and incubated overnight at 37°C.

育しなかった。これは、これら2種のTEM1断片対は、BL21 (DE3) 中で、複合体を形成しないか、形成しても本来のTEM1構造をとらないことを示唆した。これらに、GsTgl遺伝子を導入したN-179_180-C_GsTgl (DS)₅(His)₆とN-195_196-C_GsTgl (DS)₅(His)₆も、生育しなかった。しかし、TEM1断片の切断部位周辺にGlnとLys残基を導入したところ、N-179/T179Q_180-C/M180K_GsTgl(DS)₅(His)₆は生育しなかったが、N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆は生育した。これらは、細胞中で、TEM1断片のN-195と196-Cは、安定な複合体を形成しないが、導入したQ195残基とK196残基をGsTglが架橋されると本来の構造をとり、アンピシリン分解活性を示すようになることを示唆した。この考えは、N-195/E195N_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆とN-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆/C117Aが生育しなかったことから支持される。このように、pET42a(-GST)_N-195_196-C(His)₆を用い、N-195のE195と196-CのL196に変異を導入することにより、目的の基質特異性をもつGsTglを、ランダム変異ライブラリーから、効率的にスクリーニングする系を確立した。本発現系には、アンピシリン濃度を上昇させることにより、高活性な目的変異体を効率的にスクリーニングできることである。

4. 要 約

可溶性に発現しNi²⁺カラムで精製できるGsTgl

の新規発現系の構築に成功した。FRETによるGsTglの酵素活性測定法を検討した。GsTglの15種の変異体を精製し、上記の活性測定法を適用することで、活性を比較した。結果として、活性上昇をもたらす変異を明らかにした。GsTglのランダム変異ライブラリーから、目的の基質特異性をもつものを効率的にスクリーニングする系を確立した。

文 献

- Chica, R. A., Gagnon, P., Keillor, J. W., Pelletier, J. N.: Tissue transglutaminase acylation : proposed role of conserved active site Tyr and Trp residues revealed by molecular modeling of peptide substrate binding, *Protein Sci.*, **13**, 979~991, 2004.
- Fernandes, C. G., Placido, D., Lousa, D., Brito, J. A., Isidro, A., Soares, C. M., Pohl, J., Carrondo, M. A., Archer, M., Henriques, A. O. : Structural and functional characterization of an ancient bacterial transglutaminase sheds light on the minimal requirements for protein cross-linking, *Biochemistry*, **54**, 5723~5734, 2015.
- Plácido, D., Fernandes, C. G., Isidro, A., Carrondo, M. A., Henriques, A. O., Archer, M. : Auto-induction and purification of a *Bacillus subtilis* transglutaminase (Tgl) and its preliminary crystallographic characterization, *Protein Expr. Purif.*, **59**, 1~8, 2008.
- Zilhão, R., Isticato, R., Martins, L. O., Steil, L., Völker, U., Ricca, E., Moran, C. P. Jr., Henriques, A. O. : Assembly and function of a spore coat-associated transglutaminase of *Bacillus subtilis*, *J Bacteriol.*, **187**, 7753~7764, 2005.
- Wehrman, T., Kleaveland, B., Her, J. H., Balint, R. F., Blau, H. M. : Protein-protein interactions monitored in mammalian cells via complementation of beta-lactamase enzyme fragments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **99**, 3469~3474, 2002.

ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割

Contribution of aroma compounds and lipids to “*koku* attributes” of pork sausages

西 村 敏 茂

(女子栄養大学栄養学部)

Toshihide Nishimura

(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University)

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

In the previous research, the sensory characteristics in taste, aroma and texture of pork sausage were clarified by sensory evaluation. The addition of umami compounds to sausages was also shown to enhance the intensity and lastingness in the retronasal aroma sensation of pork sausage. This result indicated that umami compounds contribute to “*koku* attribute” of pork sausages. Furthermore, the analyses of aroma compounds of smoked and non-smoked pork sausages showed that common aroma compounds were clarified to be β -Pinene, 3-Carenem, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenol. However, there is no evidence that fat contributes to the enhancement of “*koku* attributes” as well as umami compounds. So, this research was carried out to clarify the role of fat on the retronasal aroma sensation of “*koku* attributes” in pork sausages.

First, the sensory characteristics of three kinds of pork sausages containing different amounts of fat were examined by sensory evaluation. Sensory analyses showed that addition of fat make the richness and lastingness of flavor of pork sausage stronger as well as the intensity of umami taste. This result indicates that fat has the enhancement effect on “*koku* attribute” by the lastingness of aroma sensation. On the other hand, there is no effect of addition of fat on the enhancement of the spicy aroma sensation in pork sausage.

GC/MS analyses of aroma released from pork sausages containing different amounts of fat have shown that β -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenol were identified in these all sausages. The amount of these aroma compounds released from sausage has been shown to decrease by addition of fat into sausage, indicating that fat was able to hold aroma compounds. From these results, the lasting effect of aroma sensation in “*koku* attribute” of sausage was also shown to be enhanced by addition of fat.

1. 目的

近年、多くの食品にコクという言葉が表示され、おいしさの代名詞のように使用されている。しかし、コクには、これまでにきちんとした定義がないため、製造者が独自の基準で評価して、表示しているのが現状である。そこで、我々は、コクが味、香りならびに食感のすべての刺激で形成されるものであり、多くの刺激で形成される複雑さ、その刺激が口腔内で膨らむ広がりならびにそれが持続する持続性の3つの要素で形成される感覚であると定義した^{1~3)}。また、コクのある食べ物に関して、その形成メカニズムを研究している。その中で、食べ物の複雑さは、熟成、発酵、加熱などの処理により形成されると考えている。また、その複雑な刺激の広がりと持続性を増強する物質として、うま味物質と脂質が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた^{4~6)}。

ポークソーセージは、食べ物の中でもとりわけ美味しい食べ物の1つであり、最も消費量の多い食肉製品である。そのおいしさは、うま味、独特の香りならびに食感によることはよく知られている。これまでの、ポークソーセージの香気成分に関する研究では、Mottram⁷⁾ やRamarathnam⁸⁾ の報告により、硝酸アルキル、ベンゾニトリル、4-メチル-2-ペンタノン、2-ブチル-2-オクテナールなどの香気成分が亜硝酸塩を添加したものから多く検出されることが明らかとなっているが、食肉製品のおいしさに関する研究は、ほとんどなされていない。そこで、我々はポークソーセージの食味性に関する研究を手掛けた。まず、ポークソーセージの製造では、調味料としてうま味物質を添加すると同時に、適量の脂肪を添加していることから、これらの物質によるコク形成・増強メカニズムに焦点を当て、研究をしている。先の研究^{9~11)}において、ポークソーセージの食味

性を官能評価で解析し、ポークソーセージの官能的特徴として、うま味、持続感、濃厚な味、広がりのある味、深みのある味、香ばしい、後をひく香り、広がりのある香り、スモーキー、スパイシーな香り、弾力、歯ごたえ、ジューシー、プリプリなど、全部で22項目の用語を見出し、ポークソーセージの食味性には、コクに当たる感覚が存在することを明らかにした。また、ソーセージに添加されているうま味物質は、ポークソーセージの口中香を強く感じさせると同時に、風味の複雑さや味の持続性を強く感じさせることから、コク増強物質であることが判明した。さらに、ポークソーセージから抽出した香気成分を臭いかぎガスクロマトグラフィー (GC-O) と質量分析ガスクロマトグラフィー (GC/MS) で解析し、ポークソーセージの特徴的な臭いに寄与する候補成分を特定した。ノンスモークソーセージでは16種類の香気成分が検出され、GC/O分析を用いたAEDA法により、16成分のうち、 β -Pinene (生シイタケ、森、豆), 3-Carene (卵スープ、青臭い), D-Limonene (酸っぱい、青臭い、除光液), Acetic acid (酸っぱい、酢), Copaene (カヌムシ、きゅうり、草), Methyl eugenol (焦げ、カラメル、醤油、ハーブ) が、ノンスモークソーセージの特徴的な臭いに寄与する候補成分として特定ならびに同定された。これらの6成分は、スモークソーセージにおいても検出されていたことから、すべて原料の豚肉由来、または香辛料由来であると推察された。スモークソーセージでは、これらに加えて、燻煙由来のポークソーセージを特徴付ける香気成分として p -Cresol (醤油、脂、スモーク) と2,6-Dimethoxy-phenol (スモーク、煙) の存在が明らかとなった。このように、ポークソーセージが、特徴のある香りを有する複雑さを有し、味わいに広がりや持続性を有するコクのある食品であることを明らかしてきた。しかし、

ソーセージの製造時に添加する脂肪が、ソーセージの食味性に与える影響に関しては、まったく研究されていない。

そこで、本研究では、これまでの研究成果を基にして、ポークソーセージの原料として添加している脂質に着目し、これがコクの形成にどのように関わっているかを解明することを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試材料

脂質添加量の異なる3種類のソーセージ（通常量添加製品、1/2量添加製品、無添加製品）を調製した。冷凍保存しておいたものを、袋ごと流水をかけて解凍し、官能評価用試料として用いた。

2.2 官能評価用の試料の調製方法

ホーロー鍋（24cm ϕ × 10cm）に水を張り、90℃まで加熱したお湯の中で、袋ごと加熱した。袋に入ったソーセージの中心温度が、50℃に達したことを確認し、官能評価のサンプルとした。加熱が終了したソーセージは、半分に切断し、2本に分けてから皿に盛りつけた。

2.3 官能評価

パネリストには、基本五味の識別、ならびに各味の濃度識別ができる、2カ月以上の訓練を行った者を選定した^{*1}。パネリストは、延べ15名により評価を行った。パネリスト1名あたり、添加脂肪量の異なる3種類のソーセージを各種類1本ずつ、計3本を提供した。官能評価では、前試料の影響をなくすため、次のサンプルを評価する前に、蒸留水で口濯ぎを実施した。

Table 1に示すように、評価項目は、スパイシーな香りの強さ、うま味強度、塩味強度、風味の広がり、風味の持続性の5項目とした。特に、風味の広がりと持続性は、コクの感覚の要素に相当するものとして、評価項目に加えた。また、風味の広がりは10回嚥んだ後に感じた感覚の強さを、風

味の持続性は飲み込んだ後の感覚を評価してもらった。評価方法は評点法を用い、各評価項目に対して、点数で評価した。評価の点数は、-3（非常に弱い）から+3（非常に強い）で適した強さを選択してもらった^{*2}。官能評価の結果についての統計処理は、一元配置による分散分析法を用いて行い、有意差の検定には、5%危険率によるt検定を用いた。

*1、古川秀子「おいしさを測る」幸書房¹²⁾を参照

*2、別添官能評価用紙（Table 1）を参照

2.4 ポークソーセージの香気成分分析

a) モノトラップ（シリカモノリス捕臭剤）による香気成分の捕集

各ソーセージを細切した後、5gを取り、40mlのバイアル瓶に入れたものを、60℃で2時間加熱した。この間に揮発したヘッドスペース香気成分をMono trap（シリカモノリス捕臭剤：ジーエルサイエンス）で捕集した。

b) GC/MSによる香気成分の同定

a) で調製した試料をGC/MS（Agilent 7890A GC-System, Agilent 7693 Auto-sampler, Agilent Technologies 5975C inert MSD with Triple-Axis Detector）に供し、香気成分を同定した。分析は、GC（GC-2014、（株）島津製作所）で、CP-wax 52 CB（30m x 0.25mm i.d. 0.25 μm film thickness）（ジーエルサイエンス（株））カラムを用いた。また、各成分の量的な変化は、サンプルに添加した内部標準物質で補正して算出し、比較した。

3. 結果と考察

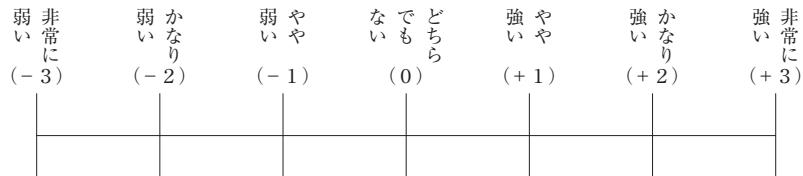
3.1 脂肪含量の異なるソーセージの食味性

通常量脂肪添加の製品、通常の1/2量脂肪添加の製品ならびに、脂肪無添加の製品を調製し、スパイシーな香りの強さ、うま味強度、塩味強度、

Table 1 ソーセージの官能評価用紙 (The sheet for sensory evaluation of sausages)

平成 年 月 日
名前 _____

- ・ポークソーセージを10回以上咀嚼し、項目①から順番に評価して下さい。
- ・サンプルは、左から順番に評価してください。
- ・下記のスケールを参考に、各評価項目についてA, B, Cを点数 (-3, -2, -1, 0, +1, +2, +3) で評価し、その評価値に試料の記号を付けて下さい。尚、風味の広がりは、10回咀嚼した後に感じた感覚を評価してください。風味の持続性は、飲み込んだ直後の強さを評価してください。
- ・評価するサンプルを変える毎に、必ず、口濯ぎを行ってください。



<記入例>		(-3) (-2) (-1) (0) (+1) (+2) (+3)
①	スパイシーな香りの強さ	
②	うま味の強さ	
③	塩味の強さ	
④	<u>風味の広がり</u>	
⑤	<u>風味の持続性</u>	

Table 2 脂肪含量がポークソーセージの食味性に与える影響 (The effect of added fat content on sensory quality of pork sausages)

脂肪の添加量	スパイシーな香り	うま味	塩味	風味の広がり	風味の持続性
無添加	0.27 ± 1.61 a	-0.60 ± 0.95 a	-0.07 ± 0.93 a	-0.27 ± 1.24 a	-0.60 ± 1.40 a
1/2量添加	-0.33 ± 1.49 a	0.53 ± 0.62 b	0.47 ± 0.62 a	0.27 ± 0.93 a	0.07 ± 0.85 a
通常量添加	0.07 ± 1.77 a	1.53 ± 1.09 c	1.53 ± 1.15 b	1.87 ± 0.62 b	1.47 ± 1.02 b

注：同じ評価項目列において、異なるアルファベット (a, b, c) 間では、有意差があることを示している。n = 15

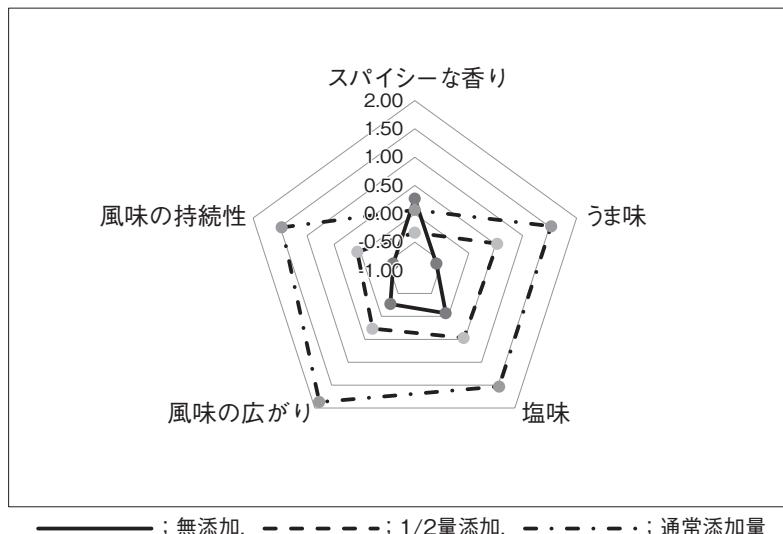


Fig. 1 Difference in sensory quality among three kinds of pork sausages containing different amounts of fat

風味の広がり、風味の持続性の5項目に関する官能評価を行った。その結果をTable 2とFig. 1にまとめた。

スパイシーな香りの強さは、脂肪の添加量の違いで有意な差は認められなかった。パネリストのコメントでは、脂肪無添加ソーセージで肉っぽい香りがしたとの記載があったので、今後はスパイクの香りと肉っぽい香りを区別して評価することにより、より正確な食味性が評価できると思われた。

うま味の強さと塩味の強さに関しては、脂肪含量が多くなるにつれて強くなると評価された。うま味の強さは、脂肪の添加量に応じて、有意にうま味が強くなることが判明した。脂肪がうま味の

強さを増強することは知られているが、そのメカニズムは明らかにされておらず、そのメカニズムの解明は興味深い課題である。塩味強度に関しては、無添加製品と通常量添加製品との間で、有意差が認められ、脂肪含量が多いほど、塩味が強くなることが明らかとなった。この結果は、脂肪添加量により、添加食塩量を少なくすることが可能であることを示している。現在、食塩摂取量の取り過ぎが問題となっているので、脂肪添加量で減塩できるかもしれないが、食肉製品の製造では、食塩は製品の味わいに影響を与えるだけでなく、品質にも影響を与える。特に、食塩を減らすと結着性の低下につながるので、トランスグルタミナーゼなどの結着補強をすることで、減塩製品の

開発が可能になる可能性が考えられる。

風味の広がりならびに持続性に関しても、添加する脂肪含量が多くなるにつれて、強くなることが明らかとなった。しかし、脂肪添加量が通常量の半分では、風味の広がりや持続性が強くなるものの、有意な差は認められなかった。添加脂肪量が通常量であると、ソーセージの味わいが有意に広がり、持続性が強くなることが判明した。

我々の研究では、タマネギ搾汁液から香気成分の保持効果を有する物質として、 β -シトステロールならびにスティグマステロールといった植物ステロールが、香気成分を結合させ、食べ物の香りを保持する効果があることが判明した。脂質によるこの効果は、風味の持続性を強め、コクを増強することが明らかとなっている⁵⁾。

今回の結果から、ポークソーセージでは、添加する脂肪含量を適量とすることで、うま味や塩味を増強するだけでなく、風味の広がりや持続性を強め、コクを増強することが明らかとなった。

3.2 脂肪含量の異なるソーセージにおける香気成分の特定とそれらの量的な違い 脂肪含量の異なるノンスマーキソーセージで

は、食味性に違いが認められ、脂肪含量が多いほど、風味の広がりや持続性が強いことが明らかとなった。この理由として、脂肪が香気成分を保持している可能性が示唆された。また、これまでの研究において、脂質に保持される香気成分は、 $\log P$ と呼ばれる脂溶性の度合いにより、結合性が異なることが知られている。そこで、ソーセージの特徴的な香気成分量が、添加された脂肪含量で、異なるか否かについて検討した。具体的には、ソーセージをバイアル瓶に入れ、60°Cで2時間加熱した時に、バイアル瓶中に放出される香気成分を捕集し、それらをGC/MSで分析し、香気成分の特定とその量的な違いを調べた。

得られたGC/MSのクロマトグラムをFig. 2～4に示した。Fig. 2は脂肪無添加製品の、Fig. 3は1/2量添加製品の、Fig. 4は通常量添加製品の分析結果を示している。各図に示してあるA～Gは、それぞれ β -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenolであり、今回の分析で検出された成分である (Table 3)。また、Table 3には、それぞれの製品での放出された香気成分量を示した。

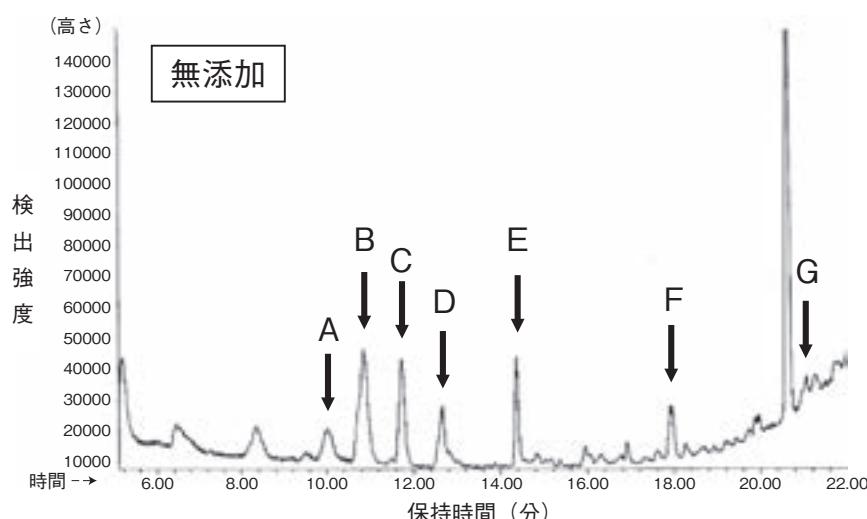


Fig. 2 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage without addition of fat

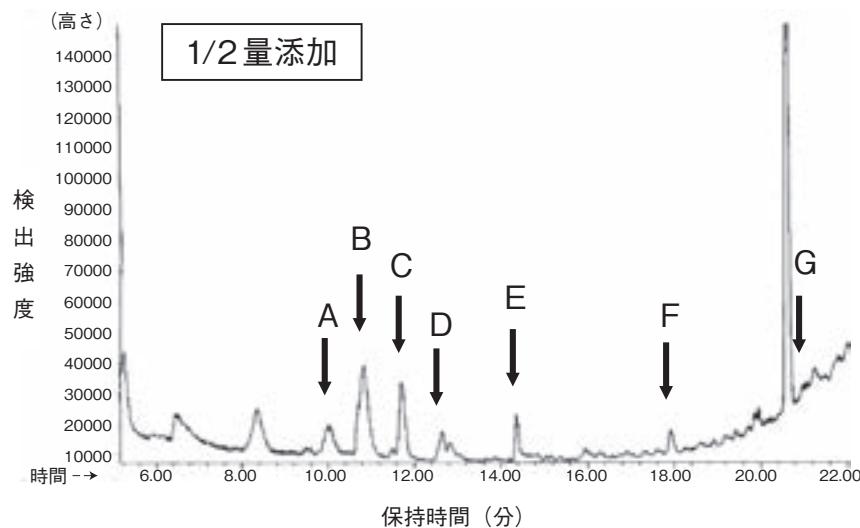


Fig. 3 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage containing 50% of regular fat content

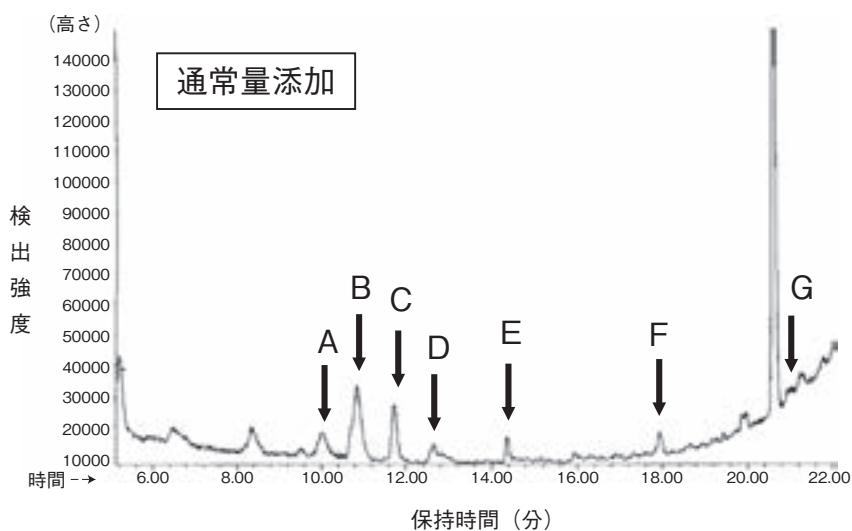


Fig. 4 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage containing regular fat content

GC/MSによる分析の結果、複数の香気成分が検出された。そのうち、過去のノンスモークソーセージの分析でも検出された香気成分として、Table 3に示した7成分が同定された。

これらは、 β -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenolであった。 β -Pineneは生シイタケ、森、

豆の臭いと、3-Careneは卵スープ、青臭い臭いと、D-Limoneneは酸っぱい、青臭い臭いと、Methyl eugenolはスパイス、カレー粉、漢方薬の臭いと評価されている。

Fig. 2～4とTable 3を見ると、添加した脂肪含量が多いほど、ソーセージから放出された香気成分量が少ないことが明らかとなった。また、

Table 3 脂肪含量の異なるソーセージから放出された香気成分量の違い (The differences in aroma compounds released from three kinds of pork sausages containing different amounts of fat)

保持時間 (分)	推定化合物名	検出された化合物量 (高さ; × 10 ³)		
		無添加	1/2量添加	通常量添加
10.05	β-Pinene (A)	10.9	10.3	8.5
10.86	3-Carene (B)	37.9	30.2	24.9
11.74	D-Limonene (C)	37	26.1	19.4
12.67	Octanal (D)	19.1	8.8	3.8
14.37	Nonanal (E)	36.7	14.3	10.3
17.94	Caryophyllene (F)	22.1	9.6	8.1
21.06	Methyleugenol (G)	9.5	4.3	3.8

β -Pineneと3-Careneの放出量は、脂肪添加量に応じて、比例的に減少していた。一方、D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenolは、脂肪が添加されると急激に放出量が減少することが明らかとなった。このことは、 β -Pineneと3-Careneは、脂肪と比較的弱い結合をしているが、それ以外の成分は脂肪と比較的強い結合をしており、60°Cの加熱により、放出されにくかったと推察された。

以上の結果から、ポークソーセージの製造で添加されている脂肪は、ポークソーセージに特徴的な複数の成分を保持していることが明らかとなった。脂肪に保持されている香気成分は、喫食時に口腔内に徐々に香気成分を放出するため、ソーセージの味わいの持続性を強め、コクを増強していると推察された。また、脂肪の添加含量の違いは、喫食時の味わいの違いをもたらしている可能性が考えられる。

4. 要 約

ポークソーセージは、美味しい食品の1つであり、コクのある食品と考えられている。以前の研究において、ポークソーセージの製造時に添加されるうま味物質が、口中香の感じ方と持続性を強め、コクの増強に寄与していることを明らかにし

た。本研究では、添加される脂肪量が異なるソーセージを作成し、脂肪含量の違いが食味性ならびに香りの持続性に及ぼす影響を調べた。

官能評価では、脂肪の添加量が増えるとうま味と塩味の感じ方を強めることが明らかとなった。また、味わいの広がりや持続性を強め、コク増強効果を示すことが明らかとなった。一方、スパイシーな香りの強さには影響を与えたなかった。

次に、GC/MSにより、それぞれのソーセージから放出される香気成分とその含量を調べた。その結果、添加される脂肪含量に関わらず β -Pinene (生シイタケ、森、豆), 3-Carene (卵スープ、青臭い), D-Limonene (酸っぱい、青臭い), Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenol (スパイス、カレー粉、漢方薬) が検出された。これらは、いずれもノンスマーキソーセージで検出された成分であった¹⁰⁾。また、これらの成分量は、脂肪含量が多くなると放出されにくくなることが判明した。この結果は、ソーセージに添加されている脂肪が、ソーセージの特徴を示す香気成分を保持し、味わいの持続性を強めていることが明らかとなり、ソーセージのコクの増強に寄与していると推察された。

今後は、ポークソーセージの香りの特徴に大きく寄与している香気成分として同定された香気成

分の標品を組み合わせて、ポークソーセージの香りを再現できるか否かを調べる必要がある。

文 献

- 1) 西村敏英：コクの要素と寄与成分を活かした食品開発，*食品と開発*，53（6），20～23，2018.
- 2) 西村敏英：食品のおいしさを改善するコク増強物質のチョイ足し技術，*月刊フードケミカル*，9，23～27，2017.
- 3) 西村敏英：食肉のおいしさとそれを引き出すコクとは！，*JATAFFジャーナル*，3（12），29～35，2015.
- 4) Nishimura, T., Goto, S., Miura, K., Takakura, Y., Egusa, S. A., Wakabayashi, H.: "Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups", *Food Chemistry*, 196, 577～583, 2016.
- 5) Nishimura, T., Egusa, S. A., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., Noshio, Y.: "Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute", *Food Chemistry*, 192, 724～728, 2016.
- 6) 西村敏英：食肉のおいしさを引き出すうま味物質の役割，*食肉の科学*，57（2），177～180，2016.
- 7) Mottram, D. M.: "Organic Nitrates and Nitriles in the Volatiles of Cooked Cured Pork", *J. Agric. Food Chem.*, 32, 343～345, 1984.
- 8) Ramarathnam, N., Rubin, L.J., Diosady, L.L.: "Studies on meat flavor. 3. A novel method for trapping volatile components from uncured and cured pork", *J. Agric. Food Chem.*, 41（6），933～938, 1993.
- 9) 西村敏英，江草愛：ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明，平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，33, 101～108, 2015.
- 10) 西村敏英，江草愛：ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その2），平成27年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，34, 72～80, 2016.
- 11) 西村敏英，江草愛：ポークソーセージの「こく」とその寄与因子の解明（その3），平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，35, 31～39, 2017.
- 12) 古川秀子：おいしさを測る-食品官能検査の実際，幸書房，1994.

ドライエイジング牛肉に特徴的な香気成分に関する研究

Study on flavor components of dry-aged beef

河 原 聰
(宮崎大学農学部)

Satoshi Kawahara
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Dry-aged beef is believed to have different and preferred flavor by some consumers to that of wet-aged (i.e., vacuum packaged) beef. In this study, we tried to compare the volatile compounds from both cooked wet-aged and dry-aged beef qualitatively and quantitatively. The wet-aged beef from Japanese Black cow was prepared at 5°C for 30 days with vacuum packaging, whereas the dry-aged beef was prepared in an aging cellar designated for processing of dry-aged meat at 1°C at 73% humidity under 2 m/sec of wind speed for 42 days. Unfortunately, there is no difference in sensory profiles among the aging methods in this study. The detailed reason was not known, but it might due to the population of contaminating microbes on the meat. Volatile compounds isolated and identified in each aged beef are composed of the aldehydes and the ketones that are typically detected in cooked beef. The amounts of volatile compounds in the dry-aged beef were higher than those in the wet-aged one, although there is no difference in those compounds qualitatively. This would be caused by the accelerated oxidative reactions between concentrated solids in the dry-aged beef. The higher amount of volatiles could contribute to the production of aroma and flavor of dry-aged beef, but this would not be necessary to improve their palatability for consumers.

1. 目 的

近年、一部の消費者の間で「熟成肉」の評価が高まっている。インターネットなどの情報では、一般に流通している「熟成肉」は、その製造方法や製造条件に特別な定めはないものの、家畜のと殺後の熟成期間を比較的長くとったものを指す。「熟成肉」の中でも、真空包装技術が食肉流通に導入される以前のように、無包装で長期間冷蔵保存された乾燥熟成肉（ドライエイジング肉）は、

マスコミにより大きく紹介されたこともあり、ブームとなっている。

このような背景から、我々は保冷庫メーカーと協働して、衛生的な品質に配慮したドライエイジング牛肉の製造方法および同製品を製造するための専用保冷庫（セラー）の開発研究を実施してきた。一連の研究において、ドライエイジング牛肉の試作製造、成分分析を含めた品質評価、ならびに消費者型官能評価試験を繰り返し実施した結果、消費者が感じる官能特性については食感およ

び香りと風味の変化が主たるものであることなど
の知見を得た。

それに対して、食肉成分等の分析結果では、ドライエイジングを行うことにより遊離アミノ酸の量は劇的に増加するものの、それらの組成に大きな差異はなく、基本的な呈味特性に大きな違いがないこと、遊離アミノ酸の生成量に食肉の微生物（細菌および真菌類）の明確な影響は認められない、などの知見が得たところである。

これらの結果から、少なくとも消費者のレベルにおいて感知される長期熟成肉と一般的な食肉との相違点は、食感および香気成分であると推測した。そこで本申請課題では、食肉の香りに着目し、ドライエイジング牛肉およびウェットエイジング牛肉との比較を通して、ドライエイジング牛肉を特徴付けている香気成分を同定することを目標として実施した。

2. 方 法

供試材料に、黒毛和種経産牛のロース肉（サーイオン）を用いた。同一個体から得た左右のパートをそれぞれウェットエイジングあるいはドライエイジングに供した。ウェットエイジングは低密度ポリエチレン製の包材で真空包装した後、 $5 \pm 1^{\circ}\text{C}$ の冷蔵庫内でと畜日から30日後まで静置した。その後、分析と官能検査まで、包材に包装したまま -70°C で保存した。

ドライエイジングは、庫内環境を温度 $1 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $73 \pm 2\%$ 、風速 2 m/s に調節したドライエイジング・セラー試作機（フジキン社、都城市）内にと畜日から42日後まで静置した。その後、肉塊表面の乾燥した部分をトリミングし、可食部をウェットエイジング肉と同様に真空包装し、冷凍庫内で保存した。なお、ドライエイジング肉可食部は一般生菌、腸内細菌科菌群、真菌についての衛生検査を実施した後、官能検査

に供した。

官能検査は、宮崎県都城市内の一般消費者60名（年齢20歳代～60歳代、男性28名、女性32名）を対象にして、洋食店の店舗を借り上げて実施した。約2cm角のサイコロ状に整形した肉を、肉重量に対して0.4%の食塩で調味し、約 250°C に加温したグリルパンで加熱調理した。加熱後、直ちに評価者に提供し、香りの強さと好み、味の濃さと好み、食感の硬さと好みに関して評価するよう求めた。評価は10cmのラインスケールにより行い、最も低評価であることを意味する左端からの距離をノギスで測定し、数値化した。

香気成分の分析試料は、熟成肉を $1\text{ cm} \times 1\text{ cm} \times 3\text{ cm}$ に整形し、 220°C のオーブン内で中心温度が 74°C に達するまで加熱して調製した。加熱肉を直ちに樹脂包装に入れ密閉し、 30°C のインキュベーター中に1時間放置した後、包装中に揮散した香気成分を固相カラム（NeedlEx有機溶剤用、信和化工）に捕集した後、GC-MS分析を行った。

また、加熱肉の粗熱をとった後、包丁で細切り、ブレード型のホモゲナイザー（AM-7、日本精機製）を用いて氷冷下にジクロロメタンで抽出した。その後、抽出液を solvent assisted flavor evaporation (SAFE、桐山製作所製) にて揮発性成分の減圧蒸留を行った。蒸留物をジクロロメタンに再溶解し、クデルナ・ダニッシュ濃縮器で濃縮した後、GC-MS分析を行った。

GC-MS分析は、DB-WAX ($30\text{ m} \times 0.25\text{ mm} \phi$ 、膜厚 $0.25\text{ }\mu\text{m}$ 、J&D Scientific) を装着した GCMS-QP5050 (島津製作所製) により行った。分析条件は、キャリアガス、He；気化室温度、 200°C ；カラム温度、 $40 \sim 220^{\circ}\text{C}$ ($40 \sim 100^{\circ}\text{C}$ まで $5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、 $100 \sim 220^{\circ}\text{C}$ まで $10^{\circ}\text{C}/\text{分}$)；イオン化電圧、70eV；スキャンレンジ、33—400m/zとした。

3. 結果と考察

本研究で調製した熟成牛肉の官能評価結果をTable 1に示す。官能検査の結果では、熟成に伴う変化は主に肉の硬さについて検知され、ウェットエイジングを施した肉が有意に軟らかいと判断された。この点については、ウェットエイジング肉の水分含量が70%代であったのに対して、ドライエイジング肉の水分含量は60%まで低下していたことに起因すると考えられた。しかし、ドライエイジング肉の硬さの好ましさについては明確な差はなかったことから、水分含量の低下に伴う食感の変化は消費者の嗜好性に適わないものではないと考えられた。一方、「香り」や「味」の項目については、熟成方法の違いにより評価が若干向上する傾向が認められたが、その差異は明確なものではなかった。「総合的な好ましさ」についても特筆すべき差異は認められなかった。

また、本試験で調製したドライエイジング肉では、特徴的とされる「ナツツ臭」の発生も検知されなかった。ナツツ臭の発生には食肉上に発生する微生物、特に*Thamnidium*属（エダケカビ属）の関与が示唆されている¹⁾。一方で、本研究では、肉の衛生を担保できるよう、専用に開発したセラー（熟成庫）を用いてドライエイジング肉を製造したことが、特徴的な好気の生成を抑制した一

因であるかもしれない。ドライエイジング肉の好気への微生物の関与については不明な点が多く、その形成機構については今後も慎重に検討する必要があると考えられた。

本研究において、加熱した熟成肉のヘッドスペースから単離・同定できた揮発性物質は32種であり、主要なものをTable 2にまとめた。熟成方法の違いはアルデヒド類やケトン類の生成量に明確な影響を及ぼしていることが観察され、ドライエイジング肉ではこれらの化合物の検出量が総じて増加した。これらの化合物の多くは、加熱に伴うアミノーカルボニル反応や脂質酸化の進行により生成するものである。その要因として、ドライエイジング肉において水分含量が低下することにより相対的に固形分含量が増加したことが、加熱の際に起こる上記の酸化反応の速度に影響を及ぼしたものと推測された。

個々の化合物に注目した場合、ケトン類では2,3-butandione（ジアセチル）や3-hydroxy-2-butanone（アセトイン）の生成量がドライエイジング肉で増加した。これらは乳製品の好気や風味の形成に重要な役割を果たしている化合物であり、香料としても使用されている。牛肉においては、バター様の風味と関連していると古くから考えられている。

一方、アルデヒド類ではmethyl butanalや

Table 1 Consumer palatability scores of grilled beef

		Wet-aged	Dry-aged
Aroma	Intensity	45.1±23.0	46.5±21.1
	Liking	59.9±16.8	59.3±17.0
Taste	Intensity	61.7±19.1	64.0±16.7
	Liking	63.2±21.5	64.4±22.3
Texture	Hardness	34.3 ^a ±23.8	45.9 ^b ±21.7
	Liking	60.3±21.2	61.9±17.4
Overall liking		65.1±22.5	63.6±26.1

Values with different superscripts are significantly different ($p<0.05$)

Table 2 Major volatile compounds (ng/g sample) of cooked beef in the headspace

Volatile compound	Wet-aged	Dry-aged
<i>Aldehydes</i>		
Acetaldehyde	6.92 ± 1.79	8.73 ± 1.93
Butanal	0.22 ± 0.08	0.27 ± 0.06
Pentanal	2.80 ± 0.48	3.43 ± 0.34
Hexanal	102.0 ± 24.5	122.7 ± 19.1
Heptanal	1.44 ± 0.11	1.71 ± 0.35
Octanal	5.69 ± 0.29	6.38 ± 0.54
Nonanal	7.85 ± 0.37	11.87 ± 1.99
Decanal	0.66 ± 0.06	1.26 ± 0.20
2-Methyl butanal	89.91 ± 28.83	193.7 ± 56.2
3-Methyl butanal	3.88 ± 0.99	9.35 ± 3.21
Benzaldehyde	6.54 ± 0.82	6.80 ± 0.81
Phenyl acetaldehyde	6.31 ± 1.97	10.34 ± 5.19
Sum of aldehydes	249.8 ± 37.9	393.7 ± 59.8
<i>Ketones</i>		
2-Propanone	99.16 ± 7.47	91.02 ± 23.46
2,3-Butandione	93.24 ± 13.38	292.4 ± 37.6
2-Butanone	1009 ± 228	1104 ± 261
3-Hydroxy-2-butanone	319.5 ± 67.0	405.4 ± 76.5
Sum of ketones	1521 ± 238	1893 ± 275
<i>Sulfides</i>		
Dimethyl sulfide	42.82 ± 3.89	22.41 ± 6.73
Dimehyl disulfide	5.86 ± 0.61	14.46 ± 3.93
Sum of sulfides	48.67 ± 3.89	40.01 ± 7.80
<i>Pyrazines</i>		
2,5-Dimethyl-pyradine	159.4 ± 115.6	36.45 ± 25.26
Trimethyl-pyrazine	258.4 ± 331.1	118.6 ± 111.7
Sum of pyrazines	453.3 ± 350.7	167.5 ± 114.5
<i>Alkans</i>		
Heptan	6.96 ± 0.28	5.96 ± 2.04
Octan	1.78 ± 0.03	1.760.27
Sum of alkans	9.53 ± 0.28	8.39 ± 2.06

The data was shown as the average ± standard deviation of 3 samples.

phenyl acetaldehydeなどが、ドライエイジング肉において増加した。チョコレート、ナッツ類、チーズなどで典型的に検出されるmethyl butanalは麦臭、トースト臭、ナッツ臭、あるいはロースト臭などに関与すると考えられている。また、phenyl acetaldehydeは、日本で伝統的に食されているハツタケの青草臭や甘い臭いに関連すると報告されている²⁾。これらの化合物はストレッカーフィラメントにより生成することが知られており、イソロイシンやロイシン、あるいはフェニルアラニンから生成する。これらのアミノ酸は長期熟成を施した牛肉において顕著に増加する苦味系アミノ

酸であり、熟成肉の香りや風味の形成に一定の役割を果たしていると推測される。

加熱肉から溶媒抽出し、SAFE法により減圧蒸留して得た揮発性化合物のうち、今回、単離・同定できたものは、ヘッドスペース法より若干多い、39種類であった。その主要なものをTable 3に示す。SAFE法による分析では、ヘッドスペース法で検出された主要な揮発性成分に加えて、フラン類やラクトン類が検出された。これらの化合物は、ドライエイジング肉において増加する傾向が認められた。

ヘッドスペース法とSAFE法の結果を比較する

Table 3 Major volatile compounds (ng/g sample) extracted from cooked beef by SAFE

Volatile compound	Wet-aged	Dry-aged
<i>Aldehydes</i>		
Pentanal	10.07 ± 4.34	12.34 ± 4.79
Hexanal	259.9 ± 40.1	380.4 ± 45.5
Heptanal	3.74 ± 1.19	4.19 ± 0.93
Octanal	12.75 ± 5.17	14.28 ± 1.81
Nonenal	36.89 ± 6.02	50.20 ± 5.92
Decanal	7.81 ± 1.84	13.57 ± 4.75
2-Methyl butanal	425.9 ± 174.6	986.4 ± 75.2
3-Methyl butanal	16.48 ± 10.25	43.96 ± 4.33
Benzaldehyde	11.12 ± 1.98	13.59 ± 0.96
Phenyl acetaldehyde	50.47 ± 11.53	101.3 ± 18.5
Cyclobutanal	2.90 ± 0.16	2.52 ± 0.76
Sum of Aldehydes	892.9 ± 180.1	1676 ± 206
<i>Ketones</i>		
2-Butanone	102.7 ± 48.9	239.2 ± 37.1
3-Hydroxy-2-butanone	79.18 ± 23.6	97.76 ± 11.1
Sum of ketones	197.4 ± 42.7	336.9 ± 32.3
<i>Sulfides</i>		
Dimethyl sulfone	50.59 ± 1.04	31.56 ± 3.20
Sum of sulfides	52.18 ± 1.28	41.23 ± 5.40
<i>Pyrazines</i>		
Ethyl-3-phridinecarboxylate	206.7 ± 6.6	145.9 ± 10.2
<i>Furans</i>		
2-Phenyl furan	28.03 ± 5.31	40.44 ± 18.79
<i>Lactones</i>		
Butyllactone	58.01 ± 4.93	85.85 ± 13.16
γ-Pentalactone	51.93 ± 8.47	96.59 ± 16.30
δ-Pentolactone	6.31 ± 1.58	8.39 ± 2.31
γ-Nonalactone	125.4 ± 12.8	160.6 ± 30.79
Sum of lactones	243.1 ± 16.2	351.45 ± 37.31
<i>Alkans</i>		
Heptan	40.72 ± 11.72	33.60 ± 11.30
Octan	14.53 ± 1.86	12.56 ± 1.63
Nonane	0.24 ± 0.01	0.21 ± 0.01
Sum of alkans	60.21 ± 4.21	49.80 ± 5.38

The data was shown as the average ± standard deviation of 3 samples.

と、主要な成分に大きな違いは認められず、熟成方法を比較するうえでの分析手法の差異は認められなかった。SAFE法では食肉中に微量に存在し、かつ、比較的揮発性が低い化合物の検出において利点があると考えられた。一方で、食肉研究の領域ではまだ実施例が少なく、参照できる知見がほぼないことは本法の最大の弱点であると考えられる。それに対してヘッドスペース法は、広く食肉の好気分析の手法として用いられており、データの蓄積が多い。また、SAFE法と比較すると分析

そのものの実施は容易であり、かつ、揮発性の高い物質の検出においてはSAFE法よりも有利であると考えられた。しかしながら、鼻先で検知する揮発性の高い成分と咀嚼に伴い口中で揮発する低揮発性成分が相互に関与して食味が形成されることを考えると、今後、低揮発性成分に関するデータを蓄積していくことも重要であると考えられた。

以上の結果をまとめると、ドライエイジング肉に特徴的な揮発性成分を検出・同定することはできず、熟成方法による成分の差異はないものと考え

えられた。一方、ドライエイジング肉では揮発性物質の量が増加する傾向が認められた。このことは、肉の香りや味わいを深めることに寄与していると推測されるが、このことが直接、消費者の嗜好性や製品の受諾性に影響するわけでもないと判断された。今後もドライエイジング肉の試作と分析知見を蓄積し、熟成と食味の関連について検討を続けたい。

4. 要 約

ウェットエイジングおよびドライエイジングを施した牛肉に生じる揮発性成分の定性的あるいは定量的な差異を明らかにすることを目標として、本研究を実施した。今回調製した熟成肉の消費者型官能評価の結果、熟成法の違いによる好気の差異あるいは食味性の差異は検知されず、ドライエイジングにより香りがよくなるという一般的な認

識については課題が残された。熟成肉から単離・同定された揮発性化合物は、加熱した牛肉から一般的に検出されるストレッカーアルデヒド類やケトン類が主要なものであり、定性的には熟成法による影響は認められなかった。一方、揮発性化合物の量はドライエイジング肉で多くなり、このことがドライエイジング肉の食味性に何らかの影響を及ぼしていると推測された。

文 献

- 1) Kotula, K. L., Kotula, A. W. : Fresh Red Meat, In the Microbiological Safety and Quality of Food (ed by Lund BM. et al.), Aspen Publishers, Inc., ML, USA, 2000.
- 2) Miyazawa, M., et al. : Character impact odorants from wild mushroom (*Lactarius hatsudake*) used in Japanese traditional food, *Flavour Fragr. J.*, 25, 197 ~201, 2010.

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

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

山之上 稔¹・趙 姬楠¹・中田 悠介¹・上田 修司¹・
市村 さやか²・吉田 由香²・羽原 正秋³・池崎 秀和³

(¹神戸大学大学院農学研究科、²食肉科学技術研究所、³株式会社INSENT)

Minoru Yamanoue¹, Yanan Zhao¹, Yusuke Nakada¹, Shuji Ueda¹,
Sayaka Ichimura², Yuka Yoshida², Masaaki Habara³ and Hidekazu Ikezaki³

(¹Graduate School of Agricultural Science, Kobe University,
²Japan Meat Science and Technology Institute, ³INSENT, Inc.)

The aim of this study was to investigate the effects of changes in intramuscular free fatty acids (FFAs) during postmortem aging on taste-trait of water-soluble extracts (broth) of Japanese Black Wagyu beef. Changes in fatty acids composed of intramuscular fat are considered to contribute to beef aroma. However, the relationship between those changes and taste-trait of beef remains poorly understood. Recently, results from an electronic taste sensing system which determined taste-trait of meat and meat products have been reported by several researchers. In this study, effects of intramuscular FFAs on taste-trait in beef broth from boiled *longissimus thoracis* muscles of Holstein and Japanese Black Wagyu cattle at 21-days postmortem were investigated using the electronic taste sensing system and sensory evaluation. As the results, deliciousness of Japanese Black Wagyu beef broth was strongly suggested to relate to the increased amounts of intramuscular FFA, even though the amounts of taste substances such as inosic acid in Japanese Black Wagyu beef were less than those in Holstein beef. In Japanese Black Wagyu beef broth, richness shown in the results of taste-trait analysis and sensory evaluation coincided each other, so richness can be probably used as an index of deliciousness of Japanese Black Wagyu beef.

1. 目的

牛肉のおいしさは、熟成中に増加するペプチド、アミノ酸や核酸関連物質などの呈味物質に加えて、脂肪交雑として知られる筋内脂肪が風味や軟らかさなどの食味性に影響して変化する^{1~3)}。

筋内脂肪の影響では、わが国では脂肪交雑の多さが高品質の牛肉として評価されているが、同程度の筋内脂肪量の牛肉でもおいしさに優劣のあることが知られている。近年、筋内脂肪量だけでなく脂肪の質、すなわちトリアシルグリセロールの構成脂肪酸が牛肉の風味要因になることが示されて

いる¹⁾が、牛肉は長期間の熟成を経て加熱後に食されており、熟成および加熱で筋内脂肪が変化し、遊離脂肪酸（FFA）の量や組成に変化が起きている可能性がある。その解明のために平成23～26年度に伊藤記念財団からの研究助成を受けて、熟成および加熱前後の牛肉肉汁中の遊離脂肪酸の量および組成の変動を分析した^{4,5)}。その結果、食味性の良い黒毛和種牛肉では熟成に伴い肉汁中の遊離脂肪酸量が増加し、その組成は筋内脂肪であるトリアシルグリセロールの脂肪酸組成と異なることを見出した。

一方で、牛肉のおいしさに密接に関連するペプチド、アミノ酸や核酸関連物質などの呈味物質と併せて、味要素としての遊離脂肪酸の影響を明らかにするためには、それらの物質の総和で感知される味の評価が要求され、ヒトによる官能評価が現在ではもっとも有効な方法である。近年、食肉・肉製品の呈味性を客観的に評価する機器分析法の一つに、味覚センサを備える味認識装置⁶⁾を利用した報告例が増えている^{7～9)}が、味覚センサによる牛肉の呈味性評価では最適かつ統一された分析方法に課題が残されている。平成28年度に伊藤記念財団からの研究助成を受けて味覚センサによる呈味性分析に供するための最適なサンプル調製法を確立するために、種々の前処理方法で調製した肉汁サンプルの味覚センサ分析結果と消費者型官能評価の結果を比較した結果、煮出し法で調製した肉汁サンプルの味覚センサ分析値と官能評価が近似することを明らかにした¹⁰⁾。それを踏まえて本研究では、煮出し法で調製した黒毛和種牛肉肉汁サンプルを用いて味覚センサ分析および分析型官能評価による標準的な肉汁分析方法を試みるとともに、筋内遊離脂肪酸に関連する味の特徴を見出した。

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。牛肉試料は、伊藤ハム（株）食肉事業本部から購入した黒毛和種およびホルスタイン種枝肉の第6～7肋骨間のロース部を用いた。

2.2 熟成および加熱牛肉の調製

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無作為に採取した牛肉片を4 cm×5 cmの大きさで厚さ1 cmの肉片に整形した。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秒間加熱した。

2.3 煮出し肉汁サンプルの調製

熟成21日目に牛肉の各4 gを採取し、佐々木らの方法⁹⁾に従って調製した煮出し液から、低温固化による脂肪除去を行った煮出し肉汁サンプルを調製した。

2.4 核酸関連物質の定量

加熱牛肉の5 gを細切し、蒸留水中でホモジナイズ後の懸濁液をろ過し、加熱肉汁サンプルとした。ろ液に終濃度が80%になるようにエタノールを加え、室温で1時間静置後にろ過し、除タンパク質したろ液をロータリーエバポレーターで蒸留乾固した乾固物を5 mlの蒸留水に溶解し、サンプルとした。TSK gel ODS-100 V（東ソー株式会社）を装着したHPLC（日立L-6000シリーズ）に10 μlのサンプルをアプライ後、リン酸溶液で溶出し、波長254 nmで検出した。定量は同条件で分離した外部標準で行った。

2.5 FFA量の測定

加熱肉汁サンプル中のFFA量はNEFA C-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。測定方法は指示書に従い、オレイン酸を標

準に波長550nmにおける吸光度から検量線を作成した。

2.6 味覚センサ分析

と畜後21日目に胸最長筋から牛肉片を採取した。牛肉片から煮出し法で肉汁サンプルを調製し、6種類のセンサを備える味認識装置 (INSENT社, SA402B) で呈味性を分析した。

2.7 官能評価

と畜後21日目の牛肉から煮出し肉汁サンプルを調製し、訓練された5人のパネリストによってホルスタイン種牛肉肉汁に比較した黒毛和種牛肉肉汁の各味要素を7段階の評点法で評価した。

2.8 統計処理

黒毛和種およびホルスタイン種牛肉の肉汁サンプル間の結果の比較については、Studentのt検定により有意差検定を行った。

3. 結果と考察

黒毛和種牛をと畜後、4℃で7, 14, 21日間熟成後に加熱した牛肉から調製した加熱肉汁サンプル中の核酸関連物質質量を測定した結果をFig. 1に示す。ATPは検出されず、ADPおよびAMPは熟成7日目で100gの筋肉当たり0.451mgおよび1.84mgから熟成21日目で0.104mgおよび1.31mgへとごく微量の含量ながら、それぞれ減少する傾向であった。IMPは熟成7日目で100gの筋肉当たり28.3mg、熟成14日目で8.96mg、熟成21日目で1.52mgと熟成日数の経過に伴い減少した。一方で、ヒポキサンチンは熟成7日目で100gの筋肉当たり10.6mg、熟成14日目で17.7mg、熟成21日目で18.4mgと熟成日数の経過に伴い増加した。黒毛和種の加熱肉汁サンプルで検出されたADP、AMP、IMP、イノシンおよびヒポキサンチンの5種の核酸関連物質の中で、ADP、AMPおよびIMP量は熟成日数の経過に伴って減少する傾向であり、ヒポキサンチン量は増加する傾向であつ

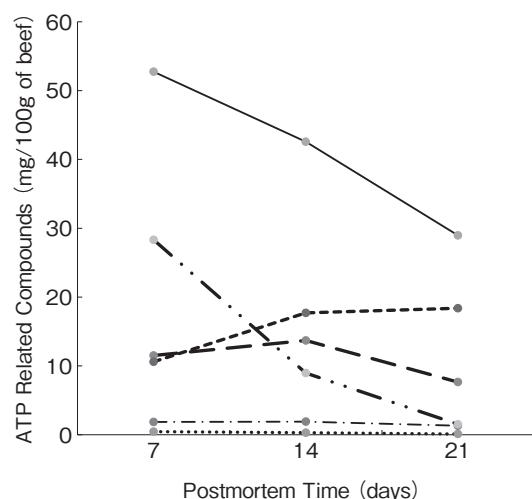


Fig. 1 Changes in ATP related compounds of soluble extracts (broth) prepared from cooked Japanese Black Wagyu beef during postmortem aging.
Total (—) : ADP (···) : AMP (- - -) : IMP (- - - -) : HxR (— —) : Hx (---). (n=5).

た。この結果は、日本短角種牛肉をと畜後4℃で10日間保存し、その間の核酸関連物質質量の変化を調べたこれまでの報告に一致した¹¹⁾。6種類の核酸関連物質質量を合わせた核酸関連物質総量は、熟成7日目で100g筋肉当たり52.7mgから熟成21日目で29.0mgと熟成日数の経過に伴いほぼ半減した。

ホルスタイン種および黒毛和種の加熱肉汁サンプル中に含まれるIMP量はいずれも熟成に伴い減少した (Fig. 2)。両品種間のIMP量の変化を比較すると、ホルスタイン種肉汁のほうが黒毛和種のものよりもIMP量が多い傾向で、熟成14日目と21日の牛肉から調製した両品種の肉汁サンプル間に有意差が認められた ($p<0.05$)。またホルスタイン種および黒毛和種の加熱肉汁サンプル中に含まれるヒポキサンチン量はいずれも熟成に伴い増加する傾向 (Fig. 3) で、両サンプル間のヒポキサンチン量を比較すると、ホルスタイン種肉汁サンプル中のヒポキサンチン量が黒毛和種牛肉のそれよりも多い傾向であったが、両品種間に有意

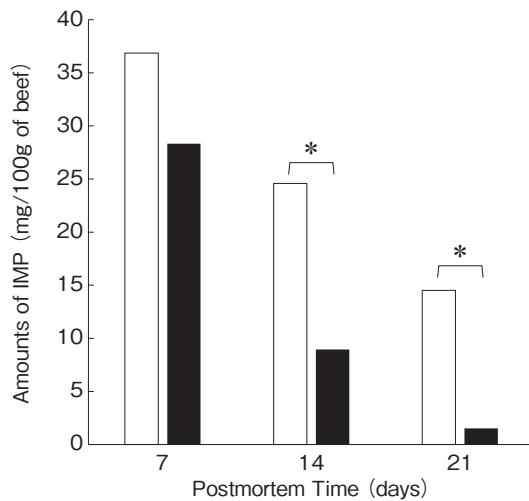


Fig. 2 Changes in the amounts of IMP in Japanese Black Wagyu and Holstein beef broth during postmortem aging.

Japanese Black Wagyu beef broth, ■: Holstein beef broth, □.

*p<0.05 between bovine breeds (n=4).

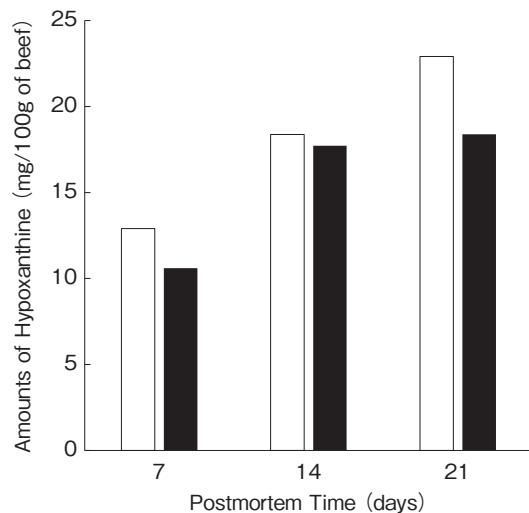


Fig. 3 Changes in the amounts of hypoxanthine in Japanese Black Wagyu and Holstein beef broth during postmortem aging.

Japanese Black Wagyu beef broth, ■: Holstein beef broth, □. (n=4).

差はなかった。これらの核酸関連物質がホルスタイン種牛肉で多い理由は、黒毛和種牛肉に比べて筋内脂肪量が少ないことが考えられる¹²⁾。ヒポキサンチンは苦味を呈することが知られており、市

村ら¹³⁾はヒポキサンチンが塩漬肉の味の強さを濃度依存的に高めることを報告している。このヒポキサンチン量の熟成による増加が牛肉に苦味を与えると同時に味の強さを高めることで、熟成による牛肉呈味性の向上に寄与している可能性が考えられる。

ホルスタイン種牛肉の加熱肉汁サンプル中のFFA量は、熟成7日目で100 g の筋肉当たり4.37mgであり、熟成21日目で4.41mgでわずかに増加する傾向であったが熟成による有意差は見られなかった (Fig. 4)。黒毛和種牛肉の加熱肉汁サンプル中のFFA量は熟成7日目で100 g の筋肉当たり5.45mgで、熟成21日目に5.98mgへと増加する傾向であったが、有意差は見られなかった。一方、両品種間のFFA量を比較すると、ホルスタイン種牛の加熱肉汁サンプルに比べて筋内脂肪量が多い黒毛和種牛サンプルのFFA量が多い傾向であり、熟成21日目では両品種間に有意差が認められた (p<0.05)。

熟成21日目で採取後の黒毛和種牛肉から煮出し肉汁サンプルを調製し、呈味性を味覚センサで調べた (Fig. 5)。その結果、ホルスタイン種の熟成21日の煮出し肉汁サンプルをコントロールとしたとき、黒毛和種牛肉の煮出し肉汁サンプルでは苦味雜味、渋味刺激および旨味コク値は高値で、旨味および甘味値は低値であることが示された。味覚センサ値で高値であった苦味雜味、渋味刺激および旨味コク値のBMS No.による変化を見ると、筋内脂肪量の増加に伴いそれらの味要素は増加することが分かった (data not shown)。熟成21日の煮出し肉汁サンプルを分析型官能評価で調べた結果、Fig. 5に破線で示すように黒毛和種牛肉の煮出し肉汁サンプルではホルスタイン種牛肉より旨味コク値は高値で、味覚センサ分析結果と類似した結果であった。しかし味覚センサ分析で低値であった旨味および甘味値もまた高値であ

り、ヒトの感覚ではホルスタイン種牛肉に比べて黒毛和種牛肉が味のバランスが良く、よりおいしいことを示唆する結果であった。味覚センサ分析

結果と官能評価の相違の理由は、味要素を検出する各センサの特性によるものと考えられる。味覚センサを備える味認識装置による分析と分析型官能評価で一致する味要素は旨味コク値であることが明らかになった。

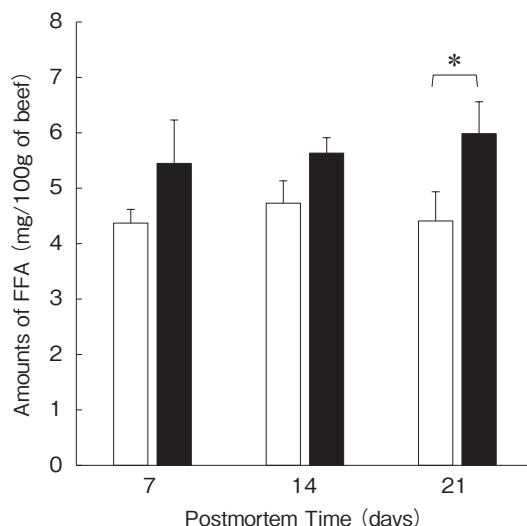


Fig. 4 Changes in the amounts of FFA in Japanese Black Wagyu and Holstein beef broth during postmortem aging.

Japanese Black Wagyu beef broth, ■; Holstein beef broth, □.

* $p<0.05$ between bovine breeds ($n=4$).

4. 要 約

本研究の目的は、熟成後に加熱された黒毛和種牛肉から抽出した水溶性抽出物（肉汁）の呈味性に及ぼす筋肉内遊離脂肪酸（FFA）の影響と呈味の特徴を明らかにすることであった。これまで筋肉内脂肪を構成する脂肪酸は牛肉の香りに影響することが報告されているが、牛肉におけるそれらの変化と呈味性の関係は十分によく理解されていない。近年、味覚センサを備える味認識装置を用いて食肉および肉製品の呈味性を調べた報告がなされているが、本装置で熟成後21日目に加熱した黒毛和種牛肉から調製した肉汁サンプルの味の特徴を調べ、比較のために訓練されたパネリストによる官能評価を行った。その結果、イノシン酸

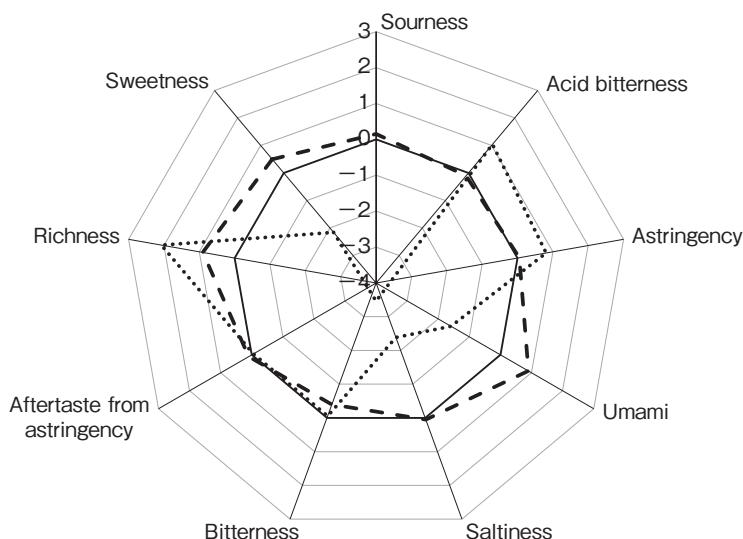


Fig. 5 Comparison of taste-trait between Japanese Black Wagyu and Holstein beef broth at 21-days postmortem by an electronic taste sensing system and sensory evaluation as control of Holstein beef broth.

Japanese Black Wagyu beef broth, dotted and broken lines ($n=4$) : Holstein beef broth, solid line ($n=2$). Electronic taste sensing system (.....) ; sensory evaluation (—).

のような呈味物質は少ないが筋内脂肪の多い黒毛和種牛肉では、旨味コク値がホルスタイン種牛肉サンプルに比べて両分析法でともに高値で検出された。またそれは筋肉内FFAの増加に関連していた。味覚センサによる旨味コクの分析値が牛肉のおいしさの指標になる可能性がある。

文 献

- 1) Westerling, D. B., Hedrick, H. B. : *J. Anim. Sci.*, **48**, 1343~1348, 1979.
- 2) Melton, S. L., Amiri, M., Davis, G. W., Backus, W. R. : *J. Anim. Sci.*, **55**, 77~87, 1982.
- 3) Mandell, I. B., Buchanan-Smith, J. G., Cambell, C. P. : *J. Anim. Sci.*, **76**, 2619~2630, 1998.
- 4) 山之上稔・西田昌弘・上田修司・井原一高・豊田淨彦：平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **32**, 27~33, 2014.
- 5) 山之上稔・西田昌弘・趙姫楠・上田修司・井原一高・豊田淨彦：平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **33**, 116~120, 2015.
- 6) Toko, K. : *Mat. Sci. Eng. C*, **4**, 69~82, 1996.
- 7) Sasaki, K., Tani, F., Sato, K., Ikezaki, H., Taniguchi, A., Emori, T., Iwaki, F., Chikuni, K., Mitsumoto, M. : *Sensor. Mater.*, **17**, 397~404, 2005.
- 8) Chikuni, K., Oe, M., Sasaki, K., Shibata, M., Nakajima, L., Ojima, K., Muroya, S. : *Anim. Sci. J.*, **81**, 600~605, 2010.
- 9) Nodake, K., Numata, M., Kosai, K., Kim, Y. J., Nishiumi, T. : *Anim. Sci. J.*, **84**, 613~621, 2013.
- 10) 山之上稔・趙姫楠・西田昌弘・上田修司・羽原正秋・池崎秀和：平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **35**, 61~66, 2017.
- 11) Watanabe, A., Tsuneishi, E., Takimoto, Y. : *J. Food Sci.*, **54**, 1169~1172, 1989.
- 12) Suzuki, K., Shioura, H., Yokota, S., Katoh, K., Roh, S., Iida, F., Komatsu, T., Syoji, N., Sakuma, H., Yamada, S. : *Anim. Sci. J.*, **88**, 421~432, 2017.
- 13) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : *Anim. Sci. J.*, **88**, 379~385, 2017.

食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチン の影響（Ⅱ）

Effect of hypoxanthine on the improvement of taste during postmortem aging of meat (Ⅱ)

市村 さやか・高橋 真佐郎・中村 幸信・吉田 由香・猪口 由美・服部 昭仁*

(一般社団法人食肉科学技術研究所, *北海道大学)

Sayaka Ichimura, Masao Takahashi, Yukinobu Nakamura,
Yuka Yoshida, Yumi Inoguchi and Akihito Hattori*

(Japan Meat Science and Technology Institute, *Hokkaido University)

It is well known that taste of meat is improved by aging. We have already reported that hypoxanthine (Hx) is essential for the improvement of meat taste during aging. In this study, we focused on the bitter taste inherent to Hx, to clarify the role of Hx in the improvement of meat taste.

First, the effects of some bitter substances (Hx, Arginine and quinine sulfate) on meat taste were examined using the soup prepared from pork aged for 7days by sensory evaluations. The sensory analyses showed that the strength of umami and kokumi tastes (thickness and continuity) of the soup was enhanced by all the bitter substances added. However, as the concentrations of these bitter substances were increased, resulting in the stronger bitter taste of the soup, the effect of bitter substances on the enhancement of umami and kokumi tastes was lost.

Subsequently, we carried out the preliminary trials to ascertain whether the ratio of the concentration of Hx and inosine monophosphate (IMP), which was a precursor of Hx, was involved in the enhancement of the strength of umami and kokumi tastes. The results from the trials showed that the strongest umami and kokumi tastes were evoked by the survival of nearly equal amounts of IMP and Hx in the soup, and suggested that the strength of umami and kokumi tastes was enhanced by the interaction of Hx with umami substances.

Furthermore, the enhancement of tastes by interaction between Hx and umami substances was examined in 0.5% NaCl solution, to eliminate the influence of intrinsic components of meat on umami and kokumi tastes. The sensory analyses showed that the interaction between Hx and glutamic sodium (Glu) brought about the enhancement of umami and kokumi tastes and the suppression of bitter taste. On the other hands, there was little enhancement by the mixture of Hx and IMP, unless the concentration of IMP was higher than one of Hx. Actually, IMP was gradually degraded to Hx during aging of meat. Therefore, Hx and Glu might be necessary for the improvement of meat taste during aging.

1. 目的

食肉の熟成は、と畜後に硬直した筋肉の軟化を主たる目的としているが、同時に熟成によって風味が改善することも知られており、現在では食品としての「おいしさ」を獲得するために行われている。この風味の改善は、熟成に伴う酸臭や獣臭の消失、アミノ酸や低分子ペプチドの増加等が関与することが報告されている^{1, 2)}。また、近年では食肉のコクについての研究が進んでおり、スープ全体にまろやかさや厚みのある酸味を付与するペプチドについて報告されている³⁾。しかしながら、熟成肉特有の風味は複雑な化学的・生物的反応によって制御されており、全容は解明されていない。

我々は、これまで熟成に伴う食肉の味の改善機構を解明することを目的として、食肉中に含まれる呈味物質の一つである核酸関連物質の変動と官能評価の関係を中心に研究を進めてきた。食肉中のATPは、と畜直後にすみやかに分解され、旨味物質として広く認知されているイノシン酸(IMP)となって蓄積し、その後の熟成によってさらに分解されてヒポキサンチン(Hx)に変換する。我々は、平成28年度の本助成研究において、畜種に関係なく、長期間の熟成により旨味およびコク味が顕著に増強した試料にはIMPはほとんど含まれず、Hxが多く蓄積していることを報告した⁴⁾。さらに、豚肉から調製したスープにHxの濃度を変えて加えると、一定の濃度まではHxの濃度に依存してスープの旨味およびコク味が増強することを報告した⁴⁾。これらの結果は、食肉の味の改善にHxが関与している可能性を強く示している。また、食肉のみならず、ハムやソーセージといった塩漬食肉製品においても、塩漬熟成の過程で顕著に増加する呈味成分の一つがHxであり、塩漬肉特有の味の増強にHxが必須であるこ

とも明らかにしている⁵⁾。

しかし、Hxについては、これまで味の観点からの研究報告はほとんどなく、食肉の味に関与する物質としては否定的な見解であるTikkiらの報告があるのみである⁶⁾。Hxは苦味を呈し、その閾値は0.73 μmo/mlと報告されている⁷⁾。一般に、苦味は好ましくない味として捉えられているが、近年では食品によっては嗜好性に寄与するとの報告も少なくない^{8, 9)}。そのため、Hxの呈する苦味が食肉に含まれる様々な物質と作用し、結果として熟成肉特有の味を形成する可能性がある。今後、食肉の熟成に伴う風味の改善におけるHxの関与機構が明らかにされれば、食肉の熟成適期およびおいしさを判断する新たな指標を提示することも可能となる。

そこで、本研究では熟成肉特有の味へのHxの呈する苦味の関与について明らかにするため、豚肉から調製したスープを用いて旨味およびコク味の増強に対する苦味の影響を官能試験により調べた。また、これまで食肉の味においてグルタミン酸と並んで主要な役割を担うと考えられてきたHxの前駆体であるIMPの関与を明らかにするため、豚肉スープにIMPおよびHxを加え、旨味およびコク味の変化と両者の濃度比の関係を予備的に調べた。さらに、食肉由来の成分の影響を排除し、0.5%NaCl溶液にHxとIMPおよびグルタミン酸ナトリウム(Glu)を混合した時の味に変化についても調べた。

2. 方 法

2.1 豚肉スープの調製

と畜後2日間経過した冷蔵豚肉ロース4本(LWD種)の胸最長筋を挽肉にして混合し、4℃で5日間熟成した。熟成後の挽肉を非通気性の袋(S-WRAP, Star Plastic Industry Inc.)に入れて沸騰水中で20分間加熱した後、氷水で冷却した。

生じたドリップを回収し、10,000 g、30分間、4℃で遠心分離して得られた上清を5 Aろ紙でろ過したろ液を豚肉スープとし、使用するまで真空状態で-30℃で保管した。

2.2 豚肉スープの成分分析

2.1で調製した豚肉スープの窒素濃度を燃焼法で（スミグラフ NC-220F、（株）住化分析センター製）、pHをガラス電極を用いて（PH-METER F52、HORIBA製）、核酸関連物質の濃度を北田らの方法で測定した¹⁰⁾。また、遊離アミノ酸濃度は、試料に蒸留水および10%スルホサリチル酸溶液を加えてホモジナイズ後に遠心分離し、得られた上清をヘキサン洗浄したものを高速アミノ酸分析計（L-8900、（株）日立ハイテクサイエンス社製）で測定した。

2.3 官能試験

試験1. 苦味物質添加による豚肉スープの味の増強

2.1で調製した豚肉スープを内在するHx含量が苦味閾値以下の0.5 μmol/mlとなるように超純水で希釈した後、NaClが0.5%になるように加えてコントロールとした。苦味物質としてHx、アルギニン(Arg)および硫酸キニーネ(Qui)を次の濃度になるようにコントロールに加えて官能試験に供した。Hx: 0.8(閾値相当), 1.6および3.2 μmol/ml, Arg: 0.05(閾値相当), 0.1および0.2%, Qui: 0.0025, 0.005(苦味識別テスト相当)および0.01 μmol/ml。室温にした各試料を試飲カップに5 ml入れて2カップずつランダムに提供した。なお、試験は2回実施した。

官能試験の評価項目は、基本五味およびコク味とした。コク味は黒田らおよび西村らの定義を用い、厚み(thickness)は「味が濃い、こってりしている」、持続性(continuity)は「旨味の後味」をそれぞれ評価した^{11, 12)}。評価の方法は採点法とし、評価の尺度は7段階で、コントロールと

比較して非常に強い場合に+3、強い場合に+2、やや強い場合に+1、同じ強さの場合に0、やや弱い場合に-1、弱い場合に-2および非常に弱い場合に-3点とした。パネルは、味覚識別テストならびに熟成期間の異なる豚肉から調製したスープを用いた訓練を実施した当研究所に所属する分析型パネル（33±5.6歳、男性2名、女性3名）とした。なお、香りの影響を極力排除するため、鼻腔を閉じた状態で評価した。

試験2. 豚肉スープの味の増強とヒポキサンチンおよびイノシン酸の濃度比の関係

2.1で調製した豚肉スープを内在するHx含量が0.3 μmol/ml、IMP含量が2.0 μmol/mlとなるように超純水で希釈した後、NaClが0.5%になるように加えてコントロールとした。コントロールにIMPおよびHxを次の濃度になるように加え、試験1と同様に官能試験に供した。Conc.1: Hx 1.6 μmol/ml, conc.2: IMP 4.0 μmol/ml, conc.3: Hx 1.6 μmol/ml・IMP 4.0 μmol/ml, conc.4: Hx 4.0 μmol/ml・IMP 4.0 μmol/ml。なお、試験回数は1回のみとした。

試験3. ヒポキサンチンと旨味物質の相互作用

IMPを2.0 μmol/mlあるいは4.0 μmol/ml含む溶液に、Hxが0, 0.7, 1.6, 4.0および8.0 μmol/mlになるように加えて官能試験に供した。また、Gluを0.2%含む溶液にも同様にHxを加えて官能試験に供した。なお、すべての試料には豚肉スープと同様に0.5%になるようにNaClを加え、試飲カップに5 ml入れて2カップずつ、Hxの濃度が薄い方から順に提供した。試験回数は1回とした。

官能試験の評価項目は、塩味、苦味、旨味およびコク味(濃厚感および持続性)とした。評価の方法は採点法とし、評価の尺度は6段階で、まったく感知しない場合は0、非常に弱く感知した場合に+1点、弱く感知した場合に+2、感知した場合に+3、強く感知した場合に+4および非常

に強く感知した場合に +5とした。パネルは試験1と同様の5名とした。

2.4 統計処理

すべての官能試験の結果はパネル5名の平均値で算出した。また、試験1についての統計学的有

意差検定はt検定を用いて行い、有意水準は5%とした。

3. 結果と考察

3.1 豚肉スープの成分分析

豚肉スープに含まれる遊離アミノ酸および核酸関連物質等の分析結果をTable 1に示した。調製したスープにはHxが $0.97\text{ }\mu\text{mol/ml}$ 含まれていた。そのため、官能試験に用いる際には内在性のHx含量を考慮してHxの苦味閾値を下回るように超純水で希釈してから使用することとした。

3.2 苦味添加による豚肉スープの味の増強

Hxの特質の一つである苦味が豚肉スープの旨味およびコク味の増強に関与するかどうかを明らかにするため、豚肉スープに代表的な苦味物質を加えて官能試験に供した際の味の変化を評価した。加えた苦味物質は、研究対象であるHxの他に、食肉中に含まれ、かつホタテ貝のコクの主要因子とされるアルギニン⁹⁾および官能パネルに対して苦味の識別テストに用いられる硫酸キニーネとした。なお、コントロールとして苦味物質不添

Table 1 Profile of the pork soup

	pH	6.142
	nitrogen (mg/100ml)	768.7
	Na (%)	0.084
free amino acids (mg/100ml)	Asp	7.2
	Thr	10.1
	Ser	13.6
	Glu	14.7
	Gly	14.6
	Ala	32.9
	Val	11.1
	Cys	0.0
	Met	7.5
	Ile	8.8
	Leu	15.8
	Tyr	9.9
	Phe	7.6
	Trp	2.3
	Lys	14.4
	His	4.7
	Arg	12.5
	Pro	4.9
ATP-related compounds ($\mu\text{mol/ml}$)	IMP	3.30
	INO	2.47
	Hx	0.97

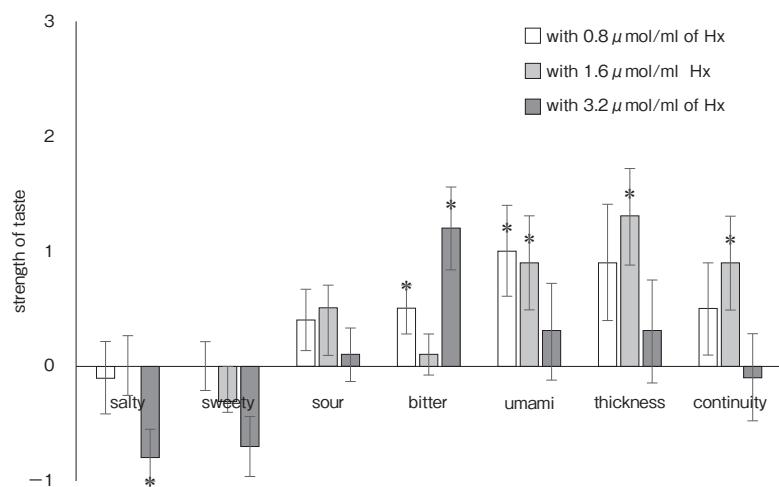


Fig. 1 Effect of hypoxanthine (Hx) on the taste of soup prepared from pork
The strength of taste of soups with addition of Hx were compared with that of soup without addition of Hx. Histograms show mean values. The values of asterisks are significantly different ($p < 0.05$).

加の豚肉スープを用いた。

まず、Hxを加えた豚肉スープの評価結果をFig. 1に示した。加えたHxの濃度は内在性の $0.5 \mu\text{mol}/\text{ml}$ を考慮し、閾値程度の0.8、その2倍の1.6および4倍の $3.2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の3段階とした。評価の結果、Hxが0.8および $1.6 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の場合、コ

トロールと苦味の強さはほとんど変わらずに旨味および濃厚感のみ増強した ($p < 0.05$)。さらに、 $1.6 \mu\text{mol}/\text{ml}$ では持続性も有意に増強した ($p < 0.05$)。また、 $3.2 \mu\text{mol}/\text{ml}$ の場合はコントロールよりも苦味をやや強く感知し、旨味およびコク味の増強は確認できなかった。この結果は、Hxが

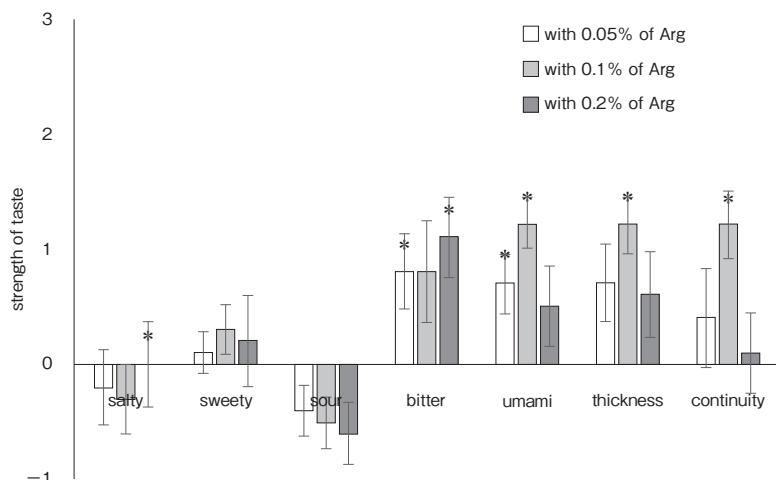


Fig. 2 Effect of arginine (Arg) on the taste of soup prepared from pork
The strength of taste of soups with addition of Arg were compared with that of soup without addition of Arg. Histograms show mean values. The values of asterisks are significantly different ($p < 0.05$).

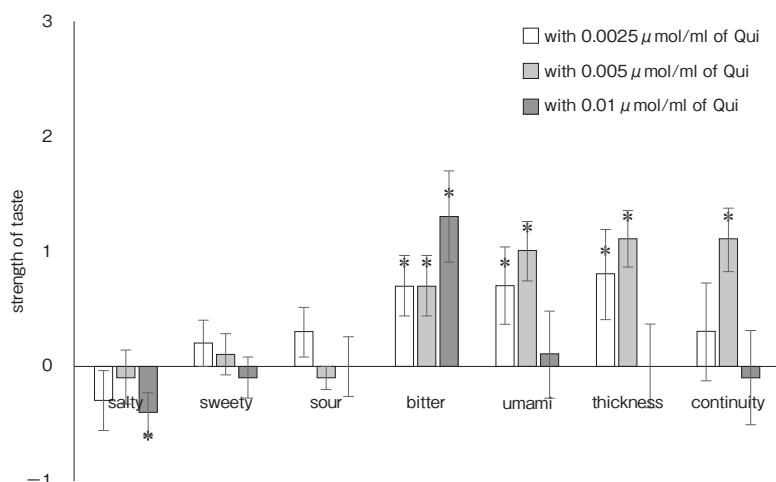


Fig. 3 Effect of quinine sulfate (Qui) on the taste of soup prepared from pork
The strength of taste of soups with addition of Qui were compared with that of soup without addition of Qui. Histograms show mean values. The values of asterisks are significantly different ($p < 0.05$).

ある一定の濃度までは豚肉スープの旨味、濃厚感および持続性が増強するが、Hxの濃度が高すぎると旨味およびコク味が増強しないことを示し、平成28年度の本助成研究結果とも一致した⁴⁾。

続いて、Argを加えた豚肉スープの評価結果をFig.2に示した。加えたArgの濃度はHxと同様に内在性の0.0065%を考慮して0.05（閾値相当）、0.1および0.2%の3段階とした。評価の結果、Argが0.05および0.1%の場合、コントロールと苦味の強さはほとんど変わらずに旨味が増強した（ $p < 0.05$ ）。さらに、0.1%では濃厚感および持続性が有意に増強した（ $p < 0.05$ ）。また、0.2%の場合、Hxを3.2mol/ml添加した場合と同様にコントロールよりも苦味をやや強く感知し、旨味およびコク味の増強は確認できなかった。

豚肉スープにQuiを加えた場合についても、HxおよびArgと同様に苦味をほとんど感知しない程度の濃度では豚肉スープの旨味およびコク味が増強する一方で、Quiを0.01 μmol/ml加えると苦味をやや強く感知し、旨味およびコク味の増強は確認できなかった（Fig.3）。

以上の結果は、苦味物質の種類にかかわらず、それ自体の呈する苦味をほとんど感知しない程度の量を豚肉スープに加えた場合、豚肉スープの旨味およびコク味が増強することを示している。さらに、コク味に関しては、ある一定の濃度までは

豚肉スープに加えた濃度に依存して増強することが確認された。一方で、苦味自体をやや強く感知する濃度を豚肉スープに加えると、味のバランスが崩れて苦味が突出してしまい、旨味およびコク味は増強しないことも明らかになった。我々は、H27年度の本助成研究において、食肉に亜硝酸塩等を加えて塩漬熟成した際の旨味およびコク味の増強について、本研究と同様にHxおよび苦味物質（カフェインおよび硫酸キニーネ）の関与を調べている。その結果、苦味の種類にかかわらず、一定の濃度の苦味は塩漬肉の旨味およびコク味を増強する可能性が示唆されており、本研究の結果とも一致した¹³⁾。すなわち、塩漬の有無にかかわらず食肉の熟成に伴う旨味およびコク味の増強機構の一つとして、Hxの呈する苦味が関与することが示唆された。

3.3 豚肉スープの味の増強とヒポキサンチンおよびイノシン酸の濃度比の関係

これまで豚肉スープの旨味およびコク味の増強へのHxの呈する苦味の関与について調べてきた。一方で、Hxの前駆体のIMPは、従来食肉の味への寄与が大きいと考えられており、その存在も否定できない。そこで、豚肉スープの旨味およびコク味が最も強く発現するHxおよびIMPの濃度比が存在すると仮定し、調製した豚肉スープにHxあるいはIMPを加えて官能評価し、両者の濃度比

Table 2 Effect of hypoxanthine and IMP on the taste of soup prepared from pork

	concentration of ATP-related compounds (μmol/ml)			strength of taste			
	Hx	IMP	salty	umami	bitter	thickness	continuity
control	0.3	2.0	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
conc.1	1.6	2.0	-0.20	1.20	0.40	1.20	1.80
conc.2	0.3	4.0	-0.20	0.80	0.60	1.00	1.80
conc.3	1.6	4.0	0.00	1.00	0.60	0.80	1.00
conc.4	4.0	4.0	0.40	1.60	0.60	1.20	1.80

Table 3 Effect of concentrations of hipoxantine on the strength oftaste by IMP or Glu.

	addition of Hx (μmol/ml)	salty	umami	bitter	thickness	continuity
IMP 2.0μmol/ml	0.0	2.4	3.0	0.0	1.6	1.6
	0.7	3.0	3.0	1.0	1.2	0.8
	1.6	3.0	2.2	0.8	1.0	1.0
	4.0	3.0	3.0	2.4	2.4	3.0
	8.0	3.0	3.0	2.4	2.2	1.8
IMP 4.0μmol/ml	0.0	2.4	3.2	0.0	2.0	2.5
	0.7	2.4	3.0	1.0	1.8	2.2
	1.6	2.6	3.2	0.8	2.4	2.0
	4.0	3.2	3.4	1.0	2.4	2.8
	8.0	2.8	3.4	1.8	2.8	2.4
Glu 0.2%	0.0	2.40	3.00	0.00	1.60	1.60
	0.7	2.20	3.60	0.60	1.80	2.80
	1.6	2.40	3.40	0.60	2.40	3.20
	4.0	2.20	3.40	2.00	3.00	3.20
	8.0	2.00	2.80	2.00	3.20	2.40

について予備的に検討した。なお、コントロールはHxおよびIMP不添加の豚肉スープとした。

HxあるいはIMPを加えた豚肉スープの評価結果をTable 2に示した。まず、conc. 1でHxのみを1.6 μmo/mlになるように加えた場合、Fig. 1で示した結果と同様にコントロールと比較して旨味、濃厚感および持続性が増強した。続いて、conc. 2でIMPのみ4.0 μmo/mになるように加えた場合、conc. 1のHxのみ添加と同様に旨味、濃厚感および持続性の増強が確認されたが、conc. 1よりは旨味および濃厚感の増強程度がやや低い傾向だった。さらに、conc. 3および4でHx、IMPの両者を濃度比を変えて加えた場合、いずれもコントロールと比較すると旨味およびコク味の増強が認められたが、conc. 4のHx、IMPともに4.0 μmo/mlになるように加えた場合の方がconc. 3のHxが1.6、IMPが4.0 μmo/mlよりも強く、また、conc. 1のHxが1.6、IMPが2.0 μmo/mlの時と同程度であった。つまり、濃度にかかわらず、Hxと

IMPの両者が等量程度の割合でスープに含まれた場合に最も旨味およびコク味が強い傾向を示した。一方、conc. 1とconc. 3の比較により、Hxが1.6 μmo/mlの時にIMPの濃度を高くしても旨味およびコク味に変化がなく、Hxが一定量存在する場合は、IMPの旨味およびコク味の増強への寄与が低いことが示唆された。以上の結果は、Hxが単に食肉の旨味およびコク味を増強するのではなく、食肉に内在するIMPあるいは旨味物質と相互作用して好ましい味わいが形成する可能性を示す。

3.4 ヒポキサンチンと旨味物質の相互作用

Hxと旨味物質の相互作用を調べるため、食肉由来の成分の影響を排除し、0.5%NaCl溶液にHxとIMPあるいはGluのみを混合した時の味の変化を予備的に調べた。

官能試験の結果をTable 3に示した。まず、IMP2.0 μmol/ml溶液にHxを混合した場合、Hxが1.6 μmo/mlまではHxの影響をほとんど受けずにIMP自身の旨味およびコク味が評価された。一

方、Hxを4.0 μmo/ml以上加えると、Hx不添加の場合よりも濃厚感および持続性が増強する傾向を示した。また、IMP4.0 μmo/ml溶液にHxを混合した場合、Hxが4.0 μmo/mlまではHxの影響をほとんど受けないが、Hxを8.0 μmo/ml加えるとHx不添加より濃厚感がやや増強する傾向を示した。したがって、IMPの濃度にかかわらず、HxがIMPよりも多く存在する場合に濃厚感を強く感じる傾向が認められた。反対に、塩味、旨味および持続性についてはIMPが2.0, 4.0 μmo/mlいずれの場合もHxによる増強を確認できなかった。また、結果は示していないが、0.5%NaCl溶液にHxのみを4.0 μmo/ml加えたときの苦味の強さは3.0であり、IMPがHxの呈する苦味を抑制する可能性が示唆された。

続いて、Glu0.2%溶液にHxを混合した場合、Hxが4.0 μmo/mlまでは旨味が増強する傾向であるが、それ以上加えると増強しない傾向にあり、また、濃厚感および持続性は、混合するHxの濃度に依存して増強する傾向を示した。なお、Hxの混合により苦味も強くなるが、その程度は弱く、IMPと同様にGluがHxの呈する苦味を抑制する可能性が示された。すなわち、0.5%NaCl溶液中でGluとHxを混合すると、旨味、濃厚感および持続性が増強し、Hx自体の呈する苦味は抑制されることが示された。

実験3.2で豚肉スープにおけるHxおよびIMPの濃度比とスープの味の関係を予備的に調べた結果、両者が等量程度の割合で含まれた場合に旨味およびコク味の増強が顕著であった。しかし、実際の食肉においては熟成に伴いIMPはほとんど消失するため、HxとIMPが等量の状態になる可能性は低い。一方で、熟成に伴うタンパク質の分解により、IMPと同様に旨味を呈すGluも熟成前の数倍量にまで増加する。本実験において、Hxとの混合により旨味およびコク味の増強が顕著で

あったのはIMPよりもGluであり、少なくとも熟成肉特有の味の発現にはHxおよびGluが必須であると考えられる。また、実験3.1で、食肉の熟成に伴う旨味およびコク味の増強機構の一つとして、Hxの呈する苦味が関与することが示唆された。実際の食肉においては熟成に伴いHx以外にもアミノ酸やミネラル等の様々な苦味物質が蓄積していると考えられる。しかし、Hxの苦味閾値はアルギニンやロイシン等のアミノ酸と比較するときわめて低く^{9, 14)}、なおかつ長期間の熟成によって閾値の数倍量まで食肉中に蓄積する⁴⁾。すなわち、Hxが食肉の熟成に伴う味の増強に必要な苦味の主要な役割を担う可能性がある。

今後、HxとIMPおよびGluの相互作用を追求し、熟成肉特有の好ましい味わいの形成機構を解明することにより、「食肉の熟成適期を判断する客観的な指標」の提案を目指したい。

4. 要 約

食肉は熟成することにより風味が改善する。本研究では、と畜後の味の改善におけるHxの関与について調べた。Hxの性質の一つに苦味がある。そこで、食肉の旨味およびコク味の増強にHxの呈する苦味が関与するか否かについて明らかにするため、豚肉から調製したスープにHx、アルギニンおよび硫酸キニーネを加えて官能試験に供した。その結果、苦味の種類にかかわらず、それ自体の苦味をほとんど感知しない程度の苦味は豚肉スープの旨味およびコク味を増強することが示唆された。続いて、Hxの前駆体であるIMPとHxの濃度比が豚肉スープの味の増強に関与するかについて予備的に調べると、スープ中にHxとIMPが等量程度存在するときに旨味およびコク味が最も強くなり、Hxが旨味物質と相互作用する可能性が示された。さらに、食肉由来の成分の影響を排除し、0.5%NaCl溶液中でHxと旨味物質による相

互作用について調べた結果、HxはGluと相互作用し、苦味自体は抑制されつつ旨味およびコク味が増強する傾向がみられた。一方、IMPについては、Hxとの相互作用はほとんど認められないが、HxよりもIMP濃度が高いときに濃厚感が増強する傾向がみられた。実際の食肉においては、熟成に伴いIMPは分解されてHxに変換するため、熟成肉特有の風味の発現にはHxおよびGluが必須であると考えられた。

文 献

- 1) Nishimura, T., Kato, H. : *Food Reviews International*, 4, 175~194, 1988.
- 2) Nishimura, T., Rhue, M. R., Okitani, A., Kato, H. : *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 2323 ~ 2330, 1988.
- 3) Ishii, K., et al. : *Journal of Home Economics of Japan.*, 46, 229~234, 1995.
- 4) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : 平成28年度食肉に関する助成研究調査報告書,
- 35, 52~60, 2016.
- 5) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : *Animal Science Journal*, 88, 379~385, 2017.
- 6) Tikk, M., et al. : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7769~7777, 2006.
- 7) Konosu, S. : *Food taste chemistry*, ACS Symposium series, No.115, 185 ~ 203, American Chemical Society, Washington DC, 1979.
- 8) Huber, L., Klostermeyer, H. : *Milchwissenschaften*, 29, 449~455, 1974.
- 9) Michikawa, K. : *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi*, 42 (12), 982~988, 1995.
- 10) Kitada, Y., Hasuike, A., Sasaki, M., Tanigawa, K., Horiuchi R., Yumiba, H. : *日本食品工業学会誌*, 30, 151~154, 1983.
- 11) Kuroda, M., Yamanaka, T., Miyamura, N. : *日本味と匂学会誌*, 11 (2), 175~180, 2004.
- 12) Nishimura, T. : *日本味と匂学会誌*, 19 (2), 163~166, 2012.
- 13) Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A. : 平成27年度食肉に関する助成研究調査報告書, 33, 23~29, 2015.
- 14) Ninomiya, K. : *調理科学*, 1, No. 4, 185~197, 1968.

霜降り豚肉の香味に寄与する因子に関する研究

Studies on factors contributing to taste and aroma of marbled pork

松石昌典・小林優多郎

(日本獣医生命科学大学応用生命科学部食品科学科)

Masanori Matsuishi and Yutaro Kobayashi

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

In order to clarify factors responsible for aroma and taste of marbled pork, sensory evaluation, analyses of free amino acids, dipeptides, aroma components and fatty acids were performed on marbled neck meat and lean silverside ham. Sensory evaluation demonstrated that there was no significant difference in strength of umami taste between two meats, although neck meat had a significantly stronger sweet and fatty aroma (retronasal aroma) than silverside ham. Measurement of free amino acids and dipeptides revealed that glutamine was significantly more abundant in neck meat than in silverside ham, although methionine, leucine, phenylalanine, anserine and carnosine were significantly more abundant in silverside ham than in neck meat. There were no significant differences in the amount of glutamic acid and other amino acids as well as total amount of amino acids between two meats. Analysis of aroma components showed that neck meat tended to have larger amount of 2-ethyl-1-hexanol, butyrolactone, gamma-heptalactone and gamma-nonalactone than silverside ham, indicating that those compounds could contribute to a sweet and fatty aroma. On the other hand, oxidation products such as aldehydes tended to be more abundant in silverside ham than in neck meat. Analysis of fatty acid composition demonstrated that myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid and heptadecenoic acid were significantly more abundant in neck meat than silverside ham, however arachidonic acid was significantly more abundant in silverside ham than in neck meat, suggesting to be responsible for larger amount of lipid oxidation products such as aldehydes in silverside ham than neck meat.

1. 目的

豚肉は日本で精肉としてよく消費される食肉の一つである。近年、豚肉のブランド化がすすみ、様々なブランドが生み出されているが、その中には、赤身の中に脂肪交雑して霜降りになったもの

がみられる。例えば、Tokyo-Xやフジロックなどである。これらの肉の脂肪含量は5—10%に達する。これらには、品種改良により系統豚として生み出されたものと、パンなどの食品廃棄物を給餌して、リジンインバランスにより生み出されたものがある^{1, 2)}。

それらのおいしさの原因は、交雑脂肪が軟らかさと滑らかな食感をもたらし、特定の呈味成分や香気成分が豊かな味や香りをもたらしていることがあるだろうことが予想される。このうち、食感については、テクスチュロメーターなどの物性測定と官能評価により、一般の豚肉（LWD（ランドレース×ラージホワイト×デュロック）など）より軟らかく、ジューシーであることが確認されている³⁾。味については、LWDと比べてうま味は差がなく、脂っぽさが強い傾向にあると報告されている⁴⁾。そして、呈味成分のアミノ酸と核酸関連物質が測定されているが、一般の豚肉との有意な差は認められていない³⁾。他方、香気成分については、豚臭さと獣臭さが一般の豚肉より少なく、アルデヒド類などの脂質酸化生成物が少ないとされている⁴⁾。

これらのうち、味と香りについては、和牛肉におけるラクトン類⁵⁾のような、霜降り豚肉の美味しさにポジティブな貢献をする因子については明らかになっていない。また、交雑脂肪の多いことがどのように影響しているのかも明らかになっていない。この原因の一つは、官能評価が味と口中香（retoronasal aroma）を区別しないで行われ、香りは口中香ではなく鼻先香で評価されていることにあると考えられる。この場合、味と香りの特性が正確にとらえられておらず、鼻先では香気物質が揮散して香りが実際より弱く感じられている可能性がある。また、別の原因として、脂肪の含量が和牛肉の平均40—50%に比べると低いために、脂肪による特徴の発現が小さく、官能評価あるいは機器分析で一般豚肉との差をとらえきれていない可能性がある。

そこで、まず、霜降り豚肉の極端なモデルとして、脂肪含量が20%程度あるいはそれ以上になる豚のネック肉を対象として、その味と香りを官能評価および機器分析により評価した。このときの

官能評価では、香りは香気物質が揮散しにくい口腔中香を選択し、鼻孔の開閉により味と口腔中香を明確に区別して、それらの特性を正確にとらえた。また、機器分析では呈味成分を測定するとともに、GC-MS（ガスクロマトグラフィー-質量分析）を実施して香気成分を明らかにした。これにより、ネック肉の美味しさに寄与する味と香りの成分を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 材料

市販の国産豚肉のネック肉（広頸筋）およびモモ肉（そともも；半腱様筋と大腿二頭筋で構成）を購入して使用した。品種はLWDである。官能評価では3個体の各肉を使用した。各個体の肉の購入を確実にするために、購入日を3日以上空けて購入し、その購入した日に官能試験を行った。アミノ酸分析、香気成分分析および脂肪酸組成分析ではそれぞれ別の3個体、3個体、4個体の各肉を使用した。各個体の肉の購入を確実にするためには、購入日を3日以上空けて購入した。アミノ酸分析に使用した肉は、購入した日に除タンパクした分析用試料を調製して、分析まで-80°Cに保存した。香気成分分析に使用した肉は、ひき肉にしたのちバイアルに詰めて-80°Cで保存し、分析するときは4°Cに1時間放置して解凍して使用した。脂肪酸組成分析に使用した肉は、一旦-80°Cで冷凍保存し、分析するときは4°Cに一晩放置して解凍して使用した。

ネック肉およびモモ肉いずれにおいても皮下脂肪と約1cm以上の結合組織を除去した赤身部分を試験用試料とした。

2.2 官能評価

官能評価では、試験用試料より縦約4cm、横約2cm、厚さ約0.4cm肉片を作成した。この肉片2—3個を沸騰浴中に保持した300mLの1%食塩

水に3分間入れて加熱したものを加熱肉片として、ただちに官能評価に供した。

まず、訓練したパネリストでネック肉とモモ肉を食べ比べ、その特徴の違いを表す言葉を出し合い、評価すべき項目を選択した。それにより、味については肉様のうま味、香りについては甘い脂っぽい香り、食感については、滑らかさとザクザクしたような独特の歯ごたえを評価することに決定した。これらの項目について、9名の訓練したパネリストが、ネック肉とモモ肉の間でその程度を2点識別法で比較した。なお、パネリストはアイマスクをしてすべての評価を行った。ノーズクリップで鼻孔を閉じて香りの情報を遮断した状態で、舌で知覚できるものを味とした。同状態で食感も評価した。ノーズクリップを外して鼻孔を開けたときに、口腔から鼻腔に抜ける気体で初めて知覚できるものを香り（口中香）とした。

2.3 遊離アミノ酸とジペプチドの分析

試験用試料をミンサーで2度挽きし、得られたひき肉5gに対して、4倍量の冷却純水を加え、0℃で17,500rpm、1分間ホモジナイズした。ホモジネートを4℃、10,000×gで20分間遠心分離し、上清を得た。上清1mLに対して等量の3%スルホサリチル酸を添加して4℃で一晩放置した。この混合物を4℃、10,000×gで10分間遠心分離して、上清を0.45μmのフィルターに通して分析用試料とした。全自动アミノ酸分析機JLC-500/V（日本電子（株）、東京）で分析した。

2.4 加熱香気成分の捕集と香気成分分析

香気成分の捕集には、ダイナミックヘッドスペースSPME（固相マイクロ抽出）法⁶⁾を用いた。試験用試料を2度挽きして得たひき肉2gと内部標準（10ppm 1,2-dichlorobenzen/diethyl ether）10μLを10mL容ガラスバイアルに封入し、バイアル上部のセプタムを通して毛細管とニードルを挿入して、これを100℃で加熱した。毛細管内部に

SPMEファイバー（Divinyl-benzen（DVB）/Carboxen（CAR）/Polydimethylsiloxane（PDMS）StableFlexTM, SUPERCO社製）を入れ、ニードルからのHeガスでページさせながら20分間香気成分の捕集を行った。

SPMEにより捕集した香気成分をGC-MS（GC-MS-QP2010SE, 島津製作所製）を用いて分析を行った。カラムはTC-WAX（0.25mm×60m, GL-Science社製）を使用し、カラム温度は50℃（4 min）→190℃（4℃/min）で分析を行った。各ピークのフラグメントパターンはNISTライブラリーを用いて定性解析を行った後、市販の標準品を用いてマススペクトル、リテンションタイムの一致を確認した。得られた結果は内部標準法を用い、添加した1,2-dichlorobenzenのピーク面積を1としたときの相対含量で示した。

2.5 脂肪酸組成分析

常法⁷⁾にしたがい、各試料のひき肉をエタノール性水酸化カリウムで加熱ケン化した後、酸性下でジエチルエーテル-ヘキサンを用いて脂肪酸を抽出した。得られた脂肪酸をメチルエステル化し、ガスクロマトグラフィーで分析定量した。ガスクロマトグラフィーは水素炎イオン化検出器付きガスクロマトグラフ（GC-15A型、島津製作所製）を用いて行った。分析条件は以下のとおりである。カラム：CP-SIL88（WCOT FUSED SILICA, 0.25mm×50m）（VARIAN社製）。カラム温度：160℃（3 min）→230℃（3℃/min）（5 min）。注入口温度：250℃。検出器温度：250℃。スプリット比：50:1. キャリアガス：He。

2.6 統計処理

官能評価の結果は、2項検定で解析した。遊離アミノ酸分析、香気成分分析、および脂肪酸組成分析の結果はt-検定で解析した。

3. 結果と考察

3.1 官能評価

訓練したパネリストが加熱したネック肉とモモ肉の、肉様のうま味、甘い脂っぽい香り、滑らかさ、および、ザクザクしたような独特の歯ごたえの程度を比較した (Table 1)。その結果、うま味の強さはネック肉とモモ肉で有意な差がなかった。一方、甘い脂っぽい香り、滑らかさ、および、ザクザクしたような独特の歯ごたえは、ネック肉の方がモモ肉よりも有意に ($p<0.001$) 高い程度にあった。これらの結果から、霜降りのネック肉のおいしさには、香味のうち甘い脂っぽい香りが貢献していると推定された。滑らかさと独特的歯ごたえについては本研究ではそれ以上追求しなかった。

3.2 遊離アミノ酸量とジペプチド量の比較

ネック肉とモモ肉の呈味成分として、遊離アミノ酸とジペプチドの分析を行い、その結果を Table 2 に示した。グルタミンはネック肉の方が有意に ($p<0.01$) 多かったが、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニンはモモ肉の方が有意に ($p<0.05$ あるいは $p<0.01$) 多かった。ジペプチドでは、アンセリンとカルノシンがモモ肉の方に有意に ($p<0.05$ と $p<0.01$) 多かった。しかし、うま味を有するアミノ酸であるグルタミン酸をはじ

めとするその他の遊離アミノ酸および総遊離アミノ酸の量には両肉間で有意差はみられなかった。この結果は、官能評価でうま味の強さに有意差がなかったことに反映されているのであろう。また、これは脂肪含量の多いTokyo-Xと少ない一般豚との比較でも遊離アミノ酸量には有意な差がなかったと報告されていること³⁾とも類似している。

3.3 香気成分の比較

ネック肉とモモ肉のヘッドスペースの香気成分をSPME法により捕集してGC-MSで分析した結果、アルカン類6種、芳香族化合物5種、アルデヒド類10種、ケトン類6種、アルコール類16種、酸類10種、エステル類4種、ラクトン類9種、その他4種を同定して定量した。アルコール類では、2-ethyl-1-hexanolがモモ肉よりもネック肉に多い傾向にあった (Fig. 1)。アルデヒド類では、benzaldehydeをはじめとする同定されたほとんどの化合物がネック肉においてモモ肉より少ない傾向にあった (Fig. 2)。他方、ラクトン類ではbutyrolactone, gamma-heptalactone, gamma-nonalactoneがモモ肉よりネック肉に多い傾向があったが、gamma-hexalactone, delta-octalactone, delta-decalactone, gamma-undecalactone, gamma-dodecalactoneはネック肉よりモモ肉に多い傾向にあった。 (Fig. 3)。これ以外の化合物

Table 1 Paired difference test for boiled neck meat and silverside ham meat of pork¹⁾

Item	Number of panelists indicating a higher level for		Difference ²⁾
	Neck meat	Silverside ham	
Intensity of umami	11	16	NS
Sweet and fatty odor	26	1	***
Smoothness	26	1	***
Characteristic chewiness	26	1	***

¹⁾ Data is the sum of three experiments. Nine panelists participated in every experiment.

²⁾ Significant difference is indicated with *** ($p<0.001$). NS, not different.

Table 2 Composition of free amino acids and dipeptides of neck meat and silverside ham

	Mean ± SD (μmol/g meat)		Difference	
	Neck meat	Silverside ham		
Free amino acids				
P-Ser	0.00 ± 0.00	0.02 ± 0.00	NS	
Tau	5.23 ± 1.77	2.89 ± 0.67	NS	
Asp	0.72 ± 0.03	0.72 ± 0.14	NS	
Thr	0.32 ± 0.06	0.30 ± 0.04	NS	
Ser	0.36 ± 0.03	0.40 ± 0.02	NS	
Asn	0.11 ± 0.04	0.11 ± 0.01	NS	
Glu	0.37 ± 0.09	0.41 ± 0.01	NS	
Gln	1.72 ± 0.09	1.06 ± 0.09	**	
Gly	1.97 ± 0.32	1.43 ± 0.19	NS	
Ala	3.16 ± 0.39	2.52 ± 0.26	NS	
Cit	0.15 ± 0.05	0.07 ± 0.01	NS	
Val	0.33 ± 0.10	0.38 ± 0.06	NS	
Met	0.08 ± 0.00	0.16 ± 0.04	*	
Ile	0.20 ± 0.06	0.27 ± 0.03	NS	
Leu	0.33 ± 0.06	0.47 ± 0.05	*	
Tyr	0.15 ± 0.02	0.23 ± 0.05	NS	
β-Ala	0.41 ± 0.23	0.54 ± 0.20	NS	
Phe	0.18 ± 0.02	0.30 ± 0.04	**	
Orn	0.05 ± 0.01	0.04 ± 0.03	NS	
His	0.11 ± 0.01	0.12 ± 0.02	NS	
Lys	0.32 ± 0.06	0.33 ± 0.05	NS	
Arg	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NS	
Hypro	0.04 ± 0.01	0.02 ± 0.00	NS	
Pro	7.57 ± 2.79	3.44 ± 1.88	NS	
Total	23.87	4.88	16.23 2.77	NS
Dipeptides				
Ans	0.57 ± 0.04	1.13 ± 0.17	*	
Car	25.78 ± 5.25	47.32 ± 1.08	**	

NS, not significant ; *, p<0.05 ; **, p<0.01.

類でも、decane, dodecane, *p*-xylene, hexanalはネック肉の方が多い傾向にあったが、それ以外の化合物はモモ肉の方が多い傾向にあった（図に示していない）。脂肪含量の多いネック肉のアルデヒド類などの香気成分が脂肪含量の少ないモモ肉より少ない傾向があることは、飯塚ら⁴⁾が脂肪含量の多いTokyo-X豚肉に脂肪含量の少ないバーケシャー種とLWD種に比べてアルデヒド類などの脂質酸化生成物が少ないと報告していることと類似している。霜降り状態であることがこのような類似した結果をもたらす原因になっているのかも

しれない。逆に、2-ethyl-1-hexanol, butyrolactone, gamma-heptalactone, gamma-nonalactoneなどのネック肉に多い化合物は、甘い脂っぽい香りに貢献している可能性がある。しかし、SPMEでの今回の分析は測定値のばらつきが大きいため、より精度の高い分析法で確かめる必要がある。

3.4 脂肪酸組成の比較

ネック肉とモモ肉の脂肪酸組成を分析した。**Table 3**に示したように、ミリスチン酸、パルミチニン酸、パルミトオレイン酸、ヘプタデセン酸はモモ肉よりネック肉に有意に多かったが、アラキ

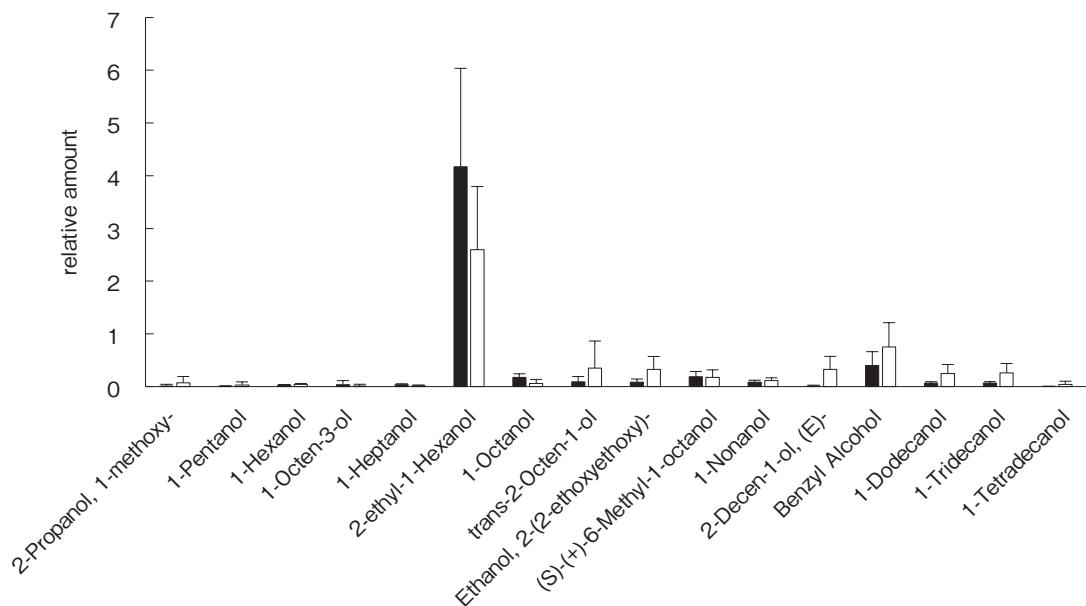


Fig. 1 Alcohols obtained from neck meat and silverside ham.

Closed bar and open bar show neck meat and silverside ham, respectively.

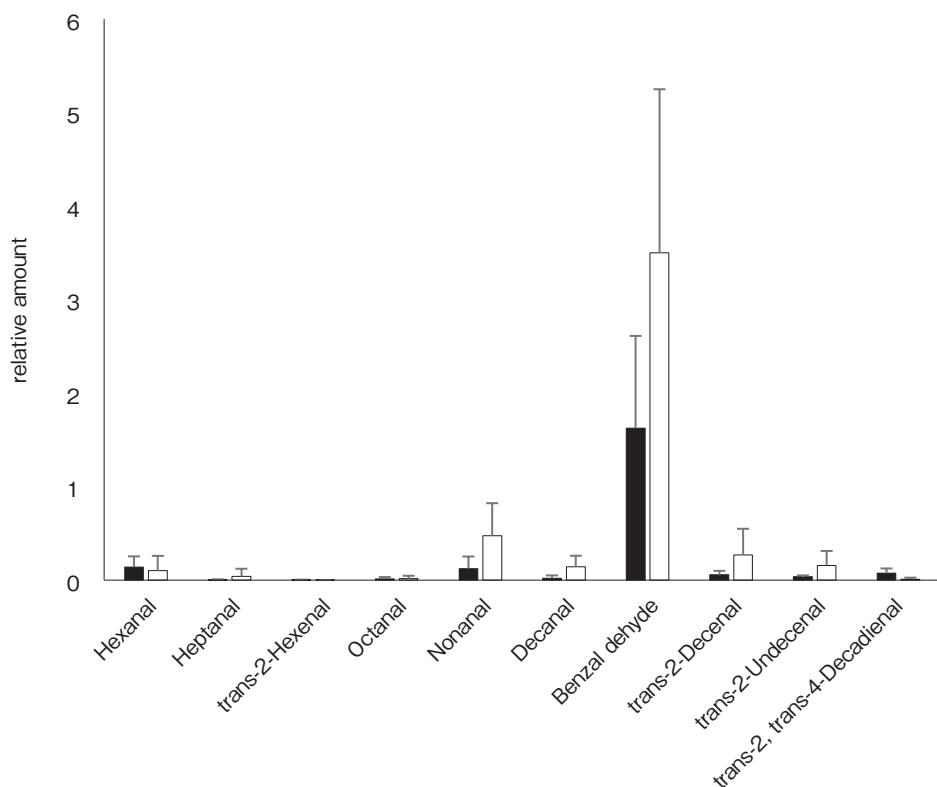


Fig. 2 Aldehydes obtained from neck meat and silverside ham.

Closed bar and open bar show neck meat and silverside ham, respectively.

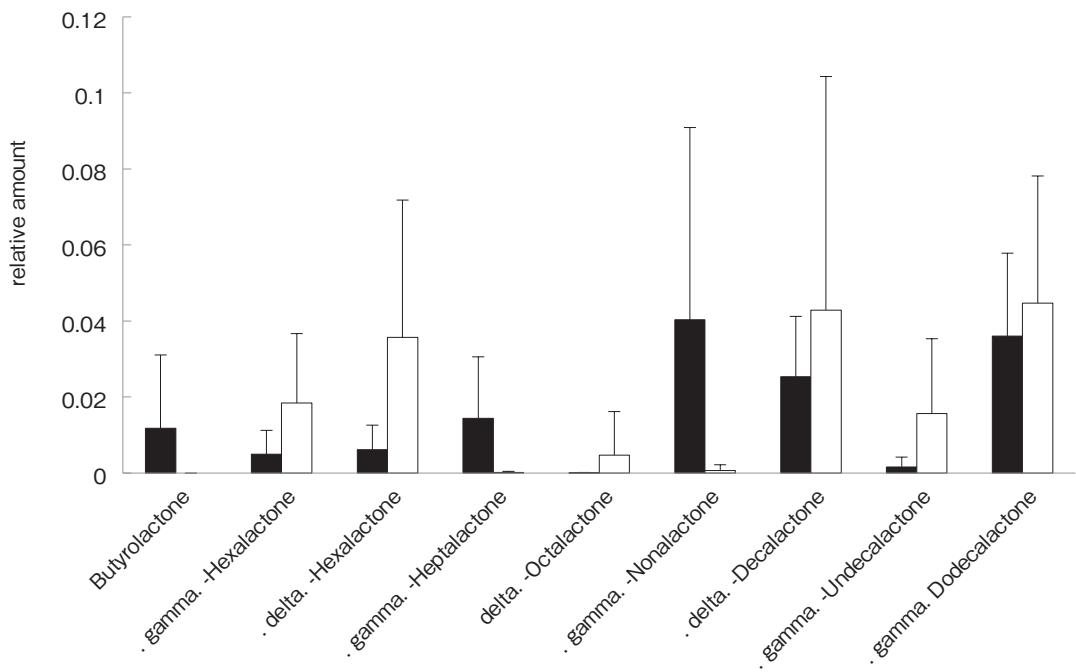


Fig. 3 Lactones obtained from neck meat and silverside ham.

Closed bar and open bar show neck meat and silverside ham, respectively.

Table 3 Fatty acid composition of neck meat and silverside ham

Fatty acids	Mean ± SD (%) †		Difference
	Neck meat	Silverside ham	
Decanoic acid	0.2 ± 0.03	0.1 ± 0.0	NS
Lauric acid	0.1 ± 0.0	0.1 ± 0.0	NS
Myristic acid	1.6 ± 0.05	1.2 ± 0.05	***
Pentadecanoic acid	0.1 ± 0.03	0 ± 0.0	NS
Palmitic acid	25.8 ± 0.52	22.7 ± 0.85	**
Palmitoleic acid	3.5 ± 0.36	2.4 ± 0.31	*
Heptadecanoic acid	0.5 ± 0.04	0.4 ± 0.13	NS
Heptadecenoic acid	0.3 ± 0.03	0 ± 0.0	***
Stearic acid	13.5 ± 0.71	13.3 ± 0.95	NS
Oleic acid	43.7 ± 0.93	43.6 ± 3.35	NS
Linoleic acid	8.2 ± 0.49	11.3 ± 3.37	NS
n-3 Linolenic acid	0.5 ± 0.05	0.4 ± 0.10	NS
Arachidic acid	0.2 ± 0.0	0.1 ± 0.05	NS
Eicosenoic acid	0.7 ± 0.09	0.6 ± 0.13	NS
Eicosadienoic acid	0.3 ± 0.0	0.4 ± 0.13	NS
Eicosatrienoic acid	0.2 ± 0.03	0.4 ± 0.13	NS
Arachidonic acid	0.7 ± 0.12	2.3 ± 0.82	*

†. Fatty acids are described as percentage of total fatty acids. NS, not significant;

*, p<0.5; **, p<0.01; ***, p<0.001.

ドン酸はネック肉よりモモ肉に有意に多かった。他の脂肪酸には両肉間に有意な差はなかった。多価不飽和脂肪酸であるアラキドン酸がモモ肉に多かったことが、酸化生成物であるアルデヒド類がモモ肉に多かった理由の1つかもしれない。高崎らはTokyo-X, バークシャー種, LWD種のロースの脂肪酸組成を調べて、オレイン酸がTokyo-Xで47.38%, バークシャー種で45.47%であり、LWD種の42.88%よりも有意に高い含量であることを示している³⁾。本研究のネック肉とモモ肉のオレイン酸含量は約44%であり、バークシャー種、LWD種とあまり差がない。したがって、オレイン酸含量は、部位差よりも品種差が大きいことが示唆される。他方、彼らの報告では、アラキドン酸含量はバークシャー種で約1%である以外は、他の2種では微量とされている。また、リノール酸含量はTokyo-Xで4.66%と低く、バークシャー種とLWD種では7—8%であり、今回のネック肉と大きな差がない。今回モモ肉で得られた、アラキドン酸2.3%とリノール酸11.3%という高い値は、部位差を示しているのであろう。

4. 要 約

霜降り豚肉の香味に寄与する因子を明らかにするために、霜降りになっているネック肉と赤身のモモ肉について、官能評価、遊離アミノ酸分析、香気成分分析、脂肪酸組成分析を行った。官能評価では、うま味の強さに関しては、ネック肉とモモ肉に有意差はないが、甘い脂っぽい香り（口中香）については、ネック肉はモモ肉よりも有意に強いことが明らかになった。遊離アミノ酸とジペプチドを分析した結果、グルタミンはネック肉に

有意に多く、メチオニン、ロイシン、フェニルアラニン、アンセリン、カルノシンは有意にモモ肉に多かったが、グルタミン酸やその他のアミノ酸およびアミノ酸の総量には有意な差がなかった。香気成分を分析した結果、ネック肉には、アルコール類の2-ethyl-1-hexanol, ラクトン類のbutyrolactone, gamma-heptalactone, gamma-nonalactoneがモモ肉より多い傾向にあり、これらが甘い脂っぽい香りに寄与する可能性が示された。他方、アルデヒド類などの脂質酸化生成物はモモ肉の方がネック肉より多い傾向にあった。脂肪酸組成分析では、ミリスチン酸、パルミチン酸、パルミトオレイン酸、ヘプタデセン酸はモモ肉よりネック肉に有意に多かったが、アラキドン酸はネック肉よりモモ肉に有意に多かった。アラキドン酸がモモ肉に多いことは脂質酸化生成物が多かった原因であることが示唆された。

文 献

- 1) 入江正和：日本養豚学会誌，39, 221～254, 2002.
- 2) 入江正和：食肉の栄養・機能と健康2017「豚肉」礼賛！，公益財団法人日本食肉消費総合センター，東京，6～15, 2017.
- 3) 高崎禎子、飯塚佳子、鈴木亜由美、伊藤米人：日本調理科学会誌，38, 404～409, 2005.
- 4) 飯塚佳子、高崎禎子、鈴木亜由美、森田香絵、相島鐵郎：日本食品科学工学会誌，53, 23～30, 2006.
- 5) 松石昌典、久米淳一、伊藤友己、高橋道長、荒井正純、永富宏、渡邊佳奈、早瀬文孝、沖谷明紘：日本畜産学会報，75, 409～415, 2004.
- 6) Watanabe, A., Ueda, Y., Higuchi, M., Shiba, N.: *Journal of Food Science*, 73, 420～425. 2008.
- 7) 堤忠一：エーテル抽出法、日本食品工業学会食品分析法編集委員会（編）食品分析法、光琳、東京, 126～127, 1982.

加熱肉に生じる赤色に対するカルノシンの影響

Effect of carnosine on the red color arising in cooked meat

中 村 幸 信・江 田 芳 崇・吉 田 由 香・猪 口 由 美

(一般社団法人食肉科学技術研究所)

Yukinobu Nakamura, Yoshitaka Eda, Yuka Yoshida and Yumi Inoguchi

(Japan Meat Science and Technology Institute)

Cooked meat, which was boiled at 85°C for one hour, was repeatedly washed with distilled water and acetone to dilute and remove water-soluble components, water and lipid, resulting in a powder. The cooked meat powder (CMP) was used to study the formation of denatured globin hemochrome (d-hemo) from carnosine. The d-hemo was formed by the addition of reducing agent to CMP. In the present of reducing agent, CMP with carnosine had higher values of a^* and C^* than that without imidazole related compounds. The stability of d-hemo formed in the addition of carnosine was pH-dependent. The d-hemo stabilized in the condition of neutral and alkaline than that of acid on the oxidation during the storage of 24 hours. Increasing carnosine concentration enhanced the stability of d-hemo at pH 6. Thus, it was suggested that carnosine formed d-hemo. Histidine and imidazole were also same mode on the condition of pH and the oxidation during the storage, indicating that imidazole group of carnosine coordinated to iron in the heme. The present results demonstrated that the suppression of color reversion in cooked meat could be operated by the condition of lower pH and the oxidation of iron.

1. 目 的

食肉の色調は、その品質に影響する因子の1つである。食肉の色調について、多くの消費者は、生の食肉は“赤色”，加熱された食肉は“褐色”と認識している。しかし、衛生的に加熱殺菌された食肉であっても、赤色を呈する現象が見られる。この加熱肉の赤色現象は、先の消費者の認識と異なることから、消費者によって“食肉の加熱不足”あるいは“健康被害につながる異常”と判定される。この結果によって食肉産業界が受ける経

済的損失は大きく、その機構の解明と解決策が望まれている。

加熱肉の赤色現象は、Pink color defect (PCD)と称され、その研究は古くから行われている。PCDは2つのケースに分類され、1つは“Persistent pink (PP)”，もう1つは“Color reversion (CR)”である。PPは赤色が加熱直後から認められる。CRは赤色が加熱直後には認められず、一定時間経過後に認められる。過去の研究では、特にPPの原因として、未変性ミオグロビンの残存¹⁾、亜硝酸塩の存在^{2,3)}、不完全燃焼

に伴うガスの発生⁴⁾、シトクロームc^{5, 6)}の存在、ニコチニアミドの存在^{7, 8)}などが示されている。他方、CRの原因については、変性グロビンヘモクロム(d-hemo)、すなわち“変性したグロビン分子と2価鉄に含窒素化合物などが配位したポルフィリーン錯体”的形成と考えられているが^{1, 9, 10)}、いまだ不明な点が多い。

PCDに関する過去の研究では、ヘモクロム(hemo)を形成する含窒素化合物としてニコチニアミドが示されている^{5, 7, 8, 11)}。また、hemoの形成に関する生化学的な研究では、イミダゾール(Imd)やL-ヒスチジン(His)によるhemoの形成が明らかにされている¹²⁾。他方、食肉がL-カルノシン(Car)やL-アンセリンなどのイミダゾールペプチドを豊富に含むことは、機能性研究から注目されている¹³⁾。これらの食肉中の濃度は、ニコチニアミド(ナイアシンとして)と比べると、最大で100倍程度高い¹⁴⁾。さらに、Imd等によりhemoが形成されることは、イミダゾールペプチドによるhemoの形成が推定されるが、これに関する知見はない。

本研究の目的は、イミダゾール基を有するCarに着目し、Carによるhemoの形成について検討することによって、CRの発生機構およびその解決策を明らかにすることにある。

2. 方 法

2.1 材料

市販の豚(パークシャー種)の大腰筋(試料数3)を使用した。Car, HisおよびImdの標準品は、シグマアルドリッヂから購入した。

2.2 加熱肉パウダー(CMP)の調製

豚の大腰筋の目立った脂肪と結合組織は除去し、穴径5mmのプレートで挽肉とした後、厚さを8mmとし、真空パック(約0.8kPa)した。真空パックした挽肉は、85°Cの湯浴で1時間加熱し

た。加熱した挽肉(加熱肉)は、以下の操作によって、水溶性成分、水分および脂質を希釈あるいは除去し、粉末化した。まず、加熱肉に10倍量の蒸留水を加えて、ホモジナイズし、遠心分離(10,000×g, 5分間)して沈殿を得た。同水処理は、さらに2回行った。次に、水処理して得られた沈殿に対して、最初の加熱肉重量の5倍量のアセトンを加え、振とう(5分間)し、遠心分離(10,000×g, 5分間)して沈殿を得た。同様のアセトン処理は、さらに2回行った。最後は、試料をろ紙(No.5A, 桐山製作所)で吸引ろ過し、残渣を回収した。室温でアセトンが揮発するまで静置した残渣をCMPとした。

2.3 CMPにおけるd-hemoの形成

CMPにおけるd-hemoの形成に対するpH、貯蔵時間およびCar濃度の影響を以下の方法で検討した。CMP0.5gを透明の遠沈管(ポリプロピレン製)に採取し、Car, HisおよびImdを添加したあるいは添加しないクエン酸緩衝液(pH 5)およびリン酸緩衝液(pH 6, 7, 8)を5ml加えて、試験液とした。蒸留水のみを加えた試験液も調製した。試験液中の各種物質の終濃度は、CMPのヘム色素が0.3-0.4mg、Carが3(0.013mol)および30mgとし、HisとImdは0.013molとした。続けて、試験液に亜ジチオン酸ナトリウム0.05gを加え還元した後、遠心分離(10,000×g, 5分間)して沈殿を得た。遠沈管の壁にある沈殿を遠沈管の外側から分光測色計(CM-2500d, コニカミノルタ(株))により測定した。測定後、試験液中の沈殿を軽い搅拌で均一化し、4°Cの暗所で24h静置した後、遠心分離(10,000×g, 5分間)した。得られた沈殿を先と同様に分光測色計に供した。

2.4 分光測色計による分析

分光測色計による測定条件は、測定径φ8mm、光源A、10°視野とし(AMSA, 2012), 付

属の白色校正板 ($L^*97.08$, $a^*-0.01$, $b^*0.11$) による校正を行った。分析によりCIE L^* (明るさ), a^* (赤), b^* (黄), C^* (彩度), h (色相角) および R (反射率) を得た。 R は360–740nmの波長域において10nmごとに測定し、各波長の R から730nmの R を差し引いて補正した反射率スペクトルを得た。d-hemo形成の程度は、Schwarzら(1998) の方法¹¹⁾を参考にし、% $R_{560\text{nm}} - \%R_{730\text{nm}}$ ／% $R_{540\text{nm}} - \%R_{730\text{nm}}$ によって相対的に比較した。

2.5 理化学分析

タンパク質含量は燃焼法（スミグラフNC-22, (株)住化分析センター), pHの測定はpHメーター (F-52, 堀場製作所), 全ヘム色素含量はAMSAの方法¹⁵⁾ (酸性アセトン抽出) により行った。また、この酸性アセトン抽出液は、分光光度計 (U-3900H, 日立製作所) によりスペクトルを測定した。

3. 結果と考察

3.1 CMPの諸性質

加熱肉における赤色の原因の1つは、d-hemoと考えられているが^{1, 9, 10)}、この加熱によって生じたd-hemoは、各種溶媒に不溶なため、加熱肉からの抽出は実現していない⁸⁾。このd-hemoが

不溶である性質を利用し、加熱肉中の水溶性成分、水分、脂質を希釈あるいは除去したd-hemoを含むCMPの調製を試みた。

調製したCMPのタンパク質含量は98%以上であり、CMPに酸性アセトン溶液を加えると、その液は赤色～褐色を呈し、酸性ヘマチンのスペクトルを示した。CMPはヘムを含み、その全ヘム色素含量は153–312ppmであった。さらに、CMPに蒸留水と還元試薬を加えて得られる沈殿は赤色を呈し、赤色は数時間単位で保持された。その反射スペクトル (Fig. 1) は560nm, 530nm, 420nmに谷があり、過去の研究におけるd-hemoのスペクトルと一致した^{5~8, 11, 12)}。

CMPの利点は、hemo形成の可能性がある成分が希釈あるいは除去され、濃縮されたヘムを含むことである。CMPが呈する色調は、ミオグロビン以外の加熱変性タンパク質を含むため、加熱肉に近い。還元試薬によってCMPが赤色を呈することは、ヘムの鉄の還元に由来することから、CRが発生した加熱肉中の鉄は還元状態にあることが示唆される。したがって、CRの発生を抑制するには、鉄の酸化が有効な手段であろう。含窒素化合物の添加なしでhemoが形成される理由は、CMPに存在する様々なタンパク質に由来する含

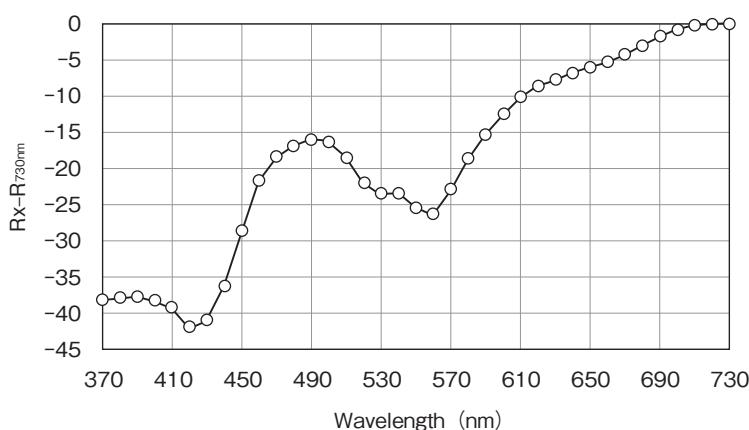


Fig. 1 Reflectance spectrum of CMP immediately after the treatment with reducing agent.

窒素の官能基が鉄に配位した可能性が考えられる⁵⁾。

3.2 CMPへのCar添加による色調とd-hemo形成に対するpH、貯蔵時間およびCar濃度の影響

Car, HisおよびImd添加と無添加のCMPに還元試薬を添加し、その後一晩空気下、4℃にて貯蔵した。還元試薬添加直後(0 h)と一晩静置した(24 h)試料を分光測色計に供し、結果をTable 1に示した。

CMPの色調は、Car等の試薬の添加に関係なく、還元試薬の添加によって褐色から赤色へと変化した。まず、0 hにおいて、Car 3mg添加のa*とC*値は、無添加より高かったことから、Car添加によってCMPの色調は“鮮やかな赤”になったと言える。他方、スペクトルに関して(Fig. 2とFig. 3)、0 hのすべてのスペクトルには、530nm

の谷と560nmのさらに大きな谷があり、hemoの特徴を示した。hemoの形成度を表すrHemoは、0 hでCar 3mg添加と無添加で違いはなかった。HisやImd添加の0 hのa*とC*値は、Car添加と同様に無添加より高かった。pHの影響に関しては、すべての0 hのa*値とrHemoが、酸性域で低かった。したがって、酸性域でのhemoの形成の不安定性が示された。また、この結果から、CRの発生を抑制するためには、低pHの環境が有効と考えられる。

24時間の貯蔵の影響に関しては、無添加のCMPは貯蔵後、褐色へと変化した。この変化は、24 hのa*、C*値およびrHemoがすべてのpHで0 hより低く、色相角が高いことに現れていた。また、貯蔵後のスペクトルの谷は浅くなつた(Fig. 2 ABCD)。これらの結果は、貯蔵によるヘムにおける鉄の酸化、すなわちhemoから“ヘミクロ

Table 1 Effects of pH, storage time and carnosine concentration on CIE color and indicator of hemochromes formation.

		pH	a*		b*		C*		Hue angle		rHemo ¹		
			Storage time(h)										
			0	24	0	24	0	24	0	24	0	24	
No agents	Carnosine	pH 5	5	9.0	7.3	12.6	12.4	15.5	14.4	54.5	59.3	1.09	0.98
			6	9.8	7.7	12.3	12.8	15.8	14.9	51.6	58.7	1.12	1.01
			7	10.1	8.4	12.4	12.7	16.0	15.3	50.8	56.8	1.15	1.09
			8	10.1	8.4	12.1	12.6	15.8	15.2	50.4	56.6	1.16	1.09
	30mg	pH 5	10.3	7.9	12.6	12.2	16.3	14.5	50.9	57.2	1.09	0.96	
			6	10.1	8.3	12.4	12.7	16.0	15.2	50.9	56.9	1.12	0.99
			7	10.4	10.3	12.4	12.6	16.3	16.3	50.2	50.9	1.14	1.12
			8	10.6	10.5	12.3	12.4	16.3	16.3	49.3	50.0	1.15	1.13
	Histidine	pH 5	9.8	8.1	12.6	13.1	16.0	15.4	52.0	58.3	1.10	1.01	
			6	10.1	9.0	12.5	13.3	16.0	16.1	51.0	55.9	1.13	1.10
			7	10.6	9.3	12.4	13.1	16.3	16.1	49.4	54.9	1.16	1.13
			8	11.0	9.7	12.3	12.7	16.4	16.0	48.3	52.8	1.17	1.14
	Imidazole	pH 5	10.2	7.6	12.4	12.1	16.0	14.3	50.6	58.0	1.09	0.96	
			6	10.5	10.0	12.5	12.8	16.3	16.2	50.0	52.1	1.12	1.10
			7	10.7	10.4	12.3	12.6	16.3	16.4	49.2	50.6	1.15	1.13
			8	10.8	11.0	12.2	12.4	16.3	16.6	48.5	48.7	1.15	1.15

¹rHemo : reflectance estimator of hemochromes, %R_{560nm}-%R_{730nm}/%R_{540nm}-%R_{730nm}, higher ratio more.

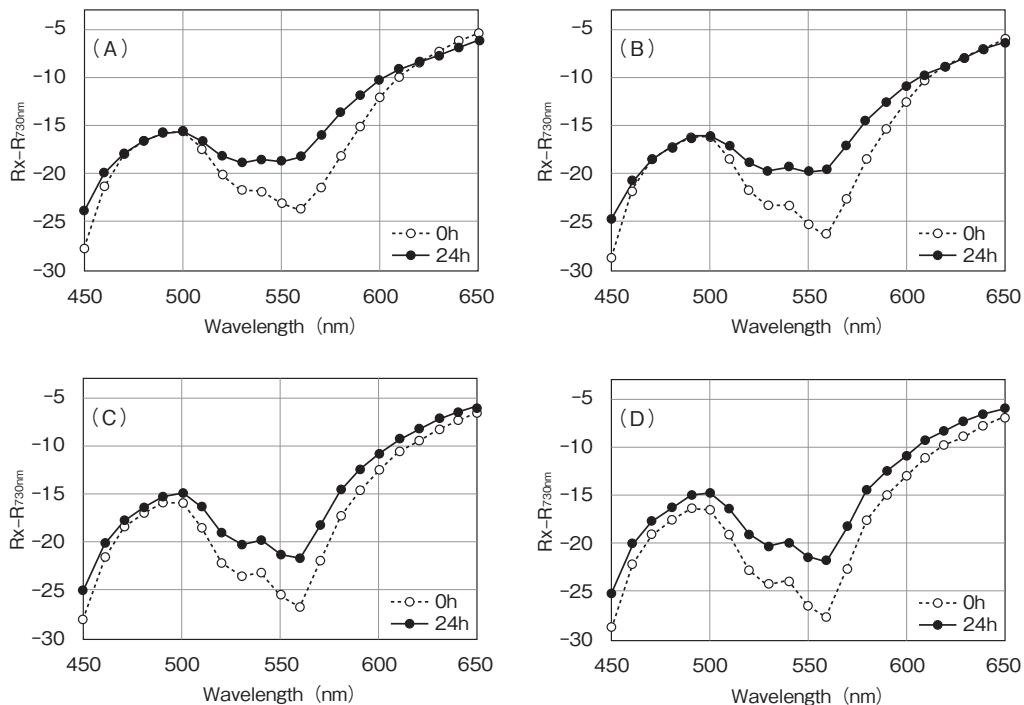


Fig. 2 Reflectance spectra of CMP without imidazole related compounds on pH 5(A), 6(B), 7(C) and 8(D) and prolongation of storage time from 0h (opened circle) to 24h (closed circle).

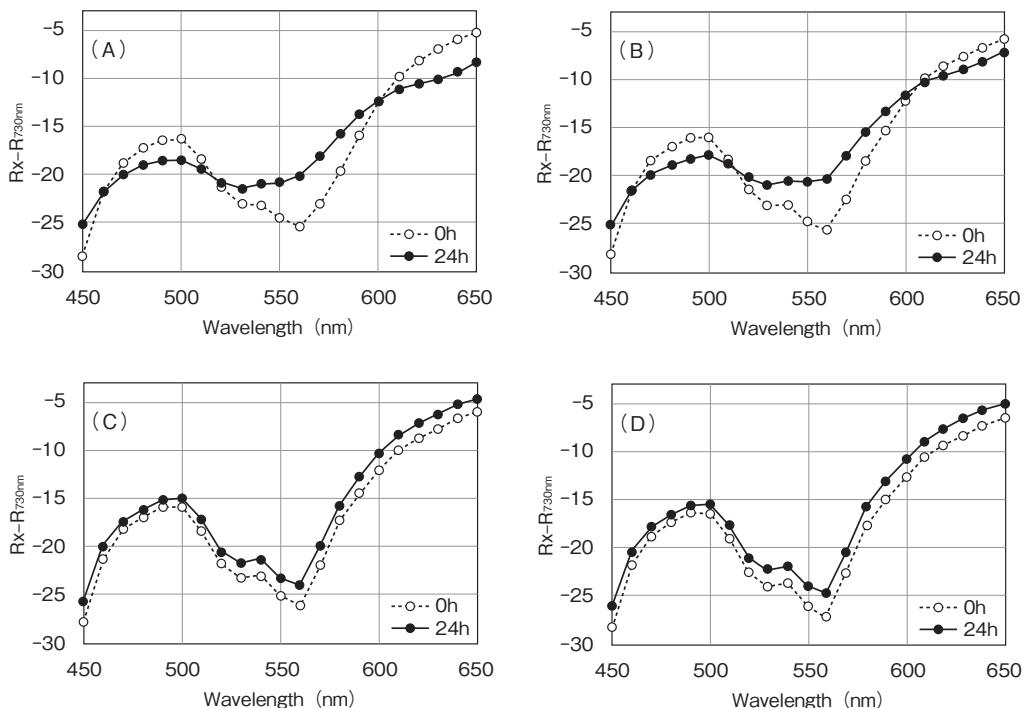


Fig. 3 Reflectance spectra of CMP with carnosine of 3 mg on pH 5(A), 6(B), 7(C) and 8(D) and prolongation of storage time from 0h (opened circle) to 24h (closed circle).

ム”あるいは“ヘミクロモーゲン”への変化と考えられた。

Car 3mg添加の場合、24 h の a^* , C^* 値およびrHemoは、酸性域では無添加と同様に 0 h より低く、色相角は高かった。また、貯蔵後のスペクトルの谷は浅くなつた (Fig. 3 AB)。さらに、24 h の pH 5 と 6 の間で比較すると、pH 6 の a^* と C^* 値は pH 5 より高く、色相角は低かった。中～アルカリ性域では、無添加と異なり、0 と 24 h の間で a^* と C^* 値、rHemo、色相角およびスペクトルの形状に違いはなかった (Fig. 3 CD)。酸性域における結果は、無添加と同様に貯蔵による鉄の酸化に起因すると考えられた。他方、中性～アルカリ性域における結果は、鉄の酸化の抑制を意味し、Car添加によって形成されたhemoの安定化を示唆している。次にCar濃度を増やした場合、pH 6 での貯蔵による a^* , C^* 値およびrHemoの低下、色相角の増加が抑制され、hemoの安定性が高められた。これらの結果から、Carはd-hemoを形成したと考えられた。

HisやImd添加の場合、pH 5, 7 および 8 での貯蔵に対する a^* と C^* 値、色相角およびrHemoの変化は、同濃度のCarと同様で、pH 5 では鉄の酸化が進行し、pH 7 と 8 では抑制されたと考えられた。他方、pH 6 での貯蔵に対する各数値の変化も、鉄の酸化の進行を示したが、酸化の程度はCarに比べて低い傾向が認められた。CarとHisやImdによるhemoが、pH や貯蔵による酸化に対して同じ様式を示したことから、Carによるhemoの形成は、そのImd基が鉄に配位することによって生じると考えられた。今回のImd関連物質によるhemo形成がpH依存性を示した原因は、各種物質が有するImdのpKaやCMP中の変性グロビンの構造が高pHでよりオープンになり、ヘムが露出したことが考えられる。さらに、pH 6 におけるCarと他物質間のhemoの安定性の違いは、Carが

HisやImdより複雑な構造であるため、比較的鉄に配位し難いためであろう。

本研究は加熱肉に発生する赤色が、食肉由来のCarによって形成されるd-hemoから生じ得ることを示した。この場合、赤色が生じた加熱肉の安全性は問題ないと見える。この機構には、鉄の還元が必須であり、加熱肉中の鉄が還元状態にあることの原因究明は今後の検討課題である。さらに、我々はCarによって形成されたd-hemoの安定性に対する食品添加物の影響、Carが色調や酸化防止の面で発色剤の代替物となる可能性について検討している。

4. 要 約

Carによるd-hemo形成を検討するために85°Cで1時間加熱した肉からCMPを調製した。CMPは還元試薬添加によってhemoを形成した。Carと還元試薬を添加したCMPは、無添加と比べて、強い赤色を呈した。Carによって形成されたhemoの安定性はpHに依存し、24時間の貯蔵による酸化に対して、酸性域より中性～アルカリ性域で高かった。Car濃度の増加は、pH 6 でのhemoの安定性を高めた。したがって、Carはhemoを形成したと考えられた。Car, HisやImdによるhemoは、pH や貯蔵による酸化に対して同様の様式を示したことから、Carによるhemo形成において、そのImd基が鉄に配位していると考えられた。CRの抑制には、低pHと鉄の酸化の環境が有効であろう。

文 献

- 1) Trout, G. R. : *Journal of food science*, 54, 536～544, 1989.
- 2) Froning, G. W., Daddario, J., Hartung, T. E., Sullivan, T. W. : *Poultry science*, 47, 1672～1673, 1968.
- 3) Ahn, D. U., Maurer, A. J. : *Poultry science*, 66, 1957～1960, 1987.

- 4) Cornforth, D. P., Rabovitser, J. K., Ahuja, S., Wagner, J. C., Hanson, R., Cummings, B., Chudnovsky, Y. : *Journal of agricultural and food chemistry*, **46**, 255~261, 1998.
- 5) Ahn, D. U., Maurer, A. J. : *Poultry science*, **69**, 157~165, 1990.
- 6) Girard, B., Vanderstoep, J., Richards, J. F. : *Journal of food science*, **55**, 1249~1254, 1990.
- 7) Brown, D. W., Tappel, A. L. : *Food research*, **22**, 214~221, 1957.
- 8) Cornforth, D. P., Vahabzadeh, F., Carprnter, C. E., Bartholomew, D. T. : *Journal of food science*, **51**, 1132~1135, 1986.
- 9) Ghorpade, V. M., Cornforth, D. P. : *Journal of food science*, **58**, 51~52, 89, 1993.
- 10) Mancini, R. A., Kropf, D. H., Hunt, M. C., Johnson, D. E. : *Journal of muscle food*, **16**, 16~26, 2005.
- 11) Schwarz, S. J., Claus, J. R., Wang, H., Marriott N. G., Graham, P. P. : *Journal of muscle food*, **9**, 101~110, 1998.
- 12) Akoyunoglou, J.-H. A., Olcott, H. S., Brown, W. D. : *Biochemistry*, **2**, 1033~1041, 1963
- 13) Boldyrev, A. A., Aldini, G., Derave, W. : *Physiological reviews*, **93**, 1803~1845, 2013.
- 14) 日本食品標準成分表2015年版(七訂), 文部科学省科学技術・学術審議会資源調査分科会, 2015
- 15) Meat Color Measurement Guidelines, American Meat Science Association, 80~81, 2012.

牛心臓由来新規脂質代謝改善ジペプチドを活用した 革新的コレステロール代謝改善素材開発のための 基礎研究

Basic study of the development of an innovative hypcholesterolemic food materials using a novel hypcholesterolemic dipeptide derived from cattle heart peptide

長岡 利

(岐阜大学応用生物科学部)

Satoshi Nagaoka

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Only a few reports have dealt with the effects of animal protein and animal protein hydrolysate on cholesterol metabolism. The cattle heart protein hydrolysate ultra-filtrate (HPHU, MW < ca. 1,000 Da peptides fraction) derived from HPH imparts a stronger hypcholesterolemic activity than HPH in rats. After purification of HPHU by a reverse phase chromatography and gel filtration chromatography, we try to identify the active hypcholesterolic peptide derived from HPHU using in vitro assay related to micellar solubility of cholesterol in vitro. Finally, we identified for the first time the hypcholesterolemic dipeptide, XY derived from HPHU in rats. XY exhibited a hypcholesterolemic action in rats fed a high cholesterol diet. Oral administration of XY induced a significant increase in HDL-cholesterol level in rats. Fecal cholesterol, acidic steroids and total steroid excretion were significantly increased by XY treatment compared to control group.

1. 目的

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

発現することを発見し検討している^{2,3)}。また、主要な食糧資源でありながら、従来ほとんど検討がなされていない畜産食品素材のうち、牛肉ペプチド、牛レバーペプチドが体内コレステロール低下作用を有することも見出した⁶⁾。さらに、昨年度の研究で、動物性食餌タンパク質である牛肉に再度着目し、畜産資源の高度有効利用という観点から、廃棄部位を含めた各部位である牛肉、牛心臓、牛赤血球、牛血漿加水分解物を用いた研究を行った結果、特に牛心臓加水分解物（HPH）が強力なコレステロール代謝改善作用を発現するこ

とを発見した⁷⁾。

我々の既報^{8, 9)}の研究手法を用いて、牛心臓タンパク質加水分解物（PHP）のコレステロール低下作用機構を明らかにした。コレステロールミセル溶解性はカゼインよりもPHPで有意に低下した。Caco-2細胞のコレステロール吸収抑制はカゼインミセルよりもPHPミセルで有意に高かった。血清コレステロールはカゼインよりもPHPで有意に低かった。放射性コレステロールで測定したコレステロール吸収はカゼインと比べてPHPで有意に減少し、PHPのコレステロール低下作用は空腸のコレステロール吸収阻害によるものである。PHP由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（PHPU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいてPHPよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し報告した¹⁰⁾。

ペプチド混合物であるPHPUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、PHPU由来ペプチドの分画精製を実施し、分画物を用いてin vitroのコレステロールミセル溶解性試験を行った¹¹⁾。活性ペプチド候補の活性をラットによる動物実験で評価した結果、世界初のコレステロール代謝改善ジペプチド（XY：アミノ酸配列は特許の関係で非公表）を発見した。そこで、今回はジペプチドXYの血清コレステロール低下作用機構を解明するために、肝臓脂質や糞中へのステロイド排泄量について分析した。

2. 方法、結果、考察

牛心臓由来ペプチド分画物であるHRHUGf3-RPIB2からジペプチドXY（アミノ酸配列は特許の関係で非公表）を同定したので、ジペプチドXYについて、高コレステロール血症ラットにおいて、脂質代謝に対する影響を評価した。高コレステロール食の食餌組成は既報¹¹⁾に従って調製し

た。実験群は以下である。

- 1) 対照群：高脂肪高コレステロール食（HFC）
- 2) XY群：ジペプチドXY投与群（HFCXY）

Wistar系雄ラット4週齢を実験に使用した。ジペプチドXYは14日間ゾンデによって経口投与した。解剖前8時間絶食後に解剖し、血液を採取し、遠心分離により血漿を得て、マイナス80度で保管した。なお、実験結果の統計的分析には、Students't-testを用いた。

実験の結果（Table 1）から、体重増加量、食餌摂取量、肝臓重量には、群間で有意な変化は認められなかった。血清コレステロールは対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で有意に低下した。血清トリグリセリドは、対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で低下傾向を示した。また、肝臓コレステロールレベルも対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で有意に低下した。さらに、糞中のコレステロール、胆汁酸（酸性ステロイド）や総ステロイド排泄量は、対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で有意に増加した。我々が牛心臓から世界で最初に発見したコレステロール代謝改善ジペプチドは、コレステロール吸収抑制作用を發揮することを明らかにした。今後はより詳細なジペプチドの作用機構の解明が望まれる。

3. 要 約

私たちはPHP由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（PHPU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいてPHPよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し報告した。そこで、ペプチド混合物であるPHPUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、PHPU由来ペプチドの分画精製を逆相クロマトグラ

Table 1 The effects of dietary XY on metabolic parameters in rats fed a high fat-cholesterol diet.

	HFC	HFCXY
Body weight gain(g/14d)	58.0±1.9	60.2±3.4
Food Intake(g/d)	9.6±0.1	9.9±0.4
Liver weight(g/100 g body weight)	5.9±0.2	6.0±0.1
Serum(mg/dl)		
Total Cholesterol(a)	245.4±14.1	165.9±2.0***
Triglyceride	358.7±75.3	179.1±20.9
HDL-Cholesterol(b)	59.1±3.2	77.4±2.4**
LDL + VLDL-Cholesterol	186.2±16.0	106.8±3.9**
Atherogenic index(a)/(b)	3.2±0.4	1.4±0.1**
Liver(mg/g liver)		
Total Lipids	259.6±8.6	235.8±5.2*
Cholesterol	37.4±1.8	24.2±0.7*
Triglyceride	96.9±5.5	99.6±5.1
Feces		
Dry weight(g/3d)	2.4±0.2	3.1±0.1*
Acidic steroids(mg/3d)	111.3±8.0	146.1±7.3*
Neutral steroids(mg/3d)		
Cholesterol	94.6±7.8	128.4±3.7**
Coprostanol	1.2±0.4	0.4±0.3
Total	95.8±8.2	128.8±3.8**
Total steroids	207.2±15.9	274.9±8.3**

1. Values are means±SEM, n=5. Asterisks indicate different from Control group

(*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

2. Values were calculated as follows : LDL + VLDL cholesterol = Total cholesterol - HDL cholesterol.

3. Total steroids = Acidic steroids + Neutral steroids

フィーやゲルfiltrationクロマトグラフィーにより実施し、分画物について、in vitroのコレステロールミセル溶解性試験を行った。in vitroコレステロールミセル溶解性の低下作用を発揮する活性ペプチド混合物を質量分析した結果、数種の候補ペプチドが含まれることを明らかにした。そのうちの活性候補ペプチドをラットによる動物実験で評価した結果、世界初のコレステロール代謝改善ジペプチド(XY:アミノ酸配列は特許の関係で非公表)を発見した。そこで、今回はXYの血清コレステロール低下作用を解明するために、肝臓脂質や糞中へのステロイド排泄量について分析した。その結果、XY投与により、血清コレステロール低下時には、肝臓コレステロールレベルも低下した。また、糞中へのコレステロール、胆汁酸(酸性ステロイド)や総ステロイド排泄量が増加した。

文 献

- Carroll, K. K., Hamilton, R. M. G. : *J. Food Sci.*, **40**, 18, 1975.
- Nagaoka, S., Kanamaru, Y., Kuzuya, Y., Kojima, T., Kuwata, T. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1484, 1992.
- 長岡利：日本栄養・食糧学会誌, **49**, 303, 1996.
- Iwami, K., Sakakibara, K., Ibuki, F. : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217, 1986.
- Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto, M. : *J. Nutr.*, **120**, 977, 1990.
- 長岡利：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 336, 1998.
- 長岡利：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 378, 1999.
- Nagaoka, S., Miyazaki, H., Oda, H., Aoyama, Y., Yoshida, A. : *J. Nutr.*, **120**, 1134, 1990.
- Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., Yamamoto, K. : *J. Nutr.*, **129**, 1725, 1999.
- Nakade, K., Kaneko, H., Oka, T., Ahmed, A. M., Muguruma, M., Numata, M., Nagaoka, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 607, 2009.
- 長岡利：食肉に関する助成研究調査成果報告書, 91, 2015.

食肉タンパク質の抗肥満および脂質代謝促進効果に関する研究

Dietary effect of meat protein on anti-obesity and lipid metabolism

若 松 純 一

(北海道大学北方生物圏フィールド科学センター)

Jun-ichi Wakamatsu

(Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)

We examined the dietary effect of meat protein on obesity and lipid metabolism by using a high fat diet-induced obesity model. The significant differences in rat body weight were not observed between groups. Regarding the weight of any white adipose tissue (WAT) (epididymal WAT, mesenteric WAT and perirenal WAT), there were no significant differences between groups. Moreover, regarding the weight of interscapular brown adipose tissue (BAT) as well as quadriceps femoris muscle, there were no significant differences between groups. On the other hand, although there was no significant difference in the liver weight between groups, liver fat content of chicken protein group was lower compared with the other groups. Relative mRNA expression of lipogenesis-related enzymes in the liver of chicken and beef protein groups was significantly lower than those of casein groups. Although relative mRNA expressions of fatty acid trafficking-related enzymes in the liver of chicken protein groups were significantly higher than those of the other groups, relative mRNA expressions of fatty acid degradation-related enzymes of chicken protein group were significantly higher than those of beef group. Consequently, Chicken protein might suppress the accumulation of fat in the liver.

