

平成30年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 37

公益財団法人

伊藤記念財団

「伊藤記念財団」設立趣意書

私、伊藤傳三は、昭和3年食肉加工業を創業して以来五十有余年の永きにわたり食肉加工品の製造販売に従事して参ったところであります。

この間、昭和47年からは日本ハム・ソーセージ工業協同組合理事長、社団法人日本食肉加工協会理事長、加えて、ハンバーグ・ハンバーガー協会理事長等の重責を担わせていただく等、業界団体の役員を勤めさせていただいてきたところであります。

こうした中で昭和55年、はからずも勲二等瑞宝章受章という身にあまる榮譽に浴したのでありますが、受章に際し私自身の過ぎ来し方を振り返り、食肉及び食肉加工業界の行く末に思いを致し、2つの事柄を決意致しました。

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

諸情勢が激しく変わりつつある中で食肉加工業界をさらに大きく発展させるには、新しいリーダーの登場が望ましいことは論をまちません。また、食肉加工品については、これまでも日本独自の技術開発は行われてきましたものの、いずれも企業内技術であると言っても過言でなく、大学等における基礎的研究の不足が将来の日本の食肉加工業の発展を遅らせるおそれがあり、この現状を打破する必要があると考えたところであります。

以上のような基本的考えの下に私は、食肉関係団体等の役員を辞すると共に、食肉及び食肉加工に関する基礎的かつ広汎な研究を行い、あるいは助長するための財団の設立を発起するものであります。

昭和56年6月

設立発起人 伊 藤 傳 三

Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

Approximately half of a century has passed since I established a meat packing corporation for commercial products in 1928. While involved in this business, I have had occasion to serve as chairman of the boards of trustees of several organizations related to the meat industry, such as the Ham-Sausage Industrial Association of Japan in 1972, the Meat Packing Industrial Association of Japan, and the Hamburg-Hamburger Association of Japan.

In 1980, unexpectedly, I was highly honored to receive the Order of the Sacred Treasure, Gold and Silver Star from the emperor in acknowledgement of my contributions to the meat industry and improved human nutrition during my career. This illustrious award provided a strong impetus for me to act on my long-standing concern for the future of meat packing industries.

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

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

Denzo Ito, Founder
June 1981

事業のあらまし

(目 的)

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

(事 業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

- (1) 食肉の生産、処理、加工等に関する基礎的研究及び調査
- (2) 食肉の生産、処理、加工等に関する研究又は調査を行う大学等の研究機関に対する助成
- (3) 食肉の生産、処理、加工等に関する研究又は調査に優れた業績が認められる研究者の表彰
- (4) 食肉の生産、処理、加工等に関する情報の普及及び広報

(事業実績)

年度	研究調査助成		
	第1回	48件	60,000千円
昭和57年度	2	52	54,400
58	3	60	49,800
59	4	62	48,000
60	5	70	53,000
61	6	79	58,900
62	7	95	70,500
63	8	86	74,250
平成元年度	9	79	60,000
2	10	70	50,000
3	11	86	60,000
4	12	81	60,000
5	13	81	60,000
6	14	82	65,000
7	15	81	69,100
8	16	78	59,000
9	17	82	60,000
10	18	67	47,000
11	19	57	41,000
12	20	53	37,000
13	21	58	40,000
14	22	55	41,000
15	23	55	48,000
16	24	56	48,000
17	25	11	10,000
18	26	12	10,000
19	27	15	16,900
20	28	11	10,000
21	29	11	10,400
22	30	12	12,000
23	31	13	13,000
24	32	38	37,000
25	33	58	54,800
26	34	69	66,000
27	35	71	69,000
28	36	74	75,000
29	37	84	101,200
30			

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37回（平成30年度）助成事業における84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4回となります伊藤記念財団賞授賞事業の受賞者とその業績概要と学会等事業助成の概要をとりまとめたものでありますが、以上の目的にしたがって、食肉産業の基礎的研究等に携わる諸氏の研究の一助ともなれば幸甚でございます。

令和元年11月

理事長 伊 藤 功 一

Dear Sir :

I am very pleased to send you and your organization a complimentary copy of the research reports of the Ito Foundation. This research foundation was founded by the late Mr.Denzo Ito to advance research in meat science. The research reports are published annually. Unfortunately, the articles are largely in Japanese ; however, in the future we hope to contribute to the international development of meat science. Any constructive suggestions or critiques from others involved in meat-related research would be accepted gratefully.

You will find out philosophy behind the establishment of the Ito Foundation described by Mr.Denzo Ito, in the research report of the Ito Foundation, Vol.37 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. 2019
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



研究助成事業

目 次

ミートエクストラクトのコク味と γ -グルタミルペプチドの関係について 鈴木 秀之・高倉 有喜子・荒井 進太郎 (京都工芸繊維大学応用生物学系)	3
地鶏肉の美味しさの決定要因の解明 (Ⅱ) 本 田 和 久 (神戸大学大学院農学研究科)	10
鹿児島黒豚における血中酸化ストレスと肉質との関連検討 川 口 博 明 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科衛生学・健康増進医学分野)	15
タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの活性増強と基質認識機構の改変 (Ⅲ) 滝 田 禎 亮 (京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)	24
豚特有のチアミン三リン酸蓄積機構の解明 室 谷 進・大江 美香 (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)	32
和牛肉のおいしさを「見える化」する 山 田 知 哉 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)	38
ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果とそのメカニズムの解明 西 村 敏 英 (女子栄養大学栄養学部)	45
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 (Ⅲ) 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)	54
豚肉の筋線維タイプ組成と肉質の関連性に関する研究 水野谷 航*・澤野 祥子**・中村 真子・辰巳 隆一 (九州大学大学院農学研究院, *現所属: 麻布大学獣医学部, **現所属: 麻布大学生命・環境科学部)	64
軽度認知症改善効果を示した豚肝臓分解物の活性本体の同定とメカニズム解明 塚原 完・羽二生 久夫*・松田 佳和** (長崎大学医歯薬学総合研究科薬学系, *信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所, **日本薬科大学薬学部臨床教育部門)	70
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 (Ⅱ) 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)	75

牛心臓由来新規コレステロール代謝改善ジペプチドの作用機構解明および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)	80
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 (Ⅱ)	林 利哉・長澤 麻央・小川 幸彦*・芳賀 聖一 (名城大学農学部, *名城大学農学部附属農場)	84
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 (Ⅱ)	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)	89
食肉摂取による, 不飽和脂肪酸等の生活習慣病予防効果について (佐久コホートに於ける疫学研究)	山田 晃一 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所)	94
食肉を中心とする食品由来核酸の腸管保護機能の解析 (Ⅱ)	河合 慶親 (徳島大学大学院医歯薬学研究部)	101
豚赤血球由来グロビタンパク分解物を用いた高血圧症の改善を目指した研究	糸井 亜弥・宮 菜美華・吉川 豊 (神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科)	107
ファージおよび食品成分等による食肉の安全確保に関する研究	宮本 敬久 (九州大学大学院農学研究科)	112
薬剤耐性菌のガスプラスマ殺菌機構解明に向けた分子論的アプローチ	作道 章一 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)	118
電気定数測定に基づく食肉の鮮度評価	齊藤 一幸 (千葉大学フロンティア医工学センター)	123
可視・近赤外分光イメージングと深層学習を併用した食肉加工品のスマート品質管理	牧野 義雄・チャオフイ フォン (東京大学大学院農学生命科学研究科)	129
牛経済形質に関わる新規 DNA 多型の探索 (Ⅱ)	松本 大和 (東海大学農学部応用動物科学科)	135
抗菌性ペプチドを指標とした豚抗病性育種法の開発	上本 吉伸 (東北大学大学院農学研究科)	141
肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索	後藤 達彦 ¹ ・國重 享子 ² ・西村 健志 ¹ ・佐藤 駿 ² (¹ 帯広畜産大学, ² 北海道立総合研究機構)	146
牛の暑熱ストレス耐性を担う HSP70.1 遺伝子多型に関する研究	森 美幸 (福岡県農林業総合試験場生産環境部)	150

DNA メチル化網羅解析法による種雄牛の受胎性の評価

..... 山崎 淳平・永野 昌志（北海道大学大学院獣医学研究院） 157

霜降り豚肉の生成に関わる生体内因子の探索

..... 谷口 雅章¹・中島 郁世¹・荒川 愛作¹・吉岡 豪²・鈴木 香澄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岐阜県畜産研究所） 163

組織分化制御因子の遺伝子発現プロファイルに基づく豚体外受精胚の新規培養技術の開発

..... 澤井 健・三浦 瑠璃（岩手大学農学部） 165

体外胚生産技術を活用した純粋種豚（トウキョウX）の生産性向上に関する研究

..... 岡田 幸之助¹・鈴木 亜由美²

（¹日本獣医生命科学大学応用生命科学部動物科学科，

²公益財団法人 東京都農林水産振興財団 東京都農林総合研究センター畜産技術科） 171

発情発見困難牛の特徴解明による授精率向上方策の検討

..... 坂口 実・菊池 元宏・三浦 弘（北里大学獣医学部） 176

牛におけるクロモグラニンAの分泌動態および繁殖障害への関与の解明と子宮内膜における生理機能の解析

..... 高 橋 透（岩手大学農学部） 181

牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基盤的研究

..... 木崎 景一郎・高橋 透（岩手大学農学部共同獣医学科） 187

牛における新規腔内薬剤投与技術の確立

..... 田中 知己・遠藤 なつ美（東京農工大学農学研究科） 194

牛体内成熟卵を用いた移植用胚生産システムの高度化に関する研究

..... 山 中 賢 一（佐賀大学農学部） 198

黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査

..... 星野 洋一郎（京都大学大学院農学研究科附属牧場） 204

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（Ⅱ）

..... 武田 久美子・西野 景知*・佐藤 伸哉**・今井 昭**

（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，

*茨城県畜産研究センター肉用牛研究所，**広島県立総合技術研究所畜産技術センター） 212

牛の卵巣・子宮機能調節に及ぼす不飽和脂肪酸の影響とその利用

..... 作 本 亮 介

（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門家畜種繁殖研究領域） 220

肝機能と栄養状態解析を用いた牛子宮内膜炎の新たな予後判定評価法の開発

..... 大 滝 忠 利（日本大学生物資源科学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室） 226

牛の肝機能障害が炎症性子宮疾患の重篤化に及ぼす分子メカニズムの解明

..... 真 方 文 絵（東京大学大学院農学生命科学研究科） 232

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（Ⅱ）	柳川 洋二郎・菅野 智裕*	238
(北海道大学大学院獣医学院, *社団法人ジェネティクス北海道)		
豚における繁殖性の向上に向けたアミノ酸の効果に関する研究	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)	243
繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響	林 武司・深水 大・上田 修二・稲田 淳	250
(福岡県農林業総合試験場畜産部)		
卵巣の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明（Ⅱ）—肝臓の鉄放出能低下と繁殖障害の関係—	山 下 泰 尚 (県立広島大学生命環境学部)	255
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（Ⅱ）	佐藤 繁・木崎 景一郎 (岩手大学農学部共同獣医学科)	263
食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の開発・評価	石原 加奈子・野村 静香 (東京農工大学農学部)	269
筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の検出法	高 島 康 弘 (岐阜大学応用生物科学部)	275
牛趾乳頭腫症の性状解明を目指したメタゲノム解析と疫学研究	後 藤 恭 宏 (九州大学大学院医学研究院)	279
簡便・迅速なマダニによって媒介される牛のアナプラズマ症とバベシア症の診断法開発	田仲 哲也 ¹ ・Galay Remil Ringgatong ¹ ・山崎 渉 ²	286
(¹ 鹿児島大学共同獣医学部, ² 宮崎大学農学部)		
消化管寄生性コクシジウム, <i>Eimeria kriegsmanni</i> における発育休止期の解析	松 尾 智 英 (鹿児島大学共同獣医学部寄生虫病学分野)	289
鶏に対する高効率・低負荷な新規サルモネラ粘膜ワクチンの開発	谷 浩 行	295
(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻獣医内科学研究グループ)		
牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの実施状況調査	森 本 素 子 (宮城大学食産業学群)	302
ゲノム疫学的手法による豚抗酸菌症のリスク評価と実態解明	大屋 賢司・小松 徹也*	307
(岐阜大学応用生物科学部 現：国立医薬品食品衛生研究所, *愛知県中央家畜保健衛生所)		
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（Ⅱ）	小 野 久 弥 (北里大学獣医学部)	313

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 (Ⅱ)	猪 熊 壽 (帯広畜産大学畜産学部)	320
エゾシカ由来腸管出血性大腸菌の食品衛生リスクに関する研究	福本 晋也 ¹ ・山崎 栄樹 ² (¹ 帯広畜産大学原虫病研究センター, ² 帯広畜産大学動物・食品検査診断センター)	324
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索 (Ⅱ) —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)	329
豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明	岡 林 環 樹 (宮崎大学農学部獣医学科)	334
アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する疫学研究	杉浦 勝明・芳賀 猛 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	339
豚増殖性腸炎による可食部位の廃棄防止に向けた適正な抗生物質使用方法の検討	岡 田 彩 加 (岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)	345
南九州における PRRS ウイルス変異株の地理的分布および病理学的解析	平 井 卓 哉 (宮崎大学農学部)	350
北海道の肉用牛における牛ウイルス性下痢症の疫学調査	磯田 典和 ¹ ・迫田 義博 ² (¹ 北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター, ² 北海道大学大学院獣医学研究院)	356
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 (Ⅱ)	黒木 香澄・吾郷 良輔・竹下 奈知子・ 仁田 義弘・門屋 亨介*・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: 椋山女学園大学生活科学部管理栄養学科)	362
野鳥が媒介する家畜のボツリヌス症の分子疫学的解析	阪 口 義 彦 (北里大学医学部微生物学)	371
豚流行性下痢ウイルス感染による致死性を決定する遺伝子の同定	大橋 誠一・神谷 亘* (国立研究開発法人農業・食品産業技術研究機構動物衛生研究部門, *大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター臨床感染症学研究グループ)	376
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索	青山 真人 ¹ ・燕山 由己人 ² (¹ 宇都宮大学農学部生物資源科学科, ² 宇都宮大学農学部応用生命化学科)	380
地方病性牛白血病の簡易鑑別診断法の開発と若齢発症牛の実態調査への応用	岡 川 朋 弘 (北海道大学大学院獣医学研究院)	387

ワイン搾汁残渣タンニンを利用したラム肉パストラルフレーバー低減技術の確立	上 田 宏一郎（北海道大学大学院農学研究院）	394
骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索	米 倉 真 一（信州大学農学部）	400
家畜生産における抗生物質使用量の低減化を目指した「ミサイル」抗菌剤の創出	榎 本 賢（東北大学大学院農学研究科）	405
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（Ⅱ）	高田 良三・田坂 祐介・立原 可南子（新潟大学農学部）	412
カリウムおよびセシウムの含量が低い国産実用牧草品種の選抜と育種に向けた植物生理学的解析	小林 奈通子・二瓶 直登（東京大学大学院農学生命科学研究科）	419
妊娠末期の乳用牛へのバイパスリジン給与がその産子の栄養代謝へ及ぼす影響	川島 千帆・山岸 則夫（帯広畜産大学畜産学部）	424
乳牛の周産期における肝臓由来の新規タンパク質の発現と分泌動態	盧 尚 建（東北大学大学院農学研究科）	431
養鶏における個体管理と清掃ロボット導入による IoT 型食肉生産技術の開発	堀口 健一 ¹ ・片平 光彦 ¹ ・市浦 茂 ² ・高垣 徹 ³ （ ¹ 山形大学農学部, ² 岩手大学大学院連合農学研究科, ³ ティーエーシー）	435
成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索	鈴 木 貴 弘（北海道大学大学院農学研究院）	441
飼料用イネの繊維消化性を左右する要因の解明と生産現場との技術的連携	近 藤 誠（三重大学大学院生物資源学研究科）	449
黒毛和種肥育牛の安定的ルーメン発酵に貢献する重要細菌群の特性把握	小 池 聡（北海道大学大学院農学研究院）	455
乳用子牛への機能性飼料の給与による亜急性第一胃アシドーシスの制御と発育向上	櫛 引 史 郎 （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）	461
豚の未熟産子（ひね豚）の発育遅延をもたらす生理的要因の解明	中島 郁世・谷口 雅章・芦原 茜・荒川 愛作・ 渡邊 源哉・本山 三知代・佐々木 啓介 （国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）	469
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（Ⅱ）	神 戸 大 朋（京都大学大学院生命科学研究科）	474
半教師あり学習による飼料成分を予測する新たな近赤外分析法の開発	田中 常喜・出口 健三郎 （地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場）	480

黒毛和種の分娩間隔短縮に資する新たな栄養管理指標の開発

～牛体3Dモデルを用いたアプローチ～

..... 木野 勝敏・児嶋 朋貴・青木 直人・増田 達明

(愛知県農業総合試験場畜産研究部) 486

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 (Ⅱ)

..... 山口 昇一郎・柴田 果歩・柿原 孝彦・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) 493

暑熱条件下で陥る肉用鶏の免疫疲弊化を回避する機能性飼料の探索

..... 豊水 正昭・平川 良太・野地 智法・喜久里 基

(東北大学大学院農学研究科) 499

CONTENTS

Relationship between kokumi and γ -glutamylpeptides in meat extracts

Hideyuki Suzuki, Yukiko Takakura and Shintaro Arai

(Division of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology) 3

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

Kazuhisa Honda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) 10

Relationships between blood oxidative stress and meat quality in swine, Kagoshima Kurobuta

Hiroaki Kawaguchi

(Department of Hygiene and Health Promotion Medicine, Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University) 15

Activity enhancement and substrate specificity modification of microbial transglutaminase by protein engineering

Teisuke Takita

(Kyoto University, Graduate School of Agriculture, Division of Food Science and Biotechnology) 24

Mechanism of porcine-specific thiamine triphosphate accumulation in skeletal muscle cells

Susumu Muroya and Mika Oe

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) 32

Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality

Tomoya Yamada

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) 38

Clarification of the enhancement mechanism of “*koku* attributes” by lipids in pork sausages

Toshihide Nishimura

(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University) 45

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

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

(Japan Meat Science and Technology Institute, *Hokkaido University) 54

Relationship between fiber type composition and meat quality in pork meat

Wataru Mizunoya*, Shoko Sawano**, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

(Faculty of Agriculture, Kyushu University, *present affiliation: School of Veterinary Medicine, Azabu University, **present affiliation: School of Life and Environmental Science, Azabu University) 64

Identification and characterization of bioactive compounds on mild cognitive impairment in porcine liver decomposition product	
Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu* and Yoshikazu Matsuda**	
(Department of Pharmacology and Therapeutic Innovation, Nagasaki University, *Graduate School of Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Shinshu University, **Clinical Pharmacology Educational Center, Nihon Pharmaceutical University)	70
Dietary effect of meat protein on anti-obesity and lipid metabolism (II)	
Jun-ichi Wakamatsu	
(Hokkaido University, Field Science Center for Northern Biosphere)	75
Elucidation of mechanism of the novel hypocholesterolemic dipeptide derived from cattle heart peptide and basic study of development of an innovative hypocholesterolemic food materials	
Satoshi Nagaoka	
(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	80
Retort processing and cold lactic acid fermentation induce protein degradation and functional peptides derivation in myofibrillar protein system (II)	
Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Yukihiro Ogawa* and Seiichi Haga	
(Faculty of Agriculture, Meijo University, *Experimental Farm, Meijo University)	84
Efficacy of carnosine intake on the prevention of sarcopenia related with obesity (II)	
Koro Gotoh, Takayuki Masaki and Hirotaka Shibata	
(Department of Endocrinology, Metabolism, Rheumatology, and Nephrology, Faculty of Medicine, Oita University)	89
Prevention effects of unsaturated fatty acids on lifestyle-related diseases by the dietary intake of meat sources (Saku cohort study)	
Kouichi Yamada	
(National Research and Development Agency National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition)	94
Effects of nucleic acids from meat and other foods on the functions of intestinal cells (II)	
Yoshichika Kawai	
(Graduate School of Biomedical Sciences, Tokushima University)	101
Improvement effect of globin protein derived from pig red cell on the blood pressure in SHR hypertension rats	
Aya Itoi, Namika Miya and Yutaka Yoshikawa	
(Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University)	107
Study on ensuring the safety of meat by phage and food components	
Takahisa Miyamoto	
(Faculty of Agriculture, Kyushu University)	112

Analysis of disinfection mechanisms of drug-resistant bacteria by gas plasma using molecular theoretical approach	
Akikazu Sakudo 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, Faculty of Science and Engineering, Saga University) ······	118
Evaluation of meat freshness based on measurement of its electrical properties	
Kazuyuki Saito	
(Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University) ······	123
Smart quality management of meat processed products using visible and near-infrared multispectral imaging combined with deep learning	
Yoshio Makino and Chao-Hui Feng	
(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) ······	129
Novel gene polymorphisms identification related to cattle economic traits (II)	
Hirokazu Matsumoto	
(Department of Animal Science, School of Agriculture, Tokai University) ······	135
Development of pig breeding for disease resistance with antimicrobial peptides	
Yoshinobu Uemoto	
(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ······	141
Rapid genetic mapping for egg production and eggshell strength in Nagoya breed for production of meat-type chicken	
Tatsuhiko Goto ¹ , Kyoko Kunishige ² , Kenji Nishimura ¹ and Shun Sato ²	
(¹ Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ² Hokkaido Research Organization) ·····	146
The study of polymorphism in the bovine <i>HSP70.1</i> gene associated with thermotolerance	
Miyuki Mori	
(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) ······	150
Genome-wide DNA methylation analysis for early evaluation of bulls	
Jumpei Yamazaki and Masashi Nagano	
(Hokkaido University, Graduate School of Veterinary Medicine) ······	157
Investigation of a bio-marker relating to pork meat marbling	
Masaaki Taniguchi ¹ , Ikuyo Nakajima ¹ , Aisaku Arakawa ¹ , Go Yoshioka ² and Kasumi Suzuki ²	
(¹ Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, ² Gifu Prefectural Livestock Research Institute) ······	163

Improvement of <i>in vitro</i> culture system of porcine IVF embryos by gene expression profiles involved in cell differentiation	
Ken Sawai and Ruri Miura	
(Faculty of Agriculture, Iwate University)	165
Improvement of offspring-productivity on closed-colony pig (Tokyo-X) using <i>in vitro</i> production technologies	
Konosuke Okada ¹ and Ayumi Suzuki ²	
(¹ School of Animal Science, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University, ² Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center)	171
Characterization of estrus-related behaviors in subestrous cattle to improve submission rate	
Minoru Sakaguchi, Motohiro Kikuchi and Hiroshi Miura	
(School of Veterinary Medicine, Kitasato University)	176
Study of bovine chromogranin-A ; Plasma profiles between the normal and repeat-breeding animals, and physiological roles in the uterine endometrium	
Toru Takahashi,	
(Faculty of Agriculture, Iwate University)	181
Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle	
Keiichiro Kizaki and Toru Takahashi	
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)	187
Establishment of novel intravaginal drug releasing device in cows	
Tomomi Tanaka and Natsumi Endo	
(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture)	194
Study on improvement of <i>in vitro</i> embryo production system using oocytes matured <i>in vivo</i> for embryo transfer	
Ken-ichi Yamanaka	
(Faculty of Agriculture, Saga University)	198
Survey of the low durability of motile sperm in the frozen semen of Japanese Black cattle	
Yoichiro Hoshino	
(Kyoto university livestock farm)	204
Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of cryopreserved bull semen (II)	
Kumiko Takeda, Kageyomo Nishino*, Nobunari Sato** and Akira Imai**	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Beef Cattle Institute, *Ibaraki Prefectural Livestock Research Center, **Hiroshima Prefectural Livestock Research Center)	212

Effects of linoleic acids and linolenic acids on ovarian and uterine function in cows

Ryosuke Sakumoto

(Division of Animal Breeding and Reproduction Research, Institute of Livestock and Grassland Science,
NARO) 220**Development of a new prognostic evaluation method for bovine endometriosis using liver
function and nutritional status analysis**

Tadatoshi Ohtaki

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences,
Nihon University) 226**Effect of hepatic dysfunction on the molecular pathophysiology of uterine inflammatory diseases
in cows**

Fumie Magata

(Graduate School of Agricultural and Life Science, The University of Tokyo) 232

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

Yojiro Yanagawa and Chihiro Kanno*

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, *Genetics Hokkaido Association) 238

Research on effects of amino acid for improving reproductive performance in sow

Go Kitahara

(Theriogenology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of
Miyazaki) 243**Effect of nutrition control on superovulation response and the number of recovered embryo in
heifer**

Takeshi Hayashi, Dai Fukamizu, Shuji Ueda and Sunao Inada

(Department of Animal Production, Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) 250

Elucidation of reproductive disorders in swine caused by iron deficiency in ovary (II)**—Relationship between reduction of iron releasing capacity of liver and reproductive disorder—**

Yasuhisa Yamashita

(Department of Life and Environment Science, Prefectural University of Hiroshima) 255

Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy cows (II)

Shigeru Sato and Kei-ichiro Kizaki

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) 263

**Development and evaluation for determination of number of antimicrobial-resistant bacteria in
meats**

Kanako Ishihara and Shizuka Nomura

(Faculty of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology) 269

Detection strategy of <i>Toxoplasma gondii</i> infected pigs and estimation of cysts burden in muscles	
Yasuhiro Takashima	
(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	275
Metagenomic and epidemiological studies for characterization of papillomatous digital dermatitis	
Yasuhiro Gotoh	
(Faculty of Medical Sciences, Kyushu University)	279
Development of simple and rapid diagnosis of bovine anaplasmosis and babesiosis transmitted by tick	
Tetsuya Tanaka ¹ , Galay Remil Ringgatong ¹ and Ayumu Yamasaki ²	
(¹ Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, ² Faculty of Agriculture, Miyazaki University)	286
Analysis of the resting stage in the life cycle of the intestinal coccidian parasite, <i>Eimeria kriegsmanni</i>	
Tomohide Matsuo	
(Laboratory of Parasitology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)	289
Development of novel salmonella mucosal vaccine with high efficiency and fewer side effects on chickens	
Hiroyuki Tani	
(Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)	295
A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of parasite control program in cattle	
Motoko Morimoto	
(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)	302
Population genomics and risk assessment of swine mycobacteriosis	
Kenji Ohya and Tetsuya Komatsu*	
(Department of Applied Biological Sciences, Gifu University, Present address : National Institute of Health Sciences, *Aichi Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center)	307
Livestock-associated <i>S. aureus</i> in chicken : virulence, resistance and pathogenesis (II)	
Hisaya Ono	
(Kitasato University School of Veterinary Medicine)	313
Analysis for pathophysiology of heterozygous individual with cholesterol deficiency in Holstein cattle (II)	
Hisashi Inokuma	
(Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine)	320

Research on food hygiene risk of enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> isolated from Sika deer Shinya Fukumoto ¹ and Eiki Yamasaki ² (¹ National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ² Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)	324
Study of mucosa-associated lymphoid tissues in farm animals (II) — 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)	329
Mechanisms of progression of sever porcine circovirus associated diseases by porcine intestinal cell model system Tamaki Okabayashi (Department of Veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	334
Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	339
Study of appropriate usage of antibiotics for preventing the disposal of edible parts by Porcine Proliferative Enteropathy Ayaka Okada (Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	345
Geographical distribution and pathological analysis of PRRS virus variants in southern Kyushu Takuya Hirai (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	350
Epidemiological study of bovine viral diarrhea in beef cattle in Hokkaido Norikazu Isoda ¹ and Yoshihiro Sakoda ² (¹ Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, ² Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)	356
Comprehensive analysis of the behavior of <i>Campylobacter</i> and coexistent bacteria in chicken food chain (II) Kasumi Kuroki, Ryosuke Ago, Nachiko Takeshita, Yoshihiro Nitta, Ryosuke Kadoya* and Tsutomu Sekizaki (Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo, *present affiliation : Department of Human Nutrition, School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University)	362

Molecular epidemiological analysis of wild bird-mediated botulism in livestock

Yoshihiko Sakaguchi

(Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine) 371

Determination of gene involved in mortality in piglets by PEDV infection

Seiichi Ohashi and Wataru Kamitani*

(National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization, *Laboratory of Clinical Research on Infectious Diseases, Research Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) 376

Investigation of the physiological markers indicating ‘nausea’ in domestic ruminants

Masato Aoyama¹ and Yukihiro Kabuyama²

(¹Department of Agrobiological and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University,

²Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University) 380

Development of a simple diagnostic criteria for enzootic bovine leukemia and survey of juvenile bovine leukemia in Japan

Tomohiro Okagawa

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University) 387

Establishment of reducing technology for pastoral flavor of lamb meat using tannin in wine pomace

Koichiro Ueda

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) 394

Screening for phytochemicals that induce skeletal muscle hypertrophy

Shinichi Yonekura

(Faculty of Agriculture, Shinshu University) 400

Synthesis of a “missile” -antibacterial reagent that can contribute to reduction of the amount of antibiotics contained in livestock feed

Masaru Enomoto

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) 405

Effects of rice feeding on growth performance and protein (amino acids) metabolism of weaning piglets (II)

Ryozo Takada, Yusuke Tasaka and Kanako Tachihara

(Faculty of Agriculture, Niigata University) 412

Species and cultivar selection for low potassium and low cesium in grasses

Natsuko I. Kobayashi and Naoto Nihei

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) 419

Effect of rumen-protected lysine supplementation during late gestation period in dairy cattle on metabolic status in their calves	
Chiho Kawashima and Norio Yamagishi	
(School of Agriculture and Animal Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)	424
The expression and secretion pattern of new hepatokine during the peripartum in dairy cattle	
Sanggun Roh	
(Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science)	431
Development of IoT type meat production system to introduce for individual management and cleaning robot of poultry farming	
Kenichi Horiguchi ¹ , Mitsuhiko Katahira ¹ , Shigeru Ichiura ² and Toru Takagaki ³	
(¹ Faculty of Agriculture, Yamagata University, ² The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, ³ TAC Inc.)	435
The search study about myogenic stem cell population which can promote muscular hypertrophy efficiently in adult animals	
Takahiro Suzuki	
(Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University)	441
Studies on fiber digestibility of forage rice, and development of research-based cooperative extension service	
Makoto Kondo	
(Graduate School of Bioresources, Mie University)	449
Determination of factors affecting on growth of rumen bacterial species contributing to stable rumen fermentation in Japanese Black cattle	
Satoshi Koike	
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	455
Effects of active dry yeast supplementation on subacute ruminal acidosis and growth performance in Holstein calves	
Shiro Kushibiki	
(National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	461
Factors affecting mortality and growth retardation in runt pigs	
Ikuyo Nakajima, Masaaki Taniguchi, Akane Ashihara, Aisaku Arakawa, Genya Watanabe, Michiyo Motoyama and Keisuke Sasaki	
(National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	469
Studies on a feed for improving zinc nutrition by the use of zinc transporters (II)	
Taiho Kambe	
(Graduate School of Biostudies, Kyoto University)	474

Semi-supervised learning in near-infrared spectroscopy and chemometrics for prediction of the nutrient composition of grass silage	
Tsuneki Tanaka and Kenzaburo Deguchi	
(Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center)	480
The development of alternative indicators of body condition score in Japanese black cows for shortening calving interval : an approach using 3D model generation of cattle by shape-from-silhouette method	
Katsutoshi Kino, Tomoki Kojima, Naoto Aoki and Tatsuaki Masuda	
(Animal Husbandry Division, Aichi Agricultural Research Center)	486
New system development of high fertility by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice whole crop silage in lactating dairy cows (Ⅱ)	
Shoichiro Yamaguchi, Kaho Shibata, Takahiko Kakihara and Chiho Kawashima*	
(Fukuoka Agricultural Research Center, *Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)	493
Development of feed for improvement of antigen-specific immune response in heat-stressed chickens	
Masaaki Toyomizu, Ryota Hirakawa, Tomonori Nochi and Motoi Kikusato	
(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)	499

伊藤記念財団賞

目 次

林 利 哉 （名城大学農学部応用生物化学科 教授）	
筋肉・食肉タンパク質の機能・加工特性に関する研究—ゲル化特性，変性・分解挙動， 生理活性—	513
今 内 覚 （北海道大学大学院獣医学研究院病原制御学分野 准教授）	
食肉の生産現場における牛白血病の新たな制御法の開発	514
水野谷 航 （九州大学大学院農学研究院 助教 現所属：麻布大学獣医学部）	
筋繊維タイプの解析技術開発と食肉生産への応用に関する研究	515

学会等事業助成

目 次

アジア地域の食肉衛生に関するシンポジウムに関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会 代表理事 久和 茂（東京大学）…………… 519

日本食肉研究会の平成 30 年度事業助成実施報告

日本食肉研究会 会長 坂田亮一（麻布大学・明治大学）…………… 521

平成 30 年度事業実施報告書

日本畜産学会第 125 回大会 公開シンポジウム「スマート畜産：IoT・人工知能および ロボット技術の利活用」

公益社団法人日本畜産学会 理事長 寺田文典（東北大学）…………… 525

研究助成事業

ミートエキストラクトのコク味と γ -グルタミルペプチドの関係について

Relationship between kokumi and γ -glutamylpeptides in meat extracts

鈴木 秀之・高倉 有喜子・荒井 進太郎

(京都工芸繊維大学応用生物学系)

Hideyuki Suzuki, Yukiko Takakura and Shintaro Arai

(Division of Applied Biology, Kyoto Institute of Technology)

Peptidase D from *Escherichia coli* which has Arg-Gly-His-Gly-Ser insertion between the first and second codon was shown to have carnosinase activity. This suggests that peptidase D may synthesize carnosine from β -alanine and histidine by its reverse reaction. γ -Glutamyltranspeptidase of *Bacillus subtilis* synthesized γ -glutamylcarnosine from glutamine and carnosine. The results suggest that γ -glutamylcarnosine can be synthesized from its constituent amino acids, glutamine, β -alanine and histidine, by two bacterial enzymes.

1. 目 的

イミダゾールジペプチド（イミダペプチド）の1種であるL-カルノシン（ β -アラニル-L-ヒスチジン）が、食肉に高濃度存在することが知られている。食肉を熱水抽出して調味料としてのミートエキストラクトを製造する工程で、グルタミンとカルノシンが反応して γ -グルタミルカルノシンが生成するとされている¹⁾。一方、さまざまな γ -グルタミルアミノ酸や γ -グルタミルペプチドがコク味物質だと報告されているが²⁻⁵⁾、 γ -グルタミルカルノシンの呈味性についてはこれまで報告がない。申請者は γ -グルタミルカルノシンがコク味物質であると予想しており、そのことを確かめることが本研究の最終目的である。

コク味物質は「それ自身は弱い香りと甘味を持っているが、それ自体の味が分からない程度の少量添加することにより、例えば、持続性、口の

中での広がり、厚みといった料理の風味を増強するものである」とされている⁶⁾ため、食品の製造段階でコク味物質を生成させることにより、料理の塩味や甘味を変えることなく調理に使う塩分や糖分を無理なく減らすことができるようになり、高血圧や糖尿病といった生活習慣病の予防や治療に繋がる低塩・低糖食が開発できると期待される。我が国では少子高齢化が進行しているが、健康長寿が理想である。また、医療費の増大が社会問題となっており、高価な医薬品でなく、日常の安価な食品によって病気を予防できれば、社会に貢献できる。

一方、経口摂取した γ -グルタミルカルノシンは、小腸絨毛突起に局在している γ -グルタミルトランスペプチダーゼ（GGT；EC 2.3.2.2）によって切断され、グルタミン酸とカルノシンとして体内に取り込まれると予想される。カルノシンには、ラジカルスカベンジャーとして細胞を酸化

ストレスから保護する効果、抗糖化作用により多くの変性疾患の発症や悪化に関与する終末糖化産物の生成速度を遅くする作用、テロメアが短くなる速度を遅くする作用などが報告されていることから⁷⁻¹⁰⁾、経口摂取した γ -グルタミルカルノシンから遊離したカルノシンの機能によっても健康寿命の伸長に貢献できる。

2. 方 法

2.1 HPLCによるアミノ酸、ペプチドの定量法

HPLCによるアミノ酸、ペプチドの分析は既法¹¹⁾に従い、Amino Naカラムを用いて行った。

2.2 TLCによるアミノ酸、ペプチドの分離

TLC分析にはアルミニウムシート シリカゲル 60 F₂₅₄ (Merck) を用いた。標準液として、10mMのカルノシン、ヒスチジン、 β -アラニン水溶液を用いた。サンプルはプレートの下から1.5cmのところに線を引いて両端1cmを開けて1cm間隔でサンプルを5 μ lずつスポットした。展開溶媒は、n-ブタノール：酢酸：水 = 4 : 1 : 1を用いた。前線がプレートの上端から0.5cmまで移動したらプレートを乾燥させた。プレートが乾燥したらもう一度展開槽にプレートを入れて前線がプレートの上端から0.5cmにくるまでサンプルを展開した。プレートを乾燥後、0.3%ニンヒドリン溶液（アセトン：エタノール = 3 : 1）をかけ、乾燥した後、ホットプレート上で加熱、発色させた。

2.3 菌株の作成

大腸菌MG1655株のゲノムを鋳型、オリゴヌクレオチドBamHI_{pepD}_N (CCCGGATCCTCTGAACTGTCTCAATTATCTCC) と PstI_{pepD}_C (CCCCGTCAGTTACTTCGCCGGAATTTCTTTCAGC) をプライマーとして*pepD*遺伝子のコーディング領域の両端にBamHIとPstI認識配

列を付加してPCR増幅した。このDNAフラグメントをアガロースゲル電気泳動で分離、Wizard SV Gel and PCR Clean-up System (プロメガ)を用いて精製した。精製フラグメントをBamHIとPstIで切断、同システムで精製後、BamHIとPstIで切断したpQE-80 Lにクローニングし、得られたプラスミドをpSH1836とした。得られたプラスミドはT5プロモーターの制御下にSD配列、開始コドン、Arg-Gly-His₆-Gly-Serに続き、PepDの第二コード以下がクローニングされた形になっていることをDNAシーケンスにより確認した。

CM86株 (F^- *pepA pepB pepN* Δ (*pro-lac*) *leu met thy*) は、C. G. Miller¹²⁾ より分与を受けた株である。 Δ (*pro-lac*) の欠失は*pepD*域も含んでいるので、この株はPepD⁻である。SH138株 (F^- *thyA36 hisG::Tn10*) からPl_{vir}ファージを用いて、*hisG::Tn10*をCM86株に形質導入した株をAS05株とした。CM86株をpSH1836とpQE-80 Lで形質転換した株をそれぞれSH1846株、AS09株、AS05株をpSH1836とpQE-80 Lで形質転換した株をそれぞれAS06株、AS08株とした。また、MG1655株をpQE-80 Lで形質転換した株をFS54株とした。

2.4 至適pHの決定法

SH1846株をアンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地5 mlに植菌し、37°Cで16時間培養した。この前培養液を体積比で50分の1になるよう、アンピシリン100 μ g/mlを含むLB培地に植菌し、37°C、120rpmで振盪培養した。OD₆₀₀が0.6となった時点で終濃度1 mMとなるようIPTGを添加し、37°Cでさらに3時間振盪培養した。

5 ml分の培養液を集菌し、さまざまなpHの緩衝液1 mlで洗菌後、同じ緩衝液1 mlに懸濁した。緩衝液としては、pH5.0, 5.5, 6.0は0.2Mの酢酸ナトリウム緩衝液、pH6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0は0.2

Mのリン酸ナトリウム緩衝液を用いた。菌体懸濁液を超音波処理して、無細胞抽出液を調製した。

無細胞抽出液と反応液を100 μ lずつ混ぜ合わせ(カルノシンの終濃度10mM, CoCl_2 の終濃度0.1mMとなるよう), 37°Cで1時間反応させたのち, 5分間煮沸して反応を停止させた。遠心後の上清をHPLCとTLCで分析した。

3. 結果と考察

3.1 pSH1836 (pQE-80L::pepD) からペプチダーゼDが発現していることの確認

pSH1836 (pQE-80L::pepD) から発現するペプチダーゼDは開始コドンと第二コドンの間にArg-Gly-His₆-Gly-Serを挿入した形になっている。SH1846株(pSH1836/CM86)とAS09(pQE-80L/CM86)の菌体を抗His-tag抗体を用いてWestern-blotに供した結果, SH1846株にのみバンドが見られ, AS09株にはバンドが見られなかった(data not shown)。SH1846株に見られたバンドの分子量はpSH1836上のpepD遺伝子がコードするペプチダーゼDのサブユニットの予想分子量(54,182)と一致したことから, N末にHis-tagが付加されたペプチダーゼDタンパク質が発現したと考えられた。

3.2 pSH1836 (pQE-80L::pepD) から発現するペプチダーゼDがLeu-Glyを分解することの確認

発現したペプチダーゼDタンパク質が酵素活性

を持つか確認した。FS54株, SH1846株, AS09株をPro, Met, Thyを補ったM9 glucose最少寒天培地に植え, 37°Cで1晩培養し生育を観察した(Table 1)。

CM86株(SH1846株とAS09株の宿主)はPro, Leu, Met, Thy要求性である。大腸菌はジペプチドを切断する基質特異性の広いペプチダーゼとして, アミノペプチダーゼA, アミノペプチダーゼB, アミノペプチダーゼN, ペプチダーゼDを持つことが知られている。CM86株はこれらすべてを欠損しているためLeu-Glyを切断してLeuを遊離し, Leu源とすることができない。pSH1836(pQE-80L::pepD)から発現するペプチダーゼDは第一コドンと第二コドンの間にArg-Gly-His₆-Gly-Serを挿入した形になっているので, ペプチダーゼDの本来の活性を持つかをまず確認した。Table 1に示すようにpSH1836から発現するペプチダーゼDは, Leu-Glyを加水分解する活性を持つことが分かった。

3.3 pSH1836 (pQE-80L::pepD) から発現するアミノペプチダーゼDがカルノシンを分解することの確認

大腸菌のペプチダーゼDの*Salmonella typhimurium*のホモログであるペプチダーゼDはカルノシンの加水分解活性を持つことが報告され, 詳しく調べられている¹³⁾。大腸菌のペプチダーゼDもカルノシン加水分解活性を持つとされているが¹⁴⁾, その性質についての詳細な報告はない。

Table 1 Utilization of Leu-Gly as a leucine source to complement leucine auxotrophy.

Strain	Representative genotype	+ 0.3mM Leu-Gly	none
FS54	pQE-80L/ <i>leu</i> ⁺	+	+
SH1846	pQE-80L::pepD/ <i>leu</i> ⁻	+	-
AS09	pQE-80L/ <i>leu</i> ⁻	-	-

M9 glucose minimal medium supplemented with 2 mM Pro, 0.3 mM Met, and 0.32 mM Thy was used. Plates were incubated at 37°C.

Table 2 Utilization of carnosine (β -Ala-His) as a histidine source to complement histidine auxotrophy.

Strain	Representative genotype	+0.1mM His	+0.1mM carnosine	none
FS54	pQE-80L/ <i>his</i> ⁺	+	+	+
AS06	pQE-80L:: <i>pepD</i> / <i>hisG</i> ⁻	+	+	-
AS08	pQE-80L/ <i>hisG</i> ⁻	+	-	-
SH1846	pQE-80L:: <i>pepD</i> / <i>his</i> ⁺	+	+	+

M9 glucose minimal medium supplemented with 2 mM Pro, 0.3 mM Met, 0.32 mM Thy, and 0.3 mM Leu was used. Plates were incubated at 37°C.

AS05株 (AS06株, AS08株の宿主) はHis, Pro, Leu, Met, Thy要求性である。カルノシンは β -Ala-Hisなので, pSH1836 (pQE-80L::*pepD*) から発現するペプチダーゼDがカルノシンを加水分解できればHisを供給できる。

Table 2が示すように, pSH1836(pQE-80L::*pepD*) から発現する第一コドンと第二コドンの間に Arg-Gly-His₆-Gly-Serを挿入したペプチダーゼDもカルノシンを加水分解してHisを供給できた。つまりカルノシナーゼ活性を持つことが分かった。

3.4 pSH1836 (pQE-80L::*pepD*) から発現するアミノペプチダーゼDのカルノシン加水分解活性の至適pHの検討

実験方法で述べたように異なるpHの緩衝液でセルフリーを調製し, TLCとHPLCで分析した。

TLCプレートでもHPLCでも, カルノシンとヒスチジンの分離はよくなかったが, β -アラニンは分離できたので, β -アラニンの生成量でペプチダーゼDのカルノシン分解活性を評価した。いずれの方法でもpH7.5の時にカルノシンが最もよく分解されていた (**Fig. 1A, B**)。

3.5 ペプチダーゼD発現のための最適IPTG濃度の検討

pSH1836 (pQE-80L::*pepD*) の*pepD*遺伝子はT5プロモーターと*lac*オペレーターの制御下であり, IPTGによる誘導が可能である。そこで, 誘導に最適なIPTG濃度を検討した。至適pHを求め

たときと同様にSH1846株を培養し, 1 mMのIPTGを添加していたところを0, 0.5, 1, 1.5mMと振って誘導し, 無細胞抽出液のカルノシン分解活性を同様に求めたところ, 1 mMのIPTG添加が最適であった (**Fig. 1C**)。

3.6 γ -グルタミルトランスペプチダーゼの転移反応を用いてグルタミンとカルノシンから γ -グルタミルカルノシンが酵素合成できることの確認

γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT; EC 2.3.2.2) はグルタチオンなどの γ -グルタミル化合物の加水分解反応とその γ -グルタミル基を他のアミノ酸やペプチドに転移し, 新たな γ -グルタミル化合物を生成する転移反応を触媒する¹⁵⁾。大腸菌や枯草菌のGGTは1つのオープンリーディングフレームの中にシグナルペプチド, 大サブユニット, 小サブユニットがコードされている構造をとっており, 1本のポリペプチド鎖として翻訳された後, 細胞質外に排出される過程でシグナルペプチドが外され, さらに自己触媒的に大小サブユニットにプロセスされることが分かっている^{16, 17)}。著者らはこれまでにこの酵素を用いてさまざまな γ -グルタミル化合物を効率よく酵素合成する方法を開発してきた^{18, 19)}。本研究では, この酵素の転移反応を利用して, グルタミンとカルノシンから γ -グルタミルカルノシンを酵素合成することを検討した。

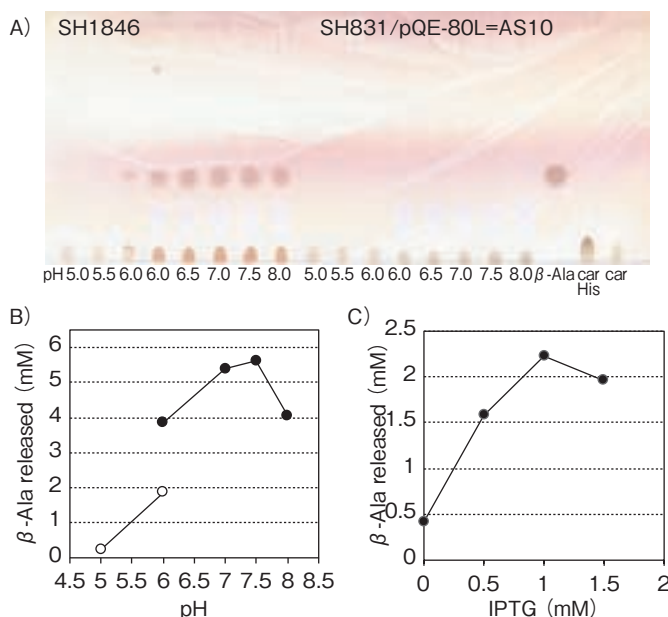


Fig. 1 The pH profile of carnosine hydrolysis activity of peptidase D from strain SH1846 obtained by TLC plate (A) and by HPLC (B). (C) Effect of IPTG concentration on *pepD* induction from pSH1836.

pQE-80Lの開始コドン, Arg-Gly-Ser-His₆に続き枯草菌の*ggt*遺伝子の大小サブユニットのコーディング域(シグナル配列を除いた)をクローニングしたプラスミドpTH3で Δ *ggt*-2変異を持つSH641株を形質転換してTH5株を得た。この株の無細胞抽出液をNi-アガロースカラム(和光純薬製)で精製した酵素標品を用いた。

グルタミン, カルノシンの混合液のpHを調整後, GGTを添加し, 各濃度が20mM, 20mM, 2.0 μ /mlになるように水で調節した。Fig. 2はpHを9にした時の反応開始前(A)と開始後1時間目(B)のHPLCのチャートである。グルタミンとカルノシンから, γ -グルタミルカルノシン, γ -グルタミルグルタミン, グルタミン酸が生成していることが分かった。反応液のpHを振ったところ, pHが中性に近いほどグルタミン酸の生成速度が速く, グルタミンの加水分解反応が優先的に進行したと考えられる。一方, pHを10.5以上になるとグルタミンの加水分解反応は緩やかになった

が γ -グルタミル化合物の生成量が多くなり, グルタミンが急速に減少し, グルタミン不足となった(data not shown)。いったん生成した γ -グルタミルカルノシンが分解したのはグルタミン不足が原因と考えられる。グルタミンの初発濃度を上げ, pHを高くし, 酵素量を減らすことで, γ -グルタミルカルノシンの収量を増大できると期待される。

4. 要 約

第一コドンと第二コドンの間にArg-Gly-His₆-Gly-Serを挿入した大腸菌のペプチダーゼDがカルノシン分解活性を持つことを示し, 逆反応による β -アラニンとヒスチジンからの酵素合成の可能性が示唆された。また, 枯草菌の γ -グルタミルトランスペプチダーゼを用いてグルタミンとカルノシンから γ -グルタミルカルノシンを酵素合成できることを示したことから, 2種類の微生物酵素を用いることでコク味物質と考えられる γ -

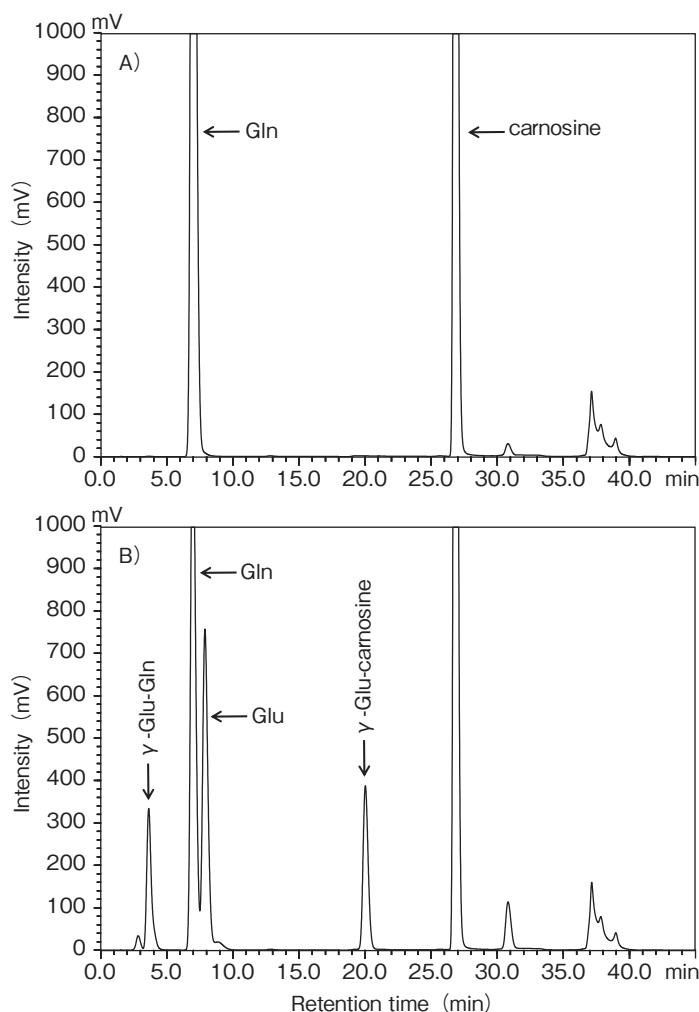


Fig. 2 HPLC elution patterns of the reaction mixture of 20 mM glutamine, 20 mM carnosine, and 2.0 μ g/ml GGT (pH9) before (A) and after (B) one hour of incubation.

グルタミルカルノシンを構成アミノ酸から全合成
できることが示唆された。

文 献

- 1) Kuroda, M., Ohtake, R., Suzuki, E., Harada, T. : Investigation on the formation and the determination of γ -glutamyl- β -alanylhistidine and related isopeptide in the macromolecular fraction of beef soup stock, *J. Agric. Food Chem.*, **48**, 6317~6324, 2000.
- 2) Ueda, Y., Yonemitsu, M., Tsubuku, T., Sakaguchi, M., Miyajima, R. : Flavor characteristics of glutathione in raw and cooked foodstuffs, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **61**, 1977~1980, 1997.
- 3) Dunkel, A., Köster, J., Hofmann, T. : Molecular and sensory characterization of γ -glutamyl peptides as key contributors to the kokumi taste of edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.), *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 6712~6719, 2007.
- 4) Toelstede, S., Dunkel, A., Hofmann, T. : A series of kokumi peptides impart the long-lasting mouthfulness of matured gouda cheesem, *J. Agric. Food Chem.*, **57**, 1440~1448, 2009.
- 5) Ohsu, T., Amino, Y., Nagasaki, H., Yamanaka, T., Takeshita, S., Hatanaka, T., Maruyama, Y., Miyamura, N., Eto, Y. : Involvement of the calcium-sensing receptor in human taste perception, *J. Biol. Chem.*, **285**, 1016~1022, 2010.

- 6) Ueda, Y., Sakaguchi, M., Hirayama, K., Miyajima, R., Kimizuka, A. : Characteristic flavor constituents in water extract of garlic, *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 163~169, 1990.
- 7) Kohen, R., Yamamoto, Y., Cundy, K. C., Ames, B. N. : Antioxidant activity of carnosine, homocarnosine, and anserine present in muscle and brain, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 3175~3179, 1988.
- 8) McFarland, G. A., Holliday, R. : Retardation of the senescence of cultured human diploid fibroblasts by carnosine, *Exp. Cell Res.*, **212**, 167~17, 1994.
- 9) Shao, L., Li, Q. H., Tan, T. : L-Carnosine reduces telomere damage and shortening rate in cultured normal fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 931~936, 2004.
- 10) Boldyrev, A., Aldini, G., Derave, W. : Physiology and pathophysiology of carnosine, *Physiol. Rev.*, **93**, 1803~1845, 2013.
- 11) Suzuki, H., Izuka, S., Minami, H., Miyakawa, N., Ishihara, S., Kumagai, H. : Use of bacterial γ -glutamyltranspeptidase for enzymatic synthesis of γ -D-glutamyl compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 6399~6404, 2003.
- 12) Miller, C. G., Schwartz, G. : Peptidase-deficient mutants of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **135**, 603~611, 1978.
- 13) Kirsh, M., Dembinski, D. R., Hartman, P. E., Miller, C. G. : *Salmonella typhimurium* peptidase active on carnosine, *J. Bacteriol.*, **134**, 361~374, 1978.
- 14) Klein, J., Henrich, B., Plapp, R. : Cloning and Expression of the *pepD* gene of *Escherichia coli*, *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 2337~2343, 1986.
- 15) Suzuki, H., Hashimoto, W., Kumagai, H. : Glutathione metabolism in *Escherichia coli*, *J. Mol. Catal. B Enzym.*, **6**, 175~184, 1999.
- 16) Suzuki, H., Kumagai, H. : Autocatalytic processing of γ -glutamyltranspeptidase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 43536~43543, 2002.
- 17) 鈴木秀之, 和田啓, 福山恵一 : γ -グルタミルトランスペプチダーゼの立体構造に基づいた成熟化と酵素反応機構, 蛋白質核酸酵素, **54**, 245~251, 2009.
- 18) Suzuki, H., Yamada, C., Kato, K. : γ -Glutamyl compounds and their enzymatic production using bacterial γ -glutamyltranspeptidase, *Amino Acids*, **32**, 333~340, 2007.
- 19) Suzuki, H. : Microbial production of amino acids and their derivatives for use in foods, nutraceuticals, and medications, *In Microbial production of food ingredients, enzymes and nutraceuticals*, Ed. by B McNeil, D Archer, I Giavasis, and L Harvey, pp.385~412, Woodhead Publishing, Cambridge, UK, 2013.

地鶏肉の美味しさの決定要因の解明（Ⅱ）

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

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. It is well known that Japanese prefer female and aged Jidori meat rather than male and young one. In the present study, the effects of age and sex on the taste of Jidori meat and unsoluble collagen ratio in order to identify the candidate index indicating the palatability of Jidori meat. The paired test for boiled thigh slice meats of Jidori revealed that 76 day old female Jidori meat was significantly juicier than same-age male one. 97 day old female Jidori meat shows significantly high chewiness and fracturability when compared to same-age male one. 97 day old female Jidori meat shows significantly high springiness when compared to the 76 day old one. 97 day old male Jidori meat shows significantly low fattiness and high chewiness when compared to 76 day old one. Unsoluble collagen ratio was significantly elevated by age, and female Jidori meats showed significantly high unsoluble collagen ratio when compared to male Jidori meats. These findings suggest that unsoluble collagen ratio in Jidori meat may be used as a good index of the quality of Jidori meat.