1. 目 的

時代の流れとともに、世界的に我々人間の肥満が大きな問題となっている。主な要因として、脂質が多く含まれる高カロリーな食事の摂取増加や、デスクワークのような仕事の仕方の多様性に伴う身体活動の低下があげられる。さらに2008年には世界の18歳以上の39%（男性38%，女性40%）が体重過多、13%（男性11%，女性15%）が肥満で、1980年から2014年で世界の肥満率は2

倍以上に增加了。体重过多や肥満は、循環器疾患や糖尿病、脂質異常症、非アルコール性脂肪性肝疾患、筋骨格障害および癌のような生活習慣病の主因である。また、世界的に肥満とその代謝性合併症の有病率は、ここ数十年間で大幅に增加している¹⁾。このように肥満の危険性が知れ渡ったことにより、人々の健康への関心が高まっている。

我々はこれまでに、鶏肉は摂取後の体温上昇を亢進することを明らかにした^{2,3)}。さらに、鶏肉タンパク質の体熱産生能は他の畜種の食肉タンパ

ク質よりも高く、食肉の体熱産生能の違いには食肉タンパク質が寄与していることが示された⁴⁾。さらに、鶏肉タンパク質を配合した高脂肪・高ショ糖食を4週間摂取することで、褐色脂肪組織(BAT)重量が大きくなり、精巣上体、腸間膜および腎周囲の白色脂肪組織(WAT)重量が減少した(未発表データ)。このことから、鶏肉タンパク質の長期摂取は、脂質代謝を促進してWATの蓄積を抑制し、BATを活性化して增量や機能の亢進をもたらすことが示され、鶏肉タンパク質には内臓型肥満に対して抗肥満効果がある可能性が示された。しかし、体重増加を抑制する作用は確認できなかった。これは、鶏肉タンパク質の摂取期間が4週間と短かったことが原因かもしれない。また、鶏肉タンパク質の摂取は内臓WATを減少させたものの、骨格筋量を増加させることにより体重に違いが現れなかつた可能性も考えられたが、骨格筋の重量は測定されていない。さらに、抗肥満効果以外の脂質代謝亢進効果については未検討である。

食肉を構成しているタンパク質のアミノ酸組成は畜種間で類似しているが⁵⁾、個々のタンパク質でアミノ酸配列が少しずつ異なっている。そのため、消化されて生成するペプチドは摂取した食肉の畜種によって異なるかもしれない。このため、鶏肉タンパク質摂取によるWAT蓄積抑制作用およびBAT活性化作用には、鶏肉タンパク質が消化されて生じる特異的なペプチドが関与しているかもしれない。

そこで本研究では、鶏肉タンパク質の長期摂取がエネルギー消費の亢進に伴う抗肥満効果、ならびに脂質代謝亢進効果をもたらすかどうかを解明するために、鶏肉、牛肉タンパク質およびカゼインを配合した高脂肪・高ショ糖食をラットに長期間給餌して遺伝子レベルでそのメカニズムを検討した。

2. 方 法

2.1 動物実験

供試動物として5週齢、Wistar系の雄ラットを用いた。馴化後の試験期間は5ヶ月間とし、高脂肪・高ショ糖食(20%牛脂、20%ショ糖)を自由に摂食させた。試験期間中は3日に1回の頻度で体重および摂食量を測定し、自由に水を摂取させた。

2.2 試験飼料の調製

鶏肉(むね、もも肉)、牛肉(もも肉)からEzoeらの方法³⁾に従って精製食肉タンパク質を調製した。試験飼料は食餌性肥満を引き起こすように、AIN-93G飼料を改変して20%牛脂、20%ショ糖を配合した高脂肪・高ショ糖食を調製した。馴化飼料のカゼイン配合量(20%)とタンパク質含量が等しくなるようにそれぞれの精製食肉タンパク質を配合した。

2.3 血液および各種組織の採取

ラットにジエチルエーテルで麻酔を行い、体重および腹囲を測定した後、直ちに血液、肝臓、白色脂肪組織(WAT)および褐色脂肪組織(BAT)を採取した。血液は後大静脈から採取し、血漿ならびに血清を得た。WATは精巣上体、腸間膜および腎周囲より採取した。BATは肩甲骨間より採取した。肝臓、骨格筋、WATおよびBATは実験に供するまで-80°Cで保存した。

2.4 血中生化学検査

血漿中のグルコース濃度(グルコースC-II-テストワコー、和光純薬工業)、血清中のトリグリセリド濃度(トリグリセライドE-テストワコー、和光純薬工業)、遊離脂肪酸濃度(NEFA C-テストワコー、和光純薬工業)、コレステロール濃度(コレステロールE-テストワコー、和光純薬工業)、GOTとGPT濃度(トランスフェラーゼC-II-テストワコー、和光純薬工業)は各々キットを

用いて定量分析した。

2.5 肝臓の脂肪定量

Soxhlet抽出器によるエーテル抽出法に基づいて行った。

2.6 qPCR法

肝臓から抽出した全RNAからTranscriptor First Standard cDNA Synthesis Kit（ロシュ）またはReverTra Ace® qPCR RT Kit（TOYOB）を用いて、1本鎖cDNAを合成した。合成した1本鎖cDNA反応液40 μlのうち2 μlを鋳型とし、KAPA SYBR® FAST qPCR Kit（日本ジェネティクス）を用いて、LightCycler® 480を用いて定量PCR（qPCR）を行った。

2.7 統計処理

測定値は平均値±標準誤差で示した。エクセル（マイクロソフト）ならびにエクセル用統計アドインソフト（エクセル統計2006 for Windows, 社会情報サービス）により、各測定値から得られたデータの一元配置分散分析を行い、Tukeyの多重比較検定によって有意差検定を行った。また、等分散性が棄却された事象についてはKruskal-Wallis検定を用いてSteel-Dwassの多重比較により有意差検定を行った。p<0.05をもって統計学的に有意であるとし、p<0.1をもって統計学的に傾向があるとした。

3. 結果と考察

3.1 食肉タンパク質の長期摂取が高脂肪・高ショ糖食摂食ラットの体重および臓器・組織重量に及ぼす影響

鶏肉タンパク質が高脂肪・高ショ糖（それぞれ20%）食を長期摂取したラットの体重、肝臓、WAT（精巣上体、腸間膜、腎周囲）、BATおよび大腿四頭筋の重量に及ぼす影響を検討した。体重および腹囲について、すべての群間で有意な差は見られなかった（Fig. 1）。また、WAT、大腿四頭筋重量についてもすべての群間で有意な差は見られなかった（Fig. 2, 3）。BAT重量については、鶏肉タンパク質群はカゼイン群と比べて大きい傾向が見られた（p=0.05）（Fig. 2）。一方、肝臓重量について鶏肉タンパク質群は牛肉タンパク質群と比べて小さい傾向が見られた（p=0.06）。さらに、鶏肉タンパク質群以外はやや脂肪肝の様相を示していたため（データ示さず）、肝臓の脂質含量を測定したところ、鶏肉タンパク質群では牛肉タンパク質群と比べて有意に少なかった（Fig. 4）。なお、摂食量は群間で有意差は見られなかった（データ示さず）。

3.2 血中の代謝関連成分

試験期間終了後に採取した血液から、糖代謝の

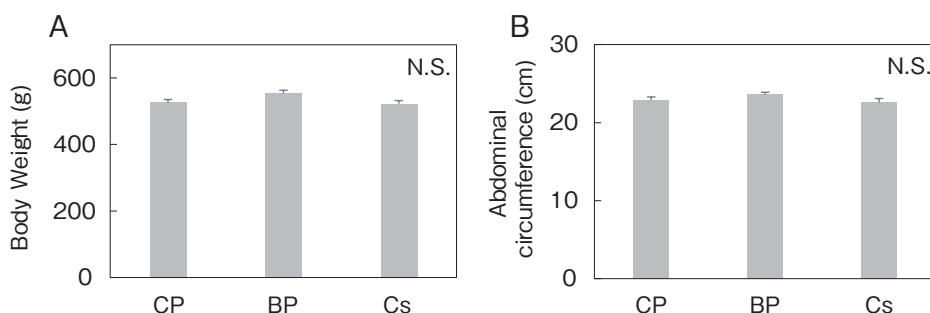


Fig. 1 Final body weight (A) and abdominal circumference (B) of rat

CP : Chicken protein, BP : Beef protein and Cs : Casein.

Data represent the mean±SEM (n=7). N.S. : Not significant

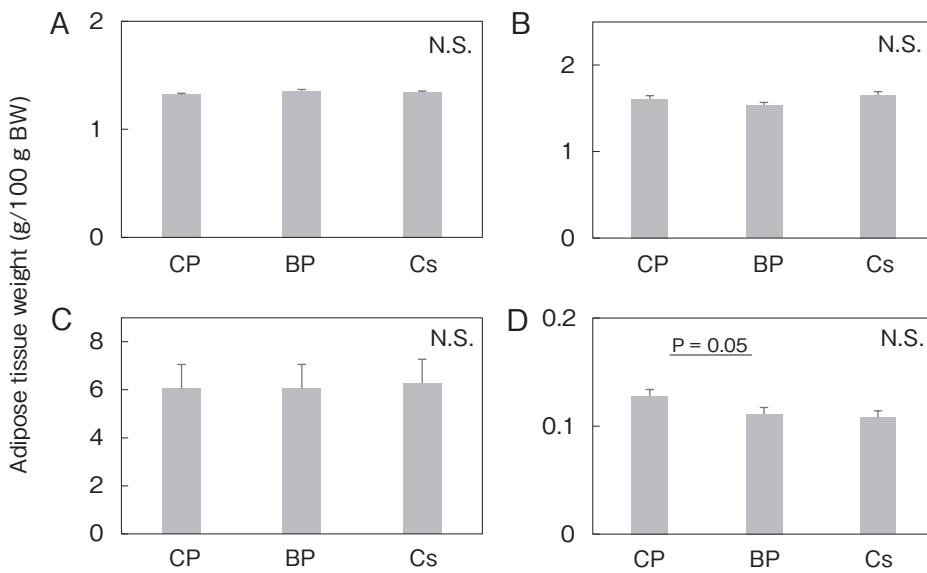


Fig. 2 Final WAT and BAT weight of rat

A : Epididymal WAT, B : Mesenteric WAT, C : Perirenal WAT, D : Interscapular BAT.

CP : Chicken protein, BP : Beef protein and Cs : Casein.

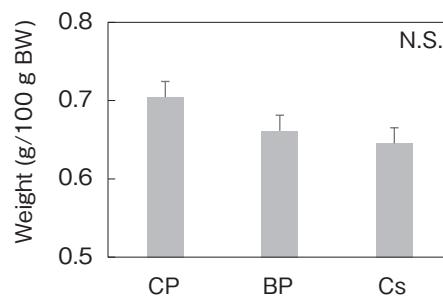
Data represent the mean \pm SEM (n=7). N.S. : Not significant

Fig. 3 Final Quadriceps femoris muscle weight of rat

CP : Chicken protein, BP : Beef protein and Cs : Casein.

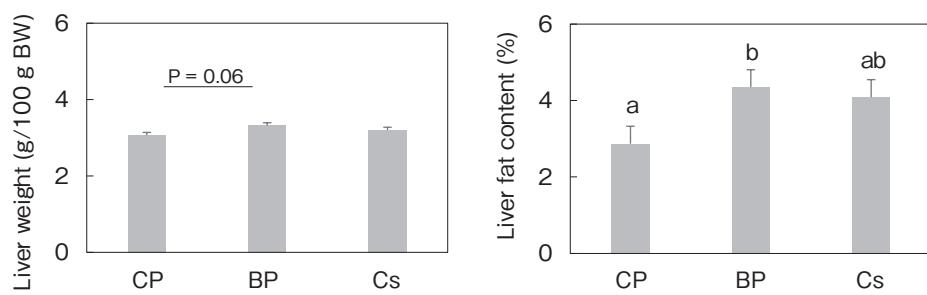
Data represent the mean \pm SEM (n=7). N.S. : Not significant

Fig. 4 Final liver weight (A) and liver fat content (B)

CP : Chicken protein, BP : Beef protein and Cs : Casein.

Data represent the mean \pm SEM (n=7). ab : Different letters indicate significantly differences between groups ($p < 0.05$).

指標となるグルコース、脂質代謝の指標となるトリグリセリド、NEFA、脂質代謝異常の指標となる総コレステロール、肝臓病の目安となるGOT、GPTの血中濃度およびGOT/GPT比を測定した。血中グルコース濃度について、鶏肉タンパク質群は牛肉タンパク質群と比べて有意に高かった。また、血中NEFA濃度について、鶏肉タンパク質群はカゼイン群と比べて有意に低かった。一方、血中トリグリセリド、総コレステロール、GOT、GPT濃度およびGOT/GPT比についてはすべての群間で有意な差は見られなかった（データ示さず）。

3.3 肝臓における脂質・糖代謝関連遺伝子の発現量

肝臓における脂肪酸合成に関与する遺伝子発現量について、*G6PD*および*PFK* mRNA発現量について、鶏肉タンパク質群と牛肉タンパク質群は

カゼイン群と比べて有意に低く、脂肪合成を促進する脂質代謝関連転写因子である*SREBP-1c* mRNA発現量は、鶏肉タンパク質群と牛肉タンパク質群はカゼイン群と比べて有意に低かった。一方、肝臓への脂肪酸の取込みに関与する*CD36*については、鶏肉タンパク質群が牛肉タンパク質群およびカゼイン群と比べてmRNA発現量は有意に高かった。また、脂肪酸の活性化に関与する*ACSL3*については、鶏肉タンパク質群が牛肉タンパク質群およびカゼイン群と比べて有意に高かった。さらに、ミトコンドリアへの脂肪酸の取込みに関与する*FABP1* mRNA発現量は、鶏肉タンパク質群が牛肉タンパク質群およびカゼイン群と比べて有意に高かった。肝臓における脂肪分解に関与するmRNA発現量は、*CPT1α*および*LCAD* mRNA発現量について、鶏肉タンパク質群は牛肉タンパク質群と比べて有意に高かった。

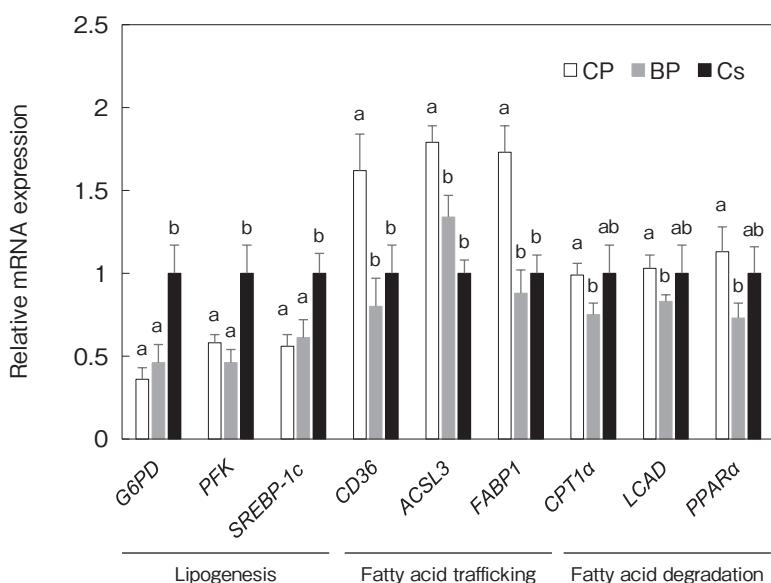


Fig. 5 Relative mRNA expression levels of lipid metabolism-related enzymes in the liver

CP : Chicken protein, BP : Beef protein and Cs : Casein.

The columns represent relative values of mRNA normalized to β -actin and expressed as the ratio of each mRNA in Cs groups

Data represent the mean \pm SEM ($n=7$).

^{ab} : Different letters indicate significantly differences between groups ($p<0.05$).

また、肝臓における脂肪分解を促進する脂質代謝関連転写因子であるPPAR α mRNA発現量について、鶏肉タンパク質群では牛肉タンパク質群と比べて有意に高かった（Fig.5）。

本研究では、鶏肉タンパク質摂取によって、骨格筋やBATによりエネルギー代謝が亢進する兆候は見られず、鶏肉タンパク質の長期摂取による抗肥満効果は認められなかった。一方、肝臓での脂質代謝に関連する遺伝子のmRNA発現量の結果から、肝臓における脂質代謝は亢進して、脂肪肝抑制効果が認められた。鶏肉および牛肉タンパク質の摂取は、肝臓における脂肪酸合成遺伝子の発現を誘導するSREBP-1c mRNAの発現を抑制して、脂肪酸合成を抑制したと考えられる。また、鶏肉タンパク質の摂取は脂肪酸の取込みを促進するものの、それ以上に脂肪酸の分解を促進したことで、肝臓での脂肪蓄積を抑制したのかもしれない。一方、牛肉タンパク質は、カゼイン群と比べて有意差はなかったが、脂肪酸の取込みを抑制したもの、脂肪酸分解も抑制したことから、結果的に肝臓での脂肪含量が増加したと考えられる。肝臓に脂肪が蓄積する脂肪肝は放置すると、肝炎や肝硬変、肝臓がんに進行することがある^{6,7)}。以前は飲酒による脂肪肝が一般的であったが、近年は飲酒とは関連しない非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD）も注目されている^{8,9)}。よって、鶏肉タンパク質の脂肪肝抑制効果は鶏肉の新しい機能として大いに期待される。

4. 要 約

食後の体熱產生能の高い鶏肉タンパク質の長期摂取が抗肥満効果や脂肪肝改善効果に及ぼす影響

を、食事性肥満モデルを用いて検討した。体重にはすべての群間で有意差がなく、WAT、BATおよび大腿四頭筋重量にも有意差はなかったことから、鶏肉タンパク質の長期摂取による抗肥満効果は見られなかった。一方、鶏肉タンパク質の長期摂取は脂肪肝を抑制する可能性が示された。そこで、脂肪肝関連の遺伝子の発現量を定量的PCRの結果から、鶏肉と牛肉タンパク質の長期摂取は、肝臓での脂肪酸合成を抑制した。しかし、鶏肉タンパク質は、脂肪酸の取込みを促進したが、牛肉タンパク質よりも肝臓における脂肪酸の分解を促進したことで、肝臓での脂肪蓄積を抑制したのかもしれない。

文 献

- 1) World Health Organization; Obesity and overweight. 2018. Available from URL : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/>
- 2) Wakamatsu, J., Fujii, R., Yamaguchi, K., Miyoshi, S., Nishimura, T., Hattori, A. : *Anim Sci J.*, 84, 416~425, 2013.
- 3) Wakamatsu, J., Takabayashi, N., Ezoe, M., Hasegawa, T., Fujimura, T., Takahata, Y., Morimatsu, F., Nishimura, T. : *J Nutr Sci Vitaminol.*, 59, 516~525, 2013.
- 4) Ezoe, M., Wakamatsu, J., Takahata, Y., Hasegawa, T., Morimatsu, F., Nishimura, T. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, 62, 93~100, 2016.
- 5) 香川芳子：五訂増補食品成分表2006，女子栄養大学出版部，東京，2006。
- 6) Bugianesi, E., Leone, N., Vanni, E., Marchesini, G., Brunello, F., Carucci, P., Musso, A., Paolis, P., Capussotti, L., Salizzoni, M., Rizzetto, M. : *Gastroenterology*, 123, 375~378, 2002.
- 7) Hui, A. Y., Wong, V. W., Chan, H. L., Liew, C. T., Chan, J. L., Chan, F. K. : *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 21, 407~413, 2005.
- 8) Adler, M., Schaffner, F. : *American Journal of Medicine*, 67, 811~816, 1979.
- 9) Ludwig, J., Viaggiano, T. R., McGill, D. B., Oh, B. J. : *Mayo Clinic Proceedings*, 55, 434~438, 1980.

肥満に伴うサルコペニア発症予防に対するカルノシン摂取の有用性

Efficacy of carnosine intake on the prevention of sarcopenia related with obesity

後藤 孔郎・正木 孝幸・柴田 洋孝

(大分大学医学部 内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座)

Koro Gotoh, Takayuki Masaki and Hirotaka Shibata

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

Obesity induces systemic low-grade chronic inflammation. Sarcopenia obesity is deeply related with obesity-induced insulin resistance, expression of inflammatory cytokines and oxidative stress although the mechanism is uncertain. It is well-known that carnosine included a lot in pork has action of anti-oxidant stress. The aim of this study is to clarify that the intake of carnosine improves obesity-induced sarcopenia. Male rats were divided into four groups and kept for 2 months as follows, standard diet (Standard:20% fat) -fed group, high-fat diet (HF; 60% fat)-fed group, Standard-fed plus carnosine (250 mg/kg body weight) group, and HF-fed plus carnosine group for 2 months. We evaluated 1) inflammatory cytokine levels, infiltration of inflammatory macrophage (M1) in muscle, 2) IL-15 expression associated with enlargement of muscular fibers and laminin which plays a role in protecting these fibers in muscle, 3) fat deposit in muscle. Carnosine treatment inhibited HF-induced inflammatory responses and infiltration of M1 macrophage in muscle. Moreover, carnosine also reversed HF-induced decrease of IL-15 as well as laminin expression and increase of fat deposit in muscle. Thus it is suggested that carnosine intake might be effective to prevent the development of sarcopenia obesity.

1. 目的

加齢性筋肉減弱症（サルコペニア）は、寝たきりや要介護状態につながる転倒の原因として、その成因解明や予防法の確立が注目されている。また、肥満・糖尿病などの代謝異常では、加齢とともに転倒頻度が増加することが指摘されている。今回申請者は、骨格筋から産生されるサイトカインであるマイオカインに着目する。例えば肥満モ

デル動物において、筋線維の肥大化をもたらすマイオカインであるIL-15の発現が低下していることが明らかになっている。その原因の1つに骨格筋内に浸潤した炎症性細胞由来のサイトカインが関与していると推測されている。肥満患者およびそれに関連したサルコペニア患者の増加は世界的な問題となっている。肥満は、全身性炎症性疾患と位置付けられており、筋肉にも炎症性変化がみられるとしている。サルコペニアには、動物性

たんぱく質の摂取が推奨されているが、どの成分が有効かについては不明な点が多い。

最近、豚肉や鶏肉に含まれる“カルノシン”は脳神経細胞を保護し、認知症発症を予防する効果があることが知られている。その他、カルノシンは抗酸化作用や疲労回復作用を有することも明らかになっている。実際、ラットの実験において、カルノシンは、脳重量減少の抑制効果があることが明らかになり、これにはカルノシンの強い抗酸化作用が関連していることが示唆されている。これまで、カルノシン摂取とサルコペニアとの関連についての研究はあまり散見されない。本研究では「カルノシン摂取がマイオカイン発現の増加をもたらす」という作業仮説を立証することを目的としている。これが証明されれば、カルノシンを多く含む豚肉や鶏肉の摂取が、速筋増加作用をもたらすことでサルコペニア発症予防に有用であることが示唆される。これと併せて、肥満による慢性炎症の1つである内臓脂肪や肝臓内の炎症性変化も改善することも期待される。今回、食餌誘導性肥満モデル動物を用い、カルノシンの摂取によるさまざまなマイオカイン合成の増加が、骨格筋の筋線維の肥大、筋肉内の炎症性変化、さらには筋肉内の異所性脂肪沈着、それぞれの改善をもたらすかについて検討する。さらにこのようなマイオカインの増加が、肝臓や内臓脂肪にも良い影響を及ぼすかについても検討する。以上より本研究の目的は、豚肉や鶏肉摂取が骨格筋からのマイオカイン発現を高め、骨格筋へのオートクライン的なメカニズムによって筋肉そのものを改善させ、サルコペニア発症予防に有用であることを証明することである。

2. 方 法

雄ラットに通常食（ST；餌中の20%が脂肪成分）または高脂肪食（HF；餌中の60%が脂肪成

分）を摂取させ、通常食群と高脂肪食群に分ける。さらに、各群をカルノシン添加群（250mg/kg体重）とコントロール群に分ける。したがって、通常食+コントロール（ST+control）群、通常食+カルノシン（ST+carnosine）添加群、高脂肪食+コントロール（HF+control）群、高脂肪食+カルノシン添加（HF+carnosine）群の4群を作成し、2ヶ月飼育する。その後、以下のような評価項目について検討する。

- a) 大腿筋（骨格筋）内の炎症性サイトカインである tumor-necrotizing factor (TNF)- α および抗炎症性サイトカインである IL-10 発現、さらには速筋肥大誘導をもたらす IL-15 の発現を測定する。
- b) 筋細胞を保護するとともに筋の再生・分化に重要な役割を果たすラミニンを用いて、骨格筋の筋線維の評価を組織学的に評価する¹⁾。
- c) 骨格筋内の脂肪蓄積を評価するため、骨格筋内の中性脂肪量を測定する。
- d) 骨格筋内の炎症性変化を評価するため、骨格筋内のマクロファージ浸潤を組織学的に評価する。また、骨格筋内の TNF- α / IL-10 の評価も併せて行う。

3. 結果と考察

3.1 高脂肪負荷に伴う骨格筋内の炎症性変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって TNF- α および IL-10 発現ともに増加したが、TNF- α / IL-10 では有意に上昇したことから、骨格筋内では炎症性変化をもたらしたことが認められた。それらの変化はカルノシンを経口投与により抑制された（Fig. 1 A-C）。また、骨格筋内の炎症性マクロファージ（M1）浸潤について検討したところ、高脂肪負荷による M1 浸潤の亢進が、カルノシン摂取によって有意に抑制された（Fig. 2）。

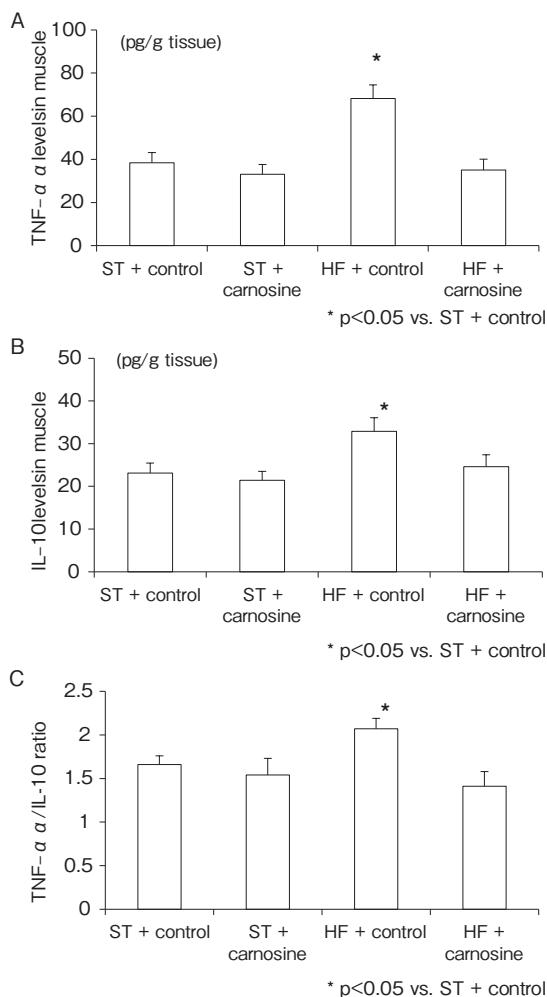


Fig. 1

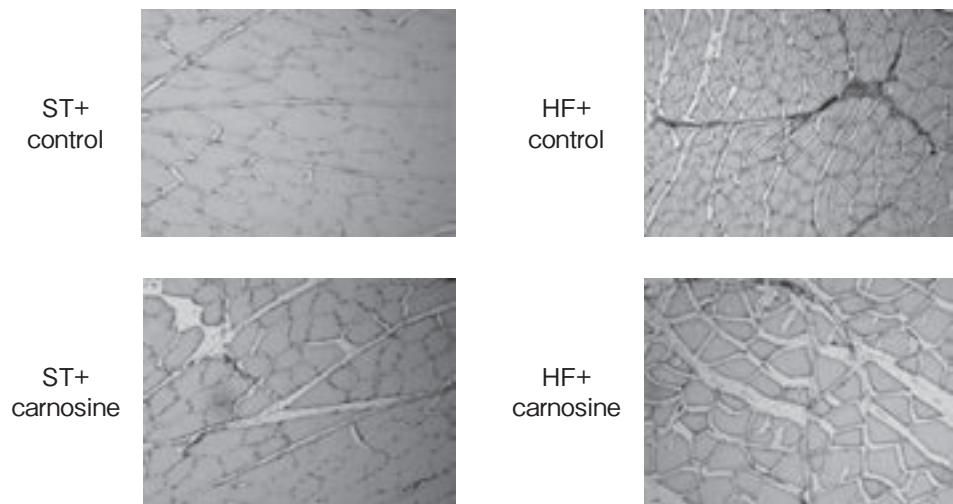


Fig. 2

3.2 高脂肪負荷に伴う骨格筋内IL-15の変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって骨格筋でのIL-15発現が低下するが、その低下はカルノシンを経口投与により改善した (Fig. 3)。また、骨格筋でのラミニン発現を検討したところ、高脂肪負荷に対するラミニン発現の低下が、カルノシンによって改善した (Fig. 4)。

3.3 高脂肪負荷に伴う骨格筋内の脂肪沈着の変化に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって骨格筋での中性脂肪量が上昇したが、その低下はカルノシン経口投与により改善した (Fig. 5)。

カルノシンは・アラニンとヒスチジンのジペプチドで・アラニン・ヒスチジンであり、特に豚や牛の筋肉中に高濃度に存在する。これらは、ヒスチジンの構成要素であるイミダゾールからイミダゾールペプチドと呼ばれ、内因性抗酸化物質としての役割を果たしている^{2,3)}。カルノシンを摂取したラットでは筋肉中のカルノシン含有量が装荷とともに筋肉脂質の過酸化や蛋白の酸化が抑制されることが知られている。

内臓肥満はインスリン抵抗性を基盤としたメタ

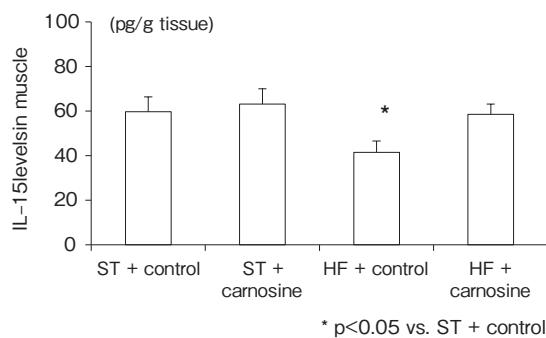


Fig. 3

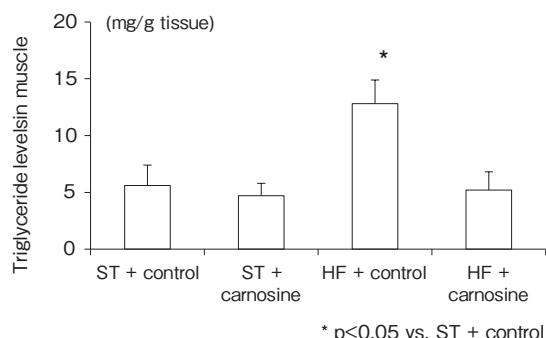


Fig. 5

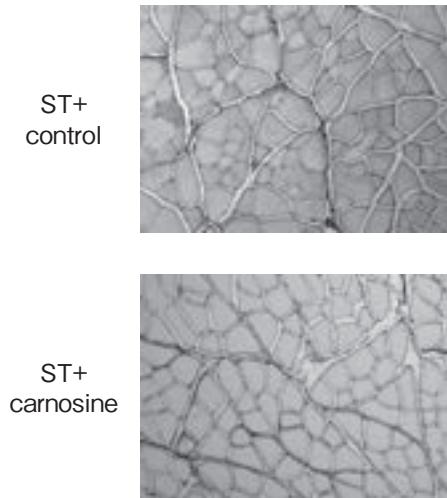


Fig. 4

ポリック症候群の基盤となる状態である。サルコペニアと肥満の合併を表すサルコペニア肥満は単なる病態の組合せではなく、代謝異常や機能障害がより強く認められる⁴⁾。また、肥満は全身の軽度慢性炎症性疾患とされており、事実、脂肪組織ではTNF- α 、IL-1 β などの炎症性サイトカインが生成され、筋委縮やサルコペニアの進行につながると推測されている⁵⁾。このようなインスリン抵抗性や炎症とサルコペニアを結びつける機序として、酸化ストレスが考えられている⁴⁾。酸化ストレスによりミトコンドリアや核内DNAが障害され、この蓄積がアポトーシスを刺激し、筋線維の委縮や筋細胞の喪失をきたすと考えられてい

る。加齢も肥満も独立して酸化ストレスを惹起するが、組み合わされることによりさらに障害が促進する⁴⁾。本研究では、抗酸化作用を有するカルノシンがサルコペニア肥満の状態を改善したことを考慮すると、カルノシンの摂取はサルコペニア肥満の発症予防に有効である可能性が示唆される。

サルコペニア肥満は、高齢者の身体機能の低下や代謝疾患と関連し、心血管疾患、死亡リスクを高めるため、その治療法の確立が求められている。サルコペニアに対しては、レジスタンス運動とタンパク質の補給の併用が除脂肪量を増加させ、筋力低下を改善することがメタ解析により報告されており、ビタミンDやタンパク同化ホルモ

ンであるテストステロン・インスリン・成長ホルモンの補充も効果が期待されている⁶⁾。しかしながら、サルコペニア肥満に対する有用性は不明である。さらに、インスリン抵抗性改善薬の効果が期待されるが、サルコペニア肥満に対するエビデンスは乏しいとされている。

骨格筋は運動器としての働きだけでなく、生理活性を持つ数多くのホルモン様活性物質（マイオカイン）を分泌する内分泌器官でもある。今後、カルノシン経口投与後におけるイリシンといったマイオカインの発現の変化を検討する必要がある。

4. 要 約

肥満は、全身性炎症性疾患と位置付けられており、サルコペニア発症の危険因子であるとされている。サルコペニア肥満の病態生理に関しては、インスリン抵抗性、炎症性サイトカインの過剰発現に伴う慢性炎症、酸化ストレスなどが関与しているとされているが、メカニズムの詳細は不明である。以前より、豚肉に多く含まれる“カルノシン”は抗酸化作用があることが知られているが、このような抗酸化作用がサルコペニア肥満に有用であるかは不明であった。以上より本研究では、「豚肉の摂取はサルコペニア肥満の進行予防効果をもたらす」ことを証明することを目的とした。

カルノシンは、肥満による骨格筋内の炎症反応を抑制させ、筋線維の増幅に必要なIL-15発現を高め、骨格筋内の脂肪沈着を低下させた。以上より、カルノシンを多くする豚肉の摂取は、サルコペニア肥満の発症もしくは進展予防に有効であることが示唆される。

文 献

- 1) Sanes, J. R. : The extracellular matrix. Engel AG, Franzini-Armstrong C (eds), *Myology*, McGraw-Hill Inc, New York, pp242~260, 1994.
- 2) Preston, J. E., Hipkiss, A. R., Himsorth, D. T., Romero, I. A., Abbott, J. N. : Toxic effects of beta-amyloid (25-35) on immortalised rat brain endothelial cell : protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine, *Neurosci Lett*, **242**, 105~108, 1998.
- 3) Fu, Q., Dai, H., Hu, W., Fan, Y., Shen, Y., Zhang, W., Chen, Z. : Carnosine protects against Abeta42-induced neurotoxicity in differentiated rat PC12 cells, *Cell Mol Neurobiol*, **28**, 307~316, 2008.
- 4) Kohara, K. : Sarcopenic obesity in aging population : current status and future directions for research, *Endocrine*, **45**, 15~25, 2014.
- 5) Vincent, H. K., Raiser, S. N., Vincent, K.R. : The aging musculoskeletal system and obesity-related considerations with exercise, *Ageing Res Rev*, **11**, 361~373, 2012.
- 6) Cermak, N. M., Res, P. T., de Groot, L. C., Saris, W. H., van Loon, L. J. : Protein supplementation augments the adaptive response of skeletal muscle to resistance-type exercise training : a meta-analysis, *Am J Clin Nutr*, **96**, 1454~1464, 2012.

野生動物肉の食料資源としての利用に関する研究 ：生理活性機能の検討

Study on game meat utilization as a food stuff ; Assessment of the physiological activity of this food stuff

坂田 亮一・竹田 志郎・時田 昇臣*

(麻布大学獣医学部, *日本獣医生命科学大学動物科学科)

Ryoichi Sakata, Shiro Takeda and Norio Tokita*

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

The antioxidant activity and inhibitory effects on the blood pressure, an increase in which causes greater hypertension, in the digestive enzyme degradation products of venison were investigated by DPPH radical elimination method and angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibition activity, respectively. The results were compared with beef as the control. The antioxidant test indicated the presence of activity in digestive enzyme decomposition products of beef and venison and the DPPH radical scavenging activity in these products of venison to be significantly higher compared to beef ($p<0.05$). The value for beef was essentially the same as that in the literature. Consequently high antioxidant power in venison peptides was considered to derive from animal meat. ACE inhibitory activity in digestive enzyme degradation products of beef and venison was demonstrated by blood pressure increase suppression. This activity in the enzyme degradation product of venison was shown to be significantly higher than in beef ($p<0.05$). Based on these findings, it may be concluded that enzymatically decomposed substances produced with venison digestion exert antioxidant action which may become evident with consumption.

1. 目的

日本各地で増加が確認されている野生鳥獣による農作物被害は、ここ数年その額を200億円前後、森林被害は約8,000ヘクタールと推移している^{1~3)}。被害対策の一環として、個体数管理のために捕獲された野生獣を利活用することは地域活性化および地域経済において非常に重要である。鹿肉はジビエ肉として親しまれており、畜肉と比べて高タ

ンパク質で低脂肪なことから優れた栄養食材としても注目されている。また適切に放血をされた個体の肉は臭みも少なく、味も良いことから、地域振興の有望な資源として期待されている^{3, 4)}。しかしながら、捕獲された個体のうち食肉として流通されているのは1割にとどまっているのが現状である⁵⁾。

一方、近年の食品業界において、食品由来ペプチドの生理活性機能の探索が盛んに行われてい

る。摂取した食品は生体内で消化作用を受けることで、タンパク質は分解されて低分子化し、生体内に吸収される。その中でも、動物性食品は生理活性を有する様々なペプチドなどに分解されることが知られている。Saigaら⁶⁾は豚肉タンパク質由来のペプチドに抗酸化活性能があることを報告している。Ahhmedら⁷⁾と竹田ら⁸⁾は、食肉の消化酵素処理により生じるペプチド混合物に血圧低下作用を有することと、抗酸化作用を有することをそれぞれ報告している。

そこで本研究では、鹿肉の食肉資源としての普及促進に向けて、食肉と同様に生理活性機能を有するか、シカと同類同亜目である牛を用いて比較検討を行った。

2. 方 法

2.1 実験材料および消化酵素分解物の調製

供試した牛肉は、神奈川県相模原市にある大学近くの精肉店にて購入し、-30°Cの冷凍庫内に保存した。鹿肉は長野県猟友会より、捕獲後24時間以内に解体された個体を冷凍状態で受け取り、保持した。

実験には、4°Cの冷蔵庫内で1日かけて解凍したものを使用した。摂取後の体内における消化吸収の条件を考慮して、挽肉量の2倍量の蒸留水で攪拌後、70°Cで30分間加熱した。その後、胃粘膜由来の消化酵素であるペプシンを添加後37°Cで2時間加温を行い、すい臓由来の消化酵素であるトリプシンとパンクレアチニンをペプシンと同量添加し、再び37°Cで2時間加温を行った。

消化酵素を加えていないものを未処理区、ペプシンのみを添加した分解物をペプシン(pep)処理区、すべての消化酵素を加えた分解物をペプシン・トリプシン・パンクレアチニン(pep/try/pan)処理区とし、各酵素分解物を遠心分離(6,000×g)した後、その上清をろ紙No.5A(東洋濾紙、東京)

でろ過した。

2.2 ペプチドの定量および分子量の推定

ペプチドの定量はChengらの方法⁹⁾により行った。すなわち、サンプル溶液に対し75倍量のo-phthalaldehyde試薬を加えて、常温で2分間反応させた。その反応液の吸光度(340nm)を分光光度計UV-1800型(島津製作所、京都)を用いて測定し、Gly-Leu相当量として算出した。

また、タンパク質が消化酵素によって低分子化されたことを確認するために、16%SDS-ポリアクリルアミドゲル(PAGE)と、ゲルろ過HPLCで評価した。ゲルろ過HPLCでは分子量マーカーとして、牛血清アルブミン(M.W.=66,000)、シトクロムC(M.W.=12,400)、アプロチニン(M.W.=6,500)、リボフラビン(M.W.=376)を使い溶出時間をもとに分子量を推定した。

2.3 抗酸化試験

抗酸化作用の評価のため、1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)ラジカル消去活性を、DPPH分光測定法¹⁰⁾に準じて行った。すなわち、各種サンプルは70%エタノールで希釀し、ホモジナイズ後の遠心上清を分析試料とした。これと200mMのMES緩衝液、800μMのDPPH溶液を混合し、20分間反応させ、520nmで吸光度を測定した。サンプルのラジカル消去率は以下の式で算出した。

$$\text{ラジカル消去率} (\%) = \{ [A_{520\text{nm}}(\text{DPPH+溶媒})] - [A_{520\text{nm}}(\text{DPPH+サンプル})] \} / [A_{520\text{nm}}(\text{DPPH+溶媒})]$$

またTrolox(和光純薬工業、東京)をスタンダードとして、検量線を作成し、サンプルの抗酸化活性のTrolox相当量として以下の式で算出した。

$$\text{DPPHラジカル消去活性 (nmol-Trolox相当量}/\mu\text{l}) = \text{分析試料の傾き} (A_{520\text{nm}}/(\mu\text{l}/\text{assay})) / \text{Troloxの傾き} (A_{520\text{nm}}/(nmol/\text{assay}))$$

2.4 アンギオテンシンⅠ変換酵素(ACE)阻害活性

アンギオテンシンⅠ変換酵素(ACE)阻害活性は、ACE阻害活性測定法¹¹⁾に準じて行った。すなわち、各種サンプルとACE, Hippuryl-L-histidyl-L-Leucine (HHL)から切り出された馬尿酸を酢酸エチルで溶媒抽出後、凝縮乾固し、再溶解して228nmの吸光度を測定した。ACE阻害率はサンプルを加えた吸光度をS、サンプルの代わりに超純水を加えた時の吸光度をC、あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして以下の式で算出した。

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

またACE阻害活性はIC₅₀値を算出し、Gly-Leu相当量として評価した。

3. 結果と考察

3.1 ペプチドの定量および分子量の推定

ペプチドの定量については、各肉サンプルとともに消化酵素を添加していくことでペプチド量が有意に増加していることが確認された($p<0.05$)。しかしながら、酵素未処理区、pep処理区およびpep/try/pan処理区では有意差が認められなかった(Table 1)。

また16% SDS-PAGEにより、各肉サンプルとともに消化酵素処理に伴いタンパク質の低分子化が確認された。しかしながら、pep/try/pan処理区においてはゲル濃度を20%に変更しても動物種間における明確なバンドは見られなかった。そこで、ゲルろ過HPLCによって確認したところ、牛肉および鹿肉のpep/try/pan処理区の低分子量画分が12kDa以下に存在していることが認められた(データ省略)。

3.2 抗酸化試験

ラジカル消去率(%)では、酵素未処理区およびpep処理区における動物種間による有意差は確

認されなかったが、pep/try/pan処理区においては牛肉に比べて鹿肉が有意に高い消去率が認められた($p<0.05$)。

また、ラジカル消去活性は、酵素未処理区のラジカル消去率(%)が低いことから、pep処理区およびpep/try/pan処理区で比較を行った。その結果、pep処理区において動物種間の有意差は確認されなかったが、pep/try/pan処理区においては牛肉に比べて鹿肉が有意に高い消去活性が認められた($p<0.05$) (Fig. 1)。

報告されている牛肉のラジカル消去活性の数値⁸⁾と今回の数値が同程度であったことから、鹿肉摂取時のペプチドが高い抗酸化力を有することが示唆された。

3.3 ACE阻害活性試験

ACE阻害率(%)は、各肉サンプル共に酵素

Table 1 Results with change in peptide concentration

Sample	Beef	Venison
Enzyme untreated (mM)	25.6 ± 2.3 ^a	22.2 ± 2.4 ^a
Pepsin treated (mM)	51.6 ± 2.3 ^b	50.6 ± 2.9 ^b
Pepsin · Trypsin · Pancreatin treated (mM)	79.0 ± 4.0 ^c	75.7 ± 6.6 ^c

Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

Data represent mean ± SD (n=3).

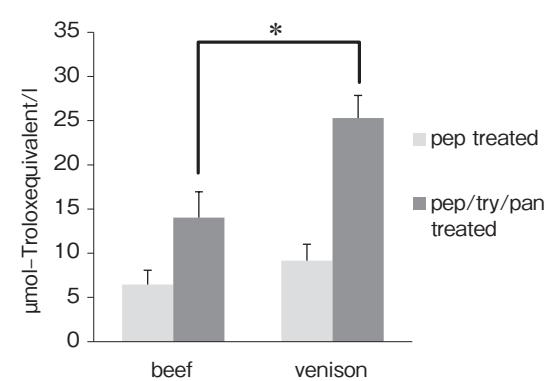


Fig. 1 Comparison of radical-scavenging activity in beef and venison.

Data represent mean ± SD (n=3). *Significantly different from beef ($p<0.05$)

未処理区に比べて pep処理区およびpep/try/pan処理区において活性が認められ、pep/try/pan処理区では牛肉に比べて鹿肉に有意に高い阻害率(%)が認められた($p<0.05$) (Fig. 2)。

またACE阻害活性を示すIC₅₀値は、牛肉に比べて鹿肉が有意に高い活性を示した($p<0.05$) (Table 2)。

ACE阻害率およびACE阻害活性とともに鹿肉が牛肉に比べて高い活性を示したことから、食肉の中で鹿肉が血圧上昇抑制作用を発揮する可能性が示唆された。

以上の結果より、捕獲された野生鳥獣の摂取を想定し、消化酵素処理をした鹿肉と牛肉は、生理活性機能を有する可能性があるペプチドへと低分子化することが認められた。

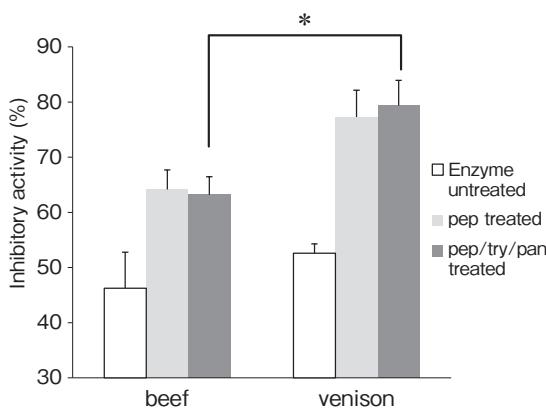


Fig. 2 Comparison of ACE-inhibitory activity in beef and venison.

Data represent mean \pm SD ($n=3$). *Significantly different from beef ($p<0.05$)

Table 2 Results of ACE-inhibitory activity for each enzyme hydrolysate derived from meat

Sample	Beef	Venison
IC ₅₀ (mM)*	33.5 \pm 0.61 ^a	18.6 \pm 1.3 ^b

Different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

Data represent mean \pm SD ($n=3$). *Peptide concentration required to inhibit ACE activity by 50%.

今後は、哺乳類イノシシ亜目であるイノシシとその家畜種である豚を追加して、食肉とジビエ肉での比較検討を行っていく。また、今回DPPHラジカル消去活性およびACE阻害活性の両方とも牛肉よりも活性が高く認められた鹿肉の消化酵素処理ペプチドにおいて、その活性成分の同定を行い、同定した成分をもとに純粋な有効成分においても比較検討を行う予定である。

また、今回の試験に供した鹿肉は長野県猟友会より入手した。野生シカは本来、生息地内の植生(植物)を採食して生活している。このため採食する植物やその栄養価値は季節によって異なることが報告¹²⁾されている。すなわち、早春から初夏においては草本植物を、夏季から秋季においては木本葉部や堅果類を採食している。そして冬季には草本枯死部、針葉樹の葉部や樹皮を採食している。こうした採食物の違いは、鹿の消化過程の主体であるルーメン内消化に変化を与えることになり、体組織(筋肉や脂肪組織)の代謝に影響を及ぼすことが想定される。したがって鹿肉を構成するアミノ酸も季節により変動するものと思われる¹³⁾。今回の試験では鹿肉を消化酵素処理することによりペプチド混合物には抗酸化力や血圧上昇抑制効果のあることが認められたが、今後は鹿を捕獲する時期や生息地の植生との関係性も明らかにする必要がある。

4. 要 約

鹿肉の消化酵素分解物による抗酸化作用および血圧上昇抑制作用について、牛肉を対照区とし、DPPHラジカル消去法およびACE阻害活性法により検討した。抗酸化試験の結果、牛肉および鹿肉の消化酵素分解物に活性が認められ、牛肉に比べ鹿肉の酵素分解物において有意に高いDPPHラジカル消去活性が認められた($p<0.05$)。牛肉の値が文献値と同程度であったことから、鹿肉が動物

肉由来のペプチドにおいて高い抗酸化力を持っていると考えられた。また血圧上昇抑制試験により、牛肉および鹿肉の消化酵素分解物にACE阻害活性が認められ、牛肉に比べ鹿肉の酵素分解物において有意に高い活性が認められた ($p < 0.05$)。以上より、ヒトの消化により生じる鹿肉酵素分解物は、高い抗酸化作用およびACE阻害活性を有するため、生体内においてこれらの生理活性機能を発揮する可能性が高いと考えられた。

謝 辞

本研究の実施にあたり、実験を担当した麻布大学大学院の金子桜子院生（獣医学研究科博士課程前期）、ならびにジビエ利活用に関し沢山の資料をご提供いただいた押田敏雄先生（麻布大学名誉教授、日本ジビエ振興協会理事）に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) 農林水産省：鳥獣被害の現状と対策、2016年3月。
http://www.maff.go.jp/j/seisan/tyozyu/higai/pdf/h2803_meguji_zentai2.pdf
- 2) 坂田亮一、時田昇臣、押田敏雄：野生動物肉の加工利用のための技術開発：加工適性に及ぼす血絞りと塩漬法の効果、平成27年度食肉に関する助成研究成果報告書VOL.34、67～71、2016。
- 3) 押田敏雄、坂田亮一：「第4回日本ジビエサミット」に参加して、第72巻4号、279～297、2018。
- 4) 押田敏雄、西澤久友、坂田亮一：その場で処理・

- ジビエカーブの可能性、家畜衛生学会誌、43 (4), 175～183、2018。
- 5) 日本農業新聞：ジビエ“農村産業”に捕獲・加工・流通人材や施設整備後押し農水省がモデル事業、2017年9月17日。 <https://www.agrinews.co.jp/p41922.html>
 - 6) Saiga, A., Tanabe, S., Nishimura, T. : Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 3661～3667, 2003.
 - 7) Ahhmed, A. M., Muguruma, M. : A review of meat protein hydrolysates and hypertension, *Meat Science*, 86, 110～118, 2010.
 - 8) 竹田志郎、久保田大樹、竹之山慎一、河原聰、六車三治男：各種食肉の消化酵素分解物における抗酸化作用の検討—その畜種別差異の比較検討—、日本暖地畜産学会報、58, 103～108, 2015.
 - 9) Cheng, F. Y., Lai, I. C., Lin, L. C., Sakata, R. : The *in vitro* antioxidant properties of alcalase hydrolysate prepared from silkie fowl (*Gallus gallus*) blood protein, *Animal Science Journal*, 87, 921～928, 2016.
 - 10) (社)日本食品科学工学会：平成19年度農林水産省補助事業（食料産業クラスター）食品機能性評価マニュアル集第Ⅱ集、71～78、2007。
 - 11) (社)日本食品科学工学会：平成20年度農林水産省補助事業（食料産業クラスター）食品機能性評価マニュアル集第Ⅲ集、68～73、2008。
 - 12) Tokita, N., Nedu, M., Sakata, E., Takii, A., Tamura, A., Furubayashi, K., Tokita, T. : Nutritive value of three sasa species in the Tanzawa mountains as a winter food for sika deer, *Wildlife Conservation Japan*, 13, 1～4, 2011.
 - 13) 時田昇臣、大橋りか、長谷川愛：野生鳥獣のジビエ活用：イノシシ及びニホンジカの機能性アミノ酸、2017年度日本草地学会弘前大会講演要旨、p.122、2017。

機能性畜産副生成物を用いた糖尿病合併高血圧症の改善を目指した開発研究

Improvement effect of natural component derived from animal product on the blood pressure in fructose-induced hypertension rats with diabetes mellitus

吉川 豊・糸井 亜弥

(神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)

Yutaka Yoshikawa and Aya Itoi

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

There are various factors for adjustment of blood pressure, and the medicines are chosen by guidelines. It is said that the angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors affect the renin-angiotensin systems (RAS), and decrease the blood pressure. They also preserve renal function. In the present study, we investigated that the whether natural component derived from animal product (globin and lever) had the ACE inhibitory effect in the in vitro experiments. And we revealed that both globin and lever showed the high ACE inhibitory effect. Fructose-induced hypertension rats with diabetes mellitus were taken as a globin (200 or 400mg globin/kg/day) orally for about 10 weeks. At the end of study period, plasma, blood vessel, lung, testis, and kidney ACE activity were measured by HPLC-UV technique. In this study, there was significant decrease in ACE activity at the lung. Moreover, the ACE inhibitory effects of the blood vessel or kidney tend to decrease. These results suggested that globin protein had decreasing effect of blood pressure.

1. 目的

生活習慣病の1つである糖尿病は、21世紀において、日本のみならず全世界中で患者数の増加が懸念されており、糖尿病の予防や治療法と同時に重篤な合併症の予防や治療法も併せて、早急に確立しなければならない疾患である。2013年の調査によると、世界の糖尿病人口は約3億8千万人にものぼると言われている¹⁾。その中でも、特に近年問題となっているのは、糖尿病患者では健常者に比べ、高血圧を合併している率が高く、高血圧

が糖尿病の大血管合併症の発症リスクを2～3倍増加させているという事実である²⁾。糖尿病と合併する高血圧は、冠動脈疾患や脳血管障害といった動脈硬化性疾患の早期発症につながるだけではなく、糖尿病の慢性合併症の進展に関与することが懸念されている。英国の疫学調査では、2型糖尿病患者において、正常血圧値群(<125 mmHg)に対する高血圧値群(>142 mmHg)における虚血性心疾患発症の相対危険度は1.82であり、脳卒中発症の相対危険度に至っては2.99であり、血圧レベルが高いほどそのリスクは有意に増加するこ

とが報告されている³⁾。

血圧を調整する機能の一つにレニン・アンジオテンシン系から產生される物質の存在がある⁴⁾。レニン・アンジオテンシン系における最初の基質は、主に肝臓で合成されるアンジオテンシノーゲンである。このアンジオテンシノーゲンは、腎臓で产生されるレニンという酵素によってアンジオテンシンⅠへと変換される。アンジオテンシンⅠはさらにアンジオテンシン変換酵素（angiotensin converting enzyme : ACE）によって、アンジオテンシンⅡという物質へと変化する。このアンジオテンシンⅡが血圧上昇に関わっている物質である。そのため、ACEを阻害すれば、アンジオテンシンⅡは作られないため、血圧上昇を抑えることができる。つまり、ACE阻害活性を測定することにより、血圧低下への効果を検討することができる。

そこで我々は、機能性畜産副生成物の1つであるグロビンタンパクを酵素分解して得られたペプチド（「バリン-バリン-チロシン-プロリン」、「バリン-チロシン-プロリン」、「バリン-スレオニン-ロイシン」など）の混合物であるグロビンタンパク分解物や豚肝臓由来レバーエキスに着目した。ジペプチドやトリペプチドなどのペプチド成分にはACE阻害作用があることが報告されているため⁵⁾、グロビンタンパク分解物も血圧低下作用をもつ物質として期待される。本研究では、in vitro実験での畜肉由来グロビンならびに豚肝臓由来レバーエキスのACE阻害活性の検討を行った。それに加えて、in vivo実験で畜肉由来グロビンをインスリン抵抗性と高血圧を併発しているラットに摂取させ、血漿および各組織のACE活性の変化から高血圧治療への可能性を検討した。

2. 方 法

2.1 ACE阻害活性測定試験

2.1.1 試薬・試料

馬尿酸、リン酸水素二ナトリウム・十二水和物、リン酸二水素カリウム、塩化ナトリウム、メタリニ酸、HPLC用メタノール、HPLC用リン酸、塩化カリウム、酢酸マグネシウム、スクロース、2-プロパノールおよびクロロホルムは和光純薬工業株式会社より購入した。トライス（ヒドロキシメチル）アミノメタンは純正化学株式会社より購入し、Hippuryl-His-Leu acetate salt (Hip-His-Leu) およびNonidet-P40はSIGMA-ALDRICH社より購入した。また、今回使用した試料はILS(株)より入手した。なお、グロビンタンパク分解物は、豚ヘモグロビンをアルカリプロテーゼ処理および限外ろ過膜処理によって調製した。

2.1.2 グロビンタンパク分解物ならびに豚肝臓由来レバーエキスのACE阻害活性

10%デキストリン含有の粉末グロビンならびにレバーエキスをElix水を用いて溶かし、被験試料として使用した。

ラットから採取した血漿50 μLに被験試料と100 mMリン酸緩衝液（pH8.3, 300 mM塩化ナトリウム含有）を合わせて100 μLになるように加え、37°Cで30分間プレインキュベートした。その後、リン酸緩衝液に溶解した5 mM Hip-His-Leuを150 μL加え、37°Cで30分間プレインキュベート後、2 %メタリニ酸を加え、反応を停止させた。これを4 °C, 4000 rpmで10分の遠心分離を2回行い、上清20 μLを高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した⁶⁾。

2.1.3 血漿中および各組織（肺、睾丸、腎臓、血管）中のACE活性の測定

深麻酔下で解剖し、摘出した各組織に30 mM 塩化カリウム、5 mM酢酸マグネシウム、0.25 M

スクロース, Nonidet-P40 (0.5%) を含む50 mM Tris-HCl buffer (pH7.8) を2.5 mL加え, ホモジナイザーを用いて30回ホモジネートした。血管は30 mM塩化カリウム, 5 mM酢酸マグネシウム, 0.25 Mスクロース, Nonidet-P40 (0.5%) を含む50 mM Tris-HCl buffer (pH7.8) を500 μL加え, 50回ホモジネートした。この溶液を4℃, 20,600 gで30分間遠心分離を行い, 得られた上清を酵素溶液として使用した。血漿または上記で調整した酵素溶液50 μLに100 mMリン酸緩衝液 (pH8.3, 300 mM塩化ナトリウム含有) を50 μL加え, 37℃で30分間プレインキュベートした。その後, リン酸緩衝液に溶解した5 mM Hip-His-Leuを150 μL加え, 37℃で30分間プレインキュベート後, 2%メタリニ酸750 μLを加え, 反応を停止させた。これを4℃, 4,000 rpmで10分の遠心分離を2回行い, 上澄み液の20 μLをHPLCで分析した。

2.2 動物実験

日本エスエルシー株式会社より5週齢のWistar-kyotoラット3匹と自然発症高血圧ラット(SHR)15匹を購入し, SHRのうち10匹に食塩添加(0.3%食塩)高フルクトース食(57%フルクトース)を与える2週間の予備飼育を行った。その10匹を, 35%グロビンタンパク分解物を水道水に溶かしたグロビン水溶液を自由摂取させる群(SHR+HF+gro群, 5匹), グロビン水溶液を摂取させない群(SHR+HF群, 5匹)に分け10週間飼育した。SHRのうち, 食塩添加高フルクトース食で予備飼育をしていない残りの5匹は普通食(20%カゼイン食)を与え, グロビン水溶液を摂取させないcontrol群とし, また, 普通食(20%カゼイン食)を与え, グロビン水溶液を摂取させないWistar-Kyotoラット3匹をnormal群とし, 10週間飼育した。与えるグロビン水溶液については, 投与開始から8週間は摂取するグロビンタンパク分解物の量が1日あたり200 mg/kg体重とな

るよう, 残りの2週間はグロビンタンパク分解物の量が400 mg/kg体重となるように水道水で希釈した水溶液を使用した。飼育期間終了後, 深麻酔下で腹部大動脈から採血を行った後, 各種臓器(血管, 腎臓, 肺, 睾丸)を採取した。血液は遠心分離し, 上澄みを採取することにより血漿を得た。血管, 血漿, 肺, 睾丸, 腎臓は-20℃で保存した。実験には, 採取した血漿, 各種臓器を室温放置で解凍し使用した。群間の有意差は, Microsoft Excel 2010を用い, Excel統計2012により, Tukey-Kramer法を用いて検定した。

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

3. 結果と考察

3.1 グロビンタンパク分解物ならびに豚肝臓由来レバーエキスのACE活性の測定

10%デキストリン含有のグロビンタンパク分解物は濃度依存的にACE活性を阻害し, IC50値は終濃度で0.072%となった(Fig. 1(A))。また, レバーエキスも濃度依存的にACE活性を阻害し, そのIC50値は終濃度で0.078%であった(Fig. 1(B))。この結果は, 先行研究である「システイントリプトファン」, 「スレオニントリプトファン」などのジペプチドによるACE阻害活性の報告と相違なく⁷⁾, 含有成分のペプチド混合物がその活性成分であると推測できる。以上の結果より, 低濃度で効果を示しているグロビンタンパク分解物をin vivo実験で使用することにした。

3.2 動物実験

飼育期間中の体重変化をFig. 2に示す。normal群に比べてそのほかの群の平均体重は低い値となつたが, 高フルクトースかつ高食塩食を与えたSHR+HF群とSHR+HF+gro群はほぼ同じ体重変化をたどつた。血漿中のACE活性の測定結果

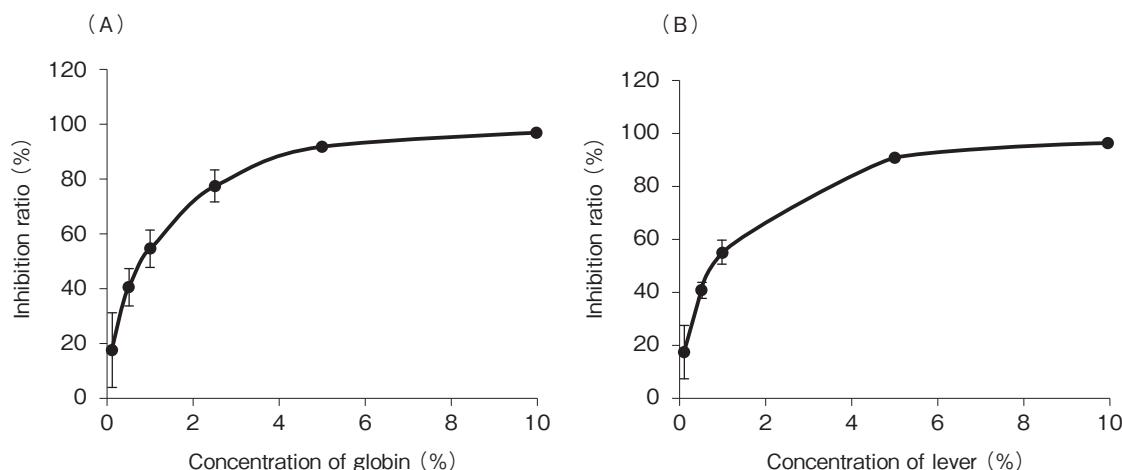


Fig. 1 ACE inhibitory effect of globin (A) and lever (B)

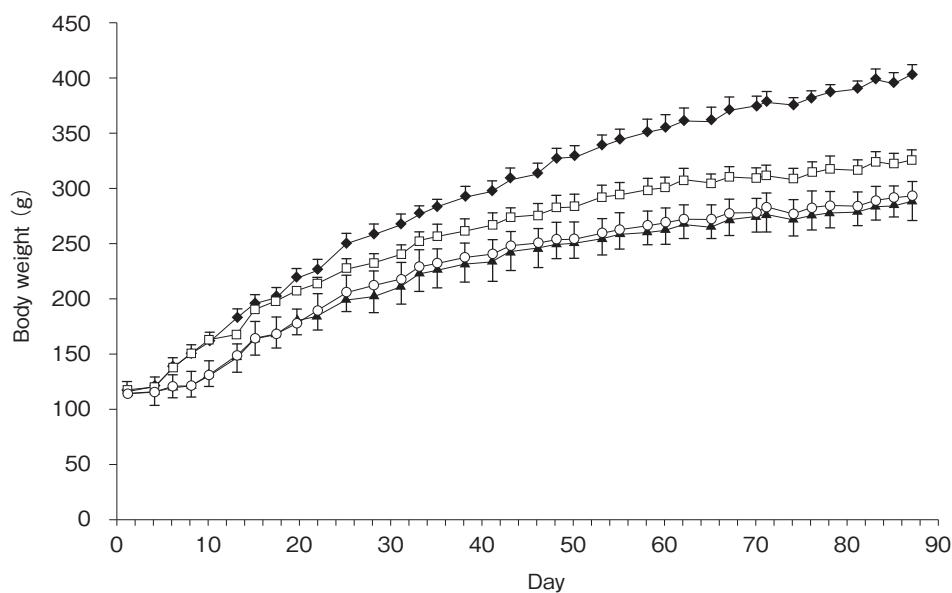


Fig. 2 Changes of body weights. Normal (◆), control (□), SHR + HF (▲), and SHR + HF + gro (○).

をFig. 3(A)に示す。すべての群で有意差は見られなかった。肺は血管内皮細胞からACEを産生・放出しており、ACE阻害活性を観察するために適した臓器である⁸⁾。Fig. 3(B)に肺中のACE活性の測定結果を示す。SHR + HF + gro群は、SHR + HF群に比べて有意に低下していた。多くの哺乳動物の精巣にACEが多量に存在することが知

られており、特にラットでは精巣中に肺や腎臓を上回る量のACEが存在することが報告されている⁹⁾。睾丸中のACE活性の測定結果をFig. 3(C)に示す。今回の実験では、すべての群において有意差は見られなかった。腎臓から分泌されるレニンという酵素は、血圧を上げる作用をもつアンジオテンシンⅡというホルモンをつくる際に欠かせ

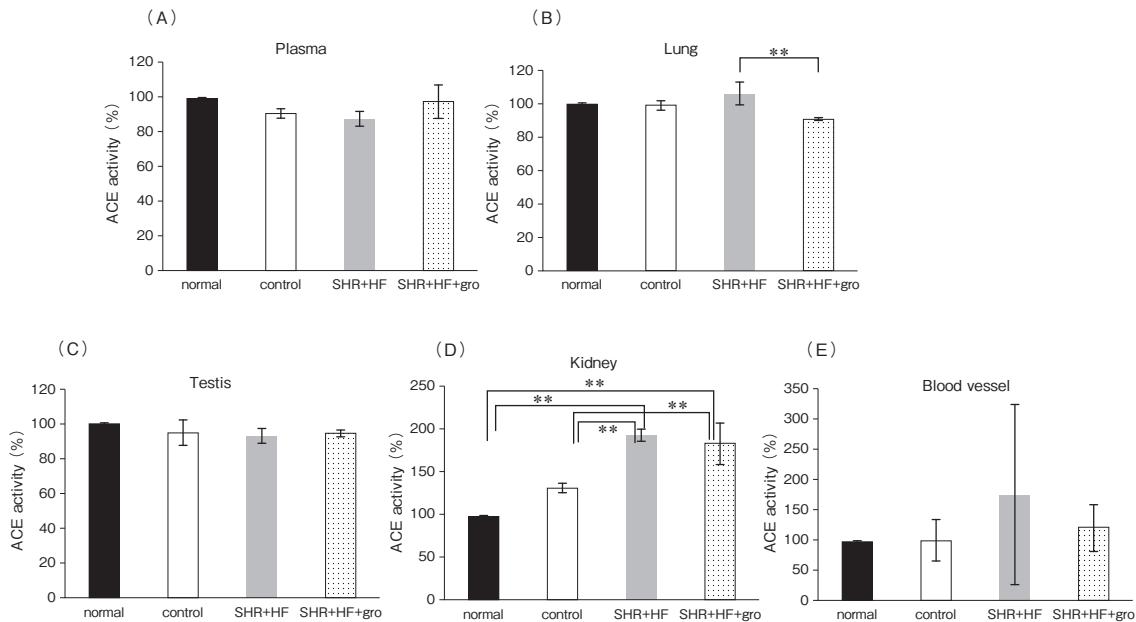


Fig. 3 ACE activity of plasma(A), lung(B), testis(C), kidney(D), and blood vessel(E). Significance : **p<0.01

ない物質であり、これによって腎臓は血圧を一定に保つ手助けをしている。腎臓中のACE活性の測定結果をFig. 3(D)に示す。normal群とcontrol群に比べて、SHR+HF群とSHR+HF+gro群で有意に高値を示した。血管中のACE活性の測定結果をFig. 3(E)に示す。すべての群において有意な差は見られなかったが、SHR+HF群に比べて、SHR+HF+gro群でACE活性が低下傾向にあることから、血圧降下作用を示すことが示唆された。

以上の結果から、SHRラット10匹に食塩添加(0.3%食塩食)高フルクトース食(57%フルクトース食)を与え、2週間の予備飼育を行うことで、高血圧とインスリン抵抗性を合わせ持つモデルとなっていると考えた。血漿、腎臓、肺、睾丸および血管中のACE活性の測定については、腎臓ではnormal群に対してSHR+HF群とSHR+HF+gro群、control群に対してSHR+HF群とSHR+HF+gro群で有意に差が見られ、肺では

SHR+HF群とSHR+HF+gro群の間で有意な差が見られた。腎臓は血圧と関係する塩分や水分の調節や血圧を上げるホルモンの分泌、末梢血管に抵抗を与えるといった働きをしている¹⁰⁾。しかし、腎臓の働きが悪くなると、血圧を調節する能力は低下するため高血圧になる傾向がある。本実験の結果では、高フルクトースかつ高食塩食の負荷によって、より腎臓に負担がかかり、ACE活性が上昇したということが考えられる。肺では、SHR+HF+gro群において他の群よりも低い値が得られたので、グロビン水溶液によって肺のACE活性が阻害される可能性がある。さらに、最も血圧の上昇に寄与すると言われている血管中のACE活性もグロビン水溶液の摂取により下がる傾向が認められ、グロビン水溶液は血圧低下への作用が期待できる。

4. 要 約

In vitro実験から、食肉由来天然成分であるグ

ロビンタンパク分解物ならびに豚肝臓由来レバーエキスには強いACE阻害活性があることが明らかとなった。また、グロビンタンパク分解物を高血圧モデル動物に投与し、各組織中のACE阻害活性を測定すると、グロビンタンパク分解物には肺において有意なACE阻害活性があり、腎臓や血管にもACE活性を抑制する傾向をもつことが証明された。今後は血圧測定も同時に行い、最適な投与量の検討、ならびに、グロビンタンパク分解物中のどの成分がACE阻害活性に寄与しているのかを、検討していく必要がある。

謝　　辞

本実験において、グロビンタンパク分解物ならびに豚肝臓由来レバーエキスをご提供いただいた、ILS株式会社様には深くお礼申し上げます。また、本実験を進めるに当たり、神戸女子大学健

康福祉学部健康スポーツ栄養学科の学生諸氏に多くの協力を頂いたことを深謝いたします。

文　　献

- 1) IDF Diabetes Atlas, International Diabetes Federation, 6th edn., 2013.
- 2) The Mainichi Medical Journal, 7, 668, 2006.
- 3) Davis, T. M., Millns, H., Stratton, I. M., et al. : *Arch Intern Med.*, 159, 1097, 1999.
- 4) 久保鈴子監：薬理学の基本が分かる事典、西東社、東京、186～187, 2011.
- 5) 藤野高大、塩田健太朗、根本友里香ら：日本水産学会誌, 83, 607, 2017.
- 6) Horiuchi, M., Fujimura, K., Terashima, T., et al. : *J Chro.*, 233, 123, 1982.
- 7) Baichuan D., Xiaojun, N., Zhenya, Z., et al. : *J Agric. Food Chem.*, 65, 9774, 2017.
- 8) 櫻林郁之介監：今日の臨床検査、南江堂、東京、458～459, 2009.
- 9) 山口高正、関根雅恵、池北雅彦ら：薬学雑誌, 105, 491, 1985.
- 10) 片山善章、柏森裕三、長村洋一監：新版臨床化学第3版、講談社、東京、273～275, 2014.

食肉を中心とする食品由来核酸の腸管保護機能の解析

Effects of nucleic acids from meat and other foods on the functions of intestinal cells

河 合 慶 親

(徳島大学大学院医歯薬学研究部)

Yoshichika Kawai

(Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University)

We usually eat animals, plants, and/or microorganisms as daily foods. Therefore, our diet necessarily contains their biological constituents, such as proteins, lipids, carbohydrates, and nucleic acids. However, as compared with three major nutrients (proteins, lipids, carbohydrates), less attention has been paid on the nutritional and biological consequences of food-derived nucleic acids. In addition, "standard tables of food composition in Japan" don't yet include the information of nucleic acid contents. We then focused on the importance of nucleic acid contents in our foods and of the potent functions of food-derived nucleic acids in our body. We have recently developed a method for measurement of food-derived nucleic acids and found that the nucleic acid contents significantly differ between each food. Especially, it was found that matcha (powdered green tea), soybean, and chicken meat contain abundant nucleic acids. We also found by agarose-gel electrophoresis that the molecular weights of food-derived nucleic acids decreased during cooking with heat. *In vitro* enzymatic digestion with pancreatic and intestinal enzymes also decreased the molecular weights of nucleic acids. Next, we investigated the beneficial functions of food-derived nucleic acids on intestinal cells, because intestinal cells can be exposed to higher concentrations of food constituents. Using differentiated Caco-2 cells as a model of small intestine, it was found that food-derived nucleic acids, especially from soybean and chicken meat, induced the mRNA expression of claudin-4 and mucin 2, both of which contribute to the barrier functions of intestinal cells. Cooking with heat scarcely affected the activity for mRNA induction, whereas enzymatic digestion significantly attenuated the activity. These results suggest that eating soybean and/or chicken meat might contribute to enhanced barrier functions of intestinal cells through intake of biologically active nucleic acids from these foods.

1. 目 的

ヒトは動物、植物、あるいは微生物由來の食品を日常的に摂取している。これらの食品には、タ

ンパク質、脂質、糖質のほかビタミン、ミネラルなどの栄養素が含まれている。これら栄養素の機能性については、これまでに多くの研究がなされており、すでに食品・栄養学的意義が確立されて

いる。一方で、核酸は遺伝情報を担う生体高分子としてすべての生物に存在しており、これらを食品として摂取する際には、常に一定量の食品由来核酸を摂取していることになる。しかし、食品中の核酸量については食品成分表に記載がなく、栄養素あるいは機能性分子としての役割についても不明である。そこでまず、食事として摂取する核酸量を明らかにする必要があると考えた。我々は食品からの核酸の抽出方法について検討し、様々な食品に含まれる核酸量の測定を試みてきた。また、食品によって核酸の分子サイズが異なることも示唆された。これらの結果を受け、本研究課題では様々な食品の核酸量の測定と分子サイズの検討を行うことを一つめの目的とした。また、腸管細胞を用いた食品由来核酸の機能性についての予備検討から、大豆と鶏ミンチ肉由来核酸で腸管のバリア機能を高める傾向が認められた。そこで、大豆・鶏ミンチ肉に加え、他の食品由来核酸の腸管細胞に対する機能性についても検討を行うことを二つめの目的とした。さらに、実際に摂取する食品は加熱処理や、体内では消化を受けたりする。そこで、加熱・消化の核酸機能への影響についても検討を行うこととした。

2. 方 法

2.1 核酸抽出方法

ビーズ式細胞破碎装置専用チューブ（トミー精工、TM-625S）に粉末類は50mg、固体、液体類は200mg量り取り、ビーズ（ジルコニアZB-30）を7個入れ、核酸抽出用バッファーを加えた後、冷却したビーズ式細胞破碎装置（トミー精工、MS-100MR）にセットし、5000rpmで3分破碎した。65℃で10分ごとに転倒混和し30分インキュベート後、10000×gで10分遠心した。上清を回収し、フェノール試薬を用いた核酸抽出を行った。なお、穀類である精白米、大豆はミキサーで

粉碎したものを用い、粉末状の薄力粉、きな粉、青のり、抹茶やスキムミルク、液状の豆乳はそのまま用いた。また、人参、しめじ、バナナ、肉類や魚類は、ある程度すりつぶしたものを使用した。

2.2 核酸の定量

核酸の定量はQantiFlour®（Promega）を用いて行った。RNA定量はQantiFlour® RNA System、ssDNA定量はQantiFlour® ssDNA System、dsDNA定量はQantiFlour® dsDNA System（いずれもPromega）を用いて行った。

2.3 核酸処理

Caco-2細胞は、10%FBS含有DMEM培地に非必須アミノ酸溶液を加えたものを培地として用了。プレートに撒いた細胞はコンフルエントになった日から適宜培地を交換しながら21日間培養を続け、小腸上皮様に分化させた。培養培地を除去してPBSで洗浄後、食品から抽出した核酸を総核酸量が1mg/mlとなるようDMEM培地で希釈し、1ウェルあたり300μl処理した。

2.4 定量的RT-PCR

細胞をPBSで洗浄し、Sepasol-RNA I Super G（Nacalai Tesque）を用いてRNAを抽出した。逆転写反応はReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO）を用いて行った。PCRはTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（TOYOBO）を用いてLightCycler® Nanoシステム（Roche）にて行った。また、Caco-2細胞の分化状態についてはRecombinant Human TNF- α 処理によるIL-8のmRNA発現量の増加を指標に評価した。プライマーの塩基配列を以下に示した。

【GAPDH】

GATGAGAAGTATGACAACAGCCT (forward)
AGTCCTTCCACGATACCAAAGT (reverse)

【IL-8】

AGAGTGATTGAGAGTGGACC (forward)

ACTTCTCCACAACCCCTCTG (reverse)

【Mucin2】

AACGGCCTGCAGAGCTATTG (forward)

ATCTTCTGCATGTTCCAAACTC (reverse)

【Claudin-4】

TTGTCACCTCGCAGACCACT (forward)

CAGCGAGTCGTACACCTTG (reverse)

2.5 核酸の人工消化実験方法

睥液は、Pancreatin (TOKYO CHEMICAL INDUSTRY) 50mgを1mlリン酸緩衝液に溶解・懸濁して調製した。また、腸液は、Intestinal acetone powders from rat (SIGMA) 100mgを1mlリン酸緩衝液に溶解・懸濁後、遠心上清を使用した。また、対照実験用に消化酵素の失活を目的として、100°C、30分の加熱処理を行った。消化反応は、核酸50μlに睥液を100μl添加して、37°Cで60分振とうさせた。次いで、腸液を100μl添加して、37°Cで90分振とうさせて反応させた。

3. 結 果

3.1 食品中の核酸量の定量

様々な食品からの核酸の抽出と定量を試みた。その結果、食品100gあたりの核酸量は抹茶で1792mgと最も多く、次いで大豆が1056mgであつ

た (Fig. 1)。また、鶏肉の部位別の核酸量については、鶏むね肉、鶏ミンチ肉、鶏もも肉の順に多く、鶏肉間で約250mgの差があった。藻類である青のりは325mgと比較的核酸量が多かった。魚類においては、まぐろに比べて鮭の核酸量が257mgと3倍以上多かった。今回の核酸の定量結果から、食品100gあたり約10—1000mgという幅広い量の核酸が含まれることが分かった。また、比較的核酸を多く含むといわれている肉類や魚類や大豆に比べて、抹茶には2倍以上も核酸が多く含まれていることが明らかとなった。

また、抽出した食品の核酸組成を調べたところ、全体的にssDNAとRNAが最も多く、dsDNAの割合がおよそ10%以下と最も少なかった。この組成は食品により異なり、ssDNAが特に多い食品はうどん、薄力粉、抹茶であり総核酸量の60—80%を占めていた。RNAが特に多い食品は大豆、しめじ、青のり、豆乳であり総核酸量の60—70%を占めていた。食品により核酸の組成が異なり、全体としてdsDNAよりもssDNAとRNAの割合が多いことが明らかとなった。

3.2 様々な食品に含まれる核酸の分子サイズ

食品と微生物から抽出した核酸の分子サイズについて、アガロースゲル電気泳動により確認し

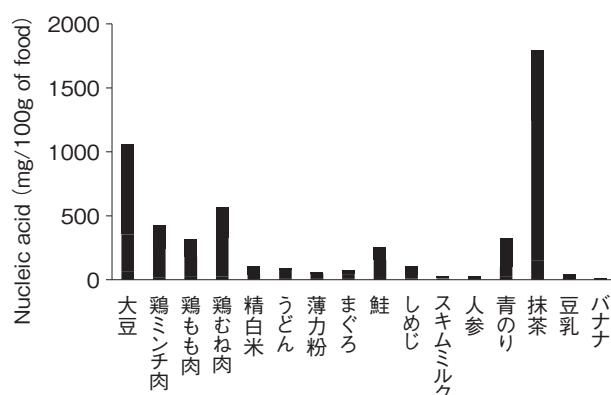


Fig. 1 Nucleic acid contents in various foods

た。なお、泳動する核酸量が同じ量となるように揃えた (Fig. 2)。その結果、食品ごとに分子サイズの異なる核酸が含まれていることが確認された。また、ほとんどの食品由来核酸で高分子側から低分子側まで幅広い分子サイズの核酸が検出されたが、鮭と豆乳由来核酸では3000bp付近の比較的高分子領域の核酸がほとんどみられなかっ

た。人参では1000bp付近の高分子の核酸が特に多くみられた。

3.3 分化Caco- 2 細胞における食品由来核酸の機能性

分化Caco- 2 細胞に 1 mg/ml の食品由来核酸を 4 時間処理し、RT-qPCR により claudin- 4 と mucin 2 の mRNA 発現量について評価した (Fig.

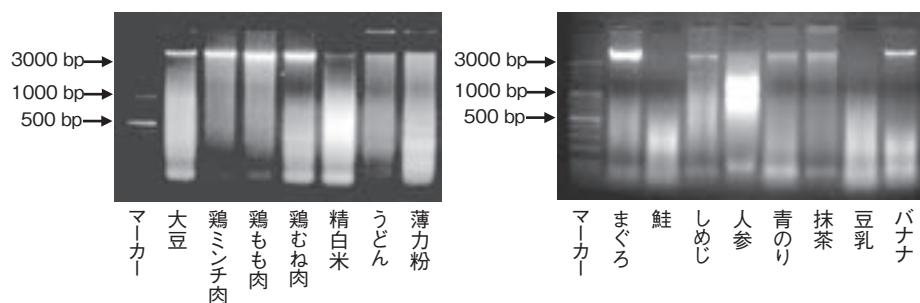


Fig. 2 Agarose-gel electrophoresis of various food-derived nucleic acids

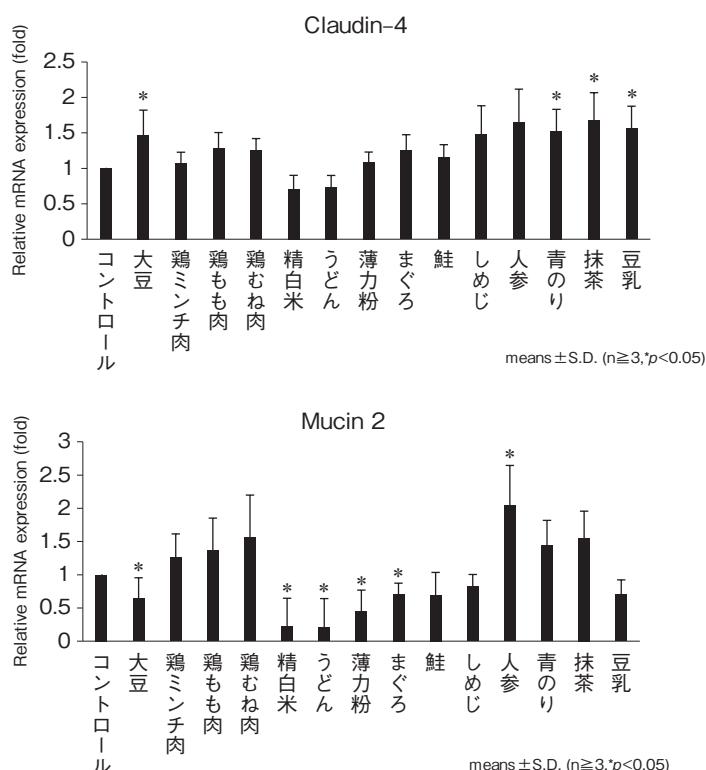


Fig. 3 Effects of food-derived nucleic acids on claudin-4 and mucin 2 expression in differentiated Caco-2 cells

3)。その結果、claudin-4 のmRNA発現量については大豆、青のり、抹茶、豆乳由來の核酸で有意な増加がみられた。鶏肉由來核酸では有意ではないものの増加傾向がみられた。Mucin 2 のmRNA発現量については、人参由來の核酸で有意な増加がみられた。その他にも、鶏ミンチ肉と、異なる種類の鶏肉、青のり、抹茶由來核酸で増加傾向がみられた。一方で、大豆由來核酸では有意な減少がみられた。また、精白米、薄力粉、うどん、まぐろ由來の核酸で有意な減少がみられた。

3.4 食品の加熱による核酸の分子サイズの変化

抽出した核酸をアガロースゲル電気泳動に供し、加熱による分子サイズの変化を検討した。その結果、試験したすべての食品で加熱により高分子領域のバンドが薄くなり、およそ500bp以下の低分子領域のバンドが濃くなったことから、食品の加熱により核酸の分子サイズが減少することが分かった(Fig. 4)。一方で、鶏もも肉においてはおよそ3000bpの高分子の核酸が残っていることが確認された。

3.5 食品の加熱による核酸の機能性の変化

加熱した食品由來の核酸を用いて、核酸の腸管

バリア機能への影響について検討を行った(Fig. 5)。その結果、claudin-4 のmRNA発現については、大豆、精白米由來核酸で加熱により減少する傾向がみられ、鶏肉由來核酸で加熱により増加する傾向にあったが、全体的に顕著な変化はみられなかった。Mucin 2 のmRNA発現については、大豆、精白米由來核酸で加熱により増加する傾向がみられ、鶏肉由來核酸で加熱により減少する傾向にあったが、こちらも全体的に顕著な変化はみられなかった。よって、食品の加熱は核酸の機能性に大きな影響を与えないことが示唆された。

4. 要 約

本研究では様々な食品を用いて核酸の量、組成、分子サイズ、機能性について評価を行い、様々な食品由來の核酸が腸管バリア機能に関する機能性を高める活性がみられた。特に、抹茶、大豆、人参、鶏肉には比較的多くの核酸が含まれており、これらの核酸には腸管バリア機能増強活性が認められた。また、加熱や消化によって核酸サイズが減少し、これが機能性に影響を与えることが示された。今後、Caco-2細胞におけるバリア機能増強効果については作用メカニズムの解析を進

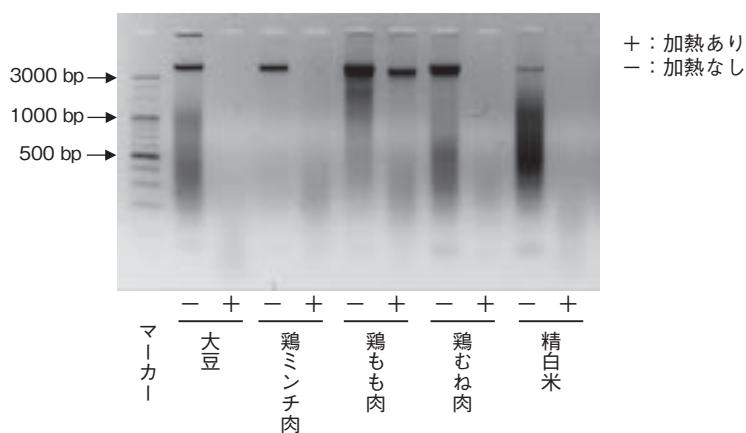


Fig. 4 Effects of cooking with heat on molecular weights of food-derived nucleic acids

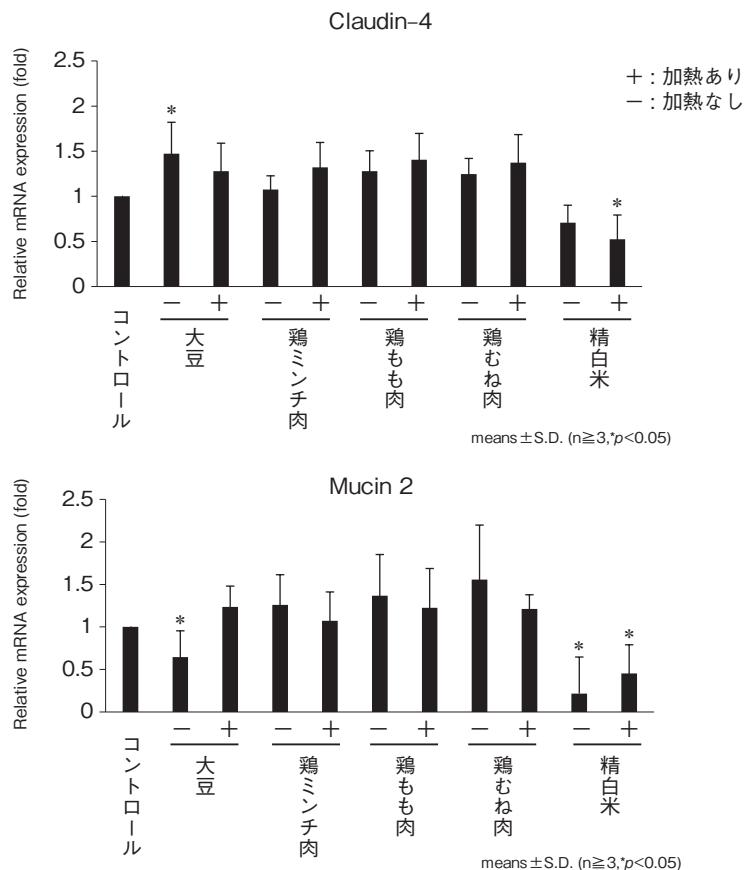


Fig. 5 Effects of cooking with heat of food-derived nucleic acids on their activity to induce claudin-4 and mucin 2

める必要がある。また、活性に起因する核酸の分子サイズや配列についても詳細な解析が必要となる。将来的には、実験動物により食品由来核酸の

腸管に対する機能性を検証することも重要な課題である。

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

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

林 利哉・長澤 麻央・芳賀 聖一・小川 幸彦*

(名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場)

Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Seiichi Haga and Yukihiko Ogawa*

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

Muscle protein degradation and expression of inhibitory activity on angiotensin I-converting enzyme by cold lactic acid fermentation and retort-processing were investigated using myofibrillar protein as the simple model system of cured meat product. In result, free amino acid and peptide contents significantly increased by retort processing or cold fermentation compared to that of control (70°C-heated). The sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis analysis indicated that the band intensities of low molecular weight (<30 kDa) proteins obtained from fermented and retorted samples were slightly stronger than those obtained from control samples. Therefore, it was suggested that retort-processing and cold fermentation may lead to degradation of myofibrillar proteins as a result of these treatments. Furthermore, inhibitory activity on angiotensin I-converting enzyme was significantly higher in fermented myofibrillar protein than that in the protein heated at 70°C. On the other hand, although the inhibitory activities on angiotensin I-converting enzyme of retort-processed samples were slightly higher than those of control (70°C-heated), there were not significant differences in that activity between retorted and control one. These results suggest that these processing treatments, especially cold fermentation may contribute to derivation of low molecular weight peptides and improvement in functionalities of cured meat products.

1. 目的

著者らはこれまで、発酵や加熱といった伝統的食品加工技術の活用による食肉製品の高付加価値化を目指し、低温増殖性乳酸菌による低温発酵やレトルト加熱処理が食肉製品の品質に及ぼす影響

について種々追究してきた^{1~3)}。その結果、低温乳酸発酵を施すことによりモデルソーセージの物性や微細構造が大きく変化することに加え、筋原線維の小片化やタンパク質の分解等も顕著にみられるることを明らかにしている¹⁾。また、120°C以上の高温加熱であるレトルト加熱によても著しい

物性低下が起こるとともに、タンパク質の分解が生じ、その結果として遊離アミノ酸や低分子ペプチドが増加することも併せて見出している^{4, 5)}。こういった発酵や加熱に伴うタンパク質分解、特に食肉の主要タンパク質である筋原線維タンパク質の分解は、ソーセージ等の製品におけるテクスチャの発現において、負の影響をもたらすものと考えられるが、その一方で、機能性という視点においては、場合によっては有益な機能を有する低分子ペプチドが生成するという付加価値をもたらす可能性も考えられる。したがって、低温乳酸発酵やレトルト加熱に伴うタンパク質分解挙動の詳細を明らかにし、かつ機能性発現の有無を評価することは、食肉・食肉製品の機能改善を図るうえできわめて意義深いといえる。

そこで本研究では、食肉の主要タンパク質である筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、低温増殖性乳酸菌を用いた低温発酵やレトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質におけるペプチド・遊離アミノ酸の量的変化を調べ、かつアンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性等を評価することで、単純モデル系におけるタンパク質分解と機能性発現の有無について検討を行った。

2. 実験材料と方法

2.1 試料調製

できる限り脂肪と結合組織を取り除いた新鮮な豚ロース肉から、一部改変したPerry and Grey⁶⁾, Etlinger⁷⁾らの方法に準じて筋原線維を調製し、最終的に0.6M-NaCl・50mMリン酸緩衝液(pH6.0)に対して透析、遠心分離(35,000×g, 15分, 4℃)して得られた上澄み画分を筋原線維試料とした。終濃度を15mg/mlに調整した筋原線維タンパク質溶液を、レトルト殺菌釜(花木製作所、HC-VA型)を用いて、120℃および130℃でそれ

ぞれ15分間加熱したものをレトルト加熱区とした。また、同じ筋原線維タンパク質溶液にグルコースが2% (w/v)となるように添加し、さらに乳酸菌スター、*Lactobacillus sakei* No.4 (*L. sakei*) を筋原線維タンパク質溶液1mlあたり10⁶個レベルとなるように接種し、4℃の低温下で静置したものを発酵区とした。発酵期間中、1～2時間ごとにpHを測定し、乳酸菌を接種した筋原線維タンパク質溶液のpHが5.3付近に達するまで発酵処理を行った後、70℃で30分間、加熱処理を施した。単に70℃で30分間加熱したものを、レトルト加熱と発酵試験共通の対照区とした。いずれの試料も、加熱後速やかに氷冷を行った。各加熱試料を遠心分離(35,000 g, 15分, 4℃)し、得られた上澄みを蒸留水に対して透析(Spectrapor CE, M.W.: 500)し、凍結乾燥したものを最終試料とした。

2.2 ペプチド・遊離アミノ酸量の測定

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

2.3 ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリル

アミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE)

上記の遠心上澄み画分のタンパク質分布をSDS-PAGE¹⁰⁾(アクリルアミド濃度: 7.5~20%)により調べた。ゲルの染色はCoomassie Brilliant Blue R-250により行った。

2.4 アンジオテンシンI変換酵素(ACE)阻害活性

ACE阻害活性は、ACE(シグマ)と合成基質Hip-His-Leu(ペプチド研究所)を用い、CushmanとCheungの方法¹¹⁾に準じて測定した。すなわちACEと基質が反応した結果、遊離する馬尿酸を酢酸エチルで抽出し、その吸光度(228nm)を測

定する方法である。試料タンパク質濃度が0.5～5.0mg/mlの範囲で阻害活性を求め、酵素活性を50%阻害するのに必要な試料タンパク質濃度(mg/ml)を算出した(IC_{50})。

3. 結果と考察

3.1 低温発酵ならびにレトルト加熱処理が筋原線維タンパク質の分解に及ぼす影響

これまでにモデルソーセージを用いた製品レベルにおいて、低温乳酸発酵やレトルト加熱処理によって食肉中のタンパク質が分解し、遊離アミノ酸や低分子ペプチドが派生することを確認している^{1, 4, 5)}。そこで本研究では、筋収縮の本体であり、主要タンパク質である筋原線維タンパク質をモデル系に用いて、低温乳酸発酵やレトルト加熱がタンパク質分解に及ぼす影響について、ペプチドと遊離アミノ酸量を調べることにより検討した。

その結果、レトルト加熱を施すことにより、ペプチド(Fig. 1A)、遊離アミノ酸量(Fig. 1B)のいずれも、対照区である70°C加熱区と比較して有意($p < 0.05$)に高い値を示し、加熱温度依存的に値が上昇した。一方の*L. sakei*を接種した発酵

処理区では、ペプチド量については対照区も含めたいずれの加熱区よりも高い値を示したが、遊離アミノ酸については、対照区よりも高いものの、レトルト加熱区よりは低い値を示した。次に、各加工処理によるタンパク質分布の変化をみるためにSDS-PAGEを行った(Fig. 2A, B)。その結果、70°C加熱区で明瞭にみられた分子量3～4万前後のバンドが、120, 130°Cの加熱によって減少し、分子量2万より下の領域のバンドの染色強度が強くなる様子がみられた。特により高温の130°C加熱区においてそれが顕著であった。一方の発酵区では、対照区でみられた明瞭なバンドはほぼ消失した。これは、pH低下による筋原線維タンパク質の酸沈殿と、乳酸菌の働きによるタンパク質の分解に起因するものと推察される。後者の可能性は先に述べたペプチド量の著しい増加とよく符合する。

3.2 低温発酵ならびにレトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質のACE阻害活性

血圧上昇抑制作用の*in vitro*指標として使用され、降圧薬のターゲットとしてもよく知られるACEの阻害活性を指標に、レトルト加熱と低温

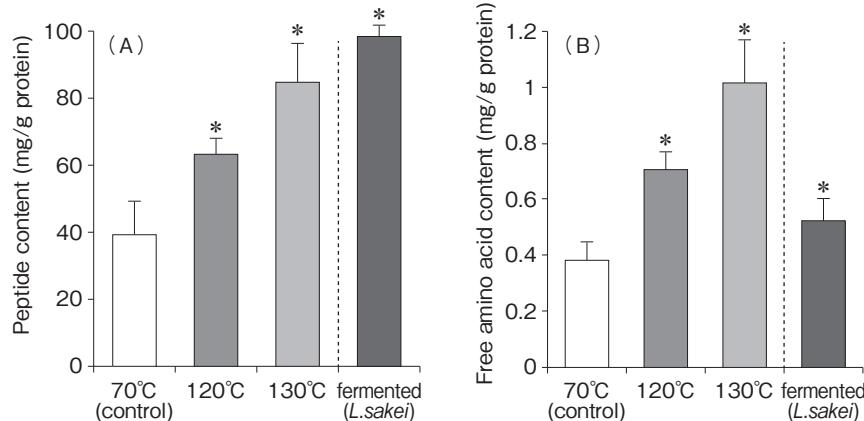


Fig. 1 Effect of retort processing or cold fermentation on the peptide (A) and free amino acid contents (B) of the myofibrillar protein.

Data represent the means \pm SD of at least three independent experiments (*, $p < 0.05$ versus the control).

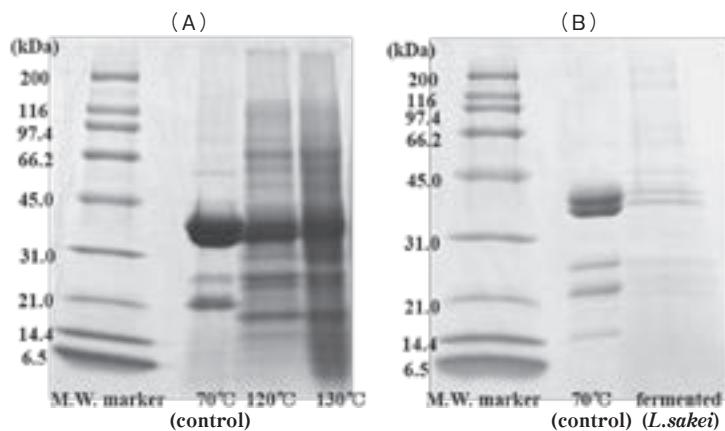


Fig. 2 Effect of retort processing (A) or cold fermentation (B) on the SDS-PAGE patterns of myofibrillar protein.

乳酸発酵を施した筋原線維タンパク質の機能性発現の有無について検討した結果をFig. 3に示した。その結果、対照区である70°C加熱区とレトルト加熱区のACE阻害活性値 (IC_{50}) を比較すると、120, 130°Cのいずれの加熱区も、わずかではあるが低い値を示し、有意ではないが加熱温度上昇に依存的な傾向もみられた。一方、低温増殖性乳酸菌*L. Sakei*を接種した発酵区では、対照区と比較して有意に低い値を示し、低温乳酸発酵によって、ACE阻害活性指標値である IC_{50} の低下、すなわち阻害活性の上昇が確認された。先述したように、いずれの処理区の場合もペプチド量の大幅な増加がみられたことから、これらの活性因子がペプチド体と仮定した場合、系中に含まれる活性の総量も大幅に増えているものと推察される¹²⁾。

今後は、低温乳酸発酵ならびにレトルト加熱処理によって派生する活性因子の特定を急ぐとともに、他の機能性指標についても検討を加えたい。

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

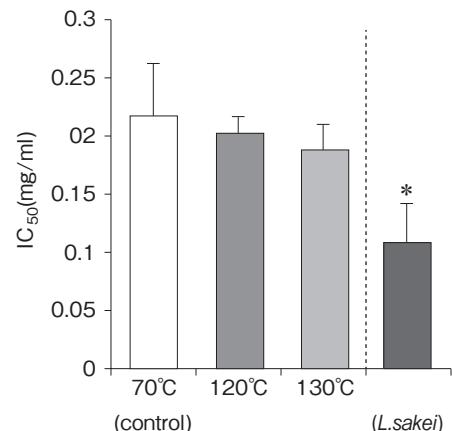


Fig. 3 Effect of salt-soluble fractions from retorted or fermented myofibrillar protein on the ACE-inhibitory activity.
Data represent the means \pm SD of at least five independent experiments (*, $p < 0.05$ versus the control).

4. 要 約

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

筋原線維タンパク質に120, 130°Cのレトルト加熱処理を施すことによって、タンパク質分布パターンに大きな変化がみられたことに加え、遊離アミノ酸ならびにペプチド量の加熱温度上昇に伴う有意な増加が確認され、超高温加熱によって、筋原線維タンパク質の分解が生じることが示唆された。また、低温発酵処理によっても同様にペプチド量の増加がみられたが、遊離アミノ酸についてはレトルト加熱区ほどの顕著な増加はみられなかった。

血圧上昇抑制作用の*in vitro*指標であるACE阻害活性については、発酵区では有意かつ顕著な活性の上昇がみられたが、レトルト加熱区ではその程度はわずかであり、その差も有意なものではなかった。

以上のことより、レトルト加熱ならびに低温乳酸発酵処理によって筋原線維タンパク質は分解し、その結果生じた低分子ペプチド群にACEを阻害する因子が含まれる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 芳賀聖一・林利哉・大場正春・坂田亮一：名城大学総合研究所総合学術研究論文集, 8, 91~96, 2009.
- 2) 芳賀聖一：ミートジャーナル, 36 (1), 107~113, 1999.
- 3) 藤田利宗・林利哉・芳賀聖一：日本食品科学工学会誌, 53 (8), 423~429, 2006.
- 4) Hayashi, T., Toyoda, N., Arakawa, M., Haga, S. : Int. Cong. Meat Sci. Technol., 56, E60, 2010.
- 5) Hayashi, T., Washio, S., Arakawa, M., Taguchi, M., Toyoda, N., Haga, S. : Int. Cong. Meat Sci. Technol., 57, P395, 2011.
- 6) Perry, S.V., Grey, T. C. : *Biochem. J.*, 64, 184~192, 1956.
- 7) Etlinger, J. D., Zak, R., Fischman, D. A. : *J. Cell Biol.*, 6, 123~141, 1976.
- 8) 三上正幸・長尾真理・関川三男・三浦弘之：日本畜産学会報, 66, 630~638, 1994.
- 9) 日本化学会編：実験化学講座23、「生物化学 I」, 丸善, 東京, 124~130, 1964.
- 10) Laemmli, U. K. : *Nature*, 227, 680~685, 1970.
- 11) Cushman, D. W., Cheung, H. S. : *Biochem. Pharm.*, 20, 1637~1648, 1971.
- 12) 伊部さちえ・吉田恵子・熊田薫：日本食品科学工学会誌, 53, 189~192, 2006.

牛経済形質に関する新規DNA多型の探索

Novel gene polymorphisms identification related to cattle economic traits

松 本 大 和

(東海大学農学部応用動物科学科)

Hirokazu Matsumoto

(Department of Animal Science, School of Agriculture, Tokai University)

Japanese Black cattle are valued around the world for their excellent beef marbling score. These days, fatty acid composition is considered another important economic trait for beef cattle, because higher concentrations of monounsaturated fatty acids are considered to contribute to beef palatability. Fatty acid composition in meat is known controlled by genetic factors. In this study, we tried to investigate the influence of bovine *MMP14* gene, one of candidate genes controlling fatty acid composition, on economic traits in beef. For this purpose, sequence comparison of the CDS and promoter region was performed, resulting two silence mutations in the CDS and three DNA polymorphisms in the promoter region were identified. One of the polymorphisms in the promoter region (g.-1723 bp A>C) was selected for association study between genotypes and economic traits, which was suggested to be bound by transcription factors influencing on muscle or adipose differentiation. The g.-1723 bp A>C had a significant effect on C16 : 1 ($p=0.0187$) and A/A type indicated 0.7% higher percentage of C18 : 0 than C/C type. These results suggest that the *MMP14* g.-1723 bp A>C is a useful genetic marker for breeding in beef cattle.

1. 目 的

日本を代表する肉用牛である黒毛和種はその脂肪交雑能力の高さから世界中で高く評価されている。脂肪交雑は食肉の霜降りの度合いを示し、枝肉単価を決めるうえで最も重要な指標の一つである。しかしながら、霜降りの度合いが高すぎるとむしろ食味性が低下してしまうため、近年脂肪交雑に代わる新しいおいしさの指標が模索されている。その一つとして、脂肪の質に影響する形質である脂肪酸組成が注目を集めている。オレイン酸

(C18 : 1) やパルミトレイン酸 (C16 : 1) 等の一価不飽和脂肪酸の含有率が増加すると食肉の食味性が向上すると言われており、より質の高い牛肉を作出するためには筋肉内脂肪の一価不飽和脂肪酸含有率を高めることが有効である。

一般に枝肉形質は飼料や性など様々な要因による影響を受けるが、脂肪酸組成は飼養管理や季節、月齢等の環境要因に加え、品種や種雄牛の効果等の遺伝的要因にも大きく影響される。したがって、脂肪酸組成の改良では遺伝学的アプローチが有効である。そこで、我々は先行研究において

て網羅的遺伝子発現解析を用いた脂肪酸組成に関する新規遺伝子の同定を試みた¹⁾。その結果、*ACACA*や*ELOVL5*, *FADS2*, *MMP14*等の遺伝子が脂肪酸代謝に関する新規候補遺伝子として浮上した。これらのうち*ACACA*, *ELOVL5*, *FADS2*の各遺伝子ではプロモーター領域においてDNA多型が同定され、これらの多型は脂肪酸組成を含む複数の枝肉形質に効果を持つことが明らかにされた^{2~4)}。したがって、この遺伝子発現解析でスクリーニングされた遺伝子群は、脂肪酸の不飽和化に関する有力な候補であると考えられる。

ウシ*MMP14* (*matrix metallopeptidase 14*) 遺伝子は第10番染色体上に位置する10個のエクソンから構成される8,480bpの遺伝子であり、コラーゲン等の細胞外基質の分解を行う膜結合型メタロプロテイナーゼをコードする。本遺伝子は血管新生や骨形成、脂肪細胞の分化等様々な生体機構の調節に関するが、枝肉形質との関わりは不明である。本研究ではこの*MMP14*遺伝子を対象とし、新規DNA多型の探索およびその経済形質に対する効果を検証した。

2. 方 法

2.1 供試動物

平成14年から平成26年の間全国の牧場で肥育され、現場後代検定に供せられた黒毛和種487個体をサンプルとして用いた。多型探索はこれらのうちから家系に偏りがないように選出した8個体を対象とした。DNA抽出はこれら個体の筋肉からフェノールを用いて実施した。枝肉形質（枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚、皮下脂肪厚、推定歩留、BMS）は社団法人日本食肉格付協会の格付により評価された格付値を用いた。また、定法に従い脂肪組織より脂肪酸を抽出・メチル化し、ガスクロマトグラフGC4000（ジーエルサイエンス、

東京）によりその組成（C14 : 0, C14 : 1, C16 : 0, C16 : 1, C18 : 0, C18 : 1, C18 : 2）を測定した。

2.2 多型探索

ウシ*MMP14*遺伝子 (AC_000167.1) の各エクソンを含むDNA領域をPCR法により增幅させるプライマーセットをOligo7 (Molecular Biology Insights, Vondelpark, CO) により作製した。PCR酵素にはGo-Taq® (Promega Corporation, Madison, WI) を使用した。プライマー配列およびPCR条件はTable 1に示した。また、ヒト*MMP14*遺伝子ではプロモーター活性を持つDNA領域がすでに明らかにされている⁵⁾。この領域と高い相同性を持つウシ*MMP14*遺伝子の上流領域約2 kbp (-2057~+186) を本遺伝子のプロモーター領域とみなし、プライマーセットを作製した (Table 1)。

得られたPCR産物はExo-sapIT (affimetrix, Cleveland, OH) を用いて精製した。精製したPCR産物はBigDye Terminator v3.1 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE) で蛍光標識し、ABI 3500xl (Thermo Fisher Scientific) により塩基配列決定した。この反応にはPCR増幅に用いたものと同じプライマーを使用した (Table 1)。鋳型になるPCR産物を5'末端と3'末端の両方向から塩基配列決定することで実験の正確性を評価した。

塩基配列決定により得られたデータはChromasにより可視化し、ClustalWを用いて比較することで多型探索を行った。CDS領域で同定した多型についてはEMBOSS Transeqによりアミノ酸置換の有無を確認し、mRNA二次構造への影響をVisual Gene Developerにより評価した。プロモーター領域で同定した多型については、転写因子結合配列への影響をALGGEN-PROMOを用いて予測した。

Table 1 Oligonucleotide primers used for sequencing

Target region	Primer (5'→3')	Tm (°C)	Size (bp)
Exons2, 3	F : TTCTTCAGACCCACTGCCA R : CGTGATGTGAGAAAAGGCCGC	60	720
Exon4	F : AGAAAGTGCAGGGTCAGACAA R : AGTTCCAGCGAGGGTTGTGT	60	770
Exon5	F : TACATCTGGTCCCTCTCTCGC R : CGGTGTCAAAGTCCCACATCACA	60	930
Exon6	F : TCTGCTGCTTGTCTCCTCCA R : GTTACAGTCCACGGGGTTGC	60	547
Exons7, 8	F : TGAAGTCGCTTAGTCGTGTCCA R : AGTCCTTCTTCAGGGAGACAT	62	734
Exon9	F : TGGTGAATCCAGTCCCAGGT R : TCTCGGTCTTCGTCCTGCT	58	274
Exon10	F : TGGTGCTATAAGTTACCCGGCT R : CAAGTGCAGAGCCCAGACATT	60	811
Promoter (-2057～-1184)	F : AAGAACGGGCTATAAAACCCTG R : ACAGAAAAGTTGACCATCAGCAA	60	874
Promoter (-1201～-384)	F : GATGGTCAACTTTCTGTCTCCC R : CCTAAATTGCCTTCTGTGGTGG	60	818
Promoter (-492～+186)	F : TGCTTAGAAGGAAAAAGTGTCCC R : TCCGATCCGGGGCTGCTCTCTCG	60	679

F : forward primer ; R : reverse primer

2.3 遺伝子型判定

g.-1723 bp A>C多型に対し、PCR-RFLP法による遺伝子型判定を行った。この多型を含むDNA領域は5'-TGGCAAGAAAAACTATATCA GTTTTCCT-3'および5'-ATGGGAGTCGGGAA ATCTGG-3'のプライマーセットで增幅させた。

PCR反応は95°Cで2分熱変性させた後、熱変性(95°C, 30秒), アニーリング(60°C, 30秒), 伸長反応(72°C, 30秒)を40サイクル行った。得られたPCR産物(189bp)は*Alu*I(New England Biolabs, Ipswich, MA)により制限酵素処理した。g.-1723 bp A>C多型のA型を持つPCR産物は認識されず、C型を持つPCR産物からは149bpおよび40bpの制限酵素処理産物が生じることが予想された。

2.4 統計解析

遺伝子型が枝肉形質と筋肉内脂肪における脂肪酸組成に及ぼす効果について検討するため、

JMP7(SAS Institute, Cary, NC)を用いて分散分析を行い、各効果の最小自乗平均値に対してTukey-Kramerの有意差検定を実施した。分析モデルには遺伝子型の他、屠殺月齢および性の要因を加えた。解析集団では種雄牛の偏りが少なかつたため、この効果は分析モデルから除外した。

3. 結果と考察

3.1 ウシMMP14遺伝子における新規DNA多型の同定

塩基配列決定の結果、CDS領域において2個の新規DNA多型(g.5176 bp C>T, g.7096 bp C>T)を同定した(Fig. 1a, b)。g.5176 bp C>T多型ではいずれの対立遺伝子も第192番目のアミノ酸がアスパラギン酸となることが予想されたため、この塩基配列の変化はMMP14タンパク質の機能や構造には影響ないと考えられた。また、g.7096 bp C>T多型においても、いずれの対立遺

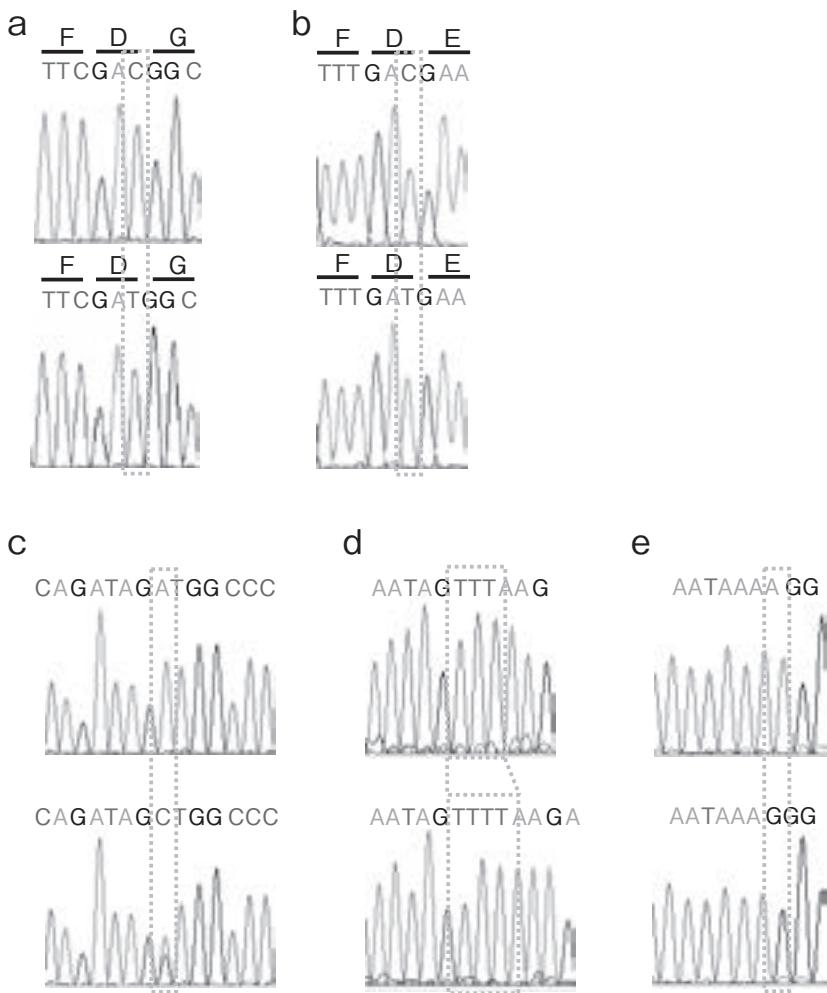


Fig. 1 Identification of DNA polymorphisms in bovine *MMP14* gene.

Sequence comparison revealed two silence mutations, g. 5176 bp C>T (a) and g. 7096 bp C>T (b), in the CDS and three DNA polymorphisms, g.-1723bp A>C (c), g.-871bp->T (d) and g.-831bp A>G (e), in the promoter region.

伝子も第390番目のアミノ酸がアスパラギン酸になることが予想された。サイレンス突然変異であってもmRNA二次構造に影響を与える可能性があり、タンパク質の翻訳効率やmRNAの安定性に関与することがある。しかしながら、CDS領域で同定した2個のDNA多型ではいずれのディプロタイプにおいてもmRNAの二次構造に大きな違いはなく、これらの多型はmRNAの二次構造に影響を及ぼさないことが示唆された (data

not shown)。

プロモーター領域では3個の新規DNA多型 (g.-1723bp A>C, g.-871bp->T, g.-831bp A>G) が同定された (Fig. 1c-e)。g.-1723bp A>C 多型のA型ではYY1およびNF-InsE2/3の各転写因子が結合する可能性があり、C型ではCP2, NF-1, CREMaw, E12, myogeninおよびMyoD の各転写因子の結合が予想された (Fig. 2a)。g.-871bp->T 多型は1塩基の挿入であり、-873か

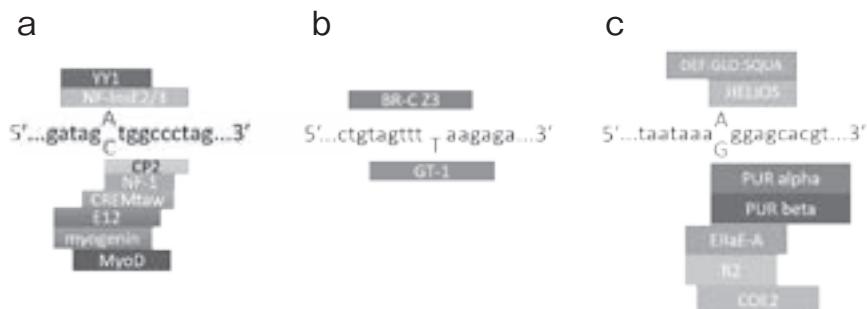


Fig. 2 Putative transcription factor biding sites in the *MMP14* promoter region.
Three DNA polymorphisms, g.-1723bp A>C (a), g.-871bp A>T (b) and g.-831bp A>G (c), were predicted to alter the bindings of transcription factors.

ら-871の位置に存在する3個のT塩基が4個に増加する多型である。T塩基が3個の場合はBR-CZ3が、4個の場合はGT-1がそれぞれ結合する可能性がある (Fig. 2b)。g.-831bp A>G多型では、A型ではDEF : GLO : SQUAおよびHELIOSが、G型ではPUR alpha, PUR beta, ElfaE-A, R2, およびCOE 2の結合が予想された (Fig. 2c)。これら転写因子が遺伝子発現に及ぼす影響は不明だが、g.-1723bp A>C多型のA型で結合が予想されたYY 1は脂肪細胞の機能に関わる転写因子の一つである。また、本多型のC型で結合が予想されたmyogeninおよびMyoDは筋肉細胞の分化を制御することで知られる転写因子である。これらの転写因子は肉質に影響する可能性があるため、g.-1723bp A>C多型を以降の解析に供した。

3.2 g.-1723 bp A>C多型が枝肉形質および脂肪酸組成に及ぼす効果

PCR-RFLP法によるg.-1723bp A>C多型の遺伝子型判定の結果、黒毛和種集団487個体のうちA/A型の個体が400個体、A/C型が78個体、C/C型が9個体だった。したがって、遺伝子型頻度はA/A型が0.82, A/C型が0.16, C/C型が0.02であり、対立遺伝子頻度はAアリルが0.90, Cアリルが0.11だった。このDNA多型の黒毛和種集団における

枝肉形質および脂肪酸組成に対する効果を分散分析により調べた。その結果、g.-1723bp A>C多型はC 16 : 1 含有率に対する有意な効果 ($p = 0.0187$) を持つことが認められた (Table 2)。この効果を詳細に検討するため、遺伝子型ごとにC 16 : 1 含有率の最小自乗平均値を比較した。A/A型は4.22%, A/C型は4.11%, C/C型は3.52%だった。A/A型とC/C型の間には有意差 ($p < 0.05$) が確認され (Table 3)，g.-1723bp A>C多型がC 16 : 1 含有率に対するDNAマーカーとして活用可能であることを示唆した。

4 要 約

日本を代表する肉用牛である黒毛和種はその高い脂肪交雑により高く評価される品種だが、近年では新たな改良指標として脂肪酸組成が注目されている。一価不飽和脂肪酸の含有率の増加は食肉の食味性向上につながり、その改良には遺伝学的アプローチが有効であるとされている。本研究では脂肪酸代謝に関与する新規候補遺伝子の一つ*MMP14*遺伝子に対する多型探索および同定したDNA多型の経済形質に対する効果の検証を行った。その結果、CDS領域において2個のサイレンス突然変異、プロモーター領域において3個のDNA多型を同定した。プロモーター領域で同定

Table 2 Comparison of carcass traits and fatty acid composition between genotypes of the g.-1723 bp A>C

Trait	g.-1723 bp A>C
Carcass traits	ns
Carcass weight	ns
Rib-eye area	ns
Rib thickness	ns
Subcutaneous fat thickness	ns
Yield estimate	ns
Beef marbling score	ns
Fatty acid composition	ns
C 14 : 0	ns
C 14 : 1	ns
C 16 : 0	ns
C 16 : 1	*
C 18 : 0	ns
C 18 : 1	ns
C 18 : 2	ns

* $p<0.05$: ns (non-significant)

Table 3 Effect of the g.-1723bp A>C on fatty acid composition

Trait	g.-1723bp A>C		
	A/A (n=400)	A/C (n=78)	C/C (n=9)
C 16 : 1 (%)	4.22 ± 0.05 ^a	4.11 ± 0.09 ^{a, b}	3.52 ± 0.25 ^b

Values are expressed as means with standard error by least squares estimates.

^{a, b}Means with different superscripts differ significantly at $p<0.05$ (Tukey's HSD analysis).

した多型のうちg.-1723 bp A>C多型は肉質に影響し得る転写因子が結合することが予想されたため、本多型が枝肉形質および脂肪酸組成に及ぼす効果を分析した。g.-1723 bp A>C多型はC 16 : 1含有率に対する有意な効果 ($p = 0.0187$) を持ち、A/A型はC/C型よりは0.7%含有率が増加することが確認された。以上より、MMP14遺伝子のg.-1723 bp A>C多型はDNAマーカーとして活用可能であることが示唆された。

文 献

- 1) 松本大和, 小栗佑介, 水野雄仁, 石田孝史, 小林郁雄, 祝前博明, 斎藤邦彦, 笹子奈々恵, 小林栄治, 久下志朗, 本多健, 笠崎晋史, 大山憲二, 万年英之: 黒毛和種の背最長筋を用いた網羅的遺伝子発現解析, 動物遺伝育種研究, 41 (1), 7~14, 2013.
- 2) Matsumoto, H., Sasaki, K., Bessho, T., Kobayashi,

E., Abe, T., Sasazaki, S., Oyama, K., Mannen, H.: The SNPs in the ACACA gene are effective on fatty acid composition in Holstein milk, *Molecular Biology Reports*, 39 (9), 8637~8644, 2012.

- 3) Matsumoto, H., Shimizu, Y., Tanaka, A., Nogi, T., Tabuchi, I., Oyama, K., Taniguchi, M., Mannen, H., Sasazaki, S.: The SNP in the promoter region of the bovine ELOVL5 gene influences economic traits including subcutaneous fat thickness, *Molecular Biology Reports*, 40 (4), 3231~3237, 2013.
- 4) Matsumoto, H., Nogi, T., Tabuchi, I., Oyama, K., Mannen, H., Sasazaki, S.: The SNPs in the promoter regions of the bovine FADS2 and FABP4 genes are associated with beef quality traits, *Livestock Science*, 163, 34~40, 2014.
- 5) Lohi, J., Lehti, K., Valtanen, H., Parks, W. C., Keski-Oja, J.: Structural analysis and promoter characterization of the human membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) gene, *Gene*, 242 (1-2), 75~86, 2000.

リキッドバイオプシーによる非侵襲的牛体外受精胚の遺伝子スクリーニング

Non-invisible genetic screening of *in vitro* fertilized bovine embryos by liquid biopsy

杉 村 智 史

(東京農工大学大学院グローバルイノベーション研究院)

Satoshi Sugimura

(Institute of Global Innovation Research, Tokyo University of Agriculture and Technology)

Preimplantation genetic screening is widely used for sexing and breeding. A disadvantage of the genetic screening is that it requires biopsy of the embryo, which may affect embryo viability because of inevitable method. Here we tried to detect *in vitro* fertilized (IVF) bovine embryo derived DNA from the spent medium as noninvasive genomic screening. G-TL medium which is human embryo culture medium was suitable for single bovine IVF embryo culture. Whole genome amplification (WGA) with optimized PEP-PCR was effective for simple detection of trace DNA. The DNA purified from spent medium was amplified by WGA, and as a result, bovine specific sequence was detected from the medium. The method may allow genetic screening including sexing and breeding applicability with noninvasiveness in cattle production.

1. 目 的

乳用後継牛の激減により、生乳生産量が減少している。他方、和牛繁殖農家戸数の減少により和牛素牛価格が高騰しており、その生産性拡大が急務となっている。そのため、生乳生産を行う雌牛（乳用後継牛）を計画的に確保しつつ、和牛繁殖雌牛や肥育用の和牛子牛（素牛）も増産する必要がある。これらの課題を解決する既存の方法として、乳牛に雌の性選別精液を人工授精して後継牛を生産しつつ、性選別精液を人工授精しない残りの乳牛群には和牛受精胚を移植することで和牛生産する方法が試みられている。これは、農林水産

省の「酪農及び肉用生産の近代化を図るための基本方針」にも示されている。しかし、性選別精液を利用した場合、選別による精子生存性へのダメージにより人工授精の初回受胎率が30%程度であること、また、限られた個体に由来する性選別精液のみの使用に限られることなどが問題となっている。一方で、受精卵移植における性の人為的制御として、マイクロマニピュレーターを用いて胚の一部を切除／分離し性を判別する方法があげられる¹⁾。この方法では細胞からDNAを単離し性特異的遺伝子をPCR等で検出することで性を特定している。また、この方法を用いることで、性判別のみならず将来経済的損失が危惧される遺伝

的不良形質や、経済的に重要視されている遺伝型を胚移植前に予知することが可能となる。しかしながら、胚の一部を切除もしくは分離することで移植後の生育や出生後の状態に負の影響を与えることが示唆されているほか、マイクロマニピュレーターといった特殊機器や熟練技術が必要なことからその実用化・普及には至っていない。本研究では、マイクロマニピュレーターを用いず、かつ、胚を一切傷つけず、牛体外受精胚の遺伝子をスクリーニングする新技術を開発する。すなわち、体外発生過程で胚から培地中に放出されたcell free DNAを採取し、その遺伝情報を解析する技術を開発することを目的とする。

2. 材料・方法

2.1 胚の培養

食肉処理場由来卵巣から卵丘細胞卵子複合体(COCs)を採取した。COCsは5%牛血清および0.1IU/ml卵胞刺激ホルモン添加HEPES-TCM199で20—22時間培養した。BO液により体外受精後、30μlヒト用胚発生培地(G-TL, Global (GLB), SAGE 1 step medium (SIS), NAKA IVF medium ONESTEP medium (OSM))で7日間培養した(38.5°C, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂)。

2.2 受精胚からのDNA抽出

PCRチューブ1つに対し体外受精胚1つ、全液体量5μl, Proteinase K0.8%, Triton X-1000.5mg/mlとなるように調整し、37°C 20分、90°C 7.5分で処理した。解析まで-80°Cで保存した。

2.3 培養液からのDNA精製

Cell free DNAは断片化された状態で放出される。そこで、小さいゲノム情報を持つウイルスのDNA精製に適したQIAamp MinElute Virus Spin Kitを用いた。解析まで-80°Cで保存した。

2.4 PEP-PCR

PEP-PCRにより全ゲノム増幅を行った。トータル10μlになるようにランダムプライマー、DNAポリメラーゼ、dNTPを含む反応ミックスに加え、サーマルサイクラーによりPCRを行った(92°C 1分、37°C 2分、55°C 4分を55サイクル)。

2.5 PCRとウシ特異的配列の検出

PEP-PCR産物を鋳型としてBovine1.715サテライトDNA配列をプライマー(F: 5'-TGGAAGC AAAGAACCCCGCT-3', R: 5'-TCGTCAGAAA CCGCACACTG-3')としたPCRを行った。反応条件は以下のとおりである。96°C 3分の後、95°C 1分、58°C 1分、72°C 0.5分を33サイクル。PCRを電気泳動を行いウシ特異的配列の検出を行った。

2.6 統計解析

胚盤胞形成率の統計解析には分散分析を用い、post-hocテストにはTukey-Kramer法を用いた。

3. 結果・考察

3.1 実験1

単一培養の最適化を行うため、培養液の種類を検討した。通用、牛胚の培養には、牛血清や牛血清アルブミンが含まれるため、培地由来の牛核酸のコンタミを防ぐため、市販されている4種類のヒト用発生培地を用いた。結果、胚盤胞への発生率はG-TL: 40%, GLB: 35.6%, SIS: 27.5%, OSM: 32.5%と有意差はないもののG-TL区で最も胚盤胞への発生が高かった。牛用血清含発生培地で培養した場合の胚盤胞形成率が34.2%だったことから、市販されているヒト用発生培地が牛受精卵の単一培養に適していることを示唆している(Fig. 1)。以降の実験ではG-TLを発生培地に用いることとした。

3.2 実験2

PEP-PCRの最適化を行うため、1胚盤胞由来DNAを用いてマグネシウム濃度を検討した。結

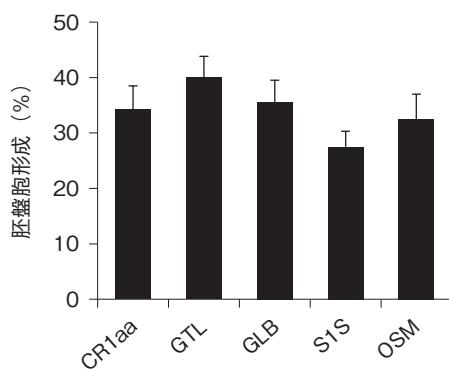


Fig. 1 異なる発生培地を用いたウシ体外受精胚の発生率

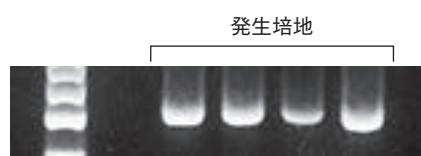


Fig. 2 受精卵培養後の発生培地から検出されたウシ特異的配列

果、2.2mMでもっとも增幅効率が高かった。最適化した全ゲノム増幅法により1割球より抽出したDNAを増幅させ、ウシ特異的配列 (Bovine1.715) の検出を行ったところ、ウシ特異的配列が検出された。

3.3 実験3

続いて、牛受精胚の単一培養後の培養液からのDNA精製と得られたDNAの全ゲノム増幅を試みた。WGAは研究1で最適化した方法を用いた。その結果、解析したすべての培地中からのウシ特異的配列の検出に成功した (Fig. 2)。

以上、受精胚養後の大別を用いることで非

侵襲的に牛体外受精胚の遺伝子情報をスクリーニングできる可能性が示された。これまで、ヒト胚を用いた研究でのみ、受精胚培養の培地からのcell-free DNA解析が成功していた^{2,3)}。今回の成果はヒト以外の動物種では初めての成果である。今後は今回開発した手法を用いて性判別、遺伝性疾患、染色体異常の診断を行っていく予定である。

4. 要 約

牛受精胚の培養後の培養液からウシ特異的配列の検出に成功した。今後は、この技術を性選別、ゲノム育種、遺伝性疾患の検出、染色体異常の検出に応用していく予定である。

文 献

- 1) Hirayama, H., Kageyama, S., Moriyasu, S., Hirano, T., Sugimoto, Y., Kobayashi, N., Inaba, M., Sawai, K., Onoe, S., Minamihashi, A.: Genetic diagnosis of claudin-16 deficiency and sex determination in bovine preimplantation embryos, *J Reprod Dev.*, 50, 613~618, 2004.
- 2) Vera-Rodriguez, M., Diez-Juan, A., Jimenez-Almazan, J., Martinez, S., Navarro, R., Peinado, V., Mercader, A., Meseguer, M., Blesa, D., Moreno, I., Valbuena, D., Rubio, C., Simon, C.: Origin and composition of cell-free DNA in spent medium from human embryo culture during preimplantation development, *Hum Reprod.*, 33, 745~756, 2018.
- 3) Xu, J., Fang, R., Chen, L., Chen, D., Xiao, J. P., Yang, W., Wang, H., Song, X., Ma, T., Bo, S., Shi, C., Ren, J., Huang, L., Cai, L. Y., Yao, B., Xie, X. S., Lu, S.: Noninvasive chromosome screening of human embryos by genome sequencing of embryo culture medium for in vitro fertilization, *Proc Natl Acad Sci USA.*, 113, 11907~11912, 2016.

肉用鶏の筋芽細胞を用いた食肉の特性評価に資する遺伝子の探索

Exploration of the genes to assess meat characteristics using skeletal muscle myoblasts from meat-type chickens

高 谷 智 英・鏡 味 裕

(信州大学農学部)

Tomohide Takaya and Hiroshi Kagami

(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

Skeletal muscle tissues of broiler chickens rapidly develop and grow compared with those of layer chickens. Myoblasts which are myogenic progenitor cells play central roles during muscle development and growth, suggesting that the cell characteristics of broiler myoblasts are critically important for meat production. Thus identification of the genes which are specifically expressed in broiler myoblasts will be useful as genetical markers for selective breeding, improving feed efficiency, and quality evaluation of the meat. In this study, we compared cell growth, myogenic differentiation, and gene expression of the primary-cultured myoblasts between UK Chunky (UKC) as broiler chicken and White Leghorn (WL) as layer chicken. In growth medium, the numbers of UKC myoblasts were significantly larger than WL myoblasts after 48 h of culture. And the ratio of proliferating EdU-positive cells were significantly higher in UKC myoblasts than WL myoblasts. In differentiation medium, the ratio of myosin heavy chain-positive myocytes and myotubes were significantly higher in UKC myoblasts than WL myoblasts. These results clearly indicated that UKC myoblasts possess remarkable capabilities of cell proliferation and myogenic differentiation compared with WL myoblasts. It suggests that such cell characteristics of UKC myoblasts actively contribute to the well-developed skeletal muscle of broiler chickens. To explore the genes specifically expressed in broiler myoblasts, comprehensive gene expression patterns of UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiating condition were analyzed by RNA sequencing. We successfully identified the genes differentially expressed between UKC and WL myoblasts; 640 genes at day 0, 608 genes at day 1, 677 genes at day 2. Notably, expression patterns of 336 genes were consistently different throughout differentiation process. Functional analyses of these gene products will elucidate the mechanism how broiler myoblasts actively proliferate and differentiate.

1. 目的

近年、特に開発途上国では、人口増加に加えて一人当たりの食肉消費量が著増しており、世界的な食肉需要が高まっている。肉用鶏の飼料効率(0.5)は、肥育豚(0.3)や肥育牛(0.1)と比較して非常に高い。徹底した育種改良により、過去50年間で肉用鶏の成長率は1日25gから100gに上昇した。安価で良質なタンパク質であり、宗教的な禁忌も少ない鶏肉は、過去40年で最も高い生産量増加率を示している。日本国内の鶏肉生産量も、消費者の国産志向などを反映して増加傾向で推移している。ところが、日本で市販されている鶏肉の約98%はブロイラーであり、その原種鶏はほぼ100%を輸入に依存している。鶏肉の安定供給という点で我が国は危機的状況にあり、有用な国産鶏（地鶏）の開発が喫緊の課題である。

加えて、先進諸国では、健康意識の高まりと嗜好の多様化から、高付加価値の鶏肉が求められている。地鶏はその代表例であり、多彩な品質を謳う様々な品種が提供されている。しかし、これらの鶏肉＝鶏骨格筋の遺伝的な特性を厳密に評価する方法は確立されていない。筋肉組織の特性は、飼料・飼育環境・個体の生育段階による後天的な影響を受けるため、各品種に固有な特性を明確に抽出するのは困難である。

そこで本研究では、骨格筋の前駆細胞である筋芽細胞に着目した。筋芽細胞は細胞分裂によって増殖した後、筋細胞へと分化する。分化した筋細胞は互いに融合して多くの筋管を形成し、筋管がさらに成長・融合して骨格筋線維が形成される。したがって、筋形成において中心的な役割を果たす筋芽細胞の遺伝子発現パターンは、鶏肉の特性と密接な関係があると考えられる。

本研究では、肉用鶏と卵用鶏から採取した筋芽細胞を用い、肉用鶏で特徴的に発現する遺伝子を

探索したので、その結果を報告する。

2. 方 法

2.1 鶏筋芽細胞の初代培養と筋分化誘導

鶏筋芽細胞の採取、初代培養、および筋分化誘導は、高谷らの方法を用いた¹⁾。肉用鶏としてUK Chunky種(UKC)、卵用鶏としてWhite Leghorn種(WL)を用いた。孵卵器で培養した鶏の10日胚の後脚の骨格筋組織を摘出し、コラゲナーゼ処理によって分散させた筋芽細胞を、コラーゲン処理した培養皿に播種し、37℃、5%CO₂条件下で培養した。増殖中の未分化な筋芽細胞は、増殖培地(RPMI1640培地、20%牛胎児血清、1%非必須アミノ酸、1%鶏胚抽出物、2ng/ml塩基性線維芽細胞成長因子)で培養した。増殖培地で培養中の筋芽細胞を分化0日目と定義した。2.0×10⁵個の筋芽細胞を、コラーゲン処理した30mm径の培養皿に播種し、分化培地(DMEM培地、2%牛胎児血清)で培養することで筋分化を誘導した。

2.2 細胞組織化学染色

DAPI染色により筋芽細胞の核を染色した。骨格筋の最終分化マーカーであるミオシン重鎖の染色は以下の方法で行った。筋芽細胞を2%パラホルムアルデヒドで固定し、0.2%Triton溶液で透過処理した後、マウスモノクローナル抗ミオシン重鎖(MHC)抗体(MF20)で蛍光免疫染色した。ミオシン重鎖陽性細胞の核の数を、すべての核の数で除した値を、ミオシン重鎖陽性細胞率として計測し、筋分化の指標とした。

筋芽細胞の増殖は、チミジンのアナログであるEdUの取り込みによって評価した。10μMのEdUで3時間処理した筋芽細胞をClick-iT EdU Alexa Fluor Imaging Kit(Thermo)で染色し、EdU陽性細胞率を計測した。

2.3 RT-PCR

Trizolを用いて筋芽細胞のRNAを回収した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mixを用いて、RNAを逆転写し、cDNAを合成した。GoTaq qPCR Master Mix (Promega) を用いて、定量的PCRを行った。PCR反応にはStepOne Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。PCR産物は、アガロースゲル電気泳動した後、エチジウムプロマイド染色によって検出した。

2.4 RNAシーケンス

筋芽細胞で発現する遺伝子を網羅的に定量するため、RNAシーケンスを行った。RNAシーケンスは、東京農業大学生物資源ゲノム解析センターとの共同研究で行った。分化0, 1, 2日目の筋芽細胞からRNAを精製し、Illumina TruSeq RNA Library Prep kit v2を用いてシーケンスライブリを調整した。Illumina HiSeq 2500を用いて、シングルリードで100塩基のシーケンス反応を行った。シーケンスによって得られた配列を、Gallus_gallus-5.0 Assembly (Genebank assembly accession : GCA_000002315.4) にマッピングし、遺伝子を同定した。このとき、1塩基の不一致を許容した。Trimmed mean of M values正規化によってシーケンスのリード数を正規化し、発現量を算出した。発現量が2倍以上 ($p<0.05$) 変動している遺伝子を抽出し、解析を行った。

3. 結果と考察

3.1 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞の増殖・分化能の比較

肉用鶏UKCと卵用鶏WLの筋芽細胞を増殖培地で培養し、24時間ごとの細胞数を計測した。培養48時間後には、UKC筋芽細胞の数はWL筋芽細胞の1.7倍 ($p<0.05$) に達し、96時間後に至るまで、UKC筋芽細胞数はWL筋芽細胞を有意に上回った

(Fig. 1)。また、細胞分裂に伴うゲノムDNAの複製の指標であるEdU陽性率は、UKC筋芽細胞で49%であり、WL筋芽細胞の35%を有意に上回った (Fig. 2)。これらの結果から、UKC筋芽細胞はWL筋芽細胞と比較して活発に細胞分裂をし、増殖することが明らかになった。

次に、分化培地でUKC筋芽細胞とWL筋芽細胞の筋分化を誘導し、24時間ごとに、骨格筋の最終分化マーカーであるMHCの免疫染色を行った (Fig. 3)。分化誘導1日目および2日目において、

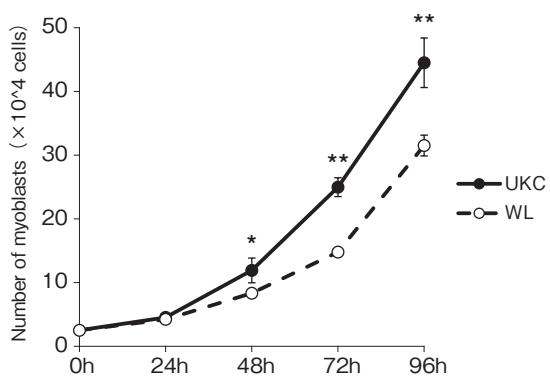


Fig. 1
Number of UKC and WL myoblasts cultured in growth medium. Graphs represent mean \pm SD. * $p<0.05$, ** $p<0.01$. $n=3$.

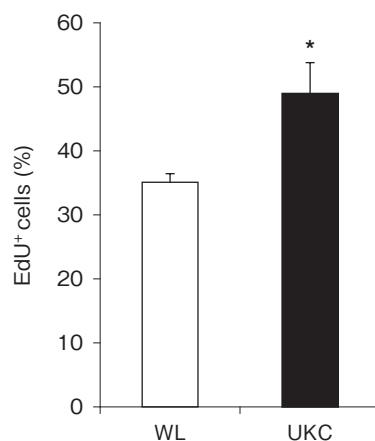


Fig. 2
Ratio of EdU-positive UKC and WL myoblasts cultured in growth medium. Graphs represent mean \pm SD. * $p<0.05$. $n=4$.

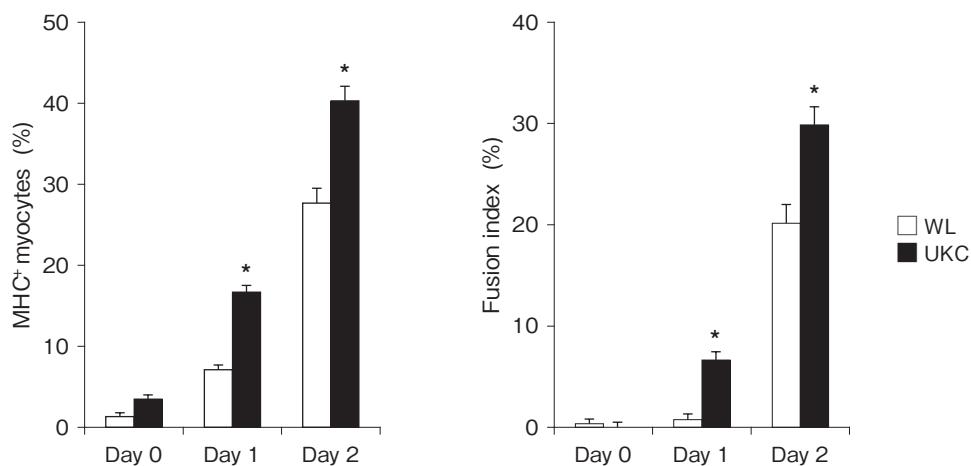


Fig. 3

Ratio of MHC-positive myocytes (left panel) and fused myotubes (right panel) derived from UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiation medium. Graphs represent mean \pm SD. * $p < 0.05$. $n = 4$.

UKC筋芽細胞のMHC陽性率はWL筋芽細胞を有意に上回った。また、成熟した多核の筋管の割合を示す細胞融合率も同様に、分化誘導1日目および2日目において、UKC筋芽細胞で有意に高い値を示した。これらの結果から、UKC筋芽細胞はWL筋芽細胞と比較して高い筋分化能を示すことが分かった。

以上のことから、WL筋芽細胞と比較して、UKC筋芽細胞は活発な細胞分裂によって急速に増殖した後、速やかに成熟した筋管に分化することが明らかとなった。このようなUKC筋芽細胞の性質が、卵用鶏の2-3倍の速度で成長する肉用鶏の骨格筋線維の形成に貢献していることが強く示唆された。

3.2 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞におけるToll

様受容体遺伝子群の発現の比較

我々はこれまで、UKC筋芽細胞とWL筋芽細胞で、筋芽細胞特異的に発現する転写因子群(*PAX3*, *PAX7*, *MYF5*, *MYOD1*, *MYOG*など)やミオシン軽鎖および重鎖(*MYL1*, *MYL3*, *MYH1*, *MYH7B*)の遺伝子発現を比較してきた。

本研究では、多様な外来因子を認識して免疫反応を誘導するToll様受容体(Toll-like receptor; TLR)遺伝子群の発現を解析した。鶏には10種類のTLR遺伝子(*TLR1A*, *TLR1B*, *TLR2A*, *TLR2B*, *TLR3*, *TLR4*, *TLR5*, *TLR7*, *TLR15*, *TLR21*)が存在する²⁾。RT-PCRの結果(Fig. 4), WL筋芽細胞ではすべてのTLR遺伝子が発現しているが、UKC筋芽細胞では*TLR1A*の発現は検出されなかった。免疫細胞を多数含む脾臓組織からRNAを抽出し、同様のRT-PCRを行った結果、UKCおよびWLの両方の脾臓ですべてのTLR遺伝子が発現していることを認めた。このことから、*TLR1A*遺伝子は、UKC筋芽細胞でのみ特異的に発現が抑制されていることが明らかになった。

近年、肉用鶏では、過剰に発達した筋組織内で生じる炎症が大きな問題となっている³⁾。この炎症の原因には諸説あるが、発症機序の詳細は不明である。TLRは細胞内にシグナルを伝達することで、インターロイキンなどの炎症性サイトカインの放出を誘導するなど、免疫疾患に深く関与す

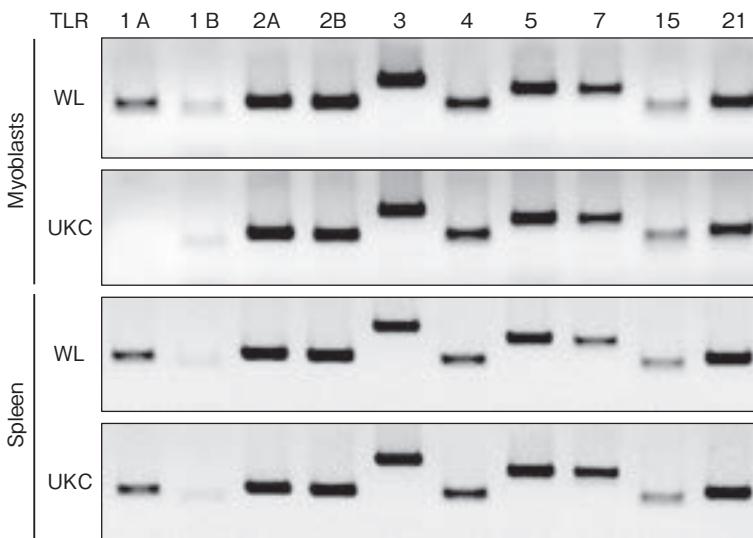


Fig. 4

Total RNAs from myoblasts and spleen of UKC and WL chickens were subjected to RT-PCR to amplify cDNAs of TLR genes. PCR products were then subjected to agarose gel electrophoresis.

る受容体である。本研究で明らかになった、UKCおよびWL筋芽細胞におけるTLR遺伝子群の発現パターンの違いが、肉用鶏の筋組織で生じる炎症と関連しているかについて、今後の研究で明らかにしていきたい。

3.3 肉用鶏と卵用鶏の筋芽細胞における遺伝子発現パターンの網羅的解析

上記の実験から、UKCとWLの筋芽細胞では増殖・分化能が明らかに異なること、UKCとWLの筋芽細胞で明確に発現パターンが異なる遺伝子が存在することが明らかになった。このような性質の相違は、UKCとWLの筋芽細胞で発現する遺伝子群によって既定されていると考えられる。これまで、肉用鶏の胸筋組織における遺伝子発現の飼料依存的な変化を網羅的に調べたDNAマイクロアレイ⁴⁾や、肉用鶏と卵用鶏の胸筋組織の遺伝子発現を調べたRNAシーケンス^{5, 6)}の解析結果が報告されている。しかし胸筋組織は、筋線維や筋芽細胞以外にも、血管、血球、脂肪、線維など多くの細胞種を含むサンプルであり、解析で得られ

た結果が真に骨格筋系の細胞に起因するものであるかどうかは定かではない。

そこで本研究では、UKCとWLの筋芽細胞における遺伝子発現を網羅的に比較・定量するために、RNAシーケンスを行った。分化0, 1, 2日目のUKCおよびWL筋芽細胞からRNAを精製した。分化誘導は独立して3回行い、各群n=3とした。すべてのサンプルで、各2,000万以上のリードを取得した後、ニワトリゲノムにマッピングして遺伝子を同定し、正規化したカウント数から遺伝子発現量を算出した。

発現が変動していた遺伝子を解析した結果、UKCとWLの筋芽細胞を比較した場合、分化0日目では640個の遺伝子が、分化1日目では608個の遺伝子が、分化2日目では677個の遺伝子の発現が異なることが明らかになった(Fig. 5)。このうち336個の遺伝子は、分化過程を通じてUKCとWLの筋芽細胞で発現量が異なっており、両品種で異なる筋芽細胞の形質に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、UKCとWLの筋芽

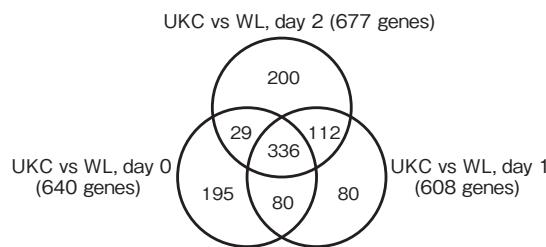


Fig. 5

Venn diagram of the number of the genes differentially expressed between UKC and WL myoblasts at day 0, 1, and 2 in differentiation condition. The genes was defined as ; fold change ≥ 2 , $p < 0.05$, $n = 3$.

細胞でそれぞれ、分化に伴って発現が変化する遺伝子も抽出した。特に分化0日目と2日目では、UKC筋芽細胞では1,307個、WL筋芽細胞では1,204個の遺伝子の発現が変化していた。これらの遺伝子群の中には、筋分化に重要な因子が多数含まれていると推測される。これらを比較し、特にUKC筋芽細胞でのみ発現が変化する遺伝子を特定することで、UKC筋芽細胞が示す高い筋分化能力を実現している因子を特定できるのではないかと考えている。今後さらに解析を進め、UKC筋芽細胞が有する旺盛な細胞増殖・分化能の機構を解明できれば、肉用鶏の特性検定に有用な遺伝マーカーの開発、肉用鶏の品種改良、肉用鶏の飼料要求率の改善などへの貢献が期待される。

4. 要 約

本研究により、肉用鶏UKCと卵用鶏WLでは、骨格筋形成で中心的な役割を果たす筋芽細胞の性質が明確に異なっていることが明らかになった。遺伝子発現解析の結果、UKCとWLの筋芽細胞では、TLR遺伝子をはじめ、多くの遺伝子群の発現パターンが異なることが分かった。肉用鶏で特異的な発現パターンを示す遺伝子群を追及することで、鶏肉の生産に資する遺伝マーカーの確立に

つながることが期待される。将来的には、地鶏などさらに多数の品種の筋芽細胞における遺伝子発現を調べることで、鶏の筋形成や鶏肉の品質に寄与する遺伝子群の立体的な理解につながると考えられる。

謝 辞

RNAシーケンスに多大なるご協力を頂きました東京農業大学の浜口悠先生、小林久人先生、河野友宏先生、そして本研究の実験で中心的な役割を果たしてくれた信州大学大学院の二橋佑磨君に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Takaya, T., Nihashi, Y., Kojima, S., Ono, T., Kagami, H. : Autonomous xenogenic cell fusion of murine and chick skeletal muscle myoblasts, *Anim Sci J.*, 88, 1880~1885, 2017.
- 2) Temperley, N. D., Berlin, S., Paton, I. R., Griffin, D. K., Burt, D. W. : Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family : a story of gene gain and gene loss, *BMC Genomics*, 9, 62~73, 2008.
- 3) Kawasaki, T., Yoshida, T., Watanabe, T. : Simple method for screening the affected birds with remarkably hardened pectoralis major muscles among broiler chickens, *J Poult Sci*, 53, 291~297, 2016.
- 4) Kong, B. W., Song, J. J., Lee, J. Y., Hargis, B. M., Wing, T., Lassiter, K., Bottje, W. : Gene expression in breast muscle associated with feed efficiency in a single male broiler line using a chicken 44K oligo microarray. I. Top differentially expressed genes, *Poult Sci*, 90, 2535~2547, 2011.
- 5) Zheng, Q., Zhang, Y., Chen, Y., Yang, N., Wang, X. J., Zhu, D. : Systematic identification of genes involved in divergent skeletal muscle growth rates of broiler and layer chickens, *BMC Genomics*, 10, 87, 2009.
- 6) Kong, B. W., Hudson, N., Seo, D., Lee, S., Khatri, B., Lassiter, K., Cook, D., Piekarski, A., Dridi, S., Anthony, N., Bottje, W. : RNA sequencing for global gene expression associated with muscle growth in a single male modern broiler line compared to a foundational Barred Plymouth Rock chicken line, *BMC Genomics*, 18, 82, 2017.

県集団における和牛肉の美味しさに関わる遺伝子マーカーの効果検証

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

笹崎晋史

(神戸大学大学院農学研究科)

Shinji Sasazaki

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)

In this study, we investigated the effect of the PLAG1 gene polymorphism on oleic acid percentage (C18 : 1) in four Japanese Black cattle populations (JB1 : n = 900, JB2 : n = 560, JB3 : n = 456, JB4 : n = 450). We genotyped the PLAG1 polymorphism (rs109231213) for four populations and then analyzed the effects on carcass weight (CW) and C18 : 1. As a result, the polymorphism was significantly associated with carcass weight in four populations ($P < 0.001$) in agreement with previous reports. In addition, it also had significant effect on C18 : 1 in JB1, JB2 and JB3 ($P < 0.05$). Turkey-Kramer's honestly significant difference test revealed that qq genotype indicated higher percentage of C18 : 1 than QQ genotype in JB1 and JB2 (1.62 and 2.23, respectively), while the qq genotype showed lower carcass weight in four populations. These results suggested that the PLAG1 gene polymorphism would be useful as DNA marker for C18 : 1 in Japanese Black population.

1. 目的

PLAG1 (Pleomorphic adenoma gene 1) は 14 番染色体に存在する遺伝子であり、胎児期に特に多く発現し (Pendeville ら 2006)，細胞増殖や細胞分化に影響を及ぼす遺伝子を調節することにより、牛の発育制御に関与することが知られている¹⁾。このような機能により PLAG1 遺伝子は成長に関わる様々な形質に対する責任遺伝子としていくつもの先行研究で報告されている。Karim ら (2011) は、牛の体長・体高に関わる多型を PLAG1 遺伝子内に同定している²⁾。また黒毛和

種において、上記のPLAG1 遺伝子多型は様々な集団において効果が認められていることから、枝肉重量に対する責任変異であると考えられている^{3~5)}。

一方で、PLAG1 遺伝子の存在する14番染色体において脂肪酸組成に対するQTLが報告されている。Kawaguchi ら (2018) は黒毛和種集団に対するGWASにより14番染色体19Mb付近にオレイン酸含有率 (C 18 : 1) に対するQTLを⁶⁾、Kelly ら (2014) はアンガスやヘレフォードなど7品種からなる集団に対するGWASにより14番染色体16~31Mbに C 16 : 0, C 18 : 0 に対する

QTLを同定している⁷⁾。さらに上記のPLAG 1 遺伝子多型において脂肪酸組成との関連がいくつか報告されている。黒毛和種においてC16: 1との関連が⁸⁾、韓牛においてはC20: 1との関連がそれぞれ報告されている⁹⁾。一方、PLAG 1 遺伝子の機能面を考慮すると脂肪酸組成に直接影響を及ぼすとは考えにくく、Sasagoら (2016) も脂肪酸組成との関連はPLAG 1 遺伝子と連鎖不平衡の関係にある遺伝子によるものであると考察している⁸⁾。しかしながら上記の14番染色体における脂肪酸組成に対するQTLの報告や、PLAG 1 遺伝子多型と脂肪酸組成との関連が認められていることを踏まえると、PLAG 1 遺伝子周辺に脂肪酸組成に対する原因変異が存在している可能性が十分に考えられる。

そこで本研究では複数の黒毛和種集団を用いてPLAG 1 遺伝子と脂肪酸組成、特にC18: 1との関連を調査し、黒毛和種におけるC18: 1改良のDNAマーカーとしての有用性を検討することを

目的とした。

2. 方 法

2.1 供試動物

PLAG 1 遺伝子内多型の枝肉形質と脂肪酸組成に対する効果の検証には以下に示す4集団を用いた。枝肉重量、ロース芯面積、ばら厚、皮下脂肪厚、推定歩留、BMSで構成される枝肉形質は、社団法人日本食肉格付協会の格付により評価された格付値を用いた。各集団の表現型値の平均値はTable 1に示した。DNA抽出のためと殺後に頸部筋肉組織を採取した。

2.1.1 兵庫県黒毛和種集団 (JB 1)

平成22年から24年の間に枝肉評価を受けた、兵庫県黒毛和種集団900頭で、平均と殺月齢±標準偏差は 31.83 ± 1.37 であった。と殺後に脂肪酸組成の測定のため、胸最長筋の筋肉内脂肪を採取した。

2.1.2 宮崎黒毛和種集団 (JB 2)

宮崎県下で肥育され2006年4月～2007年10月ま

Table 1 Summary statistics of carcass traits and fatty acid composition in four Japanese Black populations.

Trait	JB 1		JB 2		JB 3		JB 4	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Carcass weight (kg)	388.34	39.63	432.06	46.87	446.18	41.92	450.99	55.97
Rib eye area (cm ²)	52.50	7.06	55.44	7.31	56.07	7.44	56.27	8.58
Rib thickness (cm)	6.65	0.66	7.46	0.80	7.66	0.85	7.71	0.87
Subcutaneous fat thickness (cm)	2.36	0.67	2.38	0.70	2.38	0.69	2.87	0.79
Yield estimate (%)	73.70	1.19	74.08	1.26	74.10	1.25	73.66	1.46
BMS	5.83	0.93	6.07	1.98	6.43	2.20	6.44	2.24
Fatty acid composition (%)								
C14: 0	2.16	0.47	2.64	0.65	2.75	0.58	2.67	0.59
C14: 1	0.98	0.24	0.89	0.35	0.93	0.24	0.88	0.30
C16: 0	23.61	3.07	24.35	3.27	27.38	2.36	26.94	2.06
C16: 1	4.42	0.69	2.75	0.71	3.79	0.64	3.91	0.78
C18: 0	10.55	1.64	19.43	3.45	10.73	1.39	11.50	1.66
C18: 1	53.32	3.50	48.00	5.20	51.90	3.31	51.71	2.93
C18: 2	2.07	0.44	1.95	0.47	2.52	0.58	2.31	0.78
MUFA	60.03	3.87	51.63	5.40	56.62	3.29	56.50	3.10
SFA	37.81	3.96	46.42	5.47	40.86	3.37	41.11	3.15

でに出荷された560個体の黒毛和種集団を供試した。これらは、平均と殺月齢±標準偏差は 29.10 ± 1.62 であった。と殺後に脂肪酸組成測定のため、腎周囲脂肪組織を採取した。

2.1.3 岐阜県黒毛和種集団 (JB3)

岐阜県内で飼養されている黒毛和種集団2,193頭から血統情報および環境情報を考慮して選抜した456頭を用いた。平均屠殺月齢±標準偏差は 28.32 ± 1.09 であった。と殺後に脂肪酸組成測定のため、胸最長筋の筋肉内脂肪を採取した。

2.1.4 現場後代検定牛集団 (JB4)

2002年から2012年に全国和牛登録協会により行われた現場後代検定で供された黒毛和種450頭を供試した。平均と殺月齢±標準偏差は 28.58 ± 1.35 であった。と殺後に脂肪酸組成測定のため胸最長筋の筋肉内脂肪を採取した。

2.2 脂肪酸組成測定

脂肪酸組成はクロロフォルム・メタノール法による定法に従い胸最長筋内脂肪もしくは腎周囲脂肪組織から脂肪酸を抽出し¹⁰⁾、メチル化後、ガスクロマトグラフ G-3000 (HITACHI, 東京) を用いて脂肪酸組成 (C14 : 0, C14 : 1, C16 : 0, C16 : 1, C18 : 0, C18 : 1, C18 : 2) を測定した。次いで脂肪酸組成から一価不飽和脂肪酸含有率 (MUFA), 飽和脂肪酸含有率 (SFA) を計算した。

2.3 遺伝子型判定

PLAG 1 遺伝子多型において、Karimら (2011) によって報告された牛の体高に関する QTN は PCR による增幅が困難であるため²⁾、黒毛和種において高い連鎖不平衡 ($r^2 = 0.998$) にあることが報告されているFJX_250879多型 (rs109231213) を遺伝子型判定に用いた³⁾。rs109231213について Karimらが行った方法 (2011) と同様の方法を用いて黒毛和種 4 集団に対して遺伝子型判定を行った²⁾。

2.4 統計解析

PLAG 1 遺伝子内多型 rs109231213 の枝肉形質および脂肪酸組成に対する効果を検証するために最小二乗法による分散分析 (ANOVA) を行った。さらに枝肉重量と C18 : 1 に関して遺伝子型による効果を詳細に調査するために Tukey-Kramer の honestly significant difference (HSD) 検定を行った。兵庫県黒毛和種集団では遺伝子型、性別、種雄牛、出荷年、出荷月、と殺月齢の効果を、宮崎県黒毛和種集団では遺伝子型、性別、種雄牛、と殺月齢の効果を、岐阜県黒毛和種集団では遺伝子型、と殺月齢の効果を、現場後代検定牛集団では遺伝子型、性別、年度、と殺月齢の効果を考慮した。また屠殺月齢に関して、1 次回帰および 2 次回帰として分散分析に加え、その効果を考慮した。

3. 結 果

本研究では、PLAG 1 遺伝子内多型 rs109231213 について黒毛和種 4 集団 (JB1, JB2, JB3, JB4) の遺伝子型判定を行った。q アリル頻度はそれぞれ 0.462, 0.329, 0.224, 0.236 であった。各集団における遺伝子型頻度、個体数および遺伝子頻度を Table 2 に示した。

PLAG 1 遺伝子内多型 rs109231213 の黒毛和種 4 集団における枝肉形質、脂肪酸組成に対する効果を検証するために、分散分析を行った (Table 3)。その結果、JB 1 では枝肉重量、ロース芯面積、BMS、C14 : 0, C16 : 0, C16 : 1, C18 : 0, C18 : 1, MAFA, SFA に対して、JB 2 では枝肉重量、ロース芯面積、皮下脂肪厚、推定歩留、C16 : 0, C18 : 0, C18 : 1, MUFA, SFA に対して、JB 3 では枝肉重量、ロース芯面積、C18 : 1, C18 : 2, MUFA に対して、JB 4 では、枝肉重量、ロース芯面積、バラ厚、BMS、C14 : 0, C18 : 0 に対して 5 % 水準で効果が認められた。

Table 2 Genotype and allele frequency of *PLAG1* gene polymorphism in four Japanese Black populations.

Population	N	Genotype frequency (n)			Allele frequency	
		QQ	Qq	qq	Q	q
JB 1	900	0.247 (222)	0.582 (524)	0.171 (154)	0.538	0.462
JB 2	560	0.471 (264)	0.400 (224)	0.129 (72)	0.671	0.329
JB 3	456	0.614 (280)	0.325 (148)	0.061 (28)	0.766	0.224
JB 4	450	0.587 (264)	0.356 (160)	0.058 (26)	0.764	0.236

Table 3 Significance test of the *PLAG1* polymorphism using ANOVA for carcass traits and fatty acid composition in four Japanese Black populations.

Trait	JB 1	JB 2	JB 3	JB 4
Carcass weight (kg)	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Rib eye area (cm ²)	<0.0001	<0.0001	0.0341	0.0029
Rib thickness (cm)	ns	ns	ns	0.0061
Subcutaneous fat thickness (cm)	ns	0.0027	ns	ns
Yield estimate (%)	ns	0.0405	ns	ns
BMS	0.0074	ns	ns	0.0081
Fatty acid composition (%)				
C14 : 0	0.0319	ns	ns	0.0380
C14 : 1	ns	ns	ns	ns
C16 : 0	<0.0001	0.0227	ns	ns
C16 : 1	<0.0001	ns	ns	ns
C18 : 0	<0.0001	0.0422	ns	0.0003
C18 : 1	<0.0001	0.0028	0.0429	ns
C18 : 2	ns	ns	0.0364	ns
MUFA	<0.0001	0.0013	0.0243	ns
SFA	<0.0001	0.0024	ns	ns

Table 4 Effect of *PLAG1* gene polymorphism on carcass weight and C18 : 1 in four Japanese Black populations.

	Carcass weight			C18 : 1		
	QQ	Qq	qq	QQ	Qq	qq
JB 1	392.57 ^a ± 5.16	383.36 ^b ± 4.91	361.81 ^c ± 5.51	52.62 ^a ± 0.44	53.53 ^b ± 0.42	54.24 ^c ± 0.47
JB 2	437.67 ^a ± 3.84	426.11 ^b ± 6.35	399.22 ^c ± 4.28	48.11 ^a ± 0.41	48.88ab ± 0.46	50.34 ^b ± 0.68
JB 3	453.1 ^a ± 2.42	439.15 ^b ± 3.33	413.78 ^c ± 7.76	51.59 ^a ± 0.20	52.32 ^a ± 0.27	52.69 ^a ± 0.63
JB 4	455.55 ^a ± 8.84	429.26 ^b ± 3.65	389.07 ^c ± 2.90	51.70 ^a ± 0.18	52.24 ^a ± 0.22	51.84 ^a ± 0.54

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

さらに枝肉重量およびC18:1に対して、遺伝子型間における効果を詳細に調査するためにTukey-KramerのHSD検定を行った（Table 4）。枝肉重量においてはQQ型がqq型に比べ最小二乗平均値がJB 1では30.76kg, JB 2では38.43kg, JB 3では39.35kg, JB 4では66.48kg有意に高い値を示した。また、C18:1においては、qq型がQQ型に比べ最小二乗平均値がJB 1では1.62%, JB 2では2.23%有意に高い値を示した。一方で、JB 3ではqq型のほうが高いC18:1を示す傾向があるものの、遺伝子型間での有意な差は認められなかった。

4. 考 察

本研究では、枝肉重量に関わるPLAG 1 遺伝子多型に着目し、複数の黒毛和種集団を用いて、PLAG 1 遺伝子と C18:1との関連について調査し、C18:1改良におけるDNAマーカーとしての有用性について検討した。

遺伝子型判定の結果、各集団内においてアリル頻度に極端な偏りは認められず、本研究で用いた黒毛和種4集団はこれまでに本多型に対して選抜の影響を強く受けていないことが示唆された。この結果は、これまでの黒毛和種の育種改良において枝肉重量に対して強い選抜が行われていないことを反映していると考えられる。

分散分析の結果、4集団ともに枝肉重量に関してはこれまでの報告と同様にきわめて高い有意性で関連が認められた（ $p < 0.0001$ ）。一方、C18:1に関しては、JB 4を除く3つの県集団において関連が認められた（ $p < 0.05$ ）。JB 4においてC18:1との関連が認められなかつた要因としては、JB 4は様々な県からの個体で構成される集団であり、PLAG 1 遺伝子多型と C18:1との関連の有無、関連の程度が各県によって異なることが要因であると考えられる。しかしながら本

研究で用いたJB 1-JB 3の県集団ではすべてにおいてC18:1との関連が認められたことから、その他の県集団においてもC18:1との関連が認められる可能性が比較的高いと考えられる。

Sasagoら（2016）は、黒毛和種において本PLAG 1 多型と C16:0との有意な関連を報告しているが、これはPLAG 1 遺伝子と連鎖不平衡にある他の遺伝子の影響によるものであると推察している⁸⁾。本研究において、集団によってC18:1に対する効果が異なっていたことからも、本PLAG 1 多型が脂肪酸組成に対する責任変異と連鎖不平衡の関係にあることが示唆される。すなわち、3つの県集団においてp値に差が認められたのは集団によって遺伝的構造が異なっており、原因変異との連鎖不平衡の程度に差があるためであると考えられる。例えばJB 3において5%有意水準を満たしてはいるもののJB 1とJB 2に比べ低い関連が認められたのは連鎖不平衡の程度が低いためだと考えられる。今後、原因変異が同定されれば各県におけるC18:1に対するより詳細な効果が確認され、DNAマーカーとしてのより有用性が高まる期待される。

Tukey-KramerのHSD検定では、枝肉重量においてはこれまでの報告どおり4集団でQQ型がqq型に比べて枝肉重量が有意に高い値を示した。一方C18:1についてはJB 1とJB 2においてqq型がQQ型に比べ有意に高い値を示した。JB 3においては有意差が認められなかつたものの、アリルの効果について同様の傾向を示した。今回調査した集団ではqアリル頻度が0.224～0.462と比較的低く、C18:1の増加に対して選抜に大きな余地があると考えられ、C18:1に対するDNAマーカーとして有用であることが示唆される。しかしながら、C18:1を増加させるqアリルは枝肉重量を低下させる効果を示していることからC18:1に対するDNAマーカーとして利用する際には、

枝肉重量に対する影響について配慮が必要であると考えられる。

本研究の結果、PLAG 1 遺伝子が 3 県の黒毛和種集団で C18 : 1 との関連が認められたことから、他の県集団においても関連が認められる可能性が示唆された。また、遺伝子型間で C18 : 1 に差が認められたことから、枝肉重量の低下に配慮が必要なもの、PLAG 1 遺伝子多型が黒毛和種の C18 : 1 改良における DNA マーカーの一つとして有用であることが示唆された。

5. 要 約

枝肉重量の原因遺伝子として報告されている PLAG 1 遺伝子について、複数の黒毛和種集団を用いてオレイン酸含有率（C18 : 1）に対する効果の有無を調査し、DNA マーカーとしての可能性を検討することを目的とした。対象集団として、兵庫県黒毛和種 900 頭、宮崎県黒毛和種 560 頭、岐阜県黒毛和種 456 頭、現場後代検定牛 450 頭を供試した。これら 4 集団において PLAG 1 多型の遺伝子型判定を行い、分散分析および Tukey-Kramer の HSD 検定によって、各集団における枝肉重量および C18 : 1 に対する効果を調査した。遺伝子型判定を行った結果、各集団での Q アリルの頻度は兵庫県集団で 0.538、宮崎県集団で 0.671、岐阜県集団で 0.776、現場後代検定牛集団で 0.764 であった。続いて分散分析を行ったところ、枝肉形質では 4 集団ともに有意な関連が認められた（ $p < 0.0001$ ）。また、C18 : 1 においては、現場後代検定牛集団を除く 3 集団で有意な関連が認められ、 p 値はそれぞれ、兵庫県集団で < 0.0001 、宮崎県集団で 0.0028、岐阜県集団で 0.043 となった。また Tukey-Kramer の HSD 検定では、qq 型が QQ 型に比べて C18 : 1 が兵庫県集団および宮崎県集団で高い値を示した。一方、岐阜県集団では遺伝子型間での有意差は認められなかった。以上の結

果から PLAG 1 遺伝子は、枝肉重量に対しての配慮は必要であるが黒毛和種において C18 : 1 に対する有用なマーカーとなり得ることが示唆された。

文 献

- 1) Voz, M. L., Agten, N. S., Van de Ven, W. J. M., Kas, K. : PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II, *Cancer Research*, **60**, 106~113, 2000.
- 2) Karim, L., Takeda, H., Lin, L., Druet, T., Aejas, J. A., Baurain, D., Cambisano, N., Davis, S. R., Farnir, F., Grisar, B., Harris, B. L., Keehan, M. D., Littlejohn, M. D., Spelman, R. J., Georges, M., Coppiepers, W. : Variants modulationg the expression of a chromosome domain encompassing PLAG1 influence bovine stature, *Nature Genetics*, **43**, 405~415, 2011.
- 3) Nishimura, S., Watanabe, T., Mizoshita, K., Tatsuda, K., Fujita, T., Watanabe, N., Sugimoto, Y., Takasuga, A. : Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the PLAG1-CHCHD7 QTN for stature in Japanese Black cattle, *BMC Genetics*, **13**, 40, 2012.
- 4) Hoshiba, H., Setoguchi, K., Watanabe, T., Kinoshita, A., Mizoshita, K., Sugimoto, Y., Takasuga, A. : Comparison of the effects explained by variations in the bovine PLAG1 and NCAPG genes on daily body weight gain, linear skeletal measurements and carcass traits in Japanese Black steers from a progeny testing program, *Animal Science Journal*, **84**, 529~534, 2013.
- 5) Takasuga, A. : PLAG1 and NCAPG-LCRL in livestock, *Animal Science Journal*, **87**, 159~167, 2016.
- 6) Kawaguchi, F., Kigoshi, H., Nakajima, A., Matsumoto, Y. : Pool-based genome-wide association study identified novel candidate regions on BTA9 and 14 for oleic acid percentage in Japanese Black cattle, *Animal Science Journal*, in press, 2018.
- 7) Kelly, M. J., Tume, R. K., Fortes, M., Thompson, J. M. : Whole-genome association study of fatty acid composition in a diverse range of beef cattle breeds, *American Society of Animal Science*, **92**, 1895~1901, 2014.
- 8) Sasago, N., Abe, T., Sakuma, H., Kojima, T., et al. : Genome-wide association study for carcass traits, fatty acid composition, chemical composition, sugar, and the effects of related candidate genes in Japanese Black cattle, *Animal Science Journal*, **88**, 33~44, 2016.
- 9) Kim, H. J., Aditi Sharma, Soo Hyun Lee, Doo Ho Lee, et al. : Genetic association of PLAG1, SCD,

CYP7B1 and FASN SNPs and their effects on carcass weight, intramuscular fat and fatty acid composition in Hanwoo steers (Korean cattle), Stichting International Foundation for Animal Genetics, doi : 10.1111/age.12523, 2016.

- 10) Folch, J., Lees, M., Stanley, GHS. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *The Journal of Biological Chemistry*, 226, 487~509, 1957.

地鶏の行動的ストレス反応性に関する遺伝的多型の探索

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

青谷大希
(秋田県畜産試験場)

Daiki Aoya
(Akita Prefectural Livestock Experiment Station)

In this study, whole-genome sequencing of bulked DNA samples was performed in order to discover candidate regions of behavioral stress response-related gene in slow-growing meat type chicken "Jidori". Blood samples and data of female Hinai-Jidori chickens previously tested behavioral stress response were used for this study. Based on the results of the behavioral test, individuals with high or low behavioral stress response were selected to prepare two virtual testing groups. For each group, DNA was extracted from blood samples of individuals, mixed in equal amount, and sequenced.

As a result of the sequence analysis, about 11,000,000 loci of variant were detected. From them, variants with high impact were selected for statistical analysis. The ratio of variant bases to total coverage depth was regarded as the frequency of variant in the group at each locus. By chi-squared test, 6,153 loci were detected as regions with significantly different frequencies of variant between two groups. Among these loci, 2,732 have been defined.

This research provided preliminary findings about behavioral stress response-related gene in Jidori. However further studies on the relationship between polymorphism and stress response and the effects of variants on gene expression and function are necessary.

1. 目的

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

現在、全国各地において、在来種や日本鶏を交配に利用した地鶏が生産されている。地鶏は日本農林規格等の飼養基準によって、平飼いや放し飼いにより飼養することとされており、鶏が自由に

運動できることから、歯ごたえのある締まった肉質が評価されている一方で、その育成過程においては圧死事故の発生が大きな問題となっている。

そこで申請研究者は、圧死事故の発生に関与すると考えられる行動的ストレス反応性に着目し、鶏における行動的ストレス反応性の品種間差や生産性との関連について調査した結果、比内地鶏の初生時における行動的ストレス反応性と、その後の発育や悪癖（つつき；feather pecking）の発

生との間に有意な関連があることを明らかにした。

初生時のストレス反応性には、遺伝的な要因が大きく影響していると推察されるため、育種改良への応用が期待されるが、改良効率を向上させるとともに、同様の問題を抱える全国各地の地鶏生産現場へ速やかに技術を普及するためには、鶏の行動的ストレス反応性に関する遺伝子を明らかにして、マーカーアシスト選抜を可能にする必要がある。しかしながら、現在のところこの分野に関する有力な知見は存在しない。

そこで本研究では、これまでに行動的ストレス反応性を調査した供試個体から採取した血液よりDNAを抽出して全ゲノムシークエンスを行い、参照配列に対する変異塩基の頻度を行動的ストレス反応性の異なる群間で比較することにより関連遺伝子を探索した。

2. 方 法

2.1 材料

平成27年6月から平成29年6月までの間に行動反応試験に供した、882羽の比内地鶏メスのデータと血液サンプルを用いた。

2.2 Tonic Immobility試験

行動的ストレス反応性を評価するための行動反応試験として、Tonic Immobility (TI緊張不動)¹⁾試験を用いた。ヒナを仰向けにして木製の台座に寝かせて胸部を軽く押さえ、ヒナが不動姿勢をとった時点で静かに手を放し、不動状態の持続時間、すなわちヒナが起き上がるまでの時間を、180秒を上限として測定した。なお、手を放してから5秒以内にヒナが起き上がった場合は、TIに誘導されなかったものとして、直ちに誘導操作を繰り返し、TIが誘導されるまでの試行回数を記録した。

2.3 調査群の作成

TI試験の結果から、行動的ストレス反応性の

異なる2つの仮想の調査群を作成した。TIへの誘導に複数回の試行を必要とし、かつ持続時間が短かった個体を抽出してTI Short群 ($n = 31$) とし、一度目の試行でTIに誘導され、かつ持続時間が180秒に到達した個体群をTI Long群 ($n = 30$) とした。両群のTI試験のスコアをFig. 1およびFig. 2に示す。

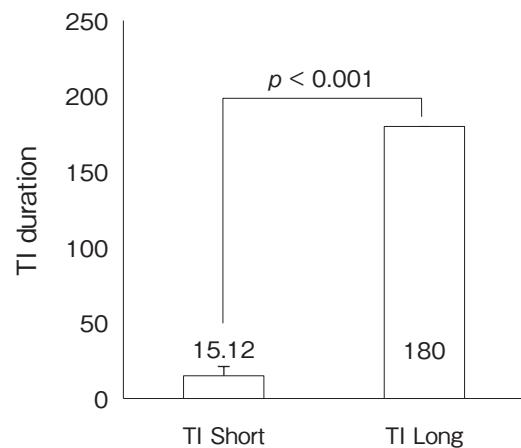


Fig. 1 Duration of Tonic immobility

Statistical analysis was performed by t-test by the null hypothesis described below.

$$H_0 : \mu_{\text{TI Short}} = 180$$

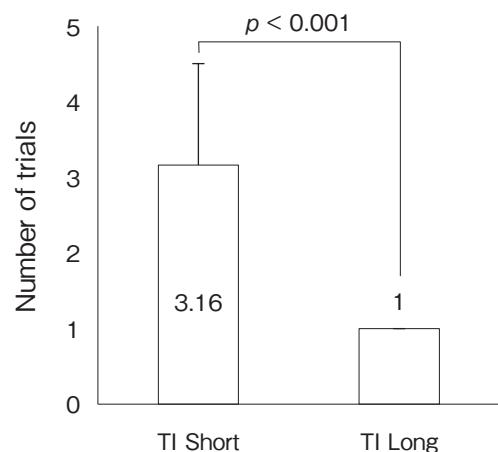


Fig. 2 The number of trials for TI induction

Statistical analysis was performed by t-test by the null hypothesis described below.

$$H_0 : \mu_{\text{TI Short}} = 1$$

2.4 DNAバルクサンプルの調製

調査群に選抜された各個体の血液サンプルから DNeasy Blood & Tissue Kit（キアゲン ヒルデン ドイツ）を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAサンプルの濃度を50ng/ μ lに調整した後、群ごとに等量ずつ混合しDNAバルクサンプルを調製した。

2.5 全ゲノムシークエンス

DNAバルクサンプルの全ゲノムシークエンスは、タカラバイオ株式会社に委託して実施した。サンプルは品質検定として濃度、純度および断片化の有無を確認した後、TruSeq DNA PCR-Free Library Prep Kit（イルミナ サンディエゴ アメリカ）を用いてシークエンスライブラリーを作製した。作製はTruSeq DNA PCR-Free Library Prep Reference Guideに沿って行われた。なお、本解析においては、2つのライブラリーを混合してシークエンシングしたため、アダプターはサンプルを選別するためのindex付きのものを用いた。作製したシークエンスライブラリーは品質検定後に混合され、シークエンス解析に供された。クラスター形成およびシークエンス解析に使用した機器はそれぞれ、cBot Cluster Generation System およびHiSeq X Five Sequencing System（ともにイルミナ）で、操作は両機器の標準プロトコルによった。

シークエンス解析により得られた塩基配列情報（リード）は、アダプターおよび低品質領域を除去したうえでセキショクヤケイのゲノム配列

(assembly名：Gallus_gallus-5.0 accession番号：GCF_000002315.4) を参照配列としてマッピングし、変異を検出した。変異の種類は一塩基置換、挿入変異および欠失変異とした。なお、リードのクリーニングにはTrimmomatic²⁾、マッピングにはBWA-MEM³⁾、変異の検出にはLoFreq⁴⁾ソフトウェアをそれぞれ用いた。

2.6 候補遺伝子の探索

検出された変異のうち、アノテーション結果より影響が大きいと予測されるもの、すなわち転写、スプライシングおよび翻訳の開始または終了に影響を与えるもの、ならびにアミノ酸配列あるいはタンパク質の構造に重篤な影響を与える可能性があるものを抽出し、両群における変異塩基の頻度を比較することにより候補遺伝子の探索を行った。両群における変異塩基の頻度は、当該部位における全冗長度に占める変異塩基の割合とし、カイ二乗検定により頻度の違いの有意性を検定した。

3. 結果と考察

各群においてシークエンス解析により検出された全変異の数ならびに影響度が大きいと予測された変異の数をTable 1に示す。これらの変異のうち、影響度が大きく、群間でその頻度が有意（ $p < 0.05$ ）に異なったものの数は6,153座位であった。このうち、すでに機能が明らかになっているものは同一遺伝子内の変異を含めて2,732座位であった。この中には、ストレス反応に関連する神

Table 1 The number of variants detected by whole-genome resequencing of bulked DNA sample.

	Type of variant			Variant with high impact
	SNP	Insertion	Deletion	
TI Short group	9,906,644	589,831	645,444	54,340
TI Long group	10,052,316	604,306	658,082	55,534

経伝達物質であるモノアミンや、自律神経に関連する神経伝達物質であるアセチルコリンの関連遺伝子が複数含まれていた。

本研究で用いた手法は、シークエンス解析における冗長度を利用して両群の変異頻度を仮定したものであり、これらの結果をもってストレス反応性の関連遺伝子であると結論付けることはできないが、これまでにヒトや他の動物種において報告^{5, 6)}されているストレス関連神経伝達物質の関連遺伝子が検出されたのは非常に意義深いことである。今後は候補領域について個体レベルの多型解析を行い、ストレス反応性との関連を解析するとともに、当該領域の変異が遺伝子の発現および機能にどのような影響をもたらすかを解析することで、地鶏の行動的ストレス反応性関連遺伝子の特定を目指す。

4. 要 約

地鶏の行動的ストレス反応性関連遺伝子の候補領域を探査するため、次世代シーケンサーによるDNAバルクサンプルの全ゲノムシークエンスを行った。比内地鶏のメスを用いて初生時に実施した行動反応試験の結果をもとに行動的ストレス反応性の異なる調査群を作成し、血液から抽出したDNAを群ごとに等量ずつ混ぜ合わせ、シークエンス解析に供した。

解析の結果、約11,000,000座位の変異が検出さ

れた。これらの中から影響度の高い変異を選び、各座位における、全冗長度に占める変異塩基の割合を群における変異の頻度であると仮定して、カイ二乗検定により群間で有意に頻度の異なる領域を調べたところ、6,153座位が検出された。このうち、機能が明らかとなっているものは2,732座位であった。今後は、個体レベルの多型とストレス反応性との関連解析や当該領域の変異が遺伝子の発現および機能にもたらす影響について調査を行う必要がある。

文 献

- 1) Jones, R. B.: The tonic immobility reaction of the domestic fowl: a review. *W Poultr Sci J.*, **42**, 82~96, 1986.
- 2) Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B.: Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, **30**, 2114~2120, 2014.
- 3) Li, H.: Aligning sequence reads, clone sequences and assembly contigs with BWA-MEM, 2013.
- 4) Wilm, A., et al.: LoFreq: A sequence-quality aware, ultra-sensitive variant caller for uncovering cell-population heterogeneity from high-throughput sequencing datasets. *Nucleic Acids Res.*, **40**, 11189~11201, 2012.
- 5) Lesch, K. P., et al.: Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region. *Science*, **274**, 1527~1531, 1996.
- 6) Brunner, H. G., Nelen, M., Breakefield, X. O., Ropers, H. H., van Oost, B. A.: Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science*, **262**, 578~580, 1993.

黒毛和種肥育牛の肥育状態を生体評価する 血中バイオマーカーの開発

Identification of microRNA biomarker candidates for assessment of
fattening Japanese Black cattle

松 橋 珠 子

(近畿大学先端技術総合研究所)

Tamako Matsuhashi

(Institute of Advanced Technology, Kindai University)

At present, the farmer has no way of knowing the fattening condition of cattle until they are shipped and slaughtered. If it is possible to identify the condition of cattle during the fattening period, efficient and stable production of high quality beef can be realized. In this study, we focused on microRNAs as a possible in vivo biomarker. Small RNA-seq with sera was conducted to construct noninvasive diagnostic technology (Liquid biopsy) to identify comprehensive blood microRNAs associated with carcass traits. Forty nine offspring of a specific bull were extracted from young steers which a farmer began fattening from 2009 to 2010. Blood samples were collected for the first time in the early stage of fattening at 12 to 15 months of age, and the second time at the middle stage of fattening at 18 to 21 months of age. In addition, individual information and carcass traits were collected. Six animals with high grade carcass traits and 6 animals with low grade carcass traits were selected from the surveyed group. MicroRNA was extracted from their serum and small RNA-seq was performed. As a result, it was shown that a sufficient amount of microRNA was extracted from 1 ml of bovine serum and it was possible to construct a library for small RNA-seq. Further analysis of results from small RNA-seq is expected to identify microRNAs involved in the formation of high-quality carcass traits of Japanese black cattle and to construct diagnostic techniques using fattening biomarker microRNAs reflecting the state of fattening.

1. 目 的

米国などとの二国間交渉（FTA）や新たな枠組みのTPPの発効が現実的になる中で外国産牛肉に負けない国産牛肉の生産体制を構築するために、高品質な和牛肉を安定的に生産できる新たな技術の開発が求められている。脂肪交雑に代表さ

れる黒毛和種の優れた産肉成績は個体の遺伝的能力と農家の飼養管理とによって生み出される。しかし多くの場合、農家は肥育牛を出荷するまで牛の出来具合（肥育状態）を知ることはできない。もし牛の肥育状態を肥育期間中に把握する事が可能になれば、農家は需要に適った肥育状態の牛を選択的に出荷したり、肥育状態に合わせて飼養

管理条件を修正することにより、高品質な牛肉を安定的に生産できるようになると期待される。

そこで申請者らは、牛の肥育状態を生体評価する肥育バイオマーカーを開発することを目的に、肥育牛の腎周囲白色脂肪組織やと畜時血液を用いた網羅的プロテオーム解析を実施し、枝肉形質と関連のみられた複数の肥育バイオマーカー候補タンパク質を報告してきた^{1~4)}。現在はこれらの成果を国内全域で実用化するため、遺伝的背景や飼養環境の異なる複数地域の協力を得て肥育期間中の牛から経時に採血を行い、肥育バイオマーカータンパク質群の効果検証と実用化へ向けたデータの整備を進めている。

さらに申請者らは牛の肥育状態を反映する、より有効な新たな生体指標を開発するため、血中に含まれるマイクロRNAに着目して研究を進めている。マイクロRNAは、ゲノム上の非コード領域から合成される比較的新しく見つかった短鎖RNAであり、共通配列を持つ複数の伝令RNA(mRNA)に結合してその発現を抑制制御する。特にがん研究ではがん細胞の種類によって特徴的なマイクロRNAが合成され細胞外に分泌されることから、新たな生体内バイオマーカーとして注目され、すでに一部はがんマーカーとして実用化されている。特に最近では一部のがんマーカーマイクロRNAが、エクソソームという細胞外分泌小胞に封入されるなどして血中や尿中に存在することが明らかとなり、体液や分泌液を活用した患者への負担が少ない非侵襲的診断技術(リキッドバイオプシー)としての可能性が大いに期待されている。申請者らはまず、Affymetrix社のジーンチップを用いたマイクロRNAマイクロアレイ解析によりと畜時血清の網羅的マイクロRNA探索を行い、枝肉成績と関連するマイクロRNAが血液中に存在することを明らかにした⁵⁾。しかし、肥育中の状態を把握するのであれば肥育期間中に

生体内で筋肉発育や脂肪交雑形成と関連を示すマイクロRNAを把握する必要がある。また、研究で用いたマイクロRNAマイクロアレイは、搭載されている牛マイクロRNAの種類が少ないうえ情報が外国品種に基づいていることから、脂肪交雑など黒毛和種に特徴的な枝肉形質に関連するマイクロRNAを十分検出できていない恐れがある。そこで本研究では、肥育期間中の牛から定期的に採血した血液を用いてRNAシークエンス法による網羅的解析を行い、黒毛和種の枝肉成績と関連する新規マイクロRNAを含む血中マイクロRNAの探索を行うことを目的とした。肥育状態を反映する肥育バイオマーカーマイクロRNAが特定できれば、さらに簡便な診断法を確立することで、将来的には肥育牛を生体評価し、最適な時期の出荷や飼養管理の改善を実現し、結果として高品質な牛肉の安定的かつ効率的な生産を実現できるようになると期待される。

2. 方 法

2.1 供試材料

2009年から2010年にかけて特定農家に導入された黒毛和種肥育牛から、特定種雄牛産子の去勢牛49頭を抽出し調査群とした。生後12~15ヶ月齢の肥育前期に1回目の採血、18~21ヶ月齢の肥育中期に2回目の採血を行い、併せてと畜時の枝肉格付成績および個体情報を収集した。調査した49頭から枝肉重量が400kg未満の個体および副産物の廃棄があった個体を除いた後、BMSナンバーおよびロース芯面積が調査群の平均から±0.5σより外れた個体を選抜し、枝肉格付成績上位群および下位群として血清を分離回収した。

2.2 エクソソーム内包型マイクロRNAの回収

miRCURY Exosome Isolation Kit-Serum and plasma (EXIQON) を用いて血清1mlからエクソソームを回収し、miRNeasy Micro Kit (QIAGEN)

を用いてエクソソーム内包型マイクロRNAを含むtotal RNAを抽出した。得られたtotal RNAはAgilent 2100 Bioanalyzer Systemを用いAgilent Small RNA Kit (Agilent)で、濃度と品質を確認した。

2.3 small RNA-seq用ライプラリの調整

抽出したtotal RNAは、NEBNext Multiplex Small RNA Sample Prep Set for Illumina Set 1 (New England Biolabs)を用い、付属のプロトコルに従ってライプラリ調整を行った。調整したライプラリはQIAQuick PCR Purification Kit (QIAGEN)で精製後、Agencourt AMPure XP Beads (BECKMAN COULTER)でサイズセレクションし、Agilent DNA 1000 Kit (Agilent)で濃度と品質の確認を行った。

2.4 small RNA-seq解析

作成したsmall RNAライプラリは、Illumina HiSeq2500によるsmall RNA-seq解析に供した。解析は、東京農業大学生物資源ゲノム解析センター生物資源ゲノム解析拠点事業による共同研究により実施した。

3. 結果と考察

3.1 牛血清からのエクソソーム内包型マイクロRNAの回収

肥育期間中に採血を行った調査群（49頭）、および枝肉成績上位群（6頭）そして下位群（6頭）として選抜された個体の採血時の月齢および枝肉形質値の基本統計量はTable 1のとおり。枝肉格付成績上位群と下位群との間で採血時の月齢およびと畜月齢には差がなかったが、枝肉重量、ロース芯面積、ばらの厚さ、歩留基準値、そしてBMSナンバーは、上位群の方が下位群より値が大きく成績が良かった。血清1mlからエクソソームを回収しマイクロRNAの抽出を行った結果、平均12.0ngのtotal RNAが回収された。Agilent 2100 Bioanalyzer Systemで測定を行った結果、回収されたtotal RNAは21nt前後のマイクロRNAを主とするsmall RNAが大部分を占めており、リボソームRNAやmRNAといった長鎖のRNAはほとんど含まれていなかった（Fig. 1）。このことから、今回採用した手法によって目的とするマイクロRNAが必要量回収できることが確認された。

3.2 small RNAライプラリの調整

次に、回収されたtotal RNAの1/4量から半量を用いてSmall RNAライプラリ調整を行った。

Table 1 Number of animals, average number and standard deviation of the surveyed age and carcass traits of the survey group, the low score group, and the high score group, respectively.

Traits	survey group	Low group	High group	P value
Number of animals	49	6	6	
1st blood sampling, months of age	13.5 ± 0.7	13.7 ± 0.6	13.4 ± 0.8	
2nd blood sampling, months of age	19.4 ± 0.7	19.7 ± 0.6	19.3 ± 0.8	
Slaughtered, months of age	28.7 ± 1.1	28.7 ± 1.3	28.5 ± 0.9	
Carcass weight, kg	442.8 ± 48.1	425.0 ± 22.2 ^b	502.3 ± 34.1 ^a	<0.001
Thoracic longissimus muscle area, cm ²	59.1 ± 9.4	52.7 ± 2.9 ^b	74.7 ± 8.1 ^a	<0.001
Rib thickness, cm	8.5 ± 0.9	8.2 ± 0.4 ^b	9.1 ± 0.5 ^a	<0.01
Subcutaneous fat thickness, cm	2.9 ± 0.7	3.0 ± 0.6	3.0 ± 0.6	
Estimated yield	74.6 ± 1.3	73.7 ± 0.7 ^b	76.2 ± 1.5 ^a	<0.01
B.M.S. rank	8.7 ± 1.8	6.0 ± 0.6 ^b	11.5 ± 0.8 ^a	<0.001

P values indicate the difference of the average value between the low score group and the high score group.

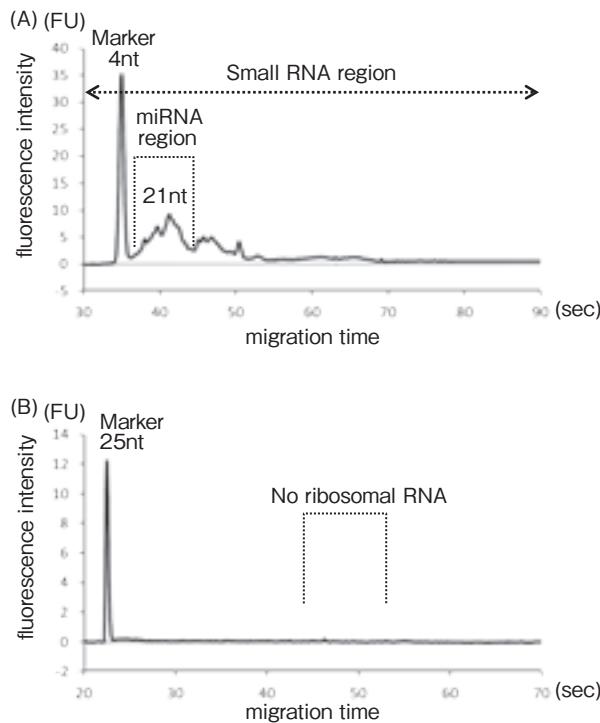


Fig. 1 Detection of exosome-encapsulated microRNA recovered from serum by Agilent 2100 Bioanalyzer.
 (A) Detection of small RNA by small RNA chip. (B) Detection of high molecular RNA by RNA 6000 Nano chip.

Agilent 2100 Bioanalyzer Systemで鎖長を確認したところ、次世代シーケンサーによるsmall RNA-seq解析に十分な量のライプラリが合成されていた。一方、一部のライプラリサンプルにおいてアダプターダイマーの生成と残留が確認された(Fig. 2 A)。ライプラリ半量からAgencourt AMPure XP Beadsを用いてアダプターダイマーの除去を試みたところ、ライプラリに含まれるアダプターダイマーの割合を半分以下に減らすことに成功した。しかし、多くのライプラリサンプルでアダプターダイマーを完全に除去するには至らなかった(Fig. 2 B, C)。今回採用したビーズを用いる方法では解析対象とするsmall RNAライプラリ(鎖長147nt前後)を大幅に失うことなくアダプターダイマー(鎖長126nt程度)だけを除去

することは困難と考えられた。サイズセレクション後のSmall RNAライプラリの量は平均200.8ngであった。

3.3 small RNA-seq

調整したsmall RNAライプラリは、共同研究機関である東京農業大学生物資源ゲノム解析センターでIllumina HiSeq2500を用いたsmall RNA-seqを実施した。その結果、のべ24,725Mbaseのデータが得られた。現在はシーケンス結果の解析を進めているところである。

3.4 今後の展開

今後は、得られたマイクロRNAデータの解析により、枝肉成績上位集団あるいは下位集団で特徴的な発現を示すマイクロRNAの選定を行う。さらに新たな検体を追加して選出されたマイクロ

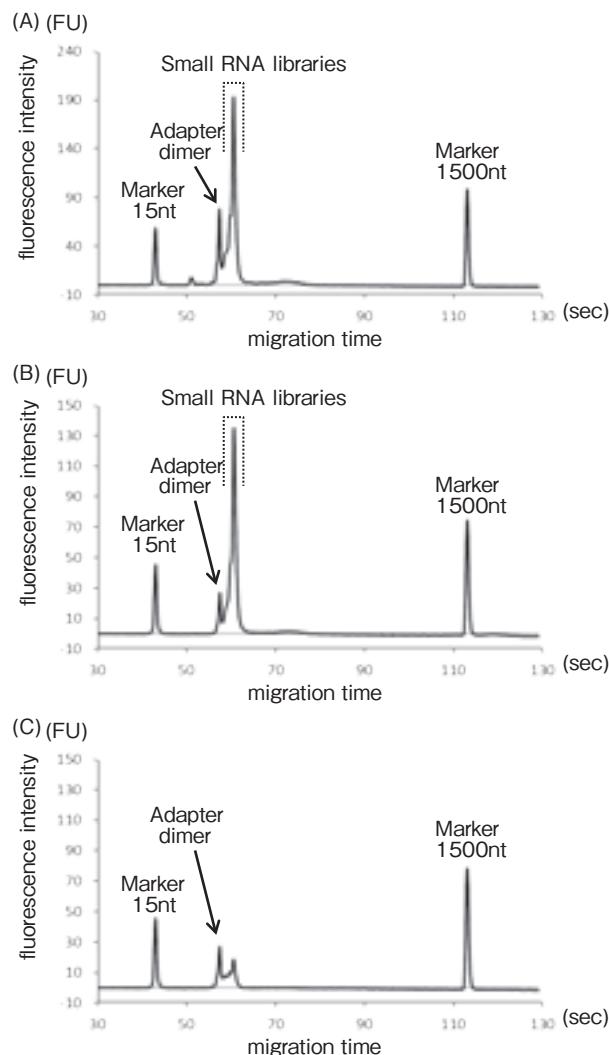


Fig. 2 Detection of synthesized small RNA libraries
 (A) Synthesized small RNA libraries before size selection with AMPure XP Beads. (B) Small RNA libraries after size selection with AMPure XP Beads. (C) Adapter-dimer removed by size selection

RNAの肥育バイオマーカーとしての有効性を検証するとともに、各マイクロRNAと肥育時期との関連解析を行い、選定されたマイクロRNAが特異的な発現を示す時期を特定する。また、TargetScan等の公共データベースを利用して標的遺伝子を推定し、脂肪交雑をはじめとする枝肉形質の形成における機能解析にもつなげていきたと考えている。

国内では黒毛和種の枝肉成績の向上は重要な研究課題だが、黒毛和種は日本固有の品種であることから、海外ではほとんど研究が行われていない。黒毛和種の肥育とマイクロRNAに関する研究として、飼養環境や骨格筋の種類とマイクロRNAとの関連を報告した研究がある^{6~8)}。しかし、肥育中の黒毛和種から枝肉形質、特に脂肪交雑と関連する血中マイクロRNAを同定した報告

はまだなく、枝肉形質と関連することが確認されたマイクロRNAを肥育バイオマーカーとし、牛におけるリキッドバイオプシー診断技術として実用化した例は他の品種でもまだ報告されていない。

4. 要 約

農家は肥育牛を出荷するまで牛の出来具合を知ることはできない。しかし、もし牛の肥育状態を肥育期間中に把握することが可能になれば、高品質な牛肉の効率的かつ安定的な生産が実現できる。そこで本研究では、新たな生体内バイオマーカーとして注目されているマイクロRNAに着目し、非侵襲的診断技術（リキッドバイオプシー）の構築が期待される血液を分析対象として、small RNA-seqを実施して枝肉形質と関連する血中マイクロRNAの網羅的同定を試みた。本研究の結果、牛血清1mlからでもマイクロRNAの抽出とsmall RNA-seq用のライブラリの構築が可能であることが示された。今後は得られたsmall RNA-seq解析を進めることにより、黒毛和種の高品質な枝肉形質の形成に関わるマイクロRNAの特定や、肥育状態を反映する肥育バイオマー

カーマイクロRNAを用いた診断技術の構築が期待される。

文 献

- 1) 池上春香, 松橋珠子, 永井宏平, 宮本圭, 大林賢伍, 坂口慎一, 松本和也: 関西畜産学会報, 175, 1~10, 2018.
- 2) 池上春香, 小林直彦, 松橋珠子, 武本淳史, 吉廣卓哉, 井上悦子, 加藤里恵, 加藤博己, 田口善智, 天野朋子, 森本康一, 中川優, 入谷明, 松本和也: 日本畜産学会報, 83 (3), 281~290, 2012.
- 3) 池上春香, 永井宏平, 松橋珠子, 小林直彦, 武本淳史, 吉廣卓哉, 井上悦子, 樋口智香, 守田昂太郎, 内堀翔, 天野朋子, 田口善智, 加藤博己, 入谷明, 松本和也: 日本畜産学会報, 86 (2), 141~152, 2015.
- 4) 永井宏平, 吉廣卓哉, 井上悦子, 池上春香, 園陽平, 川路英哉, 小林直彦, 松橋珠子, 大谷健, 森本康一, 中川優, 入谷明, 松本和也: 日本畜産学会報, 79 (4), 467~481, 2008.
- 5) 松橋珠子, 池上春香, 森本学, 永井宏平, 山口壯輝, 塚口智将, 樋口智香, 守田昂太郎, 宮本圭, 坂口慎一, 松本和也: 関西畜産学会報, 174, 38, 2017.
- 6) Muroya, S., Shibata, M., Hayashi, M., Oe, M., Ojima, K.: *PLoS One*, 11 (9), e0162496, 2016.
- 7) Muroya, S., Ogasawara, H., Hojito, M.: *PLoS One*, 10 (8), e0136475, 2015.
- 8) Muroya, S., Taniguchi, M., Shibata, M., Oe, M., Ojima, K., Nakajima, I., Chikuni, K.: *Journal of Animal Science*, 91 (1), 90~103, 2013.

選抜した黒毛和牛精子の受精能評価

Evaluation for capacitation of selected bull spermatozoa

飯田 弘・高橋秀之

(九州大学大学院農学研究院)

Hiroshi Iida and Hideyuki Takahashi

(Kyushu University, Faculty of Agriculture, Department of Zoology)

In order to improve the success rate of bovine artificial insemination, the quality evaluation method for frozen spermatozoa is essential. The purposes of this study are the evaluation of bovine spermatozoa sorted by a new "motile sperm collector" as well as development of the evaluation method for activated spermatozoa. This study especially focused on the effects of calyculin A (Phosphatase inhibitor) about immunolocalization of Phospho-Ser/Thr PKA substrate, protein phosphorylation, and motility of spermatozoa. After washing of freeze-thaw bovine spermatozoa, cells were cultured in IVF100 medium or BO medium.

Immunofluorescence microscopy was performed to examine the effects of calyculin A on spermatozoa cultured for 90 min in IVF100 medium in the absence or the presence of 100 nM calyculin A. In the absence of calyculin A, Phospho-Ser/Thr PKA substrate was detect at the post-acrosome, neck, and principal piece of flagella of spermatozoa. On the other hand, incubation with calyculin A brought about additional distinct immunostaining of Phospho-Ser/Thr PKA substrate at the annulus. Immunoblot analysis with the anti-Phospho-Ser/Thr PKA substrate antibody revealed that calyculin A promoted phosphorylation of 35kDa protein as well as de novo phosphorylation of 50 kDa and 75 kDa proteins in the insoluble fraction of spermatozoa. In the absence of calyculin A, large part of spermatozoa showed zigzag advancing motility, while most spermatozoa cultivated in the presence of calyculin A showed more straight advancing motility with reduced velocity. These data suggested that calyculin A promoted de novo protein phosphorylation in sperm flagella as well as subsequent modification of sperm motility.

1. 目的

我が国における牛の交配のほとんどは凍結精液を用いた人工授精で行われているが、受胎率はここ15年間で低下し続けている。我が国における牛人工授精における初回受胎率は、乳用牛で1989年

63%、2013年44%、肉用牛では1989年67%、2013年53%となっており、かなり低下している。受胎率低下による経済的損失は大きい。人工授精による受胎率の低下には雄雌双方の要因が関与していると考えられており、雄側からの要因解明の取り組みも必要である。肉用牛の黒毛和種は、繁殖雄

牛の飼育数の減少等によって子牛不足が常態化しており、受胎率の向上に向けた取り組みが急務である。優秀な遺伝形質をもつ種牛の一部では、精液性状が正常であるにもかかわらず実際には受胎率が低い場合がある。低受胎率を示す精液は、精子活力、生存率、精子濃度等の精液性状に基づく検査では発見することが困難な場合がある。実際に、種雄牛（黒毛和牛）の体外受精の研究において、受精率で5倍、胚発生率で4倍の相違が品種間にあることが報告されており¹⁾、種雄牛の精液の品質（精子の活性や受精能力）が受精に重大な影響を与えることが判明している。本研究の目的は、「新規運動性精子捕集器」（研究資料提供契約のため詳細は記載不可）を使用して良好な運動性を示す黒毛和牛の優良精子を選抜するとともに、種雄牛の精液の品質を分子マーカーを用いて検定する方法を確立することである。

精子は受精能獲得を経て卵との受精が可能になる。受精能獲得を経た精子は文字どおり受精能力があるが、鞭毛運動に関しては、受精能獲得の際に対称性を示す鞭毛の屈曲運動から、非対称性の力強い鞭毛運動（超活性化）へと変化すると考えられており、超活性化に至った精子の鞭毛では、多数のタンパク質のリン酸化が起きていることが報告されている。リン酸化を引き起こす細胞内シグナルとしてcAMP依存性プロテインキナーゼAの活性化がよく知られている。本研究では、凍結種雄牛精子を用いて、cAMP依存性プロテインキナーゼAの活性化、および超活性化を誘起すると報告されている calyculin A (phosphatase inhibitor)²⁾ に焦点をあて、分子マーカーの動態、タンパク質のリン酸化、精子の運動性を検討した。

我々はこれまで、ラット、マウス、牛等の動物の精子を用いて、テクチンタンパク質（TEKTs、精子の鞭毛および頭部の構成分子）の分子局在について研究を行ってきた。牛精子をcAMP +

calyculin Aで処理し活性化を誘起すると、TEKTIN3 (TEKT3) が後先体領域から赤道部へと移動することを報告した³⁾。赤道部は受精の際に卵形質膜と融合する部位であり、TEKT3が受精能獲得に関わっていることを示唆する。本研究は、活性化前の精子、活性化した精子について、分子マーカー (TEKT3, phospho-PKA substrate, PNA lectin) を用いて、選抜優良精子およびクルード精液精子を蛍光顕微鏡観察によって染色パターンを比較するとともに、ウェスタンプロットおよび精子運動性解析 (CASA) によってリン酸化タンパク質の動態と精子の運動活性を検討する。

2. 方 法

精子の培養：凍結精子を37°Cで30秒解凍し、BO培地⁴⁾にて2回洗浄した後、低吸着性ディッシュにて60~120分間CO₂インキュベーターにて培養した。培養には2種の培地（BO培地またはIVF100培地）を使用した。培養後精子を遠心によって回収し、免疫染色用には3%パラホルムアルデヒドにて精子を固定した後、抗体にて染色した。ウェスタンプロット用には、回収した精子をS-EDTA (10mM Tris, 1%SDS, 75mM NaCl, 24mM EDTA, pH7.6) によって可溶化し、上清とペレットに分けてSDS-PAGEにてタンパク質を分離し、PVDFメンブランに転写した。用いた培地の組成、薬剤、抗体等を下記に記す。

<培地>

BO 培地 : 112mM NaCl, 4mM KCl, 0.5mM MgCl₂, 0.8mM NaH₂PO₄, 10mM Hepes, 1.25mM pyruvate, 25mM NaHCO₃, 2mM CaCl₂, 0.01g/L phenol red, 1.8g/L glucose, 1.2g/L bovine serum albumin

IVF100培地 : BO培地を基礎培地として、ヘパリンナトリウム (176単位/mg) を7.5mg/L、カフェイン10mMを添加した培地。

<活性化試薬>

dbcAMP (N6, 20-O-Dibutyryladenosine 30,50-cyclic monophosphate sodium salt)

calyculin A (Wako Pure Chemical)

<染色に用いたマーカー>

FITC-PNA (EY Lab) : アクロゾーム形態の判定に使用

Hoechst (Sigma Chemical Co.) : 核染色用

anti-TEKT3 antibody : 精子の活性化に伴い移動する精子構成分子

anti-phospho-PKA substrate antibody (Cell Signaling Technology) : PKAによりリン酸化される分子。活性化により局在が変化するため、活性化の指標として有用。

3. 結果と考察**3.1 ソーティング効果の検証**

精子をBO培地で洗浄した後、「新規運動性精子捕集器」によって精子をソーティングし、その後精子を固定して、TEKT3抗体とPNA-FITC (アクロゾームの同定) にて染色し、ソーティングしていない精子と比較した。染色パターンをFig. 1 のようにA～Dの4パターンに分けた。パターン

AはTEKT3とPNAの染色パターンが正常で、パターンBではアクロゾームは正常であるがTEKT3の染色性が低い精子、パターンCは精子頭部の形状が異常を呈しTEKT3の染色も異常を呈する精子、パターンDはPNA染色 (アクロゾーム) が異常でかつTEKT3染色性が低い精子である。比較の結果、ソーティングした精子では、パターンAが92%以上あり、ソーティングしない場合にはパターンAは85.73%であった。よって、凍結精子をソーティングすると、より高品質の精子が得られることが判明した (Table 1)。

3.2 IVF100 で培養した精子における Phospho-Ser/Thr PKA substrateの局在 : calyculin Aの影響

<形態学的変化>

精子をBOで洗浄した後、IVF100およびIVF100 + calyculin Aで90分培養し、Phospho-Ser/Thr PKA substrate (Protein kinase Aによりリン酸化される基質分子) に対する抗体で精子を染色した。Fig. 2 とFig. 3 に示すとおり、IVF100培養精子では、 $64.1 \pm 4.75\%$ の精子においてpost-acrosome, neck, principal piece of flagellaが染色され (パターンIII)，IVF100 + calyculin Aでは、

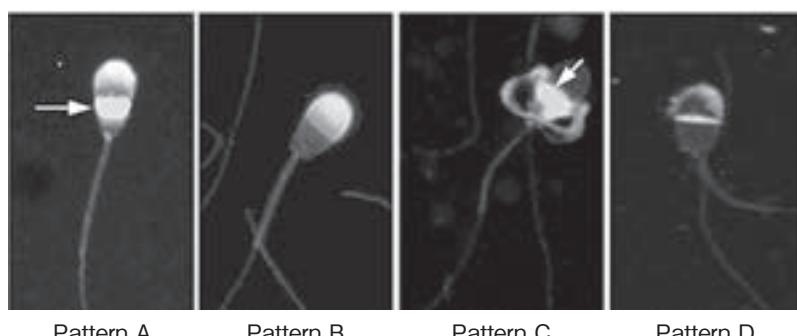


Fig. 1 Immunostaining patterns of sorted bovine spermatozoa. Spermatozoa sorted by "a novel motile sperm collector" were stained with the anti-TEKT3 antibody (red, arrows). Samples were counter-stained by PNA-FITC (green) to label acrosome. Spermatozoa were divided into four types by staining patterns (A, B, C, and D).

Table 1 Quantitative analysis of spermatozoa labeled by the anti-TEKT3 antibody and PNA-FITC.

Pattern	A (%)	B (%)	C (%)	D (%)
Sorted sperm A	93.63±3.65	1.80±1.56	2.55±2.17	2.03±1.14
Sorted sperm B	92.85±1.55	2.99±2.22	2.56±0.90	1.61±1.92
Non-sorted sperm	85.73±2.59	6.00±0.98	1.21±0.56	7.06±1.96

Staining patterns on spermatozoa are categorized into four types. A : normal staining for both TEKT3 and PNA, B : Normal staining of PNA without TEKT3 staining, C : Abnormal staining for both TEKT3 and PNA, D : abnormal staining of PNA without TEKT3 labeling. Average ± SD are shown (n=3)

Staining patterns	Pattern I	Pattern II	Pattern III	Pattern IV
IVF100				
IVF100 + calyculin A	6.23±1.16%	0.75±0.78%	64.1±4.75%	0.14±0.24%

Fig. 2 Quantitative analysis of staining patterns for Phospho-Ser/Thr PKA substrate on sperm head after 90 min incubation in the presence or absence of 100 nM calyculin A. Staining patterns were divided into four (I~IV) : pattern I : distinct labeling only at the subequatorial segment ; pattern II : distinct labeling at the postacrosome region ; pattern III : distinct labeling at the neck region (an arrowhead) ; pattern IV : distinct labeling at both the neck region (an arrowhead) and annulus (an arrow).

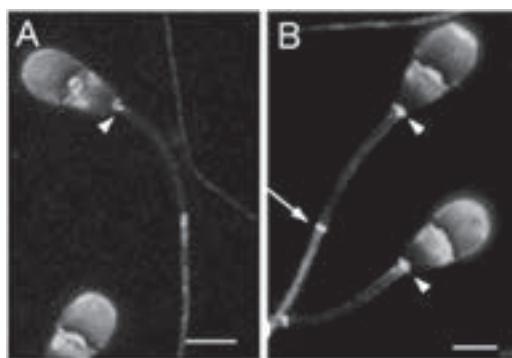


Fig. 3 Immunofluorescence microscopy demonstrating the localization of Phospho-Ser/Thr PKA substrate (red) in bovine spermatozoa incubated for 90 min in IVF100 medium in the absence (A) or presence (B) of 100 nM calyculin A. Immunostained spermatozoa were counter-stained by PNA-FITC (green) to label acrosome. Arrowheads and arrows indicate neck region and the annulus of spermatozoa, respectively. Bar : 5μm.

$73.01 \pm 4.61\%$ の精子において、さらにannulusが強く染色された(パターンIV)。つまり、calyculin A添加によって精子annulus部が新たに染色され(Fig. 3Bの矢印)、annulusにリン酸化タンパク質が蓄積することが判明した。IVF100にはヘパリンとカフェインが含まれているが、ヘパリン、カフェイン添加のみではannulus部のリン酸化は起きないことも判明した。annulus部には精子運動性に関わる多種のセプチニン分子の局在が報告されており⁵⁾、セプチニン分子のリン酸化が起きているかが今後の検討課題である。

<リン酸化タンパク質の変化>

牛凍結精子を融解した後、BO培地で2回洗浄した後、700g 7min遠心して回収し、BO培地、BO培地+dbcAMP、BO培地+dbcAMP+calyculin A添加条件下で2時間培養した。その後精子を回収し、S-EDTA bufferで処理後、可溶化分画と不溶

化分画(ペレット)に分けて電気泳動した。プロットをanti-Phospho Ser/Thr substrate antibodyにて染色し、リン酸化タンパク質を検出した。その結果、calyculin A処理によって、35kDタンパク質のリン酸化が増強され、50kDaと75kDaのタンパク質の新たなるリン酸化が観察された(Fig. 4)。同様な実験をIVF100、IVF100+calyculin A添加条件下でも行い、同様な結果を得た。これらの結果は、calyculin AはProtein kinase Aの基質となるPhospho Ser/Thr substrateのリン酸化を増強することを示唆する。

3.3 精子の運動性に与えるcalyculin Aの影響

牛精子(非凍結精子)をcAMP依存的にcalyculin Aで処理すると、超活性化(非対称的な鞭毛運動によるサーキュラーな精子の運動)が起き、それとともにタンパク質リン酸化も誘起されると報告されている²⁾。凍結精子を用いた我々

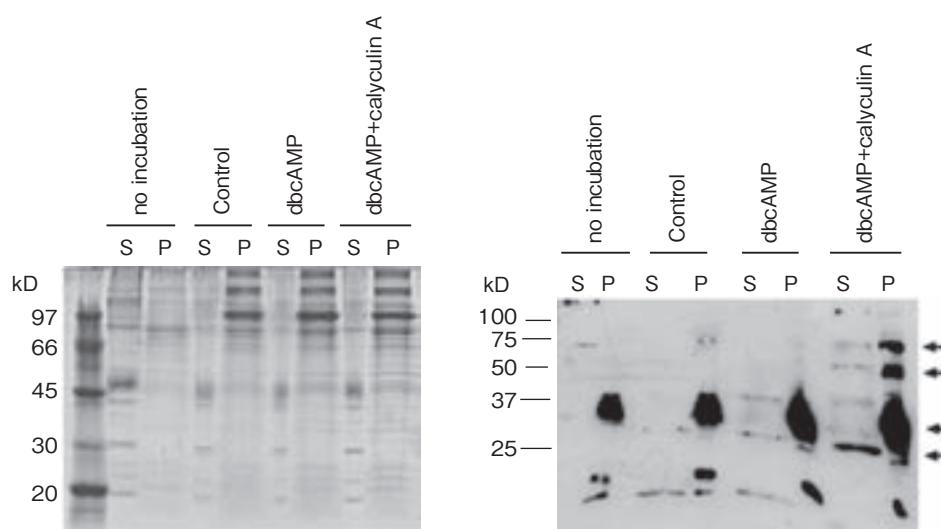


Fig. 4 Effects of 100 nM calyculin A on the phosphorylation of bovine sperm proteins. Spermatozoa were incubated in BO medium for 120 min without additive (Control), in the presence of 0.1mM dbcAMP, or 0.1mM dbcAMP + 100nM calyculin A. Spermatozoa without incubation were included as “no incubation”. After incubation, spermatozoa were dissolved in S-EDTA. Insoluble pellet (P) and soluble proteins (S) were separated by SDS-PAGE, and separated proteins were processed to either Coomassie brilliant blue staining (left panel) or to immunoblot analysis with the anti-Phospho-Ser/Thr PKA substrate antibody (right panel). Arrows indicate phosphorylated proteins. Molecular standards are shown on the left ($\text{Mr} \times 10^{-3}$).

のCASAによる観察では、一部の精子においてサーフィン運動が認められたが、多くはスムーズな直線的運動を示すものが多く、また速度も顕著に減少していた。精子の直線速度は、calyculin A非存在下では85~100μm/秒であったが、calyculin A存在下では速度が約1/2以下に低下した。また、頭部振動数(Hz)へのcalyculin Aの影響は認められなかったが、頭部振幅(μm)はcalyculin Aによって顕著に減少した。すなわち、calyculin A存在下では、精子は直線的で頭部の振り幅が少ない運動性を示す傾向があった。この結果については、多品種の精子を用いたさらなる検討が必要である。

4. 要 約

本研究の目的は「新規運動性精子捕集器」を使用して良好な運動性を示す黒毛和牛の優良精子を選抜するとともに、種雄牛の精液の品質を分子マーカーを用いて検定することである。「新規運動性精子捕集器」によるソーティングは、アクリル形態およびTEKT3染色性の観点から、精子の品質を高めることが分かった。また、培養精子に対するcalyculin Aの影響を形態学的、生化学的、および精子運動性の点から検討した。その結果、calyculin Aは、精子 annulus部への

Phospho-Ser/Thr PKA substrateの蓄積を促進するとともに、35kDタンパク質のリン酸化の増強および50kDaと75kDaのタンパク質の新たなりん酸化を引き起こすことが判明した。また、calyculin A存在下では、直線的で頭部の振り幅が少ない運動性を示す精子が増加する傾向にあった。

文 献

- 1) 岡田綾子、森本一隆、栗原昭宏：牛の体外受精技術一種雄牛による受精率および発生率の違い一、鳥取畜試研報、27、1~4、1998.
- 2) Mizuno, Y., Isono, A., Kojima, A., Arai, M. M., Noda, T., Sakase, M., Fukushima, M., Harayama, H. : Distinct segment-specific functions of calyculin A-sensitive protein phosphatases in the regulation of cAMP-triggered events in ejaculated bull spermatozoa, *Mol Reprod Dev*, 82, 232~250, 2015.
- 3) Tsukamoto, M., Hiyama, E., Hirotani, K., Gotoh, T., Inai, T., Iida, H. : Translocation of Tekton 3 to the Equatorial Segment of Heads in Bull Spermatozoa Exposed to Dibutyryl cAMP and Calyculin A, *Mol Reprod Dev*, 84, 30~43, 2017.
- 4) Brackett, B. G., Oliphant, G. : Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro, *Biol Reprod*, 12, 260~274, 1975.
- 5) Kuo, Y. C., Shen, Y. R., Chen, H. I., Lin, Y. H., Wang, Y. Y., Chen, Y. R., Wang, C. Y., Kuo, P. L. : SEPT12 orchestrates the formation of mammalian sperm annulus by organizing core octameric complexes with other SEPT proteins, *J Cell Sci*, 128, 923~934, 2015.

牛における卵管上皮細胞を用いた新規精子受精能獲得能評価法の開発および性選別精子の受精能獲得能機能評価

Novel method for evaluating capacitation ability of bovine sperm using oviductal epithelial cells and evaluation of sex sorted sperm function

柳川洋二郎・永野昌志

(北海道大学大学院獣医学院)

Yojiro Yanagawa and Masashi Nagano

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Recently sex-sorted sperm have widely used in the dairy and beef industry. However, the conception rate of them is usually low compare to those of conventional sperm. It is said that one of the reason for low fertility is due to short longevity inside the oviduct, but there is no methods to prove the hypothesis. Requirement for fertile sperm is binding ability to oviductal epithelial cells, capacitation ability and longevity to keep those abilities. The purpose of present study is to establish novel method for evaluating those factors using oviductal epithelial cells. Oviducts derived from slaughter house were divided into isthmus and ampulla. Epithelial cells were collected from both parts separately and incubated for 2 days. Isthmic epithelium was low in number of collection and ciliated cells after incubations. After 2 days incubations, epithelium was co-incubated with sperm for evaluating binding rate of sperm and detachment from epithelium using calcium ionophore. About 80% of sperm bind to epithelium but most of them were not specific binding to cilia. Also, they did not detach from epithelium by calcium ionophore. For further study, we need to improve the recovery rate of isthmic epithelium and incubation methods, and also may be another method for evaluation using molecule related to sperm-oviduct binding.

1. 目的

我が国の乳牛および肉牛はそのほとんどが凍結精液を用いた人工授精により生産されており、近年ではおよそ90%の確率で望む性別の産子を得ることができる性選別精液の利用が拡大している。性選別精液の活用によって、肉牛においては経済的価値の高い雄牛を効率的に作出できるほか、産肉能力の高い雌牛から後継雌牛を確実に獲得でき

るなど、食肉の生産に対する大きく寄与することが期待できる。しかし、人工授精受胎率の低下が問題視されている現在において性選別精液の受胎率(38-44%)は通常の凍結精液(55-60%)に比べて低く¹⁾、性選別精液による人工授精受胎率の向上が強く望まれている。販売されている性選別精液の機能評価としては、通常精液の評価と同様な精子生存性および運動性が検査されており、性選別精液についてもこれらの項目に問題が

ないとされている。しかし、実際は性選別精液を使用した人工授精については世界的に受胎率の低下が認められ、これは卵管内での生存時間が短いためであると推察されているが、既存の検査では精子の生存時間を評価する方法は確立されていない。

精子は精液の凍結融解の過程で傷害を受け、生存率および運動性の低下の他にも細胞膜および細胞小器官の形態的・機能的变化を起こす²⁾。さらに性選別精子については、精子を蛍光染色したのち雌雄の性染色体サイズの違いによるDNA量の差異をフローサイトメーターにより選別する過程においても傷害を受けていると考えられる。性選別精液を凍結せず、人工授精に用いる場合、精液作製後1日までの人工授精では受胎率が通常精液の場合とほぼ同程度であることが報告されている³⁾。そのため、性選別精液が凍結過程において受けた傷害は通常精液とは異なると考えられる。子宮内に注入された精子は、卵管峡部に到達し、卵管上皮細胞の線毛に付着して卵子が排卵・輸送されるまで待機している。この間、卵子侵入に関わる機能（受精能）を獲得し、卵子が卵管峡部に到達するまで生存性を保持していれば受精することができる。そのため、良質精子の条件として、卵管峡部における上皮細胞への付着能、受精能獲得能および生存性と受精能を維持する能力（寿命）が求められる。そこで本研究では培養卵管上皮細胞を用いて精子の雌生殖道内における卵管上皮付着能、受精能獲得能および寿命の評価法の新規開発を目的とした。

2. 方 法

2.1 卵管の採取

食肉検査場において、と殺後30分以内の雌牛より子宮、卵管および卵巣を採取した。それぞれの生殖器は切り離さず、そのまま氷上で保管し、研

究室へと運んだ。研究室到着後、生殖器より卵管を採取し、HBSSで洗浄した後、周囲の余分な組織を切除した。卵管を子宮側から卵巣側まで3つの領域に区分し、子宮側を卵管峡部、卵巣側を卵管膨大部と判定した。卵管峡部および卵管膨大部は、両端1cmを除去し、卵管1本につき3cm程度を各部位におけるサンプルとした。

2.2 卵管からの上皮細胞の回収

採取した卵管を切開し、メス刃を用いて表面を擦り、卵管上皮細胞を搔き取った。搔き取った細胞は10mlのHBSS中に懸濁した。HBSSに66IU/ml牛脾臓由来トリプシン（T9201, Sigma）および80IU/ml DNase Iを添加した後、スターラーで搅拌しながら36°Cで30分間反応させた。反応後、細胞浮遊液を70μmフィルターでろ過し、50mlの遠沈管に回収した。さらに細胞浮遊液を入れていた容器を2.5mlのDMEMで洗浄し、同様にフィルターでろ過した。ろ過後の細胞浮遊液は180×gで5分間遠心した。遠心後、上清を除去し、混入した赤血球の溶血処理のために、1mlの0.017M Tris-HCl（pH7.65）を加え、ピペッティングにより沈殿物を再懸濁した。懸濁後さらに4mlのTris-HClを加え、180×gで10分間遠心し、上清を除去した。その後、5mlのDMEMを用いて、沈殿した細胞を再懸濁し、180×gで10分間の遠心を行い、細胞を洗浄した。洗浄後、上清を除去し、10%FBS加DMEM/F12液で再懸濁した。

2.3 卵管上皮細胞の培養

細胞浮遊液の細胞数を、血球計算盤を用いて計数し、細胞数が $10 \times 10^5/\text{well}$ となるように、コラーゲンをコーティングした96wellプレートに播種した。プレートは37°C、5%CO₂環境下で2日間培養を行った。細胞の生存性は、播種直前にトリパンブルー染色により評価し、生存率が80%以上であったものを実験に供した。

2.4 凍結融解精液の処理

1頭のホルスタイン種由来（JP3H56094）の凍結精液を実験に供した。凍結精液は精液入りのストローを37°Cの温水中に40秒以上浸漬して融解した。融解した精液は1.5mlサンプルチューブに移し、DPBS（-）を1ml加えた後500×gで5分間遠心する洗浄の工程を2回くり返した。洗浄後の精子はDMEMで再懸濁し、精子浮遊液の精子濃度を血球計算盤により測定した。

2.5 実験計画

実験1. 卵管峡部および膨大部における上皮細胞回収効率、線毛および接着性の比較

卵管峡部および卵管膨大部それより卵管上皮細胞を採取し、回収細胞数、線毛の有無、wellの底面への細胞の接着性を比較した。実験は3回くり返した。

実験2. 精子の卵管上皮細胞への付着能および受精能獲得能評価試験

2日間培養した卵管峡部由來の上皮細胞を容れたwellに、精子数が 10×10^5 /wellとなるように精子浮遊液を添加し、37°C、5%CO₂で30分間のインキュベーションを行った。インキュベーション後、位相差倒立顕微鏡下でwell内を観察し、視野中の卵管上皮細胞へ付着している精子および浮遊している精子数を数え、精子の卵管上皮細胞への付着率を算出した。1回の実験で3視野観察し、実験は3回くり返した。また、付着精子の受精能獲得状況を調べるために、1μMのカルシウムイオノフォア A23187を添加し、卵管上皮細胞からの離脱状況を確認した。

2.6 統計解析

卵管峡部および卵管膨大部より採取した細胞の、卵管1本あたりの数はスチュードントのt検定により比較した。統計解析にはJMP Pro (13.1.0, SAS institute Japan, 東京) を用いp<0.05を有意とした。各データは平均値±標準偏差で示した。

3. 結 果

3.1 卵管峡部および膨大部における上皮細胞回収効率、線毛および接着性の比較

卵管1本あたりの細胞回収数は、卵管峡部が $4.2 \pm 1.1 \times 10^5$ 個（3.0–5.2×10⁵個）で、卵管膨大部が $82.3 \pm 8.0 \times 10^5$ 個（74.0–90.0×10⁵個）であり、卵管峡部の方が有意に少なかった。採取直後では、峡部、膨大部のいずれにおいても、活発な運動を示す線毛細胞が観察された。一方、培養2日目においては両者において線毛細胞数は減少し、特に峡部より採取した上皮細胞においては、膨大部由來の細胞と比較して線毛細胞はより少なかった。また、卵管峡部および膨大部由來の上皮細胞いずれにおいても、一部がwellの底に生着したが、完全に底面を覆うようなシート状には生育しなかった（Fig. 1）。

3.2 精子の卵管上皮細胞への付着能および受精能獲得能評価試験

卵管峡部由來上皮細胞と精子を30分間インキュベーションした後に卵管上皮細胞に付着していた精子は、 $81.2 \pm 5.1\%$ （76.8–86.8%）であった。しかし、精子は細胞自体に非特異的に付着してお

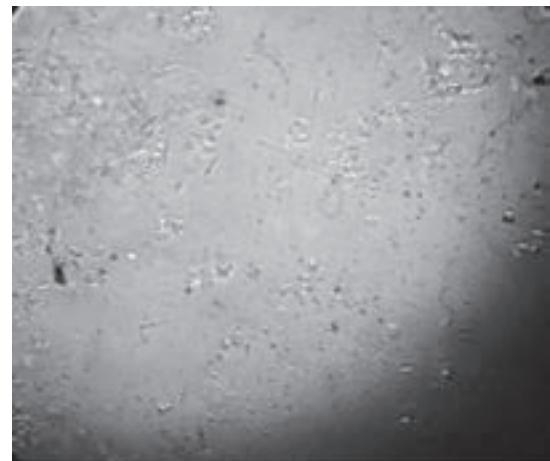


Fig. 1 Oviductal epithelial cell seeded to 96 well. Only some of the cell attached to the bottom of the well.

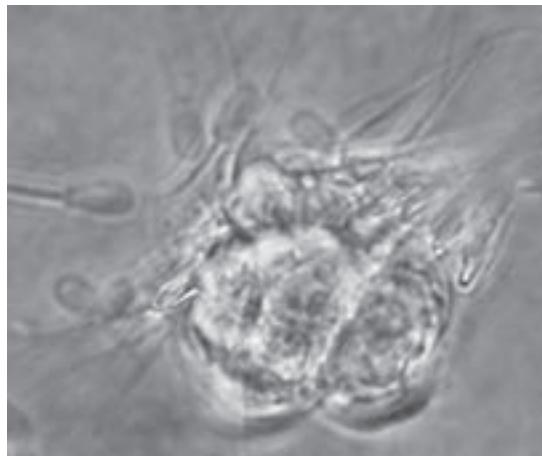


Fig. 2 Sperm binding to the isthmic epithelium not specific to cilia of the cell.

り、線毛への特異的付着は認められなかった (Fig. 2)。また、カルシウムイオノフォアを添加しても、精子は卵管上皮細胞から離脱せず、付着したままであった。

4. 考 察

本研究では卵管峡部および膨大部は同一の長さで採取したが、卵管膨大部の方が太いため管腔内の表面積は卵管膨大部の方が大きいことが推察される。この表面積の違いが卵管峡部における回収細胞数が膨大部に比べ有意に少なかったことの一因であると考えられた。また体外における卵管膨大部の上皮細胞の精子付着能は24時間以上維持されるのに対し、卵管峡部の上皮細胞は8時間程度しか機能を維持されないとされ、さらに卵管峡部の細胞は卵管膨大部の細胞と比べ脆弱で喪失が速いと報告されている⁴⁾。これらの卵管峡部の上皮細胞の特性により、本研究において回収細胞数が少なかったことおよび線毛細胞の消失が卵管膨大部の上皮細胞と比較して速かったと考えられた。精子が卵管峡部由来上皮細胞へ高い確率で結合したが、卵管の線毛細胞が消失したことおよび上皮細胞がシート状に生育せず線毛部以外が露出して

いることで線毛以外の部分に非特異的に結合しているため、精子正常の正確な評価を実施することは不可能である。また非特異的な結合が多かったことがカルシウムイオノフォア処理による離脱が誘導されなかつた要因であると考える。卵管上皮細胞がwellの底面に生着しない理由は明らかではなく、今後は培地や培養条件などを改善する必要がある。

精子は卵管峡部の上皮細胞からは受精能獲得のみで離脱できるが、卵管膨大部の上皮細胞からは受精能獲得のみならず授精直前に特有なハイパー・アクチベーション状態になることが必要であるということが分かっており、両上皮細胞の精子に対する結合能と役割は異なることが示唆されている⁴⁾。通常、精子は卵管峡部の上皮細胞と結合後、離脱し卵子と受精に至るため、本研究の目的である精子の性状評価のためには実際の結合箇所である卵管峡部の上皮細胞を使用した方法が必要である。しかし、卵管峡部から回収できる細胞数はとても少なく1本の卵管から採取された細胞で96wellプレートの1wellへの播種が限界である。国内の食肉処理場における処理頭数から考えると十分量の発情周期中の時期が適切な卵管を定期的に採取することは困難であると推察されるため、今後は卵管峡部由来上皮細胞の回収率の向上や機能維持に加え、卵管に発現する精子に結合するLewis Aなどの分子⁵⁾を利用した評価系の開発が必要であると考える。

5. 要 約

性選別精液の使用が拡大しているが通常精液と比較して受胎率が低いことが問題となっており、これは卵管内での生存時間が短いためであると推察されているが、既存の検査では精子の生存時間を評価する方法は確立されていない。良質精子の条件として、卵管峡部における上皮細胞への付着

能、受精能獲得能および生存性と受精能を維持する能力（寿命）が求められる。そこで本研究では培養卵管上皮細胞を用いて精子の雌生殖道内におけるこれらの能力を評価する方法を新規開発することを目的とした。食肉処理場より採取した卵管を卵管峡部と卵管膨大部に分け、それぞれから卵管上皮細胞を採取し2日間培養した。卵管峡部由来の上皮細胞は卵管膨大部由来の上皮細胞に比べ回収細胞数が少なく、また培養後の線毛細胞の数も少なくなっていた。2日間の培養後に精子を共培養し卵管上皮細胞への精子付着率およびカルシウムイオノフォアによる離脱について調査した。精子の80%は卵管上皮細胞に付着していたが、線毛以外の場所への非特異的な付着が目立ち、カル

シウムイオノフォア処理による離脱も観察されなかった。卵管上皮細胞の培養方法の改善とともに、精子と上皮細胞の結合に関わる分子を用いた評価系の開発も必要であると考えられた。

文 献

- 1) DeJarnette, J. M., Leach, M. A., Nebel, R. L., Marshall, C. E., McCleary, C. R., Moreno, J. F. : *J Dairy Sci*, 94, 3477~3483, 2011.
- 2) Watson, P. F. : *Anim Reprod Sci*, 60, 481~492, 2000.
- 3) Xu, Z. Z. : *J Dairy Sci*, 97, 7298~7304, 2014.
- 4) Ardon, F., Markello, R. D., Hu, L., Deutsch, Z. I., Tung, C. K., Wu, M., Suarez, S. S. : *Biol Reprod*, 95, 1~7, 2016.
- 5) Suarez, S. S., Revah, I., Lo, M., Kölle, S. : *Biol Reprod*, 59, 39~44, 1998.

長期不受胎牛の受胎率向上に向けた単為発生胚移植 の効果

The effect of bovine parthenogenesis embryo transfer to previously artificially inseminated cows

白砂孔明・岩田尚孝・浜野晴三*・柳沼日佳里*

(東京農業大学農学部畜産学科, *家畜改良事業団家畜バイテクセンター)

Koumei Shirasuna, Hisataka Iwata, Seizo Hamano* and Hikari Yaginuma*

(Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture, Department of Animal Science,

*Livestock Improvement Association of Japan, Inc.)

Repeat breeding is a major problem in the dairy industry all over the world, with an incidence ranging from 15% to 20% of lactating animals in Japan. Repeat breeder cows are described as subfertile animals without any anatomical or infectious abnormalities that do not become pregnant until after the third or later breeding attempt, or that remain infertile after numerous services.

Importantly, we and other groups reported that transfer of embryo, which derived in vitro fertilization (IVF), on Days 7 to 9 after estrus to previously artificial insemination (AI) in repeat breeding cows clearly improved pregnancy rate. However, using this technique, the reason why the conception rate improves is unknown and the problem of high twin risk is left. In the present study, we hypothesized that transfer of parthenogenesis (PA) embryos could be an alternative tools to fertilized embryo transfer for improvement of pregnancy rate in repeat breeding cows. Before using of PA embryos in vivo, we confirmed mRNA expression of interferon tau (IFNT), a pregnancy recognition factor in ruminants, in PA embryos, suggesting that PA embryos produce IFNT. At blastocyst stage both before freezing and after thawing, the levels of IFNT mRNA was higher in PA than in IVF embryos. In vivo transfer experiment, we confirmed that the transfer of PA embryos did not become a conceptus product in cows. Plasma progesterone concentrations were significantly higher in PA embryo transfer to previously AI compared with AI alone. Also, we investigated mRNA expression of Mx2, one of interferon-stimulated genes as a maker of IFNT signal, in peripheral blood leukocytes. Transfer of PA embryo alone did not increased Mx2 mRNA. In pregnant cows, Mx2 mRNA expression was significantly increased in PA embryo transfer to previously AI compared with AI alone. These results suggests that ET to previously AI is available as a reproductive assistance technology and PA embryo could became a therapeutic tool of pregnancy in repeat breeding cows.

1. 目的

近年、我が国の酪農家戸数および乳牛飼養頭数は減少を続ける現状に加え、乳牛の繁殖成績の低下が深刻な問題となっている。その問題が解決できないことには、生乳生産量の不足や乳用後継牛の確保が危惧されることに至ると考えられる。さらに、長期不受胎牛が増加しており、繁殖経費の増大や空胎期間の延長、ひいては更新による生乳生産の機会の喪失など、酪農経営に及ぼす打撃は直接的である。

長期不受胎牛の中には、疾病による繁殖不良の雌と生殖器および発情周期の異常がないにも関わらず3回以上的人工授精で受胎しないリピートブリーダーとに大別されるが、後者は全乳用牛飼養頭数の15—20%も存在していると推定されている¹⁾。

一方、乳用種雌牛は性選別精液で純粋交配を行い後継牛の効率的な確保のみならず、胚移植による和牛生産や黒毛和種精液を人工授精する交雑種（F1）生産のための資源としての重要性が増している。

これら、長期不受胎牛への対処方法の確立は、我が国畜産業の抱える喫緊の課題である。

最近、リピートブリーダーに対し人工授精後7～8日に受精卵移植を行う“追い移植”により受胎効果が見られ、リピートブリーダーに対する実用的な繁殖対策になり得ることが考えられている^{1,2)}。追い移植の実施によって妊娠成立に至る機序は不明であるが、追い移植由来の胚から生産されるインターフェロンタウ（IFNT：胚から產生される妊娠認識物質³⁾）が積極的に妊娠成立へ関与することが予想される。一方、追い移植では子宫内に人工授精および受精卵移植由來の2つの胚が共存する可能性が想定され、双子発生による分娩事故の発生の可能性が否定できない。

そこで申請者らは、IFNTを產生するとされる単為発生胚（PA胚）を追い移植することにより、受精卵を用いた追い移植効果を代替でき、双子発生を防ぐ新たな追い移植技術の開発に繋がるのでないかと考えた。PA胚とは、卵子が精子と受精することなく雌の遺伝子のみで発生した胚のことであり、薬剤で卵子を活性化するだけで作製が可能であるため体外受精のコスト削減なども可能である。しかし、PA胚追い移植の受胎性向上効果の有無や安全性などは不明である。

本研究では、利用用途のないF1卵子を用いたPA胚を追い移植に用いることを追求し、双子受胎によるリスク回避手法の開発や基礎的知見を得ることを目的とし、①PA胚のIFNT產生能力、②PA胚を追い移植することでAI由来胚の受胎や妊娠維持に悪影響はないのか、③PA胚移植にはIFNTを補充する効果があるのか、の3点を検討した。

2. 方 法

2.1 実験1

2.1.1 牛体外受精胚卵ならびにPA胚の作製
牛未成熟卵子を卵巣の卵胞から吸引採取し、TCM199 + 5 % FBS添加培地（基礎培地）中で22～24時間の成熟培養を行い、成熟卵子とした。次いで、以下の方法により体外受精ならびに単為発生処理を行った。

体外受精は、既報に基づき行った⁴⁾。

単為発生処理は、成熟卵子の裸化処理を施し、7 % エタノール添加PBS (+) 中に1分間浸漬し、次いでシクロヘキシミド（10μg/ml）およびサイトカラシンB（5 μg/ml）添加基礎培地中で5～6時間培養した。

体外受精胚（以下、IVF胚）ならびに単為発生処理胚は、ともに基礎培地中で卵丘細胞との共培養を7～8日間行い、胚盤胞までの発生を促し

た。培養終了後、遺伝子発現解析のために胚を回収した。

2.1.2 凍結保存

作製した胚盤胞期のIVF胚ならびにPA胚の凍結保存は、以下の方法で行った。すなわち、修正TCM-199 + 20% 子牛血清を基礎培地とし、10%グリセロール + 0.25M シュクロース添加基礎培地(凍結培地) 中でグリセリン平衡を行い、凍結培地とともに0.25mlストローに胚を吸引、封入した。次いで-6℃に設定したプログラムフリーザーにストローを導入し、植氷後-0.33℃／分で-25℃まで緩慢冷却し、液体窒素中にストローを投入して凍結保存した。

凍結前および融解後の胚からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いてIFNT mRNA発現を解析した。

2.1.3 培養上清の回収

IVF胚ならびにPA胚の発生培養を終えた後、それぞれの培養液を回収し、-20℃で保存した。

2.2 実験2

免疫細胞の単離のために雌牛の脾臓を用いた。脾臓組織約100 g を切り出し、0.25%ヘパリン-PBSを加えながら懸濁し、懸濁液を70μmフィルターで濾過して遠心処理を行った。次いで上清を除去し、溶血させるためにACK Lysing Buffer 3mLを加え10分間静置後、再び0.25%ヘパリン-PBSを添加して遠心処理を行った。さらに上清を除去し、0.25%ヘパリン-PBSで洗浄し、免疫細胞を単離した。

免疫細胞の培養には、抗生物質と5%FBS添加のRPMI-1640を基礎培地として用いた。免疫細胞は、 1×10^7 cell/wellの濃度で48wellプレートに播種した。IVF胚およびPA胚が免疫細胞に及ぼす影響を検討するため、回収した培養上清(Condition medium) を免疫細胞培養液中に添加して6ならびに24時間培養し、培養液を除去して

遺伝子発現解析のために細胞を回収した。

2.3 実験3

東京農業大学付属農場の黒毛和種雌牛を使用し、①AI単独区(n=6)、②PA胚移植区(n=4)ならびに③AI+PA胚移植区(n=15)を設定した。

発情日をDay 0とし、AIをDay 1に、PA胚移植(非黄体側子宮角に移植)をDay 7に実施した。Day7, Day14, Day21およびDay28に継時に採血を行い、血漿中プロジェステロン(P4)濃度をEIA法で測定した。また、末梢血白血球からRNAを抽出し、リアルタイムPCR法を用いてIFNT応答遺伝子であるMx2 mRNA発現を解析した。発情周期が回帰しない個体は、Day40において超音波画像診断装置で子宮内を観察し、胚の有無を検証することで妊娠鑑定を行った。

3. 結果と考察

3.1 PA胚のIFNT産生能力の検討

IVF胚およびPA胚を作製し、凍結前および凍結後における胚のIFNT mRNA発現量をリアルタイムPCR法で測定した(Fig. 1)。

凍結前では、IVF胚よりPA胚でIFNT mRNA発現量が3倍程度高かった。凍結後は凍結前よりもIFNT mRNA発現量が低下したが、凍結前と同様にIVF胚よりもPA胚でIFNT mRNA発現量が高かった。

PA胚はIVF胚と同等以上のIFNT産生能力を有することが報告されていることから⁵⁾、PA胚は効率的にIFNTを産生するツールである可能性が考えられた。

胚から產生されたIFNTは子宮内で働くだけではなく、子宮静脈から全身に放出され、免疫細胞や黄体組織など様々な細胞・組織に影響を及ぼす。本研究で作製したPA胚がIFNTを产生し、その他の細胞に影響を及ぼすことが可能であるかを

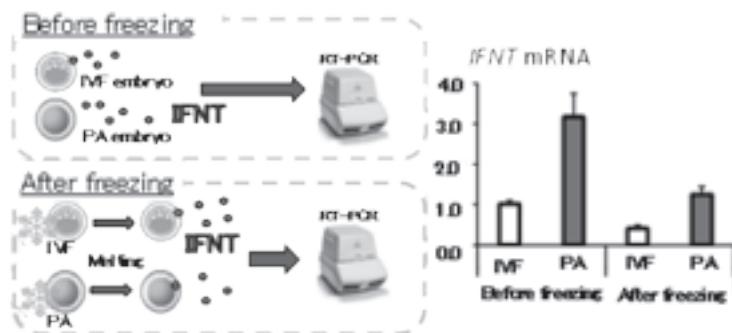


Fig. 1 IFNT mRNA expression in IVF- or PA-derived embryos.

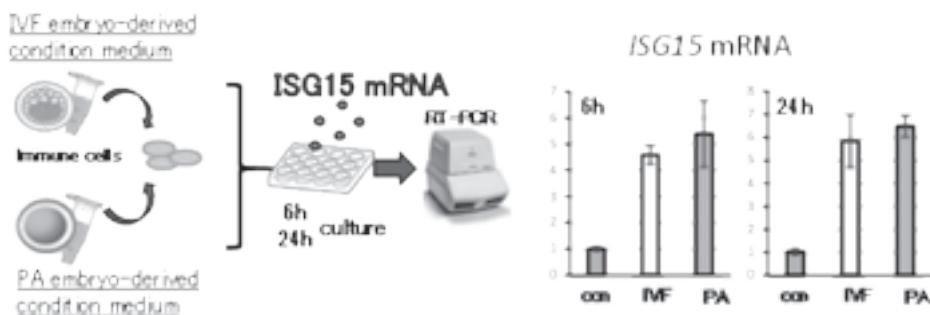


Fig. 2 ISG15 mRNA expression in bovine spleen cells at 6 and 24 h after treatment of IVF- or PA-embryo derived condition medium.

検討した (Fig. 2)。IVF胚およびPA胚の培養液を免疫細胞に添加し、6 および24時間後のISG15 mRNA発現量を検証した。一般的に、IFNTを含むI型IFNは細胞膜の受容体に結合し、ISG15やMx 2などのIFN応答遺伝子の発現を刺激するところから、ISG15やMx 2はIFN応答の指標と考えることが可能である。本実験において、どちらの培養液を添加しても対照区よりもISG15 mRNA発現量が増加した。このことから、IVF胚およびPA胚の培養液中にはIFNTが分泌され、そのIFNTは免疫細胞への応答性を有することが明らかになった。

IFNTは“異物”である受胎産物が母体から拒絶されないよう、母体の免疫細胞に作用することで「妊娠免疫寛容」を誘導する可能性が提案され

ている。PA胚から産生されたIFNTも同様に、免疫細胞の機能変化を誘導できる可能性が考えられた。

3.2 A胚移植後の血中P4濃度の測定

Day40において受胎が確認された個体は、①AI単独区で4頭 ($n = 6$)、②PA胚移植区で0頭 ($n = 4$)、③AI+PA胚移植区で9頭 ($n = 15$)であった。①と③の受胎率に有意な差は見られなかった。

PA胚移植区では、発情周期の延長効果が見られたものの超音波画像診断による受胎産物は確認されなかった。

AI+PA胚移植区で受胎が確認された牛は、全頭で妊娠が継続し分娩に至った。また、難産などは見られず、子牛も順調に成長をしていることを

確認した。Hirayamaらは⁶⁾、Code 3 の受精卵とPA胚（3個）を共移植すると、Day40の時点では妊娠率が上昇したが、Day90においては逆に流産した個体が増加したと報告している。今回実施したAI+PA胚移植区の受胎率は60%であり、妊娠150日～210日までの時点で流産を起こした個体はいなかった。今回の研究結果と直接の比較は条件が異なるために困難ではあるが、1個のPA胚を追い移植で用いたことから子宮内で過剰な炎症応答やそれに続く流産が起きず、PA胚の移植に対する安全性では問題がないと判断することができた。

血中P4濃度の推移をTable 1に示した。Day21における血中P4濃度は、AI+PA胚移植区の不受胎よりも受胎した牛において有意に高かった。Day28では、AI+PA胚移植の不受胎およびPA胚移植区の血中P4濃度は2 ng/mL以下まで低下した。AI+PA胚移植区の受胎およびAI受胎区ではDay28においても高い血中P4濃度を維持したが、AI+PA胚移植の受胎区で有意に高い値だった。

Day21およびDay28においても同様に、PA胚追い移植で受胎した区でAI受胎区よりも高いP4濃度を維持したことから、AI由来およびPA由来の胚が共存した場合には、何らかの方法で黄体機能（P4分泌）が刺激される機構が存在する可能性があると考えられる。PA胚を追い移植したP4刺激効果の候補因子としてはIFNTが想定されるが、in vitroの実験においてIFNTは直接的に

は黄体からのP4分泌を刺激しないことが分かれている⁷⁾。1つの可能性として、黄体機能維持や妊娠認識に重要なプロスタグランジン（PG）E2が考えられる⁸⁾。実際に、IFNTはPGE2産生を子宮内で増加させ、PGE2は黄体細胞のP4合成を刺激する作用を持つ⁹⁾ことから、IFNTで誘導されたPGE2がオートクライン因子として黄体に作用し、P4合成・分泌を刺激した可能性が考えられる。また興味深いことに、長期不受胎牛では子宮内膜上皮細胞中のPGE2合成酵素の遺伝子発現量が少なく、黄体を維持するPGE2の合成が少ないので早期胚死滅が起こると報告されている¹⁰⁾。AI+PAにおいてP4濃度が上昇したことから、長期不受胎牛で合成が少ないとされているPGE2を上昇させることで妊娠成立を向上させる可能性が期待される。しかし、今回実験で使用したのは長期不受胎ではない正常な黒毛和種雌牛であるため、今後は長期不受胎と判断されたホルスタイン種雌牛を用いて、より詳細な検討を実施する必要がある。

3.3 末梢血白血球におけるIFNT応答遺伝子・Mx2 mRNA発現変動の検討

末梢血白血球中のMx2 mRNA発現量の推移をFig.3に示した。

AI単独区で受胎した牛では、Day21でMx2 mRNA発現が増加したが、不受胎の牛（data not shown）では変化は見られなかった。PA胚移植区では、Mx2 mRNA発現はほとんど変動しなかつた。AI+PA胚移植区の不受胎の牛では、Day7

Table 1 Plasma P4 concentrations at Days 7, 14, 21, and 28 after AI

Plasma P4 (ng/ml)	Day 7	Day 14	Day 21	Day 28
AI : Pregnancy	1.5±0.5	3.6±0.6	4.7±0.7 ^{a, b}	4.1±0.7 ^b
PA : Non pregnancy	2.0±0.5	3.4±0.6	1.3±0.6 ^c	1.8±0.5 ^c
AI+PA : Pregnancy	2.6±0.4	6.7±0.4	6.5±1.1 ^a	7.2±1.1 ^a
AI+PA : Non pregnancy	1.8±0.3	5.5±1.1	3.7±0.6 ^b	1.8±0.6 ^c

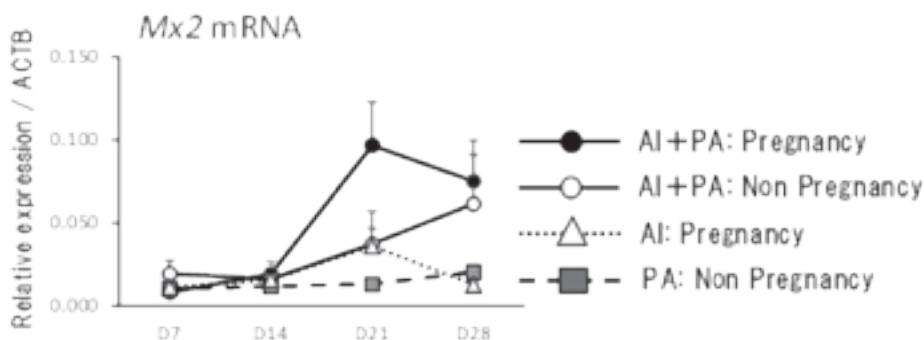


Fig. 3 Mx2 mRNA expression in bovine blood immune cells.

からDay28にかけてMx2 mRNA発現が徐々に増加した。一方、AI+PA胚移植区で受胎した牛のMx2 mRNA発現はDay21で大きく増加した。AI+PA胚移植区の受胎した牛のMx2 mRNA発現は、その他の実験区と比較し、Day21で約3倍以上高かった。

反芻家畜の妊娠認識時期において、子宮から放出されたIFNTは、生体の様々な組織や細胞（肝臓・乳腺・黄体・末梢血白血球）においてIFN応答遺伝子の発現を刺激することが報告されている^{11～14}。また、過去の報告において、PA胚はIFNTを產生し、母体末梢血白血球のIFN応答遺伝子mRNA発現を上昇させることが分かっている⁶。

今回の解析では、Mx2 mRNA発現はAI受胎区よりもPA胚を追い移植した受胎区が高い値で推移した。つまり、AI由来胚と共同して、PA胚由来で分泌されたIFNTが相加的にMx2 mRNA発現を刺激した可能性がある。PA胚のIFNT产生量やMx2 mRNAの刺激機構など、今後の詳細な検討が必要である。

以上の結果から、PA胚を移植しても産子にはならず、AI由来胚の妊娠に悪影響を及ぼす可能性が低いことが明らかとなった。また、AI後に

PA胚を追い移植することでPA胚由来のIFNT補充効果が得られることが明らかとなった。

今後、リピートブリーダーを用いてPA胚追い移植を実施することで、PA胚を追い移植することによる受胎性向上効果があるのか、その分子メカニズムを解明する必要がある。

参考文献

- 1) Dochi, O., Takahashi, K., Hirai, T., Hayakawa, H., Tanisawa, M., Yamamoto, Y., Koyama, H.: The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle, *Theriogenology*, **69**, 124～128, 2008.
- 2) Hamano, S.: 追い移植による繁殖救済, 日本胚移植学誌, **38**, 6, 2016.
- 3) Imakawa, K., Anthony, R. V., Kazemi, M., Marotti, K. R., Polites, H. G., Roberts, R. M.: Interferon-like sequence of ovine trophoblast protein secreted by embryonic trophectoderm, *Nature*, **330**, 377～379, 1987.
- 4) Hamano, S., Kuwayama, M.: In vitro fertilization and development of bovine oocytes recovered from the ovaries of individual donors: A comparison between the cutting and aspiration method, *Theriogenology*, **39**, 703～712, 1993.
- 5) Kubisch, H. M., Rasmussen, T. A., Johnson, K. M.: Interferon-tau in bovine blastocysts following parthenogenetic activation of oocytes: pattern of secretion and polymorphism in expressed mRNA sequences, *Mol Reprod Dev*, **64**, 79～85, 2003.
- 6) Hirayama, H., Moriyasu, S., Kageyama, S., Sawai, K., Takahashi, H., Geshi, M., Fujii, T., Koyama, T., Koyama, K., Miyamoto, A., Matsui, M., Minamihashi, A.: Enhancement of maternal recognition of

- pregnancy with parthenogenetic embryos in bovine embryo transfer, *Theriogenology*, **81**, 1108~1115, 2014.
- 7) Shirasuna, K., Matsumoto, H., Matsuyama, S., Kimura, K., Bollwein, H., Miyamoto, A. : Possible role of interferon tau on the bovine corpus luteum and neutrophils during the early pregnancy, *Reproduction*, **150**, 217~225, 2015.
- 8) Arosh, J. A., Banu, S. K., Kimmins, S., Chapdelaine, P., Maclareen, L. A., Fortier, M. A. : Effect of interferon-tau on prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling at the time of maternal recognition of pregnancy in cattle : evidence of polycrine actions of prostaglandin E2, *Endocrinology*, **145**, 5280~5293, 2004.
- 9) Spencer, T. E., Burghardt, R. C., Johnson, G. A., Bazer, F. W. : Conceptus signals for establishment and maintenance of pregnancy, *Anim Reprod Sci*, **82**-83, 537~550, 2004.
- 10) Wagener, K., Pothmann, H., Prunner, I., Peter, S., Erber, R., Aurich, C., Drillich, M., Gabler, C. : Endometrial mRNA expression of selected pro-inflammatory factors and mucins in repeat breeder cows with and without subclinical endometritis, *Theriogenology*, **90**, 237~244, 2017.
- 11) Shirasuna, K., Matsumoto, H., Kobayashi, E., Nitta, A., Haneda, S., Matsui, M., Kawashima, C., Kida, K., Shimizu, T., Miyamoto, A. : Upregulation of Interferon-stimulated Genes and Interleukin-10 in Peripheral Blood Immune Cells During Early Pregnancy in Dairy Cows, *J Reprod Dev*, **58**, 84~90, 2012.
- 12) Yankey, S. J., Hicks, B. A., Carnahan, K. G., Assiri, A. M., Sinor, S. J., Kodali, K., Stellflug, J. N., Ott, T. L. : Expression of the antiviral protein Mx in peripheral blood mononuclear cells of pregnant and bred, non-pregnant ewes, *J Endocrinol*, **170**, R7-11, 2001.
- 13) Yang, L., Wang, X. L., Wan, P. C., Zhang, L. Y., Wu, Y., Tang, D. W., Zeng, S. M. : Up-regulation of expression of interferon-stimulated gene 15 in the bovine corpus luteum during early pregnancy, *J Dairy Sci*, **93**, 1000~1011, 2010.
- 14) Bott, R. C., Ashley, R. L., Henkes, L. E., Antoniazzi, A. Q., Bruemmer, J. E., Niswender, G. D., Bazer, F. W., Spencer, T. E., Smirnova, N. P., Anthony, R. V., Hansen, T. R. : Uterine vein infusion of interferon tau (IFNT) extends luteal life span in ewes, *Biol Reprod*, **82**, 725~735, 2010.

抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の解明

Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of cryopreserved bull semen

武田 久美子・西野 景知*・今井 昭**

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門,

*茨城県畜産研究センター肉用牛研究所, **広島県立総合技術研究所畜産技術センター)

Kumiko Takeda, Kagetomo Nishino* and Akira Imai**

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Beef Cattle Institute,

*Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, **Hiroshima Prefectural Livestock Research Center)

It is known that spermatozoa suffer various damage by freezing. It is thought that seminal plasma containing excessive reactive oxygen species (ROS) induces oxidative stress and increases sperm nuclear DNA damage during the manufacturing process of frozen semen. The aim of this study was to clarify the efficiency of antioxidants, such as reduced glutathione (GSH) and astaxanthin supplemented to bull spermatozoa before freezing, to improve fertilization ability after artificial insemination. Semen was collected from each of three bulls and the freezing extender was supplemented with GSH before the cooling step of cryopreservation process. We assessed the sperm motility, DNA fragmentation index (DFI), and developmental ability of embryos after in vitro fertilization (IVF). The supplementation of GSH to the freezing extender did not affect sperm motility, however, DFI showed a significant increase in one of the bulls. Nonetheless, developmental rate of IVF embryos was improved in all bulls, the degree of effect showed difference among bulls and ejaculates. We examined the use of lipid-soluble astaxanthin by solvents, commercially available water-soluble solutions, and egg yolks containing high astaxanthin. The use of egg yolks containing high astaxanthin had no adverse effect on motility. The results suggest that supplementation of antioxidants to semen cryopreservation extender has a beneficial and protective effect on bull sperm fertility.

1. 目的

わが国における牛の人工授精による受胎率はここ15年間で低下し続けており、受胎率の向上に向けた取り組みは急務である。種雄牛候補の一部には、精液性状が正常でも凍結ダメージを受けやすいもの、また人工授精に使用してみると受胎性の

低いものが存在している。凍結融解後の精液は活力が凍結前の25~75%に低下し、精子機能が低下する。凍結精液の製造過程もしくは利用時に過剰な活性酸素種 (ROS) を含む精漿が酸化ストレスを惹起し、精子の成熟、先体反応、運動性などに影響を及ぼすとともにDNAダメージを与える^{1,2)}。ヒトの男性不妊の多くはROSによる精子

核DNAダメージによるものであると考えられており、妊娠率の低下、胚発達の障害、流産に関係すると指摘されている^{3, 4)}。近年、還元型グルタチオン（GSH）等の抗酸化物質の添加によって精子の受精能を改善しようとする試みが行われており、その効果が期待されている^{5, 6)}。そこで申請者らは、牛凍結精液製造時にあらかじめ抗酸化物質を希釀液へ添加することにより凍結融解時に発生する酸化障害を低減すれば、結果的に牛凍結保存精液の人工授精や体外受精の効率アップに繋がるのではないかと考えた。しかし、抗酸化物質の利用にあたりその効果やマイナス面について詳細な検討はされていない。また、脂溶性抗酸化物質については培養液や凍結精液希釀液へ容易に溶解しないため、研究はあまり進んでいない。本研究課題では、精子受精能向上効果の期待できるGSHの利用性を明らかにするとともに脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチン（Ax）の利用方法について検討を行うことを目的とする。

2. 方 法

2.1 GSHを添加した凍結精液の製造および運動性への影響

農研機構畜産研究部門で飼養している3頭の雄牛（N1～H3）より採取した新鮮精液を凍結試験に用いた。精液の凍結方法は家畜人工授精講習会テキスト（一般社団法人日本家畜人工授精師協会）を参考にし、手動で行った。精液と混合する前の希釀液に最終濃度が1, 5, 10 mMとなるようGSH（SIGMA）を添加した（GSH添加凍結精液）。凍結精液を38℃の温湯中で融解後、精子運動性を精子運動解析装置（SMAS牛用、富士平工業）で測定した。精子の活力は運動活性性（4段階分類）への重み付けにより算出した。

また、雄牛（N1, N2）より採取した新鮮精液を50倍希釀し、GSHを1, 5, 10 mMとなるよ

う添加し、凍結を経ない場合の精子運動性への影響をSMASで測定した。

2.2 GSH添加凍結精液のDNAダメージ率の測定

精子核DNAダメージを検出する方法として、末端トランスクレーバーによってDNA断片化を標識する方法（TUNEL法）を用いた^{4, 7)}。凍結精液を融解後、蛍光標識によるTUNEL法の市販キット（In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche社）を用い、既報に従って染色を行った^{8, 9)}。TUNEL陽性精子（=DNA断片化あり）は蛍光顕微鏡下（B励起蛍光フィルター）において検出し、DNA断片化指数（DFI）値を求めた。

2.3 凍結前後でGSHを添加した精液を用いた体外受精試験

2.1で作成したGSH添加凍結精液について既報に従い体外受精試験を行った¹⁰⁾。15℃で一晩保存したと場由来卵巣より未成熟卵子を吸引採取し、24時間成熟培養した。成熟卵子を20 mg/ml BSAおよび10 IU/mlノボヘパリン（持田製薬）を含むBO培地に移した。凍結融解後の精液は10mMカフェインを含むBO培地で2回洗浄し、精子濃度を $1 \times 10^7 / \text{ml}$ に希釀した。希釀精子を卵子のドロップに等量加え、5時間38.5℃、5%CO₂のインキュベーター内で共培養を行った。その後、受精卵はIVD101培養液（機能性ペプチド研）で38.5℃、5%CO₂、5%O₂のインキュベーター内で培養し、培養2日目の分割数および8日日の胚盤胞期数を調査した。

凍結融解後の精子にGSH添加した場合の体外受精への効果をみるために、GSHを添加していない凍結精液の融解後に1, 5, 10 mMとなるようGSHを添加し、既報⁶⁾に従って37℃で30分インキュベートした。その後、BO培地で2回洗浄し、体外受精試験に用いた。

2.4 GSHの添加が体外受精胚発生率へ与える

影響～種雄牛や採取ロットの違い～

広島県立総合技術研究所畜産技術センターでは、種雄牛や採取ロットの違いにおける体外受精胚発生率への影響について精査を行った。まず、3頭の種雄牛（H 1～H 3）から採取月齢の異なる各3ロットの凍結精液を用いて種雄牛および採取ロットによる体外受精胚発生率の違いについて検討した。体外受精手法は従来法に従い行った¹¹⁾。続いてそのうち2頭の種雄牛（H 1, H 2）について採取月齢の異なる各2ロットの凍結融解後の精液に2.3と同様の方法でGSH処理を行い（1 mM, 5 mM）、体外受精胚発生率への効果を検討した。また、2頭の種雄牛（H 1～H 2）について採取日の異なる各3ロットのGSHを添加した凍結精液を作成し、融解後の運動性について調査した。

2.5 アスタキサンチンを凍結精液希釈液に添加する方法の検討

脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチン（Ax）は以下の3つの方法を用いて希釈液への添加を行い凍結精液を製造した。

①Ax粉末（WAKO）を有機溶媒（ジメチルスルホキシド、DMSO；Ax/D）に溶解させた後に希釈液へ添加した。Ax/Dについては1%（w/w）を1次希釈液に5 µL/mL, 10 µL/mL, 40 µL/mL添加し、最終濃度（w/w）を0.0025%, 0.005%, 0.020%とした。

②水溶化Ax（A社製；Ax/AおよびB社製；Ax/B）を希釈液へ添加した。Ax/Aについては1次希釈液に1 µL/2 mL, 10 µL/2 mL, 50 µL/2 mL添加し、最終濃度（w/w）は0.000275%, 0.00275%, 0.01375%とした。また、Ax/Bについては1次希釈液に2 µL/2 mL, 20 µL/2 mL, 100 µL/2 mL添加し、最終濃度（w/w）は0.000265%, 0.00265%, 0.01325%とした。

③Ax高含有鶏卵（市販品、Ax/E）の卵黄を希

釀液に用いた。

①～③の方法で作成した凍結精液を融解し、精子運動性をSMASで測定した。

雄牛（N 1, N 2）より採取した新鮮精液を50倍希釈し、前述の方法でAxを添加し、凍結を経ない場合の精子運動性に及ぼす影響をSMASで測定した。Ax/Dの代わりに、細胞毒性のより低いと考えられるテトラヒドロフラン¹²⁾でAx粉末を溶解したもの（Ax/T）を用いた。Ax/Tについては最終濃度（w/w）を0.0001%, 0.005%, 0.001%となるように溶解液を0.1 µL/mL, 1 µL/mL, 5 µL/mL添加した。Ax/AおよびAx/Bは原液を、0.5 µL/mL, 5 µL/mL, 25 µL/mL添加したが、原液の濃度は異なっていたため、最終濃度（w/w）はそれぞれ、Ax/A；0.00055%, 0.0055%, 0.0275%, Ax/B；0.000265%, 0.00265%, 0.01325%となった。

Ax/A, Ax/B, Ax/Eを用いた方法で作成した凍結精液を融解し、2.2と同様に、蛍光標識によるTUNEL法によりDFIを求めた。

Ax/D, Ax/A, Ax/Eを用いた方法で作成した凍結精液を融解し、2.3と同様に、体外受精試験を行った。

2.6 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた精液凍結法が精子運動性へ与える影響～種雄牛や採取ロットの違い～

茨城県畜産センター肉用牛研究所においては牛凍結精液の製造を機械化しており、均一な品質の凍結精液製造が可能なことから、Ax/Eの利用性について種雄牛や採取ロットによる違いの詳細な検討を行った。5頭の種雄牛（I 1～I 5）について採取日の異なる3～7ロットの精液について、通常卵およびAx/Eを用いた希釈液による凍結精液製造を行った。凍結融解後、牛精子画像解析装置（C-IMAGING、コンピックス社製）により生存性（運動精子数率）および運動性（移動速

度) を計測した。

3. 結果と考察

3.1 精液へのGSH添加が精子運動性に及ぼす影響

雄牛 (N 1, N 2) より採取した新鮮精液に GSH を添加した場合、精子生存率および活力への影響はみられなかった ($p > 0.05$)。また、雄牛 (N 2) 由来の GSH 添加凍結精液について融解後の運動性を SMAS で計測したところ、1 mM の添加区で移動速度が若干上がる傾向がみられたが、精子運動性への影響はみられなかった。

3.2 GSHを添加した凍結精液のDNAダメージ率の測定

雄牛 (N 1～N 3) 由来の GSH 添加凍結精液について融解後の DFI を調査したところ、雄牛 N 2 の 2 ロットで GSH 添加による DFI 値が約 70% と著しい増加がみられた (Fig. 1)。3.1 で計測した N 2 凍結精液の生存率が 30% 程度だったことから、死亡精子核内に滲入した GSH により DNA の S-S 結合が脆弱化され DFI 値 = 非生存精子率と

なったとも考えられた。TUNEL での評価においては GSH の添加が精子凍結融解の際の DNA ダメージの低減とはならないことが示唆された。

3.3 凍結精液へのGSH添加が体外受精胚発生率へ与える影響

精液の凍結前に GSH を添加した場合、全 3 頭の雄牛で体外受精後の胚発生率への効果が認められた (Fig. 2, N 1～N 3)。体外受精後の胚盤胞期胚発生率の低い N 2 で凍結希釈液への GSH 添加効果は最大であり、10 mM 添加区で最も高かった。N 2 は、3.2 の結果から、GSH 添加によって DFI 値が非常に高くなる結果が得られたが、体外受精後の胚発生率への悪影響はみられず、逆に向上的結果となった。

一方、N 2 について凍結融解後の体外受精前に GSH 添加処理を行ったところ、体外受精胚発生率への影響は 1 mM 区で最大となることが示唆され、効果が示された (Fig. 2, N 2')。

3.4 GSHの添加が体外受精胚発生率へ与える影響～種雄牛や採取ロットの違い～

3 頭の種雄牛 (H 1～H 3) の凍結精液を体外

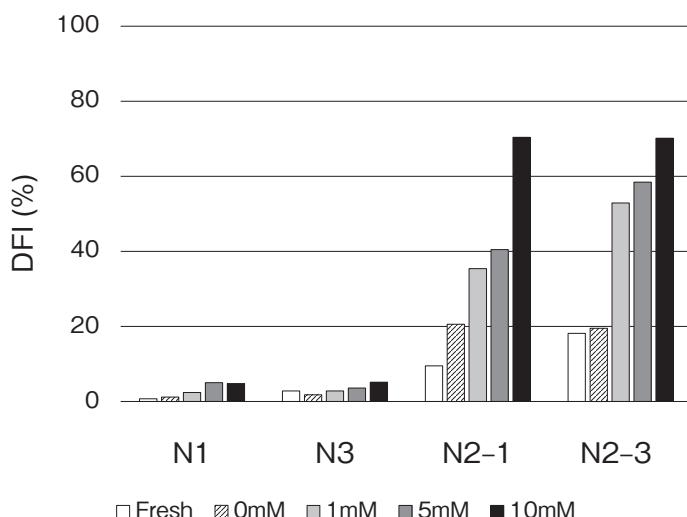


Fig. 1 The DNA fragmentation index (DFI) analyzed by TUNEL in fresh semen, and frozen-thawed semen supplemented with GSH, obtained from three bulls (N1, N2, N3).

受精に用いたところ、発生率には種雄牛による違いがみられた。すなわち、H 1は分割率において他の種雄牛より低い値を示した (68.8% vs. 82.9%, 88.6%, $p < 0.01$) が、胚盤胞発生率においては H 2がH 1より低い値を示した (23.7% vs. 33.6%, $p < 0.05$)。また、H 1については分割率にロット差がみられた。

次にロット差のみられたH 1と胚盤胞発生率の低かったH 2について凍結融解後の精液にGSH処理を施し、体外受精胚発生率を調査した結果、分割率や胚盤胞発生率の低いロットでGSH添加効果が認められるなど発生率改善への効果が認められた (Table 1)。

そこで、これらの種雄牛 (H 1, H 2) につい

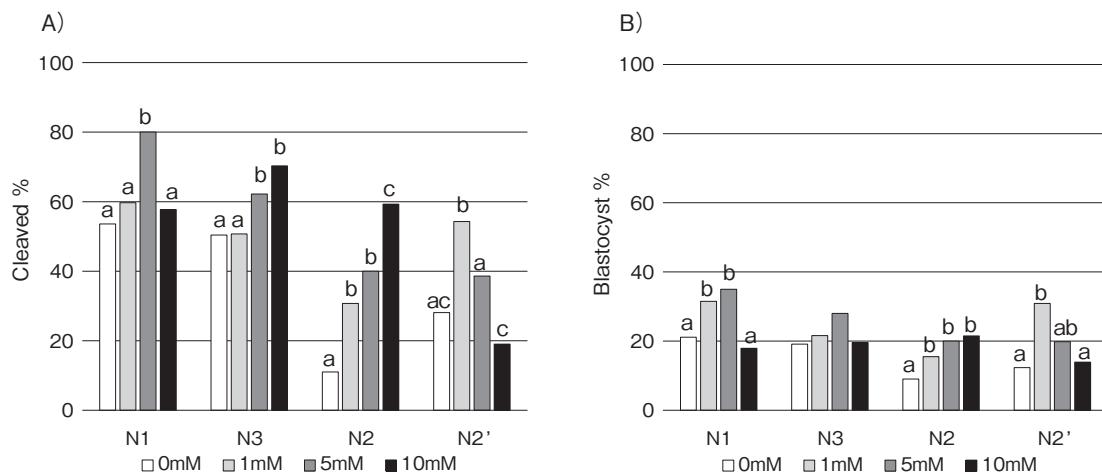


Fig. 2 Comparison of IVF results among bull spermatozoa obtained from three bulls (N1, N2, N3) supplemented with or without GSH (0, 1, 5, 10 mM) before freezing steps, and, bull spermatozoa (N2') treated with or without GSH (0, 1, 5, 10 mM) just before IVF.A) Percentage of embryo cleavage (% of total incubated embryos), B) Percentage of blastocyst development (% of total incubated embryos). abc : Bars within each bull with different letters differ ($p < 0.05$).

Table 1 IVF results of frozen-thawed bull spermatozoa treated with GSH before IVF.

Bull	Age (months)	GSH	Motility before IVF (++%)	Total oocytes	Cleaved (%)	Blastocyst (%)
H 1	16.6	0 mM	23.3	84	68 (81.0)	33 (39.3)
		1 mM	31.7	84	75 (89.3)	36 (42.9)
		5 mM	31.7	81	69 (84.0)	30 (37.0)
	61.8	0 mM	22.5	95	43 (45.3) ^a	15 (15.8) ^a
		1 mM	24.4	102	65 (63.7) ^b	20 (19.6) ^{ab}
		5 mM	23.8	101	78 (77.2) ^b	33 (32.7) ^b
H 2	33.3	0 mM	30.0	86	74 (86.0)	28 (32.6)
		1 mM	35.0	93	82 (88.8)	32 (34.4)
		5 mM	35.0	89	76 (85.4)	28 (31.5)
	70.0	0 mM	23.8	101	54 (53.5) ^a	20 (19.8)
		1 mM	26.9	96	66 (68.8) ^b	23 (24.0)
		5 mM	26.3	94	65 (69.1) ^b	26 (27.7)

a, b : Numbers within columns with different superscripts differ ($p < 0.05$).

てGSH添加凍結精液の製造を各3ロットずつ行った。凍結融解後の精子運動性を調査したところ、GSH添加による運動性低下はみられなかった。

3.5 アスタキサンチンを凍結精液希釀液に添加する方法の検討

①Axを有機溶媒に溶解し(Ax/D, Ax/T), 希釀液へ添加した場合、顕微鏡下の観察でAxの結晶の析出が観察された。次に②水溶性Ax(Ax/A, Ax/B)および③Ax高含有鶏卵(Ax/E)については希釀液に添加後も顕微鏡下でAxの結晶は観察されず、十分溶解していると考えられた。

精液へのAx/A, Ax/Bの添加では添加量に伴って運動性が低下すること、細胞毒性の低いと考えられるAx/Tの場合、一部運動性の改善がみられた(Fig. 3 A)。

Ax/A, Ax/B, Ax/Eにより凍結前にAxを添加した場合、凍結融解後の精子運動性は、Ax/AやAx/Bを用いた場合は無添加区より低くなる傾向がみられたが、Ax/Eを用いた場合は運動性への悪影響はみられなかった(Fig. 3 B)。また、DFIを検討したところ、精子DNAダメージへの悪影響はみられなかった。

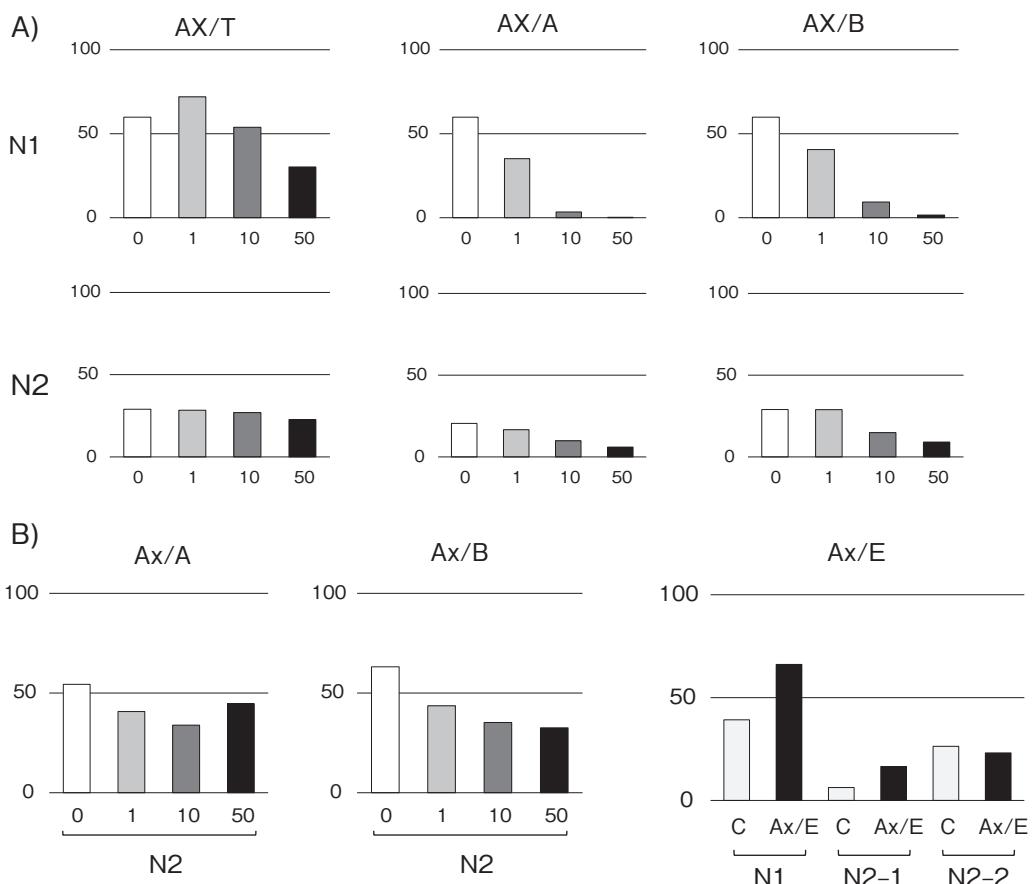


Fig. 3 A) Motility of fresh ejaculated spermatozoa (N1 and N2) supplemented with astaxanthin (Ax/A, Ax/B, and Ax/T) measured by SMAS. Ax/A and Ax/B, commercially available water-soluble solutions; Ax/T, dissolved in tetrahydrofuran. B) Motility of frozen-thawed spermatozoa supplemented with astaxanthin (Ax/A, Ax/B, Ax/E). Spermatozoa (N2) were supplemented with Ax/A and Ax/B. Spermatozoa (N1, N2-1, and N2-2) were frozen using control egg yolk (C), or astaxanthin-rich egg yolk (Ax/E).

Table 2 Sperm motility parameters measured by CASA. Spermatozoa were frozen using control egg yolk, or astaxanthin-rich egg yolk (Ax/E).

Bull	Age (months)	Viability (%)		Velocity ($\mu\text{m}/\text{s}$)	
		Control	Ax/E	Control	Ax/E
IB 1	26.6	62.2 ± 3.7	60.8 ± 6.8	102.8 ± 18.9	92.2 ± 15.0
IB 2	28.8	62.9 ± 3.3	63.6 ± 3.5	100.7 ± 16.5	94.8 ± 4.0
IB 3	61.3	60.2 ± 1.7	54.4 ± 15.1	94.2 ± 9.3	74.1 ± 29.1
IB 4	81.3	57.4 ± 1.8 ^a	66.3 ± 3.7 ^b	92.8 ± 13.8	78.4 ± 8.5
IB 5	88.6	60.2 ± 3.5	56.6 ± 5.9	88.6 ± 10.0	78.9 ± 23.8

a, b : Numbers within columns with different superscripts differ ($p < 0.05$).

Ax/D, Ax/A, Ax/EによるAx添加凍結精液について、体外受精後の胚発生率を検討したところ、Ax/Dでは添加効果がみられなかつたが、Ax/AおよびAx/Eでは分割率において効果のみられるものもあった。

以上はまだ検討段階であるが、精子に与えるダメージの少なさ、体外受精胚発生率への効果から、Ax/E利用が有利と考えられた。

3.6 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた精液凍結法が精子運動性へ与える影響～種雄牛の違い～

精液凍結時にAx/Eを利用した場合の精子運動性に与える影響を精査した結果、Ax/Eの使用による生存率および移動速度の変動は採取日によって異なっていた。雄牛ごとの調査では、5頭中1頭で生存率が高くなるものもみられた (Table 2)。

4. 要 約

本研究は、凍結精液の製造過程で抗酸化物質をあらかじめ添加することで、凍結融解時に精子が受けける酸化ダメージを低減し、受精能を改善することが目的である。抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) の添加が牛凍結精液の品質に与える影響を、精子活力、精子生存率、DNAダメージ、体外受精による胚発生率等を指標として精査した。その結果、体外受精において低発生率

を示す雄牛もしくは採取ロットについてGSH添加効果が高いことが明らかとなった。しかし体外受精において効果のみられた1頭の雄牛ではかえってGSH添加に伴いDNAダメージの検出される精子が増える結果となった。体外受精前のGSH処理効果に雄牛やロットによっての違いがみられたことから、今後、添加効果の期待できる雄牛を対象としてGSHを添加した凍結精液を製造し、受精能への効果を検証する。

脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチンの添加方法については、有機溶媒や水溶化製品の利用には運動性低下の影響がみられ、凍結希釀液にアスタキサンチン高含有卵黄を用いた凍結方法の有利性が示された。今後はアスタキサンチン高含有鶏卵を用いた凍結精液について精液の品質や受精能への効果を検証する。

文 献

- Chenm S. J., Allam, J. P., Duan, Y. G., Haidl, G. : Influence of reactive oxygen species on human sperm functions and fertilizing capacity including therapeutical approaches, *Arch Gynecol Obstet.*, 288, 191~199, 2013.
- Silva, P. F., Gadella, B. M., Colenbrander, B., Roelen, B. A. : Exposure of bovine sperm to pro-oxidants impairs the developmental competence of the embryo after the first cleavage, *Theriogenology*, 67, 609~619, 2007.
- Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendoijk, C., Mehnert, C., Menkveld, R., Gips, H.,

- Schill, W. B., Kruger, T. F. : Influence of deoxyribonucleic acid damage on fertilization and pregnancy, *Fertil Steril.*, **81**, 965~972, 2004.
- 4) Evenson, D. P. : The Sperm Chromatin Structure Assay (SCSA((R))) and other sperm DNA fragmentation tests for evaluation of sperm nuclear DNA integrity as related to fertility, *Anim Reprod Sci.*, **169**, 56~75, 2016.
- 5) Barbato, V., Talevi, R., Braun, S., Merolla, A., Sudhakaran, S., Longobardi, S., Gualtieri, R. : Supplementation of sperm media with zinc, D-aspartate and co-enzyme Q10 protects bull sperm against exogenous oxidative stress and improves their ability to support embryo development, *Zygote*, **25**, 168~175, 2017.
- 6) Gadea, J., Gumbao, D., Canovas, S., Garcia-Vazquez, F. A., Grullon, L. A., Gardon, J. C. : Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa, *Int J Androl.*, **31**, 40~49, 2008.
- 7) Sharma, R. K., Sabanegh, E., Mahfouz, R., Gupta S., Thiyagarajan, A., Agarwal, A. : TUNEL as a test for sperm DNA damage in the evaluation of male infertility, *Urology*, **76**, 1380~1386, 2010.
- 8) Takeda, K., Uchiyama, K., Kinukawa, M., Tagami, T., Kaneda, M., Watanabe, S. : Evaluation of sperm DNA damage in bulls by TUNEL assay as a parameter of semen quality, *J Reprod Dev.*, 2015.
- 9) 武田久美子：精子核DNAダメージを利用した牛凍結精液品質評価の試み，日本胚移植学雑誌，**38**，71~74, 2016.
- 10) Takeda K., Kobayashi E., Akagi S., Nishino K., Kaneda M., Watanabe S. : Differentially methylated CpG sites in bull spermatozoa revealed by human DNA methylation arrays and bisulfite analysis, *J Reprod Dev.*, 2017.
- 11) 岩水正, 尾方康弘, 田澤直子, 原田佳積, 白須洋, 堀内俊孝：ウシ体外受精胚の凍結保存, 広島県獣医学会雑誌, **13**, 59~62, 1998.
- 12) Boesch-Saadatmandi, C., Rimbach, G., Jungblut, A., Frank, J. : Comparison of tetrahydrofuran, fetal calf serum, and Tween 40 for the delivery of astaxanthin and canthaxanthin to HepG2 cells, *Cytotechnology*, **63**, 89~97, 2011.

肥育前雌牛における卵子の能力不足を解消する 培養技術の開発

Development of *in vitro* oocyte production systems to optimize oocyte resources residing in ovaries from beef calves before fattening

平 尾 雄 二・武 田 久美子・的 場 理 子

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)

Yuji Hirao, Kumiko Takeda and Satoko Matoba

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

This study aims to produce competent eggs from growing oocytes residing in the ovary of beef calves castrated before fattening. Our previous studies have suggested a poor developmental competence of oocytes that had fully grown in those ovaries, but the adverse effect (s) of immature ovaries was reduced when growth was completed *in vitro* during the last 14 days. Thus, the detrimental effect of immature ovaries could be eliminated when oocyte growth was achieved *in vitro*. Growing oocytes were collected from the ovaries of calves at 8 to 12 months of age and classified according to size : Class A, oocytes not greater than 80 µm in diameter ; Class B, oocytes approximately 100 µm. Preantral follicles containing Class A oocytes were embedded in collagen gel and cultured for 28 to 32 days. So far, no culture systems can sufficiently support growth of Class A oocytes. Class B oocytes were cultured as oocyte-granulosa cell complexes for 14 days. A calf was born from a Class B oocyte of a calf which itself was a result of culture of Class B oocytes of a calf. This achievement suggests that consecutive productions of calves by using *in vitro* growth of oocytes can contribute to shortening the generation intervals. The effect of the presence or absence of corpus luteum in the calves had little impact on the viability and growth of Class B oocytes, supporting our hypothesis of the efficacy of using the *in vitro* oocyte growth technology on the calf ovary. With respect to Class A oocytes, although the survival for 4 weeks *in vitro* was possible, oocytes at the end of culture were not fully grown, being similar to the size of Class B oocytes. Further improvement of culture systems for Class A with a focus on efficient growth is essential.

1. 目 的

本研究は、肥育前雌子牛（以下、若齢雌牛）から摘出されて廃棄される卵巣から、発育途上卵母細胞を採取して発育・成熟させ、受精卵を生産し

ようとするものである。去勢によって廃棄される黒毛和種の卵巣は毎年約2万個にのぼり、それらを活用できれば素性・血統が明らかで良質な形質を持つ和牛雌牛の後代確保が可能となる。

2014年以降、申請者らは若齢雌牛の卵巣の利用

について検討し、子牛生産が可能な卵母細胞が存在すること、しかし未熟な卵巢で発育した卵母細胞の多くは胚発生能が低いことなどの知見を得た¹⁾。一方、2週間の体外発育を経た卵母細胞では未熟卵巢による悪影響が少ない可能性も示された¹⁾。この考えを進めれば、去勢時に分類A：発育完了までに4週間程度の発育途上卵母細胞、分類B：発育完了まで2週間程度の発育途上卵母細胞、分類C：発育後の卵母細胞と分けた場合（Table 1），卵巢の影響を受ける度合いはA < B < Cになると考えられる。

この仮説を検証するにはすべての分類で卵母細胞を発育完了させうる培養系が必要となるが、培養技術で成熟卵子が得られるのは分類CとBであり、Aは体外培養の恩恵を最も多く享受する可能性があるにも関わらず、適当な培養系が存在しない。4週間の培養系で卵母細胞を発育させることができれば仮説を検証することができる。

本研究では、発育段階がBの卵母細胞からは未熟卵巢の悪影響を解消する技術を開発して産子を生産することを目的とし、Aの卵母細胞については超長期培養系の開発を目的とした。

2. 方 法

2.1 卵巣

肥育前雌子牛（8～12ヶ月）から卵巣を摘出し、左右いずれかあるいは両方の卵巣に黄体（corpus luteum）が存在していた牛を性成熟に達

していたものとしてCL（+）、黄体がなかった牛をCL（-）と表す。

2.2 卵胞の切り出しおよび分類

卵巣から卵胞あるいは卵母細胞・卵丘細胞（顆粒膜細胞）複合体をメスで切り出し、発育段階に応じてA、B、Cに分類し（Table 1），本研究ではAとBを培養に供した。

2.3 卵胞／卵母細胞・顆粒膜細胞複合体の培養

分類Aの卵胞をコラーゲンゲルに包埋して28～32日間まで培養した。

分類Bの発育途上卵母細胞については、既報^{2,3)}に従い、インサートメンブレン上で卵母細胞・顆粒膜細胞複合を2週間の培養を行った。分類Bの培養系はほぼ確立され、すでに複数の産子が誕生している。未熟卵巢の影響から2週間隔離され、培養系が存在する点でバランスのとれた発育段階であり、胚発生能力を調べるには分類Bが適している。

体外成熟後の卵子については、定法による体外受精を行い、つづいて個別識別卵子・胚培養システムで培養した。

3. 結果と考察

3.1 分類Aに含まれる卵母細胞

卵胞腔形成前の卵胞の直径と卵母細胞の直径との関係をFig. 1に示す。当初、直径約80μmの卵母細胞を分類Aとする計画であったが、実際には

Table 1 Classification of follicles/oocytes according to size after collection from the ovary of beef calves

Class	Follicle diameter (mm)	Approximate average diameter of oocytes (μm)	Estimated length of culture period necessary to give full growth (Days)
A	0.1<Ø<0.3	40～80	28～32
B	0.5<Ø<0.8	100	14
C *	2<Ø<6	120	0

*Class C oocytes were not used in the present study.

直径40~80μmの幅広い集団となった。本研究では卵胞腔形成前の卵胞をすべて分類Aとして培養することとした。直径300μm以下の卵胞では卵母細胞と卵胞の直径はほぼ直線的な関係にあり (Fig. 1), 同じサイズの卵母細胞を集めるには卵胞のサイズを揃える必要がある。胞状卵胞では状況はまったく異なり (分類B), 卵胞腔の急激な拡大が卵胞を急速に発育させるため, 卵母細胞の発育は相対的に著しく遅くなる。その結果, 比較的広い範囲のサイズの卵胞から類似のサイズの卵母細胞が集まる。すなわち, 分類AはBよりも培養開始時の卵母細胞の発育段階を揃えるのが困難である。直径200μm程度の卵胞では直径約50μmから60μmの卵母細胞が含まれていた (Fig. 1)。

3.2 分類Bの卵母細胞の培養

分類AおよびBの培養前後の卵母細胞の直径分布をFig. 2に示す。まず, 分類Bについては, 「若齢雌牛の未利用卵子資源として期待される卵母細胞の利用効率の最大化」を目的として掲げ, 2週間の培養を行った。本研究期間中の重要な成果として, 二世代の連続した体外発育培養由来の産子の誕生がある。このような例はほかにない。一世

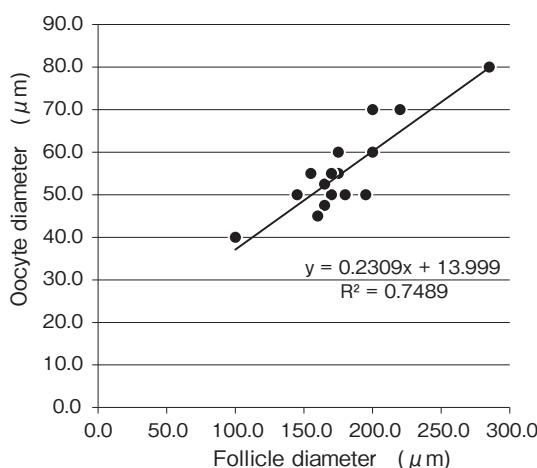


Fig. 1 A scatter plot of diameters of growing follicles and oocytes after collection from the ovaries of beef calves.

代目は2015年11月に割去した卵巣由来の体外発育卵母細胞から誕生した雌の産子である (2016年9月)。その個体にも卵巣割去が行われ, 体外発育卵母細胞から成熟卵子が作製された。二世代目の卵母細胞・顆粒膜細胞複合体 (以下, 複合体と記す) をFig. 3に示す。インサートメンブレン上に配置された複合体はドームを形成した (Fig. 3 A)。拡大したものをFig. 3 Bに示す。卵母細胞が退行した複合体ではドームは形成されない (Fig. 3 A中の矢印)。すなわち, ドーム形成は卵母細胞の生存を強く示唆するものである。ドームの天蓋部分を破ることによって, 卵母細胞・卵丘細胞 (顆粒膜細胞) 複合体を採取する (Fig. 3 C)。この技術をうまく利用すれば, 世代間隔の短縮に貢

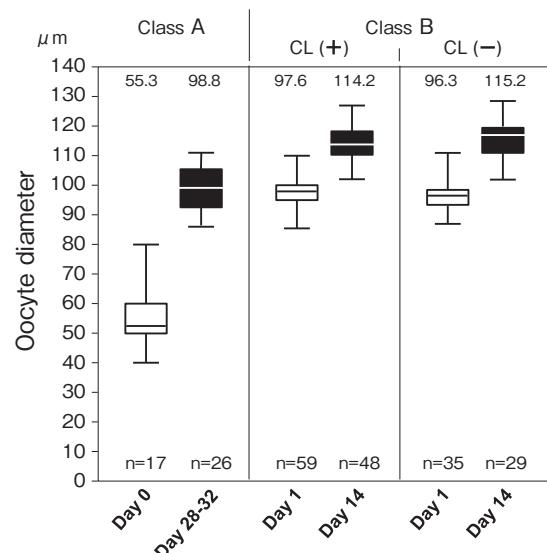


Fig. 2 Comparison of the diameters of oocytes before and after culture. Class A oocytes were grown in follicles embedded in collagen gels. Class B oocytes were cultured as oocyte-granulosa cell complexes on the membrane inserts. The day of follicle/oocyte-granulosa cell complexes collection was designated Day 0. CL(+), oocytes from the ovaries of calves that had corpus luteum in one ovary or both ovaries; CL(-), oocytes from a pair of ovaries without corpus luteum. Numbers above the box plots indicate the mean diameter (μm) of the oocytes in that group.

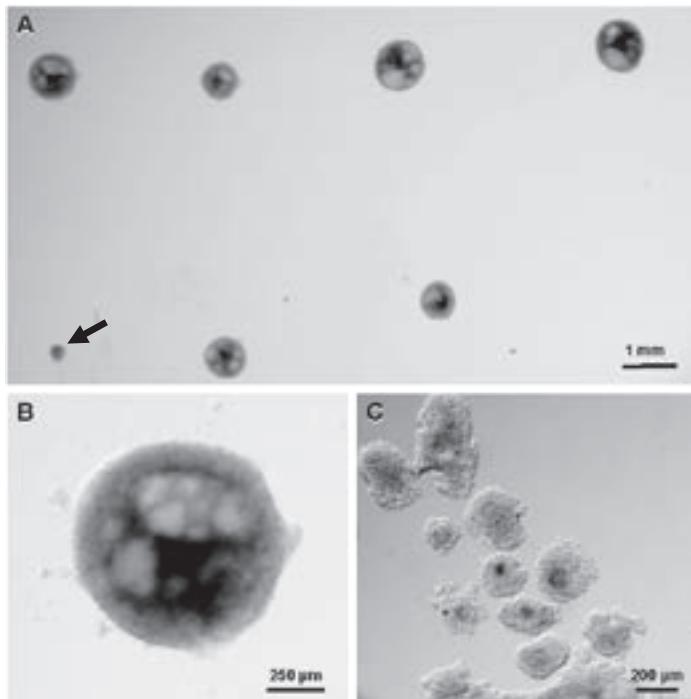


Fig. 3 Morphology of the oocyte-granulosa cell complexes of Class B, collected from follicles 0.5–0.8 mm in diameter, for 14 days. A) Oocyte-granulosa cell complexes that formed a domelike structure. The structure was not developed when the oocyte had degenerated (arrow). B) Enlarged images of a complex. C) Oocyte-cumulus cell complexes recovered on Day 14 from the dome.

献できることが示された。

分類Bの卵母細胞は平均で直径96~97μmから約115μmへと発育した (Fig. 2)。体積にして約69%の増大であった。CL (+) 区とCL (-) 区との間に明確な違いは認められなかった (Fig. 2 B)。体外発育中の生存率もCL (+) 区が81.4%であり、82.9%のCL (-) 区と同等であった。これらの結果は、分類Bの卵母細胞は(今回は用いなかった)分類Cの卵母細胞ほど個体の性成熟の影響を受けないとする仮説を支持するものである。また、生存率はこれまでに報告されている分類Bの体外発育培養の結果よりもやや低い値を示したが、直径についてはほぼ同等であった³⁾。今後、若齢雌牛か否かに関わらず、直径115μm未満の卵母細胞を120μm以上へと発育させることが課

題となる。単位体積当たりでは体外発育卵母細胞の持つミトコンドリアDNAのコピー数は生体内発育卵母細胞と同等であることが判明している。しかし、発育の完了が卵子としての最低限の基準であることを考えると、最終的にはすべての卵母細胞を120μm以上へと体外発育させることが理想である。

卵母細胞の発育を改善する可能性を持つ添加因子として、顆粒膜細胞の分化を誘導するために卵母細胞が放出するGDF 9がある。たとえば、マウスの卵母細胞・顆粒膜細胞複合体にGDF 9を作用させると顆粒膜細胞の形態に顕著な影響を及ぼす。しかし、効果の持続性やきわめて高額な培養液になるなどの課題がある。現在、牛の卵母細胞・顆粒膜細胞複合体では2.5μg/mlの濃度で培

養を行っているが、結論を得るにはさらなる検討が必要である。

3.3 分類Aの卵母細胞／卵胞の培養

分類Aの卵胞培養の様子をFig. 4に示す。基本的にTaketsuruら⁴⁾の方法に従ったものである。ただし培養液への血漿の添加は行っていない。まず、二次卵胞に周囲の結合組織が付着したものをメスで切り出した (Fig. 4 A)。拡大するとFig. 4 Bのように見える。コラーゲンゲル中に卵胞を包埋すると (Fig. 3 C)，卵胞付近の組織がコラーゲンゲルに伸展した。培養を継続することにより明確な卵胞腔が形成された (Fig. 4 D)。その中から卵母細胞・卵丘細胞複合体を採取した (Fig. 4 E)。分類Bの場合には卵胞の基底膜を培養開始時に除去するため、培養の最後に卵母細胞・卵丘細胞複合体を容易に回収することができる。しか

し、分類Aには培養後まで基底膜が残存していることがあり、切開時に卵母細胞を潰さないように留意する必要がある。採取された複合体の形態は体外発育後の分類Bの複合体と類似していた。体外成熟を試み、裸化した卵母細胞をFig. 4 Fに示す。第一極体の放出はほとんど認められなかった。

分類Aの卵母細胞／卵胞を4週間の長期培養で生存させることは可能となった。しかし、発育は不十分であった (Fig. 2)。4週間の培養で分類Bの培養開始時の直径と同等か、わずかに上回る程度であった。この課題を解決するためには培養系の改善と、分離した卵母細胞のサイズに見合う適切な培養期間の設定をいずれも高い水準で達成する必要がある。

本研究は、未熟卵巣で発育する時間が短いほど未熟卵巣の悪影響が少ないとする仮説に基づく。

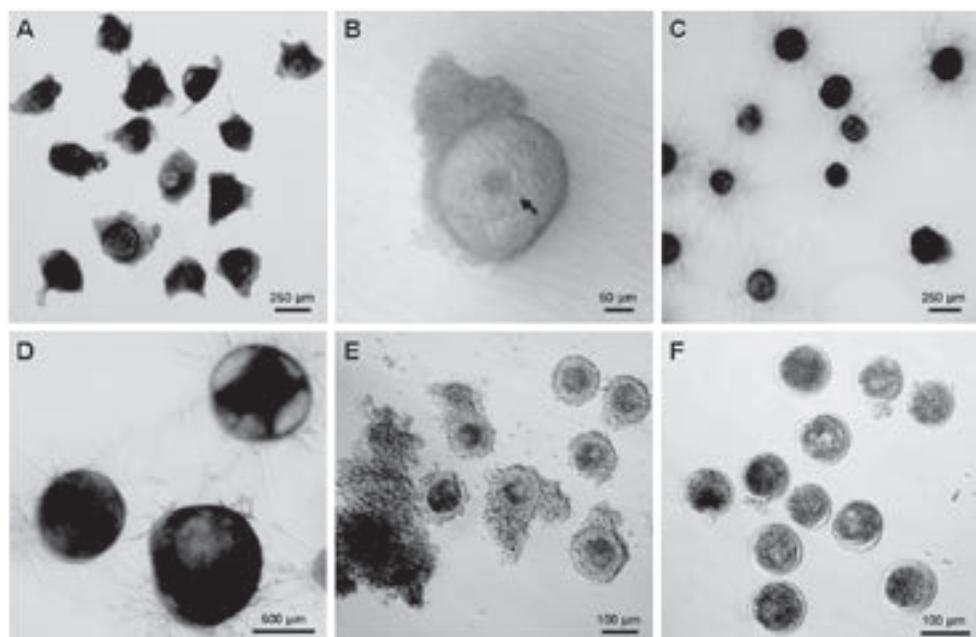


Fig. 4 Morphology of preantral follicles (Class A) during culture and oocyte-granulosa cell complexes at the end of culture period of 28 to 32 days. A) Isolated preantral follicles. B) Enlarged image of an preantral follicle shown in A. The oocyte is indicated (arrow). C) Follicles developing antral cavities during growth in a collagen gel. D) Antral follicles on Day 28. E) Oocyte-cumulus cell complexes recovered from antral follicles grown in collagen gels. F) Denuded oocytes after an over-night culture of the complexes shown in E.

分類Bの卵母細胞に関しては、黄体の有無による影響が小さく、仮説を支持する情報が得られた。卵母細胞に一定の割合で発育できないものが含まれる問題は、若齢雌牛由来に限らず生じることから、本研究が進展することにより卵子の体外作出の大きな課題の解決に繋がる可能性がある。また、二世代にわたる連続した体外発育培養由來の産子が得られた。一方、分類Aの卵母細胞が発育することのできる超長期培養系の開発については、4週間の生存が可能になったとはいえ発育が十分ではないことから、未熟卵巣の悪影響を検証することは現時点ではできない。発育完了に焦点を絞った超長期培養系の開発が必要である。

4. 要 約

本研究は、去勢される若齢雌牛の卵巣に存在する発育途上卵母細胞を利用して受精卵を生産しようとするものである。これまで、若齢雌牛の未熟な卵巣で発育した卵母細胞の多くは胚発生能が低いこと、しかし2週間の体外発育を経た卵母細胞には未熟卵巣による悪影響が少ないことを示す結果が得られている。そこで、去勢時に分類A：発育完了までに4週間程度の卵母細胞、分類B：発育完了まで2週間程度の卵母細胞に分類し、未熟卵巣での発育が短期間であるほど未熟卵巣の悪影響が少ないとする仮説を立てた。技術的な問題として、分類Aを十分に発育させうる培養系が存在しないことがある。本研究では、分類Bの卵母細胞からは産子を生産することを目的とし、分類Aの卵母細胞については超長期培養系の開発を目的

とした。材料には肥育前雌子牛（8～12ヶ月）から摘出した卵巣を用い、卵胞あるいは卵母細胞・卵丘細胞（顆粒膜細胞）複合体をメスで切り出して分類し、培養に供した。分類Aの卵胞はコラーゲンゲルに包埋して28～32日間培養した。分類Bについては、卵母細胞・顆粒膜細胞複合を2週間培養した。分類Bについては、割去した卵巣由來の体外発育卵母細胞として連続二世代目の個体が誕生した。この技術をうまく利用すれば、世代間隔の短縮に貢献できることが示された。分類Bの卵母細胞に関しては、若齢雌牛の黄体の有無による影響が小さく、仮説を支持する情報が得られた。今後、若齢雌牛か否かに関わらず、直径115μm未満の卵母細胞を120μm以上へと発育させることが課題となる。一方、分類Aの卵母細胞の超長期培養系については、4週間の生存が可能であるものの発育が十分ではないことから、発育を完了させる目的に焦点を絞った培養系の改善が必要である。

文 献

- 1) 的場理子：公益法人伊藤記念財団平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，35，158～164，2017.
- 2) Hirao, Y., Itoh, T., Shimizu, M., Iga, K., Aoyagi, K., Kobayashi, M., Kacchi, M., Hoshi, H., Takenouchi, N. : *Biol Reprod.*, 70, 83～91, 2004.
- 3) Hirao, Y., Naruse, K., Kaneda, M., Somfai, T., Iga, K., Shimizu, M., Akagi, S., Cao, F., Kono, T., Nagai, T., Takenouchi, N. : *Biol Reprod.*, 89, 57, 1～11, 2013.
- 4) Taketsuru, H., Takajo, A., Bao, R.-M., Hamawaki, A., Yoshikawa, M., Miyano, T. : *J Reprod Dev.*, 57, 99～106, 2011.

近赤外光照射による牛凍結胚の品質改善効果に関する研究

Effects of near-infrared laser irradiation on frozen bovine embryos

横尾正樹・佐藤勝祥

(秋田県立大学生物資源科学部)

Masaki Yokoo and Katsuyoshi Sato

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University)

The improvement of the quality of frozen-thawed embryos is required for the efficient cow-calf production system, because the quality of frozen-thawed embryos was significantly lower than non-cryopreserved embryos. Recently, we reported that near-infrared laser irradiation improved the quality of mouse embryo development in vitro and the live-birth rate after embryo transfer. Therefore, in the present study, we investigated the effects of near-infrared laser irradiation on the quality of frozen-thawed bovine embryos. Although, the irradiation of near-infrared laser was not impacted the embryo viability after thawing, the diameter and cell number of the surviving blastocysts were significantly increased by irradiation of near-infrared laser. From these results, we conclude that the near-infrared laser method is also useful to improving the quality of frozen-thawed bovine embryos.

1. 目的

今日、牛の胚移植技術は、優良家畜の増産や育種改良に有効な技術として実用化されている。最近は、優良肉用子牛の生産基盤強化を図るために、高品質な肉専用種子牛を生み出すための技術としても期待されている。1戸あたりの飼養頭数が少ない我が国では、一度に多くの受卵牛（仮腹親）を準備できないため、牛胚移植技術を普及定着させるためには、あらかじめ凍結保存した胚を必要に応じて融解して利用する「凍結胚移植」の利用が不可欠である。しかしながら、ここ10年の凍結胚移植は新鮮胚移植と比較すると受胎成績が低く、牛凍結胚移植の受胎率向上が急務となって

いる。

近年、胚移植の受胎率を向上させるための要因の一つとして、移植する初期胚のミトコンドリア機能との関連が報告されている。つまり、ミトコンドリア機能が高い胚を移植した場合、受胎率が向上することが明らかにされている^{1~3)}。一方で、凍結保存した胚は、胚のミトコンドリア機能が著しく低下することも報告されており⁴⁾、凍結胚移植の受胎率の低下は、凍結過程における胚のミトコンドリア機能の低下や損失が原因であると考えられる。

最近、我々は、ミトコンドリア機能は近赤外領域の光によって活性化でき、哺乳動物初期胚に照射することで、品質改善が可能であることを見出

した。さらに、マウスを使用した実験では、近赤外光を照射した胚を移植することで、受胎成績を有意に改善することにも成功している⁵⁾。そこで本研究では、我々が見出した近赤外光による品質改善技術を応用して、牛凍結胚に対する近赤外光照射の効果を調査し、牛凍結胚の品質改善技術としても有用であるかを検証することを目的とした。

2. 方 法

2.1 牛体外受精卵の作出

と場由来の牛卵巣から卵丘細胞一卵子複合体を採取し、体外成熟培地（IVMD101培地；機能性ペプチド研究所）で22時間の体外成熟培養後、媒精液（IVF100培地；機能性ペプチド研究所）中で体外受精した。6時間後に受精卵に付着している卵丘細胞をすべて剥離し、体外発生培地（CR1aa培地）で培養した。培養条件は38.5°C, 5%CO₂, 95%空気とし、培養7日目に胚盤胞に到達している受精卵を凍結実験に使用した。

2.2 牛体外受精卵の凍結と融解

培養7日目の胚盤胞は平衡化後、ガラス化液に1分間浸漬して、素早く凍結用デバイス（Cryotec Animal；リプロライフ）に載せて、液体窒素中でガラス化凍結した。融解の際は、液体窒素からCryotec Animalを素早く取り出し、凍結保存した胚盤胞を融解液、希釀液、洗浄液の順に浸漬し、最後は体外発生培地（CR1aa培地）中で72時間培養した。

2.3 近赤外光の照射

近赤外光の照射には近赤外照射機LTU-904（Rian Corp.；波長904nm）を用いた。照射条件は3分間とし、近赤外光の照射タイミングは、融解直後（融解直後区）と融解3時間後（融解3時間後区）の2実験区を設けた。また、近赤外光を照射せずに培養した胚盤胞を非照射区、凍結せずに培養した胚盤胞を未凍結区とした。

2.4 評価方法

融解した胚盤胞を経時的に観察し、胚盤胞の生存率を評価した。生存性の判定は、胞胚腔が膨張しているものを生存胚盤胞、細胞が収縮し、発生が停止したものを死滅胚盤胞とした。また、生存胚盤胞の品質を評価するために、融解後72時間後において生存していた胚盤胞の直径と、胚盤胞の構成細胞数を計測した。

3. 結果と考察

牛凍結融解胚の生存性に及ぼす近赤外光照射の影響をFig. 1に示した。凍結せずに培養した胚盤胞（未凍結区）と比較して、凍結保存した胚盤胞の生存率は全体的に低下する傾向にあった。培養から72時間後の各試験区の生存率を比較すると、未凍結区は72.2%であったのに対して、非照射区は45.7%，融解直後区は30.5%，融解3時間後区は27.7%だった。一方、培養72時間後に生存していた各試験区の胚盤胞の形態に着目して観察したところ、融解3時間後区は、非照射区や融解直後区と比較し、有意に大きかった（Fig. 2およびFig. 3）。そこで、1個の胚盤胞を構成している細胞数を計測したところ、平均構成細胞数は未凍結区の胚盤胞は 269.0 ± 31.1 個に対して、非照射区は 100.3 ± 12.5 個、融解直後区は 138.0 ± 22.6 個、融解3時間後区は 201.3 ± 22.8 個となり、融解3時間後区の胚盤胞は非照射区よりも有意に細胞数が多く、未凍結区の胚盤胞と同等の細胞数となった（Fig. 4）。

以上、本研究の結果では、牛凍結融解受精卵への近赤外光照射は、凍結融解胚の生存率を改善する効果は認められなかった。近赤外光には、凍結融解時にダメージを受けた胚を回復・修復するまでの効果は有していないのかもしれない。しかしながら、生存胚盤胞においてはその品質を改善する効果が認められたことから、融解後に生存した

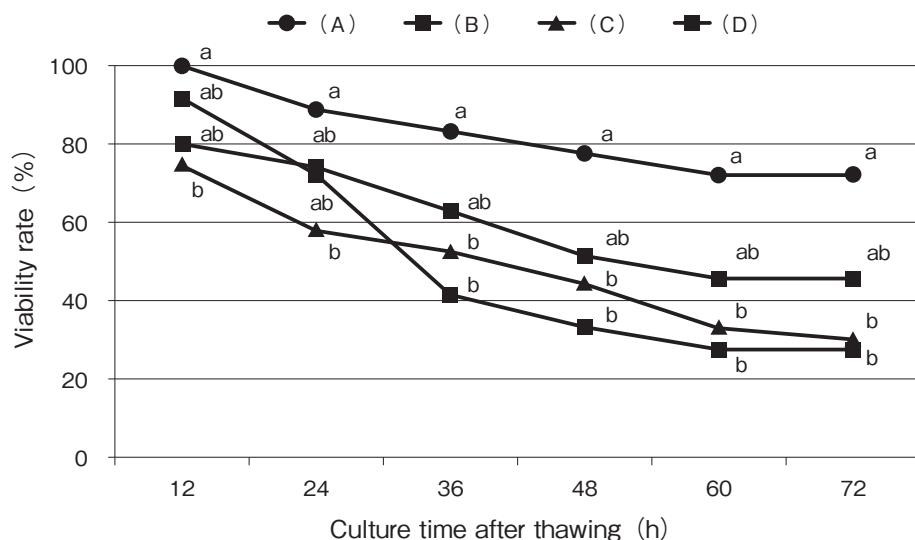


Fig. 1 Effects of near-infrared laser irradiation on the viability of frozen-thawed bovine embryos. (A) non-cryopreserved, (B) non-irradiated, (C) irradiated at 0h after thawing, (D) irradiated at 3h after thawing. a-b : p < 0.05, calculated using Chi-Square analysis.