1. 目 的

地鶏肉は我国が誇る優れた食味の食材であり、その美味しさは我国鶏肉市場の約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評価基準が確立されていない。そのため、平成11年に地鶏肉のJAS規格が決定されて以降も、地鶏肉とブロイラー肉との美味しさの違いが十分に消費者に認識されず、その市場拡大が思うように進まない状況が続いている。ここで、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も進められているが、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。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、地鶏肉の品質評価基準が確立され、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しなければならない。

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、「うま味」を形成するとされているアミノ酸および核酸関連物質については、地鶏肉とブロイラー鶏肉の抽出液に含まれるアミノ酸や核酸関連物質の含量には大きな違いは見られないことが報告されている¹⁻³⁾。一方、「適度な歯ごたえ」は骨格筋の筋線維組成の相違に基づくものであることが示唆されており⁴⁾、日齢^{5, 6)}、あるいは飼育方法⁷⁾により影響されることが報告されている。実際、比内地鶏においては雌のみが鶏肉生産用に供されており、雄の食味を改善するべく効率的な去勢方法が検討されている⁸⁾。ここで、食肉の歯ごたえは不溶性コラーゲン含有率の上昇によって増加することが知られている⁹⁾。しかしながら、これまでに、地鶏肉の食味、飼育期間、雌雄差、および不溶性コラーゲン含有率との関連を調べた報告はない。

本研究では、地鶏肉の美味しさの決定要因を解明するための一環として、日齢および性別の違いが地鶏肉の食味と不溶性コラーゲン含有率に及ぼす影響について調べた。

2. 方 法

2.1 地鶏の飼育と検査用鶏肉の調製

0日齢の雌雄の地鶏（ひょうご味どり）に前期用トウモロコシ-大豆粕主体飼料（粗タンパク質21.8%，代謝エネルギー3,147kcal/kg）を28日齢まで、後期用前期用トウモロコシ-大豆粕主体飼料（粗タンパク質18.6%，代謝エネルギー3,167kcal/kg）を76あるいは97日齢まで、それぞれ給与した後、12時間絶食し、炭酸ガス麻酔下で安楽死させた。脱羽後、右むね肉、および左もも

肉の重量を測定した後、左右のもも肉を24時間冷蔵保存後、もも肉を減圧包装し、-30℃で冷凍保存した。その後、冷凍のもも肉の中央部を内転筋に対して垂直に1cm幅でスライスし、内転筋、大腿二頭筋、および縫工筋他を含む4枚のスライス肉を再び減圧包装後、官能検査に供するまで-30℃で冷凍保存した。

2.2 官能検査

官能検査当日に2.1で調製したスライス肉を解凍後、3倍量の1%食塩水を加えた後、90℃以上で15分間湯煎し、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。パネラーには、最初に食べた鶏肉に比べ、次に食べた鶏肉の値を評価させた。なお、食べる順序が官能評価に与える影響をなくするため、パネラーには鶏肉の食べる順序を伝えない条件下で、雌-雄、雄-雌、76日齢-97日齢、97日齢-76日齢の4通りの順序で食して評価する官能検査を各パネラーごとに行った。

2.3 不溶性コラーゲン含量率の測定

2.1で調製したスライス肉をミンチ後、総コラーゲン含有率および可溶性コラーゲン含有率をLiuらの方法⁹⁾に従い測定し、総コラーゲン含有率から可溶性コラーゲン含有率を差し引き、不溶性コラーゲン含有率を算出した。

2.4 統計解析

体重、むね肉重量、もも肉重量、および不溶性

コラーゲン含有率は二元配置分散分析により、官能検査結果はマン・ホイットニーのU検定により、それぞれ解析し、危険率5%未満の差を有意とした。

3. 結果と考察

二元配置分散分析の結果、体重、むね肉、およびもも肉の重量は、雌に比べて雄が、76日齢に比べて97日齢が、それぞれ有意に高い値を示した (Fig. 1)。また、官能検査の結果、76日齢のもも

肉の比較では、雄より雌がジューシーであること (+0.50)、97日齢のもも肉の比較では、雄より雌が噛み切りやすく (+0.57)、咀嚼しやすいこと (+0.50)、異なる日齢の雄のもも肉の比較では、76日齢より97日齢の方が噛み切りやすく (+0.56)、脂っこさが少ないこと (-0.50)、および異なる日齢の雌のもも肉の比較では、76日齢より97日齢の方が歯ごたえがあること (+0.43) が、それぞれ示唆された。これらの結果から、雄よりも雌の、76日齢よりも97日齢まで飼育した地

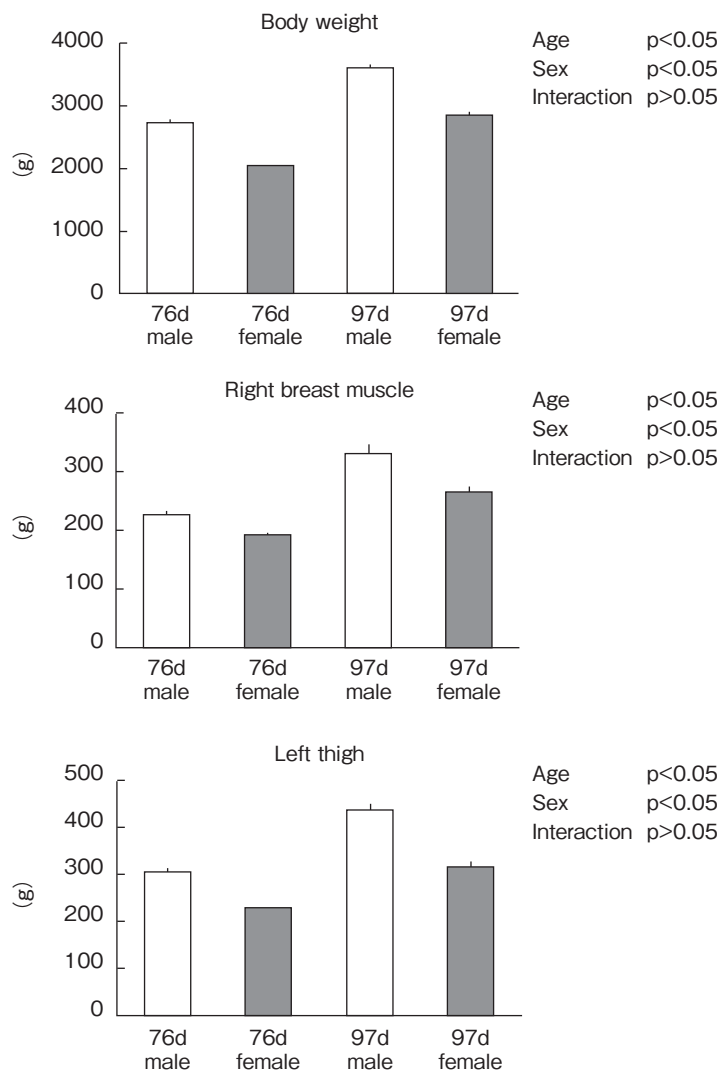


Fig. 1 Comparison of weights of body, right breast muscle, and left thigh of Jidori chickens

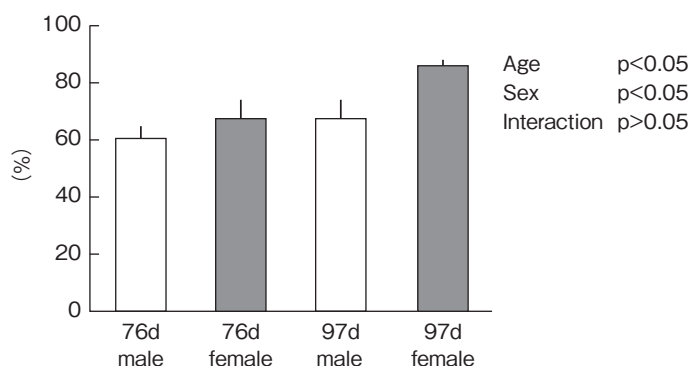


Fig. 2 Unsoluble collagen ratio of thigh meat slices of Jidori chickens

鶏の肉質が、それぞれ好ましいことが示唆された。

官能検査の結果、雌雄および日齢の違いは、主として食感の違いに認められたことから、食感に影響するとされる不溶性コラーゲン含有率を測定した。その結果、雄よりも雌の、76日齢よりも97日齢まで飼育した地鶏の不溶性コラーゲン含有率が、それぞれ有意に高いことが明らかになった（Fig. 2）。鶏肉の柔らかさは筋周膜の厚さと正の相関があることが報告されている¹⁰⁾。また、Ⅲ型コラーゲン含量の増加は、鶏肉の柔らかさと嗜好性を高めるとする報告もある¹¹⁾。これらの結果から、地鶏肉の性別および日齢における食感の違いの原因の一つとして、筋周膜におけるコラーゲンの重合促進や組成の変化に基づく物理学的性状の変化が示唆された。

地鶏肉とブロイラーの浅胸筋、深胸筋、あるいは大腿二頭筋をオープンで熱処理し、その物性を比較した報告¹²⁾では、大腿二頭筋の弾力性が地鶏肉で高いことが明らかにされている。また、タイの在来種の鶏においては、加熱した浅胸筋および大腿二頭筋の剪断力価がブロイラーに比べて高い値を示すこと、およびその原因として不溶性コラーゲン量の増加が示唆されている¹³⁾。本研究で用いたもも肉は、大腿二頭筋に加え、大内転筋や長内転筋などの骨格筋を含むことから、今後、大

腿二頭筋のみを用いて比較することによって、その差がより顕著に示される可能性もある。

最近、コラーゲンに特徴的なアミノ酸であるヒドロキシプロリン含量を近赤外線を用いて測定できることが報告された¹⁴⁾。この結果と我々の結果を考え合わせれば、解体後の鶏肉を用いて機械的・自動的に鶏肉の食感を解析することにより、鶏肉の格付けが可能になることを示唆する。また、日齢に伴う鶏肉の剪断力価の増加は、鶏の皮膚のペントシジン含量と正の相関を示すことが報告されている¹⁵⁾が、ペントシジンは非侵襲的に測定できることから、鶏肉の食感を飼育中の生体を用いて経日的に測定できる可能性もある。今後、本研究の発展により地鶏肉の美味しさの決定要因となる不溶性コラーゲンの最適含有率を明らかにできれば、その化学分析結果と、骨格筋から近赤外線により得られる種々のパラメーターや、皮膚のペントシジン含量との相関を解析することに基づき、地鶏肉の美味しさの格付けと、それを高める最適な飼育管理方法を開発できる可能性が高まると判断された。

4. 要 約

本研究では、地鶏肉の食味の指標となる候補物質を同定する目的で、日齢と性別の違いが地鶏肉

の食味と不溶性コラーゲン含有率に及ぼす影響を調べた。湯煎した地鶏ももスライス肉の比較試験の結果、76日齢のもも肉は、雄より雌がジューシーであること、97日齢のもも肉は、雄より雌が噛み切りやすく、咀嚼しやすいこと、雄のもも肉は76日齢より97日齢の方が噛み切りやすく、脂っこさが少ないこと、および雌のもも肉は76日齢より97日齢の方が歯ごたえがあることが明らかになった。また、不溶性コラーゲン含有率は、76日齢よりも97日齢で、雄よりも雌で、それぞれ有意に高い値を示した。これらの結果は、不溶性コラーゲン含有率は、地鶏肉の肉質の指標として使用できる可能性を示している。

文 献

- 1) 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.
- 2) 松石昌典, 加藤綾子, 石毛教子, 堀剛久, 石田雄祐, 金子紗千, 竹之中優典, 宮村陽子, 岩田琢磨, 沖谷明紘: 名古屋コーチン, 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.
- 3) Fujimura, S., Koga, H., Takeda, H., Tone, N., Kadowaki, M., Ishibashi, T.: Chemical compositions of pectoral meat of Japanese native chicken, Hinai-jidori, and broiler of the same and marketing age, *Animal Science and Technology*, **67**, 541~548, 1996.
- 4) 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.
- 5) 岩本久雄: 鶏骨格筋の構造と産肉生理, 西日本畜産学会報, **50**, 7~13, 2007.
- 6) 嶋澤光一, 荒木勉: 飼育形態が特産肉用鶏の肉色と筋線維特性に及ぼす影響, 日本家禽学会誌, **36**, 371~376, 1999.
- 7) 仁木隆博, 佐伯祐里佳, 家入誠二, 米田一成, 荒木朋洋, 芝田猛: 飼育形態が特産肉用鶏の成長, 産肉性および脂肪蓄積に及ぼす影響, 日本暖地畜産学会報, **55**, 157~166, 2012.
- 8) Rikimaru, K., Takahashi, H., Nichols, M. A.: An efficient method of early caponization in slow-growing meat-type chickens, *Poultry Science*, **90**, 1852~1857, 2011.
- 9) Liu, A., Nishimura, T., Takahashi, K.: Relationship between structural properties of intramuscular connective tissue and toughness of various chicken skeletal muscles, *Meat Science*, **43**, 43~49, 1996.
- 10) An, J. Y., Zheng, J., Li, J. Y., Zeng, D., Qu, L. J., Xu, G. Y., Yang, N.: Effect of myofiber characteristics and thickness of perimysium and endomysium on meat tenderness of chickens, *Poultry Science*, **89**, 1750~1754, 2010.
- 11) Yamauchi, K., Manabe, N., Matsumoto, Y., Takenoyama, S., Yamauchi, K.: Increased collagen III in culled chicken meat after feeding dietary wood charcoal and vinegar contributes to palatability and tenderness, *Animal Science Journal*, **85**, 468~480, 2014.
- 12) Sasaki, K., Motoyama, M., Tagawa, Y., Akama, K., Hayashi, T., Narita, T., Chikuni, K.: Qualitative and quantitative comparisons of texture characteristics between broiler and Jidori-niku, Japanese indigenous chicken meat, assessed by a trained panel, *The Journal of Poultry Science*, **54**, 87~96, 2017.
- 13) Wattanachant, S., Benjakul, S., Ledward, D. A.: Composition, color, and texture of Thai indigenous and broiler chickens muscles, *Poultry Science*, **83**, 123~128, 2004.
- 14) Xiong, Z., Sun, D. W., Xie, A., Han, Z., Wang, L.: Potential of hyperspectral imaging for rapid prediction of hydroxyproline content in chicken meat, *Food Chemistry*, **175**, 417~422, 2015.
- 15) Iqbal, M., Kenney, P. B., Klandorf, H.: Age-related changes in meat tenderness and tissue pentosidine: effect of diet restriction and aminoguanidine in broiler breeder hens, *Poultry Science*, **78**, 1328~1333, 1999.

鹿児島黒豚における血中酸化ストレスと肉質との 関連検討

Relationships between blood oxidative stress and meat quality in swine,
Kagoshima Kurobuta

川 口 博 明

(鹿児島大学大学院医歯学総合研究科衛生学・健康増進医学分野)

Hiroaki Kawaguchi

(Department of Hygiene and Health Promotion Medicine,
Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Kagoshima University)

It is known that the heat stress in summer affects the pork quality and flavor in domestic swine. This study was to investigate the relationship between blood oxidation stress (oxidative and anti-oxidative activity) and meat quality of slaughter pigs, Kagoshima Kurobuta (Berkshire pig), in summer and winter.

Carcass results, blood exsanguinated, pork loin of each 12 pigs in summer and winter were collected. The 24 blood biochemical concentrations, 4 blood stress marker concentrations including cortisol and catecholamine, and blood oxidation stress including d-ROMs test (oxidative activity) and BAP test (anti-oxidative activity, Wismerll Co., Ltd. Tokyo, Japan) were measured. The concentrations of 28 free amino acids including glutamic acid (Glu, one of flavor components) in the blood, lean (muscle) and fat of all pigs were also measured.

In winter, carcass results showed good tendency, and the concentrations of 5 free amino acids not including Glu in lean and the concentrations of 14 free amino acids including Glu in fat were increased compared with those in summer.

On the other hand, in summer, increase of blood d-ROMs levels, decrease of blood sodium and chlorine concentrations suggesting dehydration, increase tendency of blood lactate dehydrogenase and creatine kinase concentrations suggesting muscle injury were recognized while the stress marker concentrations did not increase. These findings were considered that the blood oxidative activity was related to the deterioration of health in Kagoshima Kurobuta.

Therefore, this study suggests that blood oxidation stress may be able to evaluate the meat quality in vivo before slaughter in domestic swine while further studies are required to reveal the concentrations of total amino acids in the lean and fat for meat quality evaluation.

1. 目 的

鹿児島県の特産品である鹿児島（六白）黒豚（バークシャー種）は肉質や脂肪分の食味などが

良好であるという長所を有する¹⁾。一方、出生数が少ない、成長も遅いため出荷までに長期間を要するという短所も有する。よって、と畜前の生体で肉質を評価することは有用であり、本研究では

と畜前の採血で評価可能な「血中酸化ストレス」に着目した。

酸化ストレスはがんや動脈硬化、ひいては老化や健康状態にも関連すると報告されている²⁾。本研究で用いる酸化ストレス検査キット、d-ROMsテスト（酸化度）およびBAPテスト（抗酸化力）で、川口らが開発したミニ豚動脈硬化モデル^{3~8)}を用いて検討した結果、動脈硬化発症と血中酸化ストレスに関連があることが確認でき、家畜豚においても酸化ストレスは健康の指標としても応用できる可能性が示唆された。また、家畜動物においては、より健康に飼育されることが肉質の向上に寄与する。よって、と畜前の血中酸化ストレス評価により、肉質を評価できる可能性があると着想した (Fig. 1)。

一方、養豚では夏季の暑熱ストレスがみられ、肉質にも影響することが知られている。本研究では、と畜鹿児島黒豚の夏季および冬季の血液および精肉サンプルを食肉センターよりダイレクトに入手し、健康の指標となり得る血中酸化ストレスと肉質との関連を検討することを目的とした。

2. 材料と方法

概要：鹿児島黒豚を対象とし、夏季および冬季に食肉センターで供試動物のと殺時放血血液を採取し、同個体のロースを肉質評価部位として入手した。

2.1 材料（動物）：と畜鹿児島六白黒豚24頭（雌，去勢雄混在）

2.2 群分け：夏季（Summer：8～9月）、冬季（Winter：11～12月）各12頭を無作為に選抜。

2.3 枝肉成績（Carcass result）、背脂肪厚（Back fat thickness）、枝肉重量（Carcass weight）：日本格付協会による格付けを実施した。

枝肉成績はスコア化して（上物：3点，中物：2点，並物：1点，外物：0点），解析した。

2.4 内臓廃棄処分（Internal organs disposal）の発生率

2.5 サンプリング：放血血液およびロース（筋肉および脂身を含む可食部）

2.6 血液処理

血清は30分以上放置後（室温），血漿は採取後なるべく早く（4℃），3,000回転，15分で遠心分離し，分注した。

2.7 血液検査

2.7.1 一般生化学値 (Table 2)

【24項目】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)，アルカリホスファターゼ (ALP)， γ -グルタミルトランスフェラーゼ (γ -GTP)，乳酸脱水素酵素 (LDH)，クレアチンキナーゼ (CK)，総ビリルビン (T-Bil)，直接

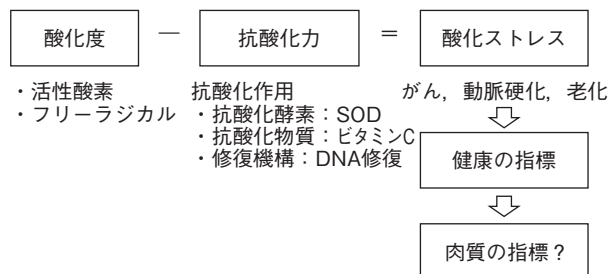


Fig. 1 酸化ストレスと肉質指標の関連の概念

ビリルビン (D-Bil), 血中尿素窒素 (BUN), クレアチニン (Cre), ナトリウム (Na), 塩素 (Cl), カリウム (K), カルシウム (Ca), 無機リン (IP), 中性脂肪 (TG), 総タンパク (TP), アルブミン (Alb), 血糖 (Glu), 総コレステロール (T-Cho), 高比重リポタンパクコレステロール (HDL-C), 低比重リポタンパクコレステロール (LDL-C), アミラーゼ (Amy), 尿酸 (UA)

2.7.2 ストレスマーカー値 (4項目, Table 3)

コルチゾール (EIA kit)

カテコラミン3分画 (HPLC): アドレナリン, ノルアドレナリン, ドーパミン

2.7.3 酸化ストレス (3項目, Table 4)

d-ROMsテスト (酸化度, 株式会社ウイスマー, 東京), BAPテスト (抗酸化力, 株式会社ウイスマー), BAP/d-ROMs。

測定機器: FREE Carrio Duo (株式会社ウイスマー)。

2.7.4 遊離アミノ酸濃度測定 (Table 5)

EZ: faast (株式会社島津ジーエルシー, 東京)

LC-MS機器: Acquity ultra-performance liquid chromatography (UPLC)/Acquity TQD tandem-quadrupole mass spectrometer: Waters, Milford, MA, USA)

[28項目] グルタミン [Glutamine (Gln)], アルギニン [Arginine (Arg)], シトルリン [Citrulline (Cit)], グリシン [Glycine (Gly)], アラニン [Alanine (Ala)], β -アラニン [β -Alanine (bAla)], セリン [Serine (Ser)], アスパラギン [Asparagine (Asn)], トレオニン [Threonine (Thr)], プロリン [Proline (Pro)], メチオニン [Methionine (Met)], オルニチン [Ornithine (Orn)], バリン [Valine (Val)], アスパラギン酸 [Aspartic acid (Asp)], グルタミン酸 [Glutamic acid (Glu)], トリプトファン [Tryptophan (Trp)], リシン [Lysine (Lys)], ヒスチジン [Histidine (His)],

ロイシン [Leucine (Leu)], イソロイシン [Isoleucine (Ile)], フェニルアラニン [Phenylalanine (Phe)], チロシン [Tyrosine (Tyr)], シスチン [Cystine (Cys)], アルギニノコハク酸2 [Argininosuccinic acid 2 (ASA2)], アルギニノコハク酸1 [Argininosuccinic acid 1 (ASA1)], セロトニン [Serotonin (SRO)], アドレナリン [Adrenaline (AND)], ドーパミン [Dopamine (DOPA)]

2.8 筋肉および脂肪における遊離アミノ酸濃度測定 (EZ: faast, LC-MS, 上記同様の28項目)

組織を0.2 g採取し, 3%過塩素酸を加えホモジナイズ。4℃, 10,000回転, 10分間で遠心分離し, 上清をKHCO₃で中和し, 検体とした。これらの検体の遊離アミノ酸 (28項目) を2.7と同様にEZ: faast, LC-MSを用いて測定した。

2.9 統計解析

測定値は平均値 (Mean) $\pm$ 標準偏差 (standard deviation: SD) で示す。統計はIBM SPSS統計ソフトを用いた。発生率 (%) および枝肉成績のスコア評価についてはPearsonのカイ2乗検定あるいはFisherの正確確率検定を実施した。計測値, 測定値についてはMann-Whitney U testを実施し, $p < 0.05$ で有意とした。

3. 結果と考察

3.1 枝肉成績と内臓廃棄処分の発生率 (Table 1)

夏季に比べ, 冬季では格付成績が良好の傾向がみられ, 背脂肪厚が有意に少なかった。枝肉重量, 肝臓および胃腸廃棄発生率に差はなかった。本試験では心臓廃棄はみられなかった。以上より, 冬季の方が, 枝肉成績が良いと判断された。

3.2 血液一般生化学値 (Table 2)

冬季に比べ, 夏季では血中のナトリウムおよび

Table 1 Inspection of carcasses and internal organs disposal result

Group	Animal No.	Carcass result score*				Internal organs disposal		
		Result (score*)	Back fat thickness (cm)	weight (kg)		Heart	Liver	Stomach and intestines
Summer	1	1	4.4	77.4			Yes	Yes
	2	1	4.0	71.6			Yes	
	3	1	4.1	81.9			Yes	
	4	2	2.7	78.4			Yes	Yes
	5	1	4.0	79.9				Yes
	6	1	3.5	77.6			Yes	Yes
	7	1	3.5	76.4			Yes	Yes
	8	1	4.2	76.0				
	9	1	5.2	78.4				
	10	1	3.5	81.3				
	11	1	4.0	81.3				
	12	1	5.5	83.9				
	Mean	1.1	4.1	78.7	The number Incidence (%)	0	6	5
Standard deviation	0.3	0.8	3.3	(0)		(50.0)	(41.7)	
Winter	13	1	3.3	83.9			Yes	
	14	1	3.8	79.0				
	15	3	2.2	77.8				
	16	1	1.2	80.9				
	17	3	1.6	74.0			Yes	Yes
	18	1	3.1	81.7			Yes	Yes
	19	2	2.4	82.5			Yes	
	20	2	2.5	78.2			Yes	
	21	3	1.5	77.4				
	22	2	2.6	76.4			Yes	
	23	1	2.3	87.5				Yes
	24	1	3.0	87.7				Yes
	Mean	1.8	2.5	80.6	The number Incidence (%)	0	6	4
Standard deviation	0.9	0.8	4.3	(0)		(50.0)	(33.3)	
	<i>p</i> -value	0.065*	0.000	0.340	<i>p</i> -value		1.00#	1.00#

*Score : 3 : high grade, 2 : middle grade, 1 : low grade. Pearson's chi-square test.

#Fisher's exact test

塩素濃度が有意に低かった。これらより、夏季では脱水が発生していることが示唆され、低張性脱水（二次性脱水）が、高張性脱水（一次性脱水）かの精査が今後必要と考えられる。

有意ではないが、冬季に比べ、夏季では乳酸脱水素酵素（約1.5倍）、クレアチンキナーゼ（約3倍）が高かった。これらより、夏季では筋肉傷害の発生は示唆される。

3.3 血中ストレスマーカー値 (Table 3)

夏季と冬季の間に血中ストレスマーカー値の差はみられなかった。

3.4 血中酸化ストレス濃度 (Table 4)

冬季に比べ、夏季では血中のd-ROMs（酸化度）が有意に高かった。3.2より、夏季では脱水や筋肉傷害といった健康状態悪化が示唆されており、血中酸化ストレスと健康状態悪化には関連があると考えられた。

3.5 血中遊離アミノ酸濃度 (Table 5)

冬季に比べ、夏季ではトレオニンが有意に高かった。トレオニンは肝臓の脂肪蓄積防止や成長促進などの効果が一般に知られている。豚においては、夏季の背脂肪厚が多いことより、脂質代謝

Table 2 Blood biochemical concentrations

No.	Item	unit	Summer	Winter	p-value
1	AST	U/l	55.1 ± 64.7	52.1 ± 53.5	0.623
2	ALT	U/l	20.1 ± 8.0	25.7 ± 6.9	0.064
3	ALP	U/l	414.5 ± 162.6	396.2 ± 100.8	0.954
4	γ-GTP	U/l	52.7 ± 26.2	45.1 ± 10.9	0.795
5	LDH	U/l	1143.6 ± 829.8	737.9 ± 207.4	0.119
6	CK	U/l	11149.8 ± 23757.1	3778.4 ± 4034.7	0.453
7	T-Bil	mg/dl	0.13 ± 0.06	0.08 ± 0.06	0.063
8	D-Bil	mg/dl	0.07 ± 0.05	0.06 ± 0.05	0.680
9	BUN	mg/dl	8.0 ± 2.0	8.0 ± 3.1	0.862
10	Cre	mg/dl	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.2	1.000
11	Na	mEq/l	148.5 ± 4.0	151.8 ± 4.3	0.032
12	Cl	mEq/l	98.6 ± 2.3	101.1 ± 3.4	0.048
13	K	mEq/l	7.2 ± 1.0	7.3 ± 1.1	0.665
14	Ca	mg/dl	11.3 ± 0.6	11.2 ± 0.5	0.862
15	IP	mg/dl	8.9 ± 0.9	9.1 ± 0.5	0.435
16	TG	mg/dl	45.4 ± 18.3	33.0 ± 15.9	0.060
17	TP	g/dl	8.2 ± 0.5	7.9 ± 0.6	0.052
18	Alb	g/dl	4.5 ± 0.4	4.8 ± 0.3	0.163
19	Glu	mg/dl	132.9 ± 35.0	138.8 ± 24.3	0.402
20	T-Cho	mg/dl	111.1 ± 15.7	109.5 ± 11.2	0.885
21	HDL-C	mg/dl	41.8 ± 7.9	47.3 ± 9.1	0.149
22	LDL-C	mg/dl	58.8 ± 9.1	55.5 ± 4.9	0.369
23	Amy	U/l	1836.0 ± 600.4	2095.8 ± 894.3	0.525
24	UA	mg/dl	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	1.000

Table 3 Blood stress marker concentrations

No.	Item	unit	Summer*	Winter	p-value
1	Cortisol	μg/dl	4.6 ± 2.3	4.5 ± 2.4	0.902
2	Adrenalin	ng/ml	42.9 ± 15.7	46.2 ± 28.7	0.268
3	Noradrenaline	ng/ml	49.3 ± 19.9	41.2 ± 26.5	0.599
4	Dopamine	ng/ml	not detected	not detected	

*n=11

Table 4 Blood oxidative stress

No.	Item	unit	Summer	Winter	p-value
1	d-ROMs	UCARR	1106.2 ± 136.6	970.8 ± 83.0	0.017
2	BAP	μmol/L	4123.0 ± 771.7	4000.2 ± 306.4	0.356
3	BAP/d-ROMs		3.8 ± 0.9	4.1 ± 0.4	0.488

とトレオニンとの関連の精査が今後必要と考えられる。

有意ではないが、冬季に比べ、夏季ではβ-アラニン（約1.3倍）、グルタミン酸（約1.3倍）が高かった。

β-アラニンは筋肉中に存在し、筋肉疲労の予

防効果が知られており、3.2で述べた筋肉傷害との関連の精査が今後必要と考えられる。

グルタミン酸は3大旨味成分の1つであり、さらに①脳の活性化、②整胃・整腸、③脂肪の蓄積の抑制、④血圧降下、⑤ストレス抑制（リラックス効果）といった効果が知られており、3.4で述

Table 5 Free amino acid concentrations in blood

No.	Name	Summer		Winter		p-value
		Number detected		Number detected		
1	Gln	11	378.7 ± 78.0	12	361.2 ± 64.1	0.758
2	Arg	11	160.6 ± 37.9	12	165.9 ± 24.7	0.538
3	Cit	11	67.0 ± 13.5	12	60.9 ± 9.7	0.498
5	Gly	11	451.2 ± 129.8	12	417.6 ± 119.5	0.712
6	Ala	11	302.9 ± 94.6	12	275.1 ± 53.6	0.758
7	bAla	11	4.0 ± 1.2	12	3.0 ± 1.0	0.064
8	Ser	11	121.5 ± 23.3	12	117.3 ± 30.6	0.268
9	Asn	11	24.5 ± 8.5	12	24.3 ± 11.2	0.372
10	Thr	11	103.1 ± 30.1	12	75.0 ± 19.3	0.003
11	Pro	11	163.8 ± 48.7	12	158.3 ± 31.5	0.389
12	Met	11	28.2 ± 7.5	12	27.5 ± 6.0	0.805
14	Orn	11	41.8 ± 17.6	12	47.7 ± 10.5	0.060
15	Val	11	268.7 ± 59.8	12	259.5 ± 66.7	0.667
16	Asp	11	6.4 ± 5.4	11	8.3 ± 5.6	0.358
17	Glu	11	191.0 ± 64.3	12	152.3 ± 55.3	0.065
18	Trp	11	50.1 ± 11.5	12	49.2 ± 11.4	0.854
19	Lys	11	159.0 ± 42.5	12	144.4 ± 21.4	0.622
20	His	11	55.5 ± 13.1	12	57.4 ± 9.0	0.853
21	Leu	11	176.6 ± 31.9	12	170.0 ± 26.8	0.782
22	Ile	11	132.1 ± 23.2	12	130.7 ± 19.9	0.758
23	Phe	11	75.7 ± 15.3	12	68.1 ± 9.3	0.242
25	Tyr	11	63.8 ± 14.8	12	54.3 ± 12.7	0.424
26	Cys	11	38.9 ± 8.7	12	36.6 ± 4.7	0.388
27	ASA2	8	3.1 ± 0.2	12	3.1 ± 0.3	0.232
28	ASA1	11	2.7 ± 0.7	12	2.6 ± 0.7	0.479
29	SRO	8	6.9 ± 3.0	10	4.9 ± 1.8	0.142
31	ADN	11	4.0 ± 0.3	8	3.8 ± 1.0	0.444
32	DOPA	8	4.0 ± 0.1	12	3.0 ± 1.5	0.682

unit : nmol/ml

べた健康状態との関連の精査が今後必要と考えられる。

3.6 筋肉中遊離アミノ酸濃度 (Table 6)

その他では、メチオニン、ヒスチジン、イソロイシン、フェニルアラニン、シスチンが夏季に比べ、冬季では有意に高かった。このように、複数の遊離アミノ酸が冬季で高値を示していることから、冬季の方が赤肉の質が良いと考えられた。

また、イソロイシンは分岐鎖アミノ酸 (Branched chain amino acids : BCAA) の1つであり、運動による筋肉中のタンパク質の分解予防効果がある。3.2および3.5で述べた筋肉傷害と総合的に考察すると、夏季では、筋肉傷害が発生しており、

筋肉中の β -アラニンが血中に拡散し血中濃度が上昇している、あるいは、筋肉傷害を改善するために β -アラニンの血中濃度が高くなっていることが推察される。

一方、ドーパミンが夏季に比べ、冬季では有意に低かった。ドーパミンが冬季に低値を示すことは、ストレス軽減 (リラックス効果) との関連が考えられ、今後精査が必要である。

グルタミン酸は夏季と冬季の間に差がみられなかった。

3.7 脂肪中遊離アミノ酸濃度 (Table 7)

夏季に比べ、冬季ではグルタミン、アルギニン、アラニン、 β -アラニン、セリン、プロリン、メ

Table 6 Free amino acid concentrations in lean (muscle)

No.	Name	Summer		Winter		p-value
		Number detected		Number detected		
1	Gln	12	1024.2 ± 944.5	12	1599.6 ± 1697.1	0.525
2	Arg	12	85.2 ± 21.0	12	102.9 ± 48.0	0.729
3	Cit	12	28.5 ± 28.6	11	33.4 ± 34.6	0.926
5	Gly	12	853.2 ± 332.1	12	866.6 ± 407.0	0.488
6	Ala	12	1320.0 ± 1243.9	12	1306.4 ± 469.8	0.073
7	bAla	12	2352.6 ± 792.1	12	2418.7 ± 1435.7	0.603
8	Ser	12	186.7 ± 82.8	12	239.3 ± 89.7	0.057
9	Asn	11	80.6 ± 49.6	7	61.3 ± 43.0	0.684
10	Thr	12	113.4 ± 59.8	12	108.0 ± 66.9	0.729
11	Pro	12	223.3 ± 78.6	12	256.4 ± 85.0	0.083
12	Met	12	68.8 ± 25.9	12	112.3 ± 69.5	0.035
14	Orn	9	37.2 ± 43.8	10	45.5 ± 36.7	0.120
15	Val	12	298.8 ± 94.5	12	332.2 ± 125.5	0.106
16	Asp	4	18.0 ± 8.5	12	17.4 ± 20.3	0.496
17	Glu	12	595.4 ± 289.9	12	610.1 ± 243.9	0.386
18	Trp	12	20.9 ± 12.7	9	32.5 ± 6.7	0.013
19	Lys	12	272.5 ± 135.5	12	270.4 ± 65.9	0.644
20	His	12	276.5 ± 73.8	12	352.8 ± 87.6	0.009
21	Leu	12	244.1 ± 54.8	12	293.3 ± 83.6	0.083
22	Ile	12	133.7 ± 26.0	12	173.3 ± 39.9	0.008
23	Phe	12	104.7 ± 26.7	12	144.4 ± 50.6	0.013
25	Tyr	12	98.0 ± 20.5	12	106.9 ± 37.3	0.525
26	Cys	12	7.5 ± 4.6	12	11.5 ± 6.0	0.041
27	ASA2	9	42.5 ± 14.0	12	43.7 ± 17.9	0.499
28	ASA1	11	38.1 ± 16.9	12	42.6 ± 23.5	0.096
29	SRO	4	44.8 ± 4.9	4	40.1 ± 2.3	0.166
31	ADN	4	31.4 ± 1.0	1	30.0	—
32	DOPA	8	30.6 ± 0.7	10	23.7 ± 10.7	0.008

unit : nmol/g

チオニン、パリン、トリプトファン、リシン、ヒスチジン、フェニルアラニン、アルギニノコハク酸 2 が有意に高かった。

グルタミン酸は、有意ではないが、夏季に比べ、冬季で高値（1.4倍）を示した。

多くの遊離アミノ酸は冬季で高値を示しており、冬季の方が脂身の質が良いと考えられた。

4. 要 約

養豚では夏季の暑熱ストレスがみられ、肉質にも影響することが知られている。本研究では、夏季および冬季のと畜鹿兒島黒豚（パークシャー種）を用いて、健康の指標である血中酸化ストレ

ス（酸化度と抗酸化力）と肉質との関連を検討することを目的とした。

夏季および冬季の各12頭の豚について、と殺時放血血液を採取し、枝肉を評価、さらに同個体の可食部ロースを入手した。血液検査では、24項目の一般生化学値、4項目のストレスマーカー値（コルチゾールおよびカテコラミン）および酸化ストレス〔d-ROMs（酸化度）およびBAP（抗酸化力）テスト、株式会社ウイスマー）を測定した。旨味成分の1つであるグルタミン酸を含む28項目の遊離アミノ酸濃度の測定は、血清、赤身（筋肉）および脂身（脂肪）について実施した。

結果、冬季では、夏季と比べ、枝肉成績が良好

Table 7 Free amino acid concentrations in fat

No.	Name	Summer		Winter		p-value
		Number detected		Number detected		
1	Gln	12	54.3 ± 13.2	12	143.2 ± 107.1	0.013
2	Arg	12	10.5 ± 1.4	12	23.2 ± 9.3	0.001
3	Cit	12	4.0 ± 1.0	12	7.6 ± 6.4	0.119
5	Gly	12	112.4 ± 40.1	12	172.3 ± 107.6	0.817
6	Ala	12	134.0 ± 50.3	12	361.1 ± 272.1	0.015
7	bAla	12	7.9 ± 10.1	12	56.4 ± 50.9	0.009
8	Ser	12	33.8 ± 10.4	12	82.3 ± 56.1	0.013
9	Asn	12	6.9 ± 5.1	12	15.0 ± 12.8	0.729
10	Thr	12	17.9 ± 4.4	12	35.2 ± 23.4	1.000
11	Pro	12	29.6 ± 12.7	12	62.2 ± 44.2	0.018
12	Met	12	5.2 ± 3.0	12	18.1 ± 15.9	0.003
14	Orn	11	2.8 ± 1.9	11	4.1 ± 2.5	0.071
15	Val	12	34.1 ± 18.3	12	78.4 ± 61.5	0.021
16	Asp	12	9.1 ± 4.2	12	19.9 ± 17.1	0.299
17	Glu	12	183.6 ± 54.1	12	253.0 ± 154.3	0.862
18	Trp	12	4.9 ± 2.5	12	10.5 ± 10.2	0.038
19	Lys	12	24.0 ± 11.2	12	54.1 ± 41.8	0.009
20	His	12	9.5 ± 4.5	12	31.7 ± 23.0	0.003
21	Leu	12	20.5 ± 4.3	12	41.8 ± 17.8	0.050
22	Ile	12	10.0 ± 3.5	12	19.4 ± 9.8	0.419
23	Phe	12	8.7 ± 1.6	12	17.2 ± 7.2	0.033
25	Tyr	12	8.3 ± 1.7	12	18.0 ± 8.9	0.106
26	Cys	12	5.9 ± 1.4	12	5.3 ± 2.9	0.273
27	ASA2	12	0.8 ± 0.2	12	1.1 ± 0.5	0.021
28	ASA1	12	0.8 ± 0.3	12	1.1 ± 0.6	0.119
29	SRO	1	0.5	1	0.6	—
31	ADN	4	1.0 ± 0.0	3	0.7 ± 0.4	0.480
32	DOPA	7	1.0 ± 0.1	9	0.8 ± 0.5	0.259

unit : nmol/g

な傾向で、赤肉ではグルタミン酸以外の5つの遊離アミノ酸の濃度が高値を示し、脂身ではグルタミン酸を含む14の遊離アミノ酸の濃度が高値を示した。

一方、夏季では、暑熱ストレスによる血中ストレスマーカー濃度の上昇はみられなかったが、血中d-ROMs濃度の上昇、脱水を示唆する血中ナトリウムおよび塩素濃度の減少、および筋肉傷害を示唆する乳酸脱水素酵素およびクレアチンキナーゼ濃度の増加傾向がみられた。これらより鹿児島黒豚では血中酸化度と健康状態悪化には関連があると考えられた。

本研究では、家畜豚のと畜前の生体で肉質を評

価するマーカーとして血中酸化ストレスが有用であることが示唆された。また、本研究では旨味成分として遊離アミノ酸（特に遊離グルタミン酸）の評価を行ったが、今後、赤肉および脂身について、総アミノ酸濃度を測定し、肉質をさらに精査する必要がある。

引用文献

- 1) 川口博明, 秋岡幸兵, 北島沢子, 有村恵美, 三好宣彰: 六白黒豚におけるどんぐり給与が肉質特性に及ぼす影響について—井辺野黒豚の開発—, 鹿児島大学農学部学術報告 第61号, p17-21, 2011.
- 2) Yagi, H., Sumino, H., Yoshida, K., Aoki, T., Tsunekawa, K., Araki, O., Kimura, T., Nara, M., Nakajima, K., Murakami, M.: Biological Antioxidant

- Potential Negatively Correlates With Carotid Artery Intima-Media Thickness, *Int Heart J*, **57**, 220~225, 2016.
- 3) Kawaguchi, H., Yamada, T., Miura, N., Ayaori, M., Uto-Kondo, H., Ikegawa, M., Noguchi, M., Wang, K. Y., Izumi, H., Tanimoto, A. : Rapid Development of Atherosclerosis in the World's Smallest Microminipig fed a high-fat/high cholesterol diet : A Useful Animal Model Because of its Size and Similarity to Human Pathophysiology, *J Atheroscler Thromb*, **21**, 186~203, 2014.
- 4) Yamada, S., Kawaguchi, H., Yamada, T., Guo, X., Matsuo, K., Hamada, T., Miura, N., Tasaki, T., Tanimoto, A. : Cholic Acid Enhances Visceral Adiposity, Atherosclerosis and Nonalcoholic Fatty Liver Disease in Microminipigs, *J Atheroscler Thromb*, **24**, 1150~1166, 2017.
- 5) Kakimoto, T., Otsuka, A., Kawaguchi, H., Ogata, K., Tanimoto, A., Kanouchi, H. : Plasma Homocysteine Concentrations in Novel Microminipigs, *In Vivo*, **28**, 579~582, 2014.
- 6) Akioka, K., Kawaguchi, H., Kitajima, S., Miura, N., Noguchi, M., Horiuchi, M., Miyoshi, N., Tanimoto, A. : Investigation of necessity of sodium cholate and minimal required amount of cholesterol for dietary induction of atherosclerosis in microminipigs, *In Vivo*, **28**, 81~90, 2014.
- 7) Kawaguchi, H., Miyoshi, N., Miura, N., Fujiki, M., Horiuchi, M., Izumi, Y., Miyajima, H., Nagata, R., Misumi, K., Takeuchi, T., Tanimoto, A., Yoshida, H. : Microminipig, a non-rodent experimental animal optimized for life science research : novel atherosclerosis model induced by high fat and cholesterol diet, *J Pharmacol Sci*, **115**, 115~21, 2011.
- 8) Miyoshi, N., Horiuchi, M., Inokuchi, Y., Miyamoto, Y., Miura, N., Tokunaga, S., Fujiki, M., Izumi, Y., Miyajima, H., Nagata, R., Misumi, K., Takeuchi, T., Tanimoto, A., Yasuda, N., Yoshida, H., Kawaguchi, H. : Novel microminipig model of atherosclerosis by high fat and high cholesterol diet, established in Japan, *In Vivo*, **24**, 671~680, 2010.

タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの 活性増強と基質認識機構の改変（Ⅲ）

Activity enhancement and substrate specificity modification of microbial
transglutaminase by protein engineering

滝 田 禎 亮

(京都大学大学院農学研究科食品生物科学専攻)

Teisuke Takita

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

I purified the product from the reaction mixture by HPLC, whose fluorescence changes suggested fluorescence resonance energy transfer occurred as a result of the crosslinking of two fluorescent peptides by the transglutaminase from *Geobacillus stearothermophilus* (GsTgl). LC/MS analysis revealed that the fluorescence changes were caused not by cross-linking of peptides but by cleavage of a peptide, suggesting that GsTgl possesses amide bond-cleaving activity. I compared the thermal stability of GsTgl with the one in which its characteristic C-terminal short extension (EX) is eliminated and instead His-tag is added (GsTglΔEX (His)₆). The results suggested that Ex contributes favorably to the thermal activity at 50-60°C but not at 70-80°C. I purified the transglutaminase from *Bacillus subtilis* (BsTgl (His)₆) and the mature form of the transglutaminase from *Streptomyces mobaraensis* (SmTG-M (His)₆). For the four enzymes, I compared the BSA cross-linking activity and the BSA modifying activity with dansylcadaverine. The results indicated that SmTG-M (His)₆ has the very highest activity in both cases. Interestingly, GsTglΔEX (His)₆ showed higher activity than GsTgl, suggesting that EX also contributes to the activity. I estimated mutational frequency in error-prone PCR and constructed the GsTglΔEX (His)₆ expression vector into which the amplified fragments were introduced. In addition, I succeeded in improvement of the screening system for the isolation of GsTgl with desired substrate specificity.

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 (SmTG) が商品化されている。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、TGにおいて利用されない。TGにより、さらに食肉の弾力性や食感の改善をもたらすためには、本来の活性の増強や基質特異性の拡大が望まれる。最近、*Bacillus subtilis*由来TG (BsTgl) の結晶構造と特性が報告された¹⁾。

中等度好熱菌の*Geobacillus stearothermophilus* 由来のTG (GsTgl) は、BsTglにないC末端伸長配列 (EX: 27残基) を有する²⁾。昨年度、申請

者は、以下を行った。

1. Ni^{2+} カラムで精製可能な2種のGsTgl発現系の構築: C末端に (AspSer)₅ リンカーとHisタグをもつGsTgl(DS)₅(His)₆; EXを欠失しHisタグをもつGsTgl Δ EX(His)₆。

2. FRETペプチド対を用いた酵素活性測定法の検討 (FRET法)。

3. GsTgl Δ EX(His)₆変異体の精製と、上記活性測定法による活性比較。

4. アンピシリン (Amp) 耐性を指標に目的GsTglをスクリーニングのためのTEM1 β -ラクタマーゼ (TEM1) 2断片とGsTglの共発現系の構築 (Amp耐性スクリーニング系)。これらの結果をもとに、本年度は以下を申請した。

1. FRET法の反応生成物の分析。
2. FRET法により同定した活性増強変異をもつ多重変異体の作製。
3. GsTgl, BsTgl, SmTGの熱安定性と架橋活性の比較。
4. Error-prone PCRの検討, 発現ベクターの構築, 変異体の選抜。
5. Amp耐性スクリーニング系の再現性の向上と変異体の選抜。
6. X線結晶構造解析。

2. 方 法

2.1 FRET法の反応生成物の分析

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 (50 μM) を, GsTgl(DS)₅(His)₆ (2.6 μM) 存在下に, 37°Cで反応させた (40 μl)。70 μl の滅菌蒸留水を添加し, HPLCに供した (Fig. 1)。カラムは, ナカライテスクのLaChrom C18 (4.6 mm I.D. $\times$ 150 mm L.)。流速は 1 ml/min。移動相は, A: 水 + 0.1% TFAと B: アセトニトリ

ル + 0.1% TFA。グラジエントは: 100% A (0 min) $\rightarrow$ 100% A (10 min) $\rightarrow$ 30% A (60 min)。蛍光分析は, 島津RF-5300PCを用い, 反応液を水で希釈後, 励起波長 (Ex) = 325 nmで測定した。LC/MS分析は, 以下の条件で行った。LC: Agilent1260。カラム: CAPCELL PAK C18 UG120。MS: QTRAP AP 3200 LC/MS/MS。Ionization mode: ESI-positive ion mode。Scan mode: Enhanced MS。

2.2 BsTglとSmTGの発現系の構築と精製

*B. subtilis*ゲノムDNAを鋳型に, BsTgl遺伝子を, *Nde*I部位をもつプライマー (以後, *Nde*Iプライマーと表記) と*Xho*IプライマーでPCR増幅し, pET-22bに導入した。SmTG人工遺伝子を合成した (Invirogen)。本遺伝子を, *Nde*Iプライマーと*Xho*IプライマーでPCR増幅し, pET-22bに導入した (pET-22b_SmTG)。SmTGはPro領域を付加して発現し, 成熟体にするにはDispace Iなどで処理する必要がある。そこで, N末端にPelBシグナル配列を付加したPro領域と成熟領域のタンデム発現系を構築した³⁾。pET-22b_SmTGの成熟領域の*Stu*I部位をQuikChange法 (QC法) で除いた (pET-22b_SmTG_*Stu*I (x))。本プラスミドのPro領域を, *Nco*Iプライマーと*Bam*HIプライマーで増幅後, pET-22bに導入した (pET-22b-pelB-Pro)。本プラスミドを*Nde*Iと*Bam*HIで処理後, GSTタグ配列を除いたpET-42aに導入した (pET-42a(-GST)-pelB-Pro)。pET-22b_SmTG_*Stu*I(x)の成熟領域を, *Nco*Iプライマーと*Xho*Iプライマーで増幅後, pET-22bに導入した (pET-22b-pelB-Mat(His)₆)。本プラスミドのT7プロモーターの上流とT7ターミネーターの下流に, QC法で*Stu*I部位を導入した。本プラスミドを*Stu*Iで処理後, pET-42a (-GST)-pelB-Proの*Stu*I部位に導入した。

2.3 GsTglの精製法の改良と結晶化

精製操作は4℃以下で行い、緩衝液は20 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いた。培養液を超音波破碎し、遠心上清を硫酸分画し、30-60%画分をDEAE-トヨパール(東ソー)に供し、0-1 M NaClで溶出した。目的画分をHiPrep Phenyl HP 16/10 (GE Healthcare) に供し、1-0 M硫酸で溶出した。目的画分をHiLoad Superdex 200 (GE Healthcare) に供した。結晶化には、Crystal Screen™ 1 & 2 とPEG Ionキット(Hampton Research)とWizard 1 & 2キット (Rigaku) を用い、シッティングドロップ法を行った。

2.4 Error-prone PCRの検討と発現ベクターの構築

GsTgl配列の*Hind*IIIと*Nco*I部位に挟まれた領域 (0.7kbp) を、鋳型濃度 (pET11a-GsTgl (DS)₅(His)₆ : 0.001-1 ng/ul) を変化させ、GeneMorph II Random Mutagenesis kit (Agilent Technologies)を用い、*Hind*IIIプライマーと*Nco*IプライマーでPCR増幅した (1st PCR)。反応液を鋳型に、ExTaq DNA polymerase HS (タカラ)を用い、*Hind*IIIプライマーと*Nco*IプライマーでPCR増幅した (2nd PCR)。増幅断片を*Hind*IIIと*Nco*Iで処理後、新規作成の*Nco*I部位をもつpUC19 (pUC19_*Nco*I) に導入した。各条件で3個のコロニーを配列解析し、変異導入頻度を算出した。*Hind*IIIと*Nco*Iで処理した増幅断片を導入するため、pET11a_GsTgl(DS)₅(His)₆のpET11a領域にある*Hind*III部位をQC法で除いた (pET11a_GsTgl(DS)₅(His)₆_HindIII(x))。

2.5 熱安定性の比較

TGを5分間熱処理後、20分間氷上に静置し、FRET法により酵素活性を求めた。50 μM KA-MCAと50 μM Z-DQMD-AFCを、5 μM TG存在下に、pH 8.0, 37℃で反応させた。反応後、水で300倍希釈し、Ex = 325 nmで、発光波長 (Em)

= 440 nmの蛍光強度から酵素活性を求めた。熱処理なしの酵素活性に対する比で、残存活性 (%) を示した。

2.6 架橋活性の比較

2.6.1 BSA架橋活性: 1 mM DTT存在下に、6 μM BSAとTGを、pH 8.0, 37℃で反応させた。TG濃度は以下とした: 5.3 μM GsTgl; 0.81 μM GsTgl Δ EX (His)₆; 1.6 μM BsTgl (His)₆; 0.081 μM SmTG-M (His)₆。反応液をSDS-PAGEに供した。

2.6.2 ダンシルカダベリン (dCAD) のBSAへの架橋活性: 1 mM DTT存在下に、6 μM BSA, 200 μM dCAD, およびTGを、pH 8.0, 37℃で反応させた (74 μl)。TG濃度は以下とした: 1.3 μM GsTgl; 0.81 μM GsTgl Δ EX (His)₆; 1.3 μM BsTgl (His)₆; 0.081 μM SmTG-M (His)₆。反応液に20% TCA (25 μl) を加え、氷上に10分放置後、4℃で遠心分離した (20000 × g, 10分)。沈殿に5% TCA (200 μl) を加え、4℃で遠心分離した (3回)。沈殿に5% SDS溶液を加え、100℃で5分加熱後、水200 μlを加えた。Ex = 325 nmで、Em = 440 nmの蛍光強度を測定した。蛍光増加速度を酵素濃度で除した値を活性とし、GsTglに対する比で表した。

2.7 Amp耐性スクリーニング系の再現性の向上と改良

70 μg/mlカナマイシン (Kan) を含むLB培地 (5 ml) に、TEM 1断片遺伝子 (N-195および196-C) やGsTgl(DS)₅(His)₆遺伝子をタンデムに配置したpET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆等のプラスミドをもつ大腸菌BL21 (DE3) を37℃で一晩培養した。培養液(100 μl)と Overnight Express™ Autoinduction Systems (Merck Millipore) の試薬を70 μg/ml Kanを含むLB培地 (5 ml) に加え、15-37℃で培養し、100-500 μg/ml Ampと1 mM IPTGを含む

LBプレートに塗布し、20-37℃での生育を観察した。TEM 1 の結晶構造から、E195の近傍には、L196に加えL199が存在することが示唆された。そこで、新たにpET42a(-GST)_N-195/E195Q_196-C/L199K等をこれまでと同様の方法で作製した。

3. 結果と考察

3.1 FRET法の反応生成物の分析

KA-MCAとZ-DQMD-AFCを反応させると、KA-MCAのピークのみが消失し、28 minに生成物が出現した (Fig.1 (a))。KA-MCAのみを反応させても、同様の生成物が出現した。後者の反応で、蛍光スペクトルのピークは443 nmに移動した (Fig.1 (b))。単離生成物のピークも443 nmであった。生成物をLC/MS分析すると、KA-MCA分子内のアミド結合が切断されていた (Fig.1 (b))。これらは、以下を明らかにした：(1) これまでFRET法で蛍光増加として観察されていたのはペプチド架橋ではなく、分解である；(2) GsTglはアミド結合分解活性を有する。したがって、昨年度にFRET法により同定した変異は、架橋ではなく分解活性を増強する変異であると考えられた。

3.2 酵素発現、精製、および結晶化

BsTgl(His)₆とSmTG-Mat(His)₆は、可溶性画分に発現され、Ni²⁺アフィニティカラムにより精製できた (Fig.2(a))。保存中に、GsTgl Δ EX(His)₆とBsTgl(His)₆は部分分解したが、SmTG-M(His)₆は重合した。精製法の改良により高純度のGsTglが得られた (Fig.2(a))。その溶解度は15 mg/mlであった。7 mg/ml GsTgl, 5 mM DTT, 50 mM l-Glnを含む溶液を、PEG Ion G 3 溶液 (0.2M NaAc · 3 H₂O, 20 % (w/v) PEG 3,350) と混合し、4℃で保存すると結晶が得られ (Fig.2(b)), 4 Å程度の回折像が見られ

た。現在、SPRING-8での解析待ちである。

3.3 Error-prone PCRの検討と発現ベクターの構築

1 st PCRの鋳型プラスミドの濃度に関係なく、2 nd PCRで目的バンドが確認できた (Fig.3 (a))。HindIIIとNcoIで処理し、pUC19_NcoIに導入後、配列解析すると、1 st PCRの鋳型プラスミドの濃度の減少とともに、変異導入率が上昇していた：0.001 ng/μl→11.6個；0.01 ng/μl→10.9個；0.1 ng/μl→7.2個；1.0 ng/μl→2.8個。pET-11a_GsTgl(DS)₅(His)₆_HindIII(x) に導入しようとしたが、GsTgl(DS)₅(His)₆はGsTgl Δ EX(His)₆に比べ、架橋活性が低いことが判明した (未掲載)。そこで、pET-22b_GsTgl Δ EX(His)₆に、PCR断片を導入することにした。GsTglのNcoI部位は、EX領域にあるため、新たにC末端付近にBamHI部位を導入した。これにより、2残基が置換されたが (A224GとT225S)、活性の低下は見られなかった (未掲載)。同様の方法で2 nd PCRで目的バンドが確認できた (Fig.3 (b))。

3.4 熱安定性の比較

50-60℃の熱処理では、GsTgl Δ EX(His)₆に比べ、GsTglが高い残存活性を示した (Fig.4(a))。70-80℃では、逆の結果となった。これらは、EX領域は、50-60℃では有利に、70-80℃では不利に働くことを示唆した。

3.5 架橋活性の比較

BSA架橋活性では、GsTglを除く3種の酵素で架橋物が確認できた (Fig.4(b))。酵素濃度を考慮するとBSA架橋活性は以下の順であると考えられた：SmTG-M(His)₆>>GsTgl Δ EX(His)₆>BsTgl(His)₆。高濃度にもかかわらず、GsTglで架橋物が確認できないことは、EX領域が本活性の障害となることを示唆した。dCADのBSAへの架橋活性では、SmTG-M(His)₆のみ蛍光スペクトルのピークが500 nm付近に見られ、その他

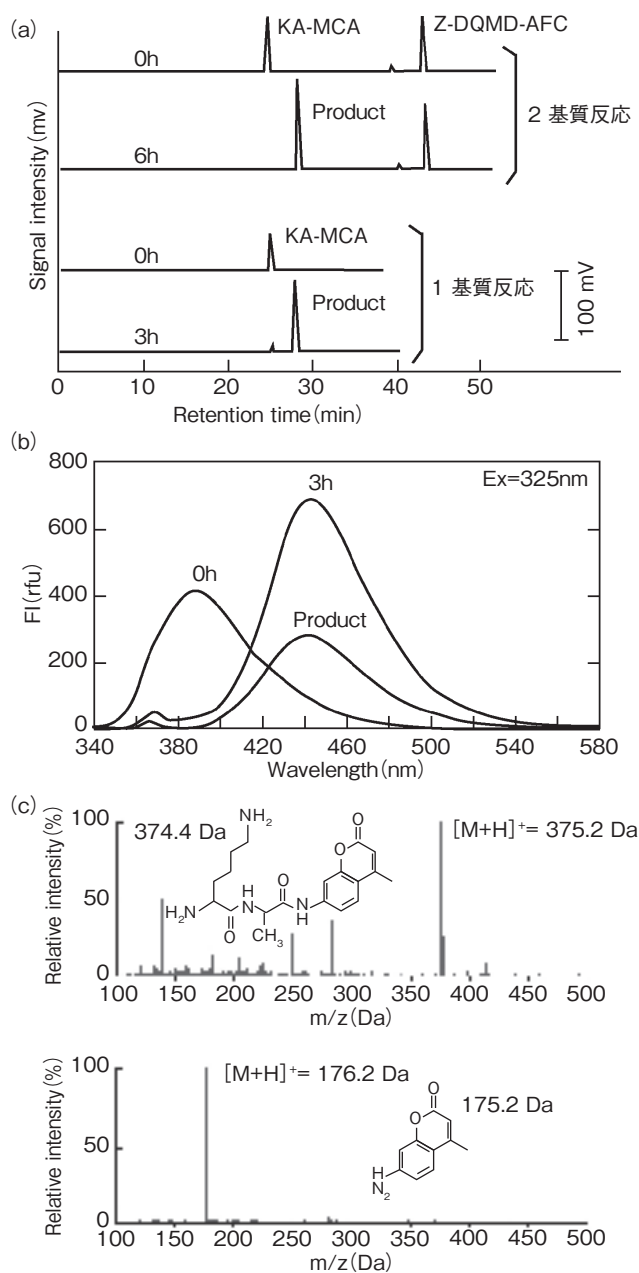


Fig. 1 Analysis of the product from the reaction catalyzed by GsTgl.

(a) HPLC analysis of the reaction mixtures containing both K-MCA and Z-DQMD-AFC and containing only K-MCA. Detected at 345 nm. (b) Fluorescence emission spectra of the product purified from the mixture containing only K-MCA. Ex = 325 nm. (c) LC/MS analysis of K-MCA and the product.