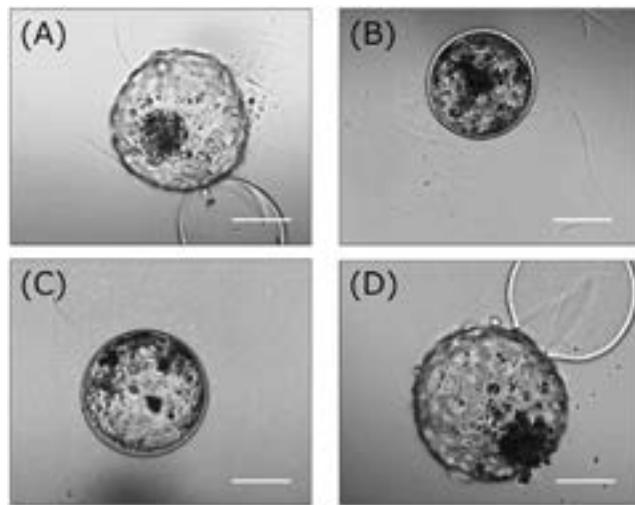


Fig. 2 Representative microphotographs of frozen-thawed bovine embryos cultured for 72h after thawing. (A) non-cryopreserved, (B) non-irradiated, (C) irradiated at 0h after thawing, (D) irradiated at 3h after thawing. All scale bars indicate 100 μ m.

胚盤胞に限っては品質を有意に改善させることができると示唆され、この方法を応用すれば、凍結保存胚の受胎性を改善させる効果も期待できると考えられる。

また、近赤外光の照射タイミングとしては、融

解直後よりも融解から3時間後が効果的であることが明らかとなった。Yamanakaら⁴⁾は、融解直後の受精卵内のミトコンドリアは小さく、その活性も低い状態であるが、融解後1.5時間からミトコンドリア活性は少しづつ回復し、融解後6時間

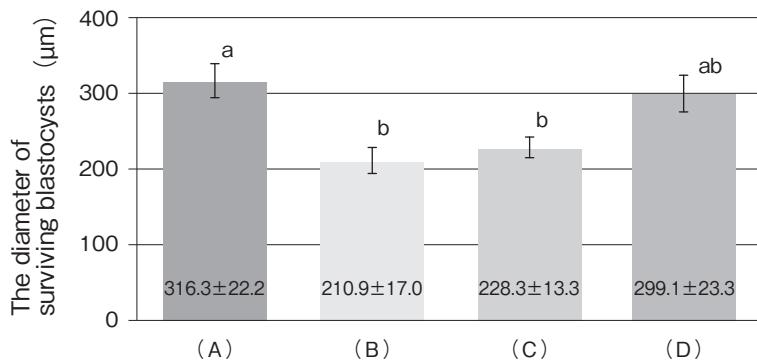


Fig. 3 Effects of near-infrared laser irradiation on the diameter of surviving bovine blastocysts at 72h after thawing. (A) non-cryopreserved, (B) non-irradiated, (C) irradiated at 0h after thawing, (D) irradiated at 3h after thawing. a-b : $p < 0.05$, calculated using repeated measures of ANOVA followed by Bonferroni correction.

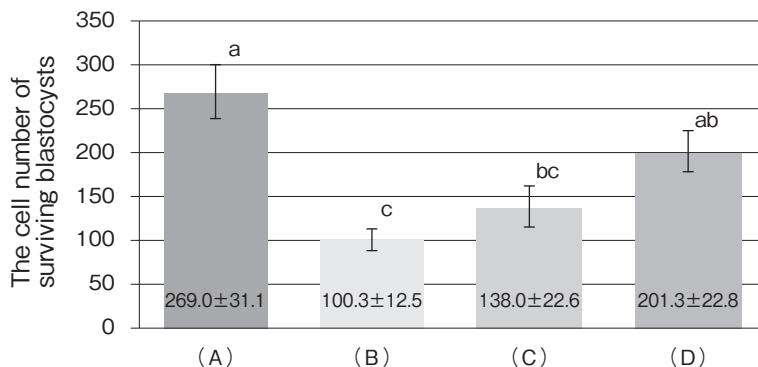


Fig. 4 Effects of near-infrared laser irradiation on the cell number of surviving bovine blastocysts at 72h after thawing. (A) non-cryopreserved, (B) non-irradiated, (C) irradiated at 0h after thawing, (D) irradiated at 3h after thawing. a-c : $p < 0.05$, calculated using repeated measures of ANOVA followed by Bonferroni correction.

後には凍結前とほぼ同等まで回復することを報告している。したがって、胚のミトコンドリア活性がある程度回復した時期に近赤外光を照射することで、胚盤胞のミトコンドリア活性を効率良く改善させることができ、品質改善効果が発揮されたと考えられる。生殖補助医療においては、ガラス化凍結保存した胚盤胞は、融解後2~3時間の回復培養を行ってから移植することが多いが、子牛の生産現場では融解直後に移植するダイレクト移植の需要が高い。したがって、生産現場において

も応用可能な近赤外光照射時期について、さらなる検討が必要と考えられる。

現在、実用化されている牛胚盤胞の凍結方法には、本研究で使用した方法（超急速ガラス化法）以外に、緩慢凍結法も普及している。緩慢凍結法とは、耐凍剤（クライオプロテクタント）を浸透させ、細胞外に氷晶を形成させることにより脱水・濃縮し、プログラムフリーザーを用いて毎分 0.3°C で -30°C まで緩慢に冷却する方法である。緩慢凍結法は、機械による一律の作業なので手間

がからず、移植時も超急速ガラス化法のように凍結液を取り除く手間がないことから、子牛生産現場で広く利用されている技術である一方、急速ガラス化法と比較して、胚のミトコンドリア機能にダメージが出やすいことが報告されている⁶⁾。

本研究の技術は、融解した胚盤胞に近赤外光を直接照射するだけの技術であることから、緩慢凍結法で凍結した胚の生存性を改善できることも期待され、今後、緩慢凍結した胚にも応用することが十分に可能であると考えられる。

以上、我々が開発した近赤外光による胚の品質改善技術は、牛凍結胚の品質改善技術としても有用である可能性を示すことができた。しかしながら、凍結融解によって低下する胚の生存性を改善させる効果がなかったことから、今後は、凍結のダメージを軽減し、生存胚盤胞の割合を増やすことができる照射条件・方法を検討していくことが課題である。また、子牛生産現場で応用可能な照射条件・方法も検討する必要がある。将来的に、受精卵の凍結ダメージを軽減する技術が確立できれば、凍結胚の受胎率を改善することが期待され、凍結胚を利用した我が国の子牛生産技術のさらなる普及にもつながると考えられる。

4. 要 約

本研究では、牛凍結胚に対する近赤外光照射の

影響を調査した。凍結融解胚の生存率を改善する効果は認められなかつたものの、生存胚盤胞においてはその品質を改善する効果が認められた。本研究により、近赤外光照射は牛凍結胚の品質改善技術としても有用である可能性が示された。

文 献

- 1) 横尾正樹, 伊藤-佐々木隆広, 珠玖仁, 末永智一, 阿部宏之: 呼吸活性を指標とした胚の品質評価: マウス胚移植試験の成績と産子の正常性について, 産婦人科の実際, 59, 1375~1379, 2010.
- 2) Yokoo, M., Abe, H.: Analysis of respiratory activity in the oocytes using by electrochemical measurement system, *Journal of Mammalian Ova Research*, 29, 170~174, 2012.
- 3) Abe, H., Shiku, H., Yokoo, M., Aoyagi, S., Moriyasu, S., Minamihashi, A., Matsue, T., Hoshi, H.: Evaluating the quality of individual embryos with a non-invasive and highly sensitive measurement of oxygen consumption by scanning electrochemical microscopy, *Journal of Reproduction and Development*, 52 (supple), s55-s64, 2006.
- 4) Yamanaka, M., Hashimoto, S., Amo, A., Ito-Sasaki, T., Abe, H., Morimoto, Y.: Developmental assessment of human vitrified-warmed blastocysts based on oxygen consumption, *Human Reproduction*, 26, 3366~3371, 2011.
- 5) Yokoo, M., Mori, M.: Near-infrared laser irradiation improves the development of mouse pre-implantation embryos, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 487, 415~418, 2017.
- 6) 戸嶋茂郎, 高橋文昭: 呼吸量計測によるウシ受精卵超急速ガラス化凍結法の評価, 表面技術, 63, 64~65, 2012.

胚ゲノム活性化および胚盤胞形成時期における新規代謝プロセスに基づく牛体外受精胚の体外培養法の改善

Improvement of *in vitro* culture of *in vitro* fertilized bovine embryos on the basis of novel metabolic processes during embryonic genome activation and blastocyst formation

山田 雅保

(京都大学農学研究科)

Masayasu Yamada

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

In the early mouse embryo, pyruvate (P) is essential for their development beyond the zygotic genome activation (ZGA) at the 2-cell stage, and for nuclear translocation of mitochondrial enzymes associated with metabolism of pyruvate to succinyl-CoA in TCA cycle during the ZGA. Interestingly, the effects of P are almost substituted with addition of a membrane permeable form of α -ketoglutarate, dimethyl α -ketoglutarate (dm- α KG) to -P medium. The aim of this study was to examine the localization of pyruvate dehydrogenase (PDH) in *in vitro* fertilization (IVF) derived bovine embryos during ZGA at the 8-cell stage, and the effects of P and/or dm- α KG on *in vitro* development of IVF bovine embryos beyond the ZGA. Immunofluorescence staining of bovine embryos at the 8-cell stage with antibodies against enzymatically both the active and the inactive forms of PDH (total PDH) revealed that total PDH was localized not only to the mitochondrion, but also in the nuclear compartment, but nuclear PDH was exclusively recognized by antibodies against phospho-PDH (inactive form) irrespective of the presence or absence of P and/or dm- α KG in medium, suggesting that unlike the case of mouse embryo, nuclear translocation of active mitochondrial PDH does not occur during the ZGA. Furthermore, it was found that addition of 4 mM dm- α KG to +P or -P medium significantly increased the developmental rates of IVF bovine embryos to the blastocyst stage, compared with +P or -P medium without dm- α KG, respectively. Further study is needed to clarify the mechanism for the promoting effect of dm- α KG on *in vitro* development of bovine embryos.

1. 目的

マウス前核期胚をピルビン酸除去培地で培養すると、胚は低エネルギー状態になり2細胞期で発生を停止し、さらにエピゲノム修飾因子として働

くアセチルコエンザイムA (Ace-CoA) や α ケトグルタル酸 (α KG) の産生量の減少とそれに伴うエピゲノムマークであるアセチル化およびメチル化ヒストンの減少によるグローバルな転写活性の低下も起こることから、卵割期の発生におい

て、ピルビン酸の供給は必須である¹⁾。また、ピルビン酸のAce-CoAへの代謝を触媒するピルビン酸脱水素酵素(PDH)と、ミトコンドリア内のTCAサイクルのAce-CoAからスクシニルCoAへの代謝を触媒するクエン酸合成酵素などの酵素が胚性ゲノムの活性化時期である2細胞期に一時的に、そしてピルビン酸依存的にミトコンドリアから核内へ移行し、そしてそのような酵素は核内でも活性を持つことから、Ace-CoAや α KGへの代謝が行われて、遺伝子発現の調節に関与していると考えられる。ヒト胚でも同様の酵素の核内への移行が胚性ゲノムの活性化時期である4細胞期に起こることも報告された¹⁾。

さらに興味あることに、培地からピルビン酸を除去すると、上述のようにマウス胚は低エネルギー状態となり2細胞期で発生停止するが、その培地に膜透過性を付与されたジメチル α ケトグルタル酸(dm- α KG)を加えると、低エネルギー状態は改善されないのにも関わらず、2細胞期以降の胚盤胞へ高率に発生するようになり、TCAサイクルの一部の酵素の核内移行も起こることが明らかにされた¹⁾。

本研究では、牛体外受精胚の体外培養において、マウス胚と同様に胚性ゲノムの活性化時期である8細胞期に、ピルビン酸依存的にPDHのミトコンドリアから核内への移行が起こるのか、そして牛体外受精胚の受精後の発生に及ぼすピルビン酸とdm- α KGの培地への単独添加、あるいは両添加の効果について検討した。

2. 方 法

2.1 牛卵母細胞の採取

食肉処理場で採取した牛卵巣の直径3~6mmの卵胞より未成熟卵子を吸引採取した。体外成熟培養には、細胞質が均一で卵丘細胞が数層緊密に付着している未成熟卵子を用いた。

2.2 体外成熟培養

卵子の成熟培養液には、0.02AU卵胞刺激ホルモン(FSH; アントリン、デンカ製薬)および10%FBSを添加したTCM-199(シグマアルドリッヂ)を用いた。成熟培養は38.5°C、5%CO₂、95%空気の条件下で24時間行った。

2.3 体外受精

凍結精液は37°Cの温湯中に30秒間浸漬して融解した後、IVF100(機能性ペプチド研究所)による遠心洗浄操作をマニュアルに従って行った。洗浄した精子は精子濃度が $1 \times 10^7/\text{ml}$ になるようにIVF100を加えて調整し、精子懸濁液とした。35mmプラスチックシャーレに3.5μlのIVF100のドロップを作成して、その中に3回洗浄した成熟卵子を20個ずつ導入した後に50μlの精子懸濁液を加えて38.5°C、5%CO₂、95%空気の条件下で体外受精を6時間行った。

2.4 体外培養

体外受精を終了した卵子は、血清無添加TCM-199培地の入った遠心チューブに移し、ボルテックスミキサーで90秒間攪拌して卵丘細胞を除去した。裸化卵をCR1aa培地で3回洗浄した後、あらかじめ200μlの発生培地を添加した低吸着性U底96ウェルプレートのウェルに5個/ウェルになるように導入し、それを38.5°C、5%O₂、5%CO₂、90%N₂の条件下で8日間培養した。発生培地として、5%FBS添加CR1aa培地(+P)、5%FBS添加ピルビン酸不含CR1aa培地(-P)、そして+Pあるいは-Pに0~4mMのdm- α KGを添加した培地を用いた。ただし、使用した培地にはおよそ0.4mMのピルビン酸を含むFBSが5%の濃度で付加されており、-P培地においても0.02mMと微量ではあるがピルビン酸が含まれていることになる。媒精日を0日として2日目に卵割率を、そして8日目に胚盤胞発生率を調べた。

2.5 免疫蛍光染色

体外受精後3日目の8細胞期胚を4%パラホルムアルデヒドで30分間室温処理することによって固定した。0.4% Triton Xを添加したPBS (PBST) で30分間処理し、3%BSAを含むPBST (ブロッキング液) で30分間ブロッキング処理した後、ブロッキング液で希釈した1次抗体による処理を4℃で一晩行った。胚をPBSTで十分洗浄した後に、ブロッキング液で希釈した2次抗体で60分間室温処理した。ヘキスト33342 (10μg/ml) 溶液で20分間室温処理することによって核染色した。次に、胚をスライドガラス上にグリセリンでマウントした後に、蛍光顕微鏡 (FSX100, Olympus, Tokyo, Japan) によって観察した。

1次抗体として、活性型と不活性型PDHの両方を認識するマウスモノクローナル抗体 (1:50希釈, sc-377092, Santa Cruz Biotech.) とリン酸化PDH (不活性型) に対するウサギモノクローナル抗体 (1:50希釈, ab177461, Abcam), そして2次抗体として、Alexa594標識抗マウスIgG抗体 (1:100希釈, A11032, Invitrogen) と Alexa488標識抗ラビットIgG抗体 (1:100希釈, A11034, Invitrogen) を使用した。

3. 結果と考察

牛体外受精胚では、8–16細胞期に胚性ゲノムの活性化が起こることから、8細胞期に活性型PDHがミトコンドリアから核内へ移行するのかを活性型と不活性型の両方を認識するPDH抗体 (Total PDH抗体) と不活性型を認識するリン酸化PDH抗体を用いた免疫蛍光染色によって検討した。ピルビン酸とdm- α KGの添加あるいは無添加に関わらず、それぞれの培地で発生した8細胞期胚では、Total PDH抗体によってミトコンドリアだけでなく核も染色されたが、リン酸化PDH抗体では主に核内が染色された (Fig. 1)。したがって、体外培養牛受精胚では、マウスおよびヒト胚とは異なり、胚性ゲノムの活性化時期においても活性化型PDHは細胞質のミトコンドリアに局在し、ピルビン酸依存的な核内への移行は起こらないことが示唆された。

牛胚では胚性ゲノムの活性化時期である8細胞期において、PDHの核内への移行が起こらない理由は今のところ不明であるが、着床前の初期胚では8細胞期ごろからミトコンドリアは形態的かつ機能的に成熟するとともに、胚のエネルギー要求性が高まる²⁾ことから、おそらくは、ミトコン

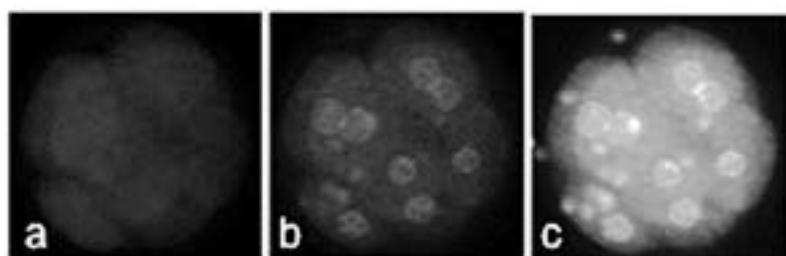


Fig. 1 Immunofluorescence staining of pyruvate dehydrogenase (PDH) in bovine 8-cell embryo cultured in +P medium with 4mM dm- α KG
a. Anti-PDH (total) antibody shows staining in nucleus and cytoplasm.
b. Anti-phospho-PDH antibody staining shows that PDH (inactive) exclusively exists in nucleus.
c. Hoechst staining

Table 1 Effects of pyruvate and dimethyl α ketoglutarate (dm- α KG) on development of bovine embryos cultured in medium with or without pyruvate.

Pyruvate (mM)	dm- α KG (mM)	No. of oocytes examined	No. (%) of cleaved embryos	No. (%) * of blastocysts
0.4	0	126	107 (84.9)	30 (28.0) ^b
	1	114	91 (79.8)	27 (29.7) ^b
	4	124	96 (77.4)	51 (53.1) ^a
0	0	116	90 (77.6)	6 (6.7) ^c
	4	118	98 (83.1)	28 (28.6) ^b

*Percentage is the ratio of blastocysts to cleaved embryos.

^{a,b} Values with different superscripts within the same column are significantly different ($p<0.05$)

ドリア内でのPDHを含むTCAサイクルの多くの酵素の消失は、牛胚の発生にとって好ましくない胚の低エネルギー状態を招くことになるからであろうと推察される。今後、牛胚の胚性ゲノムの活性化と代謝との関係を明らかにすることは、その発生メカニズムの解明にとって重要と考えられる。

次に、牛体外受精胚の胚盤胞への発生に及ぼす培地へのピルビン酸あるいはdm- α KG添加の効果を検討した (Table 1)。その結果、体外受精後8日目の胚盤胞への発生率は、-P培地ではほとんどの胚が8細胞期以前に発生を停止するのに対して、+P培地では高率に胚盤胞へ発生した。よって、体外培養における牛胚の胚盤胞への発生はピルビン酸に依存していることが分かる。一方、-Pあるいは+P培地における牛体外受精胚の発生に及ぼすdm- α KGの効果について検討した結果、+P培地における胚盤胞への発生率は1 mM dm- α KG添加では無添加区と変わらないのに対して、4 mM dm- α KG添加によって有意に増加した。また-P培地においても、4 mMのdm- α KGを添加することによって、胚盤胞期への発生率は無添加区に比べて有意に増加した。したがって、dm- α KGはピルビン酸の濃度に関わらず牛体外受精胚の発生を促進する効果のあることが明らかとなった。

最近、dm- α KGがマウス胚性幹細胞の多能性

の維持と自己複製を促進し、逆に細胞膜透過性コハク酸を培地に添加することによってコハク酸に対する α KGの比率 (α KG/コハク酸) が低下するとES細胞の分化が促進されることが報告された^{3,4)}。ミトコンドリアでのTCAサイクルの中間代謝産物である α KGは、ヒストン脱メチル化を引き起こす酵素JmjC-domain containing histone demethylases (JHDM) やten-eleven translocation (TET) タンパク質が酵素活性を發揮するうえで不可欠な分子であり⁵⁾、実際にES細胞での α KG/コハク酸の増加は、ヒストンやDNAの脱メチル化による多能性および自己複製に関連する遺伝子の発現を調節している³⁾。したがって、牛初期胚の胚盤胞への発生を促進するdm- α KGの効果は、ミトコンドリアでの α KG/コハク酸の増加を引き起こし、ES細胞での作用機構と同様に、胚発生に必要な遺伝子発現のエピジェネティック調節によって発揮されるのではないかと推察される。

4. 要 約

本研究では、牛体外受精胚の胚性ゲノムの活性化時期（8細胞期）におけるピルビン酸脱水素酵素 (PDH) の局在について検討した。免疫蛍光染色により、8細胞期胚ではリン酸化PDH（不活性型）が主に核内に観察されることから、活性型PDHは細胞質内のミトコンドリアに局在する

ことが示唆された。この結果は、胚性ゲノムの活性化時期に活性型PDHがミトコンドリアから核内に移行するマウス胚やヒト胚とは異なる結果であった。次に牛体外受精胚の体外発生に及ぼすピルビン酸とdm- α KGの影響について検討した。胚盤胞への発生はピルビン酸によって促進され、さらに-P培地あるいは+P培地のいずれにおいても4 mM dm- α KGによって胚盤胞への発生は無添加区に比べて有意に促進されることが明らかとなった。

文 献

- 1) Nagaraj, R., Sharpley, M. S., Chi, F., Braas, D., Zhou, Y., Kim, R., Clark, A. T., Banerjee, U. : *Cell*, 168, 210~223, 2017.
- 2) Calarco, P. G., Brown, E. H. : *J Expt Zool*, 171, 253~83, 1969.
- 3) Carey, B. W., Finley, L. W., Cross, J. R., Allis, C. D., Thompson, C. B. : *Nature*, 518, 413~416, 2015.
- 4) TeSlaa, T., Chaikovsky, A. C., Lipchina, I., Escobar, S. L., Hochedlinger, K., Huang, J., Graeber, T. G., Braasm D., Teitell, M. A. : *Cell Metab*, 24, 485~493, 2016.
- 5) Kaelin, W. G. Jr., McKnight, S. L. : *Cell*, 153, 56~69, 2013.

「豚の一腹産子数を一頭増やす」子宮の免疫調節を担う 精漿タンパクの特定

Identification of seminal plasma proteins responsible for regulating immune system in porcine uterus "to increase litter size"

奥 山 みなみ

(大分大学医学部医学科)

Minami W Okuyama

(Faculty of Medicine, Oita University)

For the establishment and maintenance of pregnancy, physiological factors such as immune system influence each other and play an important role. In human and mouse, it was reported that seminal fluid changed the cytokine expression and induced regulatory T cells (T-reg) in uterine. It was also reported that pregnancy changed lymphocyte subsets in peripheral blood. In porcine, it was suggested that there was the relationship between the cytokine expression pattern of uterine and the fertility. However, there was no report that deal with the changes in cytokine expressions and constitution of lymphocytes in porcine peripheral blood related to reproductive event. In the present study, the effect of mating and seminal plasma (SP) on cytokine expressions in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) was evaluated in sows.

Total 8 breeding sows were used in this study. Blood samples were collected from three sows in luteal phase, and also collected during last 24 hours up to the mating and during 12 to 24 hours after the mating from 6 sows, 3 of those had injected 1,000 IU of equine chorionic gonadotropin (eCG) at weaning and the others without treatment. The mRNA expressions of interferon (γ), interleukin (IL)-2, -4, -8, -10, -17 and Foxp3 in PBMC were measured in realtime-PCR.

IL-2 expression in sows those had been injected eCG was higher than untreated ($p < 0.05$) and IL-2 expression tended to decrease after mating ($p=0.08$) compared to before mating. The values of IFN- γ , IL-4 and IL-17 expressions were varied largely between individuals before mating, but the variation seems to be reduced after mating. It was suggested that estrus or mating influenced to cytokine expressions in PBMC.

In conclusion, there were some changes in cytokine expressions of PBMC were observed. Therefore, it is suggested that the systemic immune system changes as well as the uterine by the reproductive stage.

1. 目的

養豚現場では、離乳後の初回発情時に自然交配または人工授精を行うため、発情回帰日数を延長させずに交配を成功させることで効率的な生産が行われる。このため母豚は離乳時に母豚に対して馬絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）を投与し、離乳後4～5日に発情を誘起する処置として養豚場で広く実施されている¹⁾。

妊娠の成立・維持には母体の栄養状態や内分泌、免疫応答など、様々な生理的な要因が関与しており、互いに作用することで生殖機能を調整している。特に免疫系の役割としては、生体防御と免疫寛容がバランスを保ちながら働く必要があり、これらには子宮におけるリンパ球などの免疫細胞の出現やサイトカインによる免疫調節が関係している²⁾。近年、精漿中のタンパク質が交配時に子宮内膜に作用し免疫機能を調節し受胎性に関与することが分かってきた。

妊娠の成立・維持に重要な役割を果たすと考えられている免疫細胞の一つにヘルパーT細胞がある。ヘルパーT細胞はサイトカインを産生することで免疫機能調節の中心的な役割を担うとともに、サイトカインや抗原提示細胞からの刺激を受け、Th1, Th2, Th17, 制御性T細胞（T-reg）などのサブセットに分化する。豚では精漿が子宮内への白血球の浸潤やサイトカイン発現に影響を及ぼすこと³⁾や交配後に子宮内でヘルパーT細胞やT-regが増加すること⁴⁾が報告されている。また、子宮への精漿の暴露が受胎率および産子数を増加させるとの報告もある^{5, 6)}。さらに、精漿を除いた希釈精子液で人工授精した豚に比べ、精漿を添加した希釈精子液で人工授精した豚ではその産子数が多く、また子宮内膜組織中の授精から3時間後のIL-2発現量が低いことが報告されている⁷⁾。このように交配時に子宮で起きている免疫

の変化は、精漿の子宮の免疫系への作用を介して、受胎率や産子数などの繁殖成績に影響を及ぼしている。ヒトやマウスでは、全身の免疫系も局部と同様に変化することが妊娠の成立および維持に影響していると考えられていることから、豚においても末梢血の免疫系が同様に変化し、妊娠の成立および維持に影響を及ぼしているのではないかと推察される。そこで本研究では、精漿を利用した豚の繁殖成績向上を目指し、豚の発情・交配による末梢血中の免疫細胞に及ぼす影響を評価するため、末梢血から末梢血単核球（PBMC）を分離し、ヘルパーT細胞が産生するサイトカインおよび白血球遊走に関わるケモカインのmRNA発現について交配との関係を調べるために基礎データの収集を行った。

2. 方 法

2.1 材料採取とPBMC分離

実験には、繁殖母豚8頭（W1頭、L1頭およびWL6頭、0～3歳、未経産～7産）を使用した。本研究は北海道大学動物実験委員会（承認番号15-0089）および酪農学園大学動物実験委員会（承認番号VH17B2）に承認され、各大学の動物実験規程に基づき実施した。母豚より血液を採取し、1,710×g、15分遠心し、血漿を分離し測定まで-30℃で保存した。バフィコートを回収し0.5mg/ml EDTA-2Na 添加 DPBS（以下EDTA-PBS）で希釈懸濁した。5倍希釈バーコール溶液にその懸濁液を重層し、800×g、30分遠心した後、上清とバーコール層の間にあるPBMCの層を回収した。その後EDTA-PBSを加え、200×gで10分間遠心し、上清を捨てる洗浄を3回実施した後、培養液に懸濁し、40μm Cell Strainerで濾過し分離したPBMCを以降の実験に用いた。培養液は RPMI-1640（R8758, Sigma-Aldrich）に100IU/mlペニシリン、100μg/mlストレプトマイ

シン、10%牛胎子血清に調整した。

2.2 PBMCの精漿添加試験

3頭の母豚について分離したPBMCを培養液中 $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、 $200 \times g$ で10分間遠心し、上清を捨て、再度培養液に懸濁したものをコントロール群、10%の精漿を添加した培養液に懸濁したものとSP群とし、それぞれ1 mlずつ 37°C 、5% CO_2 条件下で1時間培養した。精漿は、3品種の雄種豚計6頭より採取しプールしたものを -30°C で保存し、培養液への添加より前に $1.2\mu\text{m}$ 径の滅菌フィルターでろ過したものを用いた。

2.3 リアルタイムPCR

得られたPBMCのうち $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 細胞からISOGEN II（ニッポンジーン）を用いて、添付の指示書に従いRNAを抽出した。さらにReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡株式会社）を用いて逆転写反応を行い、cDNAを得た。リアルタイムPCRによりIL-2、IL-4、IL-8、IL-10、IL-17、IFN- γ およびFoxp3のmRNA発現量を測定した（Table 1）。内部標準にはUbiquitin Bを用い、 $\Delta\Delta$

CT法を採用した。測定にはTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix（東洋紡株式会社）およびLightCycler® 480 ver.2（Roche Diagnostics, Indianapolis）を用いて測定した。增幅条件は、初期変性（ 95°C 、60秒間）の後、変性（ 95°C 、15秒間）、アニーリング（ 60°C もしくは 62°C 、30秒間）および伸長反応（ 72°C 、45秒間）を45サイクル行った。

2.4 血漿中ステロイドホルモン濃度測定

血漿中プロジェステロン（P4）およびエストラジオール（E2）は既報⁸⁾の方法に従って測定した。

2.5 実験計画

黄体期の血液材料は交配していない母豚3頭から、最も強い発情徵候を示した日から11～13日後に採取した。交配前後の血液材料は経産豚6頭から採取した。離乳時にeCG（動物用セロトロピン、あすかアニマルヘルス株式会社）を1,000IU筋肉注射して発情を誘起した3頭と、無処置の3頭から、離乳後の初回交配からその24時間前までの24時間（交配前）および初回交配から12～24時間後

Table 1 Oligonucleotide primers and annealing temperature used for realtimePCR

Gene	Primer (5'-3')	Size (bp)	GenBank	Annealing Tm (°C)
IL-2	F : GCTACAGAATTGAAACACCTTCAGT R : GAGTCAGAGTTTTGCTTGACCTA	92	NM_213861	60°C
IFN- γ	F : TCAGTCAGCATCAAGGGTCA R : GGGCAGAACAGAGAGGGTTA	134	NM_213948	62°C
IL-4	F : TTCGGCACATCTACACAGACAC R : TTTCATGCACAGAACAGGTCA	101	NM_214123.1	60°C
IL-10	F : TGGAAGACGTAATGCCGA R : CCCTCTCTGGAGCTTGCTA	186	NM_214041	60°C
IL-17	F : ACTCGGGCTGTATCAATGCT R : AGCCCACGTGTCACCATCACT	144	NM_001005729	60°C
IL-8	F : TGCAATAAACCGATTCCAC R : TTGTTGTTGCTTCTCAGTTCTC	198	NM_213867*	60°C
Foxp3	F : GCAGTCTCTGGAACAACAGC R : CAATACAGCAGGAACCCCTTG	131	NM_001128438	60°C
Ubiquitin B	F : TGTTGGCGTTTCGCTGTTG R : AGTGCAGGCCATCCTCCAGCT	248	NM_001105309*	60°C

*Yamaguchi et al., 2013

までの12時間（交配後）に血液材料を採取した。発情鑑定は、朝夕2回の背圧試験による不動反応および外陰部所見により判定し、発情と判断された場合、自然交配または人工授精を行った。

2.6 統計解析

統計解析については、各ステージのサイトカイン、転写因子、および血漿中ステロイドホルモン濃度は一元配置分散分析を行った後、Tukey-KramerのHSD検定を用いて比較した。交配前後のサイトカイン発現および血漿中ステロイドホルモン濃度については二元配置分散分析を行い、離乳時のeCG投与の有無と交配前後が及ぼす影響について比較し、Post hoc検定にはStudentのt検定を行った。いずれの解析においても $p < 0.05$ を有意差とした。

3. 結果と考察

本研究では、豚の交配における末梢血のリンパ球への影響を検討するため、末梢血からPBMCを分離し、ヘルパーT細胞のそれぞれサブセットの指標、すなわちTh1の指標としてIL-2およびIFN- γ 、Th2の指標としてIL-4およびIL-10、Th17の指標としてIL-17、T-regの指標として転写因子であるFoxp3のmRNA発現を測定した。さらに、白血球を遊走させるケモカインとしてIL-8のmRNA発現を測定した。

超音波画像診断により交配後採材時の卵胞の大きさはeCG処置母豚3頭で7～10mm、無処置母豚3頭のうち1頭は前卵胞が排卵しており、2頭は一部の卵胞が排卵していた。血漿中ステロイドホルモン濃度の結果（Table 2）、P4濃度は交配前および交配後に比べ黄体期が有意に高かった（ $p < 0.01$ ）。E2濃度は交配前が交配後に比べ有意に高かった（ $p < 0.05$ ）（Table 2）。また、E2およびP4濃度は離乳時にeCG処置母豚と無処置母豚の間で有意な差はなかった。これらは母豚の生殖ステージ中のホルモン変化を調べた報告^{9, 10}と一致する。無処置母豚は5～8日後、eCG処置母豚は離乳からより早い3～4日後に発情を示したことから、eCGによる発情誘起ができていたと考えられる。

交配前後および黄体期におけるmRNA発現は（Fig. 1），いずれのサイトカインについても各ステージ間で有意差はなかった。交配前後で変化傾向が認められたIL-2、IFN- γ 、IL-4およびIL-17のmRNA発現について、eCG処置母豚および無処置母豚の個体ごとの交配前後の変化をFig. 2に示した。IL-2の発現量はeCG処置母豚において有意に高く（ $p < 0.05$ ），また交配前に比べ交配後に低下する傾向にあった（ $p = 0.08$ ）。IFN- γ 、IL-4およびIL-17の発現量はeCG処置の有無や交配前後で有意な差異は認められなかつ

Table 2 Plasma Progesterone and Estradiol concentration in reproductive cycle

Samples		CL	Before	After
P4 (ng/ml)	Mean ± SD	17.9 ± 6.0 ^a	1.0 ± 0.7 ^b	1.6 ± 1.0 ^b
	Maximum conc.	22.5	2.1	3.1
	Minimum conc.	9.4	0.2	0.4
E2 (pg/ml)	Mean ± SD	2.7 ± 0.9 ^{AB}	26.1 ± 20.0 ^A	2.5 ± 1.0 ^B
	Maximum conc.	3.9	53.5	4.5
	Minimum conc.	1.8	2.1	1.2

CL : Samples in Luteal Phase

Before : Samples which were collected within 24 h before the first mating or AI

After : Samples which were collected within 12 to 24 h after the first mating or AI

a, b : ($p < 0.01$, Tukey-Kramertest)

A, B : ($p < 0.05$, Tukey-Kramertest)

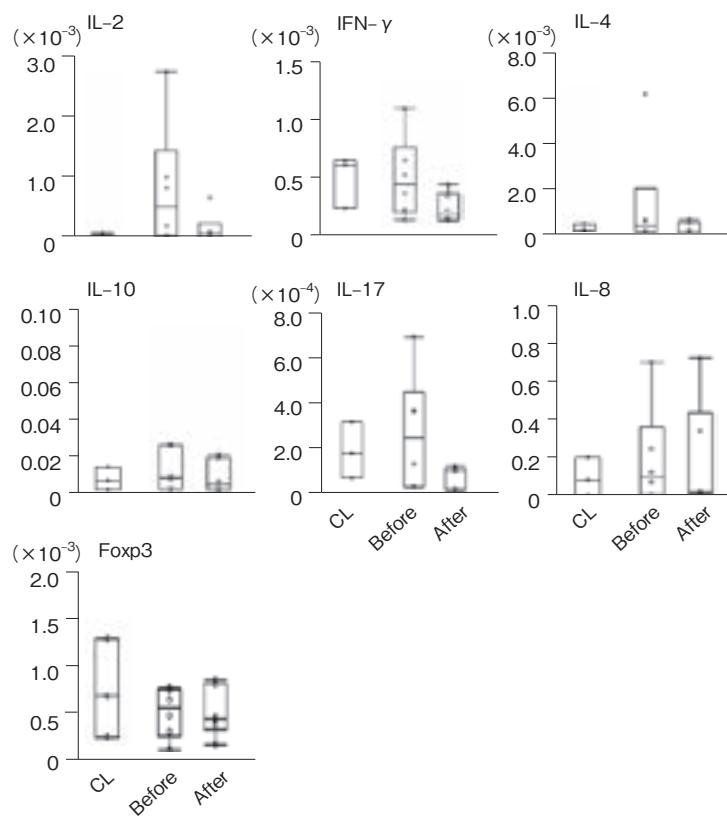


Fig. 1 Comparison of mRNA expression in PBMCs in reproductive cycle.

(There was no significant difference among groups. $p > 0.05$, Tukey-Kramer test)

CL : Samples in Luteal Phase

Before : Samples which were collected within 24 h before the first mating or AI

After : Samples which were collected within 12 to 24 h after the first mating or AI

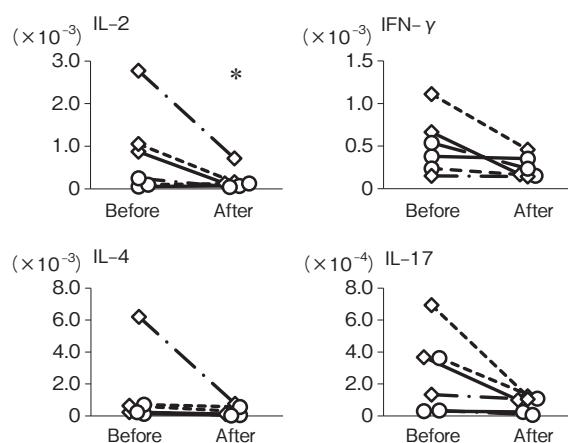


Fig. 2 Changes of cytokine expression in peripheral blood mononuclear cells in same sows. The diamonds (◇) represent sows treated with eCG and the circles (○) represent sows non-treated.

* : higher in eCG treated sows ($p < 0.05$) compared with non-treated

Before : Samples which were collected within 24 h before the first mating or AI

After : Samples which were collected within 12 to 24 h after the first mating or AI

たものの、交配前には大きかった個体間の差異が交配後には縮小しており、またeCG処置母豚の方が無処置母豚に比べ、交配前の個体間の差異が大きい可能性が示された（Fig.2）。本研究において交配前は離乳後の初回交配から24時間前までの24時間に採材しており、この時期は発情に向けてエストロジエンのピークや卵胞の発育など大きな変化が予想されるため、個体の状態に差が大きく、交配前のサイトカイン発現量もばらつきが大きくなつた可能性が考えられる。また、交配後については初回交配後の12時間に採材しているた

め、個体間の差異も小さく、また交配の刺激や精液の侵入によってサイトカイン発現が適正な水準に調整された、あるいは発情終了に向けてサイトカイン発現が元の水準に戻つた可能性が考えられる。

培養したPBMCsへの精漿添加については予備試験として3頭のみで実施したが、いずれのサイトカインについてもコントロール群と精漿添加群との間で有意差はなかった。それぞれの値を個別に示したところ（Fig.3），個体差はあるもののIL-8，10および17においてコントロール群に比

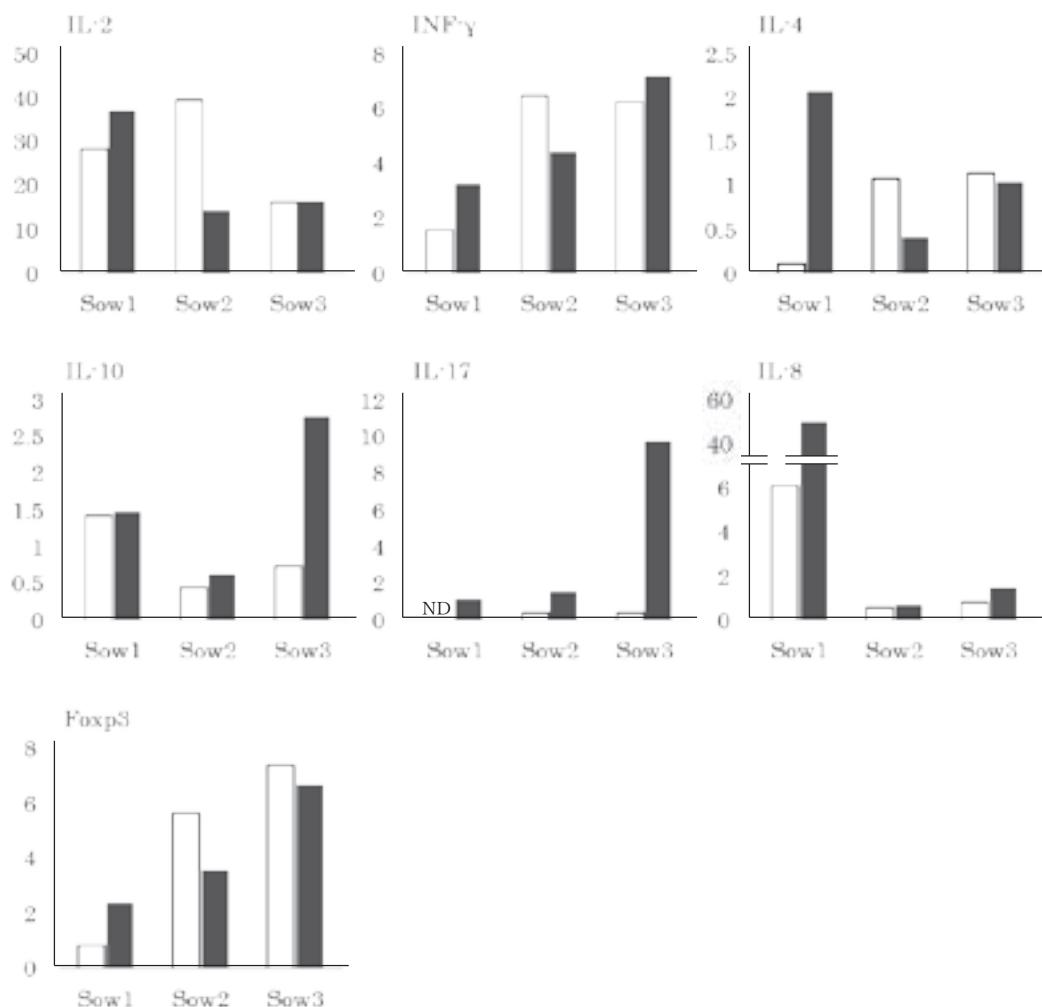


Fig. 3 Individual values of mRNA expression in PBMCs in control (open bar) and SP-treated (black bar) condition. Each value was calculated with the values before PBMC culture started as 1.

べ精漿添加群における発現量が増加する変化が見られた。IL-8は多くの細胞で産生される強力な白血球を遊走させる因子である¹¹⁾。豚の子宮内膜においても交配から3時間後に子宮内膜IL-8発現が増加し、特に精子や精液希釈液の影響で大きく増加することが報告されている^{12, 13)}。子宮におけるIL-8を含めたケモカインは、白血球を遊走させ細菌の感染防止や受精に関与しない精子の除去などにより子宮環境を調節し、その役割は胚の生存に重要であると考えられ^{13, 14)}、今回の結果はそれらを反映したものと考えられる。

妊娠の成立および維持において重要な役割を果たすヘルパーT細胞のサブセットは互いに分化・活性化を抑制し合うことでバランスを保っている。マウスでは交配時に精漿が子宮に作用し、子宮および末梢血において交配後にT-regが増加する¹⁵⁾。ヒトでは妊娠時には子宮および末梢血においてTh1・Th2バランスがTh2優位になること、またT-regが増加することが知られており、Th2優位によるTh1の細胞性免疫の抑制やT-regの免疫抑制作用が、胚への免疫寛容・妊娠維持において重要な役割を担っている^{16, 17)}。このようにヒトやマウスでは、交配や妊娠に伴い生じる免疫系の変化が子宮局所だけでなく末梢血においても認められることが知られていることから、交配や妊娠は全身の免疫系に影響していると考えられる。本研究においてはヒトやマウスと同様の変化を豚で確認することはできなかったが、豚におけるヘルパーT細胞およびサイトカインの役割にはまだ不明な点が多いため、今後は動物種差を考慮したさらなる詳細な検討が必要である。

4. 要 約

豚の交配における末梢血のリンパ球への影響を検討するため、末梢血からPBMCを分離し繁殖ステージにおけるサイトカイン発現mRNA発現を

測定し、交配および精漿の影響を評価した。

IFN- γ , IL-4, -17については交配前に大きかった個体差が交配後に縮小したことから、発情または交配によりPBMCのサイトカイン発現が適正な水準に調節されることが示唆された。

培養PBMCへの精漿添加によってIL-8発現が増加したことから、精漿がPBMCにおいても遊走作用を惹起する可能性が示された。

生殖ステージに応じてPBMCのサイトカイン発現に一部変化が認められたことから、豚において子宮局所と同様に全身の免疫系にも変化が生じることが示唆された。

文 献

- 1) 齊藤利朗他：北畜会報, 41, 36~52, 1999.
- 2) Ernerudh, et al. : *Am J Reprod Immunol*, 65, 31~43, 2011.
- 3) O'Leary, et al. : *Reproduction*, 128, 237~247, 2004.
- 4) Jalali, et al. : *Mol Reprod Dev*, 81, 270~281, 2014.
- 5) Murray, et al. : *J Anim Sci*, 56, 895~900, 1983.
- 6) Mah, et al. : *J Anim Sci*, 60, 1052~1054, 1985
- 7) 奥山みなみ他：第108回日本繁殖生物学会大会講演要旨集, 104, 2015.
- 8) Yanagawa, et al. : *J Reprod Dev*, 61, 61~66, 2015.
- 9) Robertson, et al. : *J Reprod Fertil*, 40, 133~141, 1974.
- 10) Noguchi, et al. : *Reproduction*, 139, 153~161, 2010.
- 11) 矢田純一：医系免疫学改訂12版，中外医学社，378~384, 2011.
- 12) Schuberth, et al. : *Theriogenology*, 70, 1174~1181, 2008.
- 13) Taylor, et al. : *Reprod Domest Anim*, 44, 180~188, 2009.
- 14) Lorenzen, et al. : *Veterinary Research*, 46, 116, 2015.
- 15) Robertson, et al. : *Biology of Reproduction*, 80, 1036~1045, 2009.
- 16) Wegmann, et al. : *Immunology Today*, 14, 353~356, 1993.
- 17) Saito, et al. : *Am J Reprod Immunol*, 63, 601~610, 2010.

牛精液および受精卵の未凍結保存に向けた過冷却促進物質の配合デザイン

The blend design of supercooling facilitating materials for non-cryopreserve of bovine semen and early embryo

星野由美

(広島大学大学院生物圏科学研究所)

Yumi Hoshino

(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

Cryopreservation is extensively used for the preservation of reproductive cells such as sperm, oocyte and early embryo. This method offers a major advantage as the frozen material can be preserved almost permanently in liquid nitrogen. However, DMSO and ethylene glycol used in the preservation solution are known to be cytotoxic, and cellular damage by freezing injury is responsible for the low fertilization and development rate. In this study, the validity of plant-derived non-cryopreserve compounds were inspected with the aim of developing a non-freeze preservation technology for the preservation of semen and early embryo. The coffee extract was used as supercooling-accelerating substances. The component of the coffee extract was caffeine, caffeic acid, ferulic acid, coumaric acid, chlorogenic acid. The suprecooling-facilitating activity of caffeine was highest. The supercooling-promoting effect was observed with coffee extract and caffeine during preservation of semen and 2-cell embryo for 14 days at -6°C. The viability and motility of the sperm were good by adding coffee extract or/and caffeine, and structure of the cell membrane in the 2-cell embryo was maintained by adding. As a result, in coffee extract and caffeine added group, 2-cell embryos were developed to blastocyst even after 14 days preservation at -6°C. In this study, supercooling preservation of semen and embryos were achieved by using supercooling-accelerating substances such as coffee extract and caffeine. When the appropriate condition can be built, non-cryopreserve of semen and early embryo would become possible.

1. 目的

生殖細胞の保存は、優良形質をもつ家畜遺伝資源の活用や希少動物の遺伝子保存に有効であり、必要不可欠な技術となっている。細胞の長期保存には、ガラス化法や緩慢凍結法などの凍結保存法

が広く用いられており、液体窒素中で半永久的な保存が可能である。しかし、凍結により生じる細胞膜へのダメージや、保存液に含まれる凍害保護物質による細胞毒性は、現行の凍結保存法では避けることができない^{1,2)}。また最近の研究によると、保存液に含まれる凍害保護物質が受精卵移植

後に子宮内で炎症を引き起こす原因になることも指摘されている。精子や受精卵がダメージを受けると、細胞の生存やその後の受精・発生に大きく影響する。これらの問題を回避するために、過冷却を利用した未凍結での保存法を検討する。関西大学の河原秀久教授らは、植物（ヒノキ、大根など）や食品廃棄物（コーヒー粕、あん粕など）から氷晶形成抑制物質を発見し、その抽出に成功している³⁾。氷晶形成抑制物質には、不凍タンパク質や過冷却促進物質として分類されるものがある。これを適切な濃度で加えると、低温下でも氷核形成が抑制されるため、過冷却状態を維持させることができる。一般に液体が凝固点以下でも固体にならない状態を過冷却というが、液体中に異物が存在すると過冷却温度は上昇し凍結しやすくなる。しかし、氷晶形成抑制物質を添加することで過冷却温度を下げることが可能になるため、細胞や組織の保存に有効であると考えられる。本研

究では、植物由来の氷晶形成抑制物質を用いて、細胞毒性のない保存液で生殖細胞の未凍結保存の可能性を検証するとともに、精液や受精卵を未凍結で保存するための過冷却促進物質の配合デザインを検討することとした。

2. 方 法

植物由来の抽出液に含まれる過冷却促進物質（氷晶形成抑制物質）を単離・精製し、含有成分を分析することにより抗酸化効果や代謝制御に関わる物質を探索し、細胞保存に有効な成分を検討した。過冷却促進物質の単離・精製および含有成分の分析は、関西大学の河原秀久教授の協力を得た (Fig. 1)。

生殖細胞における過冷却保存の条件を検討するため、マウスを用いて予備実験を行った。まず、ICR成熟雄マウスの精巣上体尾部より精子塊を採取した。採取した精子塊は、37°Cに加温したUW

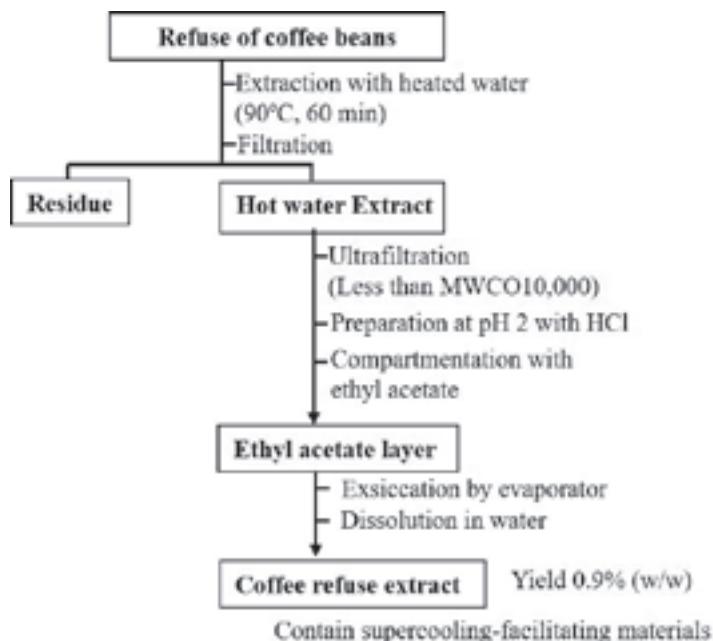


Fig. 1 The preparation of the coffee refuse extract containing supercooling-facilitating materials.

液 (University of Wisconsin (ViaSpan), アステラス製薬) 100 μ l のドロップに10分間静置し、精子を自然に懸濁させた。均一に拡散した精子懸濁液10 μ l は各保存液100 μ l に希釈して過冷却保存に供した。温度制御と過冷却維持には超低温アルミブロック恒温槽 (クライオポーター, サイニクス) を使用し、20°C から段階的 (0.1°C／分) に温度を下げ、-6°Cで1, 3, 7, 14日間保存を行った。温度回復時には、段階的 (0.1°C／分) に温度を上げ、20°Cで回収した。温度制御は、Berendsenらの方法に準じて行った⁴⁾。精子の健常性は、HTF培地で培養1時間後の生存性と運動性、その後の体外受精によって評価した。

受精卵の保存には、体外受精後2細胞になったものを選別し、100 μ l の保存液に浸漬して過冷却保存を行った。保存条件は精子と同様であった。過冷却保存後、受精卵はKSOM培地で培養し胚盤胞までの発生率を調べた。マウスでの保存条件に基づき、牛精液および受精卵の過冷却保存条件の検討を行った。

3. 結果と考察

コーヒー粕抽出液 1 mg/mlに含まれる成分を分析したところ、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、クマル酸が主として含まれていることが明らかになった。それぞれの濃度と抗氷核活性値を比較したところ、弱酸性フェノール層にカフェインが多く含まれ、抗氷核活性が最も高かった。カフェインは哺乳動物の卵子や受精卵の活性を維持する効果があり、培養液にも添加されることが多い⁵⁾。このことから、本研究ではコーヒー粕抽出液とカフェインを過冷却促進物質として使用することとした。それぞれ0.5または1.0mg/mlの濃度になるようUW液に添加し、水晶形成抑制効果(過冷却促進効果)を検証したところ、どちらも-6°C～-12°Cの温度条件下で安定して過冷却を

維持できることを確認した。また、この温度条件下においては、14日間維持しても保存液の凍結は認められず、細胞保存に有効であると判断した。

精子をコーヒー粕抽出液またはカフェインを含むUW液で1, 3, 7, 14日間、-6°Cで保存したところ、生存性および運動性に効果が認められた (Fig. 2)。すなわち、UW液単独の保存液では保存14日後には運動性を有する精子は確認できなかつたが、コーヒー粕抽出液またはカフェイン添加区では精子の運動性が認められた (コーヒー粕抽出液添加区: 23%, カフェイン添加区: 47%)。さらにコーヒー粕抽出液とカフェインの混合添加区においては、さらにその効果は高く14日後に55%の精子で運動性が確認された。倒立顕微鏡下での形態観察においては、保存後の精子形態に異常は認められなかった。コーヒー粕抽出液に含まれる成分とカフェインが過冷却条件下においても精子の運動性維持に効果を発揮したものと考えられた。

受精卵の保存は2細胞期胚を対象とした。コーヒー粕抽出液またはカフェインを含むUW液で最大14日間保存した。保存後の細胞骨格の正常性を判定するため、F-actinおよび α -Tubulin抗体を用いた免疫蛍光染色を行った。UW液単独に比べ、コーヒー粕抽出液とカフェイン添加区において、細胞膜および微小管が安定していることを確認した。保存後の受精卵を体外培養し胚盤胞への発生率を比較したところ、保存3日以降でコーヒー粕抽出液とカフェインの有効性が示された (Fig. 3)。コーヒー粕抽出液とカフェインは単独でもそれ効果を発揮するが、混合添加はより効果が高い結果となった。

以上の結果から、精子や受精卵の保存においてコーヒー粕抽出液とカフェインを含むUW液が有効であり、-6°Cで14日間の未凍結保存が可能であることを示した。一般的に生殖細胞の体外操作

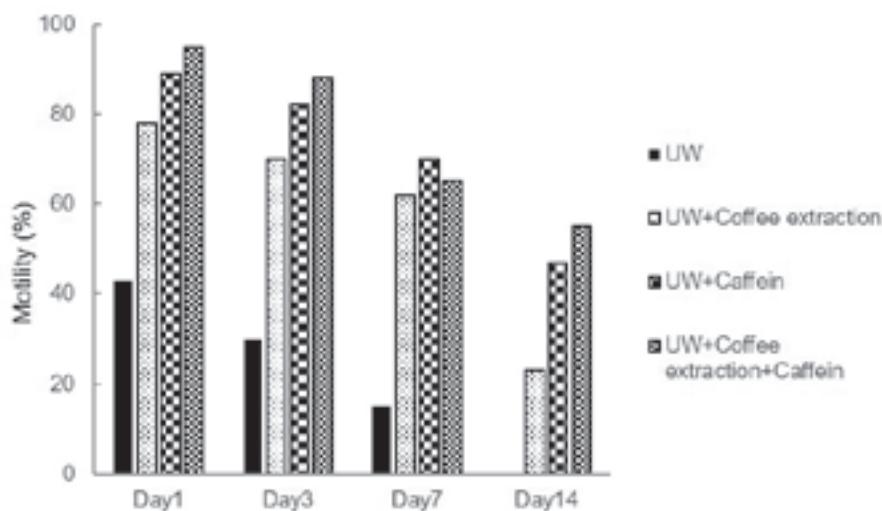


Fig. 2 The motility of the sperm after 1, 3, 7 and 14 days supercooling preservation.

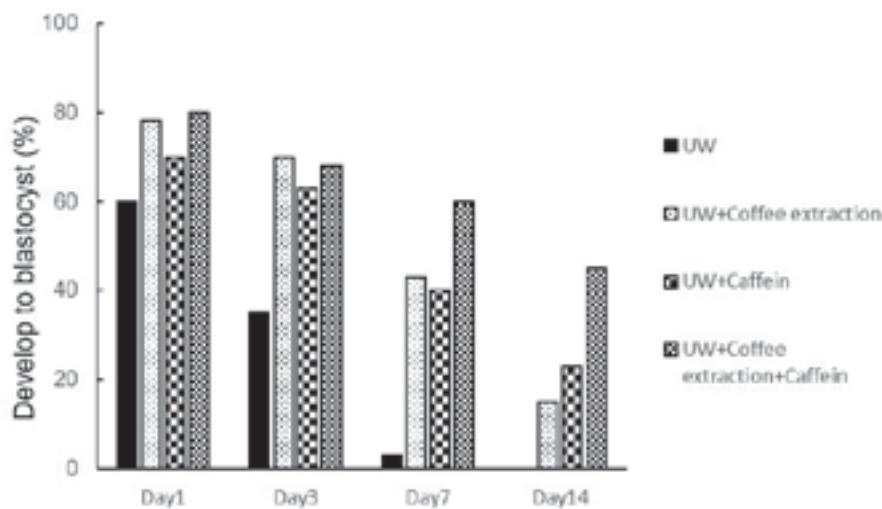


Fig. 3 The developmental rate to blastocyst after 1, 3, 7 and 14 days supercooling preservation.

過程では酸化ストレスが生じやすく、それによって生殖細胞はダメージを受ける⁶⁾。コーヒー粕抽出液に含まれるクロロゲン酸は抗酸化物質としても知られており、抗酸化作用によって細胞が保護されたことも考えられる。また受精卵においては、コーヒー粕抽出液添加区で細胞膜の安定性が高かったことから、抽出液含有成分に細胞膜の安

定性を維持する効果があったものと考えられた。

本研究では、コーヒー粕抽出液とその成分であるカフェインをUW液に添加することで、精子と受精卵の未凍結保存が可能であることを示した。動物種や対象細胞に最適な条件検討を行う必要はあるが、適切な条件を構築できれば、新規保存法としての発展が期待されるため、引き続き生殖細

胞の過冷却保存に有効な成分を探査し、保存条件の最適化を図っていく予定である。

4. 要 約

生殖細胞の保存には凍結保存法が広く用いられているが、細胞へのダメージは避けられず、融解後の受精や発生に影響を及ぼしている。現状の問題点としては、凍結により生じる細胞膜の損傷、保存液に含まれる凍害保護物質による細胞毒性、である。この問題を解決するために、本研究では植物由来の氷晶形成抑制物質を用いて、細胞毒性のない保存液で生殖細胞の過冷却保存（未凍結保存）の可能性を検証することとした。氷晶形成抑制効果が知られているコーヒー粕抽出液の有効成分を分析したところ、カフェイン、カフェ酸、クロロゲン酸、クマル酸が含まれ、特にカフェインで抗氷核活性（過冷却促進効果）が高いことが明らかになった。そこで、コーヒー粕抽出液とカフェインを過冷却促進物質として保存液に添加し、その効果を検証した。その結果、コーヒー粕抽出液とカフェインが精子や受精卵の過冷却保存に有効であり、-6℃の温度条件下で14日間の保存が可能であることを示した。保存効果はどちらも混合区で高かった。動物種や対象細胞に最適な

条件検討を行う必要はあるが、適切な条件を構築できれば新規保存法としての発展が期待される。

文 献

- 1) Mandawala, A. A., Harvey, S. C., Roy, T. K., Fowler, K. E. : Cryopreservation of animal oocytes and embryos : Current progress and future prospects, *Theriogenology*, 86 (7), 1637～1644, 2016.
- 2) Saragusty, J., Arav, A. : Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction*, 141 (1), 1～19, 2011.
- 3) Kawahara, H., Tagawa, E., Watanabe, C., Hamada, J., Hamada, S. : Characterization of Anti-Ice Nucleation Activity of the Extract from Coffee Refuse, *Biocontrol Sci.*, 22 (4), 205～211, 2017.
- 4) Berendsen, T. A., Bruinsma, B. G., Puts, C. F., Saeidi, N., Usta, O. B., Uygun, B. E., Izamis, M. L., Toner, M., Yarmush, M. L., Uygun, K. : Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation, *Nat Med.*, 20 (7), 790～793, 2014.
- 5) Ariu, F., Bogliolo, L., Leoni, G., Falchi, L., Bebbere, D., Nieddu, S. M., Zedda, M. T., Pau, S., Ledda, S. : Effect of caffeine treatment before vitrification on MPF and MAPK activity and spontaneous parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes, *Cryo Letters*, 35 (6), 530～536, 2014.
- 6) Agarwal, A., Aponte-Mellado, A., Premkumar, B. J., Shaman, A., Gupta, S. : The effects of oxidative stress on female reproduction : a review, *Reprod Biol Endocrinol*, 10 (49), 2012.

アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の妊孕性に及ぼす影響（Ⅱ）

Effects of adipokine and insulin resistance on the bovine fertility (Ⅱ)

小林 仁

(宮城大学食産業学群)

Jin Kobayashi

(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)

The present study aimed to identify compounds related to fertility in bovine maternal serum. In Experiment I, three cattle trying to pregnant with grazing because of infertility were used. Blood samples were collected at the start of grazing and mating which subsequently resulted in pregnancy. Sample were analyzed using metabolome analysis. In Experiment II, six breeding cows which were scheduled for fix-time insemination were used. Blood samples were collected at the immediately after delivery (2 weeks after delivery) and the insemination (6 weeks after delivery). Samples were analyzed using metabolic profile test (MPT). The analysis revealed four or six compounds, which were significant ($p < 0.05$) at mating compared to the start of grazing or at the start of grazing compared to mating, respectively. There were no compounds which increased more than two-fold at mating compared with the start of grazing or the start of grazing compared with mating (Exp I). The results of MPT from six breeding cattle showed that the blood glucose level at 6 weeks was less than 2 weeks in the cattle becoming pregnant. In contrast, the blood glucose level increased in empty cattle (Exp II). Although the cause of infertility was unknown, energy metabolism was considered to be involved in fertility.

1. 目的

近年、乳用牛の受胎率低下が世界的に続いている。遺伝的な改良による乳量の増加がその原因ともいわれ、深刻な問題となっている¹⁾。一方、我が国では肉用牛でも、人工授精による受胎率が継続して低下が起きている²⁾。不妊の要因として、急激な飼養頭数の上昇に伴う発情の見逃しや注入時期のずれなどの技術的な問題、脂肪交雑を重視した育種改良や飼養管理による影響などが指摘さ

れているものの、受胎率低下が止まらない状態が続いている。その原因の解明が急務となっている。

肉用牛の受胎率が低下する中、不妊の繁殖牛を受託して妊娠させる不妊牛専門の牧場が少数ながら全国的に開設されている。その一つであるH牧場は、受託した牛を放牧牧牛繁殖で飼養し、不妊となった繁殖牛を高率に妊娠させている。繁殖牛の人工授精による全国平均の受胎率が55.6%（家畜改良事業団、平成26年度）に対し、不妊牛を集めたH牧場の受胎率は8割以上としており、交配

方法の違い以外にも繁殖牛の妊娠性を改善する技術がH牧場の飼養管理には含まれていると考えられる。そこで、本研究では、H牧場に入牧して妊娠した不妊牛の入牧時と入牧後の血液を比較することで、H牧場で行われている妊娠性を回復させる機序を調べ、現在繁殖牛で起きている受胎率低下に関与するする原因の解明につなげることを目的とした。

初年目は、不妊牛の入牧時と入牧後の血液を用いて、代謝プロファイルテスト（MPT）を行い、牛群の栄養状態や健康状態から不妊に関与する血液成分について調べた。今回は、H牧場への預託によって妊娠性を回復した牛の、入牧時と入牧後の血液を用いてメタボローム解析を行い、不妊に関与する化合物の探索を行った。また、別の繁殖牧場の分娩後と種付け時の血液を採取しその後の妊否の結果から、血液成分と妊娠性との関係を調べた。

2. 方 法

2.1 試験Ⅰ：妊娠に至った不妊牛の血液成分のメタボローム解析

昨年調査した宮城県登米市南方町のH牧場で不妊牛として預託され妊娠に至った黒毛和種繁殖牛から3頭を選び、入牧時と妊娠に至った交配時の血清を比較してメタボローム解析を行った。メタボローム解析には、液体クロマトグラフィー質量分析法（LC : 1200 series(Agilent), 質量分析計 : LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific)）を用い、(株)アプロサイエンスに依託して行った。

2.2 試験Ⅱ：繁殖牛の分娩後のMPTと繁殖性

宮城県登米市米山町M牧場の繁殖牛群から無作為に黒毛和種6頭を抽出し、第1回目の採血を分娩直後（分娩後約2週間）、第2回目の採血を種付け時期（分娩後1月半）に行った。朝夕の飼料

給与時を避け、牛を保定して頸静脈から凝固促進用シリカ微粒子添加（SST）管およびフッ化ナトリウム添加（NaF）管の真空採血管を用いて採血を行った。採血後は保冷剤入りの保冷バッグに入れ、宅配便で冷蔵のまま研究室に送付した。採血の翌日、研究室で20分間冷却遠心して血清分離を行い、そのまま、または一旦-30°Cで凍結保存した後、血液生化学検査、ホルモンおよびアディポサイトカインを測定した。測定項目は、ブドウ糖（Glu）、尿素窒素（BUN）、総コレステロール（T-cho）、アルブミン（Alb）、総タンパク質（TP）、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（GPT）、アンドロステンジオン（A₄）とエストラジオール17 β （E₂）、TNF α とした。

3. 結果と考察

3.1 試験Ⅰ：妊娠に至った不妊牛の血液成分のメタボローム解析

入牧時と妊娠に至った交配時の血清サンプルについて精密質量分析を実施し、2,881種類の化合物ピークが得られた。FDR (false discovery rate)有意水準5%以下で、入牧時と妊娠に至った発情時（妊娠発情時）の化合物のピークについてt検討を行ったところ、入牧時のみに出現する化合物のピークは4種類、妊娠発情時のみに出現する化合物のピークは6種類であった。妊娠発情時に比較して入牧時にあるいは入牧時に比較して妊娠発情時に2倍以上多いピークはともに検出されなかった。

次に、二次元主成分分析（PCA）を用いてデータセットを分析した。PCAプロットを作成し、保存した血清サンプルを6つのグループに分けた（Fig. 1）。Factor 1（第一主成分）は23.5%を示し、50%を上回るfactorはみられなかった。このことから、今回用いた入牧時と妊娠に至った交配

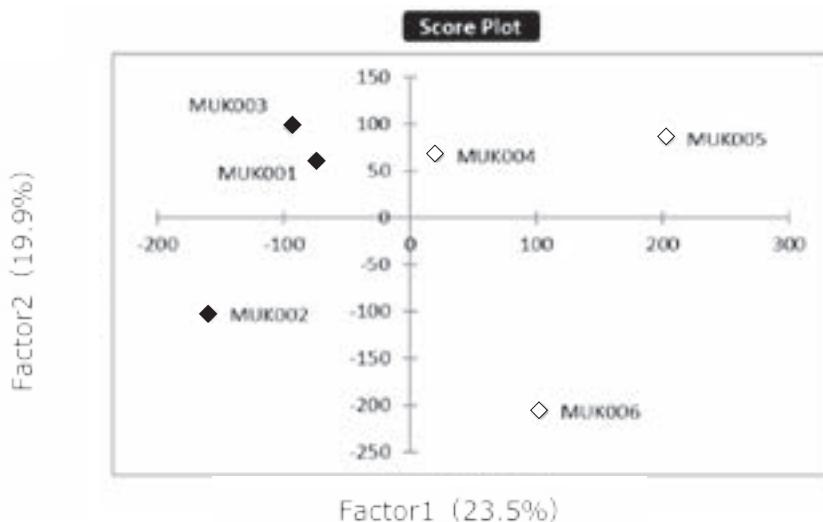


Fig. 1 Principal component analysis of infertile bovine serum. Blood samples were collected at the start of grazing (◆) and mating (◇) which resulted in pregnancy.

時の血清サンプルによるメタボローム解析では、妊娠性に関する要因の抽出は困難と判断された。

3.2 実験Ⅱ：繁殖牛の分娩後のMPTと妊娠性

繁殖牛群の中から6頭を抽出し、分娩直後および種付け時期に採血を行い、その後の妊娠の有無により血液成分と妊娠性の比較を行った。供試牛6頭のうち、定時人工授精により受胎したのは4頭で、2頭に発情の再発がみられた。この妊娠牛と不妊牛の血液成分を比較したところ、妊娠牛では種付け時期に血糖値が減少したのに対し、不妊牛では逆に上昇傾向を示した。一方、その他の血液成分には、一定した傾向は認められなかった。

牛の血糖値は糖新生によって生成されるため、食餌に由来する糖質に影響を受ける単胃動物に比べ比較的安定しており、単位動物と異なる反応を示す。エネルギー摂取が不足した場合、牛では糖新生が亢進するため、血糖値が一時的に上昇することが知られている^{3, 4)}。今回、不受胎となった繁殖牛にエネルギーの不足が起きていたと仮定すると、エネルギー不足が妊娠しなかった原因と

なっている可能性も考えられる。供試牛はすべて同じ牛房内で飼養され、妊娠に至らなかった2頭にBCSの減少など、深刻なエネルギー不足を示す兆候はみられなかった。しかし、妊娠性とも関係の深い視床下部-下垂体-性腺軸の中央制御にも関与する可能性のあるエネルギーセンサー機能が視床下部にあり、体重やBCSの変化のような表現系に先行して内分泌的にエネルギーバランスが負に傾いていることも考えられる。その制御のいくつかは内臓脂肪が産生するレプチンを介して行われていることも報告されている^{5, 6)}。肉用牛の繁殖では、るい瘦による不妊とともに過剰な脂肪蓄積による不妊も経験的に知られていることから、エネルギーバランスと受胎についてさらなる研究が必要である。

4. 要 約

不妊牛専門の牧場に預託され、その後妊娠した牛3頭の入牧時と妊娠に至った発情時の血清についてメタボローム解析を実施し、不妊に関与する

化合物の探索を行った。入牧時のみに出現する化合物のピークは4種類、妊娠発情時のみに出現する可能物のピークは6種類であった。妊娠発情時に比較して入牧時に2倍以上多いピークおよび入牧時に比較して妊娠発情時に2倍以上多いピークは共に検出されなかった。次に、定時授精を行う繁殖牛群から無作為に6頭を抽出し、分娩直後と分娩1月半後の血液成分と妊娠の有無を調べたところ、妊娠した牛と妊娠しなかった牛の血糖値の推移に違いがみられることが明らかとなった。

文 献

- 1) Butler, W. R. : Energy balance relationships with

follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows, *Livest Prod Sci*, 83, 211～218, 2003.

- 2) 家畜改良事技術研究所：受胎調査成績〔インターネット上ホームページ〕家畜改良事業団、前橋；[2018年3月10日引用] URL : <http://liaj.or.jp/giken/aboutus.html>
- 3) 渡邊貴之、小西一之、熊谷秀一郎、野口浩正、武井直樹：日本畜産学会報, 85 (3), 295～300, 2014.
- 4) 渡邊貴之、小西一之：多頭飼養における黒毛和種繁殖雌牛生産性向上のための代謝プロファイルテストを用いた飼養管理マニュアル、平成28年度版、1～159、独立行政法人家畜改良センター鳥取牧場、鳥取、2016.
- 5) Briana, D. D., Malamitsi-Puchner, A. : *Reprod Sci*, 16, 921～937, 2009.
- 6) Magni, P., Vettor, R., Pagano, C., Calcagno, A., Beretta, E., Messi, E., Zanisi, M., Martini, L., Motta, M. : *Endocrinology*, 140, 1581～1585, 1999.

乳牛の卵胞囊腫における副腎由来ホルモンの関与と 卵胞囊腫共存卵胞由來の卵母細胞の正常性

Involvement of corticosteroid on ovarian cystic follicles and quality of oocyte of follicles coexisting with cystic follicle in dairy cow

清水 隆

(帯広畜産大学生命・食料科学研究部門)

Takashi Shimizu

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Department of Life and Food Science)

After parturition, the increased concentration of cortisol in blood is observed in cow with uterine inflammation before formation of ovarian follicular cyst. Thus, the formation of follicular cyst may be related to uterine inflammation of postpartum cow. The aim of the present study is to examine the association of cortisol and noradrenaline (NA) in cystic follicles isolated from bovine ovary, and to examine the quality of oocyte of follicles coexisting with cystic follicle. Exp. 1 : Ovarian follicles were collected from slaughterhouse, and were divided to 3 categories; preovulatory follicle (POF), E 2-active follicular cyst (EAFC), and E 2-inactive follicular cyst (EIFC). Follicular fluid (FF), granulosa cells (GC) and theca cells (TC) were collected from each follicle stage. Estradiol (E2), cortisol and NA in FF were measured by enzyme-immuno assay (EIA). Exp 2 : Immature oocytes were collected from small follicles with or without follicular cysts in ovary from slaughterhouse. After in vitro maturation culture of collected immature oocytes, the matured oocytes were transferred to IVF 100 medium and fertilized with frozen-thawed bovine spermatozoa from the same bull. After 8 h of fertilization, groups of 30 presumptive zygotes were transferred to 300 μ l droplets of IVD 101 medium overlaid with mineral oil and were cultured for 9 days in humidified air with 5% CO₂, 5% O₂, and 90% N₂ at 38.5°C. Cleavage was evaluated at 2 days after fertilization, and the blastocyst rate was calculated as the proportion of cleaved embryos that developed to the blastocyst stage at day 8 post-fertilization.

In exp1, cortisol concentration in FF of each follicle was the same level. The expression of 11 β HSD1 in granulosa cells of EAFC was higher than those of POF and EIFC. NA concentration in FF of EAFC was significantly lower than those of POF and EIFC. In exp.2, the matured oocytes from follicles coexisting with follicular cyst were fertilized and the fertilization rate was the same as that of control oocytes. The embryos coexisting with follicular cyst were developed to the blastocyst stage and the proportions of blastocysts were significantly low in coexisting with follicular cyst compared with healthy follicles.

The results from the present study suggest that noradrenaline may promote estrogen-active cystic follicle to estrogen-inactive cystic follicle with cortisol. Thus, noradrenaline may induce the formation of cystic follicle in postpartum cow. In addition, cystic follicle may influence quality of oocyte of small follicles coexisting with these follicles.

1. 目 的

乳牛の生産性を向上させるためには、分娩間隔が短く（空胎日数が短く）、人工授精適期に排卵卵子が確実に受精することが重要である。このことは、産仔を計画的に得ることだけでなく、安定的なミルク生産にも寄与する。しかしながら、分娩後に発症する卵胞囊腫は乳牛の繁殖性低下（生産性阻害）を引き起こす要因の一つであり、人工授精適期を延長させ、受胎率向上の妨げとなっている。卵胞囊腫の発症要因として、外的環境要因や疾病などによるストレス因子の関与があげられる。体内で生じるストレス因子は、副腎機能に影響することから、ストレス因子による副腎機能の亢進が卵胞囊腫の発症に関与している可能性が考えられるが、そのメカニズムに関しては不明である。副腎からは、ステレス因子に反応してコルチゾールが分泌されるとともに、神経伝達物質であるノルアドレナリンを分泌する。そこで、本研究では、囊腫卵胞の卵胞液中コルチゾール濃度、ノルアドレナリン濃度およびエストラジオール（E2）やプロジェステロン（P4）濃度を同時に測定することにより副腎機能と卵胞囊腫との相互連関を検証する（研究1）。

卵胞囊腫が治癒した後、その個体の繁殖性を見極めることは、生産性を持続させるためにもきわめて重要なことである。卵胞囊腫が治療により治癒した場合、卵胞囊腫と共に存在していた卵胞の中から次の排卵卵胞が発育することになる。通常とは異なる内分泌環境に曝された卵胞群のなかから将来排卵する優勢卵胞が発育し、排卵期に達した排卵卵胞から卵母細胞が放出されるが、その卵母細胞が受精能および発生能を有しているのかは不明である。そこで、本研究では、卵胞囊腫と共に存在していた卵胞および非共存していた卵胞からそれぞれ未成熟の卵母細胞を採取し、体外成熟させ、体

外受精における受精率および胚発生率を検証することにより、卵胞囊腫が他の卵胞内卵母細胞に及ぼす影響を検討する（研究2）。

2. 方 法

2.1 研究1 卵胞囊腫と副腎由来ホルモンとの関連性の検証

本研究では、食肉処理場由來の乳牛卵巣を用いて、卵巣内に黄体が存在することなく25mm以上の囊腫卵胞を採取する。対照区として健常卵胞である排卵卵胞を採取する。採取した排卵卵胞および卵胞囊腫から卵胞液、顆粒層細胞および卵胞膜細胞をそれぞれ分離採取する。前述したように卵胞囊腫には、卵胞液中に高いE2濃度を保有する高E2囊腫卵胞と低いE2濃度である低E2囊腫卵胞が存在することから、卵胞液中のE2濃度を測定し、高E2囊腫卵胞と低E2囊腫卵胞とに区分した。また、採取した卵胞液は、酵素免疫法（EIA）によりコルチゾール濃度を測定するとともに、ノルアドレナリン測定キット（Abonova社製）を用いてノルアドレナリン濃度を測定した。さらに、分離採取した顆粒層細胞および卵胞膜細胞からRNAを抽出して、コルチゾールを含むステロイド産生関連酵素群およびノルアドレナリンに関係する交感神経系因子群の遺伝子発現を解析した。

2.2 研究2 卵胞囊腫と共に存在した小卵胞内の卵母細胞の機能解析

本研究では、卵胞囊腫と共に存在していた卵胞および非共存していた卵胞からそれぞれ未成熟の卵母細胞を採取し、体外成熟させ、体外受精における受精率、および胚発生率を検証することにより、卵胞囊腫が他の卵胞内卵母細胞に及ぼす影響を検討する。食肉処理場由來の牛卵巣を用いて、囊腫卵胞が付随している卵巣の小卵胞から卵母細胞を採取し、体外成熟培地にて38.5℃、5%CO₂、

95% Airの条件で21時間培養した。成熟した卵母細胞を体外受精に供し、卵割率を求めた。さらに、胚盤胞期胚まで発生させ、その発生率を算出した。

3. 結果と考察

3.1 卵胞囊腫と副腎由来ホルモンとの関連性の検証について

排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞の卵胞液中におけるE2濃度、P4濃度およびE/P比をTable 1に示した。排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞における卵胞液中のE2濃度は、それぞれ $501.3 \pm 186.2\text{ng/ml}$ 、 $255.6 \pm 40.9\text{ng/ml}$ 、および $8.6 \pm 1.6\text{ng/ml}$ であり、すべての卵胞間で有意な差が認められた。排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞における卵胞液中のP4濃度は、それぞれ $77.6 \pm 16.0\text{ng/ml}$ 、 $87.1 \pm 12.0\text{ng/ml}$ 、および $517.1 \pm$

16.0ng/ml であり、排卵前卵胞および高E2囊腫卵胞に比べ低E2囊腫卵胞で有意に低下した。排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞のE/P比は、それぞれ 7.4 ± 2.8 、 3.4 ± 0.5 、 0.04 ± 0.01 であり、すべての卵胞間で有意な差が認められた。

排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞の卵胞液中コルチゾール濃度をFig. 1に示した。排卵前卵胞、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞の間で有意な差は認められなかった。乳牛において、LHのサージ状分泌の開始から排卵までの期間では、血中および排卵卵胞の卵胞液中のコルチゾール濃度が増加することが報告されている¹⁾。したがって、高E2囊腫卵胞および低E2囊腫卵胞のコルチゾール濃度は排卵卵胞の時期から一定濃度で維持されていると考えられる。このようなことから、排卵できずに発育を継続している卵胞囊腫内に存在する顆粒層細胞は、常にコル

Table 1 Follicle size, concentration of steroid hormone and E/P ratio in follicular fluid of pre-ovulatory follicle, E2-active follicular cyst and E2-inactive follicular cyst.

	Preovulatory follicle	E2-active follicular cyst	E2-inactive follicular cyst
Sample no.	8	17	35
Follicle diam. (mm)	$17.7 \pm 1.3^{\text{a}}$	$28.6 \pm 1.0^{\text{b}}$	$30.8 \pm 1.0^{\text{b}}$
Estradiol (ng/ml)	$501.3 \pm 186.2^{\text{a}}$	$255.6 \pm 40.9^{\text{b}}$	$8.6 \pm 1.6^{\text{c}}$
Progesterone (ng/ml)	$77.6 \pm 16.0^{\text{a}}$	$87.1 \pm 12.0^{\text{a}}$	$517.1 \pm 81.6^{\text{b}}$
E/P ratio	$7.4 \pm 2.8^{\text{a}}$	$3.4 \pm 0.5^{\text{b}}$	$0.04 \pm 0.01^{\text{c}}$

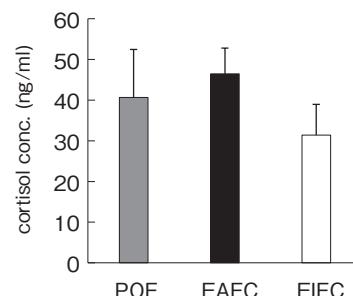


Fig. 1 Concentration of cortisol in follicular fluid of pre-ovulatory follicle (POF), E2-active follicular cyst (EAFC) and E2-inactive follicular cyst (EIFC). All values are shown as mean \pm SEM.

チゾールに曝されており、細胞内に刺激が入力されていると推察される。コルチゾールは、顆粒層細胞のE2産生を阻害することから²⁾、卵胞囊腫のE2産生の抑制に長期間のコルチゾール曝露が関与していることが推察される。興味深いことに、高E2囊腫卵胞の顆粒層細胞ではコルチゾンからコルチゾールへ変換する酵素である11 β HSD type 1の遺伝子発現が他の卵胞に比べ有意に高かった(Fig. 2)。このことは、卵胞囊腫内に存在する顆粒層細胞ではコルチゾールの合成が促進されることを示していると考えられるが、他

の卵胞とコルチゾールの濃度が同程度であったことから、この顆粒層細胞の能力は卵胞液中のコルチゾール濃度に反映されるほど大きなものではないと推察される。このようなことから、高E2囊腫化卵胞の顆粒層細胞では11 β HSD type 1の遺伝子発現は高まっているものの、タンパク質発現あるいはその機能が他の因子によって阻害されている可能性が考えられる。

卵巢内には交感神経線維が豊富に分布している。卵巢内の神経の一部は血管に分布しているが、交感神経線維終末は卵巣間質や黄体および卵

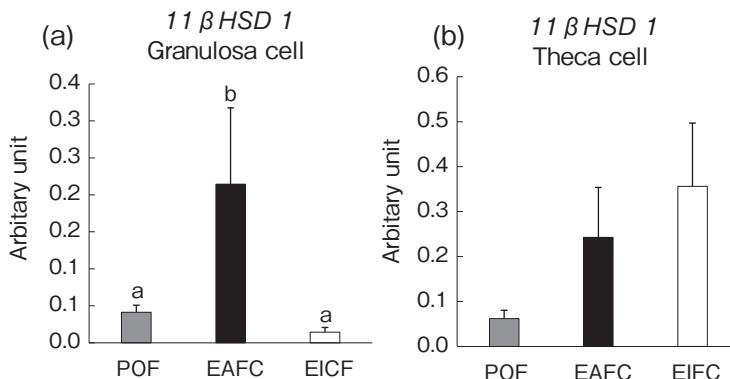


Fig. 2 Expression of 11 β HSD in (a) granulosa and (b) thecal cells of POF, EAFC and EIFC. All values are shown as mean \pm SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($p < 0.05$).

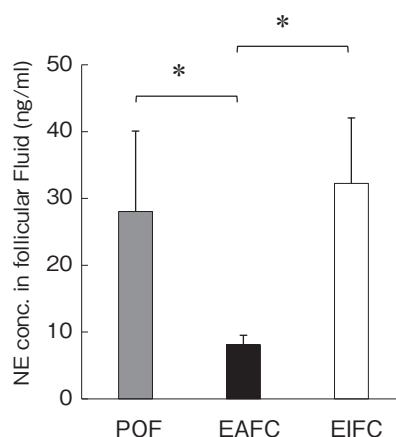


Fig. 3 Concentration of cortisol in follicular fluid of POF, EAFC and EIFC. All values are shown as mean \pm SEM.
* : $p < 0.05$

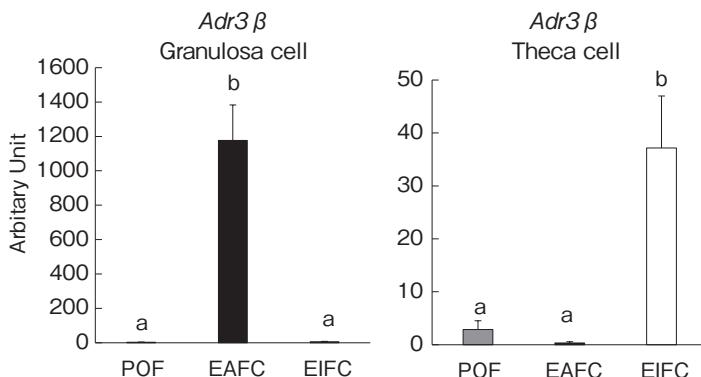


Fig. 4 Expression of *Adr3β* in (a) granulosa and (b) thecal cells of POF, EAFC and EIFC. All values are shown as mean \pm SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($p < 0.05$).

Table 2 Effect of coexisting of cystic follicle on oocyte competence

	No. of oocytes	Cleavage (%)	Blastocyst (%)
Healthy follicle	198	123 (62.1)	48 (24.2)
Cystic follicle			
Ipsilateral	63	35 (55.6)	4 (6.3) **
Contralateral	52	30 (57.7)	7 (13.5) *

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

胞などに到達している。交感神経線維から分泌される神経伝達物質であるカテコールアミン（アドレナリン、ノルアドレナリン、ドーパミン）は、細胞膜上に存在する受容体を介してシグナルを細胞内に伝達することにより体内の恒常性の維持に寄与している。本研究において、卵胞液中ノルアドレナリン濃度は、健常な排卵前卵胞に比べて高E2囊腫卵胞で有意に低下していた (Fig. 3)。Paredesら³⁾は、牛卵胞囊腫の卵胞液中ノルアドレナリン濃度が排卵前卵胞に比べて有意に低下することを報告しており、本研究結果はParedesら³⁾の研究結果と一致している。また、本研究では、低E2囊腫卵胞の卵胞液中ノルアドレナリン濃度が、高E2囊腫卵胞と比較して有意に高い値を示していた。Paccinatoら⁴⁾は、ノルアドレナリンに暴露された顆粒層細胞においてP4産生が著しく活発化することを報告している。これは卵胞液

中に含まれるノルアドレナリンの増減がステロイド産生機構に影響し、卵胞内の内分泌環境に変化をもたらす可能性を示唆している。さらに、低E2囊腫卵胞では卵胞膜細胞において*Adr3β*の遺伝子発現の増加が認められた (Fig. 4)。卵胞膜細胞は主要なP4産生細胞であり、ノルアドレナリンによるP4産生の促進も報告されていることから⁴⁾、低E2囊腫卵胞におけるステロイドホルモン産生機構にノルアドレナリンが影響を及ぼしている可能性が示唆されたといえる。

3.2 卵胞囊腫と共に存した小卵胞内の卵母細胞の機能解析

卵胞囊腫が共存する卵巣内の小卵胞から採取した卵母細胞の卵割率および胚盤胞発生率をTable 2に示した。本研究では、卵胞囊腫が存在する卵巣（同側）とそうでない卵巣（反対側）から、それぞれ未成熟卵母細胞を採取した。体外成熟後に

体外受精に供した卵母細胞の卵割率は、対照区で62.1%，同側で45.6%，反対側で57.7%であり，有意な差は認められなかった。このことは、囊腫卵胞が存在している卵巣側，あるいはその反対側にある卵胞内の卵母細胞は、成熟して排卵可能な状態にまで発育することで受精が可能であることを示唆している。つまり，卵胞囊腫の有無に関係なく卵母細胞は受精をすることが可能なのかもしれない。

胚盤胞期胚の発生率をみてみると、対照区が24.2%，同側が6.3%，反対側が13.5%であり、対照区に比べ有意に減少していた。このことは、囊腫卵胞が存在していた卵巣の小卵胞内にある卵母細胞は、胚盤胞までの発生が悪いことを示しており、胚発生に関連する因子が影響を受けている可能性を示唆している。

4. 要 約

本研究では、囊腫卵胞の卵胞液中には排卵卵胞と同程度のコルチゾールが存在していること、またノルエピエフリン濃度は高E2囊腫卵胞で低かったことから、牛卵胞囊腫の発症にはコルチ

ゾールが一定濃度存在する条件でノルエピエフリンが介在する可能性が示唆された。

囊腫卵胞と共存している卵胞から採取した卵母細胞は、正常に受精をするが、その後の胚発生が悪くなることが示されたことから、卵胞囊腫が仮に治療により治癒したとしても、囊腫卵胞と共存していた期間の卵胞内の卵母細胞は囊腫卵胞の影響を受けている可能性が示唆された。このことは、酪農現場における卵胞囊腫治癒後の乳牛が、人工授精後に受胎しないことに関連するのかもしれない。

文 献

- 1) Acosta, T. J., Tetsuka, M., Matsui, M., Shimizu, T., Berisha, B., Schams, D., Miyamoto, A. : *J Reprod Dev.*, **51**, 483~489, 2005.
- 2) Zhu, H. S., Qian, Z., Liu, H. L., Bao, E. D. : *Reprod Biol Endocrinol*, **14**, 80, 2016.
- 3) Paredes, A. H., Salvetti, N. R., Diaz, A., Dallard, B. D., Ortega, H. H., Lara, H. E. : *Reprod Biol Endocrinol*, **9**, 66, 2011.
- 4) Pacciato, C. A., Montrezor, L. H., Collared, C. A. V., Vireque, A. A., Silva, A. A. R. : *Reprod Biol Endocrinol*, **10**, 95, 2012.

子宮内膜炎罹患牛における特異的脂質メディエーターの同定と新規高感度診断法の開発

Identification of specific lipid mediators in the cow with endometritis and development of a novel sensitive diagnostic method

大澤 健司・村田 幸久*・北原 豪

(宮崎大学農学部獣医学科産業動物臨床繁殖学研究室,

*東京大学大学院農学生命科学研究科放射線動物科学研究室)

Takeshi Osawa, Takahisa Murata* and Go Kitahara

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki,

*Department of Animal Radiology, The University of Tokyo)

Objectives of this study were to clarify usefulness of esterase (LE), myeloperoxidase (MPO) and lipid mediators as the biomarker for rapid and sensitive diagnosis of bovine endometritis, and to elucidate association of bacterial infection with inflammation of the endometrium. In Experiment 1, endometrial and plasma samples were collected by cytobrush from 43 Holstein-Friesian cows at 3, 5, and 7 weeks postpartum for LE and MPO activities, bacterial detection and profiles of the PMN%. Plasma samples were used for biochemical analysis. The 43 cows were divided into healthy, subclinical endometritis (SE) and clinical endometritis (CE) groups, which were classified differently at W3, 5, and 7 pp based on the definitions of SE and CE made for each of the three different weeks postpartum. In Experiment 2, intrauterine fluid samples were collected by uterine lavage from 5 cows with and another 5 cows without endometritis, and used for comprehensive lipid analysis. Albumin and BUN had a weak negative association with endometrial PMN% at week 3. LE had an association with PMN % in all weeks postpartum ($p<0.05$). On the other hand, MPO had no association with PMN%. Pathogenic bacterial detection rates were higher in cows with endometritis at week 3 and week 5. In Experiment 2, among 143 lipids, a total of 50 lipids were detected in the 10 cows, and of which level of 39 lipids were higher in cows with endometritis than in cows without endometritis. It is concluded that serum Alb and BUN level, LE activity and pathogenic bacteria in endometrium sample, and some lipid mediators are possible candidates for biomarkers of bovine endometritis.

1. 目的

子宮内膜炎は牛の子宮疾患の中で最も罹患率が高く、受胎性を大きく低下させる疾患である。子宮内膜炎は潜在性と臨床性に大別できる。これま

で潜在性子宮内膜炎は現場で利用可能な診断方法がなかったが、代表研究者らは自作の牛子宮内膜細胞診用ブラシ（サイトブラシ）を用いて子宮内膜における炎症の程度を子宮内膜上皮細胞中に占める多形核好中球（PMN）の割合（PMN%）と

して数値化することで潜在性子宮内膜炎を診断した結果、不受胎牛の約30%に潜在性子宮内膜炎が存在し、分娩後の初回排卵を遅延させることや血中グルコース濃度が低い個体は潜在性子宮内膜炎発症リスクが高いことなどを実証してきた^{1,2)}。一方、臨床性子宮内膜炎は外子宮口からの異常滲出物の排出 (Purulent vaginal discharge : PVD) を伴う場合と定義されているものの、PWDを有しているにもかかわらず子宮内膜に炎症が観察されない例があり³⁾、代表研究者らも子宮頸管炎に限局した症例の場合でも腔室内に膿性排出物を認める個体が少なからず存在することを示唆する結果を得ている⁴⁾。また、子宮内膜炎や蓄膿症は低受胎の原因となるものの全身症状を示さない点が犬の場合と異なり、PMN %が高い個体でも子宮内膜から細菌が分離されない症例、またその逆も散見されるなど、子宮内膜における細菌感染と炎症反応の詳細に関しては不明な点が多い。

このように、牛の子宮内膜炎は潜在性、臨床性ともに正確な診断が求められていて、サイトラシを利用することでその実態を明らかにする道筋ができてきた。しかしながら、塗沫標本の作成や鏡検は現場での診療の中で実施するのは依然として難しい側面がある。そこで、牛子宮内膜炎の迅速診断方法開発に際してのバイオマーカー候補として、白血球由来エステラーゼおよびミエロペルオキシダーゼに着目した。

一方、炎症性疾患において脂質メディエーターの役割に注目が集まっている。炎症性疾患の発症や進行には細胞膜のアラキドン酸から障害刺激に反応して即時に產生される脂質メディエーターが重要な役割を持つ。近年、質量分析装置の開発が進み、超低分子で類似構造の多い脂質メディエーターの検出が可能となった。炎症時にはプロスタグランジン E₂ (PGE₂) が產生され、末梢血管が弛緩して血流が増加する結果、発熱や痛みが増強

することが知られているが、現在までにPGE₂以外にも脂質メディエーターが300種類以上も存在することが知られており、障害の部位や程度、ステージによってこれらの产生が変化することで炎症が巧みに制御されていることが明らかになってきた。

そこで本研究では、牛子宮内膜炎の簡易、迅速かつ高感度な診断方法確立の基礎データを得るためにエステラーゼ、ミエロペルオキシダーゼおよび脂質メディエーターのバイオマーカーとしての有用性ならびに細菌感染と子宮内膜炎との関係を明らかにすることを目的として一連の実験を実施した。

2. 方 法

2.1 子宮内膜炎の症状評価

2.1.1 供試動物

宮崎県内の一酪農場（フリーストール牛舎）にて繁養のホルスタイン種経産牛43頭を供試した。

2.1.2 材料採取方法

各供試牛における分娩後3週、5週および7週に腔検査、直腸検査、超音波検査を実施、生殖器の所見を得た後、サイトラシにて子宮内膜上皮および子宮内粘液を採取してスメア標本をスライドガラスに作製すると同時に生理食塩水10mlに浸漬させてサンプル（生食浸漬サンプル）を得た。また、尾正中静脈より血液10mlを採取、遠心分離して血漿サンプルを得た後、-20°Cにて分析時まで保存した。

2.1.3 検査項目

超音波検査により各個体における子宮内の液体貯留の有無、卵巣所見（黄体および主席卵胞の有無とサイズ、個数）を記録、メトリチェックにより子宮腔部における粘液性状（膿汁の混入割合）を記録した。また、子宮内膜スメア標本の鏡検によりPMN %を決定した。子宮腔部粘液性状およ

び子宮内膜スメアのPMN%により供試牛を健康牛、潜在性および臨床性子宮内膜炎罹患牛に分類した。なお、分娩後3週、5週および7週それにおける子宮内膜炎の定義に従って分類した。

血漿サンプルについて生化学検査を実施した。生化学検査項目はアルブミン（Alb）、血中尿素窒素（BUN）、非エステル型遊離脂肪酸（NEFA）、 β ヒドロキシ酪酸（BHBA）および総コレステロール（T-Chol）とした。また、生食浸漬サンプルのエステラーゼおよびミエロペルオキシダーゼ活性を測定した。子宮内膜サンプルよりスワップを取り、細菌（好気性、嫌気性）培養とMALDI-TOF質量分析計による菌種同定を行った。なお、分離細菌のうち、*Trueperella pyogenes*および*Escherichia coli*を子宮内膜に対する病原性細菌とした。

2.2 脂質の網羅的探索と標的物質の選択

2.2.1 供試動物

宮崎県内2箇所の酪農場（フリーストール牛舎）にて飼養のホルスタイン種経産牛計17頭（分娩後3週から13週）について上記2.1と同様の方法により子宮内膜炎の診断を実施し、健康牛11頭および子宮内膜炎罹患牛6頭からそれぞれ5頭を無作為に選び、脂質の網羅的探索に供した。

2.2.2 材料採取方法

各供試牛において診断的子宮洗浄の要領で両子宮角内に滅菌生理食塩水を計30ml注入後に回収した。回収液は遠心分離して上清をリピドーム解析に、沈渣をPMN%算出に使用した。上清サンプルは-30°Cにて分析時まで保存した。

2.2.3 質量分析装置を用いた脂質の網羅的探索（リピドーム）

得られた上清サンプルを用いて質量分析装置を用いた脂質メティエーターの適切な抽出条件（固相抽出カラムの選択、タンパクやマトリックスの除去方法、脂質の抽出溶媒の選択、質量分析装置

の測定条件設定）を設定した後、精製したサンプルを対象に脂質を網羅的に探索した。

3. 結果と考察

3.1 子宮内膜炎の症状評価

3.1.1 子宮内膜における炎症度（PMN%）と血液生化学検査結果との関係

分娩後3週のAlbとPMN%との間に弱い負の関係 ($p=0.07$) が認められた（Table 1）。低Alb値が分娩後疾患と関連していることが知られており⁵⁾、子宮内膜炎を含む周産期疾病リスクを予測する指標の一つとして使える可能性がある。同様に、分娩後3週と7週のBUNとPMN%との間に弱い負の関係（3週： $p=0.07$ 、7週： $p=0.08$ ）が認められた。この結果は、分娩後2週および4週における低BUN値が分娩後5週および6週における子宮内膜炎罹患リスクを高めるという過去の報告²⁾に一致するものである。低BUN値の個体は移行期における乾物摂取量が低下していたためにエネルギーバランスの負の程度が大きくなり、そのことが子宮内膜における易感染性につながっている⁶⁾ことが推察される。

3.1.2 白血球エステラーゼ（LE）およびミエロペルオキシダーゼ（MPO）活性とPMN%との関係

分娩後3週、5週、7週のいずれにおいてもLE活性はPMN%との間に有意 ($p<0.01$) な正の相関が認められた（Fig. 1）。潜在性子宮内膜炎罹患牛においてLE活性が高いという報告はこれまでもあるが⁷⁾、本研究では分娩後3週という早期における相関が最も高いということが明らかとなった。検査感度の向上という点においても分娩後3週での診断は有用かもしれない。一方、牛の子宮疾患に関してMPO値とPMN%との関係を観察した報告は今回が初めてであるが、いずれの週においても有意な関係は認められなかった。馬の

Table 1 Pearson correlation coefficients (r) of the relationship between PMN%, concentrations of biochemical parameters and body condition scores in postpartum dairy cows (n=43).

Biochemical indices	Week3		Week5		Week7	
	r	p	r	p	r	p
Albumin	-0.26	0.07	-0.14	0.34	-0.10	0.53
BUN	-0.26	0.07	-0.20	0.19	-0.32	0.08
T-Chol	-0.20	0.18	2.05	0.99	-0.22	0.18
NEFA	2.97	0.84	-0.08	0.59	2.86	0.96
BHBA	-0.06	0.69	-0.05	0.23	-0.14	0.38
BCS	-0.22	0.12	-0.20	0.20	-0.10	0.50

Values of $p = 0.07$ and $p = 0.08$ showed tendency. The blood albumin, blood urea nitrogen (BUN), Total cholesterol (T-cho), non-esterified fatty acid (NEFA) and β -hydroxybutyric acid (BHBA) concentrations biochemically analyzed from week 3, 5 and 7 postpartum. The body condition scores (BCS) were evaluated at Week 3, 5 and 7.

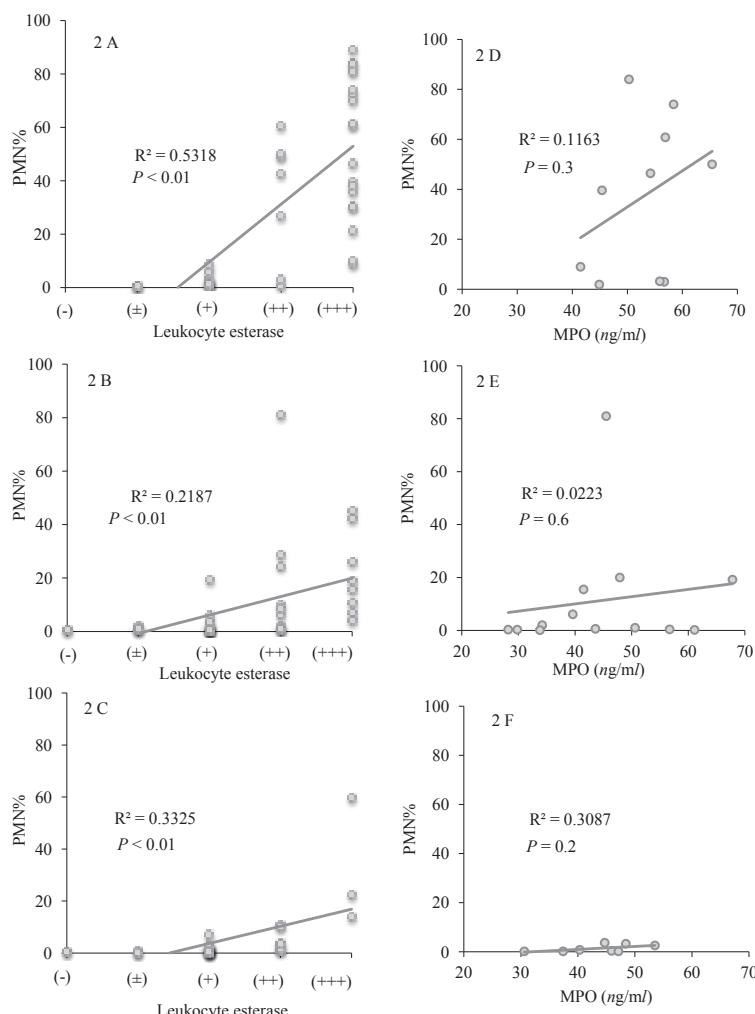


Fig. 1 Association of leukocyte esterase (LE) (n=43) and myeloperoxidase (MPO) (n=13) concentrations with PMN% from endometrial samples in dairy cows. Graphs A to C show associations between LE and PMN% at week 3 (A), 5 (B), and 7 (C) postpartum. Graphs D to F show associations between MPO and PMN% at week 3 (D), 5 (E) and 7 (F).

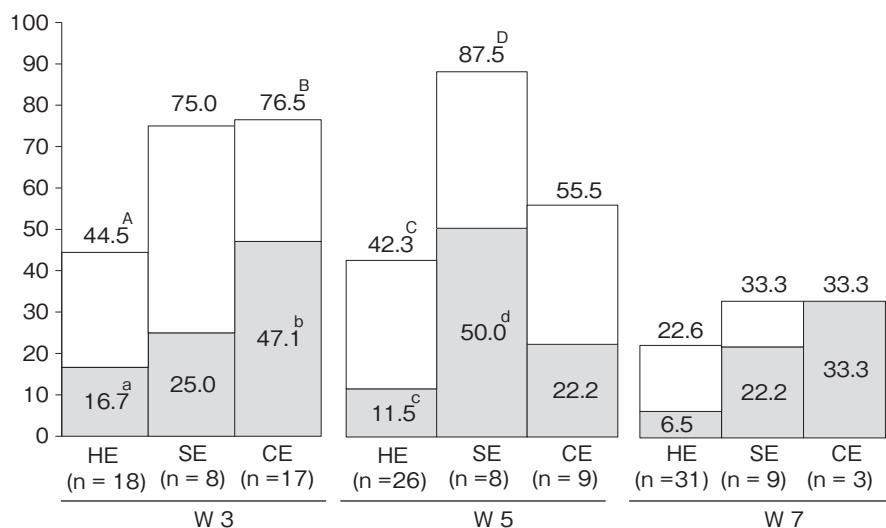


Fig. 2 Comparison of bacterial detection rates between healthy (HE) clinical endometritis (CE) and subclinical endometritis (SE) groups in dairy cows (n=43). The three groups were classified differently at W3, 5, 7 pp based on the definitions of SE and CE made for each of the following three different weeks pp : W3 : HE was defined as when the PMN% were <18 and VMS was 0 to 2. SE was defined as when the PMN% was ≥18 and VMS was 0 to 2. CE was defined as when the PMN% was ≥18 and VMS was 3 to 4. W5 : HE was defined as when the PMN% was <6 and VMS was 0 to 1. SE was defined as when the PMN% was ≥6 and VMS were 0 to 1. CE was defined as when the PMN% were ≥6 and VMS was 2 to 4. W7 : HE was defined as when the PMN% was <4 and VMS was 0 to 1. SE was defined as when the PMN% was ≥4 and VMS was 0 to 1. CE was defined as when PMN% was ≥4 and VMS was 2 to 4. a-b, A-B : p = 0.055 c - d, C-D : p<0.05

子宮疾患におけるMPO値測定の有用性は過去に指摘されているが⁸⁾、今回同様の結果が得られなかった。その理由の一つとして発情周期における変動の可能性があることから今後発情周期のステージがMPO値に及ぼす影響についても精査する必要がある。

3.1.3 細菌検出率と子宮内膜の病態との関係
分娩後3週では臨床性子宮内膜炎罹患牛における細菌検出率および病原性細菌検出率が健康牛と比較して高い傾向が認められた ($p=0.055$) (Fig. 2)。また、分娩後5週では潜在性子宮内膜炎罹患牛における細菌検出率および病原性細菌検出率が健康牛と比較して有意 ($p<0.05$) に高かった。通常、健康牛の場合分娩後3週までに子宮内の細菌を排除し、分娩後4から6週までに子宮修復が

完了するものの⁹⁾、分娩後3週以降において子宮内感染が認められる場合には臨床性および潜在性子宮内膜炎発症リスクが高くなることが本研究の結果から示唆された。

3.2 脂質の網羅的探索と標的物質の選択

子宮洗浄液の上清サンプルについて脂質メティエーターの網羅的検索を行ったところ、143種類の脂質のうち50種類が検出された。そのうち、子宮内膜炎罹患牛において上昇が認められた脂質メティエーターは39種類であり、それらはPGF系、トロンボキサン系、アラキドン酸 (AA) 代謝産物、リノレン (LA) 酸代謝産物、ジホモ- γ -リノレン酸 (DGLA) 代謝産物、エイコサペンタエン酸 (EPA) 代謝産物であった。これらのうち AA, LA, DGLAはn-6系脂肪酸であり、炎症

性の脂質メディエーターとして知られている。一方、油糧種子をサプリメントとして投与した最近の試験¹⁰⁾では、分娩5週間前にヒマワリ油（高リノール酸：n-6系多価不飽和脂肪酸）給与群、菜種油（高オレイン酸：n-9系一価不飽和脂肪酸）給与群、無給与群の3群に分けて分娩後25日前後での子宮内膜環境と35日までの卵巣動態への影響を調べたところ、ヒマワリ油給与群では子宮内膜環境に悪影響を与えることなく初回排卵日がより早く、分娩後35日までに排卵する個体の割合も多かった。本研究と合わせ、これらの結果は、正常な子宮修復過程において分娩前から分娩後早期（3週まで）では炎症促進性に働き、それ以降の時期においては炎症抑制性に働いているという仮説を支持するものである。

今回、網羅的な検出モードで用いた脂質の濃度測定は相対的評価であったため、探索はできても絶対的な評価に用いることはできなかった。炎症の程度（子宮内膜PMN%）や原因菌を反映できる候補物質を選択後、対象物質の単独測定モードを用いて絶対濃度を測定する必要がある。また、子宮内膜上皮サンプルは採取ごとに得られる細胞数が異なるが、細胞数を勘案したうえで脂質の絶対濃度を評価することが実用的な診断ツール開発を実現するうえで必要となるだろう。さらに、個体差も考慮し、発情周期や栄養状態に関係なく子宮内膜炎罹患によって特異的に上昇する物質を標的として絞り、健康牛、潜在性子宮内膜炎罹患牛および臨床性子宮内膜炎罹患牛の各群における脂質構成および絶対量の相違を明らかにすることで、子宮内膜炎罹患牛に特異的な脂質メディエータープロファイルを決定する必要がある。

4. 要 約

牛子宮内膜炎の簡易、迅速かつ高感度な診断方法確立の基礎データを得るためにエステラーゼ、

ミエロペルオキシダーゼおよび脂質メディエーターのバイオマーカーとしての有用性ならびに細菌感染と子宮内膜炎との関係を明らかにすることを目的として一連の実験を実施した。試験Ⅰではホルスタイン種経産牛43頭を供試、分娩後3, 5, 7週に膣検査、直腸検査、超音波検査を実施した後、サイトブラシにて子宮内膜上皮および子宮内粘液サンプルを採取するとともに採血して血漿サンプルを採取、生化学検査を実施した。試験Ⅱではホルスタイン種経産の子宮内膜炎罹患牛および非罹患牛各5頭より子宮洗浄液を回収、脂質の網羅的探索に供した。その結果、分娩後3週のAlbとPMN%との間に弱い負の相関（ $p = 0.07$ ）が、分娩後3週と7週のBUNとPMN%との間に弱い負の相関（3週： $p = 0.07$, 7週： $p = 0.08$ ）が認められた。LE活性は分娩後3, 5, 7週のいずれにおいてもPMN%との間に正の相関（ $p < 0.01$ ）が認められた。一方、MPO値とPMN%との間には関係が認められなかった。また、分娩後5週では潜在性子宮内膜炎罹患牛における細菌検出率および病原性細菌検出率が健康牛と比較して高かった（ $p < 0.05$ ）。脂質メディエーターの網羅的検索の結果、143種類の脂質のうち50種類が検出され、子宮内膜炎罹患牛において上昇が認められたのは39種類であった。以上より、子宮内膜炎の診断におけるバイオマーカーとして血清中AlbおよびBUN値、子宮内膜サンプル中のLE活性と病原細菌、ならびに一部の脂質メディエーターが候補物質となることが明らかになった。

文 献

- 1) Senosy, W. S., Uchiza, M., Tameoka, N., Izaike, Y., Osawa, T.: *Theriogenology*, **72**, 1153~1162, 2009.
- 2) Senosy, W. S., Izaike, Y., Osawa, T.: *Reprod Dom Anim*, **47**, 666~674, 2012.
- 3) Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J.: *J Dairy Sci*, **93**, 5225~5233, 2010.
- 4) Osawa, T., Neves, R. C., LeBlanc, S. J.: *J Dairy*

- Sci, 94, E-Suppl 1, 746, 2011.
- 5) Van Sun, R. J. : *Proc Am Assoc Bov Pract*, 37, 212~213, 2004.
- 6) Huzzey, J. M., Veira, D. M., Weary, D. M., von Keyserlingk, M. A. : *J Dairy Sci*, 90, 3220~3233, 2007.
- 7) Couto, G. B., Vaillancourt, D. H., Lefebvre, R. C. : *Theriogenology*, 79, 103~107, 2013.
- 8) Parrilla-Hernandez, S., Ponthier, J., Franck, T. Y., Serteyn, D. D., Deleuze, S. C. : *Theriogenology*, 81, 936~940, 2014.
- 9) Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., Gilbert, R. O. : *Theriogenology*, 65, 1516~1530, 2006.
- 10) Salehi, R., Colazo, M. G., Gobikrushanth, M., Basu, U., Ambrose, D. J. : *Reprod Fertil Dev*, 29, 747~758, 2016.

新規DNAメチル化網羅探索法を用いた牛の精液性状の評価法開発

A novel genomic screening system for DNA methylation to evaluate bovine spermatozoa

山崎淳平・永野昌志

(北海道大学大学院獣医学研究院)

Jumpei Yamazaki and Masashi Nagano

(Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Aberrant DNA in spermatozoa has increasingly been appreciated as an important factor that associates with male infertility and abnormal development of fetus in human medicine. The aim of this study is to establish a novel genomic screening system for DNA methylation to evaluate bovine spermatozoa.

We studied three bloods and three pre/post sex sorting spermatozoa from bulls for a genome-wide quantitative DNA methylation analysis with next-generation sequencing based on sequential treatment of methylation sensitive/insensitive restriction enzymes. We had 21,801 CpG sites that were commonly obtained from all nine samples by newly established method (Bovine DREAM). Clustering analysis with these CpG sites identified a clearly separated cluster of blood samples from that of spermatozoa, indicating that Bovine DREAM is capable of differentiating inter-tissue specificity. Then, we used only each of three spermatozoa samples for clustering analysis and found that inter-individual difference is dominant over sex sorting process. We also found several hundreds of differentially methylated CpG sites between pre/post sex sorting.

Bovine DREAM is found to identify inter-tissue and inter-individual difference by analyzing tens of thousands of CpG sites for their DNA methylation level. The fact that there were several hundreds of differentially methylated CpG sites prompted us to obtain more spermatozoa samples to validate the finding in this study. We are also planning to analyze a variety of conditions that possibly affect sperm such as difference in feeding and season. Associating these results with known sperm parameters and reproduction performance of bulls will help identify the best CpG sites important to determine/predict sperm quality. Since DNA methylation is easy, simple, and quick to be analyzed, future applications of DNA methylation as a novel method would be anticipated.

1. 目的

遺伝子のインプリンティング（刷り込み）現象とは、父方および母方由来対立遺伝子それぞれからの特異的な発現様式を可能とするために厳密に制御されている機構で、胚発生、新生子の発達、胎盤機能などに重要である¹⁾。この機構を司る中心的存在がDNAメチル化であり、近年、ヒトの男性不妊の原因となる乏精子症にこのDNAメチル化の異常が関わることが示唆されつつある¹⁾。父方および母方の対立遺伝子それぞれで特異的にメチル化されている部位（インプリンティング遺伝子）がヒトゲノムでは約100箇所同定されており、これらは配偶子形成の段階で形成されるが、これらインプリンティング遺伝子の適切なメチル化の喪失および子への伝達異常によりBeckwith-Wiedemann syndrome (BWS) といった発達異常につながることが判明している²⁾。一方、近年シークエンス技術が発展し、エピジェネティクス分野におけるゲノムワイドな解析法が様々に樹立され用いられている。その結果、精子におけるインプリンティング遺伝子だけでなく様々な異常なメチル化と男性不妊や胎児発達異常との強い関連が指摘されている³⁾。また興味深いことに、肥満などの父親の状態が精子に反映され、子に伝わっていく現象もDNAメチル化で説明可能であることが発表されている⁴⁾。

興味深いことに、牛にもヒトのBWSと同様の表現型を示すLarge offspring syndrome (LOS) が報告され、体外受精を用いた場合にその発生頻度が高いことが判明している。さらに重要な点として、この異常を呈する子牛にはヒトと同様にインプリンティング遺伝子の伝達異常が起きていることが示されている⁵⁾。この事実は、インプリンティングを伝える大元である精子におけるDNAメチル化状態の変化が、臨床的に存在する未解明

の問題、特に種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下を関連づける重要なメカニズムであることを示唆しているのではないだろうか？

ところがこれまでの報告では、ヒトの遺伝子情報を外挿し限られた遺伝子部位の検討やヒトにおけるDNAメチル化のゲノムワイド解析デバイスを半ば強引に牛で用いたものであるため、網羅的かつ信頼性のあるデータを提供することができていない。また少ない遺伝子座に限定して検討することでは多数存在すると想定される未知のインプリンティング遺伝子を含めた網羅探索を可能とする研究を行う必要性がある。

そこで、我々は牛のDNAメチル化のゲノムワイドな検討が可能となる解析法を樹立することでの2つの問題点の解決を試みた。今回は性選別前後の精液サンプルを用い、ウシ精子ゲノムにおける網羅探索的なDNAメチル化解析を行った。

2. 方 法

2.1 牛凍結精液におけるDNAメチル化のゲノムワイド解析法の応用

射出精液および性選別精液と末梢血液はジェネティクス北海道から譲渡を受けたものを使用した。既知の細胞数を含む凍結精液サンプルをPBSで洗浄し、 1×10^6 , 2×10^6 , 5×10^6 の精子数に合わせゲノムDNAをDNA抽出キット (QIAGEN) によって抽出した。Nanodrop (Thermo Fisher Scientific) による濃度測定を行ったところ 1×10^6 の精子より約 $1.5 \mu\text{g}$ のゲノムDNAが抽出できることを確認した。また、このうちの100ngを1%アガロースの電気泳動にて泳動像を確認したところ、ゲノムDNAに大幅な切断は見られなかった。これらのことから、質および量ともにDNAメチル化のゲノムワイド解析に耐えうるゲノムDNAの抽出が可能であることが確認された。

次に、これらゲノムDNAに関しDREAM法⁶⁾による解析を行った。まず抽出したDNAより、CCCGGGと共に認識配列とするDNAメチル化感受性／非感受性制限酵素ペアSmaI (NEB)にて25℃、3時間、次にXmaI (NEB)を用いて25℃、16時間の連続的処理により切断した。次にKlenow (NEB)を用いて切断末端を平滑化後AmpureXP (Beckman Coulter)による精製を行った。次に、シークエンス用アダプター (NEB)を付加し、DNAを精製後、AmpureXPにより目的のサイズ (250-500bp) の断片を精製、インデックスプライマー (NEB)を用いたPCR反応により増幅を行い、次世代シークエンス用のライプラリ作製を行った。得られたライプラリをQubit HS (Invitrogen)によって定量を行い、必要量を（株）DNAチップ研究所に外注、バイオアナライザー (Agilent) にてクオリティチェック後、 Illumina HiSeq3000を用いたシークエンスを行った。得られたfastqシークエンスデータのBowtie 2を用いたウシゲノムへのマッピング後、Pythonスクリプトを用いたゲノムワイドDNAメ

チル化データを得た。

3. 結果と考察

はじめに精液サンプル由来のゲノムDNAより作製したライプラリの検討を行ったところ、ヒトやマウスおよびイヌのサンプルで同様に行った場合にはターゲットサイズの250-450bpにスマートバーンが見られるのに対し、牛の血液を含めたすべてのサンプルにおいて400bpと500bpに鋭いピークパターンが現れた (Fig. 1)。確認のため、イヌのサンプルと並行して行った場合でも、イヌには見られず牛のサンプルのみに見られたため、この現象は牛特異的であることが示唆された。このバンドパターンの除去方法を模索したものの、その解決には至らなかったため、まずこれらのライプラリサンプルをシークエンス試行してみたところすべてのサンプルで約1000万リードが得ることができ、ライプラリの量に問題がないことが確認された。次にこのfastqシークエンスデータをBowtie 2によるウシゲノムにマッピングを行ったところ、得られたリードの約20%がウシゲノム

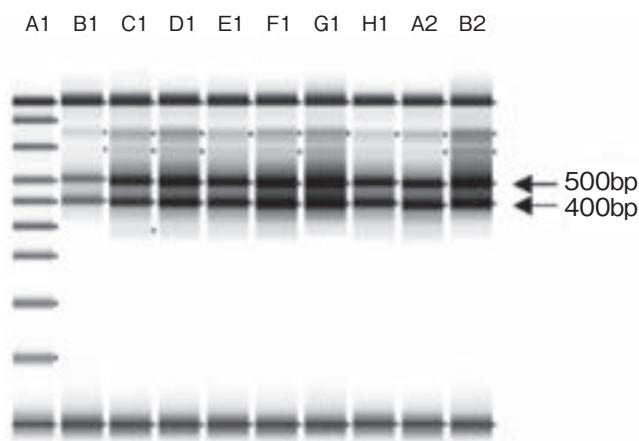


Fig. 1

Quality check of libraries for Bovine DREAM. Genomic DNA from all 9 samples was used for library preparations and then analyzed by Bioanalyzer. There are two sharp bands around 400-500 bp. Left : DNA ladder, second from left to fourth : blood samples, and fifth to tenth : spermatozoa samples.

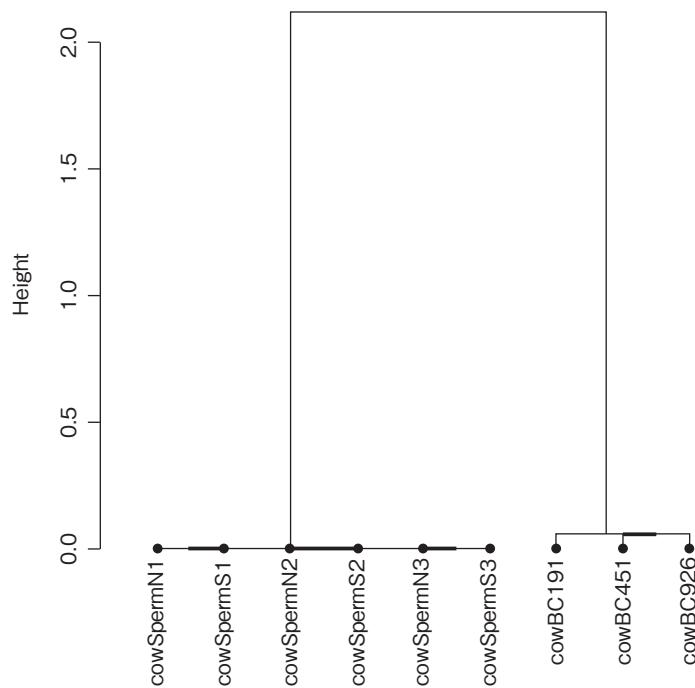


Fig. 2

Clustering analysis with all nine samples. Three blood samples and six spermatozoa samples were analyzed by 21801 CpG sites that commonly available for clustering analysis. Note that blood samples showed a clearly separated cluster (Right cluster) from those by spermatozoa samples (Left cluster).

への単一のマッピングを示したが、その他約80%はウシゲノム上の複数領域にマッピングされることが判明した。また、同配列の增幅がライブラリ内に認められ、これらは他の動物種をサンプルに用いた場合には見られないものであった。これらの原因としてウシゲノム特有の繰り返し配列が原因となっていることが推測されるが、本法におけるこの問題の克服点は現時点では見つかっておらず今後の検討が必要である。

次に、約20%ながらもウシゲノムへの単一のマッピングが認められたシークエンスデータを用いてゲノムワイドなDNAメチル化データの取得を試みた。まず、血液3サンプルおよび性選別前3サンプル、性選別後3サンプルの全9サンプルにおいて共通してDNAメチル化の比較が可能であった21801CpGサイトについて検討を行った。

その結果、49%がCpGアイランドと呼ばれるCpGサイトが密集している領域、また21%が遺伝子のプロモーター領域由来のCpGサイトであることが判明した。次に、それぞれのサンプルにおけるDNAメチル化の相関を検討するためにクラスタリング解析を行ったところ、血液由来3サンプルは精子由来6サンプルから大きく離れたクラスターを形成した (Fig. 2)。これはDNAメチル化パターンが血液と精子では大きく異なることを唆し、Bovine DREAMによるゲノムワイドなDNAメチル化解析が組織間の相違を検出可能であることを示している。

次に性選別前3サンプル、性選別後3サンプルの計6サンプルのみにおける精子の詳細な検討を行うために、これらサンプルで共通して比較が可能であった23432CpGサイトについて検討を行っ

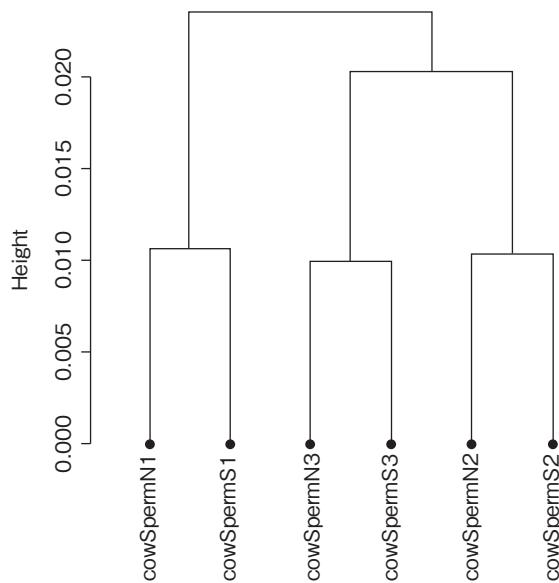


Fig. 3

Clustering analysis with only six samples of spermatozoa. 23432 CpG sites that are commonly available were analyzed for clustering analysis. Note that samples from same individuals showed close cluster and separated from clusters by other individuals.

た。CpGアイランド、プロモーター領域における割合は49%, 21%と前検討と同等であった。またクラスタリング解析では、性選別前後に関わらず種雄牛個体による差が、性選別処理による違いよりも大きいことが判明した (Fig. 3)。

最後に、これら23432CpGサイトの定量的DNAメチル化データを詳細に検討し、特異的变化を伴うサイトを同定しようと試みた。受胎率の低下に影響を及ぼすと予想されるDNAメチル化の変化はインプリンティング遺伝子のDNAメチル化の喪失および低下であると報告されているため、DNAメチル化レベルが「射出精液>処理後精液」である箇所の探索をまず行った。それぞれ3サンプルずつの平均DNAメチル化レベルを算出、性選別前後の差を計算し、性選別前が性選別後に比べ10%以上メチル化が高いCpGサイトを抽出したところ、95CpGサイトがこれに該当した。また、逆の傾向である性選別後が性選別前に比べ10%以上メチル化が高いCpGサイトは122箇所であった。

また、Carvalho et al.⁷⁾によって検討されたIGF2R遺伝子の近傍のDNAメチル化レベルは既報と同じく性選別前後で変わりはなかった。今後、これら変化の見られたCpGサイトについて対象種雄牛数を増やすことによって確証を得るとともに、性選別以外の条件（個体間、季節変動など環境要因）によるDNAメチル化と既存の精液評価項目、さらには繁殖成績との関連を検討し、種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下を関連づける根本的メカニズムの解明を目指すとともにDNAメチル化を指標とした牛凍結精子の新規評価法の樹立による臨床的有用性と牛特有の新規インプリンティング遺伝子候補の同定といった基礎研究への貢献を目指す。

4. 要 約

昨今、ヒトの精子における様々な異常なDNAメチル化と男性不妊や胎児発達異常との強い関連が指摘されている背景から、牛のDNAメチル化

のゲノムワイドな検討が可能となる解析法を樹立することで、種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下を関連づける重要なメカニズムを解明することを可能と考え、本研究ではまず性選別による影響を検討した。血液3サンプルおよび性選別前3サンプル、性選別後3サンプルの全9サンプルにおいて次世代シーケンスにより約1000万リードを得ることができ、全9サンプルにおいて共通してDNAメチル化の比較が可能であった21801CpGサイトについてクラスタリング解析を行ったところ、血液由来3サンプルは精子由来6サンプルから大きく離れたクラスターを形成し、本ゲノムワイドなDNAメチル化解析が組織間の相違を検出可能であることを示した。次に性選別前3サンプル、性選別後3サンプルの計6サンプルを用いたクラスタリング解析では、性選別前後にわらず種雄牛個体による差が、性選別処理による違いよりも大きいことが判明した。また性選別によるDNAメチル化の差を認めるサイトが数百箇所認められた。今回樹立した牛のDNAメチル化のゲノムワイド解析法が組織間の違い、および個体間の違いを同定することが可能であることを示し、また性選別によるDNAメチル化の差が認められしたことから、今後対象種雄牛数を増やすことによって確証を得る予定である。また、様々な条件によるDNAメチル化と既存の精液評価項目、さらには繁殖成績との関連を検討し、種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下を関連づける根本的メカニズムの解明を目指すとともにDNAメチル化を指標とした牛凍結精子の新規評価法の樹立による

臨床的有用性と牛特有の新規インプリントинг遺伝子候補の同定といった基礎研究への貢献を目指す。

文 献

- 1) Kobayashi, N., Miyauchi, N., Tatsuta, N., Kitamura, A., Okae, H., Hiura, H., Sato, A., Utsunomiya, T., Yaegashi, N., Nakai, K., Arima, T. : Factors associated with aberrant imprint methylation and oligozoospermia, *Sci Rep.*, **7**, 42336, 2017.
- 2) Elhamamsy, A. R. : Role of DNA methylation in imprinting disorders : an updated review, *J Assist Reprod Genet.*, **34**, 549~562, 2017.
- 3) Kobayashi, H., Sato, A., Otsu, E., Hiura, H., Tomatsu, C., Utsunomiya, T., Sasaki, H., Yaegashi, N., Arima, T. : Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients, *Hum Mol Genet.*, **16**, 2542~51, 2007.
- 4) Donkin, I., Versteyhe, S., Ingerslev, L. R., Qian, K., Mechta, M., Nordkap, L., Mortensen, B., Appel, E. V., Jørgensen, N., Kristiansen, V. B., Hansen, T., Workman, C. T., Zierath, J. R., Barrès, R. : Obesity and Bariatric Surgery Drive Epigenetic Variation of Spermatozoa in Humans, *Cell Metab.*, **23**, 369~78, 2016.
- 5) Chen, Z., Hagen, D. E., Elsik, C. G., Ji, T., Morris, C. J., Moon, L. E., Rivera, R. M. : Characterization of global loss of imprinting in fetal overgrowth syndrome induced by assisted reproduction, *Proc Natl Acad Sci USA.*, **112**, 4618~23, 2015.
- 6) Jelinek, J., Lee, J. T., Cesaroni, M., Madzo, J., Liang, S., Lu, Y., Issa, J. J. : Digital Restriction Enzyme Analysis of Methylation (DREAM), *Methods Mol Biol.*, **1708**, 247~265, 2018.
- 7) Carvalho, J. O., Michalczechen-Lacerda, V. A., Sartori, R., Rodrigues, F. C., Bravim, O., Franco, M. M., Dode, M. A. : The methylation patterns of the IGF2 and IGF2R genes in bovine spermatozoa are not affected by flow-cytometric sex sorting, *Mol Reprod Dev.*, **79**, 77~84, 2012.

牛肉の生産性向上に資する安全なマダニ・マダニ媒介感染症防除法の開発

Development of the safety protective strategy against tick and tick-borne diseases for the improvement of beef productivity in cattle industry

八田岳士・坪川大悟
(北里大学医学部)

Takeshi Hatta and Daigo Tsubokawa
(Kitasato University School of Medicine)

Milk and dairy products as well as beef production is greatly influenced by the strategy to protect against tick and tick-borne diseases including piroplasmosis. Currently, no antiprotozoal vaccines are available and thus the control of tick vectors is of utmost importance. Until now, the control of these vectors depends mainly on the use of chemical acaricides. The emergence of acaricide resistance in ticks due to improper use of these acaricides is becoming a worldwide problem. Accordingly, there is an urgent need for a safe preventive measure against these ticks such as vaccine development. A recombinant protein vaccine (BM86) containing an 86 kDa protein localized on the digestive cell surface of the *Rhipicephalus microplus* has a remarkable success against the feeding and reproduction of this tick species in Australia and South America. Therefore, the aim of this study is to evaluate the vaccine efficacy of BM86-orthologue in *Haemaphysalis longicornis*, the dominant tick in Japan. Three genes including Hl86 have been successfully identified using molecular cloning tests. Domain structure analysis using the predicted amino acid residues showed that they contained multiple EGF-like domains and GPI anchor signal or transmembrane domain, suggesting to be membrane proteins. In the trial experiment, larval ticks which have shown strong expression of the said protein were infested on mice immunized with recombinant Hl86. The ticks mostly survived, completed their feeding, and molted to the next stage. It is suggested that the vaccination of Hl86 alone may possibly be ineffective as a tick control strategy, in spite of the effects of BM86 vaccination against *R. microplus*. Although the other two BM86-orthologues have not been tested yet, it may be necessary to use the BM86 orthologues in combination with a method that reduced the tick gut protease activity.

1. 目的

牛肉や牛乳・乳製品の生産性向上は、国内外を問わずマダニ防除とピロプラズマ病などマダニ媒

介疾病の予防対策の成否によって大きく左右される。抗原虫ワクチンなどが未開発の現状では、唯一の予防手段として病原虫を媒介するマダニのコントロールに全精力が注がれ、いわゆる「殺ダニ

剤」に依存してきた結果、頻回投与による耐性マダニの出現や薬物残留問題が台頭している。そのため畜産物への残留がなく、安全性が担保できる新たな予防手段、すなわち安心・安全なワクチンの開発が求められている。

オウシマダニ中腸の消化細胞表面に局在する分子量86kDaの糖タンパク質（Bm86）の組換えタンパク質ワクチンは当該マダニの吸血防除に対し顕著な効果があることが報告され^{1,2)}、本分子の組換えタンパク質が1993年にHeber Biotec S.A.社（Havana, Cuba）より“Gavac®”，続いて1994年にHoechst Animal Health社（Australia）より“TickGARD®”として上市された。そこで本研究では、国内最優占種であり、我が国の畜産業において重要な小型ピロプラズマ病媒介マダニ種であるフタトゲチマダニについて、その生活環を遮断しうるBm86-orthologue型組換えタンパク質ワクチンの有効性について評価することを目的とした。

2. 方 法

2.1 フタトゲチマダニのマウス・ラットにおける吸血試験

ウサギにて継代飼育しているフタトゲチマダニ単為生殖系岡山株について、ワクチン実験における実験区数を増やすことを目的とし、ウサギより小型のマウスおよびラットにおいてフタトゲチマダニの吸血および産卵が可能か、また継代維持が可能かどうかを検証することを目的とした吸血試験を行った。

2.2 Bm86-orthologue遺伝子の同定

吸血後3～4日目のマダニ中腸よりTRI reagent（Sigma-Aldrich）を用いてtotal RNAを抽出し、次世代シーケンサーによるRNA-seq解析および得られたリード配列のde novoアッセンブリーとNCBI nrペプチドデータベースに対するBLASTx解析によるranscriptome解析

を行い、Bm86-orthologue遺伝子の同定を試みた。得られたBm86-orthologue遺伝子について、ReverTra-Plus-（東洋紡）を用いたRT-PCRによる全長ORFを含むcDNAのクローニングにより配列を決定した。

2.3 バイオインフォマティクス解析

予測アミノ酸配列をもとに、ドメイン構造解析および各マダニ種由来Bm86-orthologue配列に対する相同性解析情報を得た。

2.4 抗ペプチド抗体の作製および内在性タンパク質発現の確認

Bm86-orthologueの予測アミノ酸配列をもとに、ペプチドを合成しBSAをキャリアーとしたペプチド抗原（Sigma-Aldrich）を作製し、ウサギへ免疫することによって抗血清を得た。幼ダニ・若ダニ・成ダニ各発育期別に粗抽出タンパク質液を作製し、これを10%ゲル濃度のSDS-PAGEにて展開後、ウェスタンプロッティングに供した。一次抗体には抗ペプチド抗体を1/100, 1/500, 1/2500, 1/7500の希釀系列で、二次抗体には、anti-Rabbit IgG (H+L)-AP, 1/5000希釀の条件で検討した。

2.5 組換えタンパク質の発現

遺伝子ORFより、シグナル配列等を除く全長をpET49b+（Millipore, Novagen）のBamHIサイトに結合させ、大腸菌コンピテントセルに導入した。コンピテントセルには、細胞質内におけるS-S結合形成能を向上させたE. coli B派生株SHuffle T7 Express Competent E. coli (New England BioLabs)を使用した。

2.6 ワクチントライアル：マウスへの免疫およびマダニによる攻撃試験

発現させたタンパク質をCOSMOGEL GST-Accept（ナカライテスク）を用いてアフィニティ精製を行い、脱塩カラムPD-10（GE Health Care）にてバッファーをPBSに置換後、

TiterMax Gold (TiterMax Inc. USA) アジュvantプロトコールに従い、8週齢のメスBalb/cマウス（5匹）を組換えタンパク質25 μ g/headにて、皮下投与し免疫を行った。一方、コントロールにはアジュvantのみを投与した（3匹）。初回投与後7日目と21日目に等量の抗原を追加免疫し、22日目に幼ダニ約500匹を吸血させ、吸血および脱皮の成否について検討した。

3. 結果と考察

3.1 マウス・ラットにおけるフタトゲチマダニ吸血実験系の確立

小動物用電気バリカンにて剃毛した背部に、15ml（マウス）または50mL（ラット）ファルコンチューブの一部（蓋側2cmを切断したもの）と晒し布を用いて作製した「マダニ繁殖用チャンバー（以下チャンバー）」を、ゴム系多用途接着剤で皺やヨレなく密着させ、6時間以上放置し乾燥させた。チャンバー内にマウス一匹あたり幼：最大1,500匹、若：最大150匹、成：3匹、ラット一匹あたり幼：最大4,500匹、若：最大450匹、成：最大20匹を投入し、吸血し終えるまで飼育を継続した。マウス・ラットともに、幼ダニと若ダニでは飽血したマダニが得られ、すべて脱皮することができ維持することができた。一方、成ダニではマウスでは吸血を終え産卵まで終えたが、ラットを吸血させた成ダニは飽血する個体が少なく、ほとんど産卵することができなかった。以上より、マウスはマダニの吸血源として適しており、ワクチン実験にも有用であることが示唆された。一方ラットは幼ダニ・若ダニの吸血源やワクチン実験解析に供することは可能だが、成ダニには不適当であることが分かった。

3.2 Bm86-orthologueの配列情報解析

フタトゲチマダニのBm86-orthologue遺伝子について、3種候補遺伝子について解析したとこ

ろ、1種類は既報のHI86³⁾、残り2種は新規Bm86-orthologue遺伝子であるATAQ様遺伝子(HIATAQ1およびHIATAQ2)であることが分かった。各タンパク質アミノ酸配列より2次構造のドメイン構造について調査した結果、Bm86 familyに属する分子は、複数の上皮成長因子(Epidermal growth factor, EGF)様ドメインで構成されていた。ただし、分子種によって構成数に差が認められ、Bm86では8個、HI86とHIATAQ1は6個、HIATAQ2は5個であった。EGFドメインは、30～40アミノ酸からなり、6個の保存されたシスティン残基によって3組のジスルフィド結合をつくることで定義される後生動物に特有なタンパク質の基本モジュールであり、このドメインを複数もつタンパク質（ラミニンやニドゲン等）は、EGF受容体のような細胞表面型のシグナル伝達受容体の活性化に関与していることが示唆されている⁴⁾。その他、HI86とHIATAQ1はBm86と同様にグリコシルホスファチジルイノシトール(glycosylphosphatidylinositol, GPI)アンカー型の膜タンパク質と予測されたが、HIATAQ2は、N末端が細胞膜外、C末端が細胞質内に配向する1型膜タンパク質と予測された(Fig. 1)。先行して解析が進められたHI86については、特異抗体を用いた免疫蛍光抗体法により中腸細胞の上皮側に強く局在していることが示唆されており、局在予測に合致していることが示唆された³⁾。

3.3 発育期別Bm86-orthologueタンパク質発現の有無

各発育期における未吸血マダニの全タンパク質を抽出し、抗ペプチド抗体を用いたウェスタンブロッティングによってその発現の有無を調査した。作製した3種類抗体は、いずれも若ダニ、成ダニ粗抗原に対する反応性は認められなかった。しかし、抗HI86-ペプチド抗体は、幼ダニ粗抗原

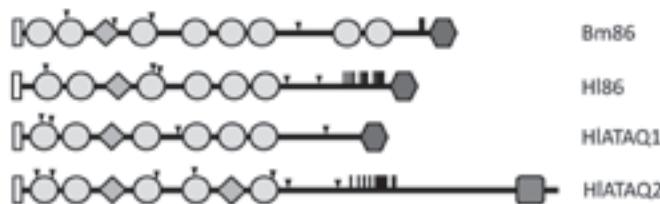


Fig. 1 Predicted domain structure of Bm86 and Bm-orthologues from *H. longicornis*. rectangle : signal peptides, circle : epidermal growth factor (EGF)-like domain, rhombs : incomplete EGF-like domain, hexagon : glycosylphosphatidylinositol (GPI) anchor signal peptides, square : transmembrane region, arrow head : N-glycosylation site, stick : O-glycosylation site.

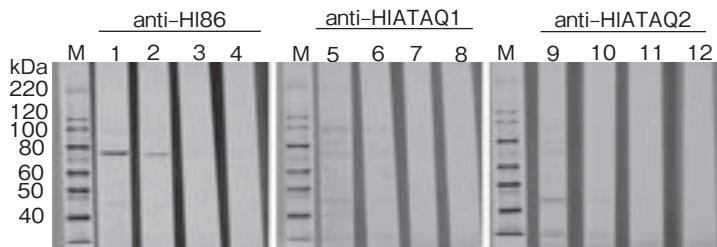


Fig. 2 Western blotting analysis by using anti peptide antibody against the crude antigen prepared from larval ticks. Lane M : Merker, Lane 1, 5, 9 : 1/100 dilution of antibody, Lane 2, 6, 10 : 1/500 dilution of antibody, Lane 3, 7, 11 : 1/2500 dilution of antibody, Lane 4, 8, 12 : 1/7500 dilution of antibody.

に強く反応性を示した (Fig. 2)。HI86の発現量については、幼ダニにおいて最も高発現であることが示唆されたが、他の2種 (HIATAQ1およびHIATAQ2) については、ペプチド抗体が反応しなかったか、または発現量が検出限界以下であると示唆されるが、現在のところ不明である。

3.4 ワクチントライアル

3回免疫後の抗体力価は、コントロール群で4,000 (中央値, N = 3), テスト群で74074.07 (中央値, N = 5) であった (Fig. 3)。攻撃試験に供した幼ダニは飽血し、その後回収した幼ダニを100匹ずつ逃走防止処置済みの小瓶にいれ、湿箱 (RH > 90%, 25°C) にて保存し脱皮の有無を確認したところ、テスト群・コントロール群とともに、すべての小瓶で99%以上の脱皮による若ダニへの変態を確認した。ワクチントライアルの結果から

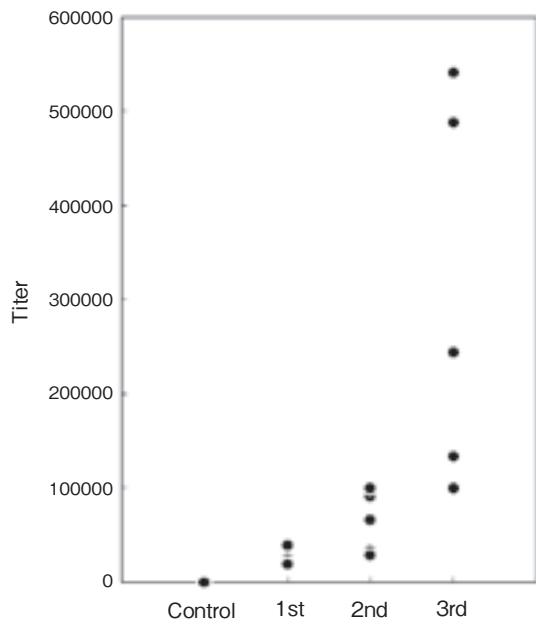


Fig. 3 Antibody titer after the indicated immunization. Dot indicates the individual mouse.

Hl86抗原としてはさらなる改良の必要性がある。フタトゲチマダニと同様3宿主性マダニである *Ixodes ricinus*における最近の研究でも、Bm86ホモログであるIr86-1, Ir86-2および両者の混合組換え抗原によるワクチン効果は認められない⁵⁾ことから、3宿主性のマダニ種では、中腸内におけるタンパク質分解酵素類の発現レベルが高く、取り込んだ抗体や補体の効果を打ち消している可能性が高い⁶⁾。すなわち、Bm86-orthologue等マダニ中腸膜に存在する非暴露型抗原を基軸としたマダニ防御ワクチンの開発には、これら酵素類を阻害する必要がある。

4. 要 約

本研究では、フタトゲチマダニにおけるBm86-orthologueの組換えタンパク質を基軸としたマダニワクチン開発の実現可能性に関し、その予備知見を得ることを目的として検討を行った。その結果、幼ダニでの強発現が確認されたHl86の組換えタンパク質を単体で免疫した場合のワクチン効果はきわめて低い可能性が示唆された。他の2種Bm86-orthologueにおいては検討の余地はあるが、中腸内プロテアーゼ活性を低減させることが可能な阻害剤との併用が有効である可能性が高い。今後は、マダニの中腸プロテアーゼ組換えタ

ンパク質を抗原とする併用アプローチにて検討を進めたい。

文 献

- 1) Willadsen, P., Riding, G. A., McKenna, R. V., Kemp, D. H., Tellam, R. L., Nielsen, J. N., Lahnstein, J., Cobon, G. S., Gough, J. M. : Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*, *J Immunol*, **143**(4), 1346~1351, 1989.
- 2) Rand, K. N., Moore, T., Sriskantha, A., Spring, K., Tellam, R., Willadsen, P., Cobon, G. S. : Cloning and expression of a protective antigen from the cattle tick *Boophilus microplus*, *Proc Natl Acad Sci USA*, **86** (24), 9657~9661, 1989.
- 3) Liao, M., Zhou, J., Hatta, T., Umekiya, R., Miyoshi, T., Tsuji, N., Xuan, X., Fujisaki, K. : Molecular characterization of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* Bm86 homologue from *Haemaphysalis longicornis* ticks, *Vet Parasitol*, **146** (1-2), 148~157, 2007.
- 4) Engel, J. : EGF-like domains in extracellular matrix proteins : localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett*, **251** (1-2), 1~7, 1989.
- 5) Coumou, J., Wagemakers, A., Trentelman, J. J., Nijhof, A. M., Hovius, J. W. : Vaccination against Bm86 Homologues in Rabbits Does Not Impair *Ixodes ricinus* Feeding or Oviposition, *PLoS One*, **10** (4), e0123495, 2015.
- 6) Popara, M., Villar, M., Mateos-Hernandez, L., de Mera, I.G., Marina, A., del Valle, M., Almazan, C., Domingos, A., de la Fuente, J. : Lesser protein degradation machinery correlates with higher BM86 tick vaccine efficacy in *Rhipicephalus annulatus* when compared to *Rhipicephalus microplus*, *Vaccine*, **31** (42), 4728~4735, 2013.

牛胸腺器官培養法の確立

Optimization of bovine thymic organ culture

脇 谷 晶 一・保 田 昌 宏

(宮崎大学農学部獣医解剖学研究室)

Shoichi Wakitani and Masahiro Yasuda

(Laboratory of Veterinary Anatomy, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Early involution of thymus is a risk of low productivity in the livestock industry, because the involution can result in decreased resistance to infection and prolonged duration of the symptoms through the loss of thymic function in maturing T-cells which have a central role in cell-mediated immunity. To establish *ex-vivo* system that enables us to uncover the mechanism of early involution of bovine thymus and to develop a preventive method of the unwanted involution, this study aimed to optimize the organ culture method of bovine thymus. Gas-liquid interphase method using hydrophilic polytetrafluoroethylene membranes and RPMI-1640 media containing 12% of bovine calf serum was applied to the sliced thymus of Japanese Black cattle under three-months-old. The slices incubated at the condition of 7% CO₂ in air at 37°C presented with decreased condense of lymphocytes in the lobule at the following day. In the lobule, marginal region surrounded by the capsule showed higher dense of lymphocytes than the central region. Although the nuclear structure of thymic epithelial cells both in the cortex and medulla had sustained for the first three days, almost all of the epithelial nuclei indicated degenerative changes at the fifth day of incubation. Alternatively, outgrowths of the interlobular connective tissue, including cell proliferation and increased layer of fiber, were confirmed at the fifth day, and then neogenesis of adipose tissues expanded from interlobular region to former lobule. As these sequential findings in histological alteration are similar to the events during *in-vivo* thymic involution, our culture method could be an *ex-vivo* model of bovine thymic involution.

1. 目 的

畜産物を計画的に生産するためには、家畜の健康を保つことが欠かせない。しかし農林水産省が公表する家畜共済統計表によると、平成27年度の加入頭数639万頭に対して疾病事故件数は239万件、死廃事故頭数は38万頭にのぼるように、疾病

による損失が多数発生しているのが現状である。特に子牛の肺炎と下痢症は頻繁にみられ、これら感染症に対する防御には免疫系が重要な役割を担っている。胸腺は病原体等の異物に対する細胞性免疫を司るTリンパ球の成熟・分化に不可欠な一次リンパ器官である。通常、胸腺は春期発動期前後に齢退縮を開始するが、感染症・外傷・放射

線やステロイドホルモンの影響を受けて齢退縮が始まる前に急性退縮（早期退縮）してしまうことがある¹⁾。

胸腺の早期退縮を予防するには、そのメカニズムを理解することが欠かせない。マウスを用いた研究で胸腺の退縮は髓質上皮細胞の増殖機構の破綻が引き金になること²⁾、その破綻にはIFN- α が主要な役割を担うことが明らかにされているが³⁾、そのメカニズムが牛などの家畜でも同様に働いているかどうかは分かっていない。その外挿性を検証するためには対象家畜の生体を用いて研究を行うことが最も好ましいが、少なくとも牛の生体を用いた化合物の添加実験はマウス等の小型動物を用いた同様の実験と比較して費用効率が著しく悪い。器官培養法は各種器官の組織片を体外で維持する*ex vivo*実験モデルである。生体を用いた実験と比較して、器官培養法はより少量の化合物を対象器官に直接添加できる利点がある。また、細胞培養法では失われてしまう異種細胞間の相互作用を保持することができるため、器官培養法は細胞培養法より生体に近い状態を再現することができる。さらに、マウス等の小型実験動物と比較して、牛等の家畜では個体あたりの組織量が多いため、器官培養法は小型実験動物よりも大型家畜に向いている実験系と考えられる。

以上の背景のように、牛胸腺の早期退縮メカニズムを解明し、その予防法を確立するためには、器官培養法を利用した実験を行うことが最も現実的であると考えられるが、器官培養法を牛胸腺に適用した報告は現存しない。よって、本研究ではマウス胸腺器官培養法を基に⁴⁾、牛胸腺器官培養法の至適条件を確立することを目的とする。

2. 方 法

宮崎大学農学部獣医解剖学研究室に病理解剖のために運び込まれた黒毛和種の廃用牛のうち、肉

眼的に胸腺の早期退縮が認められない生後3日齢、2週齢、3ヶ月齢の個体を計3頭用いた。胸腺の胸葉を無菌的に採取後、クリーンベンチ内で約2mm角の組織片を作成した。12%牛胎子血清、ペニシリンおよびストレプトマイシン（100U/mlおよび100μg/ml、Thermo Fisher Scientific）を含有する RPMI-1640 培地（Thermo Fisher Scientific）の表面にメッシュフィルター（Millicell® Cell Culture Insert、Merck）を設置し、そのフィルター上に胸腺組織片を静置して37°C、7%CO₂気相条件下で気液相界面培養を行った。培養開始直前、1日後、3日後、5日後、7日後、14日後に培養胸腺組織片を20%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン切片を作製してHE染色を施した後、光学顕微鏡下で観察した。また、培養開始直前、1日後、3日後、5日後の胸腺組織片からISOGEN II（ニッポンジーン）を用いてRNAを抽出し、ReverTra Ace®（東洋紡）を用いて逆転写反応を行った後にPower SYBR® Green（Thermo Fisher Scientific）によるリアルタイムPCRを実施して培養胸腺内における遺伝子発現量を定量化した。統計学的解析にはTukeyの多重比較法を用いた。

3. 結果と考察

器官培養用に作成した胸腺組織片の組織構造を観察すると、小葉内はリンパ球が高密度に存在し、皮質と髓質の境界が明瞭に判別可能で正常な胸腺の組織構造を保持していることが確認できた。しかしながら、小片化作業の際の切断箇所に相当する被膜に覆われていない小葉の辺縁領域ではリンパ球密度の低下が認められた（Fig. 1）。胸腺組織片の培養1日後、実質内のリンパ球の密度は培養前と比較して全体的に低下していたが、被膜直下の小葉辺縁領域におけるリンパ球の密度は比較的高かった（Fig. 2）。上皮性細網細胞は

異染色質と正染色質を区別可能なヘマトキシリン淡染性で比較的大型の球形核を保持したものが多数認められた。髓質の細網細胞は皮質の細網細胞と比較して細胞質がエオジン好性を示し、細胞の形態が球形に膨張している様子を示すものも認められた。この球形に膨張する像を示す細胞の核はすべて凝縮を示し、核の形態が正常を示す髓質の細網細胞は多角形を示していた。

培養3日後、実質内のリンパ球の密度は辺縁領域を含めてより低下し、培養胸腺片の周囲にはやや乳白色を示す組織液が目立つようになった。細網細胞は核の凝縮を示すものが培養1日後と比較

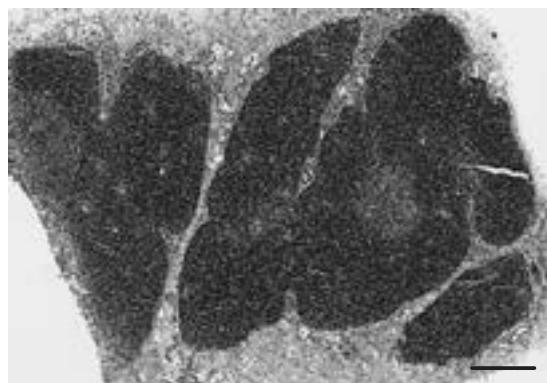


Fig. 1 A thymic slice prepared for the organ culture.
Scale bar : 250μm



Fig. 2 A thymic slice adopted to the organ culture for a day. Lymphocytes are concentrated in the marginal region of the lobule. Scale bar : 500μm

して多く認められ始めたが、ヘマトキシリン淡染性の球形核を保持する上皮性細網細胞も多く存在した。培養5日後、小葉間結合組織や被膜下結合組織においてエオジン好性を示す線維性結合組織の増生が顕著に認められ始めた (Fig. 3)。また、目視ではあるが培養胸腺片が委縮しているようにみられた。上皮性細網細胞は大部分が核の凝縮を示し、小葉の辺縁では細胞質がやや塩基好性を有し、未分化間葉系細胞とみられる細胞の集塊が認められた。この細胞の増加は多数の上皮性細網細胞が生存していたとみられる培養3日後には起こっていなかったため、上皮性細網細胞によって間葉系細胞の増殖が抑えられている可能性が示唆されるが、その証明にはさらなる研究を要する。

5日間の培養期間における胸腺内の遺伝子発現解析を行ったところ、培養3日後から5日後にかけて胸腺特有のサイトカインであるCcl17と胸腺上皮細胞と樹状細胞の表面マーカーであるCD205の発現が減少傾向を示した (Fig. 4)。また、細胞傷害性T細胞とその前駆細胞が発現するCD8aの発現量もリンパ球の密度低下が組織学的に認められた培養3日後には培養開始直前と同等に維持

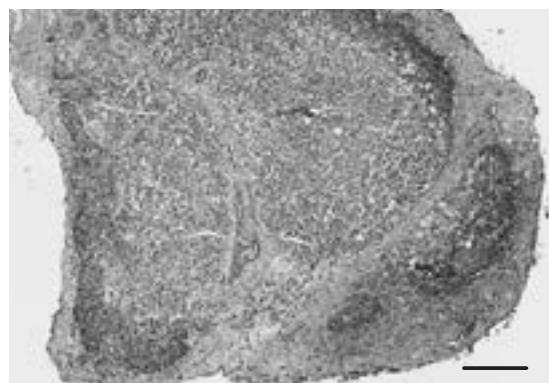


Fig. 3 A thymic slice adopted to the organ culture for five days. Connective tissue in interlobular and subcapsular region indicates overgrowth. Proliferated mesenchymal-like cells are expanding to the lobule. Scale bar : 250μm

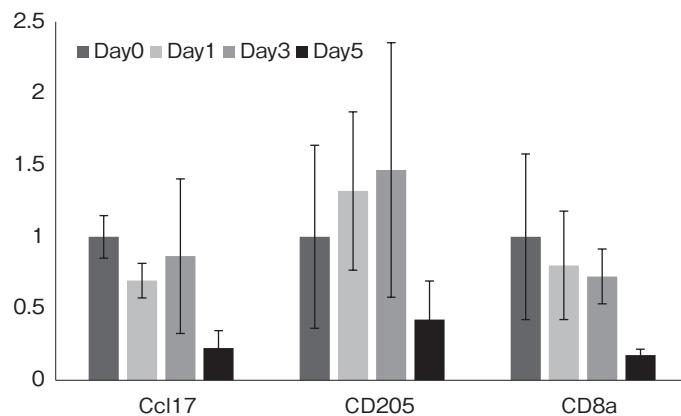


Fig. 4 Gene expression in the incubated thymus. Each column and error bar indicates mean and standard error, respectively, of triplicate samples derived from the same individual. The statistical difference has not been determined.