は440 nm付近にピークが見られた (未掲載)。
490 nmの蛍光強度で比較すると、GsTgl Δ EX
(His)₆, BsTgl(His)₆, SmTG-M(His)₆の活性は、

GsTglに比べ、それぞれ、10倍、4倍、1000倍高
いと算出された。

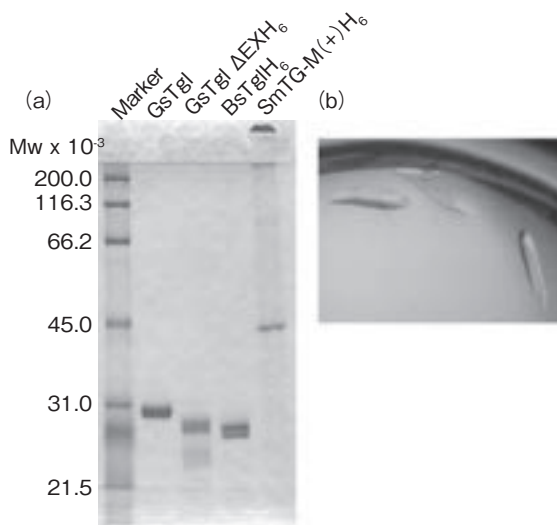


Fig. 2 Purification of GsTgl, BsTgl, and SmTG and crystallization of GsTgl.
(a) SDS-PAGE. (b) Crystals of GsTgl.

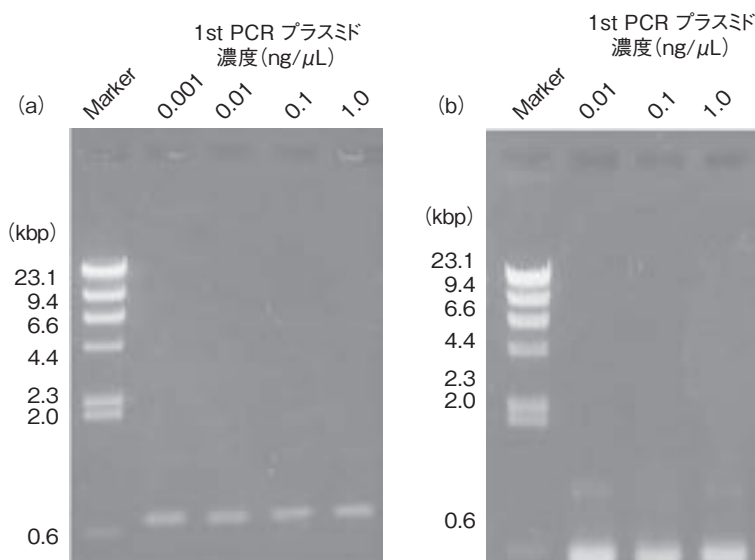


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of the 2nd PCR product.
(a) PCR fragment corresponding the region between *Hind*III and *Nco*I of GsTgl (0.67 kbp).
(b) PCR fragment corresponding the region between *Hind*III and introduced *Bam*HI of the A224G/T225S mutant of GsTgl Δ EX(His)₆ (0.53 kbp). In both cases, the 1st PCR and 2nd PCR was performed with GeneMorph II Random Mutagenesis kit and ExTaq DNA polymerase HS, respectively.

3.6 Amp耐性スクリーニング系の再現性の向上と改良

Overnight Express™ Autoinduction Systemsを用い20–30℃で発現誘導した培養液を、100 μ g/

ml Ampと1 mM IPTGを含むLBプレートに塗布し20–30℃に保持すると、以下の3種で生育が観察された(未掲載):(1) N-195_196-C;(2) N-195_196-C_GsTgl(DS)₅(His)₆;(3) N-195/

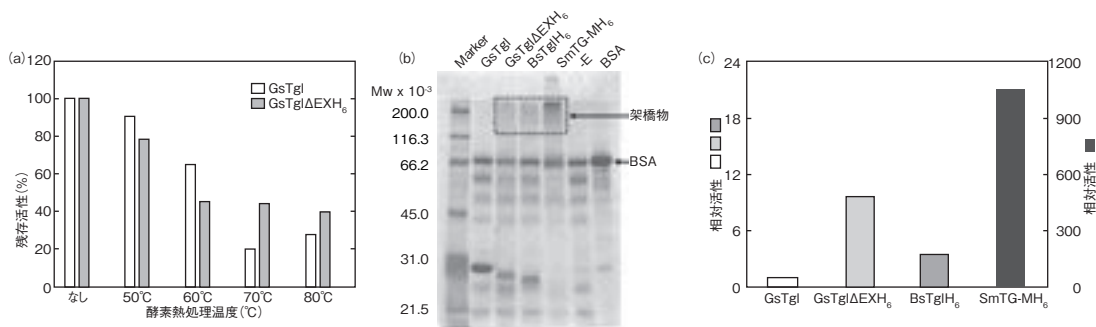


Fig. 4 Comparison of GsTgl, BsTgl, and SmTg.

(a) Thermal stability. The residual activity was expressed as the percentage of the activity without heat treatment (5 min). (b) BSA cross-linking activity. (c) BSA modifying activity with dansylcadaverine. The activity (velocity/enzyme concentration) was expressed as the ratio of the activity of GsTgl.

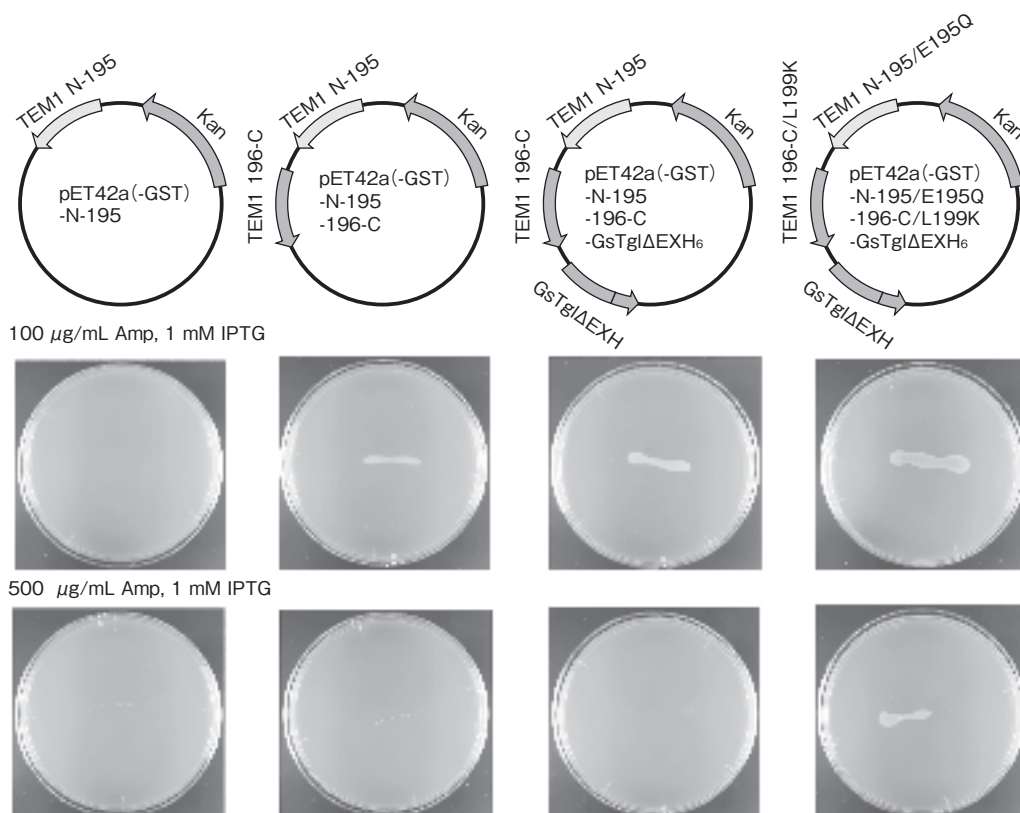


Fig. 5 Construction of screening systems for GsTgl with substrate specificity altered by random mutagenesis.

(A) Plasmids constructed. All plasmids were constructed on the basis of pET-42a(-GST), which confers Kanamycin resistance and in which the region of glutathione S-transferase was removed. TEM1 β -lactamase or both of the N-terminal domain (N-195) and C-terminal domain (196-C) domain, and GsTglΔEX(His)₆ were introduced into the plasmid. (B) Ampicillin susceptibility testing. *E. coli* BL21 (DE3) harboring each plasmid, in which the expression of GsTglΔEX(His)₆ was induced by Overnight Express™ Autoinduction Systems, was inoculated on a LB agar plate containing 100 μM Ampicillin and 1 mM IPTG or on that containing 500 μM Ampicillin and 1 mM IPTG. The plates were incubated overnight at 30°C.

E195Q_196-C/L196K_GsTgl(DS)₅(His)₆。これは、TEM 1 断片複合体 (N-195・196-C および N-195/E195Q・196-C/L196K) の比較的高い安定性とGsTgl(DS)₅(His)₆の低い架橋活性に起因すると考えられた。そこで、Lys残基導入部位を変更し、架橋活性の高いGsTgl Δ EX(His)₆を用いた。30℃で誘導し、500 μg/ml Ampと1 mM IPTGを含むLBプレートに塗布し30℃に保持するとN-195_196-CとN-195_196-C_GsTgl Δ EX(His)₆は生育せず、N-195/E195Q_196-C/L199K_GsTgl Δ EX(His)₆のみが生育した (Fig. 5)。これは、GsTgl Δ EX(His)₆によりTEM 1 断片複合体がE195QとL199Kを介し架橋・安定化されたことを示唆し、有効なスクリーニング系が得られた可能性を示した。

4. 要 約

GsTglはアミド結合分解活性を有し、蛍光基質を分解することを明らかにした。BsTglとSmTG

成熟体を発現精製した。GsTglのEX領域が熱安定性と架橋活性に寄与をすることを明らかにした。GsTgl, BsTgl, SmTG成熟体の架橋活性を比較した。目的GsTglを効率的にスクリーニングする系を得た。

文 献

- 1) Fernandes, C. G., Plácido, D., Lousa, D., Brito, J. A., Isidro, A., Soares, C. M., Pohl, J., Carrondo, M. A., Archer, M., Henriques, A. O. : Structural and functional characterization of an ancient bacterial transglutaminase sheds light on the minimal requirements for protein cross-linking, *Biochemistry*, **54**, 5723~5734, 2015.
- 2) 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.
- 3) Liu, S., Zhang, D., Wang, M., Cui, W., Chen, K., Du, G., Chen, J., Zhou, Z. : The order of expression is a key factor in the production of active transglutaminase in *Escherichia coli* by co-expression with its pro-peptide, *Microb Cell Fact.*, **10**, 112~118, 2011.

豚特有のチアミン三リン酸蓄積機構の解明

Mechanism of porcine-specific thiamine triphosphate accumulation in skeletal muscle cells

室 谷 進・大 江 美 香

(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)

Susumu Muroya and Mika Oe

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Thiamine triphosphate (ThTP) is extraordinarily abundant in porcine skeletal muscle compared to muscle of the other animals. It is possible that the remarkable thiamine abundance in pork is potentially due to ThTP accumulation, which could be caused by porcine specific mutation of thiamine triphosphatase (THTPA) gene. To investigate potential involvement of porcine *THTPA* mutation in the thiamine accumulation, porcine *THTPA* was overexpressed in HEK 293 cells (PT), and the influence on generation of thiamine and its phosphate derivatives was analyzed, using bovine *THTPA* (BT) as a positive control. First, the total content of thiamine in the representative HEK 293 cell sample for each treatment were analyzed by an assay based on microbiological activity (*ID-Vit* kit). The total thiamine content determined in the assay was 120, 160, 359, and 315 pmol/10⁶ cells in mock, PT, BT, and non-transfected (NT) cell culture, respectively, suggesting negative effect of porcine THTPA on total thiamine content compared to bovine THTPA. Next, the content and composition of the thiamine phosphate derivatives were analyzed by capillary electrophoresis-time of flight mass spectrometry (CE-TOFMS). The CE-TOFMS result agreed with the *ID-Vit* result, showing that thiamine content in the PT cells (43 pmol/10⁶ cells) was lower than those in BT (72 pmol/10⁶ cells) and NT cells (159 pmol/10⁶ cells). Thiamine diphosphate (ThDP) was detected in BT (53 pmol/10⁶ cells) and NT cells (81 pmol/10⁶ cells), but not in PT cells. Unexpectedly, thiamine monophosphate (ThMP) and ThTP were not detected in all the cell cultures in the CE-TOFMS analysis. Our results indicated that overexpression of porcine *THTPA* drastically reduced not only thiamine and ThDP generation, but also a variety of compounds mainly related to glycolysis, amino acid, and energy metabolism in HEK293 cells.

1. 目 的

チアミン（ビタミンB1）は動物各種組織において、エネルギー生産に重要なピルベートデヒドロゲナーゼ等の代謝系酵素の活性に必須な生理活

性物質で、動物細胞内で補酵素チアミン二リン酸（ThDP）に変換される。細胞内ではThDPのほか、一リン酸化物（ThMP）、三リン酸化物（ThTP）が生成し（Fig. 1）、一般に多くの哺乳類、鳥類の組織でThDPの存在割合が70%以上だ

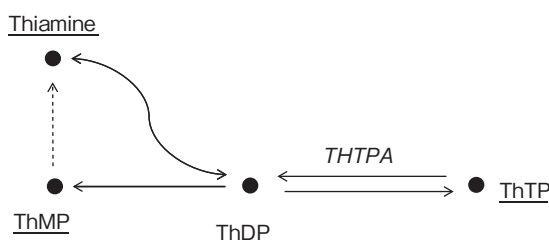


Fig. 1 Interconversion of thiamine and its phosphate derivatives in animal cells.
 ThMP : thiamine monophosphate, ThDP : thiamine diphosphate, ThTP :
 thiamine triphosphate, THTPA : thiamine triphosphatase.

が、豚と鶏の骨格筋では、ThTPの存在割合が60%以上と多く¹⁾、このことが豚肉にチアミンの蓄積をもたらす一因である可能性が考えられる。しかし現在までにその原因の詳細については検証されていない。一方で、ThTPをThDPへと変換する細胞質性酵素チアミントリフォスファターゼ(ThTPase)遺伝子*THTPA*について、豚では他の哺乳類にみられない変異が存在することが知られ、ブタThTPaseの機能欠損が考えられる。

これまでに我々は、豚骨格筋に含まれる代謝化合物の網羅的解析を行う中で、188種もの検出可能化合物リストを得て変動の全体像をとらえ²⁾、チアミン関連化合物の効率的な一斉解析にも成功しチアミンおよびそのリン酸化物が変動することを示した。また、その変動が2種の骨格筋の間で異なること、と畜直後に高いレベルで存在したチアミン三リン酸が貯蔵過程で脱リン酸化されてチアミンが蓄積することを明らかにした³⁾。一連の研究で我々は、*THTPA*遺伝子の変異が細胞内のThTP蓄積の一因であり、それが豚肉のチアミン蓄積と関連することを仮説として考えた。そこで本研究では、豚、牛の*THTPA*遺伝子を培養細胞で強制発現させ、チアミンの蓄積に寄与するチアミン化合物生成に関する機能を解析して種間で比較し、チアミン関連化合物の生成におけるブタ*THTPA*遺伝子の特性を解明することを目的とした。*THTPA*遺伝子型の機能解明、およびブタ

*THTPA*遺伝子の特徴を明らかにすることは、豚肉におけるチアミン蓄積機構解明に寄与する。本研究ではメタボロミクス(代謝化合物の一斉解析)を実施し、ThTPをはじめとするチアミン関連化合物の含量や存在割合を中心とした代謝がどのような影響を受けるかという点を中心に解析を行った。また、*THTPA*の本来の機能以外で代謝に及ぼす影響についても検討した。

2. 方法

2.1 *THTPA*導入用ベクターの構築

*THTPA*を過剰発現するコンストラクトを作製するために、豚および牛の骨格筋cDNAライブラリーより*THTPA*のcDNAをクローニングした。各cDNAをpeGFPベクターに導入し、GFPを融合したブタ*THTPA*(XP_013833657.1)、またはGFPを融合したウシ*THTPA*(NP_776895.1)を発現するコンストラクトを作製した。対照群としてGFPのみを発現するベクターを用いた。

2.2 細胞へのベクターの導入

作製したコンストラクトをトランスフェクションしHEK293細胞に導入した。細胞内で導入したGFP-*THTPA*が発現することを免疫ブロッティングにて確認した(Data not shown)。

2.3 HEK293細胞の培養

本研究では、HEK293(ヒト胎児腎臓由来)を用い、GFPのみ(Mock)、GFPと豚(PT)また

はGFPと牛 (BT) 由来THTPA遺伝子を発現させる系で実験を実施した。具体的には、HEK293細胞を10%FBS/DMEM培地で、3日ごとに培地交換しながら培養した。試験時には $1 \times 10^4/\text{cm}^2$ の細胞密度で細胞を播種し、翌日細胞の接着を確認した後にトランスフェクションを行った後、48時間後に細胞試料として回収した。回収後の細胞試料は液体窒素で凍結し、解析までの間 -80°C で保存した。

2.4 THTPA導入細胞の全チアミン含量およびメタボロームの解析

各種THTPA遺伝子を導入して得た細胞サンプルを回収し、全チアミン関連化合物の含量およびメタボロミクス解析用サンプルとした。全チアミン化合物含量の分析には、Immundiagnostik社のID-Vit[®]Vitamin B1キットを用い、メーカーのプロトコルに従って分析した。メタボローム解析ではCE-TOFMSを用い (委託分析)、チアミン、ThMP、ThDP、およびThTPの標準試料を用いた絶対定量を行うとともに、その他の代謝物についても処理区間の差異を網羅的に解析した。今回の分析では、1分析あたり1サンプルを用いた。前処理として、5%マンニトール液で細胞を洗浄後、メタノールで細胞を可溶化し内部標準化合物としてInternal Standard Solution 1 (10mM, HMT社)を細胞試料に添加、さらに限外濾過フィルターユニット (ULTRAFREE MC PLHCC, Millipore)により試料を濾過した。その後、回収した濾液を乾固させて純水に再溶解させたものを分析に用いた。測定はAgilent CE-TOFMS systemを用いてアニオンモードとカチオンモードに分けて行い、CE-TOFMSで検出されたピークは、自動積分ソフトウェアのMasterHands ver.2.17.1.11を用いてノイズを除去しピークの質量電荷比 (m/z)、ピーク面積値、泳動時間 (Migration time : MT)を得た。また、ピーク面

積値から相対面積値を算出するとともに、検出されたピークに対してHMT代謝化合物ライブラリおよびKnown-Unknownライブラリに登録された全化合物との照合、検索を行った。一部の対象化合物に対しては、各化合物について100 μM の一点検量 (内部標準化合物200 μM)として濃度を算出した。

3. 結果と考察

3.1 HEK293へのトランスフェクションの影響

HEK293細胞にブタTHTPAまたはウシTHTPAを強制発現させた細胞PTおよびBTについて、回収された細胞数をMockおよび無処理区 (NT)と比較すると、Mock, PT, BT, NTでそれぞれ、 204×10^4 , 220×10^4 , 106×10^4 , 400×10^4 cells/mLであった。例数が少ないため結論付けることは難しいものの、この結果からは細胞へのベクターの導入により細部増殖に対する何らかの影響があったことも考えられた。この結果については、今後例数を重ねて検証する必要がある。

3.2 トランスフェクションがHEK293細胞中チアミン含量に及ぼす影響

ID-Vit[®]Vitamin B1キットを用い、HEK293細胞における全チアミン化合物含量を測定した。その数値を細胞数あたりに換算した結果、Mock, PT, BT, NTでそれぞれ、120, 160, 359, 315 pmol/ 10^6 cellとなった。Mockでチアミン含量が低かった理由の詳細は不明だが、この結果でBTを対照として比較した場合、ブタTHTPAを発現するPTがウシTHTPAを発現するBTの44%ほどの値を示しており、PTでチアミン関連化合物の存在量が低下したことが示された。したがってブタ型THTPAを導入したHEK293細胞において、チアミン含量の低下をもたらしていることが示唆された。

今回のキットでは *Lactobacillus fermentum* の増殖活性を指標としており、測定対象となるチアミン関連化合物には、チアミン、ThMP、ThDP、ThTPが含まれる。さらに、これまでにアデニンヌクレオチドに結合したThTPの誘導体も大腸菌で見出されており、その含量も測定数値に反映している可能性がある。当初、*THTPA*の機能としてThTPの脱リン酸化反応のみを想定していたが、本遺伝子の過剰発現がチアミン関連化合物の生成反応の平衡に影響を及ぼし、今回の方法で検出された全チアミン含量が変化したと考えられる。なぜ全チアミン含量に処理区間の差異が生じたかについては今後の詳細の検討が必要であるとともに、今後例数を重ねて検証する必要がある。

3.3 *THTPA*の過剰発現がHEK293細胞のメタボロームに及ぼす影響

ID-Vit[®]Vitamin B1 キットによる測定の結果、PTでBTよりも全チアミン含量が低かったことから、PTではBTに比べチアミン関連化合物の生成量が少ないことが示唆された。そこで、*THTPA*の過剰発現がどの化合物生成に影響するのかについて詳細を明らかにするため、CE-TOFMSによりメタボローム解析を行い、チアミン関連化合物

に含まれるチアミン、ThMP、ThDP、ThTPの詳細な含量比について調べた。

メタボローム解析の結果、HEK293細胞において、MSのピークが検出され代謝化合物ライブラリにアノテーションされた化合物の数は合計84種であった。チアミン関連化合物のうち、チアミンおよびThDPのピークは検出され定量可能であったが、予想に反してThMPおよびThTPのピークはMock、PT、BT、NTのいずれにおいても検出されなかった。チアミンおよびThDPの含量は、MockおよびNTと比べてPTとBTで低い傾向を示し、特にPTで低かった (Fig. 2)。このことは、*ID-Vit*[®]Vitamin B1 キットによる全チアミン含量の測定結果と一致するものであり、HEK293細胞においてブタ *THTPA* がウシ *THTPA* に比べてチアミンおよびThDP生成に対してネガティブな影響を及ぼしたことを示唆している。

また、チアミン関連化合物以外を含むメタボローム全体について処理区間で比べると、MockまたはNTに対しPTおよびBTは異なるパターンを示した (Fig. 3)。BTでは、核酸関連化合物を中心とする化合物群が高い含量を示す一方、PTではMock、NT、BTに比べて検出された多くの化合物で低い含量を示した。

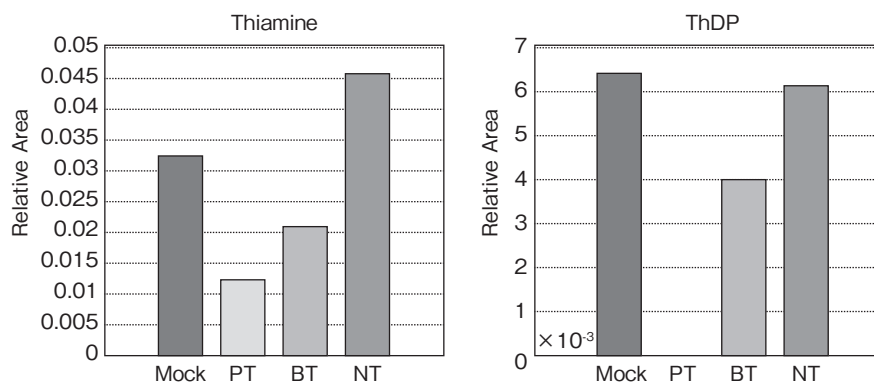


Fig. 2 Effect of *THTPA* overexpression on thiamine and thiamine diphosphate content in HEK293 cells. Mock : vector only, PT : porcine *THTPA*, BT : bovine *THTPA*, NT : no transfection. ThDP : thiamine diphosphate.

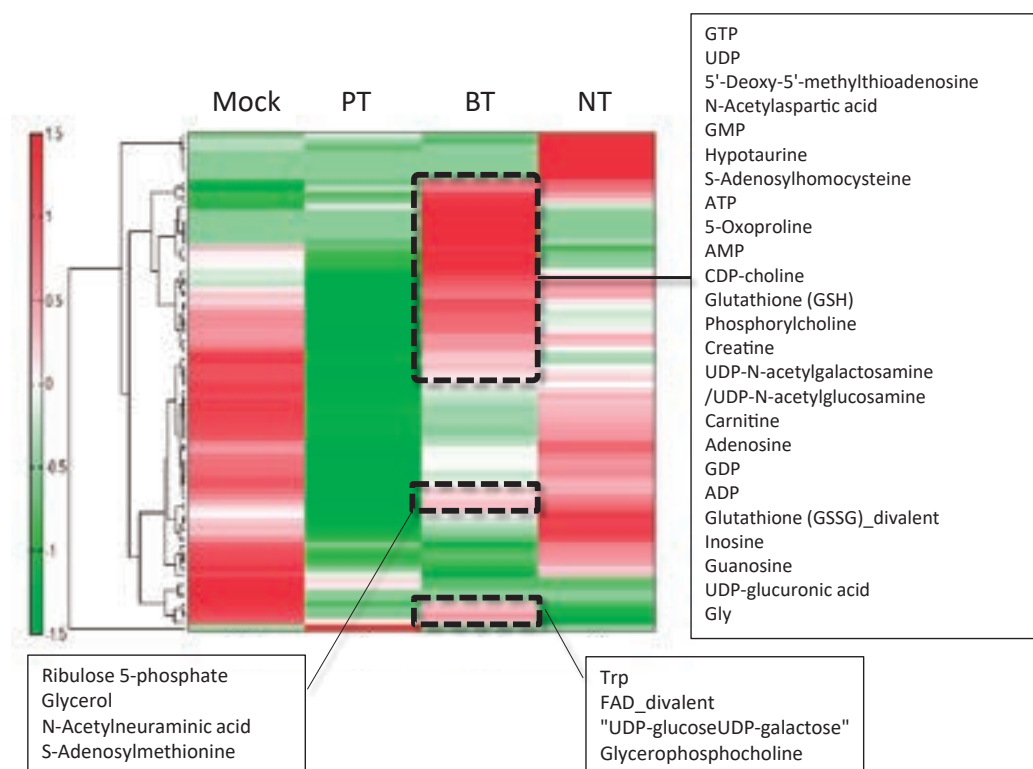


Fig. 3 Heatmap result of hierarchical clustering of metabolome profile in HEK293 cells overexpressing *THTPA*. Mock : vector only, PT : porcine *THTPA*, BT : bovine *THTPA*, NT : no transfection.

このことは、PTにおいて豚型 *THTPA* を過剰発現したことにより、解糖、核酸代謝、アミノ酸代謝等のあらゆるカテゴリーにおいて多くの化合物の生成量が低下したこと、それによりHEK293細胞の代謝活性が全体的に低下したことを示している。ThDPは糖代謝からエネルギーを生産する過程に重要なピルベートデヒドロゲナーゼ複合体や、ペントースリン酸経路で5単糖を産生するトランスケトラーゼの活性に不可欠な補酵素である。PTでは、ブタ *THTPA* 過剰発現による全チアミン含量の低下、ThDP含量の低下が起こっていたことから、今回のPTにおける全体的な代謝化合物含量の低下は、ブタ *THTPA* の過剰発現によるThDPの低下を裏付けるものである。以上のことは、*THTPA* がチアミン関連化合物生成に関して何らかの重要な機能を担っていることを示唆

すると考えられる。これらの結果をうけ、現在、豚の遺伝子型とチアミン蓄積との関係や、筋細胞における *THTPA* 過剰発現の影響等についての解析を計画している。

4. 要 約

豚骨格筋において、チアミン三リン酸 (ThTP) は他の哺乳類骨格筋よりも極端に多く含まれている。豚肉のチアミン含量が他の畜肉に比べて高いことについては、チアミン三リン酸脱リン酸化酵素 (*THTPA*) にみられる豚特異的な変異であることが一因であると考えられる。本研究では、豚特有のチアミン蓄積におけるブタ *THTPA* の機能と意義について解明するため、HEK293細胞にブタ *THTPA* 遺伝子を過剰発現させ (PT)、その際に変化するチアミン関連化合物の生成、およびメ

タボロームの変動について解析した。PTについて市販キットで測定した全チアミン含量，CE-TOFMSメタボロミクスで解析したチアミンおよびチアミン二リン酸（ThDP）の含量は，対照として作製したウシ *THTPA* の過剰発現系（BT）と比べて低い値を示した。チアミン一リン酸（ThMP）およびThTPは，予想に反してCE-TOFMSによる測定でいずれの細胞系においても検出されなかった。また，解糖系等の主要代謝系における多くの化合物の含量は，PTにおいてBT

や無処理区より低い値を示し，ブタ *THTPA* の過剰発現がHEK293細胞において代謝全体に大きな影響を及ぼすことが明らかになった。

文 献

- 1) Bettendorff, L., Lakaye, B., Kohn, G., Wins, P. : *Metab Brain Dis*, **29**, 1069~1082, 2014.
- 2) Muroya, S., Oe, M., Nakajima, I., Ojima, K., Chikuni, K. : *Meat Sci*, **98**, 726~735, 2014.
- 3) Muroya, S., Oe, M., Ojima, K. : *Meat Sci*, **137**, 228~234, 2018.

和牛肉のおいしさを「見える化」する

Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality

山 田 知 哉

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)

Tomoya Yamada

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

In this experiment, we studied the metabolomic analysis of longissimus muscle between Japanese black (Wagyu) fattening cattle and Holstein fattening cattle to determine the key components associated with beef quality. Total 67 compounds were detected in both groups by GC-MS analysis. Principal component analysis (PCA) of metabolomic profiles in longissimus muscle indicated that PC1 were clearly separated by breed differences. Holstein beef were characterized by the abundance of components such as amino acids, amino compounds and nucleic acid metabolites. In contrast, Wagyu beef were characterized by the abundance of components such as sugars, sugar phosphates and fatty acids. These results suggest that the differences of beef quality between Wagyu and Holstein might be affected by the metabolic products identified in the present study.

1. 目 的

食肉のおいしさは、口に入れてから知覚される複雑な味や香りの組み合わせによって構成されている。黒毛和種はきわめて優れた肉質を有しており、これまで多くの研究によって、和牛肉特有の風味やおいしさを特徴付ける成分の探索がなされてきた。しかし牛肉の味に影響する成分に関しては、と畜後に牛肉中で進行する種々の生化学反応が大きく関与しており、これら多くの代謝反応系の中から和牛肉の特徴に直結する要因物質を同定するのはきわめて困難を有する。

メタボローム解析は、生体中の多くの代謝物質の中から、網羅的解析によって目的とするバイオマーカーを特定することが可能な点に大きな特徴

を有しており、癌の早期発見のための特異的な血中バイオマーカーの同定など、これまで主に医学分野において活用されてきた。また農業分野においても、トマトの品質¹⁾や、茶や果物の風味に関連するバイオマーカーの特定^{2,3)}にメタボローム解析が用いられている。これに対し畜産分野では、食肉の品質評価を目的としてメタボローム解析を用いた事例は少なく^{4~6)}、特に牛肉品質に対するメタボローム解析に関しては不明な点が多い。和牛肉のおいしさには、牛肉中の複数の物質が関与していると考えられている。そこで牛肉のメタボローム解析を実施することによって、数多くの対象候補物質の中から、複数の目的物質を同定することが可能となると考えられる。

本研究では、肉質が大きく異なる黒毛和種とホ

ルスタイン種牛肉のメタボローム解析結果を比較することにより、和牛肉のおいしさに影響を及ぼす牛肉中成分を特定することを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試牛

供試牛として、黒毛和種去勢牛（ $n = 4$ ）とホルスタイン種去勢牛（ $n = 4$ ）を用いた。供試牛はすべて畜産研究部門で生産されたものであり、両品種とも濃厚飼料は市販配合飼料、粗飼料は畜産研究部門で生産したオーチャードグラス乾草の、同一飼料を肥育期に給与した。両品種とも10ヶ月齢時から肥育を開始し、黒毛和種は30ヶ月齢、ホルスタイン種は22ヶ月齢時にと畜を実施した。と畜時に胸最長筋（リブロース）部位からサンプルを採取した。採取した胸最長筋サンプルは、真空パック状態で7日間4度にて冷蔵保存後、分析時までディープフリーザーで冷凍保存した。

2.2 メタボローム解析

メタボローム解析実施のため、保存した胸最長筋サンプル約1gを液体窒素下で乳鉢を用いパウダー状に粉碎した。粉碎した胸最長筋サンプル100mgに80%メタノールを1,500 μ l添加してジルコニアビーズを用いたホモジナイズおよび、超音波処理を5分実施後、遠心分離（15,000rpm, 5 min）にて上清を回収した。上清はMonoSpin C18カラム（GL Science Cat. 5010-21701）を用いて精製処理を行った。得られたカラム透過画分のうち50 μ lに対し窒素ガス吹付下で濃縮乾固処理を行い、メトキシアミン20mg/mlピリジン溶液50 μ lを添加し、30℃、90分間メトキシ化処理を行った。次にこれらサンプルにトリメチルシリルトリフルオロアセトアミド50 μ lを添加し、37℃で30分間トリメチルシリル化誘導化処理を行った。これら誘導化サンプルを用い、GC-MS

（QP2010Ultra, 島津製作所）にて網羅的解析を実施した（（公財）かずさDNA研究所）。装置への試料注入量は0.5 μ lとした。分析条件は、GC部はカラムDB-5（30 m 0.250mm 1.00 μ m, Agilent Technologies）を用い、ヘリウムをキャリアガスとして流速1.1ml/min, 注入口温度は280度、オーブン昇温プログラムは100度で4分保持後、毎分4分で320度まで昇温し、8分保持とした。質量分析部はイオン源温度200℃、イオン化法はEI、走査速度2,500u/sec, 計測質量範囲を $m/z = 45-600$ で実施した。時間補正にはC7-C33アルカン混合標準試料を分析し、その成分ピークの検出時間から保持指標を算出し補正を適用した。データ解析では、GC/MSsolution（島津製作所）およびGC/MS代謝成分データベースVer. 2（島津製作所）を用いて化合物推定、試料間比較を行った。

3. 結果と考察

GC-MS解析の結果、67の代謝産物が同定された。この結果に対し主成分分析を実施したところ、PC 1 軸方向に黒毛和種とホルスタイン種の検体が分離してプロットされたことから、両品種の牛肉は成分のプロファイルが異なっていることが示された（Fig. 1）。本研究の結果から、検体が品種ごとに分離された軸（PC 1 軸, 41.3%）は、同じ品種の検体が分離された軸（PC 2 軸, 21.0%）よりも寄与率が高く、品種間の差の方が、品種内のバラつきよりも大きかった。したがって、本研究で同定されたPC 1 軸に対する因子負荷量の絶対値が大きい化合物は、牛肉の品種差を特徴付ける代謝産物であると考えられた。

Table 1 に、PC 1 因子負荷量の上位30物質を示した。PC 1 軸の相関係数Rが正の化合物は、ホルスタイン種で高値を示す代謝産物である。PC 1 因子負荷量の上位30物質には、アミノ酸およびその関連代謝産物と、核酸関連の代謝産物が多く

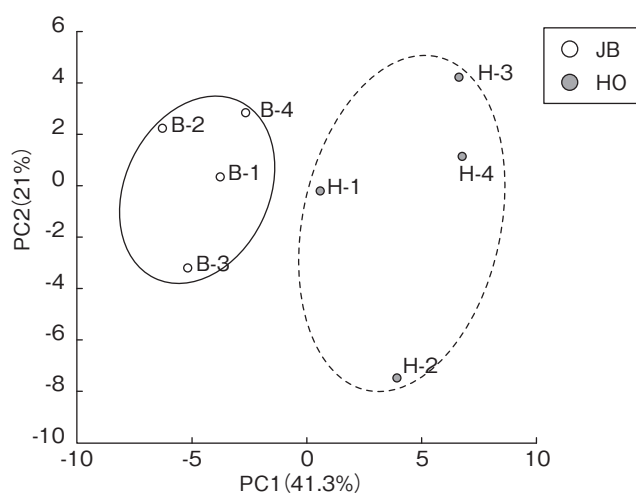


Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of *longissimus muscle* between Japanese black (Wagyu) and Holstein fattening cattle.

JB : Japanese black fattening steers (n = 4), HO : Holstein fattening steers (n = 4)

Table 1 Loading values of top 30 compounds for principal component-1

		compound name	PC1	
			R	<i>p</i>
1	11	Alanine-2TMS	0.949	3.21E-04
2	40	Valine-2TMS	0.948	3.41E-04
3	88	Threonine-3TMS	0.946	3.87E-04
4	129	5-Oxoproline-2TMS	0.945	3.96E-04
5	239	Glutamine-3TMS	0.926	9.63E-04
6	192	Asparagine-3TMS	0.916	1.39E-03
7	223	Glutamine-4TMS	0.914	1.48E-03
8	367	Ribose 5-phosphate-meto-5TMS (1)	0.902	2.15E-03
9	74	Glycine-3TMS	0.899	2.38E-03
10	385	Tryptophan-3TMS	0.894	2.74E-03
11	406	Inosine-4TMS	0.890	3.07E-03
12	70	Proline-2TMS	0.870	4.95E-03
13	66	allo-Isoleucine-2TMS	0.862	5.90E-03
14	67	Isoleucine-2TMS	0.862	5.90E-03
15	253	Arginine-3TMS	0.849	7.63E-03
16	60	Leucine-2TMS	0.843	8.58E-03
17	63	Phosphoric acid-3TMS	0.840	9.07E-03
18	83	Serine-3TMS	0.833	1.02E-02
19	163	Ornithine-3TMS	0.820	1.28E-02
20	171	Phenylalanine-2TMS	0.806	1.57E-02
21	323	Tyrosine-3TMS	0.792	1.90E-02
22	45	4-Hydroxybutyric acid-2TMS	0.776	2.36E-02
23	151	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS	0.757	2.96E-02
24	110	Niacinamide-TMS	0.752	3.15E-02
25	166	Glutamic acid-3TMS	0.749	3.26E-02
26	143	Cysteine-3TMS	0.747	3.31E-02
27	425	Inosine monophosphate-5TMS	0.743	3.46E-02
28	127	Methionine-2TMS	0.730	3.98E-02
29	313	Lysine-4TMS	0.725	4.19E-02
30	364	Uric acid-4TMS	0.719	4.43E-02

Table 2 Loading values of bottom 30 compounds for principal component-1

compound name			PC1	
			R	p
30 347	Xanthine-3TMS		0.502	2.05E-01
29 134	4-Aminobutyric acid-3TMS		0.493	2.15E-01
28 397	Glucose 6-phosphate-meto-6TMS (2)		0.442	2.72E-01
27 365	Inositol-6TMS (2)		0.415	3.07E-01
26 25	3-Hydroxybutyric acid-2TMS		0.407	3.17E-01
25 392	Fructose 6-phosphate-meto-6TMS		0.395	3.33E-01
24 254	Ornithine-4TMS		0.384	3.48E-01
23 393	Glucose 6-phosphate-meto-6TMS (1)		0.351	3.94E-01
22 308	Glucose-meto-5TMS (1)		0.345	4.02E-01
21 321	Glucose-meto-5TMS (2)		0.339	4.11E-01
20 20	3-Hydroxypropionic acid-2TMS		0.318	4.43E-01
19 97	3-Aminopropanoic acid-3TMS		0.303	4.66E-01
18 115	Malic acid-3TMS		0.275	5.10E-01
17 61	Glycerol-3TMS		0.231	5.81E-01
16 44	Urea-2TMS		0.128	7.62E-01
15 196	Taurine-3TMS		0.128	7.63E-01
14 293	Fructose-meto-5TMS (1)		0.108	8.00E-01
13 299	Fructose-meto-5TMS (2)		0.088	8.36E-01
12 1	Boric acid-3TMS		0.048	9.10E-01
11 81	Nonanoic acid-TMS		-0.020	9.63E-01
10 77	Glyceric acid-3TMS		-0.030	9.45E-01
9 407	Sedoheptulose 7-phosphate-meto-7TMS		-0.141	7.39E-01
8 202	Ribose-meto-4TMS		-0.192	6.49E-01
7 302	Mannose-meto-5TMS (1)		-0.193	6.48E-01
6 236	Glycerol 3-phosphate-4TMS		-0.223	5.96E-01
5 330	Sorbitol-6TMS		-0.226	5.90E-01
4 384	Stearic acid-TMS		-0.417	3.05E-01
3 214	Xylitol-5TMS		-0.643	8.52E-02
2 350	Palmitic acid-TMS		-0.658	7.63E-02
1 417	Maltose-meto-8TMS (1)		-0.674	6.66E-02

含まれていた。Table 2 に、PC 1 因子負荷量の下位30物質を示した。PC 1 軸の相関係数 R が負の化合物は、黒毛和種で高値を示す代謝産物である。PC 1 因子負荷量の下位30物質には、糖と糖リン酸などが含まれていた。これらの結果から、ホルスタイン種はアミノ酸およびその関連代謝産物と核酸関連の代謝産物が、黒毛和種は糖と糖リン酸が、品種を特徴付ける牛肉中の候補代謝産物であると考えられた。

Fig. 2 に、階層的クラスタリング解析 (HCA) で得られたヒートマップならびに各クラスターを形成した代謝産物を示した。クラスター7は黒毛和種で低値かつホルスタイン種で高値の代謝産物

で構成されている。クラスター7にはアミノ酸、アミノ化合物、核酸関連物質などが多く含まれていた。クラスター5と6はホルスタイン種で高値の代謝産物で構成されている。クラスター5と6には、アミノ酸と核酸関連物質が多く含まれていた。クラスター1は黒毛和種で高値の代謝産物で構成されている。クラスター1には、脂肪酸と糖が主成分として含まれていた。それ以外のクラスターは品種による高低の傾向が不明瞭であった。これらの結果から、ホルスタイン種の牛肉中成分はアミノ酸と核酸関連物質、黒毛和種の牛肉成分は糖と脂肪酸によって特徴付けられることが示唆された。

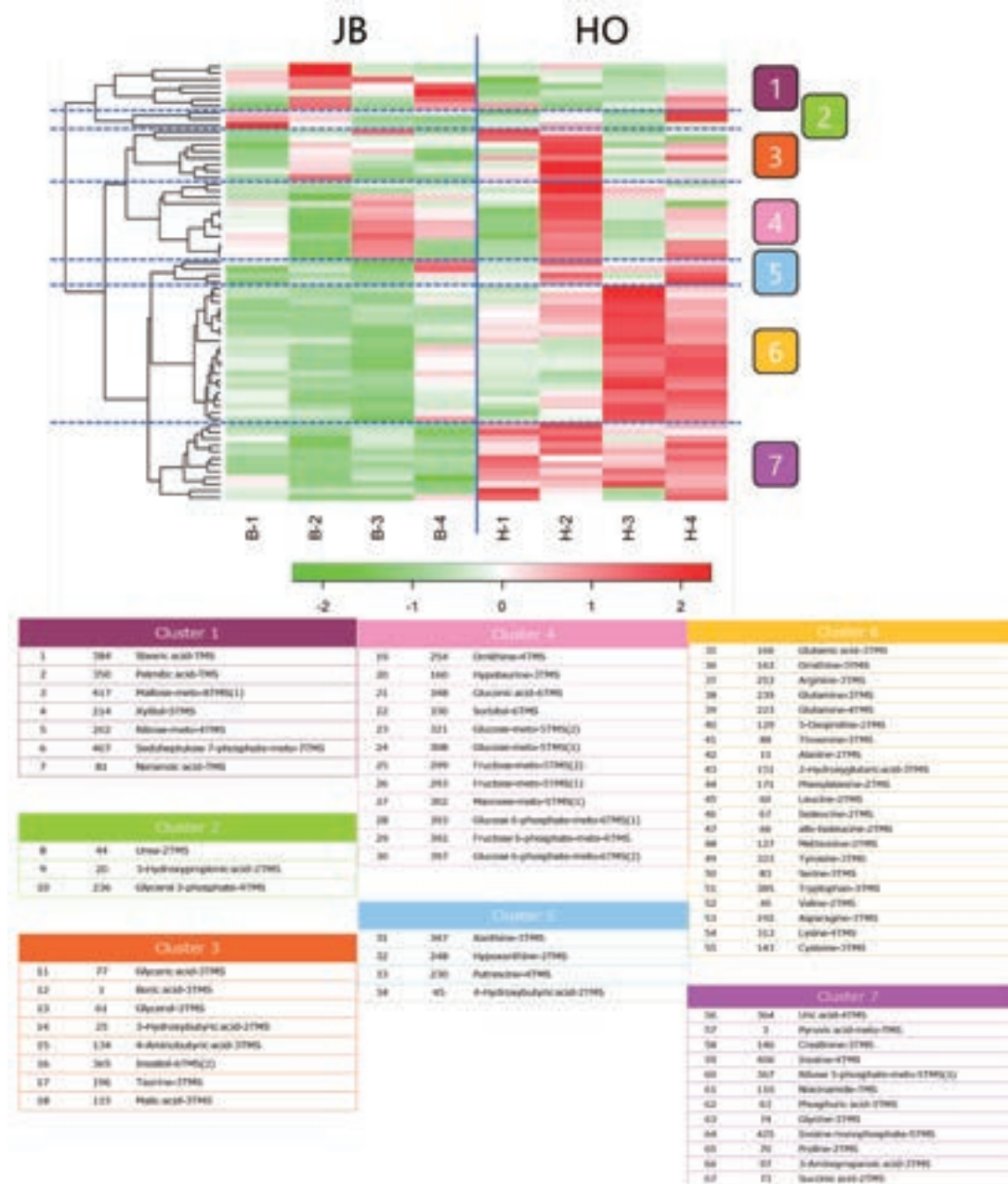


Fig. 2 Heatmap for the metabolites of *longissimus muscle* between Japanese black (Wagyu) and Holstein fattening cattle.

JB : Japanese black fattening steers (n = 4), HO : Holstein fattening steers (n = 4)

以上の結果から、ホルスタイン種の牛肉中主成分はアミノ酸、アミノ化合物、核酸関連代謝産物によって、黒毛和種の牛肉は糖、糖リン酸、脂肪酸によって特徴付けられることが明らかとなっ

た。旨味を呈する代表的な化合物として、L-グルタミン酸、L-アスパラギン酸、コハク酸、イノシンーリン酸等があげられる。したがって、ホルスタイン種においてグルタミン酸、コハク酸、

イノシンーリン酸が高値傾向にあることは、ホルスタイン種牛肉の旨味の強さを示唆すると考えられた。またシステインやリボースを加熱すると、含硫芳香化合物の生成が促進される⁷⁾。本試験の結果から、品種差が認められた含硫化合物としてシステインとメチオニンがあげられる。これらはいずれもホルスタイン種で高値傾向であった。ホルスタイン種と黒毛和種で含硫化合物の含有量が異なっていることは、牛肉加熱調理時の風味の差異につながる可能性が推察された。

一方、本研究から黒毛和種の牛肉成分は、糖と脂肪酸類に特徴があることが明らかとなった。和牛肉には独特の「甘み」があり、この風味の特徴が和牛肉の、他の品種の牛肉との差別化につながっていると考えられる。本試験の結果から、黒毛和種牛肉中のキシリトールやマルトース等の糖類の含量がホルスタイン種より高かったことから、これら糖類の存在が、和牛肉特有の「甘み」に関与している可能性が示唆された。一般に、受容体による化合物の認識について、低濃度域にはシグナル伝達の閾値が存在し、高濃度域には刺激に対する飽和が存在する。また、同じ濃度であっても風味の強さは化合物によって異なる。さらに、化合物の組み合わせによって風味は増強したり減弱したりすることが知られている。油脂そのものには明確な味はないが、食物中に存在する油脂は旨味や甘みを増強する働きがあることが報告されている⁸⁾。したがって、和牛肉に多く含まれる脂肪酸類が、和牛肉中に多い糖類の風味を増強した結果、特有の甘みを強く感じる可能性が推察されるが、糖類と脂肪酸類の相互作用に関しては、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

本研究によって、ホルスタイン種と黒毛和種の牛肉の風味を特徴付けると考えられる、牛肉中代謝成分が複数同定された。したがってメタボローム解析は、牛品種に由来する牛肉の味や風味の相

違に関連する物質の探索に対し、きわめて有効であると考えられた。

4. 要 約

和牛肉のおいしさに影響を及ぼす牛肉中成分を明らかにするため、肉質が大きく異なる黒毛和種とホルスタイン種の胸最長筋を用いてGC-MS解析を行った。その結果、67の代謝産物が同定された。主成分分析を実施したところ、両品種の牛肉は成分のプロファイルが大きく異なっていることが示された。主要な成分として、ホルスタイン種牛肉はアミノ酸、アミノ化合物、核酸関連代謝産物が、黒毛和種牛肉は糖、糖リン酸、脂肪酸によって特徴付けられることが明らかとなった。これら成分の牛肉中含量の差が、味や風味の品種による違いに影響していると考えられた。

文 献

- 1) Ikeda, H., Shibuya T., Imanishi, S., Aso H., Nishiyama M., Kanayama, Y. : Dynamic metabolic regulation by a chromosome segment from a wild relative during fruit development in a Tomoto introgression line IL8-3, *Plant Cell. Physiol.* **57**, 1257~1270, 2016.
- 2) 及川彰 : メタボロミクスの農業・食品分野への応用, *化学と生物*, **51**, 615~621, 2013.
- 3) Sumitani, H., Ootsuka, T., Sasai, M. : Metabolomic analysis of the degradation of ascorbic acid in a commercial green tea beverage stored in PET bottles, *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*, **61**, 418~426, 2014.
- 4) Muroya, S., Oe, M., Nakajima, I., Ojima, K., Chikuni, K. : CE-TOF MS-based metabolomic profiling revealed characteristic metaboloc pathways in postmortem porcine fast and slow type muscles, *Meat Sci.*, **98**, 726~735, 2014.
- 5) Watanabe, G., Kobayashi, H., Shibata, M., Kubota, M., Kadowaki, M., Fujimura, S. : Regulation of free glutamate content in meat by dietary lysine in broilers, *Anim. Sci. J.*, **86**, 435~442, 2015.
- 6) Muroya, S., Oe, M., Ojima, K., Watanabe, A. : Metabolomic approach to key metabolites characterizing postmortem aged loin muscle of Japanese black cattle, Asian-Australas. *J. Anim. Sci.*, (in press), 2019.

7) Mottram, D. S., Nobrega, I. C. : Formation of sulfur aroma compounds in reaction mixtures containing cysteine and three different forms of ribose, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 4080~4086, 2002.

8) 山本隆：おいしさとコクの科学，日本調理科学会誌，43，327~332，2010.

ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果とそのメカニズムの解明

Clarification of the enhancement mechanism of “*koku* attributes” by lipids
in pork sausages

西 村 敏 英
(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. Recently, it has been shown that pork sausage gives us Koku attributes such as mouthfulness and lastingness in the retronasal aroma sensation. However, the clarification of factors involved in its Koku attribute has not been carried out yet.

In the previous research, the addition of umami compounds and fats was shown to enhance the intensity and lastingness in the retronasal aroma sensation of pork sausage, resulting 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-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, Methyl eugenol. In this research, the difference in amounts and characteristics of aroma compounds released from the sausages containing different amounts of fat was examined.

GC/MS analyses of aroma released from three kinds of pork sausages containing different amounts of fat have shown that D-Limonene, Linalyl anthranilate, Hexanoic acid and Eugenol were detected in these all sausages. 1-Octen-3-ol was detected from the sausage without addition of fat. Its characteristic was sweet or like green tea. On the other hands, 1-Pentanol (tea or vinegar like), α -Terpineol (grass or sea weed like) and Methyl eugenol (flower or irritation) were detected in only the sausages with addition of fats.

Next, the mechanisms of persistence of aroma compounds to fats were examined using soy and egg lecithins. One percent lecithin held methyl propyl disulfides significantly and did not hold furfural, 2, 6-dimethyl pyridine and hexanal. Furthermore, methyl propyl disulfides were held by both lecithins at the concentration more than 0.1%. Next step is to examine the mechanism for holding effect of fats in pork sausages.

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
がなかったため、それぞれの製造者が独自の基準

で評価して、表示しているのが現状である。そこで、我々は、コクを客観的に評価し、「見える化」できないかと考えた。その結果、コクは、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（基本コク）で形成される感覚であると定義した^{1~3)}。また、食べ物の複雑さは、熟成、発酵、加熱などの処理により形成されると考えている。その複雑な刺激の広がり持続性を増強する物質として、うま味物質と脂質が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた^{4~6)}。さらに、コクのある食べ物としてよく知られている食品に関して、コクの形成・増強因子とその形成メカニズムを研究している。

ポークソーセージは、食べ物の中でもとりわけ美味な食べ物の1つであり、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。これまでの食肉製品の香気に関する研究から、塩漬肉特有のフレーバーは、亜硝酸塩の脂質酸化抑制作用による香りであるとの報告があるが、完全に解明はされていない。また、Motttram⁷⁾やRamarathnam⁸⁾の報告により、硝酸アルキル、ベンゾニトリル、フェニルアセトニトリル、4-メチル-2-ペンタノン、2-ブチル-2-オク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、食肉製品の食味性との関連での研究は、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

点を当てて研究を実施している。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、コクに当てはま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。スモークソーセージとノンスモークソーセージの香気成分を分析した。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成分の内、 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 (カメムシ、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ている。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としてきた。昨年の研究¹²⁾では、ソーセージの製造時に添加する脂肪が、ソーセージの食味性に与える影響を調べ、添加する脂質含量を増やすと、うま味や塩味を増強するだけでなく、風味の広がりや持続性を強め、コクを増強することが明らかとなった。また、それが脂質による香氣成分の保持による可能性が推定された。

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、脂質の添加量で異なる香氣成分の特性を調べると同時に、脂質の添加量が香氣成分の保持量に及ぼす影響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（通常量脂肪添加製品、通常量の50%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、試料として用いた。

2.2 ポークソーセージの香氣成分分析

a) モノトラップ（シリカモノリス捕臭剤）による香氣成分の捕集

各ソーセージを細切した後、5 g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氣成分をMono trap（シリカモノリス捕臭剤：ジューエルサイエンス）で捕集した。

b) GC/MSによる香氣成分の同定

a) で調製した試料をGC/MS（GC-2014, (株) 島津製作所）に供し、香氣成分を同定した。また、分析にはCP-wax 52 CB(30 m×0.25mm i.d., 0.25 μ m film thickness)（ジューエルサイエンス（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。

c) GC-Oによる香氣成分の特性解析とAEDAによる寄与成分の特定

a) で調製した試料をGC/MS（GC-2014, (株) 島津製作所）に供し、香氣成分を同定すると同時に、分離した成分の特性をGC-Oにて、解析した。さらに、AEDA法により、脂肪添加量の異なるポークソーセージの香氣成分として、寄与度の大きいものを特定した。

2.3 脂質による香氣成分の保持効果

脂質の中で、まず、香氣成分の保持効果が期待できるリン脂質に関して調べた。リン脂質の中で、大豆あるいは卵由来のレシチンを用い、それぞれを1%の濃度になるように蒸留水を加えた。大豆由来のものは2晩放置し、卵由来のものは激しく攪拌して溶解した。メチルプロピルジスルフィド1 μ l, 2,6-ジメチルピラジン5 μ l, フルフラール5 μ l, ヘキサナール1 μ l添加した後、レシチン液を加え3分間超音波処理した後、HS-GC（下記の条件）で、放出量を測定した。
〈GC条件〉装置：島津GC-2014, TuroboMatrix40, カラム：TC-WAX (30m×0.25mm i.d. 0.25 μ m), オープン温度：40℃（1 min）－10℃/min－180℃（5 min）, キャリヤーガス：He, 3.5mL/min

注入口温度：200℃, 検出器：FID（200℃）

〈HS条件〉加温温度：40℃, 加熱時間：10min, 加圧時間：3 min, 注入量：0.4ml

また、レシチンの添加濃度が、メチルプロピルジスルフィド保持効果に及ぼす影響を調べた。大豆と卵由来のレシチンを1, 0.5, 0.1, 0.01%になるように蒸留水で溶解した。バイアルビンにメチルプロピルジスルフィド1 μ lを添加した後、レシチン溶液を加え、3分間超音波処理した後、HS-GC（上記の条件）で、放出量を分析した。

3. 結果と考察

3.1 脂肪含量の異なるソーセージに含まれる 香気成分の特徴

脂肪含量の異なるノンスモークソーセージでは、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。

そこで、添加された脂肪含量の違いが、ソーセージのどの香気成分量に変動があるかを検討した。具体的には、細切した脂肪含量の異なるソーセージをバイアル瓶に入れ、60℃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で分析することにより、香気成分の特定とその量的な違いを調べた。

脂肪無添加製品から放出される香気成分の分析結果をFig. 1に示した。通常量の50%脂肪量添加製品から放出される香気成分の分析結果をFig. 2に示した。通常量の脂肪添加製品から放出される香気成分の分析結果をFig. 3に示した。

GC/MSによる分析の結果、複数の香気成分が検出された。Limonene, Linalyl anthranilate, Hexanoic acid, ならびにEugenolは、添加する脂肪含量に関係なく、すべてのソーセージで共通して検出された。このうち、Limonene, Hexanoic acidとEugenolは、脂肪添加量が多くなると、放出される量が減少した。これは、両香気化合物が、脂肪に保持されやすい性質を有している可能性が考えられた。1-Octen-3-olは、脂肪無添加のソーセージのみから検出されたので、脂肪に保持されやすい香気成分であると推定された。また、スパイス、カレー粉、漢方薬の香気成分であるMethyl eugenolは、脂肪が添加されている製品から検出されていることから、脂肪に保持されにくいと推定された。さらに、1-Pentanolは、脂肪添加の

製品からだけ検出されており、脂質由来の香気成分の可能性が示唆された。

3.2 GC-Oによる香気成分の特性解析と AEDAによる寄与成分の特定

GC-O装置を用いて、GCで検出された香気成分の臭いかぎを行い、脂肪添加量の異なる3種類のポークソーセージの風味形成に寄与度の高い香気成分の特定を試みた。

モノトラップで捕集した試料を、ジクロロメタンを用いて、4の倍数で段階的に希釈した後、GC-OによるAEDA法を実施し、寄与度の高い香気成分を特定した。それらの結果を、Table 1からTable 3に示した。希釈していないサンプルで実施した臭いかぎでは、脂肪無添加ポークソーセージで40か所、1/2量脂肪添加ポークソーセージで36か所、通常量脂肪添加ポークソーセージでは27か所で臭いが検出された。この結果から、脂肪を加えることで臭いの放出が抑えられることが判明し、昨年報告したように、脂肪添加により、香気成分が保持されることが判明した。

次に、これらのサンプルを段階的に希釈し、64倍希釈サンプルまでGC-OによるAEDA法を実施した。その結果、64倍希釈サンプルで検出された成分として、無添加ポークソーセージは4か所、通常の半分量脂肪添加ポークソーセージは5か所、通常量脂肪添加ポークソーセージは5か所であり、これらを重要成分として絞り込むことができた。

今回の結果から、これら脂肪添加量の異なる3種類のポークソーセージを比較すると、すべての試料で検出されたHexanoic acidは、あげもの・ゴム・人工的・靴の臭いとして感じられた。Linalyl anthranilateは、ひなたの臭い・燃えている臭い・花・筆筒の臭いと、またMethyl eugenolは、花・刺激臭・不快臭と感じられた。22.42分頃に検出されるeugenolは、ケチャップの臭いと

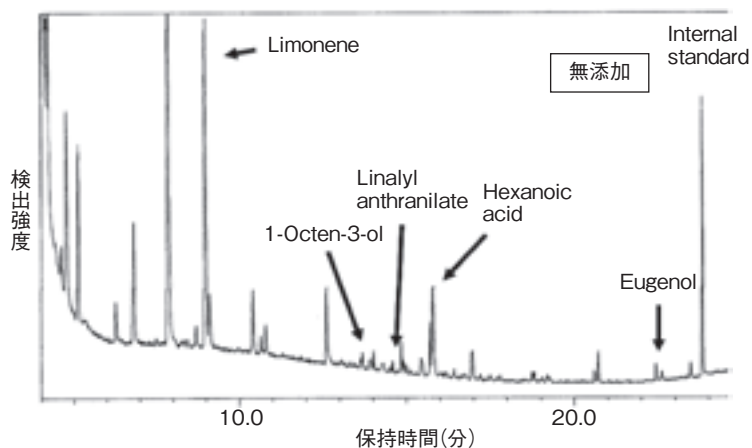


Fig. 1 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage without addition of fat

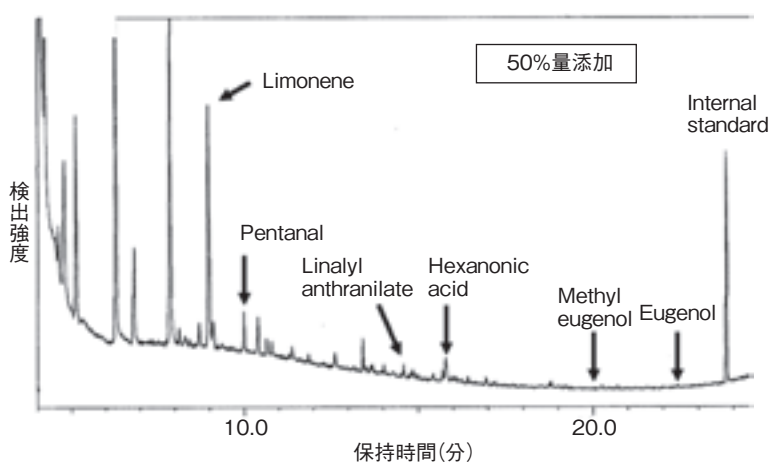


Fig. 2 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage containing 50 % of regular fat content

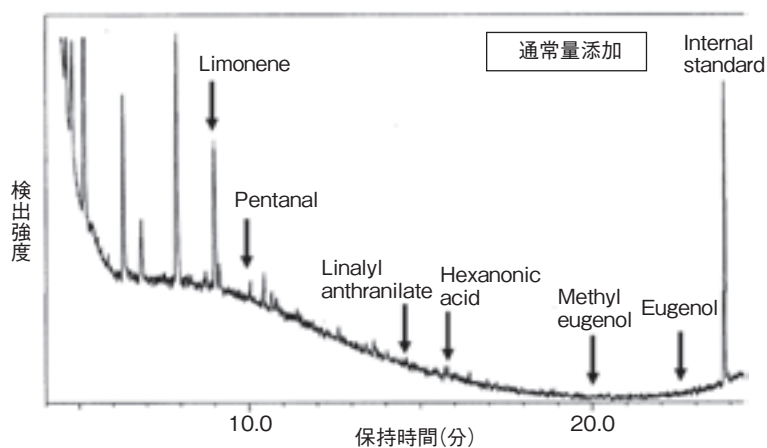


Fig. 3 GC-chromatogram of aroma compounds extracted from non-smoked pork sausage containing regular fat content

Table 1 GC-OによるAEDA法で検出された脂肪無添加ソーセージの香気成分 (Characteristic of aroma compounds released from the sausage without addition of fat)

【脂肪無添加】

保持時間	サンプルの希釈倍率				推定化合物名
	1	4	16	64	
8.95	ガス		ガス		Limonene
10.99	舞茸	すっきり			
12.32	コンソメ			刺激臭	
13.15	薬品・すっきり	酸化臭			
13.38	緑茶		甘い		1-Octen-3-ol
16.04	人工的	靴	人工的	人工的	Hexanoic acid
19.8		イカ		不快臭	2-Butenoic acid (E)-
20.39	不快臭	不快臭			
21.53	?	?			
22.42	ケチャップ	ケチャップ	ケチャップ	ケチャップ	Eugenol

	4倍希釈サンプルで検出できたもの
	16倍希釈サンプルで検出できたもの
	64倍希釈サンプルで検出できたもの

Table 2 GC-OによるAEDA法で検出された通常の半分量の脂肪添加ソーセージの香気成分 (Characteristic of aroma compounds released from the sausage containing 50% of regular fat content)

【通常量の半分の脂肪量添加】

保持時間	サンプルの希釈倍率				推定化合物名
	1	4	16	64	
9.11	酸っぱい	酸っぱい			Limonene
9.86	宇治抹茶	抹茶			1-Pentanol
10.98	キノコ類	すっきり			
14.42	刺激臭			刺激臭	Benzaldehyde
14.75	ひなたの匂い	ひなたの匂い			Linalyl anthranilate
16.04	車のオイル	刺激臭			Hexanoic acid
16.88	汗臭い		汗臭い		
17.03	草			刺激臭	α -Terpineol
17.75	磯		花		
18.43	夏の下駄箱		夏の下駄箱	不快臭	
20.7	花	刺激臭		花	Methyleugenol
21.54	夏の下駄箱		刺激臭・酸っぱい		
22.4	ケチャップ		ケチャップ	ケチャップ	Eugenol

	4倍希釈サンプルで検出できたもの
	16倍希釈サンプルで検出できたもの
	64倍希釈サンプルで検出できたもの

Table 3 GC-OによるAEDA法で検出された通常量の脂肪添加ソーセージの香気成分 (Characteristic of aroma compounds released from the sausage containing regular fat content)

【通常量の脂肪量添加】

保持時間	サンプルの希釈倍率				推定化合物名
	1	4	16	64	
8.68	不快臭	不快臭			Heptanal
9.75	宇治抹茶		すっきり		
9.89	レジン		酢		1-Pentanol
14.36	?	薬品			Benzaldehyde
14.77	花		酢		
14.86	燃えている匂い	花、筆筒			Linalyl anthranilate
16.05	あげもの	刺激臭	酸っぱい	ゴム	Hexanoic acid
16.56	チーズ・ホワイトソース	チーズ			2-Furanmethanol
17.07	ミルク	海苔			α -Terpineol
18.27	悪臭	ミルク様			
18.83			悪臭	フレッシュ	
19.72	ミルク様		牛乳		
20.09			落ち着く	不快臭	Methyleugenol
21.53	不快臭			酸っぱい	
22.32			?	アルコール	Eugenol

	4倍希釈サンプルで検出できたもの
	16倍希釈サンプルで検出できたもの
	64倍希釈サンプルで検出できたもの

感じられた。脂肪添加量のソーセージのみで検出された1-Pentanolは抹茶・酢と、 α -Terpineolは、草・ミルク・刺激臭と感じられた。このように、同じ香気成分を異なる臭いと感じられるので、臭いかぎでは事前に評価者同士のすり合わせが必要であると思われた。

3.3 脂質による香気成分の保持効果

これまでの結果から、脂質が香気成分を保持することが明らかとなったので、本研究では、脂質の中で、まず、香気成分の保持効果が期待できるリン脂質に関して香気成分保持効果を調べた。

リン脂質の中で、大豆あるいは卵由来のレシチンを用い、それぞれを1%の濃度になるように、蒸留水を加えて調製した。1%レシチン溶液に、メチルプロピルジスルフィドを添加した結果、大豆あるいは、卵由来のレシチン添加のいずれにおいても、レシチン無添加のものと比べて、放出量が有意に抑制された (Fig. 4)。また、卵由来のレシチンが、大豆由来のものより放出量が少ないことから、より多くの香気成分を保持できることが明らかとなった。レシチンには、主成分であるホスファチジルコリン以外に、ホスファチジルエタノールアミン、スフィンゴミエリン、リゾホスファチジルコリンなどを含んでいるので、今後、

香気成分保持効果にどの成分が寄与しているかを調べる必要がある。一方、レシチンによる2,6-ジメチルピラジン、フルフラール、ヘキサナールに対する保持効果は、認められなかった。

レシチンの添加量がメチルプロピルジスルフィドの保持量に及ぼす影響を調べた結果、大豆ならびに卵のいずれのレシチンでも、1, 0.5ならびに0.1%の添加では、メチルプロピルジスルフィドの保持効果が認められたが、0.01%の添加では、保持効果は消失することが判明した (Fig. 5, 6)。

4. 要 約

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

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、GC/MSならびにGC-O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香気成分の臭いの特性を調べた。その結果、Limonene (酸っぱい), Linalyl anthranilate (花,

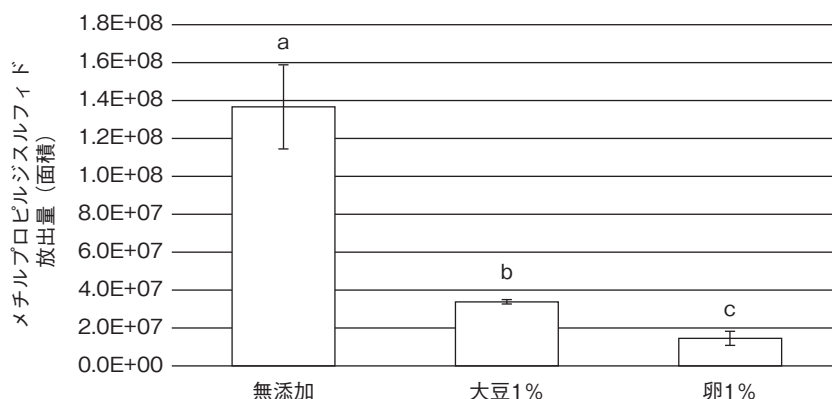


Fig.4 Effect of addition of lecitin on persistence of methylpropyl disulfide

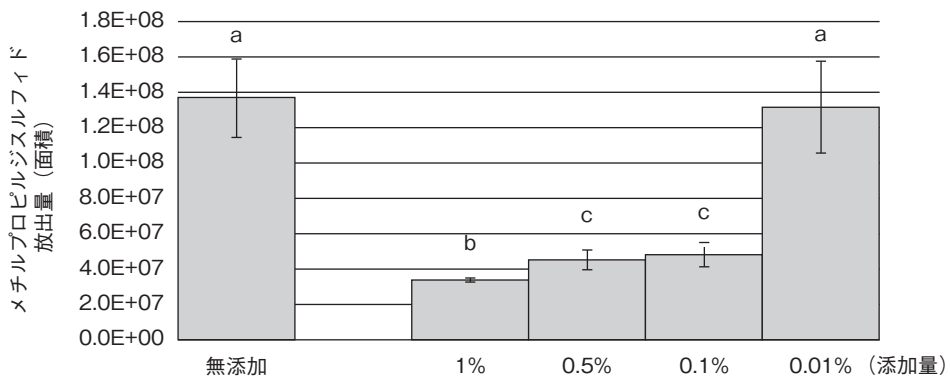


Fig. 5 Effect of soy lecithin on persistence of methylpropyl disulfide

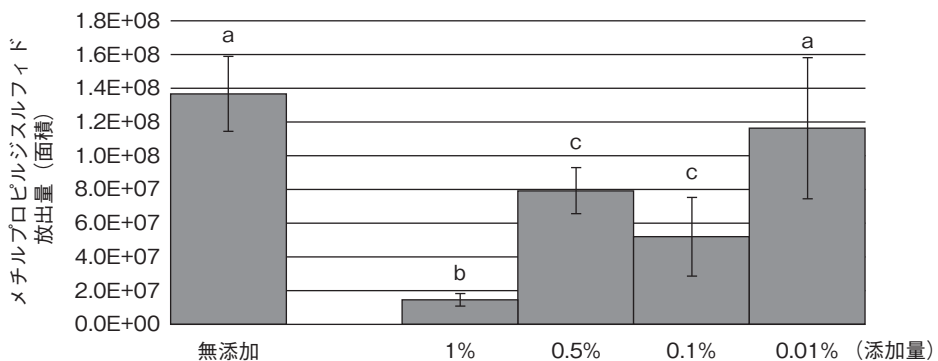


Fig. 6 Effect of egg lecithin on persistence of methylpropyl disulfide

* : Fig. 4~6 異なるアルファベットのデータ群間では有意差あり ($p < 0.05$)

ひなたの臭い), Hexanoic acid (揚げ物, ゴム), ならびにEugenol (ケチャップ) は, 添加する脂肪含量に関係なく, すべてのソーセージで共通して検出された。1-Octen-3-ol (緑茶, 甘い) は, 脂肪無添加のソーセージのみから検出された。一方, 1-Pentanol (抹茶, 酢), α -Terpineol (草, 海苔) ならびに, Methyl eugenol (花・刺激臭・不快臭) は, 脂肪添加の製品からだけ検出されていた。

そこで, 脂質の種類や添加量が香気成分の保持量に及ぼす影響を明らかにするため, リン脂質であるレシチンによる香気成分保持効果を調べた。1%の大豆由来レシチンと卵由来レシチン溶液は, メチルプロピルジスルフィドを保持する効果

が明らかとなった。その効果は, いずれもレシチン濃度が0.1%まで低下しても持続することが判明した。しかし, 2,6-ジメチルピラジン, フルフラール, ヘキサナールに対する保持効果は認められなかった。

文 献

- 1) 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.
- 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, 2017-9, 23~27, 2017.
- 3) 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.
- 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) 西村敏英 : 「ポークソーセージのkokの形成における香気成分と脂質の役割」, 平成29年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, **36**, 59~67, 2018.

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（Ⅲ）

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

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)

Hypoxanthine (Hx) accumulates in aged meat because of the degradation of inosine monophosphate (IMP) during postmortem aging. Hx has little studied as a substance participating in the taste of meats. However, in preceeding study, we revealed that Hx enhanced umami and kokumi tastes of the soup prepared from pork. Therefore, Hx might be responsible for the improvement of meat taste during postmortem aging.

The purpose of this study was to estimate the degree of paratability of aged meat in terms of Hx. Three sirloins of beef were respectively aged by dry-aging and wet-aging at 2℃ for 70 days, and 10, 20, 30, 40, 50, 60 and 70 days postmortem samples were obtained. In each sample, the strength of taste, aroma and texture were evaluated by sensory test, and the levels of taste-related substances containing Hx were determined.

In the sensory test, the increase of aging aroma depended on prolongation of aging periods, while the increase of umami and kokumi tastes and tenderness stopped in the late aging. Especially, in dry-aged beef, the scores of sensory test were the highest values at 40 to 50 postmortem days, followed by decrease. As regards the taste-related substances, free amino acids increased significantly by prolongation of aging periods, while free peptide increased until 40 days postmortem, Hx increased until 40 days postmortem in dry-aging and 60 days postmortem in wet-aging. The correlation coefficients between the amounts of free peptide or Hx and the scores of sensory tests were above 0.8 in both of dry-aging and wet-aging. These results suggest that there is a each suitable period for dry-aging and wet-aging. Thus it was concluded that the amounts of Hx might be important factor to estimate paratability of aged meat.

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いる。熟成による風味

味の改善には、酸臭や獣臭といった不快臭の消失や、遊離アミノ酸や低分子ペプチドの増加等の呈味への関与が報告されており^{1~3)}、近年では食品としての付加価値を高めるために長期間の熟成が行われている。熟成方法は大きく2種類に分けら

れ、一つは食肉流通の主流となっている真空包装した食肉を低温貯蔵するウェットエイジング法、もう一つは昔ながらの無包装で温度、湿度および送風を管理しながら低温貯蔵するドライエイジング法である。いずれの熟成方法においても熟成期間の延長は風味の改善を促すと考えられているが、熟成肉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。また食肉の熟成適期を判断する明確な基準もない。

我々は、熟成肉の風味のうち、「味」に関与する因子を解明することを目的として、食肉中の呈味成分の一つである核酸関連物質に着目して研究を進めてきた。生筋中に含まれるATPは、と畜直後から速やかに分解され始め、食肉のうま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、その後の長期熟成中にさらに分解されてヒポキサンチン (Hx) に変換する。このHxについては、これまでに鮮度指標K値に関連する研究報告がいくつかなされているが^{4~6)}、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った⁷⁾。しかし我々は、これまでにハムやソーセージといった食肉製品において、Hxが塩漬熟成と称される熟成過程で顕著に増加する呈味物質の一つであり、塩漬肉特有の味の増強に必須であることを明らかにしてきた⁸⁾。

そこで、熟成中の食肉に蓄積するHxの熟成肉特有の味への関与を予測し、豚肉スープに各種濃度のHxを加え、分析型官能評価を実施した。その結果、Hxが一定の濃度までは、加えたHx量に依存してスープのうま味およびコクが増強されること、さらに一定量を超えるとスープの苦味が増し、うま味およびコクが増強されないことを明らかにした⁹⁾。Hx自体が苦味を呈する物質であるため、その苦味が食肉の味に関与していると考

え、他の苦味物質 (硫酸キニーネ・アルギニン) が豚肉スープに与える影響についても官能評価により調べた。その結果、苦味物質の種類にかかわらず、ある程度の苦味は豚肉スープの苦味自体を増強せずに、うま味およびコクといった好ましい味わいを増強することを明らかにした¹⁰⁾。したがって、Hxの呈する苦味は食肉に含まれるさまざまな物質と作用し、結果として熟成肉特有の好ましい味を形成している可能性がある。今後、食肉の熟成に伴う味の改善におけるHxの関与機構を明らかにすれば、食肉の熟成適期およびおいしさを判断する指標を提示することも可能となる。

そこで、本課題では、長期熟成を施した食肉の熟成適期の指標としてHxを利用することを考え、次のような実験を実施した。交雑牛のサーロインをドライエイジングおよびウェットエイジングにより最長70日間熟成した。この長期熟成に伴う牛肉の呈味成分および食味の変化を経時的に分析・評価し、Hx濃度と食味性との相関について調べた。

2. 方 法

2.1 材料

供試試料には国産交雑牛 (と畜月齢26ヶ月) の3頭を用いた。と畜から4日目に左右のサーロインを採取し、右側にはドライエイジング (DA) を、左側にはウェットエイジング (WA) を施した。DAでは、熟成庫内の温度を2℃、相対湿度を75%に調節し、試料は常に送風が当たるように管理しながら静置した。熟成10, 20, 30, 40, 50, 60および70日目に試料を厚さ5 cmずつカットし、表面に付着したカビをトリミングした後、真空包装して成分分析および官能評価に供するまで-30℃で凍結保管した。WAでは、試料を最初に厚さ5 cmずつ7分割して非通気性の袋に入れて真空包装し、次に2℃に設定した熟成庫内で最長70日間静置した。熟成10日ごとに試料を熟成庫

から取り出し、DAと同様に凍結保管した。各熟成試料を4℃に設定した冷蔵庫内に置いて一晩かけて解凍し、試験に供した。試験部位は胸最長筋とし、中心部を官能評価に、周辺部を成分分析に供した。

2.2 官能評価

各熟成試料を5 cm × 5 cm × 0.8 cmに整形し、230℃に設定したホットプレート (ATF-500, アサヒ理化製作所) 上で片面60秒、反対面を90秒加熱調理した。調理の際にはタイムキーパー1名および調理者1名を設けた。調理後の試料をただちに当研究所に所属する訓練された分析型パネル5名 (36.4 ± 4.3歳, 男性2名, 女性3名) により評価した。

官能評価の方法は特性プロファイル法を用いた。同一個体の熟成0日目をコントロール (0点) とし、熟成した試料の食味を-3点~+3点の7段階で評価した。評価項目は、基本五味 (塩味, 甘味, 酸味, 苦味, うま味), コク, 熟成香および軟らかさとした。コクは、西村ら¹¹⁾ が提唱する定義の中から濃厚感 (complexity: 複雑さ, あつみ) および持続性 (lastingness: うま味の後味) の強さについて評価した。なお、基本五味の評価をする時は、鼻腔を閉じた状態で香りの影響を排除した。

2.3 成分分析

各熟成試料は、フードカッター (GRINDMIX GM200, Retsch) を用いて均一化し、一般成分 (水分, 脂肪, タンパク質), pHおよび呈味成分 (遊離アミノ酸, 核酸関連物質, 遊離ペプチド) の分析に供した。

水分は加熱乾燥法, 脂肪はソックスレー法 (ソクステストSER148/6, (株) アクタック製), タンパク質は燃焼法 (スミグラフNC-220F, (株) 住化分析センター製), pHはガラス電極 (PH-METER F52, 堀場製作所) によって測定した。

遊離アミノ酸の濃度は、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 (バイオミキサーBM-1, (株) 日本精機製作所) 後に遠心分離し、得られた上清をヘキサンで脱脂したものを高速アミノ酸分析計 (L-8900, (株) 日立ハイテクテクノロジーズ) で測定した。

核酸関連物質の濃度は、北田らの方法¹²⁾ で測定した。試料に10%過塩素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5 N水酸化カリウム溶液を用いてpH6.4に調整したものをHPLCシステム (Waters2695, 日本ウォーターズ (株)) に供した。カラムはShimpack HRC ODS column (6.0 mm i.d. × 150 mm, 島津製作所) を用い、測定波長は250 nmとした。

遊離ペプチドの濃度は、熟成した試料に蒸留水を加えてホモジナイズ後、2%になるようにトリクロロ酢酸を加えて遠心分離し、得られた抽出液をプロテインアッセイLowryキット (ナラカイ社製) を使用して測定した¹³⁾。

2.4 統計処理

すべての理化学分析の結果は交雑牛3頭の平均値および標準誤差で示し、官能評価の結果は3頭に対するパネル5名の平均値および標準誤差で算出した。また官能評価の有意差検定はF検定およびT検定を用いて行い、有意水準は1%とした。さらに、食肉成分と官能評価との相関係数はMicrosoft Excel 2013を用いて算出した。

3. 結果と考察

3.1 官能評価

DAおよびWAを施した試料の官能評価結果をFig. 1に示す。熟成に伴う風味の変化は、苦味, うま味, コク, 熟成香および軟らかさについて認められた。一方、データには示していないが、塩味, 甘味および酸味については熟成に伴う変化が認められなかった。

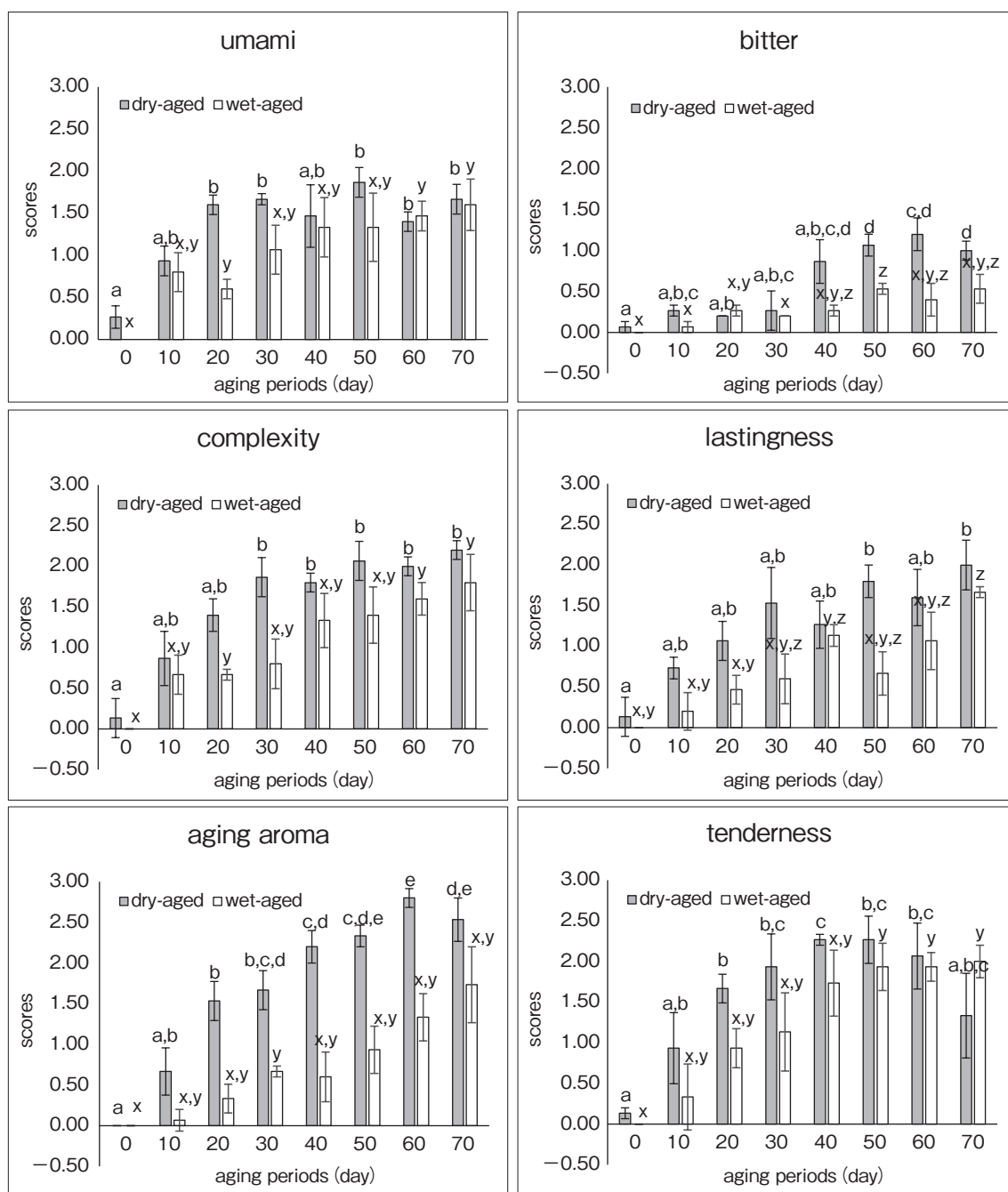


Fig. 1 Changes in the sensory scores of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

The strength of taste, aroma and texture of dry-aged and wet-aged beef ($n = 3$) are estimated by sensory evaluations (mean $\pm$ standard error). Different small letters in the same column are significantly different ($p < 0.01$).

うま味の強さは、DA、WAいずれの熟成方法でも熟成により増強された。熟成50日目まではDAの方がWAよりも増強の程度が大きく、熟成方法による違いが認められた。しかし、60日目以降はDAとWAのうま味の強さは同程度の強さに感知され、熟成方法による違いが認められなかった。コクを表す濃厚感および持続性の強さは、うま味の推移と同様の傾向が認められた。苦味の強さは、DAにおいてうま味およびコクのような顕著な増強は認められなかったものの、熟成によりやや増強された。

熟成香の強さは、熟成方法による違いが最も顕著だった。DAにおいて熟成により顕著に増強され、最大となった60日目ではWAの2倍以上の強さが感知された。DAを施すことにより期待される効果の一つに「ナッツ臭」とも呼ばれる特徴的な香りの付与があり¹⁴⁾、本結果でもその効果がよく現れていた。なお、DAほどではないものの、WAでも熟成に伴い熟成香は上昇する傾向がみられた。また、軟らかさについては、DAで最も軟らかいと感知されたのが40～50日目で、それ以降は硬くなる傾向が示され、興味深い結果となった。

以上の結果から、熟成香は熟成期間に依存して増強される傾向がみられたが、味および食感についてはいずれの熟成方法においても期間が長いほど風味が改善するわけではなく、長期間になると風味の変化は緩やかになる傾向が認められた。特に、DAでは40日～50日目をピークとしてそれ以降は風味が低下する傾向がみられた。

3.2 成分分析

一般成分の測定結果をTable 1に示す。DAにおいて、水分が熟成開始時には63.3%だったが、熟成に伴い減少し、70日目に49.7%となった。特に60日から70日目にかけての減少が大きかった。この結果は、試料が熟成期間中に空気に触れることにより乾燥したことを示している。また、WAに

おいても、わずかに水分が減少した。これは、熟成試料を分析に供するまで凍結して保管していたため、解凍時にドリップとして水分を失った結果と推定された。タンパク質含量は、熟成に伴って変化しなかったが、脂肪含量はDAにおいて熟成に伴い増加し、試料の乾燥に伴い濃縮したと考えられた。

pHの測定結果をTable 2に示す。DAにおいて、熟成開始時には5.4だったが、熟成に伴い上昇し、70日目には5.8となった。一方、WAでは熟成に伴う変化は認められなかった。pHの値は酸味の強さに影響すると考えられる。しかし、官能評価の結果では酸味の強さは熟成により変化しておらず(データ未掲載)、本結果で得られた程度のpHの変化はヒトが感知しないと推定された。

遊離ペプチドの測定結果をTable 3に、遊離アミノ酸の測定結果をTable 4に示す。熟成に伴うこれらの変動についてはこれまでに多くの報告があり、西村らにより熟成によって蓄積する遊離ペプチドおよび遊離アミノ酸は食肉の風味向上に寄与すると報告されている^{1・2)}。本結果においても、遊離ペプチドおよび遊離アミノ酸は熟成により顕著に増加しており、官能評価で認められたうま味およびコクの増強に寄与すると考えられた。長尾らは、熟成中に蓄積したペプチドは内在するエンドペプチダーゼの作用によりタンパク質が分解されて生成すると報告している¹⁵⁾。本結果において、遊離ペプチドの熟成中の変化は熟成方法による差が認められなかった。したがって、熟成中のペプチドの生成は、同一温度で熟成した場合、熟成方法の影響を受けないと推定された。また、熟成40日目以降はペプチドがほとんど増加せずに横ばいとなった。この結果は、チルド牛肉において32日目までペプチドが増加しその後は64日目まで横ばいだったとする柳原らの結果¹⁶⁾とも一致しており、熟成が長期間になるとタンパク質からペプチ

Table 1 Changes in water, protein and fat contents (%) of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

	dry-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
water	63.3 ± 1.6	62.1 ± 1.3	61.5 ± 1.4	58.6 ± 1.9	57.3 ± 1.8	57.1 ± 1.3	57.3 ± 2.4	49.7 ± 1.4
protein	20.0 ± 0.5	20.0 ± 0.4	19.9 ± 0.5	21.2 ± 0.5	21.1 ± 0.6	21.5 ± 0.5	21.4 ± 0.7	21.2 ± 0.6
fat	13.7 ± 1.4	16.0 ± 1.7	18.6 ± 2.6	20.2 ± 2.6	20.1 ± 2.0	20.1 ± 2.0	22.1 ± 2.2	23.3 ± 2.8

	wet-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
water	65.6 ± 1.0	62.6 ± 1.3	62.7 ± 1.5	62.8 ± 0.9	61.4 ± 1.5	60.6 ± 0.7	61.8 ± 0.9	62.7 ± 1.3
protein	20.0 ± 0.4	19.8 ± 0.4	19.7 ± 0.5	19.7 ± 0.4	19.2 ± 0.5	19.2 ± 0.3	19.0 ± 0.3	18.9 ± 0.5
fat	14.7 ± 1.6	15.8 ± 1.5	16.3 ± 1.8	15.7 ± 1.0	19.2 ± 1.6	19.2 ± 0.9	18.1 ± 1.3	16.6 ± 1.1

Values show the mean ± standard error of three samples.

Table 2 Changes in pH values of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

	aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
dry-aged	5.4 ± 0.01	5.4 ± 0.01	5.5 ± 0.01	5.5 ± 0.01	5.6 ± 0.01	5.7 ± 0.01	5.8 ± 0.02	5.8 ± 0.03
wet-aged	5.5 ± 0.01	5.5 ± 0.01	5.5 ± 0.01	5.6 ± 0.01	5.6 ± 0.01	5.5 ± 0.01	5.5 ± 0.03	5.5 ± 0.03

Values show the mean ± standard error of three samples.

Table 3 Changes in amounts of free peptide (mg/100g) of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

	aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
dry-aged	338.4 ± 10.1	422.1 ± 14.5	570.0 ± 19.5	579.5 ± 28.5	819.1 ± 64.2	648.2 ± 27.6	682.6 ± 36.0	691.9 ± 41.4
wet-aged	378.0 ± 19.6	467.2 ± 25.3	498.7 ± 13.4	575.6 ± 13.4	651.5 ± 23.4	667.2 ± 12.1	673.9 ± 9.7	645.9 ± 13.7

Values show the mean ± standard error of three samples.

ドへの分解はあまり進まないと考えられた。一方、遊離アミノ酸の熟成中の変化は熟成方法による変化の違いが認められた。DAにおける遊離アミノ酸の増加は、水分が減少し濃縮したと考えられる割合よりも顕著に大きく、うま味を呈するグルタミン酸 (Glu) の濃度は熟成開始時の 5.4mg/100 g から70日間で64.5mg/100 g にまで達した。一方、WAでのGluの濃度は熟成開始時の 4.1mg/100 g から37.8mg/100 g となり、DAよりも増加の程度は低かった。遊離アミノ酸は、熟成期間中にペプチドが内在するアミノペプチダーゼの作用により分解されて蓄積する¹⁷⁾。したがって、DAにおいて、何らかの要因によりアミノペプチダーゼが活性化する可能性が考えられた。

核酸関連物質の測定結果をTable 5に示す。と畜後の筋肉中にはATP、ADPおよびAMPはほとんど含まれないため、IMP、イノシン (INO) およびHxの濃度を測定した。多くの研究において、IMPは熟成に伴い内在する5'ヌクレオチダーゼによって分解されると報告されている^{15, 16, 18)}。本結果においても熟成方法にかかわらずIMPは減少し、60日目にはほとんど消失した。一方、Hxは熟成に伴い増加した。DAでは10日目に、WAでは20日目にHx含量とIMP含量が逆転し、Hx含量はDAで40日目、WAで60日目に最高値に達した。この熟成に伴うHxの増加は、官能評価で認められたうま味およびコクの変動と非常に似た挙動を示した。

Table 4 Changes in the amounts of free amino acids (mg/100g) of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

	dry-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Asp	0.0 ± 0.0	0.6 ± 0.0	1.6 ± 0.3	3.5 ± 0.3	5.9 ± 0.6	9.4 ± 0.9	11.6 ± 0.9	18.5 ± 2.5
Thr	5.2 ± 0.0	10.3 ± 0.4	14.1 ± 0.5	17.2 ± 0.9	23.0 ± 1.6	32.8 ± 2.4	36.0 ± 2.5	40.8 ± 3.5
Ser	5.9 ± 0.1	14.6 ± 0.6	19.5 ± 0.7	23.2 ± 1.0	29.6 ± 2.0	41.3 ± 2.6	44.2 ± 2.9	48.3 ± 3.5
Asn	2.7 ± 0.0	5.5 ± 0.2	7.7 ± 0.2	9.2 ± 0.4	12.8 ± 0.9	19.8 ± 1.3	21.9 ± 1.7	24.2 ± 2.0
Glu	5.4 ± 0.3	14.2 ± 0.6	19.6 ± 0.7	27.2 ± 1.3	36.8 ± 2.0	47.0 ± 3.5	54.8 ± 3.7	64.5 ± 5.4
Gln	39.8 ± 2.1	49.6 ± 2.7	48.0 ± 2.6	61.3 ± 3.9	62.8 ± 4.3	80.3 ± 1.2	82.6 ± 2.5	86.4 ± 2.7
Gly	9.3 ± 0.1	13.1 ± 0.3	14.9 ± 0.4	17.5 ± 0.6	20.8 ± 1.3	29.4 ± 1.8	31.6 ± 1.2	33.7 ± 2.5
Ala	33.4 ± 0.4	45.7 ± 1.0	50.5 ± 1.5	55.7 ± 1.2	63.3 ± 3.6	82.3 ± 4.3	84.7 ± 4.7	88.5 ± 6.0
Val	6.6 ± 0.1	15.0 ± 0.7	21.3 ± 0.8	25.5 ± 1.4	33.9 ± 2.1	47.1 ± 3.2	50.1 ± 3.3	55.4 ± 4.8
Cys	1.6 ± 0.1	1.6 ± 0.4	1.7 ± 0.4	2.7 ± 0.2	2.8 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.8 ± 0.1
Met	3.2 ± 0.1	11.9 ± 0.2	15.0 ± 0.5	16.7 ± 0.7	21.0 ± 1.0	26.8 ± 1.5	28.1 ± 1.6	29.9 ± 2.1
Ile	5.4 ± 0.2	13.7 ± 0.5	18.9 ± 0.5	21.6 ± 1.0	27.8 ± 1.2	37.5 ± 2.3	40.5 ± 2.2	45.0 ± 3.3
Leu	8.6 ± 0.2	23.6 ± 1.1	32.0 ± 1.1	37.1 ± 1.8	47.9 ± 2.3	64.1 ± 3.9	68.6 ± 4.1	74.2 ± 5.5
Tyr	5.2 ± 0.2	14.2 ± 0.7	19.2 ± 0.7	22.1 ± 1.1	28.2 ± 1.4	36.4 ± 2.3	38.6 ± 2.4	42.1 ± 3.3
Phe	4.7 ± 0.1	13.6 ± 0.6	19.5 ± 0.7	22.9 ± 1.2	29.7 ± 1.3	39.6 ± 2.5	41.9 ± 2.6	44.9 ± 3.5
Trp	1.1 ± 0.0	3.2 ± 0.1	4.7 ± 0.2	5.3 ± 0.3	7.3 ± 0.5	9.0 ± 0.6	9.8 ± 0.6	11.7 ± 1.1
Lys	8.6 ± 0.1	17.0 ± 0.6	22.9 ± 0.7	27.1 ± 1.2	38.2 ± 1.9	55.0 ± 3.7	62.0 ± 3.8	72.1 ± 6.9
His	3.4 ± 0.0	6.0 ± 0.2	7.8 ± 0.2	9.2 ± 0.4	12.5 ± 0.6	17.6 ± 1.2	19.8 ± 1.2	23.5 ± 2.2
Arg	8.6 ± 0.4	16.5 ± 0.4	23.3 ± 1.0	25.1 ± 0.9	32.5 ± 1.5	44.1 ± 2.6	48.3 ± 2.8	52.9 ± 4.5
Pro	3.0 ± 0.1	4.7 ± 0.0	6.2 ± 0.2	7.5 ± 0.3	11.8 ± 0.3	16.2 ± 1.2	19.4 ± 0.7	23.5 ± 2.1
total	161.7 ± 4.8	294.6 ± 11.4	368.5 ± 14.2	437.6 ± 20.0	548.7 ± 30.6	738.4 ± 43.1	797.1 ± 45.6	882.7 ± 67.5

	wet-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
Asp	0.0 ± 0.0	0.2 ± 0.1	0.6 ± 0.1	2.5 ± 0.1	4.9 ± 0.2	4.5 ± 0.1	4.7 ± 0.2	5.3 ± 0.2
Thr	4.2 ± 0.1	5.4 ± 0.2	8.2 ± 0.4	12.6 ± 0.7	16.9 ± 0.4	19.4 ± 0.3	20.2 ± 0.5	22.0 ± 0.6
Ser	5.0 ± 0.1	7.1 ± 0.5	12.0 ± 0.6	18.0 ± 0.9	23.7 ± 0.5	27.4 ± 0.6	28.8 ± 0.6	28.8 ± 0.6
Asn	2.3 ± 0.1	2.9 ± 0.1	4.2 ± 0.2	6.8 ± 0.3	9.7 ± 0.2	11.4 ± 0.2	12.1 ± 0.2	13.3 ± 0.2
Glu	4.1 ± 0.3	5.5 ± 0.5	10.3 ± 0.3	17.5 ± 0.8	24.6 ± 0.5	30.9 ± 0.6	34.2 ± 0.7	37.8 ± 0.8
Gln	39.2 ± 1.5	40.0 ± 1.1	39.2 ± 0.9	49.5 ± 2.3	56.8 ± 3.2	58.6 ± 3.8	63.5 ± 2.8	71.9 ± 2.4
Gly	8.3 ± 0.2	8.9 ± 0.2	10.6 ± 0.5	13.9 ± 0.6	16.8 ± 0.3	18.9 ± 0.4	20.2 ± 0.4	21.6 ± 0.4
Ala	30.5 ± 0.8	33.2 ± 0.9	37.6 ± 1.5	46.9 ± 1.4	53.7 ± 0.8	58.5 ± 1.4	60.6 ± 1.4	63.9 ± 1.3
Val	5.8 ± 0.2	7.9 ± 0.4	13.0 ± 0.7	19.2 ± 1.1	25.6 ± 0.7	30.2 ± 0.6	31.0 ± 0.7	32.5 ± 0.8
Cys	1.3 ± 0.0	1.7 ± 0.0	1.9 ± 0.0	2.0 ± 0.0	2.1 ± 0.0	2.3 ± 0.0	2.4 ± 0.0	2.5 ± 0.1
Met	3.4 ± 0.1	6.6 ± 0.7	10.7 ± 0.2	13.4 ± 0.7	17.1 ± 0.3	19.3 ± 0.3	19.9 ± 0.2	20.9 ± 0.3
Ile	4.3 ± 0.1	6.8 ± 0.5	11.4 ± 0.4	16.0 ± 0.7	20.9 ± 0.3	24.5 ± 0.4	25.8 ± 0.4	27.2 ± 0.4
Leu	7.1 ± 0.2	11.1 ± 0.8	19.1 ± 0.8	27.6 ± 1.4	36.7 ± 0.7	43.4 ± 0.7	45.2 ± 0.6	47.6 ± 0.6
Tyr	4.3 ± 0.1	6.8 ± 0.5	12.0 ± 0.5	16.9 ± 0.9	21.5 ± 0.5	23.9 ± 1.0	22.5 ± 0.2	21.2 ± 1.3
Phe	4.4 ± 0.2	6.6 ± 0.4	11.2 ± 0.4	16.6 ± 0.8	22.1 ± 0.4	26.6 ± 0.4	28.4 ± 0.3	30.2 ± 0.6
Trp	0.9 ± 0.0	1.3 ± 0.1	2.6 ± 0.1	3.6 ± 0.2	4.7 ± 0.1	5.9 ± 0.2	6.2 ± 0.3	6.1 ± 0.1
Lys	7.4 ± 0.2	9.2 ± 0.4	13.5 ± 0.6	19.9 ± 0.9	25.8 ± 0.4	30.9 ± 0.5	32.0 ± 0.7	34.1 ± 0.5
His	2.8 ± 0.0	3.4 ± 0.2	4.8 ± 0.2	6.8 ± 0.3	8.7 ± 0.1	10.3 ± 0.2	10.8 ± 0.2	11.4 ± 0.2
Arg	7.4 ± 0.0	9.0 ± 0.6	13.1 ± 0.6	20.5 ± 1.2	26.0 ± 0.6	30.1 ± 0.6	29.4 ± 0.3	28.9 ± 0.3
Pro	2.9 ± 0.2	2.7 ± 0.1	3.6 ± 0.1	5.5 ± 0.3	7.1 ± 0.1	8.6 ± 0.1	9.7 ± 0.3	10.5 ± 0.3
total	145.5 ± 4.4	176.2 ± 8.3	239.7 ± 8.8	335.5 ± 15.6	425.3 ± 10.5	485.6 ± 12.4	507.6 ± 11.2	537.5 ± 11.9

Values show the mean ± standard error of three samples.

Table 5 Changes in the amounts of ATP-related substances ($\mu\text{mol/g}$) of beef during dry-aging and wet-aging at 2°C

	dry-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
IMP	3.1 $\pm$ 0.2	2.0 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.2	0.4 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
INO	0.9 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.0	0.9 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2	0.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
Hx	1.4 $\pm$ 0.0	2.3 $\pm$ 0.0	3.0 $\pm$ 0.0	3.1 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.3	3.7 $\pm$ 0.2
	wet-aging periods (day)							
	0	10	20	30	40	50	60	70
IMP	4.2 $\pm$ 0.5	3.0 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.4	1.0 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.2	0.2 $\pm$ 0.1	0.1 $\pm$ 0.0	0.0 $\pm$ 0.0
INO	1.6 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.2	1.7 $\pm$ 0.3	1.4 $\pm$ 0.3	1.3 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.1
Hx	1.2 $\pm$ 0.1	2.1 $\pm$ 0.0	2.7 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.1	3.5 $\pm$ 0.1	4.0 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 0.2

Values show the mean $\pm$ standard error of three samples.

Table 6 Correlation coefficient between sensory evaluation and taste substances of beef

		total of free-amino acids	Glu	peptide	IMP	Hx
dry-aged	umami	0.7511	0.7306	0.8859	-0.9771	0.9493
	complexity	0.8865	0.8774	0.8662	-0.9927	0.9575
	lastingness	0.8957	0.8935	0.8966	-0.9747	0.9572
	aging aroma	0.9337	0.9251	0.9027	-0.9684	0.9807
	tenderness	0.6229	0.5917	0.8506	-0.8972	0.8962
wet-aged	umami	0.9270	0.9088	0.9573	-0.9464	0.9517
	complexity	0.9582	0.9546	0.9446	-0.9357	0.9576
	lastingness	0.8894	0.8949	0.8252	-0.8531	0.8579
	aging aroma	0.9320	0.9554	0.8229	-0.8587	0.8794
	tenderness	0.9811	0.9631	0.9807	-0.9825	0.9860

ここで、官能評価と相関のある食肉成分を調べるために、遊離アミノ酸の総量、グルタミン酸、遊離ペプチド、IMPおよびHxの濃度と、官能評価によって得られたスコアとの相関係数を算出した (Table 6)。その結果、熟成方法にかかわらず、遊離ペプチドおよびHxの濃度とすべての官能評価との間にRが0.8以上の強い正の相関が認められた。遊離アミノ酸の総量およびグルタミン酸の濃度は、DAにおいてうま味および軟らかさとの相関がやや低かった。また、IMPの濃度はすべての官能評価との間に強い負の相関が認められた。さらに、IMPおよびGluの含量から食品のうま味強度を算出する計算式 (うま味強度 = $\text{Glu}(\%) + 1218 \times \text{Glu}(\%) \times \text{IMP}(\%)$)¹⁹⁾ を利用し、熟成し

た試料のうま味強度を算出し、官能評価によるうま味の強さとの相関を調べた。その結果、うま味強度とうま味との相関係数はDAでR = -0.6079、WAでR = -0.7171となり、いずれも負の相関を示した。GluとIMPによるうま味の相乗効果についてはすでに山口らにより明らかにされている¹⁹⁾が、熟成された食肉において発現する強いうま味はGluとIMPの濃度のみでは説明できないと考えられた。

本研究により、WA、DAのいずれにおいても長期間の熟成が必ずしも風味の改善には繋がらず、特にDAにおいては熟成40日～50日目をピークとしてそれ以降は風味が低下する傾向が示された。また、成分の変化では、遊離ペプチドは40日

目以降、HxはDAで40日目、WAで60日目以降増加せず、その挙動は官能評価と高い相関を示した。以上の結果から、DAおよびWAにはともに熟成適期があり、その期間は遊離ペプチドあるいはHxの濃度を測定することによって把握できる可能性が示された。これらの物質により食肉の熟成適期を判断することができれば、無駄な熟成時間を省き、歩留まりを向上させることが可能となる。

すでに、我々は、Hxが呈する苦味は豚肉スープのうま味およびコクの増強に寄与することを明らかにしている^{9, 10)}。この苦味が、実際の食肉においてどのようにうま味やコクの発現を惹起しているのかについては今のところ明らかにされていないが、今回Hx濃度と官能評価の間に強い相関関係が示されたことに鑑みれば、これらの間に因果関係が存在することを強く支持するものと考えている。また、中村らによって報告されている²⁰⁾ように、筋肉部位によって核酸関連物質の含量や熟成に伴う変化は異なる。そのため、今後は、異なる畜種や筋肉部位における検討や、Hxと呈味成分との成分間の相互作用について検討したい。

4. 要 約

我々は、これまでに食肉中のヒポキサンチン(Hx)は豚肉スープのうま味およびコクの増強に寄与することを明らかにしている。本研究では、長期熟成を施した食肉の熟成適期の指標としてHxが利用できるのか否かを調べる目的から、2℃で70日間のドライエイジングおよびウェットエイジングにより熟成した交雑牛の食味および呈味成分の変化について調べた。官能評価の結果、熟成香は熟成期間に依存して増強された。一方、うま味、コクおよび軟らかさについては、いずれの熟成方法においても熟成に伴い増強したが、熟成期間が長くなると風味の変化は緩やかになる傾向が

認められた。特に、ドライエイジングでは40日～50日目をピークとしてそれ以降は風味が低下する傾向が認められた。続いて、呈味成分を分析した結果、遊離アミノ酸は熟成により顕著に増加したが、遊離ペプチドは40日目以降、Hxはドライエイジングにおいて40日、ウェットエイジングにおいて60日目以降増加しなかった。これらの物質のうち、遊離ペプチドとHxの熟成中の挙動は官能評価と強い相関($R > 0.8$)を示した。以上の結果から、各種熟成方法には適期があり、この適期を知る指標としてHxは有力な候補の一つと考えられた。

謝 辞

- ・ 試料の提供にご協力いただいた小川畜産食品(株)に深く感謝します。
- ・ 試験の遂行にあたりご指導をいただいた神戸大学大学院農学研究科の山之上稔准教授に深く感謝します。

文 献

- 1) Nishimura, T., *et al.* : *Food Reviews International*, 4, 175~194, 1988.
- 2) Nishimura, T., *et al.* : *Agricultural and Biological Chemistry*, 52, 2323~2330, 1988.
- 3) 松石昌典 : 食肉の科学, 36, 183~198, 1995.
- 4) Yukio, Y., *et al.* : *Food Chemistry*, 52, 4, 439~445, 1995.
- 5) Horiuchi, A., *et al.* : 日本養豚学会誌, 39, 200~207, 2002.
- 6) Nicholas, P., *et al.* : *Journal of food protection*, 46, No.7, 614~617, 1983.
- 7) Tikk, M., *et al.* : *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 7769~7777, 2006.
- 8) Ichimura, S., *et al.* : *Animal Science Journal*, 88, 379~385, 2017.
- 9) Ichimura, S., *et al.* : 平成28年度食肉に関する助成研究調査報告書, 35, 52~60, 2017.
- 10) Ichimura, S., *et al.* : 平成29年度食肉に関する助成研究調査報告書, 36, 80~88, 2018.
- 11) 西村敏英ほか : 化学と生物, 54, No.2, 102~108, 2016.
- 12) Kitada, Y., *et al.* : 日本食品工業学会誌, 30, 151~154, 1983.

- 13) 食肉の官能評価ガイドライン, (独法) 家畜改良センター編, 三津本充ほか, 遊離ペプチド量の測定, 137~138, 2005.
- 14) 松石昌典: 日本調理科学会誌, **51**, 3, 193~196, 2018.
- 15) 長尾真理ほか: 北海道畜産草地学会報, **36**, 29~32, 1994.
- 16) 柳原一美ほか: 日本畜産学会報, **66**, 2 160~166, 1994.
- 17) Okitani, A., *et al.*: 日本調理科学会誌, **25**, No.4, 314~426, 1992.
- 18) 荒川信彦: 日本調理科学会誌, **12**, 192~202, 1979.
- 19) Yamaguchi, S.: *Journal of Food Science*, **32**, 473~478, 1967.
- 20) 中村好徳ほか: 日本暖地畜産学会報, **61**, 1, 3~9, 2018.

豚肉の筋線維タイプ組成と肉質の関連性に関する研究

Relationship between fiber type composition and meat quality in pork
meat

水野谷 航*・澤野 祥子**・中村 真子・辰巳 隆一

(九州大学大学院農学研究院, *現所属: 麻布大学獣医学部, **現所属: 麻布大生命・環境科学部)

Wataru Mizunoya*, Shoko Sawano**, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

(Faculty of Agriculture, Kyushu University, *present affiliation: School of Veterinary Medicine, Azabu University,

**present affiliation: School of Life and Environmental Science, Azabu University)

Skeletal muscle fibers are largely classified into two types: slow-twitch fibers and fast-twitch fibers. To date, muscle fiber type composition is thought as an important factor to determine meat quality and nutritional value of meat. Nonetheless, the relationship between fiber type composition and meat quality have not been fully understood. In this study, we aimed to clarify the relation of various meat quality parameters and muscle fiber type. Loin meat from Large Yorkshire pigs were used as experimental samples, which were raised in a conventional pen or grazed during daytime (exercise treatment). The muscle fiber type composition and the physicochemical properties were analyzed. Furthermore, sensory evaluation test was conducted to investigate changes in taste. The pork samples were also subjected to metabolomic analysis in order to examine the alterations of total substrate level. In loin meat of exercised pigs (Ex-loin), MyHC1 (slow-twitch fiber marker protein) was significantly increased and MyHC2 (fast-twitch fiber marker protein) was significantly decreased compared with control loin (Con-loin), indicating exercise treatment can be used as high slow-twitch fibers meat. The shear force value, which is an index of toughness of meat, was significantly increased in Ex-loin. The water holding capacity of the Ex-loin tended to be increased. In the sensory evaluation test, the Ex-loin showed higher score of “the strength of meat taste” and “the smell in the mouth” compared with Con-loin. Metabolomic analysis revealed marked differences between Con-loin and Ex-loin in various metabolomic substrates contained in meat. These results suggest that higher level of slow-twitch fibers alters the various metabolites of pork and leads the differences of taste and texture of the pork.

1. 目 的

骨格筋を構成する筋線維は遅筋タイプ（赤筋）、速筋タイプ（白筋）、中間タイプに分類でき、収縮特性および代謝特性が異なる。これまで筋線維

タイプと食肉の食味に関わる特性についてはいくつか報告があるものの、各論的な検討が主であった。例えば、豚肉においては速筋タイプ筋線維が多いほど肉が硬くなることが示唆されている¹⁾。保水性とは食肉に含まれる水分を保持する力のこ

とで多汁性（液汁性）とも密接に関係している。豚肉で遅筋タイプの比率の増加が、食肉の保水性および多汁性を向上させるという報告がなされている²⁾。保水性は食肉のpHが低いと著しく低下することが知られているが³⁾、それ以上の分子的な考察はいまだ十分とは言えない。

筋線維タイプは、筋の代謝能力と関わりが深いことから、筋細胞に存在する代謝基質レベルも異なる。代謝基質の多くは食肉の呈味性化合物や香气成分である以上、食肉の風味と筋線維タイプは密接な関連があっても不思議ではない。さらには、硬さに影響する細胞外マトリックスが筋組織に存在する細胞に由来することから、細胞の代謝特性が異なれば、発現する細胞外タンパク質のレベルや発現パターンが異なる可能性も大いに考えられる。ヒレ（大腰筋）はロース（胸最長筋）より軟らかいと言われるが、姿勢維持に使われる大腰筋の方が遅筋タイプの組成比が高いことから、硬さとの関連性は大いに示唆される。

以上より、筋線維タイプと食肉の特性は、いまだ解明の余地が多く残されている。本研究の目的は、食肉の筋線維タイプ組成比と食肉の種々の特性、特に消費者にとって重要な味に関連する特性との関係性を豚肉を研究対象に検討し、関連性を見出すことである。

2. 方 法

2.1 実験材料

福岡県の農場にて肥育された去勢雄2頭、雌2頭の豚（大ヨークシャー）の肉を解析に用いた。これらの豚は出荷1か月前に安静区と放牧区に分けて肥育された。放牧は豚の運動量を増加させることを確認しており（data not shown）、この運動量の増加が遅筋タイプの増加を引き起こすと考えた。放牧区は1か月間、出荷まで日中に放牧場に出した。出荷体重に達した時点で、と畜し、ロー

ス（胸最長筋）を5日間チルド条件下で保存した後、解析に応じた量に切り出し、解析を実施するまでは -30°C で冷凍保存した。

2.2 SDS-PAGE 法によるミオシン重鎖（MyHC）アイソフォームの測定

Mizunoyaらの方法に従い解析を行った⁴⁾。まず冷凍保存していた胸最長筋を液体窒素で冷やした乳鉢で粉碎後、50mg程度秤量し10%SDSを含む細胞溶解液で処理後、サンプルバッファーで希釈した。次に35%グリセロールを含む8%アクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEに供し、ゲル上でミオシン重鎖アイソフォーム（MyHC）1とMyHC2（2A、2X、2Bがすべて含まれる）に分離し、その割合をImageJを使って解析した。

2.3 理化学的特性

$1 \times 1 \times 5 \text{ cm}$ に整形した胸最長筋片を、ナイフカッターで筋線維方向に垂直に切断し、その際の最大荷重をレオメーターで測定し、剪断力価とした。サンプルは 70°C のウォーターバスで1時間加温後、流水で30分間冷却した加熱後の状態で測定した。次に肉の遠心力に対する物理的な保水性を測定した。胸最長筋を約0.5 g程度の立方体に切り出し、サンプルをろ紙で包んだものを準備した。作成したサンプルはガラスビーズを入れた15mLチューブに入れ、 $2,200 \times \text{g}$, 30 min, 4°C で遠心分離し、遠心分離前後のサンプル重量の割合を算出した。

2.4 官能試験

20代から40代の男女10名を対象に官能試験を行った。 -30°C に冷凍保存された胸最長筋を 4°C で一晩解凍し、ミートスライサーで厚さ5 mmにスライスした。試験に提供する部位を約 $3 \times 3 \text{ cm}$ に整形し、15%食塩水を入れ、10分間浸漬した。浸漬後は試料の水分をキムタオルで除去した。 170°C に設定したホットプレートで表面25秒、裏面20秒加熱し室温に戻して提供した。試料の評

価は香りと味に関わる項目を5段階の評価紙で評価した。

2.5 メタボローム解析

サンプル内の代謝物量の変化を測定するため、各個体および加熱した豚肉サンプルをメタボローム解析に供した。メタボローム解析は、ヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ (HMT) 株式会社に委託し、CE-TOFMSによるピーク検出、主成分分析 (PCA) や階層的クラスタリング解析 (HCA) をはじめとした統計解析を行った。

2.6 統計処理

安静区と放牧 (遅筋増加) 区の有意差検定 (危険率5%) にはStudent's t-testを用いた。値は平均値±標準誤差で表した。

3. 結果と考察

運動刺激は、骨格筋の遅筋タイプを増加することが多くの研究により確かめられている⁵⁾。放牧により、遅筋タイプが増加したかどうかを検討す

るため、骨格筋のMyHCアイソフォーム組成をSDS-PAGEで解析したところ、放牧区の胸最長筋 (ロース部位の主要な筋組織) において、MyHC 1 (遅筋タイプ筋線維で発現する) が有意に増加し、MyHC 2 (速筋タイプ筋線維で発現する) が有意に減少した (Fig. 1)。したがって、放牧によって運動トレーニングと同様の効果が、豚のロース部位で引き起こされることが分かった。以降、放牧区の試料を遅筋割合が高まった筋組織として、安静区と比較した。

硬さの指標である剪断力価をレオメーターで測定したところ、放牧区の加熱ロース肉で有意に剪断力価が増加した (Fig. 2)。遅筋タイプ組成比と食肉の硬さが正の相関を示すという報告は、筆者の知る限り、これまでなく、硬さの増加は遅筋タイプの増加によるものではなく、恐らく放牧による運動量の増加がコラーゲンの産生を促したために生じたと予想した。実際この筋の切片をシリュスレッド染色 (コラーゲンを赤色に染色する染

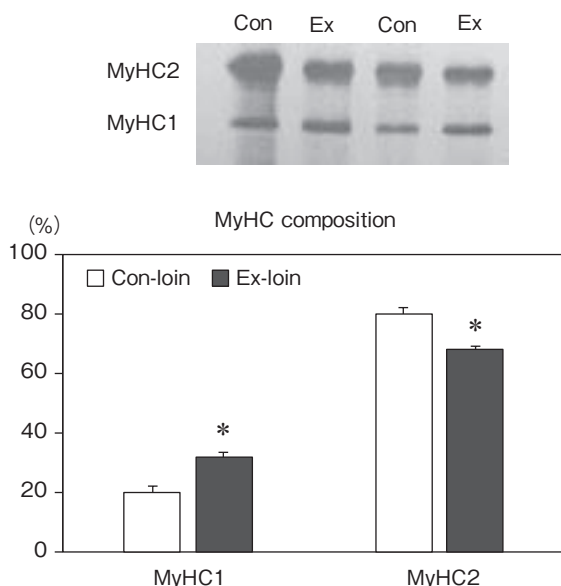


Fig. 1

MyHC composition of pork loin meat from control (sedentary) and grazed (exercise) pigs. Values are means±SE for 2 animals. *p<0.05 vs Con-loin.