されていたが、培養3日後から5日後における減少傾向を示した。この結果はCD8aを発現するT細胞のクラスターが胸腺上皮細胞の産生するCcl17等のサイトカインの影響を受けて胸腺内に付着する可能性を示唆するが、その検証にはさらなる研究を要する。また、本研究で実施した遺伝子発現解析ではいずれの遺伝子に関しても同一個体に由来するサンプルごとの偏差が大きく、培養期間に依存した有意差は認められなかった。2mm角の組織片では含まれる細胞構成が大きく異なる可能性があるため、遺伝子発現解析によって安定的な結果を得るために組織片の大きさを再考する必要があると考えられる。

培養7日後には未分化間葉系細胞とみられる細胞が小葉内を占めるようになり、上皮性細網細胞はエオジン好性の残骸として集塊状に認められるのみであった。小葉間結合組織では単胞性脂肪細胞が集まった脂肪組織の出現が認められた。培養14日後には小葉内にも線維性結合組織様の構造が認められたが、中隔の線維性結合組織が示すエオジン好性は認められなかった。脂肪組織は中隔で多数認められるようになり、小葉内にも大型の小胞を有する白色脂肪細胞様の細胞が認められた

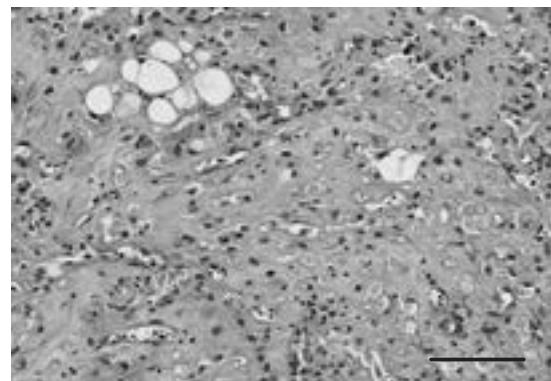


Fig. 5 A thymic slice adopted to the organ culture for fourteen days. Maturated adipose cells are shown in the interlobular region. Cells in the former lobule also contain large follicles. Scale bar : 100μm

(Fig. 5)。

胸腺が齢退縮する際、リンパ球の減少、皮質と髓質の萎縮が起こった後、中隔から脂肪細胞が次第に増加し、最終的には実質が脂肪組織で置き換えられる⁵⁾。本研究で行った牛胸腺の器官培養では、初めに小葉内のリンパ球の密度が低下し、上皮性細網細胞の退行性変化が完了したとほぼ同時に小葉間結合組織の増生が認められ、脂肪組織が中隔から実質へと順次出現した。このように、本研究の器官培養法は生体内の胸腺退縮の組織学的

変化を模倣しており、胸腺退縮の体外モデルとなり得ることが明らかになった。本培養法を用いれば、胸腺の退縮を防止する物質のスクリーニングを比較的小頭数の牛を用いて実施することが可能と考えられる。また、そのような胸腺の退縮を防止する物質を本培養法に用いれば、より長期間牛胸腺を生体外で維持することが可能であると考えられる。

4. 要 約

胸腺の早期退縮は感染に対する抵抗性の低下や感染症の慢性化を招き、計画的な畜産物の生産を妨げる要因の一つと考えられている。牛胸腺の早期退縮メカニズムを解明し、その予防法を確立する前段階として本研究では牛胸腺器官培養法の確立を試みた。生後3か月齢未満の黒毛和種牛の胸腺に対し、12%牛胎子血清含有RPMI-1640培地を用いて気相液相界面培養を行ったところ、培養1日後に胸腺小葉内のリンパ球密度の低下、5日後に小葉間結合組織の増生が認められた。上皮性細網細胞は培養3日後まで正常な核の形状を示すものが多数認められたが、5日後にはほとんどの核が凝縮を示した。培養7日後には中隔内にお

ける脂肪組織の新生がみられ、14日後には小葉内においても脂肪組織の新生は観察された。本研究で培養胸腺組織片内に認められた組織学的变化は生体内における胸腺の退縮過程と一致していることから、本研究で実施した培養法は生体外の牛胸腺退縮モデルとなり得ることが明らかになった。

文 献

- 1) Ansari, A. R., Liu, H.: Acute Thymic Involution and Mechanisms for Recovery, *Arch Immunol Ther Exp.*, 65, 401~420, 2017.
- 2) Sekai, M., Hamazaki, Y., Minato, N.: Medullary thymic epithelial stem cells maintain a functional thymus to ensure lifelong central T cell tolerance, *Immunity*, 41, 753~761, 2014.
- 3) Papadopoulou, A. S., Dooley, J., Linterman, M. A., Pierson, W., Ucar, O., Kyewski, B., Zuklys, S., Hollander, G. A., Matthys, P., Gray, D. H., de Strooper, B., Liston, A.: The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- α receptor, *Nat Immunol.*, 13, 181~187, 2011.
- 4) Anderson, G., Jenkinson, E. J.: Thymus organ cultures and T-cell receptor repertoire development, *Immunology*, 100, 405~410, 2000.
- 5) Rezzani, R., Nardo, L., Favero, G., Peroni, M., Rodella, L. F.: Thymus and aging : morphological, radiological, and functional overview, *Age*, 36, 313~351, 2014.

卵巢の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明と診断法の確立

Study of reproductive disorders in pigs caused by iron deficiency in the ovary and establishment of its diagnostic methods

山 下 泰 尚

(県立広島大学生命環境学部)

Yasuhisa Yamashita

(Department of Life and Environment Science, Prefectural University of Hiroshima)

We previously showed that the transferrin (TF), carrier protein of trivalent iron ion (Fe^{3+}) is accumulated in growing follicle in pig. In this study, to firstly investigate the mechanism of iron ion uptake in growing follicle, expression of transferrin receptor, *Tfr1* mRNA and intracellular localization of iron in granulosa/cumulus cells were detected. The expression of *Tfr1* mRNA was highly expressed in cumulus cells and granulosa cells through follicular development. When granulosa cells were primary cultured with FSH and TF- Fe^{3+} , a lot of red fluorescence showing iron ions was detected. TF- Fe^{3+} significantly induced *Cyp19a1* mRNA expression in cumulus cells during in vitro maturation of cumulus-oocyte complexes (COCs). Furthermore, the supplement of TF- Fe^{3+} in FSH-contained medium where cultured cumulus-oocyte complexes (COCs) significantly up-regulated formation rate of Molura compared to control that were cultured with FSH alone. Thus, these results indicated that uptake of TF derived- Fe^{3+} via TFR1 in granulosa/cumulus cells were important for oocyte maturation and developmental competence of oocyte, and its failure inhibit ovarian function during follicular development. Almost 8% of the follicular fluid showed low iron concentration compared to that collected from low COC expansion rate, implying that iron content in the ovary is one of the causes of reproductive disorders in pig.

1. 目 的

哺乳動物では、卵巣から受精後に十分発生能を有した卵が排卵されるが、その形成には、卵巣における卵胞発育と排卵過程が重要であることが知られている。この卵胞発育と排卵は、それぞれ下垂体から放出され、卵胞表面の血管を介して卵胞に作用するFSH（卵胞刺激ホルモン）とLH（黄

体形成ホルモン）により誘導されることから、これらが受容体の存在する卵胞の最外部を構成する顆粒層細胞や卵の周りの卵丘細胞に作用し、間接的に卵が発生能獲得に関与すると考えられてきた。しかし、FSHやLHの下流に存在する因子などを考慮しても体外培養後の発生率は、体内のそれと比較し著しく低い。我々は、卵胞表面に形成される血管に着目し、卵胞発育時の卵胞に特異的

にトランスフェリン (TF) が血液中の4倍以上も存在することを見出した。

TFは、主に肝臓で合成され、3価の鉄イオン (Fe^{3+}) を2分子抱合可能な鉄の担体タンパク質である^{1,2)}。TFに対する受容体には主にTfr1とTFR2の2つのサブタイプが存在し、 Fe^{3+} を抱合したTFはこれらの受容体と結合すると、細胞内にエンドソームとして取り込まれ、還元された Fe^{2+} が細胞質中に貯蔵されることが報告されている^{3~5)}。貯蔵された Fe^{2+} は、適時必要に応じて主にエネルギー合成、細胞増殖などを促進する。これまでにヒト、マウス、豚において、TF受容体 (TFR1) が卵胞に存在することは示されているものの、その役割と繁殖障害との関係はまったく不明である。そこで本研究では、まず卵胞発育および排卵時にTFにより卵胞に供給される鉄イオン (Fe^{3+}) が卵成熟を誘導し、この破綻が卵巣機能の低下と関係することを明らかにするために以下の研究を行った。

2. 方 法

2.1 実験1 卵巣内の鉄取り込み制御因子の発現と鉄の局在

食肉処理場由来の正常個体の豚の卵巣から卵胞サイズ別 (3 mm以下, 3~5 mm, 5~8 mm, 8 mm以上) に顆粒層細胞を回収した。また、排卵後に形成される黄体 (CL) の開花期と退行期も回収した。回収後、卵、卵丘細胞、顆粒層細胞におけるTF受容体 (*Tfr1*) のmRNA発現をRT-PCR法により調べた。またサイズ別に回収した顆粒層細胞と黄体開花期、黄体退行期の *Tfr1* mRNA発現をRealtime RT-PCR法により検出した。TFにより供給される Fe^{3+} は細胞内に取り込まれる際に Fe^{2+} に還元され細胞内に蓄積されることから、顆粒層細胞を初代培養し、FSHとTF- Fe^{3+} を添加していない区をコントロールと

し、これらを添加した培地で1時間培養した区をTF- Fe^{3+} 区とした。培養後、細胞内に取り込まれた Fe^{2+} に特異的に結合するFeRhoNox-1を添加し、この局在を蛍光顕微鏡で調べた。

2.2 実験2 卵胞発育環境におけるTF- Fe^{3+} の役割

卵胞発育時における鉄イオンの役割を調べる目的で、卵胞発育刺激を模倣した低濃度FSH (10ng/ml) を添加した培地で培養した区をコントロールとし、これに卵胞液中の Fe^{3+} と結合したTF量 (14mg/ml) を添加して培養した区を+TF- Fe^{3+} 区として実験1と同様に回収した卵丘細胞卵複合体 (COC) を10あるいは12時間培養した。培養後の卵丘細胞における卵胞発育マーカー (*Ccnd2*, *Cyp19a1*) の発現 (12時間)、増殖細胞を示すPCNA陽性細胞を蛍光免疫染色により染色し、PCNA陽性細胞数を調べた (10時間)。また、培養後のCOC形態を調べた (12時間)。さらに、卵胞発育環境時にTF- Fe^{3+} を添加することが卵成熟および発生能に及ぼす影響を調べるために、卵胞発育環境でコントロール区およびTF- Fe^{3+} 区で12時間培養後、高濃度FSH (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加した培地でさらに20, 24, 48時間培養した。培養後、排卵促進マーカー遺伝子 (*Has2*, *Ptx3*, *Tnfaip6*) の発現 (20時間)、COCの膨潤直径 (48時間)、卵の核膜が消失し減数分裂が再開したことを示す指標の卵殻胞崩壊 (Germinal Vesicle Breakdown; GVBD) 率 (24時間) と卵成熟が完了したことを示す第二減数分裂中期 (Metaphase II; MII) 率 (48時間) を調べた。また一部のCOCを豚新鮮精液による体外受精に供試し、7日間発生培養し、着床前の胚盤胞 (Blastocyst) 率を調べた。

2.3 実験3 排卵環境におけるTF- Fe^{3+} の役割

排卵期の鉄イオンの役割を調べる目的で、排卵

期を模倣した高濃度FSH（1 µg/ml）とEGF（1 ng/ml）を添加した培地で培養した区をコントロール、TFを添加した区を+TF-Fe³⁺区としてCOCをさらに20, 24, あるいは48時間培養した。培養後の排卵促進マーカー遺伝子（*Areg*；10時間, *Ereg*；15時間, *Egfr*；20時間, *Has2*；20時間, *Ptx3*；20時間, *Tnfaip6*；20時間）の発現、COCの膨潤直径（48時間）、卵成熟率（GVBD；24時間、MII率；48時間）を調べた。また一部のCOCを体外受精し、7日間発生培養後胚盤胞（Blastocyst）率を調べた。

2.4 実験4：卵巣中鉄濃度の測定による卵巣鉄不足による繁殖障害豚の推定

食肉処理場由来の豚からランダムに卵巣を採取し（14個体分）、1頭分の直径8 mm以上のすべての卵胞から卵胞液を1つの遠沈管に採取した。これらの卵胞液中の鉄濃度濃度を測定し、血中鉄濃度が平均値よりも半分以下の低い個体群を選抜した。選抜した血中鉄濃度の低い個体群の卵巣から回収したCOCを体外成熟培養し、COCの膨潤直径からこれらの個体群における繁殖性を推定した。

3. 結果と考察

3.1 実験1 卵巣内の鉄取り込み制御因子の発現と鉄の局在

卵胞発育時の*Tfr1*の発現は、顆粒層細胞および卵丘細胞に強く発現したが、卵にはまったく検出されなかった（Fig. 1 A）。卵胞サイズ別に回収した顆粒層細胞における*Tfr1* mRNA発現をrealtime RT-PCRにより検出した結果、*Tfr1*発現は、すべての卵胞サイズで変化せず、黄体の開花期および退行期においても恒常に発現していた（Fig. 1 B）。コントロール区におけるFe²⁺を示す赤色の蛍光像はまったく検出されなかった。一方、TF-Fe³⁺を添加して培養すると、Fe²⁺を示す赤色の蛍光像が多数検出された（Fig. 1 C）。これらの結果から、卵胞発育期から黄体期にTFと結合したFe³⁺はTfr1を介して細胞内に取り込むことが可能であることが明らかになった。

3.2 実験2 卵胞発育環境におけるTF-Fe³⁺の役割

実験2では、まず卵胞発育期におけるTF-Fe³⁺

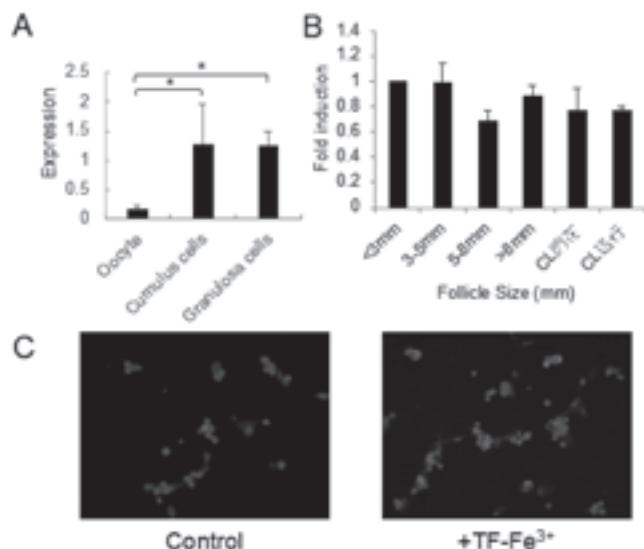


Fig. 1 Expression of and localization of Fe²⁺ in granulosa cells.
GC: granulosa cells, CC: cumulus cells

の役割を検討した。その結果、卵丘細胞における卵胞発育マーカー遺伝子 (*Ccnd2*, *Cyp19a1*) の発現は、コントロール区に比べ、TF-Fe³⁺区において有意に高い値を示した (Fig. 2 A, 2 B)。また、PCNA陽性細胞もコントロール区に比べTF-Fe³⁺区において多く観察された (Fig. 2 C)。

TF-Fe³⁺を添加した卵胞発育環境が、排卵環境で培養後の卵成熟に及ぼす影響を調べた結果、*Has2*の発現には影響なかったが、*Ptx3*, *Tnfaip6*の発現、COC直径はTF-Fe³⁺区で有意に高い値を示した (Fig. 2 D, 2 E, 2 F, 2 G)。MII率については、コントロール区とTF-Fe³⁺区で同程度の値を示したが (Fig. 2 H), 胚盤胞率はTF-Fe³⁺区で有意に高い値を示した (Fig. 2 I)。これまでの研究により、卵の成熟能には核が受精前の状態へと変化する核成熟能と精子と受精後発生することが可能となる細胞質成熟の2つが存在することが知られている。本研究ではMII率という核成熟能の指標についてはコントロール区とTF-Fe³⁺区で差が認められず高い値を示したことから、鉄

イオンは核成熟には関与しないと考えられた。一方、胚盤胞率については、TF-Fe³⁺区で高い値を示したことから、鉄イオンは卵の細胞質成熟を促進することが明らかになった。

3.3 実験3 排卵環境におけるTF-Fe³⁺の役割

卵胞発育期の後の排卵期におけるTF-Fe³⁺区の役割を検討する目的で、排卵環境の高濃度FSH添加時で検討し、排卵促進マーカー遺伝子の発現を調べた結果、*Ptx3*, *Tnfaip6*の発現はコントロール区とTF-Fe³⁺区で差が認められなかつたが、*Areg*, *Ereg*, *Egfr*, *Has2*の発現はコントロール区に比べ、TF-Fe³⁺区で有意に低い値を示した (Fig. 3 A)。このことから、排卵環境においてはほとんどの排卵促進マーカー遺伝子の発現を負に影響することが明らかになった。さらにMII率にはTF-Fe³⁺はまったく影響しなかつたが (Fig. 3 B), 発生後の胚盤胞率に関してはコントロール区で20%程度であったものが、TF-Fe³⁺区ではまったく認められなかつた (Fig. 3 C)。以上の結果から、卵胞発育期に蓄積するTF-Fe³⁺は卵胞

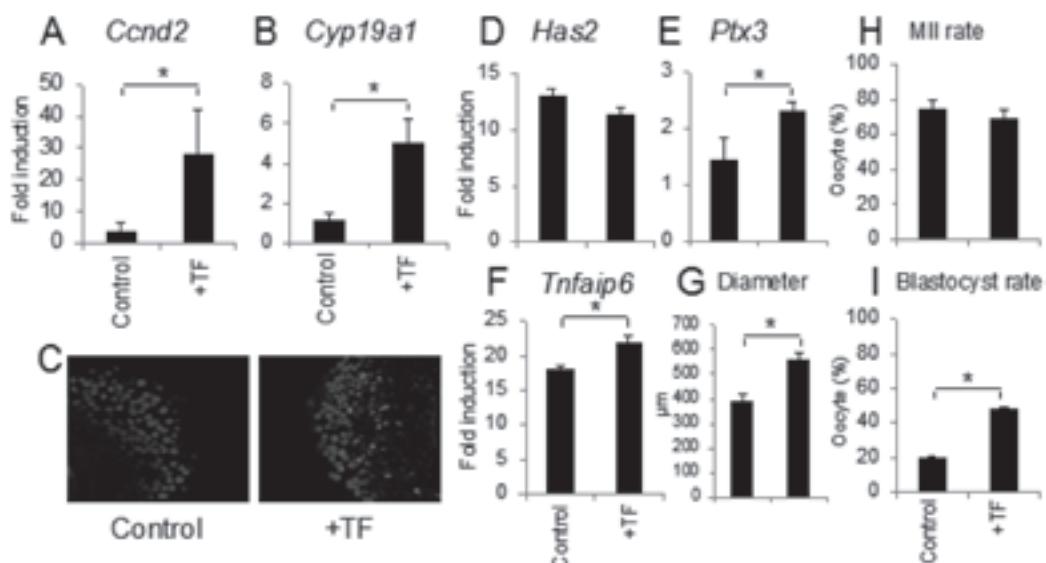


Fig. 2 Effect of supplement of TF-Fe³⁺ in follicular development condition in vitro on expressions of follicular development-related gene (A, B), granulosa cell proliferation (C), expressions of ovulation related gene (D, E, F), COC expansion (G), and MII rate (H), and blastocyst rate (I).

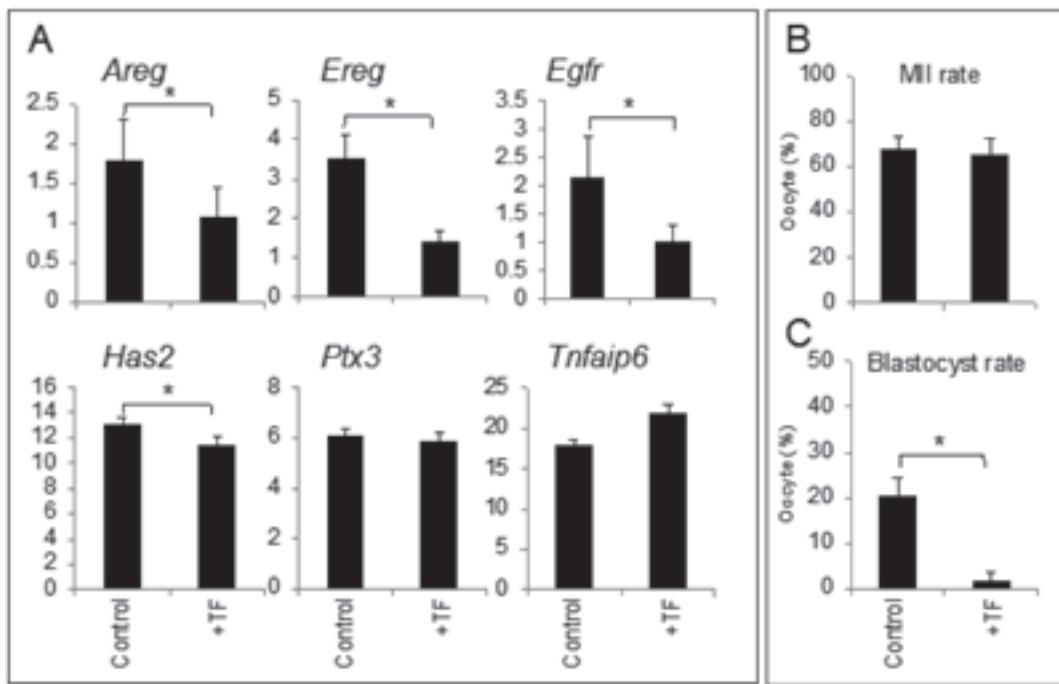


Fig. 3 Effect of supplement of TF- Fe^{3+} in ovulation condition in vitro on expressions of ovulation-related gene (A), MII rate (B), and blastocyst rate (C).

発育、卵成熟を促進する新規因子であることが明らかになった。さらに、それに続く排卵期にTF- Fe^{3+} 区が存在することはマイナスに作用することが明らかになった。

3.4 実験4 卵巣中鉄濃度の測定による卵巣鉄不足による繁殖障害豚の推定

卵巣中の鉄濃度が平均値は、 $40.69 \pm 3.18 \mu\text{g}/\text{dl}$ であり、この半分に満たない鉄濃度の低い個体群は、4サンプルであり（28.5%）、その値は $9.79 \pm 2.02 \text{mg}/\text{ml}$ であった（Fig. 4 A）。卵巣鉄が正常な個体群のCOC形態は、卵丘細胞が十分に膨潤していたが、鉄濃度の低い卵巣鉄由来のCOCではこの膨潤が不十分であった（Fig. 4 B）。このことから、卵巣鉄の不足により卵胞発育、排卵過程が阻害され、繁殖障害の一因となると考えられた。今後は、正常個体のTF- Fe^{3+} 濃度で培養することで、上昇するかを検討し、卵巣鉄不足が繁殖性を低下させる原因であることを確定診断する方法

を確立する予定である。

4. 要 約

当研究室では、卵胞発育期の豚卵胞にはTFが多量に蓄積することを見出した。TFは鉄イオン（ Fe^{3+} ）の担体タンパク質であることから、正常な卵成熟にはTFにより供給される鉄イオンが重要であり、その破綻が繁殖障害となると仮説を立て、以下の研究を行った。まず、卵巣におけるTfr1とTRF2の発現を調べた結果、Tfr1が卵胞の顆粒層細胞と卵丘細胞に発現すること、TF- Fe^{3+} 依存的に顆粒層細胞に鉄が取り込まれることを明らかにした。また体外培養系を用いた解析により、卵胞発育環境においてTF- Fe^{3+} 依存的に卵胞発育マーカーと顆粒層細胞の増殖活性が増加することを明らかにした。さらに、その後続けて排卵環境で培養すると卵成熟が促進され、体外受精後の発生能が向上することを明らかにした。一

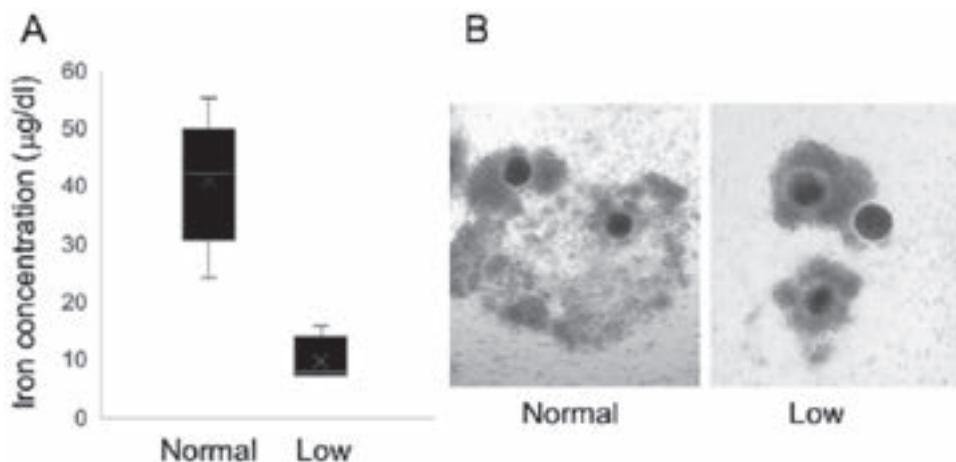


Fig. 4 Iron concentration distribution, and morphology of expansion of COC collected from between normal and low iron amount in ovary.

方、卵胞発育環境を経ずに排卵環境でCOCを培養すると卵成熟が抑制され、胚発生が低下したことから、TF-Fe³⁺は卵胞発育期限的に働く卵成熟促進因子であることが明らかになった。さらに、卵巣鉄の低い個体から採取したCOCを培養し、COCの膨潤直徑を測定したところ、28.5%が低い値を示していたことから、卵巣鉄の不足により卵胞発育、排卵過程が阻害され、繁殖障害の一因となると考えられた。

文 献

- Williams, J., Grace, S. A., Williams, J. M. : Evolutionary significance of the renal excretion of transferrin half-molecule fragments, *Biochem. J.*, 201 (0264-6021), 417~419, 1982.
- Bowman, B. H., Yang, F. M., Adrian, G. S. : Transferrin : Evolution and Genetic Regulation of Expression, *Advances in Genetics*, 25, 1~38, 1988.
- Aisen, P. : Transferrin receptor 1, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (11), 2137~2143, 2004.
- Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Andrews, N. C. : Balancing Acts : Molecular Control of Mammalian Iron Metabolism, *Cell*, 117 (3), 285~297, 2004.
- Lawrence, C. M. : Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor, *Science*, 286 (5440), 779~782, 1999.

鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルス耐性機構の解明：感染細胞における初期応答の品種間比較

Elucidation of the resistance mechanisms for highly pathogenic avian influenza virus in chickens—early antiviral response in infected cells

松 鶴 彩

(鹿児島大学共同獣医学部附属越境性動物疾病制御研究センター)

Aya Matsuu

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

Highly pathogenic avian influenza virus (HPAIV) causes severe clinical symptoms in chickens. The mechanisms underlying the highly pathogenic manifestation of the HPAIV in chickens has not been fully elucidated. In our previous study, we found the differences in the sensitivities to HPAIV among the different breeds of chicken. In this study, to understand the underlying molecular differences in host response in the primary chicken embryo fibroblast (CEF) cells were isolated from two different chicken breed (SPF white leghorn and native chicken), and infected with HPAIV and low pathogenic avian influenza virus (LPAIV). We found that HPAIV replication in CEF cells isolated from native chicken were slightly inhibited than SPF white leghorn. Two chicken breed showed significantly different interferon, and interferon stimulated genes mRNA expression pattern after infection. Although we could not identify the host factor associated with increased resistance to HPAIV in native chicken, CEF cells of this study may be useful model for determining the host defense mechanisms against HPAIV through extensive genetic analysis.

1. 目 的

高病原性鳥インフルエンザ（HPAI）は、家禽に対して強力な病原性を有するH5あるいはH7亜型インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患である。国内では2003年に79年ぶりに発生が認められて以降、野鳥や養鶏場において散発的な発生が認められている。高病原性鳥インフルエンザウイルス（HPAIV）に感染した鶏は急激な臨床症状の悪化を示し、またウイルスの強い伝播性を有することから、HPAIは畜産界において甚

大な被害をもたらす重要疾病の一つである。

家禽の中でも特に鶏はHPAIVに対する感受性が高い。HPAI制圧のためには鶏における病原性発現機序の解明が不可欠であるが、その詳細は現時点で十分に解明されていない。我々は平成28年度研究において国産地鶏を用いた感染実験を実施し、地鶏の中にはH5N8亜型HPAIVに対して耐性を示す品種が存在することを明らかにした。このような異なる感受性の鶏はHPAIVに対する宿主防御機構を解明するための有用なモデルとなる可能性に着目した。

本研究ではウイルスと宿主の最初の攻防の場である感染細胞におけるウイルス増殖性および宿主応答性の違いを比較することを目的とし、HPAI耐性地鶏および感受性SPF白色レグホン由来の初代鶏胚線維芽（CEF）細胞を用いて、HPAIVおよび低病原性鳥インフルエンザウイルス（LPAIV）の二種類のA型インフルエンザウイルスの感染実験を行った。

2. 方 法

2.1 ウィルス株

本研究では2014年冬季に鹿児島県内の野鳥から分離されたH5N8亜型HPAIVであるA/duck/Kagoshima/KU-70/2015¹⁾およびH11N9亜型LPAIVであるA/duck/Kagoshima/T40/2014を用いた。

2.2 CEF細胞

SPF白色レグホン種および鹿児島県産地鶏由來の10日齢の発育鶏卵から鶏胎子を取り出し、常法によりCEF細胞を10%FBS添加DMEMに浮遊させ、6ウェルプレートに添加し、37°Cで培養を行った（SPF-CEFおよびnative-CEF）。24時間後に接着していない浮遊細胞を除去し、PBSで細胞を洗浄したのち、2種類のウイルス（10²EID₅₀あるいは10⁶EID₅₀）あるいはpolyI:Cを接種した。接種後10、16、24時間後に細胞を洗浄したのち回収し、RNAを抽出した。

2.3 CEF細胞におけるウイルス増殖

回収したRNA1 μlを用いてSYBR Green real-time PCR（Agilent Brilliant Ultra SYBR QPCR）法によってA型インフルエンザウイルスM遺伝子の増幅を確認した。

2.4 CEF細胞における免疫関連遺伝子発現解析

βアクチンを内部標準として、SYBR Green real-time PCR法を用いた△△法により、以下の

11種類の遺伝子：インターフェロン（IFN- α ，IFN- β ，IFN- λ ），炎症サイトカイン（IL-6, IL-8, IL1 β , TNF- α ），interferon stimulated gene（Mx 1 およびOAS：2'5'-oligoadenylate synthetase），受容体（MDA5およびTLR3），の発現について解析を行った。

3. 結果と考察

高用量（10⁶EID₅₀）のHPAIVおよびLPAIVを感染させたCEF細胞内でのウイルス増殖について、品種間で明らかな違いは認められなかった。一方、低用量（10²EID₅₀）のHPAIVを感染した後のウイルス増殖は、native-CEFにおいて有意に抑制された。LPAIVについても同様の傾向が認められたが、品種間で統計学的有意差は認められなかった（Fig. 1）。

I型およびⅢ型インターフェロンmRNA発現をFig. 2に示した。SPF-CEF細胞においてHPAIV感染後のIFN α およびIFN β 発現が16時間後にピークに達したのに対し、native-CEF細胞は24時間後に同レベルに達したことから、native-CEF細胞ではI型インターフェロン発現が遅延する傾向にあった。またLPAIV感染16～24時間後にかけてのI型インターフェロン発現についてもnative-CEF細胞の方が低い傾向にあった。一方Ⅲ型インターフェロンであるIFN γ の発現は二種類のウイルス感染10～24時間後においてnative-CEF細胞の方が高い傾向にあった。過去の研究では、HPAIVに対して異なる感受性を示すアヒルと鶏由来胎子線維芽細胞を用いてHPAIVに対する宿主応答を比較しているが、HPAIV耐性を示すアヒルに比べて鶏由来細胞において、Ⅲ型インターフェロンのアップレギュレーションが確認されている²⁾。本研究では同じ動物種の中で品種によるインターフェロン発現様式の差が認められ、免疫応答性に違いが存在する

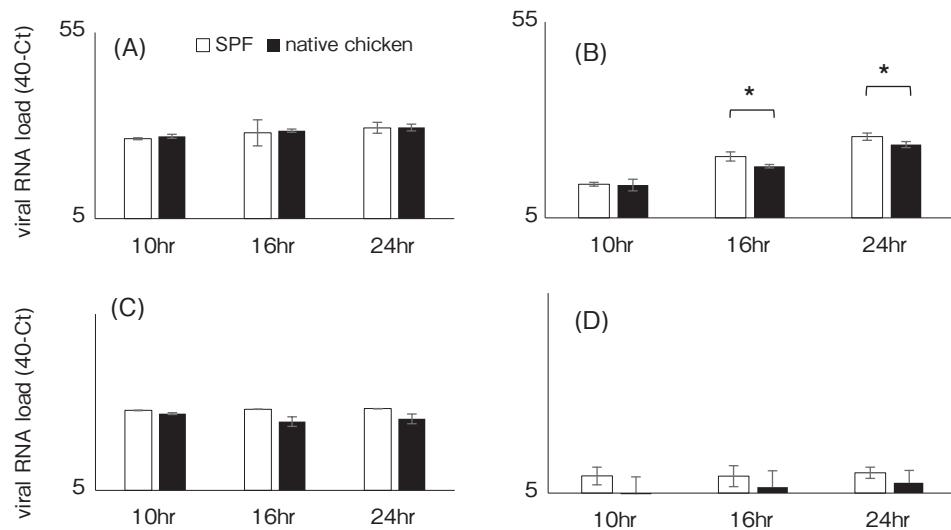


Fig. 1 Quantification of viral RNA by real-time RT-PCR. Cells were harvested from 3 eggs per group after 10, 16, and 24 hours post (A) H5N8 10^6 EID₅₀, (B) H5N8 10^2 EID₅₀, (C) H11N9 10^6 EID₅₀, and (D) H11N9 10^2 EID₅₀ infection and type A influenza virus M gene was analyzed using SYBR Green real-time PCR. * $p<0.05$ between SPF chicken (white) and native chicken (black).

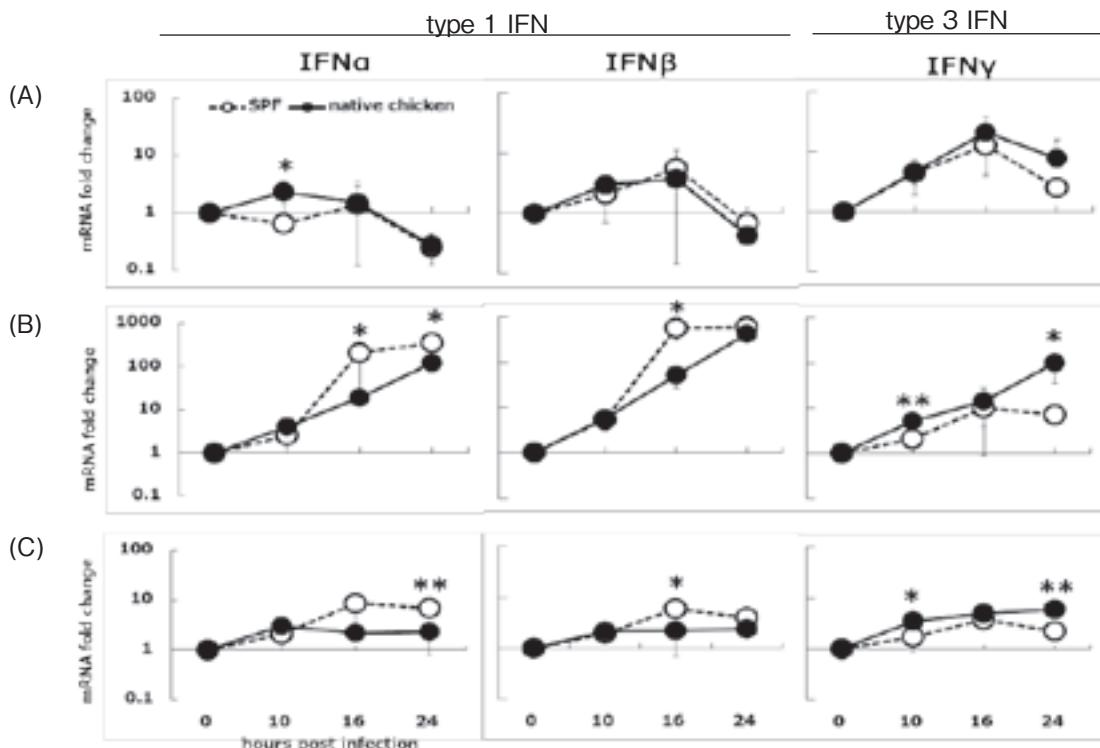


Fig. 2 Comparison of Interferon mRNA expression. Cells were harvested from 3 eggs per group after 10, 16, and 24 hours post (A) poly I : C inoculation, (B) H5N8 10^6 EID₅₀, and (C) H11N9 10^6 EID₅₀ infection and interferon mRNA expression was analyzed using real-time PCR. * $p<0.05$ and ** $p<0.01$ between SPF chicken (white circle) and native chicken (black circle).

可能性が疑われた。

インターフェロンにより誘導される抗ウイルス遺伝子IFN-stimulated genes (ISG)としてMx 1およびOAS発現を評価した。Mx1 mRNA発現については、SPF-CEF細胞においてpolyI:C刺激、HPAIVおよびLPAIV感染初期（10時間後）から高い発現が認められた。これに対してnative-CEF細胞ではウイルス感染後期（16時間後）に同レベルにまで上昇し、さらにHPAIV感染後24時間においてSPF-CEFよりも有意に高い発現が認められた。OAS mRNA発現はpolyI:C刺激後初期（10時間）にSPF-CEFにおける有意な発現上昇が認められたが、HPAIV感染後後期（24時間）にはnative-CEFの有意な発現上昇が認められ、Mx1 mRNAと類似した結果が得られた (Fig. 3)。近年の哺乳動物由来細胞を用いた研究では、A型インフルエンザウイルス感染によって、ISGの発現がIFN非依存的に誘導されることが指摘さ

れている²⁾。本研究においても特にSPF-CEFがIFN mRNAの発現が上昇するより早い段階でMx 1やOAS mRNAの発現が上昇しており、IFN非介在性の応答を反映している可能性が疑われる。特にHPAIV感染24時間後のMx 1およびOAS発現がnative-CEFで有意に上昇していることから、ウイルス増殖抑制に関連する可能性が疑われる。一部の研究においてMx 1遺伝子の一塩基多型とインフルエンザウイルス耐性の関連性が示されている^{3, 4)}。本研究で用いた細胞のMx 1遺伝子配列については未実施であるものの、地鶏のMx 1遺伝子ではこの多型が認められる確率が高いことを確認している（データ非表示）。このような多型とISG発現の違いとの関連性の解明は今後の課題である。

炎症性サイトカインとしてIL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α mRNAの発現を比較したが、SPF-CEFおよびnative-CEFの間で有意な差は認められな

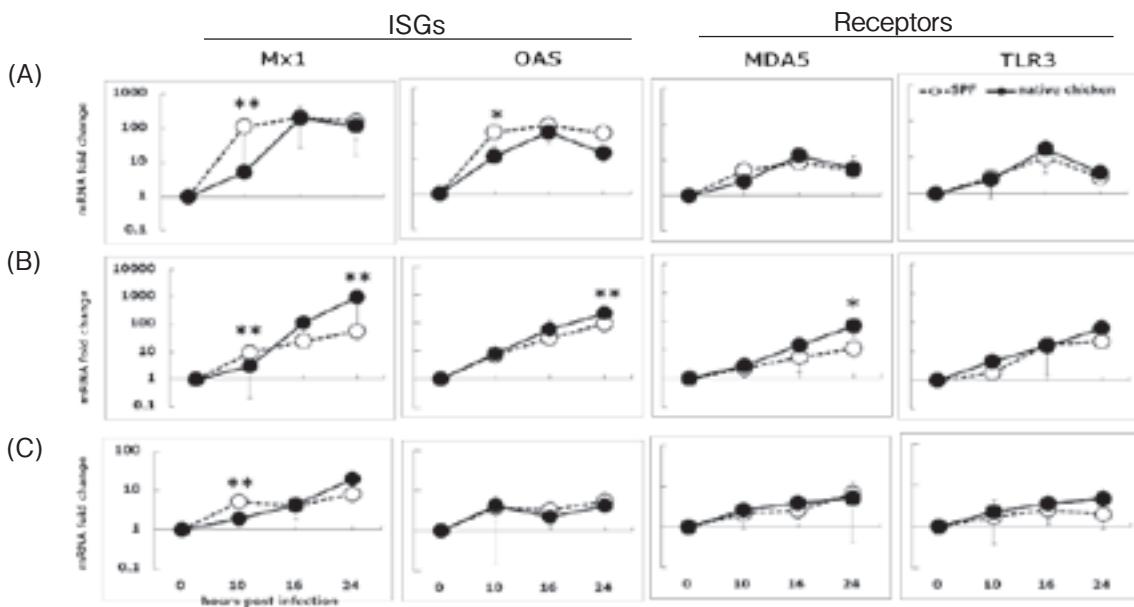


Fig. 3 Comparison of cytokine mRNA expression. Cells were harvested from 3 eggs per group after 10, 16, and 24 hours post (A) poly I : C inoculation, (B) H5N8 10⁶EID₅₀, and (C) H11N9 10⁶EID₅₀ infection and interferon mRNA expression was analyzed using real-time PCR. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between SPF chicken (white circle) and native chicken (black circle).

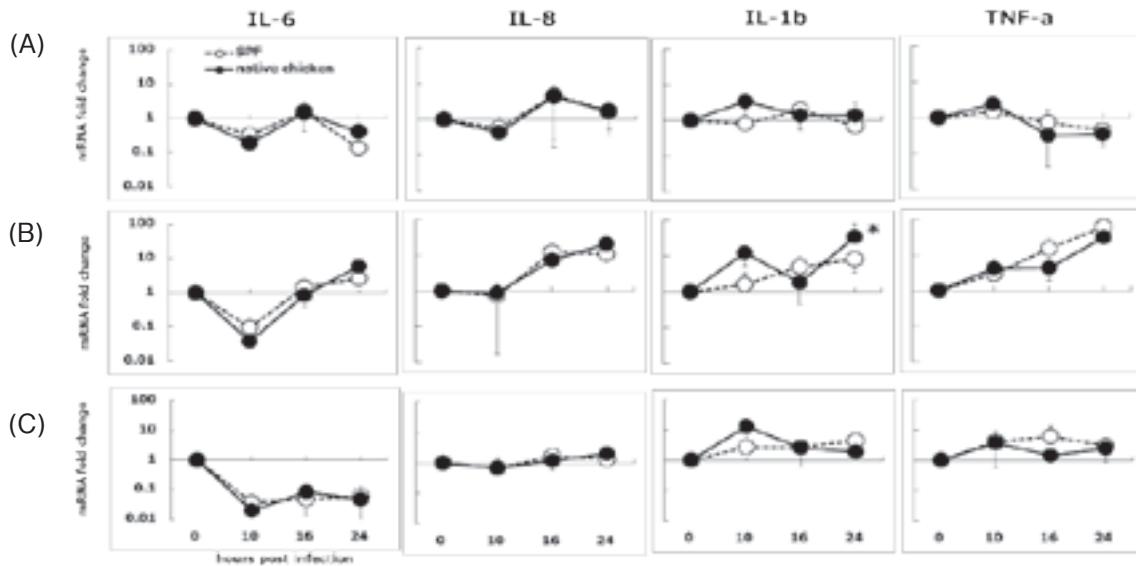


Fig. 4 Comparison of cytokine mRNA expression. Cells were harvested from 3 eggs per group after 10, 16, and 24 hours post (A) poly I : C inoculation, (B) H5N8 10^6 EID₅₀, and (C) H11N9 10^6 EID₅₀ infection and interferon mRNA expression was analyzed using real-time PCR. * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ between SPF chicken (white circle) and native chicken (black circle).

かった (Fig. 4)。追加としてインターフェロン誘導因子であるIRF-3 およびIFR-7についても評価を行ったが、mRNAの発現について群間で有意な差は認められなかった (データ非表示)。

本研究では、感染実験によって明らかなHPAI耐性を示した地鶏由来CEF細胞において、細胞内のウイルス増殖が抑制される傾向にあることを明らかにした。この細胞において鶏宿主の自然免疫に関連するmRNA発現について評価を行ったところ、①HPAIV およびLPAIV感染後のI型IFN mRNA発現が有意に抑制されたのに対して、Ⅲ型IFN (IFN λ) 発現が高い傾向にあった。②ISGであるMx1 mRNAの発現は、polyI:C刺激、HPAIV およびLPAIV感染初期において低いものの、その後逆転し特にHPAIV感染後24時間において有意に高い発現を示した。このような地鶏における宿主応答性の違いが細胞内ウイルス増殖の抑制に関与する可能性が疑われる。本研究で得ら

れた情報を基に、今後はより網羅的解析を行い発現変動遺伝子の特定に向けた研究を遂行する予定である。

4. 要 約

高病原性鳥インフルエンザ (HPAI) は家禽に対して強力な病原性を有するH5あるいはH7亜型インフルエンザウイルスによって引き起こされる疾患である。HPAI制圧のためには鶏における病原性発現機序の解明が不可欠である。本研究では、感染実験によってHPAIウイルスに対して異なる感受性を示した二種類の品種 (地鶏およびSPF白色レグホン) 由來の初代鶏胚線維芽 (CEF) 細胞を用いて、HPAIウイルス (HPAIV) および低病原性鳥インフルエンザウイルス (LPAIV) の増殖性と、これに対する宿主応答を比較した。その結果、HPAI耐性を示した地鶏由来CEF細胞において、細胞内のウイルス増殖が

抑制される傾向にあった。この細胞において鶏宿主の自然免疫に関連するmRNA発現について評価を行ったところ、地鶏由来細胞では、HPAIVおよびLPAIV感染後のI型インターフェロンmRNA発現が有意に抑制され、一方Ⅲ型インターフェロンmRNA発現は高い傾向にあった。さらにインターフェロンにより誘導される抗ウイルス遺伝子の発現が、特にHPAIV感染後24時間において有意に高い発現を示した。本研究で得られた情報を基に、今後はより網羅的解析を行い、ウイルス感染後の発現変動遺伝子の特定に向けた研究を継続する。

文 献

- 1) Ozawa, M., Matsuu, A., Tokorozaki, K., Horie, M., Masatani, T., Nakagawa, H., et al. : Genetic diversity of highly pathogenic H5N8 avian influenza viruses at a single overwintering site of migratory birds in Japan, 2014/15, *Euro Surveill.*, 20 (20), 2015.
- 2) Kuchipudi, S. V., Tellabati M., Sebastian, S., Londt, B. Z., Jansen, C., Vervelde, L., et al. : Highly pathogenic avian influenza virus infection in chickens but not ducks is associated with elevated host immune and pro-inflammatory responses, *Vet Res.*, 45 : 118. doi : 10.1186/s13567-014-0118-3, 2014.
- 3) Ewald, S. J., Kapczynski, D. R., Livant, E. J., Suarez, D. L., Ralph, J., McLeod, S., et al. : Association of Mx1 Asn631 variant alleles with reductions in morbidity, early mortality, viral shedding, and cytokine responses in chickens infected with a highly pathogenic avian influenza virus, *Immunogenetics*, 63 (6), 363~75, 2011.
- 4) Wang, Y., Brahmakshatriya, V., Lupiani, B., Reddy, S., Okimoto, R., Li, X., et al. : Associations of chicken Mx1 polymorphism with antiviral responses in avian influenza virus infected embryos and broilers, *Poult Sci*, 91 (12), 3019~24, 2012.

鶏における家畜関連黄色ブドウ球菌の病原遺伝子および病態形成の解析

Livestock-associated *S. aureus* in chicken : virulence, resistance and pathogenesis

小野久弥
(北里大学獣医学部)

Hisaya Ono
(Kitasato University School of Veterinary Medicine)

Staphylococcus aureus is one of the most common causes of zoonotic agents in the world, which are attributable to the infectious diseases and the contamination of food with enterotoxins in human and animals. In this study, to investigate the prevalence and pathogenic factors of *S. aureus* in chickens in Japan, *S. aureus* isolates were cultured from chickens in slaughterhouses. The results showed that positive rates of *S. aureus* detected in the heads, wings and legs were 22.6, 30.4 and 65.2 percent, respectively. The isolates cultured from leg showed high frequency of *S. aureus* but a few of the isolates harbor Staphylococcal enterotoxin (SE) genes. In contrast, the isolates from head and wing harbor more SE genes. These results suggest that the lineages of isolates from head and wing are different with that from leg. Interestingly, *mecA*-gene was not detected in the *S. aureus* isolates but detected in high level from the coagulase-negative staphylococci in this study. It is important to further analyze the genetic background and pathogenicity for both of *S. aureus* and coagulase-negative staphylococci isolated from chickens. Studies in vitro showed Staphylococcal enterotoxin A (SEA) co-localized in early endosome and endoplasmic reticulum at 30 min to 6 h after SEA inoculation. In vivo study showed that SEA injection induced an inflammatory response to chickens, infiltration of inflammatory cells and allergic-related cells and expression of proinflammatory cytokines. Our results would be vital clues to elucidate the mechanisms of *S. aureus* infection in chicken.

1. 目的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、家畜・家禽に感染し多くの感染症を引き起こす重要な病原菌である。ヒトにおいても黄色ブドウ球菌は重要な感染症原因菌であり、種々の皮膚感染症、耐性菌による院内感染および毒素性ショック

症候群を起こすことが知られている。近年、EU圏内および北米において家畜関連メチシリントリペptidase耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA) による疾病が問題視されており、実際に家畜・家禽と高頻度に接触する農場関係者や獣医師でLA-MRSAが検出されている¹⁾。さらに、流通している食肉およびその食肉を購入した消費者からもLA-MRSAが検出さ

れたことが報告されている²⁾。我が国においてもLA-MRSAの主要な遺伝子型が家畜（主に豚）から検出されており、家禽においても実態を調査する必要がある。海外と同様に、我が国でもLA-MRSAの増加が見込まれており、またLA-MRSAはそのほとんどが多剤耐性菌であるため、鶏において黄色ブドウ球菌感染症が増加することが予想される。

我々は黄色ブドウ球菌食中毒の原因毒素であるブドウ球菌エンテロトキシン（SE）が鶏由来培養細胞株に空胞の形成および炎症サイトカインの産生を誘導することを見出した。SEによる鶏への病原性は報告されておらず、本毒素が鶏におけるブドウ球菌感染症の成立および病態形成に関与する可能性が示された。本研究では、鶏におけるブドウ球菌感染症の病態解析を目的とし、鶏における黄色ブドウ球菌およびメチシリン耐性菌の保有状況を調査し、分離された黄色ブドウ球菌の保有遺伝子を解析する。さらにSEの解析をin vitroおよびin vivoで行い、ブドウ球菌感染の成立および増悪に重要な因子を明らかにする。

2. 方 法

2.1 ブドウ球菌の分離

食鳥処理場において一月当たり60～100羽、計500羽の鶏から菌を採取した。同一の鶏の体表3カ所（頭部、翼下および脚部）を滅菌した綿棒で拭い卵黄加マンニット食塩培地（栄研化学）に塗抹した。また一部の試料はセフォキシチンを加入了卵黄加マンニット食塩培地に塗抹した。37℃で24～48時間培養し、周辺の培地の黄変および卵黄反応が認められたコロニーを *S. aureus* と推定した。

2.2 ブドウ球菌種の同定とSE遺伝子の検出

*S. aureus*と推定された分離株をコアグラーーゼ試験に供した。ウサギプラズマ（栄研化学）を用

い、定法に従って各株のコアグラーーゼ陽性または陰性を確認した。コアグラーーゼ試験陽性株およびセフォキシチン耐性コアグラーーゼ陰性株について、さらにChrobakらの方法により multiplex PCRを実施し、ブドウ球菌種の同定とメチシリン耐性遺伝子である *mecA* の検出を行った³⁾。分離した *S. aureus* のSE遺伝子はOmoeらの方法を改変したmultiplex PCRにより検出した⁴⁾。

2.3 鶏培養細胞内におけるSEの動態

鶏由来マクロファージ細胞株HD11細胞を用いて細胞内におけるSEの解析を行った。ブドウ球菌エンテロトキシンA（SEA）の免疫蛍光染色は HD11細胞を 1×10^5 cells/mlにSEAを10μg/mlになるように添加し、各時間培養後、免疫蛍光染色に使用した。固定は10%ホルムアルデヒド（関東化学株式会社）浸透処理は0.1% TritonX-100（ナカライトスク）加PBSで行った後、2 %正常ロバ血清でブロッキングした。1次抗体として抗SEA抗体、抗初期エンドソーム抗原1（EEA 1）抗体（BD Biosciences）を用い、室温で1時間振盪し、反応させた。2次抗体として Alexa Fluor™ 488標識抗ウサギIgG抗体、Alexa Fluor™ 594標識抗マウスIgG抗体（Invitrogen）を用いた。また、SEAと小胞体を2重染色するために、2次抗体反応後、Concanavalin A Conjugates（Invitrogen）を反応させた。核の染色はDAPI solution（同仁化学研究所）を用いた。さらに HD11細胞にSEAを添加後、cell counting kit-8（同仁化学研究所）を用いて細胞増殖を測定した。

2.4 SEAに結合するHD11細胞タンパク質の探索

HD11細胞に2×Sample bufferを加え、細胞溶解液を作製し、Far Western blottingを行った。SDS-PAGEを行い、HD11細胞溶解液を泳動後、PVDFメンブレンへの転写と5 %スキムミルクによるブロッキングを行った。SEAと、コントロー

ルとしてBSAを用い、それぞれ8 µg/mlで4℃、一晩振盪した。洗浄後、ウサギ抗SEA抗体1 µg/mlをメンブレンの上に載せ、室温で1時間振盪した。洗浄後、HRP標識抗ウサギIgG抗体(Bio-Rad)をPBS-Tで2,0000倍希釈し、室温で1時間遮光しながら反応させた。化学発光シグナルの検出はClarity Western ECL Substrate(Bio-Rad)を用いた。

2.5 質量分析

SDS-PAGEを行い、HD11細胞溶解液を泳動後、Far Western Blottingで検出されたバンドと同じサイズのバンドを切り出した。切り出したゲルは株式会社日本プロテオミクスに質量分析を依頼し、nano LC-MS/MSによりタンパク質の同定を行った。

2.6 鶏へのSEAの接種と炎症の解析

養鶏場より8～10週齢のブロイラーおよびレイヤーを購入し、背部の羽毛を除去後、皮内にSEAおよびコントロールとしてPBSを接種した。12,24,48時間後に皮膚を切除し形態学および免疫学的解析に供した。採取した皮膚を4%PFAに

浸漬して固定後、定法に従いパラフィン包埋およびHE染色を行った。また、採取した皮膚をRNAiso(タカラバイオ)に浸漬後、-80℃で保存した。説明書に従いRNAの抽出を行い、総RNAを回収した。このRNAをReverTra Ace(TOYOBO)を用いて逆転写し、THUNDERBIRD SYBR qPCR(TOYOBO)により増幅反応を行った。プライマーはBerndtらの方法に従った⁵⁾。

3. 結果と考察

3.1 鶏におけるLA-MRSAの調査とその病原遺伝子の探索

500羽の鶏の各部位から菌を分離・培養したところ、*S. aureus*の陽性率はそれぞれ頭部22.6%(113/500)、翼下30.4%(154/500)、脚部65.2%(326/500)であった(Table 1)。脚部から高頻度で*S. aureus*が分離されたがこれらの株は多くがSE遺伝子を保有していなかった(Table 2)。一方、頭部と翼下から分離された*S. aureus*の70%以上がSE遺伝子を保有していた(Table 2)。以上の結果から頭部および翼下から分離された菌株は

Table 1 Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Japanese chicken

	Number of <i>S. aureus</i> -harboring chickens (n=500)	(%)	<i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i>
Head	113	22.6	0
Wing	154	30.4	0
Leg	326	65.2	0

Table 2 SE gene types of *S. aureus* derived from chicken

SE gene types	Head (%) n = 77	Wing (%) n = 84	Leg (%) n = 223
<i>sed, seh, ser</i>	31 (40.3)	34 (40.5)	41 (18.4)
<i>seg, seI, sem, sen, seo</i>	19 (24.7)	17 (20.2)	9 (4.0)
<i>sed, ser, sey</i>	6 (7.8)	3 (3.6)	3 (1.3)
<i>seb</i>	2 (2.6)	2 (2.4)	4 (1.8)
<i>seh, ser</i>	0 (0)	2 (2.4)	0 (0)
<i>sed, ser</i>	0 (0)	1 (1.2)	0 (0)
<i>seh</i>	0 (0)	1 (1.2)	0 (0)
<i>sec</i>	0 (0)	0 (0)	2 (0.9)
no SE gene	19 (24.7)	24 (28.6)	164 (73.5)

脚部の主要な菌株と異なる系統であることが示唆される。またSE遺伝子の検出によりヒト・家畜由来*S. aureus*で高頻度に見られる*egc* SEs (EG, SEI, SEM, SEN, SEO) よりも、食中毒やアレルギーに関与し産生量が多いSE遺伝子 (SEB, SED, SEH, SER, SEY) が多数検出され鶏特有の毒素パターンをもつ*S. aureus*により疾病が起る可能性が示唆された (Table 2)。今回MRSAは検出されなかつたが、興味深いことに*mecA*を保持するコアグラーゼ陰性のブドウ球菌が多数検出された。*mecA*は可動性遺伝子であるSCC*mec*

に存在する。本*mecA*陽性コアグラーゼ陰性菌が鶏飼育環境において蔓延していることは、鶏に付着している*S. aureus*にSCC*mec*が水平伝播しMRSAへとなる可能性を提示するため、今後さらなる解析が必要である。

3.2 ブドウ球菌毒素によるin vitroでの病原性
免疫蛍光染色によって、SEA添加後5分でHD11細胞への結合が観察された。30分以降では細胞質内に取り込まれており、その後も経時的観察を行ったところ空胞が形成される24時間でも細胞質内にSEAのシグナルが観察された (Fig. 1)。

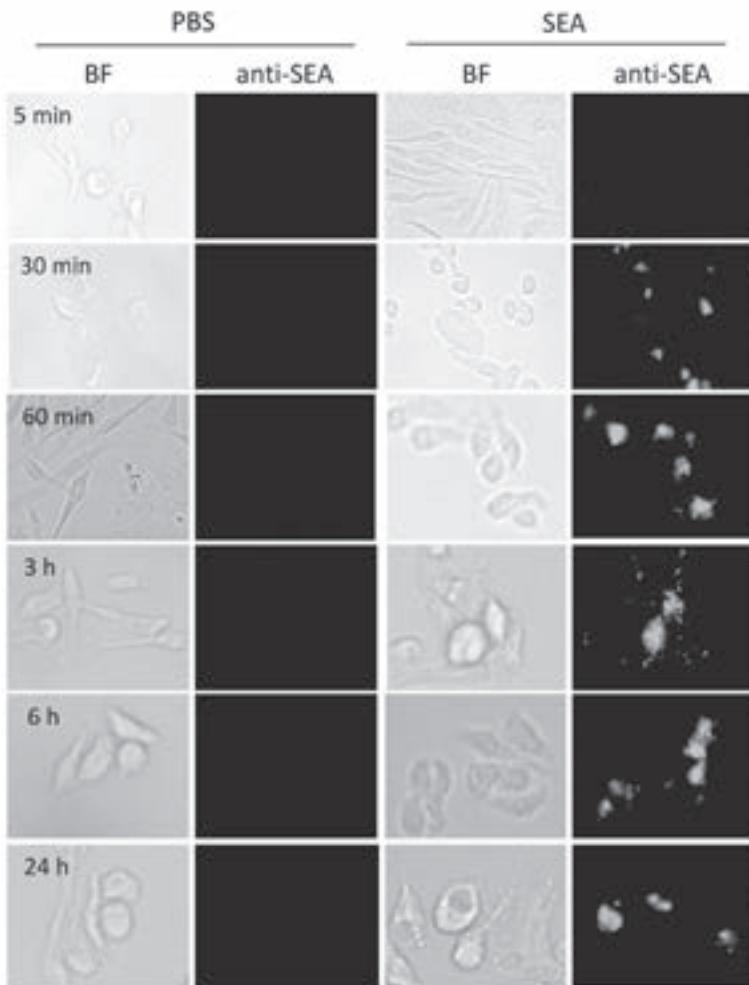


Fig. 1 SEA translocates in HD11 cells.

Immunofluorescence analysis showed SEA signals are detected in HD11 cells during 30 min to 24 h after SEA inoculation. BF : Bright field

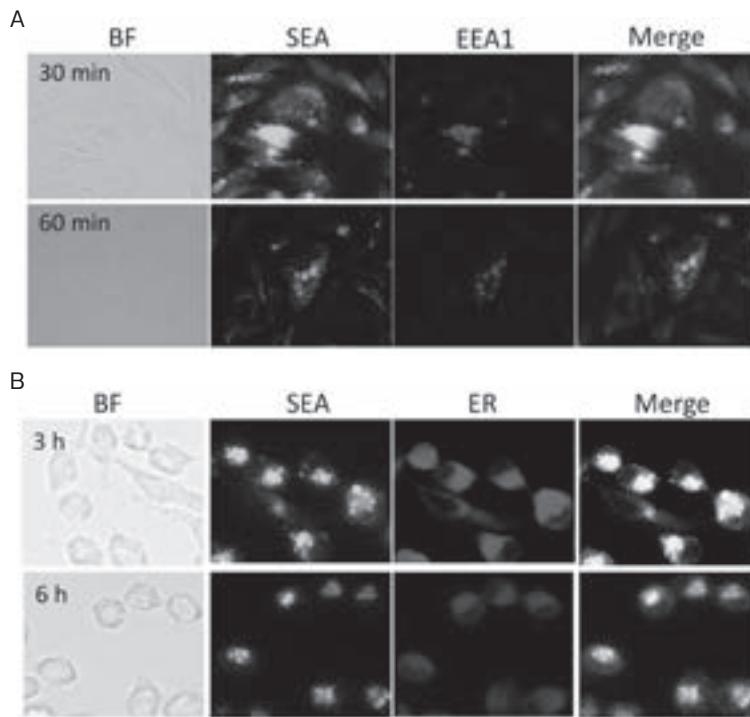


Fig. 2 Immunostaining exhibits colocalization of SEA and organelles.

A : SEA signals co-localized in early endosome (EEA1) at 30 to 60 min after SEA inoculation.
 B : SEA co-localized in endoplasmic reticulum (ER) at 3 to 6 hour after SEA inoculation.

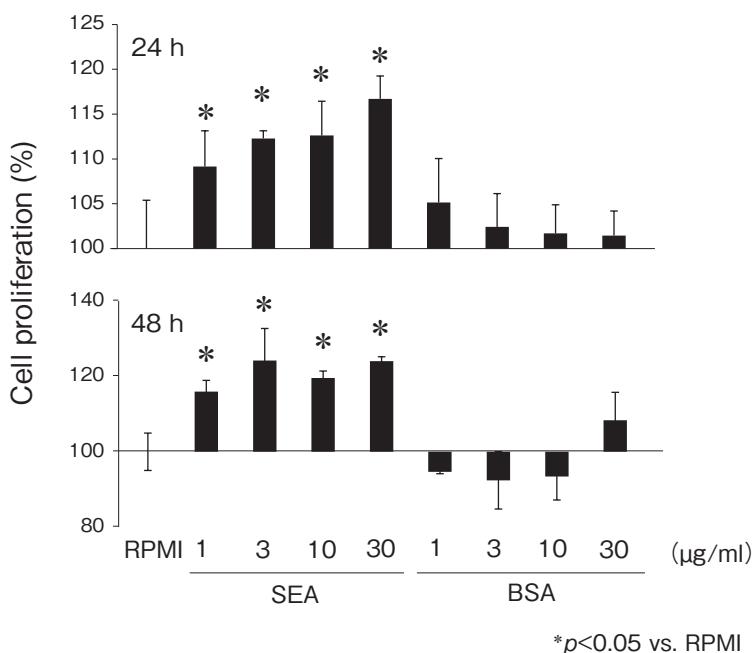


Fig. 3 SEA induced HD11 cell proliferation.

HD11 cells were incubated with SEA or bovine serum albumin (BSA). SEA significantly induced HD11 cell proliferation. BSA was used as negative control.

続いて初期エンドソームとの2重染色によって、SEAは30分から90分で初期エンドソームに局在している像が観察された (Fig. 2A)。さらに小胞体との2重染色では、90分から一部SEAのシグナルが小胞体に重なり、3時間から6時間でSEAと小胞体の顕著な共局在が見られた (Fig. 2B)。以上の結果から、毒素は細胞内に取り込まれた後、エンドソームから小胞体へと移行することが示唆された。次にHD11細胞の増殖への影響を確

認したところ、BSAを添加した細胞と比較してSEAを添加した細胞では有意な細胞増殖が確認された (Fig. 3)。さらにSEAに結合するHD11細胞タンパク質の探索を行った。Far Western blottingで検出されたバンドをSDS-PAGEを行ったゲルから切り出し、質量分析を行ったところSEAに結合するHD11細胞タンパク質の候補として鶏のピルビン酸キナーゼ (PK) が浮上した。ウサギ抗PK抗体を用いてWestern blottingを行

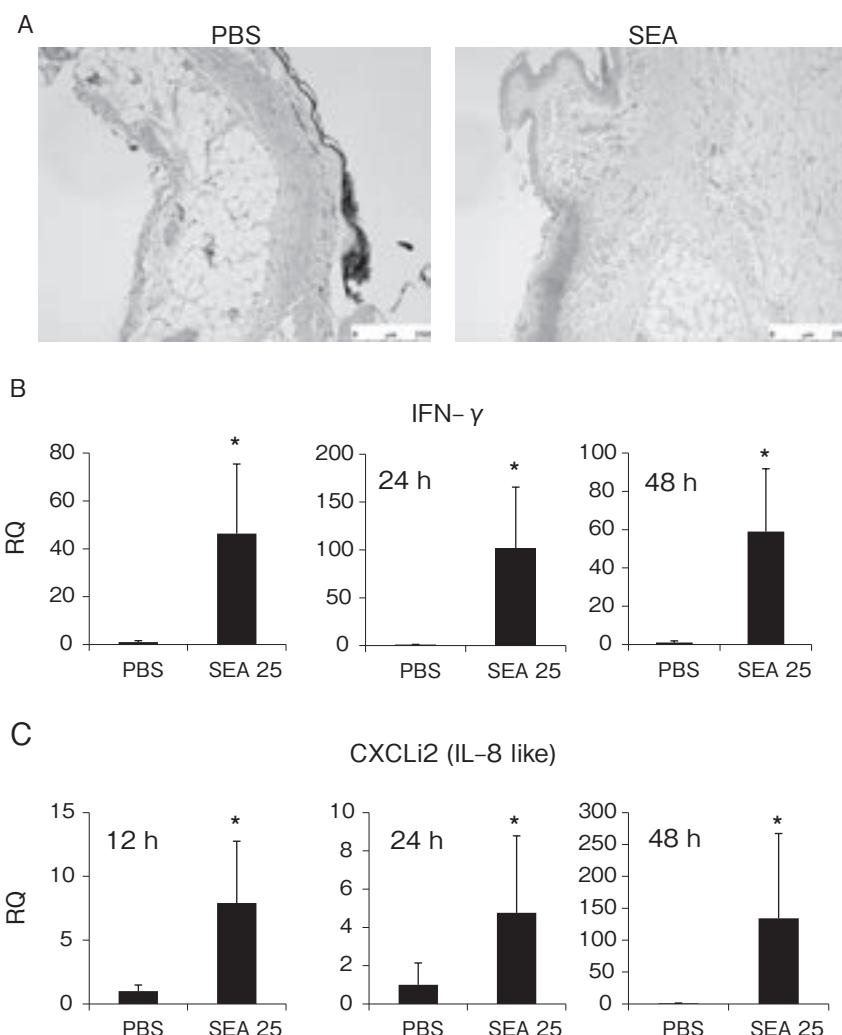


Fig. 4 Effect of SEA intradermal injection in chickens.

A : HE staining shows SEA injection induced infiltration of lymphocytes, heterophils and eosinophils. B, C : SEA injection induced significant increase of interferon- γ (IFN- γ) and CXCLi2. RQ : relative quantification, * $p < 0.05$

い、上記のSEA結合タンパク質とPKが同じ分子量のバンドであることを確認した。SEA添加によりHD11細胞が増殖すること (Fig. 3) およびPKが2量体を形成すると細胞増殖が促進されることから⁶⁾、現在SEAが細胞内で相互作用する重要な分子としてPKの解析を進めている。

3.3 黄色ブドウ球菌由来物質による鶏への病原性

鶏の*S. aureus*感染症におけるSEsの関与を明らかにするため、SEAを鶏に投与し、SEsの鶏における病原性への関与を検討した。皮内にSEAを投与した組織のHE染色像では、皮内、皮下ともに偽好酸球の出現が確認され炎症が惹起されたことが示された (Fig. 4A)。また皮内には赤血球が確認され、出血が引き起こされたことが示唆された。さらに好酸球および好塩基球の出現が認められ、アレルギー様の反応が起きていることが示唆された。一方、陰性対照としてPBSを投与した皮膚ではこれらの変化は確認されなかった (Fig. 4A)。次に炎症性サイトカインおよびケモカインの発現を定量的PCRで測定した。SEA投与12から48時間後でIFN- γ 、CXCLi2 およびIL-6 で発現の上昇が見られた (Fig. 4Bおよび4C)。以上の結果から、SEAは単体で鶏の皮膚組織において炎症を誘導し、鶏の*S. aureus*感染症における病態形成への関与が示唆された。

4. 要 約

本研究では我が国の家禽におけるブドウ球菌感染の実態を調査し、鶏における黄色ブドウ球菌感染症の解明を目的とした。食鳥処理場で鶏500羽からブドウ球菌の分離を試みたところ、頭部、翼下および脚部からそれぞれ22.6%、30.4%および65.2%と高頻度に黄色ブドウ球菌が分離された。

またその保有するSE遺伝子型は従来知られてきたものと異なるパターンであった。MRSAは検出されなかつた一方で、メチシリン耐性コアグラーーゼ陰性ブドウ球菌が多数検出され、我が国の鶏特有のブドウ球菌系統の存在が示唆された。in vitroおよびin vivoにおける研究により、SEsが鶏に対して炎症反応を惹起し、特にアレルギー関連細胞の反応も見られたことから鶏ブドウ球菌感染症における劇的な症状の解明への端緒が見出された。

文 献

- 1) Lekkerkerk, W. S., van Wamel, W. J., Snijders, S. V., Willemse, R. J., van Duijkeren, E., Broens, E. M., Wagenaar, J. A., Lindsay, J. A., Vos, M. C. : What Is the Origin of Livestock-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Clonal Complex 398 Isolates from Humans without Livestock Contact? An Epidemiological and Genetic Analysis, *J. Clin. Microbiol.*, **53**, 1836~1841. 2015.
- 2) Tang, Y., Larsen, J., Kjeldgaard, J., Andersen, P. S., Skov, R., Ingmer, H. : Methicillin-resistant and-susceptible *Staphylococcus aureus* from retail meat in Denmark, *Int. J Food Microbiol.*, **249**, 72~79, 2017.
- 3) Chrobak, D., Kizerwetter-Świda, M., Rzewuska, M., Moodley, A., Guardabassi, L., Binek, M. : Molecular characterization of *Staphylococcus pseudintermedius* strains isolated from clinical samples of animal origin, *Folia Microbiologica*, **56**, 415~422, 2011.
- 4) Omoe, K., Hu, D-L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K. : Comprehensive analysis of classical and newly described staphylococcal superantigenic toxin genes in *Staphylococcus aureus* isolates, *FEMS Microbiol. Lett.*, **246**, 191~198, 2005.
- 5) Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, C., Pieper, J., Sachse, K., Methner, U. : Chicken Cecum Immune Response to *Salmonella enterica* Serovars of Different Levels of Invasiveness, *Infect. Immun.*, **75**, 5993~6007, 2007.
- 6) Gao, X., Wang, H., Yang, J. J., Liu, X., Liu, Z-R. : Pyruvate Kinase M2 Regulates Gene Transcription by Acting as a Protein Kinase, *Mol. Cell.*, **45**, 598~609, 2012.

鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと 共存する細菌の網羅的な挙動解析

Comprehensive analysis of the behavior of *Campylobacter* and coexistent bacteria in chicken food chain

黒木 香澄・竹下 奈知子・吾郷 良輔・渡辺 孝康*・関崎 勉

(東京大学大学院農学生命科学研究科食の安全研究センター, *現所属: 日本大学歯学部基礎自然科学分野(化学))

Kasumi Kuroki, Nachiko Takeshita, Ryosuke Ago, Takayasu Watanabe* and Tsutomu Sekizaki

(Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo,

*present affiliation: Department of Chemistry, Nihon University School of Dentistry)

Campylobacteriosis is a serious bacterial food-borne disease mainly caused by *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. The colonization of *Campylobacter* in the chicken intestine occurs on broiler farms and that induces the bacterial contamination to chicken meats throughout the food chain from farm to fork. Also, it is known that the contaminated *Campylobacter* can survive on the chicken meat, despite the fact that they are microaerophilic bacteria which cannot live long under the atmospheric oxygen tension. Other studies suggested that coexisting bacteria would help *Campylobacter* to survive for long periods outside the host. In this study, we observed the bacterial population structure and dynamics in chicken meats to understand the relationship between *Campylobacter* and other bacteria in the retail shops using 16S rRNA gene-based metagenomic analysis, in addition to the investigation of contamination rates of *Campylobacter* in chicken meats. A total of 40 packed chicken products were tested by nested PCR combined with an enrichment culture, with 75% of the products found to be *Campylobacter*-positive. As a result of 16S rRNA gene-based metagenomic analysis, it was shown that the abundance ratio of *Pseudomonas* was more than 30%, suggesting that the chicken meat was the favorable environment for *Campylobacter* because *Pseudomonas* would help the survival of *Campylobacter* under the aerobic conditions. Furthermore, some bacteria existing in chicken intestines such as *Ruminococcus* and *Helicobacter* were detected from *Campylobacter*-positive meats, but the contamination of 23 bacterial taxa were predicted to be derived from other sources except broiler chickens. In addition, principal coordinate analysis showed that the bacterial composition of chicken meat was similar among samples in each retail store regardless of the presence or absence of *Campylobacter*. These results suggest that cross-contamination occurred in not only slaughterhouses but also retail stores and other places. The microbiota in retail stores are complicated by the cross-contamination in various stages of the food chain, and the prevention of cross-contamination in retail stores may lead to improvement of control strategies against *Campylobacter*.

1. 目的

カンピロバクター食中毒は日本での発生件数が最多の細菌性食中毒で、同菌に汚染された鶏肉を摂食することで発症する。主な原因細菌は *Campylobacter jejuni* と *Campylobacter coli* であり、養鶏場で鶏腸管内に定着し、食肉処理場で鶏肉に付着することが知られている^{1,2)}。

本菌に汚染された鶏肉が消費者に喫食されるまでの数日間、本菌は微好気性細菌であるにもかかわらず、大気中の鶏肉表面上で生き続け、食中毒を引き起こしている。培養実験を用いた調査により、本菌と *Pseudomonas* を共培養することで、本菌の大気中での生存期間が延びることが示されており³⁾、鶏肉上での本菌の生存にも他の細菌が影響を与えている可能性がある。これまでにも本菌の動態を食肉加工場などで調べた報告があるが、そのいずれも本菌のみを調べた報告であるため、他の細菌種と本菌の鶏肉上での関係性はいまだ不明である。そこで本研究は16S rRNA遺伝子を標的としたメタゲノム解析を行うことで鶏肉上の細菌叢とカンピロバクターの関係性における基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方 法

2.1 実験材料

東京都の小売店4店舗（A, B, C, D）で鶏肉を10パックずつ購入し用いた。部位はムネ（n = 12）、モモ（n = 18）、ささみ（n = 5）、レバー（n = 3）、レバーとハツが同封されているもの（n = 2）の5種類とした。

2.2 試料調整

購入した鶏肉を125 g 量り取り、ストマッカーバッグに移した。ただし、125 g に満たない鶏肉は全量を用いた。ストマッカーバッグに滅菌生理食塩水を100ml入れ、袋越しに手で鶏肉を30秒揉んだ後

生理食塩水を試料として収集した。ストマッカーバッグを使用せず、手で鶏肉を揉んだ理由としては、機械操作による本菌の死滅があげられる。収集した試料は5000 × g で5分間遠心した後、上清を捨て、沈渣を含む5 mlの試料を以降の実験（2.3 増菌培養と2.4 16S rRNAメタゲノム解析）に使用した。

2.3 増菌培養とnested PCR法によるカンピロバクター遺伝子の検出

Bolton培地（Oxoid）が10ml入った3本の試験管に2.2で調製した試料を1 mlずつ分注し、アネロパック・微好気（三菱ガス化学）と角型ジャー（三菱ガス化学）による微好気条件の下42°Cで48時間培養した。培地を遠心後に得られた沈殿物を滅菌生理食塩水で洗浄後、フェノール・クロロホルム抽出法を用いてDNAを抽出し、*C. jejuni* または*C. coli* の遺伝子が存在するかをnested PCR法⁴⁾で確認した。プライマー配列とPCR条件は以前の報告に従った⁴⁾。Nested PCRの結果、3本の試験管中1本でも陽性であれば、元の鶏肉はカンピロバクターに汚染されていると判定した。

2.4 16S rRNAメタゲノム解析

2.2で調整した試料のうち200 μlをDNAの分解抑制作用のある溶液RNAlater Stabilizing Solution（Thermo Fisher Scientific）1 ml中に入れ、DNA抽出を行うまで-20°Cの冷凍庫に保管した。試料を滅菌生理食塩水で洗浄後、PowerBiofilm® DNA Isolation Kit（QIAGEN）を用いてDNAを抽出した。ただし、細胞破碎に利用するビーズをより破碎力の強いジルコニアビーズ（Toray）に換え、破碎力の強いBeads Crusher μT-12（TAITEC）を用いて作業を行うことで、DNAの抽出効率を高めた。

抽出したDNAにおける16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を、PCR法で增幅し、高速シーケンサーMiSeq（Illumina）を用いて塩基配列を決定

した。決定した塩基配列は16S rRNAメタゲノム解析用のパイプラインIM-TORNADO⁵⁾を用いた処理に供した。また、各試料に存在する構成細菌やその比率、試料間の関連性などを、ソフトウェアQuantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME)⁶⁾およびR言語⁷⁾を用いて精査した。統計学的処理として、データの正規性をR言語を用いてShapiro-Wilk検定で判断した。データが正規分布に従っていた場合は、等分散性をF検定あるいはBartlett検定で判断した。

3. 結果と考察

3.1 市販鶏肉からのカンピロバクター検出率

鶏肉中のカンピロバクターをnested PCRで検出したところ、*C. jejuni*陽性検体の方が*C. coli*陽性検体よりも多かったが、レバーにおいてはすべての検体で*C. jejuni*と*C. coli*の両方が確認された。カンピロバクター陽性率は75%と高く（30/40検体）、特に内臓肉は100%汚染されていた（5/5検体）（Table 1）。

平成26年度に厚生労働省で実施された「と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究」ではモモ肉の汚染率が42%，ムネ肉の汚染率が40%という成績が報

告されたが⁹⁾、本研究ではそれを上回る成績を得た。また、レバーの汚染率も過去の報告より高く¹⁰⁾、これらの汚染率の違いは鶏肉の汚染状況に加えて、検査・検出方法の違いも反映されていることが考えられた。本菌は数百個程度の少ない菌量でも食中毒を引き起こすため、高感度の検出方法の選択が重要だと考えられる。本研究で用いた増菌培養法とnested PCR法を組み合わせた方法は感度、特異度ともに優れているため、過去の報告よりも高い検出率が得られたと考えられる。

3.2 16S rRNAメタゲノム解析による鶏肉中の構成細菌の同定

3.2.1 主要な構成細菌

収集した試料の構成細菌（属レベル）およびその比率を平均化した値を棒グラフで示した（Fig. 1）。ささみ、モモ、ムネの主要な構成細菌は*Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Jathinobacterium*であり、この3菌属だけで全体の約60%を占めていた。*Pseudomonas*だけで50%以上の存在率を占める検体も存在しており、*Pseudomonas*が食肉の最も主要な構成細菌であることが明らかとなつた。*Pseudomonas*属菌の存在がカンピロバクターの大気中における生存を助長しているとの報告があるため³⁾、鶏肉は本菌の生存に有利な環境であ

Table 1 Percentages of *Campylobacter*-positive chicken products in retail stores.

Part	Percent positive (No. positive/Total)											
	Store A		Store B		Store C		Store D		Total			
	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>Campylobacter</i> spp.	
Tender	—	—	—	—	—	—	60%	0%	60%	0%	60%	
							(3/5)	(0/5)	(3/5)	(0/5)	(3/5)	
Thigh	71.4% (5/7)	0% (0/3)	60% (3/5)	20% (1/5)	100% (6/6)	0% (0/6)	—	—	77.8% (14/18)	7.2% (1/14)	77.8% (14/18)	
Breast	100% (3/3)	0% (0/3)	0% (0/5)	60% (3/5)	50% (2/4)	0% (0/4)	—	—	41.7% (5/12)	25% (3/12)	66.7% (8/12)	
Liver	—	—	—	—	—	—	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	100% (3/3)	
Liver & heart	—	—	—	—	—	—	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	0% (0/2)	100% (2/2)	

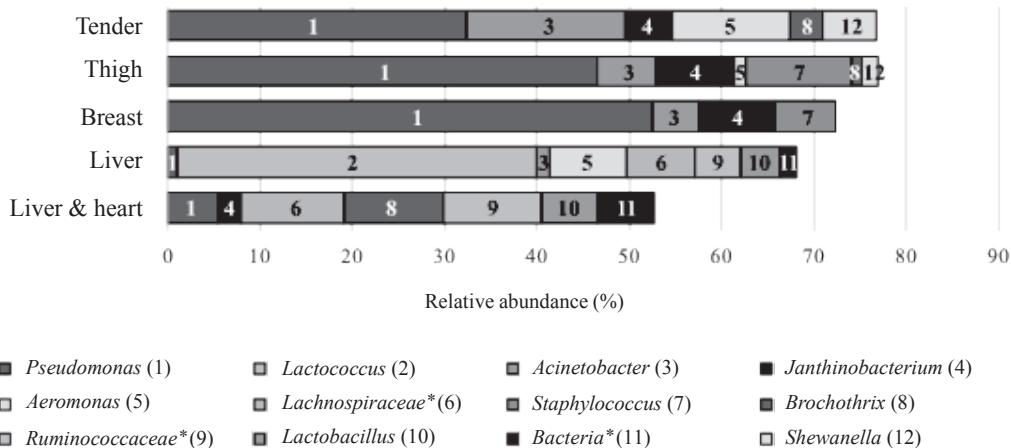


Fig. 1 The bacterial composition in chicken meats at the genus level.

Twelve bacterial genera are shown as the predominant taxa (>5%). *These taxa were unclassifiable at the genus level.

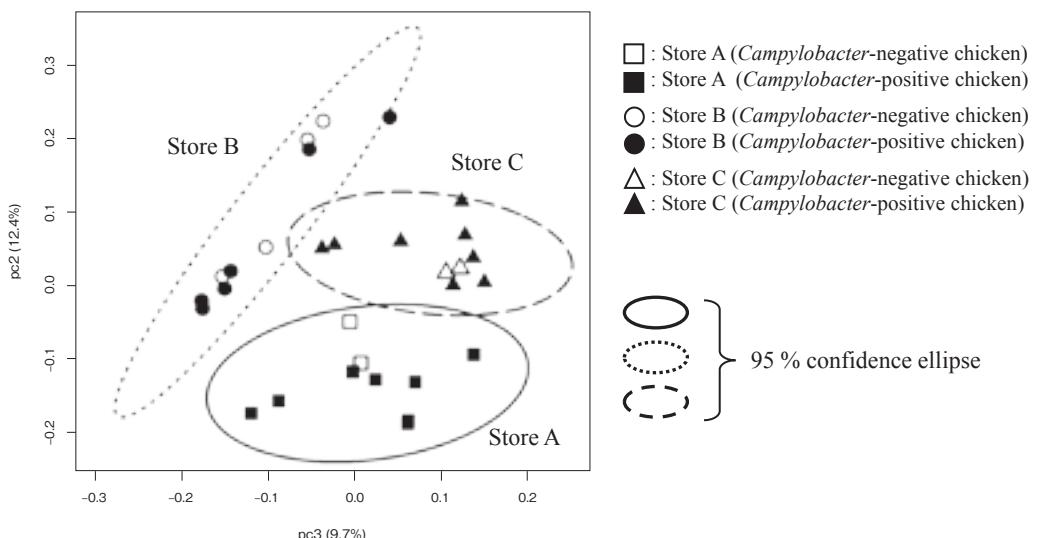


Fig. 2 Principal coordinate analysis (PCoA) showing the similarity of chicken samples in each store.

PCoA was performed by R using UniFrac distance calculated by QIIME. Each sample is plotted by a symbol, which is open for *Campylobacter*-negative and filled for *Campylobacter*-positive.

ることが示唆された。一方、レバーとレバー・ハツが同封されていた検体では*Pseudomonas*の平均存在率がそれぞれ1%、5%と、精肉に比べて低かった。また、レバーとレバー・ハツが同封されていた検体の構成細菌は異なっており、同じ内臓肉でもハツの存在の有無で構成細菌に違いが生じることが明らかとなった。

3.2.2 主座標分析

モモ肉とムネ肉の検体において、UniFrac距離を用いた主座標分析を行った成績をFig. 2に示した。解析の結果、汚染・非汚染試料を示す点の距離が近かったことから、両者の構成細菌に大きな差はないことが示された (Fig. 2)。また、各試料は店舗ごとにクラスターを形成していたことか

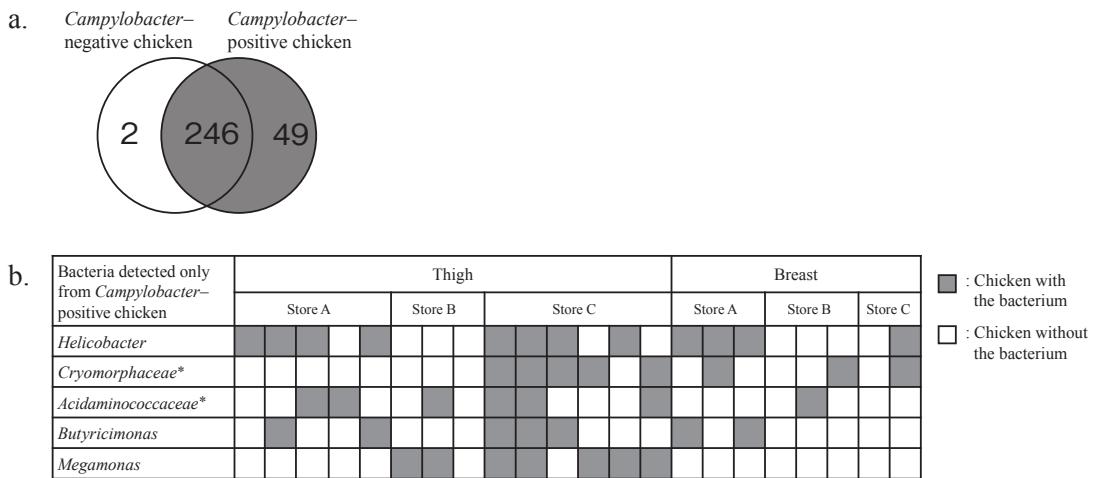


Fig. 3 Comparison of the bacterial composition between *Campylobacter*-negative and-positive chickens.

a) The Venn diagram shows the number of bacteria at the genus level. *Campylobacter* are included in 49 bacteria detected only in *Campylobacter*-positive chicken. b) Five representative bacteria detected only in *Campylobacter*-positive chicken are shown. Each column represents a chicken sample.

ら (Fig. 2), 店舗内で交差汚染が起きている可能性が示された。カンピロバクターの鶏肉への汚染は食肉処理場で起きることが過去に示されているが^{1, 2)}、本成績から店舗での交差汚染も鶏肉の汚染率を上昇させている可能性が考えられた。

3.2.3 カンピロバクター汚染肉と非汚染肉の構成細菌比較

汚染および非汚染肉に特有な構成細菌を調査したところ、非汚染肉にのみ存在している2種類の細菌属と汚染肉にのみ存在している49種類の細菌属が確認された (Fig. 3a)。49種類の細菌のうち19種類の細菌 (*Ruminococcus*, *Helicobacter*など) は我々の過去の調査で鶏盲腸便および糞便でも確認されていたことから、食肉処理場での処理過程で便を介して鶏肉上に付着したと考えられた。また、盲腸便と糞便では認められなかった30種類の細菌のうち、7種類は内臓肉からも検出されたため、これらは内臓肉からの汚染が疑われた。一方、残りの23種類の細菌は鶏由来ではなく、食肉処理場や小売店での運搬や作業の工程で付着した細菌の可能性が考えられた。非汚染肉にのみ存在して

いる細菌が2種類だったのに対し、汚染肉にのみ存在していた細菌は40種類以上確認されたことから (Fig. 3a)，カンピロバクターは加工処理過程で汚染の伝播を意識しない扱い方によって汚染が増大するものと考えられた。また、店舗間で汚染肉にのみ存在している細菌の種類が異なっていたことから (Fig. 3b)，食肉処理場由来の汚染だけではなく、店舗内でも本菌の汚染が起きる可能性について今後詳細に調べる必要がある。

3.2.4 Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) 解析

カンピロバクターに汚染されていた、あるいは汚染されていなかったモモ肉とムネ肉に特徴的な細菌を明らかにするためにLEfSe解析⁸⁾を行った結果、汚染肉に特徴的な14種類の細菌と、非汚染肉に特徴的な1種類の細菌が確認された (Fig. 4)。また、本解析で汚染肉に特徴的な細菌として確認された14種類の細菌のうち13種類の細菌は我々の過去の調査で鶏盲腸便および糞便でも確認されていた。一方、非汚染肉に特徴的だった *Janthinobacterium* は鶏盲腸便および糞便中に存

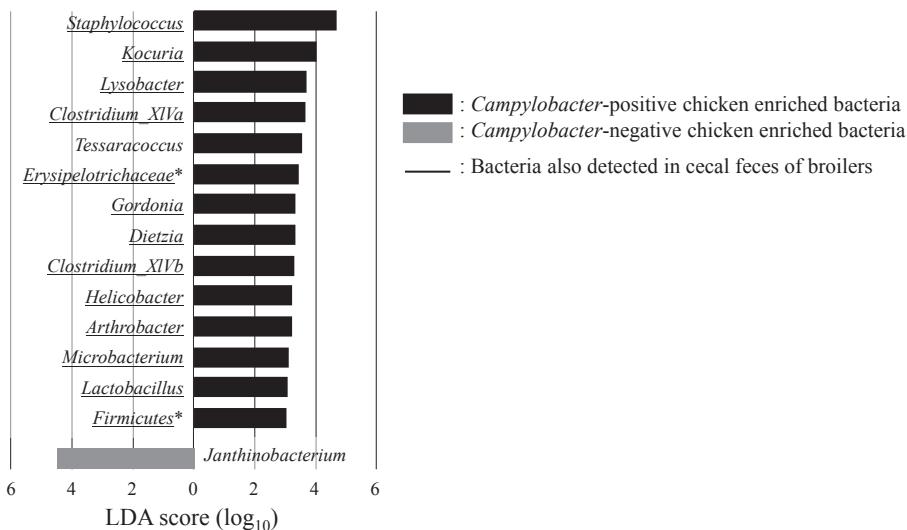


Fig. 4 Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) identified the most differentially abundant bacteria at the genus level between *Campylobacter*-positive and-negative chicken (LDA score > 3, $p < 0.05$). *Campylobacter*-positive chicken-enriched bacteria are indicated with black bars, and bacteria enriched in *Campylobacter*-negative chicken are represented with gray bars. Underlined bacteria were identified in cecal feces of broilers in another study of us. *These taxa were unclassifiable at the genus level

在せず、非汚染肉でのみ確認された細菌とも一致しなかった。

汚染肉に特徴的な14種類の細菌のうち、汚染肉のみに存在する細菌は*Helicobacter*のみだった。したがって、*Helicobacter*は食肉処理場でカンピロバクターとともに盲腸便や糞便を介して鶏肉に付着し、その後、店舗内での交差汚染時にもカンピロバクターと挙動をともにしている可能性が示された。

4. 要 約

増菌培養とnested PCR法を組み合わせて鶏肉のカンピロバクター汚染率を調査した結果、75%の鶏肉に汚染が認められた。また、16S rRNAメタゲノム解析により、鶏肉上にはカンピロバクターが大気中で生存するのを助長することが示されている*Pseudomonas*が多く存在することが明らかとなり、鶏肉は本菌の生存に有利な環境であ

ることが示唆された。また*Helicobacter*のように鶏腸管内から本菌と挙動をともにしている細菌が複数確認された一方、鶏由来ではないと予想される細菌も本菌と挙動をともにしていたことから、フードチェーンにおける本菌の動態は複雑であり、様々な作業工程で鶏肉への汚染が起きる可能性が示された。さらに、鶏肉のカンピロバクター汚染は食肉処理場だけではなく、小売店内でも起こることが示唆されたため、小売店内での交差汚染を防ぐことで本菌の汚染率減少に繋がる可能性が示された。

文 献

- 1) García-Sánchez, L., Melero, B., Jaime, I., Hänninen, M. L., Rossi, M., Rovira, J.: *Campylobacter jejuni* survival in a poultry processing plant environment, *Food microbiology*, 65, 185 ~ 192, 2017.
- 2) Sasaki, Y., Maruyama, N., Zou, B., Haruna, M., Kusukawa, M., Murakami, M., Yamada, Y.:

- Campylobacter* cross-contamination of chicken products at an abattoir, *Zoonoses and public health*, **60**, 134~140, 2013.
- 3) Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P., Szostak, M. P. : Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp, *Applied and environmental microbiology*, **76**, 5911~5917, 2010.
- 4) Inglis, G. D., Kalischuk, L. D. : Use of PCR for direct detection of *Campylobacter* species in bovine feces, *Applied and environmental microbiology*, **69**, 3435~3447, 2003.
- 5) Jeraldo, P., Kalari, K., Chen, X., Bhavsar, J., Mangalam, A., White, B., Nelson, H., Kocher, J., Chia, N. : IM-TORNADO : a tool for comparison of 16S reads from paired-end libraries, *PLoS One*, **9**, e114804, 2014.
- 6) Caporaso, J. G., Kuczynski, J., Stombaugh, J., Bittinger, K., Bushman, F. D., Costello, E. K., Fierer, N., Pena, A. G., Goodrich, J. K., Gordon, J. I., Huttley, G. A., Kelley, S. T., Knights, D., Koenig, J. E., Ley, R. E., Lozupone, C. A., Donald, D. M., Muegge, B. D., Pirrung, M., Reeder, J., Sevinsky, J. R., Turnbaugh, P. J., Walters, W. A., Widmann, J., Yatsunenko, T., Zaneveld, J., Knight, R. : QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature methods*, **7**, 335~336, 2010.
- 7) Ihaka, R., Gentleman, R. : R : a language for data analysis and graphics, *Journal of computational and graphical statistics*, **5**, 299~314, 1996.
- 8) Segata, N., Izard, J., Waldron, L., Gevers, D., Miropolsky, L., Garrett, W. S., Huttenhower, C. : Metagenomic biomarker discovery and explanation, *Genome biology*, **12**, R60, 2011.
- 9) 厚生労働科学研究（食品安全確保推進研究事業）：と畜・食鳥検査における疾病診断の標準化とカンピロバクター等の制御に関する研究平成26年度報告
- 10) Noormohamed, A., Fakhr, M. K. : Incidence and antimicrobial resistance profiling of *Campylobacter* in retail chicken livers and gizzards, *Foodborne pathogens and disease*, **9**, 617~624, 2012.

野生動物が保菌する腸管出血性大腸菌の特徴解析と リスク評価

Characterization and risk evaluation of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
isolated from wild animals

井 口 純
(宮崎大学農学部)

Atsushi Iguchi
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) is one of the most important groups of food-borne pathogens, because it can cause gastroenteritis that may be complicated by hemorrhagic colitis or hemolytic-uremic syndrome (HUS). Although cattle is considered to be a major reservoir and an important source of EHEC infections in humans, wild deer also carried EHEC, which may be involved in human infections. In Japan, the number of sika deer (*Cervus nippon*) has increased and their habitat has expanded during the last two decades, and opportunities to eat deer meat have also increased. However, the pathogenicity of deer EHEC strains for humans remains to be elucidated. Here, we examined the potential pathogenicity of EHEC carried by wild deer in Japan. The screening by the PCR revealed that 30.6 % of wild deer feces (56/183) which were collected in Miyazaki, Ohita and Hyogo prefectures were positive with EHEC. Most EHEC isolates from deer belonged to an O146 serogroup, and furthermore they were classified into two subtypes O146 : H21 and O146 : H28. Phylogenetic analysis based on the sequences of seven housekeeping genes demonstrated that the O146 : H21 and the O146 : H28 strains formed two distinct groups. Additionally it was revealed that EHEC O146 strains isolated from human were closely related to deer EHEC O146 : H21 or O146 : H28, suggesting that the EHEC O146 which are shedding from deer has caused the infection to humans. Good sanitary conditions should be used for deer meat processing to avoid EHEC contamination, because EHEC is prevalent in deer and deer may be a potential source of EHEC causing human infections.

1. 目 的

本研究では、野生動物から分離される腸管出血性大腸菌 (EHEC ; enterohemorrhagic *Escherichia coli*) の血清型、進化系統、保有病原因子などの特徴を明らかにし、さらにそれら分離株をヒト患

者および家畜牛から分離されるEHECと比較して共通点と相違点を明らかすることで、「野生動物由来EHECのリスク評価」や「安全な野生鳥獣肉(ジビエ)の提供」に資するための基盤情報を得ることを目的としている。

EHECは下痢症や出血性大腸炎を引き起こし、

患者の一部は溶血性尿毒症症候群や脳症を併発して死に至ることから、最も注意が必要な食中毒原因細菌の一つにあげられる。わが国におけるEHECの感染者数は2009年以降毎年4,000件前後で推移しており、本菌による死亡者は2009年から2015年の間で49名にのぼっている（国立感染症研究所報告）。これまでの調査・研究などからEHECの主な保菌宿主は家畜牛であると考えられており、家畜牛が保菌・排菌するEHECが食品や環境水などに汚染し、そこから直接または何かを介してヒトへと伝播していると考えられている。そこでEHECの予防や低減などのために、畜産現場および畜産物が消費者へ流通するまでの複数箇所で、様々な法令やガイドラインに基づいたEHEC対策が講じられている。2011年には富山県等の焼肉チェーン店で提供された「牛ユッケ」が原因と考えられるEHECによる食中毒事件が発生して5名が死亡した。この事件を受けて、食品衛生法に基づく新たな規格基準（2011年10月には「生食用牛肉の提供規制」、2012年7月には「牛生レバーの提供禁止」）が定められた。しかし、この対策後も感染者数は減少しておらず、本菌の汚染源または感染経路の多様性が示唆された。

近年、野生鳥獣の増加や生息域の拡大に伴う農林業等被害が深刻化している。2014年に被害の防止を主な目的として、従来の「鳥獣の保護及び狩猟の適正化に関する法律（鳥獣保護法）」が「鳥獣の保護及び管理並びに狩猟の適正化に関する法律（鳥獣保護管理法）」に改正され、狩猟に伴う規制の一部が緩和された。さらに、国や地方自治体から捕獲報奨金の交付や捕獲経費の補助などが始まった。一方で、これまで管理のために捕獲された野生鳥獣の多くは、埋没などにより廃棄されていたが、それをジビエとして町おこしなどで利活用する動きが全国に広がった。特にシカについては、農作物被害の主要な原因害獣であること

や、そのジビエがヨーロッパでは伝統的な食材として親しまれていることなどから、積極的な利活用の対象となった。しかし、野生のシカにはサルモネラやEHEC、E型肝炎ウイルスや寄生虫など様々な病原体が潜んでおり、これまでにも生または加熱不十分なシカのジビエを喫食したことによる感染事例が数多く報告されている¹⁾。このような状況の中で、厚生労働省は2014年11月に解体方法や必要処置などを示した「野生鳥獣肉の衛生管理に関する指針」を通知した。しかし、国内の野生シカにおけるEHECの保菌実態に関する情報は少なく、ヒトへのリスクも不明な点が多い。野生シカが保菌するEHECの種類や特徴、ヒト患者や家畜牛から分離されるEHECとの関連性が明らかになれば、ジビエの処理・加工や消費において、より具体的な衛生対策を立案・指導・啓発することが可能となる。そこで我々は、野生のニホンシカから分離されるEHECに注目し、その血清型や遺伝子型の特徴を明らかにするとともに、ヒト患者などから分離されるEHECとの比較を行った。

2. 方 法

2.1 野生シカ糞便検体

2016年3月から2017年8月に宮崎県（141頭）、大分県（21頭）、兵庫県（21頭）で捕獲された野生シカから採取した腸内容物（糞便）計183検体を用いた。

2.2 PCR法

すべてのPCR反応にはKAPA Taq Extra（KAPA BIOSYSTEMS）を用いた。

志賀毒素1型遺伝子（*stx1*）、志賀毒素2型遺伝子（*stx2*）、インチミン遺伝子（*eae*）の検出、大腸菌の同定（*E. coli*-specific *gyrB*）にはTable 1で示すプライマーセットを用いた。

2.3 EHECの検出と分離

EHECの保菌率を以下の方法で求めた。糞便

Table 1 PCR primer sequences used in this study

Target gene	Sequence	Product size (bp)	Reference
<i>stx1</i>	LP30 : CAGTTAATGTGGTGGCGAAGG LP31 : CACCAGACAATGTAACCGCTG	348	(2)
<i>stx2</i>	LP43 : ATCCTATTCCCGGGAGTTACG LP44 : GCGTCATCGTATAACACAGGAGC	584	(2)
<i>eae</i>	eae_univ_F : GACCCGGCACAAAGCATAAGC eae_univ_R : TCTGCCAGTATTCGCCACC	867	unpublished
<i>gyrB</i>	Ecoli_gyrB_F : AGTGATCATGACCGTTCTGCA Ecoli_gyrB_R : TTTGTCCATGTAGGCAGTCA	622	unpublished

(2 g) を生理食塩水 (4 ml) に懸濁し、DHL寒天平板培地 (DHL寒天培地「ニッスイ」、日本製薬) に一白金耳塗抹して37℃で18–24時間培養した。生育した菌床を白金耳で搔き取って生理食塩水 (300μl) に懸濁した。菌懸濁液からアルカリ熱抽出法によりDNAを調整した後に、PCRにより *stx1* と *stx2* の検査を行った (colony-sweep PCR)。さらにEHECの分離は以下の方法で行った。colony-sweep PCRで陽性となった検体について、上記検査で残しておいた菌懸濁液の段階希釈液をDHL寒天平板培地に塗抹して37℃で18–24時間培養して生育した単コロニーを1検体につき95コロニーから最大570コロニー釣菌してPCRにより *stx1* と *stx2* の検査を行った。EHEC (*stx*陽性株) については *gyrB* を標的としたPCRにより大腸菌であることを確認するとともに、*eae* の検査を行った。

2.4 PCR法によるO:H血清型の判定

O群およびH型の遺伝子型判定は、Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) で精製したDNAを用いて、*E. coli* O-genotyping PCR法³⁾ および*E. coli* H-genotyping PCR法⁴⁾ により行った。

2.5 ヒト由来EHEC O146株

東京食品技術研究所および国立感染症研究所から分与していただいたヒト由来EHEC O146計27

株 (2009から2016年にかけて、九州、四国、中国、近畿、東海、関東地方で分離) を用いた。PCR法で血清型を判定するとともに、*stx1*, *stx2*, *eae* の保有を確認した。

2.6 系統解析

Multilocus sequence typing (MLST) に用いられる7つのhousekeeping遺伝子 (*adk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA*, *recA*) の塩基配列情報を用いて系統解析を行った。得られた配列を連結し (計3423bp), MEGA6.06ソフトによるNeighbor-joining法で系統樹を作成した。さらにWebツール (http://enterobase.warwick.ac.uk/species/ecoli/allele_st_search) を用いてsequence type (ST) の判定を行った⁵⁾。

3. 結果と考察

3.1 シカのEHEC保菌率

EHEC保菌率は、*stx1* 単独が0.5% (1/183), *stx2* 単独が26.2% (48/183), *stx1* + *stx2* が3.8% (7/183) で、野生シカにおけるEHEC保菌率は少なくとも30.6%であることが確認された (Table 2)。宮崎県だけでみると36.9%と他の地域より高いことから、野生シカのEHEC保菌率には地域的な偏りがあるものと推察された。

3.2 シカ由来EHECの特徴

EHEC陽性56検体のうち、36検体から195株の

Table 2 Prevalence of EHEC in deer

Area	No. of samples	No. of positive samples with screening PCR			No. of samples from which EHEC could be isolated		
		stx1 only	stx2 only	stx1 + stx2	stx1 only	stx2 only	stx1 + stx2
Miyazaki	141	1	44	7	1	28	5
Ohita	21	0	1	0	0	1	0
Hyogo	21	0	3	0	0	1	0
Total	183	1	48	7	1	30	5

EHECを分離した (Table 2)。*eae*の保有を確認したところ、すべてが陰性であった。血清型は Og91 : Hg14 (1 株), Og146 : Hg21 (163株), Og146 : Hg28 (28株), Og148 : Hg18 (3株) の 4種類が確認された。以上の結果から、Og146はシカが保菌するEHECの優勢O群であること、さらにOg146の中でHg21とHg28に大きく分類されることが明らかとなった。これまでに報告のある野生シカ由来EHECのO群として、Kabeyaら⁶⁾によるとO5, O7, O96, O130, O141, O146, O157, O166の8種類が、中村ら⁷⁾によるとO11, O54, O84, O113, O146, O157の6種類が確認されており、Kabeyaらの調査においてはO146が最優勢であった。また、海外においてもスペイン、アメリカ、ドイツ、アルゼンチンで野生または家畜化したシカからEHEC O146が分離されている^{8~11)}。一方で、家畜牛からEHEC O146が分離されるケースは限られており、国内においてはKobayashiら¹²⁾が行った調査で乳牛111頭から分離したEHEC118株のうちO146は含まれておらず、Leeら¹³⁾が行った調査でも牛糞便由来EHEC112株のうちO146は含まれていなかつた。以上の結果から、EHEC O146はシカに親和性の高いO群であることが予想された。

3.3 系統解析

シカ由来EHEC27株 (Og146 : Hg21 20株, Og146 : Hg28 6株, Og148 : Hg18 1株) とヒト由来EHEC27株 (すべてOg146) の計54株を

用いて系統解析を行った (Fig. 1)。その結果、Og146 : Hg21 (ST829, ST422) とOg146 : Hg28 (ST738) はそれぞれ異なる系統に属し、どちらの系統群においてもシカ由来株とヒト由来株が近縁な関係にあることが明らかとなった。以上の結果から、野生のシカから排菌されたEHECがジビエや環境を介してヒトに感染している可能性が示唆された。

4. 要 約

近年、ジビエとしての利用が進められている野生シカを対象としたEHECの保菌調査を行い、その保菌率は少なくとも30.6%であることが確認された。分離されたEHECの多くはO146に属し、H型の判定と系統解析から、EHEC O146は明らかに系統が異なるO146 : H21とO146 : H28に分類されることが明らかとなった。これまでにヒトから分離されたEHEC O146もシカ由来株と近縁な系統であったことから、EHEC O146の主な保菌宿主は野生のシカであり、そこから排菌されたEHECがジビエや環境を介してヒトに感染している可能性が示唆された。EHECのO146はこれまでほとんど注目されていなかったが、海外で重症患者からの分離報告があることや、国内外で近年検出数が増加傾向にあることを考慮すると、国内においても注意が必要なO群の1つであると言える。今後、さらにシカ肉の利用が普及すると予想される中で、その安全性を確保するためには、シ

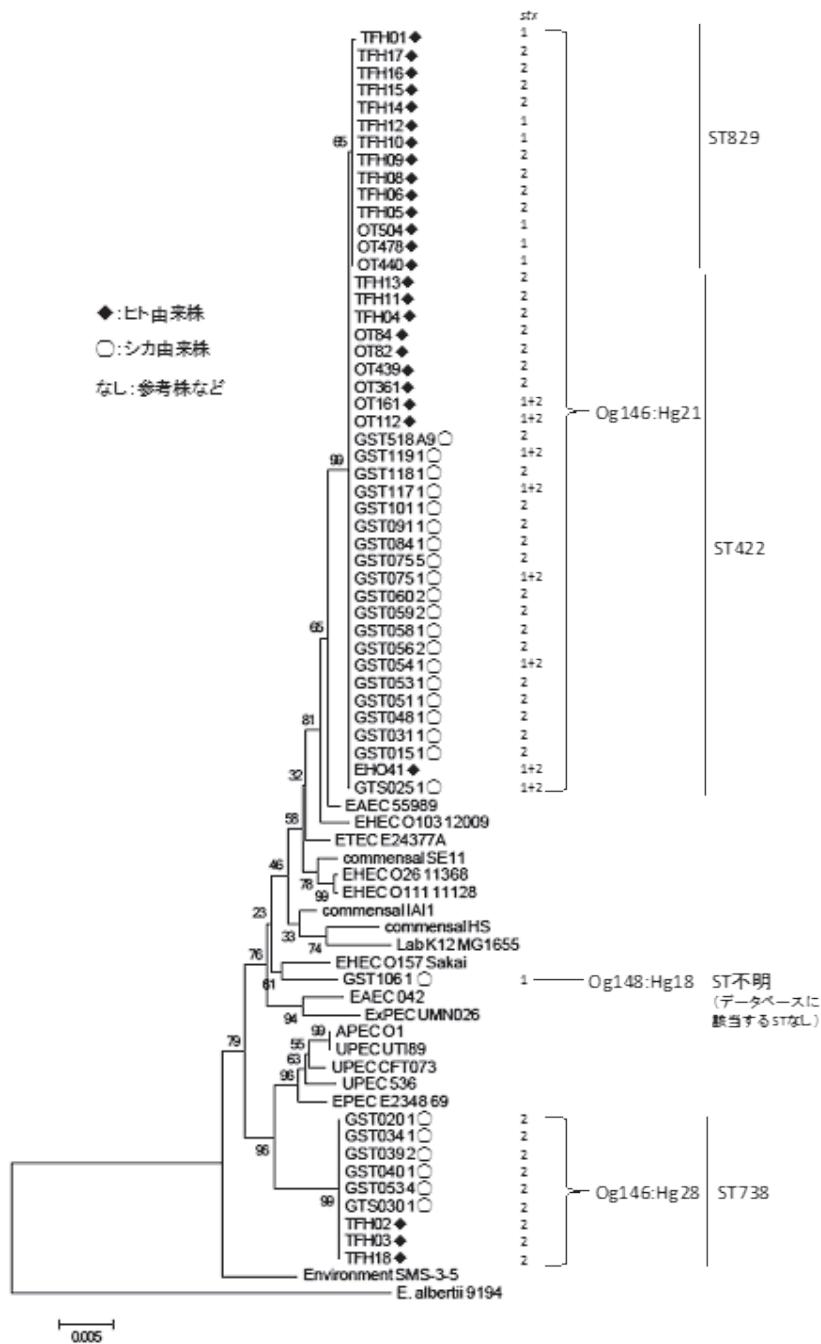


Fig. 1 Phylogenetic relationship of EHEC O146 isolates from deer and human

カが保菌するEHECのヒトへのリスクを狩猟者や提供者、消費者が正しく理解し、その取り扱いに際して充分な注意を払う必要がある。

文 献

- 1) 高井伸二：野生鳥獣由来食肉の安全性確保に関する研究（平成23－25年度総合研究報告書），厚生労働省科学研究費補助金食品安全確保推進研究事業，2014.

- 2) Cebula, T. A., Payne, W. L., Feng, P. : *J Clin Microbiol.*, **33**, 248~250, 1995.
- 3) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F., Ohnishi, M. : Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan, *J Clin Microbiol.*, **53**, 2427~2432, 2015.
- 4) Banjo, M., Iguchi, A., Seto, K., Kikuchi, T., Harada, T., Scheutz, F., Iyoda, S. : Pathogenic *E. coli* Working Group in Japan, *J Clin Microbiol.*, (accepted)
- 5) Wirth, T., Falush, D., Lan, R., Colles, F., Mensa, P., Wieler, L. H., Karch, H., Reeves, P. R., Maiden, M. C., Ochman, H., Achtman, M. : *Mol Microbiol.*, **60**, 1136 ~1151, 2006.
- 6) Kabeya, H., Sato, S., Oda, S., Kawamura, M., Nagasaka, M., Kuranaga, M., Yokoyama, E., Hirai, S., Iguchi, A., Ishihara, T., Kuroki, T., Morita-Ishihara, T., Iyoda, S., Terajima, J., Ohnishi, M., Maruyama, S. : *J Vet Med Sci.*, **79**, 834~841, 2017.
- 7) 中村昂紀ら：第21回腸管出血性大腸菌感染症研究会プログラム・抄録集, p.27, 2017.
- 8) Mora, A., López, C., Dhabi, G., López-Beceiro, A. A., Fidalgo, L. E., Díaz, E. A., Martínez-Carrasco, C., Mamani, R., Herrera, A., Blanco, J. E., Blanco, M., Blanco, J. : *Appl Environ Microbiol.*, **78**, 2578 ~ 2585, 2012.
- 9) Eggert, M., Stüber, E., Heurich, M., Fredriksson-Ahomaa, M., Burgos, Y., Beutin, L., Märtilbauer, E. : *Epidemiol Infect.*, **141**, 251~259, 2013.
- 10) Franklin, A. B., Vercauteren, K. C., Maguire, H., Cichon, M. K., Fischer, J. W., Lavelle, M. J., Powell, A., Root, J. J., Scallan, E. : *PLOS One*, **8**, e81512, 2013.
- 11) Leotta, G. A., Deza, N., Origlia, J., Toma, C., Chinen, I., Miliwebsky, E., Iyoda, S., Sosa-Estani, S., Rivas, M. : *Vet Microbiol.*, **118**, 151~157, 2006.
- 12) Kobayashi, H., Kanazaki, M., Ogawa, T., Iyoda, S., Hara-Kudo, Y. : *J Vet Med Sci.*, **71**, 363 ~ 366, 2009.
- 13) Lee, K., Kusumoto, M., Iwata, T., Iyoda, S., Akiba, M. : *Epidemiol Infect.*, **145**, 1557~1566, 2017.

農場で発生する腸炎にカラス由来のウエルシュ菌は どのように関与しているか? —MLST法による遺伝学的解析での検討—

How the wild crow-derived *Clostridium perfringens* relate to the occurrence of enteritis in domestic animals in farms?

—Genetical characterization of *C. perfringens* strains by MLST analysis—

上塚 浩司

(茨城大学農学部)

Koji Uetsuka

(Ibaraki University, College of Agriculture)

In order to study how the wild crow-derived *Clostridium perfringens* (Cp) relate to the occurrence of enteritis in domestic animals in farms, genetical characterization of Cp strains were examined by multilocus sequence typing (MLST) analysis.

In this study, twenty-five Cp strains derived from the intestinal contents of 15 crows were genetically analyzed by MLST, in that the 15 crows from which the 25 Cp strains derived had been captured in Ibaraki prefecture. In addition, other previously published 13 Cp strains derived from various hosts were also analyzed as reference strains for phylogenetic analysis.

As a result, wild crow-derived 25 Cp strains were classified into 16 sequence types (ST). Considering to the discrepancy of ST in pair of Cp strains derived from an identical crow, it would be interesting to investigate the clonality of Cp strains in the intestine of healthy crow.

Furthermore, it was difficult to find any significant phylogenetic relationships between wild crow-derived 25 Cp strains and 13 reference strains. Meanwhile, major 3 clusters were found in the phylogenetic tree constructed by wild crow-derived 25 Cp strains, and it is suspected that each cluster show its own topographical distribution in Ibaraki prefecture, suggesting that the distribution of Cp strains in each cluster might have some relationship with the inhabitation and/or traveling of wild crows from which they derived. To verify this hypothesis, still much more Cp strains derived from wild crows in Ibaraki prefecture should be examined genetically by MLST.

1. 目的

Clostridium perfringens (以後、ウエルシュ菌) は、ヒトおよび動物の腸内細菌叢を構成する細菌の一種であり、産生する毒素の種類に応じて5つの毒素型に分類され、それぞれが鶏や豚での壞死

性腸炎、牛や馬での出血性腸炎など、農場における家畜や家禽の腸炎の原因となることから、食肉の安定した供給において、大きな障害となってしまう。

しかしながら、ウエルシュ菌は健常なヒトや動物の腸内容物からも分離される一般的な腸内細菌

である一方で、農場に侵入する野生鳥獣の排泄するウエルシュ菌は農場での腸炎の発生に関与している可能性が推察されているものの、野生鳥獣が保有するウエルシュ菌の多様性や分布を調査した例はほとんど報告がない。

そこで我々は平成26年度、27年度と、茨城県で捕獲されたカラス、スズメ、ムクドリについて調査を行い、それぞれの腸内容物からのウエルシュ菌の分離の頻度、菌量および毒素型を調べ、スズメ、ムクドリに比較して、カラスではウエルシュ菌の分離頻度、菌量ともに著しく高く、外界へのウエルシュ菌の排泄にはこれら3種の留鳥の中ではカラスの関与が最も大きいことを明らかにし、平成28年度に学会報告を行った。

今回の研究助成で行った研究では、カラスから分離されるウエルシュ菌が農場で発生する腸炎に関与しているのかどうかについて、さらに検討を深めることを目的として、カラスから分離したウエルシュ菌株を Multilocus Sequencing Typing法(MLST法)によって遺伝学的に解析し、NCBI GeneBankに登録されているウエルシュ菌の病原性株と比較して系統樹を作成し、農場での腸炎の発症への関与を遺伝学的に検証するものである。

MLST法とは、複数のハウスキーピング遺伝子の配列データを用いるゲノムタイピングの手法である。この方法の利点として、自研究室の所有する菌株だけでなく、世界中の研究室においてシークエンス解析されWeb上に公開された菌株との比較解析が可能になることがあげられる。したがって、自前の研究でシークエンス解析されたカラス由来菌株の遺伝学的性状を調べるのみならず、病原性株など他のウエルシュ菌株との性状比較を可能にする非常に有用な手法であると考えている。これにより、相応の予防対策を行うための一助となり、安定した食肉供給への貢献が期待できるものと考えている。

2. 方 法

検体は茨城県の高病原性鳥インフルエンザ対策事業での留鳥の感染状況の調査のために平成26年度の獵期に茨城県内で捕獲され、県北家畜保健衛生所あるいは県南家畜保健衛生所に持ち込まれた野生カラスであり、気管スワブおよびクロアカスワブでの簡易キットによるインフルエンザ検査で陰性と判定されたものから腸管を分与いただき、その腸内容物から分離されたウエルシュ菌株である。検体として用いた腸管に、病変等は観察されなかった。

凍結保存してあった菌株を、10%卵黄カナマイシン入りCW寒天培地にて38℃で一晩嫌気培養し、翌日プレートに発育したコロニーを搔き取り、エッペンチューブ内の滅菌MQ水中で搅拌して10分間煮沸した。その後、遠心してDNAが含まれている上清を回収した。

MLST解析に使用する8種のハウスキーピング遺伝子のシーケンス解析はDeguchiらの論文を参考して実施した¹⁾。8種のハウスキーピング遺伝子それぞれについてKAPA HiFi Hot Start Ready Mix (KAPA BIOSYSTEMS：米国)を使用してPCR反応を行い、その後、1%アガロースゲルで電気泳動を行い、増幅遺伝子の存在およびサイズを確認した。

遺伝子の増幅が確認されたPCR産物は、FastGene Gel/PCR Extraction Kit(ニッポンジーン：東京)を用いてキットの説明書に従って精製し、BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific：米国)を使用したサイクルシークエンス反応を行った。反応液は、エタノール沈殿により精製して、茨城大学農学部の遺伝子実験施設にある ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems：米国)を用いてシークエンス解析を行った。

3. 結果と考察

今回の研究では、平成26年度に茨城県内で捕獲されたカラス45羽の腸内容物から分離されたウエルシュ菌118菌株をMLST法での解析に用いたが、8つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列がすべて適切に解読できてMLST解析を行うことができたのは、最終的に15羽のカラスに由来する25株のウエルシュ菌株となった。

また、データベース上でゲノム遺伝子の全塩基配列が公開されているウエルシュ菌株が13株あり、これらを参照株として合わせて解析を実施した。これらの菌株はヒト由来の病原株が大半であるが、牛由来が1株、農業関連が3株、工業廃水から分離された環境由来が1株である。今回の研究においてMLST法による遺伝学的解析を行った分離株の一覧をTable 1に示す。

3.1 配列型（Sequence type : ST）の解析

今回のウエルシュ菌のMLST解析では、公開データベースが設置されているWebサイトであるPubMLST (<https://pubmlst.org/>) に従い、*colA*, *groEL*, *sodA*, *plc*, *gyrB*, *sigK*, *pgk*, *nadA*の8つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列を利用した。このデータベースには、8つのハウスキーピング遺伝子ごとにそれぞれ塩基配列の違いに基づくアレル番号が登録され、さらに8種のアレル番号の組み合わせに基づき配列型（Sequence type : ST）が登録されている。

今回の研究においてMLST法による遺伝学的解析に用いた25株の分離菌株と13株の参照株について、STの解析結果をTable 2に示す。PubMLSTの公開データベースに一致するアレル番号が登録されていない場合には任意でアレル番号を付け、既存の番号との区別のため100番台とした。また、この場合はアレル番号の組み合わせで決定するSTの登録も存在しないため、任意のST番号を付

け、既存の番号との区別のため100番台とした。

その結果、今回の分離菌25株は16種類の配列型(ST)に分類された (Table 2)。具体的には、分離菌25株のうち5株が102型に分類され、これら5株は異なる3個体に由来していた。次に、2株ずつが104, 105, 106, 113, 115型に分類されたが、これら2株は同一個体に由来するペアであった。残りの10菌株は別々のSTに分類された、菌株名4と5は同一個体由来の分離株でありながら、それぞれ102型と103型と別々のSTに分類された。

同一個体に由来する菌株のペアの結果から、健常なカラスの腸内に生息するウエルシュ菌のクローニ性について考察した。パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法を用いた研究において、健康な鶏はいくつかの異なるウエルシュ菌のクローニを保有し、これに対し壊死性腸炎を発症している鶏は1つまたは2つのクローニしか保有していないことが報告されている⁴⁾。さらにいくつかのゲノムタイピングによる研究において、健康な鶏には一般的に多数の異なる分離株が存在するのに対し、壊死性腸炎に罹患した鶏の腸管内では単一タイプのウエルシュ菌による支配が示唆されている^{2~5)}。これらの報告から、今回の研究に使用した検体は健常なカラスの腸管であるので、遺伝的に多様なウエルシュ菌株を保有していることが推察されるが、今回の研究で同一個体に由来する2菌株で異なるSTに分類されたのは、菌株名4と5だけであった。健常なカラスの腸内でのウエルシュ菌のクローニ性について今後さらに検討したいと考えている。

3.2 系統学的解析

配列レベルでの菌株間の系統学的な関連性を調べるため、塩基配列データをMEGA 7ソフトウェアを使用して均一な長さにトリミングおよびアラインメントし、調整された8つのハウスキーピング遺伝子の配列を連結し合計5870bpの配列データ

Table 1 The list of *Clostridium perfringens* strains analyzed by MLST method in this study.

Wild crow-derived strain

Strain name	Strain-derived crow No.	Location of capture	Host name
1	K1-R1	Omitama	crow
4	K1-R2	Omitama	crow
5			
12	K1-R5	Omitama	crow
14			
23	K2-R2	Ibaraki-machi	crow
27			
35	K6-R1	Ooarai	crow
38			
48	K8-R2	Omitama	crow
57	K8-R3	Omitama	crow
68	K17-R2	Mito	crow
74			
75	K17-R4	Mito	crow
M16	M2-R6	Tsukuba	crow
M17			
M25	M2-R9	Tsukuba	crow
M26			
M37	M5-R4	Inashiki	crow
M47	M5-R5	Inashiki	crow
M48			
M57	M5-R7	Inashiki	crow
M59			
M66	M5-R8	Inashiki	crow
M67			

Reference strain

Strain name	Sequencing center	Host name	Relevance
str.F4969	J. Craig Venter Institute (JCVI)	Homo sapiens	Pathogen
WAL-14572	Broad Institute	Homo sapiens	Medical
str. 13	Kyushu University, University of Tsukuba, Kitasato University	Homo sapiens	Pathogen
FORC_003	Food-borne Pathogen Omics Research Center (FORC)	—	Agricultural
JP55	University of Guelph	—	Agricultural
str. JGS1495	J. Craig Venter Institute (JCVI)	Homo sapiens	Pathogen
str. JGS1721	J. Craig Venter Institute (JCVI)	Homo sapiens	Pathogen
JJC	Monash University	—	Environmental
JP838	University of Guelph	—	Agricultural
ATCC13124	J. Craig Venter Institute (JCVI)	Homo sapiens	Pathogen
str. JGS1987	J. Craig Venter Institute (JCVI)	Homo sapiens	Pathogen
F262	University of Guelph	Bos taurus	Medical
FORC_025	Seoul National University, Food-borne Pathogen Omics Research Center (FORC)	Homo sapiens	Medical

Table 2 Sequence type (ST) of strains analyzed in this study

strain name	allele No.								sequence type (ST)
	<i>colA</i>	<i>groEL</i>	<i>sodA</i>	<i>plc</i>	<i>gyrB</i>	<i>sigK</i>	<i>pgk</i>	<i>nadA</i>	
wild crow-derived strain									
1	1	101	1	101	1	4	8	101	101
4	101	6	1	7	1	5	4	1	102
5	102	102	1	4	3	5	1	1	103
12	102	19	1	4	3	5	1	1	104
14	102	19	1	4	3	5	1	1	104
23	4	8	5	4	2	7	1	11	105
27	4	8	5	4	2	7	1	11	105
35	4	20	101	102	1	24	12	102	106
38	4	20	101	102	1	24	12	102	106
48	6	103	102	5	5	2	2	3	107
57	103	104	103	103	101	101	8	103	108
68	26	105	1	24	102	4	101	104	109
74	4	106	1	4	2	2	1	105	110
75	4	107	3	4	3	2	4	13	111
M16	11	108	6	104	2	5	2	106	112
M17	4	1	3	4	3	2	1	4	5
M25	104	30	104	1	103	4	8	107	113
M26	104	30	104	1	103	4	8	107	113
M37	4	1	1	10	3	102	1	4	114
M47	101	6	1	7	1	5	4	1	102
M48	101	6	1	7	1	5	4	1	102
M57	105	104	105	103	104	101	8	108	115
M59	105	104	105	103	104	101	8	108	115
M66	101	6	1	7	1	5	4	1	102
M67	101	6	1	7	1	5	4	1	102
reference strain									
str. F4969	6	6	1	7	1	5	4	1	36
WAL-14572	106	4	6	105	3	103	1	109	116
str. 13	29	5	1	31	5	4	8	13	40
FORC_003	6	5	1	33	24	4	7	105	117
JP55	4	19	3	4	3	5	102	1	118
str. JGS1495	107	4	106	106	105	4	3	19	119
str. JGS1721	108	6	15	107	1	5	12	110	120
JJC	6	3	107	5	4	3	3	10	121
JP838	109	109	108	108	106	26	103	111	122
ATCC13124	1	1	1	1	1	1	1	1	1
str. JGS1987	22	5	17	21	15	16	7	19	32
F262	26	29	5	109	3	24	104	112	123
FORC_025	4	110	1	6	4	4	3	1	124

タを用いて、カラス由来の25菌株についての系統樹を作成した (Fig. 1)。

次に、データベース上でゲノム遺伝子の全塩基配列が公開されている既知のウエルシュ菌株である13株を参照株として加え、合わせて38株の系統樹を作成した (Fig. 2)。

カラス由来菌株はすべて健常なカラスの腸管から採取されたものであり、参照株は様々な起源に

由来するウエルシュ菌株である。これら38菌株について系統樹を作成してみたが、特に有意な関連性など見出すことはできなかった。今後は、鶏の農場で分離された病原性株と比較検討を行う予定である。

しかし、カラス由来の25菌株についての系統樹 (Fig. 1)において、菌株は大きく3つのクラスターに分かれるように見受けられる。クラスター

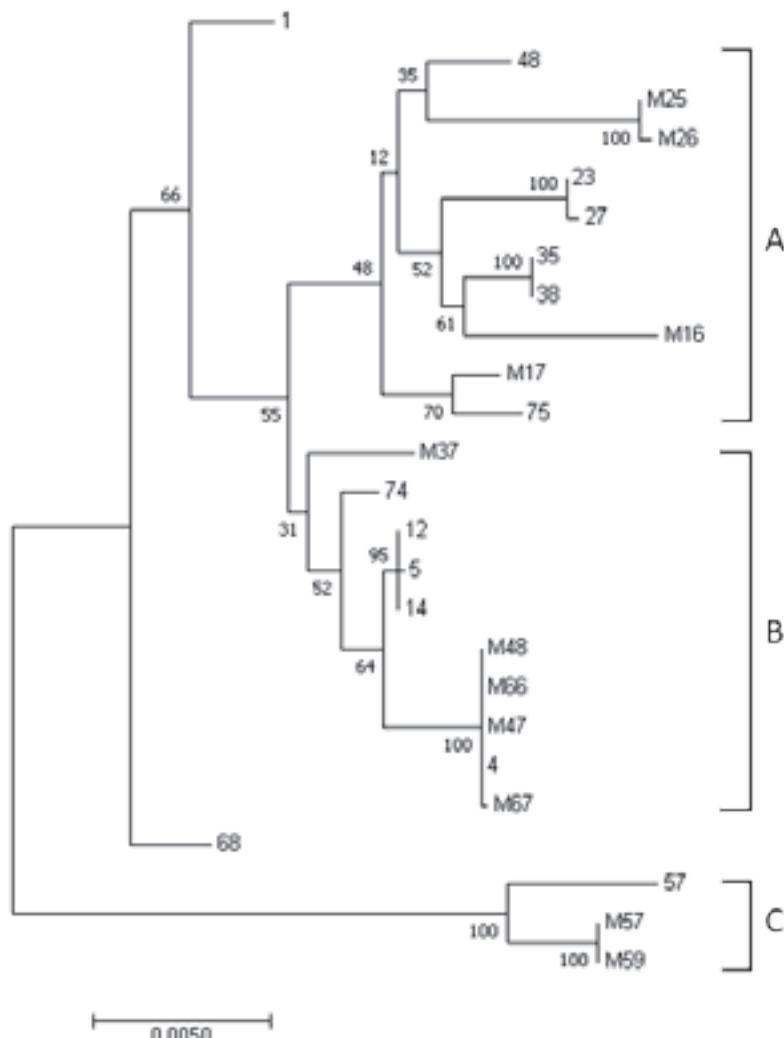


Fig. 1 Phylogenetic trees of the 25 strains of wild crow-derived *Clostridium perfringens* obtained in our study. A phylogenetic tree was constructed by Maximum Likelihood method. The reliability of the tree was assessed using bootstrap method with 1000 replicates.

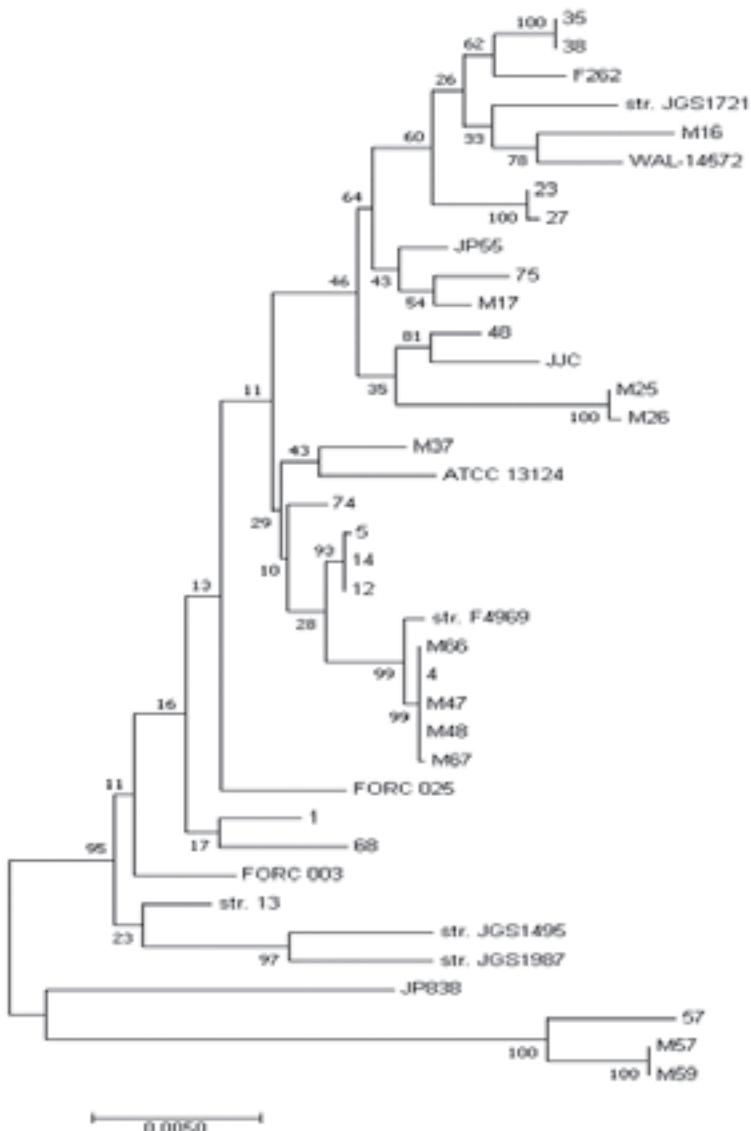


Fig. 2 Phylogenetic trees of the 25 strains of wild crow-derived *Clostridium perfringens* obtained in our study and the 13 reference strains previously published.

Isolates from this study are marked in No. or M-No. A phylogenetic tree was constructed by Maximum Likelihood method. The reliability of the tree was assessed using bootstrap method with 1000 replicates.

ごとに菌株が分離されたカラスの捕獲場所を茨城県の白地図上に書き込んでみると、クラスターAの菌株は大洗町、茨城町からつくば市への東西方向 (Fig. 3A)、クラスターBの菌株は水戸市、小美玉市から稲敷市への南北方向への分布が推察された (Fig. 3B)。またクラスターCの菌株は小美

玉市から稲敷市へと南北に伸びるクラスターBに重なるがそれよりも小さな分布が推察された (Fig. 3C)。カラスの移動範囲はおよそ20kmから30km程度と言われているが、3つのクラスターの菌株の分布に対応して、3つのカラス群が生息あるいは移動しているという仮説を考えた。しか

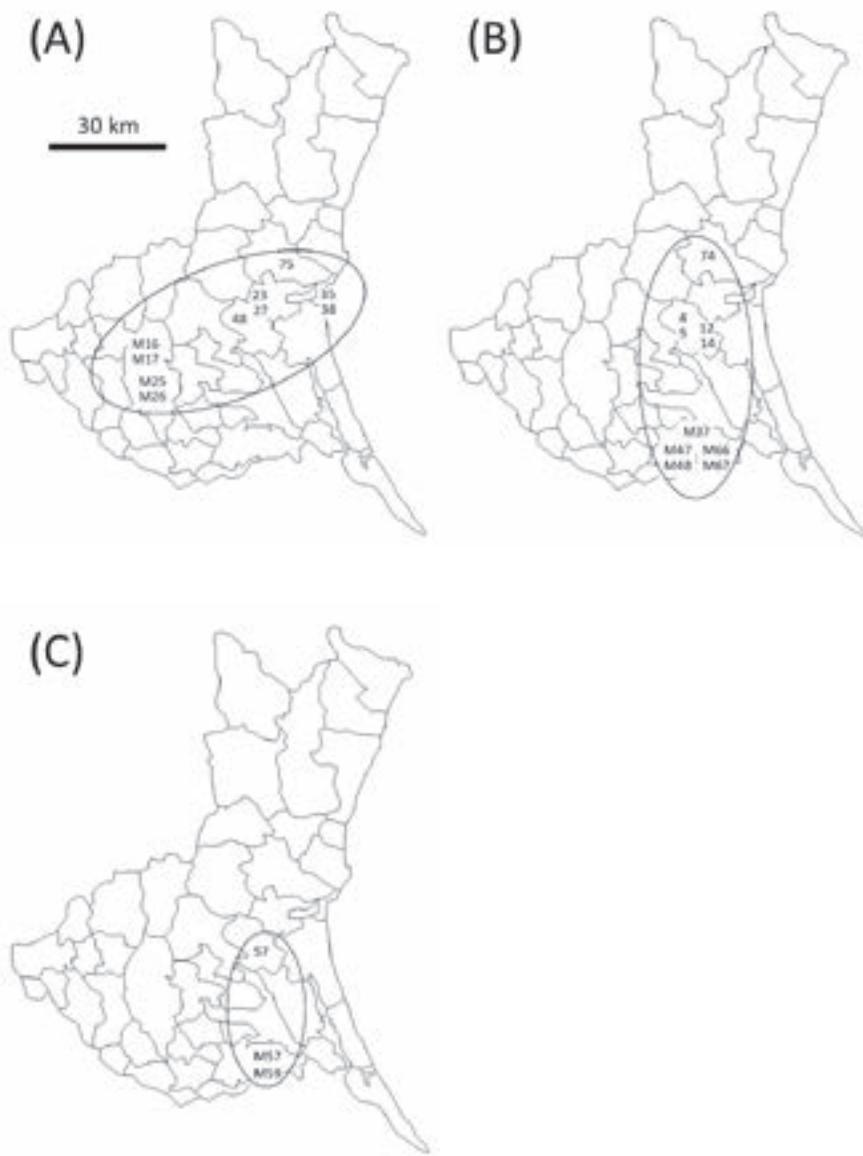


Fig. 3 The distribution of wild crow-derived *Clostridium perfringens* strains in Ibaraki prefecture. The numbers are the strain name and shown at the location where their host-crows had been captured. The strains belong to cluster A in Fig.1 are shown in (A), and cluster B in (B), cluster C in (C).

しながら、今回用いたカラス由来の菌株が25菌株と少なく、仮説を検証するには不十分であることから、今後さらに解析菌株を増やし、菌株のクラスターとその分布の地域性との間の関連性を検討していく予定である。

4. 要 約

野生カラスが保有するウエルシュ菌について、MLST (Multi Locus Sequence Typing) 法による遺伝学的解析を行った。解析は平成26年度の獵期に捕獲された15個体のカラスに由来するウエル

シュ菌25株に加えて、データベース上にゲノム遺伝子の全塩基配列が公開されているウエルシュ菌13株を参照株として追加し、合計38株について実施した。その結果、カラスからの分離菌25株は16種類の配列型(ST)に分類され、同一個体のカラスに由来する2菌株のSTについての考察から、健常なカラスの腸内に生息するウエルシュ菌のクローニングについて、さらに検討する必要性が示唆された。また、カラスからの分離菌25株と参照株13株との系統樹では、特に関連性を見出すことはできなかったが、カラスからの分離菌25株は大きく3つのクラスターに分かれ、分離菌の由来カラスの捕獲場所についてクラスターごとに茨城県内の分布に特徴があることが示された。これより

3つのクラスターの菌株の分布に対応して、3つのカラス群が生息あるいは移動している可能性が推察された。今後さらに解析する菌株数を増やし、検討を続ける予定である。

文 献

- 1) Deguchi, A., Miyamoto, K., Kuwahara, T., Miki, Y., Kaneko, I., Li, J., McClane, B. A., Akimoto, S. : *PLoS ONE*, 4, e5598, 2009.
- 2) Lacey, J. A., Johanesen, P. A., Lyras, D., Moore R. J. : *Avian Pathology*, 45, 302~307, 2016.
- 3) Gholamiandekhordi, A. R., Ducatelle R., Heyndrickx, M., Haesebrouck, F., Van Immerseel, F. : *Veterinary Microbiology*, 113, 143~152, 2006.
- 4) Nauer, B., Pedersen, K., Madsen, M. : *Veterinary Microbiology*, 94, 257~266, 2003.
- 5) Barbara, A. J., Trinh, H. T., Glock, R. D., Glenn, S. J. : *Veterinary Microbiology*, 126, 377~382, 2008.

肺エコーとプロカルシトニン値を用いた牛の非定型 肺炎と細菌性肺炎の簡易迅速鑑別診断システム

Simply and rapid differential diagnosis system of bovine atypical and bacterial pneumonia using a pulmonary echography and plasma procalcitonin level

鈴木一由

(酪農学園大学獣医学群)

Kazuyuki Suzuki

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

The purpose of this study is to examine an association between an anti-inflammatory effect of tulathromycin : 15 membered ring macrolide antibiotics for cattle and plasma and BALF endotoxin (ETX) activity and plasma procalcitonin value in ETX challenge model calves. Fourteen healthy calves 25.8 ± 13.2 days of age were enrolled in this study. Calves were divided into control group ($n=7$) and Draxxin group ($n=7$). Control group received normal saline solution (0.025ml/kg) each at day0, 3, 6, and 9. Likewise, Draxxin group received tulathromycin (2.5mg/kg, Draxxin, Zoetis) intermuscularly. All calves received 2.5 μ g/kg of O111 : B4 lipopolysaccharide at day10 via indwelling catheter in jugular vein. We set the time of endotoxin challenge at $t=0$, and correct whole blood at $t = 30$ minute, 1, 2, 4, 8, 12, 24hours from jugular vein into heparinized tube. Plasma endotoxin activity was measured by kinetic turbidimetric (KTA) : limulus amebocyte lysate (LAL) based assay. Samples were diluted to 20 times and heated 80°C for 10 minute. BALF endotoxin activity was measured by kinetic chromogenic (KCA) : LAL based assay. Samples were diluted to 200 times. Procalcitonin concentrations were measured by ELISA kit (Bovine Procalcitonin (PCT) ELISA Kit, MyBioSource). There were no significant differences between control group and Draxxin group in plasma and BALF ETX activity. As for plasma procalcitonin concentrations, values kept higher than pre in control group. But in Draxxin group, plasma procalcitonin values decrease at $t=30$ minuites and 1hour after ETX challenge compared to pre. The present result suggested that anti-inflammatory effect of tulathromycin participates in ETX cascade, not inhibiting ETX activity. As a result, plasma procalcitonin concentrations were low value in Draxxin group. We conclude that plasma procalcitonin value may be a useful diagnostic tool to surmise a degree of inflammation. Further studies are needed in order to apply to clinical field.

1. 目的

ヒト医療において血中プロカルシトニンは細菌、寄生虫、真菌感染時に特異的に上昇する炎症マーカーとして利用されている。血中プロカルシトニン濃度をもとに細菌性肺炎とマイコプラズマ性肺炎の鑑別や抗生物質の投与の必要性を判断することが可能で、治療方針の決定に役立つと同時に不必要的抗生物質投与を防ぎ、結果として耐性菌の出現を抑えることができると考えられる。

生産動物医療においても食の安全という観点から、耐性菌への対策は重要な課題となっている。患畜の炎症の程度を把握することや細菌性肺炎とマイコプラズマ性肺炎の鑑別をすることは、その後の抗菌薬の使用など治療方針を決定する上で重要である。鑑別を迅速かつ適切に行うことで、不必要的抗生物質の使用を減少させ、現在大きな問題となっている薬剤耐性菌の出現を抑えることができる。生産動物医療において、患畜の血中プロカルシトニン濃度を測定し炎症の程度の指標として利用することが可能となれば、呼吸器疾患などの炎症性疾患のガイドラインとなりうると考えられる。

一方で、マクロライド系抗生物質は、細菌のリボソーム50Sサブユニットに結合してタンパク質合成を阻害することで静菌作用を示す薬剤である。さらに、新作用としてインターロイキン8(IL-8)の遊離阻害やNF- κ Bの活性化抑制により抗炎症作用をもたらすことが知られており、ヒト医療では慢性炎症性疾患の治療にも応用されている。近年、肉牛の生産現場においても牛用15員環マクロライドであるツラスロマイシンが使用されており、その抗炎症作用についても注目されている。

本研究ではエンドトキシンチャレンジモデルを用いて、牛用15員環マクロライドであるツラスロ

マイシンの抗炎症作用と、炎症の指標としての血中および気管支肺胞洗浄液(BALF)中エンドトキシン活性値と血中プロカルシトニン濃度の関係について検討した。

2. 方 法

本研究では、牛用15員環マクロライドであるツラスロマイシン(商品名：ドラクシン[®], Zoetis)を血漿消失半減期($t_{1/2} = 91$ 時間)に相当する3日間隔で4回投与して血漿レベルを定常状態に保ちエンドトキシンをチャレンジした。

酪農学園大学附属動物医療センターで飼育している健康子牛計14頭(対照群7頭、ドラクシン群7頭)を用いた。供試牛の日齢および体重はそれぞれ 25.8 ± 13.2 日齢、 36.2 ± 7.2 kgであった。品種は、ホルスタイン種8頭、ジャージー種6頭であった。

対照群には生理食塩水0.025ml/kgを、ドラクシン群には2.5mg/kgのツラスロマイシン(ドラクシン[®], Zoetis)を処置開始0日目、3日目、6日目、9日目に計4回筋肉内投与した。処置開始10日目に各供試牛に2.5μg/kgのO111:B4リポポリサッカライド(Lipopolysaccharides from Escherichia coli, SIGMA)を頸静脈に留置したカテーテルを介してチャレンジした(実験的全身性炎症モデル)。エンドトキシンをチャレンジした時点を $t = 0$ 時間と設定した。供試牛よりエンドトキシンチャレンジ前(pre), $t = 30$ 分, 1, 2, 4, 8, 12および24時間目に頸静脈より採血した。採取した血液は直ちにヘパリン添加採血管に入れ、3000回転で15分間遠心し、血漿を分離後-30°C以下で保存した。BALFは気管支鏡ガイド下で採取した。あらかじめ回収前に肺胞内を生理食塩水で洗浄し、直後に生理食塩水100mlを肺胞内に注入してその回収液をサンプルとした。肺胞洗浄はpre, $t = 2, 4$ および24時間の各時点で実施

し、回収液は-30°C以下で保存した。

血漿中エンドトキシン活性値はLimulus Amebocyte Lysate (LAL) 法であるKinetic Turbidimetric (KTA) 法を用いて測定した。測定時の前処理条件は20倍希釀、80°Cで10分加温し、干渉物質を除去した。BALF中エンドトキシン活性値はLAL法であるKinetic Chromogenic (KCA) 法を用いて測定した。測定時の前処理条件は200倍希釀とした。血漿中プロカルシトニン濃度はBovine Procalcitonin (PCT) ELISA Kit (MyBioSource) を用いて所定の方法に則って測定した。

データは平均値±標準偏差で示した。pre値に対する各群内変動を二元配置分散分析法により解析した後、post-hoc testとしてDunnet法により評価した。また、群間の平均値の差は二元配置分散分析法により分散を評価した後、post-hoc test

としてTukey Kramer testにより評価した。

3. 結果と考察

ツラスロマイシン処理牛のエンドトキシンチャレンジにおける血漿中ETX活性値の経時的变化をFig. 1に示した。対照群およびドラクシン群の血漿中エンドトキシン活性値はt=30分においてそれぞれ 3.93 ± 3.39 および 2.94 ± 6.03 EU/mLの最高値を示し、pre値の 0.16 ± 0.75 および 0.82 ± 0.63 EU/mLに対して有意な上昇を示した。しかし、対照群およびドラクシン群間における血漿中エンドトキシン活性値の経時的变化に有意な差は認められなかった。対照群およびドラクシン群におけるBALF中エンドトキシン活性値は対照群はt=2時間目において 63.69 ± 66.70 、ドラクシン群はpreにおいて 116.0 ± 123.61 EU/mLの最高値を示した。しかし、血漿中エンドトキシン活性値と

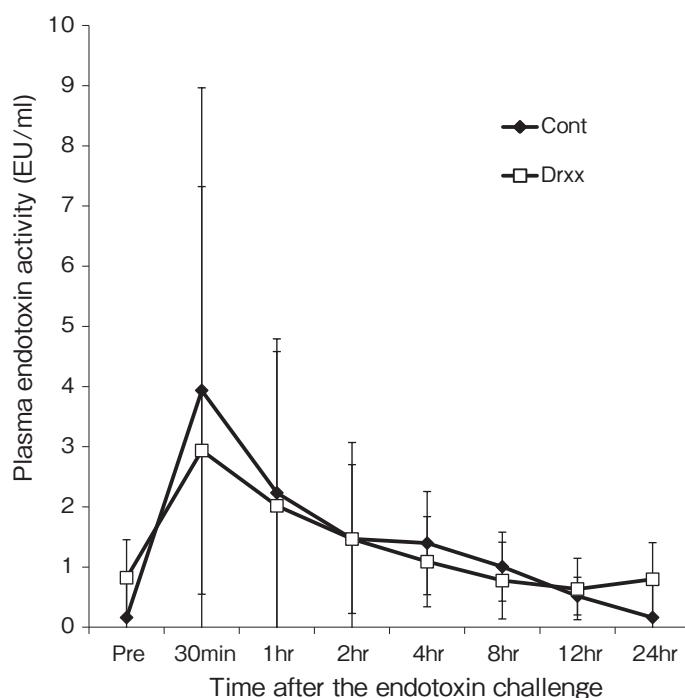


Fig. 1 Graph depicting plasma endotoxin activity in endotoxin challenge models (mean ± SD). There are no significant differences between control group and Draxxin group.

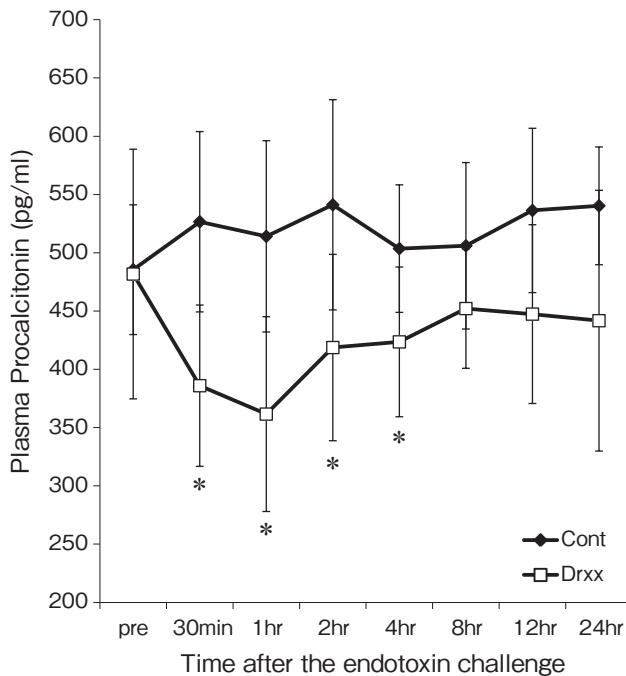


Fig. 2 Graph depicting plasma procalcitonin concentration in endotoxin challenge models (mean \pm SD). In Drxx : Draxxin group, plasma procalcitonin concentration decreased after endotoxin challenge. * : $p < 0.05$ vs pre by Dunnet.

同様にBALF中エンドトキシン活性値は両群の差は認められなかった。

血漿中プロカルシトニン濃度の経時的变化をFig. 2に示した。対照群およびドラクシン群の血漿中プロカルシトニン濃度はpreにおいてそれぞれ 485.5 ± 55.7 および 437.5 ± 107.1 pg/mlであった。対照群の血漿中プロカルシトニン濃度はエンドトキシンチャレンジによりチャレンジ直後から試験終了までやや高値を維持したが、ツラスロマイシン処置をした子牛では対照群のそれよりも有意に低値を推移した。またドラクシン群においてチャレンジ後30分および1時間でチャレンジ前と比較して低値を示し、チャレンジ後1時間で最低値を示した。

エンドトキシンチャレンジモデルにおいて、血漿中エンドトキシン活性値ではツラスロマイシン処置の有無による差は認められなかつたが、ツラ

スロマイシンを処置した子牛では無処置子牛と比較して血漿中プロカルシトニン濃度の上昇が認められなかつた。血漿中エンドトキシン活性値と炎症の程度の関係は相関があることが知られているが、ドラクシン群でも対照群と同様の炎症が惹起されているにも関わらず血漿中プロカルシトニン濃度の推移が低値であったことは興味深い。これはツラスロマイシンを処置することによりエンドトキシン由来であるIL-8などの炎症メディエーターの活性抑制などのマクロライド系抗生物質の新作用によると思われる。それゆえに、マクロライド系抗生物質であるツラスロマイシンの抗炎症作用は、エンドトキシンの暴露をうけても血漿中エンドトキシン活性値の上昇を抑制するのではなく、なんらかの機序でエンドトキシンカスケードに作用して炎症を緩和すると考えられた。その結果、炎症性物質であるプロカルシトニンの分泌が

抑制するために無処置群と比較して血漿中プロカルシトニン濃度が低値を推移したと推察できる。

ヒト医療ではすでに血中プロカルシトニン濃度を用いて細菌性肺炎とマイコプラズマ性肺炎の鑑別に用いられており、牛医療においても炎症性疾患の鑑別診断の補助ツールとしてその応用が期待されている。本研究では、エンドトキシンチャレンジモデル牛における炎症の程度が血漿中プロカルシトニン値を指標に把握できることから、血漿中プロカルシトニン値はその個体の炎症の程度を知る良好なツールとなりうることが明らかになった。

今後は臨床現場での応用に向け、肺エコー検査による細菌性肺炎とマイコプラズマ性肺炎の鑑別法と組み合わせることで血中プロカルシトニンによる鑑別能を検証するとともに、抗生物質の使用必要性を判断するためのカットオフ値の設定、より簡便な測定システムの構築を進める。

4. 要 約

ヒト医療において血中プロカルシトニンは抗生物質の投与の必要性を判断する炎症マーカーとして利用されている。生産動物医療においても食の

安全という観点から、抗生物質の適正使用は重要な課題であり、抗生物質投与の必要性を判断する指標としての迅速な血中プロカルシトニン濃度測定法の確立が望まれる。一方で、肉牛の生産現場でも利用されているマクロライド系抗生物質は静菌作用に加えて新作用としてサイトカインの遊離抑制などの抗炎症作用をもつことが知られている。本研究ではエンドトキシンチャレンジモデルを用いて、牛用15員環マクロライドであるツラスロマイシンの抗炎症作用と、炎症の指標としての血中および肺胞洗浄液（BALF）中エンドトキシン活性値と血中プロカルシトニン濃度の関係について検討した。その結果、血漿中およびBALF中エンドトキシン活性値は対照群およびツラスロマイシン処置群において差は認められなかった。血漿中プロカルシトニン濃度はエンドトキシンチャレンジ後に対照群では高値を維持したのに対し、ツラスロマイシン処置群ではチャレンジ前よりも低下した。エンドトキシンチャレンジモデル牛における炎症の程度が血漿中プロカルシトニン値を指標に把握できることから、血漿中プロカルシトニン値はその個体の炎症の程度を知る良好なツールとなりうることが明らかになった。

鼻咽腔におけるPRRSおよび豚インフルエンザウイルス感染症の病態解析

Pathological analysis of PRRS and swine influenza virus infection in the nasopharynx

平井 卓哉
(宮崎大学農学部)

Takuya Hirai
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The objectives of the present study were to evaluate the nasopharyngeal lesion by PRRS and SI infections in pigs. Totally 135 nasal swabs and 60 nasopharynx samples including nasal-associated lymphoid tissue (NALT) were collected from several pig farms in the Miyazaki prefecture, Japan. Nested RT-PCR was used for detection of PRRS and SI viruses in nasal swabs. Nasopharynx samples were examined by histopathology and *in situ* hybridization. Thirty-four out of 135 nasal swab samples (25%) were positive for PRRS virus by nested RT-PCR. In contrast, 24 (18%) samples were positive for SI virus. Various degrees of nasopharyngitis were found in 34 (57%) out of 60 samples. In the nasopharyngeal lesion, neutrophils and macrophages infiltration in the nasopharyngeal duct, denatured/exfoliated epithelium, and degeneration and necrosis of crypt epithelium were observed. In the cases with remarkable crypt lesion, numerous neutrophils infiltrated into the dilated lumen. Nasopharyngitis was observed in high frequency (72%) in PRRSV-infected pigs. Nasopharyngitis was also seen in 3 out of 8 SIV-infected pigs. The PRRS nucleic acids were detected in the cytoplasm of cells resembling macrophages in the NALT by *in situ* hybridization. These results confirm previous findings that PRRS and SI viruses are deeply associated with nasopharyngitis. Our findings suggest that the PRRS virus replicates in the macrophages of NALT after nasal infection. The virus may be shed into the nasal discharge. It is also speculated that the virus can reach to the lungs from NALT by viremia and cause interstitial pneumonia.

1. 目的

豚の呼吸器複合感染症は、豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスをはじめ、豚インフルエンザ（SI）ウイルス、豚呼吸器コロナウイルス、豚サーコウイルスなどのウイルスのほか、各種細

菌の重感染により引き起こされる呼吸器病で、全国の推定損失額は年間280億円と報告されている。このため、養豚業界における呼吸器病対策が最も重要な課題となっている。本症はPRRSが主となり、上記の複数の病原体が複雑に関与して肺病変を形成する。PRRSはマクロファージに感染し、

子豚に間質性肺炎を引き起こす。一方、SIウイルスは呼吸器粘膜の上皮細胞に感染して上皮バリアを障害し、他病原体の感染増加に影響すると推測されている。

豚呼吸器病の病理発生機序の理解と予防対策の確立のためには、呼吸器病ウイルスの侵入門戸である上部呼吸粘膜における病原性ウイルスの増殖性や病態を理解することが不可欠である。また、鼻咽腔には鼻咽頭関連リンパ組織（NALT）が存在し、感染初期における生体防御に重要な役割を担っていると考えられる。養豚業界において子豚の呼吸器複合感染症が最重要課題となっているにも関わらず、NALTを含む鼻咽腔の病態解析が進展していないため、今回の研究の着想に至った。本研究では、子豚の呼吸器複合感染症における鼻咽腔病変を明らかにし、呼吸器病の病理発生機序と予防対策の確立の基礎的知見を得ることを目的とする。また、事前調査をもとに、対象とする豚呼吸器病関連ウイルスをPRRSウイルスおよびSIウイルスに絞って行う。

2. 方 法

2.1 ウィルス学的検査

2017年11月～2018年3月にかけて宮崎県県央部の複数の養豚場にて死亡した子豚135頭から鼻腔スワブおよび肺を採取した。綿棒を浸す液として、ペニシリン・ストレプトマイシン（和光純薬）入りの細胞培養培地（MEM培地；和光純薬）を3ml用いた。TRIzol試薬（ThermoFisher）でRNA抽出した後、AccessQuick™ RT-PCR System（プロメガ）を使ってPRRSウイルスのnested RT-PCRを実施した¹⁾。また、SIウイルスについては、プライマー（Po1：5'-ATGGACG AAGAACAAAGG ATTGC-3'），（SI Po2：5'-TC TCAGTTCAAGAGTGC TGGAG-3'）および（SI Pi1：5'-GCCCATAGTCCTGCTTGCCCTGC-

3'），（SI Pi2：5'-AGCAAATCTGAACCTCC TCTAGTG-3'）を用いてnested RT-PCRを実施した。SIウイルス陽性の症例については、肺の10%乳剤を定法により作製し、同様にnested RT-PCRを実施した。また、鼻腔スワブをサンプルとし、発育鶏卵の羊膜腔内接種によりSIウイルスの分離を試みた。

2.2 病理組織学的検査

上記135頭の子豚を剖検し、NALTを含む鼻咽腔および肺の採材が可能であった60頭を病理組織検査材料に供した。その他の症例は、死後変化が高度あるいは凍結のため、採材できなかった。NALTを含む鼻咽腔および肺は、4%パラホルムアルデヒド（PFA）に約48時間固定した後、定法に従ってパラフィン標本を作製し、ヘマトキシリノ・エオジン（HE）染色を行い、鏡検した。NALTにおける鼻咽腔炎の有無は、組織障害の程度および腔内へ浸潤する炎症細胞や変性・剥離上皮の程度をもとに病理組織学的に評価した。また、鼻腔スワブにおいてPRRSウイルス陽性の検体を抽出し、肺のHE染色を作製後、肺病変の病理組織学的評価を行った。また、肺においてSIウイルス陽性の検体について、肺の病理組織学的評価を行った。

2.3 超高感度*in situ* hybridization (ISH) 法によるPRRSウイルス感染細胞の検出

鼻腔スワブにてPRRSウイルス陽性の検体を選別し、NALTを含む鼻咽腔のパラフィン切片を作製した。脱パラフィンした切片は洗浄後、Proteinase K（タカラバイオ）でタンパク分解酵素処理（37°C, 10分）し、4%PFAで室温10分間、後固定した。洗浄後に内因性ペルオキシダーゼの処理を3%過酸化水素水で室温60分間行い、脱水系列を通して、切片を乾燥させた。cRNAプローブは、PRRSウイルスのORF 7領域プライマー²⁾のanti-sense側の5'領域にT7プロモーター領域の

配列を加え、in vitro transcription法にて作製した¹⁾。プローブはハイブリダイゼーション溶液（コスマ・バイオ、東京）と混合して、切片に載せ、50°Cで16~18時間反応させた。洗浄後、RNase処理を行い、HRP標識抗Dig抗体（Dako）と反応させた。洗浄を挟んで、ビオチン化タイラマイド（Dako）、HRP標識ストレプトアビシン（Dako）を反応させ、Liquid DAB（Dako）を用いたDAB反応で反応物を可視化した¹⁾。

3. 結果と考察

3.1 ウィルス学的検査

本研究に供した135例中、鼻腔スワブにてPRRSウイルスに陽性となった検体は34例（25%）、SIウイルスに陽性となった検体は24例（18%）であった。PRRSウイルスおよびSIウイルスの両方に陽性を示した検体は2例であった。SIウイルス陽性となった24検体の肺を用いてSIウイルスのnested RT-PCRを実施した結果、1例の肺が陽性となった。SIウイルス陽性になった4検体の鼻腔スワブを発育鶏卵の羊膜腔内に接種してウイルス分離を試みたが、SIウイルスは分離されなかつた。

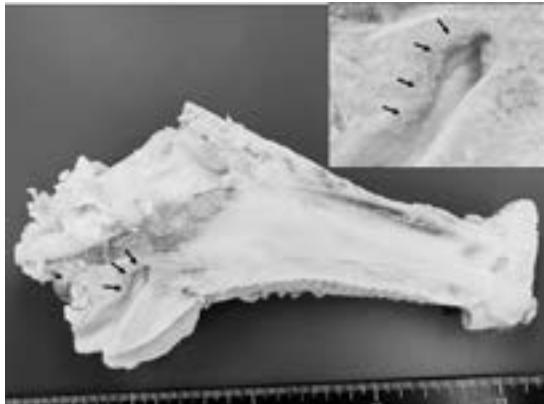


Fig. 1 Note the anatomical location of nasal-associated lymphoid tissue (NALT) in pig (arrows).

3.2 病理学的検査

本研究に供した135例中3例に肉眼的に鼻咽腔病変が認められた。NALTを含む鼻咽腔（Fig. 1）が採材可能であった60例のうち38例（63%）に様々な程度の鼻咽腔炎がみられた。鼻咽腔病変として、腔内の好中球を主とした炎症細胞浸潤および粘液を混じる剥離上皮（Fig. 2），陰窩部の壞死や好中球浸潤が認められた。陰窩病変が顕著な症例では、陰窩が拡張し、腔内に好中球が多数浸潤していた（Fig. 3）。同部の上皮細胞は変性・壞死し、一部に糜爛が形成されていた。鼻咽腔炎38例中3例に重度な炎症像が認められた。

NALTを含む鼻咽腔が採材可能であった60例のうち、鼻腔スワブにてPRRS陽性の症例は18/60例（30%）あり、鼻咽腔炎は13/18例（72%）にみられた。一方、鼻腔スワブにてSI陽性の症例は8/60例（13%）あり、鼻咽腔炎のある症例は3/8例（38%）であった。

鼻腔スワブのnested PCR検査にてPRRS陽性であった34例のうち、7例の肺について病理組織学的検査した結果、全例に肺炎が認められた。7例中5例には、肺胞壁および肺胞腔内にマクロファージが浸潤していた（Fig. 4）。また、立方

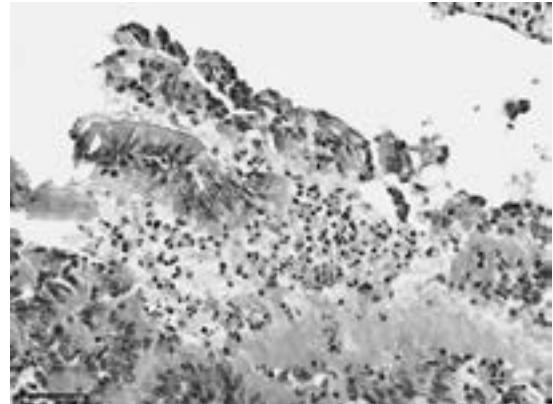


Fig. 2 Note infiltration of neutrophils and macrophages, cell debris and desquamated epithelial cells in the nasopharynx. HE.



Fig. 3 Note infiltration of neutrophils, macrophages, and cell debris in the lumen of the crypt in the NALT. HE.

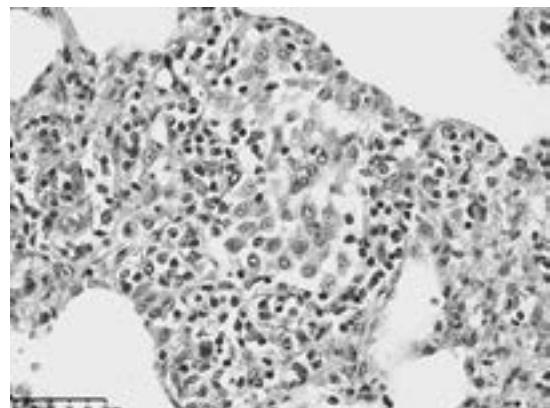


Fig. 4 Note infiltration of macrophages in the alveolar septa. HE.

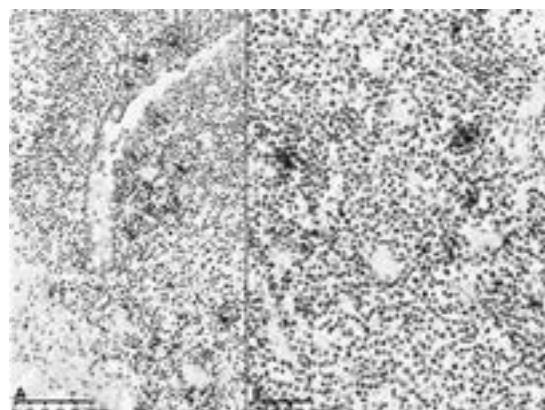


Fig. 5 A : PRRSV nucleic acid was detected in the cytoplasm of the cells resembling macrophages in the NALT. *In situ* hybridization. B ; Higher magnification. *In situ* hybridization.

形のⅡ型肺胞上皮の過形成および炎症細胞浸潤による肺胞中隔の肥厚が認められた。また、nested RT-PCR検査にてSIウイルス陽性の1例の肺について、気管支上皮細胞の変性・剥離と軽度の炎症細胞浸潤、肺胞マクロファージの増生がみられ、気管支間質性肺炎が観察された。

3.3 超高感度ISH法によるPRRSウイルス感染細胞の検出

鼻腔スワップにてPRRS陽性症例の中で、NALTを含めて鼻咽腔を採材できた症例は18例あり、そ

のうち13例（72%）に鼻咽腔炎が認められた。18例のNALTを含めた鼻咽腔標本を用いて超高感度ISH法を実施したところ、4例が陽性になった。陽性シグナルは陰窓周囲のNALTにおいて散在性に検出された (Fig. 5)。陽性細胞は形態学的にマクロファージに類似していた。

死亡した子豚135例中、NALTを含む鼻咽腔が採材可能であった60例を病理組織学的検査した結果、38/60例（63%）に鼻咽腔炎が認められたことより、死亡子豚に上部呼吸器病変が多いことが

明らかになった。また、鼻腔スワブでPRRS陽性を示した症例において、鼻咽腔炎は高率（13/18例：72%）に認められたことより、PRRSウイルスは鼻咽腔炎の一因として考えられた。一方、鼻腔スワブにてSI陽性を示した症例において、鼻咽腔炎は3/8例（36%）であった。これは、SIウイルスの排泄期間が約1週間であり、ウイルス遺伝子の検出できる期間も短いためと考えられた。

cRNAプローブを用いた超高感度ISH法により、PRRS陽性シグナルは陰窩周囲のNALTに存在する細胞が陽性を示し、これらの細胞はマクロファージと考えられた。PRRSの標的細胞はマクロファージであることが知られている。PRRSウイルスは経鼻感染後、鼻咽腔のNALTに存在するマクロファージで増殖することが示された。また、NALTで増殖したウイルスの一部が鼻汁として排泄されること、およびウイルス血症により肺に到達して、間質性肺炎を引き起こすことが推察された。

NALTを含む鼻咽腔が採材可能であった60例のうち、nested RT-PCR検査にてSI陽性の症例は鼻腔スワブで8例、肺で1例であった。今後、SIウイルス検出用のcRNAプローブを作製し、NALTを含む鼻咽腔および肺の標本を用いた超高感度ISH法を実施予定である。本法により、ウイルス感染細胞の分布等を明らかにできると思われる。また、SIウイルスのレセプター分布についても調べる。鼻腔スワブにてSIウイルス陽性の検体は24例であったが、これらのうち4例を用いてウイルス分離を試みたが、陰性であった。残り20例の鼻腔スワブおよび1例の肺乳剤を用いて、SIウイルスの分離を実施する。

4. 要 約

子豚の呼吸器複合感染症における鼻咽腔病変を明らかにするために、2017年11月～2018年3月に

かけて宮崎県県央部の養豚場にて死亡した子豚135例を剖検した。鼻腔スワブを用いて、PRRSウイルスおよびSIウイルスの検出を行い、NALTを含む鼻咽腔を病理組織学的に検査した。135例中、鼻腔スワブのPRRSウイルス陽性検体は34例（25%）、SIウイルス陽性検体は24例（18%）であった。NALTを含む鼻咽腔が採材可能であった60例のうち38例（63%）に様々な程度の鼻咽腔炎がみられた。鼻腔スワブでPRRS陽性を示した症例において、鼻咽腔炎は高率（13/18例：72%）に認められた。一方、鼻腔スワブのSI陽性例において、鼻咽腔炎は3/8例（36%）であった。NALTを含めた鼻咽腔標本を用いて超高感度ISH法を実施したところ、4例がPRRS陽性になった。以上より、死亡子豚に上部呼吸器病変が多く、鼻咽腔炎の一因としてPRRSウイルスやSIウイルスの関与が示唆された。cRNAプローブを用いた超高感度ISH法により、PRRS陽性シグナルは陰窩周囲のNALTに存在する細胞にみられ、これらの細胞はマクロファージと考えられた。PRRSウイルスは経鼻感染後、鼻咽腔のNALTに存在するマクロファージで増殖することが示唆された。NALTで増殖したウイルスの一部が鼻汁として排泄されること、およびウイルス血症により肺に到達して、間質性肺炎を引き起こすことが推察された。

文 献

- Trang, N. T., Hirai, T., Ngan, P. H., Lan, N. T., Fukui, N., Toyama, K., Yamamoto, T., Yamaguchi, R.: Enhanced detection of Porcine reproductive and respiratory syndrome virus in fixed tissues by *in situ* hybridization following tyramide signal amplification, *J Vet Diagn Invest*, May ; 27 (3), 326 ~31, 2015.
- Shin, J. H., Molitor, T. W.: Localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in boars by *in situ* riboprobe hybridization, *J Vet Sci*, Jun ; 3 (2), 87~96, 2002.

感染性A型インフルエンザウイルスの迅速検出系の確立

Establishment of rapid detection system of infectious influenza A viruses

小澤 真

(鹿児島大学共同獣医学部)

Makoto Ozawa

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Infectious influenza A viruses have been confirmed by means of classical virus isolation in embryonated chicken eggs or cultured cells, followed by virological analyses. Since these procedures require a couple of days, rapid detection methods for infectious influenza A viruses are needed. To develop such a detection method, by using self-inactivating retroviral vectors, human-, chicken-, and canine-derived cell lines that stably express recombinant influenza virus-like RNAs encoding the green fluorescent protein (GFP) reporter genes were established. These cell lines expressed GFP upon either transfection with plasmids for the expression influenza viral proteins responsible for viral RNA transcription/replication or infection with the influenza A virus laboratory strain A/WSN/33 (H1N1). The chicken-derived recombinant influenza virus-like RNA-expressing cells exhibited the highest GFP expression level among the established cell lines and specifically expressed GFP upon infection with influenza A viruses of various subtypes within 12 hours after infection. Immunofluorescent assay with anti-influenza viral protein antibody revealed that only approximately 5% of the virus-infected cells indeed expressed GFP. Although further studies, such as cell cloning of the established cell lines, are needed to improve the GFP expression efficiency, our cell lines would be useful to detect infectious influenza A viruses rapidly.

1. 目的

A型インフルエンザウイルスは、ヒトを含む様々な動物種に感染して人獣共通感染症を引き起こす。とりわけ家禽で発生する鳥インフルエンザは、その流行によって甚大な経済的被害をもたらす可能性があるため、ウイルスの種類によって家畜伝染病および届出伝染病に指定され、その迅速かつ正確な検出が求められる。近年、タンパク質

や遺伝子など、ウイルスの構成要素の一部を検出する検査は開発・改良が進んでいるが、感染性を備えた「生きた」ウイルスの証明には、古典的なウイルス分離法が引き続き適応されている。

A型インフルエンザウイルスは、検査検体の発育鶏卵または培養細胞への接種および培養、さらにその漿尿液や培養上清を用いた赤血球凝集試験や遺伝子検査などのウイルス学的な解析を経て分離され、これらの検査作業には2～3日間を要す

る。また、簡易検査あるいは遺伝子検査で陽性と判定された検体であっても、感染性ウイルスが分離されない事例は少なくない。例えば、高病原性鳥インフルエンザウイルスが全国で確認された2016—17年冬季を含め、過去の野鳥検体検査の一部は、あらかじめ実施された簡易検査や遺伝子検査で陽性反応が認められた検体からウイルスが分離されず、最終的に「陰性」と判断されている。ウイルス分離の結果が確定するまでの数日間に、検体が回収された地域の住民や行政関係者は緊張状態の中で様々な対応を迫られるほか、「鳥インフルエンザ陽性」の情報が周辺の諸産業に多大な風評被害を与える。このような課題に対応するため、感染性A型インフルエンザウイルスをより迅速に検出する新たな検査手法の確立が求められている。

本研究では、感染性A型インフルエンザウイルスの迅速検出法を確立することを目的として、レトロウイルスベクターをはじめとする遺伝子組み換え技術を用い、ウイルス感染に応答して短時間でレポーター遺伝子を特異的に発現する培養細胞株の樹立を試みた。

2. 方 法

2.1 細胞とウイルス

ヒト肺胞上皮由来A549細胞および鶏胎児由来DF-1細胞（いずれも東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与）は10%牛胎児血清含有DMEM培地で、犬腎臓由来MDCK細胞（東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与）は5%新生子牛血清含有MEM培地でそれぞれ培養しながら維持した。これらの細胞へウイルスを感染した際には、TPCK処理トリプシン（0.5μg/ml）を添加した0.15%牛血清アルブミン含有MEM培地で培養した。レトロウイルスパッケージング用Plat-GP細胞（コスモ・バイオ社）は、培養細胞

選択薬剤プラスチサイジン（10μg/ml）を添加した10%牛胎児血清含有DMEM培地で培養した。また、プラスミドを導入またはレトロウイルスベクターを感染させた培養細胞の一部は、培養細胞選択薬剤ピューロマイシン（2μg/ml）を添加した培地で培養した。

A型インフルエンザウイルス8株のほか、B型インフルエンザウイルスとニューカッスル病ウイルス各1株（Table 1）を使用した。各ウイルス株を接種した発育鶏卵を2日間培養し、その漿尿液を回収して-80°Cで凍結保存した後、MDCK細胞を用いてplaques assayによりウイルス力価を測定した。

2.2 組換えウイルス遺伝子発現プラスミド

A型インフルエンザウイルス実験室株A/WSN/33 (H1N1) の野生型HA遺伝子（Fig. 1a）の翻訳領域を緑色蛍光タンパク質（GFP）レポーター遺伝子の塩基配列へ置換した組換えウイルス遺伝子HA (0) GFP (0) (Fig. 1a) を発現する、ヒト由来RNAポリメラーゼIプロモーター領域を備えたプラスミドpPolII/HA (0) GFP (0)¹⁾（東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与）をもとに、ウイルス遺伝子の転写・複製効率を上昇させることが報告されているウイルス遺伝子3'末端プロモーター領域の3箇所の点変異²⁾を導入したプロモーター変異（promoter mutation；PM）組換えウイルス遺伝子PM-HA (0) GFP (0) (Fig. 1a) の発現プラスミドpPolII/PM-HA (0) GFP (0) (Fig. 1b) を構築した。RNAポリメラーゼIプロモーター領域は動物種特異性が高く、鶏由来DF-1細胞や犬由来MDCK細胞ではPM-HA (0) GFP (0) の十分な発現が期待できなかつたため、pPolII/PM-HA (0) GFP (0) 上の組換えウイルス遺伝子領域を鶏ならびに犬由来RNAポリメラーゼIプロモーター領域を備える各プラスミド³⁾（いずれも東京大学医科学研究所・河岡義

Table 1 Viruses used in this study.

Virus	Strain	Host
Influenza A virus	A/WSN/33 (H1N1)* (laboratory strain) A/Puerto Rico/8/33 (H1N1)* (laboratory strain) A/California/04/2009 (H1N1)* A/Aichi/75/2008 (H3N2) A/environment/Kagoshima/KU-ngrI/2014 (H6N2)	Human Human Human Human Environmental water
	A/duck/Kagoshima/KU57/2014 (H1N9) A/swine/Japan/KU-HY5/2013 (H1N1) A/canine/Korea/DJ-cd1/2009 (H3N2)**	Duck Pig Dog
Influenza B virus	B/Lee/1940* (laboratory strain)	Human
Newcastle disease virus	B1*** (vaccine strain)	Chicken

*These viruses were kindly provided by Dr. Yoshihiro Kawaoka, University of Tokyo.

**This virus was kindly provided by Dr. Young Ki Choi, Chungbuk National University, South Korea.

***This virus was kindly provided by Dr. Kozo Takase, Kagoshima University.

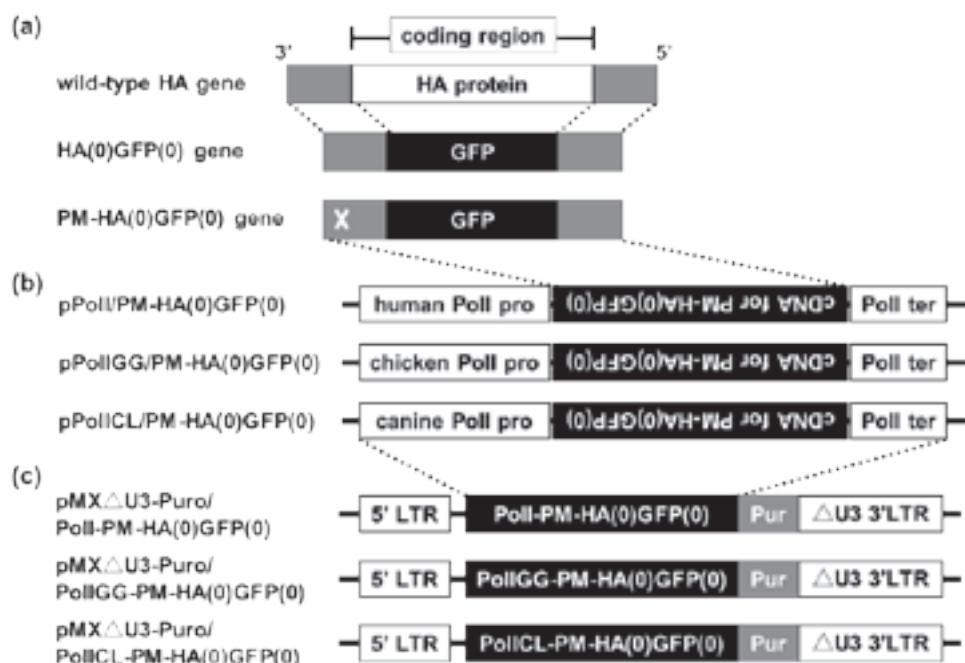


Fig. 1 Schematic diagrams of recombinant influenza virus-like RNAs(a) and plasmids constructed in this study(b, c).(a)

The coding region for the HA protein in wild-type HA gene is replaced by the open reading frame of green fluorescent protein (GFP) in both HA (0) GFP (0) and PM-HA (0) GFP (0) genes. X in PM-HA (0) GFP (0) gene indicates three nucleotide mutations that were demonstrated to enhance the viral RNA promoter activity² introduced in the 3' noncoding ends. (b) pPolII/, pPolIGG/, and pPolICL/PM-HA (0) GFP (0) encode the cDNAs for PM-HA (0) GFP (0) genes under the control of human, chicken, and canine RNA polymerase I promoters (PolI pro), respectively. PolI ter, mouse RNA polymerase I terminator. (c) pMX△U3-Puro/PolI-, pMX△U3-Puro/PolIGG-, and pMX△U3-Puro/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) encode cDNAs for mouse leukemia virus-derived self-inactivating for the expression of PM-HA (0) GFP (0) genes under the control of human, chicken, and canine RNA polymerase I promoters, respectively. 5'LTR, MLV 5' long terminal repeat ; Pur, transcription unit for Puromycin resistance gene ; △U3 3'LTR, MLV U3 region-deleted 3' long terminal repeat.

裕教授より分与) ヘクローニングし、鶏および犬由来培養細胞内で組換えウイルス遺伝子を発現するプラスミド pPolIGG/PM-HA (0) GFP (0) やび pPolICL/PM-HA (0) GFP (0) (Fig. 1b) を構築した。

続いて、pPolI/PM-HA (0) GFP (0), pPolIGG/PM-HA (0) GFP (0) やび pPolICL/PM-HA (0) GFP (0) 上の各動物種由来 RNAポリメラーゼ I プロモーター—組換えウイルス遺伝子—RNAポリメラーゼ I ターミネーター (動物種特異性が低いターミネーター領域は全プラスミドに共通してマウス由来) に至る遺伝子領域を、マウス白血病ウイルス由来自己不活型レトロウイルスベクターパッケージングプラスミド pMX△U3⁴⁾ にピューロマイシン耐性遺伝子発現ユニットを付加した pMX△U3-Puro (東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与) ヘクローニングして、pMX△U3-Puro/PolI-PM-HA (0) GFP (0), pMX△U3-Puro/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0), やび pMX△U3-Puro/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) (Fig. 1c) を構築した。

A/WSN/33 (H1N1) のPB2, PB1, PA, やび NPタンパク質の各発現プラスミド pCAGGS/PB2, pCAGGS/PB1, pCAGGS/PA, やび pCAGGS/NP⁵⁾ は、東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与された。

2.3 レトロウイルスベクター

構築したレトロウイルスベクターパッケージングプラスミド pMX△U3-Puro/PolI-PM-HA (0) GFP (0), pMX△U3-Puro/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0), あるいは pMX△U3-Puro/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) を、水疱性口内炎ウイルス G タンパク質発現プラスミド pCAGGS/VSV-G (東京大学医科学研究所・河岡義裕教授より分与) とともに Plat-GP 細胞へ導入して 2 日間培養し、各組換えウイルス遺伝子発現レトロウイルスベク

ターー RV/PolI-PM-HA (0) GFP (0), RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0), やび RV/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) を作出了。

2.4 プラスミドの導入およびレトロウイルスベクターの感染

構築した組換えウイルス遺伝子発現プラスミドをはじめ、すべてのプラスミドは Lipofectamine3000 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いて各種培養細胞へ導入した。また組換えウイルス遺伝子発現レトロウイルスベクターは ViraDuctin レトロウイルス導入キット (コスマ・バイオ社) を用いて培養細胞へ感染させた。

2.5 免疫蛍光染色法によるウイルス感染細胞の検出

ウイルス感染細胞をリン酸緩衝生理食塩水で洗浄後、Mildform 10N (和光純薬社) により固定し、0.2% トリトン X-100 (ナカライテスク社) やび 1% 牛血清アルブミン含有リン酸緩衝生理食塩水で処理した。続いて抗 A 型インフルエンザウイルス NP タンパク質マウス単クローナル抗体クローン 9 G 8 (アズカム社) やび DyLight 594 標識馬由来抗マウス IgG 抗体 (Vector Laboratory 社) を反応させて、蛍光顕微鏡下で細胞を観察した。

3. 結果と考察

3.1 プラスミドからの組換えウイルス遺伝子発現の確認

構築した各プラスミドが、RNAポリメラーゼ I プロモーター領域に対応する 3 種の動物種 (ヒト、鶏、やび犬) 由来の培養細胞内において組換えウイルス遺伝子 HA (0) GFP (0) あるいは PM-HA (0) GFP (0) を発現することを確認するため、pPolI/HA (0) GFP (0), pPolI/PM-HA (0) GFP (0), やび pMX△U3-Puro/PolI-PM-HA (0) GFP (0) を A 549 細胞へ、pPolIGG/PM-HA (0) GFP (0) やび pMX△

U3-Puro/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) を DF-1 細胞へ、 pPolICL/PM-HA (0) GFP (0) および pMX \triangle U3-Puro/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) を MDCK 細胞へ、 それぞれ単独またはウイルス遺伝子の転写・複製を担う 4 種類のウイルスタンパク質 PB2, PB1, PA, および NP の各発現プラスミドとともに導入して、 2 日間培養後の GFP 発現を検証した。いずれの組換えウイルス遺伝子発現プラスミドも、 4 種類のウイルスタンパク質発現プラスミドとともに導入した細胞でのみ、 GFP を発現した。これらの結果は、 構築した各プラスミドが、 プラスミド上の RNA ポリメラーゼ I プロモーター領域に対応する動物種由来の培養細胞内において、 組換えウイルス遺伝子を発現したことを示す。

さらに、 各組換えウイルス遺伝子発現プラスミドを単独で導入した培養細胞へ、 A/WSN/33 (H1N1) を感染多度 (Multiplicity of Infection ; MOI) = 0.1 で感染させたところ、 pPolII/HA (0) GFP (0) を除くすべてのプラスミド導入・ウイルス感染細胞において、 感染後 12 時間以内に GFP の発現が見られた。これらの結果は、 既報²⁾ のとおりウイルス遺伝子 3' 末端のプロモーター領域に 3箇所の点変異を導入されたウイルス遺伝子が、 野生型ウイルス遺伝子と比べて高い転写・複製効率を備えることを示す。

3.2 レトロウイルスベクターからの組換えウイルス遺伝子発現の確認

作出した各レトロウイルスベクターが、 培養細胞内において組換えウイルス遺伝子 PM-HA (0) GFP (0) を発現することを確認するため、 RV/PolII-PM-HA (0) GFP (0), RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0), および RV/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) を、 A 549 細胞、 DF-1 細胞、 および MDCK 細胞へ、 それぞれ感染させた。各感染細胞を 2 日間培養して、 いずれの細胞でも GFP の発

現が見られないことを確認したうえで、 A/WSN/33 (H1N1) 由来の PB2, PB1, PA, および NP タンパク質の各発現プラスミドを導入し、 さらに 2 日間培養後の GFP 発現を検証した。いずれのレトロウイルスベクター感染・プラスミド導入細胞においても GFP の発現が見られた。これらの結果は、 作出した各レトロウイルスベクターが、 レトロウイルスベクター内の RNA ポリメラーゼ I プロモーターに対応する動物種由来の培養細胞内において、 組換えウイルス遺伝子を発現したことを見た。

3.3 組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株の樹立

RV/PolII-PM-HA (0) GFP (0) を感染させた A 549 細胞、 RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) を感染させた DF-1 細胞、 および RV/PolICL-PM-HA (0) GFP (0) を感染させた MDCK 細胞を、 それぞれピューロマイシン (2 μ g/ml) を添加した培地で培養し、 ピューロマイシン耐性細胞株を樹立した。樹立したピューロマイシン耐性細胞株における組換えウイルス遺伝子 PM-HA (0) GFP (0) の発現を確認するため、 いずれの細胞でも GFP の発現が見られないことを確認したうえで、 A/WSN/33 (H1N1) 由来の PB2, PB1, PA, および NP タンパク質の各発現プラスミドを導入して、 2 日間培養後の GFP 発現を検証した。すべての細胞株において GFP の発現が見られたが、 特に RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染 DF-1 細胞における GFP 発現が明瞭だった。さらに、 各ピューロマイシン耐性細胞株へ A/WSN/33 (H1N1) を MOI = 0.1 で感染させたところ、 すべての細胞株において感染 12 時間以内に GFP の発現が見られたが、 特に RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染 DF-1 細胞における GFP 発現が明瞭だった。これらの結果は、 3 種の動物種に由来する培養細胞をベースとして組換えウイ

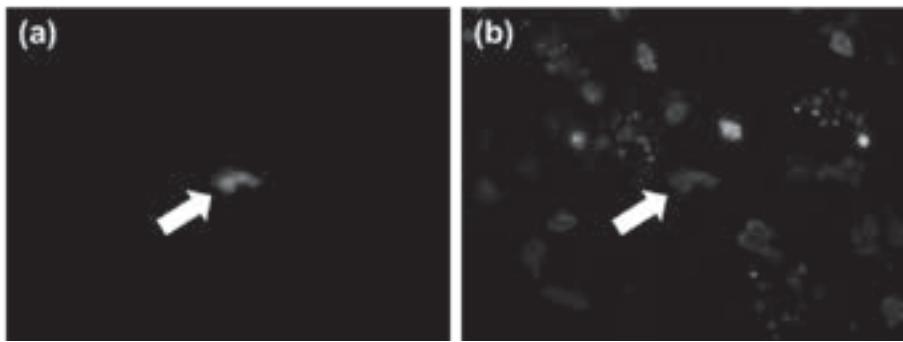


Fig. 2 GFP expression in recombinant influenza virus-like RNA-expressing cells upon virus infection. RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0)-transduced Puromycin-resistant DF-1 cells were infected with A/WSN/33 (H1N1) (MOI=0.1) and stained with anti-influenza A viral NP monoclonal antibody at 12 hour post-infection. The stained cells were observed under fluorescent microscopy for detection of green (a, indicating the GFP expression) and red (b, indicating the influenza A viral NP expression) signals. The white arrows indicate the identical cells in each figure.

ルス遺伝子安定発現細胞株が樹立されたこと、中でも鶏由来DF-1細胞をベースとした細胞株が感染性A型インフルエンザウイルスの迅速な検出に最も有用なことを示す。

3.4 感染性A型インフルエンザウイルス検出の特異性および感度の検証

組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株を用いた感染性A型インフルエンザウイルス検出の特異性を検証するため、RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染ピューロマイシン耐性DF-1細胞株へ、宿主や亜型の異なるA型インフルエンザウイルス8株、B型インフルエンザウイルスとニューカッスル病ウイルス各1株（Table 1）をそれぞれMOI = 0.1で感染させ、GFP発現を検証した。A型インフルエンザウイルス8株すべてで、感染後12時間以内にGFPの発現が見られた一方、B型インフルエンザウイルスまたはニューカッスル病ウイルスを感染させた細胞ではGFPの発現が見られなかった。これらの結果は、樹立したRV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染ピューロマイシン耐性DF-1細胞株において、A型インフルエンザウイルス感染特異的にGFPを発現したことを示す。

組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株を用いた

感染性A型インフルエンザウイルス検出の感度を検証するため、RV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染ピューロマイシン耐性DF-1細胞株へA/WSN/33 (H1N1) を MOI = 0.1で感染させて12時間培養した後、ウイルス感染細胞を免疫蛍光染色法により検出した。ウイルス感染陽性細胞のうち約5%においてのみ、GFPの発現が見られた（Fig. 2）。これらの結果は、樹立したRV/PolIGG-PM-HA (0) GFP (0) 感染ピューロマイシン耐性DF-1細胞のうち、A型インフルエンザウイルスの感染に応答してGFPを発現する細胞は限定的であることを示す。

今後、樹立した組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株のクローニングなど、GFP発現効率の改善へ向けた取り組みが必要なもの、これらの細胞株は感染性A型インフルエンザウイルスの迅速な検出に有用となる。

4. 要 約

感染性A型インフルエンザウイルスの速検出法を確立するため、ヒト、鶏、犬由来の各培養細胞をベースに、緑色蛍光タンパク質（GFP）レポーター遺伝子をコードした組換えウイルス遺伝子を

安定的に発現する細胞株を、それぞれレトロウイルスベクターを用いて樹立した。これらの細胞株は、ウイルス遺伝子の転写・複製を担うウイルスタンパク質の各発現プラスミドの導入、ならびにA型インフルエンザウイルス実験室株A/WSN/33 (H1N1) の感染に応答して、GFPを発現した。樹立した細胞株の中でも最もGFP発現が明瞭だった鶏由来の組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株は、多様な亜型のA型インフルエンザウイルスの感染に応答して、感染後12時間以内にGFPを発現した一方で、B型インフルエンザウイルスまたはニューカッスル病ウイルスを感染させた場合にはGFPを発現しなかった。抗ウイルスタンパク質抗体を用いた免疫蛍光染色法により、A型インフルエンザウイルスを感染させた鶏由来組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株の中で、実際にGFPを発現した細胞は約5%のみであった。今後、樹立した組換えウイルス遺伝子安定発現細胞株のクローニングなど、GFP発現効率の改善へ向けた取り組みが必要なもの、これらの細胞株は感染性A型インフルエンザウイルスの迅速な検出

に有用となる。

文 献

- 1) Watanabe, T., Watanabe, S., Noda, T., Fujii, Y., Kawaoka, Y. : Exploitation of nucleic acid packaging signals to generate a novel influenza virus-based vector stably expressing two foreign genes, *J Virol.*, **77**, 10575~10583, 2003.
- 2) Neumann G., Hobom G. : Mutational analysis of influenza virus promoter elements in vivo, *J Gen Virol.*, **76** (Pt7), 1709~1717, 1995.
- 3) Murakami, S., Horimoto, T., Yamada, S., Kakugawa, S., Goto, H., Kawaoka, Y. : Establishment of canine RNA polymerase I-driven reverse genetics for influenza A virus: its application for H5N1 vaccine production, *J Virol.*, **82**, 1605~1609, 2008.
- 4) Ozawa, M., Shimojima, M., Goto, H., Watanabe, S., Hatta, Y., Kiso, M., Furuta, Y., Horimoto, T., Peters, N. R., Hoffmann, F. M., Kawaoka, Y. : A cell-based screening system for influenza A viral RNA transcription/replication inhibitors, *Sci Rep.*, **3**, 1106, 2013.
- 5) Neumann, G., Watanabe, T., Ito, H., Watanabe, S., Goto, H., Gao, P., Hughes, M., Perez, D. R., Donis, R., Hoffmann, E., Hobom, G., Kawaoka, Y. : Generation of influenza A viruses entirely from cloned cDNAs, *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 9345~9350, 1999.

肉用牛生産におけるアシドーシス予防をめざした ルーメン内乳酸代謝性細菌群の特定

Profiling of lactic acid metabolizing bacterial group in the rumen to prevent from rumen acidosis in beef cattle production

福間直希
(帯広畜産大学)

Naoki Fukuma
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Feeding high grain diet to cattle can lead to an accumulation of lactate and reduced buffering capacity in the rumen, known as ruminal acidosis. To minimize the effect of ruminal acidosis, maintaining the activity of bacterial community scavenging lactate is important. However, only small number of cultivated species have been reported as lactate utilizers, such as *Megasphaera elsdenii*, *Selenomonas ruminantium*, *Coprococcus catus*, *Veillonella parvula*, and *Anaerovibrio lipolyticus*. In the present study, lactate-metabolizing bacterial community was enriched by *in vitro* anaerobic culturing, and community structure was analyzed using Next Generation Sequencing. For the DNA Amplicon-seq, partial bacterial 16S rRNA genes (the V3-V4 region) were amplified and sequenced using the Illumina MiSeq platform. The raw 16S rRNA gene sequence data were analyzed by QIIME version 1.9.1. The MiSeq provided 206,361 sequences per sample, which was considered as enough quantity for microbial community analysis. Results showed that some OTUs belonging to genus *Selenomonas* and *Lactobacillus* were detected in the enriched culture. According to BLAST analysis, OTUs related to *S. ruminantium*, a variety of *Lactobacillus* species, *Pediococcus pentosaceus*, and *Allisonella histaminiformans* were indicated as lactate-metabolizing bacteria. These findings suggest that minor bacterial species in the normal rumen are responsible for lactate metabolism.

1. 目的

近年、肉用牛生産の効率化および肉質の高品質化を図るために濃厚飼料を増給した家畜生産が行われており、その際にアシドーシスを発症させることがある。アシドーシスは第一胃（ルーメン）内発酵の停滞および牛個体の採食量の低下を招き、鼓脹症、第一胃炎、肝臓病、蹄葉炎などが誘

引される。これら代謝性疾患による死廃事故は牛死廃用頭数の約20%を占めると報告されている¹⁾。よって、肉用牛生産においてアシドーシスを予防することは経済的損失を防ぐためにきわめて重要な課題といえる。

アシドーシスの発症にはルーメン内の乳酸が大きく関与している。濃厚飼料に含まれるデンプンは、ルーメン内でデンプン分解菌により急速な分

解・発酵を受け、最終発酵産物として乳酸が產生される。乳酸が過剰蓄積されると、ルーメン内pHが低下する。これにより大部分のルーメン細菌が死滅し、発酵の停滞や採食量の低下を招く。したがって、乳酸の蓄積はアシドーシスの主要因であり、濃厚飼料増給下で乳酸の蓄積を解除することがアシドーシス予防の鍵を握る。本研究課題では、ルーメン内で乳酸を代謝しうる細菌群を網羅的に特定することを目的とした。

2. 方 法

供試動物として、帯広畜産大学の畜産フィールド科学センター内で飼養されているカニューレ装着済みのホルスタイン牛を用いた。牛個体ごとの菌叢の差異を評価するため、4頭の牛（個体番号 #298, #382, #663, #665）を使用した。ルーメン内容物をカニューレから採取した後にガーゼで濾過し、得られたルーメン液をイノキュラムとして以下の試験に用いた。

牛ルーメン内の乳酸代謝性細菌群を選抜するため、乳酸を唯一の炭素源とする培地²⁾で集積培養を行った。培地20mlにルーメン液を0.1ml接種し、39℃で48時間の*in vitro*集積培養を行った。培地作製から培養終了まではすべて嫌気条件下で行った。採取したルーメン液および集積培養物から遠心分離により菌体を回収した。菌体からRBB+C法³⁾に従い、微生物由来DNAの抽出・精製を行った。

精製したDNAの16S rRNA遺伝子をPCR增幅し、MiSeqを用いてV3-V4領域の配列を解読した。得られた配列データを元に解析を行い、各配列の属レベルおよびOperational Taxonomic Unit (OTU) レベルでの系統分類を特定した。イノキュラムの菌叢と集積培養物の菌叢を比較し、集積培養により存在量が増加した属およびOTUを乳酸代謝性細菌として特定した。分類群の詳細を把握するために、各OTUの代表配列をBLAST解析し、最近縁の細菌種との相同意を評価した。

3. 結果と考察

次世代シーケンサーによる取得塩基配列数をTable 1に示す。本試験で供試した8サンプルからは、最も少ないもので93,837配列、平均で206,361配列を取得した。取得した配列の約93%が菌叢解析に必要なクオリティーを満たしていた。次世代シーケンスによる菌叢解析では数万配列程度の解析深度があれば環境中の細菌種を検出可能であるという報告があり⁴⁾、今回解析に用いた配列数は十分であると考えられた。

細菌叢の群集構造解析の結果をTable 2に示す。集積培養前のルーメン液内の菌叢は他の多くの報告⁵⁾にあるとおり *Firmicutes* (41.68%) および *Bacteroidetes* (42.28%) が優占的な分類門として検出された。属レベルの分類群としては *Prevotella*が最優占 (34.09%) であった。これら

Table 1 Number of sequences obtained and analysed in this study

Samples	Rumen Fluid				Lactate Enrichment				Mean	S.D.
	#298	#382	#663	#665	#298	#382	#663	#665		
Total Reads	255,273	277,380	279,673	93,837	263,982	204,935	153,884	121,924	206,361	74,333
Reads Passing Quality Filtering	235,755	255,075	258,548	86,507	247,853	190,542	144,385	114,220	191,611	68,544
%Reads Passing Quality Filtering	92.4%	92.0%	92.4%	92.2%	93.9%	93.0%	93.8%	93.7%	92.9%	

Table 2 Distribution of taxa detected in the rumen fluid and lactic-acid enrichment culture

Taxonomy	Rumen Fluid					Lactate Enrichment				
	#298	#382	#663	#665	Mean	#298	#382	#663	#665	Mean
phylum Firmicutes	45.44%	34.01%	37.47%	49.80%	41.68%	98.00%	96.13%	98.18%	98.21%	97.63%
unclassified family Lactobacillaceae	0.02%	0.02%	0.02%	0.00%	0.02%	3.47%	11.29%	5.83%	6.29%	6.72%
genus <i>Lactobacillus</i>	0.01%	0.01%	0.02%	0.02%	0.01%	7.05%	24.78%	12.54%	26.27%	17.66%
genus <i>Pediococcus</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.40%	0.04%	0.32%	0.22%	0.50%
genus <i>Streptococcus</i>	0.36%	0.72%	0.27%	0.78%	0.53%	0.01%	0.03%	0.00%	0.04%	0.02%
order Clostridiales	11.62%	6.89%	7.00%	11.15%	9.17%	0.31%	0.81%	0.16%	0.34%	0.40%
unclassified family Clostridiaceae	0.51%	0.36%	0.42%	0.90%	0.55%	0.01%	0.02%	0.01%	0.01%	0.01%
genus <i>Clostridium</i>	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	1.95%	0.49%
unclassified family Lachnospiraceae	4.87%	2.85%	4.63%	3.86%	4.05%	0.10%	0.26%	0.13%	0.12%	0.15%
genus <i>Butyrivibrio</i>	5.95%	4.18%	6.66%	9.67%	6.61%	0.08%	0.38%	0.14%	0.19%	0.20%
genus <i>Pseudobutyryvibrio</i>	3.47%	2.66%	2.20%	1.84%	2.54%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
genus <i>Shuttleworthia</i>	0.58%	1.05%	0.31%	0.25%	0.55%	0.02%	0.02%	0.00%	0.01%	0.01%
unclassified family Ruminococcaceae	6.38%	5.19%	5.30%	8.74%	6.40%	0.15%	0.77%	0.15%	0.28%	0.34%
genus <i>Ruminococcus</i>	4.16%	1.13%	4.29%	5.32%	3.73%	0.14%	0.12%	0.09%	0.19%	0.14%
unclassified family Veillonellaceae	0.93%	1.10%	0.64%	1.35%	1.00%	0.01%	0.03%	0.01%	0.02%	0.02%
genus <i>Selenomonas</i>	1.52%	3.97%	1.05%	0.79%	1.83%	85.16%	57.35%	78.72%	62.18%	70.85%
genus <i>Succinivibrio</i>	5.06%	3.89%	4.66%	5.13%	4.69%	0.10%	0.22%	0.09%	0.11%	0.13%
phylum Bacteroidetes	38.28%	46.26%	49.28%	35.32%	42.28%	1.66%	3.47%	1.59%	1.50%	2.05%
order Bacteroidales	2.07%	3.40%	1.36%	2.98%	2.45%	0.12%	0.42%	0.08%	0.19%	0.20%
unclassified family Paraprevotellaceae	0.36%	0.53%	0.78%	0.23%	0.48%	0.02%	0.04%	0.02%	0.01%	0.02%
genus CF231	0.29%	0.87%	0.35%	0.50%	0.51%	0.00%	0.05%	0.00%	0.00%	0.01%
genus YRC22	1.36%	1.64%	2.99%	1.98%	1.99%	0.05%	0.07%	0.09%	0.06%	0.07%
genus <i>Prevotella</i>	31.62%	37.12%	40.67%	26.98%	34.09%	1.35%	2.43%	1.29%	1.11%	1.54%
unclassified family RF16	2.58%	2.69%	3.13%	2.65%	2.76%	0.11%	0.46%	0.11%	0.13%	0.20%
phylum Fibrobacteres	5.11%	10.29%	4.17%	5.58%	6.29%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
genus <i>Fibrobacter</i>	5.11%	10.29%	4.17%	5.58%	6.29%	0.00%	0.01%	0.00%	0.00%	0.00%
phylum Actinobacteria	3.93%	0.53%	2.72%	1.01%	2.05%	0.11%	0.07%	0.11%	0.03%	0.08%
unclassified family Coriobacteriaceae	3.93%	0.53%	2.72%	1.01%	2.05%	0.11%	0.07%	0.11%	0.03%	0.08%
phylum Verrucomicrobia	1.87%	2.56%	0.81%	1.72%	1.74%	0.04%	0.04%	0.01%	0.04%	0.03%
unclassified family RFP12	1.87%	2.56%	0.81%	1.72%	1.74%	0.04%	0.04%	0.01%	0.04%	0.03%
phylum Tenericutes	0.59%	1.41%	1.60%	1.00%	1.15%	0.01%	0.05%	0.02%	0.02%	0.03%
genus <i>Anaeroplasma</i>	0.59%	1.41%	1.60%	1.00%	1.15%	0.01%	0.05%	0.02%	0.02%	0.03%
phylum Lentisphaerae	0.98%	1.34%	0.70%	1.06%	1.02%	0.04%	0.08%	0.02%	0.04%	0.05%
unclassified family Victivallaceae	0.98%	1.34%	0.70%	1.06%	1.02%	0.04%	0.08%	0.02%	0.04%	0.05%
phylum Proteobacteria	0.50%	1.10%	0.55%	1.13%	0.82%	0.01%	0.03%	0.01%	0.04%	0.02%
genus <i>Succinivibrio</i>	0.50%	1.10%	0.55%	1.13%	0.82%	0.01%	0.03%	0.01%	0.04%	0.02%
phylum Euryarchaeota	0.89%	0.29%	0.84%	0.75%	0.69%	0.03%	0.09%	0.03%	0.04%	0.05%
genus <i>Methanobrevibacter</i>	0.89%	0.29%	0.84%	0.75%	0.69%	0.03%	0.09%	0.03%	0.04%	0.05%
phylum SR1	0.36%	0.50%	0.72%	1.13%	0.68%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
unclassified SR1	0.36%	0.50%	0.72%	1.13%	0.68%	0.00%	0.00%	0.00%	0.01%	0.00%
phylum Spirochaetes	0.33%	1.24%	0.50%	0.37%	0.61%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
genus <i>Treponema</i>	0.33%	1.24%	0.50%	0.37%	0.61%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
phylum TM7	0.88%	0.20%	0.48%	0.61%	0.54%	0.04%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%
unclassified family F16	0.88%	0.20%	0.48%	0.61%	0.54%	0.04%	0.02%	0.02%	0.03%	0.03%
phylum Planctomycetes	0.85%	0.27%	0.16%	0.52%	0.45%	0.04%	0.02%	0.01%	0.03%	0.02%
unclassified family Pirellulaceae	0.85%	0.27%	0.16%	0.52%	0.45%	0.04%	0.02%	0.01%	0.03%	0.02%

の傾向は本試験で用いた4個体を通じて確認された。一方で、乳酸培地で集積培養後の細菌叢は大部分を**Firmicutes**が占め(97.63%)、**Bacteroidetes**や**Fibrobacteres**をはじめとする他の分類門はルーメン液内と比較して存在量が減少した。**Firmicutes**の中では**Selenomonas**(70.85%)と**Lactobacillus**(17.66%)および未分類の**Lactobacillaceae**(6.72%)が優先的な分類群であった。ルーメン内の乳酸利用菌として知られる**Megasphaera**, **Coprococcus**, **Veillonella**および**Anaerovibrio**は本試験で用いたルーメン液からは検出されなかった。

乳酸培地による集積培養により、16のOTUレベルでのグループがルーメン液中の存在量よりも高密度で検出された。これらOTUの同定を行うため、各OTUの配列情報を取得しBLAST解析を行った(Table 3)。最優勢であった2つのOTUは**Selenomonas**属の細菌種**S. ruminantium** subsp. *lactilytica* TAM6421および**S. ruminantium** strain

LongY 6に近縁であり、それぞれ44.45%および26.05%を占めていた。本研究で集積された16のOTUのうち12のOTUが**Lactobacillus**属細菌に近縁であった(*L. plantarum*, *L. mucosae*, *L. panis*, *L. oris*, *L. brevis*, *L. secaliphilus*, *L. paracasei*, *L. pentosus*, *L. rapi*)。このことから、ルーメン内**Lactobacillus**属細菌の多様な種が乳酸利用能を保有していることが示された。また、その他の2つのOTUは、*Pediococcus pentosaceus*および*Allisonella histaminiformans*と99%以上の相同意を示したことから、これらの細菌種がルーメン内の乳酸代謝に貢献している可能性も示唆された。これら以外のOTUは通常のルーメン内の存在量は0.1%未満であることから、ルーメン内ではマイナーな細菌種により、他菌種によって産生された乳酸が代謝されている可能性が示された。

4. 要 約

反芻家畜生産においては、アシドーシスの原因

Table 3 The nearest relative of OTUs identified as lactic-acid metabolizing bacterial group

#OTU ID	Relative abundance (%)			Description	Identities	()
	RF*	LE**	Accession#			
99436	1.022	44.648	AP012292.1	<i>Selenomonas ruminantium</i> subsp. <i>lactilytica</i> TAM6421	462 / 465	99.4
239386	0.325	26.053	EU327402.1	<i>Selenomonas ruminantium</i> strain LongY6	461 / 465	99.1
160548	0.004	5.844	MG754561.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain Sourdough-K11	453 / 465	97.4
New.ReferenceOTU1100	0.003	5.657	MF975714.1	<i>Lactobacillus mucosae</i> strain GML-6	462 / 465	99.4
433676	0.005	4.265	MF099894.1	<i>Lactobacillus panis</i> strain C-M2	462 / 465	99.4
355089	0.001	2.895	KP317736.1	<i>Lactobacillus oris</i> strain L75	462 / 465	99.4
4431608	0.001	1.915	MH045715.1	<i>Lactobacillus brevis</i> strain CDB6	463 / 465	99.6
725198	0.001	1.292	AM411002.1	<i>Lactobacillus secaliphilus</i> strain TMW 1.1313	454 / 465	97.6
518033	0.003	0.715	MH045714.1	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain CDB4	462 / 465	99.4
New.ReferenceOTU1712	0.016	0.676	AB362751.1	<i>Lactobacillus pentosus</i> strain NRIC 1830	463 / 465	99.6
773251	0.003	0.534	MH045193.1	<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain P10	462 / 465	99.4
215963	0.001	0.475	NR_028862.1	<i>Allisonella histaminiformans</i> strain MR2	462 / 465	99.4
338852	0.001	0.322	MG597114.1	<i>Lactobacillus mucosae</i> strain R6	464 / 465	99.8
New.ReferenceOTU2298	0.000	0.305	KU985242.1	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain UNQLp27	463 / 465	99.6
712971	0.000	0.291	MF099894.1	<i>Lactobacillus panis</i> strain C-M2	462 / 465	99.4
3851582	0.000	0.231	KX010101.1	<i>Lactobacillus rapi</i> strain GeFF	463 / 465	99.6

*RF, Rumen fluid

**LE, Lactate enrichment

となりうるルーメン内の乳酸蓄積を解消することが重要である。本研究では、乳酸代謝能を保有するルーメン内細菌種を網羅的に特定することを目的とし、乳酸培地による集積培養を行い培養物内の菌叢の群集構造解析を行った。本研究の結果から、*S. ruminantium*が乳酸代謝性細菌群の大部分を占める優占種であることが示された。乳酸産生菌として知られる*Lactobacillus*属細菌種のうち、多様な細菌種が乳酸代謝能を保有することが示された。また、通常のルーメン内では存在量が0.1%未満のマイナーな細菌種により、乳酸が代謝されている可能性が示された。

文 献

- 1) 農林水産省：平成26年度家畜共済統計，2015.
- 2) Sato, T., Matsumoto, K., Okumura, T., Yokoi, W., Naito, E., Yoshida, Y., Nomoto, K., Ito, M., Sawada, H. : *FEMS Microbiol. Ecol.*, 66 (3), 528 ~ 36, 2008.
- 3) Yu, Z., Morrison, M. : *BioTechniques*, 36, 808 ~ 812, 2004.
- 4) Zheng, W., Tsompana, M., Ruscitto, A., Sharma, A., Genco, R., Sun, Y., Buck, M. J. : *Microbiome* , 3 , 48, 2015.
- 5) Henderson, G., Cox, F., Ganesh, S., Jonker, A., Young, W., Global Rumen Census Collaborators, Janssen, P. H. : *Scientific Reports*, 5, 14567, 2015.

食肉家畜における原虫感染症の血清診断法の開発と 血清疫学的研究

Development of serodiagnosis system for protozoan parasite infection in food animals and its seroepidemiological study

西川 義文・正谷 達謙*

(帯広畜産大学原虫病研究センター, *鹿児島大学共同獣医学部)

Yoshifumi Nishikawa and Tatsunori Masatani*

(National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, *Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Diseases which cause damage on livestock production are reproductive disorders and calf diarrhea by infections with pathogen. Pathogenic protozoan parasites, *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* cause reproductive disorders, and *Cryptosporidium parvum* triggers calf diarrhea. In this study, we aimed to develop serodiagnosis system for the infection with these pathogenic protozoan parasites and perform seroepidemiological studies in Hokkaido, Miyazaki and Kagoshima prefectures in Japan. Based on the results from antigen screening and validation with the reference tests, we confirmed effectiveness of *Cryptosporidium* antigens CpP23 and CpGP15, *Neospora* antigen NcSAG1 and *Toxoplasma* antigen TgGRA7. The ELISA based on CpP23 and CpGP15 revealed that neonatal calf diarrhea associated with high seroprevalence of *Cryptosporidium*. The ELISA with NcSAG1 showed that seroprevalence rate in abortion outbreak was significantly higher compared with farms with no record of neosporosis. Although seroprevalence of anti-TgGRA7 was confirmed in Hokkaido and Miyazaki, further analysis should be required because of lower antibody levels. Thus, seroepidemiological studies using ELISAs with these antigens showed infection risk in cattle in Hokkaido and southern Kyushu. In order to minimize the damage of livestock production, early diagnosis of the pathogenic protozoan infection should be required. Our results suggest necessity of continuous survey for these protozoan infection in livestock in Japan.

1. 目的

食の安全性が注目されている現代で、食肉を介した人畜共通感染症に対応しヒトへの影響を抑えることが緊急課題とされている。また、農場経営を進める上で家畜生産に損害を与える疾病に注意する必要があり、特にその2大疾病として感染性

の繁殖障害と子牛の下痢症があげられる。しかし、寄生虫感染症の研究については横断的な解析が十分になされていないのが現状である。我が国の食肉家畜における寄生虫感染症では、下痢症の原因となるクリプトスパリジウム (*Cryptosporidium* spp.)¹⁾、繁殖障害の原因となるネオスポラ (*Neospora caninum*)²⁾ およびトキソプラズマ

(*Toxoplasma gondii*)³⁾ の汚染が現場レベルで危惧されているが、その実態は不明である。

クリプトスピリジウムは、ヒトを含む脊椎動物の消化管などに寄生する原虫である。クリプトスピリジウム・パルバム（遺伝子型1または2）は病原性原虫としては唯一感染症法により特定病原体等（四種病原体）に指定されており、ヒトや新生子牛に重篤な下痢症を引き起こし、特に畜産業における生産性や公衆衛生的な観点からも汚染対策が急務となっている。ネオスポラは、牛・羊・山羊、鹿などに感染する細胞内寄生性原虫である。特に牛には流産、死産あるいは子牛の神経症状を主徴とする異常産を高率に引き起こす。ネオスポラの感染例が世界中で報告されており、子牛と搾乳量の損耗などによる獣医・畜産領域での経済的損失はきわめて大きい。細胞内寄生原虫のトキソプラズマによって引き起こされるトキソプラズマ症は、世界的な広がりを見せる重要な人獣共通感染症である。ヒトでは妊婦が初感染した場合、流・死産や先天性トキソプラズマ症を引き起こすほか、エイズ患者や免疫抑制剤の投与を受けている患者にトキソプラズマ性脳炎を起こすことが知られている。また、トキソプラズマの家畜への感染は直接的損耗による経済的被害だけではなく、食肉を介してヒトに感染するリスクがあることから、公衆衛生上きわめて重要な問題である。

そこで本研究では「家畜における原虫感染症の血清診断法の開発と血清疫学的研究」を提案し、クリプトスピリジウム、ネオスポラ、トキソプラズマの血清診断法を開発するとともに、我が国における食肉用家畜の原虫汚染リスクの基礎データを取得することを目的とした。

2. 方 法

2.1 クリプトスピリジウムの診断用抗原の作製 クリプトスピリジウム・パルバムのゲノム

DNAからPCR法により4種類の候補遺伝子、CpP23, CpP2, CpGP15およびCpGP60を増幅した。PCR産物をそれぞれ大腸菌発現用ベクターpGEX-6P1にクローニングし、グルタチオンSトランسفエラーゼ（GST）融合タンパク質として大腸菌で発現させた。大腸菌の可溶性画分からグルタチオンビーズを用いてCpP23, CpP2, CpGP15およびCpGP60の組換えタンパク質を作製した⁴⁾。

2.2 ネオスポラの診断用抗原の作製

ネオスポラNc 1株よりRNAを抽出し、RT-PCR法により20種類の候補遺伝子を増幅した。PCR産物をそれぞれ哺乳動物細胞発現用ベクターp3XFLAG-CMV-14にクローニングし、293T細胞へトランسفエクションすることで哺乳動物細胞内で発現させた。当該細胞から可溶性画分を調整し、抗原ライセートを作製した。ELISA法によりネオスポラのマウス抗血清に対する反応性を比較し、抗原性の高い抗原としてNcGRA6, NcGRA7, NcSAG 1を選定した。前述の方法により、NcGRA6, NcGRA7, NcSAG 1のGST融合タンパク質を大腸菌で発現させ、組換えタンパク質を作製した⁴⁾。

2.3 トキソプラズマの診断用抗原の作製

トキソプラズマPLK株よりRNAを抽出し、RT-PCR法により39種類の候補遺伝子を増幅した。PCR産物をそれぞれ哺乳動物細胞発現用ベクターp3XFLAG-CMV-14にクローニングし、293T細胞へトランسفエクションすることで哺乳動物細胞内で発現させた。当該細胞から可溶性画分を調整し、抗原ライセートを作製した。ELISA法によりトキソプラズマのマウス抗血清に対する反応性を比較し、抗原性の高い抗原としてTgGRA 7を選定した。前述の方法により、TgGRA 7のGST融合タンパク質を大腸菌で発現させ、トロンビン処理によりGSTを除いた組換え

タンパク質を作製した⁵⁾。

2.4 ELISA法

組換えタンパク質を0.1μM、抗原ライセートを約1 μg/mlとなるようにcarbonate-bicarbonate buffer (pH9.6)で希釈し、F96 MAXISORP NUNC-IMMUNO PLATEに50μlずつ加えて4℃で一晩保存した。0.05 % Tween20含有PBS (PBS-T)で洗浄後、3 %スキムミルク含有PBSにより37℃で1時間ブロッキングを行った。PBS-Tで洗浄後、3 %スキムミルク含有PBSにより250倍希釈した1次抗体を50μlずつ加え37℃で1時間反応させた。PBS-Tで6回洗浄後、3 %スキムミルク含有PBSにより10,000倍希釈した2次抗体を50μlずつ加え37℃で1時間反応させた。PBS-Tで6回洗浄し、基質溶液(0.1M citric acid, 0.2 M sodium phosphate, 0.003% H₂O₂, 0.1mg/ml 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid))を用いて暗室で1時間反応させ、415nmにおける吸光度を測定した。1次抗体はマウス血清または牛血清、2次抗体は抗マウス

または抗牛horseradish peroxidase (HRP) 標識total IgGを使用した^{4,5)}。

2.5 被検血清

北海道の家畜保健衛生所、岩手大学、鹿児島大学、宮崎大学より提供された牛血清をELISA法の評価に供した。

3. 結果と考察

クリプトスピリジウム抗体陽性牛血清(10検体)と陰性牛血清(10検体)を用いて、クリプトスピリジウム抗原CpP23, CpP2, CpGP15およびCpGP60の反応性をELISA法により比較した(Fig. 1)。CpP2では陽性牛血清に対する反応性が認められなかったが、その他の抗原については陽性牛血清に対する特異的な反応が確認された。反応性の優れていたCpP23とCpGP15について、野外牛血清を用いて解析を行った。北海道と岩手県の牛血清を用い、下痢発生の頻度とクリプトスピリジウム抗体陽性の関連性を比較した(Table 1)。CpP23とCpGP15の反応性について単一抗原

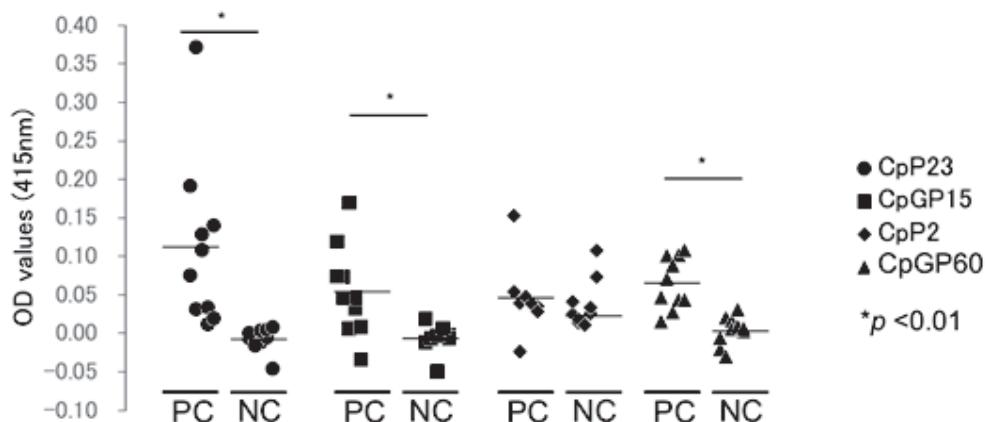


Fig. 1 ELISA with recombinant antigens using sera from a farm with confirmed *Cryptosporidium parvum*-associated diarrhea. Positive controls (PC, n = 10) and negative controls (NC, n = 10) were from the sera of cattle previously infected with *C. parvum* and those of neonatal cattle before being given colostrum, respectively. Solid lines indicate average values of the samples. *indicates significant differences between positive and negative sera in CpP23, CpGP15, and CpGP60 as determined by Student's t-test ($p < 0.01$).

Table 1 Seroprevalence of *Cryptosporidium* in Hokkaido, Iwate and Kagoshima Prefectures.

Neonatal calf diarrhea	Place	No. tested	No. positive (%)			
			CpP23	CpGP15	both	either
few	Iwate	133	19** (14.3)	13** (9.8)	3** (2.3)	25** (18.8)
many	Hanamaki, Iwate	92	39 (42.4)	13 (14.1)	8 (8.7)	44 (47.8)
many (C. parvum related)	Shizukuishi, Iwate	66	15 (22.7)	11 (16.7)	5 (7.6)	21 (31.8)
many (C. parvum related)	Obihiro, Hokkaido	145	75 (51.7)	94 (64.8)	57 (39.3)	112 (77.2)
subtotal		303	129** (42.6)	118** (38.9)	70** (23.1)	177** (58.4)

**The seroprevalences of each antigen were significantly higher in farms with many diarrhea cases than in the farms with few diarrhea cases (Chi-square test, $p < 0.01$).

Blood samples were collected in 2016.

Place in Kagoshima	No. tested	No. positive(%) of anti-CpP23
Satsumasendai	22	21 (95.5%)
Hioki	32	32 (100%)
Kagoshima	124	124 (100%)
Yuu sui	22	22 (100%)

Blood samples were collected in 2014–2015.

陽性の検体が複数存在していたため、いずれかの特異抗体の陽性率に着目した。下痢の発生頻度が低い農場ではクリプトスピロジウム抗体陽性率が18.8%であったが、下痢の発生頻度が高い農場（毎月発生）では58.4%となり、農場における下痢の発生とクリプトスピロジウム感染の関連性が推測された ($p < 0.01$)。鹿児島県での下痢の発生頻度が高い農場から採材した血清では、4地域でほぼ100%の抗体陽性率であった (Table 1)。今回の結果により、農場における下痢の発生とクリプトスピロジウム感染の関連性が示唆された。クリプトスピロジウム抗原CpP23とCpGP15を組み合わせたELISA法はクリプトスピロジウム感染の履歴を把握することができ、糞便サンプルを用いたクリプトスピロジウム検査と併用することで効果的な防疫対策が実施できると考える。

我が国のネオスポラ症確定診断には免疫染色法(IHC)による流産胎子からの抗原検出が必要である。一方、簡易血清診断では間接蛍光抗体法(IFAT)が使用されている。そこで、ネオスポラの抗原スクリーニングにより選定したNcSAG1, NcGRA6, NcGRA7を用いたELISA

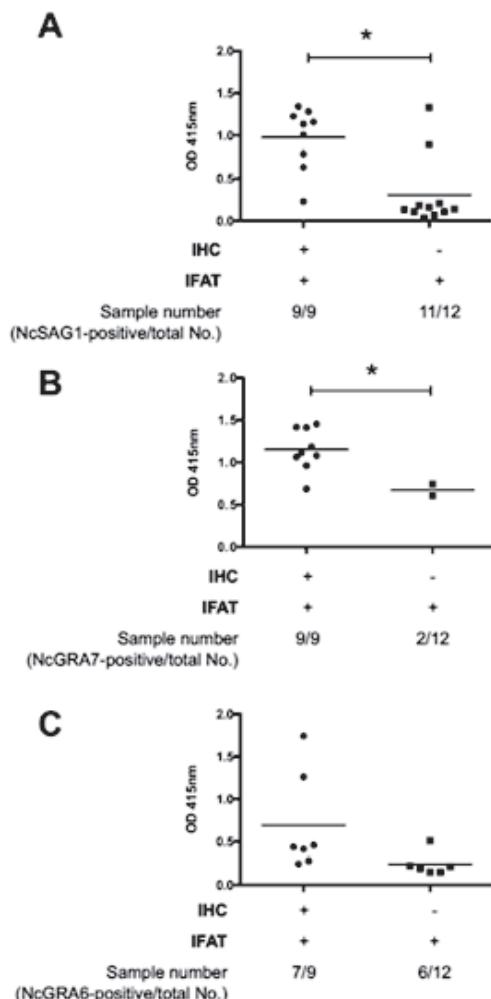


Fig. 2 ELISA with recombinant antigens (A : NcSAG1, B : NcGRA7, C : NcGRA6) using bovine sera confirmed neosporosis (IHC) and *Neospora* antibodies (IFAT) . IHC-positive samples ($n=9$) and IFAT-single positive samples ($n=12$) were used. Solid lines indicate average values of the samples. *indicates significant differences as determined by Student's t -test ($p < 0.05$).

Table 2 Seoprevalence of *Neospora caninum* in a cattle herd with abortion case in Hokkaido and Kagoshima Prefectures.

Place in Hokkaido	Category	Sample number in a cattle herd	Number of NcSAG1 Ab-positive (percentage)	year of sampling
A	abortion outbreak ^a	278	207 (74.5%)	2010
		171 (Lactation period)	139 (81.3%)	
		75 (Dry period)	49 (65.3%)	
		32 (First pregnancy)	19 (59.4%)	
B	abortion ^b	62	22 (35.5%)	2010
C	abortion ^c	55	32 (58.2%)	2013
D	abortion ^d	100	8 (8.0%)	2012
E	abortion ^e	40	4 (10.0%)	2012
F	no record of neosporosis at sampling	594	104 (17.5%)	2007-2009
G	no record of neosporosis at sampling	240	63 (26.3%)	2010-2011

^a37 cases of abortion occurred in 2010, and neosporosis was confirmed in this herd.

^b6 cases of abortion occurred in 2007–2008, and neosporosis was confirmed in this herd. Additionally, 8 cases of Neospora abortion was confirmed in 2008–2009 in Bekkai and Nakashibetsu.

^c4 cases of abortion occurred in 2013, and neosporosis was confirmed in this herd.

^d8 cases of abortion occurred in 2012, and neosporosis was confirmed in this herd.

^e3 cases of abortion occurred in 2012, and neosporosis was confirmed in this herd.

Place in Kagoshima	No. tested	Number of NcSAG1 Ab-positive (percentage)
Satsumasendai	22	3 (13.6%)
Hioki	32	3 (9.4%)
Kagoshima	124	61 (49.2%)
Yuuusui	22	3 (13.6%)

Blood samples were collected in 2014–2015.

法により、ネオスポラ流産に関連する牛血清 (IHC陽性9検体とIFATのみ陽性12検体) に対する反応性を比較した (Fig. 2)。NcGRA 6 および NcGRA 7 を用いたELISA法では、IFAT陽性検体の検出効率が低かったが、NcSAG 1 を用いたELISA法は91.7 % の検出率であった。また、NcSAG 1 およびNcGRA 7 を用いたELISA法では IHC陽性検体の検出率が100 % であり、IHC陽性検体の抗体レベルはIFAT陽性検体のものより高い値であった ($p < 0.05$)。反応性の優れていた NcSAG 1について、野外牛血清を用いて解析を行った。北海道の牛血清を用い、流産発生の頻度とネオスポラ抗体陽性の関連性を比較した (Table 2)。ネオスポラ症の発生報告のない農場

では抗体陽性率が17.5 %～26.3 % であったのに対し、ネオスポラ感染による流産の集団発生が見られた農場では74.5 % であった。単発的なネオスポラ症の発生農場では、抗体陽性率に相関性は認められなかった。鹿児島県の場合、鹿児島市で高い抗体陽性率 (49.2 %) が認められたが、その他の地域では9.4 %～13.6 % であった (Table 2)。今回の結果により、NcSAG 1 を用いたELISA法はネオスポラ症に関連する血清診断法に有効であることが示された。NcSAG 1 抗体の陽性率の調査を進めることで、ネオスポラ症の実態が明らかになると思われる。

トキソプラズマの抗原スクリーニングにより選定したTgGRA 7 を用いたELISA法とトキソプラ

Table 3 Specificity and sensitivity of TgGRA7-based ELISA in detecting IgG to *Toxoplasma gondii* infection in cattle sera compared with the reference test LAT, and Seroprevalence of *T. gondii* in Hokkaido and Miyazaki Prefectures.

LAT				ELISA				LAT/ELISA positive				
No. of tested	No. of positive	No. of negative	% of positivity	No. of tested	No. of positive	No. of negative	% of positivity	No. of tested	No. of positive	No. of negative	% of positivity	95%CI
301	88	213	29.24	301	85	216	28.24	301	71	230	23.59	18.9-28.8

LAT=Latex agglutination test, CI=Confidence interval

LAT/ELISA positive=samples that were simultaneously positive on both tests

95%CI calculated according to method described by at <http://vassarstats.net/>

*Kappa value : 0.65, Sensitivity : 84%, Specificity : 88%

Place	No. tested	Number of TgGRA7 Ab-positive (percentage)
Hokkaido	187	68 (36.4%)
Miyazaki	118	31 (26.3%)

ズマの市販キット（ラテックス凝集試験(LAT), トキソテスト-MT, 栄研社製 *現在は販売中止）の相関解析を行った（Table 3）。感度84%, 特異性84%, 一致度 (κ 係数0.65) となり, TgGRA 7を用いたELISA法とLATの相関性が確認された。次に北海道と宮崎県の牛血清を用い, トキソプラズマ抗体の陽性率を測定した（Table 3）。北海道で36.4%, 宮崎県で26.3%の抗体陽性率が確認されたが, 抗体レベルはカットオフ値近くに分布していた。今回の結果はNcGAR 7を用いたELISA法の有用性を示唆しているが, 我が国の牛におけるトキソプラズマ感染についてはさらなる解析による検討が必要とされる。

4. 要 約

家畜生産に損害を与える疾病に感染性の繁殖障害と子牛の下痢症がある。病原性原虫のトキソプラズマとネオスポラの感染は繁殖障害, クリプトスピリジウムの感染は子牛の下痢症を引き起す。本研究はこれら病原性原虫感染症の血清診断法の開発を目的とし, 牛の飼養頭数の多い北海道, 宮崎, 鹿児島を中心とした疫学調査を行った。

抗原スクリーニングと標準検査法との比較結果より, クリプトスピリジウム抗原CpP23, ネオスポラ抗原NcSAG 1, トキソプラズマ抗原TgGRA 7の有効性を確認した。これら抗原を使用したELISA法により血清疫学調査を実施したところ, 北海道と南九州において牛における病原性原虫感染のリスクが明らかとなった。家畜生産の損害を抑えるためにはこれら病原性原虫感染の早期診断が必要であり, 今後の継続的な調査の必要性が示唆された。

文 献

- 1) 西川義文：化学療法の領域, 32, 108~115, 2016.
- 2) Nishikawa, Y. : *J. Vet. Med. Sci.*, 79, 1374 ~ 1380, 2017.
- 3) 西川義文, 猪原史成：医学のあゆみ, 259, 952~960, 2016.
- 4) Fereig, R. M., AbouLaila, M. R., Mohamed, S. G., Mahmoud, H. Y., Ali, A. O., Ali, A. F., Hilali, M., Zaid, A., Mohamed, A. E., Nishikawa, Y. : *Acta Trop.*, 162, 206~211, 2016.
- 5) Fereig, R. M., Mahmoud, H. Y. A. H., Mohamed, S. G. A., AbouLaila, M. R., Abdel-Wahab, A., Osman, S. A., Zidan, S. A., El-Khodary, S. A., Mohamed, A. E. A., Nishikawa, Y. : *Veterinary Parasitology : Regional Studies and Reports*, 3-4, 1~6, 2016.

心臓あるいは横隔膜を用いたオーエスキ一病ウイルス抗体検査法の確立

Establishment of serological method against pseudorabies virus using myocardium or diaphragm

前田 健

(山口大学共同獣医学部)

Ken Maeda

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University)

In Japan, pseudorabies virus (PRV) has been eradicated from pig farms in many prefectures, but wild boars are naturally infected with PRV in prefectures where PRV has been free among pig population. In this study, we tried to establish the simple and easy method for detection of anti-PRV antibody in wild boars. At first, ADV (gI) ELISA Kit (IDEXX) for pig was applied for sero-surveillance of PRV infection among wild boars in Japan. The results indicated that the kit is available for detection of antibody against PRV from wild boars and that PRV has been still spreading in some prefectures where PRV is free from pig farms. Furthermore, we carried out detection of anti-PRV antibody from meat juice of heart and diaphragm of wild boars. The results indicated that anti-PRV antibody was successfully detected from meat juices, but the concentration of antibody in meat juice was less than that in sera. Therefore, it is recommended that meat juice should be used for screening of anti-PRV antibody among wild boar population.

1. 目的

オーエスキ一病ウイルスは豚コレラウイルスに次ぐ国内での撲滅対策の標的となっている。しかし、我々の調査により豚で清浄化が進み、ワクチン接種を中止した都道府県において、いまだ野生の猪に抗オーエスキ一病ウイルス抗体が存在していることが判明している (Mahmoud HYA *et al.* Pseudorabies virus infection in wild boars in Japan. *J Vet Med Sci* 2011. 73 : 1535-1537)。さらに、驚くべきことに2016年2月にはオーエスキ一病清浄県にてアライグマのオーエスキ一病ウ

イルス感染死を我々は発見した（南昌平ら「アライグマ集団死の死因究明」第159回日本獣医学会学術集会（2016），論文準備中）。これらは、豚での清浄化に成功している都道府県でも野生動物、特に猪でオーエスキ一病が維持されていることを意味している。さらには家畜での伝染病対策を行う上で、野生動物における調査の重要性を示している。

一方、猪での検査の重要性は多くの担当者が理解しているところではあるが、野生動物からの血清の採集の困難さ、ならびに血清を回収できても溶血などの状態の悪さが調査の障害となってきた。

本研究では、血清の状態が悪くても抗体検出が可能なオーエスキーウィルスの検出系を用いて、血清の代わりに採集が比較的容易な猪の心筋および横隔膜のミートジュースより抗体の検出を実施することにより、簡易に野生動物である猪におけるオーエスキーウィルスに対する抗体の検出系を確立することを目的にする。

2. 方 法

2.1 血清

各地の狩猟あるいは有害捕獲にて捕獲された猪から血清を回収した。関西Aは2011—2017年に77頭、関東Aは2011年に56頭、山口県は2016—2018年に43頭、中部Aは2014—2017年に75頭、中部Bは2014—2018年に99頭、関東Bは2014—2018年に43頭、関東Cは2015—2018年に18頭、中国Aは2017—2018年に31頭、中国Bは2017年に20頭の猪から血清を回収した。回収された血清は使用まで-20℃で保存した。

2.2 臓器

山口県の狩猟者の協力のもと33頭の猪から心臓と横隔膜を回収した。兵庫県では猪の解体場で3頭の猪から心臓と横隔膜を回収した。回収された

臓器はジップロック（旭化成ホームプロダクツ株式会社）に入れて-20℃で保存した。

2.3 ミートジュースの回収

心臓あるいは横隔膜をいたしたジップロックは使用まで-20℃に保存しておく。ジップロックは輪ゴムで中央を縛り、上部に肉片がくるようにする。そのジップロックをクリップなどで紐にぶら下げる、常温で5時間放置する。5時間後に、肉片を取り除き、ミートジュースを回収する。回収されたミートジュースは3,500回転で5分間4℃で遠心し、その上清を回収して実験に用いる(Fig. 1)。

2.4 ELISA

血清およびミートジュースからのオーエスキーウィルスに対する抗体価の検出にはADV (gI) エリーザキット (IDEXX社) を用いた。キットのプロトコールに従って実験を実施した。

2.5 ウィルス中和試験

オーエスキーウィルスには2016年に死亡したアライグマから分離されたRC 1株をVero細胞で増殖し、80% プラーク減数試験 (PRNT₈₀) により5倍から2倍階段希釈した血清を用いて中和抗体価を求めた。



Fig. 1 実験方法

3. 結果と考察

3.1 猪からのオーエスキーウイルスに対する抗体検出

猪からのオーエスキーウイルスの抗体検出のためにIDEXX社のADV (gI) エリーザキットの条件検討を行った。関西Aで捕獲された猪66頭の血清を用いてウイルス中和抗体価を比較した。中和抗体価1:10未満を陰性と判断した場合、Fig. 2のようにS/N比0.4以上を陽性と考えて良いのかもしれない。中和抗体価が1:10未満の個体の一頭（灰色）でS/N比が0.4未満となっているが、再検討中である。以下の実験では、IDEXX社のADV (gI) エリーザキットを用いてS/N比が0.4未満の場合、猪においてオーエスキーウイルスに対する抗体の保有と判定した。

以上の結果より、IDEXX社の豚用のエリーザキットは野生猪にも応用可能であることが判明した。また、猪の血清での抗体の判定はS/N比0.4以下を抗体陽性とした。

3.2 全国の猪におけるオーエスキーウイルスに対する抗体保有率

全国の猪の血清を用いてIDEXX社のキットで抗体保有率の調査をした結果、関西Aでは66頭中11頭(17%)、関東Aでは56頭中0頭(0%)、山口では67頭中0頭(0%)、中部Aでは75頭中0頭(0%)、中部Bでは99頭中0頭(0%)、関東Bでは43頭中0頭(0%)、関東Cでは18頭中0頭(0%)、四国Aでは31頭中0頭(0%)、四国Bでは20頭中0頭(0%)がオーエスキーウイルスに対する抗体を保有していた(Table 1)。

豚での清浄化が報告されている関西Aにおいて

Table 1 IDEXX社のADV (gI) エリーザキットを用いた猪の抗体保有率調査

	山口	関西A	関東A	関東B	関東C	中部A	中部B	四国A	四国B
検査頭数	67	66	56	43	18	75	99	31	20
陽性数	0	11	0	0	0	0	0	0	0
陽性率 (%)	0	17	0	0	0	0	0	0	0

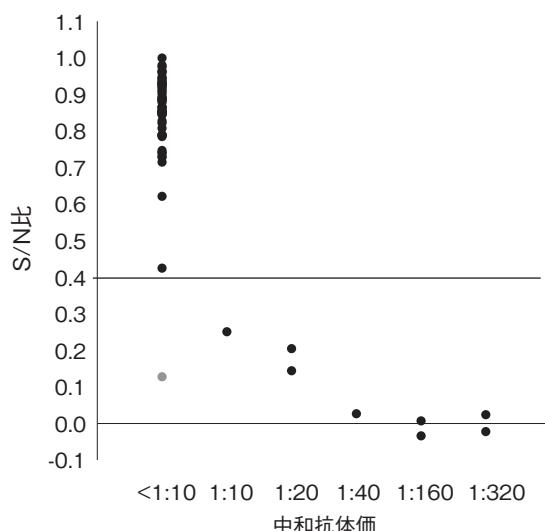


Fig. 2 ELISA結果と中和試験結果の比較（関西Aイノシシ66頭）

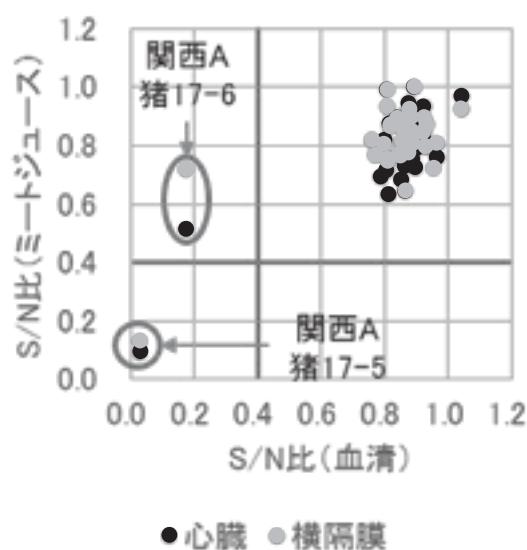


Fig. 3 血清とミートジュースのS/N比の比較

猪では依然としてオーエスキーウィルスが蔓延していることが判明した。特に関西Aでは非常に高い陽性率であり、かつアライグマにも致死的感染が発生していることから、オーエスキーウィルスが動物間で伝播しており、豚への感染のリスクも注意しなければいけないことが示された。

3.3 ミートジュースからのオーエスキーウィルスに対する抗体検出

血清および心臓と横隔膜が回収された個体は関西Aと山口の36個体となっている。IDEXX社のキットを用いたELISAのS/N比をFig. 3に示した。1個体関西A猪17-5の心臓と横隔膜のミートジュースからオーエスキーウィルスに対する抗体が検出された。また、関西A猪17-6は血清で陽性であり、さらに心臓からのミートジュースのS/N比が0.5123と豚では陽性判定となる0.6未満であった。また、血清で陰性が確認された34頭は心臓および横隔膜のミートジュースを用いた結果も陰性であった。

ミートジュースからもオーエスキーウィルスの抗体の検出に成功した。また、血清陰性の個体のミートジュースはすべて陰性となったことから非特異反応なども検出されないことが確認された。しかし、血清で陽性であった個体の一部のミートジュースは、S/N比が比較的低いものの0.4

以上となる場合があった。日本脳炎ウィルスやE型肝炎ウィルスでの同様の実験では、ミートジュースの抗体濃度は血清の5分の1であり、ミートジュースの抗体濃度が血清に比べて低いことが再確認された。ミートジュースは確定診断には適していないが、スクリーニング等には有用であると期待される。

4. 要 約

猪におけるオーエスキーウィルスの感染状況を調査した結果、IDEXX社のキットが有用であることが示された。血清からの検出により、豚でのオーエスキーウィルスが撲滅された地域の猪に未だオーエスキーウィルスが蔓延していることが確認された。心臓と横隔膜のミートジュースを用いてオーエスキーウィルスの抗体を検出した結果、抗体の検出に成功したが、血清で陽性であった個体がミートジュースでは陰性となる個体が存在しており、ミートジュースを用いた検出は血清を用いた場合に比べて感度が低いことが判明した。検出感度が低いことから、ミートジュースはオーエスキーウィルス感染の確定診断ではなく、地域の猪におけるオーエスキーウィルス感染状況のスクリーニングに有用であると期待された。

産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索 —より効果的なワクチン接種部位を求めて—

Study of mucosa-associated lymphoid tissues in farm animals
—to identify more effective regions for their vaccination—

市居 修・中村 鉄平・小千田 圭吾・山下 祐輔・池田 哲平
(北海道大学大学院獣医学研究院)

Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Keigo Kosenda, Yusuke Yamashita and Teppei Ikeda
(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

In recent years, the development of an ophthalmic vaccine is progressing rapidly and has been put to practical use in respiratory diseases of chickens such as highly pathogenic avian influenza. These methods target to mucosa-associated lymphoid tissues, in particular the role of “eye-associated lymphoid tissue” would be important for the achievement of effective ophthalmic vaccination. On the other hand, the anatomical and histological structures of eye-related lymphoid tissues in cattle and pigs are still unclear. Therefore, in the present study, we focused on “eye-associated mucosa” as well as “vaginal mucosa” to induce a host mucosal immunity, assuming the future development of local mucosal vaccination in cattle and pigs. Our histological analysis of eye-associated tissues in the cattle and miniature pigs revealed that the mucosa-associated lymphoid tissues were developed in the bulbar conjunctiva rather than the palpebral conjunctiva. Especially in the miniature pigs, mucosa-associated lymphoid tissue was also developed beneath epithelium of third eyelid mucosa and its excretory ducts. However, in the both species, no vaginal mucosa-associated lymphoid tissue was found in this experiment. Thus, in the present study, we found the eye-related lymphoid tissues and showed their characteristics in cattle and miniature pigs. In further study, we would continue to focus on the possibility of mucosa-associated lymphoid tissue to realize the efficient immunity induction in farm animals.

1. 目的

産業動物の感染症予防には、ワクチン接種が不可欠であり、全身免疫を誘導する“注射型ワクチン”が主体である。一方、多くの産業動物感染症では、消化器、呼吸器および生殖器等の粘膜が病原体の侵入門戸となるため、IgAを主役とする局所粘膜免疫誘導による感染防御がより効果的であ

ると考えられる。全身免疫誘導は病原体侵入後の防御・回復に有効であるが、産業動物では乳房炎、牛ウイルス性下痢・粘膜病等および豚の各種呼吸器感染症等、難治性の粘膜感染症が頻発するため、粘膜免疫を誘導して粘膜への病原体侵入を未然に防ぐことができる“粘膜型ワクチン”的開発に大きな関心が寄せられている。

粘膜免疫では、粘膜関連リンパ組織（MALT）

が主役となる。MALTは抗原提示細胞、T・B細胞等の細胞集団を一定の区画に配置し、かつ未成熟リンパ球および抗原提示能をもつ樹状細胞の小さなクラスターを上皮細胞周辺に配置し、リンパ球を機能的に成熟できる。MALTには特徴的なM細胞が存在し、特に抗原取り込み能を有する“M細胞”が重要である。M細胞は基底膜側に樹状細胞等を集簇させ、外来抗原に対する粘膜免疫誘導に重要な役割を果たす。代表的なMALTとして、ワルダイエルの咽頭輪に存在する扁桃や鼻咽頭関連リンパ組織(NALT)、腸管関連リンパ組織(GALT、パイエル板)がある。鶏では、特にNALTを標的とした経鼻ワクチンが開発され、ヒトでも経鼻インフルエンザ生ワクチン“フルミスト”が有名である。2015年に牛ではTSV2(牛伝染性鼻気管炎と牛パラインフルエンザ3型)経鼻ワクチンが実用化され、豚では回虫抗原を応用した粘膜免疫が検討されてきた。粘膜型ワクチン接種には高価な医療基材や高度な技術を必要とせず、開発途上国への応用という点からも新たな技術として期待されている。

さらに近年、点眼ワクチンの開発も日進月歩であり、高病原性鳥インフルエンザ等、鶏の呼吸器疾患で実用化されている。これらはNALTに加えて結膜関連リンパ組織や涙道関連リンパ組織、いわゆる“眼関連リンパ組織(EALT)”を標的としている。しかし、NALTに比べて、牛や豚のEALTについてはその構造すら明らかではない。重要なことに、MALTの構造は動物種で顕著に異なり、豚は口蓋扁桃を欠き、牛では耳管扁桃が発達する。それゆえ、今後の点眼・点鼻等による粘膜型ワクチンの開発には、これらの形態機能学的見地によるMALTの基礎研究が重要である。

そこで報告者らは、牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及を想定し、接種しやすい粘膜免疫誘導部位として“眼と膣”に注目した。

口や直腸もその候補部位となるが、前者は食渣に、後者は糞便に邪魔される。また、眼と膣の所属リンパ節を考慮に入れると、眼は上部気道疾患に、膣は付近の尿生殖器や乳房等への免疫誘導に有用である。本研究では、牛と豚の眼および膣のMALTを精査し、既知のMALTと比較しながら、その形態機能学的特徴をつかむことを目的とした。

2. 方 法

2.1 動物実験倫理および供試動物

本研究のすべての過程において、北海道大学ならびに同学獣医学研究院における動物実験ガイドラインに従って実験を行った(承認番号16-0074・16-0077、本研究院の動物実験プログラムは The Association for the Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care Internationalによる認証を受けている)。本学部の実習で安樂死された雌のホルスタイン種成牛(n=4)および雌の交雑系成ミニ豚(n=4)を用いた。動物はいずれも微生物学的にコンベンショナルな環境で飼育された。安樂死後の個体を用いて、抗原を模倣したシリカビーズ(Sicastar、直径800nm)を眼瞼結膜と眼球結膜の間に滴下した。30分静置した後、動物から眼瞼、眼球結膜、膣前庭、膣および子宮頸膣部(膣円蓋を含む)を採取した。

2.2 組織解析

上記のように採取した臓器を10%中性緩衝ホルマリンあるいは4%パラホルムアルデヒドで固定し、階段希釀アルコール系列で脱水後、定法に従いパラフィン包埋組織を作成した。眼瞼結膜および眼球結膜、第三眼瞼、膣前庭、膣および子宮頸膣部の3μm厚組織切片を作成後、ヘマトキシリソ・エオジン(HE)染色を施した。

2.3 画像解析

組織スライドグラスについて、BZ-X710(キー

エンス、大阪、日本)で撮影、あるいはNano Zoomer 2.0-RS(浜松ホトニクス、静岡、日本)でバーチャルスライド化することで組織画像を得た。

3. 結果と考察

3.1 眼関連リンパ組織 (EALT) について

牛およびミニ豚とともに眼瞼結膜は角化重層扁平

上皮で構成されており、杯細胞や粘膜上皮下のリンパ球は少數であった。一方、両動物種ともに眼球結膜には多数の杯細胞が出現し、粘膜上皮下のリンパ球も豊富だった。また、牛の眼球結膜関連リンパ組織ではリンパ球浸潤が発達する様式を示したが (Fig. 1), ミニ豚では明瞭なリンパ濾胞が複数認められた (Fig. 2)。リンパ組織直上の眼球結膜粘膜は重層あるいは偽重層上皮で構成さ

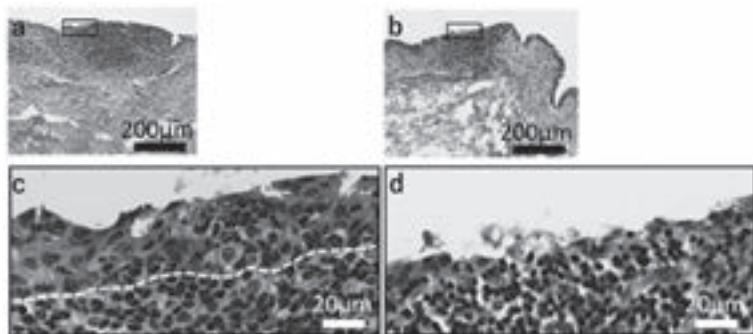


Fig. 1 Eye-associated lymphoid tissue (EALT) in cow.

Panels (a) and (b) show the bulbar conjunctiva-associated lymphoid tissues (BCALT). Panels (c) and shows the inset area of panels (a) and (b), respectively. Panel (c) shows stratified or pseudostratified epithelial cells and developed lymphoid tissue. In panel (d), epithelium is obscure. HE staining.

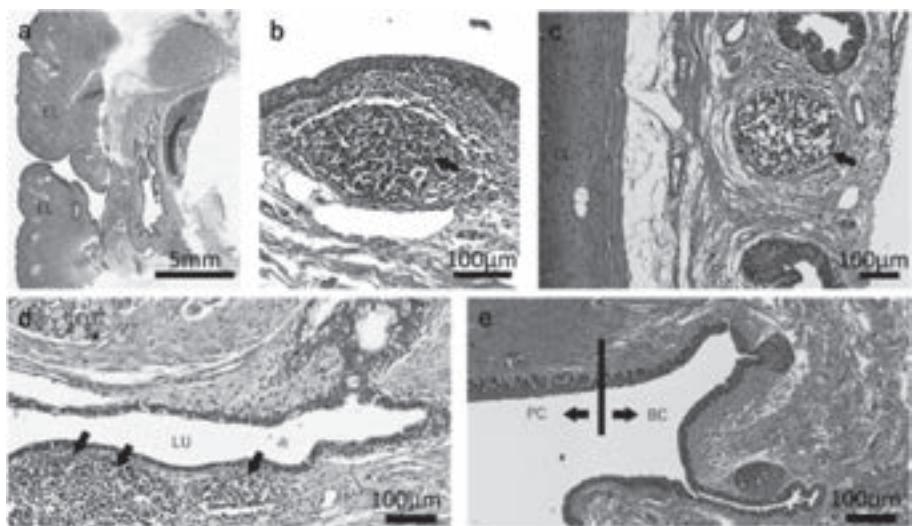


Fig. 2 Eye-associated lymphoid tissue (EALT) in miniature pig.

Panel (a) shows the eye-associated tissues including eyelids (EL) and third eyelid (TEL). Panel (b) and (c) shows the lymphoid tissue found in TEL (arrows). CL: cartilage. Panel (d) shows the lymphoid tissue found beside the duct from TEL. LU: lumen of duct. TELG: third eyelid gland. Panel (e) shows the border between palpebral conjunctiva (PC) and bulbar conjunctiva (BC). Lymphoid tissues are observed in BCC. HE staining.

れ、牛では上皮が欠如している粘膜関連リンパ組織もみられた。

さらにミニ豚では第三眼瞼部も観察した（牛に関しては検索中である）。第三眼瞼粘膜上皮下に粘膜関連リンパ組織が発達しており、多数のリンパ濾胞構造も認められた（Fig. 2）。また、粘液腺を主体とする第三眼瞼腺がみられ、その導管周囲にも濾胞を含むリンパ組織が発達していた（Fig. 2）。

牛とミニ豚の眼瞼組織を用い、投与したシリカビーズを検索した。眼瞼粘膜上皮表面に付着するシリカビーズが認められた一方、上皮内に取り込まれたビーズは見当たらなかった。

3.2 膀胱関連リンパ組織について

両動物種ともに解析途中であり、これまで牛の膀胱について検索を実施しているが、明瞭な粘膜関連リンパ組織はみつかっていない。

3.3 考察

これまで報告者らは、自己免疫異常モデルマウスの唾液腺・涙腺炎の進行に伴い涙中に免疫細胞が出現することを報告してきた¹⁾。この細胞は涙腺やEALTに由来すると考えられ、EALTの免疫学的重要性を着想させた。これまでの予備実験として、牛、馬、猫およびマウスの結膜関連リンパ組織を発見しているが、今回は畜産分野において重要な牛と豚（ミニ豚）について検索した。組織学的解析の結果、両動物種の結膜、特に眼球結膜に粘膜関連リンパ組織がみられた。

MALTの解析においては、その組織学的な検索に加え、抗原の取り込みに重要な役割を果たすM細胞の検出が重要である。本研究では、シリカビーズを模倣抗原として結膜部分に投与したが²⁾、明瞭な取り込み像は見当たらなかった。死亡個体を用いている点やビーズの大きさなど、今後のさらなる検討が必要である。また、牛や豚のM細胞マーカーを利用した組織学的検出も重要で

ある。動物のM細胞マーカーとして、マウスではGlycoprotein2³⁾が汎用されるが、豚ではCytokeratin18やToll-like receptor（TLR）2および9が用いられ⁴⁾、牛のM細胞はCytokeratin18やCyclophilin Aに陽性を示す⁵⁾。これまで牛や豚のEALT内M細胞に関する報告はなく、その詳細を今後明らかにしたい。

本研究において、膀胱周囲に免疫関連リンパ組織はみつかっていない。報告者らは、自己免疫異常モデル動物の性腺およびそれらに付属する生殖器、腎臓や尿管を病理学的に精査し、免疫と尿生殖器の分子病態におけるクロストークを明らかにしてきた^{6, 7)}。また、マウスの縦隔内脂肪組織に新たなリンパ組織を発見した⁸⁾。この脂肪関連リンパ組織は、リンパ節やMALTと異なり、リンパ濾胞を形成しない。また肺炎等、胸腔内の免疫学的变化に反応して発達する⁹⁾。動物の膀胱におけるMALTに関して明確な報告がないが、尿管炎モデル動物では、尿管周囲脂肪組織に炎症細胞が浸潤するため⁷⁾、まだ発見されていない尿生殖器周囲の脂肪関連リンパ組織が尿生殖器の免疫学的機能を担うことも想定される。

我々の着目する眼粘膜は、ワクチン接種時に保定は必要だが、忌避行動を起こしにくく呼吸器症状にも左右されない。さらに、近傍リンパ組織として眼窩のリンパ節（いわゆる眼底リンパ節）が存在するため、迅速かつ効果の高い免疫誘導が期待される。膀胱膜は、接種時の保定を必ずしも必要とせず、忌避行動も起こさず、動物の健康状態にも左右されない。また、効率的な免疫誘導実現のために、抗原が生体内で長期間持続する必要があり、既存の産業動物用注射型ワクチンでは水酸化アルミニウムゲルやリン酸アルミニウムゲル等のアジュバントを添加して、徐放性に抗原を放出する工夫がなされている。眼瞼および膀胱は薬剤の留置に適しており、ヒト医療では過去に下眼瞼留

置型のピロカルピン徐放剤（オキュサート）が使用され、また産業動物では牛用の腔内留置型プロジエステロン徐放剤（シダー1900）が広く使用されている。本研究で免疫誘導部位として着目する眼および腔は留置および徐放暴露によって長期間の抗原刺激が可能な部位であり、今後も既存のワクチン接種部位よりも効率的な免疫誘導を実現する可能性に着目したい。

4. 要 約

近年、点眼ワクチンの開発は日進月歩であり、高病原性鳥インフルエンザ等、鶏の呼吸器疾患で実用化されている。これらは粘膜関連リンパ組織（MALT）を標的としており、特に点眼ワクチンでは“眼関連リンパ組織（EALT）”の役割が重要である。一方で、牛や豚のEALTの構造は明らかではない。本研究では、牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及を想定し、接種しやすい粘膜免疫誘導部位として“眼”，さらには“腔粘膜”に注目した。牛とミニ豚の眼周囲組織の解析の結果、両者ともに眼球結膜に発達したMALTが認められた。特に後者では、第三眼瞼粘膜および第三眼瞼腺の導管周囲にも発達したMALTが認められた。これまでの解析では、腔粘膜関連リンパ組織はみつかっていない。以上、本

研究では牛と豚のEALTの存在を明らかにした。今後も、EALTを利用して効率的な免疫誘導を実現する可能性に着目したい。

文 献

- 1) Kosenda, K., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y., Kon, Y. : *Clin Exp Ophthalmol.*, 41, 788~797, 2013.
- 2) Nagai, Y., Shiraishi, D., Tanaka, Y., Nagasawa, Y., Ohwada, S., Shimauchi, H., Aso, H., Endo, Y., Sugawara, S. : *Clin Exp Allergy*, 45, 677~486, 2015.
- 3) Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nohchi, T., Pontes, G. S., Hase, K., Ohno, H., Kurokawa, S., Mejima, M., Takayama, N., Yuki, Y., Lowe, A. W., Kiyono, H. : *J Immunol.*, 180, 7840~7846, 2008.
- 4) Tohno, M., Shimosato, T., Moue, M., Aso, H., Watanabe, K., Kawai, Y., Yamaguchi, T., Saito, T., Kitazawa, H. : *Vet Res.*, 37, 791~812, 2006.
- 5) Hondo, T., Someya, S., Nagasawa, Y., Terada, S., Watanabe, H., Chen, X., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M. T., Nohchi, T., Aso, H. : *Cell Tissue Res.*, 364, 585~597, 2016.
- 6) Otani, Y., Ichii, O., Otsuka-Kanazawa, S., Chihara, M., Nakamura, T., Kon, Y. : *Autoimmunity*, 48, 402~411, 2015.
- 7) Ichii, O., Chihara, M., Lee, S. H., Nakamura, T., Otsuka-Kanazawa, S., Horino, T., Elewa, Y. H., Kon, Y. : *Autoimmunity*, 50, 114~124, 2017.
- 8) Elewa, Y. H., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y., Kon, Y. : *Cell Tissue Res.*, 357, 731~741, 2014.
- 9) Elewa, Y. H. A., Ichii, O., Takada, K., Nakamura, T., Masum, M. A., Kon, Y. : *Front Immunol.*, 9, 271, 2018.

畜産分野における抗菌剤使用量削減に有効な手段の探索 に関する研究（Ⅱ）

—動物用抗菌剤使用量と農場バイオセキュリティ水準 および適正飼養因子との関連—

Epidemiological analysis of the factors affecting the use of veterinary antimicrobials at farm level in Japanese pig farms

—the relationship between veterinary antimicrobial usage, on-farm biosecurity level and animal welfare indicators—

杉 浦 勝 明・松 田 真 理・磯 村 れ ん

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Katsuaki Sugiura, Mari Matsuda and Ren Isomura

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

Pig production sector is the heaviest antimicrobial user amongst livestock sectors. This study aimed to analyze the relationship between on-farm biosecurity (BS) level, animal welfare indicators and antimicrobial usage (AMU) in the hope to obtain useful information to achieve the best practice for lower AMU. Data on annual AMU based on prescription records were collected from 121 pig farms under contract with members of the Japanese Association of Swine Veterinarians (JASV). Of these farms, 38 farms were selected for assessing BS level and animal welfare level : pre-/post-weaning mortality rate (%) and dimensions for fattening pig ($m^2/head$). Multivariable linear regression analysis using BS scores/animal welfare indicators as independent variables and AMU as dependent variables was performed. The results showed that better site status and higher external BS scores in the category of "farm contractors" and "replacement gilts" were strongly associated with lower oral AMU ($p<0.001$), suggesting that in order to reduce the group antibiotic treatments, famers should preferentially reinforce the entrance requirements against high risk visitors and improve the acclimation procedures when introducing gilts. The site status, the external BS scores in the category of "replacement gilts" and "pig flows" (e.g. the completeness of all-in/all-out system) and the pre-weaning mortality rate as an animal welfare indicator were the mutual significant factors in more than 2 regression models. Further studies on cost-effectiveness analysis are needed to support the hypothesis that better BS level and higher animal welfare standards are effective to reduce AMU.

1. 目的

2016年4月に薬剤耐性アクションプランが発表され、2020年までに畜産分野で分離される大腸菌のテトラサイクリンに対する耐性率を2014年の45%から33%に下げるという目標が設定された¹⁾。耐性率を下げるためには、耐性菌の選択圧を下げることが有用であり、そのためには抗菌剤の使用量を削減する必要がある。日本における動物用抗菌剤の半分は豚用に販売されており²⁾、養豚分野での抗菌剤使用量の削減はきわめて重要度が高い。しかし抗菌剤使用量の削減は、感染性疾患の発生リスクを高め、畜産経営に多大な影響を及ぼす可能性がある。

養豚農家の感染症対策には、①感染症の農場への侵入リスクおよび農場内でのまん延リスクを下げる方法、仮に侵入した場合でも家畜が感染・発症しないように②ワクチン接種、③予防的な抗菌剤投与を行う方法がある。また、④アニマルウェルフェアの確保も家畜のストレスを軽減し感染症への抵抗力を高める効果があることからヨーロッパ諸国では奨励され、日本でも東京オリンピックでの食料供給に向けて一部の農家で取り組みが検討されている。これらの方法は互いに補完的であり、抗菌剤の使用量はこれらの方法のどれを組み合わせて実施するかの戦略検討により決まると考えられる。

本研究は、畜産農家における動物用抗菌剤の使用と関連し、かつ畜産農家にとって実現可能な措置として考えられる農場バイオセキュリティ(BS)水準およびアニマルウェルフェア水準と農場レベルでの動物用抗菌剤使用量との関係について疫学的解析を行い、感染症対策の戦略に影響を及ぼす要因を上記の2因子と仮定し、各要因の戦略への影響度を推定することにより、抗菌剤に依存しない予防対策の推進に有効な手段を探求する

ことを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 農場における抗菌剤使用量データなどの収集および算出方法

農場における抗菌剤使用量データは、日本養豚開業獣医師協会（JASV）の会員獣医師とコンサルティング契約を結ぶ養豚農家（N = 121）から収集した。2015年1月1日～12月31日の1年間にこれらの農場を対象に発行されたすべての抗菌剤処方記録（品目名、販売単位規格、数量）のデータを指示書集計システム（伊藤貢JASV会員獣医師が開発したシステム）を用いて統合抽出した。WHOのATCvet分類に基づき、日本での販売が認可されている動物用抗菌剤のうち豚を対象畜種として含むすべての製品に7桁の抗菌剤コードを付与したリストを作成し、13の抗菌剤クラスおよび42の薬剤を投与経路別に有効成分重量（グラム）で算出した。抗菌剤コードは1桁目に投薬経路、2および3桁目に抗菌剤クラス、4から6桁目に製品番号、7桁目に包装単位を設定した³⁾。2015年の農場別の年間出荷頭数値については、「PigINFO（JASVおよび農研機構動物衛生部門により共同開発された生産性に関するベンチマー킹システム）」で収集されたデータを用いた。これらのデータを用いて、次式により2015年における出荷豚1頭当たりの抗菌剤使用量を算出した。

$$\text{2015年出荷豚一頭当たりの有効成分重量(g／頭)} = \frac{\text{2015年処方の有効成分重量(g)}}{\text{2015年年間出荷頭数(頭)}}$$

2.2 農場BSレベルの評価

農場BSレベルの評価には、「BioAsseT（大竹聰JASV会員獣医師他からなるPRRS撲滅推進チームJAPAN）」⁴⁾により開発された農場BSレベルのスコアリングシステム）を参考に、新たに質

Table 1 Categories of the biosecurity level assessment tool, their number of questions, their allotment of scores, their contents asked and the results from 38 farms.

Categories	Sub-Categories	# Questions	Subtotal Scores	Average	SD	Max	Min	Contents
A. Site	1. Site conditions	4	16	9.58	3.75	16.00	3.67	Site conditions.
B. External Biosecurity	Subtotal	18	24	13.08	3.63	20.73	5.61	Prevent disease-causing agent from entering/leaving farms.
	2. Replacement Gilts	3	4	1.90	0.79	3.56	0.44	Introduction and acclimation of replacement gilts.
	3. Personnels	2	4	2.26	1.11	4.00	0.00	Entrance requirements for employees.
	4. Transport Vehicles	4	4	2.77	0.71	4.00	1.00	Status of transport vehicle use.
	5. Manure & Carcass	5	4	2.53	0.73	4.00	1.13	Status of manure and carcass disposition.
	6. Vermin Controls	2	4	2.23	0.89	3.33	0.00	Status of vermin control against rodents and wild birds.
	7. Farm Contractors	2	4	1.39	1.12	4.00	0.00	Entrance requirements for farm contractors.
C. Internal Biosecurity	Subtotal	26	24	12.38	3.71	21.48	6.31	Prevent the spread of disease on farms.
	8. Pen Layouts	2	4	2.05	1.09	4.00	0.00	Status of pen layouts.
	9. Pigflows	6	4	2.07	0.95	3.67	0.00	Status of AIAO implementations and pig treatments.
	10. Cleaning & Disinfection	9	4	2.58	0.66	3.70	1.04	Status of cleaning & disinfections on each pen.
	11. Personnels	2	4	1.09	1.06	4.00	0.00	Status of clothes change implementations of employees.
	12. Injection Needles	3	4	1.45	1.21	4.00	0.00	Status of needle change implementations.
	13. Delivery Stalls	4	4	3.14	0.71	4.00	1.00	Status of delivery stall managements.
	Total	48	—	—	—	—	—	

問票を作成し、2017年7月～12月の期間にアンケート形式で回収した。本アンケートはA. 立地、B. 農場外BS、C. 農場内BSの3大項目からなり、それぞれA. 農場の立地条件、B. 農場への病原体の侵入防止、C. 農場内における病原体の伝搬防止の水準を測定することを目的としている。これらの3大項目は合計13の小評価項目からなり、評価は現場で実践されうる最大限の対策がとられている場合はA評価、まったく取られていない場合はE評価とし、4点満点で評価した(Table 1)。従来、立地条件はB. 農場外BSに含まれてきたが、他の項目と異なり自助努力での改善が難しい項目であることから独立させ大項目A. 立地とした。A. 立地条件では、近隣の農場との位置関係や公道および畜場との距離を評価した。大項目に関しては、立地BSスコアは16点満点、農場外BSスコアは24点満点、農場内BSスコアは24点満点で算出した。小項目に関しては、各質問に対する結果の平均値を採用した。2015年「PigINFO」に参加し、かつ2015年の年間抗菌剤使用量データを提出した農場のうち、アンケートが回収された38農場を解析の対象とした。アンケート実施期間は抗菌剤使用量調査および「PigINFO」の参加期間

とは一致しないが、BSレベルはPRRS等の重度の伝染性疾患が流行しないかぎり大きく変化することはないと考え、本研究ではこれらの農場で重度伝染性疾患の発生がなかったことを確認した上で査定結果を採用し、現時点で入手可能な最新のデータを用いた。

2.3 アニマルウェルフェアの観点からの適正飼養指標の決定

欧州委員会が定義する養豚に関するアニマルウェルフェア基準は、1991年に制定（欧州連合、EU指令91/630/ECC）された後、2008年に改正（EU指令2008/120/ECC）された「豚の保護のための最低基準を定める理事会指令」に基づくものである⁵⁾。主要な規定には①体重別の豚1頭当たりの十分な飼養面積の確保、②豚房のスノコ床の利用面積の制限、③豚房の水はけ効率を考慮した床面積の確保、④群飼の実施（妊娠豚の受胎後4週間から分娩1週間前までの期間のストール飼育禁止）、⑤群飼における十分な給餌量および咀嚼要求を満たす粗飼料の確保、⑥病豚の隔離房の設置、⑦豚房の気温、⑧遊具の設置、⑨習慣的な断尾・切歯の禁止、等がある。EU加盟国は本指令に基づき国内法を制定しこれらの基準を実施して

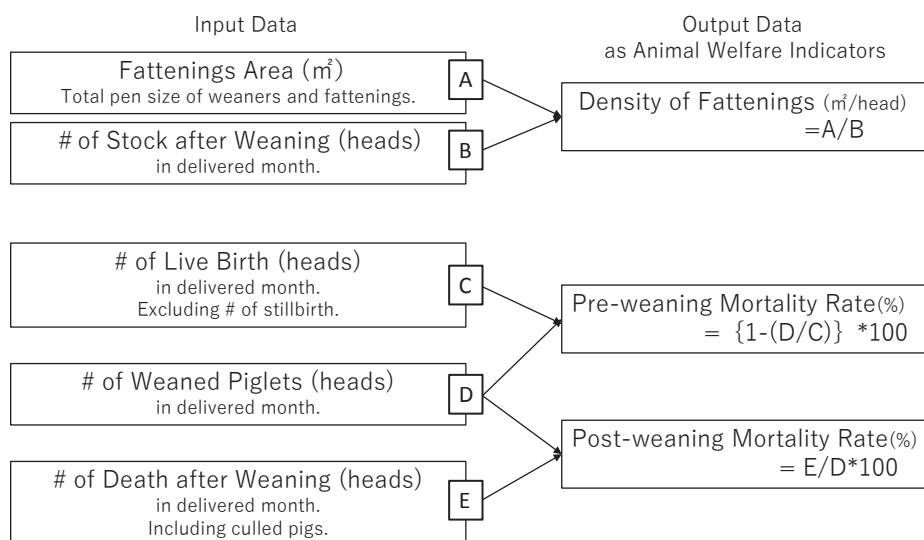


Fig. 1 Definition formula for calculating animal welfare indicators in delivered month.

いる。特に、動物用抗菌剤使用量の低減に成功しているデンマーク・オランダ⁶⁾ではEU指令に対応し、自主的な強化規制を設けている⁷⁾。本国では2016年に社団法人畜産技術協会により「アニマルウェルフェアの考え方に対応した豚の飼養管理指針」⁸⁾が公表されたが、養豚現場では作業効率が重要視される傾向があることに加え、飼養スペースの絶対的な不足により、アニマルウェルフェア基準の達成に積極的に取り組む農場は少ないのが現状である。本研究では、家畜の快適性に配慮した飼養管理を徹底することで家畜へのストレスが減少し、疾病発生および抗菌剤を使用する治療機会が低減されると考え、死亡率が高いほどアニマルウェルフェア水準が高いと仮定した。適正飼養指標には、現在「Pig INFO」において収集可能なデータである「肥育密度 ($m^2/\text{頭}$)」、「哺乳中死亡率 (%)」および「離乳後死亡率 (%)」の年間平均値を採用した。各指標の月ごとの定義式はFig. 1 のとおりである。

2.4 統計解析

説明変数となる因子と従属変数である抗菌剤使用

量との関係性について回帰分析モデルを用いて解析を行った。多変量解析を行うにあたって、統計学的に有意な説明変数をステップワイズ法で検討した。統計分析はすべてSPSS Ver.24 (IBM) を用いて行い、統計学的有意水準は $p < 0.05$ とした。

3. 結果と考察

3.1 記述統計

38農場における2015年出荷豚頭数は平均16936.01頭（標準偏差SD = 25963.93）となり、ばらつきが認められた。2015年出荷豚1頭当たりの抗菌剤総使用量は平均25.61 g (SD = 22.66) であった。そのうち経口抗菌剤が97%以上を占めており、使用量が最も多かった抗菌剤はテトラサイクリン系 (47.92%) で、次いでマクロライド系 (13.26%), ペニシリン系 (10.54%), サルファ剤 (9.05%) であった。テトラサイクリン系使用量の内訳は、オキシテトラサイクリン59.86%, ドキシサイクリン31.93%, クロルテトラサイクリン8.21%であった。

自記式質問表によるBSレベル査定結果のA.立

Table 2 Results of multivariable general linear regression models (n=38). The figure shows the most fitted combinations judged by adjusted R² value. The boldface shows independent variables with significance in more than 2 different dependent variables.

Independent Variables		Dependent Variables						
		Total Oral Antimicrobial Usage	Doxycycline Usage	Thiamphenicol Usage	Penicillins Usage	Sulfonamides Usage	Macrolides Usage	Fluoroquinolones Usage
		Standardized Coefficients (β)						
A. Site	1. Site conditions	-0.367				-0.529		
B. External Biosecurity	2. Replacement Glits	-0.274		-0.223				
	3. Personnels							
	4. Transport Vehicles							
	5. Manure & Carcass		-0.287					
	6. Vermin Controls						-0.412	
	7. Farm Contractors	-0.330						
C. Internal Biosecurity	8. Pen Layouts					-0.550		
	9. Pigflows		-0.289	-0.375				-0.552
	10. Cleaning & Disinfection							
	11. Personnels							
	12. Injection Needles							
	13. Delivery Stalls							
D. Animal Welfare Indicators	14. Density of Fattenings				0.582			
	15. Pre-weaning Mortality Rate	0.441	0.456					
	16. Post-weaning Mortality Rate	0.329	0.428					
	Adjusted R ²	0.376	0.541	0.689	0.260	0.531	0.283	0.285
	p-value	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001
	n	38	38	38	38	38	38	38

地スコアは平均9.58点 (SD = 3.75), B. 農場外BSスコアは平均13.08点 (SD = 3.63), C. 農場内BSスコアは平均12.38点 (SD = 3.71), であった。各小項目の結果はTable 1 のとおりである。

D. 適正飼養指標の結果は、肉豚飼養面積は平均1.40 m²/頭 (SD = 0.79), 哺乳中死亡率は平均11.36% (SD = 3.49), 離乳後死亡率は平均6.71% (SD = 3.64) であった。

3.2 養豚場における抗菌剤使用量と農場BSレベルおよび適正飼養因子との関連

農場における抗菌剤使用量を目的変数とし、農場BSレベルおよび適正飼養指標を説明変数に用いた多変量解析の結果はTable 2 のとおりである。

経口抗菌剤使用量に影響する因子として、影響力の大きい順にA. 立地条件, B. 農場外BSスコアの小項目7. 工事業者および2. 更新豚に関するBS対策があげられる (p < 0.001)。モデルの全体説明力 (Adjusted R²値) は37.6%と低く、C. 農

場内BSおよびD. 適正飼育因子の影響は認められなかった。豚の飼養密度が低い地域に位置し農場が隔離されること、また長期間農場にて飼育される更新豚の導入に関する対策を講じ、他の農場に入り出する頻度が高い工事業者への入場規則を徹底することにより、群投与される経口抗菌剤使用量の低減につながることが示唆された。豚舎の立地条件は既に建設された豚舎での改善は難しいが、同等レベルで重要な因子である農場外BSの強化が求められる。

次に全体説明力が高いドキシサイクリン、チアンフェニコール類、サルファ剤の使用量を目的変数としたモデルでは、いずれも使用量に影響する要因に適正飼養因子が含まれた。ドキシサイクリンおよびチアンフェニコール類の使用量に影響力を及ぼす共通因子には、影響力の大きい順に哺乳中死亡率、離乳後死亡率およびC. 農場内BS小項目9. ピッグフローがあげられ (各々 p < 0.001),

双方ともに哺乳中死亡率の改善が最も有用な対策であると考えられる。哺乳中死亡率の改善には初乳の十分な給与ならびにそれに伴う貧血対策、分娩舎の保温、去勢や断尾に際する子豚のストレス軽減があげられる^{9~11)}。一般的にアニマルウェルフェアの観点における適正飼養基準では、長期間農場で飼養される母豚を対象とした基準が多く設けられており、肉豚の死亡率が適正飼養指標として正しく反映されているかの検討が必要である。一方、サルファ剤の使用量に影響する因子では、肉豚飼養面積が広いほど、またC.農場内BS小項目6.害獣管理のスコアが低いほど多く使用していた。その原因としてサルファ剤は安価な第一選択薬の一つであり、肉豚飼養面積が広く疾病管理がしやすい農場において、グレーサー病などの日和見感染対策として予防的に使われた可能性が考えられるが、さらなる調査が必要である。さらに、農場内のネズミや野鳥対策が不足している農場において害獣により媒介されるサルモネラ症などの対策として使用されたと考えられる。

最後に、最重要抗菌剤に定義¹²⁾されるフルオロキノロン系使用量に影響する因子として、C.農場内BSの小項目9.ピッグフローのスコアが高いほど使用量が少なかった（ $p < 0.001$ ）。この小項目9.ピッグフローでは、各生産ステージの豚舎のall-in/all-out (AI/AO) の徹底レベルや病豚・出荷残り豚の扱いが評価対象となっている。棟単位での完全なAI/AOの実施や病豚の早期隔離などの個体管理の徹底により、二次選択薬のフルオロキノロン系抗菌剤による治療が必要となるような大腸菌性下痢症や胸膜肺炎の発生が減少していくとも推測される。

本研究では現時点で入手可能なデータを基に、抗菌剤使用量と農場BSレベルおよび適正飼養指標との間の関連が認められた。農場BSレベルの向上に加え、哺乳期の疾病管理を改善し死亡率を

改善することで抗菌剤使用量の低減につながることが示唆された。

今後は品質認証基準を参考とした母豚中心のアニマルウェルフェア水準評価方法を確立すること、また重要なBS対策の向上に掛かる経費および労力を推定する費用・有効度分析の研究を進めることにより、抗菌剤使用量削減のために有効な具体的方策を特定できると考える。最後に、本研究における抗菌剤使用量データおよびアンケートの収集に協力くださいました、日本養豚開業獣医師協会（JASV）会員獣医師および生産者、「PIGINFO」関係者の皆様に深謝する。

4. 要 約

本研究では、日本養豚開業獣医師協会（JASV）会員獣医師とコンサルティング契約を結ぶ38農場について、①2015年の出荷肉豚1頭当たりの年間抗菌剤使用量データ、②自記式質問表による農場バイオセキュリティレベル（BS）の評価結果および③ベンチマー킹から得られたアニマルウェルフェアに基づく適正飼養指標を用いて、農場における動物用抗菌剤使用量における各要因の影響度について疫学的解析を行った。その結果、経口抗菌剤使用量に影響する因子として、影響力の大きい順にA.立地条件、B.農場外BSスコアの小項目7.工事業者および2.更新豚に関する対策があげられた（ $p < 0.001$ ）。豚の飼養密度が低い地域に位置し農場が隔絶されること、また長期間農場にて飼育される更新豚の導入に関する対策を講じ、他の農場に出入りする頻度が高い工事業者への入場規則を徹底することにより、群投与される経口抗菌剤使用量の低減につながることが示唆された。次に各抗菌剤使用量における共通因子として、BS水準では①農場の立地条件、②農場で長期飼養される更新豚の導入に関する条件および③ピッグフロー（各生産ステージの豚舎のAI/

AOの徹底レベルや病豚・出荷残り豚の扱い), また適正飼養指標としては哺乳期死亡率があげられ, これらの改善が抗菌剤使用量の低減につながることが示唆された。

今後は母豚を中心としたアニマルウェルフェア水準評価方法の確立および重要なBS対策の向上の費用・有効度分析の研究を進めることにより, 抗菌剤使用量削減のために有効な具体的方策を特定できると考える。

参考文献

- 1) 農林水産省：薬剤耐性（AMR）対策アクションプラン2016—2020。農林水産省ホームページ, 2016.
http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuzi/pdf/yakuzai_honbun.pdf
- 2) 松田真理ら：日本における家畜バイオマス重量当たりの抗菌剤使用量の評価—細井らの方法とEUの方法による評価結果の比較—, 家畜衛生学雑誌, 42, 191~197, 2017.
- 3) 松田真理ら：養豚場における抗菌剤使用量の測定のための豚用抗菌剤IDリストの作成の試み, 日本獣医師会雑誌, 71 (1), 15~17, 2018.
- 4) PRRS撲滅推進チームJAPAN : <http://site-pjet.com/>
- 5) The Council of the European Union : COUNCIL DIRECTIVE 2008/120/EC of 18 December 2008— laying down minimum standards for the protection of pigs, 2008.
<http://eur-lex.europa.eu/eli/dir/2008/120/oj>
- 6) European Medicines Agency : Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2015 —Trends from 2010 to 2015 Seventh ESVAC report, October 2017.
http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2017/10/WC500236750.pdf
- 7) Wageningen UR Livestock Research : Report 273 EU-Welfare legislation on pigs, March 2010.
<http://edepot.wur.nl/136142>
- 8) 社団法畜産技術協会：アニマルウェルフェアの考え方に対応した豚の飼養管理指針, http://www.maff.go.jp/j/chikusan/sinko/attach/pdf/animal_welfare-10.pdf
- 9) ピッグフォーラム22：『養豚の教科書』ベネット, 2016.
- 10) 中村高志：「子豚が生まれてからすぐやるべきこと！」, 『Pig Journal』2014年3月号, p12-15, アニマル・メディア社, 2014.
- 11) Xavier Manteca, Bryan Jones : Improving farm animal welfare, 1st edition, p175-200, Wageningen Academic Publishers, the Nederlands, 2013.
- 12) WHO : Critically important antibacterial agents for human medicine for risk management strategies of non-human use, 2005.
http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43330/1/9241593601_eng.pdf?ua=1&ua=1

初乳に含まれる抗菌因子の機能を利用した子牛の下痢症予防

Inhibition of diarrhea in calf by utilizing colostrum antimicrobial components

磯 部 直 樹

(広島大学大学院生物圏科学研究所)

Naoki Isobe

(Graduate School of Biosphere Science, Hiroshima University)

The present study was undertaken to find the preventing methods of diarrhea in calf by investigating the relationship between antimicrobial components in colostrum and diarrhea. In the first experiment, blood was collected from calves at 0, 1 and 30 days after birth. Plasma concentrations of IgA and IgG were dramatically increased at 1 day compared with those at 0 day, followed by the decrease at 30 days. This results indicates that immunoglobulin was moved through intestine wall to blood circulation directly without digestion. In the second experiment, blood, saliva and feces were collected from calves at 0, 1, 7, 14, 28 and 50 days after birth. Colostrum was also collected. Concentrations of IgA, IgG and LAP (antimicrobial components) in colostrum fed calves without diarrhea tended to be higher than those with diarrhea. Calves without diarrhea showed higher IgA concentration in serum and feces at 1 day. Since IgA in colostrum absorbed through intestine wall into blood within 1 day after birth, high concentration of IgA in serum and feces must be due to its high amount in colostrum. LAP concentration was increased at 7 days followed by gradual decrease towards to 50 days, whereas, there is no significant difference between calved with and without diarrhea. These results suggest that immunological antimicrobial components in colostrum was associated with the incidence of diarrhea in calf, which has important implications toward controlling the diarrhea in calf.

1. 目 的

肉牛を生産するためには子牛の日増体量を最大にすることが重要である。子牛が感染症にかかると増体量が激減するため、感染症予防には細心の注意が払われている。しかし、全国の消化器病による出生子牛の死廃事故別頭数は12,000頭であり（平成23年度家畜共済統計表）、その被害額は北海

道だけでも十数億円にものぼる。子牛の消化管感染時の主な症状が下痢であり、これを防ぐことは効率的な成長にとって非常に重要となる。

子牛の感染症を防除するためには高い免疫機能を維持させることが重要となる。子牛の免疫機能は、母牛の免疫グロブリンを豊富に含んだ初乳によって得られる“移行免疫”と、子牛自身が制御する“獲得免疫”的二つがある。そのうち、生後

最初の生体防御機構は、前者の初乳中に含まれる移行抗体によるものであり、その移行抗体量は、初乳の質、量および給与時間に影響を受ける。

現在の初乳給与法は、「生後6時間以内に、1回2Lの初乳を飲ませること」が推奨されている。しかし今まででは、初乳給与のタイミングや量については研究されてきたが、初乳の成分については十分に検討されてこなかった。

我々は牛乳に多くの種類の抗菌物質が含まれていることを示してきた^{1~5)}。これらは広い抗菌スペクトラムを有しており、子牛下痢症の原因となるウイルス、細菌、寄生虫および真菌などに対しても抗菌性を示すことが知られている。さらに、抗菌物質は初乳だけでなくそれ以降の常乳でも高濃度で含まれている。したがって、これらの抗菌物質は、子牛内の病原体の排除に働き、下痢症を予防していることが強く示唆される。また、我々はこの抗菌因子の牛乳中濃度が母牛個体によって顕著に異なることを発見した⁶⁾が、なぜこのような違いが出るのかは未だに不明である。また、唾液中にも多くの抗菌物質が含まれており、これらは子牛個体によって濃度差が認められた。しかし、個体差の原因とその結果どのような生理的違いが出るのかは明らかになっていない。

そこで本試験では、初乳および唾液中の抗菌物質を考慮に入れた子牛下痢の予防法を確立することを目的として、抗菌物質の濃度と子牛の下痢症との関係を調べた。

2. 方 法

2.1 子牛血清中の免疫グロブリンの濃度変化

初乳中の免疫物質としての免疫グロブリン(IgA, IgG)は子牛の腸管から直接吸収され、血中に移行すると言われているため、これを確認した。

生後0, 1および30日目の子牛（8頭）から血

液を採取して、遠心分離して血清を分離した。血清中のIgAおよびIgGの濃度を酵素免疫測定法で測定した。

2.2 子牛の唾液、血清および糞中の抗菌因子と下痢との関係

初乳を摂取した後に唾液、腸管および血中の免疫物質が変化すると考えられるので、これらのサンプル中のIgA, IgGおよびLAP（抗菌物質のひとつ）を調べた。生後0, 1, 7, 14, 28, 50日目の血液（7頭）、6, 14, 28, 50日目の唾液（10頭）を採取した。また、糞（7頭）は生後直後と1日後に採取した。血液は遠心分離後血清を分離した。唾液は約5cm四方の脱脂綿を子牛の口腔内に約10秒留置し、唾液を吸収させた。その脱脂綿の一部を取り取り、唾液分離用の遠心チューブ（サリベット、ザルスタット社）に入れ、遠心分離することにより唾液を分離した。糞は凍結乾燥した後、50mgを1mlトリス緩衝液内で攪拌した後、遠心分離し、その上澄みを用いた。血清、唾液、糞および初乳について、IgAおよびIgG濃度を、唾液および初乳についてはLAP濃度も測定した。そして、これらの濃度と子牛の下痢発生との関係を調べた。

3. 結果と考察

生後0, 1および30日目の子牛の血液中IgAおよびIgG濃度を測定した（Fig. 1）。IgAおよびIgG濃度ともに生後1日目で激増し、その後30日目にかけて減少した。生後24時間以内の子牛の腸管では初乳中のタンパク質が分解されることなく直接吸収されると言われていることから、IgAおよびIgGのような免疫グロブリンも消化管から直接血中に移行したと考えられる。しかし、生後30日になると、乳中のIgAおよびIgGの濃度が初乳に比べて低下することから子牛の血清中濃度も低下したと思われる。また、乳中にこれらの免疫

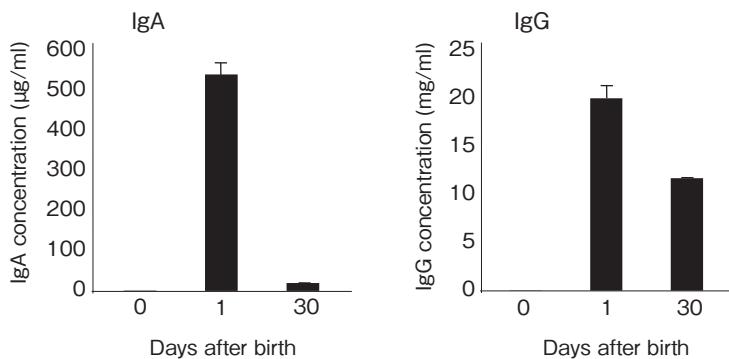
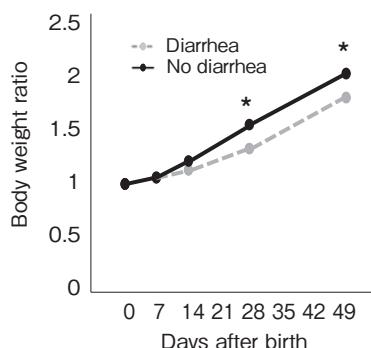


Fig. 1 Changes in IgA and IgG concentrations in calf serum

Fig. 2 Body weight of calves with and without diarrhea Asterisk means significant difference between groups ($p<0.05$)

グロブリンがあったとしても、30日後では消化管から吸収されないので、血清中の濃度も低下したのだろう。生後30日においてIgGよりもIgAの濃度の方が7日目に対する低下割合が顕著であった。IgAは主に粘膜免疫として働いており、血中から結合組織へ移行した形質細胞から分泌されて、腸管内へ入り⁷⁾、腸管内の病原体を攻撃する。したがって、IgAは血液内よりも腸管内に存在するため、濃度が低下したと考えられる。そこで、実験2では腸管内のIgAの存在を確認するために糞中の濃度も測定した。

実験2で用いた子牛の体重変化を、0日目を1とした割合で示した (Fig. 2)。下痢を起こした子牛の方が体重増加が緩やかで、生後28および50日目では、下痢をしてない子牛の方が下痢をした

それに比べて有意に重かった。これらは下痢をすると体重の増加が顕著に遅くなることを改めて示したものである。

この体重の差が初乳の影響かを調べた結果、初乳中のIgA、IgGおよびLAP濃度すべてで下痢をしなかった子牛が飲んだ初乳の方が下痢をした子牛のそれらに比べて高い傾向であった (Fig. 3, $P = 0.39, 0.08, 0.21$)。したがって、初乳中の抗菌物質が子牛の免疫機能に影響を及ぼしている可能性が示唆された。

また、初乳が子牛の免疫機能に影響を及ぼすかを調べた結果、唾液中のIgAの濃度はいずれの区でも生後28日目に比べて50日で増加する傾向が認められた (Fig. 4)。唾液腺では多くの形質細胞が分布しており、これらがIgAを分泌し、導管を

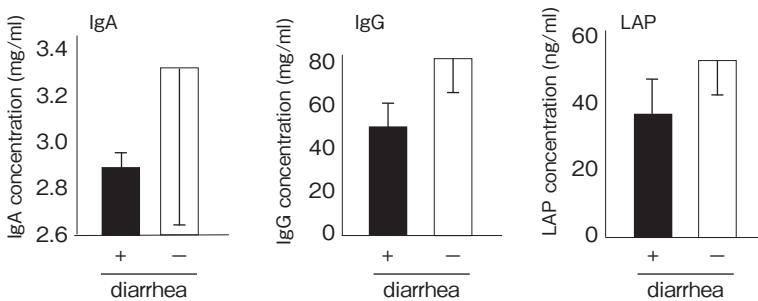


Fig. 3 IgA, IgG and antimicrobial peptide (LAP) concentrations in colostrum fed to calves with and without diarrhea

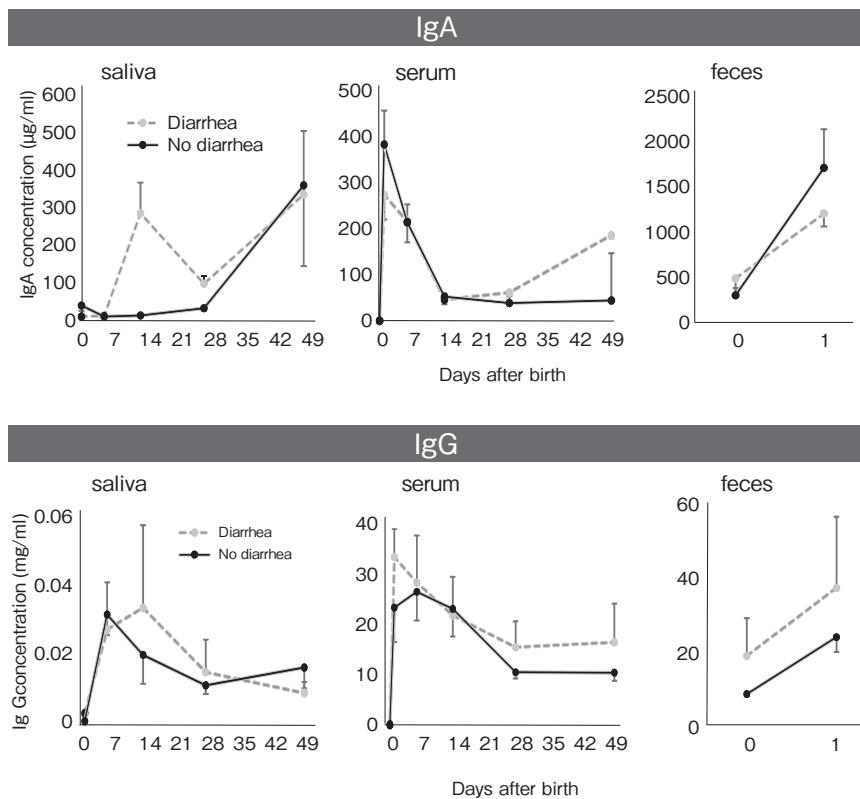


Fig. 4 IgA and IgG concentrations in saliva, serum and feces of calves with and without diarrhea

通って唾液とともに口腔内へ分泌されている⁸⁾。このような唾液腺によるIgAの分泌は生後28日以後に始まるのかもしれない。しかし、下痢を起こした区では14日目でも高くなかった。これは下痢を起こす病原体が口腔に侵入したことにより、唾液中にIgAが増えた結果と考えられる。しかし、唾液中のIgAの濃度において区間に有意な差は

なかった。今後はさらに頭数を増やして検討する必要がある。

初乳中のIgAの一部は腸管から吸収され血中に入り、残りが糞として体外に排出される。1日目の糞中IgA濃度を区間で比較すると、下痢を起こさなかった子牛の方が高い傾向を示した(Fig. 4, P = 0.19)。また、1日目の血清中IgAの濃度

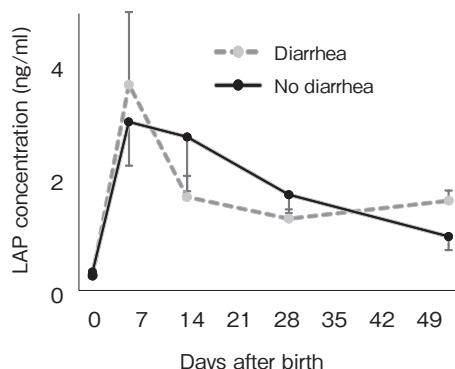


Fig. 5 LAP concentration in saliva of calves with and without diarrhea

も下痢を起こさなかった子牛の方が高い傾向を示した (Fig. 4, $P = 0.14$)。このように、糞中および血清中いずれも下痢を起こさなかった方が高い濃度であったことは、上述した初乳中のIgAの濃度が高かったことによるものと考えられ、初乳中IgAは下痢の抑制に重要である可能性が示唆された。

血清中および糞中のIgGの濃度の変化はIgAと似ており、1日目で増加しその後減少した (Fig. 4)。したがって、初乳中のIgGが消化管から吸収されたり、糞中に排出されたと考えられた。唾液中のIgGは生後7～14日で少し増加しその後減少した。IgGは粘膜免疫の機能はないので、これらのIgGは初乳の由来と考えられる。

唾液には多くの抗菌物質が含まれており、その一つがlingual antimicrobial peptide (LAP) である。これは、乳房内でも活発に合成されており、乳中に含まれている^{1,2)}が、唾液中にも存在している。子牛の唾液中LAP濃度を測定したところ、出生直後は濃度が低かったが、1日目で急増し、その後徐々に減少した (Fig. 5)。初乳中のLAPは常乳に比べて高いことから、7日目の唾液中LAP濃度が高いのは、初乳に含まれていたLAPが混入したのかもしれない。このLAPが腸管の免疫に重要と考えられるが、下痢の有無によって

LAPの濃度に有意な違いはなかった。この点については今後さらに例数を増やして検討する必要がある。

4. 要 約

初乳および唾液中の抗菌物質を考慮に入れた子牛下痢の予防法を確立することを目的として、抗菌物質の濃度と子牛の下痢症罹患との関係を調べた。まず、生後0, 1および30日目の子牛から血液を採取して、血清中のIgAおよびIgGの濃度を測定した。IgAおよびIgG濃度とともに生後1日目で激増し、その後30日目には減少した。1日目で濃度が高くなったのは、初乳中のIgAおよびIgGが消化管から直接血中に移行した結果と考えられる。次に、生後0, 1, 7, 14, 28, 50日目の血液、6, 14, 28, 50日目の唾液を採取した。また、生後直後と1日後には糞も採取した。血清、唾液、糞および初乳のIgA、IgG濃度およびLAP濃度を測定し、これらの濃度と子牛の下痢発生との関係を調べた。初乳中のIgA、IgGおよびLAP濃度は下痢を起こさなかった子牛が飲んだものの方が下痢を起こした子牛のそれらに比べて高い傾向であった。生後1日目の糞および血清中IgA濃度は、下痢を起こさなかった子牛の方が起こした牛に比べて高かった。初乳中IgAの一部は腸管から吸収され血中に入り、残りは糞とともに排出されるので、初乳中IgAが多かったため、血清および糞中IgA濃度も高かったと考えられる。唾液中のLAP濃度は7日目に高くなりその後徐々に減少したが、区間に有意差はなかった。以上の結果から、初乳中の免疫関連抗菌物質は下痢の抑制に関与しており、これを用いた下痢予防の可能性が示された。

文 献

- 1) Isobe, N., Nakamura, J., Nakano, H., Yoshimura, Y. : *Journal of Dairy Science*, **92**, 2691~2695, 2009.
- 2) Isobe, N., Hosoda, K., Yoshimura, Y. : *Animal Science Journal*, **80**, 446~450, 2009.
- 3) Zhang, G. W., Lai, S. J., Yoshimura, Y., Isobe, N. : *Veterinary Microbiology*, **170**, 125~134, 2014.
- 4) Zhang, G. W., Lai, S. J., Yoshimura, Y., Isobe, N. : *The Veterinary Journal*, **202**, 89~93, 2014.
- 5) Srisaikham, S., Suksombat, W., Yoshimura, Y., Isobe, N. : *Animal Science Journal*, **87**, 423~427, 2016.
- 6) Kawai, K., Akamatsu, H., Obayashi, T., Nagahata, H., Higuchi, H., Iwano, H., Oshida, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. : *Veterinary Immunology and Immunopathology*, **153**, 298~301, 2013.
- 7) Suzuki, K., Nakajima, A. : *International Immunology*, **26**, 489~494, 2014.
- 8) Matsukawa, S., Ueno, K., Sugino, T., Yoshimura, Y., Isobe, N. : *Animal Science Journal*, (in press) 2018.

周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの発症予知と制御

Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy cows

佐藤 繁・櫛引史郎*

(岩手大学農学部共同獣医学科, *農業・食品産業技術総合研究機構畜産草地研究部門)

Shigeru Sato and Shiro Kushibiki*

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University,

*National Institute of Livestock and Grassland Science)

The objectives of this project are to clarify the current incidence rate and pathogenesis of subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows using radio transmission pH measurement system, and further, to assess the diagnostic availability for post-partum SARA at the pre-partum stage. Ten dry period and multiparous Holstein cows (A herd, $n=2$; B herd, $n=4$; C herd, $n=4$) were used in this experiment, and the amount and composition of diets were thoroughly managed. The nutritional management during the transition period, and milk yield and breeding performance at the post-partum were monitored. Rumen fluids were collected at 3 weeks pre-partum and 2, 4, and 6 weeks post-partum for analysis of VFA, ammonia, and lactic acid, LPS activity. Furthermore, liver tissues were biopsied at 3 weeks pre-partum and 2 and 6 weeks post-partum, and transcriptomic dynamics were evaluated using microarray method.

As a result, ruminal pH decreased dramatically, and the difference between maximum and minimum within diurnal changes (diurnal deviation) maximized at the post-partum compared with the pre-partum. During 2 weeks after parturition, 1 of 2 cows in A herd, 2 of 4 cows in B herds, and 1 of 4 cows in C herd were diagnosed with SARA (ruminal pH < 5.6 for more than 3 hours daily), and total incidence rate was 40% (4 out of 10 cows). Furthermore, SARA cows showed higher diurnal deviation at the pre-partum compared with non-SARA cows.

In conclusion, the use of wireless pH sensor during the transition period can detect SARA at the post-partum stage, and the prediction or prevention of the post-partum SARA might be possible at the pre-partum stage through an analysis of liver transcriptomic dynamics.

1. 目的

乳牛の泌乳量は栄養管理や育種改良の進展によって飛躍的に増加してきた。一方で泌乳量を維

持・向上させるために濃厚飼料が多給され、その結果、潜在性第一胃アシドーシス (SARA) が増加している。SARAは濃厚飼料などの易発酵性飼料の多給により揮発性脂肪酸 (VFA) の產生量

と吸収量のバランスが崩れて第一胃液pHが低下し、第一胃内細菌の死滅によって細胞壁からリポポリサッカライド（LPS）の遊離が亢進する病態である¹⁾。分娩後に発生するSARAは、代謝病（生産病）および繁殖障害の発生と密接な関連のあることが示唆されており、農家経営に多大な影響を及ぼす代謝障害リスクである。

本研究の目的は、申請者らが開発した無線伝送式pHセンサ^{2~5)}を用いて、乳牛の分娩後に多発するSARAの発生状況と発症リスクを明らかにし、将来的には分娩前の段階で分娩後SARAの発症予知と制御を目指すことである。これによって、乳牛の周産期に発生する種々の生産病を予防し、乳牛の健康を維持して食品としての牛乳と食肉の安全確保に貢献したいと考えている。

具体的には、乳牛の周産期における栄養管理状況が第一胃液pHの変動や第一胃内発酵（VFA、乳酸）に及ぼす影響、LPSの第一胃内産生と体内移行による生体反応、栄養吸収に関連するインスリン感受性の変化に及ぼす影響を解析する。さらに、SARAの病態生理解明を基盤として、正常な第一胃発酵機能の維持による分娩後SARAの制御効果や生産病の低減効果を検討する。

2. 方 法

申請者らが開発した無線伝送式pHセンサ（Fig.

1）を用い、野外の周産期乳牛を対象として栄養管理状態などSARAの発症リスクと病態生理を解析し、さらに、分娩前における分娩後SARAの発症予知と制御の可能性を検討する。そのため、「周産期乳牛におけるSARA発症のリスク解明」と「SARA発症牛における第一胃LPSカスケードと病態の解明および分娩前における分娩後SARAの発症予知」の課題に取り組む。なお、実験と採材および動物の飼養管理は、岩手大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号 A201452-2）。

2.1 供試牛群および供試牛

野外実態調査と病態解明に関する調査は、移行期の給与飼料内容や飼養管理状況が明らかな3牛群において、乾乳期の経産牛10頭（A牛群・2頭、B牛群・4頭、C牛群・4頭）を対象として行った。移行期における給与飼料などの飼養管理状況、さらに分娩後の泌乳量と繁殖成績を調査した。なお、供試したすべての牛において分娩前後に臨床的異常は認められなかった。

2.2 採材

第一胃液はカテーテルを用いて経口的に、血液は頸静脈から真空採血管を用いて、いずれも分娩前3週、分娩後2週、4週および6週の計4回採取した。また、肝組織は生検（自動生検針エースカット14G×115mm 22mmタイプ、タスク（株）、



Fig. 1 Appearance of the pH sensor of a radio transmission pH measurement system. The pH sensor (A), which is 184 g in weight, 30 mm in diameter, and 145 mm in length, was composed of a small-grass electrode (B) and antenna.

栃木) により分娩前3週と分娩後2週と6週の計3回採取した。

2.3 検査項目および方法

2.3.1 第一胃液pH, VFA, アンモニア態窒素および乳酸濃度

第一胃液pHは、無線伝送式pHセンサを用いて分娩前3—2週から分娩後6—8週までの間、10分間隔で連続測定した。VFA濃度の測定は、ガスクロマトグラフィー (HITACHI-163型、日立、東京) を用いて行った。アンモニア態窒素濃度の測定は、窒素自動蒸留装置 (ケルティックオート1035型、アクタック、東京) を用いた水蒸気蒸留法で、乳酸濃度の測定は、市販の乳酸測定キット (Fキット, D-/L-乳酸, R-Biopharm, ドイツ) を用いて行った。

2.3.2 第一胃液LPS活性値

LPS活性値は、LAL (Limulus amebocyte lysate) 試薬 (パイロクロム、生化学工業、東京) を用いたカイネティック比色法により測定した。

2.3.3 肝臓の遺伝子解析

肝臓の遺伝子解析は、組織から総RNAを抽出した後、マイクロアレイ法およびリアルタイムPCR法により行った。マイクロアレイ法は、約15,000のウシ遺伝子を搭載したウシ・オリゴDNAマイクロアレイ (Agilent Technologies, USA) を使用した。RNAサンプルからのcDNA合成、cDNAからのCyanine3 (Cy3)-CTP標識cDNAの合成、標識cRNAの精製、ハイブリダイゼーション、洗浄、スキャンおよびデータ解析の一連の操作を行った。

2.4 統計解析

マイクロアレイ法のデータはIngenuity Pathway Analysisソフトウェア (IPA, Ingenuity System, USA) を用い、統計処理はGene Spring GX12.0 (Agilent Technologies, USA) を用いて解析した。

3. 結果と考察

3.1 周産期乳牛におけるSARA発症のリスク解明

3牛群の10頭において、分娩前3—2週から分娩後6—8週までの間、第一胃液pHを連続測定した結果 (Fig. 2), pH値は分娩日以降に著しく低下し、分娩前に比べて低値、かつ1日の最大値と最小値との差異 (日内較差) が増大する傾向が認められた。A牛群では2頭中1頭、B牛群では4頭中2頭、C牛群では4頭中1頭において、分娩後2週以内に1日あたり3時間以上にわたって第一胃液pHが5.6以下の値を示し、これらの牛は分娩後SARAと診断され、その発症率は40% (10頭中4頭) であった。なお、分娩後SARA牛では非SARA牛に比べて、分娩前および分娩後における第一胃液pHの日内較差が大きい傾向が認められた。

これまでに、乳牛の周産期における第一胃液pHの変化を観察した報告^{2, 6)} およびSARAの予防を目的とした報告^{6, 7)} はあるが、分娩前の第一胃液pHの変動による分娩後SARAの摘発を目的とした研究はみられない。また、周産期の飼養管理状況と生産病の発生との間に関連があるとされているが、本課題のように飼養管理状況と第一胃液pHの連続的変化との関係を検討した研究はみられない。今後の解析によって、分娩前後の乳牛における第一胃液pHの変動のほか、飼料給与方法などの飼養管理法とSARA発症との関係が明らかになるとを考えている。なお、本課題において、分娩前後における飼養管理状況の調査は、すでに終了しており、現在、飼養管理状況とSARA発生との関係性について解析中である。また、第一胃液と血液は、分娩前2週、分娩後2週、4週および6週の計4回のサンプリングを終了しており、VFA、アンモニア態窒素、乳酸およびLPS活性

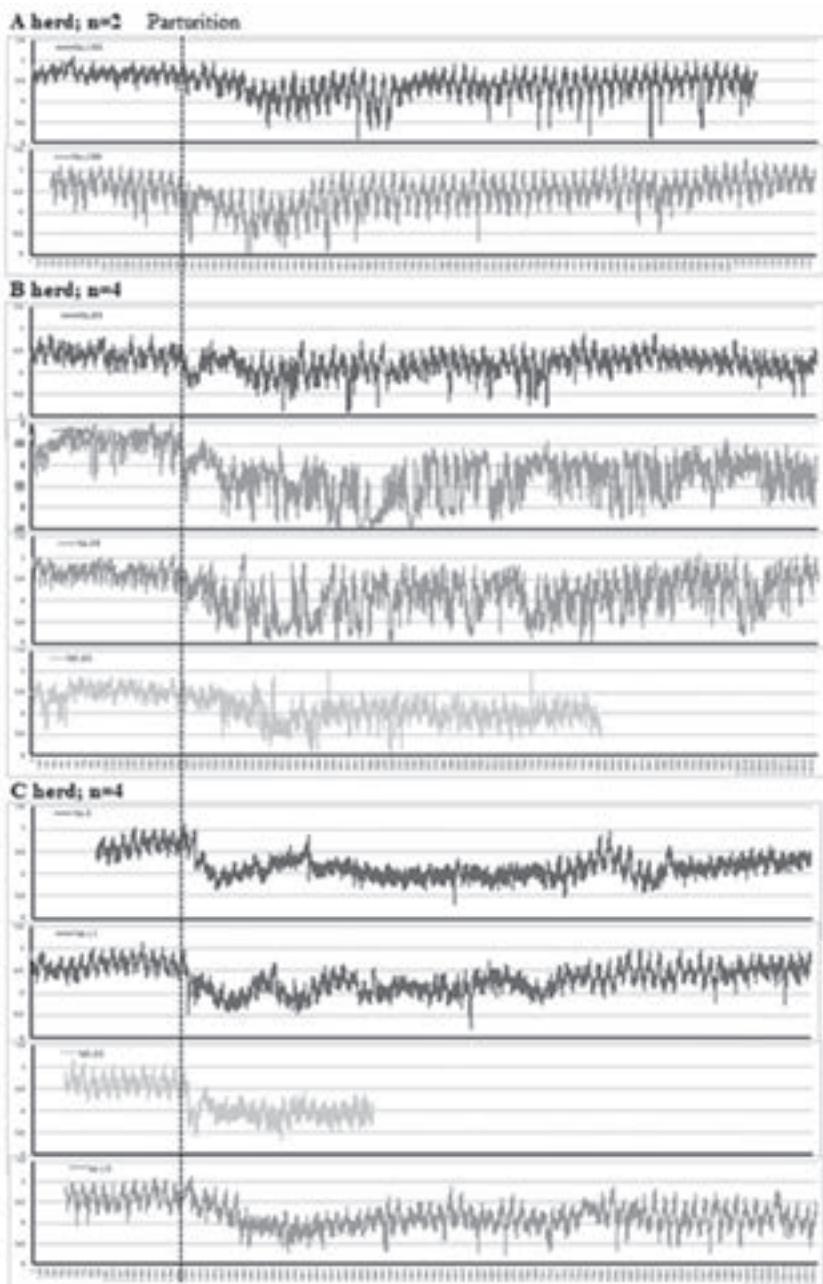


Fig. 2 Long term recording of the ruminal pH in the periparturient 10 cows (3 herds) from 2 weeks before parturition to 6 weeks after parturition. The ruminal pH decreased markedly after parturition, and the frequency of ruminal pH below 5.5 increased markedly in the 1-2 weeks after parturition. The circadian variations of the ruminal pH were regular in the pre-parturient period, however, it was irregular and larger in the post-parturient period.

値を解析中である。これらデータが出揃った段階で栄養管理上のSARA発症リスクを評価する予定である。

3.2 SARA 発症牛における第一胃 LPS カスクエードと病態の解明および分娩前における分娩後SARAの発症予知



Fig. 3 Relationship in the mRNA levels of genes related to amino acid metabolism, small molecule biochemistry, cellular function and maintenance in the SARA cattle. Red symbols denote significantly ($p \leq 0.05$) increased mRNA levels, whereas green symbols denote significantly ($p \leq 0.05$) decreased mRNA levels.