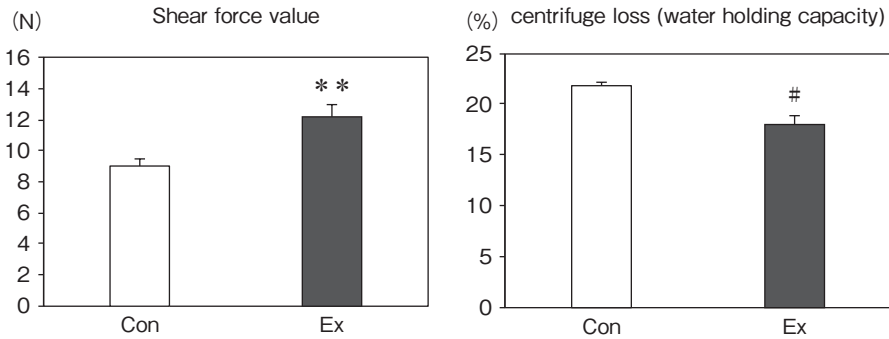


Fig. 2

Shear force value (left) and water holding capacity (right) of pork loin meat from control (sedentary) and grazed (exercise) pigs. Values are means $\pm$ SE for 9–10 meat pieces. # $p < 0.1$, ** $p < 0.01$ vs Con-loin.

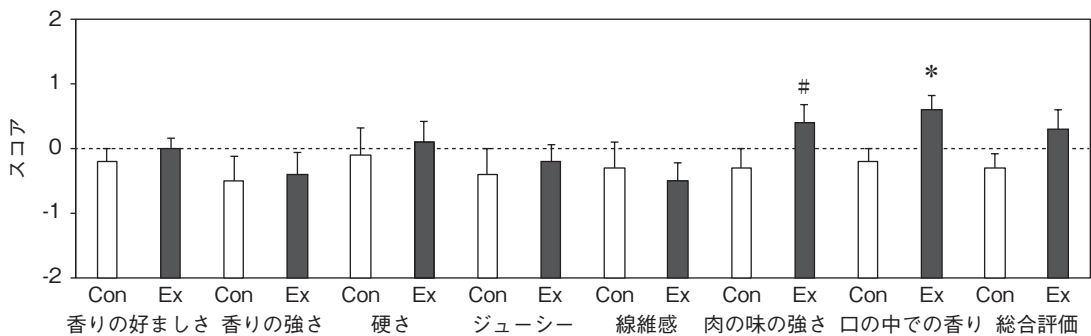


Fig. 3

Sensory evaluation of cooked pork loin meat from control (sedentary) and grazed (exercise) pigs. Values are means $\pm$ SE for 10 panelists. # $p < 0.1$, * $p < 0.05$ vs Con-loin.

色法) したところ、放牧区では安静区と比較して赤色で染まった筋線維間のコラーゲンが増加する傾向を示した (data not shown)。さらに、多汁性に寄与する保水性を測定した結果、放牧区のロース肉において、保水性の上昇傾向が認められた (Fig. 2)。遅筋タイプと保水性は正の相関を示すことが複数の報告で示されていることから^{2, 6)}、本研究もそれらの報告と一致した結果と言える。ただし現在まで遅筋タイプの増加が保水力を高める分子機序は分かっていない。

官能試験での注目すべき差として、遅筋タイプ筋線維が多い放牧区のロースにおいて「肉の味の強さ」の評価が増加する傾向が見られ ($p = 0.098$)、「口の中での香り」の評価が有意に増加

した (Fig. 3)。すなわち、遅筋タイプは、速筋タイプより呈味性化合物 (食肉では遊離アミノ酸あるいは核酸関連物質がその候補) が多く含まれ、その影響で「肉の味の強さ」「口の中での香り」の評価が高まったと予想した。実際に我々の研究から、牛肉の各種筋組織で遅筋タイプの指標であるMyHC 1組成と総遊離アミノ酸量は有意な正の相関を示すことを明らかにしており⁷⁾、本結果を支持している。また遊離アミノ酸は、加熱調理中に食品に含まれる還元糖とメイラード反応を起こし、このとき生成する香気成分が「口の中での香り」を強める可能性も考えられた。

メタボローム解析による代謝物の網羅的解析結果では、主成分分析 (PCA) の結果から、去勢

オスにおいて安静区 (A 1) と遅筋の多い放牧区 (B 1) で顕著な違いが認められた (Fig. 4)。また、今回は試験的に加熱と非加熱の豚肉も比較したところ、加熱により代謝物分布が顕著に変化することも分かり、さらに安静区 (C ; 加熱したA

2) と遅筋の多い放牧区 (D ; 加熱したB 2) を比較しても、代謝物分布はかなり異なっていることが分かり、加熱調理後も筋線維タイプによる代謝物の違いは維持され则认为られた (Fig. 5)。検出できた各代謝物については、性差によって運

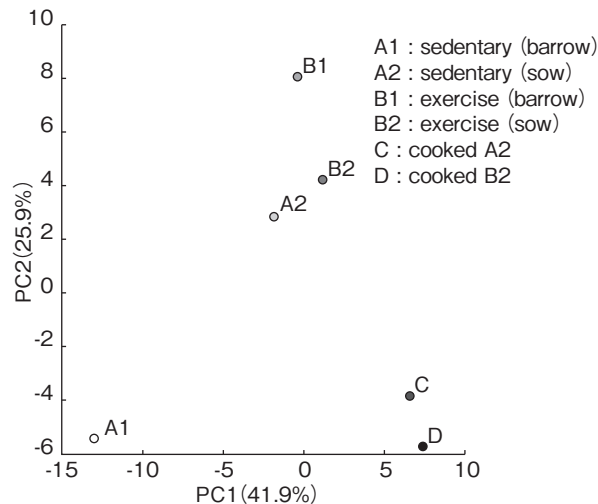


Fig. 4

Principal component analysis (PCA) of whole metabolites detected in pork loin meat from six different control (sedentary) and grazed (exercise) pigs.

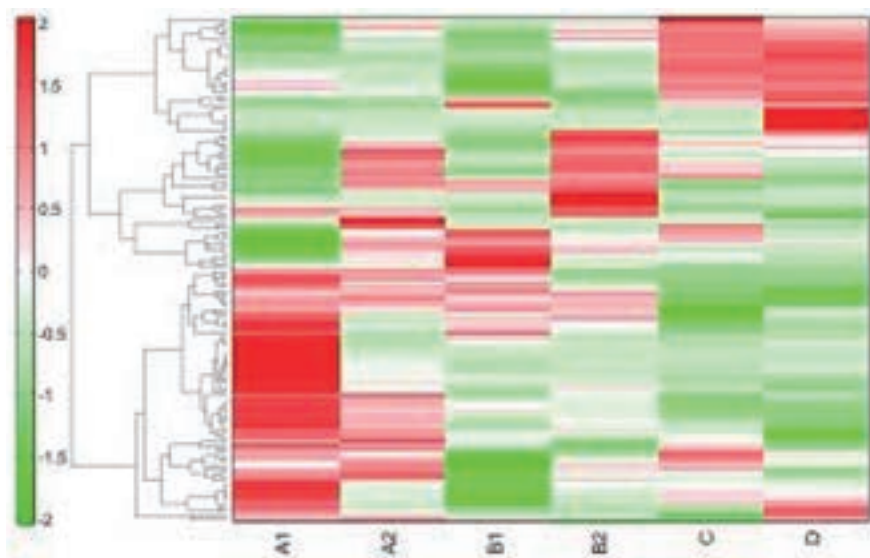


Fig. 5

Heat map of whole metabolites detected in pork loin meat from six different control (sedentary) and grazed (exercise) pigs.

動の影響は異なり、去勢オスは運動によりアスパラギン酸、グルタミン酸、アルギニンなどのアミノ酸量が減少し、一方で、メスは運動によりそれらの代謝物量が上がることが分かった。核酸についてはIMP、GMPについては去勢オスに比べメスに多く存在していることが確認された。またAMPやATPは加熱により存在量が多くなる傾向が見られた。これらの結果を総合すると、呈味性に関わる代謝物の挙動は性差や加熱により複雑に影響を受けるが、オスでは運動により呈味性代謝物が下がる傾向にあること、逆にメスでは上がる傾向にあることが示唆された。

さらに、去勢オスとメスの豚肉をプロのシェフに調理をしてもらい、官能試験を行った結果、「メスのほうが柔らかく美味しい」とシェフが話していた。すなわち性差は肉質と呈味性に多大な影響を及ぼしていると推測される。今後、性差も念頭においてさらに検討を進めることで、筋線維タイプとそれに応じた食肉の呈味性に迫れるものと期待される。

4. 要 約

遅筋タイプを増加させる処理として、放牧をさせた豚の胸最長筋では遅筋タイプのMyHC 1が有

意に増加し、速筋タイプのMyHC 2が有意に減少しており、同一組織で異なる筋線維タイプ組成を有する試料が得られた。遅筋が増加した豚胸最長筋では遠心保水性が増加傾向を示した。また遅筋が増加した豚胸最長筋で加熱後の剪断力価が有意に増加した。官能試験では遅筋が増加した胸最長筋で「肉の味の強さ」「口の中での香り」の評価が増加した。以上より、豚肉の遅筋タイプの筋線維割合の増加は、保水性を向上させ、食味性の評価では「肉の味の強さ」「口の中での香り」を増す変化が生じると考えられた。

文 献

- 1) Hamill, R. M., McBryan, J., McGee, C., Mullen, A. M., Sweeney, T., Talbot, A., Cairns, M. T., Davey, G. C. : *Meat Sci.*, **92**(4), 440~450, 2012.
- 2) Kim, G. D., Ryu, Y. C., Jeong, J. Y., Yang, H. S., Joo, S. T. : *J. Anim. Sci.*, **91**(11), 5525~5534, 2013.
- 3) 荒川信彦 : 調理科学, **12**(4), 194~202, 1979.
- 4) Mizunoya, W., Wakamatsu, J., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y. : *Anal. Biochem.*, **377**(1), 111~113, 2008.
- 5) Pette, D. : *Acta Physiol. Scand.*, **162**(3), 367~376, 1998.
- 6) Ryu, Y. C., Kim, B. C. : *J. Anim. Sci.*, **84**(4), 894 ~ 901, 2006.
- 7) Mashima, D., Oka, Y., Gotoh, T., Tomonaga, S., Sawano, S., Nakamura, M., Tatsumi, R., Mizunoya, W. : *Anim. Sci. J.*, 2019.

軽度認知症改善効果を示した豚肝臓分解物の活性本体の同定とメカニズム解明

Identification and characterization of bioactive compounds on mild cognitive impairment in porcine liver decomposition product

塚原 完・羽二生 久夫*・松田 佳和**

(長崎大学医歯薬学総合研究科薬学系, *信州大学先鋭領域融合研究群バイオメディカル研究所,

**日本薬科大学薬学部臨床教育部門)

Tamotsu Tsukahara, Hisao Haniu* and Yoshikazu Matsuda**

(Department of Pharmacology and Therapeutic Innovation, Nagasaki University,

*Graduate School of Biomedical Sciences, Interdisciplinary Cluster for Cutting Edge Research, Shinshu University,

**Clinical Pharmacology Educational Center, Nihon Pharmaceutical University)

Phospholipids are the most important class of polar lipids in human and they are amphipathic molecules that make up the bilayer of the plasma membrane and keep the membrane fluid. Since the brain is one of the richest organs in phospholipids content, changes in the brain phospholipid levels could lead to different pathogenic processes. In this study, an analytical procedure for determination of major phospholipids in porcine liver decomposition product (PLDP) by LC-MS/MS was optimized and validated. PLDP is currently attracting a great deal of interest to help improve cognitive function in older adults. However, the exact mechanisms of PLDP are still unclear. Here, we focus in particular identified the lysophospholipids in PLDP and effects on the proliferation and cytokine gene expression of brain microglial cells.

1. 目 的

廃棄処分される豚肝臓の有効利用を模索する中で、豚肝臓ホモジネートのプロテアーゼ分解物 (Porcine Liver Decomposition Product, PLDP) が、長谷川式簡易認知評価スケールで有意な認知障害改善効果を観察した¹⁾。認知症の発症前予防には、血管障害を起こす危険因子を取り除くことが重要である。血管性型、アルツハイマー型、レビー小体型のいずれも、人格障害などの重篤な症状が発生する以前に、軽度な認知障害が現れるが、これは血管障害が共通の原因である場合が多

い。我々のこれまでの研究から、生理活性リン脂質の1つであるリゾリン脂質が血管障害改善に寄与することを明らかにしている。PLDPの認知障害改善効果はこれらのリン脂質に由来する可能性が高く、その活性本体を同定し作用機序を明らかにすることを本研究の目的とした。

2. 方 法

2.1 PLDPからの総リン脂質抽出と精製

PLDPを解凍後、5 mlを量り取り、Bligh-Dyer法により総脂質を抽出した。抽出物をシリカゲルカラムに添加し、クロロホルム (中性脂質画分)、

アセトン（糖脂質画分）、メタノール（リン脂質画分）にて、順次系統分離し、リン脂質濃縮画分として回収した。リン脂質濃縮画分は15 μ lずつマイクロチューブへ小分け後、窒素ガスエバポレーターで乾固し、使用するまで -80°C にて凍結保存した。

2.2 LC-MS/MS法によるPLDP中のリン脂質定量

タンデム型液体クロマトグラフィー質量分析器 (UltiMate 3000 LC system, Thermo-Fisher Scientific) を使用して、PLDP中のリン脂質成分を同定した。リン脂質濃縮画分をHPLC用グレードのクロロホルム10 μ lで溶解後、C18 Waters X-Bridge C18カラム (3.5mm, 150mm $\times$ 1.0mm i.d.) に添加後、溶媒A (イソプロパノール/メタノール/水 (5/1/4 v/v/v), 5 mMギ酸アンモニウム, 0.05%水酸化アンモニウム) と溶媒B (イソプロパノール, 5 mMギ酸アンモニウム, 0.05%水酸化アンモニウム) を利用したリニアグラジエント溶出法にて分画した。流速は20 μ l/min, カラムオープン温度は 20°C とした。

2.3 同定したリン脂質成分のin vitro評価

PLDPのミクログリアに対する細胞増殖試験は水溶性ホルマザンを生成するテトラゾリウム塩であるWST-8 (同仁科学研究所, Cell counting Kit-8) を用いた細胞増殖測定法を用いた。BV-2細胞はFBSを除いた培地で調製後、96ウェルプレートに細胞を播種 (5×10^3 /well) し、培地でPLDPを段階希釈 (0, 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1%) した供試検体溶液を添加し、24時間培養 (37°C , 5% CO_2) 後、WST-8 試薬を添加し2時間培養 (37°C , 5% CO_2) 後、450nmにおける吸光度を測定した。

2.4 リアルタイムPCR法による変動発現解析

マウス脳ミクログリア由来の細胞株であるBV-2細胞 (1×10^4 /well) に1%および0.25%

で調製したPLDPを24時間暴露させた。培地除去後、各細胞から精製したtotal RNAよりcDNAを合成し、炎症性サイトカインであるIL-6, IL-1 β , CCL-2 (MCP-1) の発現変動をリアルタイムPCRで確認した。発現解析はSYBR Green Realtime PCR Master Mix (toyobo) およびEco Real-Time PCR System (illumina) にて行った。

3. 結果と考察

3.1 PLDPのリン脂質組成

前述したLC-MS/MS法により、PLDPに含まれるリン脂質を測定した結果、ホスファチジルコリン (PC) が7,100pmol/ μ lと最も多く、次いでホスファチジルエタノールアミン (PE) が2,200pmol/ μ l, ホスファチジルイノシトール (PI) が200pmol/ μ l, ホスファチジン酸 (PA) が3.9pmol/ μ lであった。PCにおける主なる分子種としてPC34:1, PC34:2, PC36:2, PC36:3, PC36:4, PC38:4であった。その他の分子種としてはPC32:0, PC32:1, PC38:3, PC38:5, PC38:6, PC40:4, PC40:5, PC40:6が検出されたが、その存在量は少なかった。PEに関してはPE36:2およびPE38:4が主となる分子種であったが、PE34:1, PE34:2, PE36:1, PE36:3, PE36:4, PE38:3, PE38:5, PE38:6, PE40:5, PE40:6も検出された。PIについてはPI38:4が主となる分子種であったが、その他にもPI34:1, PI34:2, PI36:2, PI36:4, PI38:3, PI38:5, PI40:4も検出された。PSに関してはPS36:1およびPS38:4が主なる分子種であったが、PS34:1, PS34:2, PS36:2, PS36:3, PS36:4, PS38:3, PS38:5, PS38:6, PS40:4, PS40:5, PS40:6も検出された。PAに関してはPA36:1およびPA38:4が主となる分子種であり、PA32:0, PA32:1, PA34:0, PA34:1, PA34:2,

PA36 : 0, PA36 : 2, PA36 : 3, PA36 : 4, PA38 : 3, PA38 : 5, PA38 : 6, PA40 : 4, PA40 : 5, PA40 : 6 も検出された。リゾ体についても同様に測定したところ、リゾホスファチジルコリン (LPC) が $5,000\text{pmo}/\mu\text{l}$ で最も多く、LPC18 : 0 が主なる分子種であったが、LPC16 : 0, LPC18 : 1, LPC18 : 2, LPC20 : 4 も検出された。リゾホスファチジイルイノシトール (LPI) は $400\text{pmo}/\mu\text{l}$ で、LPI18 : 0 が主なる分子種であったが、LPI16 : 0, LPI18 : 1, LPI18 : 2, LPI20 : 4 も検出された。リゾフォスファチジルセリン (LPS) は $230\text{pmol}/\mu\text{l}$ で、LPS18 : 0 が主なる分子種であったが、LPS16 : 0, LPS18 : 1, LPS18 : 2, LPS20 : 4, LPS22 : 6 も検出された。リゾホスファチジン酸 (LPA) は $25\text{pmol}/\mu\text{l}$ で、LPA18 : 0 が主なる分子種であったが、LPA16 : 0, LPA18 : 1, LPA18 : 2, LPA20 : 4 も検出された。我々のこれまでの研究から、生理活性リン脂質の1つであるリゾリン脂質が血管障害改善に寄与することを明らかにしている。本研究では

PLDP中に多く含まれていたLPCに注目した。

3.2 PLDPに反応するミクログリア細胞増殖能力の測定

テトラゾリウム塩 (WST-8) を用いたプロトコールに従い、細胞生存率を計測した。PLDP添加前日に96Well Plateに 5×10^3 個/wellの細胞を撒き、PLDP添加から24時間後にアッセイを行った。アッセイは各々4回行い、細胞増殖抑制曲線を作成した。450nm波長の吸光光度計を用いて計測を行い、DMSOのみ添加の細胞群の吸光度をコントロールとして、生存率を計算した。BV 2細胞の脱水素酵素活性はPLDP濃度依存的に増加していたことから、PLDPはBV 2細胞において細胞増殖活性を持つことが明らかとなった。結果をFig. 1に示した。

3.3 炎症性サイトカイン産生におけるPLDPおよびLPCの抑制効果

ミクログリアは定常状態においても非常に活発な活動をしており、脳内環境維持のみならず、その発達、学習にも重要な役割がある。リアルタイ

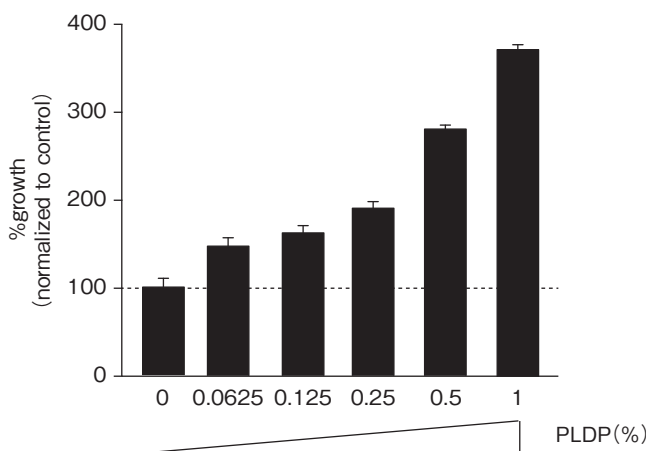


Fig. 1 BV-2 cells were seeded in 96-well culture plates (5×10^3 cells/well), and PLDP was added to cells. PLDP was serially diluted to 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, and 1 % respectively. After 24h, cell proliferation was determined using Cell Counting Kit-8 (Dojindo, Kumamoto, Japan). After cells were incubated for 24h, $10\mu\text{L}$ of the Cell Counting Kit-8 solution was added to each well and the plates were incubated for 2h in an incubator at 37°C with 5% CO_2 . The amount of orange formazan dye was determined by measuring absorbance at 450nm using a microplate reader (Awareness Technology, Westport, CT, USA).

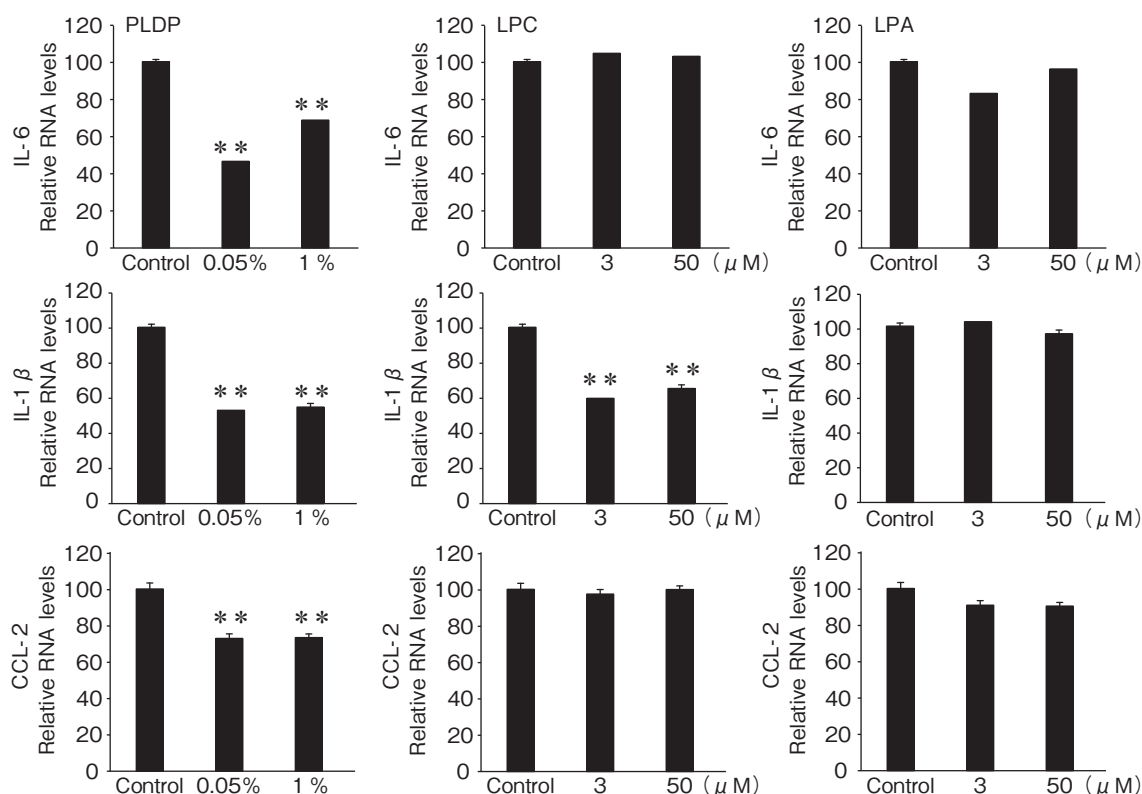


Fig. 2 BV-2 cells were seeded in 12-well culture plates (1×10^4 cells/well), and PLDP, or LPC18 : 0, or LPA18 : 1 was added to cells. After 24 h, total RNA was extracted from cell lines using TRIzol (Invitrogen). Total RNA was isolated from cells using a NucleoSpin[®] RNA II Kit (Takara, Otsu, Japan). Then, 0.5 μ g of total RNA was used for cDNA synthesis using a ReverTra Ace qPCR RT Kit (Toyobo) as per the manufacturer's instructions. IL-6 or IL-1 β or CCL2 mRNA levels were quantified using an ECO Real-Time PCR System (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). All PCRs were performed in 10- μ L volumes in 48-well PCR plates (Illumina) with GeneAmp SYBR qPCR MIX α No ROX (Nippon Gene, Toyama, Japan). Relative mRNA levels were quantified using the formula $2^{-\Delta\Delta Cq}$, where ΔCq is the difference between the threshold cycle of a target cDNA and an endogenous reference cDNA.

μPCRの結果をFig. 2に示す。いずれの炎症性サイトカインもPLDP (0.05および1%) 処理により発現低下が有意に認められた。一方で、PLDPの主要リゾリン脂質であるLPCおよびLPAを生理的濃度 (3および50 μ M) でBV-2細胞へ暴露した場合、IL-1 β のみ発現の低下が観察され、その他の炎症性サイトカインの発現には影響を及ぼさなかった。また、炎症性リゾリン脂質の一つと考えられているリゾホスファチジン酸 (LPA) を3 or 50 μ Mの濃度でBV-2細胞へ暴露しても、

炎症性サイトカインの発現変動は認められなかった。

4. 要 約

PLDPは豊富にリン脂質を含むことが明らかであることから、PLDP中のリン脂質組成をLC-MS/MS法で再検討したところ、リゾホスファチジルコリン (LPC) が数百 μ Mの濃度で検出された。LPCは、神経細胞に作用する「リゾホスファチジン酸 (LPA)」や「環状リゾホスファチジン

酸 (cPA)」の前駆物質として重要なリン脂質である。我々はPLDP中に含まれるLPCが体内で代謝産物として、認知機能改善の活性本体であると考えた。また、PLDPは細胞非刺激時において、複数の炎症性マーカーの発現を低下させることも明らかとなった。PLDPには多種多様なリン脂質が含まれることが明らかとなっているが、少なくともその構成リン脂質の一つであるLPCがIL-1 β の発現を抑制する抗炎症性分子として機能している。これらの結果より、軽度認知症改善効果を

示した豚肝臓分解物の活性本体がLPCであることが明らかとなったが、LPCは体内でさまざまな生理活性脂質へ変換される重要なリン脂質であり、LPC代謝物による認知症改善効果を明らかにすることも重要であり、次のテーマである。

文 献

- 1) 特願2019-7552神経機能再生促進剤：塚原完，井上俊夫，植村健，羽二生久夫，松田佳和，佐藤和二郎

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（Ⅱ）

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

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

（Hokkaido University, Field Science Center for Northern Biosphere）

In order to elucidate whether a long-term intake of chicken protein results in anti-obesity effect and/or lifestyle disease ameliorating effect, we examined effect of chicken parts by using a high-fat and high-sucrose diet fed animal experimental model. A long-term intake of any parts of chicken did not decrease their body weight and white adipose tissue (WAT) weight and did not increase their brown adipose tissue (BAT) weight compared with beef- and casein-fed groups. No significant differences were observed in blood biochemical parameters or liver fat content among groups. Anti-obesity effect and lifestyle disease ameliorating effect of chicken protein were not verified in this study. However, the expression of genes related to fatty acid synthesis in the liver and fatty acid uptake into the liver was significantly suppressed by chicken protein consumption. A long-term intake of chicken protein was suggested to suppress the expression of *SREBP-1c* in the liver, resulting in preventing fatty acid synthesis in the liver. But, the effect of chicken parts on fatty acid synthesis in the liver was not verified in this study.

1. 目 的

我々はこれまでの研究において、鶏肉や羊肉は他の畜肉に比べて摂取後の体温上昇を亢進することを明らかにした¹⁾。さらに、食肉タンパク質の摂取による体熱産生効果は食肉の摂取による体熱産生効果と一致することを示し、食肉の体熱産生にはタンパク質が関与していることが明らかになった²⁾。また、鶏肉タンパク質や羊肉タンパク質の摂取による体熱産生亢進効果は、褐色脂肪組織（BAT）のUCP 1による熱産生が中心的な役割を果たしていることが示唆された²⁾。

鶏肉タンパク質や羊肉タンパク質の摂取による体熱産生にはUCP 1によって脂肪酸が使用されている可能性があることから、鶏肉タンパク質や羊肉タンパク質を長期的に摂取することで、脂肪を減らし、抗肥満効果が得られるのではないかと考えられた。そこで、ラットに各種食肉タンパク質を配合した高脂肪・高シヨ糖食を4週間投与したところ、鶏肉タンパク質投与群で精巢上体、腸間膜、腎周囲の白色脂肪組織（WAT）の減少を確認し、鶏肉タンパク質の4週間の摂取は内臓型肥満に対する抗肥満効果をもたらすことが示唆された（未発表データ）。また、ラットに鶏肉タン

パク質を配合した高脂肪・高ショ糖食を22週間投与したところ、鶏肉タンパク質の抗肥満効果は確認できなかったが、肝臓の脂質含量が鶏肉タンパク質投与群で有意に低いことが示され、肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量より、脂肪酸の合成を抑制、分解および取込を促進することが示された（未発表データ）。鶏肉タンパク質の摂取は脂肪酸の取込を促進するが、それ以上に脂肪酸の分解が促進されたことで、肝臓での脂質蓄積を抑制し、脂肪肝抑制効果がある可能性が示された。このように、鶏肉タンパク質の抗肥満効果や脂肪肝抑制効果の可能性は示されたが、投与期間によって結果が異なるため、鶏肉タンパク質の作用が明確になっていない。また、脂質異常症などの生活習慣病の改善効果についても期待されるが、これまで検討されていない。

ところで、鶏むね肉と鶏もも肉では構成している筋線維型が異なる³⁾。筋線維型が異なると、ミオシンなどの構成タンパク質のサブタイプも異なる。同一タンパク質でもサブタイプが異なると、分子量やアミノ酸配列に差が生じる⁴⁾。畜種による体熱産生の違いは、構成タンパク質のアミノ酸配列のわずかな違いから生じる特異的なペプチドによってもたらされていると考えられている²⁾。このため、鶏むね肉や鶏もも肉においても生じるペプチドによって、体熱産生能や各種代謝亢進作用が異なるかもしれない。

そこで本研究では、鶏肉タンパク質の長期摂取が抗肥満効果、脂肪肝抑制作用のような生活習慣病改善効果をもたらすかどうかを解明するために、食餌性肥満モデルである高脂肪・高ショ糖食を投与し、鶏肉タンパク質の効果について検討した。さらに、鶏肉の部位の違いによる効果についても検討した。

2. 方 法

2.1 動物実験

供試動物には5週齢、Wistar系の雄ラットを用いた。ラットは室温23℃、12時間の明暗サイクルに設定された部屋で、後述の馴化飼料と水を自由に摂取させ、1週間馴化させた後に実験に供した。なお、各試験群間の平均体重に有意差がないように群分けし、個別飼育した。馴化後の試験期間は8週間とし、高脂肪・高ショ糖食（40%豚脂、20%ショ糖）、水を自由に摂取させた。試験期間中は7日に1回の頻度で体重測定、3日に1回の頻度で摂食量測定を行った。

2.2 試験飼料の調製

鶏肉には北海道大学産のロードアイランドレッド種の産卵廃鶏のむね肉ともも肉を、牛肉には北海道大学静内研究牧場産の日本短角種を用いた（部位混合）。各種ひき肉を凍結乾燥し（FD-01、東京理科機器）、乳鉢で均一にすり潰した。Ezoeらの方法²⁾に従って凍結乾燥物から精製タンパク質を調製した。馴化飼料はAIN-93G標準飼料組成に準拠して調製し、馴化期間中にラットに与えた。試験飼料は40%豚脂（日清商会）、20%ショ糖を配合した高脂肪・高ショ糖食を調製した。なお試験飼料は、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

ラットに麻酔し、体重、体長（鼻先から尾付け根まで）、腹囲を測定した後、ただちに血液、肝臓、WAT、BAT、大腿四頭筋を採取した。血液は後大静脈から採取し、血漿、血清を得た。WATは精巣上体、腸間膜、腎周囲から、BATは肩甲骨間から採取した。大腿四頭筋は右脚から採取した。肝臓は重量を測定後、使用時まで-80℃で保存した。

2.4 血液生化学検査

血漿中のグルコース濃度（グルコースCⅡ-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）を分光光度計またはマイクロプレートリーダーを用いて定量分析した。

2.5 肝臓の脂肪定量

Folch法⁵⁾に基づいて行った。

2.6 半定量的PCR法

肝臓から抽出した全RNAからReverTra Ace[®] qPCR RT Kit (TOYOBO) を用いて一本鎖cDNAを合成し，TACポリメラーゼ（promega）を用いてPCR Thermal CyclerでPCRを行った。PCR産物をアガロースゲルにアプライして電気泳動を行った。画像解析ソフトを用いて，撮影されたバンドを β -ACTINに対する相対量として算出することで遺伝子の発現量を算出した。

2.7 統計処理

測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。Excel (Microsoft)，Excel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。等分散性が棄却されたものについては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た。

3. 結果と考察

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

一日当たりの平均摂食量，解剖前のラットの体重，腹囲，BMI，WAT重量，BAT重量，大腿四頭筋重量，肝臓重量および肝臓脂質重量をTable 1に示す。摂食量，体重，腹囲，BMIではすべての群間で有意な差は見られなかった。また，脂肪

Table 1 Various parameters of animals

	CBP ^x	CLP ^x	BP ^x	C ^x
Feed intake (g/day)	15.2 $\pm$ 0.3	15.0 $\pm$ 0.3	15.1 $\pm$ 0.4	15.6 $\pm$ 0.5
Body weight (BW) (g)	436.2 $\pm$ 7.6	450.0 $\pm$ 11.0	446.3 $\pm$ 14.9	464.1 $\pm$ 16.9
Abdominal circumference (cm)	20.4 $\pm$ 0.3	20.8 $\pm$ 0.4	20.4 $\pm$ 0.4	21.2 $\pm$ 0.5
BMI ^y	7.59 $\pm$ 0.22	7.62 $\pm$ 0.10	7.60 $\pm$ 0.12	7.77 $\pm$ 0.21
Organs and tissue weights (g/BW 100g)				
Epididymal WAT	2.93 $\pm$ 0.19	2.84 $\pm$ 0.16	2.59 $\pm$ 0.27	2.88 $\pm$ 0.14
Mesenteric WAT	2.15 $\pm$ 0.11	2.27 $\pm$ 0.11	2.03 $\pm$ 0.20	2.27 $\pm$ 0.10
Perirenal WAT	5.35 $\pm$ 0.25	5.25 $\pm$ 0.21	4.91 $\pm$ 0.27	5.81 $\pm$ 0.27
WAT Total	10.4 $\pm$ 0.4	10.4 $\pm$ 0.4	9.5 $\pm$ 0.7	11.0 $\pm$ 0.5
Interscapular BAT	0.172 $\pm$ 0.006	0.167 $\pm$ 0.008	0.167 $\pm$ 0.012	0.169 $\pm$ 0.007
Quadriceps femoris	0.75 $\pm$ 0.04	0.72 $\pm$ 0.02	0.73 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.05
Liver	2.56 $\pm$ 0.05	2.71 $\pm$ 0.08	2.56 $\pm$ 0.03	2.95 $\pm$ 0.27
Liver fat content (g/liver 1g)	0.166 $\pm$ 0.012	0.191 $\pm$ 0.014	0.159 $\pm$ 0.010	0.173 $\pm$ 0.006

Values present average $\pm$ SEM (n = 7).

^x: CBP (Chicken breast protein), CLP (Chicken leg protein), BP (Beef protein), C (Casein)

^y: (BW(kg))/(Body length (m))²

組織であるWATやBATの重量においてもすべての群間で有意な差は見られなかった。骨格筋である大腿四頭筋重量においてもすべての群間で有意な差は見られなかった。そして、肝臓重量および肝臓脂質含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。

先行研究では脂質に牛脂を用い、本試験では多くの研究で用いられている豚脂を使用した。また、牛脂には共役リノール酸が多く含まれ、共役リノール酸は脂肪組織重量を減少させる⁶⁾。そのため、飼料中の脂質源を変更したため、抗肥満効果や脂肪肝抑制作用が見られなかったのかもしれない。また、脂質の割合を増加したことで、ラットに対する脂質の影響が大きくなったことも考えられる。

3.2 鶏肉タンパク質が血中の代謝関連成分に及ぼす影響

試験期間終了後に採取した血液から、糖代謝の指標となるグルコース、脂質代謝の指標となるト

リグリセリドおよび遊離脂肪酸、脂質代謝異常の指標となる総コレステロールを測定した (Table 2)。グルコース、トリグリセリド、遊離脂肪酸、総コレステロールについて、すべての群間で有意な差は見られなかった。

3.3 肝臓における脂質代謝関連遺伝子の発現量

肝臓における脂質代謝関連遺伝子として*FAS*, *CD36*, *CPT1 α*, *SREBP-1c*の相対的発現量を測定した (Table 3)。脂肪酸合成に関与する*FAS*について、CBP群とCLP群は、BP群やC群と比べて有意に低い値を示した。脂肪酸合成を促進する脂質代謝関連転写因子である*SREBP-1c*について、CBP群とCLP群は、BP群やC群と比べて有意に低い値を示し、BP群はC群と比べて有意に高い値を示した。脂肪酸の輸送に関与する*CD36*については、CBP群とCLP群は、BP群と比べて有意に低い値を示した。一方、脂肪分解に関与する*CPT1 α*については、すべての群間で有意

Table 2 Biochemical blood parameters

	CBP	CLP	BP	C
Glucose (mg/dL)	127.3 ± 4.2	160.0 ± 13.2	156.6 ± 28.4	132.3 ± 16.3
Triglyceride (mg/dL)	144.8 ± 18.9	153.6 ± 1.8	150.4 ± 17.6	120.4 ± 13.3
Free fatty acid (mEq/L)	0.91 ± 0.06	0.80 ± 0.08	0.82 ± 0.10	0.96 ± 0.16
Total cholesterol (mg/mL)	83.0 ± 11.9	65.5 ± 3.2	82.1 ± 6.2	83.4 ± 7.1

Values present average ± SEM (n = 7).

Group names were shown in Table 1.

Table 3 Relative expression of lipid metabolism-related gene in liver

Gene	CBP	CLP	BP	C
Fatty acid synthesis				
<i>FAS</i>	0.40 ± 0.10 ^a	0.43 ± 0.07 ^a	1.78 ± 0.22 ^b	1.00 ± 0.22 ^b
<i>SREBP-1c</i>	0.53 ± 0.14 ^a	0.56 ± 0.08 ^a	1.51 ± 0.11 ^c	1.00 ± 0.09 ^b
Fatty acid uptake				
<i>CD36</i>	0.33 ± 0.09 ^a	0.32 ± 0.05 ^a	1.34 ± 0.16 ^b	1.00 ± 0.12 ^b
Fatty acid degradation				
<i>CPT1 α</i>	0.93 ± 0.30	0.81 ± 0.14	1.17 ± 0.19	1.00 ± 0.12

Values present average ± SEM (n = 7).

Group names were shown in Table 1.

^a, ^b, ^c : Numbers within columns with different superscripts significantly differ ($p < 0.05$).

な差は見られなかった。

SREBPは複数の核内受容体とクロストークを介し、代謝制御を包括的にとり行っている⁷⁾。*SREBP-1*の発現はLDL受容体が多く発現している肝臓で多い⁸⁾。鶏むね肉タンパク質や鶏もも肉タンパク質はLDL受容体に作用することで*SREBP-1c*の発現を抑制し、肝臓における脂肪酸合成を抑制したのかもしれない。鶏肉タンパク質の長期摂取は肝臓における脂肪酸合成を抑制することが示唆された。一方、脂肪酸の取込に参与する遺伝子である*CD36*の発現量は、CBP、CLP群で有意に低い値を示した*CD36*は細胞膜に局在し、長鎖脂肪酸に結合して細胞内への輸送を促進する⁹⁾。また、ヒト単球細胞における細胞性リン脂質へのEPAやDHAの組み込みはmRNAおよびタンパク質レベルで*CD36*発現を抑制し、アラキドン酸やリノール酸に組み込みは*CD36*発現を促進させる傾向がある¹⁰⁾。そのため、脂肪酸が*CD36*発現に参与している可能性がある。先行研究では牛脂を、本研究では豚脂を用いたため、摂取した脂質の違いが影響したのかもしれない。脂肪の分解に参与する遺伝子である*CPT1α*の発現量はすべての群間で有意な差は見られなかった。*CPT1α*はアシルCoAとカルニチンをアシルカルニチンに変換する酵素であり、脂肪酸の燃焼を亢進する^{11, 12)}。*CD36*と同様に、飼料に用いた脂質の違いが影響した可能性が考えられる。以上より、鶏肉タンパク質の摂取は肝臓での脂肪酸の合成を抑制するが、脂肪の違いや投与期間の短さにより脂肪肝抑制作用が見られなかった可能性が考えられる。

4. 要 約

本研究では、鶏肉タンパク質が高いDIT亢進効果を示すことから、鶏肉タンパク質の長期摂取が抗肥満効果や生活習慣病改善効果をもたらすかど

うかを解明するため、高脂肪・高ショ糖食をラットに投与し、抗肥満効果や生活習慣病改善効果、鶏肉の部位の違いによる影響について検討した。体重の減少やWAT重量の減少、BAT重量の増加が確認されず、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。また、血液生化学パラメータや肝臓脂質含量に有意な差が見られなかったため、生活習慣病改善効果も認められなかった。一方、鶏むね肉、鶏もも肉タンパク質の長期摂取により肝臓における脂肪酸の合成や取込に参与する遺伝子の発現が抑制された。そのため、鶏肉タンパク質の長期摂取では肝臓における*SREBP-1c*の発現を抑制することで脂肪酸合成を抑制していることが示唆された。しかし、鶏肉の部位の違いによる影響は確認できなかった。

文 献

- 1) Wakamatsu, J., Fujii, R., Yamaguchi, K., Miyoshi, S., Nishimura, T., Hattori, A. : *Anim. Sci. J.*, **84**, 416~425, 2013.
- 2) Ezoe, M., Wakamatsu, J., Takahata, Y., Hasegawa, T., Morimatsu, F., Nishimura, T. : *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **62**, 93~100, 2016.
- 3) 岩元久雄 : 西日本畜産学会報, **50**, 7~13, 2007.
- 4) Mizunoya, W., Wakamatsu, J., Tatsumi, R., Ikeuchi, Y. : *Anal. Biochem.*, **377**, 111~113, 2008.
- 5) Folch, J., Lees, M., Sloane Stanley, G. H. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497~509, 1957.
- 6) Miner, J. L., Cederberg, C. A., Nielsen, M. K., Chen, X., Baile, C. A. : *Obesity*, **9**, 129~134, 2001.
- 7) Brown, M. S., Goldstein, J. L. : *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 11041~11048, 1999.
- 8) Yokoyama, C., Wang, X., Briggs, M. R., Admon, A., Wu, J., Hua, X., Goldstein, J. L., Brown, M. S. : *Cell*, **75**, 187~197, 1993.
- 9) Roy, L. : *Int. J. Dev. Biol.*, **54**, 1229~1239, 2009.
- 10) Pietsch, A., Weber, C., Goretzki, M., Weber, P. C., Lorenz, R. L. : *Cell Biochem. Func.*, **13**, 211~216, 1995.
- 11) Ota, N., Soga, S., Murase, T., Shimotoyodome, A., Hase, T. : *J. Health Sci.*, **56**, 745~751, 2010.
- 12) Murase, T., Misawa, K., Minegishi, Y., Aoki, M., Ominami, H., Suzuki, Y., Shibuya, Y., Hase, T. : *Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab.*, Doi : 10.1152/ajpendo.00441.2010.2011.

牛心臓由来新規コレステロール代謝改善ジペプチドの作用機構解明および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

Elucidation of mechanism of the novel hypocholesterolemic dipeptide
drived from cattle heart peptide and basic study of development of an
innovative hypocholesterolemic food materials

長 岡 利

(岐阜大学応用生物科学部)

Satoshi Nagaoka

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

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

The mRNA level of hepatic cholesterol metabolism related genes, such as HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, ABCA1, apolipoprotein A-I, SREBP-2 was unchanged by dietary XY feeding. While, the mRNA level of intestinal ABCA1 related to cholesterol absorption was significantly decreased by XY feeding in rats. Thus, a hypocholesterolemic action of XY was induced by an inhibition of intestinal cholesterol absorption related to the down regulation of ABCA1 in rats.

1. 目 的

一般に、大豆タンパク質などの植物性タンパク質は、カゼインなどの動物性タンパク質と比較して、抗動脈硬化作用を有すると考えられている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（HPH）のコレステロール低下作用機構を明らかにした。コレステロールミセル溶解性はカゼインよりもHPHで有意に低下した。Caco-2細胞のコレステロール吸収抑制はカゼインミセルよりもHPHミセルで有意に高かった。血清コレステロールはカゼインよりもHPHで有意に低かった。放射性コレステロールで測定したコレステロール吸収はカゼインと比べてHPHで有意に減少し、HPHのコレステロール低下作用は空腸のコレステロール吸収阻害によるものである。HPH由来の牛心臓タンパク質加水分解物の限外濾過物（HPHU、分子量約1000ダルトン以下のペプチド分画物）は、ラットにおいてHPHよりも強力なコレステロール低下作用を示すことを発見し報告した¹⁰⁾。

ペプチド混合物であるHPHUのコレステロール代謝改善作用に寄与する活性ペプチドを特定するために、HPHU由来ペプチドの分画精製を実施し、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、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、肝臓や腸におけるコレステロール代謝関連遺伝子のmRNAレベル

に対する影響を解析した。

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。また、既報の方法に従い、肝臓や腸からRNAを回収し、肝臓や腸のコレステロール代謝関連遺伝子mRNAレベルを解析した¹²⁾。なお、実験結果の統計的分析には、Students't-testを用いた。

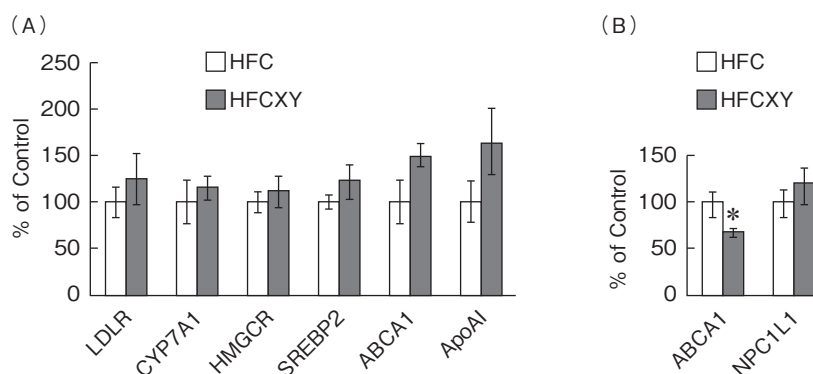
実験の結果（Table 1）から、体重増加量、食餌摂取量、肝臓重量には、群間で有意な変化は認められなかった。血清コレステロールは対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で有意に低下した。血清トリグリセリドは、対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で低下傾向を示した。また、肝臓コレステロールレベルも対照群（HFC）と比較して、XY投与群（HFCXY）で有意に低下した。そこで、今回はXYの血清コレステロール低下作用のさらなる機構解明のために、肝臓（Fig. 1A）や腸（Fig. 1B）の脂質代謝関連遺伝子mRNAについて分析した。その結果、XY投与により、血清・肝臓コレステロール低下時には、腸ABCA1のmRNAレベルが有意に低下したが、コレステロール輸送担体であ

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/100g 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

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.

**Fig. 1**

るNPC1L1のmRNAレベルは変化しなかった。一方、肝臓のコレステロール生合成の律速酵素HMG-CoA還元酵素 (HMGCR) や、コレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール7 α -水酸化酵素 (CYP7A1), LDL受容体 (LDLR), ABCA1, SREBP-2, アポリポタンパク質A-I (ApoAI), mRNAレベルは有意な変化は観察されなかった。XYは腸ABCA1発現低下を介するコレステロールの腸管での吸収抑制作用により、コレステロール代謝改善作用を発揮することを明らかにした。

3. 要 約

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

し、分画物について、in vitroのコレステロールミセル溶解性試験を行った。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、肝臓や腸のコレステロール代謝関連遺伝子mRNAについて分析した。その結果、XY投与により、血清・肝臓コレステロール低下時には、腸ABCA1のmRNAレベルが有意に低下し、肝臓のコレステロール合成の律速酵素HMG-CoA還元酵素、コレステロール分解系の律速酵素であるコレステロール7 α -水酸化酵素（CYP7A1）やLDL受容体mRNAレベルは有意な変化は観察されなかった。XYは腸ABCA1発現低下を介するコレステロールの腸管での吸収抑制作用により、コレステロール代謝改善作用を発揮することを明らかにした。

文 献

- 1) Carroll, K. K., Hamilton, R. M. G. : *J. Food Sci.*, **40**, 18, 1975.
- 2) Nagaoka, S., Kanamaru, Y., Kuzuya, Y., Kojima, T., Kuwata, T. : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1484, 1992.
- 3) 長岡利 : 日本栄養・食糧学会誌, **49**, 303, 1996.
- 4) Iwami, K., Sakakibara, K., Ibuki, F. : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 1217, 1986.
- 5) Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yosida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T., Kimoto, M. : *J. Nutr.*, **120**, 977, 1990.
- 6) 長岡利 : 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 336, 1998.
- 7) 長岡利 : 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 378, 1999.
- 8) Nagaoka, S., Miyazaki, H., Oda, H., Aoyama, Y., Yoshida, A. : *J. Nutr.*, **120**, 1134, 1990.
- 9) Nagaoka, S., Miwa, K., Eto, M., Kuzuya, Y., Hori, G., Yamamoto, K. : *J. Nutr.*, **129**, 1725, 1999.
- 10) Nakade, K., Kaneko, H., Oka, T., Ahhmed, A. M., Muguruma, M., Numata, M., Nagaoka, S. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **73**, 607, 2009.
- 11) 長岡利 : 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 91, 2015.
- 12) Kashima, Y., Kanematsu, S., Asai, S., Kusada, M., Watanabe, S., Kawashima, T., Nakamura, T., Shimada, M., Goto, T., Nagaoka, S. : *PLOS ONE*, **9**, e105073, 2014.

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（Ⅱ）

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

林 利哉・長澤 麻央・小川 幸彦*・芳賀 聖一

（名城大学農学部，*名城大学農学部附属農場）

Toshiya Hayashi, Mao Nagasawa, Yukihiro Ogawa* and Seiichi Haga

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

The proteolysis and expression of the inhibitory activities against angiotensin I-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV by chilled lactic acid fermentation and retort-processing were investigated using myofibrillar protein as the simple model system of meat product. The contents of free amino acid and peptide significantly increased by retort processing (140°C) or cold fermentation compared to that of control (70°C-heated). Therefore, it was suggested that retort-processing and chilled fermentation lead to decomposition of the myofibrillar proteins. Furthermore, inhibitory activities on angiotensin I-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV were significantly higher in fermented myofibrillar protein than that in control. On the other hand, although the inhibitory activities on angiotensin I-converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV of retort-processed samples including 140°C-heated 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 food processing treatments, in particular, lactic acid fermentation at cold temperatures can improve the food functionality of cured meat products.

1. 目 的

著者らは、食肉製品の高付加価値化を念頭に、低温性乳酸菌による低温発酵やレトルト加熱処理といった食品加工技術が食肉製品の品質に及ぼす影響について種々検討してきた^{1~3)}。その結果、低温乳酸発酵をモデルソーセージの塩漬工程に導入することにより、その物性や微細構造が、非発酵の対照区と比較して大きく変化し、かつ筋原線

維の脆弱化やタンパク質の分解等も顕著にみられ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っ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もみられ、その結果として遊離アミノ酸やペプチドが派生することも併せて見出している^{4, 5)}。このような低温乳酸発酵や高温加熱に伴う筋原線維タンパク質の分解は、良好な結着を伴う食肉製品の好ましい食感の発現において、負の影響をもたらすも

のと考えられるが、その一方で生体調節機能の付与という観点においては、場合によっては機能性を有する低分子ペプチドが派生するという付加価値をもたらす可能性も十分考えられる。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。既報において、筋原線維タンパク質に、*Lactobacillus sakei* No.4を用いた低温乳酸発酵や、120、130℃のレトルト加熱処理を施すことによって、筋原線維タンパク質の分解が昂進することや、そのタンパク質分解に伴い、血圧上昇の鍵酵素であるアンジオテンシン I 変換酵素 (ACE) の阻害活性が上昇する傾向にあることを報告した⁶⁾。

そこで本研究では、既報と同様に、食肉の主要タンパク質である筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、既報とは異なる低温性乳酸菌株を用いた低温発酵やハイレトルト加熱に相当する高温レトルト加熱 (140℃) 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、かつ血圧上昇抑制作用の *in vitro* 指標である ACE、ならびに血糖値上昇抑制剤の標的酵素でもあるジペプチジル・ペプチダーゼ IV (DPPIV) の阻害活性を評価することで、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 Grey⁷⁾, Etlinger⁸⁾ 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、140℃で15分間加熱したものをハイ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ター、*Lactobacillus sakei* No.7 と No.9 (*L. sakei* No.7, No.9) を筋原線維タンパク質溶液 1 ml 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した。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 (Spectra/por CE, M.W.: 500) した後、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⁹⁾ の方法に準じてペプチド量を、ニンヒドリン法¹⁰⁾ 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-PAGE¹¹⁾ (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 ACE ならびに DPPIV 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¹²⁾ 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。DPP IV阻害活性は、DPP IV (シグマ アルドリッチ) と基質 Gly-Pro-NA・p-tosylate (ペプチド研究所) を用い、Ikeharaらの方法¹³⁾ を一部改変して測定した。すなわち、DPP IVと基質が反応した結果、遊離するp-NA量を分光光度計(波長: 385nm)で測定する方法である。いずれの活性測定においても、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、両酵素活性を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 (IC₅₀値)。

3. 結果と考察

3.1 低温発酵ならびにハイレトルト加熱処理

が筋原線維タンパク質の分解に及ぼす影響

筋収縮の本体であり、筋肉・食肉の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、低温乳酸発酵やハイ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、140℃のハイ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℃加熱区と比較して有意に高い値を示し、特にペプチド量においてそれが顕著であった。一方の当研究室で保有する低温性乳酸菌である *L. sakei* No. 7 と No. 9 を接種した発酵区では、ペプチド量、遊離アミノ酸量のいずれも対照区と比較して、顕著かつ有意に高い値を示した (Fig. 2A, B)。SDS-PAGEによってタンパク質の分布を確認したところ、前報⁶⁾ で示した120, 130℃加熱区と同様、対照区ではで明瞭にみられた分子量 3 万前後のバンドが、140℃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 (Data not shown)。一方の発酵区においても、対照区でみられた明瞭なバンドはほぼ消失した (Data not shown)。これは、pH低下による筋原線維タンパク質の酸変性・沈殿と、添加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。

3.2 低温発酵ならびにハイレトルト加熱処理を施した筋原線維タンパク質のACEとDPP IV阻害活性

ハイレトルト加熱 (140℃) を施した筋原線維

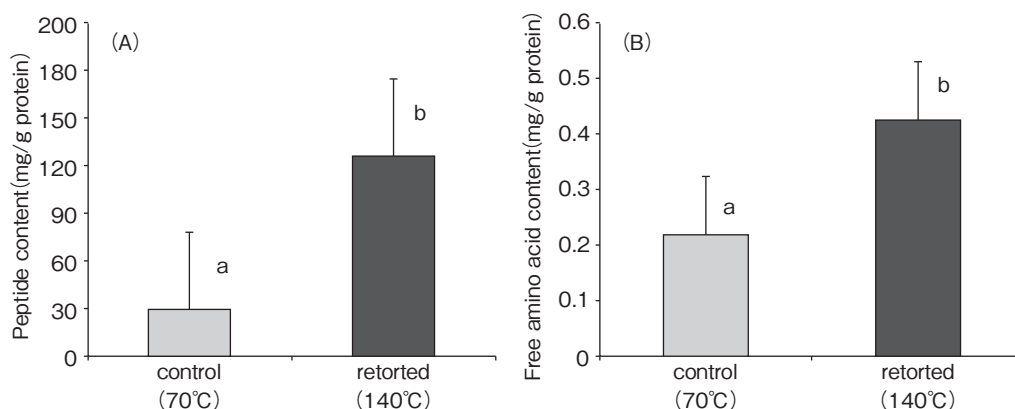


Fig. 1 Effect of high-retort processing on the peptide (A) and free amino acid contents (B) of the myofibrillar protein. Data represent the means $\pm$ SD of at least three independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

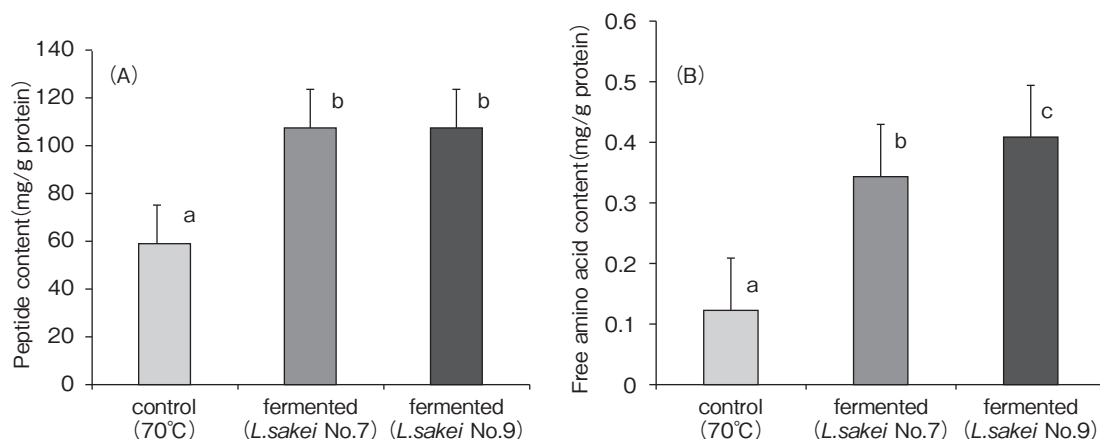


Fig. 2 Effect of chiled lactic acid fermentation on the peptide (A) and free amino acid contents (B) of the myofibrillar protein.