肝組織は、生検により分娩前3週、分娩後2週と6週の3回、すでにサンプリングを終了している。現在、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析（Fig. 3）およびリアルタイムPCR法による特定遺伝子の発現解析のためにRNAおよびcDNAサンプルを調整中であり、数ヶ月以内に解析を終了する予定である。これら解析データが出揃った段階で、肝組織における遺伝子発現状況について、分娩後SARAの発症牛と非発症牛との比較、さらには、分娩後SARA牛の分娩前と分娩後の比較を行い、肝組織における遺伝子発現の面から、SARAの病態解明にアプローチするとともに、分娩前における発症予知の可能性について検討する予定である。

SARA牛の肝組織における遺伝子発現、特にSARAに起因したLPSの影響に関する報告^{8, 9)}やSARA牛の第一胃粘膜における遺伝子発現に関する報告^{10, 11)}はあるが、いずれも実験的に誘発したSARA牛を対象として観察したもので、本課題の

ように野外の周産期乳牛を対象とした実証的研究はみられない。今後の解析によって、分娩前後の乳牛における肝組織中のエネルギー関連遺伝子のほか、分娩後SARA牛においてLPSカスケードや酸化ストレスと関連のある遺伝子の発現状況が明らかになるとを考えている。

4. 要 約

無線伝送式pHセンサを用いて、乳牛の分娩後に多発するSARAの発生状況と発症リスクを明らかにし、将来的には分娩前の段階で分娩後SARAの発症予知と制御を目指す目的で以下の試験を行った。試験は移行期の給与飼料内容や飼養管理状況が明らかな3牛群において、乾乳期の経産牛10頭（A牛群・2頭、B牛群・4頭、C牛群・4頭）を対象として行った。移行期における給与飼料などの飼養管理状況、分娩後の泌乳量と繁殖成績を調査した。分娩前3週、分娩後2週、4週および6週に第一胃液を採取し、VFA、アンモニ

アセチル素および乳酸濃度のほか、LPS活性値を測定した。また、分娩前3週、分娩後2週と6週に生検により肝組織を採取し、マイクロアレイ法によって網羅的遺伝子解析を行った。

その結果、第一胃液pHは分娩後に著しく低下し、分娩前に比べて低値で推移し、1日の最大値と最小値との差異（日内較差）は増大する傾向が認められた。A牛群では2頭中1頭、B牛群では4頭中2頭、C牛群では4頭中1頭において、分娩後2週以内にSARAが発生し、その発生率は40%（10頭中4頭）であった。なお、分娩後SARA牛では非SARA牛に比べて、分娩前後における第一胃液pHの日内較差が大きい傾向が認められた。

以上のように、周産期における第一胃液pHの連続測定により、分娩後SARAの摘発が可能であり、さらに、肝組織の遺伝子発現解析の結果を加味することによって、分娩前における分娩後SARAの発症予知が可能になると考えられた。

文 献

- 1) Sato, S. : *Anim Sci J.* doi : 10.1111/asj.12415 , 2015.
- 2) Sato, S., Mizuguchi, H., Ito, K., Ikuta, K., Kimura, A., Okada, K. : *Prev Vet Med.*, 103 , 274 ~ 279 , 2012.
- 3) Sato, S., Kimura, A., Anan, T., Yamagishi, N., Okada, K., Mizuguchi, H., Ito, K. : *Vet Med Commun.*, 36 , 85~89, 2012.
- 4) Sato, S., Ikeda, A., Tsuchiya, Y., Ikuta, K., Murayama, I., Kanehira, M., Okada, K., Mizuguchi, H. : *Vet Med Commun.*, 36 , 85~89, 2012.
- 5) Nagata, R., Yo-Han, K. I. M., Ohkubo, A., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *J Dairy Sci.*, 101, 1 ~13, 2018.
- 6) Hasunuma, T., Uyeno, Y., Akiyama, K., Hashimura, S., Yamamoto, H., Yokokawa, H., Yamaguchi, T., Itoh, M., Mizuguchi, H., Sato, S., Hirako, M., Kushibiki S. : *Anim Feed Sci Technol.*, 221, 215~225, 2016.
- 7) Uyeno, Y., Akiyama, K., Hasunuma, T., Yamamoto, H., Yokokawa, H., Yamaguchi, T., Kawashima, K., Itoh, M., Kushibiki, S., Hirako, M. : *Anim Sci J.* 88, 119~124, 2017.
- 8) Chang, G., Zhuang, S., Seyfert, H-M., Zhang, K., Xu, T., Jin, D., Guo, J., Shen, X. : *Oncotarget.* 6 (36), 38578~38590, 2017.
- 9) Guo, J., Chang, G., Zhang, K., Xu, T., Jin, D., Bilal, M. S., Shen, X. : *Oncotarget.* 6 (36), 38578~38590, 2017.
- 10) Yo-Han, K., Nagatani R., Ohtani N., Ichijom T., Ikutam K., Sato, S. : *Front Microbiol.* doi : 10.3389/fmicb.2016.01575, 2016.
- 11) Yo-Han K., Touji, N., Kizaki, K., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S., *Physiol Genomics*, doi : 10.1152/physiolgenomics.00086.2016, 2016

離乳子豚への飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質 (アミノ酸) 代謝に及ぼす影響

Effects of rice feeding on growth performance and protein (amino acids) metabolism of weaning piglets

高田 良三・香川 龍太郎・立原 可南子
(新潟大学農学部)

Ryozo Takada, Ryutaro Kagawa and Kanako Tachihara
(Faculty of Agriculture, Niigata University)

In this study, we investigated the effects of feeding rice on growth performance and protein (amino acids) metabolism of weaning piglets. Sixteen weaning piglets with an average initial weight of 7.5 kg were divided into two groups. One group was fed a corn-soybean meal based diet, and the other was fed a rice-soybean meal diet, containing about 46% of corn or rice, respectively. A two weeks growth trial was conducted and growth performance, liver lysine-ketoglutarate reductase activity, plasma urea nitrogen, glucose, insulin and free amino acids concentration were measured. The average daily gain (g/d) and feed efficiency (gain/feed) in rice group were significantly higher than in corn group. Liver lysine-ketoglutarate reductase activity tended to be lower ($p=0.073$) in rice group than in corn group. Plasma urea nitrogen concentration in rice group was significantly lower than in corn group. Plasma glucose and insulin concentrations were significantly higher in rice group than in corn group. Plasma free valine, isoleucine and tryptophan concentration were significantly higher in rice group than in corn group. On the other hand, plasma histidine concentration in rice group was significantly lower than in corn group. Overall, these results show that rice feeding affect the protein and amino acids metabolism and growth performance is improved in weaning piglets.

1. 目的

離乳子豚は、母豚からの急激な隔離・消化管の未成熟・母乳から穀物主体の飼料への急変・複数の腹兄弟の同一豚房での飼育等、多くのストレスがかかり、しばしば発育の停滞や下痢の発生が起きる。さらにこの時期の発育停滞はその後の肥育成績に大きく影響を及ぼすとされていることから離乳子豚に対する飼料栄養に関する研究がこれま

で多くなされている。一方、イネは東南アジアを中心にして栽培されている主要穀物であり、その穀実であるコメは食用や飼料用に供されてきた。しかし、わが国においては、コメの価格が比較的高いこともあって、家畜の飼料としてのコメ（飼料用米）の利用はほとんどされていなかった。そのような状況下において、食用米価格の低迷や食料自給率向上、水田維持等の理由から、約10年前から急激に飼料用米の利活用が叫ばれるようにな

なった。最近、牛、豚、鶏に対する飼料用米の研究報告が増加してきた。一方、海外に目を向けると、基本的に欧米ではイネは栽培されている量が少ないため、飼料用米の研究実績はきわめて少ない。わずかにスペインのMateosらのグループ^{3, 4, 6, 9)}とオーストラリアのPluskeらのグループ^{7, 8)}が離乳子豚に対する飼料用米の研究を行っており、飼養成績の改善や下痢発生の軽減効果が報告されている。そのような中で、当研究室を中心とした研究グループは離乳子豚に対する飼料用米の新規機能性を解明する研究に着手した（新たな農林水産省政策を推進する実用技術開発事業、2009～2011）。その結果、得られた飼料用米の特性は以下のとおりである。

①飼養成績の改善、②下痢発生の軽減、③高価である脱脂粉乳の配合割合を低下できる、④乾物の消化率はトウモロコシと比べて飼料用米が優れる、等である。この中で、タンパク質蓄積量の有力な指標である血漿中尿素態窒素濃度は飼料用米給与で有意に低下することが明らかとなった。そこで本研究では飼料用米を離乳子豚に給与した時のタンパク質（アミノ酸）代謝に焦点をあて、タンパク質合成・分解・アミノ酸分解に関する酵素活性や血中成分を解析し、飼料用米給与による離乳子豚のタンパク質（アミノ酸）代謝変動のメカニズムを明らかにする。

2. 方 法

本実験は、国立大学法人新潟大学の動物実験指針にしたがって計画し、実験計画検討専門委員会、動物実験倫理委員会の審査、承認を得て行った。

約25日齢の離乳子豚を実験動物として用いた。飼料用米を約46%含む飼料を2週間給与する飼養試験を行い、日増体量、飼料摂取量および飼料効率を求めた。飼養試験終了後、子豚をと畜し、血

液、肝臓を採取して各主成分や酵素活性を測定した。

2.1 飼養試験

2.1.1 縮乳子豚を用いる実験。

飼料の配合割合をTable 1に示した。

試験区：対照区・・・トウモロコシを約47%配合した対照飼料

飼料用米区・・トウモロコシを飼料用米（玄米）で完全代替した飼料用米飼料

供試動物：約25日齢の離乳子豚16頭を2試験区に8頭ずつ振り分ける

試験期間：2週間。その間不断給餌、自由飲水

日増体量、飼料摂取量および飼料効率を求める。

分析項目：血中尿素態窒素、遊離アミノ酸濃度。インスリン・グルコース濃度肝臓中のリジン分解酵素（Lysine ketoglutarate reductase, LKR）活性

3. 結果と考察

飼養成績の結果をTable 2に示した。日増体量(g/d)は飼料用米区がトウモロコシ区に対して有意($p=0.025$)に高い値を示した。これは我々の以前の報告²⁾とよく一致した結果であるが、この報告では日増体量とともに飼料摂取量(g/d)も同時に有意な高い値を示し、その結果として飼料効率(gain/feed)は両試験区間でほぼ同じ値であった。ところが本実験では飼料摂取量において両試験区間に差は認められず、結果として飼料効率は飼料用米区で有意($p=0.011$)に高くなる値を示した。このような飼料効率の有意な上昇

Table 1 Composition of experimental diets (g/kg)

Item	Corn	Rice
Ingredients		
Corn	466.9	—
Brown rice	—	460.9
Soybean meal	150	150
Soybean meal (extruder)	80	90
Dried skim milk	200	200
Soybean oil	60	55
Dicalcium phosphate	15	15
Calcium carbonate	6	6
Sodium chloride	5	5
L-lysine · HCl	3	3.5
DL-methionine	2.5	2.5
L-threonine	2	2.5
L-tryptophan	0.1	0.1
Vitamin mixture ¹⁾	4.5	4.5
Mineral mixture ²⁾	2	2
Antibiotics ³⁾	2	2
Chlomic oxide	1	1
Calculated chemical composition		
ME (MJ/kg)	15.1	15.1
CP (g/kg)	211	215
Calcium (g/kg)	90	90
Phosphorus (g/kg)	70	73
L-lysine (g/kg) ⁴⁾	15.5	16.3
DL-methionine + cystine (g/kg)	9.2	9.8
L-threonine (g/kg) ⁴⁾	10.4	10.9
L-tryptophan (g/kg) ⁴⁾	2.7	2.9

¹⁾ Provided the following (per kg of diet) : retinol, 6mg; cholecalciferol, 100µg; α-tocopherol acetate, 200mg; thiamine mononitrate, 2.5mg; riboflavin, 17.5mg; pyridoxine HCl, 1.25mg; D-Ca pantothenate, 272.5mg; nicotinamide, 15mg; choline chloride, 1440mg.

²⁾ Provided the following (per kg of diet) : Mn, 100mg; Fe, 100mg; Cu, 20mg; ZnCO₃, 120mg; CaI₂, 2mg.

³⁾ Provided the following (per kg of diet) : avilamycin, 20mg titre; colistin sulfate, 20mg titre; morantel citrate, 30mg titre

⁴⁾ Analysed data

Table 2 Growth performance of piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	P-value
Initial body weight (kg)	7.4±0.2	7.6±0.2	0.498
Average daily gain (g/d)			
0 to 1 week	188±18	236±25	0.135
1 to 2 week	439±21	529±39	0.061
0 to 2 week	313±17	382±21	0.025
Average feed intake (g/d)			
0 to 1 week	257±23	270±24	0.703
1 to 2 week	561±27	600±28	0.345
0 to 2 week	409±23	435±25	0.461
Feed efficiency (gain/feed)			
0 to 1 week	0.729±0.043	0.870±0.057	0.068
1 to 2 week	0.789±0.039	0.879±0.046	0.159
0 to 2 week	0.770±0.032	0.881±0.02	0.011

Values are means±SE (n=8)

は、少なくとも当研究室ではこれまでに得られておらず、今回が初めての結果である。海外の報告においても Mateos らのグループ^{3, 4, 6, 9)} では飼料用米給与による飼料効率の上昇は報告していない。今回の実験において飼料効率が上昇した原因について以下のことが推察される。近年の豚はその成長能力が著しく改善されており、その結果として栄養素要求量、特にアミノ酸要求量が高まっている。その点をよく反映しているのが2012年に出版された NRC⁵⁾ である。ここでは体重 7～11kg の子豚のリジン要求量は 1.53% となっている。一方、日本飼養標準¹⁾ では増体 1 kg に要する真のリジン要求量を 17.3 g / 日としており、この値はかなり正確と思われるが、体重 5～10kg のリジン要求量は 1.24% となっており、NRC のそれよりも低くなっている。この原因は明確であり、日本飼養標準のこの体重の増体量が 250 g / 日と低く設定しているためである。NRC ではこの間の増体量を 335 g / 日としている。我々の以前の報告²⁾ のリジン含量は 1.3% であり、成長の優れる子豚に対してはやや不足であった可能性が高い。飼料用米給与によってさらに増体量が高くなり、やや不足気味のアミノ酸を満たすために飼料摂取量が高くなっていたのかもしれない。飼料摂取量を増やすことによってやや不足するアミノ酸を満たす現象は豚ではよく知られている事実である。逆に本実験ではトウモロコシ区および飼料用米区の飼料中リジン含量は 1.55%，1.63% と十分に高く、したがって飼料摂取量をあえて増やす必

要はなかったのかもしれない。

結果として飼料用米区の飼料効率がトウモロコシ区と比べて有意に改善されることとなった。成長の優れる豚にはより多くの栄養素が要求されることをよく示している。

血漿中の尿素態窒素、グルコースおよびインスリン濃度の結果を Table 3 に示した。血漿中尿素態窒素濃度は飼料用米区で有意にトウモロコシ区よりも低くなった。この結果は Yagami and Takada の報告²⁾ とよく一致した。体内の窒素蓄積量が飼料用米給与によって増加することを示唆している。それを裏付けるように血漿中グルコース濃度およびインスリン濃度は飼料用米区で有意に高かった。おそらく飼料用米給与によってインスリン分泌が促進され、その作用によってタンパク質（アミノ酸）代謝が影響を受けたものと考えられた。本実験の採血方法は、3 時間の絶食の後、50 g の飼料を給与し、その 1 時間後に採血を行ったが、これはインスリン分泌の変動をより明確にするためである。しかし実際の養豚現場では不断給餌条件下であり、胃の中は常時飼料で満たされていると思われる。したがってここで得られた血漿インスリン濃度の変化が不断給餌条件下の豚においても同様な結果が得られるかは検討する必要がある。なお、血漿尿素態窒素濃度は不断給餌条件および絶食・再給餌条件のいずれの採血方法でも数値の絶対値は異なるものの、給与飼料間の反応はほとんど同様であることが得られている（未発表データ）。

Table 3 Plasma urea nitrogen, glucose and insulin concentrations in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	P-value
Plasma urea nitrogen (mg/dL)	9.57 ± 1.75	5.28 ± 1.40	0.033
Glucose (mg/dL)	106 ± 3	119 ± 3	0.013
Insulin (μg/L)	0.110 ± 0.006	0.148 ± 0.015	0.035

Values are means ± SE (n = 8)

Table 4 Liver lysine-ketoglutarate reductase (LKR) activity in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	p-value
LKR activity (μmole/min/g liver)	1.17±0.072	0.95±0.082	0.073

Values are means±SE (n=8)

Table 5 Plasma free amino acids concentrations in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	p-value
	(μmol/L)		
Essential amino acids			
Threonine	593±178	691±271	0.406
Valine	276±45	328±41	0.005
Methionine	129±30	132±26	0.845
Isoleucine	155±25	270±30	0.002
Leucine	220±43	195±39	0.236
Phenylalanine	98±12	80±23	0.075
Histidine	80±14	62±11	0.011
Lysine	182±71	221±92	0.362
Arginine	172±78	173±91	0.983
Tryptophan	67±14	89±23	0.035
Nonessential amino acids			
Aspartic acid	31±5	29±5	0.447
Serine	239±82	229±5	0.773
glutamic acid	200±79	206±53	0.872
Glycine	899±205	1103±160	0.043
Alanine	570±126	664±115	0.143
Tyrosine	161±27	164±47	0.861

Values are means±SE (n=8)

Table 4 に肝臓LKR活性の結果を示した。肝臓LKR活性は飼料用米区でトウモロコシ区よりも低くなる傾向 ($p=0.073$) が見られた。LKRは体内でのリジン分解の律速酵素である。したがってLKR活性が低いことは体内でのリジン分解が抑えられており、必須アミノ酸としての再利用が高まっているものと考えられる。リジンは通常の飼料では第一制限アミノ酸となり、かつその要求量の絶対量も他の必須アミノ酸よりも高い。アミノ酸要求量を求めるとき、一般にはまずリジン要求量を定め、他のアミノ酸要求量はリジンに対する理想タンパク質からの比率で求めている。したがってリジンの体内代謝が変動することはリジン要求量にも影響を及ぼし、もしリジンの再利用が

高まっていれば（リジンの分解が低くなていれば）リジンの要求量は低くなるはずである。近年の豚の成長能力は著しく改善されており、平均的な増体量は高くなっている。それに応じてリジン要求量は高くなっている可能性が高い。もし飼料用米給与によってリジン分解が抑制されればリジンの利用率は高くなり、成長能力の高い現在の豚においても飼料中のリジン含量を高めることなく対応が可能になるかもしれない。

Table 5 に血漿中遊離アミノ酸濃度の結果を示した。分岐鎖アミノ酸であるバリンおよびイソロイシンの血漿中濃度は飼料用米区で明らかにトウモロコシ区よりも有意（それぞれ $p=0.005$ および 0.002）に高い値を示した。同様にトリプトファ

ンも飼料用米区で有意 ($p = 0.035$) に高い値であった。これらの変動については、おそらく体内での分解抑制が関与していると推定される。リジンはLKR活性が飼料用米区で低くなっているにもかかわらず、血漿中遊離リジン濃度に統計的な有意差は認められなかった。この原因は不明であるが、リジンの体内での利用度（タンパク質合成の素材としての要求量が高い）が飼料用米区で高まっており、より多くのリジンがタンパク質合成に利用されたのかもしれない。なお、同じ分岐鎖アミノ酸であるロイシンは両試験区間で差はなかった。これはトウモロコシ区の飼料中ロイシン含量が飼料用米区よりも高い (1.91 vs. 1.78) ことが原因かもしれない。一方、ヒスチジン濃度はバリンやイソロイシンとは逆に、飼料用米区で有意に低くなった。このことは今後の検討課題である。

4. 要 約

離乳子豚への飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質（アミノ酸）代謝に及ぼす影響について検討を行った。トウモロコシあるいは飼料用米を約46%含む飼料を離乳子豚（各試験区8頭ずつ）に給与し、2週間の飼養試験を行った。その結果、日増体量および飼料効率は飼料用米区がトウモロコシ区よりも有意 ($p = 0.025, 0.011$) に優っていた。血漿中の尿素態窒素濃度は飼料用米区で有意に低く、また、グルコースおよびインスリン濃度は有意に高くなかった。肝臓におけるリジン分解酵素であるLysine-ketoglutarate reductase活性は飼料用米区でトウモロコシ区よりも低くなる傾向 ($p = 0.073$) が認められた。血漿中の遊離バリン、イソロイシンおよびトリプトファン濃度は飼料用

米区で有意に高くなった。これらの結果は、離乳子豚に飼料用米を給与すると飼養成績は改善され、タンパク質（アミノ酸）代謝は影響を受けてタンパク質蓄積量が高まることを示している。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準・豚（2013年版），21，中央畜産会，東京，2013.
- 2) Yagami, K., Takada, R. : Dietary rice improves growth performance, mucosal enzyme activities and plasma urea nitrogen in weaning piglets, *Animal Science journal*, 88, 2010~2015, 2017.
- 3) Mateos, G. G., Martin, F., Latorre, M. A., Vicente, B., Lazaro, R. : Inclusion of oat hulls in diets for young pigs based on cooked maize or cooked rice, *Animal Science*, 82, 57~63, 2006.
- 4) Mateos, G. G., Lopez, E., Latorre, M. A., Vicent, B., Lazaro, R. P. : The effect of inclusion of oat hulls in piglet diets based on raw or cooked rice and maize, *Animal Feed Science and Technology*, 135, 100~112, 2007.
- 5) National Research Council : Nutrient Requirement of Swine, 211, National Academic Press, Washington, D.C.2012.
- 6) Parra, N., Lazaro, R. P., Serrano, M. P., Valencia, D. G., Mateos, G. G. : Influence of the inclusion of cooked cereals and pea starch in diets based on soy or pea protein concentrate on nutrient digestibility and performance of young pigs, *Journal of Animal science*, 88, 671~679, 2010.
- 7) Pluske, J. R., Siva, P. M., Pethick, D. W., Durmic, Z., Mullan, B. P., Hampson, D. J. : The incidence of swine dysentery in pigs can be reduced by feeding diets that limit the amount of fermentable substrate entering the large intestine, *Journal of Nutrition*, 126, 2920~2933, 1996.
- 8) Pluske, J. R., Black, B., Pethick, D. W., Mullan, B. P., Hampson, D. J. : Effects of different sources and levels of dietary fibre in diets on performance, digesta characteristics and antibiotic treatment of pigs after weaning, *Animal Feed Science and Technology*, 107, 129~142, 2003.
- 9) Vicente, B., Valencia, D. G., Serrano, M. P., Lazaro, R., Mateos, G. G. : Effects of feeding rice and the degree of starch gelatinization of rice on nutrient digestibility and ileal morphology of young pigs, *British Journal of Nutrition*, 101, 1278~1281, 2009.

黒毛和種仔牛の免疫能を高める機能性飼料の探索

Screening for functional feeds that enhance the immune function in
Japanese Black calves

米 倉 真 一・時 田 瞳

(信州大学農学部)

Shinichi Yonekura and Hitomi Tokita
(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

Calf diarrhea is a frequently occurring disease in Japanese black calf breeding farms; hence, it is important to establish a prevention method. In this study, first we investigated the relationship between diarrhea and $\gamma\delta$ T cells, which are believed to play an important role in the immune function of young bovines, using Holstein calves. Second, we tried to find out a lactobacillus which can elevate the proportion of $\gamma\delta$ T cells and WC1 $^+$ $\gamma\delta$ T cells. In the first experiment, we found a significant negative correlation between the proportion of $\gamma\delta$ T cells and fecal score, and a significant negative correlation between the proportion of $\gamma\delta$ T cells or WC1 $^+$ $\gamma\delta$ T cells and the fecal moisture content. Our findings suggested that the proportion of $\gamma\delta$ T cells in the blood of two-week-old calves is significantly associated with the fragility of their immune function. In the second experiment, we could isolate 23 species of lactobacillus from sorghum silage and 22 species of lactobacillus from dent corn silage. We found that one of lactobacillus from sorghum silage may have the ability to elevate the proportion of $\gamma\delta$ T cells and WC1 $^+$ $\gamma\delta$ T cells in vitro.

1. 目 的

仔牛の下痢症は、黒毛和種繁殖農家における多発疾病であり、死亡例も少なくない。さらに増体も遅延することも生じることから、下痢症の予防法の確立が重要である。仔牛は成牛に比べて免疫機能が未熟なため、下痢症などの感染症を発症しやすいことが知られている¹⁾。すなわち、仔牛が下痢症等の感染症に罹患しやすいのは、仔牛の免疫機能が未発達なためであるとの考えが広く受け入れられている。よって健康で強靭な仔牛を育て

るためには、仔牛の免疫学的特性を配慮した疾病的予防法の開発が必要である。

T細胞は、末梢血中のリンパ球の70~80%を占めており、体を異物から守る免疫応答の司令塔を担う大切な細胞集団である。T細胞は細胞表面に特徴的なT細胞抗原受容体を有し、外から入ってきた異物を認識している。T細胞抗原受容体には $\alpha\beta$ 鎖と $\gamma\delta$ 鎖の2種類が存在しているが、ほとんどのT細胞が $\alpha\beta$ 鎖である。それに比べ、 $\gamma\delta$ T細胞の割合はわずかしかない²⁾。しかし、 $\gamma\delta$ T細胞は幼若期の牛の末梢血中にある程度高い割

合で存在し、成長とともにその割合が低下することが明らかとなっている³⁾。また $\gamma\delta$ T細胞は $\alpha\beta$ T細胞よりも個体発生早期に分化するのが特徴であり“innate T cel”と呼ばれている。加えて、 $\gamma\delta$ T細胞が自然免疫のパターン認識レセプターであるToll様レセプター2を発現することから自然免疫としての機能を有することが明らかとなっている^{4,5)}。さらに牛 $\gamma\delta$ T細胞はWC1とCD8の発現パターンによって、WC1⁺CD8⁻ $\gamma\delta$ T細胞、WC1⁻CD8⁺ $\gamma\delta$ T細胞に分類される。WC1分子は、215kDaの膜糖タンパク質であり、牛 $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現し、ヒトやマウスのT細胞では認められない。WC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞は、仔牛の末梢血中に非常に高い割合で存在することから⁶⁾、幼若期の牛の免疫機能の恒常性維持に重要な役割を持つと考えられている。

これまで我々は黒毛和種牛2週齢時のWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合と下痢症の治療回数との間に有意な負の相関があることを明らかにしている。すなわちWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合が高い個体は下痢を発症しにくいことを見出した。よって、仔牛の下痢発症を抑制する方法として、WC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合を高める飼養技術がきわめて有効であると考える。T細胞の分化には病原性の有無に関わらず細菌の成分が関与していると考えられており、安全に食べられる細菌として乳酸菌が注目されている。乳酸菌はT細胞を含む免疫細胞の成熟や増殖活性を高めることが知られているが、牛の $\gamma\delta$ T細胞でのみ発現するWC1陽性細胞と乳酸菌との関連性を検討した報告は皆無である。よって本研究では、仔牛の免疫機能を高める機能性飼料の開発を目指す上で、WC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合を高める乳酸菌を探査した。さらに、ホルスタイン仔牛においても、WC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合と下痢症との間に相関が認められるのか検討した。

2. 方 法

2.1 実験1

ホルスタイン仔牛6頭を用いた。生後すぐに母牛から離して飼育した。生後24時間以内に初乳製剤900g(IgGを150g含む)を給餌した。その後は、milk replacer(CP 26%, TDN 110%)を700g/日給餌し、Pelleted calf starter(CPN 25%, TDN 76%)と水は自由採食・飲水とした。

生後14日目に血液を採取し、フローサイトメトリーを用いて $\gamma\delta$ T細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合を測定した。また糞を採取し、糞中の水分含量を測定するとともに、糞便スコアを評価した。 $\gamma\delta$ T細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合と糞便スコア、糞中の水分含量との相関は、ピアソンの相関係数を用いて解析した。

2.2 実験2

信州大学農学部附属農場で作製したソルガムサイレージ、デントコーンサイレージより乳酸菌を単離した。具体的には、乳酸菌を単糖がグルコース、フルクトース、キシロース、マルトースと異なる4種のMRS寒天培地で嫌気ジャーに入れて培養後、得られたコロニーを液体培地に置換し培養した。液体培養により増殖した乳酸菌を回収後、凍結乾燥した。

2週齢の黒毛和種仔牛の血液を採取し、末梢血単核球を単離し培養した。サイレージから単離した乳酸菌(100ng/ml)を7日間刺激し、刺激前後の細胞における $\gamma\delta$ T細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合をフローサイトメトリーで解析した。スクエードントのT検定を用いて有意差を求めた(n=3, p<0.05)。

3. 結果と考察

3.1 実験1

$\gamma\delta$ T細胞、WC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合

と糞便スコアとの関連性を検討した。糞便スコアは1～4段階でスコアが高いほど便が柔らかいことを示している。その結果、 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と糞便スコアとの間に有意な負の相関が認められた（ $p < 0.05$ ）。また、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合が低い牛ほど糞便スコアが高い傾向があった（ $p = 0.054$ ）。続いて、 $\gamma\delta T$ 細胞、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と糞中の水分割合との関連性を検討した。その結果、 $\gamma\delta T$ 細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と糞中の水分割合との間に有意な負の相関が認められた（ $p < 0.05$ ）。

これまで我々は黒毛和種仔牛において、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合が高い個体は下痢を発症しにくいことを明らかにしている。本結果からホルスタイン仔牛も同様であることが明らかとなった。生後30日以内の仔牛は、免疫機能は発達していないことから、初乳からの免疫グロブリンが感染防御に大きな役割を果たす⁷⁾。本実験で用いた仔牛は、同一の初乳製剤で飼育したものであるから、各個体の $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合の違いは初乳による影響ではないことが言える。よって、血中 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合は、仔牛の免疫機能の重要な指標であると考えられる。

3.2 実験2

ソルガムサイレージおよびデントコーンサイレージより乳酸菌を単離した。单糖がグルコース、フルクトース、キシロース、マルトースと異なる4種のMRS寒天培地を用いて単離を試みた。その結果、ソルガムサイレージからは、グルコースMRS寒天培地由来の乳酸菌を7種（ソルガムーグル#1～7）、フルクトースMRS寒天培地由来の乳酸菌を5種（ソルガムーフル#1～5）、キシロースMRS寒天培地由来の乳酸菌を5種（ソルガムーキシ#1～5）、マルトースMRS寒天培地由来の乳酸菌を6種（ソルガムーマル#1

～6）の計23種の乳酸菌を単離することができた。またデントコーンサイレージからは、グルコースMRS寒天培地由来の乳酸菌を6種（デントーグル#1～6）、フルクトースMRS寒天培地由来の乳酸菌を5種（デントーフル#1～5）、キシロースMRS寒天培地由来の乳酸菌を5種（デントーキシ#1～5）、マルトースMRS寒天培地由来の乳酸菌を6種（デントーマル#1～6）の計22種の乳酸菌を単離することができた。続いて、ソルガムサイレージ由来の乳酸菌23種について、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合に及ぼす影響を検討した。その結果、ソルガムーグル#3を処理した末梢血単核球は、 $\gamma\delta T$ 細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合が高い傾向にあった（ $p = 0.075$ ）。本実験は100ng/mlの濃度で刺激したものであるため、現在、より高い濃度で刺激した検討を行っているところである。またデントコーンサイレージ由来の乳酸菌についても現在検討中である。

4. 要 約

これまで我々は黒毛和種においてWC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合が高い個体は下痢を発症しにくいことを見出している。よって、仔牛の下痢発症を抑制する方法として、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合を高める飼養技術がきわめて有効であると考える。そこで本研究では、仔牛の免疫機能を高める機能性飼料の開発を目指す上で、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合を高める乳酸菌を探索した。さらに、ホルスタイン仔牛においても、WC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と下痢症との間に相関が認められるのか検討した。その結果、 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と糞便スコアとの間に有意な負の相関が認められた。また $\gamma\delta T$ 細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta T$ 細胞の出現割合と糞中の水分割合との間に有意な負の相関が認められた。ホルス

タイン仔牛も $\gamma\delta$ T細胞の出現割合が高い個体は下痢を発症しにくいことが明らかとなり、血中 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合は、仔牛の免疫機能の重要な指標であると考えられた。また、ソルガムサイレージから23種、デントコーンサイレージより22種の乳酸菌を単離することができ、ソルガムサイレージ由来の乳酸菌の一つは、 $\gamma\delta$ T細胞およびWC1陽性 $\gamma\delta$ T細胞の出現割合を高める効果を有している可能性が示唆された。今後、この乳酸菌の特性について検討するとともに、動物個体を用いた検討も行っていく予定である。

文 献

- 1) Acres, S. D., Saunders, J. R., Radostits, O. M. : *Canadian Veterinary Journal*, 18, 113~121, 1977.
- 2) Cai, J. L., Tucker, P. W. : *Chemical Immunology*, 79, 99~138, 2001.
- 3) Hein, W. R., Mackay, C. R. : *Immunology Today*, 12, 30~34, 1991.
- 4) Mak, T. W., Ferrick, D. A. : *Nature Medicine*, 4, 764~765, 1998.
- 5) Prin, I., Silva-Santos, B., Pennington, D. J. : *European Journal of Immunology*, 43, 1988~1994, 2013.
- 6) Rogers, A. N., Vanburen, D. G., Hedblom, E. E., Tilahum, M. E., Telfer, J. C., Baldwin, C. L. : *Journal of Immunology*, 174, 3386~3393, 2005.
- 7) Webster, A. J. : *Veterinary Record*, 108, 183~187, 1981.

産褥牛に起きた急性肝ストレス亢進と肝ビタミンE 体内動態関連遺伝子発現抑制に対する*Rhizopus oryzae* 水抽出物給与の予防効果に関する研究

Study on the preventive effects of administration of aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* on the puerperal acute hepatic stress and suppression of vitamin E related genes expression in cows

芳賀 聰¹・石崎 宏¹・狩野 友佳²・鈴木 武人²

(¹国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門, ²麻布大学獣医学部)

Satoshi Haga¹, Hiroshi Ishizaki¹, Yuuka Kanou² and Takehito Suzuki²

(¹Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, ²School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Blood alpha-tocopherol (α -Toc), the most biologically active form of vitamin E, concentrations decline gradually throughout the prepartum period, reaching the nadir after calving in dairy cows. The α -Toc-related molecules (α -Toc transfer protein [α TTP] and afamin [AFM]) are expressed in liver. These molecules could regulate α -Toc transport and blood concentrations of α -Toc, however, these gene expression levels decreased after calving. Therefore, the aim of this study was to evaluate the preventive effects of oral administration (OA) of aqueous extracts of *Rhizopus oryzae* (RU) on the puerperal acute hepatic stress and suppression of α -Toc-related genes expression in dairy cows, which have remained elusive until now. Six multiparous Holstein cows were used (from -3 to 3 weeks postpartum) for blood sampling and liver tissue biopsy. Treatments (each n=3) were as follows : OA (10 g/day) of (i) RU (RU group) and (ii) placebo (P group) from -3 weeks to 0 day postpartum. Liver injury was assessed by the activities of serum aspartate transaminase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), which in RU group were lower than those in P group during the puerperal period (from day 0 to 7 postpartum). The serum α -Toc concentrations declined gradually towards calving time. In puerperal period, the serum α -Toc concentrations remained at a lower concentration. The α TTP, AFM, and other hepatic functional genes mRNA expression levels in the liver were temporarily down-regulated during day 0-3 day postpartum, and the hepatic mRNA levels of endoplasmic reticulum stress-induced unfolded protein response marker increased at calving. However, we could not confirm the difference between these data in two groups. These results indicate that the OA of RU (10g/day for 3weeks prepartum) may be able to prevent the liver injury after calving, while, could not show clearly the preventive effects on the puerperal acute hepatic stress and suppression of α -Toc-related genes expression in dairy cows.

1. 目的

近年、繁殖農家数および子取り用雌牛の著減による「肉牛の少子化」により、国内の肉牛生産基盤が深刻な危機に直面している。そのため、乳牛から生産される、乳用雄子牛や受精卵移植による黒毛和種子牛が肉用素牛の重要な供給源となっている。しかし現状では、乳牛の高泌乳化や飼養規模の拡大により、個体管理や飼養管理は一層難しくなっている。特に周産期疾病の増加は、繁殖遅延そして供用期間の短縮にも直結し、乳牛から安定的な肉用素牛供給を大きく妨げる。すなわち、周産期における乳牛の健全性を向上させる技術の開発は酪農にとどまらず、いまや国内肉牛生産の観点からも喫緊の課題となっている。

分娩は子牛および生乳の生産上、絶対に回避できないイベントである。一方、乳牛における疾病発生率は、産褥期（分娩直後～1週間）に最も高く¹⁾、頻発する乳房炎、後産停滞や第四胃変位等のリスクファクターとして、産褥期の血中ビタミンE（主に α -トコフェロール [α -Toc]）欠乏（低 α -Toc血症）が近年報告されている^{2~4)}。 α -Tocは強力な抗酸化機能および免疫調節機能を有しているが、動物体内では合成できないため、食餌やサプリメントにより摂取しなければならない。吸収された α -Tocの体内動態は主に肝臓により調節されるが、そのメカニズムには、特異的な α -Toc結合能を有し細胞内輸送等を担う α -Toc transfer protein (α TTP) やafamin (AFM) の発現が強く関与している⁵⁾。しかし乳牛の場合、分娩による多大な生理的ストレスや酸化ストレスの増大および急激に始まる乳生産による代謝負担が肝臓にかかり、肝障害が亢進し肝機能が低下すると考えられる。実際に著者らは分娩直後の高泌乳牛の肝組織において、急性的な肝臓の炎症応答と小胞体ストレスの亢進、そして、アルブミンや

抗酸化酵素等の肝機能遺伝子発現の抑制に加え、 α TTPやAFMの遺伝子発現も強く抑制されることを見出している⁶⁾。すなわち、乳牛の健全性向上には、産褥期に起こる肝障害、急性肝ストレス亢進および肝機能遺伝子発現抑制を防ぎ、周産期疾病リスクファクターである低 α -Toc血症化を予防する対策が必要である。

接合菌類ケカビ科の*Rhizopus oryzae*はアジア諸国で紹興酒などの麹に用いられているが、その抽出物は様々な生理活性を示す。近年、Suzukiらは四塩化炭素 (CCl₄) 投与により誘発した肝障害モデルラットにおいて*Rhizopus oryzae*水抽出物 (RU) 投与が肝障害を低減すること⁷⁾、さらに、牛へのRU給与が肝臓から分泌されるインスリン様成長因子-1 (IGF-1) の血中レベルを有意に増加させることを見出し、RUに肝障害抑制作用や肝機能賦活化作用があることを示唆している。そこで本研究では、分娩前の乳牛へのRU給与が産褥期に起きた肝障害、急性肝ストレス亢進および肝 α -Toc体内動態関連遺伝子発現抑制を予防するという仮説を立て、その検証を目的とした。

2. 方 法

本研究計画は、国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）畜産研究部門動物実験委員会の事前承認を得て「畜産研究部門動物実験等実施要領」に従って実施された。

農研機構畜産研究部門畜産飼料作研究拠点（栃木県那須塩原市）にて飼養され、2017年5月から8月にかけて分娩したホルスタイン経産牛6頭を供試した。分娩予定日の3週間前から分娩3週間後までの分娩移行期間を試験期間とした。産次および分娩月を揃えつつ、3頭をRU区（産次： 3 ± 0.6 ）、3頭をプラセボ（Placebo：P）区（産次： 3 ± 0.6 ）に配置した。分娩予定日の3週間

前から分娩日まで毎日、夕方給餌（1600—1630）前にRU製剤10 gをRU区の牛に経口投与した。RU製剤は、米ぬか油かすおよびブドウ糖を賦形剤としてRU粉末を重量10%含有する粉末剤である。経口投与処理および賦形剤摂取によるプラセボ効果を相殺するため、P区の牛にはRU粉末を含まない賦形剤成分のみの疑似RU製剤10 gをRU区と同法により投与した。本試験における投与量および期間はSuzukiらの報告（第155回日本獣学会発表）を参考にした。両区共にフリーストルルにて飼養し、分娩前後の期間のみ分娩房で単飼養した。給餌は日本飼養標準を基に給与量を算出し、分娩前は市販の乾乳期用配合（CP20%，TDN72%以上）、コーンサイレージ（CP6.4%，TDN67%）およびイネ科乾草（チモシーまたはクレイングラス：CP16.5%，TDN63%）を給与し、分娩後は市販の搾乳牛用配合（CP17%，TDN74%以上）、コーンサイレージ（同上）およびイネ科乾草（同上）を給与した。試験期間を通じて給与飼料にマグネシウム剤とビタミン剤を定量添加補給し、自由飲水および鉱塩自由摂取とした。また、分娩以降は毎日朝夕2回の搾乳を行った。

分娩予定日の3週、1週間前、分娩直後（約14時間以内）、分娩3日後、1週、2週、3週間後に頸静脈から採血して血清サンプルを得た。さらに体重測定とボディコンディションスコア（BCS）記録を行った。肝臓組織サンプルは、分娩予定日の3週間前、分娩直後（約14時間以内）、分娩3日後、1週、3週間後に、自動生検装置を用いて既報⁶⁾に基づき採取した。血清中 α -Toc濃度をHPLC法により測定した。血清中HDL、遊離脂肪酸（NEFA）、 β ヒドロキシ酪酸（BHBA）濃度および血清中アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）活性は分析委託して自動分

析装置（Hitachi LABOSPECT）により分析した。肝組織における α TTP、AFM、IGF-1、アルブミン（ALB）、カタラーゼ（CAT）および成熟型X-box binding protein 1（XBPs）の各mRNA発現量は、既報⁶⁾に基づき、Q-RT-PCR法により測定した。統計解析は、各項目において、個体を変動効果、処理区（Treat）およびサンプリング週（Week）を固定効果として混合モデル（SAS）解析を行い、 $p<0.05$ の場合に有意な差があり、 $p<0.1$ の場合に差の傾向ありと判定した。

3. 結果と考察

試験牛の体重およびBCSは分娩前と比較して分娩後に有意に減少したが（ $p<0.05$ ），各週における両区間に有意差は見られなかった（データ略）。血清中NEFAおよびBHBA濃度の推移では、分娩前と比較して分娩後に有意に増加し（ $p<0.01$ ），高泌乳牛の典型的な分娩移行期の負のエネルギーバランスを示した。産褥期以降では、RU区の血清中NEFAおよびBHBA濃度がP区より低く推移したが、統計的な有意差はいずれも認められなかつた（データ略）。以上より、分娩前3週間のRU給与（10 g/日）が分娩移行期のエネルギー代謝負荷に及ぼす改善効果は明らかにできなかつた。一方、肝障害マーカーである血清中ASTおよびALT酵素活性値（Fig. 1A, B）は、P区では分娩直後から3日目まで増加し分娩1週間後においても高値を示したが、RU区では産褥期における濃度上昇が小さく、AST活性はP区より低い傾向（ $p<0.1$ ）を示し、そしてALT活性はP区よりも有意に低かった（ $p<0.01$ ）。これは、肝障害モデルラットを用いたSuzukiら⁷⁾の結果を支持しており、分娩前3週間のRU給与（10 g/日）が分娩に伴う肝障害に対し予防的な緩和効果を發揮した可能性が示唆された。

既報⁶⁾と同様、血清中 α -Toc濃度は試験期間

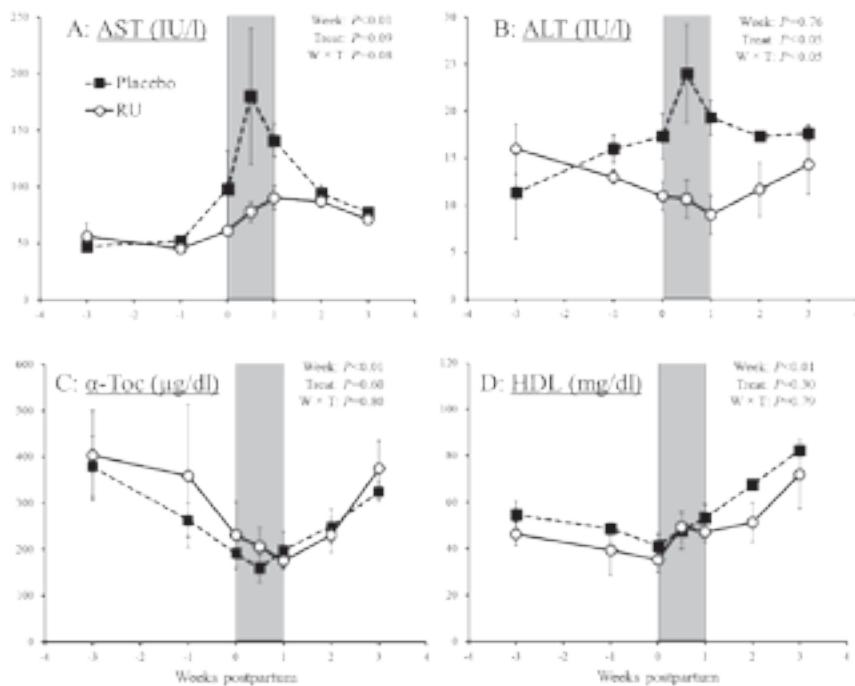


Fig. 1 Changes in serum levels and concentrations of peripartum dairy cows (RU vs. Placebo, each $n = 3$). A) aspartate transaminase (AST) activities, B) alanine aminotransferase (ALT) activities, C) Alpha-tocopherol (α -Toc) concentrations, and D) High-density lipoprotein (HDL) concentrations. The puerperal period (from day 0 to 7 postpartum) is denoted by the gray area. All data are expressed as means \pm SE.

を通じて有意に変動した (Fig. 1C, $P < 0.01$)。具体的には、分娩 3 週間前から分娩にかけて漸減し、産褥期間は低値で推移した後、分娩 3 週間後にかけて漸増した。一方、各週における両区の値に有意差は確認されなかった。牛血中において最もメジャーな α -Toc キャリアである高密度リボタンパク (HDL)⁸⁾ の血清中濃度も試験期間を通じて有意に変動し (Fig. 1D, $p < 0.01$)、分娩 3 週間前から分娩にかけて漸減したが、分娩後すぐに濃度の上昇と分娩前レベル以上の値に達することが確認され、産褥期における血中の低 α -Toc 濃度の要因としての血中 HDL 濃度変化の寄与率は両区共に低いものと示唆された。そこで次に、肝組織中の α -Toc 体内動態関連遺伝子 (α TTP, AFM) の mRNA 発現量について調べた (Fig. 2A, B)。 α TTP mRNA 発現量は分娩前後の期間

に変動する傾向が認められ ($p < 0.1$)、分娩 3 週間前と比較して分娩直後から 3 日後にかけて mRNA 発現量が 60~70% まで低下した。AFM mRNA 発現量は、分娩前後の期間に有意な変化が認められ ($p < 0.01$)、分娩 3 週間前と比較して、分娩直後から 3 日後にかけて mRNA 発現量が有意に低下した。しかし、両発現量について各週における両区間に有意差は確認されなかった。また、肝機能遺伝子である ALB, CAT および IGF-1 mRNA 発現量は (Fig. 2C-E), いずれも分娩 3 週間前と比較して産褥期に有意に減少し ($p < 0.01$)、一方、小胞体ストレスマーカーである XBP1s mRNA 発現量は分娩直後に有意に増加した (Fig. 2F, $p < 0.01$)。しかし、各週における両区間の有意差はいずれも認められなかった。以上より、分娩に伴う産褥期の急性肝ストレス亢進と

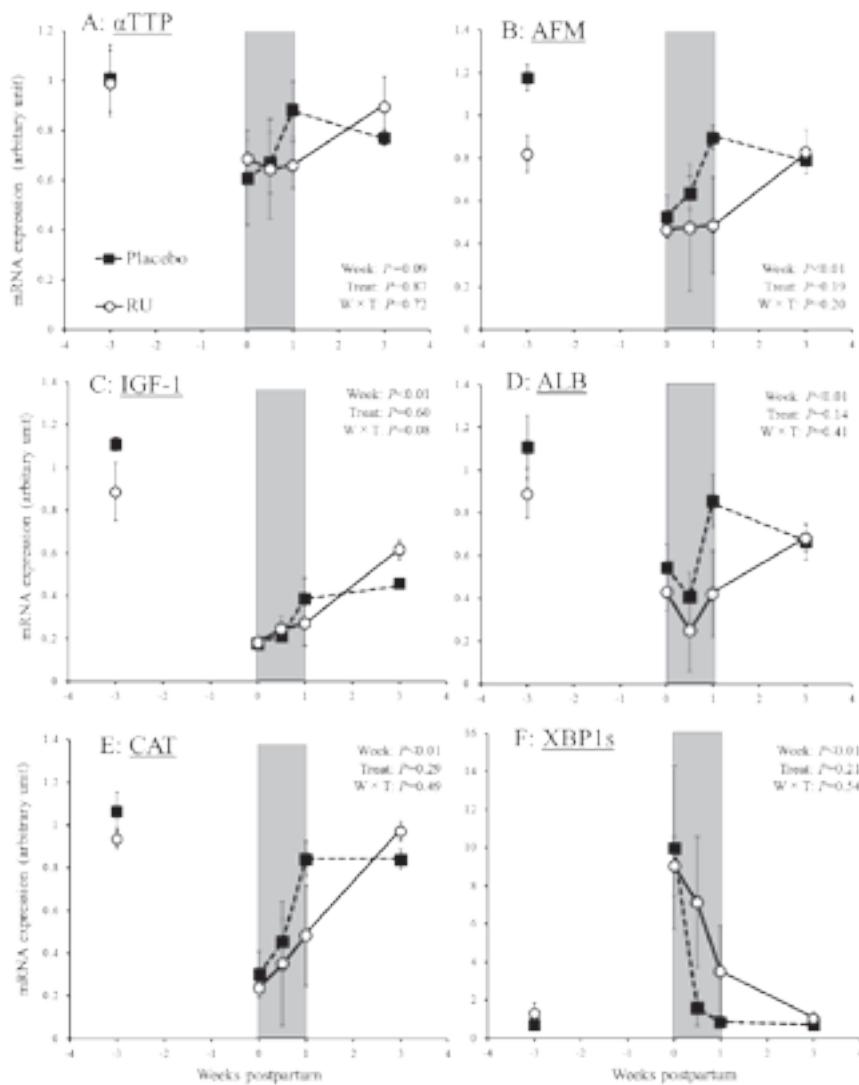


Fig. 2 Hepatic mRNA expression levels in peripartum dairy cows. (RU vs. Placebo, each $n=3$). A) α -tocopherol transfer protein (α -TTP), B) afamin (AFM), C) insulin-like growth factors-1 (IGF-1), D) albumin (ALB), E) catalase (CAT), and F) spliced form of X-box binding protein 1 (XBPIs). Messenger RNA expression levels of all genes were normalized by arithmetic mean of the ribosomal protein S9 and β -actin mRNA expressions as multiple housekeeping genes. The puerperal period (from day 0 to 7 postpartum) is denoted by the gray area. All data are expressed as means \pm SE.

肝 α -Toc体内動態関連遺伝子発現抑制に対する、分婏前3週間のRU給与(10 g/日)による予防効果は低い可能性が示唆された。

総括として、分婏前3週間のRU給与(10 g/日)は、分婏に伴う肝障害に対し有効な緩和効果を示すが、産褥期の急性肝ストレス亢進と肝 α

-Toc体内動態関連遺伝子発現抑制に対する「機能的」な予防効果は低い可能性が示唆された。今後は、投与量や投与期間などを再検討する予定である。

最後に、RU製剤および疑似RU製剤を製造し無償提供して頂きました株式会社牛越生理学研究所

に深謝いたします。また、本研究をサポート頂きました畜産飼料作研究拠点技術支援センター那須業務科諸氏ならびに試験牛に深謝いたします。

4. 要 約

本研究では、分娩前の乳牛へのRU給与が産褥期に起きた肝障害、急性肝ストレス亢進および肝 α -Toc体内動態関連遺伝子発現抑制を予防すると仮説を立て、その検証を試みた。分娩予定日の3週間前から分娩3週後までを試験期間とし、3頭をRU区、3頭をプラセボ(P)区に配置した。RU区にはRU製剤10 gを、P区にはRU成分を含まない疑似RU製剤10 gを、それぞれ分娩3週間前から分娩日まで毎日経口投与した。定期的に採血、肝バイオプシーを行い、血液および肝組織サンプルを得て分析に供した。産褥期における血清中ASTおよびALT酵素活性値は、RU区においてP区より低く推移した。血清中 α -Toc濃度は分娩直後から分娩1週間後の産褥期間は低値で推移し、肝組織中の α -Toc体内動態関連遺伝子(α TTP, AFM)のmRNA発現量も分娩直後から3日後にかけてmRNA発現量が低下した。しかし、いずれも両区の値に有意差は確認されなかった。また、肝機能遺伝子としてIGF-1, ALBおよびCAT mRNA発現量および小胞体ストレスマーカーであるXBPIs mRNA発現量についても両区間の有意差は認められなかった。以上より分娩前3週間のRU給与(10 g/日)は、分娩に伴う肝障害に対し有効な緩和効果を示すが、産褥期の急性肝ストレス亢進と肝 α -Toc体内動態関連遺伝子発現抑制に対する「機能的」な予防効果は低い可能性が示唆された。今後は、投与量や投与期間など

を再検討する予定である。

文 献

- 1) Ingvarstsen, K. L., Dewhurst, R. J., Friggens, N. C. : On the relationship between lactational performance and health : is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper, *Livest. Prod. Sci.*, 83, 277~308, 2003.
- 2) Politis, I., Theodorou, G., Lampidonis, A. D., Kominakis, A., Baldi, A. : Short communication : Oxidative status and incidence of mastitis relative to blood α -tocopherol concentrations in the postpartum period in dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 95, 7331~7335, 2012.
- 3) Pontes, G. C., Monteiro Jr. P. L., Prata, A. B., Guardieiro, M. M., Pinto, D. A., Fernandes, G. O., Wiltbank, M. C., Santos, J. E., Sartori, R. : Effect of injectable vitamin E on incidence of retained fetal membranes and reproductive performance of dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 98, 2437~2449, 2015.
- 4) Qu, Y., Lytle, K., Traber, M. G., Bobe, G. : Depleted serum vitamin E concentrations precede left displaced abomasum in early-lactation dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 96, 3012~3022, 2013.
- 5) 芳賀聰, 中野美和, 宮地慎, 石崎宏, 松山裕城, 鈴木裕, 北山峻, 小林洋介, 加藤和雄, 盧尚建 : ウシ組織における α -トコフェロール体内動態関連遺伝子の発現特性に関する研究, 栄養生理研究会報, 61(1), 9~19, 2017.
- 6) Haga, S., Miyaji, M., Nakano, M., Ishizaki, H., Matsuyama, H., Katoh, K., Roh, S. G. : Changes in the expression of α -tocopherol-related genes in liver and mammary gland biopsy specimens of peripartum dairy cows, *J. Dairy Sci.*, 101, 5277~5293, 2018.
- 7) Suzuki, T., Fukuoka, H., Ushikoshi, S., Sato, R., Morita, H., Takizawa, T. : Protective effect of aqueous extracts from *Rhizopus oryzae* on liver injury induced by carbon tetrachloride in rats, *Anim. Sci. J.*, 86 (5), 532~540, 2015.
- 8) Higuchi, H., Ito, E., Iwano, H., Oikawa, S., Nagahata, H. : Effects of vitamin E supplementation on cellular α -tocopherol concentrations of neutrophils in Holstein calves, *Can. J. Vet. Res.*, 77 (2), 120~125, 2013.

*Lactococcus*属乳酸菌を用いて調製した発酵乳給与が離乳子豚の飼料摂取量および増体成績を改善する要因の解明

Dietary effects of fermented milk prepared with *Lactococcus* genus on growth performance and fecal microbial community in weaning piglets

守谷 直子・兼松 伸枝・成田 卓美・木元 広実

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)

Naoko Moriya, Nobue Kanematsu, Takumi Narita and Hiromi Kimoto-Nira

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Fermented milk by lactic acid bacteria is expected to have a beneficial effect on not only growth performance but also microbial community of the gut for weaning piglets. In this study, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain J50 from lactic acid bacteria collection of our institute was used for the preparation of fermented milk, because this strain indicated some probiotic properties in our previous study. Ten piglets (three weeks old) were allocated to milk fed group and fermented milk fed group. The feeding experiment was carried out for 4 weeks. The piglets of fermented milk fed group were assumed to take 12 ~ 14 log₁₀ cfu of live strain J50 every day. There is no significant difference in average dry matter intake and average daily gain of both groups. Although fecal IgA and IgG concentrations were significantly decreased after weaning, there is no significant difference in both groups. Fecal microbiota was changed by the fermented milk feeding. At the phylum level, the relative abundance of *Bacteroidetes* in fermented milk fed group decreased and the relative abundance of *Firmicutes* increased compared with milk fed group. At the genus level, the abundance of *Lactococcus* increased and the proportion of *Escherichia/Shigella* and *Klebsiella* decreased in fermented milk fed group. The administration of fermented milk containing *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strain J50 may therefore have a beneficial effect on gut microbiota of weaning piglets.

1. 目的

離乳直後の移行期の子豚は母豚からの分離や飼育群の再編など飼養環境の変化によりストレスを受ける。また、母乳から粉餌の人工乳への摂取飼料の変化が原因となる消化不良性の下痢症の発生や、母乳を通して受け取った移行免疫の抗体値が

低下することで大腸菌群やサルモネラ菌による感染性疾病の増加も問題となっている。この時期の子豚に液状飼料を給与することは増体の改善に効果があることが知られており^{1,2)}、液状飼料の給与は乾物摂取量を増加させるため、腸管絨毛が伸長するなど消化管が健全な状態に保たれ、子豚の成長につながると考えられている³⁾。大塚らは、

離乳期の子豚を用いた試験を行ったところ、粉状の人工乳を給与する場合と比較して、人工乳と発酵乳を混合した液状飼料の給与が飼養成績の改善に有益であったと報告している⁴⁾。我々は平成28年度の本助成において、*Lactococcus*属乳酸菌を用いて調製した発酵乳の給与が離乳子豚の乾物摂取量を増大させることを報告している。さらに、発酵乳には乳酸菌が生菌で多く含まれることから、乳酸菌が子豚の消化管内でプロバイオティクスとして働くことにより腸内環境が改善する効果が期待される。

これまでに*Lactobacillus*属乳酸菌や*Bacillus*属細菌などのプロバイオティクスの摂取が大腸菌数を低下させ^{5, 6)}、豚の腸内菌叢に有益な効果を及ぼすことが報告されており、発酵飼料中に含まれる乳酸菌の摂取は、消化管内において大腸菌群の競合阻害に有効で、宿主の消化管環境を健全に保つ効果があると考えられている⁷⁾。しかし、昔から乳業用乳酸菌として広く利用されてきた*Lactococcus*属乳酸菌が、豚の腸内菌叢に及ぼす影響について調べた報告はない。そこで本試験では、離乳直後の子豚に*Lactococcus*属乳酸菌を用いて調製した発酵乳を給与する試験を行い、離乳期の子豚の成長に及ぼす効果について検討した。

2. 方 法

2.1 *Lactococcus*属乳酸菌を用いた発酵乳の調製

平成28年度の本助成において選抜した*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株（以下J50株）を発酵乳調製に用いた。J50株は畜産研究部門の乳酸菌ライブラーに分離、保存されており、良好な乳発酵能を示す⁸⁾。牛乳は畜産研究部門で搾乳された生乳を80℃で30分間殺菌することで調製した。発酵乳は、あらかじめ8%スキムミルクに接種して30℃で24時間培養しておいたJ50

株を、殺菌後30℃に冷却した牛乳に1%（wt/wt）添加し、30℃で一晩発酵させて調製した。牛乳および発酵乳は4℃で保管し、1週間にごとに必要量を調製した。

2.2 発酵乳給与試験

試験には母豚2頭の産子であるLWD三元交雑種の雌の離乳子豚10頭を用いた。供試子豚は3週齢で離乳し、28℃に温度制御された動物飼育室の単飼用ケージに収容して4週間の飼養試験を行った。単飼用ケージの上部には子豚の保温のために赤外線ランプを設置した。試験区は牛乳給与区（牛乳区）と発酵乳給与区（発酵乳区）の2区とし、供試子豚を腹、体重が等しくなるように5頭ずつ割り当てた。給与する基礎飼料には抗菌性飼料添加物および生菌剤を含まない市販の人工乳後期用（SDS No.2、フィード・ワン株式会社）を用いた。牛乳区の子豚には、基礎飼料と牛乳を現物比で1:2の割合で混合した飼料を、発酵乳区の子豚には、基礎飼料と発酵乳を現物比で1:2の割合で混合した飼料を、それぞれ9:00と15:00に飽食となるように給与した。なお、本研究は農研機構の動物実験等実施規程に従って実施した。

2.3 測定項目

発酵乳給与試験中、飼料摂取量は毎日、体重は毎週測定した。試験開始前（3週齢）と試験終了後（7週齢）に頸静脈より採血とともに新鮮糞を採取した。血液については生化学性状と血液像（江東微生物研究所）を測定した。糞便はサンプリング後すぐに-80℃で保存した。糞中の免疫グロブリン（IgAおよびIgG）濃度については、糞便100mgを10%FBS含有PBSに懸濁してホモジナイズした後、遠心分離処理を行った上清についてELISAキット（Bethyl Laboratories）を用いて測定した。また、糞便100mgからリゾチームとアクロモペプチダーゼを用いた酵素法により細菌のゲノムDNAを抽出した。このサンプルについ

て16S rRNA遺伝子のメタゲノム解析を行い (Macrogen Japan Corp.), 牛乳区と発酵乳区の細菌叢を比較した。

2.4 統計解析

統計解析には、SAS (バージョン9.4) プログラムのGLMプロシージャを用いた。結果は平均値±標準誤差で表した。

3. 結果と考察

本試験で給与した発酵乳中のJ50株の菌数は調製直後において 10^{12} cfu/g, 1週間貯蔵後において 10^9 cfu/gであった。これを給与した発酵乳区の子豚における乳酸菌摂取量は、平均して 10^{12} ～ 10^{14} cfu/dayであった。発酵乳給与試験期間中の1日あたり乾物摂取量は、牛乳区0.74kgに対して発酵乳区0.76kgであった。平均日増体重量 (ADG)

は牛乳区0.47kgと発酵乳区0.44kg、飼料効率は牛乳区0.63に対して発酵乳区0.58と、発酵乳区がわずかに低い値となった。血液生化学性状 (Table 1) は血漿中の総タンパク質、アルブミン含量、アルブミン／グロブリン (A/G) 比について、両試験区に有意な差は認められず、発酵乳給与の影響はなかった。血中の中性脂肪、総コレステロール、HDLコレステロールおよびLDLコレステロール濃度 (Table 2) は、いずれも3週齢から7週齢へ成長するに伴って有意に ($p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$, $p < 0.05$) 低下したが、発酵乳給与による影響は認められなかった。糞便中のIgAおよびIgG含量 (Fig. 1) は、離乳に伴って有意に ($p < 0.05$, $p < 0.05$) 低下したが、発酵乳給与による影響は認められなかった。

発酵乳給与試験終了日に牛乳区および発酵乳区

Table 1 Plasma biochemical parameters of experimental piglets

	Total protein (g/dL)	Albumin (g/dL)	A/G	Fe (μg/dL)
milk				
3 weeks old	5.3	3.7	2.6	63.0
7 weeks old	5.2	3.5	2.1	38.0
fermented milk				
3 weeks old	5.5	3.9	2.6	120.2**
7 weeks old	5.5	3.9	2.4	186.8**

Values are least squares means. n=5. Piglets were fed basal diet with milk or fermented milk from weaning at 3 weeks old for four weeks. The statistical comparisons were made in same column within each group. ** : $p < 0.05$

Table 2 Plasma lipid profiles of experimental piglets

	Triglycerides	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	(mg/dL)
milk					
3 weeks old	87.8	135.1	58.2	66.3	
7 weeks old	34.8**	95.3**	44.6**	45.5**	
fermented milk					
3 weeks old	82.8	183.1	71.4	102.5	
7 weeks old	37.2**	94.5**	44.2**	46.1**	

Value are least squares means. n=5. milk, milk fed group from weaning at 3 weeks old for four weeks ; fermented milk, fermented milk fed group during weaning period. The statistical comparisons were made in same column within each group. ** : $p < 0.05$

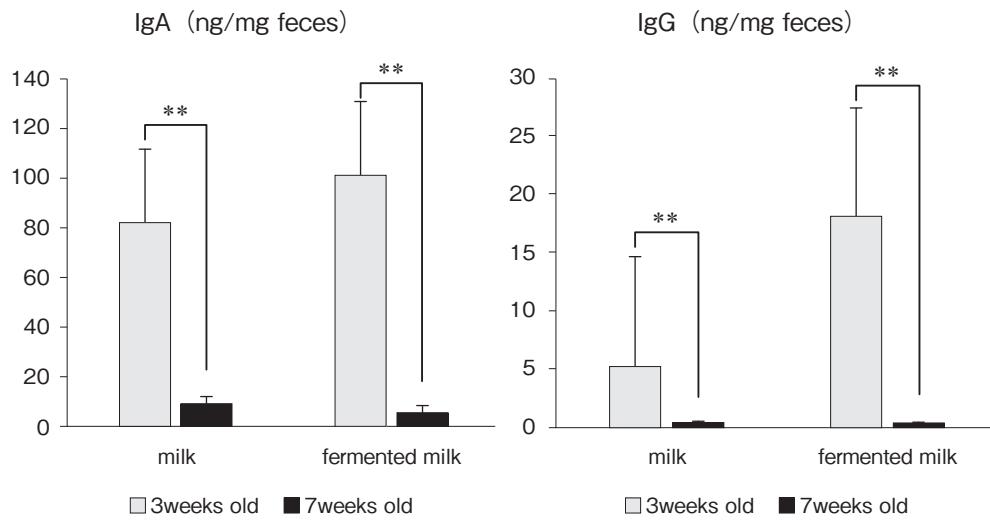


Fig. 1 Fecal IgA and IgG concentrations of milk and fermented milk fed pigs. Asterisks indicate $P < 0.05$ compared to milk fed pigs ($n=5$).

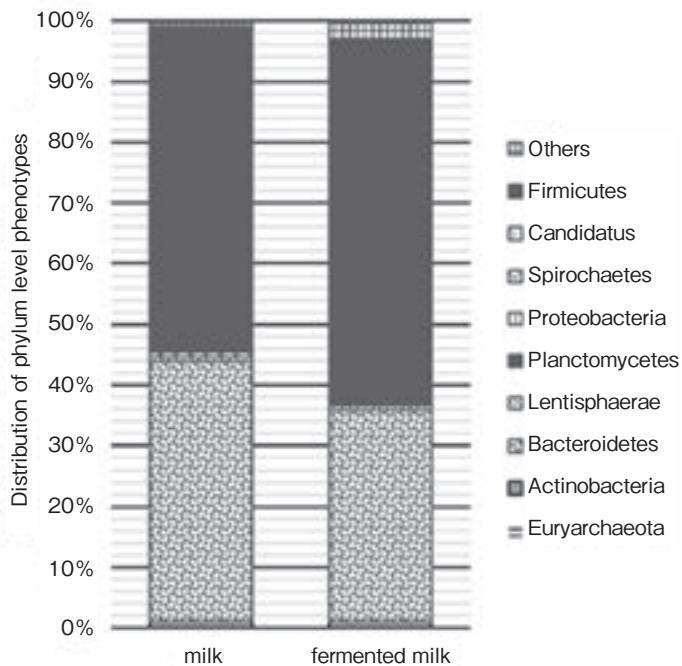


Fig. 2 Representative fecal microbiota profiles of milk and fermented milk fed pigs.

の子豚から採取した新鮮糞便中の細菌叢構造の代表例をFig. 2に示した。この時期の子豚の糞便中の細菌叢はFirmicutes門とBacteroidetes門が優勢

菌群であった。Bacteroidetes門の割合は牛乳区で38.7%に対して、発酵乳区では33.3%と有意に減少した ($p < 0.01$)。一方Firmicutes門の割合は、

牛乳区で55.3%に対して、発酵乳区では61.3%と増大した。菌叢構造において**Firmicutes**門の割合やその多様性は宿主の腸内環境に有益な効果をもたらすと考えられている。Hanらは9週齢の離乳子豚の糞便細菌叢を解析した結果、体重が小さい子豚では**Firmicutes**門の割合が小さい一方、**Bacteroidetes**門の割合が大きかったことを報告している⁹⁾。また、*Enterococcus faecium*をプロバイオティクスとして出生後の子豚に給与することで増体が促進されること、糞便細菌叢の**Bacteroidetes**門の割合が低下し、**Firmicutes**門の割合が増加することが報告されている¹⁰⁾。本年度試験では、J50株を用いて調製した発酵乳の給与は、離乳期の子豚の乾物摂取量に影響を及ぼさなかったが、J50株を含む発酵乳の給与は離乳期の子豚の菌叢構造に影響を及ぼすことが明らかとなった。属レベルでは、両試験区とも*Prevotella*属と*Lactobacillus*属が糞便の優勢菌群であり、発酵乳区においては発酵乳に含まれる*Lactococcus*属の割合が有意に増加した($p < 0.01$)。また発酵乳区では*Escherichia/Shigella*属および*Klebsiella*属、*Veillonella*属の割合が減少した($p < 0.05$, $p < 0.1$, $p < 0.05$)。*E. coli*や*Klebsiella*などのグラム陰性桿菌は日和見感染により、消化管の炎症性疾患に関与していると考えられている^{11), 12)}。離乳期は、子豚の腸内細菌のバランスが大きく変化することで消化管疾患のリスクが大きくなることから、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を用いて調製した発酵乳の給与は離乳期の子豚の腸内環境に有益である可能性が示唆された。

以上の結果から、*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を用いて調製した発酵乳を離乳期の子豚へ4週間給与することによって、子豚の腸内細菌叢に有益な効果をもたらす可能性が示唆された。本年度の試験では、発酵乳給与による離乳期の飼養成績の改善が認められなかつたが、今

後、試験数を増やして、離乳子豚の成長に及ぼす発酵乳の給与効果や*Lactococcus*属乳酸菌の摂取効果について引き続き検討する必要があると考えられる。

4. 要 約

離乳期の子豚の腸内環境の改善による成長促進効果を期待して、3週齢の雌の離乳子豚に発酵乳を4週間給与する試験を行った。発酵乳調製には、昨年度の本助成研究において離乳子豚の乾物摂取量を増加させる効果が認められた*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* J50株を用いた。発酵乳区の子豚では、発酵乳給与試験期間中の乳酸菌摂取量が $10^{12} \sim 10^{14}$ cfu/dayであった。乾物摂取量、増体、飼料効率は、いずれも両試験区で差が認められなかった。糞便中のIgAおよびIgG含量は離乳に伴って有意に減少したが、両試験区に差は認められなかった。*Lactococcus*属乳酸菌を含む発酵乳の給与は離乳子豚の糞便細菌叢に影響を及ぼし、牛乳区と比較して発酵乳区では**Bacteroidetes**門の割合が有意に減少し、**Firmicutes**門の割合が増大した。属レベルでは、発酵乳区において発酵乳に含まれる*Lactococcus*属の割合が有意に増加し、*Enterobacteriaceae*科の*Escherichia/Shigella*属および*Klebsiella*属の割合が減少した。離乳期の子豚に*Lactococcus*属乳酸菌を含む発酵乳を給与することで腸内環境が改善される可能性が示唆された。

文 献

- 1) Brooks, P. H., Geary, T. M., Morgan, D. T., Campbell, A. : *Pig. J.*, 36, 43~64, 1996.
- 2) Russell, P. J., Geary, T. M., Brooks, P. H., Campbell, A. : *J. Sci. Food. Agric.*, 72, 8~16, 1996.
- 3) Lawlor, P. G., Lynch, P. B., Gardiner, G. E., Caffery, P. J., O'Doherty, J. V. : *J. Anim. Sci.*, 80, 1725~1735, 2002.
- 4) Otsuka, M., Ishida, A., Murakami, H., Narita, T.,

- Minato, H., Takada, R. : *Jpn. J. Swine Sci.*, **42**, 54~60, 2005.
- 5) Blomberg, L., Henriksson, A., Conway, P. L. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 34~39, 1993.
- 6) Guo, X. H., Li, D. F., Lu, W. Q., Piao, X. S., Chen, X. L. : *Anto. Van. Leeuw.*, **90**, 139~146, 2006.
- 7) Missotten, J. A. M., Michiels, J., Ovyn, A., Smet, S. D., Dierick, N. A. : *Arch. Anim. Nutr.*, **64**, 437 ~ 466, 2010.
- 8) Nomura, M., Kobayashi, M., Narita, T., Kimoto-Nira, H., Okamoto, T. : *J. Appl. Microbiol.*, **101**, 396 ~405, 2006.
- 9) Han, G. G., Lee, J. Y., Jin, G. D., Park, J., Choi, Y. H., Chae, B. J., Kim, E. B., Choi, Y. J. : *Appl. Microbiol. Biothechnol.*, **101**, 5903~5911, 2017.
- 10) Wang, Y. B., Du, W., Fu, A. K., Zhang, X. P., Huang, Y., Lee, K. H., Yu, K., Li, WF., Li, Y. L. : *Benef. Microbes.*, **7**, 529~538, 2016.
- 11) Uejima, M., Kinoushi, T., Kataoka, K., Hiraoka, I., Ohnishi, Y. : *Microbial. Immunol.*, **40**, 553 ~ 560, 1996.
- 12) Fouhse, J. M., Zijlstra, R. T., Willing, B. P. : *Anim. Front.*, **6**, 30~36, 2016.

ビタミンA強化代用乳が黒毛和種子牛の哺育・育成期における生育へ及ぼす影響

Effects of vitamin A content in calf milk replacer on blood parameters and development of Japanese Black calves

小野晴美

(福岡県農林業総合試験場)

Harumi Ono

(Fukuoka Agricultural and Forestry Research Center)

We investigated the effects of different levels of vitamin A additive in calf milk replacer (CMR) on the blood parameters and growth rate of Japanese Black calves. The CMR used in this experiment was "Calf Top EX Black" (TDN 108% CP 28% EE 18%). Experimental animals were 15 calves (nine bulls and six heifers). Three bulls and three heifers were given CMR that was not supplemented with vitamin A (Control group), three bulls and three heifers were given CMR supplemented with vitamin A (50,000 IU/day; Group 1), and three bulls were given CMR supplemented with vitamin A (70,000 IU/day; Group 2). Other than the quantity of vitamin A supplement, all calves were maintained under the same conditions. We investigated changes in blood plasma retinol (Vitamin A1) levels, plasma α -tocopherol levels (Vitamin E), total cholesterol (T-Chol), feed intake and growth rate of calves between the ages of 2 and 10 weeks. Although there were no marked differences in the measured parameters among groups, changes were more noticeable in the experimental groups (Group 1 and Group 2) than in the Control group. The findings showed that CMR supplemented with vitamin A had an influence of plasma retinol levels. We considered that it is important to increase blood vitamin A levels by giving CMR supplemented with vitamin A (>50,000 IU/dl) by 2 weeks of age in order to maintain blood vitamin A levels at about 80 IU/dl. No clear differences in blood plasma α -tocopherol levels or T-Chol were observed in any of the animal groups. Blood α -tocopherol levels and T-Chol increased when the calves were given CMR (1.2 kg/day) between the ages of 3 and 8 weeks; however, blood α -tocopherol levels and T-Chol decreased when we reduced the quantity of CMR from 1.2 kg/day after 8 weeks of age. These findings imply that CMR was the main energy source of calves. Similarly, no major differences were observed in live weight, physical constitution and feed intake in all groups at ten weeks of age. We plan to extend this study to an age of nine months to determine if any such differences arise. We will also attempt to determine how much vitamin A is required in order to maintain blood plasma vitamin A levels above 85 IU/dl in calves aged 2 and 7 weeks-old to ensure healthy growth.

1. 目的

黒毛和種子牛の哺育体系では、分娩後速やかに母牛から離し、高蛋白・低脂肪の代用乳を多給する「強化哺育」により、通常の人工哺育と比較して哺育終了時の体重・体格が優れることが報告されている¹⁾。しかし、哺育期の黒毛和種子牛の血中ビタミンA (VitA) 濃度について、自然哺育した子牛では、出生直後の約30IU/dlから7日齢には約60IU/dlと2倍に増加し、その後12週齢まで徐々に増加して約100IU/dlに達するが、代用乳のみを給与した場合、出生から3か月齢まで60IU/dl以下で推移することが報告されている^{2,3)}。近年の種雄牛の改良により、黒毛和種子牛は出生時体重が重く、増体量も向上しており、現在使用されている代用乳では、哺育期におけるVitA要求量を充足していないことが考えられる。VitAは、粘膜形成に不可欠な要素であり、VitA

の摂取不足は腸粘膜発育停滞等による食欲低下、下痢および飼料効率の低下等、生育に支障をきたす恐れがある。そこで本研究では、哺育期において、肉用牛の血中VitA制御閾 (85~200IU/dl)⁴⁾ の下限値である血中VitA濃度85IU/dl以上を維持するために必要な代用乳へのVitA添加量を明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試牛と飼育期間ステージ

Table 1に供試牛の概要と試験区分を示した。黒毛和種子牛15頭（雄9頭、雌6頭）を代用乳へのビタミンA (VitA) 添加量の違いにより、対照区（無添加）および5万IU区（5万IU/日添加）に雄・雌各3頭、7万IU区（7万IU/日添加）に雄3頭を配置した。試験は福岡県内1戸の黒毛和種繁殖農家で実施し、試験期間は哺育期（2~10週齢）とした。

Table 1 List of examination calves

Group	SEX	Date of Birth	1st Father	Start week age be gave CMR
70,000IU	Male	2017/12/23	Mituhirateru	0.6
		2017/12/31	Sakio	1.4
		2018/1/8	Sigehisazakura	1.1
			Average	1.0
50,000IU	Male	2017/11/29	Mituhirateru	1.3
		2017/12/8	Mituhirateru	2.7
		2017/12/12	Sakio	2.1
			Average	2.0
Control	Female	2017/11/19	Mikunizakura	0.9
		2017/11/23	Takanokuni	1.0
		2017/11/26	Mituhirateru	1.7
			Average	1.2
	Male	2017/10/8	Mikunizakura	1.3
		2017/11/16	Mikunizakura	0.7
		2017/11/26	Fukuyasuteru	1.7
			Average	1.2
	Female	2017/10/20	Satitadasakae	0.9
		2017/11/18	Kitahirayasu	0.4
		2017/11/19	Sigehisazakura	0.6
			Average	0.6

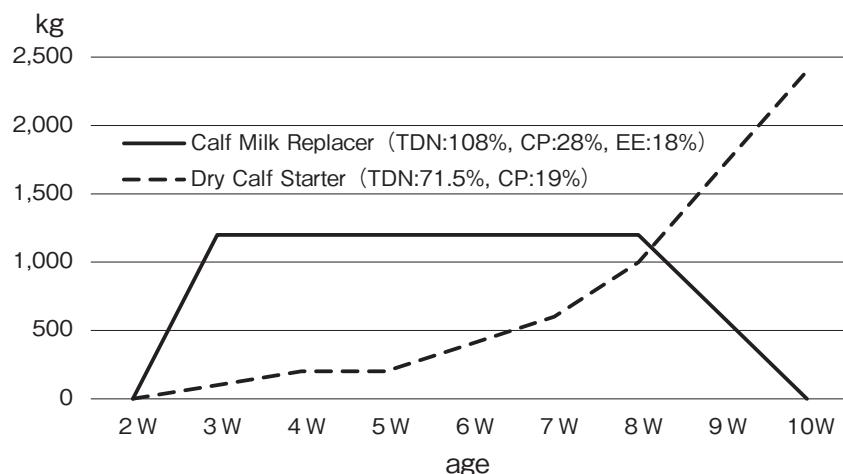


Fig. 1 Feeding program of Calf Milk Replacer and Dry Calf Starter

2.2 試験方法

VitA添加材は市販代用乳へ添加されているVitA剤と同様のものを使用した。VitAの添加量は5万IU区で5万IU／日、7万IU区で7万IU／日とし、代用乳（現物当たり可消化養分総量(TDN) 108%，粗タンパク質(CP) 28%，粗脂肪(EE) 18%）に添加し、朝晩2回給与した。代用乳と人工乳の給与プログラムをFig. 1に示した。代用乳の給与プログラムは全区で同様とし、生後2週齢までに給与を開始した後、最大給与量1.2kg／日を5週間給与、その後、段階的に減量して10週齢までに離乳した。人工乳の給与プログラムも全区で同様とし、市販飼料(TDN71.5%，CP19%)を朝晩2回給与した。人工乳は3週齢から給与を開始し、10週齢到達時に2.4kg／日まで増給した。飼育環境は個別飼いとし、飲水等の飼養条件は全区で同様とした。

本研究は、「産業動物の飼養および保管に関する基準」(昭和62年10月9日総理府告示第22号)に基づいて実施した。

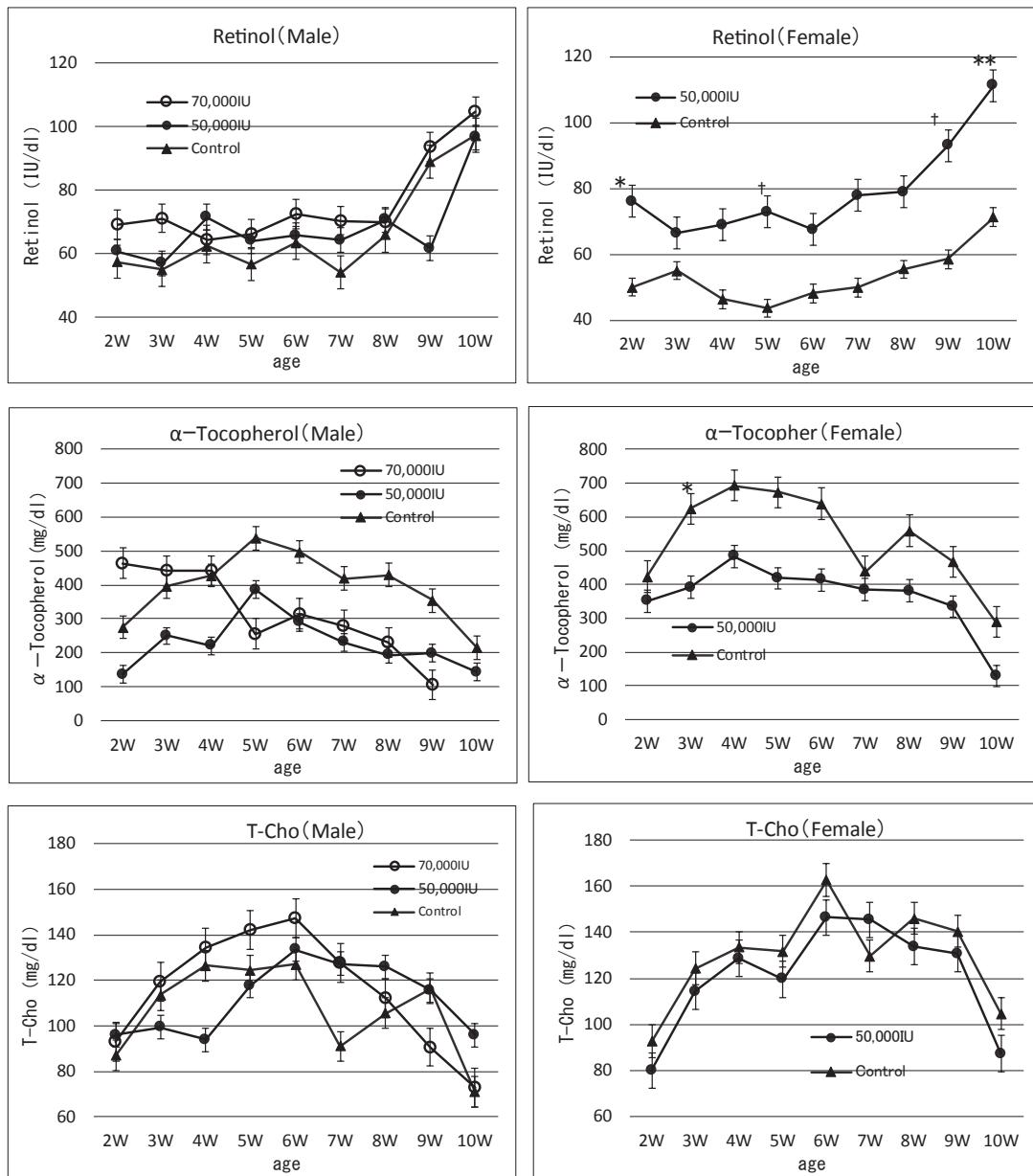
2.3 調査項目

体重と体格（体高・胸囲・腹囲）は2、10週齢時に測定した。試験開始以降1週間ごとに試験牛

の頸静脈より血液を採取し、遠心分離によって得られた血漿中のVitAおよびビタミンE(VitE)濃度をHPLC法により測定した。また、血漿中の総コレステロール(T-Chol)を乾式臨床化学分析装置(Spotchem SP-4410, Arkray)により測定した。代用乳摂取量は毎回の給与量と残量を測定することで、人工乳摂取量は毎日の給与量を記帳し、1週間ごとに残量を測定することで調査した。統計処理は、雄は分散分析、雌はTukeyHSDにより各試験区間の有意差検定を行った。

3. 結果と考察

雄雌における各試験区の血中VitA、VitEおよびT-Chol濃度の変化状況をFig. 2に示した。雄の血中VitA濃度は全区において、7週齢まで60IU/dl前後で推移した後、急激に上昇し、10週齢には全区約100IU/dlとなった。試験区間に有意な差は認められなかったものの、2～7週齢でVitA添加区が対照区よりも高い値で推移した。また雌では、2～7週齢において対照区で40～50IU/dl、5万IU区で70～80IU/dlで推移し、その後、10週齢には対照区で70IU/dl程度、5万IU区で110IU/dl以上の値を示した。2、10週齢時において、

Fig. 2 E. Changes of blood plasma retinol, α -Tocopherol and T-Chol (mean \pm SE)*** : Significant difference between the groups ($p < 0.01$)* : Significant difference between the groups ($p < 0.05$)† : Significant difference between the groups ($p < 0.10$)

5万IU区が対照区よりも有意に高く ($p < 0.05$), 約1.6倍の高い値を示した。

子牛は、6週齢まで体内で β -カロテンをVitAに変換できず⁵⁾、この間、体外からのVitAの供給に依存する。また、若齢牛はVitAの体内での貯

藏量が少なく、成牛よりも早くVitA欠乏症を発症することが知られている⁶⁾。血中VitAは、今回の試験でも、雄子牛で7週齢、雌子牛で6週齢まで変動なく推移しており、その後、いずれも急激に上昇した。人工乳、代用乳の β カロテン含

有量は非常に少ないことから、体内でのVitAの貯蔵能力が高まったことが推察された。雄の血中VitA濃度について試験区間に有意な差は認められなかったものの、2～7週齢でVitA添加区が対照区よりも高い値で推移した。雌においても、全期間を通じて5万IU区の血中VitA濃度が対照区よりも高く推移した。このことは、代用乳へのVitA添加が、雄雌の別なく、血中VitA濃度に影響を及ぼしたことを見た。また、雌では試験開始時である2週齢で、5万IU区が対照区よりも有意に高い血中VitA濃度を示した。これは、代用乳給与開始の週齢が、対照区は0.6週齢と早いのに対し、5万IUは1.2週齢と遅く、母乳の給与期間が長かったことが一つの要因と考えられた。つまり、初乳を含め、分娩初期の母乳を長期間摂取することで、子牛は母乳からのVitAを効率的に吸収し、血中VitA濃度を急激に上昇させたと考えられた。また、哺育期間を通じて血中VitA濃度を高位に維持するためには、2週齢までに血中VitA濃度をいかに上昇させるかが重要と考えられた。

雄の血中VitE濃度は、対照区と5万IU区で5週齢まで上昇し、その後10週齢には200mg/dl程度まで低下した。7万IU区では4週齢まで450mg/dl程度で推移し、その後、同様に低下した。すべての週齢時において、試験区間に有意な差は認められなかった。雌の血中VitE濃度は、対照区が4週齢時までに約700mg/dlまで急激に上昇した後、低下した。5万IU区は9週齢まで400mg/dl程度で推移し、10週齢で急激に低下した。また、3週齢時において対照区が5万IU区よりも有意（ $p < 0.05$ ）に高い値を示した（Fig. 2）。雄雌全区において、血中VitE濃度の変化は代用乳給与プログラム（Fig. 1）と同様の動きを示したことから、代用乳は哺育期における子牛へのVitEの主要な供給源であることが示唆された。

我々は既報において、VitAを多給した黒毛和種子牛の血中VitE濃度が高く推移したことから、VitA給与による子牛生体内の脂質代謝向上の可能性を報告した²⁾。しかし、今回の試験では、雌3週齢の血中VitE濃度について対照区が5万IU区よりも有意に高い値を示すなど、既報と異なる結果となったことは、今後の検討課題としたい。

雄雌の血中T-Chol濃度は、全区で6週齢まで上昇し、7週齢以降低下した。いずれの週齢時においても試験区間に有意な差は認められなかった（Fig. 2）。血中T-Chol濃度の変化もVitE同様、代用乳給与プログラム（Fig. 1）と同様の動きを示した。本試験において、代用乳給与量の漸減時（8～10週齢）に血中T-Chol濃度が低下したことから、代用乳を多給する今回の給与プログラムにおいて、人工乳への切り替え方法を改善する必要性が認められた。

試験牛の発育および飼料摂取状況をTable 2に示した。10週齢時における雄雌の体重、体高、胸囲、腹囲について、試験区間に差はなく、試験期間中の日増体量にも差は認められなかった。また、代用乳、人工乳およびTDN、CP摂取量についても、雄雌全区において差はなかった（Table 2）。既報²⁾において我々は、哺育期間のVitA給与は哺育終了時の体重に影響を及ぼさないものの、その後、育成期の発育性が向上し、育成期終了（9か月齢）時の体重が増加することを報告している。今回の試験牛についても、今後、9か月齢時点までの生育を調査し、哺育期のVitA摂取量が発育性に及ぼす影響について検討する必要がある。

今回の試験では、目的とした血中VitA濃度85IU/dl以上を維持することができなかつたが、哺育期間を通じて血中VitA濃度を高位に維持するためには、2週齢までに血中VitA濃度を十分に上昇させることが重要であることが明らかになった。また、分娩初期に母乳を長期間給与した

Table 2 Effect of Vitamin A on performance of calves.

Sex	Quantity of Vit. A Additon to CMR	n	Weight				D.G		Height		Chest measurment		Abdominal girth		Intake per day (kg) (2~10w)							
			2week (kg)		10week (kg)		(2~10w) (kg/day)		(10w) (cm)		(10w) (cm)		(10w) (cm)		DM		TDN		CMR		Calf Starter	
			mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD	mean	SD
Male	70,000IU	3	47.4	5.9	90.7	7.1	0.77	0.03	88.2	0.7	102.2	0.6	115.0	4.1	165	0.29	148	0.27	0.89	0.23	0.92	0.23
	50,000IU	3	48.0	0.0	89.8	9.3	0.77	0.16	87.3	0.9	102.3	2.4	114.3	4.1	132	0.28	122	0.24	0.83	0.11	0.61	0.21
	Control(0IU)	3	50.4	3.3	92.8	3.5	0.76	0.10	87.6	0.6	103.5	0.6	114.5	0.6	142	0.13	131	0.16	0.89	0.21	0.61	0.19
Female	50,000IU	3	42.7	4.7	83.7	6.6	0.73	0.06	84.9	1.9	102.0	0.5	112.0	3.7	135	0.18	118	0.19	0.65	0.20	0.84	0.11
	Control(0IU)	3	45.9	4.7	92.8	6.7	0.84	0.07	88.4	2.6	104.8	1.2	116.5	3.4	141	0.08	129	0.09	0.85	0.20	0.66	0.26

試験牛において、血中VitA濃度が上昇したことから、今後、母乳と代用乳からのVitA吸収効率の違いを解明することが重要と考えられた。

4. 要 約

代用乳中へのビタミンA(VitA)添加量の違いが哺育期の血液性状および発育性に及ぼす影響について検討した。黒毛和種子牛15頭を、対照区(無添加)、5万IU区(5万IU/日添加)に雄・雌各3頭、7万IU区(7万IU/日添加)に雄3頭をそれぞれ配置した。VitA添加量以外の飼養条件は全区同様とし、哺育期間(2~10週齢)中の血中VitA、ビタミンE(VitE)および総コレステロール(T-Chol)濃度の推移および飼料摂取状況、発育状況を調査した。

血中VitA濃度について、雄雌の各試験区間に明確な差異は認められなかったが、2~7週齢において、VitAを添加した区が無添加のものより高い値で推移したことから、代用乳へのVitA添加が、血中VitA濃度に影響を及ぼすことが明らかとなった。また、試験開始前の母乳給与期間が長かった試験区において、試験開始時(2週齢)から7週齢まで血中VitA濃度が70IU/dl程度と高く推移したことから、哺育期の血中VitA濃度を高位に維持するためには、2週齢までに血中VitA濃度を十分に上昇させる必要性が示唆された。血中VitE、T-Chol濃度についても、雄雌の各試験区間に差は認められなかつたが、全区にお

いて代用乳給与量の増減に準じて変動し、代用乳は子牛への主要なエネルギー供給源であることが明らかとなった。飼料摂取、発育状況についても、雄雌の各試験区間に差は認められなかつた。今後、9か月齢時点まで発育性を調査するとともに、人工哺育開始時に血中VitAを85IU/dl以上となるVitA添加量を解明することが必要である。

キーワード：黒毛和種子牛、哺育期、代用乳、ビタミンA

謝 辞

本研究の実施にあたり、調査子牛の提供および調査にご協力頂きました石橋牧場のご夫婦に心より感謝いたします。

文 献

- 1) 小野晴美、浅岡壮平、林武司、磯崎良寛、家守紹光：福岡県農林業総合試験場研究報告、3号、49~56、2017.
- 2) Ono, H., Saito, A., Matuno, T., Hayashi, T., Ueda, S., Baba, T.: Different level of vitamin in Calf Milk Replacer effect on calf blood parameters and calf development on a Japanese Black cow, The 17th AAAP Animal Science Congress, 202, 2016.
- 3) 吾郷英昭、大谷研文、奥田郁子、坂田昭次：黒毛和種子牛とその母牛の血中レチノール、 β -カロチン及び α -トコフェロール値の推移、山口県畜産試験場報告、第16号、27~33、2000.
- 4) 日本飼養標準(肉用牛)、2007.
- 5) ZINZEN.H: ロシュ飼料セミナー講演会、6, 58, 1975.
- 6) 小野斉：日本畜産学会北海道支部会報、第25卷第3号、27~34、1983.

子牛の強健性と発育能力を高める初期栄養強化 プログラムの開発

Development of intensified neonatal feeding program for improved health and growth in suckling calves

松崎正敏

(弘前大学農学生命科学部)

Masatoshi Matsuzaki

(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)

A feeding trial was conducted to clarify whether further acceleration of intensified milk replacer feeding can improve growth and health status of suckling calves. Four Holstein bull calves and one each of male and female Jersey calves were purchased from local dairy farmers at the age of 1 week. They were housed in individual pens and raised on intensified calf feeding programs "Calf top EX and EX black" (ZEN-RAK-REN), which provided maximum amounts of 1,200 and 1,000 g high protein milk replacer powders per day, respectively for Holstein and Jersey calves. Control group followed the feeding programs instructed by manufacturer taking 2 weeks of accustom period for increased milk replacer feeding to attain maximum amounts. Further acceleration by shortening the accustom period by approximately 1 week was adopted to treatment group. Holstein calves consumed designed amounts of diet on both treatments while Jersey calves were not able to consume the diet including milk replacer and starter. Accelerated Holstein calves showed higher growth rate on the 2nd weeks of experiment which corresponded to increased consumption of milk replacer. Health status including fecal score was not affected by nutritional treatment. There was no appreciable difference in weekly plasma measurements of metabolites, IL-6, IL-1 β , TNF- α and IFN- γ . The results suggest that nutritional acceleration of suckling calves should accord with their growth potential and/or frame size.

1. 目的

哺育期の疾病をきっかけとした子牛の損耗・廃用は依然少なくなく、国内で生まれる子牛の消化器・呼吸器疾患による損耗率は1割にも達するものと推計されている。子牛損耗・廃用のきっかけとなる疾病は、子牛自身の免疫機能の発達が盛んになり始める1ヵ月齢頃以前に発生しており、出

生後早期の疾病予防が課題である。この時期の感染症による発熱を伴う子牛の体調不良には抗生物質投与による対症療法が効果を発揮することから、様々な抗菌性飼料添加物などを利用した疾病予防策の開発が試みられている。しかしながら、抗生物質や抗菌性飼料添加物に頼ることなく子牛自身の強健性・抗病性を高めて哺育期の損耗率低減をはかるとともに、早期の肥育開始が可能な発

育能力の優れる肉用子牛の飼養システム開発が求められている。これまで、プレバイオティクスやプロバイオティクスなどの利用による抗病性向上やホエータンパク質を活用した代用乳の開発、高タンパク質代用乳の增量給与¹⁾などによる子牛の発育促進技術が提案されている。しかしながら、子牛自身の免疫機能の発達が盛んになり始める生後1ヵ月齢頃まで、すなわち子牛損耗の端緒となる疾病が発生する時期をターゲットとした栄養強化プログラムの開発とその効果検証はなされていない。

そこで本研究では、高タンパク質代用乳を增量給与する哺育方式における代用乳增量給与スピードをさらに早期化して哺乳初期からの栄養強化を試み、飼養成績ならびに下痢軟便の発生状況やLPS負荷試験に対する応答、血中の代謝成分やサイトカイン濃度に及ぼす影響を調査した。

2. 方 法

本実験は、弘前大学動物実験委員会による審査・承認を受け（A17005）、動物実験に関する規則に従って実施した。

生後約1週齢のホルスタイン種雄子牛4頭、ジャージー種の雌雄子牛各1頭の計6頭を青森県内の酪農家より購入して飼養試験に供試した。ホルスタイン種およびジャージー種には、粗タンパク質含量が28%、粗脂肪含量はそれぞれ15%および18%の代用乳粉末を5倍量の温湯に溶解して10時と18時に2等分して給与した。ホルスタイン種への代用乳粉末の給与日量は600 gから2週間かけて最大1200 gに增量して2週間給与した後、2週間かけて代用乳給与量を漸減、固形のスターク給与量を漸増、若干量の乾草を給与して7週齢時に離乳した。ジャージー種では同様の哺乳プログラムにおける代用乳粉末の最大給与量を1000 gとした。これら高タンパク質代用乳を增量給与

する哺乳方式を対照区として、試験区（早期強化区）においては代用乳粉末給与量を最大量に増大させる期間を約1週間前倒しして、より早期からの栄養強化を試みた。

毎日の給餌の際に、飼料摂取量を調査し、下痢軟便の発生状況を糞スコア（1：しっかり固い～5：水様）として観察記録するとともに、体重は毎週測定した。1週間間隔で朝の給餌前に頸静脈血を採取して、グルコース、NEFA、乳酸およびβ-ハイドロキシ酪酸の血漿中濃度を測定した。さらに、血漿中のIL-6、IL-1b、TNF- α およびIFN- γ の濃度を牛サンプルの測定を対象としたELISAキットで測定した。

4週齢時には、Plessers et al. (2015)²⁾ の方法に従って、LPS負荷試験による炎症反応評価を試みた。LPS (Sigma L-4516, E. coli O127 : B8) の投与用量 (0.3 μ g/kg体重) は、自然哺育育成中の子めん羊を用いて実施した予備試験により、血漿中サイトカイン濃度や直腸温の上昇などを引き起こすものの重篤な臨床症状がみられないことを確認して設定した。

3. 結果と考察

試験開始の1週齢における供試牛の平均体重はホルスタイン種が47.6kgとジャージー種の19.4kgの2倍以上と、両品種のフレームサイズの違いが明らかであった。Fig. 1に代用乳摂取量の推移を示したように、ホルスタイン種では残飼が発生することはなかったが、ジャージー種においては最大給与日量に相当する溶解した代用乳 6 kgを安定的に摂取できるまでに至ることなく、離乳に向けた給与量漸減の時期を迎えることとなった。ジャージー種の供試牛においては朝夕いずれかの代用乳をほとんど摂取しない日が散見された。すなわち、フレームサイズの大きく異なる両品種に対して代用乳給与量が大差のない設定となってい

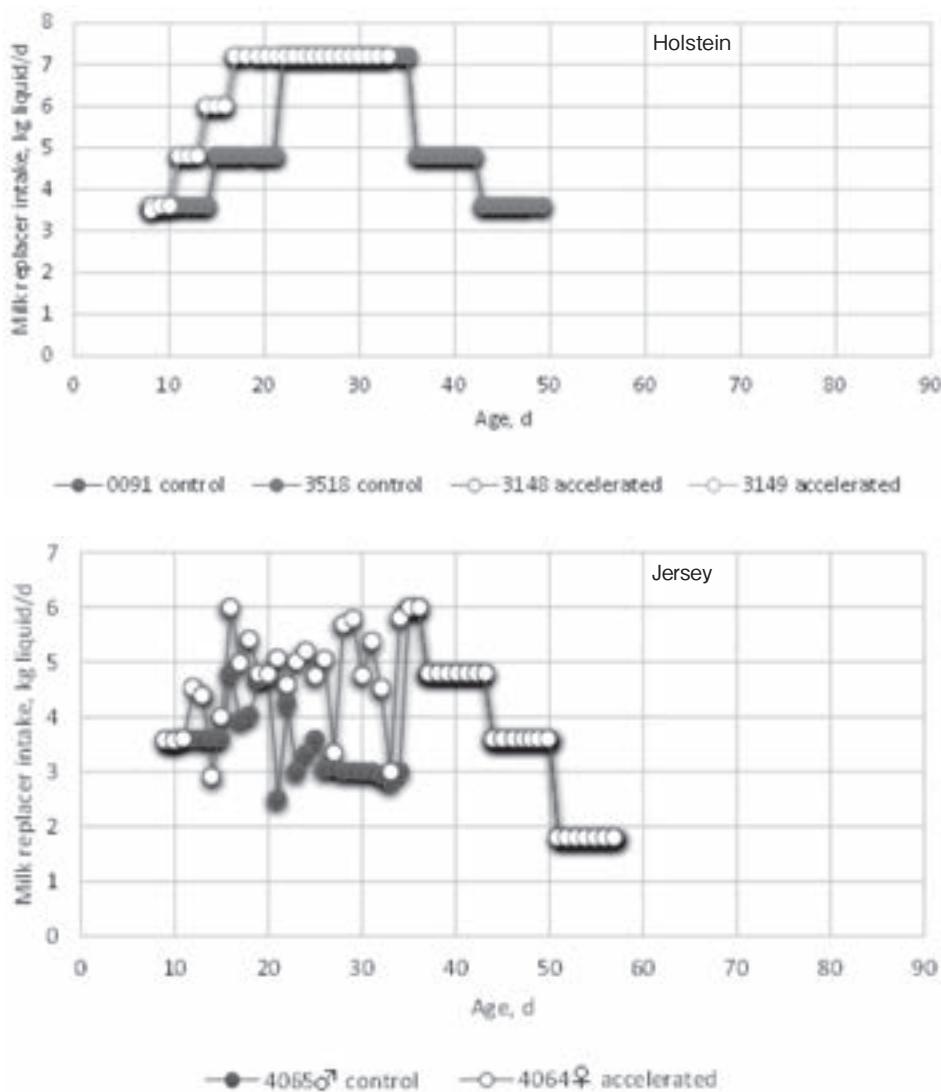


Fig. 1 Actual milk replacer intake of calves in control and accelerated intensified feeding group.

たため、両者の給与された栄養水準が異なり、ホルスタイン種では不足、ジャージー種では過剰となっていたものと推察された。実際、ホルスタイン種では1～2週齢時における日増体量が両試験区ともに低く、2～3週齢時には早期強化区で増体量が高まっていた (Table 1)。一方、ジャージー種では過剰量の代用乳を給与されていたにもかかわらず、1～3週齢時を通じて両個体ともに日増体量は0.3kg程度にとどまっていた (Table 1)。

また、ジャージー種子牛では設定した7週齢の離乳時期においてもスターターの摂取量がきわめて少なく、さらに1週間、1日1回の哺乳を継続せざるを得なかった。これらの結果は、フレームサイズの大きいホルスタイン種では本試験開始時期よりも早期の出生直後からの代用乳増給による初期栄養強化が可能なのに対して、ジャージー種のように小型な品種においては1回あたりの代用乳給与量を少なくして給与回数を増やすなど慎重な

Table 1 Weekly average daily gains in calves fed on control or accelerated intensified feeding regimen.

	control	accelerated	p-value
Holstein	n = 2	n = 2	
1-2 week	0.14 ± 0.04	0.10 ± 0.19	0.82
2-3 week	0.57 ± 0.07	1.06 ± 0.13	0.04
3-4 week	1.24 ± 0.12	1.08 ± 0.01	0.21
Jersey	4065♂	4064♀	
1-2 week	0.33	0.35	N.A.
2-3 week	0.35	0.27	N.A.
3-4 week	0.09	0.80	N.A.

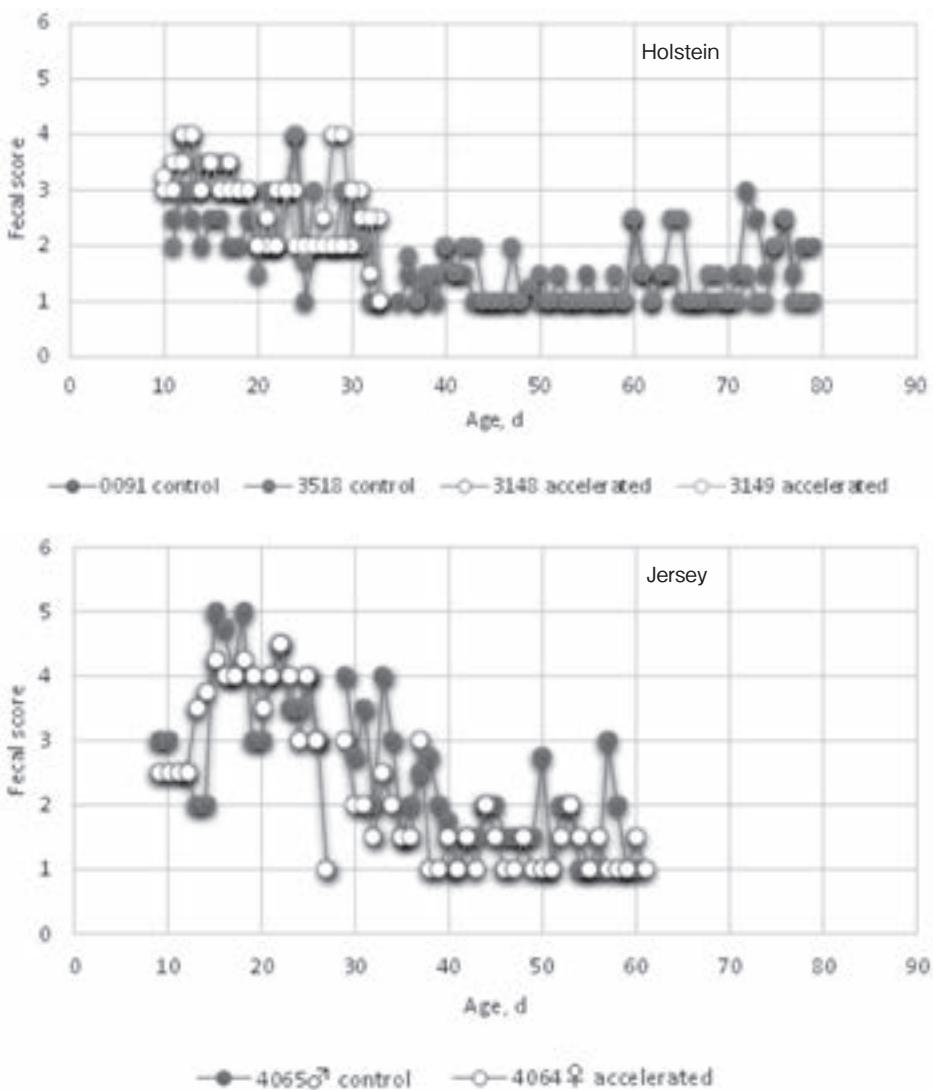


Fig. 2 Fecal scores of calves in control and accelerated intensified feeding group. Fecal scores were recorded from 1 : firm and dry to 5 : watery.

栄養強化が必要なものと考えられた。

Fig. 2 に示した糞スコアの推移をみると、両品種とも日齢の進行とともに低い値へと安定していく傾向が認められたが、代用乳給与プログラムの違いによる差は明らかではなく、下痢軟便の発生に哺乳プログラムの影響は認められなかった。

出生日が早く先行して試験を開始したホルスタイン種4頭の4週齢到達時に、LPS負荷試験を実施した。すべての個体においてLPS静注後10分程度から目視でも感知できるほどの頻脈と多呼吸が認められ、うち2頭が30分以内に斃死した。異常を感じた時点で獣医師に連絡して指示を仰ぐとともに、生存した2頭については獣医師の往診を受けて抗炎症剤の投与、脱水・アシドーシス改善のための補液、栄養補給、強肝剤の投薬治療などにより快復した。Plessers et. al.は本研究で用いたLPS 0.3 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重よりも多量の0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重のLPS投与を行って子牛における急性期炎症反応に対する評価モデルとしての有用性を報告している。と同時にLPS投与を行った8頭のうち1頭の斃死を報告しており、静脈内へのLPS投与による負荷試験の実施には急性のエンドトキシンショックに至らない用量の設定や標品の選択など綿密な予備検討が必要と考えられた。以上の事故を受けて、ジャージー種の供試牛に対するLPS負荷試験は断念することとした。

1週間間隔で採材した血漿サンプルについて分析を行った代謝成分ならびにサイトカインの濃度には、飼料処理ならびに日齢の進行に伴う影響は

認められず、これらを指標とした栄養強化の効果判定や免疫機能の発達、強健性の評価は難しいものと考えられた。

4. 要 約

高タンパク質低脂肪の代用乳を增量給与する哺育方式における代用乳增量給与をさらに早期化して哺乳初期からの栄養強化を行い、発育および強健性に及ぼす効果の検証を試みた。ホルスタイン種の供試牛に対しては代用乳增量給与のスピードを速めることによる増体促進効果が認められたものの、ジャージー種の子牛においては安定的に摂取可能な代用乳給与水準や給与回数の検討が必要なことが示された。代用乳增量給与時期の早期化による初期栄養強化は血中代謝成分やサイトカイン濃度、糞スコアなどに対する目立った効果を認められなかった。以上の結果から、フレームサイズの異なる品種の子牛それぞれが持つ潜在的な発育ポテンシャルに応じた初期栄養強化プログラム開発の重要性が示唆された。

文 献

- 1) 斎藤昭：哺乳子牛の栄養と飼養管理の変遷～“強化”哺育への道程～、家畜感染症学会誌、1, 37～47, 2012.
- 2) Plessers, E., Wyns, H., Watteyn, A., Pardon, B., De Backer, P., Croubels, S. : Characterization of an intravenous lipopolysaccharide inflammation model in calves with respect to the acute-phase response, *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 163, 46～56, 2015.

骨格筋の成長と筋線維型決定におけるストレス応答ホルモンの影響

The effect of stress hormone on the proliferation of myoblast and the determination of muscle fiber type

佐藤 勝祥

(秋田県立大学生物資源科学部)

Katsuyoshi Sato

(Faculty of Bioresource Sciences, Akita Prefectural University)

In recent years, the idea of animal welfare is widespread in animal husbandry field. In addition, stress adversely affects on productivity and the quality of animal product. So, it is very important to reduce the stress of livestock. We have studied with attention to the novel physiologically active peptide "apelin", this hormone was known as stress related hormones. Recently, the new possibilities as apelin's growth factor have been suggested. The aim of this study, therefore, 1) to investigate that apelin promotes mouse growth 2) to investigate the effect of apelin to Japanese short horn-derived muscle satellite cells growth and differentiation. In Experiment 1, apelin intraperitoneal administration twice weekly significantly increased weight gain of C57BL/6 mouse. In Experiment 2 with myoblast cell from Japanese shorthorn cattle, apelin stimulated cell growth. And apelin decreased the expression level of slow MyHC mRNA that is expressively expressed in type 1 muscle fibers at differentiation induction. From this experiment, it became clear that apelin promotes weight gain of mice and promotes proliferation of Japanese short horn-derived muscle satellite cells, suggesting the possibility of apelin growth promoting effect.

1. 目的

秋田県立大学付属フィールド教育研究センター（FC）で飼育されている日本短角種牛は、粗飼料の利用効率に優れており、放牧飼育に適していることから、地元の飼料資源を有効活用できる食肉資源として大変魅力的である。我々は、ストレス応答ホルモンを指標として、ストレスの少ない飼育環境の構築と生産性および肉質の改善を目標に研究に取り組んでいる。これまでの研究から、反

芻動物のストレス反応において新規ストレス応答ホルモン「アペリン」が重要な役割を担っていることが明らかになっており、ヤギへの絶水刺激によってアペリン分泌が促進されることや、ヒツジにおけるストレスホルモン（AVPやACTH）分泌促進作用を報告している¹⁾。ところで、アペリンにはストレス応答因子としての働きだけでなく、成長因子としての可能性が明らかになりつつある。ヒツジにおける成長ホルモン分泌促進作用¹⁾や、マウス由来骨格筋細胞の細胞増殖促進作

用²⁾が報告されている。これらのことから、アペリンがストレス管理と生産性の向上という二つの課題を結びつける指標となりうる可能性が期待される。

そこで本研究では、アペリンによる成長促進作用を検討することを目的として、マウスへのアペリン投与試験を行った。また、これらの研究成果を牛へと応用することを目指し、日本短角種由来の筋衛星細胞を用いて細胞増殖、および筋線維型調節に与える影響を検討することを目的とした。

2. 方 法

本実験は、秋田県立大学動物実験委員会の承認を得て行った。

2.1 アペリンによるマウスの成長促進作用の検討

2.1.1 実験① アペリン投与量の検討

C57BL/6（5週齢、雄）を用いてアペリン投与試験を行った。投与試薬は [Pyrl]-apelin-13（ペチド研究所）を用い、試験区は1匹あたり1, 10, 100μg (in PBS 100μl) のアペリン投与区と、対照区としてPBS投与区を設定し、各区に5匹ずつ供試した。腹腔内投与15分後に採血を行い、EDTA-2Na（1 mg/ml 血液）の入ったチューブに血液を採取し、遠心分離（3,000rpm, 4℃, 10分間）後の血漿サンプルを回収した。測定項目は血漿中のトリグリセリド濃度とし、トリグリセライド E-テストワコー（和光純薬工業株式会社）を用いて測定した。統計解析には、Tukeyの多重比較検定を用い、p < 0.05を有意差ありと判定した。

2.1.2 実験② マウスへのアペリン投与による体重の変化

C57BL/6（5週齢、雄）を用いて週2回ずつのアペリン腹腔内投与試験を行った。投与試薬は [Pyrl]-apelin-13を用い、投与量は1匹あたり

10μg (in 100μl PBS) とした。試験区は、通常飼料（動物実験用飼料MF、オリエンタル酵母工業株式会社）給餌区と高脂肪飼料（Quick Fat、日本クレア株式会社）給餌区を設け、それぞれにPBS投与区とアペリン投与区を設定し、計4区で試験を行った。各区に5匹ずつ供試し、1週間ごとに体重を測定しながら、4週間試験を行った。試験開始0週の体重を100として体重増加率を計算し、通常飼料給餌区と高脂肪飼料給餌区ごとに統計解析（t検定）を行った。p < 0.05を有意差ありと判定した。

2.2 日本短角種由来筋衛星細胞におけるアペリン刺激の影響

2.2.1 実験③ 日本短角種牛由来筋衛星細胞の増殖におけるアペリン刺激の影響

三宅ら³⁾の方法に従って、秋田県立大学生物資源科学部付属フィールド教育研究センターで飼育する日本短角種牛（6ヵ月齢、雄）の胸最長筋から筋衛星細胞を単離した。

単離した筋衛星細胞は、ダルベッコ変性イーグル培地（DMEM, high-glucose）に、牛胎児由来血清（FBS）を10%，抗生物質（ペニシリヌーストレプトマイシン）を1%，bFGF（線維芽細胞増殖因子）を4 ng/mlの濃度となるように添加した増殖用培地を用いて、37℃, 5%CO₂, 95%O₂の条件下で培養を行った。

単離した日本短角種牛由来筋衛星細胞を用いて、アペリン刺激による細胞増殖への影響を検討した。増殖用培地に [Pyrl]-apelin-13を0.1μMの濃度で添加した刺激用培地を作成した。6穴プレートを用いて、1穴あたり9 × 10⁴個（1.0 × 10⁴個/cm²）程度になるように細胞を播種し、2日おきに培地を交換しながら、14日間培養を行った。通常の増殖用培地区を対照区とし、対照区とアペリン刺激培地区それぞれに7枚のプレート用いて培養を行った。培養開始から2日間間隔

で1枚のプレート（6穴分）の細胞を回収し、トリパンブルー染色後、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。統計解析には t 検定を用い、測定日ごとに試験区間の細胞数を比較した。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2.2.2 実験④ 分化誘導におけるアペリン刺激の影響

2%ウマ血清を加えたダルベッコ変性イーグル培地 (DMEM, low-glucose) を分化誘導培地として、単離した筋衛星細胞の筋管細胞への分化能を検討した。4穴チャンバースライドに細胞を播種し、サブコンフルエント状態となるまで培養を続けた後、培地を分化誘導培地に変え、分化誘導刺激を4日間行った。分化誘導刺激の後、三宅ら³⁾の方法に従ってembryonic MyHCタンパク質の染色を行った。

この時、実験③と同様にして分化誘導培地に[Pyrl]-apelin-13を1.0 μM の濃度で添加し、分化誘導時におけるアペリン刺激の影響を検討した。2日おきに培地交換を行いながら4日間培養した後、各ウェルにRNAiso Plus（タカラバイオ）を700 μl ずつ加えて細胞を回収した。回収したRNAiso Plusにクロロホルムを200 μl ずつ加えて10秒間混和した後、室温で5分間静置し、12,000

$\times G$ 、4°Cで15分間遠心分離した。その後、上清のみを回収し、イソプロパノールを500 μl ずつ加えて数回転倒混和した後、室温で10分間静置し、12,000 $\times G$ 、4°Cで10分間遠心分離した。上清をアスピレートした後、70%エタノールを加え、同様にして遠心分離した。上清をアスピレートした後、回収したRNAをRNase-free-H₂Oに溶解させた。逆転写キット (PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser: タカラバイオ) を用いてcDNAを作成した後、リアルタイムPCR法 (LightCycler® 96 System, Roche) を用いてI型筋線維に発現するslow MyHC mRNAの発現量を解析した。用いたプライマーとPCR条件は、堀川らの報告⁴⁾に従い、GAPDHを内部標準として相対定量解析を行った。統計解析には t 検定を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

3. 結果と考察

3.1 実験①

マウスへのアペリン投与による血漿中トリグリセリド濃度の変動をFig. 1に示す。PBS投与区の値 ($159.10 \pm 14.84\text{mg/dl}$) と比べて、アペリン10 μg 投与区 ($100.16 \pm 5.67\text{mg/dl}$) および100 μg 投与区 ($104.83 \pm 9.08\text{mg/dl}$) の値が有意に低下

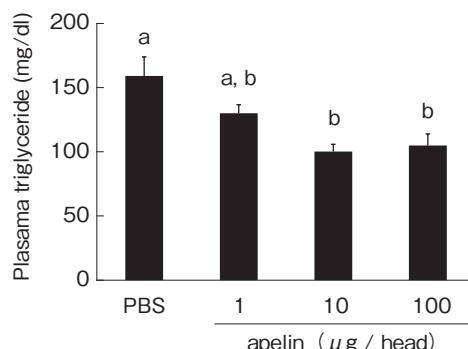


Fig. 1 Changes in plasma triglyceride concentrations by apelin administration. All data are expressed as mean \pm SEM. The different letters are significantly different by Tukey's multiple comparison test.

した ($p < 0.05$)。このことから、アペリンは脂質代謝調節に関与し、その作用は1匹あたり10 μg 以上の投与によって効果が現れることが示唆された。この結果を受け、実験②におけるアペリンの投与量を1匹あたり10 μg とした。

3.2 実験②

マウスへのアペリン投与による体重増加率の変動をTable 1およびTable 2に示す。通常飼料給餌区の結果では、試験開始3週間後のアペリン投与区の体重増加率 ($113.13 \pm 0.41\%$) が、PBS投与区の体重増加率 ($107.43 \pm 1.47\%$) と比べて有意に高い値となった ($p = 0.04$, Table 1)。また、高脂肪飼料給餌区の体重増加率では、試験開始1週間後から4週間後まですべての時点においてPBS投与区よりもアペリン投与区の方が有意に高い値となった (すべて $p < 0.05$, Table 2)。これらの結果から、アペリンがマウスの成長を促進する可能性が示唆された。

3.3 実験③

日本短角種由来筋衛星細胞の増殖におけるアペ

リン刺激試験の結果をTable 3に示す。試験開始4日目から10日目において、通常の増殖用培地区の細胞数に比べてアペリン刺激区の細胞数が有意に増えていた ($p < 0.05$)。

3.4 実験④

単離した筋衛星細胞における分化誘導刺激の結果をFig. 2(a)に示す。細胞染色の結果、embryonic MyHCタンパク質の発現が観察されたことから、本実験で単離した筋衛星細胞が筋管細胞への分化能を有することが確認できた。また、分化誘導時におけるアペリン刺激試験における、I型筋線維に特異的に発現するslow MyHC mRNA発現量の変化をFig. 2(b)に示す。結果、分化誘導時のアペリン刺激によってslow MyHC mRNA発現が有意に減少した。日本短角種牛由来筋衛星細胞における、細胞増殖と分化誘導におけるアペリン刺激の結果は、マウス由来筋芽細胞(C2C12)へのアペリン刺激試験の報告²⁾と一致しており、アペリンが骨格筋の成長を促進させる可能性が示唆された。

Table 1 Effect of apelin on weight gain in normal diet group

	0w	1w	2w	3w	4w
PBS	100	106.48 ± 1.33	106.29 ± 1.62	107.43 ± 1.43	112.47 ± 1.54
apelin	100	107.19 ± 0.32	101.45 ± 2.50	$111.13 \pm 0.41^*$	115.06 ± 0.88

All values are expressed as mean \pm SEM and analyzed by t-test. * $p < 0.05$ vs. PBS group.

Table 2 Effect of apelin on weight gain in high fat diet group

	0w	1w	2w	3w	4w
PBS	100	112.86 ± 1.46	115.63 ± 1.42	121.42 ± 1.42	125.91 ± 1.57
apelin	100	$117.21 \pm 1.23^*$	$123.06 \pm 0.87^*$	$127.89 \pm 0.80^*$	$133.83 \pm 1.12^*$

All values are expressed as mean \pm SEM and analyzed by t-test. * $p < 0.05$ vs. PBS group.

Table 3 Cell count of muscle satellite cells ($\times 10^4$ cells/well) from Japanese shorthorn cattle with apelin

	day2	day4	day6	day8	day10	day12	day14
control	40.6 ± 3.9	102.3 ± 4.6	131.0 ± 2.2	136.2 ± 3.0	168.8 ± 3.7	204.5 ± 2.5	210.2 ± 6.0
apelin	43.8 ± 1.8	$121.8 \pm 3.6^*$	$139.3 \pm 0.7^*$	$157.7 \pm 5.2^*$	$194.1 \pm 5.2^*$	198.1 ± 1.9	202.8 ± 9.4

All values are expressed as mean \pm SEM, and analyzed by t-test. * $p < 0.05$ vs. control group.

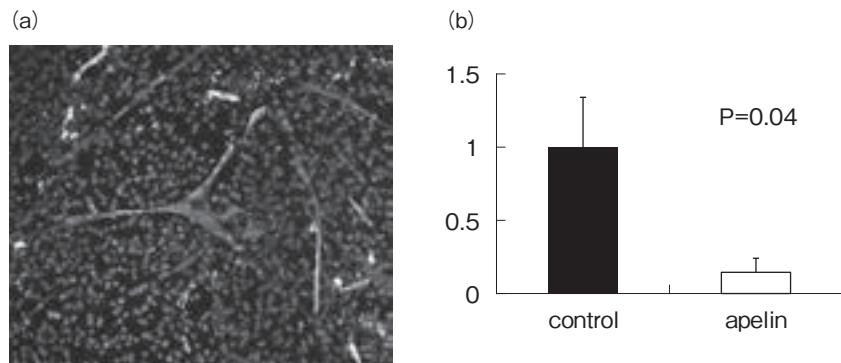


Fig. 2 Effect of differentiation induction stimulation on myotube cells. (a) Cells immunostained using anti-embryonic MyHC. Bars 100 μ m. (b) Change in expression level of slow MyHC mRNA by adding apelin quantified by real-time PCR. The values were normalized to GAPDH, and analyzed by t-test.

本試験で得られた以上の結果から、アペリンによる成長促進作用の可能性が示唆された。

4. 要 約

本試験では、アペリンによる成長促進作用および筋線維型調節への影響を検討することを目的とした。マウスへの腹腔内アペリン投与によって血漿中トリグリセリド濃度が有意に低下することが明らかになり、アペリンが脂質代謝調節に関与している可能性が示唆された。また、週2回ずつのアペリン投与によって、マウスの体重増加率が有意に増加することが明らかになった。日本短角種由来の筋衛星細胞におけるアペリン刺激試験の結果、細胞増殖が有意に促進されることが明らかになった。また、筋管細胞への分化誘導時におけるアペリン刺激試験ではI型筋線維に特異的に発現するslow MyHC mRNAの発現量が低下する結果が得られた。

本試験から、アペリンがマウスの体重増加を促

進し、日本短角種由来筋衛星細胞の増殖を促進することが明らかになり、アペリンによる成長促進作用の可能性が示唆された。

文 献

- Sato, K., Takahashi, T., Kobayashi, Y., Hagino, A., Roh, S. G., Katoh, K.: Apelin is involved in postprandial responses and stimulates secretion of arginine-vasopressin, adrenocorticotrophic hormone and growth hormone in the ruminant, *Domestic Animal Endocrinology*, 42 (3), 165~72, 2012.
- 佐藤勝祥, 堤優樹, 小池晶琴, 横尾正樹: マウス由来筋芽細胞の増殖におけるストレス応答ホルモン刺激の影響, 秋田県立大学ウェブジャーナルB, Vol3, 118~123, 2016.
- Miyake, M., Takahashi, H., Kitagawa, E., Watanabe, H., Sakurada, T., Aso, H., Yamaguchi, T.: AMPK activation by AICAR inhibits myogenic differentiation and myostatin expression in cattle, *Cell Tissue Res.*, 349, 615~623, 2012.
- Horikawa, A., Ogasawara, H., Okada, K., Kobayashi, M., Muroya, S., Hojito, M.: Grazing-induced changes in muscle microRNA-206 and -208b expression in association with myogenic gene expression in cattle, *Animal Science Journal*, 86 (11), 952~60, 2015.

亜鉛トランスポーターに着目した亜鉛栄養改善飼料の開発

Studies on a feed for improving zinc nutrition by the use of zinc transporters

神戸 大朋

(京都大学大学院生命科学研究科)

Taiho Kambe

(Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Zinc is an essential trace element as a second most abundant transition metal in biological systems. Recent *in silico* studies indicate that approximately 10% of the mammalian proteome requires zinc for cellular activity, and its deficiency causes severe defects in life. Thus, preventing zinc deficiency is critically important for growth promotion for livestock. In zinc absorption processes, the zinc transporter ZIP4, which is localized to the apical membrane in the enterocytes, plays an essential role as a zinc uptake pathway. ZIP4 expression is decreased in zinc sufficient conditions and thus increases of zinc contents in foods for livestock would decreases zinc absorption rate. In addition to ZIP4, ZNT1, which is located to the basolateral membrane of the enterocytes, plays a role by effluxing zinc into the portal blood. Thus, food component(s) that enables cell surface ZIP4 or ZNT1 expression, would lead to facilitating zinc absorption. In this study, we screened food extracts possessing such activity by the use of our screening systems named ZIP4-targeting or ZNT1-targeting. Moreover, we screened food extracts, which possess the activities to increase expression or activities of ZNT transporters involved in zinc transports into the breast milk using newly established two screening systems, because the content of zinc significantly affects the good health and growth of child livestock such as piglets. Our approaches would provide new information to achieve a feed for livestock by improving zinc nutrition through the use of zinc transporters.

1. 目的

亜鉛は家畜の成長にとってきわめて重要な必須微量元素である。特に、仔豚においては、亜鉛の添加が、成長促進、下痢の抑制、免疫力亢進効果を示すという報告が多数ある^{1,2)}。そのため、一般的な家畜用配合飼料には十分量の亜鉛が添加されている。しかしながら、腸管での亜鉛吸収効率が30%程度と低いこと、さらに、その吸収効率

が亜鉛摂取量の増加に反比例して低下するため、添加亜鉛の大部分は家畜の体内に吸収されず、糞尿とともに排出される。したがって、家畜における亜鉛栄養の効果を十分に發揮させるには、亜鉛摂取量を増加させることよりも、むしろ亜鉛吸収効率を上昇させることが肝要となる。

消化管からの亜鉛吸収は、消化管上皮細胞の管腔側膜に発現するZIP4と側底膜側に発現するZNT1が重要であり、ZIP4が食事由来の亜鉛を細

胞内に取り込み、ZNT1が細胞から門脈への放出を担う。亜鉛吸収効率を高めるには、両トランスポーターの発現とともに高めることが重要となる。ZIP4は先天性亜鉛欠乏症・腸性肢端皮膚炎の原因遺伝子として同定されたタンパク質であり、消化管管腔からの亜鉛取り込みに必須の役割を果たす。消化管特異的にZIP4を欠損させたマウスは、亜鉛の補充なしには成育することができない³⁾。また、家畜では、牛においてlethal trait A46と呼ばれる先天性の亜鉛欠乏症が存在するが、その原因もZIP4の変異である⁴⁾。したがって、ZIP4はヒトのみならず、家畜を含めたすべてのほ乳類の亜鉛吸収に必須のタンパク質となる。研究代表者は、これまでに、ZIP4の発現が亜鉛欠乏依存的に増加するが、亜鉛十分時には速やかに消失することを分子レベルで証明している^{5, 6)}。一方、上皮細胞に取り込まれた亜鉛を血流に放出する役割を果たすZNT1に関しては、発現が亜鉛量に応じてタンパク質レベルで変動することを突き止めている（未発表データ）。これらの結果を基に、「ZIP4・ZNT1発現促進活性を持つ食品の摂取→腸管でのZIP4・ZNT1発現の増大→亜鉛の吸収効率上昇→亜鉛欠乏を予防」というストラテジーを考案し、これらの発現を増加させる因子をスクリーニングできるZIP4-targetingおよびZNT1-targeting因子探索系を構築した。また、本研究では、乳児期という主に母乳を栄養源としている時期に着目し、上述のZIP4およびZNT1の発現を介して消化管からの亜鉛吸収を促進する可能性がある食品因子の探索だけではなく、母乳中に亜鉛を輸送する活性を有することが知られる複数のZNTトランスポーターの発現や活性を増強させる効果を有する因子の探索も実施した。両探索によって見出された因子を組み合わせることで、乳児期から成長期までの腸管での亜鉛吸収効率を上昇させ、結果として、家畜の健康な成長の

促進につなげることが可能となることが予想される。亜鉛栄養改善飼料の開発につながる基盤の確立を目的として本研究を遂行した。

2. 方 法

2.1 ZIP4およびZNT1発現を増強させる活性を有する因子の探索

ZIP4-targetingおよびZNT1-targeting探索系に使用する培養細胞を単層培養し、その培養液に終濃度0.1%となるように種々の食品抽出物を添加し、24時間培養した。細胞を回収して細胞膜画分を調製し、タンパク質濃度を測定後、ウェスタンプロット法にてZIP4およびZNT1の発現量を定量した。ZIP4とZNT1の検出には抗ZIP4あるいは抗ZNT1モノクローナル抗体を使用した^{6, 7)}。

2.2 母乳中に亜鉛を輸送するZNT2の発現を促進させる因子の探索

ZNT2プロモーターの下流に分泌型ルシフェラーゼ遺伝子 (Cypridina Luciferase) を接続したプラスミドを導入したマウス乳腺上皮HC11細胞の培養液に、食品抽出画分を終濃度0.1%となるように添加し、24時間培養した。Pierce Cypridina Glow Assay Kitを使用して培養液中に分泌されたルシフェラーゼ活性を測定した。

2.3 ZNT5-ZNT6へテロ二量体の亜鉛輸送活性を増強させる因子の探索

ZNT2に加えて、分泌経路の局在するZNT5-ZNT6へテロ二量体は、マウス以外のほ乳類の哺乳中に亜鉛を輸送する活性があることが示唆されている⁸⁾。ヒトミエローマ細胞株を使用して、亜鉛要求性酵素であるアルカリリフォスファターゼ (ALP) 活性を指標にZNT5-ZNT6へテロ二量体の亜鉛輸送活性評価できる系を構築し、上述の抽出物中から活性因子を探索した。ALP活性の測定には、*p*-nitrophenyl phosphateを基質として加水分解活性を測定した。

3 結果と考察

3.1 消化管からの亜鉛吸収を増強させる因子の探索

ZIP4-targetingおよびZNT1-targeting探索系を用いて、種々の食品抽出物におけるZIP4およびZNT1の発現を増強させる因子を探査した結果、新たに複数の抽出物にZIP4の発現を増強させる活性があることを見出した (Fig. 1)。ZIP4のスクリーニングには、これまでにZIP4の発現増強因子として同定している大豆含有因子ソヤサポニンBbを対象として使用したが⁹⁾、いくつかの抽出物でソヤサポニンBbに匹敵する活性を有することが明らかとなった。現在、活性が確認された抽出物のいくつかについては、中圧カラムクロマトグラフィー等で、活性化合物の単離を試みており、单一画分までに精製できた成分について

は、NMRやMSなどに供してその構造を決定し、ソヤサポニンBbとの比較から構造活性相関などを詳しく検討することを計画している。一方、ZNT1に関しては、ポジティブコントロールに使用した亜鉛添加条件に匹敵するような有意な活性を有する抽出物を見出すことができなかった。この理由としては、ZNT1の発現変化のリスペンスがZIP4に比べて遅いため、大きな影響を与える因子を検出できなかった可能性が考えられる。しかしながら、ZNT1に関しては、これまでのところ、発現を変化させる食品因子に関する情報がほとんどなく、本成分の同定を試みる意義は大きいため、今後は親油性画分抽出物についても解析を進めて行く予定である。消化管からの亜鉛吸収は、消化管上皮細胞においてZIP4とZNT1が連動することが重要と考えられるため、まだ試していない食材を用いて、今後も本解析を進める予定で

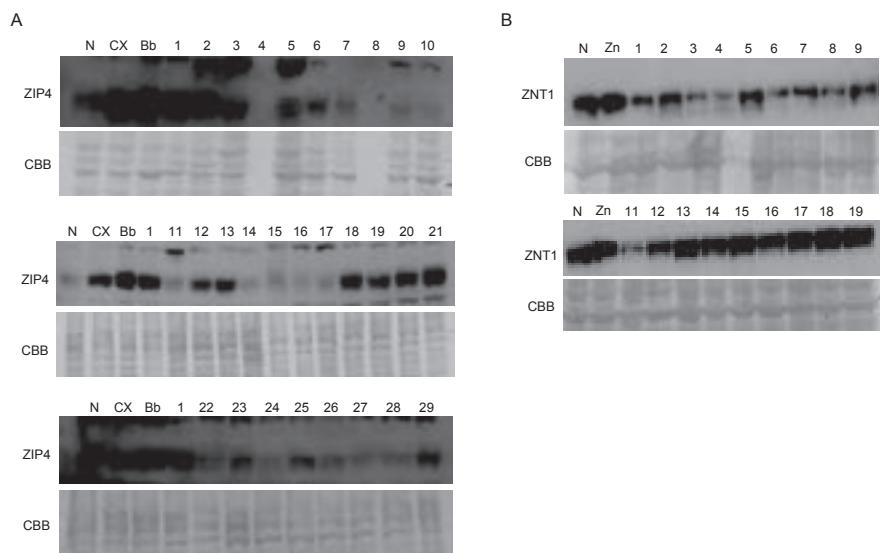


Fig. 1 Screening of component(s) to increase ZIP4 and ZNT1 expression. A, Mouse Hepa cells were cultured in the presence or absence of various food extracts (1-29) for 24 h. Membrane proteins (20μg) prepared from the cells were subjected to western blot analysis, and ZIP4 protein was detected by anti-ZIP4 antibody. S : zinc sufficient, D : zinc deficient, Bb : soybean extracts. B, CaCo2 cells were cultured with various food extracts (1-19) for 24 h, and total cellular proteins were subjected to immunoblot analysis, and ZNT1 protein was detected by anti-ZNT1 antibody. In A and B, the representative results are shown. N : normal medium, CX : zinc deficient medium. Bb : soyasaponin Bb, Zn : zinc-supplemented medium

ある。亜鉛強化飼料の使用時に家畜の糞尿とともに排出される余剰量亜鉛は重金属環境汚染源として問題となるため²⁾、本アプローチから開発される亜鉛栄養改善飼料は、この余剰亜鉛の減少にも貢献することが期待される。

3.2 母乳中に亜鉛を輸送する活性を増強させる食品因子の探索

本アッセイ方法では、ZNT2プロモーターの活性がルシフェラーゼ活性に反映されるため、ZNT2の発現を増加させる食品抽出物の探索が可能となる。これまでのところ、ルシフェラーゼ活性を劇的に増加させる抽出物を見出すことに成功していないが（Fig. 2），細胞種の検討を含めて引き続き解析を進めて行く予定である。また、マウス細胞の解析とはなるが、いくつかの抽出物でZNT2タンパク質の発現を増加させていたる活性を有する結果が得られているため（結果省略）、牛や豚のZNT2発現細胞を探査し、同様の解析を進める計画を立てている。

また、本解析では、ZNT2と同様に母乳中の亜

鉛輸送に関わることが示されているZNT5-ZNT6ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性評価系を構築し⁸⁾、スクリーニングに使用した。ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性は、亜鉛要求性酵素であるALP活性に反映されるため、ALP活性増強効果を解析することで、ZNT5-ZNT6ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性を評価することが可能となる¹⁰⁾。本解析においては、弱いながらも活性を増強させる食品抽出物を数種類見出しているが（Fig. 3），今後、さらに強い活性を有する抽出物を探索していく予定である。これら2つの解析で見出された因子については、今後、ラットを使用した動物実験でその効果を検証する計画を立てており、因子同定後は速やかに実施したい。

乳児期の亜鉛栄養が家畜の成長に重要なことは、乳幼児期の豚に亜鉛を補充することで成長が促進されることを示す結果が複数報告されていることからも明らかである。よって、本研究を継続し、母乳中の亜鉛含量を増加させる手法を確立し、健康な家畜の成長につながる飼料開発の基盤

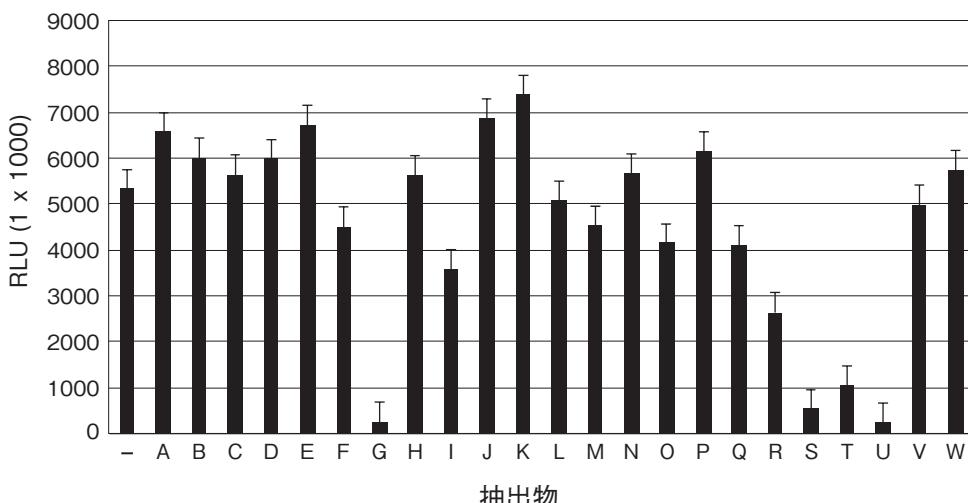


Fig. 2 Screening of component(s) to increase ZNT2 transcription.

Mouse mammary gland HC11 cells stably expressing Cypridina Luciferase were established, in which its expression is under control ZNT2 promoter. The HC11 cells were cultured with or without (-) various food extracts (A-W) for 24 h, and the activity of luciferase secreted in the spent medium was measured. The representative results are shown.

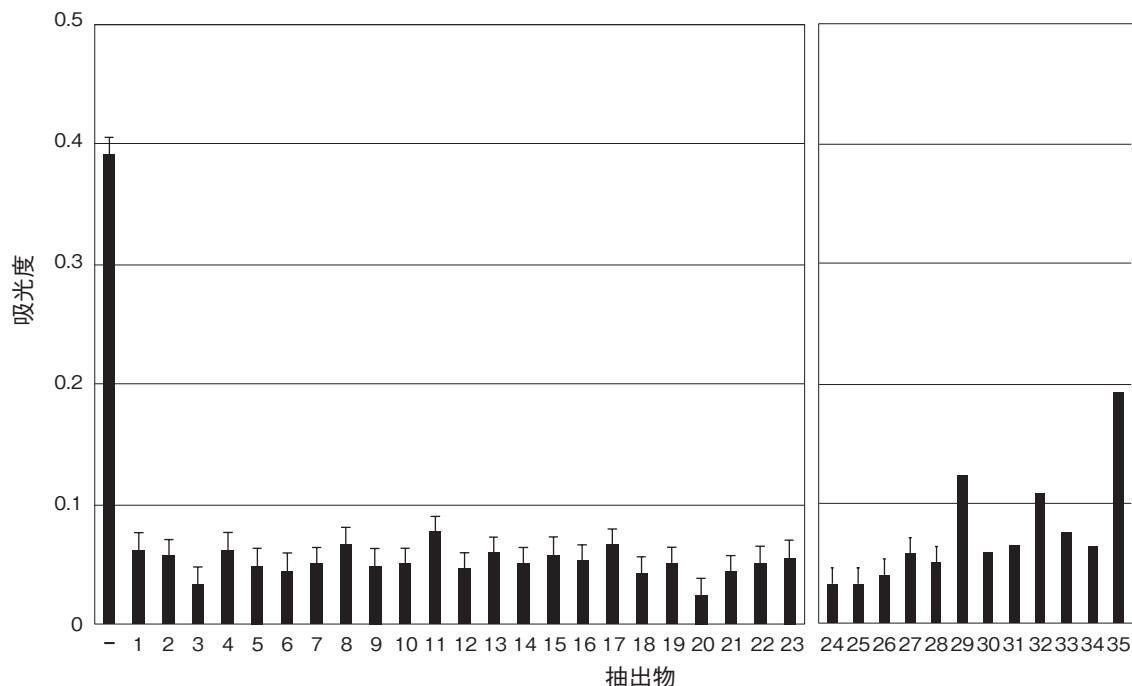


Fig. 3 Screening of component(s) to facilitate ZNT5-ZNT6 zinc transport activity.

Human chronic myelogenous leukemia-derived HAP1 cells stably expressing mutant ZNT5 and ZNT6, and secretary alkaline phosphatase (SEAP) were established. The ZNT5 mutant used in this study has reduced zinc transport activity, and thus SEAP is not fully activated. The HAP1 cells were cultured in medium in the presence or absence (-) of various food extracts (1-35) for 24 h, and the activity of SEAP secreted in the spent medium was measured. The representative results are shown.

の確立を目指したい。

4. 要 約

亜鉛栄養改善飼料の開発につながる基盤の確立を目的として、消化管からの亜鉛吸収に機能するZIP4およびZNT1の発現を増加させる食品因子の探索を実施した。結果、ZNT1の発現に影響を与える抽出物を見出すことはできなかったが、新たに複数の抽出物にZIP4の発現を増強させる活性があることを見出した。また、家畜の成長に重要な要素となる母乳中亜鉛を増加させる食品因子の探索を実施した結果、弱いながらも母乳中の亜鉛輸送に関わるとされるZNT5-ZNT6ヘテロ二量体の亜鉛輸送活性を増強させる活性因子を見出すことに成功した。本研究でのアプローチを継続し、

健康な家畜の成長につながる飼料開発の基盤の確立を目指したい。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、ご援助賜りました公益財団法人伊藤記念財団に厚く御礼申し上げます。

文 献

- Wang, Y., Tang, J. W., Ma, W. Q., Feng, J., Feng, J. : Dietary zinc glycine chelate on growth performance, tissue mineral concentrations, and serum enzyme activity in weanling piglets, *Biol Trace Elem Res*, 133, 325~334, 2010.
- Cho, J. H., Upadhyaya, S. D., Kim, I. H. : Effects of dietary supplementation of modified zinc oxide on growth performance, nutrient digestibility, blood profiles, fecal microbial shedding and fecal score in

- weanling pigs, *Anim Sci J.*, **86**, 617~623, 2015.
- 3) Geiser, J., Venken, K. J., De Lisle, R. C., Andrews, G. K. : A Mouse Model of Acrodermatitis Enteropathica : Loss of Intestine Zinc Transporter ZIP4 (Slc39a4) Disrupts the Stem Cell Niche and Intestine Integrity, *PLoS Genet.*, **8**, e1002766, 2012.
- 4) Yuzbasiyan-Gurkan, V., Bartlett, E. : Identification of a unique splice site variant in SLC39A4 in bovine hereditary zinc deficiency, lethal trait A46 : An animal model of acrodermatitis enteropathica, *Genomics*, **88**, 521~526, 2006.
- 5) Kambe, T., Andrews, G. K. : Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations, *Mol Cell Biol*, **29**, 129~139, 2009.
- 6) Hashimoto, A., Nakagawa, M., Tsujimura, N., Miyazaki, S., Kizu, K., Goto, T., Komatsu, Y., Matsunaga, A., Shirakawa, H., Narita, H., Kambe, T., Komai, M. : Properties of Zip4 accumulation during zinc deficiency and its usefulness to evaluate zinc status : A study of the effects of zinc deficiency during lactation, *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **310**, R459~468, 2016.
- 7) Nishito, Y., Tsuji, N., Fujishiro, H., Takeda, T., Yamazaki, T., Teranishi, F., Okazaki, F., Matsunaga, A., Tuschl, K., Rao, R., Kono, S., Miyajima, H., Narita, H., Himeno, S., Kambe, T. : Direct Comparison of Manganese Detoxification/Efflux Proteins and Molecular Characterization of ZnT10 as a Manganese Transporter, *J Biol Chem*, **291**, 14773~14787, 2016.
- 8) Kumar, L., Michalczyk, A., McKay, J., Ford, D., Kambe, T., Hudek, L., Varigios, G., Taylor, P. E., Ackland, M. L. : Altered expression of two zinc transporters, SLC30A5 and SLC30A6, underlies a mammary gland disorder of reduced zinc secretion into milk, *Genes Nutr*, **10**, 487, 2015.
- 9) Hashimoto, A., Ohkura, K., Takahashi, M., Kizu, K., Narita, H., Enomoto, S., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., Irie, K., Ohigashi, H., Andrews, G. K., Kambe, T. : Soybean extracts increase cell surface ZIP4 abundance and cellular zinc levels : a potential novel strategy to enhance zinc absorption by ZIP4 targeting, *Biochem J.*, **472**, 183~193, 2015.
- 10) Kambe, T., Matsunaga, M., Takeda, T. A. : Understanding the Contribution of Zinc Transporters in the Function of the Early Secretory Pathway, *Int J Mol Sci*, **18**, 2017.

西南暖地におけるイネ科牧草リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発（Ⅱ）

Development of soybean production technique by living multi method
with tropical grasses in southwestern Japan

石垣元気¹・荒井昌和²・福山喜一¹

(¹宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールド, ²宮崎大学工学部)

Genki Ishigaki¹, Masakazu Arai² and Kiichi Fukuyama¹

(¹Sumiyoshi Livestock Science Station, Field Science Education Research Center, Faculty of Agriculture,
University of Miyazaki, ²Faculty of Engineering, University of Miyazaki)

Tropical grasses mainly utilized in southwestern Japan have exhibited that the dry matter yield is increased as the growth stage developed. However, the nutritive value such as crude protein tends to be decreased strikingly as the growth stage developed. Therefore, the introduction or breeding the new grass or crops which have high potential as high protein source will be urgent problem. However, the practical success cases have not been reported in southern-western region of Japan. The aim of study were to investigate the dry matter yield of soybean (*Glycine max*) 'Tachinagaha' under two cultivation experiment. First experiment was that Italian ryegrass (*Lolium multiflorum*) have been used as multi-living plant after 1st cutting. Second experiment is to intercrop with rhodesgrass (*Chloris gayana*) and soybean. For first experiment, the plant height and dry matter yield under the plowing-fertilizer plot was the highest significantly ($p<0.05$). Interestingly, these value under the living multi-non-fertilizer plot were higher than those under the living multi-fertilizer plot. The development growth of the Italian ryegrass hampered the growth of soybean at the initial growth stage and the subsequent stages. For second experiment, there is no significant differences for the plant height of soybean between single-soybean sowing plot and rhodes grass-soybean intercropping plot. For dry matter yield in flowering stage, there is no significant differences between single-soybean sowing plot (37.9kg/10a) and rhodes grass-soybean intercropping plot (47.9kg/10a). However, in pods growing stage, the value of single-soybean sowing plot (107.9kg/10a) were significant ($p<0.05$) higher than that of rhodes grass-soybean intercropping plot (65.0kg/10a). Finally, many kinds of insects were observed in this study. Especially, the damages by a kind of *Popillia japonica* were strikingly much have been observed. Therefore, it will be important to introduce the insect resistant soybean cultivar in future.

1. 目的

国内の西南暖地（主に西日本）において主に栽培されている暖地型イネ科牧草は、生育段階が進むにつれて、乾物収量は増加するものの、タンパク質や消化性が著しく低下し、家畜における繁殖障害や増体・発育の遅延が認められるケースがある。このことから、今後、高タンパク粗飼料となるような作物を新たに探索、導入することが望まれる。しかしながら、このような高タンパク粗飼料となるような作物が西南暖地において導入された例はない。最近、国内の寒冷地では、新しい高タンパク質供給源として、ダイズサイレージが注目されており、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスをリビングマルチとして利用することでダイズを栽培する技術を確立している（内野ら2014）¹⁾。一方、南九州を含む西南暖地での牧草を利用した飼料用ダイズ生産の技術開発はまだ行われていない。著者らは、暖地型イネ科牧草リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発を試みた（石垣2017）²⁾。結果として、秋季に暖地型イネ科牧草ローズグラスのリビングマルチとして用いると、ローズグラスの高い再生力および生殖成長に伴う出穂茎の伸長により、ダイズの初期生育およびその後の生育に負の影響を及ぼすことが明らかとなった。このことから、西南暖地での粗飼料生産体系において、ダイズ生産を組み入れられるような栽培時期を、秋季以外で新たに検討する必要がある。南九州をはじめとする西南暖地の多くの地域では、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスの2番草の刈取りが5月上旬頃には行われ、その後、トウモロコシなどの長大作物や暖地型イネ科牧草が作付けされる。今後、春季におけるトウモロコシとの混播、イタリアンライグラスの2番草刈取り株をリビングマルチとして利用する技術や、ローズグラスとの混播によるダ

イズ生産技術を検討する必要がある。

本課題は、寒地型イネ科牧草または暖地型イネ科牧草を利用した飼料用ダイズ生産の技術開発を目指し、春季におけるダイズ生産として、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスをリビングマルチとして利用した生産体系（試験1）と、暖地型イネ科牧草ローズグラスとダイズとの混播した場合による生産体系（試験2）における収量生について検討した。

2. 方 法

2.1 供試材料

春季におけるダイズ生産として、イタリアンライグラス品種ハヤテ（以下IRと記す）をリビングマルチとして利用した場合（試験1）と、ローズグラス品種カリーデとダイズ品種タチナガハとの混播した場合によるダイズ生産（試験2）について検討した。本研究ではダイズ品種タチナガハを供試した。

2.2 ダイズ栽培試験および収量性調査

試験は、国立大学法人宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールドの圃場（北緯39°59'、東經131°28'、海拔12m）にて、2017年5月から2017年9月の期間に行つた。供試土壌は、礫が比較的少なく、有機物に乏しい砂質土壌である。

試験1は、IRの1番草刈り取り後（2017年5月8日）、試験区として耕起施肥区（P+F+）、リビングマルチ施肥区（M+F+）およびリビングマルチ無施肥区（M+F-）を設けた。耕起施肥区はロータリー（クボタ社）を用いて完全耕起した。1区面積は15m²（3×5 m）とし、すべての処理区で畦長5 m、4本とした。各処理区の圃場配置は乱塊法を採用した。条間は75cm幅とし、ダイズ播種は、ダイズ種子を株間6 cmで1点1粒播きの条件で点播した。施肥処理は、耕起施肥

区およびリビングマルチ施肥区に、化成肥料でNを4kg, P₂O₅を3.4kg, K₂Oを2.9kg施用した。調査は播種後1週目から発芽数を調査し、播種2週間後から刈り取りまで各供試品種の草高を毎週記録した。刈り取りはダイズの開花期と莢伸長期に合わせて2回に分けて行い、乾物収量を調査した。

試験2では、ローズグラス単播区（R+S-）およびダイズ単播区（R-S+）、およびローズグラスとダイズの混播区（R+S+）を設けた。区画設計（面積、畝長、条間）は試験1と同じ条件である。2017年5月にローズグラス種子を3.0kg/10aの播種量で散播した。ダイズ播種は試験1と同じ条件である。施肥は、10a当たり換算量で基肥として発酵牛糞1t（N 2.5%, P₂O₅ 4.0%, K₂O 2.1%），化成肥料でNを4kg, P₂O₅を3.4kg, K₂Oを2.9kg施用した。調査は播種後1週目から発芽数を調査し、播種2週間後から刈り取りまで各供試品種の草高を毎週記録した。刈り取りはダイズの開花期に行い、乾物収量および雑草の混入割合について調査した。

3. 結果と考察

3.1 寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスをリビングマルチとして利用した場合（試験1）

土壤硬度（結果は支持強度として表示）は、土壤深度10cmにおいて、耕起施肥区（1.2kg/cm²）がリビングマルチ区（施肥区：6.3kg/cm², 無施肥区：6.9kg/cm²）よりも有意に低い値となった。その結果、播種後2週目の発芽率は、耕起施肥区（約70%）がリビングマルチ区（施肥区：53%, 無施肥区：57%）よりも有意に高い値となった。草高は、播種後14週目の、耕起施肥区で85cm、リビングマルチ施肥区で62cm、リビングマルチ無施肥区で74cmとなり、耕起施肥区が最

も高かった（P<0.05）。リビングマルチ施肥区におけるダイズ草高がリビングマルチ無施肥区よりも低かったのは、リビングマルチ施肥区におけるイタリアンライグラスが施肥後に著しく伸長し、ダイズの伸長を抑制したためと考えられる。

ダイズ乾物収量は、開花期では、耕起施肥区で170.5kg/10a、リビングマルチ施肥区で80.0kg/10a、リビングマルチ無施肥区で80.0kg/10aの順となり、耕起施肥区が最も高かった（p<0.05）。リビングマルチ施肥区およびリビングマルチ無施肥区の処理間で有意差は認められなかった（Table 1）。

莢伸長期では、耕起施肥区で257.9kg/10a、リビングマルチ施肥区で153.8kg/10a、リビングマルチ無施肥区で198.0kg/10aの順となり、耕起施肥区が最も高かった（p<0.05）。リビングマルチ施肥区およびリビングマルチ無施肥区の処理間で有意差はないものの、リビングマルチ無施肥区に高い傾向が認められた。ダイズ乾物収量は、いずれの処理区においても、開花期よりも莢伸長期の方が多収であった（Fig. 1, Table 1）。

3.2 暖地型イネ科牧草ローズグラスとダイズとの混播した場合（試験2）

ダイズ発芽率は、ダイズ単播区およびローズグラス・ダイズ混播区の間には有意差は認められなかった（結果記載なし）。ダイズ草高は、播種後2、および10週目のいずれにおいても、ダイズ単播区およびローズグラス・ダイズ混播区において有意差は認められなかった。このことからダイズの伸長は、ローズグラスと混播した場合は、ローズグラスの伸長による有意な影響は受けないと推察される。ローズグラス草高も播種後2、6および10週日のいずれにおいても、ローズグラス単播区およびローズグラス・ダイズ混播区において有意差は認められなかった（Fig. 2, Table 2）。

ローズグラス乾物収量は、開花期では、ローズグラス単播区（164.3kg/10a）とローズグラス・



Fig. 1 Growth of soybean plants under different cultivation system. (Fig. 1a : tilling and fertilizer treatment, Fig. 1b : living-multi and fertilizer treatment, Fig. 1c : living-multi and non-fertilizer treatment) at 11th July 2016.

Table 1 Soil hardness, germination rate and dry matter yield of soybean under different cultivation.