Data represent the means $\pm$ SD of at least three independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

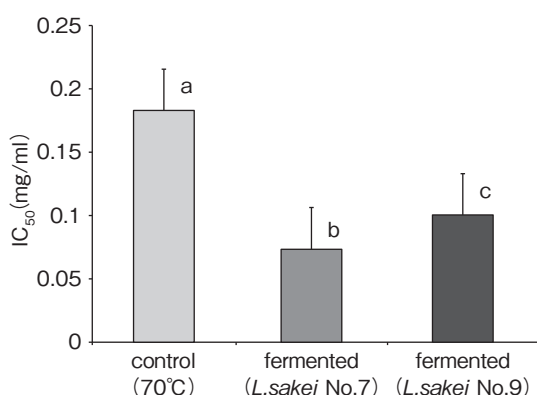


Fig. 3 Effect of water-soluble fractions from fermented myofibrillar protein on the ACE-inhibitory activity.

Data represent the means $\pm$ SD of at least five independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

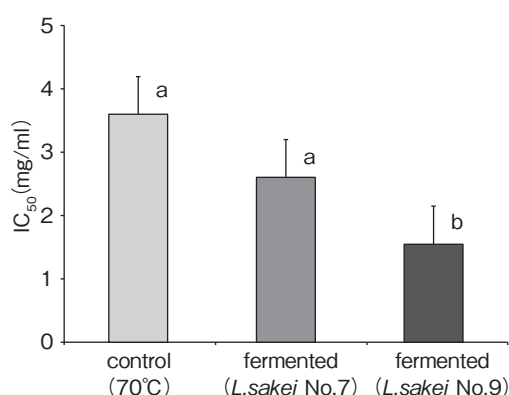


Fig. 4 Effect of water-soluble fractions from fermented myofibrillar protein on the DPP-IV-inhibitory activity.

Data represent the means $\pm$ SD of at least five independent experiments. Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

タンパク質におけるACE阻害活性の発現の有無について検討したところ、既報⁽⁶⁾における120, 130°C加熱区と同様、有意な活性上昇は認められず、この傾向は、高血糖治療薬の標的酵素の一つであるDPP-IVに対しても同様であった (Data not shown)。

一方、低温性乳酸菌*L. Sakei* No.7とNo.9を接種した発酵区のACE阻害活性は、いずれの菌株

接種区も対照区と比較して有意に低いIC₅₀を示し、低温乳酸発酵によって、ACE阻害活性が上昇することが確認された (Fig. 3)。また、DPP-IV阻害活性についても同様に検討したところ、いずれの菌株接種区においても有意なIC₅₀の低下がみられ、特に*L. Sakei* No.9接種区においてそれが顕著であった (Fig. 4)。先述したように、いずれの場合もペプチド量の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であると仮定した場合、系中に含まれる活性総量も大幅に増えているものと推察される¹⁴⁾。

今後は、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。

4. 要 約

豚肉由来の筋原線維タンパク質を単純モデル系として用いて、140℃のハイレトルト加熱、あるいは低温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140℃の加熱処理を施すことによって、遊離アミノ酸ならびにペプチド量の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・遊離アミノ酸量の増加がみられた。

血圧上昇および血糖値上昇抑制作用の*in vitro*指標であるACE阻害活性およびDPP IV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差はわずかであった。

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機能性を有する因子が存在する可能性が示唆された。特に、低温性乳酸菌によって低温発酵することによって、ACE、DPP IVの両阻害活性が顕著に上昇することが確認された。

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) 林利哉, 長澤麻央, 芳賀聖一, 小川幸彦: 平成29年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, 36, 135~139, 2018.
- 7) Perry, S. V., Grey, T. C.: *Biochem. J.*, **64**, 184~192, 1956.
- 8) Etlinger, J. D., Zak, R., Fischman D. A.: *J. Cell Biol.*, **6**, 123~141, 1976.
- 9) 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.
- 10) 日本化学会編: 実験化学講座23, 「生物化学 I」, 丸善, 東京, pp.124~130, 1964.
- 11) Laemmli, U. K.: *Nature*, **227**, 680~685, 1970.
- 12) Cushman, D. W., Cheung, H. S.: *Biochem. Pharm.*, **20**, 1637~1648, 1971.
- 13) Ikehara, Y., Ogata, S., Misumi, Y.: *Methods In Emzymology*, 244, pp. 215~227, Academic Press, New York, 1993.
- 14) 伊部さちえ, 吉田恵子, 熊田薫: 日本食品科学工学会誌, 53, 189~192, 2006.

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（Ⅱ）

Efficacy of carnosine intake on the prevention of sarcopenia related with obesity（Ⅱ）

後藤 孔郎・正木 孝幸・柴田 洋孝

（大分大学医学部内分泌代謝・膠原病・腎臓内科学講座）

Koro Gotoh, Takayuki Masaki and Hiroataka Shibata

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

Obesity induces systemic low-grade chronic inflammation. Obesity-induced sarcopenia 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) plasma lipopolysaccharide (LPS) levels, 2) TNF- α expression in small intestine, 3) IL-6, irisin, and BDNF expressions as myokines in muscle. Carnosine treatment inhibited HF-induced elevation of TNF- α expression in small intestine and plasma LPS concentration. Moreover, carnosine also reversed HF-induced decrease of BDNF and IL-6 but not irisin expression in muscle. In addition, HF-induced atrophy of muscle fibers were ameliorated by carnosine intake. Thus, it is suggested that carnosine intake might be effective to prevent the development of obesity-induced sarcopenia.

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、筋繊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されている。サルコペニアには、動物性タンパク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。申請者は、カルノシン摂取は肥満に伴う骨格筋での炎症性変化や異所性脂肪沈着を抑制させることを明らかにしている。このように、肥満による全身性炎症性病変には、腸管内での炎症性変化による腸粘膜バリア構造の破綻により腸管から放出される炎症惹起物質であるlipopolysaccharide (LPS) が大きく関与しており、このLPSが骨格筋に作用することで炎症性変化をもたらすといった可能性が示唆されている¹⁾。本研究では「豚肉や鶏肉摂取が、腸管内炎症性変化を抑制することによって腸粘膜からのLPS放出を減少させ、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」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。

2. 方 法

雄ラットに通常食 (CNT; 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 (CNT) 群、通常食

+カルノシン (CNT+Carnosine) 添加群、高脂肪食+コントロール (HF) 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、採血および骨格筋として大腿筋、下部小腸を摘出する。以下のような評価項目について検討する。

- a) 末梢血のLPS濃度を測定する。
- b) 小腸内での炎症性変化を評価するため、小腸内の炎症性サイトカインであるTNF- α 発現を評価する。
- c) マイオカインであるIL-6, irisin, 脳由来神経栄養因子 (BDNF) の骨格筋内での発現を評価する。
- d) 骨格筋のうち、速筋に特異的に発現するSERCA 1 抗体を用いて、速筋繊維の萎縮度を免疫組織学的に評価する。

3. 結果と考察

3.1 高脂肪負荷に伴う小腸内の炎症性変化および末梢血LPS濃度に対するカルノシンの効果

高脂肪負荷によって小腸内での炎症性サイトカインであるTNF- α 発現が亢進した。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)。また、末梢血のLPS濃度について検討したところ、高脂肪負荷による末梢血LPS濃度の増加が、カルノシン摂取によって有意に抑制された (Fig. 2)。

3.2 高脂肪負荷に伴う骨格筋内マイオカイン発現および速筋繊維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TNF- α 発現が増加するが、その増加はカルノシンの経口投与により抑制された (Fig. 3)。また、BDNFについては高脂肪食によって低下したが、その変化もカルノシン投与により抑制された (Fig. 4)。一方、

irisinについては各群間で有意な変化がみられなかった (Fig. 5)。また、骨格筋でのBDNF発現と血中LPS濃度には負の相関が認められた (Fig. 6)。さらに速筋繊維については、高脂肪食負荷によって速筋繊維が萎縮したが、その変化はカルノシン投与により改善した (Fig. 7)。またIL-6の骨格筋内発現については、高脂肪負荷によって増加したが、カルノシン投与によって抑制された (Fig. 8)。

カルノシンは β アラニンとヒスチジンのジペ

プチドで β アラニン・ヒスチジンであり、特に豚や牛の筋肉中に高濃度に存在する。これらは、ヒスチジンの構成要素であるイミダゾールからイミダゾールペプチドと呼ばれ、内因性抗酸化物質としての役割を果たしている^{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するとともに筋肉脂質の過酸化やタンパクの酸化が抑制されることが知られている。

内臓肥満はインスリン抵抗性を基盤としたメタボリック症候群の基盤となる状態である。サルコ

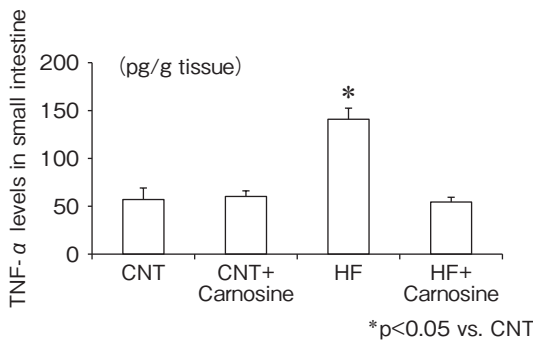


Fig. 1

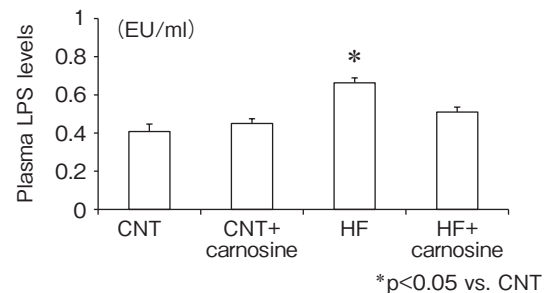


Fig. 2

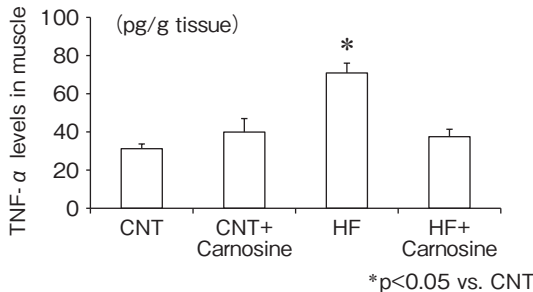


Fig. 3

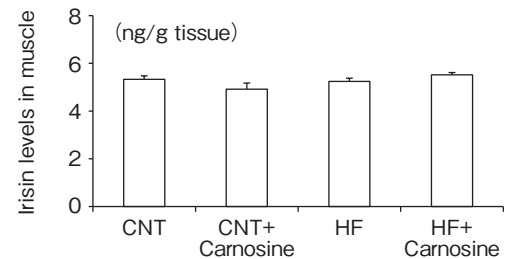


Fig. 4

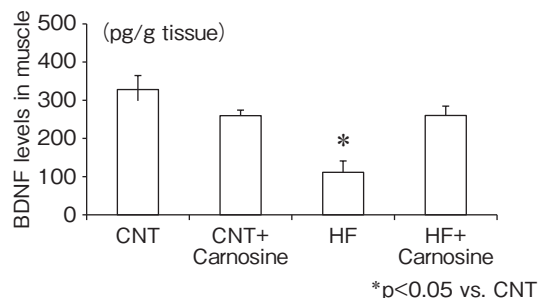


Fig. 5

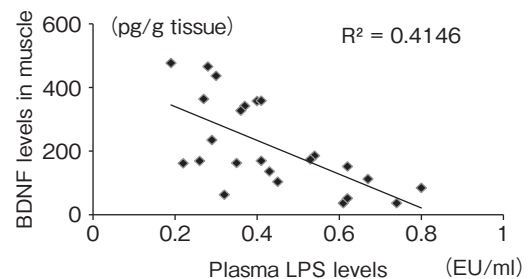


Fig. 6

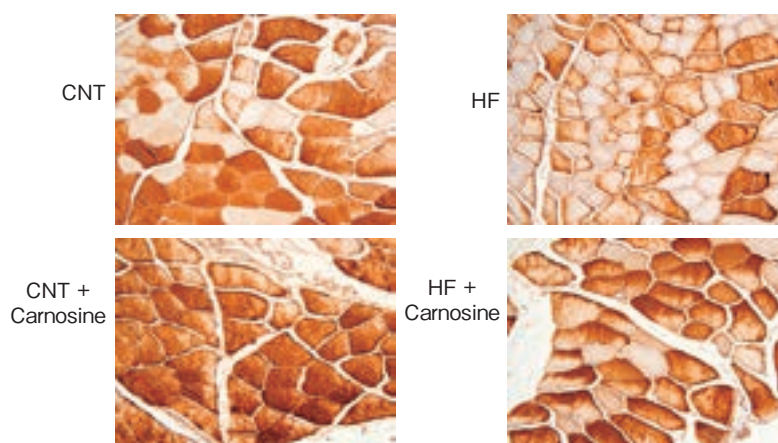


Fig. 7

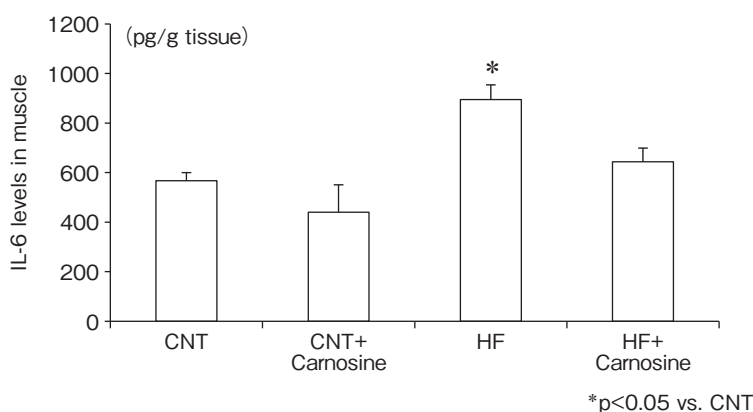


Fig. 8

ペニアと肥満の合併を表す肥満サルコペニア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、筋萎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、筋繊維の萎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、組み合わせら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肥満サルコペニア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肥満サルコペニアの発症予防に有効である可能性が示唆される。

肥満サルコペニアは、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^{6,7)}。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⁸⁾。しかしながら、肥満サルコペニア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、肥満サルコペニア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。IL-6の意義については、IL-6はマイオカインである一方、炎症性サイトカインでもある。今回の研究において、高脂肪負荷で萎縮した速筋繊維とともにIL-6発現が増加していた。肥満サルコペニアにおいては、IL-6は炎症性サイトカインとしての役割が大きいことが推測された。

本研究により、腸管から全身へと放出されるLPSが骨格筋内で炎症性変化をもたらす、そのような炎症がマイオカイン発現を低下させていることが示唆された。これに対して、カルノシンには腸内での炎症性変化といった腸内環境を改善させる作用があることが推測された。さらにカルノシンの抗酸化作用によって、腸粘膜のバリア保護作用をもたらす、腸管からLPSを全身へと放出するのを抑制させ、骨格筋とくに速筋が維持されることが考えられた。このような結果は、運動によるサルコペニア発症予防が困難な症例に対して、カルノシンを多く含む豚や牛肉の摂取が有効であることが大いに期待されるものである。

4. 要 約

肥満は、全身性炎症性疾患と位置付けられており、サルコペニア発症の危険因子であるとされている。肥満サルコペニア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肥満サルコペニアに有用

であるかは不明であった。以上より本研究では、「豚肉の摂取は肥満サルコペニア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。カルノシン摂取は、肥満による小腸内での炎症変化および腸管から全身へと放出するLPSを抑制させることで、骨格筋内での炎症性変化を抑制させ、マイオカイン発現が亢進し速筋繊維の萎縮も改善させた。以上より、カルノシンを多くする豚肉の摂取は、肥満サルコペニア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) Cari, P. D., Delzenne, N. M. : Interplay between obesity and associated metabolic disorders : new insights into the gut microbiota, *Curr Opin Pharmacol*, **9**, 737~743, 2009.
- 2) Preston, J. E., Hipkiss, A. R., Himsworth, D. T., Romero, I. A., Abbott, J. N. : Toxic effects of beta-amyloid (25-35) on immortalised rat brain endothelial cell : protection by carnosine, homocarnosine and beta-alanine, *Neurosci Lett*, **242**, 105~108, 1998.
- 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) Gusmao-Sena, M. H., Curvello-Silva, K., Barreto-Medeiros, J. M., Da-Cunha-Daltro, C. H. : Association between sarcopenic obesity and cardiovascular risk : where are we? *Nutr Hosp*, **33**, 592, 2016.
- 7) Calvani, R., Marini, F., Cesari, M., Tosato, M., Picca, A., Anker, S. D., von Haehling, S., Miller, R. R., Bernabei, R., Landi, F., Marzetti, E. : SPRINTT Consortium. Biomarkers for physical frailty and sarcopenia, *Aging Clin Exp Res*, **29**, 29~34, 2017.
- 8) 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.

食肉摂取による，不飽和脂肪酸等の生活習慣病予防効果について（佐久コホートに於ける疫学研究）

Prevention effects of unsaturated fatty acids on lifestyle-related diseases
by the dietary intake of meat sources (Saku cohort study)

山 田 晃 一

（国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所）

Kouichi Yamada

（National Research and Development Agency National Institutes of Biomedical Innovation, Health and Nutrition）

ω 3-polyunsaturated fatty acids, such as eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA), are expected to have preventive effects against cardiovascular disease (CVD). We detected the polymorphism (SNPs) of Fatty Acids Desaturating enzymes (FADS) and examined the association with blood EPA, DHA or other polyunsaturated fatty acids in the obese men and women of Saku Control Obesity Program (SCOP). A significant association was observed between FADS1 SNPs and arachidonic acid (AA), suggesting that FADS1 is actually implicated in the metabolism of ω 6-unsaturated fatty acids. In addition, the FADS1 SNPs are associated with blood EPA/AA ratio. The ratio was reported to be correlated with the risk of CVD in the other Japanese Cohort, such as Hisayama Study. These findings lead the conclusion that FADS1 SNPs are one of the genetic background affecting CVD. On the other hand, the dietary intake of ω 3- or ω 6-unsaturated fatty acid, or the fish and shellfish intake, estimated from self-administered diet history questionnaire (DHQ), was scarcely associated with the blood EPA or DHA level.

To study the preventive effects of meat intake against life style-related diseases, we have also examined the correlation between meat intake and blood-biochemical parameters (red blood cells, hematocrit, serum Fe⁺⁺⁺ etc.). As a result, meat intake was correlated with platelet level in the obese men, and in the obese women, it was significantly correlated with white blood cell level, indicating that meat intake effectively contributes to the blood-forming faculty.

1. 目 的

EPAやDHAのような ω 3系多価不飽和脂肪酸には、血中の中性脂肪値を下げ、不整脈や動脈硬化を予防し、脳梗塞（脳血栓）や心筋梗塞を防ぐなど、さまざまな生活習慣病予防効果が期待されている。また、一価不飽和脂肪酸のオレイン酸は、

LDLコレステロール値を低下させて、高脂血症を改善することが報告されている。食肉には飽和脂肪酸と一価不飽和脂肪酸が多く含まれるが、 ω 3系脂肪酸は微量である。しかし、近年は魚油等を飼料に配合し、 ω 3系脂肪酸を多く含む鶏卵や豚肉の生産も試みられている。肉類の過剰摂取は肥満や高脂血症、動脈硬化を招くとされ、栄養学的

にも敬遠されてきたが、本課題では食肉の生活習慣病予防効果を疫学的に検証し、食肉摂取のポジティブな面に焦点を当てたい。

2. 方 法

食肉や食肉成分の生活習慣病予防効果、 ω 3系不飽和脂肪酸の生活習慣病予防効果、および、DHA、EPAの体内合成の遺伝的背景を日本人において明らかにするため、まず、人間ドック受診者の中高年肥満者を対象に参加者を募った「佐久肥満克服プログラム（235名）^{1,2)}」において、①血中脂肪酸組成を定量分析し、そのEPAやDHA値と、肉類等の食品の食事摂取量との関係を回帰分析する。

次に、②これらの血中脂肪酸値と、体格指標等の肥満所見、血液生化学的検査値等の高脂血症所見、糖負荷試験結果等の糖尿病所見との相関を解析し、肉類の生活習慣病予防効果について明らかにする。

③血中脂肪酸成分値は食事摂取量とともに、被験者の遺伝的背景（脂肪酸代謝酵素の遺伝子多型）に影響されることが報告されているため^{3,4)}、 α リノレン酸→EPA or DHAの生成に影響する遺伝子FADS1、ELOVL2などの多型を検出し、血中EPAやDHA値との相関を一元配置分散分析する。

④このコホートにおいても、 ω 3系不飽和脂肪酸の食事摂取による生活習慣病予防効果が認められるか、血中の ω 3系不飽和脂肪酸値と、高脂血症、動脈硬化、心筋梗塞、肥満、糖尿病など生活習慣病所見との相関を解析する。

さらに、人間ドック受診者一般を対象に参加者を募った「佐久健康長寿プログラム」（4,502名）において、

⑤上記③でEPA or DHAの体内生成量を有意に増減させていた不飽和脂肪酸関連遺伝子多型を

解析する。一元配置分散分析により、高脂血症、動脈硬化（PWV値）、心筋梗塞、肥満、糖尿病など生活習慣病所見との相関を解析し、罹患傾向を明らかにする。

⑥「佐久肥満克服プログラム」の結果である、①～④を再検証する。特に4,502名の心筋梗塞、脳血管疾患、脳梗塞の現在までの罹患歴を調べ、不飽和脂肪酸関連遺伝子多型、および ω 3系不飽和脂肪酸の食事による摂取量との相関を調べる。

○遺伝子多型解析の方法と箇所

キアゲン社のキットを用いて、被験者の全血よりDNA精製を行う。遺伝子多型の解析はPCR-RFLP法を用い、切断断片はMultiNA（島津製作所）にて検出する。この方法で、すでに生活習慣病関連35遺伝子、90多型の解析を終了⁵⁻⁷⁾。

○統計解析

回帰分析、一元配置分散分析等の統計にはSPSSを用いる。

3. 結果と考察

3.1 「佐久肥満克服プログラム（235名）」に

おける、血中不飽和脂肪酸成分値の測定

「佐久肥満克服プログラム（SCOP）」の血清を使用する予定だったが、見当たらないため、SCOPの遺伝子精製用全血の残りから、0.25mlを分取し、SRLに血中不飽和脂肪酸分画の測定を依頼した。SRLの分析方法は、血液サンプルを乾固した後、塩酸メタノールでエステル化（50℃）、上層をガス・クロマトグラフで分離・定量するものと考えられる。得られたSCOPの値は、SRLが提示している「基準値」の範囲にほぼ収まっている。

3.2 「佐久肥満克服プログラム」における、

FADS1多型等の検出と血中不飽和脂肪酸成分値との相関解析

不飽和脂肪酸代謝に関与するFADS1とELOVL

2 遺伝子について、各々 rs174537, rs953413 を PCR-RFLP 法で解析し、血中不飽和脂肪酸成分値との一元配置分散分析を行った。その結果、FADS1 (rs174537) については、肥満男性で血中アラキドン酸値と有意な相関 (ANOVA $p=0.021$)、肥満女性でも血中アラキドン酸値とより強い相関を認め ($p=0.003$)、血中 EPA/AA 比とも相関傾向があった (Fig. 2)。

FADS1 遺伝子と FADS2 遺伝子は向かい合わせの位置に存在し、両遺伝子を含む一帯が連鎖不平衡領域であることが知られている。rs174537 は FADS1 遺伝子の相当下流のイントロン域に存在

するため、より上流の rs174547 と、FADS1 遺伝子のプロモーター領域に存在する rs174556 を選択し、同様に解析を行った。

その結果、rs174547 についても、肥満男性で血中アラキドン酸値と有意な相関 ($p=0.025$)、肥満女性でも血中アラキドン酸値とさらに強い相関を認め ($p=0.002$) (Fig. 1)、血中 EPA/AA 比とも有意な相関 ($p=0.032$) があった (Fig. 2)。この rs174547 の場合について Bonferroni による多重比較を行うと (Fig. 1)、肥満男性では、血中アラキドン酸値について、大多数型 (T/T) と少数型 (C/C) の間でのみ有意 ($p=0.023$)。肥満女

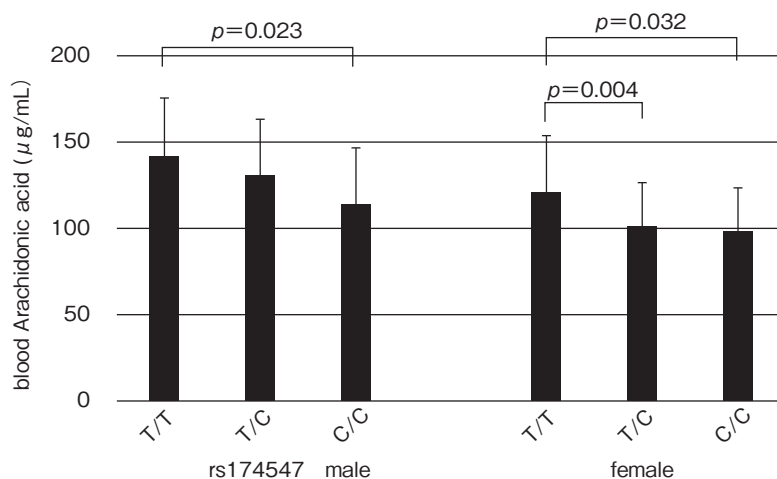


Fig. 1 Association between FADS1 polymorphism (rs174547) and blood arachidonic acid

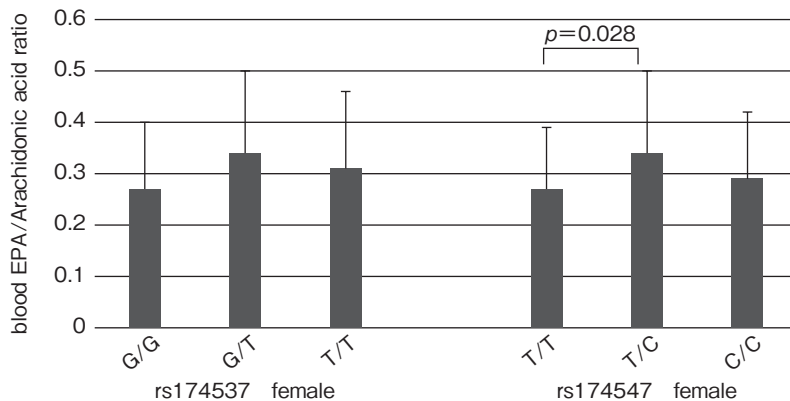


Fig. 2 Association between FADS1 polymorphisms and blood EPA/arachidonic acid ratio

性の場合、血中アラキドン酸値について、大多数型（T/T）と少数型（C/C）の間で有意（ $p=0.032$ ）に加えて、大多数型（T/T）とヘテロ（T/C）の間でも有意（ $p=0.004$ ）であった。血中EPA/AA比については、大多数型（T/T）とヘテロ（T/C）の間で有意（ $p=0.028$ ）であった。

同様に、rs174556についても、肥満男性で血中アラキドン酸値と有意な相関（ $p=0.031$ ）、肥満女性でも血中アラキドン酸値と有意な相関を認め（ $p=0.037$ ）、血中EPA/AA比とも相関傾向があった（データ略）。

rs174537, rs174547, rs174556の3ヶ所の多型について、肥満男女性で血中アラキドン酸値と有意な相関を示したことは、FADS1（ないしはFADS2）が、少なくとも ω 6系不飽和脂肪酸代謝に確かに関与していることを示唆する。おそらく、FADS1の酵素発現量が違い、それがアラキドン酸生成に影響を及ぼしていると考えられる。

肥満女性ではrs174547について、血中EPA/AA比と有意な相関があり、rs174537, rs174556の2ヶ所の多型についても、相関傾向があった。EPA/AA比は、日本の他のコホート（例えば、久山町研究）において、心血管系疾患の死亡率との相関が報告されている所見であり^{8, 9)}、FADS1多型は心血管疾患に影響する1つの遺伝的な背

景であることが本課題で明らかになった。久山町研究では「血清EPA/AA比が高い人ほど心血管系疾患による死亡率が低い」と報告されている⁹⁾が、大多数型（T/T）の血中EPA/AA比值（ 0.27 ± 0.12 ）、とヘテロ（T/C）のそれ（ 0.34 ± 0.16 ）の差は僅差であり、ただちに大多数型が心血管系疾患に罹りやすいというほどのことはない。

3.3 「佐久肥満克服プログラム」における、

DHQによる肉類等、食事摂取量と血中不飽和脂肪酸成分値との相関解析

次に、食事歴法質問表（DHQ）¹⁰⁾によって推定された食事摂取量と血中不飽和脂肪酸成分値との回帰分析を行った。以下が有意なものすべてであり、肥満男性で肉類摂取量と血中アラキドン酸値の弱い正相関（Pearsonの相関係数 $r=0.217$ ；有意確率（両側） $p=0.022$ ）（Fig. 3）、魚介類摂取量とEPA/AA比の弱い正相関（ $r=0.194$ ； $p=0.041$ ）以外に、 ω 3系、および ω 6系不飽和脂肪酸食事摂取量と血中不飽和脂肪酸成分値との相関は一切出なかった。

3.4 「佐久肥満克服プログラム」における、

DHQによる肉類等、食事摂取量とBMI等の肥満所見、生活習慣病所見との相関解析

SCOPは肥満治療介入研究を実施したコホートであるため、肥満、高脂血症や糖尿病の生活習慣

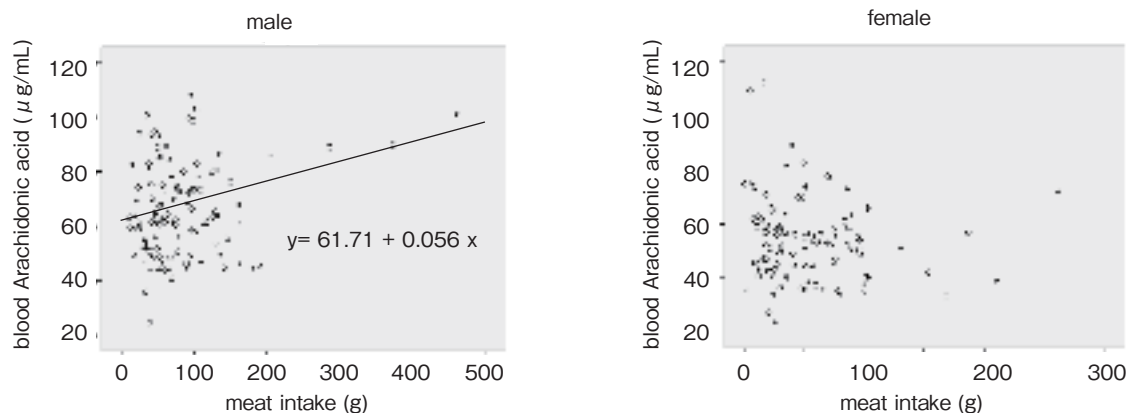


Fig. 3 Association between meat intake and blood Arachidonic acid

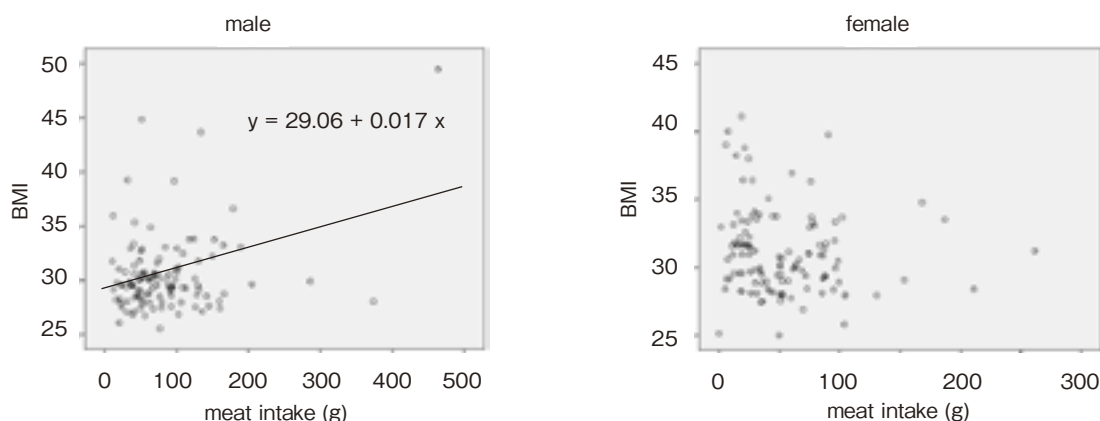


Fig. 4 Association between meat intake and BMI

病所見が充実しており、肉類等、食事摂取量とこれらの生活習慣病所見との相関解析を行った。

肥満男性では、肉類摂取量と、肥満所見 (BMI, WaistAve, 胴回り, 全体脂肪面積, 皮下脂肪面積) の間に強い正相関が認められたが、肥満女性では相関がなかった。この場合、肉類摂取量と相関があるのは、BMI ($r=0.307$; $p=0.001$) (Fig. 4), WaistAverage ($r=0.302$; $p=0.001$), 胴回り ($r=0.269$; $p=0.004$), CTで測定した全体脂肪面積 ($r=0.327$; $p=0.000$), 皮下脂肪面積 ($r=0.209$; $p=0.030$)。肉類摂取量と、同じくCTで測定した腹腔内脂肪 (= 内臓脂肪) 面積の間には相関がないことから、肉類摂取による脂肪は主に皮下脂肪に付くことが示唆される。

肥満男女性ともに、肉類摂取量と高脂血症所見、糖尿病所見との相関はなかった。

肥満女性では、血中アラキドン酸値と肥満所見 (BMI, WaistAve, 胴回り, 全体脂肪面積, 皮下脂肪面積) の間に強い負相関があった (肥満男性では相関なし); 血中アラキドン酸値と、BMI ($r=-0.289$; $p=0.002$), WaistAverage ($r=-0.382$; $p=0.000$), 胴回り ($r=-0.347$; $p=0.000$), CTで測定した全体脂肪面積 ($r=-0.316$; $p=0.001$), 皮下脂肪面積 ($r=-0.322$; $p=0.001$)。

ω 6系不飽和脂肪酸であるアラキドン酸は卵や豚肉、レバーなどに多く含まれるが、どうして強い負相関になるのかは、よく分からない。

それから、肥満女性が何を多く摂取して肥満したか、については、穀類、菓子類、炭水化物等、いろいろ解析したが、有意なものは見つけれなかった。

肉類摂取による生活習慣病予防効果について、肉類の摂取頻度と「貧血」との相関が日本人で報告されている¹¹⁾ので、私達もSPSSのデータビューに今まで削除してきた赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値、血清鉄、血清アルブミン等の血液生化学的所見を追加して、「貧血」との相関を解析した。その結果、赤血球数、血色素量、ヘマトクリット値等の貧血所見との相関は検出できなかったが、肥満男性では肉類摂取量と血小板数との間に、弱い正相関 ($r=0.230$; $p=0.025$)、肥満女性で肉類摂取量と白血球数との間に、強い正相関が認められた ($r=0.272$; $p=0.007$) (Fig. 5)。回帰直線を描くと、いずれも、基準値の範囲 (正常範囲) に収まる (血小板数: $13.0 \sim 34.9 \times 10^4 / \mu\text{L}$; 白血球数: $3.3 \sim 9 \times 10^3 / \mu\text{L}$)。このように、少なくとも「佐久肥満克服プログラム」の肥満男女において、肉類は造血機能の亢進に寄与してい

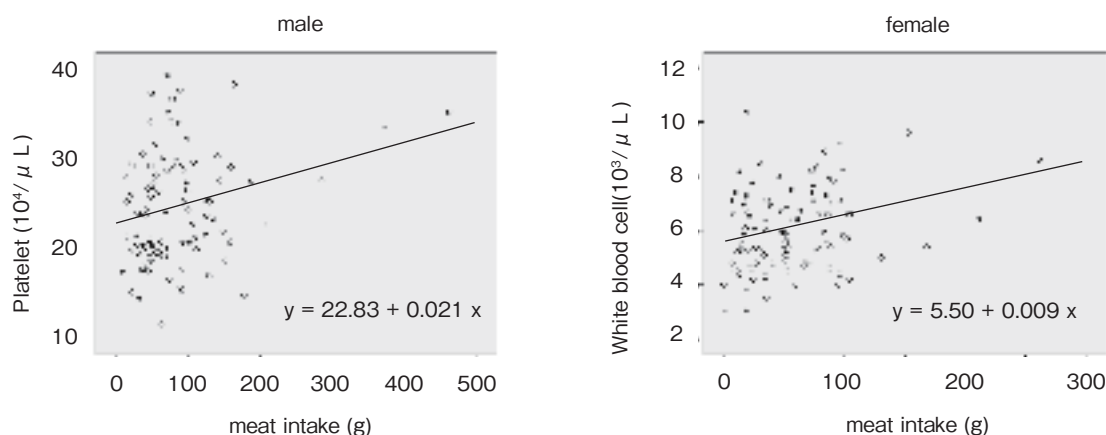


Fig. 5 Association between meat intake and platelet (male) or white blood cell (female)

と考えられる。

3.5 「佐久健康長寿プログラム」(4,502名)におけるFADS1多型の検出

「佐久健康長寿プログラム (SHAP)」は標準体重者が大部分で、それに肥満者と若干名の痩身者を加えた構成となっており、心血管系疾患の追跡調査を行うのに適したコホートである。FADS1多型の検出をするために、まず被験者、約2,200人分の全血からキアゲン社のQIAamp DNA blood kitを用いて、DNA精製を行った（本課題研究開始以前に約1,600人分のDNA精製を行っており、これで合計約3,800人分のDNA精製が完了した）。

血中EPA/AA比と最も有意な相関が得られたrs174547について、上記のPCR-RFLP法によりSHAPの3,797人の遺伝子多型を解析した（男性2,211人；女性1,586人）。当初の研究計画では、平成29年度にこのコホートの5年後の追跡調査が行われ、心血管系疾患についても罹患人数等の所見が得られる予定だった。ところが、共同研究を行っている佐久総合病院の事情により、被験者の健診データとの連結ができないまま、現在に至っている。

脈波伝播速度（PWV）は測定が終了している

が、集約が不完全ということで、データとして利用できなかった。

4. 要 約

EPAやDHAのような ω 3系多価不飽和脂肪酸には、血中の中性脂肪値を下げ、不整脈や動脈硬化を予防し、脳梗塞（脳血栓）や心筋梗塞を防ぐなど、さまざまな生活習慣病予防効果が期待されている。私達は、脂肪酸不飽和化酵素であるFADS1の遺伝子多型を検出し、血中EPAやDHA値等との相関を分析した結果、FADS1多型と血中アラキドン酸値との間に有意な相関を見出した。これは、FADS1が ω 3系、および ω 6系不飽和脂肪酸代謝に確かに関与していることを示唆する。同様に、FADS1多型と、血中EPA値／アラキドン酸値比（EPA/AA比）との間にも、有意な相関を検出した。EPA/AA比は、日本の他のコホート（例えば、久山町研究）において、心血管系疾患の死亡率との相関が報告されている所見であり、FADS1多型は心血管系疾患に影響する1つの遺伝的な背景であるといえる。一方、食事歴法質問表（DHQ）によって推定された食事摂取による、 ω 3系、および ω 6系不飽和脂肪酸量、あるいは魚介類摂取量は、血中EPA

やDHA値等とほとんど相関がなかった。

肉類摂取による生活習慣病予防効果について、肉類摂取量と、赤血球数、血色素量、血清鉄等の、血液生化学的所見との相関を解析した。その結果、肥満男性では肉類摂取量と血小板数との間に弱い正相関、肥満女性で肉類摂取量と白血球数との間に強い正相関が認められたことから、少なくとも「佐久肥満克服プログラム」の肥満男女性においては、肉類摂取が造血機能の亢進に寄与していると考えられる。

共同研究者

饗場 直美 (神奈川工科大学応用バイオ科学部)

森田 明美 (三重大学医学系研究科)

宮地 元彦 (国立研究開発法人医薬基盤・健康・栄養研究所)

渡邊 昌 (公益社団法人生命科学振興会)

文 献

- 1) Watanabe, S., Morita, A., Aiba, N., Miyachi, M., Sasaki, S., Morioka, M., *et al.* : *Anti-Aging Medicine*, **4**, 70~73, 2007.
- 2) Morita, A., Ohmori, Y., Suzuki, N., Ide, N., Morioka, M., Aiba, N., *et al.* : *Anti-Aging Medicine*, **5**, 13~16, 2008.
- 3) Tanaka T., *et al.* : *PLoS GENET*, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000338>, 2009.
- 4) Ameer, A., *et al.* : *Ame. J Hum. Getet*, **90**, 809~820, 2012.
- 5) Yamada, K., Takezawa, J., Morita, A., Matsumura, Y., Watanabe, S. : *Anti-Aging Medicine*, **4**, 63~69, 2007.
- 6) Takezawa, J., Yamada, K., Morita, A., Aiba, N., Watanabe, S. : *Obesity Research & Clinical Practice*, **3**, 179~191, 2009.
- 7) Takezawa, J., Yamada, K., Miyachi, M., Morita, A., Aiba, N., Sasaki S., Watanabe S. : *Appetite*, **63**, 105~111, 2013.
- 8) Ninomiya, T., *et al.* : *Atherosclerosis*, **231**, 261 ~ 7, 2013.
- 9) 九州大学大学院医学系研究科病態機能内科学・環境医学 久山町研究室, 2011.
- 10) Sasaki, S., Yanagibori, R., Amano, K. : *Journal of Epidemiology*, **8**, 203~215, 1998.
- 11) Kunitsugu, I., *et al.* : *Nursing & Health Sci.*, **14**, 2012.

食肉を中心とする食品由来核酸の腸管保護機能の 解析（Ⅱ）

Effects of nucleic acids from meat and other foods on the functions of
intestinal cells (II)

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 therefore focused on the importance of nucleic acid contents in our foods and of the potent functions of food-derived nucleic acids in our body. Our previous studies have demonstrated that food-derived nucleic acids, especially from soybean and chicken meat, induced the mRNA expression of claudin-4 and mucin 2 in differentiated Caco-2 cells, both of which contribute to the barrier functions of intestinal cells. Here, we especially focused on the effects of enzymatic digestion of soybean-derived nucleic acids on the activity in the intestinal cells. It was found that *in vitro* enzymatic digestion of soybean-derived nucleic acids with pancreatic and intestinal enzymes decreased the molecular weights of nucleic acids, and that the enzymatic digestion significantly attenuated the activity of the nucleic acids for mRNA induction in the differentiated Caco-2 cells. We also found that DNA, rather than RNA, could contribute to the activity of soybean-derived nucleic acids. We also tried the chemical analysis of the bioactive nucleic acids using high-performance liquid chromatography (HPLC). However, we could not establish suitable HPLC conditions for food-derived nucleic acids within this study. These studies demonstrated that decrease in the molecular size of during enzymatic digestion could be crucial for the potent biological activity of food-derived nucleic acids.

1. 目 的

ヒトは動物、植物、あるいは微生物由来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。昨年度の検討において、食事として摂取する核酸量を明らかにするため、食品からの核酸の抽出方法について検討し、さまざまな食品に含まれる核酸量の測定を試みた。また、食品の加熱によって核酸の分子サイズが低下することも示された。また、小腸上皮モデルである分化Caco-2細胞を用いた検討から、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ことが示された。本年度は、食品由来核酸もモデルとして大豆由来核酸を用いて、経口摂取時に予想される消化分解による分子サイズの変化と、腸管細胞への機能性への影響について検討を行うこととした。また、機能性に資する核酸分子および配列等の情報を得るために、大豆由来核酸のHPLC分析も試みた。

2. 方 法

2.1 核酸抽出方法

50mlチューブに大豆破碎粉末を約1.5 g量り取り、核酸抽出用バッファーを30ml加え攪拌した。65℃ウォーターバスで10分ごとに転倒混和し30分インキュベート後、12000rpmで15分遠心した。上清を回収し、フェノール試薬（フェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール=25：24：1, pH5.2, nacalai tesque）を15ml加えて転倒混和し、泡立ないようにゆっくりと20分振とうし、4℃、12000rpmで15分遠心した。上清を回収し、クロロホルムを等量加え、10分よく攪拌させて、4℃、12000rpmで15分遠心した。さらに上清を回収し、イソプロパノール（-20℃）を等量加えて-20℃で20分冷却し、4℃、12000rpmで15分遠心した。上清を除去し、70%エタノール

（-20℃）を500 μ l加え、沈殿を洗浄した。4℃、12000rpmで15分遠心し、デカンテーションにより上澄みを除去し、沈殿を室温で乾固させた。核酸処理用のダルベッコ変法イーグル培地（DMEM）を適量加え、4℃で溶解させた。

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 核酸の人工消化実験

膵液は、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、1分×3回の超音波破碎し、3000rpmで5分の遠心後の上清を使用した。そして消化液ごとに1, 10, 100, 1000, 10000倍希釈したものを用意した。エッペンドルフチューブに、大豆由来核酸（核酸濃度1.81mg/ml）を100 μ lと膵液を100 μ l入れて、37℃で60分振とうさせた。その後、腸液100 μ l添加し、37℃で90分振とうさせた。

2.4 アガロースゲル電気泳動

2%アガロースゲルを作製した。パラフィルム上に6×Loadingバッファーを2 μ l乗せ、サンプル10 μ lと混合し、そのうち10 μ lアプライし、100Vの低電圧で泳動した。低分子側のマーカーがゲルの半分程度移動したところで止め、UV照射装置で312nmの波長を照射して検出した。

2.5 培養細胞への核酸処理

ヒト結腸癌由来細胞株Caco-2を10%FBS含有DMEMで培養し、実験計画に応じて適宜希釈し、24ウェルプレートに1ウェルあたり1mlずつ撒いた。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DMEM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後、実験に用いた。食品抽出した核酸をDMEMに溶かし、各核酸量を測定した。24ウェルプレートに撒いて小腸上皮細胞様に分化させた細胞を用意し、培養液を除いてPBSで洗浄した。食品から抽出した核酸を総核酸量 (dsDNA + ssDNA + RNA) が 1 mg/mlとなるよう核酸処理用DMEMで希釈し、1ウェルあたり300 μ L処理した。37°C, 5 %CO₂条件下で4時間培養した。

2.6 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。プライマーの塩基配列を以下に示した。

【GAPDH】 GATGAGAAGTATGACAACAGCCT
(forward)

AGTCCTTCCACGATACCAAAGT
(reverse)

【Claudin-4】 TTGTACCTCGCAGACCACT
(forward)

CAGCGAGTCGTACACCTTG
(reverse)

2.7 各組成の画分の調製方法

〈RNA-rich画分の調製〉

エッペンドルフチューブに大豆由来核酸溶液50 μ LとSepasol-RNA I Super G 400 μ Lを加えた。そこにクロロホルムを1/5量加え、15秒間ボルテックスを行い、よく混合した。室温で3分静置した後、20000 $\times$ gで15分遠心した。上清を200 μ L回収し、2-プロパノールを等量加えて混合した。室温で5分静置した後、20000 $\times$ gで10分遠心し

た。上清を捨て、70%エタノールを加えて洗浄し、20000 $\times$ gで10分遠心した。上清を捨て風乾し、DMEM培地を適量加え、4°Cで溶解させた。

〈DNA-rich画分の調製〉

エッペンドルフチューブに1 mg/ml RNase A (nacalai tesque) を調製し、DNaseの失活を目的として100°Cで5分加熱処理を行った。大豆由来核酸溶液に1 mg/ml RNase Aを添加し、37°Cで60分間反応させた後、フェノール試薬を用いて核酸抽出を行った。

3. 結 果

3.1 人工消化による核酸の抽出率と組成、分子サイズの変化

摂取する食品は体内での消化を受けることから、人工消化された食品由来核酸を用いて機能性を評価することとした。今回は、核酸含有量が多くclaudin-4遺伝子発現量の有意な増加がみられた大豆に着目し、大豆由来核酸を用いて人工消化実験を行った。調製した腩液と腸液を人工消化液として用いて、大豆由来核酸の人工消化を行った後、フェノール・クロロホルム抽出を行った。対照実験として消化酵素の失活を目的に100°Cで30分加熱した人工消化液も使用した。人工消化液を加えず、人工消化と同じ条件でインキュベートした後、フェノール・クロロホルム抽出した核酸の量を100%として抽出率を比較したところ、消化液処理で83%、加熱した人工消化液処理で109%となった。(Fig. 1)。また、核酸の組成は、グラフには示さないが人工消化液を加えず人工消化と同じ条件で抽出した大豆由来核酸は、元々の大豆由来核酸と比べてssDNAの割合が増加した。この人工消化と同じ条件で抽出した大豆由来核酸と比べて消化後の核酸の組成に大きな変化はなく、加熱した消化液を加えた大豆由来核酸では、dsDNA、RNAの割合が増加した (Fig. 2)。

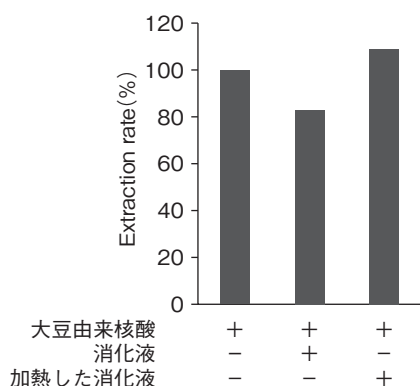


Fig. 1 Effects of enzymatic digestion on the extraction rate of nucleic acids.

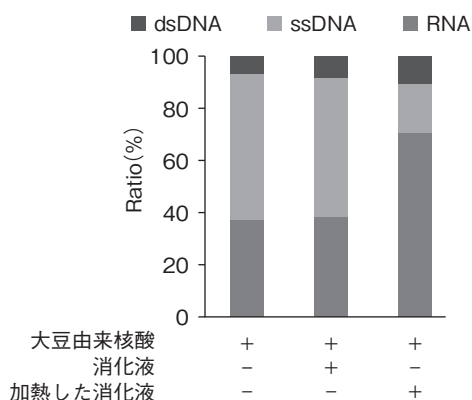


Fig. 2 Effects of enzymatic digestion on the nucleic acid contents.

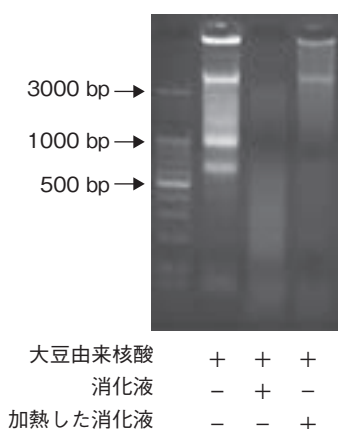


Fig. 3 Effects of enzyme digestion on molecular weights of soybean-derived nucleic acids.

さらに、これら抽出した核酸の分子サイズを確認した。消化後の核酸で高分子領域のバンドが消失し、500bp以下の低分子領域のバンドが濃くなっていた。一方で加熱した消化液を加えた核酸ではDNAとみられる高分子領域のバンドは薄いながらも確認できたが、RNAとみられる500-1000bp付近のバンドは消失した (Fig. 3)。データは省略するが、人工消化液を加えずにインキュベートした後、フェノール・クロロホルム抽出した核酸のバンドは、大豆由来核酸のバンドと比べてやや低分子側のバンドが薄くなっていたがほとんど変化がなかった。よって、確かに人工消化液によって核酸が消化されていることが示された。

昨年度までの検討において、大豆由来核酸は分化Caco-2細胞への処理によって、claudin-4やmucin-2などのバリアタンパク質のmRNA発現を誘導することが示されている。そこで、人工消化した大豆由来核酸を細胞へ処理し、今回はclaudin-4のmRNA発現量について評価を行った。その結果、消化液処理により大豆由来核酸によるclaudin-4のmRNA発現の増加は顕著に抑制され、消化液をあらかじめ加熱することで酵素活性を失活させるとその抑制作用は弱まった (Fig. 4)。このことから、大豆由来核酸消化液による低分子化によって腸管細胞に対する機能性が低下することが示唆された。

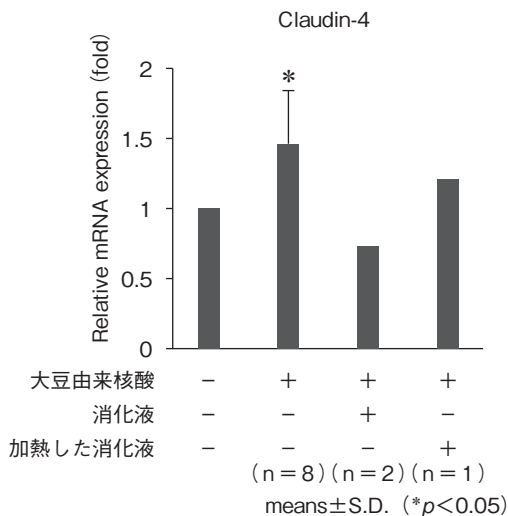


Fig. 4 Effects of enzymatic digestion on the activity for claudin-4 mRNA induction in differentiated Caco-2 cells.

3.2 大豆由来核酸における機能性に寄与する核酸の組成の特定

大豆由来核酸を用いて、加熱や消化が核酸に与える影響を検討してきた。ここでは、核酸の機能性に寄与する核酸の組成を特定することを目的として、核酸のRNA-rich画分とDNA-rich画分の調製を行い、それぞれの画分で腸管のバリア機能に関連した機能性について評価を行うこととした。

機能性の検討に用いた1.0mg/ml大豆由来核酸はおおよそ0.6mg/ml RNA, 0.4mg/ml DNAからなることから、RNA-rich画分中のRNAを0.6mg/ml, DNA-rich画分中のDNAを0.4mg/mlとなるよう濃度調節したものを細胞に処理してclaudin-4のmRNA発現量について評価を行った。その結果、claudin-4のmRNA発現量がRNA-rich画分では低下し、DNA-rich画分では増加した (Fig. 5)。このことから、大豆由来核酸に含まれる成分のうち、DNAが機能性に寄与している可能性が示唆された。

3.3 HPLCによる大豆由来核酸の分析

食品由来核酸のHPLC分析を行うにあたり、ま

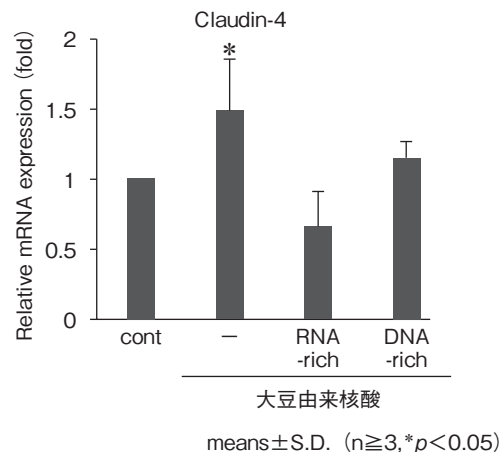


Fig. 5 Activity of soybean-derived nucleic acid, and the RNA- and DNA-rich fractions to induce claudin-4 mRNA in differentiated Caco-2 cells.

ず、ODSカラムを用いた逆相HPLCによってサイズ既知の合成オリゴヌクレオチドの分析を試みた。逆相HPLCでは、オリゴヌクレオチドは分子サイズが大きくなるほど溶出時間が長くなる。データは省略するが、合成オリゴヌクレオチドの分析においても、分子サイズの小さな順に溶出することが確認できた。この条件において大豆由来核酸の分析を試みたが、良好な分離パターンを得ることができなかった。また、これまでの実験結果から、ある程度の大きさを持った核酸分子により高い機能性があると考えられたため、比較的大きな分子を分離するのに適しているゲル濾過カラムを用いたHPLC分析も試みた。今回の検討では、ゲル濾過の性質を利用して、分子サイズごとに溶質を分離することを試みた。データは省略するが、市販のDNA ladderのゲル濾過HPLC分析を試みたところ、確かに分子サイズの大きな順に溶出されたが、ピークの分離形状は良好ではなかった。本条件で、大豆由来核酸を分析したが、明瞭なピークの分離は確認できなかった。

4. 要 約

昨年度の研究において、食品由来核酸が腸管細胞のバリア機能を増強させる活性を有することを明らかにした。また、加熱調理による核酸の低分子化も確認され、低分子化による機能性への影響も危惧された。本年度の検討においては、高分子である核酸分子を実際に食品として摂取した際に予想される消化・分解による機能性への影響に焦点を当てて検討を実施した。本研究では食品由来核酸のモデルとして大豆由来核酸を用いて消化による分子サイズと機能性の変化について評価を行った。今回、人工消化液を用いた酵素消化反応によって核酸サイズが減少するとともに、分化Caco-2細胞に対する機能性も低下することが示された。よって、食品として核酸を経口摂取した

場合には、消化酵素によって分解され、本来有する機能性が低下する可能性が考えられる。今後、動物実験やヒト試験でのさらなる検討が必要であるが、実際に食品由来核酸の機能性を発揮させるためには、活性を有する形で腸管細胞へ効率良く到達するような摂取方法の開発が必要となる。また、食品由来核酸の機能性発現メカニズムについてはまったく不明のままである。今回、大豆由来核酸のHPLC分析を試みたが、良好な分離条件を得ることができなかった。本研究によって、食品由来核酸の機能性には分子サイズが重要であることが示されたが、核酸の塩基配列の重要性についても今後の検討課題である。HPLCならびにLC-MSを用いた詳細な分析により、活性発現に重要となる分子サイズや塩基配列を明らかにすることが重要となるであろう。

豚赤血球由来グロビタンパク分解物を用いた 高血圧症の改善を目指した研究

Improvement effect of globin protein derived from pig red cell on the
blood pressure in SHR hypertension rats

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

Aya Itoi, Namika Miya and Yutaka Yoshikawa
(Department of Health, Sports and Nutrition, Kobe Women's University)

In in vitro experiments, it was reported that globin protein products of meat-derived natural components have strong ACE inhibitory activity. In this experiment, globin protein products showed the blood pressure lowering effect in hypertensive model SHR rats. Furthermore, from the measurement of catecholamine, it was revealed that the globin protein product suppresses the secretion of two kinds of hormones, NE and Epi. But the suppressive effects were not significant with or without globin protein product. It was suggested that the effect of globin protein products on blood pressure lowering effect is mainly due to ACE inhibitory action in the organ rather than action on catecholamine secretion.