Cultivation	Soil hardness (kg/cm ²)		Germination (%)		Dry matter yield (kg/10 ^a)	
	Depth 0cm	Depth 10cm	1 week	2 weeks	Flowering	Pod growing
M-F+	3.4 ± 0.5 ^a	6.3 ± 0.2 ^a	38 ± 1.1 ^a	52.8 ± 0.7 ^b	80.0 ± 29.6 ^a	153.8 ± 26.6 ^{ab}
M-F-	3.4 ± 0.4 ^a	6.9 ± 0.8 ^a	48.4 ± 7.8 ^a	56.5 ± 2.2 ^b	77.9 ± 9.2 ^a	198.0 ± 32.5 ^b
P+F+	1.2 ± 0.3 ^b	2.3 ± 0.3 ^b	49.7 ± 5.3 ^a	68.8 ± 3.6 ^a	170.5 ± 59.8 ^a	257.9 ± 31.4 ^a

Values followed by different letters among different cultivation differ significantly ($p < 0.05$) by Tukey-test. M-F+, living-multi and fertilizer : M-F-, living-multi and non-fertilizer : P+F+, plowing and fertilizer.

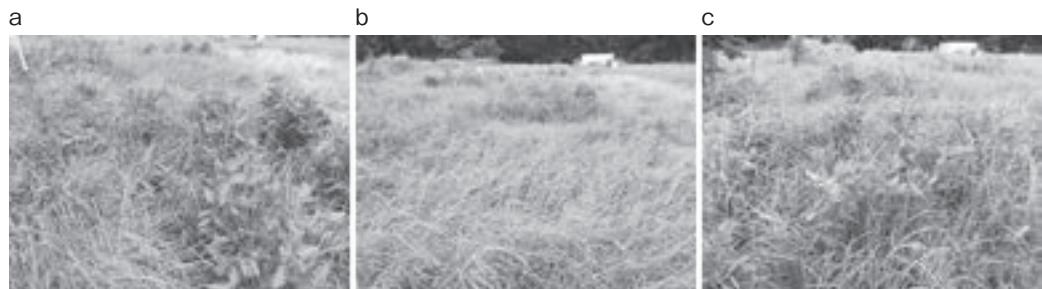


Fig. 2 Growth of material plants (rhodes grass and/or soybean) under different cultivation system. (Fig. 2a : tilling and fertilizer treatment, Fig. 2b : living-multi and fertilizer treatment, Fig. 2c : living-multi and non-fertilizer treatment) at 11th July 2016.

Table 2 Dry matter yield of rhodes grass, soybean and the amount of weeds under different cultivation.

Cultivation	Flowering			Pod growing		
	Rhodes	Soybean	Weeds	Rhodes	Soybean	Weeds
R-S+	—	37.9 ± 11.8	98.7 ± 10.7 ^a	—	107.9 ± 26.6	157.8 ± 63.8
R+S-	164.3 ± 55.1 ^a	—	66.4 ± 17.6 ^a	464.5 ± 204.2	—	67.7 ± 18.1
R+S+	99.7 ± 6.8 ^b	47.9 ± 17.8	54.7 ± 11.9 ^a	493.1 ± 301.6	65.0 ± 16.0	146.4 ± 59.3

Values followed by different letters among different cultivation differ significantly ($p < 0.05$) by Tukey-test. R-S+, single-soybean cultivation : R+S-, single-rhodes grass cultivation : R+S+, soybean-rhodesgrass intercropping.



Fig. 3 Damage of soybean plants by insects observed during the experiment. (Fig. 3a ; larva of *Spodoptera litura*, Fig. 3b : *Popillia japonica* adults, Fig. 3c : Damage by *Popillia japonica* adults observed at 11th July 2016.

ダイズ混播区（99.7kg/10a）の間に有意差は認められたものの ($p<0.05$)、莢伸長期では、ローズグラス单播区（464.5kg/10a）とローズグラス・ダイズ混播区（493.1kg/10a）の間に有意差は認められなかった (Fig. 3)。

ダイズ乾物収量は、開花期では、ダイズ单播区（37.9kg/10a）とローズグラス・ダイズ混播区（47.9kg/10a）の間に有意差は認められなかったものの、莢伸長期では、ダイズ单播区（107.9kg/10a）が、ローズグラス・ダイズ混播区（65.0kg/10a）よりも有意に高い値であった ($p<0.05$)。

本研究の結果、ダイズ单収として考えた場合、春季のIRリビングマルチ無施肥条件下におけるダイズ生産体系が、最も高いダイズ乾物収量を期待できると考えられる。しかしながら、本生産体系では、ダイズの収穫期が8月頃になるため、その後の粗飼料または作物の作付けについて新たに検討する必要がある。一方、ローズグラスとダイズの混播では、収穫後もローズグラスは再生し、2番草として収穫することができる。このことから、乾物収量として考えた場合には、ローズグラスとダイズの混播による生産体系が西南暖地での高タンパク粗飼料として適用できるものと考えられる。

3.3 西南暖地におけるダイズ生産で確認された虫害について

本試験期間中に、多くの種類の害虫が確認された。特にカムシ科およびコガネムシ科の昆虫による食害が顕著であった (Fig. 3)。マメコガネはコガネムシ科に分類される甲虫の一種であり、幼虫は地下部の根部を食し、成虫は地上部の葉部を葉脈に沿って食する。このことから、西南暖地の春季から夏季における飼料用ダイズ生産体系では、耐虫性ダイズ系統の検討や害虫管理・防除法 (阿久津1987)³⁾ または栽培体系の検討 (田澤・三浦2016)⁴⁾ などのような害虫に対する諸対策を早急に講じる必要がある。

4. 要 約

高タンパク質飼料としてのダイズ生産が注目されているが、飼料用ダイズ生産に使用可能な除草剤が国内では登録されていない。そのため、寒冷地では、前植生をリビングマルチとして雑草防除に利用した飼料用ダイズ生産体系が確立されている。一方、西南暖地での飼料用ダイズ生産体系は確立されていない。本研究では、西南暖地における飼料用ダイズ生産技術の確立を目指し、寒地型イネ科牧草イタリアンライグラスをリビングマルチとして利用した体系 (試験1) と暖地型イネ科牧草ローズグラスとの混播した体系 (試験2) に

よるダイズ生産体系に関する基礎的研究を行った。試験1では、ダイズ草高および乾物収量は、耕起施肥区が最も高い値を示した。リビングマルチ区では、リビングマルチ無施肥区がリビングマルチ施肥区よりも、ダイズ草高および乾物収量が高い傾向が認められた。これはリビングマルチ施肥における施肥処理が刈取り後のイタリアンライグラスの再生を助長し、ダイズの伸長が抑制されたものと考えられる。試験2では、ダイズ草高は、播種後2, 6および10週目のいずれにおいても、ダイズ単播区およびローズグラス・ダイズ混播区において有意差は認められなかった。ダイズ乾物収量は、開花期では、ダイズ単播区（37.9kg/10a）とローズグラス・ダイズ混播区（47.9kg/10a）の間に有意差は認められなかったものの、莢伸長期では、ダイズ単播区（107.9kg/10a）が、ローズグラス・ダイズ混播区（65.0kg/10a）よりも有意

に高い値であった（ $p < 0.05$ ）。本研究の結果、西南暖地では、春季のIRリビングマルチ条件下におけるダイズ生産体系が、最も高い収量を期待できると考えられた。

文 献

- 1) 内野宙、魚住順、嶋野英子、河本英憲、出口新：イタリアンライグラスをリビングマルチとして導入した飼料用大豆生産体系一大豆の播種時期が収量性に及ぼす影響について—、第237回日本作物学会講演要旨、2014.
- 2) 石垣元氣、福山喜一：西南暖地におけるイネ科リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発、伊藤記念財団研究成果報告、2017.
- 3) 阿久津四良：神奈川県平坦地の晩播大豆におけるダイズサヤタマバエおよびカメムシ類の発生と防除に関する研究、神奈川県農研研報129巻、p38～49、1987.
- 4) 田澤純子、三浦重典：関東地域の有機栽培に適したダイズ品種の特性および栽培体系、日作物紀行85巻、p23～32、2016.

乳牛における高糖分イネWCS(ホールクロップサイレージ) 多給による高繁殖型飼養管理システムの確立

New system development of high fertility by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice whole crop silage in lactating dairy cows

山口 昇一郎・浅岡 壮平・馬場 武志・川島 千帆*

(福岡県農林業総合試験場, *帯広畜産大学フィールド科学センター)

Shoichiro Yamaguchi, Sohei Asaoka, Takeshi Baba and Chiho Kawashima*

(Fukuoka Agricultural Research Center, *Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

The aim of this study was to investigate metabolic parameters and reproductive performance in dairy cows by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice whole crop silage (WCS) and adding a dietary supplement such as betaine to serve as an agent for amelioration of hepatic steatosis during the dry and postpartum periods. The experimental diets consisted of two total mixed rations (TMR) consisting of grass silage and/or cured hay (control) or sugar-rich rice WCS (rice WCS, 28% of DM). Rice WCS cows ($n=3$) were supplied with 50g of betaine by oral administration daily from 3 weeks pre-partum to 3 weeks postpartum. Control cows ($n=2$) did not receive betaine supplementation. Blood samples from multiparous Holstein cows were collected once a week from 3 weeks pre-partum to 12 weeks postpartum. The first postpartum luteal formation was confirmed using ultrasonography. The TDN dry matter intake, milk yield, plasma glucose, total cholesterol, total protein and NEFA did not differ between control and rice WCS cows. The plasma GGT in rice WCS cows tended to be higher than in control cows ($p<0.1$). However, the TDN dry matter intake, plasma glucose and total cholesterol in rice WCS cows remained slightly higher than in control cows from 0 to 7 weeks postpartum. Days of the first postpartum luteal formation in rice WCS cows were earlier than in control cows ($p<0.05$). In conclusion, the present study suggests that the resumption of postpartum ovarian function was earlier by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice WCS.

1. 目的

国内における乳牛の受胎率は低下傾向にあり、生産子牛の減少は子牛価格の高騰や乳牛後継牛の不足の要因となっている。都道府県における乳牛の分娩間隔は、450日程度であり、理想とされる

400日前後と大きくかけ離れているのが現状である。酪農現場では、従来から繁殖成績向上対策としてオブシンクなどのホルモン投与プログラムの利用等が行われてきたが、飼料からのエネルギー摂取が乳生産のエネルギーを下回っている泌乳初期牛は、まずは飼料摂取量を最大化することが一

番の対策と考えられている¹⁾。

近年、イネホールクロップサイレージ(WCS)用でモミが少なく茎葉に糖を多く含む「たちすずか」が開発された²⁾。乳牛に給与した場合に、従来品種では、モミが消化されず糞として排泄されてしまうという問題を、モミが少なく茎葉を長くすることで解決した画期的な品種とされている。「たちすずか」を乳牛に給与する事例は増えているものの酪農現場では、従来品種同様に少量(乾物で3~5kg程度)給与している事例がまだ多く、飼料特性を十分に活用しているとは言い難い。

一方、分娩後の体重減少に伴う血中の体脂肪の処理により卵巣からの発情ホルモン分泌に関与する肝臓(インスリン様成長因子-1の産生)には多大な負担がかかっており、結果として発情の微弱、または発情がこないことにより初回授精が遅れ、分娩間隔延長の一因となっている。Kawakamiら³⁾はマウスにおいてアミノ酸の一種であるベタインを給与すると肝臓への脂肪蓄積が抑制されること、中井ら⁴⁾はベタインがグルーメンで完全に分解されずに小腸に流入することを報告している。これまで脂肪肝対策として乳牛に給与した事例はないため、分娩後の体脂肪動員への対策として活用すれば繁殖性改善につなげられるかもしれない。

そこで、本研究では、高糖分イネWCSを泌乳初期牛に多給(通常の2倍程度)して泌乳初期牛の飼料摂取量を向上させるとともに、ベタインを分娩前後3週間給与することによってエネルギーバランスをすみやかに回復させ、さらに脂肪肝対策を行うことによって泌乳牛の繁殖性が改善できるかについて検討した。

2. 方 法

供試牛は福岡県農林業総合試験場で飼養するホルスタイン種経産牛5頭(対照区: 2産2頭、試

験区: 4産1頭、2産2頭)を用いた。試験牛はフリーストール牛舎で飼養し、ドアフィーダによって個体ごとに飼料摂取量を計測した。搾乳はミルキングパーラーで8:45と17:15の1日2回行った。試験期間は、分娩予定の3週間前から分娩後12週目とした。採血および超音波画像診断装置による分娩後の卵巣診断は、1週間に1回行った。血漿中の血糖、総蛋白、総コレステロール、BUN、GOT(グルタミック・オキザロアセティック・タランスアミナーゼ)、およびGGT(γ -グルタミルトランスフェラーゼ)は血液化学自動分析機(スポットケムSP-4410)によって測定した。またNEFA(遊離脂肪酸)はキット(WAKO)によって分析した。すべての試験用飼料は、カッターで細断した粗飼料と濃厚飼料を合わせ混合飼料(TMR)によって調製した。対照区用TMRの養分含量は、TDN71%, CP15%, NDF35%となるように場内産自給飼料(イタリアンライグラスまたはヒエサイレージ)を給与した。なお、ヒエサイレージを給与する際には、流通乾草(オーツヘイ)を併用した。試験区用WCS用イネは、場内で生産した高糖分イネ「たちすずか」を完熟期で刈り、乳酸菌(畜草2号、雪印種苗)を添加後、ラッピングしたものを用了。試験区のTMRは、TDN71%, CP15, NDF32%となるように調整し、イネの配合割合は、28%(乾物)とした。なお、イネWCS数量に限りがあったため、分娩後1週目までは対照区TMRを給与し、その後試験区TMRに変更した。試験区には、分娩前3週間から分娩後3週間まで食品添加物の無水ベタイン(日本甜菜製糖株式会社)を50g/日トップドレスで給与した。また分娩から分娩後1週間まで飼料用グリセリン(85-S、日油株式会社)を500ml/日経口投与した。統計処理は、t検定で実施した。

3. 結果と考察

TDN乾物摂取量、栄養状態を示す血中グルコースおよび総コレステロール値は分娩後7週目まで有意差はないものの、試験区が高い傾向が認められた (Fig. 1 およびFig. 2)。肝機能障害を示すGGTは、試験区が高くなる傾向がある週が認められた (Fig. 2, $p < 0.1$)。NEFAについては、差が認められなかった。分娩後、超音波画像検査によって初めて黄体が確認された日数は、対照区 54.0 ± 9.0 日、試験区 22.3 ± 3.0 日であり、有意に試験区が短くなった (Fig. 3, $p < 0.05$)。

我々は、泌乳中後期牛に対して高糖分イネWCSに関する給与試験を実施したところ、本県で一般的な自給粗飼料であるイタリアンライグラスサイレージ（開花期刈り）を乾物割合で3割配合したTMRよりも高糖分イネWCS配合TMRを給与した場合には、乾物摂取量がイタリアンライグラスサイレージの半量代替（乾物割合で1.5割）で6%, 全量代替（乾物割合で3割）で11%有意に向上し、多給することによって乾物摂取量がより向上することを明らかにした⁵⁾。また、収

穫時期が異なる高糖分WCSを泌乳中後期牛に給与した場合において、完熟期刈りで調製した給与飼料の方が、適期刈りと考えられていた糊熟期刈りの場合よりも泌乳牛の乾物摂取量が若干多い傾向にあり、発情ホルモン合成に深く関与する血糖値が有意に高く推移することも明らかにしている⁵⁾。本研究では、完熟期刈りの高糖分イネWCSを3割程度TMRに配合し、泌乳初期牛に給与したところ、有意差は認められないものの分娩後7週目までTDN摂取量は多い傾向を示し、また栄養状態を示す血糖値や総コレステロール値も高い傾向を示した。この分娩後のエネルギー状態の改善は、卵巣機能の回復を高め、初回排卵を試験区において有意に早めたものと思われた。一般的に分娩後の初回排卵が早い方がその後の正常な卵巣機能回復が早く、早期受胎につながることが報告されている⁶⁾。したがって嗜好性の高い高糖分イネWCSを多給することで繁殖性が向上する可能性が示唆された。一方、分娩前後3週間のベタインの効果については、ベタイン給与期間中のNEFAおよびGOTには差が認められず、GGTは有意に高くなる傾向にあった。GGTが高くなっ

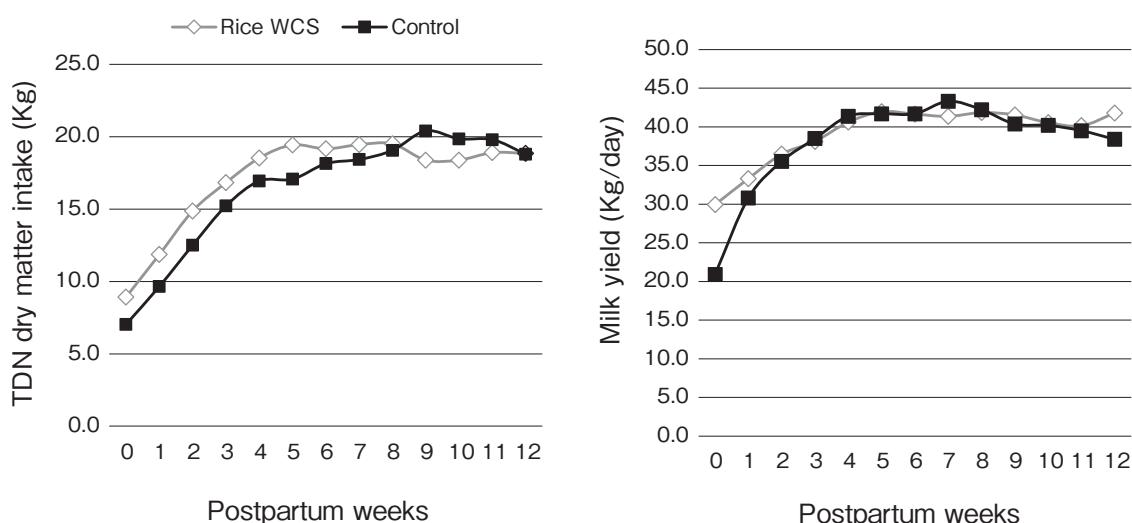


Fig. 1 TDN dry matter intake and milk yields in control and rice WCS cows from 0 to 12 weeks postpartum.

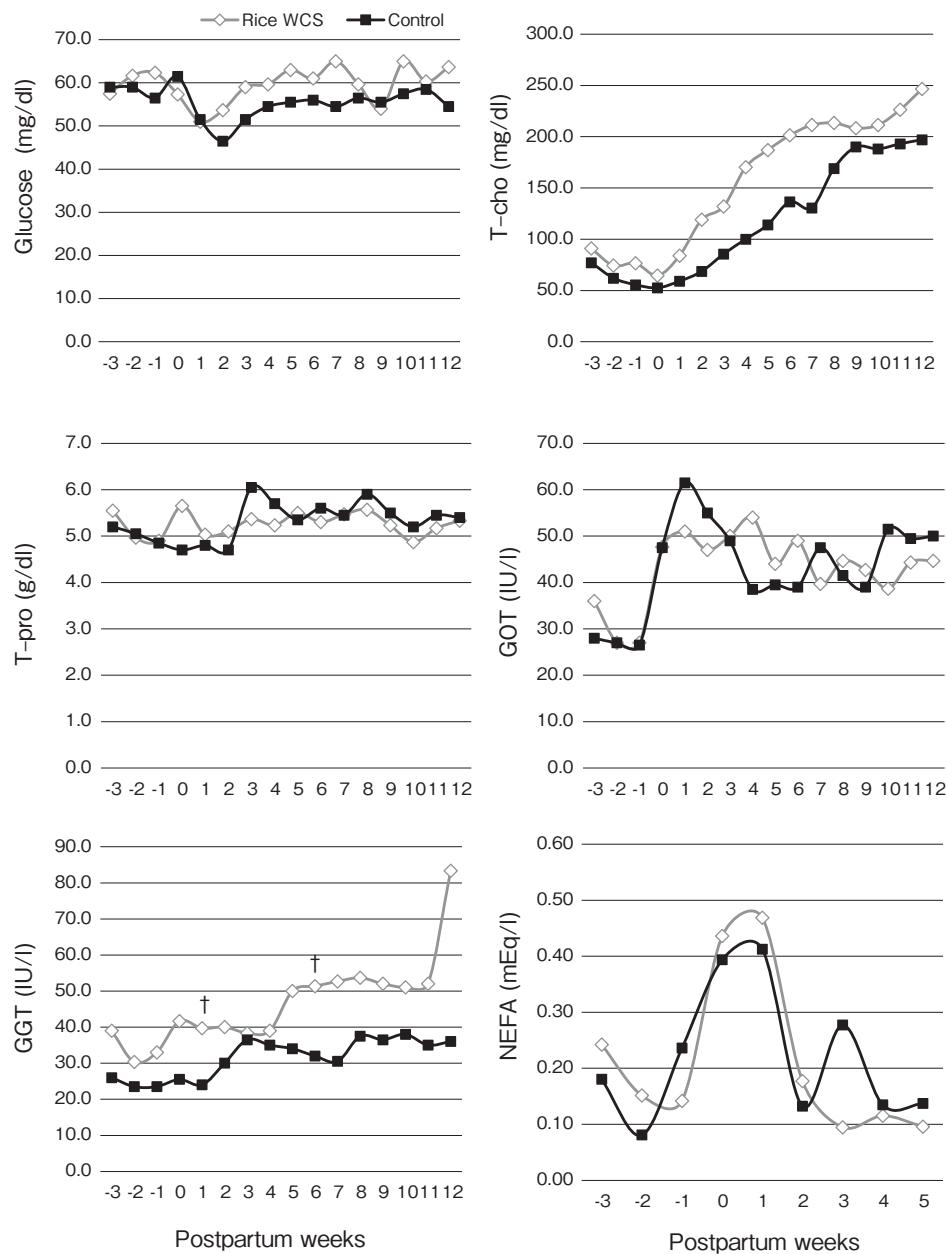


Fig. 2 Metabolic parameters in control and rice WCS cows from 3 weeks prepartum to 5 or 12 weeks postpartum. [†]Indicates differences of $p < 0.1$ between the treatment group.

た理由は、試験区が試験開始前から数値が高かった影響が大きかったと考える。本試験の結果ではベタインの効果は必ずしも明らかにはできなかつたが、今後例数を重ねるとともにボディコンディションスコアが高い牛等でどのような影響がある

かについて再度検討する必要があるものと考える。なお、試験区には分娩後1週間のグリセリンの給与も行ったが分娩後1週間目の血糖には差が認められなかった。しかし分娩1週目の乳量には統計上差が認められないものの、10kg／日の増

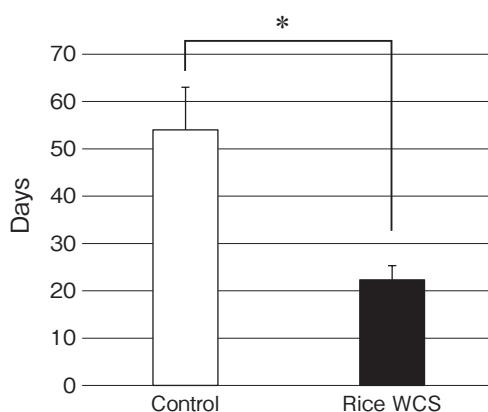


Fig. 3 Days of the first postpartum luteal formation in control and rice WCS cows. *Indicates differences of $p < 0.05$ between the treatment group. Values are mean \pm SEM.

加が認められた。栄養状態や繁殖への影響については今後検討する必要があるものと考える。

以上のことから、分娩後の乳牛に高糖分WCS用イネを給与すると乾物摂取量が多くなることでエネルギー状態が改善され、卵巣機能回復が早まることが明らかとなった。また、脂肪肝対策として給与したベタインの効果は、今回の試験では明らかではなかった。

4. 要 約

本研究では、高糖分イネホールクロップサイレージ (WCS) を泌乳牛に多給し、かつ脂肪肝に効果があるとされるベタインを給与することで栄養状態や繁殖性が改善できるかどうかについて検討した。試験飼料は、グラスサイレージ単体または乾草と併用したTMR (対照区) および高糖分イネWCSで構成したTMR (イネWCS区、乾物割合で28%配合)とした。イネWCS区の試験牛

($n = 3$)には、分娩前後3週間にわたりベタインを50 g／日経口投与した。対照区 ($n = 2$)には無処理とした。本試験は経産牛のみ用い、分娩前3週間から分娩後12週まで週1回採血した。分娩後の初回黄体形成は、超音波検査によって確認した。TDN摂取量、乳量、血糖、総コレステロール、総タンパクおよびNEFAとも試験区間で有意差は認められなかった。GGTは、イネWCS区が高くなる傾向にあった ($p < 0.1$)。しかし、TDN摂取量、血糖および総コレステロールは、イネWCS区が分娩後7週目までやや高く推移した。分娩後の初回黄体形成日数は、イネWCS区が有意に早くなった ($p < 0.05$)。

以上のことから、高糖分イネWCSを泌乳牛に多給することによって、エネルギーバランスが改善し、分娩後の卵巣機能の回復が早くなることが明らかとなった。

文 献

- 1) Rensis, F., Scaramuzzi, R. J.: *Theriogenology*, 60, 1139~51, 2003.
- 2) 松下景, 飯田修一, 出田収, 春原嘉弘, 前田英郎, 田村泰章: 近畿中国四国農業研究センター研究報告, 第11号, 1~14, 2012.
- 3) Kawakami, S., Han, K., Nakamura, Y., Shimada, K., Kitano, T., Aritsuka, T., Nagura, T., Ohba, K., Nakamura, K., Fukushima, M.: *J Nutr Sci Vitaminol*, 58, 371~5, 2012.
- 4) 中井朋一, 菊地裕人, 佐藤忠, 佐渡谷裕朗, 大谷昌之, 花田正明, 岡本明治: 日獸会誌, 60, 131~133, 2007.
- 5) 福岡県農林業総合試験場: <http://farc.pref.fukuoka.jp/>
- 6) Kawashima, C., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Sasamoto, Y., Takahashi, Y., Matsui, M., Miyamoto, A.: *J Reprod Dev*, 53, 113~20, 2006.

ルーメンアシドーシス防除を目指した新規ルーメン幹細胞培養モデルの開発

Establishment of a novel culture model of bovine rumen epithelial cell using tissue stem cell culture method

鈴木 裕

(北海道大学大学院農学研究院)

Yutaka Suzuki

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Developing a practical culture model of bovine rumen epithelial cells is required for better understanding of molecular mechanism in cellular response and tissue regeneration under subacute ruminal acidosis (SARA). Recent advances in stem cell and cancer research revealed the molecular event within stem cell niche which maintains stemness of tissue stem cells, and therefore it enabled the refinement of tissue stem cell culture method. In the present study, we aimed to identify tissue stem cell in bovine rumen tissue, and to establish a novel culturing model of ruminal epithelial cells by adapting tissue stem cell culturing method for human and mice gastrointestinal tract (GIT). The result showed that several tissue stem cell markers including SOX2 as a pivotal transcription factor for the maintenance of stemness expressed in rumen tissue from Holstein calves at 3 weeks of age. SOX2 expressing cells were located at basale of rumen epithelia, in which Ki67 positive proliferating cells were also observed. Notably, SOX2 and Ki67 double positive cells were detected at the same region, suggesting this cell population plays important for the maintenance and regeneration of ruminal tissue via providing intact and undifferentiated epithelial cells. Further *in vitro* study was conducted to establish a culturing method of rumen epithelial cells. Rumen epithelial cells were grown by the combination of culturing media containing ligand/inhibitor of WNT and BMP signaling, and gelatin-coating of culture dish. As these cultured cells expressed SOX2 and Ki67, this culturing method was considered to successfully mimic the rumen epithelial niche. These results might contribute insights into cellular and molecular mechanism of rumen epithelium during SARA, and are expected for the future application to screen protective agents against SARA.

1. 目的

濃厚飼料の過給に起因する亜急性ルーメンアシドーシス (Subacute ruminal acidosis : SARA) の発生が、肉牛・乳牛生産において問題となって

いる。SARAの状態では、ルーメン内pHの低下によりルーメン上皮のバリア機能が損なわれ、細菌や毒素が体内に流入すると考えられている¹⁾。しかし、その際の上皮組織の分子応答機序や、その後の組織修復メカニズムについては詳細像が明

らかにされていない。非モデル動物である牛のルーメン上皮細胞は優れた細胞株が樹立されておらず、これまで使用されていた初代培養系では継代可能回数や増殖性が低いという問題を抱えていた。

組織の維持や修復には未分化状態を維持した組織幹細胞（または体性幹細胞）の働きが重要であることが示されており、ルーメン組織においても重要な役割を持つことが予想される。近年の再生医療やがん研究の進展から幹細胞の未分化性維持を担う微小環境（ニッチ）の解明が進み、オルガノイド培養法の開発などによる組織幹細胞の培養法の改良が行われている。牛のルーメンはマウスの前胃や食道に近い性質を持つと考えられることから、ヒトやマウスの胃や食道における研究知見が応用できると予想される。ルーメン上皮幹細胞についてはその存在を示唆する報告はあるが詳細な検討がなされておらず²⁾、その同定と培養技術の確立は、制約の多い非モデル動物である牛の消化管研究への応用が期待できる。

本研究では、SARAにおけるルーメン上皮組織の応答・修復機序の解明への将来的な応用を見据え、ルーメン上皮における組織幹細胞の探索、およびそれを利用した利便性の高い新規ルーメン上皮細胞培養法を作出することを目的とした。

2. 方 法

2.1 消化管組織の採材

本研究では3週齢、13週齢、10カ月齢のホルスタイン種牛オスより採取した消化管組織を分析用サンプルとして使用した。組織サンプルは国内の研究機関より譲渡されたものであり、当該機関における認可・規定に基づき採取された。供試牛は出生後、市販の代用乳およびスターターで哺育し、約8週齢で離乳した。ルーメンを含む消化管組織の採材は、深麻酔下で放血処理した供試牛よ

り行い、採取した組織はトリミング後に液体窒素により急速凍結して、分析まで-80°Cにおいて保存した。

2.2 ルーメン上皮細胞の単離と培養

ホルスタイン種牛オス（3週齢～13週齢）よりルーメン組織を採取した。採取したルーメン組織から上皮絨毛を切り取り、遠沈管内で抗生物質を添加したリン酸緩衝生理食塩水（PBS）により10回洗浄した。洗浄したルーメン絨毛を外科ハサミにより細切し、Trypsin/EDTAを加えて恒温シェーカー内で60分間浸透培養することで、上皮細胞を剥離させた。浸透後の上清を回収し、遠心分離（1,500rpm、4℃、10分間）により細胞ペレットを回収した後、PBSにより2回洗浄した。洗浄後の細胞ペレットはAdvanced DMEM/F-12、2%FBSにより懸濁した。細胞を播種する6 well plateはあらかじめ以下のいずれかの方法で表面処理を行った。フィーダー細胞培養では牛胎子線維芽細胞を約60%コンフルエントになるまで培養し、2時間のマイトイシンC処理を行った。細胞外マトリクスコーティング培養では各ウェルに2mlの0.1%豚皮膚由来ゼラチン液を分注し、37℃にて2時間以上インキュベーションした。いずれの方法においてもルーメン上皮細胞の播種前に、PBSでウェルを洗浄した。既報の組成を基に調製した組織幹細胞用培地を6 well plateを分注（2ml/well）し、採取したルーメン上皮細胞を細胞密度100cells/cm²となるように播種した³⁾。ルーメン上皮細胞は37℃、5%CO₂、飽和蒸気圧下で培養し、24時間ごとに培地交換を行い、120時間培養した。

2.3 RNA抽出およびqRT-PCR

RNA抽出前試薬の添加前に、ルーメン組織は凍結破碎し、培養ルーメン上皮細胞はPBSにより洗浄した。組織または細胞をRNA抽出試薬（RNAliso plus, Takara）により溶解し、定法によ

り total RNAを抽出した。抽出したtotal RNAは Nanodrop (Thermo Scientific) による濃度・純度測定、およびアガロースゲル電気泳動による分離度の確認を行った。500ng/sampleのtotal RNAを逆転写 (Revertra-ase, TOYOB0) に供し、cDNAを作製した。作製したcDNAを用いてRT-PCRまたはqRT-PCRを行い、標的遺伝子発現の定性的または定量的解析を行った。

2.4 タンパク質抽出およびウエスタンプロット

RNAiso plusで溶解した組織より、定法に従つてtotal proteinを抽出し、BCA法でタンパク質濃度を測定した。10μg/sampleのtotal proteinを SDS-PAGE sample bufferと混合し、12.5%ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEに供した。泳動後のゲルよりPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは2% (w/v) のカゼインを添加したトリス緩衝生理食塩水 (TBS) により30分間ブロッキングし、希釈した1次抗体液中で一晩インキュベーションした。メンブレンは洗浄後、5000倍希釈したHRP標識2次抗体液中で1時間インキュベーションした後、イムノゼータ（和光純薬）を用いて、特異的バンドの化学発光検出を行った。

2.5 免疫染色

凍結保存したルーメン組織をクライオスタッフにより、10μm厚で薄切した。組織切片をCRESTコートスライドグラスにマウントし、室温でよく乾燥させた後、10%ホルマリン/PBSで15分間固定した。固定した切片はTBSで10分間洗浄し、1% Normal Goat Serum、2% Caseinを添加したTBSにより30分間ブロッキングした。Can get signal immunostain (TOYOB0) により希釈した1次抗体液を組織切片に添加し、4℃で1晩インキュベーションした。TBSにより切片を洗浄し、ブロッキング液で1000倍希釈した蛍光色素標

識2次抗体を滴下し、室温にて1時間インキュベーションした。切片を洗浄・封入し、蛍光顕微鏡下で組織染色像を観察した。

2.6 統計

統計解析はOne-way ANOVAおよびTukey法による多重比較検定を行い、 $P < 0.05$ の場合にデータ間に有意差があるとした。

3. 結果と考察

3.1 ルーメン組織における幹細胞・未分化細胞マーカーの発現

3週齢のホルスタイン種子牛より採取したルーメン組織における、組織幹細胞マーカーの候補遺伝子の発現を解析した結果をFig. 1Aに示す。ルーメン組織において、重層扁平上皮組織の幹細胞マーカーと考えられるTP63, AXIN2, ITGA6, ITGB4, SOX2、および増殖細胞のマーカーとなるMKI67のmRNA発現が確認された。これらの遺伝子の中で、Ki67および転写因子として未分化性の維持において特に重要なと考えられるSOX2についてウエスタンプロットを行ったところ、両者ともにタンパク質レベルでの発現が確認された (Fig. 1B)。Xiangらの報告から、ルーメン上皮の遺伝子発現パターンは食道・扁桃腺に近似していることが示されている⁴⁾。本研究では既報におけるSOX2やTP63といったヒト、マウスの食道上皮幹細胞マーカーがルーメン上皮幹細胞／未分化細胞の同定に利用できると予想したが⁵⁾、実際に解析したすべてのマーカー候補遺伝子の発現が確認された。また、免疫染色法によりルーメン組織におけるSOX2およびKi67陽性細胞の局在を検討したところ、両者ともに上皮組織基底部において多数の陽性細胞がみられ、それらの一部は共陽性細胞であった (Fig. 2)。皮膚などの一般的な重層扁平上皮において、組織の修復などに関わる増殖細胞は基底部に位置することが知られている。

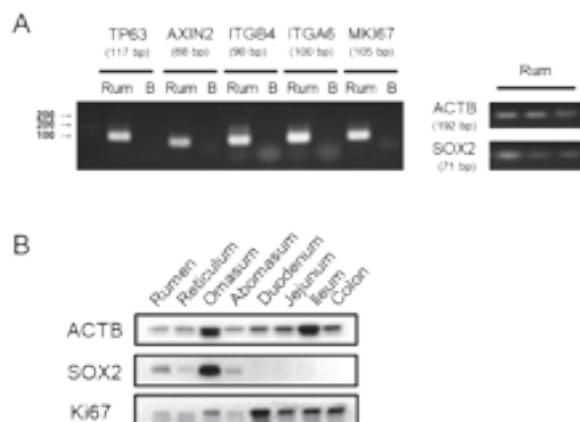


Fig. 1 Gene and protein expression of stem/undifferentiated cell marker candidates in the rumen and other digestive organs. Tissue samples from male Holstein calves at 3 weeks of their age were subjected to RT-PCR and western blotting. A shows mRNA expression of each gene in rumen (Rum) and PCR blanks (B). B shows protein expression of each gene in the indicated parts of digestive organ of same calves.

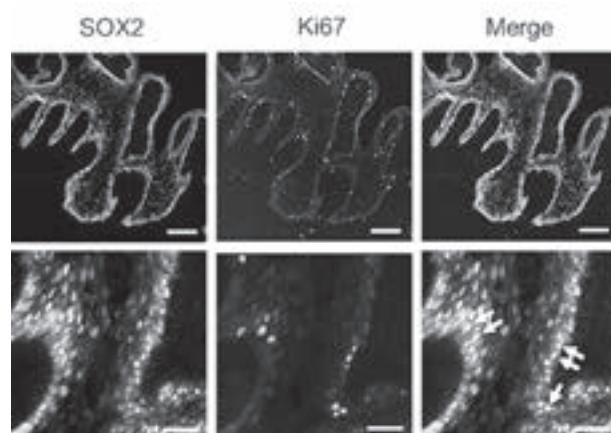


Fig. 2 Cellular location of SOX2 and Ki67 expressing cells in rumen epithelium. Rumen tissue samples from male Holstein calves at 3 weeks of their age were subjected to immunostaining to visualize SOX2, Ki67 and the merged image of SOX2 and Ki67. Bottom panels show magnified image of top panels. White arrows indicate SOX2+/Ki67+ cells. Scale bars represent 25 μm (top) and 5 μm (bottom).

本実験の結果から、重層扁平上皮であるルーメン上皮組織の基底部において、未分化性を維持しつつ、増殖を繰り返して組織に細胞を供給する組織幹細胞的な機能を有する未分化細胞群が存在することが示唆された。

3.2 幹細胞マーカーを高発現する時期の検討
ルーメン組織から未分化細胞を効率的に回収するためには、このような細胞群の存在量の高い時

期を明らかにする必要がある。離乳前の子牛のルーメンは未発達であり、未分化細胞が多く存在していると予想されるため、本実験では3週齢、10週齢、10カ月齢のホルスタイン種牛オスよりルーメン組織を採取し、ウエスタンプロット法により組織中のSOX2およびKi67の存在量を比較した。その結果、SOX2は予想に反して3週齢で最もタンパク質発現レベルが低く、13週齢、10カ月

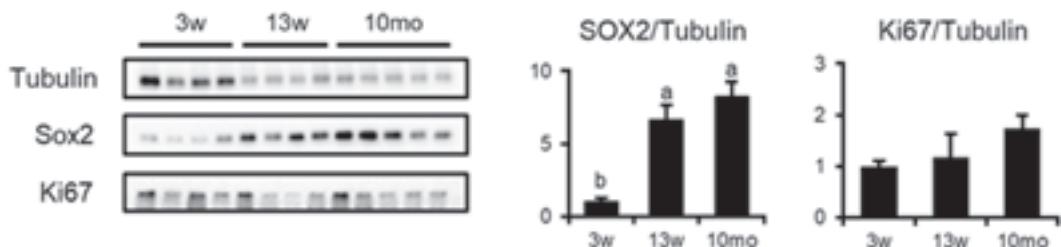


Fig. 3 Changes in SOX2 and Ki67 levels in rumen epithelium in growing calves. Tissue protein was extracted from the rumen of male Holstein calves at 3 weeks, 13 weeks and 10 months of their age and protein levels of SOX2 and Ki67 were quantified by western blotting. The specific bands of SOX2 and Ki67 are indicated (left) and relative intensities of each protein bands normalized by Tubulin are shown (right). Different alphabet letters represents statistical significance : $P < 0.05$.

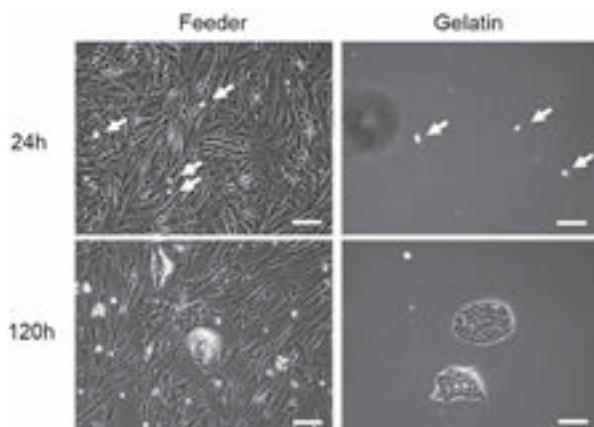


Fig. 4 Initial cellular adhesion and colony formation of cultured rumen epithelial cells. Rumen epithelial cells were harvested from male Holstein calves at 3 weeks of age and cultured in tissue stem cell media on feeder cell or gelatin-coated plate. Top panels : White arrows indicate adhered epithelial cells 24h post seeding in feeder cell or gelatin-coated culture. Bottom panels : rumen epithelial cells demonstrated tissue stem cell-like colonies in both culture conditions 120h post seeding. Scale bars represent 100μm.

齢と成長するに従い、8倍程度まで量が増加した(Fig. 3)。一方でKi67は個体差が大きく、各週齢間で有意な差はなかった。本実験ではヒト・マウスにおける食道疾病の研究から同定された幹細胞マーカーSOX2に着目した⁵⁾。この研究では、採取した細胞の幹細胞性はオルガノイド形成能を指標に評価されており、これと相関する他のマーカー遺伝子も同定されている。本実験の結果から、成牛において組織幹細胞の存在が高まった可能性は排除できないものの、SOX2陽性細胞よりも未分化な細胞群が存在する可能性が考えられる。ルーメン上皮は離乳期を境に分化・発達する

という他の重層扁平上皮組織にない性質を持つため、より未分化な細胞のマーカーが存在しないか今後詳細に検討する必要性が示された。

3.3 ルーメン上皮細胞の単離と培養条件の検討

これまでの実験からルーメン上皮において未分化細胞の存在が示唆されたため、本実験ではこのような細胞群の単離および体外培養の可能性について検討した。3週齢の子牛より採取したルーメン組織から単離した上皮細胞を、組織幹細胞培地においてフィーダー培養(Feeder)した結果をFig. 4に示す。また、ゼラチンコート(Gelatin)

によるフィーダーフリー培養法についても同時に検討した。細胞播種から24時間後のFeederおよびGelatinではウェル底面に付着した生細胞が確認された。また、播種後120時間では両培養条件下においてルーメン上皮細胞はコロニーを形成していた。次に、フィーダーフリー培養したルーメン上皮細胞の性状を免疫染色により検討したところ、SOX2, Ki67, ITGA6を発現していることが確認された (Fig.5)。また、SOX2, Ki67については上皮細胞コロニー内の細胞間で発現量のばらつきがみられた。

組織幹細胞の培養法では生体内の幹細胞ニッチを模倣することが重要であり、幹細胞によるオートクライインや周辺細胞からのパラクライインを介したWnt, BMPなどのシグナル経路により組織幹細胞は維持されていると考えられている^{3,6)}。本実験においてもWntシグナル因子とBMP阻害因子を添加した幹細胞培地を使用することで幹細胞コロニー様の形態を持つルーメン上皮細胞の培養に成功した。また、ゼラチンコーティングによるフィーダーフリー培養が可能であることも示され

た。ECMはそれぞれに対応する受容体を介して細胞と結合することで、細胞の生存や増殖を促進する。当グループの未発表データからルーメン組織ではコラーゲン類が高発現することから、このECMがルーメン上皮細胞の足場として重要であると考えられ、二次元培養下でも上皮細胞が増殖したと考えられる。本実験は培地およびECMの基礎的な培養条件検討であり、今後は細胞継代能や未分化能の評価および分化培養法の検討が必要である。しかしこの培養系は、SARAにおける上皮細胞応答メカニズムの検討や治療薬の探索に応用できると期待される。

4. 要 約

本研究では、ルーメンアシドーシス時の細胞応答研究への応用を見据え、組織修復に関わるルーメン組織幹細胞の同定と単離培養法の確立を目指した。離乳前（3週齢）のホルスタイン種牛のルーメン組織における、組織幹細胞マーカー遺伝子の発現を検討したところ、SOX2などの既報で示されている候補遺伝子群の発現がみられた。ま

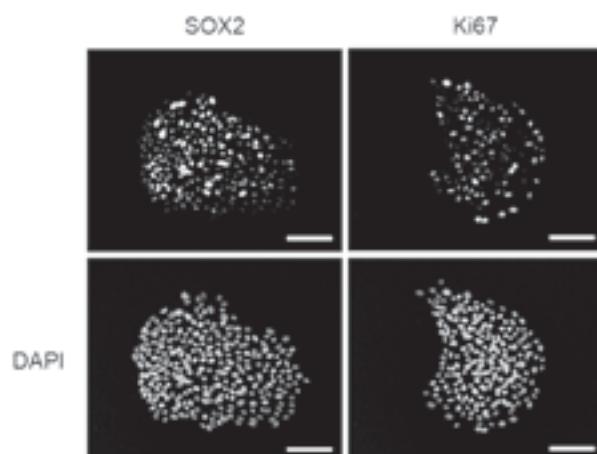


Fig. 5 The maintenance of undifferentiated state in cultured rumen epithelial cells. Rumen epithelial cells from Holstein calves (3 weeks of age) were cultured using feeder-free method for 120h to form tissue stem cell-like colonies. Immunofluorescence visualized SOX2 and Ki67 expressing cells (Top panels) and their corresponding DAPI staining (Bottom panels). Scale bars represent 100μm.

た、免疫染色により、ルーメン組織内ではSOX2とKi67の共陽性細胞が存在し、幹細胞性を維持しつつ細胞増殖により組織に細胞を供給する細胞群があることが示唆された。さらに、これらの細胞群の培養法を検討したところ、WntおよびBMPシグナル制御因子を添加した培地を用いることでフィーダー細胞共存下およびフィーダーフリー条件下で培養することが可能となった。これらの培養細胞はSOX2およびKi67を発現していたことから、未分化性や増殖性が維持されていると考えられた。本研究により、ルーメン組織において増殖能を持つ幹細胞様の未分化細胞の存在が示唆され、その性質を維持しつつ体外培養を行うことが

可能となった。現在、培養細胞の詳細な性状解析を行っており、今後は分化培養法を作出することでルーメン上皮を精度よく模倣した培養モデルの作出が期待される。

文 献

- 1) Steele, M. A., et al. : *J. Dairy Sci.*, 99, 4955~4966, 2016.
- 2) Yohe, T. T., et al. : *J. Dairy Sci.*, 99, 7654~7660, 2016.
- 3) Yamamoto, Y., et al. : *Nat. Commun.*, 7, 1~10, 2016.
- 4) Xiang, R., et al. : *PeerJ*, 4, e1762, 2016.
- 5) DeWard, A. D., et al. : *Cell Rep.*, 9, 701~711, 2014.
- 6) Sato, T., et al. : *Nature*, 459, 262~265, 2009.

哺乳子牛の下痢を低減する発酵代用乳の開発

Development of the fermented milk which reduces the loose bowel of calves

庄 司 則 章

(山形県立農林学校)

Noriaki Shoji

(Yamagata Prefectural College of Agriculture and Forestry)

Loose bowel of calves is known to result in contracting pneumonia and suppressing the growth of them. In order to restrain diarrhea of calves, feeding the fermented milk on them as reducing measures of the diarrhea was studied. The feeding effect of the fermented milk replacer, which was added lactic acid bacteria *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1, was investigated. The feeding the fermented milk replacer on calves was indicated to promote the growth and decrease diseases because of the improvement of nutritional conditions and infection protective function, whereas the reducing effect of diarrhea was obscure.

1. 目 的

子牛の生産基盤の弱体化により黒毛和種子牛の生産頭数は減少しており、子牛価格は高値で推移している（H28 815千円／頭）¹⁾。そのため、繁殖経営における規模拡大や、肥育経営における繁殖部門の導入が進みつつあるが、管理不十分により子牛が疾病に罹り、発育不良となる事例が多く見受けられる。子牛は抵抗力が弱いため病傷事故が発生しやすく（H27 約32万5千件）²⁾、そのうち約50%を下痢等の消化器関係が占める。子牛は下痢により栄養状態が不良となって発育が停滞しやすくなるとともに、免疫が低下して肺炎を併発しやすくなる。哺乳や育成の段階で肺炎になると、肥育中にも肺炎を発症しやすくなり、これにより枝肉成績が低下したり、最悪の場合は死亡し

たりする。そのため、肺炎の一因である子牛の下痢を低減させることは、生産現場において非常に重要な課題である。

黒毛和種子牛は、乳用種や交雑種の子牛に比べて生時体重が小さくて、下痢が発生しやすい。子牛の下痢は、細菌やウイルスなどの感染による感染性下痢と、消化不良などによる食餌性下痢に大別される。感染性下痢に対しては、抗病性を十分に發揮させる栄養とストレスの少ない適切な環境が重要である。また、食餌性下痢は未消化の乳成分が大量に小腸に流入することにより起きやすくなることから、母牛の栄養管理や代用乳の多回給与が重要である。

我々は、黒毛和種子牛の下痢低減対策として発酵乳の給与に着目した。一部の酪農家では、下痢の低減を目的として廃棄乳を加熱処理後に乳酸菌

を添加し、発酵乳としてから子牛に給与している事例がある。発酵乳は、pH 4程度の酸性乳であることから、子牛の第4胃を酸性に保つて有害なバクテリアの増殖を防ぐとともに、乳酸発酵により乳成分が消化されやすくなっていることから食餌性下痢に対しても有効である可能性が高い。しかし、廃棄乳が生じない黒毛和種繁殖経営では、発酵乳の給与効果はほとんど検討されていない。ヒトでは、免疫賦活作用を有する乳酸菌株による発酵乳（ヨーグルト）の摂取効果が報告されており、第一胃が未発達で单胃動物に近い哺乳子牛に発酵乳を給与することにより、ヒトと同様に免疫力を高め、疾病が低減することが期待される。

そこで本研究では、市販代用乳とヒトで免疫賦活作用や感染防止効果が報告されている乳酸菌株を用いて、黒毛和種繁殖経営でも給与可能な発酵乳を試作し、発酵乳の給与による黒毛和種子牛の下痢低減効果を検証した。

2. 方 法

2.1 試験1 発酵代用乳の製造方法の検討

子牛の免疫賦活作用や感染防止効果が期待される菌体外多糖（EPS）の產生能が高い乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 株から製造されたヨーグルト（製品名「明治プロビオヨーグルトR-1」）を用いて次の条件で発酵代用乳を調製し、EPS含量の高い調製法を検討した。

試験1.1 EPS產生量を高める発酵条件の検討

M社製代用乳（CP27%，Fat15.5%）を5倍量の温水で希釀し、R-1ヨーグルトを10%混合して発酵させた。発酵温度は35, 40°C、発酵時間は0, 8, 16, 24, 48時間とし、調製した発酵代用乳のEPS、pH、遊離アミノ酸、総タンパク質、総脂質、トリグリセリド、乳酸を測定した。

試験1.2 EPS產生量を高める代用乳の成分の

検討

6社8製品の代用乳を5倍もしくは7倍量の温水で希釀し、R-1ヨーグルトを10%混合したのち、40°Cで24時間発酵させた。代用乳については粗タンパク質と粗脂肪、調製した発酵代用乳についてEPSを測定した。

2.2 試験2 子牛への発酵代用乳の給与効果の検討

分娩後約2週間で親子分離し人工哺乳している農場において、黒毛和種哺乳子牛に2種類の発酵代用乳を給与し、血液および糞性状や腸内細菌叢等から給与効果を調査した。

発酵代用乳は、高脂肪代用乳A（CP24%，Fat25%）もしくは高タンパク質代用乳B（CP30%，Fat18%）を、それぞれメーカーが推奨する8倍もしくは5倍量の温水で溶解し、R-1ヨーグルトを10%添加し、40°Cで24時間発酵させて調製した。

供試牛は、当該農場で平成29年6～11月に出生した黒毛和種子牛を用い、代用乳A、Bともに対照区および試験区に各4頭ずつ配置した。代用乳の給与量はA、Bともに1000g／日・頭とし、試験区では代用乳の一部（代用乳A：111g／日、B：167g／日）を発酵代用乳AもしくはBで代替した。代用乳および発酵代用乳はそれぞれ1/2量を朝夕に分けて、離乳まで給与した。

おおむね45日齢時に血液と糞を採取し、血液性状（一般生化学検査、GC/MSによるメタボローム解析、サイトカイン解析等）、糞性状（pH、VFA、IgA）、腸内細菌叢（T-RFLP解析）ならびに人工哺乳期間中の疾病罹患状況を調査した。

3. 結果と考察

3.1 試験1.1

発酵条件の違いによる発酵代用乳の成分変化をTable 1に示した。発酵温度の違いによる大きな

変化は認められず、発酵時間が長くなるにつれてpHは低下し、乳酸、EPSおよび各遊離アミノ酸は増加した。特に遊離アミノ酸総量の増加は、発酵前と比べ約15倍と著しかった。EPSは48時間目まで増加し、pHや遊離アミノ酸濃度は24時間でおおむね安定した。生産現場の作業効率を考慮すると、作業が終了する夕方に発酵代用乳を調製して約40°Cで発酵させ、翌日の朝と夕に子牛に給与することが望ましいと考えられた (Table 1)。

3.2 試験1.2

8製品の代用乳を5倍もしくは7倍の温水で希釀して調製した発酵代用乳のEPS含量はそれぞれ 151 ± 28 (112~185), 124 ± 28 (92~175) mg/kgであった。希釀した代用乳の粗タンパク質および粗脂肪と発酵後のEPSとの分布図をFig. 1に示した。粗脂肪とEPSの相関は $r = 0.448$ ($p < 0.1$) であり、粗脂肪含量の高い代用乳を用いることにより、EPS含量の高い発酵代用乳を調製できる可能性が示唆された (Fig. 1)。

3.3 試験2

供試牛の血液性状をTable 2に示した。個体差が大きく有意ではなかったが、栄養状態の指標である総コレステロール、トリグリセリド、尿素態窒素が試験区で高く、良好な栄養状態にあると推察された。また、試験区では各遊離アミノ酸(FAA)濃度が有意に高かった。哺乳子牛にアミノ酸製剤を給与することによりアミノ酸が子牛の消化管から吸収されて血中FAA濃度が高まる³⁾ことから、発酵調製により大幅に増加した発酵代用乳中のFAAが吸収されて血中濃度が高まったものと考えられた。3-ヒドロキシ酪酸(BHB)は酪酸がルーメン絨毛粘膜で代謝されてできる物質であり、子牛のルーメン発達の指標とされている⁴⁾。発酵代用乳は食道溝反射によりただちに第四胃に送られるため、ルーメンの発達に直接関与するとは考えづらいが、試験区においてBHBが

Table 1 Component change of the fermented milk.

Milk replacer fermentation Temp (°C)	Time (hr)	n	pH	Lactic acid -TMS	EPS ²	Amount of free amino acid (μmol/L)												Total protein (%)	Total fat (%)				
						Essential						Non-essential											
						Val	Leu	Ile	Thr	Phe	His	Lys	Met	Arg	Ser	Pro	Gly	Glu	Gln				
Ambient	0	3	5.8	238	13	12	0	0	0	15	0	0	0	0	0	21	9	7	0	17	0	69	3.9
	8	3	4.1	831	104	154	20	0	70	50	99	10	0	0	117	121	52	7	0	78	14	655	3.9
	16	3	3.9	1068	143	198	36	7	127	99	130	14	0	0	184	186	70	7	0	66	13	941	3.8
	35	24	3	3.7	1317	156	214	45	11	154	121	134	16	4	0	212	215	70	7	0	16	0	1005
40	48	3	3.6	1722	177	225	54	14	168	135	137	19	7	7	228	223	71	8	4	15	0	1090	3.7
	8	3	3.9	1095	111	171	23	0	92	67	106	9	0	0	141	146	56	5	0	89	12	747	3.8
	16	3	3.9	1464	135	206	38	8	154	112	122	13	0	0	201	198	64	8	0	27	3	947	3.8
	48	3	3.6	2005	174	216	44	11	168	127	123	15	5	0	214	211	69	9	0	17	0	1012	3.7
Data are expressed as mean value (n=3). IS% ¹ : Relative intensity of the TMS derivative against the internal standard (0.1 mg/ml of 2-isopropylmalic acid) determined by GC/MS. EPS ² : Exopolysaccharide.																							

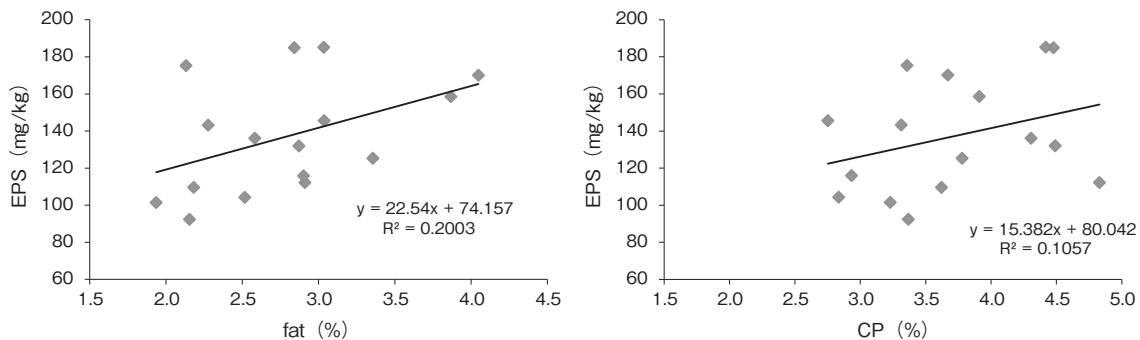


Fig. 1 EPS content correlation between fat and CP in the fermented milk replacer.

Table 2 Blood components

Treatment ²	Milk replacer ¹		High fat		High protein		ProcMixed test ³		
	n		Control	Fermented	Control	Fermented	Milk replacer	Treatment	Milk replacer × Treatment
			4	4	4	4			
GOT		(U/L)	56	56	64	61			
GGT		(U/L)	33	27	23	25	*		
Urea nitrogen		(mg/dl)	6.6	8.5	13.4	14.9	**	+	
Total protein		(g/dl)	6.4	6.1	6.4	6.2			
Albmine		(g/dl)	3.3	3.4	3.6	3.4			+
Total cholesterol		(mg/dl)	169	204	124	157	+		
Triglyceride		(mg/dl)	25	35	17	21	+		
Free fatty acid		(mEq/L)	0.18	0.20	0.22	0.24			
Glucose		(mg/dl)	114	115	111	120			
Calcium		(mg/dl)	12.7	13.3	13.3	13.1			
Retinol		(IU/dl)	40	61	63	64			
α-Tocopherol		(μg/dl)	536	836	624	680			
Tyrosine-3TMS		(IS%) ⁴	1.5	1.9	1.6	2.8	+	*	
Phenylalanine-2TMS		(IS%)	50.0	61.4	57.4	88.5	+	*	
Isoleucine-2TMS		(IS%)	7.1	8.1	8.7	15.2	**	*	+
Valine-2TMS		(IS%)	55.6	62.2	75.3	119.1	**	*	+
Leucine-2TMS		(IS%)	11.0	12.8	16.0	27.4	**	*	
Proline-2TMS		(IS%)	8.6	9.7	10.1	13.5			
Threonine-3TMS		(IS%)	20.8	20.8	26.1	42.0	*		
Lysine-4TMS		(IS%)	76.1	66.4	84.9	131.4	*		
3-Hydroxybutyric acid-2TMS		(IS%)	12.5	17.5	19.4	21.9	*	+	
Threonic acid-4TMS		(IS%)	3.4	2.8	3.2	1.9	*		
Uric acid-4TMS		(IS%)	7.1	8.9	6.0	7.6	*		
Fructose-meto-5TMS(2)		(IS%)	1.2	2.6	1.3	1.7	*		
Dopamine-4TMS		(IS%)	5.2	5.8	5.2	6.2	*		
IGF-1		(ng/ml)	68	90	80	92		+	
GH		(ng/ml)	6.8	17.6	7.1	6.1			
TNF-α		(pg/ml)	231	133	262	145			
IgG		(mg/ml)	8.5	9.0	11.0	8.0			
IgA		(μg/ml)	62	73	67	65			
LPS-binding protein		(ng/ml)	742	509	494	578			
Serum amyloid A protein		(mg/ml)	46	24	16	29			
Haptoglobin		(mg/ml)	63	11	2	57			

Data are expressed as mean value (n = 4).

Milk replacer¹ : High fat : CP 24%, fat 25% : High protein : CP 30%, fat 18%.Treatment² : Control : no fermented milk replacer ; Fermented : fermented milk replacer was fed (1 L/day).ProcMixed test³ : ** : p < 0.01, * : p < 0.05, + : p < 0.1.IS %⁴ : Relative intensity of the TMS derivatives against the internal standard (0.1 mg/ml of 2-isopropylmalic acid), determined by GC/MS.

高い傾向にあったことからルーメン絨毛の発達にも関与する可能性が示唆された。子牛の発育に影響するIGF-Iは試験区で高い傾向であった。血中IGF-I濃度は高栄養やアミノ酸投与により増大することから、発酵代用乳の給与により栄養状態が良好になるとともにアミノ酸吸収が促進されてIGF-I濃度が高まったと考えられた。炎症性サイトカインであるTNF- α は有意ではないものの試験区で低い傾向にあり、IL-6は高タンパク代用乳の対照区で1頭、試験区で3頭が検出限界以下であった。IFN- γ とIL-4はほとんどの個体で検出限界以下であった。免疫グロブリンや急性期タンパク質（LBP、SAA、Hp）については個体差が大きく、処理区間の差は認められなかった（Table 2）。

Table 3に糞の性状と腸内細菌叢の結果を示した。糞のpHはVFA含量と有意な負の相関（ $r = -0.71$ ）であり、有意ではないものの両代用乳とも試験区においてVFA含量が少なくpHが高い傾向であった。自然哺乳子牛の黒毛和種新生下痢の原因は、糞中乳酸濃度の増加とそれに伴うpH低下が一因である⁵⁾が、発酵代用乳の給与により糞のpH低下に伴う下痢を低減できる可能性が示唆された。腸内細菌叢についてはClostridium subcluster XIVa (OTU517) の割合のみ試験区で有意に高かった。

人工哺乳期間中の供試牛の疾病罹患状況をTable 4に示した。高タンパク質代用乳では、試験区において肺炎や腸炎に罹患する個体が少なく、また、すべての個体で下痢を発症したが平均発症回数は対照区の約半分であった。一方、高脂肪代用乳では、両区の疾病罹患頭数はほぼ同程度であったが、試験区において下痢の平均発症回数が多かった（Table 3、Table 4）。

全乳にクエン酸を添加してpH4.6とした酸性乳を子牛に給与することにより、哺乳中の下痢の発

生が抑えられ発育が向上⁶⁾したり、市販ヨーグルトを添加した発酵初乳を代用乳に15%混合して給与することにより、下痢発症が極端に減少⁷⁾したりするとの報告がある。本試験では、代用乳の10～15%程度を発酵代用乳に代替し、pH4.6程度の混合代用乳として給与したが、明瞭な下痢低減効果を確認することはできなかった。しかし、発酵代用乳を給与することに血液中に次のような傾向がみられた。

- ① 尿素態窒素、総コレステロール、トリグリセリドが高いことから、栄養状態は良好である。
- ② 遊離アミノ酸やIGF-Iが高いことから、良好な発育が期待できる。
- ③ 3-ヒドロキシ酪酸が高いことから、ルーメン絨毛の発達が期待される。
- ④ TNF- α やIL-6が低く肺炎や腸炎も少なかったことから、腸内の感染防御機能の向上による疾病低減が期待できる。

以上より、発酵代用乳の給与は哺乳子牛の発育向上に効果的である可能性が示唆された。

4. 要 約

哺乳子牛の下痢は、肺炎の罹患と生育不足につながることが知られている。本研究では、哺乳子牛の下痢低減による発育向上を目的として、菌体外多糖の產生能の高い乳酸菌 *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* OLL1073R-1 株を代用乳に添加し、発酵させた発酵代用乳の給与効果を検討した。下痢の低減効果は明瞭ではなかったが、発酵代用乳の給与により栄養状態の改善による発育の向上や、腸内の感染防御機能の向上による疾病低減が期待されることが示唆された。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、発酵代用乳のEPS含

Table 3 Feces components and intestinal flora.

Milk replacer ¹		High fat		High protein		ProcMixed test ³		
Treatment ²		Control	Fermented	Control	Fermented	Milk replacer	Treatment	Milk replacer × Treatment
n		4	4	4	4			
pH		6.90	7.29	7.16	7.38			
Total VFA	(μmol/g)	107	79	105	88			
VFA components								
Acetic acid	(%)	48.8	52.9	58.0	52.5			
Propanoic acid	(%)	36.7	32.1	28.3	35.6			*
Isobutyric acid	(%)	1.9	2.2	1.7	1.8			
Butyric acid	(%)	9.2	9.5	8.3	7.0			
Isovaleric acid	(%)	2.5	2.6	2.1	2.2			
Valeric acid	(%)	0.9	0.7	1.4	0.8			
IgA	(μg/g)	97.6	125.9	352.1	193.1			
Intestinal flora	OTU ⁴							
Bacteroidales	106 (%)	0.7	6.0	6.0	3.4			
Clostridium cluster IX	110 (%)	1.8	0.3	0.0	1.6			+
Actinobacteria	124 (%)	0.4	0.5	0.7	1.9			
Deltaproteobacteria	149 (%)	0.6	0.4	0.6	1.5	+		+
Clostridium cluster IV	168 (%)	0.1	0.2	0.8	0.6	*		
Prevotella	317 (%)	8.5	9.3	6.1	11.5			
Streptococcus	332 (%)	0.1	0.0	0.0	0.6			
Clostridium cluster XI	338 (%)	0.6	0.1	1.4	0.2			
None	359 (%)	0.8	12.7	2.8	1.5	+		*
Bacteroidales	366 (%)	8.0	7.7	6.6	8.8			
Clostridium cluster IV	369 (%)	3.0	2.6	3.7	6.6			
Bacteroides	469 (%)	24.5	22.8	25.1	18.7			
Clostridium subcluster XIVa	494 (%)	3.4	2.6	1.9	2.5			
Clostridium subcluster XIVa	505 (%)	0.6	0.9	0.7	0.7			
Clostridium subcluster XIVa	517 (%)	1.0	1.8	0.7	4.2	*		
Lactobacillales	520 (%)	0.1	0.0	0.2	0.1			
None	643 (%)	0.0	0.3	0.3	0.4			
Firmicutes	650 (%)	2.1	2.0	2.1	2.0			
Betaproteobacteria	656 (%)	1.3	1.4	2.0	2.2			
Lactobacillales	657 (%)	4.6	2.4	11.1	9.5	+		
Clostridium cluster IV	749 (%)	10.6	9.7	8.4	5.6			
Clostridium subcluster XIVa	754 (%)	0.7	1.4	0.1	0.2			
None	772 (%)	0.4	0.3	0.0	0.4			
None	853 (%)	1.7	1.9	2.1	2.1			
Clostridium cluster IV	912 (%)	0.9	0.5	0.6	0.3			
Clostridium cluster XI	919 (%)	2.0	1.1	1.3	1.8			
Clostridium subcluster XIVa	940 (%)	6.2	4.3	4.7	4.7			
Clostridium subcluster XIVa	955 (%)	10.3	3.8	6.4	3.1			
None	968 (%)	2.0	1.2	1.0	1.5			
None	985 (%)	0.5	0.2	0.6	0.1			
Clostridium subcluster XIVa	990 (%)	2.6	1.6	1.8	1.8			

Data are expressed as mean value (n=4).

Milk replacer¹ : High fat : CP 24%, fat 25% ; High protein : CP 30%, fat 18%.Treatment² : Control : no fermented milk replacer ; Fermented : fermented milk replacer was fed (1 L/day).ProcMixed test³ : ** : p<0.01, * : p<0.05, + : p<0.1.OTU⁴ : Operational taxonomic unit (base length peak detected by Nagashima procedure).

Table 4 Type and frequency of contracted disease.

Milk replacer ¹	Higt fat				High protein					
	Treatment ²		Control		Fermented		Control		Fermented	
	n	4	Number ³	Frequency ⁴	4	Number ³	Frequency ⁴	4	Number ³	Frequency ⁴
Fever	2	1.5	3	1.0	3	2.0	1	1.0		
Pneumonia	3	1.7	3	1.3	4	1.0	2	1.0		
Enteritis	0	—	0	—	2	1.0	0	—		
Diarrhea	4	1.8	4	2.8	4	3.3	4	1.8		

Milk replacer¹ : High fat : CP 24%, fat 25% ; High protein : CP 30%, fat 18%.

Treatment² : Control : no fermented milk replacer ; Fermented : fermented milk replacer was fed (1 L/day).

Number³ : Number of contracted calves.

Frequency⁴ : Average number of times on the contracted calves.

量、免疫および炎症関連項目、IGF-I の分析に協力いただいた（株）明治 研究本部乳酸菌研究所 牧野聖也先生、（独）農研機構畜産研究部門 柳引史郎先生、広島大学大学院生物圈科学研究科 杉野利久先生に感謝いたします。

文 献

- 1) 肉用子牛の取引頭数と価格、独立行政法人農畜産業振興機構HP、2018.
- 2) 平成27年度農業災害補償制度家畜共済統計表、農林水産省HP、2016.
- 3) 芝野健一、宇崎敬与、宮本孝明、三谷睦、山村佳宏、森本啓介、佐野努：日齢体重が異なる黒毛和種子牛

の血中アミノ酸濃度とアミノ酸製剤給与効果、家畜診療、59, 685~696, 2012.

- 4) 鈴田史子、横山竜太、山本和利、田中英隆、元村泰彦：肉用子牛を丈夫に育てる血中BHBを指標とした子牛の離乳時期と発育成績の検討、臨床獣医、25(7), 24~28, 2007.
- 5) 芝野健一、三輪岳宏：黒毛和種新生子牛における糞便中有機酸濃度の影響、家畜感染症学会誌、1, 19~23, 2012.
- 6) 林田宏昭、成光昭男、伊東重雄：消化酵素剤添加乳またはクエン酸添加乳の給与が乳用雌子牛に及ぼす効果、九州農業研究、59, 1997.
- 7) 日下知加久、出石俊治：哺乳子牛における市販ブレンヨーグルト応用発酵乳の投与による下痢症予防対策、家畜診療、45, 541~545, 1998.

ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛における病態解析

Analysis for pathophysiology of heterozygous individual with cholesterol deficiency in Holstein cattle

猪 熊 壽

(帯広畜産大学畜産学部)

Hisashi Inokuma

(Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)

This study was conducted to clarify the cholesterol level and clinical findings of heterozygote calves with autosomal recessive cholesterol deficiency disorder. A total of 61 calves with mal-growth or weakness was divided into three groups—38 homozygotes, 8 heterozygotes and 21 non-carrier (wild) base on polymerase chain reaction for the autosomal recessive cholesterol deficiency disorder. The median values of serum total cholesterol (TC) of homozygotes, heterozygotes and wild were 8.0, 36.0 and 47.0 mg/dl, respectively. TC level of homozygotes was significantly lower than those of heterozygotes and wild. TC level of heterozygotes was lower than that of wild; however, the difference was not statistically significant. One of eight heterozygotes calves, 91 days old, showed severe chronic diarrhea and very low TC level of 11 mg/dl same as the level of homozygote calves. The heterozygote calf also showed similar clinical and laboratory findings as homozygote calves, including systematic muscular atrophy, facial change, diarrhea, microcytic hypochromic anemia and acanthocytosis. These findings suggested that similar clinical findings as homozygotes can be expressed in heterozygote calves with autosomal recessive cholesterol deficiency disorder. It is possible that the inheritance of this disease will be incomplete dominance instead of 'recessive'.

1. 目 的

ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症は2015年に見出された新しい遺伝病で、罹患牛は著しい低コレステロール血症を呈して栄養不良に陥り、6ヵ月以内に死亡する¹⁾。欧州で初発例が報告され²⁾、その後2016年には日本でも確定診断された発症牛が報告された^{3, 4)}。本症の原因はリポタンパク質Apo B合成遺伝子の異常、すなわち

Exon 5への過剰な塩基挿入であり、遺伝様式は常染色体劣性遺伝とされている^{5, 6)}。本疾患遺伝子の始祖とされる種雄牛モーリンストームは生産性が高く、その子孫の種雄牛は酪農家に人気がある。このため我が国のホルスタイン種におけるコレステロール代謝異常症保因牛の頻度は比較的高く、牛乳生産のみならず、国産牛肉の生産性にも大いに影響を与えている可能性がある。

本症が真に常染色体劣性遺伝疾患であれば、理

論的にはホモ接合体だけが発症する。このため、現在本病対策の基本は保因牛の摘発と交配計画による発現リスクの低減が主である。実際、我が国では平成29年3月からコレステロール代謝異常症保因牛の精液は供給されていない。しかし、コレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛でも血清コレステロール濃度が低下しているという報告もあり⁷⁾、本症の遺伝様式については真に常染色体劣性なのかどうか明らかになっていない。ヘテロ保因牛にもコレステロール代謝異常が発現するのであれば、ホルスタイン種改良上および乳肉生産の障害となりうるが、その病態と発症機序には不明な点が多い。このため、本病ヘテロ保因牛にみられるコレステロール代謝異常の発現実態を把握するとともに、発病機序を解明し、その対応策を提案することが緊急の課題と考えられる。

そこで、本研究ではコレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛におけるコレステロールレベルと臨床症状発現の実態を把握し、生産性に及ぼす影響を考察することを目的とした。

2. 方 法

本研究の対象牛は2007年4月から2018年1月までに発育不良、虚弱等を主訴として病性鑑定のため帯広畜産大学に搬入された1歳未満の牛で、病理剖によっても形態的な先天異常や重度肺炎、または腸炎等の明らかな原疾患が見出せなかった61頭である。各症例からEDTAを抗凝固剤として採血した新鮮または保存血からDNAを抽出し、Menziらの方法によるpolymerase chain reaction (PCR) を用いて⁸⁾、コレステロール代謝異常症についてホモ接合体（ホモ）、ヘテロ接合体（ヘテロ）および非保因牛（ワイルド）に分類し、各群の血清コレステロール濃度（TC）を、マンホイットニーU検定を用いて比較した。また、各群のTC 20mg/dl未満を呈した個体と20mg/dl以上

の個体の割合をカイ2乗検定により比較した。

さらに、ヘテロ個体の臨床症状を観察するとともに、ホモ個体と同様の臨床症状を呈した1頭の概要を記載した。

3. 結果と考察

3.1 ヘテロ接合体の血清コレステロール濃度 Menziらの方法によるPCRを用いてコレステロール代謝異常症の遺伝子診断を実施したところ、61頭の供試牛はホモ32頭、ヘテロ8頭、ワイルド21頭に分類された。

各群のTC中央値はホモ群8.0mg/dl、ヘテロ群36.0mg/dl、ワイルド群47.0mg/dlであり、ホモ群のTCは他の2群に比較して有意に低値であった($p<0.01$, Fig. 1)。いっぽう、ヘテロ群のTC値はワイルド群と比較すると低い傾向を示したが、有意差はなかった。

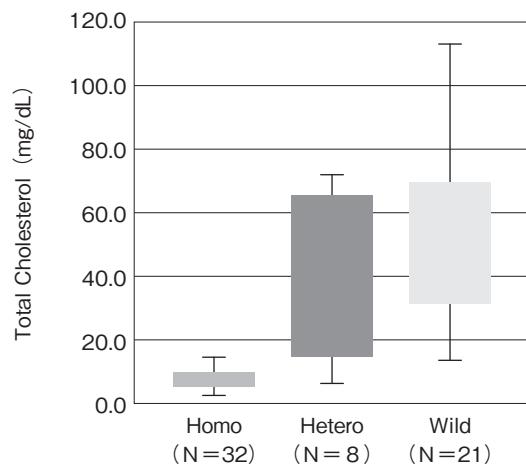


Fig. 1 Total cholesterol levels of 32 homozygotes (Homo), 8 heterozygotes (Hetero) and 21 non-carrier (Wild) calves with mal-growth or weakness. The data are represented by box-and-whisler diagram. The median values of serum total cholesterol (TC) of Homo, Hetero and Wild were 8.0, 36.0 and 47.0 mg/dl, respectively. TC level of Homo was significantly lower than those of Hetero and Wild. TC level of Hetero was lower than that of Wild; however, the difference was not statistically significant.

TC 20mg/dl未満と著しい低コレステロール血症を示した個体は、ホモ群では32頭すべて(100.0%), ヘテロ群では8頭中2頭(25.0%), ワイルド群では21頭中2頭(9.5%)であった。ホモ群のTC 20mg/dl未満を呈する個体の割合は、他の2群に比べて有意に高かったが($p < 0.01$)、ヘテロ群とワイルド群の間には有意差は認められなかった。

今回の検索ではヘテロ群のTC濃度はワイルド群と比べて有意な差を認めなかつたが、これら両群ではいずれも発育不良、虚弱等の臨床症状を呈する子牛を材料としている。このため、いずれの子牛も栄養状態が悪く、コレステロール代謝異常症以外の要因がヘテロ群およびワイルド群の低コレステロール状態に影響を及ぼしている可能性が否定できない。Grossらは臨床健常なヘテロ個体とワイルド個体のTCを比較して、ヘテロ群のTC (55 ± 13)は、ワイルド群のTC (125 ± 33)に比べて有意に低かったと報告している⁷⁾。ヘテロ個体の生産性について検討を行うためには、今後臨床異常のない牛を用いてヘテロとワイルドの比較を行う必要があると考えられた。

3.2 ヘテロ接合体におけるコレステロール代謝異常症発症

ヘテロ群8頭の主訴は体格小3頭、活気なし3頭、下痢1頭、起立不能1頭であった。このうち、難治性下痢を主訴とした1頭および起立不能を呈した1頭では著しい低TC値を示した(11.0および7.0mg/dl)。このTC値はホモ群のTC値とほとんど同じであった。これらのうち1頭について、臨床経過および病理検索を詳細に観察することができたので、以下に概要を記載する。

当該ヘテロ症例は91日齢のホルスタイン種雌子牛で、初診時に食欲不振と眼球陥凹、削瘦および泥状便の排泄が認められた。感染性腸炎を疑って抗菌薬により治療されたが治癒しなかつた。TC

9mg/dlと顕著な低値を示したため、担当獣医師は牛コレステロール代謝異常症を疑つた。一般財団日本ホルスタイン登録協会の家畜改良データバンク (<http://www.rgliaj.jp/hol/j1.do?fn=init>) で血統情報を検索したところ、父牛は非保因牛であったが、母牛は牛コレステロール代謝異常症保因牛の可能性のあることが確認された。帯広畜産大学にてPCR検査によりヘテロ個体と診断された。

症例は病性鑑定のため103日齢時に帯広畜産大学に搬入された。搬入時、症例は体温39.2°C、心拍数84回/分、呼吸数32回/分で、自力起立と歩行可能であり、食欲もみられたが、削瘦が顕著で体格も小さかった(Fig. 2)。全身の筋の萎縮、後肢蹠蹠、咬筋と側頭筋の萎縮による顔貌の変化、眼球陥凹、四肢冷感および唾液粘液亢進がみられた。血液検査では小球性正色素性貧血がみられ、血液塗抹標本中に有棘赤血球が観察された。搬入時の血液生化学検査でTC 11mg/dl、中性脂肪濃度は3mg/dl未満であった。症例は104日齢に水様下痢を呈したが、糞便検査で寄生虫卵およ



Fig. 2 One of 8 heterozygotes calves, 91 days old, showed severe chronic diarrhea and very low TC level of 11 mg/dl same as the level of homozygote calves. The heterozygote calf also showed similar clinical and laboratory findings as homozygote calves, including systematic muscular atrophy, facial change, diarrhea, microcytic hypochromic anemia and acanthocytosis.

びオーシストはみられなかった。また、末梢血を材料とした牛ウイルス性下痢ウイルス（bovine viral diarrhea virus : BVDV）のreverse transcription-PCR検査も陰性であった。症例は105日齢に起立不能となり、予後不良と判断されて同日安楽殺された（帯広畜産大学動物実験委員会承認番号28-33号）。

病理解剖では、全身の筋の萎縮および脂肪織が少なく栄養状態の不良が認められた。病理組織所見では、消化管上皮細胞の壊死・剥離が散在性に認められ、粘膜固有層では軽度の炎症細胞浸潤が観察された。

本症例はコレステロール代謝異常症ヘテロ個体にも関わらず、慢性下痢、低コレステロール血症、全身性の筋萎縮、貧血、有棘赤血球の出現といったホモ個体でみられる典型的な臨床徵候が認められた^{2,4)}。子牛が慢性下痢、あるいは低コレステロール血症を呈し虚弱となる疾患の鑑別診断として、腸炎、吸収不良症候群、タンパク漏出性腸症、慢性肺炎などによる吸収不良、肝疾患または先天性門脈体循環シャントの存在によるコレステロール産生低下、あるいは甲状腺機能亢進症、悪性腫瘍、脾腫や慢性炎症によるコレステロール異化亢進があげられる。本症例では経過と臨床所見から寄生虫感染、コクシジウム感染またはBVDV感染による腸炎も疑ったが、検査結果からは否定的であり、またその他の疾患についても臨床および病理学的検査から否定的であった。

牛コレステロール代謝異常症と類似のヒト疾患に家族性低βリポタンパク血症があるが、これは低LDLコレステロール血症を認める常染色体優性遺伝性疾患であり、その原因としてAPOB遺伝子変異が知られている。変異APOBにより短縮ApoBタンパク質が生成され、ホモ個体のみならずヘテロ個体も、低コレステロール血症を呈する^{9,10)}。今後、本症例と同様の症例が蓄積され

ば、牛コレステロール代謝異常症も、不完全優性となる可能性も考えられる⁸⁾。

現在、牛コレステロール代謝異常症のヘテロ個体はキャリアとして広く生産活動に供されており、その症状発現の個体差は大きいものと考えられる。ヘテロ個体の生産性について今後検討する必要がある。また、牛コレステロール代謝異常症は理論的には単一遺伝性疾患と考えられているが、コレステロール代謝に関わるAPOB以外の遺伝子が関与している可能性も検討する必要があると思われた。

4. 要 約

ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛における病態を解析し、コレステロールレベルと臨床症状発現の実態を明らかにするために、発育不良、虚弱等を主訴とした子牛61頭をホモ38頭、ヘテロ8頭、ワイルド21頭に分類し、その臨床病理学的所見を比較検討した。各群の血清総コレステロール濃度（TC）の中央値は、ホモ8.0mg/dl、ヘテロ36.0mg/dl、ワイルド群47.0mg/dlであり、ホモ群のTCは他の2群に比較して有意に低値であったが、ヘテロ群のTC値はワイルド群と比較すると低い傾向を示したもの有意差を認めなかった。いっぽう、ヘテロ群のうち1頭は、難治性下痢を呈した91日齢のホルスタイン種雌子牛で、TC濃度はホモ群と同程度の著しい低い値（11mg/dl）を呈した。本症例の臨床所見として、ホモと同様の全身筋萎縮、顔貌変化、下痢、小球性正色素性貧血および有棘赤血球がみられた。これらの所見からヘテロ個体でも牛コレステロール代謝異常症ホモ個体と同様の病態が発現する可能性が示唆された。本症の遺伝様式は‘劣性’ではなく、不完全優性である可能性も考えられた。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、貴重な症例をご紹介いただきました十勝NOSAI、NOSAIオホーツク、NOSAIひがしの臨床獣医師各位、および症例の病理検索を担当いただいた帯広畜産大学、古林与吉安教授、堀内雅之助教、渡邊謙一特任助教に深謝いたします。

文 献

- 1) Kipp, S., Segelke, D., Schierenbeck, S. : *Interbull*, **49**, 49~53, 2015.
- 2) Mock, T., Mehinagic, K., Menzi, F., Studer, E., Oevermann, A., Stoffel, M. H., Drogemuller, F., Meylan, M., Regenscheit, N. : *J Vet Intern Med*, **30**, 1369~1375, 2016.
- 3) 鶴田直子, 大脇茂雄, 萩野敦, 黒木一仁, 堀内雅之, 猪熊壽 : 家畜診療, **64**, 515~523, 2017.
- 4) Inokuma, H., Horiuchi, N., Watanabe, K., et al. : *Jpn J Vet Res*, **65**, 107~112, 2017.
- 5) Kipp, S., Segelke, D., Schierenbeck, S., Reinhardt, F., Reents, R., Wurmser, C., Pausch, H., Fries, R., Thaller, G., Tetens, J., Pott, J., Haas, D., Radatz, B. B., Hewicker-Trautwein, M., Proios, I., Schmicke, M., Grunberg, W. : *J Dairy Sci*, **99**, 8915~8931, 2016.
- 6) Schütz, E., Wehrhahn, C., Wanjek, M., Bortfeld, R., Wemheuer, W. E., Beck, J., Brenig, B. : *PLoS One*, **11**, e0154602, 2016.
- 7) Gross, J. J., Schwinn, A. C., Schmitz-Hsu, F., et al. : *J Anim Sci*, **94**, 1761~1766, 2016.
- 8) Menzi, F., Besuchet-Schmutz, N., Fragnière, M. : *Anim Genet*, **47**, 253~257, 2016.
- 9) 石神真人, 山下静也, 山村卓 : 低脂血症の病因, 診断, 臨床化学, **35**, 199~205, 2006.
- 10) Hooper, A. J., Robertson, K., Champain, D., Hua, J., Song, S., Parhofer, K. G., Barrett, P. H. R., van Bockxmeer, F. M., Burnett, J. R. : *Clinical Biochemistry*, **49**, 720~722, 2016.

飼養環境下の牛群における新規「カビ毒（マイコトキシン）防除法」の検証—飼料へのフラクトオリゴ糖添加が牛消化管バリア機能に与える臨床的評価

Monitoring natural feed contamination of mycotoxins in cattle herd and its prevention-clinical evaluation of protecting effects of intestinal epithelial integrity by supplemented fructo-oligosaccharides

高木光博・宇野誠一*

(山口大学共同獣医学部, *鹿児島大学水産学部)

Mitsuhiro Takagi and Seiichi Uno*

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Yamaguchi University, *Faculty of Fisheries, Kagoshima University)

The objective of the present study was to evaluate the potential protective effects of difructose anhydride III (DFA III) supplementation in cattle feed using this urinary ZEN monitoring system. DFA III belongs to the group of small cyclic disaccharides used as prebiotics. It is also known to affect calcium homeostasis. Female Japanese Black cattle from two fattening herds (Herd 1 : n = 10, Herd 2 : n = 20; age : 9–10 months; mass : ~300kg) were used in this study. DFA III (40 g/day; 20 g top-dressed mornings and evenings) was administered as a supplement to half of each herd for 2 weeks (Herd 1 : n = 5; Herd 2 : n = 10; DFA III group); the other cattle in each herd served as controls (Herd 1 : n = 5; Herd 2 : n = 10). Urine and blood samples were collected on the day before DFA III supplementation (Day 0), on Days 9 and 14 after supplementation, and again on Day 23 (9 days after supplementation ceased). Zen concentrations in urine and its metabolites, α -zearalenol (α -ZOL) and β -ZOL, were measured using LC/MS/MS. Additionally, serum Ca, inorganic phosphorus (iP) and Mg concentrations were measured, as DFA III is known to affect the paracellular transport of calcium and also likely affects other bivalent ions through the intestinal epithelial cells barrier. The concentrations of ZEN in the mixture of roughage and concentrates fed to the heifers was 0.27 mg/kg in Herd 1 and 0.22 mg/kg in Herd 2. These findings confirmed that the ZEN contamination levels of the dietary feeds were at approximately the same level in both herds and were below the threshold levels applied in Japan (< 1 mg/kg). The urinary ZEN concentrations on Day 0 also revealed that each herd had approximately the same level of ZEN contamination. When comparing the DFA III and control groups, significant differences ($p < 0.05$) in ZEN were confirmed on Day 14 (11.0 vs. 22.2 pg/mg of Creatinine), in α -ZOL on Day 23 (11.3 vs. 25.2 pg/mg of Crea), in β -ZOL on Day 14 (8.6 vs. 25.4 pg/mg of Crea) and Day 23 (12.7 vs. 34.3 pg/mg of Crea), and in the Σ ZEN (ZEN+ β -ZOL+ β -ZOL) on Day 9 (11.6 vs. 38.3 pg/mg of Crea) and Day 14 (31.0 vs. 63.9 pg/mg of Crea), respectively. Moreover, although no differences were observed in either serum Ca or Mg, the iP concentration in DFA III-supplemented animals was significantly higher than the control on Day 23 (8.4 vs. 7.7 mg/dL), suggesting a possible role of DFA III in tight-junction functions of intestine epithelial cells. These results suggest that the DFA III supplementation of dietary feed alters ZEN and ion adsorption levels in cattle. Our results indicate for the first time that DFA III supplementation may reduce the levels of mycotoxins that reach systemic circulation and are excreted in the urine. This preventive effect may be associated with an improved tight junction-dependent intestinal barrier function.

1. 目 的

申請者らはこれまでに、*Fusarium*属真菌由来マイコトキシン(MT)で、エストロ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、実際に腸管から吸収されたMTレベルが反映される尿中ZEN(代謝物を含む)濃度測定系を構築するとともに、本測定系はMT吸着剤添加効果の客観的評価法としてきわめて有用であることを初めて報告している^{1~3)}。飼料へのMT吸着剤添加は、生産現場において実践可能な唯一のMT防除法とされているが、我々の研究成果からその効果はMTの種類や汚染レベル、吸着剤の添加方法などにより大きく影響を受けることを明らかにしており、実際の添加効果はいまだ不明である。

最近、実験動物を用いたMT汚染飼料へのフラクトオリゴ糖(FOS)添加試験から、タイトジョンクション(TJ)の「消化管バリア」機能増強による腸管からのMT吸収阻害効果が報告された⁴⁾。一方、我々はすでに子牛に対するFOS(Difructose anhydride III)添加による消化管からの初乳中IgG吸収増強作用⁵⁾、および胃腸炎発症低減効果⁶⁾を報告している。したがって、我々の尿中MT濃度測定系を用いて飼料へのFOS添加によるMT吸収低減効果が確認されれば、MT対策がきわめて困難な生産現場での新規MT防除法としてただちに臨床応用可能であり、世界的にも重要な科学的発見となることが期待できる。以上のことから、本申請課題においては、実験動物において確認されたFOS添加による「TJの消化管バリア」機能増強作用の有無を牛群において初めて客観的に評価することを目的とする。

2. 方 法

2.1 黒毛和種牛群の概要とサンプリング法

黒毛和種肥育雌の2牛群(牛群1および2)を本実験に供した。両牛群ともに自家産粗飼料と購入濃厚飼料が給与されており、試験開始前にLC/MS/MS法による飼料中ZEN濃度分析を行った。2牛群から①無処置対照群15頭、②FOS添加群15頭の計30頭を使用した。FOS添加は朝夕の給餌時に飼料に添加し、添加試験期間はAkbariら(2015)⁴⁾のFOSに関する報告、および申請者らのこれまでのMT吸着剤添加試験結果を参照して2週間とし、添加試験開始時(Day 0)と添加開始9日目(Day 9)、14日目(Day 14)、および添加休止後9日目の23日目(Day 23)に陰部マッサージ法にて尿サンプリングを行った。

2.2 飼料中ZEN濃度測定

Fushimiら(2014)³⁾の報告に従い、LC/MS/MS法による公定法を用いて測定を行った。

2.3 尿中ZEN濃度測定

尿サンプルの調整は我々の既報¹⁾に従い、 β -Glucuronidase/arylsulfatase添加による前処理を行った尿サンプルを固相抽出後にLC/MS/MS測定に供した。結果はZENとその代謝物 α -および β -ゼアラレノール(α -ZOLおよび β -ZOL)濃度を測定した。

2.4 血清生化学検査

DFAⅢ添加による腸管TJ機能をモニターするために、我々の既報に従って血清生化学検査を行った(使用器機: Labospect 7180 autoanalyzer, Hitachi)⁷⁾。測定項目はカルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、無機リン(iP)の各項目の測定を行った。

2.5 各成績の取りまとめ

尿中ZEN、 α -ZOL、 β -ZOLおよびそれらの合計値(Σ ZEN)濃度、各血清生化学検査項目

濃度は平均±SDで算出した。各項目についてFOS添加群と対照群の2群間での比較検討を行った。

3. 結果と考察

本試験では2牛群の15頭ずつからデータを得た。両牛群の飼料中ZEN濃度はそれぞれ0.27mg/kg(牛群1), 0.22mg/kg(牛群2)とほぼ同値を示した。また、いずれのZEN濃度も日本で定められている基準値(<1mg/kg)を下回っていたことから、本実験を行った両牛群において日常的に給餌されている飼料のZEN浸潤はきわめて低いものであることが判明した。

2群間で比較を行った結果、尿中濃度はZEN, α -ZOL, β -ZOL, Σ ZENのいずれにおいても対照群がFOS添加群よりも有意に高くなり(p

<0.05)，それらは2群間の飼料中ZENの吸収量の差を反映するものと推測された。なお、ZENではDay 14, α -ZOLではDay 23, β -ZOLではDay 9, Day 14およびDay 23においてコントロール群がFOS添加群よりも有意に高い濃度となつた(Fig. 1)。

一方、血清生化学検査についてはCa, Mgにおける2群間の差は確認できなかった。しかしIPにおいては有意な差が認められ、Day 23においてFOS添加群が対象群よりも有意に高い濃度となつた(p <0.05)(Fig. 2)。これはDFA III添加が腸管表面のTJバリア機能に何らかの影響を与えた結果を反映するものであると思われた。

ZENは雌性動物に繁殖障害を引き起こす可能性があるMTである。家畜生産において繁殖サイクルが正常に営まれないことは経営状態を悪化さ

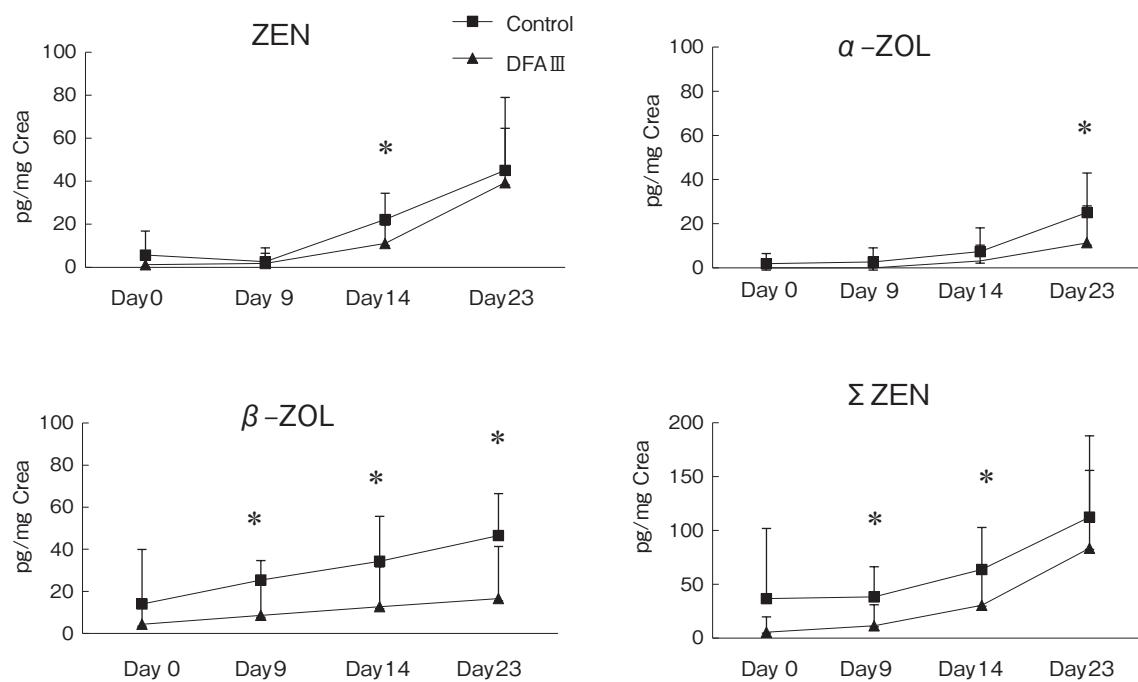


Fig. 1 Results for the analysis of urinary concentrations of ZEN, α -ZOL, β -ZOL, and total ZEN (Σ ZEN : ZEN+ α -ZOL+ β -ZOL) during the experimental period, with or without DFA III supplementation. * : Significant difference (p <0.05) between DFA III and control group.

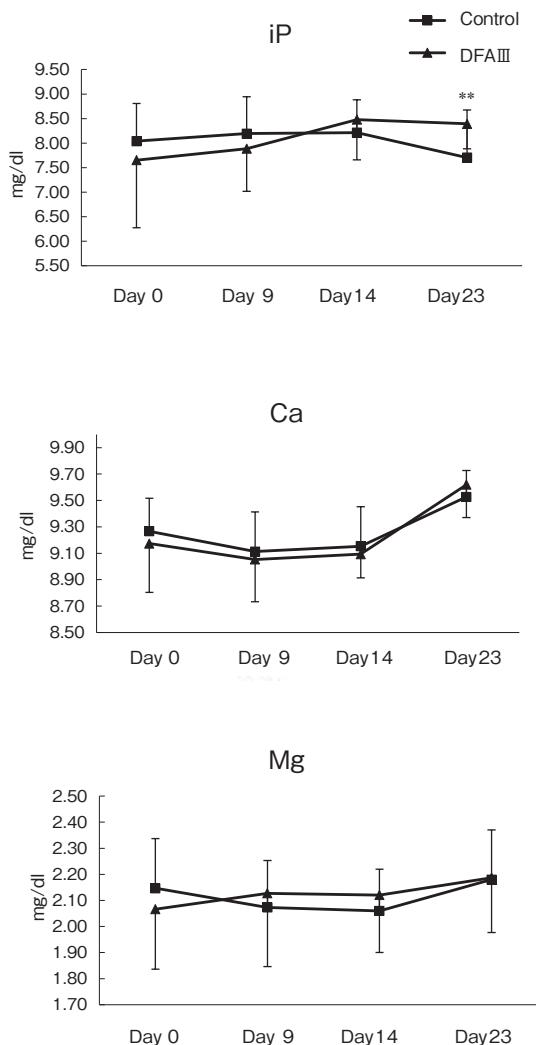


Fig. 2 Results for the concentration of serum Ca, Mg, and iP during the experimental period. **: Significant difference ($p < 0.05$) between DFA III and control group.

せる重要な要因となりうる。繁殖牛のエサである粗飼料は管理が不十分なためにMTに汚染されている場合が多く、そのような飼料を摂取しZENやそのほか複数のMTに暴露されることで飼養環境下にある牛群の繁殖性に多大なる影響が及ぶ危険性がある。そのため、MT吸着剤の添加が生産現場では以前より実施されているが、その効果検証については十分になされているとはいえない。

我々はこれまでに尿中ZENやその代謝物の濃度測定系を構築し、これにより牛群のMT浸潤状況やMT吸着剤の添加効果を客観的に評価することが可能であることを報告している。DFA IIIは消化酵素に対して難消化性のオリゴ糖であり、下部消化管に未消化の状態で到達して腸内微生物によって分解利用されることでこれら微生物の増殖や、微生物が分解することで生じる揮発性脂肪酸が腸内を酸性化することでミネラルのイオン化を促進し、結果ミネラルの吸収量を増加させる効果をもたらすことが報告されている。さらに、ラットの消化管や牛の十二指腸においてDFA IIIが腸管のTJに作用してCa吸収能が上昇されることも報告されている^{8~10)}。本研究結果から、飼料中ZEN濃度は低いものの、飼料へのDFA III添加により、尿中ZENおよびその代謝物濃度が低下すること、すなわち腸管からのZEN吸収が低下することが明らかとなった。腸管からのZEN吸収低下については、DFA III添加により腸管TJの消化管バリア機能が増強され、その結果として尿中ZEN濃度が低下した可能性、あるいは、DFA III添加により腸内有用微生物が増加し、良好な腸内細菌叢が維持されたことで腸管上皮細胞の細胞表面が安定したことによる腸管TJの消化管バリア機能の増強などが考えられる。今後は試験牛群数を増やして、その効果のさらに詳細な検証を行うとともに、DFA IIIの添加量や飼料への添加方法などあわせて検証して、臨床応用に向けたデータベースの拡充をはかる必要がある。

4. 要 約

黒毛和種肥育雌牛群におけるDFA III添加によるMT吸収阻害効果を検証することを目的とし、飼料へのDFA III添加後の尿中ZENやその代謝物濃度の測定を行い、あわせてイオン吸収能の変化を確認するために血清中イオン濃度の測定を行っ

た。比較はDFAⅢ添加群と対象群各15頭ずつの2群間で、DFAⅢの添加は2週間継続し、朝と夕方の2回とした。Day 0（実験開始日）、Day 9、Day 14およびDay 23にそれぞれ採尿と採血を行った。尿サンプルはLC/MS/MS法により尿中ZEN、 α -ZOLおよび β -ZOL濃度の測定を行い、血清サンプルはCa、Mg、iP濃度の測定を行った。その結果、DFAⅢ添加群において尿中ZEN、 α -ZOL、 β -ZOL濃度は対照群と比較して有意に低くなり、Day 23においてiP濃度が有意に高くなつた。本研究結果から、飼料へのDFAⅢ添加により、尿中ZENおよびその代謝物濃度が低下すること、すなわち腸管からのZEN吸収が低下することが明らかとなり、それはDFAⅢ添加により腸管タイトジョンクションの消化管バリア機能增强による腸管からのMT吸収阻害効果による可能性が示された。

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. : *J Anim Sci.*, **90**, 1610~1616, 2012.
- 3) Fushimi, Y., Takagi, M., Hasunuma, H., Uno, S., Kokushi, E., Watanabe, U., Liu, J., Marey, M., Miyamoto, A., Otoi, T., Deguchi, E., Fink-Gremmels, J. : *World Mycotoxin J.*, **7**, 367~378, 2014.
- 4) Akbari P., Braber, S., Alizadeh, A., Verheijden, K. A., Schoterman, M. H., Kraneveld, A. D., Garssen, J., Fink-Gremmels, J. : *J Nutr.*, **29**, 1604~1613, 2015.
- 5) Matsumoto, D., Takagi, M., Hasunuma, H., Fushimi, Y., Ohtani, M., Sato, T., Okamoto, K., Shahada, F., Tanaka, T., Deguchi, E. : *Asian Australasian J Anim Sci.*, **22**, 1640~1647, 2009.
- 6) Takagi, M., Hasunuma, H., Matsumoto, D., Obi, T., Takase, K., Ohtani, M., Sato, T., Watanabe, U., Okamoto, K., Tanaka, T., Tscherling, C., Deguchi E. : *Anim Nutri Feed Technol.*, **11**, 147~158, 2011.
- 7) Watanabe, U., Takagi, M., Yamato, O., Otoi, T., Tscherling, C., Okamoto, K. : *J Vet Med Sci.*, **75**, 481~487, 2013.
- 8) Suzuki, T., Hara, H., Kasai, T., Tomita, F. : *Biosci Biotechnol Biochem.*, **62**, 837~841, 1998.
- 9) Mineo, H., Hara, H., Shigematsu, N., Okuhara, Y., Tomita, F. : *J Nutrition*, **132**, 3394~3399, 2002.
- 10) Teramura, M., Wynn, S., Reshalaitihan, M., Kyuno, W., Sato T., Ohtani, M., Kawashima, C., Hanada, M. : *J Dairy Sci.*, **98**, 1~10, 2015.

乳酸菌を用いた多剤耐性菌の抑制と機能性家畜飼料への応用

Bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria using lactic acid bacteria and development of functional domestic animal fodder

木下 英樹・原口 梨花・山中 猛・服部 法文・神鷹 孝至・實田 正博・
本田 憲昭・森川 充実・金子 博・中野 佑志・浦部 一浩・石田 光晴*

(東海大学農学部, *宮城大学食産業学群)

Hideki Kinoshita, Rinka Haraguchi, Takeshi Yamanaka, Norifumi Hattori, Takashi Kotaka, Masahiro Saneda, Kensho Honda, Atsumi Morikawa, Hiroshi Kaneko, Yushi Nakano, Kazuhiro Urabe and Mitsuhiro Ishida*

(School of Agriculture, Tokai University, *School of Food, Agricultural and Environmental Sciences, Miyagi University)

The bactericidal effect of multi-drug resistance bacteria and meat quality improving effects by the administration of lactic acid bacteria to swine were tested in this study. Yogurt made from 10% skim milk by *Lactococcus lactis* MBR916 which is bacteriocin (Bac916) producer was administered for 27 days. The weight gains were 21.0 kg in the control group and 22.2 kg in the administration group, however, the feed demand rates were 3.47 and 3.64 during the administration period, respectively.

The total number of bacteria in the control group gradually increased whereas the number of bacteria were maintained during the administration period in the administration group. The colistin-resistant bacteria also increased in the control group on day 27, whereas the increase was remarkably suppressed in the administration group. It suggests the effect of lactic acid and the Bac916. In the microbiota analysis, the proportion of phylum *Firmicutes* decreased in the administration group compared to the control group, and the proportion of phylum *Bacteroidetes* increased. It suggested that *Firmicutes* which is gram positive bacteria were killed by the Bac916.

In the meat quality analysis of the rib-eye, there was no significant difference in fatty acid composition whereas bitter amino acids were lower in the administration group. In the analysis with a taste sensor, the acidity was lower in the administration group, however, it was thought that the difference can not be felt. In the palatability test, although the meat color was judged to be pale, terms of richness, flavor, and overall taste in the administration group were higher than the control group.

Thus, administration of yogurt containing the Bac916 bacteriocin made from *Lactococcus lactis* MBR 916 affects the porcine microbiota, and improves their meat quality.

1. 目的

現在、複数の抗菌薬が効かなくなつた多剤耐性菌が出現し、ヒトへの感染とその拡大が問題となつてゐる^{1, 2)}。抗菌薬の開発と耐性菌の出現はイタチごっこの様相を呈してゐるが、新しい抗菌薬が作られるとすぐに耐性菌が出現するため、新薬の開発は遅れを取つてゐる。そこで我々は、乳酸菌のバクテリオシンにより多剤耐性菌が殺菌できなかつたと考え、900菌株以上の乳酸菌からバクテリオシン産生株をスクリーニングし、バクテリオシンによる多剤耐性菌の殺菌が可能であることを明らかにした³⁾。特に*Lactococcus lactis* MBR916（以下、MBR916株）のバクテリオシン（以下、Bac916）は多くの多剤耐性菌に有効で、耐熱性に優れ、中性領域でも抗菌活性を示し、アクチナーゼEに対して高い耐性を有することが明らかになり、非常に有用なバクテリオシンであることが示された³⁾。また、予備検討では糞便にBac916を混ぜた場合、耐性菌数の減少が見られた。しかしながら、実際に豚に投与した場合どのようになるのかを検証する必要があつた。

多剤耐性菌の対策は急務であるもののそれを普及させるには経済的なメリットがないとなかなか難しいと考えられる。乳酸菌には肉質改善効果が報告されており⁴⁾、同様の効果が見られれば普及に繋がっていくと考えた。そこで、本研究ではMBR916株を豚に投与し、豚糞便中の多剤耐性菌の殺菌効果と肉質への影響について検討した。

2. 方 法

2.1 使用菌株と培養条件

豚への投与試験では、MBR916株³⁾を用いた。抗菌活性試験の指標菌には、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* JCM1002^T（以下、JCM1002株）を用いた。-80°Cで保存されていた菌株をMRS

broth（Difco Laboratories, Detroit, MI, USA）に植菌し24時間培養した。その後、2%摂取で同培地、同条件にて2度継代培養した。MBR916株は30°Cで、JCM1002株は37°Cで培養した。

2.2 豚への投与飼料の検討

オートクレーブ殺菌したMRS broth、10%スキムミルク、豆乳、10%米糠水を乳酸菌用の培地として用いた。MRS brothで継代培養したMBR916株を2%摂取で各培地に接種し、30°Cで18時間培養した。培養後、0.22μmフィルターに通し濾液を得た。本濾液を抗菌活性試験に供しバクテリオシン産生性を試験した。

2.3 抗菌活性試験

抗菌活性値の測定は、ペニシリンカップ法⁵⁾により行った。JCM1002株を混合した寒天平板上にペニシリンカップを静置し、2ⁿ倍ずつ希釀した濾液100μlを添加し、37°Cで一晩培養後、生育阻止円の有無を測定した。阻止円が形成される最大希釀倍率を上清100μl当たりの抗菌活性値（A.U./100μl）とした。

2.4 豚への投与試験

東海大学農学部付属農場において、バーカシャー種4頭を対照区2頭、投与区2頭に分けて肥育した。肥育後期に対照区は混合飼料（くみあい配合飼料くまもとC-EX、ジェイエイ北九州くみあい飼料、福岡）を2.7kg/日、乳酸菌投与区は混合飼料に加え、乳酸菌を用いた2%ペプトン添加スキムミルク培地で培養したヨーグルトを0.3kg/日投与し、と殺まで27日間肥育した。ヨーグルト投与前（0日目）、投与16日目および27日目の糞便を回収し、薬剤耐性菌の測定と菌叢解析に用いた。また、体重を測定し飼料要求率を算出した。さらに、と殺後のロース芯の肉質の測定と食味試験を行つた。なお、本試験は東海大学動物実験委員会で承認を得た後、適切な動物実験倫理規定等に則つて実施した。

2.5 豚糞便における菌数測定

凍結保存していた豚の糞便サンプル 1 g を 9 mL の滅菌ペプトン水に懸濁し、 10^{-1} サンプルとした。段階希釈により 10^{-10} サンプルまで希釈し、希釈液 1 ml をシャーレに添加し、GAM 寒天培地（日本水産株式会社、東京）を流し込みよく攪拌して固めた。37°Cで48時間嫌気培養し生菌数を求めた。また、硫酸コリスチン（8 µg/ml）添加培地でも同様に試験した。

2.6 豚糞便の菌叢解析

上記菌数変化測定サンプルの投与前（0日目）、投与16日目、27日目の対照区および試験区のサンプルをそれぞれ 1 g 採取し、ただちに -80°C にて凍結した。凍結したサンプルを Novogene Corporation (Beijing, China) に依頼し、次世代シーケンサーによる 16S rDNA の V 3-V 4 領域の配列解析により菌叢解析を行った。

2.7 肉質の測定

肉質はロース芯（第 4～5 胸椎）を用い全脂質含量測定（解凍 1 日目）、脂肪酸分析（解凍 1 日目）、肉色測定（解凍 1 日目と 5 日目）、ドリップロス（解凍 5 日目）、クッキングロス（解凍 1 日目のサンプルを 80°C で 30 分間加熱）、テクスチャーテスト（解凍 5 日目）、遊離アミノ酸分析（解凍 5 日目）にて評価した。

2.8 味覚認識装置による分析

解凍 5 日目にロース芯 10 g を精秤し、15% エタノール溶液を 50 ml 加え、ホモジナイザーで 2 分間均質化した。これを 3,000 rpm、15 分間遠心分離し、メスフラスコへ濾過した。残渣に 75% エタノール溶液を 30 ml 加え、同様に遠心分離して濾過し、15% エタノールで 100 ml に定容し試料溶液とした。本溶液を味認識装置（インテリジェントセンサー テクノロジー社、神奈川）にて分析した。

2.9 食味試験

嗜好型パネルとして学生 6 名をパネラーとし

た。解凍 5 日目のロース芯を 3 mm にスライスし、3 cm × 3 cm に成形した。80°C のお湯で 1 分間加熱し、対照区の豚肉を基準として比較し評価した。評価には食べる前に判断する項目として香り、肉色、食べてから判断する項目としてやわらかさ（食べ始め）、やわらかさ（数回噛んだ後）、ジューシー感（多汁性）、肉の甘味、肉様の味（コク）、風味（香りを含む味の総評）の程度、風味（香りを含む味の総合）の好ましさ、脂っぽさ、総合的なおいしさの 11 項目について評価した。試験結果は 5 点法により点数化し、その平均値を求めた。

3. 結果と考察

各種培地でのバクテリオシン产生について試験したところ、MRS broth および 10% スキムミルク培地では 16A.U./100 µl と抗菌活性が見られたことからバクテリオシンが产生されていることが示唆された。一方、豆乳および糠培地では菌は生育しているものの抗菌活性は見られなかった。そこで本試験では 10% スキムミルク培地でヨーグルトを作製し豚に投与することとした。なお、発酵性を高めるために 2% ペプトンをスキムミルクに混ぜてから発酵させた。

ヨーグルトは混合飼料の上に添加する形で投与したが、嗜好性は非常に高いと考えられた。水分を多く含むためか、通常飼料だけと比較して食べ終わる時間も短かった。また、投与期間中、下痢や体調不調などの症状は観察されず安全性も特に問題ないと考えられた。増体重は対照区で 21.0 kg、投与区で 22.2 kg で投与区の方が多かったが (Fig. 1)，投与期間中の飼料要求率は 3.47 および 3.64 と投与区の方が高くなかった。これは投与したヨーグルト量 (300 g/day) のためであると考えられるが、日本飼養標準の肥育期 (70～115 kg) の飼料要求率は 3.61 であり、またスキム

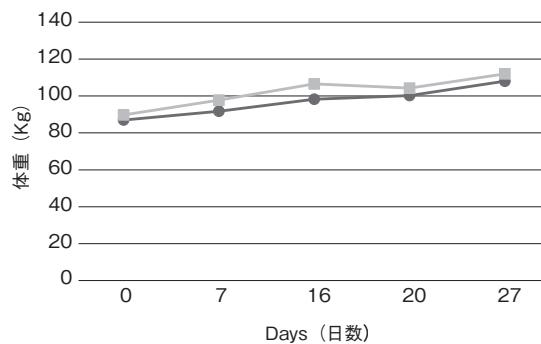
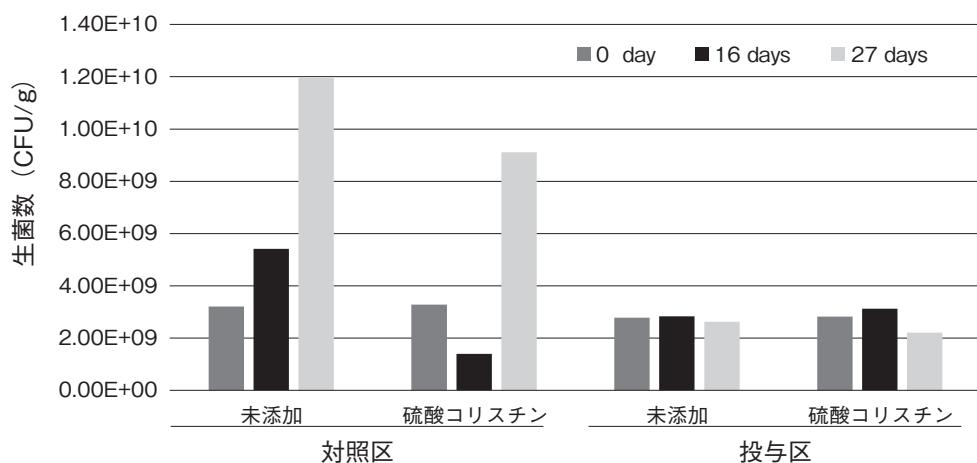


Fig. 1 Changing body weight during the administration period.

● : control group, ■ : administration group

Fig. 2 Changing bacterial counts in the porcine feces during the administration period. Data shows bacterial counts (CFU) per one gram on GAM agar contain 8 μ g/ml colistin sulfate or not.

ミルクは単価もそれほど高くないため、特に問題となる値ではないと考えられた。

糞便中の総生菌数とコリスチン耐性菌数を測定した結果をFig. 2に示した。対照区の総菌数は時間経過とともに増加したが、投与区では投与期間中同じ菌数で推移した。また、コリスチン耐性菌も対照区の16日目以外は同様の結果であった。特に投与27日目の対照区では総菌数の増加とともにコリスチン耐性菌も増加していた。一方で、ヨーグルト投与区ではその増加が顕著に抑えられていたことから、乳酸やBac916バクテリオシンの効

果であると考えられた。

Fig. 3には菌叢解析の結果を示した。対照区、投与区ともに*Firmicutes*門の割合が半数以上を占めており、次いで*Bacteroidetes*門の割合が多かった。この2門で全体の9割以上を占めていた。対照区と比較して投与区は*Firmicutes*門が割合が減って、*Bacteroidetes*門の割合が増えていた。投与したヨーグルト中に含まれているバクテリオシンは類縁菌に作用する性質があるため、グラム陽性菌である*Firmicutes*門の細菌が減った可能性が考えられた。また、*Firmicutes*門の減少に伴い

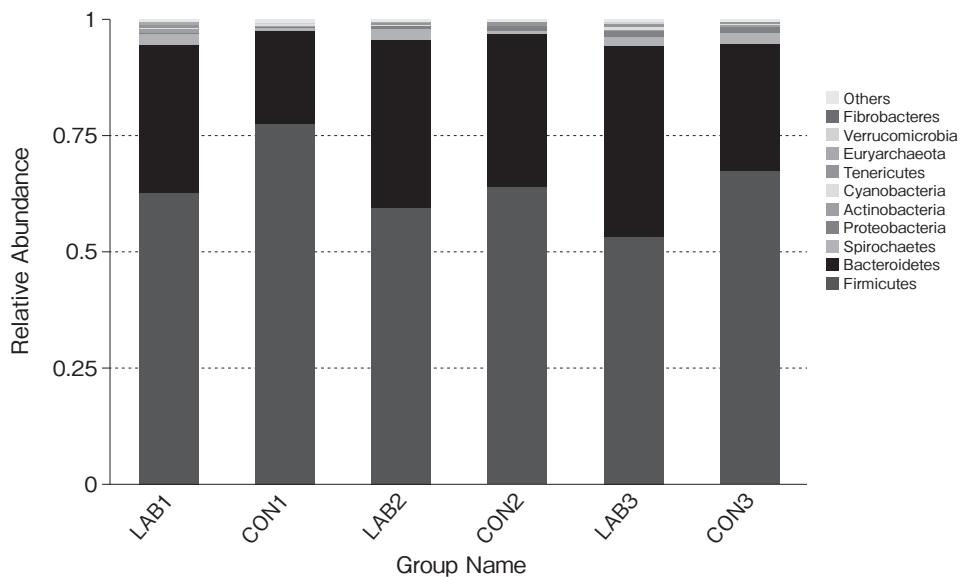


Fig. 3 Species relative abundance in phylum. The top ten species in the different taxonomic ranks were selected to form the distribution histogram of relative abundance. “Others” represents a total relative abundance of the rest phylum besides the top 10 phylum. LAB means the administration group, and CON means the control group. The numbers (1, 2 and 3) after the letters (LAB and CON) indicate 0, 16 and 27 days, respectively.

*Bacteroidetes*門の細菌が増えたと考えられた。糞便における*Bacteroidetes*門の主要な属は*Bacteroides*属である。*Bacteroides*属は稀に日和見感染を引き起こすが、腸内細菌叢を構成する優勢菌の1つであり、健康な場合では特に問題ない細菌である。また、*Bacteroides*属は小腸バイエル板細胞に対するIgA産生誘導能が*Lactobacillus*属乳酸菌よりも強いとする報告もあり⁶⁾、腸管免疫において重要な働きをしている可能性が指摘されている。このことから、本ヨーグルト投与は、免疫賦活化効果も期待できる可能性が考えられるが、こちらについてはさらなる検証が必要である。また、*Bacteroides*属はコリスチン耐性を持つことが知られている。本試験では、GAM寒天培地に生育した糞便中のほとんどの菌がコリスチン耐性を示したが(Fig. 2)，グラム陽性菌である*Firmicutes*門と*Bacteroides*属が優勢菌種であるためそのような結果となった可能性が示唆され

た。今後は、大腸菌等の病原性に関連する菌のコリスチン耐性を試験する必要がある。

ロース芯の肉質分析では、全脂質含量は対照区2.43%，投与区2.54%となり投与区がやや高かったが、ロース芯の脂肪酸組成および筋肉間脂肪、皮下脂肪内層、皮下脂肪外層の脂肪酸組成に大きな差はなかった。遊離アミノ酸は、投与区の方がやや低かった(Fig. 4)。保水性とテクスチャ試験では差がなかったが、肉色は1日目の赤色と黄色が投与区で低かった。味認識装置による分析では、苦味雑味、渋味刺激、旨味、塩味、苦味、渋味、旨味コクではほとんど差がなかったものの酸味については対照区が3.85、投与区が2.98となり、投与区の方が酸味が低いという結果となった(Fig. 5a)。しかしながら、本装置では1未満の差ではヒトが違いを感じることが難しいとされているため、いずれの味覚認識においてもヒトが違いを感じるほどの差ではないと考えられた。食味試

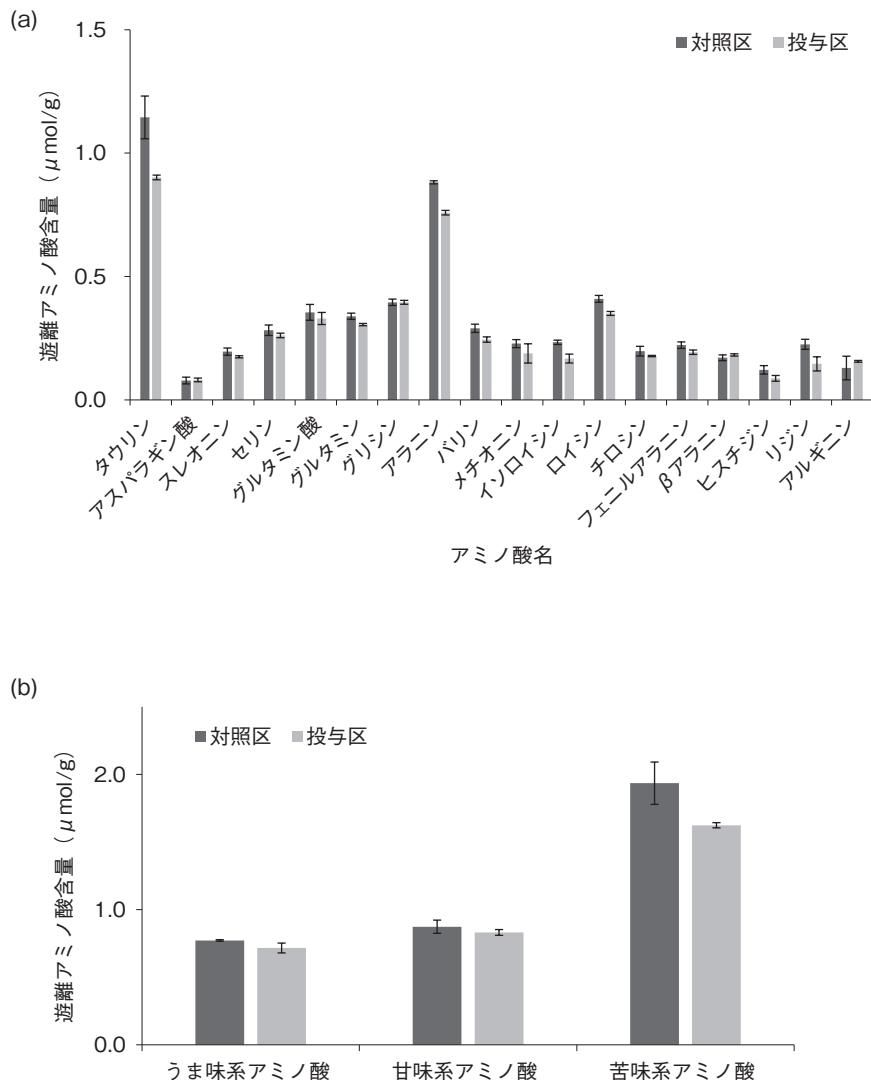


Fig. 4 Free amino acid contents of the rib-eye of the pork. Individual (a) and systematic (b) data of free amino acids were shown.

験では、肉色が淡いと判断され、肉様の味（コク）、風味（香りを含む味の総合）の程度、風味（香りを含む味の総合）の好ましさ、総合的なおいしさの項目で投与区が高く評価された (Fig. 5b)。これらの結果から乳酸菌投与豚は消費者に好まれる豚肉の生産ができる可能性が示唆された。腸内細菌叢が肉質に及ぼす影響は今後さらには解明が必要だろう。

4. 要 約

本試験では豚への乳酸菌投与による多剤耐性菌の殺菌効果と食肉改善効果を試験した。投与サンプルは抗菌活性が見られた10%スキムミルク培地で作製したヨーグルトを用いることとした。増体量は対照区で21.0kg、投与区で22.2kgと投与区の方が多かったが、投与期間中の飼料要求率は3.47および3.64と投与区の方が高くなつた。対照区の

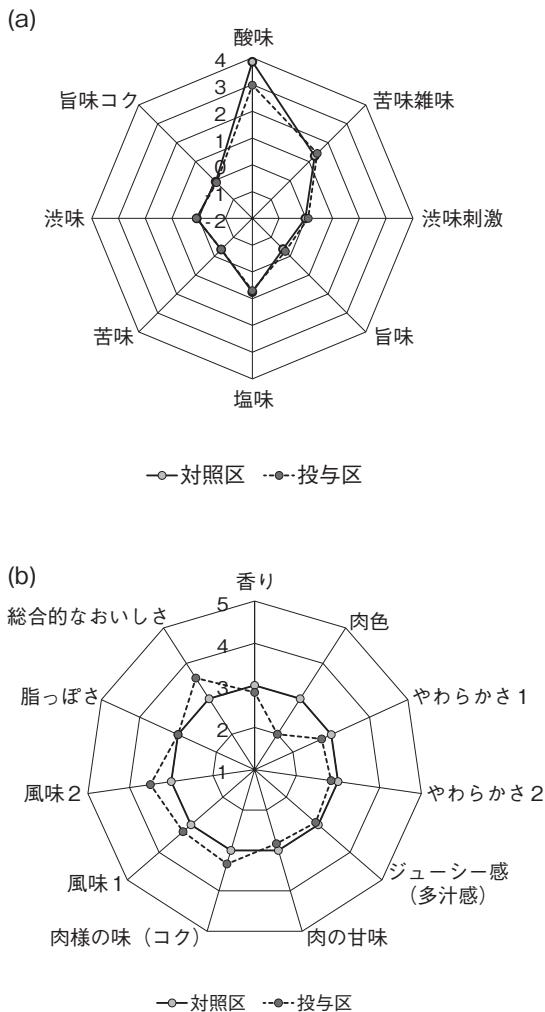


Fig. 5 Comparison of the pork taste between the control and administration groups.

(a) Analysis using a taste sensor, (b) Palatability test by six panelists.

総菌数は時間経過とともに増加したが、投与区では投与期間中同じ菌数で推移した。また、特に投与27日目の対照区では総菌数の増加とともにコリスチン耐性菌も増加していた。一方で、投与区ではその増加が顕著に抑えられていたことから、乳

酸やBac916バクテリオシンの効果であると考えられた。菌叢解析では、対照区と比較して投与区は**Firmicutes**門の割合が減って、**Bacteroidetes**門の割合が増えていた。これはバクテリオシンによりグラム陽性菌である**Firmicutes**門の細菌が殺菌されたためである可能性が考えられた。

ロース芯の肉質分析では脂肪酸組成に大きな差はなかった。苦味系アミノ酸が投与区においてやや低い結果となった。味覚認識装置での分析では、酸味が投与区の方が低かったが、いずれの味覚認識においてもヒトが違いを感じるほどの差ではないと考えられた。しかしながら、食味試験では、肉色が淡いと判断されたものの、コク、風味、総合的なおいしさの項目で投与区が高く評価された。これらのことからBac916を含むMBR916株で作製したヨーグルトの投与は、菌叢に影響を与える、肉質改善効果が期待できる。

文 献

- 1) Tsuji, A., Kobayashi, I., Oguri, T., Inoue, M., Yabuuchi, E., Goto, S. : *J Infect Chemother*, 11, 64 ~70, 2005.
- 2) Hirakata, Y., Yamaguchi, T., Nakano, M., Izumikawa, K., Mine, M., Aoki, S., Kondoh, A., Matsuda, J., Hirayama, M., Yanagihara, K., Miyazaki, Y., Tomono, K., Yamada, Y., Kamihira, S., Kohno, S. : *Clin Infect Dis*, 37, 26~32, 2003.
- 3) 石川潤一, 木下英樹, 萩田俊一, 須田義人, 石田光晴 : *Milk Sci*, 65, 179~190, 2016.
- 4) Suda, Y., Villena, J., Takahashi, Y., Hosoya, S., Tomosada, Y., Tsukida, K., Shimazu, T., Aso, H., Tohno, M., Ishida, M., Makino, S., Ikegami, S., Kitazawa, H. : *BMC Immunol*, 15, 24, 2014.
- 5) Cholden, L. S. : *J. Bacteriol*, 47, 402 ~ 403, 1944.
- 6) 細野朗 : バクテロイデスと免疫, 腸内細菌学雑誌, 27, 203~209, 2013.

平成29年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉に関する研究または調査（製造加工、食品的価値、家畜生産、飼料、疾病、食肉・食肉製品の流通など）

単位：千円

研 究 課 題	継続年数	代 表 研 究 者		助成金額
		代表者名	所属機関	
I 食肉の品質、加工分野				
薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌効果とメカニズム解析	H.27～	作道 章一	琉球大学医学部	1,000
地鶏肉の美味しさの決定要因の解明		本田 和久	神戸大学大学院農学研究科	1,000
市販食肉より分離されたリストeriaのストレス応答に関する研究		落合 由嗣	日本獣医学生命科学大	1,000
食品加工機器の信頼性と安全性向上のための基礎的研究		小茂鳥 潤	慶應義塾大學理工學部機械工學	1,000
食肉の高品位熟成に寄与する可食性蓄熱マイクロカプセルの開発		小林 敬	京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻	1,000
乳業用乳酸菌カルチャーを接種した発酵乾燥食肉製品の加工技術と特徴に関する研究（Ⅲ）		根岸 晴夫	中部大学応用生物学部	1,000
オリーブ葉抽出液が食肉タンパク質の加熱ゲル物性および嗜好性に及ぼす影響		小川 雅廣	香川大学農学部	1,000
食肉加工品のコク味増強を可能とするグルタチオンアナログの発酵生産法の開発		伊藤 智和	名古屋大学大学院生命農学研究科	1,100
タンパク質工学によるトランスクルタミナーゼの基質認識機構の改変（Ⅱ）		滝田 複亮	京都大学大学院農学研究科	1,200
ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割		西村 敏英	女子栄養大学栄養学部	1,000
ドライエイジング牛肉に特徴的な香気成分に関する研究	H.28～	河原 聰	宮崎大学農学部	1,000
黒毛和種牛肉の筋内遊離脂肪酸とおいしさ、および味認識装置による呈味性評価（Ⅱ）		山之上 稔	神戸大学大学院農学研究科	1,000

II 食肉の食品的価値				
食肉の熟成に伴う味の改善に対するヒポキサンチンの影響（II）	H.28～	吉田 由香 松石 昌典 中村 幸信	食肉科学技術研究所 日本獣医生命科学大学応用生命科学部 食肉科学技術研究所	1,100 1,000 1,000
霜降り豚肉の香味に寄与する因子に関する研究				
加熱肉に生じる赤色に対するカルノシンの影響				
牛心臓由来新規脂質代謝改善ジペプチドを活用した革新的コレステロール代謝改善素材開発のための基礎研究	H.26～	長岡 利 若松 純一 後藤 孔郎	岐阜大学応用生物科学部 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター 大分大学医学部	1,000 1,000 1,100
食肉タンパク質の抗肥満および脂質代謝促進効果に関する研究				
肥満に伴うサルコペニア発症予防に対するカルノシン摂取の有用性				
III 遺伝育種分野				
野生動物肉の食料資源としての利用に関する研究：生理活性機能の検討		坂田 亮一	麻布大学獣医学部	1,000
機能性畜産副生成物を用いた糖尿病合併高血圧症の改善を目指した開発研究		吉川 豊	神戸女子大学健康福祉学部	1,000
食肉を中心とする食品由来核酸の腸管保護機能の解析		河合 慶親	徳島大学大学院医歯薬学研究部	1,100
低温乳酸発酵ならびに超高温加熱処理を施した筋原線維タンパク質モデル系におけるタンパク質分解と機能性発現に関する研究		林 利哉	名城大学農学部	900
牛経済形質に関わる新規DNA多型の探索		松本 大和	東海大学農学部応用動物科学科	1,000
IV 繁殖分野				
リキッドバイオプシーによる非侵襲的牛体外受精胚の遺伝子スクリーニング		杉村 智史	東京農工大学大学院グローバルイノベーション研究院	900
肉用鶏の筋芽細胞を用いた食肉の特性評価に資する遺伝子の探索		高谷 智英	信州大学農学部	900
県集団における和牛肉の美味しさに関わる遺伝子マークの効果検証	H.28～	笛崎 晋史	神戸大学大学院農学研究科	1,000
地鶏の行動的ストレス反応性に関与する遺伝的多型の探索		青谷 大希	秋田県畜産試験場	1,500
黒毛和種肥育牛の肥育状態を生体評価する血中バイオマーカーの開発		松橋 珠子	近畿大学先端技術総合研究所	1,300
選抜した黒毛和牛精子の受精能評価		飯田 弘	九州大学大学院農学研究院	1,000
牛における卵管上皮細胞を用いた新規精子受精能獲得能評価法の開発および性選別精子の受精能獲得能機能評価		柳川洋二郎	北海道大学大学院獣医学	1,000
長期不受胎牛の受胎率向上に向けた单為発生胚移植の効果		白砂 孔明	東京農業大学農学部家畜学科	1,000

抗酸化物質添加による牛凍結精液の品質向上効果の解明		武田久美子	農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門	1,000
肥育前雌牛における卵子の能力不足を解消する培養技術の開発		平尾 雄二	農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門	1,000
近赤外光照射による牛凍結胚の品質改善効果に関する研究		横尾 正樹	秋田県立大学生物資源科学部	1,000
胚ゲノム活性化および胚盤胞形成時期における新規代謝プロセスに基づく牛体外受精胚の体外培養法の改善		山田 雅保	京都大学農学研究科	900
「豚の一腹産子数を一頭増やす」子宮の免疫調節を担う精漿タンパクの特定		奥山みなみ	大分大学医学部医	1,000

V 動物衛生分野

牛精液および受精卵の未凍結保存に向けた過冷却促進物質の配合デザイン	H.28~	星野 由美	広島大学大学院生物圈科学研究所	900
アディポカインおよびインシュリン抵抗性が繁殖牛の妊娠性に及ぼす影響（II）		小林 仁	宮城大学食産業学群	1,000
乳牛の卵胞囊腫における副腎由来ホルモンの関与と卵胞囊腫共存卵胞由来の卵母細胞の正常性		清水 隆	帯広畜産大学生命・食料科学研究所	1,000
子宮内膜炎罹患牛における特異的脂質メディエーターの同定と新規高感度診断法の開発		大澤 健司	宮崎大学農学部獣医学科	1,000
新規DNAメチル化網羅探索法を用いた牛の精液性状の評価法開発		山崎 淳平	北海道大学大学院獣医学研究院	1,000
牛肉の生産性向上に資する安全なマダニ・マダニ媒介感染症防除法の開発		八田 岳士	北里大学医学部	1,000
牛胸腺器官培養法の確立		脇谷 晶一	宮崎大学農学部	1,000
卵巣の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明と診断法の確立		山下 泰尚	県立広島大学生命環境学部	1,000
鶏における高病原性鳥インフルエンザウイルス耐性機構の解明：感染細胞における初期応答の品種間比較	H.28~	松鶴 彩	鹿児島大学共同獣医学部	1,000
鶏における家畜関連黄色ブドウ球菌の病原遺伝子および病態形成の解析		小野 久弥	北里大学獣医学部	1,000
鶏肉フードチェーンにおけるカンピロバクターと共に存する細菌の網羅的な挙動解析		黒木 香澄	東京大学大学院農学生命科学研究所	1,000
野生動物が保菌する腸管出血性大腸菌の特徴解析とリスク評価		井口 純	宮崎大学農学部	900
農場で発生する腸炎にカラス由来のウエルシュ菌はどうに関与しているか？—MLST法による遺伝学的解析での検討—		上塙 浩司	茨城大学農学部	1,000
肺エコーとプロカルシトニン値を用いた牛の非定型肺炎と細菌性肺炎の簡易迅速鑑別診断システム		鈴木 一由	酪農学園大学獣医学群	1,000
鼻咽腔におけるPRRSおよび豚インフルエンザウイルス感染症の病態解析		平井 卓哉	宮崎大学農学部	900
感染性A型インフルエンザウイルスの迅速検出系の確立		小澤 真	鹿児島大学共同獣医学部	1,000

肉用牛生産におけるアシドーシス予防をめざしたルーメン内乳酸代謝性細菌群の特定		福間 直希	帯広畜産大学	500
VI 家畜飼養、飼料分野				
食肉家畜における原虫感染症の血清診断法の開発と血清疫学的研究		西川 義文 前田 健 市居 修 杉浦 勝明 磯部 直樹 佐藤 繁 高田 良三 米倉 真一 芳賀 聰 守谷 直子 小野 晴美 松崎 正敏 佐藤 勝祥 神戸 大朋 石垣 元氣 山口昇一郎 鈴木 裕 庄司 則章 猪熊 壽 高木 光博	帯広畜産大学 原虫病研究センター 山口大学共同獣医学部 北海道大学大学院獣医学研究院 東京大学大学院農学生命科学研究所 広島大学大学院生物圈科学研究所 岩手大学農学部 新潟大学農学部 信州大学農学部 農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門 福岡県農林業業総合試験場 弘前大学農学生命科学部 秋田県立大学生物資源科学部 京都大学大学院生命科学研究所 宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター 福岡県農林業業総合試験場 北海道大学大学院農学研究院 山形県立農林大学校 帯広畜産大学畜产学部 山口大学共同獣医学部	1,000 1,000 1,000 900 1,000 1,300 900 700 1,100 1,200 1,000 1,200 1,400 1,200 1,000 1,000 1,400 1,000 800 700
心臓あるいは横隔膜を用いたオーエスキーウイルス抗体検査法の確立	H.28~			
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索—より効果的なワクチン接種部位を求めて—				
畜産分野における抗菌剤使用量削減に有効な手段の探索に関する研究（II）—動物用抗菌剤使用量と農場バイオセキュリティ水準および適正飼養因子との関連—				
初乳に含まれる抗菌因子の機能を利用した子牛の下痢症予防				
周産期乳牛における潜在性第一胃アシドーシスの発症予知と制御				
離乳子豚への飼料用米給与が飼養成績およびタンパク質（アミノ酸）代謝に及ぼす影響				
黒毛和種仔牛の免疫能を高める機能性飼料の探索				
産褥牛に起きた急性肝ストレス亢進と肝ビタミンE体内動態関連遺伝子発現抑制に対する <i>Rhizopus oryzae</i> 水抽出物給与の予防効果に関する研究				
<i>Lactococcus</i> 属乳酸菌を用いて調製した発酵乳給与が離乳子豚の飼料摂取量および増体成績を改善する要因の解明	H.28~			
ビタミンA強化代用乳が黒毛和種子牛の哺育・育成期における生育へ及ぼす影響				
子牛の強健性と発育能力を高める初期栄養強化プログラムの開発				
骨格筋の成長と筋線維型決定におけるストレス応答ホルモンの影響	H.28~			
亜鉛トランスポーターに着目した亜鉛栄養改善飼料の開発				
西南暖地におけるイネ科牧草リビングマルチ体系による飼料用ダイズ生産技術の開発（II）	H.28~			
乳牛における高糖分イネWCS（ホールクロップサイレージ）多給による高繁殖型飼養管理システムの確立				
ルーメンアシドーシス防除を目指した新規ルーメン幹細胞培養モデルの開発				
哺乳子牛の下痢を低減する発酵代用乳の開発				
ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症ヘテロ保因牛における病態解析				
飼養環境下の牛群における新規「カビ毒（マイコトキシン）防除法」の検証—飼料へのフラクトオリゴ糖添加が牛消化管バリア機能に与える臨床的評価				

乳酸菌を用いた多剤耐性菌の抑制と機能性家畜飼料への応用	H.26~	木下 英樹	東海大学農学部	1,000
合 計 74件				75,000

伊藤記念財団賞

須 田 義 人

宮城大学食産業学部ファームビジネス学科 教授

〔業績の課題名〕

黒毛和種ゲノム DNA メチル化多型と肉質形質との関係に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

黒毛和種の脂肪交雑などの遺伝率は約 60% と高く、効果の大きい遺伝子の存在が期待されるが、関連遺伝子数が膨大で絞り込みは困難を極めている。さらに、その他の経済形質に関する塩基配列多型情報の寄与も数 % であり、より効果的な育種改良のためには環境効果を考慮した方法を検討する必要がある。遺伝子発現を制御する領域の DNA メチル化は、環境に応じて変化し遺伝子発現量を制御する。須田氏はこれまで親子の 2 種雄牛の産子由来ゲノム DNA を供し、ヒトのメチル化促進領域である 34 領域を選択してメチル化度（メチル化割合）を調査した。そして枝肉成績との相関解析を行った結果、親子の種雄牛産子のメチル化割合は類似傾向にあること、特に CHFR (checkpoint with forkhead and ring finger domain) や ASS1 (Argininosuccinatesynthase) 遺伝子の上流 CpG 領域におけるメチル化割合と BMS や格付けとは有意な相関を認め、A 3 ランク以下は A 5 に比べ有意にメチル化割合の高いことを明らかにした。DNA メチル化は飼養状況に起因する可能性があり、生産段階での仕上がりをモニターするバイオメーカーとして利用できる可能性を示唆する成果をあげている。

須田氏は、前述に加えて以下の様な研究成果をあげている。

1. 牛の生理遺伝的指標の探索

牛の代謝成分や生理活性物質の血中動態に関する遺伝性を推定し、経済形質との相関性が高いことを明らかにし、血液成分の遺伝的改良マーカーとしての有用性を提示した。

2. モデル動物を用いた蓄積体脂肪における脂肪酸組成の遺伝的評価

モデル動物を供し、肉の脂質性状に影響するとされる脂肪酸組成に関する遺伝性を評価し、脂質化学的な遺伝的改良の可能性を報告した。これは国内で最も早く報告された先駆的な成果といえる。

3. 反芻家畜の妊娠着床機構に関する研究（早期妊娠診断法の開発と免疫寛容物質の探索）

哺乳類の妊娠着床に伴う子宮内膜における特異的な妊娠関連因子の同定を共同で行い報告した。現在は受胎率向上を目指し免疫寛容因子を探索している。また、反芻動物の早期妊娠診断法として血中アミノ酸濃度変化をモニターし、多変量解析法で判別する方法を考案した。

4. 豚の腸管フローラ制御による免疫能賦活化に関する研究

豚の慢性疾患を予防し生産性を高める目的で、機能性乳酸菌を探索・開発し、産肉性や免疫能への効果と腸内フローラとの関係性を検討した結果、腸管免疫能を賦活化して抗病性を高め、肉質と共に産肉性を高めることを報告した。これらは、国際的に使用禁止されている抗菌剤の代替物開発に貢献する。

上記の研究成果は、牛や豚の健康を保ち、良肉質の生産効率を高めることに貢献することが期待される。

河 原 聰

宮崎大学農学部応用生物科学科 教授

〔業績の課題名〕

食肉脂質の食品栄養学的再評価に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉や食肉製品の食味性は、共存する脂肪の量に依存して向上する。一方で、飽和脂肪酸に富む動物性脂肪の過剰摂取は肥満や脂質異常症の原因となるため、摂取量を抑制することが推奨されている。食肉の食味性と健康上のリスクとのバランスに関する知見を得ることは、食生活の質を高める上で重要である。そこで河原氏は牛肉脂肪（牛脂）の健康リスクについての再評価ならびに動物性脂肪の含量と食味性についての評価を行った。

同氏は、牛脂および植物油を12～22%添加した飼料を28日間ラットに摂食させた。22%牛脂を摂食したラットの血清脂肪濃度は、同レベルの植物油を摂取したラットより有意に高くなるが、牛脂の飼料添加量が12%の場合、血清脂質濃度は植物油と同程度の値であることを認めた。また、牛脂を摂取したラットの肝臓脂質濃度および多価不飽和脂肪酸の組成は植物油摂取ラットのそれより低くなり、牛脂摂取ラット肝臓の脂肪酸化度は植物油摂取ラットのそれよりも低くなることを明らかにした。

一方、牛脂を添加した食肉製品（牛肉パテ）の食味性について検討し、牛脂添加量が10%から20%のときに最も食味性を呈し、その食味性は植物油を同レベル添加したものより優れていること、そして最も食味性を高める脂肪酸成分はパルミチン酸であることを明らかにした。また、ソーセージの場合には、牛脂や豚脂を10%添加したものの食味性が最も高いことを示し、食肉製品については10%から15%程度の脂肪量で十分に食味性を引き出せると結論した。

また同氏は、反芻動物に由来する肉や乳に含有される機能性脂肪酸に関する研究を行った。抗発がん作用を持つことで注目されている共役リノール酸（CLA）に着目し、牛脂は効率の良いCLA補給源であり、食餌から吸収されたCLAは中性脂質画分に優先的に蓄積されること、CLAの摂取により筋肉組織中の不飽和脂肪酸含量が低下し、組織の脂質酸化が抑制されることなどを明らかにした。さらに、糖尿病の予防効果に対する期待から近年注目されているフィタン酸が免疫系に及ぼす影響を検討し、ヒト血中に見出される濃度域においてフィタン酸が免疫系細胞の活性を抑制する可能性を見出した。

学会等事業助成

日本食肉研究会の平成29年度事業助成実施報告

日本食肉研究会会長 根岸晴夫（中部大学応用生物学部）

1. はじめに

標記の事業の項目として、（公財）伊藤記念財団から今回助成を受けたのは（1）海外派遣事業の補助（国際食肉科学会議派遣）、（2）国内における研究会でのセミナーの補助の2項目である。

（1）の助成は昨年8月に実施され、今年3月に行った（2）の項目まで、実施内容の概要を順次報告するが、この助成を受けた団体である「日本食肉研究会」の概要について以下に報告する。

2. 日本食肉研究会等の概要

本会は昭和34年（1959年）4月に発足し、食肉に関する分野について広く学界、業界、団体関係者がお互いの研鑽の場として、学術と産業の発展を目指し、活動を行ってきた。

本会では毎年、研究会大会（学術講演会）の開催、ならびに会誌として「食肉の科学」を発行している（平成3年に「肉の科学」を改称）。研究会は通常、日本畜産学会大会の開催に合わせて春に実施され、食肉および食肉加工に関連する分野のエキスパートによる特別講演、ならびに会員による研究発表を行い、活発な意見交換がなされている。「食肉の科学」の主な内容として、総説、解説、海外事情、最近の文献紹介、研究会の発表要旨などが満載されている。

設立40周年の1999年に横浜で第45回国際食肉科学技術会議（International Congress of Meat Science and Technology、通称ICoMST）を開催し、会員相互一体となって運営を行った経緯がある。この国際会議は毎夏に欧州と他の国々で交互に開催されている。その各国代表者会議での話し合いで、2022年（第68回）にわが国で再び開催する運びとなり、このICoMSTの成功に向けて国内受入組織である本研究会の果たす役割は大きい。

なお本年2月時点で、正会員170名（うち学生会員4名）、特別会員30社、名誉会員9名、賛助会員7社である。

3. 今回の助成結果

（1）海外派遣事業の補助

国際食肉科学技術会議派遣助成として、第63回国際会議に本会から会員2名が参加した。このICoMST（International Congress of Meat Science and Technologyの略称）は毎年8月中旬に開催され、本会からは、会長、副会長あるいは常任幹事の中から1名を派遣し、代表者会議に出席し、会議報告を研究会機関誌の「食肉の科学」に掲載し内容を会員に周知することが研究会の中で義務づけられている。今年は8月13日（日）～18日（金）にコーク（アイルランド）で開催され（写真1）、本助成により、松石昌典会員（日本獣医生命科学大学応用生命科学部）と坂田亮一会員（麻布大学獣医学部）が参加した。

コークはアイルランドの南部に位置し、首都ダブリンについて2番目に大きな都市である。会議全体はよく組織され、登録時に配布されたプログラム（写真1）も内容が充実していた。日本からは、上記

2名以外に農研機構畜産研究部門から、渡邊源哉氏が参加した。この会議の詳細は、食肉の科学（2017年2号）にその3名で報告した¹⁾ので、参照されたい。今回開催地が日本からは遠かったせいか、日本の参加者が例年より少なかったが、デスクを会場に設置し、2022年日本開催のPRに3名が務めた（写真2）。

前回の本事業助成報告²⁾にも記載したが、2022年の第68回ICoMST開催準備のための情報収集、ならびに情宣活動を行うために、本研究会では準備委員会を立ち上げ、開催地を神戸国際会議場に決定している。今回の伊藤記念財団からの派遣助成により参加者は積極的に海外の研究者との学術交流を行い、日本での会議参加のアピールを大いに実施できた。

今年のICoMSTはオーストラリアのメルボルンで8月12日～17日に開催された。わが国ではお盆の時期であるが4年後のわが国での開催を見据え、日本から多くの参加者があった。

（2）国内における研究会でのセミナーの補助

「国際的な食肉研究のトップランナーを海外から招聘し、討論重視型の食肉ワークショップを開催するために、昨年度から外国人研究者を日本食肉研究会大会に招き、財団から助成を受けこの事業を行っている。第1回目は、昨年3月30日に神戸大学国際文化学部で開催された第58回日本食肉研究会大会の中で特別講演としてドイツからProf. Schwägele (Max-Rubner Institute, Kulmbach副所長) を招き、食肉中の微量残留物質の基準と分析法の話題を中心にセミナーを実施した²⁾。

この講演で、欧州の中心としてドイツが発信する研究情報の影響力と指導力を、日本の研究者にも知らせる機会となった。

今回は、日本畜産学会第124回大会に引き続き、東京大学農学部 本郷キャンパスで第59回日本食肉研究会大会にて、トルコ共和国からDr. Abdulatef Ahhmed (Yildiz Technical University准教授) を招き、「Accreditation of Halal meat products and the diversity of their protein properties」の演題で、ハラルと畜の科学的検証について、また食肉としての機能性について特別講演が行われた。続いて、韓国のDr. Seon-Tea Joo (Gyeongsang National University教授) により、「Health implication of consuming highly marbled Hanwoo beef」の演題で、韓牛の肉質について講演があり、その脂肪酸組成から機能性に富む肉であることが示され

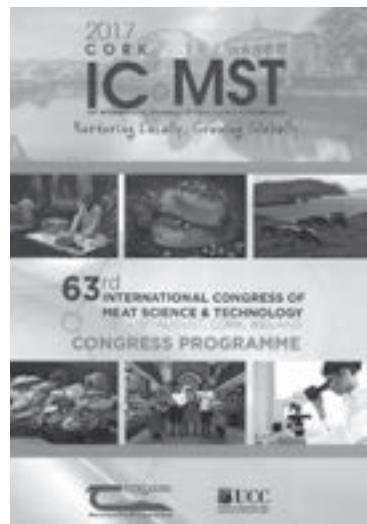


写真1 今年の会議のプログラム、会議登録デスクで配布。



写真2 上：日本開催PRポスター、下：会場の一角に設置した日本コーナーのデスク。



写真3 質問に回答するDr. Ahhmed。



写真4 韓牛の肉質について、熱弁をふるうJoo教授。

た。会場からも和牛との比較についてなど、活発な討論が行われた。

4. おわりに

伊藤記念財団からの学会・研究会など学術集団への活動助成は今年で2回目となり、私ども招く側も前回の経験で順調に招聘を実施することができた。

日本食肉研究会大会の席上、英語の講演であったが、通訳を入れる必要はなく、演者と参加者でのコミュニケーションは十分図られたと判断する。この招聘の人選は今回も国際食肉科学技術会議で各国からの研究者が集うことを利用した。その前年にアイルランドでの会議で特別講演を行い、その講演内容とパフォーマンスで場内を沸かせたDr. Jooと交渉し、快諾を得た。本人は2010年のICoMST韓国開催時の組織委員会キーパーソンでもあり、2022年の日本開催のためのアドバイスを聞くことができた。また、Dr. Ahhmedも2013年トルコで開催されたICoMSTのScientific committeeのメンバーで、招待講演者の選出などの担当経験があり、日本での留学経験があることから（鹿児島・宮崎大学連合大学院で学位取得）、日本語も流暢で、今後より多くの情報の提供が期待できる。

参考資料

- 1) 松石昌典・渡邊源哉・坂田亮一：海外事情「第63回国際食肉科学技術会議に出席して」食肉の科学、VOL.58, No.2, 178~178, 2017.
- 2) 根岸晴夫：日本食肉研究会への平成28年度事業助成実施報告、平成28年度食肉に関する助成研究調査成果報告書、VOL.35, 438~439, 2017.

「食肉の安全性に関する公開シンポジウム」

—食肉に由来する感染症とその予防—に関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会 代表理事 久和 茂（東京大学）

[日時] 平成29年9月15日（金）9：00-12：00

[場所] 国立大学法人鹿児島大学 農・獣医共通棟101講義室

本シンポジウムは、食肉に関連する食中毒や人の食肉由来感染症についての理解を深めるために、第160回日本獣医学会学術集会の期間中に下記のような内容で開催した。一般市民が自由に参加できるように参加費無料の公開シンポジウムとして開催し、100名以上が参加した。以下、本シンポジウムのプログラムと各講演の概要を報告する。

[プログラム]

座長：関崎 勉（東京大学・食の安全研究センター）

1. 「サルモネラ食中毒の現状と対策」：岡村雅史（北里大学獣医学部人獣共通感染症学研究室）
2. 「カンピロバクター食中毒とその制御」：三澤尚明（宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター）
3. 「腸管出血性大腸菌感染症」：楠本正博（農研機構動物衛生研究部門）
4. 「わが国における食肉由来寄生虫症」：丸山治彦（宮崎大学医学部寄生虫学分野）
5. 「野生動物におけるE型肝炎ウイルス感染」：荻原克郎（酪農学園大学獣医学群）

[講演内容]

1. 「サルモネラ食中毒の現状と対策」

サルモネラ食中毒に対する問題意識は薄れつつあるようにみえるが、2011年に3人がサルモネラ食中毒により死亡しており、軽視できる状況にはない。さらに、欧州諸国を中心に、ブロイラーにおけるサルモネラに関するリスク評価が実施され、サルモネラ食中毒は生産、処理・加工、および消費を含むフードチェーン全体に存在することが示された。消費段階では、調理時の二次汚染のみならず、食肉の新鮮度と微生物学的清浄度の混同、無防備な生食の拡大も問題と考えられ、消費者への教育と啓発が不可欠である。

2. 「カンピロバクター食中毒とその制御」

カンピロバクターによる食中毒事例の疫学調査から、感染源として、特に注意が必要な食品は鶏肉とその関連調理食品である。効果的なと体の殺菌方法はいまだ確立されていないのが現状で、カンピロバクターを含む食鳥肉由来の病原微生物の汚染を防止するためには、すべてのフードチェーンの過程においてHACCP方式に基づいた衛生管理によるリスク低減に努める必要がある。

3. 「腸管出血性大腸菌感染症」

腸管出血性大腸菌（EHEC）による感染症は、血様下痢と激しい腹痛を主症状とする出血性大腸炎を引き起こすが、きわめて少ない菌量で感染が成立し、溶血性尿毒症症候群（HUS）や脳症等の生死に関わる重篤な合併症を数%の頻度で引き起こすことがある。腸管出血性大腸菌（EHEC）は主に食中毒

として飲食物を介して感染し、その感染源は食肉、野菜、果物、生牛乳、飲料水等、多岐にわたる。特に本菌を保有する健康な牛を起点とする食品汚染が社会において深刻な問題となり、腸管出血性大腸菌感染症の流行を防止するためには、より効果的な様々な防疫体制が重要である。

4. 「わが国における食肉由来寄生虫症」

食肉の摂取によって感染する寄生虫疾患のうち、国内で毎年一定数以上の患者が発生している疾患には、肺吸虫症と動物由来の回虫類による幼虫移行症がある。肺吸虫は国内では古くから猪の肉からの感染がよく知られているが、日本鹿の筋肉からも肺吸虫の生きた幼虫が検出されている。鹿肉関連の肺吸虫症例は岐阜県と大分県等、比較的狭い地域に集中していたことから、凍結せずに消費する「地産地消」が感染のリスクを高めていると考えられている。一方、回虫症は各種の回虫に感染した犬、猫、あるいは豚から排出された虫卵を直接口にするか、あるいはこれらの寄生虫に感染した動物の筋肉を加熱不十分なまま摂取することで発生する。患者は中高年男性が多く、牛肉または牛の肝臓の生食歴が目立ち、さらに最近では海外で牛肉や肝臓を食して感染したと考えられる症例が発生しており、啓発活動の重要性を浮き彫りにする事例となってきている。

5. 「野生動物におけるE型肝炎ウイルス感染」

鹿や猪等の野生動物の肉を食材にする「ジビエ」を提供するレストランが増えてきている。過去、狩猟者人口の減少と野生動物の保護政策が効果的に進められた背景もあり、鹿や猪等の個体数が全国的に増加し、農作物被害の増加が問題となってきている。それに対応して、狩猟による農作物被害の抑制を目的とし、地域振興と野生鳥獣を廃棄せずに流通させる活動が活発になってきた。ジビエには人に感染する寄生虫や細菌のみならず、E型肝炎を発症するウイルスが存在し、狩猟者や調理者が食肉として利用するための安全な処理・調理方法が必要になってきている。

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29年度 (Vol. 36)

2018年11月 発行

編集・発行—— 公益財団法人伊藤記念財団

THE ITO FOUNDATION

東京都目黒区三田 1 丁目 6 番21号 アルト伊藤ビル

〒 153-8587

Alt Ito Building, 1-6-21 Mita, Meguro-ku, TOKYO

153-8587 JAPAN

TEL : 03 (5720) 8611

FAX : 03 (5720) 8612

印刷・製本—— 株式会社友楽社

<非売品・無断禁転載>