1. 目 的

厚生労働省が3年ごとに実施している「患者調査」の平成26年度の調査によると、生活習慣病の1つである高血圧性疾患の総患者数（継続的な治療を受けていると推測される患者数）は、1,010万8,000人と報告され、前回の調査に比べて約104万人増加しており、減少する気配が見られない状況が続いている¹⁾。さらに、平成25年度の厚生労働省の調査では、高血圧性疾患の医療費は1兆8,890億円であり、国民総医療費の約5%を占めている²⁾。さらに、日本生活習慣病予防協会の調査では、国民の平均血圧が4 mmHg下がると、脳卒中による死亡者数を約1万人、心筋梗塞による死亡者数を約5,000人減らすことができるとも言われており、血圧を正常レベルで維持すること

ができる手軽な方法を提案することは喫緊の課題である。

現在の臨床現場において、医療用医薬品の数は約16,000品目以上あり、種々の疾患を患ったヒトの治療薬として利用されているが、臨床で用いられている多くの有機薬剤は、開発し尽くされた感もあり、新規有機薬剤の開発は難しくなってきた。一方、特定保健用食品の分野では、 γ アミノ酪酸や酢酸、クロロゲン酸類が、血圧が高めの方の食品として注目されている³⁾。さらに近年では、アンジオテンシン変換酵素を阻害する働きを有するペプチド類も血圧上昇を抑制することが報告されており⁴⁾、ペプチド含有の天然物は新たな血圧降下作用の可能性を秘めている。我々は、運動や微量元素（特に金属元素）・天然物などのサプリメント素材に適用可能な物質に注目して研究

を行い、高血圧や糖尿病など生活習慣病に関わる数多くの研究を実施してきた^{5, 6)}。本研究では、これまでの我々の研究分野の中から、過去にACE阻害作用が発見されたグロビンタンパク分解物にターゲットを絞り⁷⁾、高血圧自然発症のSHRラットを用いて、血圧上昇抑制効果の評価を行った。

2. 方 法

2.1 高血圧モデルラットの作成と化合物の投与

5週齢のWistar-Kyotoラットを3匹と自然発症高血圧ラット (SHR) を8匹用意し、高フルクトース食 (57%フルクトース食) を与え2週間予備飼育した。その後、その8匹をグロビン水溶液を自由摂取させる群 (SHR+HF+glo群, 4匹)、グロビン水溶液を摂取させない群 (SHR+HF群, 4匹) に分け10週間飼育した。また、普通食 (40%コンスターチ食) 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。与えるグロビン水については、摂取するグロビンの量が400 mg/kg BWとなるように35%グロビン抽出物をElix水で希釈したサンプルを飲料水として使用した。飼育開始時、飼育から2週間後 (予備飼育最終日)、飼育から4週間後、飼育から7週間後、飼育から10週間後、解剖前の5回、血圧の測定を行った。血圧は、株式会社ハクバテック・ライフサイエンス・ソリューションズのVolume Pressure Recording (VPR) Tail-Cuff Systemを使用して測定した。なお、35%グロビン抽出物は、ILS株式会社から提供していただいた。

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。

2.2 血漿中カテコールアミンへの麻酔薬による影響

6週齢のWistar系雄性ラットを用い、ウレタン麻酔 (カルバミン酸エチル0.7 g/kg + α -クロロロース0.06 g/kg混合を腹腔内投与) および、イソフルラン麻酔下 (導入濃度4-5%, 維持濃度2-3%で吸入投与) で腹部大静脈から採血した^{8, 9)}。得られた血液を4℃, 800 gで10分間遠心分離を2回行うことにより得た血漿を用いてカテコールアミンの測定を行った。

2.3 血漿中カテコールアミンの定量

イソフルラン麻酔下で採血し、得られた血液を4℃, 800 gで10分間遠心分離を2回行うことにより血漿を得た。血漿50 μ Lに、0.1 MのEDTAを100 μ L、内標準物質として36 μ MのDHBA臭化水素酸塩を5 μ L、1.5 Mトリス塩酸緩衝液 (pH8.6) を500 μ L加え、さらに活性アルミナ5 mg加えた。これらを10分間振盪攪拌し4℃, 800 gで1分間遠心分離し、液相をアスピレーターで吸引除去した。活性アルミナを1 mLの超純水で3回洗浄した後、活性アルミナをフィルター付遠沈管 (MILLIPORE Ultrafree-MC Centrifugal Filter Units) に移した。4℃, 1,500 gにおける3分間の遠心分離による活性アルミナの脱水後、2%酢酸溶液50 μ Lを加えてカテコールアミンを抽出させた。数秒間ボルテックスミキサーにかけ攪拌し、4℃, 2,000 gで5分間遠心分離を行い、上清10 μ Lを電気化学検出器付きの高速液体クロマトグラフィー (HPLC-ECD) を用いてノルエピネフリン (NE) およびエピネフリン (Epi) を定量分析した。なお、HPLCの条件はTable 1のとおりとする。

Table 1 HPLC conditions of catecholamine measurement

分析カラム	: EICOMPAK SC-50DS (Φ3.0×150mm)
プレカラム	: EICOMPAK AC-ODS (Φ4.0×5 mm)
流速	: 0.5mL / min
分析温度	: 25℃
検出器	: EICOM ECD-300
設定加電圧	: +450mV vs Ag/AgCl
作用電極	: Platinum electrode WE-3G
参照電極	: RE-100
ガasket	: GS-50
脱気装置	: DG-300
注入量	: 10 μL

3. 結果と考察

3.1 グロビントタンパク分解物摂取によるラットへの影響

3.1.1 体重への影響

飼育終了時の体重平均は、Normal群では408 g, SHR + HF群では308 g, SHR + HF + glo群では309 gとなった。Normal群に比べて他の群の平均体重は低い値となったが、高フルクトース食を与えたSHR + HF群とSHR + HF + glo群はほとんど同じ体重変化をたどった (Fig. 1(A))。

3.1.2 摂食量・摂水量への影響

飼育期間を通して、普通食を与えたNormal群と比べて高フルクトース食を与えたSHR + HF群とSHR + HF + glo群は摂食量が少ない傾向にあった。また、摂水量は、飼育期間を通して、Wistar-KyotoラットであるNormal群に比べて、SHR + HF群、SHR + HF + glo群で多い傾向にあった (Fig. 1(B) (C))。

3.1.3 血圧への影響

収縮期血圧 (systolic blood pressure ; SBP) はSHR + HF群、SHR + HF + glo群のすべての群で飼育2週間後 (予備飼育最終日) までに上昇した。グロビン水溶液を与えたSHR + HF + glo群においては、飼育5週間後に血圧は低下した。今回の結果を、既報のグロビントタンパク分解物が動物

組織のACE阻害作用を有する結果と総合的に考えると⁷⁾、今回摂取したグロビン水溶液に含まれる各種のペプチドが、各組織中のACEを阻害することで血圧低下もしくは血圧上昇抑制効果に寄与したと考えられる (Fig. 1(D))。

3.2 血漿中カテコールアミン測定に対する麻酔薬の影響

イソフルラン麻酔時はウレタン麻酔時のカテコールアミンレベルと類似した傾向にあった。カテコールアミンの測定においてはその測定値が麻酔の影響を受けることが報告されており、特にウレタン麻酔が最適であることが報告されていたが、イソフルランの麻酔でもその差がないことを確認することができた。

3.3 血漿中カテコールアミンの濃度変化

血漿中のNEの濃度はEpiの濃度より高かった。NE・Epiともに、Normalのラットと比べ、SHRにフルクトースを摂取させたラットでは、低い数値を示した。また、グロビンを摂取させるとNEもEpiもさらに低下した (Fig. 2(A) (B))。

4. 要 約

過去の研究において、in vitro実験では食肉由来天然成分である、グロビントタンパク分解物には強いACE阻害活性があることが報告されていたが⁷⁾、本実験の結果より高血圧モデル動物の血圧

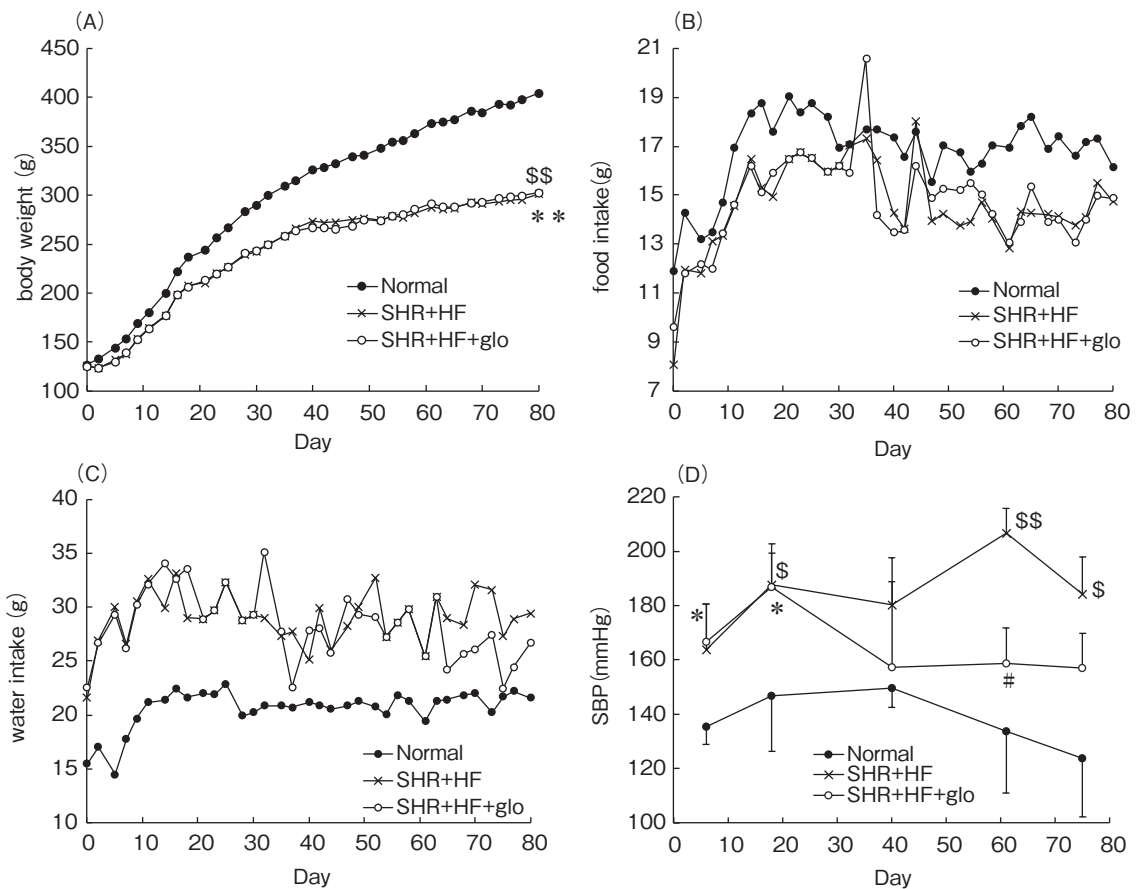


Fig. 1 Changes of body weight (A), food intake (B), water intake (C), and systolic blood pressure (SBP) (D). Significance : * $p < 0.05$ (Normal vs SHR + HF + glo), $^s p < 0.05$ (Normal vs SHR + HF), $^{ss} p < 0.01$ (Normal vs SHR + HF), and $^{\#} p < 0.01$ (SHR + HF vs SHR + HF + glo)

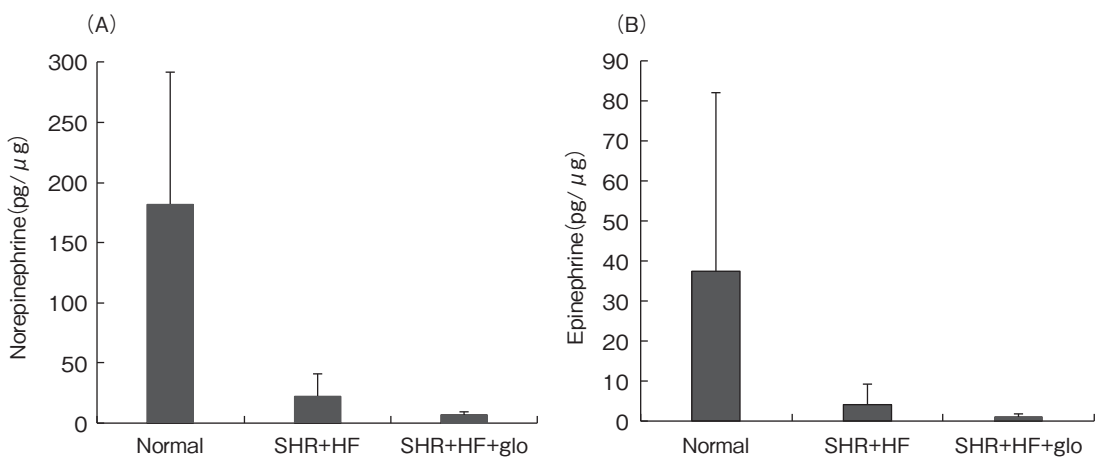


Fig. 2 Changes of serum catecholamine, norepinephrine (A) and epinephrine (B), concentrations after dissection

を低下させる作用を有することが明らかになった。さらに、カテコールアミンの測定から、NEとEpiの二種のホルモンの分泌を抑制することが明らかになった。カテコールアミンの血中レベルの上昇は血圧上昇につながることが分かっているが、高果糖食において、カテコールアミンの分泌が大きく抑制されることから、グロビンタンパク分解物の血圧への影響は、カテコールアミンの分泌に対する作用よりも、ACE阻害作用が主たる要因であることが示唆された。

謝 辞

本実験において、グロビンタンパク分解物をご提供いただいた、ILS株式会社様には深くお礼申し上げます。また、本実験を進めるにあたり、神戸女子大学大学院健康栄養学研究科、ならびに、神戸女子大学健康福祉学部健康スポーツ栄養学科の学生諸氏に多くの協力をいただいたことを深謝いたします。

文 献

- 1) 厚生労働省 平成26年(2014)患者調査の概況, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/14/index.html>, 閲覧日20180428.
- 2) 厚生労働省, 平成25年度 国民医療費の概況, <https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/k-iryohi/13/index.html>, 閲覧日20180428.
- 3) 松井利郎: レニン-アンジオテンシン系と血圧調節, 化学と生物, **53**, 228~235, 2015.
- 4) Maolin, T., Cong, W., Cheng, C., *et al.*: Identification of a novel ACE-inhibitory peptide from casein and evaluation of the inhibitory mechanisms, *Food Chemistry*, **256**, 98~104, 2018.
- 5) Adachi, Y., Yoshikawa, Y., Yoshida, J., *et al.*: Improvement of diabetes, obesity and hypertension in type 2 diabetic KKA^y mice by bis (allixinato) oxovanadium (IV) complex, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **345**, 945~950, 2006.
- 6) Yoshikawa, Y., Yasui, H.: Zinc complexes developed as metallopharmaceutics for treating diabetes mellitus based on the bio-medicinal inorganic chemistry, *Curr Top Med Chem*, **12**, 210~218, 2012.
- 7) 吉川豊, 糸井亜弥: 機能性畜産副生成物を用いた糖尿病合併症高血圧症の改善を目指した開発研究, 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **36**, 123~128, 2018.
- 8) 田嶋嘉雄編: 実験動物学各論, 朝倉書店, 東京, 1973.
- 9) Sasaki-Hamada, S., Okada, S., Ito, K., *et al.*: Immunohistochemical determination of the site of hypotensive effects of glucagon-like peptide-2 in the rat brain, *Neuroscience*, **212**, 140~148, 2012.

ファージおよび食品成分等による食肉の安全確保に関する研究

Study on ensuring the safety of meat by phage and food components

宮 本 敬 久

(九州大学大学院農学研究院)

Takahisa Miyamoto

(Faculty of Agriculture, Kyushu University)

Presence of Extended Spectrum Beta-Lactamase-producing *E. coli* (ESBLEC) in food is a risk to human health. From 9 meat samples, 10 lytic phages against ESBLEC isolates and enterohaemorrhagic *E. coli* were successfully isolated by using ESBLEC strains and enterohaemorrhagic *E. coli* as the hosts. The 10 purified phages were spotted onto double layer TSA embedded with each of the ESBLEC isolates for the determination of lytic spectra. Among the 10 phages, 2 phages showed the broadest lytic spectra against ESBLEC. Viable counts of ESBLEC in liquid medium with the phage cocktail reduced by 2 and 1.3 log CFU/ml at 25 and 5°C, respectively, after incubation for 6 h, compared to that of control without phage cocktail.

To identify the genes involved in phage resistance of bacteria, the phage sensitivity of single gene-deficient strain of *E. coli* was examined. As a result of screening using a 96-well plate, 10 strains including Δrpe strain showed strong phage sensitivity among the single gene-deficient *E. coli* strains tested. The time-dependent changes of the viable counts in the presence of the lytic phage, viable count of *E. coli* Δrpe was 4.7 log lower than that of the wild type *E. coli* after 12 h of cultivation. The viable count was 2.6 log lower even after 24 h of cultivation as compared with that of the wild type strain. The same tendency was also shown in the other 9 strains, suggesting that the inhibition of the function of these genes might suppress the growth of phage-resistant bacteria.

1. 目 的

腸管出血性大腸菌を原因とする食中毒は、ベロ毒素（VT）産生性大腸菌O157等により¹⁾、飲食チェーン店の食事（サイコロステーキ）や焼き肉、ユッケのような畜肉製品を原因として発生している。特に小児や高齢者は本菌の産生するVTの細胞毒性により溶血性尿毒症症候群などを発症

して重症化し、死亡することもある。さらにExtended Spectrum Beta-Lactamase (ESBL)-産生大腸菌など、広範な抗生物質に耐性な食中毒細菌の割合も増えてきており、感染者の治療において大きな問題となっているため抗生物質に依存しない食中毒細菌対策も必要とされている。この対策の一つの可能性としてファージがある^{2, 3)}。ファージは非常に特異性が高いので、一種の食中

毒細菌種についても菌株ごとにファージ感受性が異なることが多い⁴⁾。今後、加工食品のロングライフ化は進むと思われ、品質が高いことから特にチルド流通による加熱殺菌後の食品のロングライフ化が期待されている。このため、抗生物質耐性菌も含む主要な食中毒細菌の溶菌ファージの単離を行い、低温流通食品においても食中毒菌を制御可能な低温作用性のファージを見出す必要がある。さらにファージに対する耐性菌は細菌集団中に必ず少数存在するので、この制御のためには耐性化の機構解明が必要である⁵⁾。本研究ではファージに対する耐性菌発生の機構解明の糸口とするため、大腸菌の一遺伝子欠損株ライブラリーについてファージ感受性試験を行い、野生株よりも感受性の高い遺伝子欠損株の検索を行ってファージ耐性化に関与すると思われる遺伝子の同定を試みた。

2. 方 法

2.1 抗生物質耐性大腸菌溶菌ファージの分離および精製

福岡市内で購入した鶏肉および牛内臓を試料とした。試料50 gを1 mM CaCl₂含有LB培地200 mlと混合し、15 sec ストマッカー処理した。腸管出血性大腸菌O157:H7およびESBL産生大腸菌を含む宿主菌液各100 μ lをストマッカー袋に添加し、37℃で一晩振とう培養した。培養液10 mlを遠心分離(12,000 $\times g$, 4℃, 5 min)後、フィルターろ過(0.22 μ m)してファージ溶菌液を調製した。ファージ溶菌液10 μ lと前培養した宿主菌液100 μ lをマイクロ遠心管内で混合し、37℃で30 min培養した。これを、加熱溶解して50℃に保温したTop Agar 5 mlに全量混合し、1 mM CaCl₂含有TSA培地に重層し、37℃で一晩培養後、溶菌班の有無を確認した。調製したファージ溶菌液20 μ lをSM buffer 180 μ lで段階希釈し、希釈液

100 μ lと前培養した宿主菌液100 μ lを混合して37℃で30 min培養した。これを、上記と同様にし、プラークを形成させた。確認されたプラークを滅菌済みのメスで切り抜き、前培養した宿主菌液1 mlとともに1.5 mlチューブに加えた。十分にボルテックスした後に、37℃で一晩振とう培養し、ファージを増殖させた。培養液を遠心分離(12,000 $\times g$, 4℃, 5 min)後、フィルターろ過(0.22 μ m)して溶液を回収した。これを3回繰り返してファージの純化を行った。純化したファージ保存液は4℃で保存した。

2.2 ファージの抗菌試験

1 mM CaCl₂含有LB培地4.8 mlに前培養した菌液100 μ lおよびファージ保存液100 μ lを加え、宿主菌の至適生育温度、5℃および25℃で振とう培養した。各培養時間にサンプリングを行い、PBS bufferで希釈した後に1 mM CaCl₂含有TSA培地に塗布した。37℃で一晩培養し、形成したコロニー数をカウントして生菌数を算出した。

2.3 ファージ耐性化に関与する遺伝子の同定

E. coli BW25113 (野生株, WT) および *E. coli* BW25113 単一遺伝子欠損株3,909 菌株は国立遺伝学研究所から購入した。この欠損株は、大腸菌のすべての遺伝子のうち非必須遺伝子をノックアウトした生育可能変異株である。1 mM CaCl₂含有LB培地200 μ lを添加した96ウェルプレートに、爪楊枝を用いて野生株と欠損株を播種し、37℃で2 h 振とう培養した。ファージ10 μ lを添加し、37℃で48 h 振とう培養して濁度を0, 6, 48 hに測定した。二次スクリーニングでは、一次スクリーニングにおいて48 hに野生株と比較して濁度が低かった欠損株について、初発菌数を10⁸ CFU/mlにそろえ、1 mM CaCl₂含有LB培地200 μ lを添加した96ウェルプレートに菌液10 μ lを播種し、10倍希釈したファージ保存液10 μ lを添加して37℃で48 h 振とう培養した (n = 3)。濁度を0, 6,

24, 48 h に測定して菌の増殖を調べた。

3. 結果と考察

3.1 抗生物質耐性大腸菌溶菌ファージの分離・精製

福岡市内で購入した生肉を9試料から、腸管出血性大腸菌およびESBL産生大腸菌を宿主として10種のファージが分離された (Table 1)。このうちの2種は宿主特異性が広く、ESBL産生大腸菌を広く溶菌した。

3.2 分離ファージの低温下での溶菌効果

広い宿主域を示したPBL66-1およびPBL116-1のファージ混合液を用いて、25℃および5℃におけるESBL産生大腸菌に対する効果を調べた結果をFig. 1に示す。25℃の培養ではESBL産生大腸菌の生菌数は初発菌数に比べて2 h後に2桁低下したが、その後ファージ無添加と同程度の生育速度で増殖した。これに対して5℃の培養ではESBL産生大腸菌の生菌数は2 h後に1.0桁、4 h後に1.3桁、6 h後に1.3桁、24 h後に2.2桁低下した。

3.3 ファージ耐性化に関与する遺伝子の同定

ファージを添加して培養48 h後に野生株と比較して濁度が低かった欠損株は3,909欠損株のうち211株であった。ファージ感染により野生株と異なる挙動を示した計211欠損株について二次スクリーニングを、初発菌数 10^8 CFU/ml、ファージの力価 10^9 PFU/mlに調整して行った。この結果、10欠損株において、ファージ添加した場合、野生株と比較して培養48 h後の濁度が低かったことから、これらはファージ耐性が低い可能性が示された。しかし、さらに培養を継続すると野生株と同程度まで濁度が増加したことから、完全に耐性化が抑制されていないことが示された。この中で*rpe*欠損株についてファージ添加後の生菌数の変化を測定した結果をFig. 2に示す。*rpe*欠損株は培養6 h後および12 h後において生菌数が約 10^3

Table 1 Host range of isolated phages against ESBL-producing *E. coli*

Phage	ESBL-producing <i>E. coli</i> isolate																				No. of infected isolate (%)							
	TEM group					SHV group					CTX-M1 group											CTX-M2 group			CTX-M9 group			
	5	31	36	95	100	139	64	66	81	88	108	138	29	40	42	45	50	65	126	134		145	9	98	129	33	110	116
PBL42-1	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5/27 (18.5)
PBL33-1	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	3/27 (11.1)
PBL9-1	±	-	-	-	-	+	±	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	9/27 (33.3)
PBL66-1	+	-	±	+	±	-	±	+	+	±	±	±	+	-	-	+	+	±	+	-	-	±	+	-	±	±	+	21/27 (77.7)
PBL42-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2/27 (7.4)
PBL5-1	+	±	±	-	-	-	±	-	-	-	±	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	10/27 (37)
PBL126-1	-	±	-	-	+	-	-	-	-	+	±	±	-	±	±	-	-	-	+	-	-	±	-	-	±	-	+	10/27 (37)
PBL42-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	±	±	-	-	±	+	-	-	-	+	-	-	±	-	-	-	-	+	6/27 (22.2)
PBL33-2	-	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	5/27 (18.5)
PBL116-1	+	±	±	-	+	-	+	+	±	+	+	+	±	-	-	+	+	-	+	+	-	±	±	±	+	-	+	20/27 (74)

(+) : Strong lysis, (±) : Weak lysis, (-) : Non-lysis

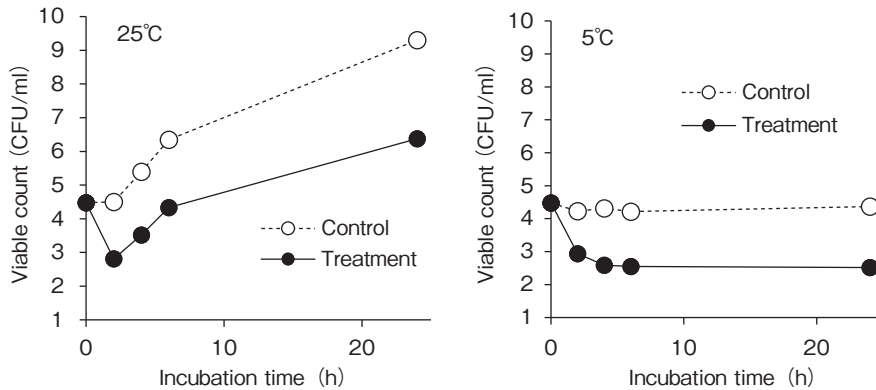


Fig. 1 Effects of phage cocktail on viability of ESBLEC isolate at different temperature

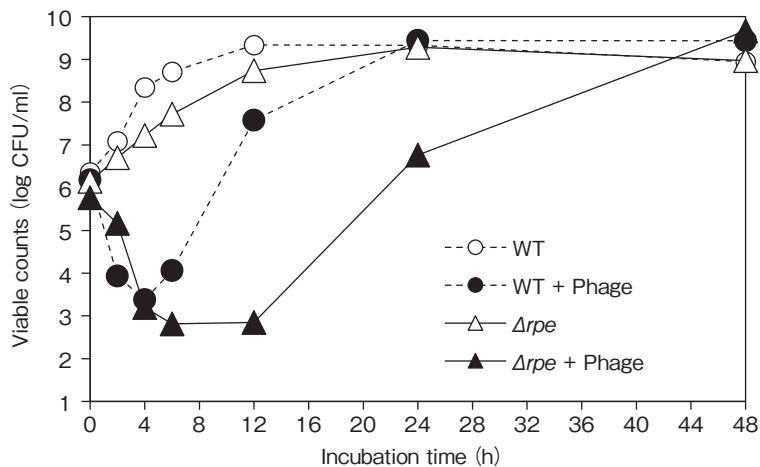


Fig. 2 Effects of phage S127 on viability of *E. coli* wild type and *rpe* deletion mutant

CFU/mlと最も減少し、野生株のファージ処理群と同程度まで溶菌された。その後、生菌数は増加し、48 h 後には野生株と同程度まで増加した。*rpe*欠損株にファージを感染させた場合、6 h 後から12 h 後において生菌数の増加がみられなかったことからファージ耐性菌の生育が遅延したことが考えられる。*rpe*は解糖系の側路であるペントースリン酸回路において、リブロース5リン酸をキシルロース5リン酸に変換するD-リブロース-5-リン酸3-エピメラーゼをコードする遺伝子であり、この回路はNADPHのような還元物質の産生に重要である⁶⁾。*rpe*の欠損により、ペントース

リン酸回路が機能せず、その結果、大腸菌の生育が悪くなることが報告されている⁷⁾。したがって、*rpe*欠損はファージ耐性菌の生育にはペントースリン酸回路が非常に重要であると考えられる。

細菌におけるファージ防御機構としてはすでにいくつかの説が報告されているが、未知の部分が多い。その一つは、菌細胞表面に存在するファージ受容体の欠損によりファージが細菌に吸着できなくなり、細菌がファージ耐性を獲得する防御機構である⁸⁾。単一遺伝子の欠損によりファージ受容体の欠損を阻害できれば、細菌のファージ耐性化の一部が制御可能になると考えられる。他の防

御機構として、獲得免疫機構であるCRISPR/Casシステムがあげられる。CRISPR/Casシステムは、ファージゲノムのような外来性遺伝子が菌体内に侵入すると、その一部を切り出して記憶し、外来性遺伝子の再侵入時に切断する機構であり、細菌のファージ感染への抵抗性に関与していることが報告されている⁹⁾。このCRISPR/Casシステムに関与する遺伝子として*cmr*遺伝子がある。しかし、*cmr*遺伝子の欠損株に対しファージを感染させたところ、感染後6 h後において濁度の減少がみられたものの、感染後48 h後において濁度は大きく増加した。このことから、CRISPR/Casシステム関与遺伝子の単一欠損ではファージ耐性化を阻害することはできないと考えられた。その他の防御機構として、細胞外マトリックスを産生してファージと受容体との結合を物理的に阻害する機構、ファージDNAの侵入を阻害する機構、細胞内に侵入したファージゲノムを切断する機構（制限修飾系）、細胞集団を守るためファージ感染菌が自殺する機構などがある⁵⁾。少なくともこれらの防御機構が十分には機能せず、ファージによる溶菌後の耐性菌の生育が抑制された欠損株が10欠損株であると考察される。今回の実験では単一遺伝子欠損株を使用した、ファージ感受性向上に関与したこれらの遺伝子を組み合わせた複数遺伝子欠損株を作成してファージ耐性を調べることで、ファージ耐性の機構が明らかになると期待される。

4. 要 約

腸管出血性大腸菌およびESBL産生大腸菌を宿主として10種のファージが分離された。このうちの2種は宿主特異性が広く、ESBL産生大腸菌を広く溶菌した。広い宿主域を示した2種のファージ混合液を用いて調べた結果、25℃の培養ではESBL産生大腸菌の生菌数は初発菌数に比べて2

h後に3.4桁低下したが、その後増加した。これに対して5℃ではESBL産生大腸菌の生菌数は2 h後に1.0桁、4 h後に1.3桁、6 h後に1.3桁、24 h後に2.2桁低下し、低温でも感染し、ファージの増殖可能な温度に達した場合に溶菌することが示された。大腸菌の単一遺伝子を欠損させた3,909株のうち10欠損株において、ファージ添加した場合、野生株と比較して培養48 h後の濁度が低かったが、さらに培養後には野生株と同程度まで生育した。これらの10欠損株はファージ耐性が低い可能性が示された。これらの遺伝子の機能を解明し、その機能を抑制することで細菌のファージ耐性化を抑制できると期待される。

文 献

- 1) Paton, J. C., Paton, A. W. : Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections, *Clinical microbiology reviews*, 11 (3), 450 ~479, 1998.
- 2) Brovko, L. Y., Anany, H., Griffiths, M. W. : Chapter 6 - Bacteriophages for Detection and Control of Bacterial Pathogens in Food and Food-Processing Environment, In Jeyakuma Henry, *Advances in Food and Nutrition Research*, pp. 241-288, Academic Press, 2012.
- 3) Hagens, S., Loessner, M. J. : Bacteriophage for biocontrol of foodborne pathogens : calculations and considerations, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11 (1), 58~68, 2010.
- 4) Ackermann, H. : Phage Classification and Characterization, In Clokie, M. J., & Kropinski, A., pp. 127-140, Humana Press, 2009.
- 5) Labrie, S. J., Samson, J. E., Moineau, S. : Bacteriophage resistance mechanisms, *Nature Reviews Microbiology*, 8, 317~327, 2010.
- 6) Zaigao, T., Jing, C., Xueli, Z. : Systematic engineering of pentose phosphate pathway improves *Escherichia coli* succinate production, *Biotechnology for Biofuels*, 9, 262, 2016.
- 7) Lyngstadaas, A., Sprenger, G. A., Boye, E. : Impaired growth of an *Escherichia coli* rpe mutant lacking ribulose-5-phosphate epimerase activity, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1381, 319~330, 1998.
- 8) Hashemolhosseini, S., Holmes, Z., Mutschler, B., Henning, U. : Alterations of receptor specificities of coliphages of the T2 family, *Journal of Molecular Biology*, 240, 2, 105~110, 1994.

-
- 9) Barrangou, R., Fremaux, C., Deveau, H., Richards, M., Boyaval, P., Moineau, S., Romero, D. A., Horvath, P. : CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*, **315**, 5819, 1709～1712, 2007.

薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌機構解明に向けた分子論的アプローチ

Analysis of disinfection mechanisms of drug-resistant bacteria by gas plasma using molecular theoretical approach

作 道 章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 and Tatsuya Misawa²

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

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

We previously demonstrated that gas plasma is effective against both drug-resistant and non-resistant bacteria in a study using *Escherichia coli* transformed with a plasmid encoding an ampicillin-resistant gene and treated with a dielectric barrier discharge (DBD) plasma torch. In the present study, we further investigated the mechanisms by which the DBD plasma torch disinfects drug-resistant and non-resistant bacteria. A DBD plasma torch was applied to suspensions of *E. coli* transformed with a chloramphenicol acetyltransferase (CAT)-expressing plasmid and cultured in ampicillin-containing or non-drug containing medium. The results showed that CAT was reduced under both conditions in a time-dependent manner, suggesting that the gas plasma similarly inactivated proteins in both *E. coli* suspensions. Electron spin resonance spectroscopy has shown that the plasma torch generates reactive chemical species, including hydrogen radical ($H\cdot$) and hydroxyl radical ($OH\cdot$), which may contribute to the inactivation of proteins. Taken together, these findings suggest that the protein inactivation, possibly due to oxidation by reactive chemical species, may at least in part contribute to the mechanism of action of gas plasma. Consequently, the mechanism of inactivation 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、サルモネラなどの細菌の薬剤耐性化が世界的問題となっている。例えば、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)}。また、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。

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、サルモネラを含むさまざまな細菌の殺菌に成功した^{4~6)}。さらに、大気圧プラズマトーチを用いて薬剤耐性菌と非耐性菌

のガスプラズマ感受性が同じであることを明らかにした⁷⁾。

一方、ガスプラズマによる殺菌メカニズムにはいまだ不明な部分が多く、ガスプラズマ発生時に起こる種々の物理および化学過程は十分には解明されていない。そのようななか、分光技術の発展により、物理化学反応メカニズムの解明への分子論的アプローチが活発化しつつあることに着目した。本研究では、まず大気圧プラズマトーチにおけるガスプラズマの反応過程を電子スピン共鳴 (ESR) により分子レベルで解析を行った。さらに、ガスプラズマが菌体にどのように反応するかを理解し、ガスプラズマによる殺菌メカニズムを明らかにする目的で、ガスプラズマ処理によりもたらされる菌のタンパク質成分の変化を生化学解析した。

2. 方 法

2.1 大気圧プラズマトーチと大腸菌 *Escherichia coli* のガスプラズマ処理

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10kV、周波数10kHzの高周波パルスを印加し、誘電体バリア放電 (DBD: Dielectric barrier discharge) によるガスプラズマを発生させた。生成したガスプラズマは、エアーポンプ (水作: 水心SSPP-2S) を用いて筒先端から3.5L/minの流量で放出させた。*E. coli* サンプルは時計皿上に20 μ L滴下し、筒先端までの距離を20mm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 *E. 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、アンピシリン耐性遺伝子と Chloramphenicol acetyltransferase (CAT) 遺伝

子を持つプラスミドである pPRO-EX-HT-CAT (Life Technologies) をトランスフォーメーション後にアンピシリン (50mg/L) を含むLB (Luria Broth) 寒天培地でセクションを行い、出現したコロニーをピックアップ後にアンピシリン (50mg/L) を含むLB液体培地もしくはアンピシリンを含まないLB液体培地中で37℃、24時間培養して得られた *E. coli* を使用した。

2.3 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。

2.4 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

CAT ELISA (CAT No. 11 363 727 001, Roche) を用いて、インストラクションに従いCATの定量を行った。

2.5 電子スピン共鳴 (ESR)

ラジカル捕捉剤として、DMPO (5,5-Dimethyl-1-pyrroline *N*-oxide) (京都スピンラボ) を使用した。まず、2.0mlのマイクロチューブ中に1.0mlの100mM DMPO溶液を調整し、そこに溶存酸素を除去するためにエアーポンプを用いて5分間窒素ガス (流量1.0L/min) でバブリングした。その後、大気圧プラズマトーチの筒先端から100mM DMPOの液体表面との距離を10mmに保ちプラズマ処理 (窒素ガス流量1.0L/min) を行った。プラズマ処理後のDMPO溶液からヘマトクリット管を用いて一部を採取し、これを石英管の上に置き、ESR分光計 (TE-100, 日本電子株式会社) で測定した (測定条件: マイクロ波周波数9.428GHz, 掃引時間60秒, 磁場335.6 $\pm$ 5.0mT, 変調幅0.10mT, 変調周波数100kHz, 時定数30msec, 検出器ゲイン125~500)。ESR信号の強度を比較するために、Mn (II) イオンを酸化マグネシウムの結晶にドープした外部標準試料 (ESRスペクトルの左右両側に観測される2本の信号) を使用

し、そのESRキャビティー内への挿入位置の制御には日本電子株式会社製のデジタルマンガンマーカ―を使用した。これらのシグナルを用いて g 値の推定を行った。

2.6 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。なお、数値は平均 $\pm$ SEM (standard error of the mean) で表示した。

3. 結果と考察

まず、ガスプラズマ処理が *E. coli* の構成成分に与える影響を明らかにするために、CATを発現するプラスミドをトランスフォーメーションしたDH5 α に対して大気圧プラズマトーチを用いた処理を行った後、ELISAによりCATの定量を行った。

具体的には、まず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寒天培地で一晚セクション後、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。それらから回収したDH5 α に対して大気圧プラズマトーチを用いた処理を行った。そうして得られたDH5 α ペレット中のCATの量をELISAにより定量した結果、プラズマ処理によりいずれのDH5 α でもCATが減少し、pPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーション・セクションしたDH5 α をアンピシリン非含有LB液体培地で培養したものはガスプラズマ処理前 (0 min) のCAT量は $0.3961 \pm 0.0182 \text{ ng/ml}$ (0min) であったのに対し、1 minのプラズマ処理により $0.0344 \pm 0.0004 \text{ ng/ml}$ へと、2 minのプラズマ処理では $0.0339 \pm 0.0004 \text{ ng/ml}$ へと有意にCAT量が減少した (Fig. 1)。また、pPRO-EX-HT-CATをトランスフォーメーション・セクションしたDH5 α をアンピシリン含有LB液体培地で培養したものについても $3147.7302 \pm 224.9762 \text{ ng/ml}$ (0min) と $0.0325 \pm 0.0001 \text{ ng/ml}$ (1min) および $0.0335 \pm 0.0009 \text{ ng/ml}$ (2min) であり、いずれの時間においても0 minと比較して有意なCATの減少が観察された (Fig. 2)。

次に、大気圧プラズマトーチにおけるガスプラズマの反応過程を調べるため、ESRを用いて解析

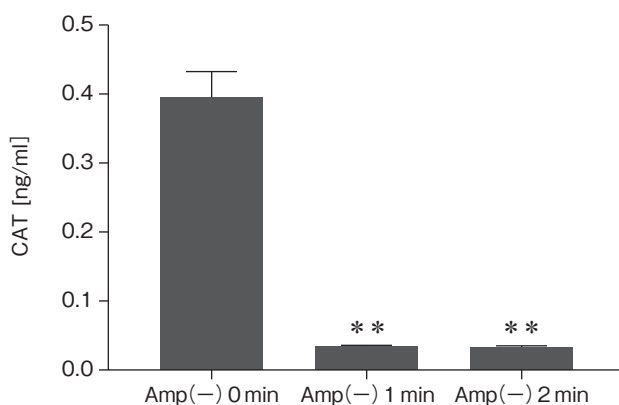


Fig. 1 *E. coli* cells transformed with pPRO-EX-HT-CAT and selected in ampicillin-containing LB agar were proliferated in non-drug-containing LB liquid medium (Amp(-)) and then subjected to plasma torch treatment for 0-2 min. The quantities of CAT in the cells were subsequently measured by CAT ELISA. ** $p < 0.01$ (vs 0 min).

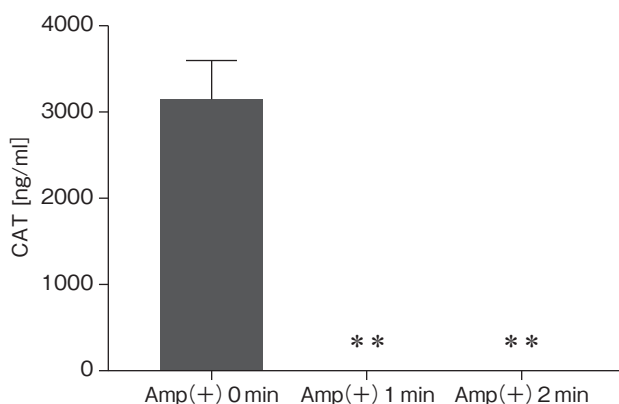


Fig. 2 *E. coli* cells transformed with pPRO-EX-HT-CAT and selected in ampicillin-containing LB agar were proliferated in ampicillin-containing LB liquid medium (Amp(+)) and then subjected to plasma torch treatment for 0–2 min. The quantities of CAT in the cells were subsequently measured by CAT ELISA. ** $p < 0.01$ (vs 0 min).

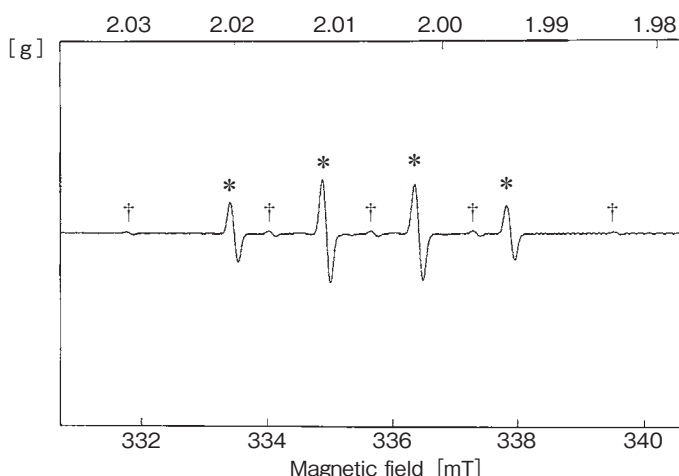


Fig. 3 Electron spin resonance spectroscopy (ESR) detected radicals generated during DBD plasma torch operation. ESR spectra of spin adducts in aqueous solutions irradiated using a DBD plasma torch with nitrogen at 1.0 L/min for 10 min after bubbling with nitrogen gas. ESR spectrum of DMPO shows a 1 : 2 : 2 : 1 quartet of DMPO-OH (*) and several other small peaks due to DMPO-H (†).

を行った。大気圧プラズマトーチによって生成されたフリーラジカルを検出するために、ラジカル捕捉剤DMPOを用いてESRの測定を行った。得られたESRスペクトルを見ると、信号強度比が1 : 2 : 2 : 1の4本線の強い信号が主成分であり、この他に弱い信号（見かけは5本、実際は9本）が観測された。解析の結果、前者はDMPOの2位にOHラジカルが付加したDMPO/OHラジカル

であり、後者は、DMPOの2位に水素原子が付加したDMPO/Hラジカルと帰属された。これらの結果より、プラズマ照射によりOHラジカルやHラジカルが水中で生成したものと考えられた (Fig. 3)。

本研究により、ガスプラズマ発生に伴い、OHラジカルやHラジカルが発生することが確認された。さらに、ガスプラズマ処理後の*E. coli*のCAT

を定量した結果、経時的にCATが減少することが明らかとなった。これらの結果より、ガスプラズマは活性種（ラジカル等）の効果で酸化ストレス作用をもたらしてタンパク質を不活化し、殺菌作用を示したものと考えられた。しかし、OHラジカルとHラジカルはタンパク質以外にもさまざまな化学物質と反応して酸化生成物を変換する可能性がある。したがって、これらのラジカルによりタンパク質以外のどのような菌体構成成分の変化も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より明確化するものと考えられる。

4. 要 約

これまでに、大気圧プラズマトーチを用いた解析で、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ている。本研究では、その殺菌メカニズムを明らかにするため、ELISAによる菌体タンパク質の定量とESRによるガスプラズマ成分の解析を行った。その結果、CATがガスプラズマ処理により減少することとガスプラズマ中にはOHラジカルやHラジカルが含まれていることが分かった。これらのことから、OHラジカルやHラジカルなどの活性種がタンパク質に作用して、菌を殺菌した可能性が考えられた。一方で、活性種はタンパク質以外の成分にも作用する可能性があるため、他の菌体成分の解析も必要と考えられた。タンパク質の変化などこれまで明らかとなったガスプラズマ処理による菌体成分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 slaughtering plants, *J. Food. Prot.*, 62(2), 140～145, 1999.
- 4) Shintani, H., Sakudo, A. : *Gas Plasma Sterilization in Microbiology : Theory, Applications, Pitfalls and New Perspectives*, Caister Academic Press, Poole, UK, 2016.
- 5) Sakudo, A., Shintani, H. : *Sterilization and disinfection by plasma : Sterilization mechanisms, biological and medical applications*, NOVA Science Publishers, Hauppauge, New York, 2011.
- 6) 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.
- 7) 作道章一，山城梨沙，三沢達也：薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌効果とメカニズム解析，平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，公益財団法人伊藤記念財団，36，3～7，2018。
- 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.

電気定数測定に基づく食肉の鮮度評価

Evaluation of meat freshness based on measurement of its electrical properties

齊 藤 一 幸

(千葉大学フロンティア医工学センター)

Kazuyuki Saito

(Center for Frontier Medical Engineering, Chiba University)

The author has been studying biological tissue characterization by the electromagnetic field. Possibilities of characterization depends on frequency of the electromagnetic field. For example, aspect of cells in the biological tissue can be observed by mm wave (around several tens of GHz or higher). However, it is not easy to realize, because it must be employed several expensive devices and is needed high precision measurements. Therefore, in this study, the electric current around several hundreds kHz is injected into the biological tissue and relative permittivity and conductivity of the tissue are derived. From measured relative permittivities and conductivities of the tissues, it has found that these values depend on their freshness. Therefore, it is considered that the meat freshness can be estimated by many measured results under various conditions. Moreover, in this study, simplify of the measurement have also been studied. At this time, the relative permittivity and the conductivity of the tissue which is filled into an acrylic cylinder have been measured. In order to simplify the measurement, measurement system without the acrylic cylinder has been investigated by use of numerical computations. In this case, using the various shapes of a pair electrodes can be considered. As a result, possibilities of the measurement simplification could be found. As a further study, more simplified electrodes should be investigated and the freshness of the meat should be measured by the simplified measurement system.

1. 目 的

本研究では、食肉の新鮮度をその電気定数に基づいて、簡便かつ高速に測定可能な装置を開発するための基礎検討を行う。今日、例えば、我々が個人で食肉の鮮度を判断するには、色、硬さ、においといった情報を判断基準に用いる。しかしながら、これらの“パラメータ”は、感じ方に個人差

があることは言うまでもなく、また、これらを判断するには、多少なりとも経験が必要である。

ところで、筆者らのこれまでの経験によれば、動物性食品の電気定数（誘電率・導電率）は、鮮度が落ちる、すなわち、生産から日数が経つにつれて大きく変化することが分かった。この現象は、数kHz～数十MHzのHigh Frequency（HF）帯程度の周波数帯で顕著に観測されるものの、そ

れよりも高い、例えばマイクロ波帯では観測できない。これは、こういった高周波数帯では、そのエネルギーが電流ではなく電磁波として物質中を伝搬するため、上記のような細胞状態の変化に応じた電気定数変化は現れないと考えられるためである。なお、類似の考えにより、過去には魚肉の鮮度とそのインピーダンスの関係が議論されている^{1, 2)}。しかしながら、こういった研究は少数であり、また、食肉に関する研究も筆者が知る限りごく少数しか行われていないようである³⁾。

上記のように、電気定数測定により鮮度判定ができれば、色、硬さ、においといったような感じ方に個人差が大きいパラメータに基づく必要がなくなり、非常に有用であると考えられる。なお、こういった測定システムでの鮮度判定を実現するには、さまざまな種類の食肉においてさまざまな状態（鮮度）での電気定数測定を行い、それらのデータを蓄積する必要がある。しかしながら、現時点で、HF帯における電気定数測定は容易ではない。筆者らが所有する測定器では、直径および長さがともに数cmのサンプルホルダに、被測定物を隙間なく充填した後、サンプルホルダ両端に装荷された電極間のインピーダンスをLCRメータで測定し、それを誘電率・導電率に変換する。したがってこの測定の過程では、被測定物を“破壊”しなければならず手間も多い。そこで本研究では、HF帯における電気定数測定用の簡易な電極、すなわち、食肉の簡易な鮮度測定システムの開発を目指して、その基礎的検討も行った。

2. 方 法

まず、食肉電気定数の鮮度依存に関する測定を行う。測定対象として、新鮮な豚レバーを選択した。豚レバーは、安価かつ入手しやすく、また、鮮度の低下が見た目でも分かりやすいため選択した。測定サンプルは、比較的室温の高い計算機室

内に食品用プラスチックラップに包んで放置し、毎日1回、電気定数の測定を行ってその経日変化を記録した。通常、食肉は冷蔵庫内で保存されることが多い。したがって本研究での測定は、一種の加速試験と考えられる。

測定サンプルは、測定のたびごとに直径30mmの亚克力円筒に隙間なく充填し、その両端に銅板の円形電極を配置した。試料からは時間経過によってドリップが発生し、組織の体積が縮小したため、異なる長さの亚克力円筒を用意し、測定ごとに小型のものへ試料を移し替えることで電極間が常に試料で満たされるようにした。なお、これらの試料は、同一の豚肝臓よりトリミングした4片である。

試料はLCRメータ（Waynee Kerr Electronics社製 6530 B）に接続し、2端子法により電極間のインピーダンスを測定した（Fig. 1）。測定周波数は100kHzである。そして、その結果から試料の比誘電率・導電率を算出した。また、被測定対象が置かれていた部屋の室温を同時に記録した。

以上により収集した電気定数測定結果を経日変化としてまとめ、鮮度が劣化する過程で、どのように測定結果が変化するかを見出す。この結果を用いれば、鮮度が未知の食肉であっても、その電気定数を測定することで、生産からの日数を割り出すこともできる。

次に、本研究では、測定システムの簡素化を目指す。現行の測定システムでは、被測定物を両端に電極が装荷されたサンプルホルダ（Fig. 1）に隙間なく充填しなければならないため、侵襲的であり、どこでも手軽に扱えるというものではない。そこで本研究では、被測定物に接触するだけでその電気定数測定を行うことができる電極構造を明らかにする。被測定対象の電気定数は、マイクロ波のような高い周波数帯では、信号を電磁波として考えるため、同軸型プローブを被測定対象

に接触させ、そこからの反射信号を解析することで、物質の電気定数を知ることができる⁴⁾。これに対して、本研究で測定を行うマイクロ波帯よりも低い周波数帯のHF帯においては、被測定物に一对の電極を密着させ電流を注入し、電極間の電圧と電流の大きさ、およびそれらの位相差によって電気定数を決定する。したがって、サンプルホルダを必要とせず、かつ、被測定対象に確実に電流を注入できる電極構造を見出さなければなら

い。そこで本研究ではその初期段階として、肉塊（被測定物）に電極を刺入しただけの簡単な構造で、そのインピーダンス測定が可能かどうかを数値電磁界解析によって検討した。

3. 結果と考察

Fig. 1 に、サンプルホルダに被測定対象を充填し、LCRメータにてその電気定数を測定している様子を示す。この測定では、測定時に配線の影響

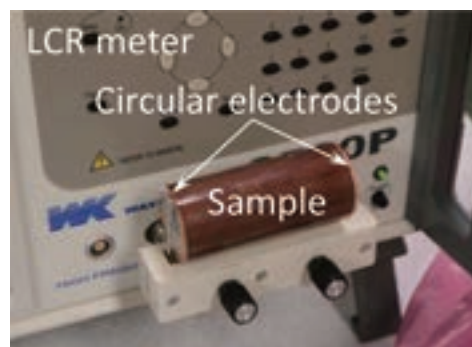


Fig. 1 Measurement of electrical properties by LCR meter

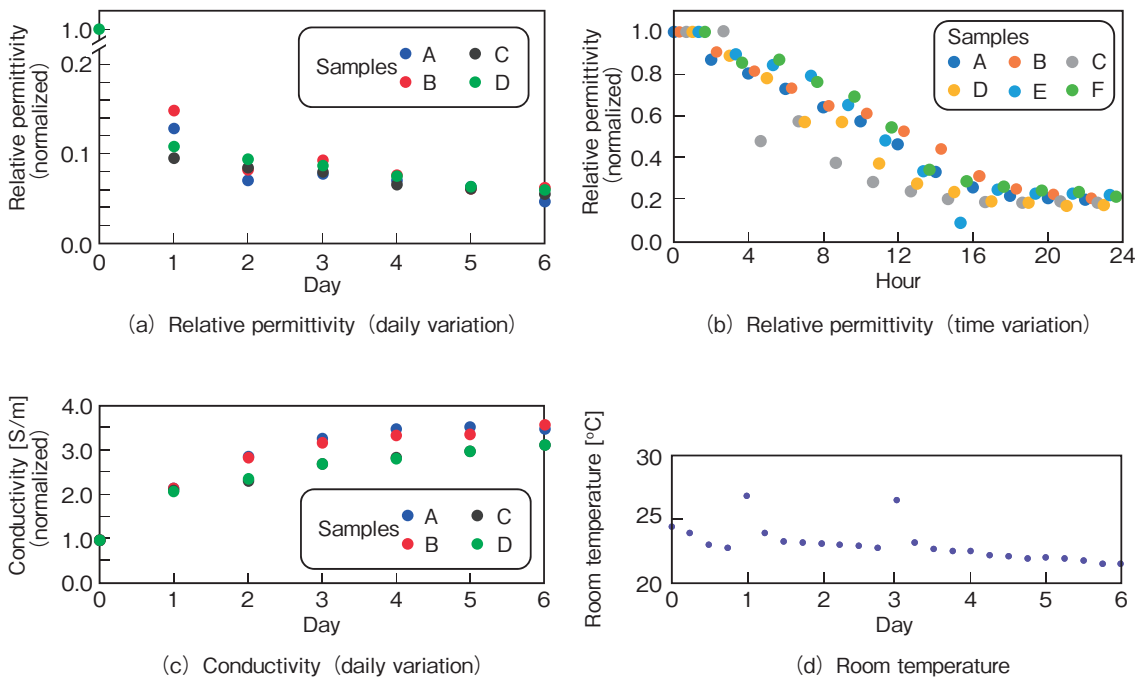


Fig. 2 Measured electrical properties and room temperature

が現れないよう、サンプルホルダに装荷した円形電極とLCRメータ本体は可能な限り近接させて接続した。Fig. 2 に、測定結果を示す。Fig. 2(a), (c) はそれぞれ、比誘電率、導電率の経日変化である。これらの値は、初回の測定値を1.0として規格化した。Fig. 2(d) は、測定サンプルを放置した部屋の室温の経時変化であり、室温は約21~27℃程度であった。Fig. 2(a) より、比誘電率は、測定開始後1日で急激に低下し、さらにその後、ゆっくりと低下傾向を示すことが分かった。そこで、Fig. 2(b) には、この測定開始後24時間の比誘電率測定結果を示した。この測定では、被測定対象の電気定数変化を確実に捉えるため、サンプル数を同図(a)よりも増やした。一方、導電率は、測定開始から5日間ほど上昇し、その後は、大きく変化しないことが分かった。2節で述べたように、被測定サンプルは室温中に放置しているため、一種の加速試験と考えられる。したがって通常の冷蔵保存であれば、この急激な比誘電率変化は数日間をかけて生じる現象であると考えられる。この点については、今後、さらなる検討が必要であると考えている。一方、導電率は、測定開始後に徐々に値が上昇するものの、その時間上昇率はそれほど大きくないため、この試料の場合は、比誘電率変化の方が鮮度測定に適していると考えられる。これらの変化は、被測定対象の品質劣化によって、それを構成する細胞膜が破れ、その結果として細胞での静電容量が低下するためであると考えられる⁵⁾。

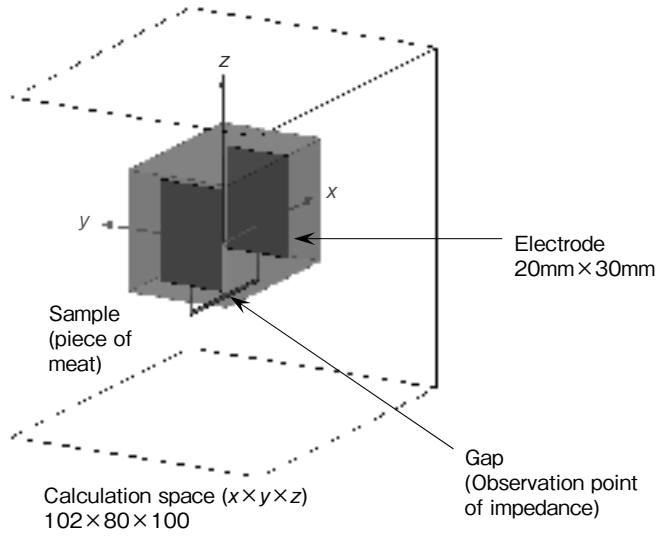
次に、HF帯における電気定数測定用の簡易な電極を開発するための基礎検討に関する結果を示す。Fig. 3(a) に、この検討に用いた数値電磁界解析モデルを示す。このモデルでは、一対の方形電極を肉塊に刺入し、それらの電極に接続した導線のギャップ部分でのインピーダンスを測定する。数値電磁界解析には、FDTD(finite difference

time domain : 有限差分時間領域) 法⁶⁾を用いる。この手法は、今日、多種多様な数値電磁界解析に用いられる方法である。Fig. 3(a) に示すギャップ部分に、同図(b) に示すガウシアンパルス電圧を印加し、その時に流れる電流で除し、さらにこれをフーリエ変換することで、電極間のインピーダンスを算出することができる。Fig. 3(c) は、肉塊の電気定数を“ $\epsilon_r=5,000$, $\sigma=0.5$ S/m”および“ $\epsilon_r=5,000$, $\sigma=1.0$ S/m”に設定した際の電極間のインピーダンス計算結果である。周波数が2 MHz程度以下の場合に、肉塊の電気定数が変化することによって、電極間のインピーダンスも有意に変化することが分かる。したがって、この程度の周波数の信号を電極間に印加することによって、肉塊の電気定数変化、すなわち鮮度の測定が可能であると考えられる。

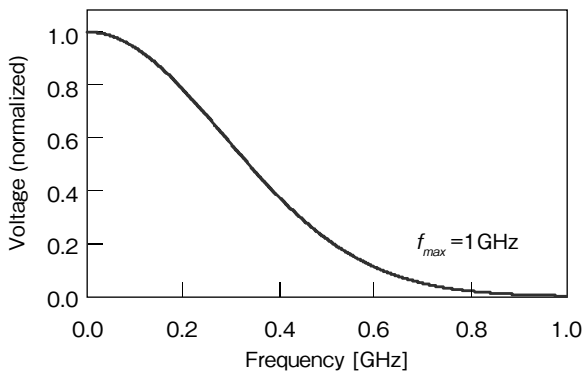
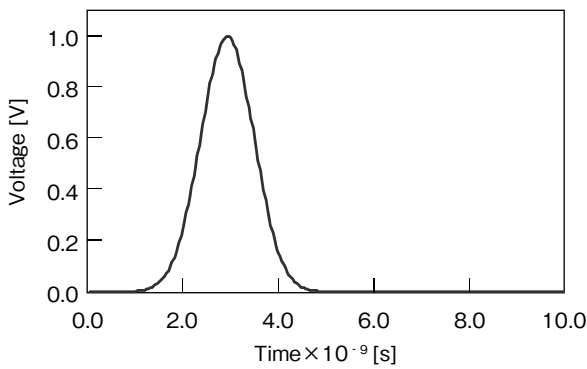
そこで、周波数を1 MHzに設定し、電極間の肉塊の電気定数をさまざまに変化させた場合の電極間インピーダンス計算結果をFig. 4 に示す。ここで、Fig. 4(a), (b) はそれぞれインピーダンスの実部、虚部である。この結果より、肉塊の電気定数が変化すると、電極間のインピーダンスも大きく変動することが分かる。特に、この場合には、インピーダンス虚部が、肉塊の ϵ_r と σ の双方の変化を反映している。したがって、Fig. 1 に示すように被測定対象をサンプルホルダに充填することなく、その電気定数(鮮度)を評価できる可能性があることが分かった。

4. 要 約

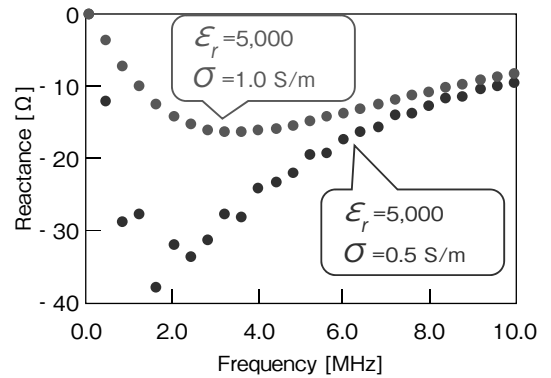
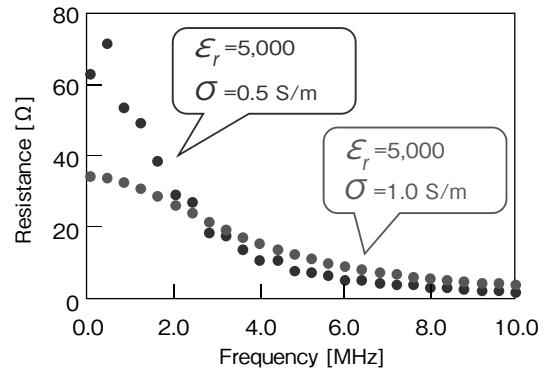
本研究では、食用の豚レバーの鮮度をその電気定数を測定することで推定できる可能性があることを見出した。すなわち、鮮度が低下するとその電気定数が変化するため、この変化の度合いに応じて、鮮度を定量的な物理量として定義することが可能である。本研究ではさらに、測定方法の簡



(a) Calculation model



(b) Input signal



(c) Calculated input impedance

Fig. 3 Calculation model and results

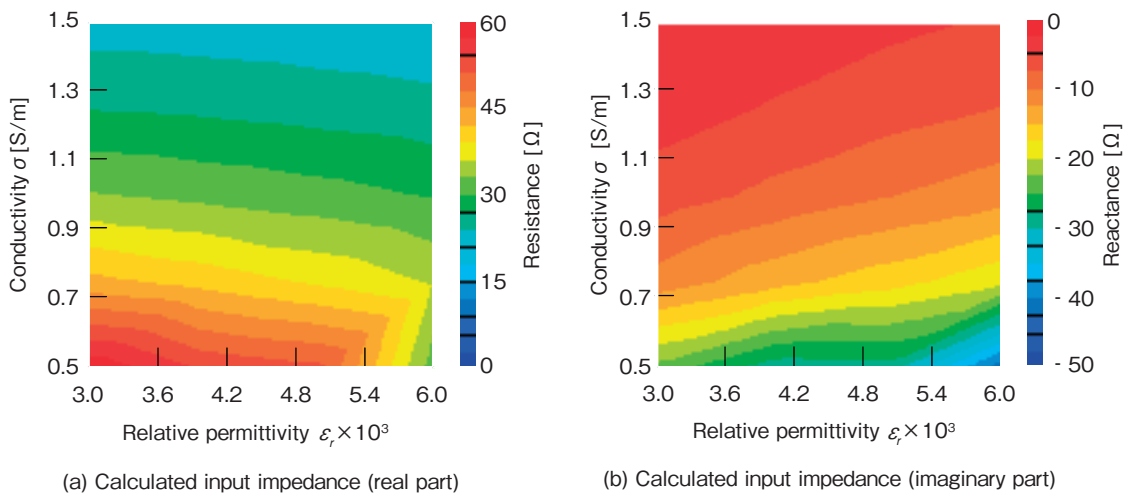


Fig. 4 Calculated input impedance under various electrical properties

易化についても検討し、従来のように被測定物をサンプルホルダに充填しなくてもその電気定数を測定できる可能性があることを見出した。

文 献

- 1) 北村豊, 藤浦建史, 中尾清治, 豊田浄彦: インピーダンス計測法の食品分野への応用—保存中の魚肉におけるインピーダンス変化—, 農業機械学会第57回大会講演要旨, pp.303-304, 1998.
- 2) 加藤宏郎, 坂口守彦, 大井康之, 丸尾信, 豊田薫: インピーダンス特性による魚肉の鮮度判定, 農業機械学会第57回大会講演要旨, pp.305-306, 1998.
- 3) 佐藤幸男, 梅沢長一: 獣肉, 魚肉の電気抵抗と鮮度に関する研究, 日本獣医師会雑誌, vol.18, pp.389-392, 1965.
- 4) Blackham, D. V., Pollard, R. D.: An improved technique for permittivity measurements using a coaxial probe, IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, 46, 1093-1099, 1997.
- 5) 電気学会 高周波電磁界の生体効果に関する計測技術調査専門委員会 編: 電磁界の生体効果と計測, コロナ社, 1995.
- 6) Yee, K. S.: Numerical solution of initial boundary value problems involving Maxwell's equation in isotropic media, IEEE Transaction on Antennas and Propagation, 14, 302-307, 1966.

可視・近赤外分光イメージングと深層学習を併用した 食肉加工品のスマート品質管理

Smart quality management of meat processed products using visible and
near-infrared multispectral imaging combined with deep learning

牧 野 義 雄・チャオフイ フォン

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Yoshio Makino and Chao-Hui Feng

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

The development of Artificial Intelligence (AI) is remarkable, and it has been introduced in all fields in society, but its application in the field of livestock is not sufficient. Therefore, in this research, we will develop a system that targets sliced sausages, inputs two-dimensional spectral data measured using a hyperspectral camera into AI, and nondestructively predicts the adenosine-5'-triphosphate (ATP) concentration that is an index of freshness and decay of sliced sausages. The samples were stored for 5 d at 35°C and 15% relative humidity, and spectroscopic analysis and ATP measurement were performed over time. Since the ATP concentration tended to increase with time, it was revealed that the deterioration during storage was more likely to be due to rotten ATP than to the decrease in ATP concentration due to the decrease in freshness. Furthermore, when an attempt was made to predict using AI (machine learning), it is possible to predict the ATP concentration with an accuracy of a coefficient of determination of 0.86 or more and an average square error of 0.14 mmol·L⁻¹ or less. The method proposed in this study was considered to be effective for nondestructive evaluation of the quality of sliced sausage by AI.

1. 目 的

申請者らは過去に、可視・近赤外分光画像と多変量解析を併用した食肉加工品の品質管理に関する研究に取り組んできた。ソーセージの抗酸化性等理化学的特性^{1, 2)}、表面色³⁾、pH⁴⁾の空間分布や経時変化を可視化により非破壊評価した。その際、多変量解析で最も多用されている偏最小2乗回帰分析 (PLSR) は、入力変数である「分光吸収／反射スペクトルデータ」と出力変数である「理化学特性」、「衛生状態」との関係を線形モデ

ルで関連付ける手法である。

一方、人工知能 (AI) は、近年進歩が著しい分類・予測技術として知られる⁵⁾。なかでも、画像認識の分野で威力を発揮し、医学分野における医療用画像診断や、気象学分野における衛生雲画像診断においてAIの利用が進められ、現在は医師や気象予報士の能力を上回る精度で病変を発見したり⁶⁾、降水確率を予測する⁷⁾ことが実証されている。

そこで本研究では、AIに分光スペクトルを学習させることにより、食肉加工品の理化学特性を

高い精度で把握できることを実証する。AIの場合、入力データが多くなるほど分類・予測精度が上がることが知られていることから、分光分析データのようなビッグデータは、AIの能力を発揮させるには適切な応用分野と考えられる。

本研究では特に、スライスソーセージ中のアデノシン-5'-三リン酸 (ATP) 濃度の経時変化を調べることにした。新鮮なソーセージには高い濃度のATPが含まれ、鮮度低下とともに濃度が減少することが知られている。一方、ATPは微生物数評価の指標としても知られていることから、腐敗とともに増えることが予想される。このため、ソーセージの品質低下とともにATP濃度の低下と上昇が同時進行すると考えられるが、ATP濃度に基づいてソーセージの品質評価を試みた研究例は見当たらない。そこで本研究では、AIによりATP濃度を予測するシステムを開発し、貯蔵中スライスソーセージの品質変化を、可視・近赤外イメージングで非破壊評価する方法について検討する。

2. 方 法

東京都内の食品量販店から購入したスライスソーセージ (質量 6.85 ± 0.12 g ; 直径 8.86 ± 0.37 cm ; 厚み 0.12 ± 0.02 cm) 75枚を実験試料と

し、ランダムに3つのグループ (Group I 25枚, 1 d 貯蔵 ; Group II 26枚, 3 d 貯蔵 ; Group III 24枚, 5 d 貯蔵) に分割した。なお、貯蔵環境は 35°C 、相対湿度15%とした。

試料をハイパースペクトルカメラ (Fig. 1) で経時的に撮影し、分光吸収スペクトルデータを得た。ハイパースペクトルカメラのハードウェア (JFEテクノリサーチ (株)) について説明する。光源は150Wキセノンランプと150Wタングステン-ハロゲンランプの混合光源を使用し、可視～近赤外の広い範囲で強い光照射を可能にすることにより、測定精度を向上させる。光センサーは12ビット (4096諸調) の精度で光の強弱を判定できるCCDカメラ、分光器は透過型回折格子、レンズは16mmのものを使用した。すべての光学部品は光学ベンチにて固定した状態で試料をカメラ撮影するため、試料、光源、光センサーの幾何学的位置関係が常に不変である。これは、再現性の高い計測データを得るために有効である。400～1,000nmの波長範囲の分光反射/吸収データを5 nmごとに取得した (原スペクトルの取得⁸⁾)。

ATP濃度 ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) はOto et al.⁹⁾ の方法にて、試料を粉碎・ATP抽出の後、ルミノセンサー (アトー) にて測定した。

取得した画像データの解析は、Feng, Makino

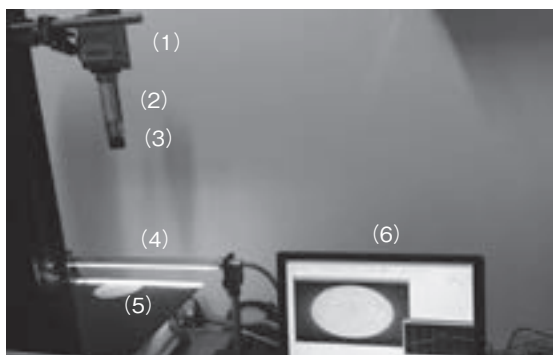


Fig. 1 Hyperspectral imaging system applied in the present study (JFE Techno-Research Co.)

(1) 12-bit CCD camera, (2) Spectrometer, (3) Lends, (4) Light source (xenon and halogen lamps), (5) Sample, (6) PC Monitor

et al.^{3,4)}の方法に従い、科学計算用プログラミング言語 MATLAB 2018a (MathWorks, Inc.) と The Unscrambler X (Camo Software Inc.)で行った。画像のコンピューターへの取り込みと前処理には主としてMATLAB 2018aを使用し、AI(機械学習)によるATP濃度出力にはThe Unscrambler Xを使用した。

3. 結果と考察

実験に使用したスライスソーセージの外観変化をFig. 2に示した。デジタルカメラ画像を観察したところ、外観の違いは不明瞭であった。ただし、ATP濃度は貯蔵日数の経過とともに増える傾向となったことから、鮮度低下による減少よりも、腐敗による増加の影響の方が大きかったと考えられた。

Fig. 3には、全波長での分光分析データを入力変数とした、機械学習によるATP濃度予測精度を示す。検量 (Cal) は、モデル作成時のATP濃度算出結果、交叉検証 (CV) は、検量モデル精度向上過程でのATP濃度算出結果、予測 (Pred) は、検量モデル作成時に使用しなかった未知のデータセットへの検量モデルの適合度を示す。このことから、実際の予測精度はPredの値を重視して評価することが望ましいと考えられる。

決定係数は、実測値と予測値の間の相関係数の2乗であることから、値が高いほど予測精度が高

いことを意味する。Fig. 3(a)の結果によると、Standard normal variate (SNV) で分光分析データを前処理したモデルが最もPredの値が高かった。また、平均2乗誤差 (root mean square error) は、値が小さいほど予測精度が高いことを意味する。Fig. 3(b)の結果によると、Predのデータに着目すれば、Multiplicative scatter correction (MSC) またはSNVの値が小さかった。決定係数と併せて評価すれば、SNVでの前処理が、ATP濃度予測モデルの構築には最も有効であったと考えられた。

Fig. 4には、重要な選択された10波長 (385, 390, 395, 505, 580, 670, 745, 780, 855, 955nm) での分光分析データを入力変数とした、機械学習によるATP濃度予測精度を示す。Fig. 4(a)の結果によると、元データの1次微分 (1st der) と1st der + Normal (N) で分光分析データを前処理したモデルでPredの決定係数の値が高く、全波長でのデータを入力した場合よりも高かった。これは、過剰なデータを入力したことによる過剰適合が抑制されたためと考えられる。またFig. 4(b)の結果によると、Predのデータに着目すれば、MSC, SNVまたは1st derの値が小さかった。決定係数と併せて評価すれば、1st derでの前処理が、ATP濃度予測モデルの構築には最も有効であったと考えられた。

本研究で対象とする光センシングは、非破壊検

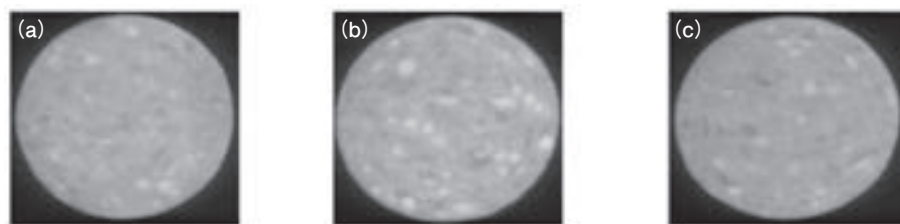


Fig. 2 Appearance of sausages on (a) day 1 (ATP : 6.16 mmol·L⁻¹), (b) day 3 (ATP : 6.28 mmol·L⁻¹) and (c) day 5 (ATP : 6.81 mmol·L⁻¹) stored at 35°C and 15% relative humidity.

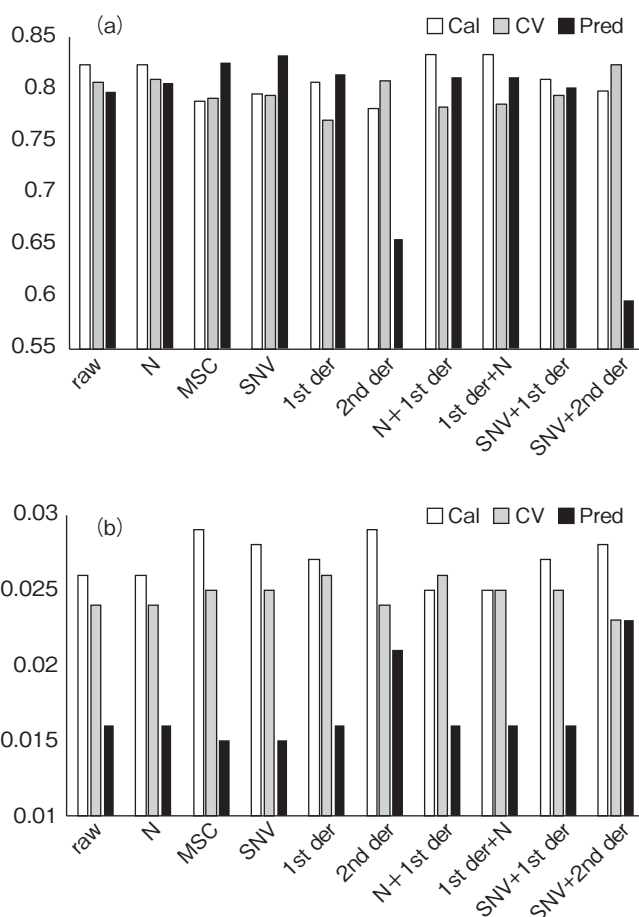


Fig. 3 Statistical parameters as (a) determination coefficient and as (b) root mean square error of machine learning with 125 raw (every 5 nm in the range of 380–1000 nm) and pre-treated spectra.

Note : N, normalization ; MSC, multiplicative scatter correction ; SNV, standard normal variate ; der, derivative ; Cal, calibration; CV, cross validation ; Pred, prediction

査であることから、迅速、簡便、低ランニングコストという特徴点があげられるが、最大の利点は、検体に対し非接触であるため、全数検査が可能になることである。

従来から行われている製造・出荷ラインにおける品質管理の基本的手法は抜き取り検査である。当該検査を高頻度で行えば安全確保の可能性は高まるが、検体は処分せざるを得ないため、出荷品が減ってしまう欠点がある。しかも、検査には熟練を必要とし、化学薬品を使用するなど、見直す

べき点も多い。その一方で、本研究で用いる手法である光センシングは、従来法と比較して、必ずしも測定精度は高いとは言えない。

そこで考えられるのは、破壊検査と非破壊検査を併用した生肉の品質管理である¹⁰⁾。すなわち、光センシングの特徴である非接触という利点を生かし、非破壊検査による全品のスクリーニングへの応用が考えられる。その結果、深刻な鮮度低下や腐敗が疑われる検体を製造ライン上や店頭で発見・選別し、当該検体についてのみ、従来法によ

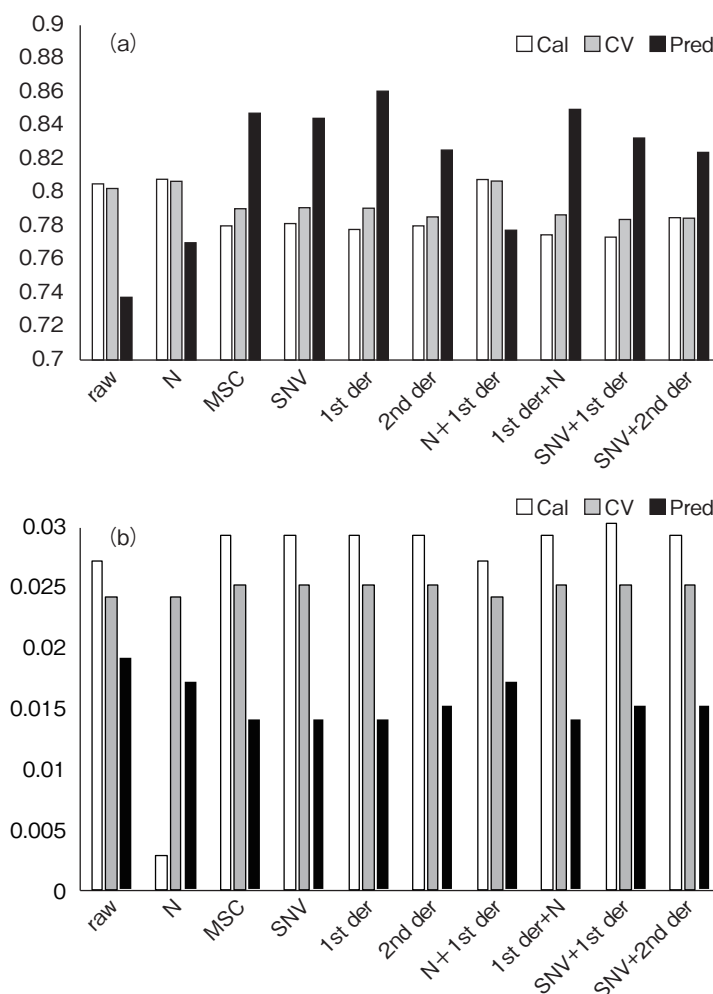


Fig. 4 Statistical parameters as (a) determination coefficient and as (b) root mean square error of machine learning with 10 raw (385, 390, 395, 505, 580, 670, 745, 780, 855, 955 nm) and pre-treated spectra.

Note : N, normalization ; MSC, multiplicative scatter correction ; SNV, standard normal variate ; der, derivative ; Cal, calibration ; CV, cross validation ; Pred, prediction

る検査を行い、著しい品質低下が起きた原因を追究するという手段が考えられる。そうすれば、検査漏れの心配がなくなるうえに、時間やコストの削減にもつながる。

本研究での成果を普及すれば、畜産物利用分野におけるAI利用の先進的導入事例となる。医療、自動運転、機械翻訳、レシピ提案など、さまざまな分野で社会生活に浸透しつつあるAIを、遅滞

なく畜産分野にも取り込むための有効な機会作出に貢献できると考えられる。

4. 要 約

AIの発展は著しく、社会でのあらゆる分野での導入が進められているが、畜産分野での応用は十分とは言えない。そこで本研究では、スライスソーセージを研究対象とし、ハイパースペクトル

カメラで撮影した二次元分光分析データをAIに入力し、スライスソーセージの鮮度や腐敗の指標となるATP濃度を非破壊予測するシステムの開発を試みた。試料を35℃、相対湿度15%で5 d貯蔵し、経時的に分光分析とATP測定を行った。ATP濃度は経時的に増加する傾向がみられたことから、貯蔵中における品質低下は、鮮度低下によるATP濃度減少よりも腐敗によるATP増加の方が優勢であることが明らかになった。さらにAIで予測を試みたところ、決定係数0.86以上、平均2乗誤差 $0.14\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 以下の精度でATP濃度を予測可能であり、分光分析データを1st derで前処理した場合に最も優良なAIモデルが作成された。以上の結果から、本研究で提案した方法は、AIによるスライスソーセージの品質の非破壊評価に有効であると考えられた。

文 献

- 1) Siripatrawan, U., Makino, Y. : *Meat Science*, **146**, 26~33, 2018.
- 2) Feng, C. H., Liu, Y. W., Makino, Y., Martín, J. F. G., Cummins, E. : *International Journal of Food Science and Technology*, **52**, 1777~1788, 2017.
- 3) Feng, C. H., Makino, Y., Yoshimura, M., Rodríguez-Pulido, F. J. : *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **98**, 2564~2572, 2018.
- 4) Feng, C. H., Makino, Y., Yoshimura, M., Dang, Q. T., García-Martín, J. F. : *Journal of Food Science*, **83**, 358~366, 2018.
- 5) 山下隆義 : ディープラーニング, 講談社, 東京, 2016
- 6) <https://lp-tech.net/articles/TXrrN>, 2016.9.15
- 7) <https://tech.nikkeibp.co.jp/it/atcl/column/14/346926/083000618/>, 2016.8.31
- 8) Makino, Y., Isami, A., Suhara, T., Goto, K., Oshita, S., Kawagoe, Y., Kuroki, S., Purwanto, Y. A., Sutrisno, A. U. : *Food Science and Technology Research*, **21**, 59~65, 2015.
- 9) Oto, N., Oshita, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Sugiyama, J., Yoshimura, M. : *Meat Science*, **93**, 579~585, 2013.
- 10) 牧野義雄 (監修 : 山本重夫) : 農産物・食品検査法の新展開, 53, シーエムシー出版, 東京, 2010.

牛経済形質に関わる新規DNA多型の探索 (Ⅱ)

Novel gene polymorphisms identification related to cattle economic traits

(Ⅱ)

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)

Various attempts have been made to improve carcass traits of Japanese Black cattle, representative beef cattle in Japan. Genetic factors are known to influence on meat quality in beef cattle. Therefore, development of additional DNA markers is useful for breeding. In this study, we tried to investigate the influence of bovine *SPP1* gene, coding a multifunctional cytokine, on economic traits in beef. For this purpose, sequence comparison of the promoter region and CDS was performed, resulting two DNA polymorphisms in the promoter region and one missense mutation in the CDS were identified. The missense mutation (g.58675C>T) was predicted to cause amino acid substitution from threonine to methionine, suggesting a strong influence on the function of the SPP1 protein. Association study between genotypes and economic traits revealed that g.58675C>T had a significant effect on carcass weight ($p=0.0078$) and C/T type was heavier than other genotypes. These results suggest that *SPP1* g.58675C>T is a useful genetic marker for breeding in beef cattle.

1. 目 的

日本固有の肉専用種を和牛と総称するが、これには黒毛和種・褐毛和種・日本短角種・無角和種の4品種が含まれる。これら和牛品種の内、黒毛和種は国内外問わず人気の高い品種であり、現在国内で飼養されている肉用牛の約95%を黒毛和種が占める。黒毛和種の特徴として、俗に霜降りと呼称される脂肪交雑が優れている点あげられる。脂肪交雑は口に入れた際の食感の良さに影響し、甘味や香りを向上させることで、肉の旨みに影響を与える。この脂肪交雑の評価基準がBMS

(Beef Marbling Standard) であるが、このBMSは枝肉単価との相関が高いため、格付項目の中でも特に重要視されている。このBMSの他、脂肪酸組成やアミノ酸組成、枝肉重量、歩留等も牛の経済性に影響するため、これらの形質を向上させようと精力的に遺伝学的研究が進められている。

一般に枝肉形質は飼料や性などさまざまな要因による影響を受けるが、遺伝的要因にも大きく影響されるため、枝肉形質の改良では遺伝学的アプローチが有効である。そこで、我々は枝肉形質に関与する新規遺伝子の同定を網羅的遺伝子発現解析により試みた¹⁾。その結果、ACACAやELOVL5、

FADS2, *MMP14*, *SPPI*等の遺伝子が枝肉形質に関与する候補遺伝子として浮上した。これらの内*ACACA*, *ELOVL5*, *FADS2*, *MMP14*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、これらの多型は複数の枝肉形質に効果を持つことが明らかにされた²⁻⁵⁾。したがって、先行研究でスクリーニングされた遺伝子群は枝肉形質に関連する有力な候補であると考えられる。

SPPI (*secreted phosphoprotein 1*) 遺伝子は牛第6番染色体上に位置し、8個のエクソンから構成される。その翻訳産物はOsteopontinとも呼ばれる多機能性のサイトカインであり、骨形成や免疫反応、アポトーシスなどさまざまな生命現象を制御することが知られている。経済形質に対する効果も検証されており、ホルスタイン種の乳房炎耐性や枝肉重量に対する効果が報告されている。しかしながら、黒毛和種の枝肉形質との関わりは不明である。本研究ではこの*SPPI*遺伝子を対象として、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484個体をサンプルとして用いた。多型探索はこれらの内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

*SPPI*遺伝子(AC_000163.1)の各エクソンを含むDNA領域をPCR法により増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。*SPPI*遺伝子ではプロモーター活性を持つDNA領域が明らかにされているため⁶⁾、この領域も解析対象とした。PCR酵素にはGo-Taq[®](Promega Corporation, Madison, WI)を使用した。第3, 4エクソンに対する反応にはEX-Taq[®](Takara Bio, Siga, Japan)を用いた。PCR反応は95℃で2分熱変性させた後、熱変性(95℃, 30秒)、アニーリング(任意の温度, 30秒)、伸長反応(72℃, 30秒)を35サイクル行った。ただし、-1004~-57のプロモーター領域については伸長反応の時間を60秒とした。プライマー配列およびPCR条件はTable 1に示した。

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領域で同定したミスセンス変異についてはClustalWにより保存性を評価した。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)
Promoter (-1863~-990)	F : TATAGCAGTTATCAGATCCAT R : CAAGAACAGAAACTTATACG	60	919
Promoter (-1004~-57)	F : AAGAGTATAATGGTAAACACT R : TGGAATCTTTTCTATTTTATA	50	990
Promoter (-655~+2)	F : ATATTTTCACCTCTGTATTTAG R : ACGTCCTTTTATAGTAATGGTA	55	657
Exons 3, 4	F : GAGATGGAAAATAGAGGTGGC R : AGCAGGCACACAATAAATACT	60	539
Exons 5, 6	F : TTATCACTTAGAGACCCCTGT R : GCCTGGATAATCAAAAGGTGA	62	997
Exon 7	F : CCCTGACACCCATTTTCTGG R : TGGGCTCTAATCATAACCATCTGA	60	384
Exon 8	F : GGTGTGGAAGTTAGAAGGCATTA R : TGCTTTAATGTATCCTTTTCGTTTT	54	467

F : forward primer ; R : reverse primer

2.3 遺伝子型判定

遺伝子型判定にはPCR-RFLP法を採用した。

c.-1117G > A を含む DNA 領域は 5'-ATCACAGGGGACTGGACTCTTCTCG-3' および 5'-ACCTTCCCAATGAAATGAGGCA GCG-3' のプライマーセットで増幅させた。本 DNA 多型を含む付近の塩基配列を認識する適切な制限酵素が存在しなかったため、ミスマッチ塩基 (下線) を導入し、*Fnu*4HI (New England BioLabs, Ipswich, MA) で認識できるように改変した。g.58675C > T を含む DNA 領域は 5'-GCATGACGCACCTAAGAAGACGA-3' および 5'-T C A A G G C T A T G G A A T T C TTGGCTGA-3' のプライマーセットで増幅させた。本 DNA 多型に対する制限酵素処理には *Nla*III (New England BioLabs) を用いた。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 (任意の温度, 30 秒)、伸長反応 (72°C, 30 秒) を 35 サイクル行った。c.-1117G > A に対する PCR 増幅のアニーリング温度は 58°C で、g.58675C > T のアニーリング温度は 60°C だった。

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、と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ったため、この効果は分析モデルから除外した。

3. 結果と考察

3.1 *SPPI* 遺伝子における DNA 多型の同定

黒毛和種 8 個体を用いた塩基配列決定の結果、プロモーター領域において 2 個 (c.-1121C > T : rs110329232, c.-1117G > A : rs110254070), CDS 領域において 1 個の DNA 多型 (g.58675C > T : rs133929040) を同定した (Fig. 1)。プロモーター領域の DNA 多型は非常に近い位置で同定されたため、連鎖していることが予想された。そのため、黒毛和種 30 個体を対象とした塩基配列決定によりこれらの連鎖関係を調査した。いずれの個体でも c.-1121C > T の C 型を持つ個体は c.-1117G

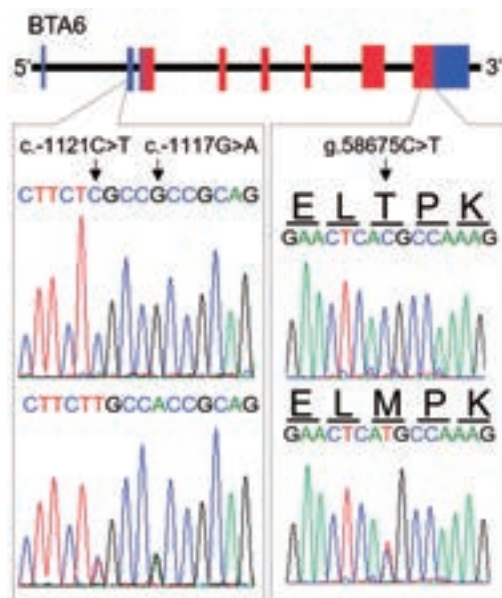


Fig. 1 Identification of DNA polymorphisms in bovine *SPPI* gene.

Sequence comparison revealed two DNA polymorphisms, c.-1121C>T and c.-1117G>A, in the promoter region and one missense mutation, g.58675C>T, in Exon 8. The missense mutation was predicted to cause amino acid substitution from threonine to methionine.

>AはG型であり、例外は存在しなかった (data not shown)。この二つのDNA多型は連鎖していることが強く示唆されたため、以降の集団解析ではc.-1117G>Aのみを対象とした。次いで、c.-1121C>Tおよびc.-1117G>Aが転写因子の結合様式に及ぼす影響を調べた結果、C/G型とT/A型では結合が予想される転写因子が大きく異なった (data not shown)。したがって、同定されたこれらのDNA多型は*SPPI*遺伝子の発現量に影響することが示唆された。CDS領域で同定されたg.58675C>Tはミスセンス変異であり、第218番のアミノ酸をスレオニンからメチオニンに置換することが予想された。スレオニンは極性無電荷側鎖アミノ酸であり、メチオニンは側鎖に硫黄を含む疎水性アミノ酸である。また、牛SPP1タンパク質における第218番目のアミノ酸に相当するアミノ酸は偶蹄目では高度に保存されていることが確認された (Fig. 2)。保存性の高い領域でアミ

ノ酸の性質を大きく変更するため、このDNA多型はSPP1タンパク質の機能や構造に影響することが示唆された。

3.2 *SPPI*遺伝子のDNA多型が枝肉形質に及ぼす効果

PCR-RFLP法によるc.-1117G>Aの遺伝子型判定の結果、黒毛和種集団484個体のうちG/G型の個体が220個体、G/A型が259個体、A/A型が5個体だった。したがって、遺伝子型頻度はG/G型が0.451、G/A型が0.532、A/A型が0.016であり、対立遺伝子頻度はG型が0.771、A型が0.229だった。一方、g.58675C>TではC/C型の個体は404個体、C/T型は77個体、T/T型は3個体検出された。したがって、遺伝子型頻度はC/C型が0.829、C/T型が0.164、T/T型が0.06であり、対立遺伝子頻度はC型が0.91、T型が0.09だった。これら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

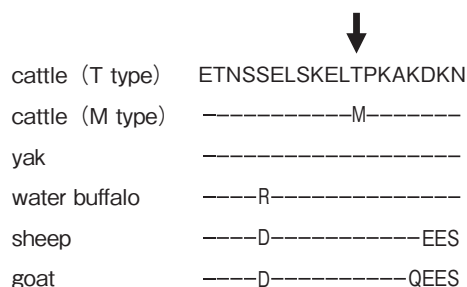


Fig. 2 Homology study of SPP1 among Artiodactyla. g.58765C>T was predicted to influence on the 218th amino acid (arrow). The amino acid sequence on this region is highly conserved among Artiodactyla, yak (ELR54943), water buffalo (ABC02202.1), sheep (AAD38388.1) and goat (ABY21280.1). Dots indicate the same amino acids with above sequences.

Table 2 Comparison of carcass traits and fatty acid composition between genotypes of the c.-1117G>A and g.58675C>T

Trait	c.-1117G>A	g.58675C>T
Carcass traits		
Carcass weight	ns	* *
Rib-eye area	ns	ns
Rib thickness	ns	ns
Subcutaneous fat thickness	ns	ns
Yield estimate	ns	ns
Beef marbling score	ns	ns
Fatty acid composition		
C 14 : 0	ns	ns
C 14 : 1	ns	ns
C 16 : 0	ns	ns
C 16 : 1	ns	ns
C 18 : 0	ns	ns
C 18 : 1	ns	ns
C 18 : 2	ns	ns

* $p<0.05$; ** $p<0.01$; *** $p<0.005$; ns (non-significant)

Table 3 Effect of the g.58675C>T on carcass weight

Trait	g.58675C>T		
	C/C (n=407)	C/T (n=83)	T/T (n=3)
Carcass weight (kg)	459.2±2.8 ^b	473.9±6.0 ^a	412.0±25.6 ^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).

た。その結果、g.58675C>Tでは枝肉重量において高い有意差 ($p=0.0078$) が認められたが、c.-1117G>Aはいずれの形質に対しても有意な効果を示さなかった (Table 2)。g.58675C>Tの効果の詳細に検討するため、遺伝子型ごとに枝肉重量

の最小自乗平均値を比較した。C/C型は459.2kg、C/T型は473.9kg、T/T型は412.0kgであり、C/T型を持つ個体は他の遺伝子型の個体に比べ有意に重かった (Table 3)。SPP1遺伝子はミオスタチンの上流因子であるため⁷⁾、このシグナ

ル伝達の変化により枝肉重量に差が出たと考えられた。以上の結果はg.58675C>Tが重要な枝肉形質の一つである枝肉重量に対する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では枝肉形質の向上を目的とした試みが盛んに行われている。枝肉形質はさまざまな要因による影響を受けるが、その改良には遺伝学的アプローチが有効である。そこで、本研究では枝肉形質に関与する候補遺伝子の一つSPPI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、プロモーター領域において連鎖する2個のDNA多型、CDS領域において1個のミスセンス変異を同定した。これらのDNA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結果、CDS領域で同定されたg.58675C>Tは枝肉重量に対する有意な効果($p=0.0078$)を持ち、C/T型が他の遺伝子型に比べて重いことが確認された。以上より、SPPI遺伝子のg.58675C>T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, 齋藤邦彦, 笹子奈々恵, 小林栄治, 久下志朗, 本多健, 笹崎晋史, 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) Matsumoto, H., Kawaguchi, F., Itoh, S., Yotsu, S., Fukuda, K., Oyama, K., Mannen, H., Sasazaki, S.: The SNPs in bovine MMP14 promoter influence on fat-related traits, *Meta Gene*, (in press).
- 6) Dudemaine, P. L., Thibault, C., Alain, K., Bissonnette, N.: Genetic variations in the SPPI promoter affect gene expression and the level of osteopontin secretion into bovine milk, *Animal Genetics*, 45(5), 629~640, 2014.
- 7) Nghiem, P. P., Kornegay, J. N., Uaesoontrachoon, K., Bello, L., Yin, Y., Kesari, A., Mittal, P., Schatzberg, S. J., Many, G. M., Lee, N. H., Hoffman, E. P.: Osteopontin is linked with AKT, FoxO1, and myostatin in skeletal muscle cells, *Muscle Nerve*, 56(6), 1119~1127, 2017.

抗菌性ペプチドを指標とした豚抗病性育種法の開発

Development of pig breeding for disease resistance with antimicrobial peptides

上 本 吉 伸

(東北大学大学院農学研究科)

Yoshinobu Uemoto

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Mycoplasma pneumoniae of swine (MPS) caused by *Mycoplasma hyopneumoniae* is one of the important factors of economic loss in the pig industry. The objective of this study was to evaluate the genetic effect of the serum β -defensing 2 concentration (DEFB2), which is one of the antimicrobial peptides, and the relationship of DEFB2 with MPS lesion score and the serum concentration of interleukin 17 (IL17) for genetic improvement of disease resistance in pigs. The Landrace purebred pigs selected for MPS lesion score were used in this study, and these pigs have the phenotype of MPS lesion score and IL17. A total of 298 pigs reached 105 kg body weight were measured DEFB2 by ELISA, and then the genetic parameter of DEFB2 with selection traits and IL17 were estimated. Heritability of DEFB2 (0.04) was lower than that of MPS lesion score (0.08). The genetic correlation between DEFB2 and MPS lesion score were negatively moderate (-0.39). In addition, it showed moderate positive residual correlation between DEFB2 and IL17 (0.54) in spite of low genetic correlation between them (-0.07), suggesting that non-genetic association of DEFB2 with IL17 was shown in our study. These results suggest that DEFB2 is not suitable as a selection indicator of disease resistance in pig, but may be indirectly related to MPS lesion score via IL17.

1. 目 的

近年の養豚業では、経営の大規模化や多頭飼養化傾向が進んでおり、呼吸器性慢性疾病による経済的損失が大きな問題となっている。この呼吸器性慢性疾病の一つとして、*Mycoplasma hyopneumoniae*によるマイコプラズマ性肺炎(MPS, mycoplasma pneumonia of swine)があげられる。MPSによる病変の肉眼的特徴として、肺の両側性肝変化があげられる。MPSに感染し

た個体は、生体防御機能が低下して他の細菌あるいはウイルスに感染しやすくなる。その結果、飼料効率の低下、増体重の減少、斉一性の悪化、格付けの低下および治療費の増大など、養豚業界に与える経済的損失は大きい。MPSの対策として、養豚現場ではワクチン接種や抗菌性資材の飼料添加による対策などが取られているが、ワクチン効果には限界があること、抗生物質耐性菌の出現や食肉への抗生物質の残留問題などから、抗菌性添加物に依存しない抗病性機能の向上が求められて

いる。そこで、家畜自身の抗病性機能を遺伝的に高める抗病性育種が検討されてきた。宮城県畜産試験場では、MPS病変をスコア化した指標（MPS病変スコア）を用いてMPS病変スコアが減少するように選抜したMPS抵抗性ランドレース種集団を造成した¹⁾。しかし、MPS病変スコアの選抜では、豚のと畜および煩雑な病変検査が必要不可欠であり、多検体の調査は難しく次世代の親候補個体から直接測定することができない。また、一般的に病変形質は遺伝率が低く、この集団のMPS病変スコア遺伝率は0.07であった¹⁾。そのため、簡易に測定でき、MPSと密接に関連し、かつ遺伝率が比較的高い形質がMPS病変スコアに代わる新たな選抜指標として求められている。

MPS抵抗性ランドレース種集団では、選抜に伴って血清中インターロイキン17濃度（IL17）など一部のサイトカインの遺伝的趨勢が変化している²⁾。IL17はサイトカインの一つであり、感染防御応答の働きとして抗菌性ペプチドの産生誘導による直接的な菌体排除および好中球の活性化・遊走による間接的な菌体排除などがあげられる。IL17の遺伝率は中程度で、MPS病変スコアと高い遺伝相関（-0.86）を持つことから²⁾、IL17によって産生誘導される抗菌性ペプチドがMPS病変スコアと大きな関連性を示す可能性がある。ここで、抗菌性ペプチドとは、病原体を認識して結合すると同時に強力な殺菌作用を持つ分子であり、代表的な抗菌性ペプチドとして、ディフェンシンやカセリジシンなどがあげられる。このうち、ディフェンシンは哺乳類の自然免疫において重要な働きを持つ低分子量の抗菌性ペプチドである。豚において、腸内で産生され抗菌活性を持つ β ディフェンシン2が発見されており、その産生部位および幅広い抗菌活性から腸の免疫にとって重要な防御分子であることが報告されている³⁾。しかし、血清中 β ディフェンシン2濃度

（DEBF2）の個体間差に遺伝的影響があるかは未知である。そこで本研究ではMPS抵抗性ランドレース種集団を用いて、DEBF2について遺伝率を推定するとともに、選抜形質およびIL17との間の遺伝相関および残差相関を推定し、DEBF2を指標としたMPS抵抗性育種の可能性を検討した。

2. 方 法

2.1 供試動物

本研究では、宮城県畜産試験場にて2003～2008年に5世代選抜によって系統造成したランドレース種集団1,395頭を用いた。この集団は、一日平均増体重（DG, g/day）、背脂肪厚（BFM, mm）、MPS病変スコア（%）および血漿中コルチゾール濃度（CORT, $\mu\text{g/dL}$ ）の4形質を指標として、MPS病変スコアが低下する方向に選抜したMPS抵抗性集団である¹⁾。このうち、MPS病変スコアを測定した調査豚は、疾病が発生しにくいコンクリート床豚舎および疾病が発生しやすいハウス豚舎の2つの豚舎に分けて飼育を行った。調査豚は、体重105kg時に血清をサンプリングし、と畜後にMPS病変スコアを記録している。

2.2 対象形質

本研究ではMP病変スコアを持つ調査豚630頭のうち298頭について、ELISA法によってDEBF2を測定した。ELISA法は、市販のキット（Cloud-Clone Corp.）を用いてマニュアルに従って行った。得られた結果は、その後、自然対数変換を行った。

本集団では、選抜形質であるDG、BF、MPSスコアおよびCORTを有していることから、これらの形質を用いた。MPS病変スコアは、Goodwin and Whittles⁴⁾が各肺葉のMPS病変面積割合をスコア化した評価法である。これらの形質の詳細はKadowaki et al.¹⁾にて記されている。また、体重105kg時のIL17についても当集団にてすでに得ら

れていることから統計解析に用いた²⁾。

2.3 統計解析

遺伝率、遺伝相関および残差相関の推定は、選抜形質4形質、IL17およびDEFB2からなる多形質アニマルモデルREML法によって推定した。統計解析に用いた混合モデルは以下のとおりである。

$$y_{ijklm} = \mu_i + G_{ij} + S_{ik} + R_{il} + u_{im} + e_{ijklm}$$

ここで、 y_{ijklm} は形質*i*の測定値、 μ_i は形質*i*の総平均、 G_{ij} は形質*i*の世代*j*、 S_{ik} は形質*i*の性別*k*、 R_{il} は形質*i*の飼育環境*l*、 u_{im} は形質*i*の個体*m*の育種価、 e_{ijklm} は残差である。遺伝率、遺伝相関および残差相関の推定は、VCE6プログラム⁵⁾を用いた。

3. 結果と考察

本研究で得られたDEFB2の基本統計量をTable 1に示した。本集団では第3世代の血清サンプルを有していなかったため、第1, 2, 4および5世

代の個体を用いた。基本統計量の結果、各世代で一定の個体間差が見られ、特に第1世代では最も標準偏差が高い値を示していた。また4, 5世代では、1, 2世代に比べ、低い標準偏差を示していた。これらのことから、DEFB2は集団内に個体間差が見られ、選抜に伴って何らかの変化が起こっている可能性が示唆された。

次に、DEFB2、選抜形質4形質およびIL17に関する遺伝率、DEFB2と他の形質との間の遺伝相関および残差相関の推定値をTable 2に示す。

本集団では、DEFB2の遺伝率は0.04と低い値を示した。また、DG, BF, MPS, CORTおよびIL17の遺伝率は、それぞれ0.60, 0.65, 0.08, 0.20および0.27であった。これらの推定値は、Kadowaki et al.¹⁾ およびSato et al.²⁾ と非常に近い値を示している。DEFB2と各形質との間の遺伝相関について、DG, BFおよびIL17とは低い遺伝相関を示していた（それぞれ-0.03, 0.04およ

Table 1 Descriptive statistics of the concentration of serum β -defensin2 (pg/ml).

Generation	N	Mean	SD	Min	Max
1	57	2,879	1,209	888	6,964
2	84	2,642	1,099	515	6,005
4	68	2,868	808	1,734	5,421
5	89	2,090	837	811	5,473
Total	298	2,571	1,045	515	6,964

Table 2 Estimates of heritability, and genetic and residual correlations of β -defensin2 with other traits.

Traits	N	Heritability		Genetic correlation		Residual correlation	
		Estimate	SE	Estimate	SE	Estimate	SE
DEFB2	298	0.04	0.09	—	—	—	—
DG	941	0.60	0.05	-0.03	0.29	-0.10	0.05
BF	929	0.65	0.05	0.04	0.39	-0.09	0.09
MPS lesion score	630	0.08	0.04	-0.39	1.01	0.19	0.11
CORT	1197	0.20	0.05	-0.88	1.10	-0.02	0.05
IL17	566	0.27	0.07	-0.07	0.55	0.54	0.06

DEFB2, β -defensin2 ; DG, daily gain ; BF, backfat thickness ; MPS lesion score, mycoplasmal pneumonia of swine lesion score ; CORT, cortisol concentration ; IL17, interleukin 17.

び-0.07)。MPSとは推定誤差が高かったものの-0.39と中程度の負の遺伝相関を示し、CORTも同様に推定誤差が高かったものの-0.88の高程度の負の遺伝相関を示した。残差相関については、IL17を除くすべての形質で低い残差相関を示しているが、IL17については中程度の正の残差相関(0.54)を示していた。

抗菌性ペプチドの遺伝的寄与について調査した報告は、ヒトや家畜などすべての動物でこれまでにない。また、抗菌性ペプチドとサイトカインおよび病変形質との遺伝的な関連性についても同様にこれまでに報告がない。本研究は、抗菌性ペプチドの遺伝的関連性を示した初めての報告であり、抗病性育種を行ううえでの基礎的情報である。豚 β ディフェンシンをコードする遺伝子はChoi et al.⁶⁾によって29遺伝子報告されており、そのうちいくつかの遺伝子には一塩基多型(SNP, single nucleotide polymorphism)が存在することが報告されている。そのため、DEFB2においても個体間差に遺伝的な影響が存在することが考えられた。しかし、本集団ではDEFB2の遺伝率がMPS病変スコアよりも低いことから、その個体間差に対する遺伝的な影響は小さく、直接的な選抜指標としては適さないことが示唆された。一方で、MPS病変スコアとは中程度の負の遺伝相関を示していたことから、MPS病変スコアが低下する方向への選抜に伴ってDEFB2が上昇する方向へ選抜されている可能性が示唆され、MPS病変スコアと何らかの関係が存在することが示唆された。

ヒトにおいて、DEFB2は乾癬のバイオマーカーとして有効であることが報告され⁷⁾、またIL17との間に高い相関が報告されている⁸⁾。本研究では、DEFB2とIL17との間の遺伝相関は低い値であったが、中程度の正の残差相関を示していた。DEFB2はIL17の産生誘導によって産出される抗

菌性ペプチドの一つであり、ヒトの報告においてその関連性が報告されているが、本研究によりこの関連性は特に非遺伝的なものである可能性が示唆された。本研究では、IL17がMPS病変スコアと高い遺伝相関を示し、遺伝率も中程度であったことから、IL17の産生誘導によって産出される抗菌性ペプチドに焦点を当てた。しかし、DEFB2自体は選抜指標として適さないことが本研究から示唆されたことから、今後の課題として、ナイーブT細胞に刺激を与えることで、IL17を産生するヘルパーT細胞(Th17)への分化誘導を行うインターロイキン6(IL6)など、IL17を取り巻くサイトカインについて詳細な分析を行うことで、MPS抗病性育種に有用なバイオマーカーの探索を行う必要があると考える。

4. 要 約

本研究ではMPS抵抗性ランドレース種集団を用いて、DEFB2の遺伝的な影響を調査するとともに、選抜形質およびIL17との間の遺伝的な関係を調査することで、DEFB2を指標としたMPS抵抗性育種の可能性を検討した。その結果、DEFB2の遺伝率はMPS病変スコアよりも低いことから選抜指標としては適さないことが示唆された。その一方で、MPS病変スコアとは中程度の負の遺伝相関を示していたことから、MPS病変スコアが低下する方向への選抜に伴ってDEFB2が上昇する方向へ選抜されている可能性が示唆された。また、IL17とは遺伝相関が低い値であったが、中程度の正の残差相関を示していたことから、DEFB2とIL17は非遺伝的な関連性を示すことが示唆された。

文 献

- 1) Kadowaki, H., Suzuki, E., Kojima-Shibata, C., Suzuki, K., Okamura, T., Onodera, W., Shibata, T., Kano, H.: Selection for resistance to swine

- mycoplasmal pneumonia over 5 generations in Landrace pigs, *Livestock Science*, **147**, 20~26, 2012.
- 2) Sato, T., Okamura, T., Kojima-Shibata, C., Kadowaki, H., Suzuki, E., Uenishi, H., Suzuki, K. : Correlated response of peripheral blood cytokines with selection for reduced mycoplasma pneumonia of swine lesions in Landrace pigs, *Animal Science Journal*, **87**, 477~483, 2016.
- 3) Veldhuizen, E. J., Rijnders, M., Claassen, E. A., van Dijk, A., Haagsman, H. P. : Porcine β -defensin 2 displays broad antimicrobial activity against pathogenic intestinal bacteria, *Molecular immunology*, **45**, 386~394, 2008.
- 4) Goodwin, R. F. W., Whittlestone, P. : Enzootic pneumonia of pigs : immunization attempts inoculating *Mycoplasma suis* pneumoniae antigen by various routes and with different adjuvants, *British Veterinary Journal*, **129**, 456~464, 1973.
- 5) Groeneveld E. VCE User's Guide and Reference Manual Version 6.0, 2008.
- 6) Choi, M. K., Le, M. T., Nguyen, D. T., Choi, H., Kim, W., Kim, J. H., Chun, J., Hyeon, J., Seo, K., Park, C. : Genome-level identification, gene expression, and comparative analysis of porcine β -defensin genes, *BMC genetics*, **13**, 98, 2012.
- 7) Jansen, P. A., Rodijk-Olthuis, D., Hollox, E. J., Kamsteeg, M., Tjabringa, G. S., de Jongh, G. J., van Vlijmen-Willems, I. J. J., Bergboer, J. G. M., van Rossum, M. M., de Jong, E. G. J., den Hijer, M., Evers, A. W. M., Bergers, M., Armour, J. L., Zeeuwen, P. J. M., Schalkwijk, J. : β -Defensin-2 protein is a serum biomarker for disease activity in psoriasis and reaches biologically relevant concentrations in lesional skin, *PLoS one*, **4**, e4725, 2009.
- 8) Kolbinger, F., Loesche, C., Valentin, M. A., Jiang, X., Cheng, Y., Jarvis, P., Peters, T., Calonder, C., Bruin, G., Polus, F., Aigner, B., Lee, D. M., Bodenlenz, M., Sinner, F., Pieber, T. R., Patel, D. D. : β -Defensin 2 is a responsive biomarker of IL-17A-driven skin pathology in patients with psoriasis, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **139**, 923~932, 2017.

肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率 および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索

Rapid genetic mapping for egg production and eggshell strength in
Nagoya breed for production of meat-type chicken

後藤 達彦¹・國重 享子²・西村 健志¹・佐藤 駿²

(¹帯広畜産大学・²北海道立総合研究機構)

Tatsuhiko Goto¹, Kyoko Kunishige², Kenji Nishimura¹ and Shun Sato²

(¹Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ²Hokkaido Research Organization)

Further improvement of egg production rate and eggshell quality in maternal lines of meat-type chickens is crucial to enhance amount of chicken meat. The aim of this study is to detect genetic loci affecting egg production rate and eggshell strength and to collect information for future breeding of meat-type chickens. We found that Nagoya breed has 8,563,560 SNPs by using whole genome resequencing technique. By whole genome comparison with high ($n=10$) and low ($n=10$) egg production populations, 53 candidate regions were found on chromosomes 1-3, 5-13, 15-19, 23-25, and 27. On chromosomes 1-7, 9-11, 19, 20, 23, 25, 27, and 28, we identified 42 candidate regions affecting eggshell strength using window-approach for comparing genetic differentiation with high ($n=9$) and low ($n=9$) eggshell strength populations. These candidate regions are quite high-resolution than those of previous QTL reports. Further analyses are planned to reveal which variants of genes affect egg-related traits and to search common regions sharing the other breeds of Japanese indigenous chickens e.g., Hinai-dori.

1. 目 的

鶏卵は、栄養価が高く、世界中で最も需要のある動物性タンパク源の一つである。卵に関連する特徴（卵形質）は、鶏卵生産用のレイヤー産業における重要性は言うまでもないが、鶏肉生産用のブロイラー産業においても、コマーシャル鶏を生産する親世代のとりわけ雌系において非常に重要なものとなる。すなわち、一定期間内に100個の卵を生産可能な個体と、50個を生産する個体では、受精卵の生産効率が2倍異なるため、より多

くのコマーシャル鶏を生産するためには、高産卵率の雌系が求められる。しかしながら、たとえ2倍の産卵数を示しても、孵化率が低い場合には、そのメリットを最大限に引き出せない。地鶏の種鶏は平飼いで自然交配の環境下のため、破卵を防ぐ目的で卵殻強度の高い卵が求められる。また、卵殻質が悪い卵は、その孵化率が低いため、産卵率の増加とともに、卵殻質の向上も同時に求められる¹⁾。つまり、肉用地鶏の雌系において、産卵率および卵殻質のさらなる向上は、鶏肉増産に向けた産業上の最重要課題の一つとなる。

北海道の特産品である新得地鶏は、これまでにさまざまな改良がなされ、地域の鶏肉生産を支えている。開発元である北海道立総合研究機構畜産試験場では、継続した改良が行われており、雌系には、日本の品種である名古屋種が使われている。名古屋種の卵は、新得地鶏コマーシャル世代を生み出すために重要な働きをしている。現在、名古屋種の雌は、約500個体の規模で継代維持されているが、産卵ピークを含む180日から300日齢の産卵率は、低いもので20%程度、高いもので90%程度と分布の範囲が広く、平均67%（標準偏差16）と大きなバラツキがあるため、今後の改良が強く求められている。卵殻質の一つの指標である卵殻強度は、平均 3.8 ± 0.8 標準偏差とこちらも分布が広く、改良の余地がある。これらの鶏肉産業上、重要な形質に関与する遺伝子座が同定できれば、将来、新得地鶏の雌系名古屋種の改良を効率的に行うことに貢献する。

そこで本研究では、産卵率および卵殻強度の表現型の多様性に関与する遺伝子座を同定し、今後の雌系名古屋種の集団を効率良く改良するための基礎的知見を得ることを目的とした。

2. 方 法

北海道立総合研究機構畜産試験場で継代維持されている新得地鶏の雌系名古屋種の集団の雌（ $n=488$ ）を対象に、180日から300日齢の産卵率

の表現型のヒストグラムを作成し、両極端な位置に存在する個体群（上位群10個体および下位群10個体）を選定した。集団全体の平均産卵率は 67 ± 16 標準偏差（%）であったが、上位10個体では $88.8 \pm 1.9\%$ 、下位10個体では $34.4 \pm 7.0\%$ であった（Table 1）。300日齢の卵殻強度について分類すると、上位グループで $4.0 \pm 0.4 \text{ kg/cm}^2$ 、下位グループで $2.9 \pm 0.5 \text{ kg/cm}^2$ であった（Table 1）。次世代シーケンサーによる全ゲノムリシーケンスより検出される数百万の変異を対象に、これらの集団それぞれが保有する変異のパターンを比較することによって、産卵率および卵殻強度に関与する遺伝子座の迅速な探索を行った。

各個体の血液サンプルを収集し、個体別にDNAを抽出し、濃度測定および品質管理を行った。次世代シーケンサー（illumina社のHiSeq X Ten）を用いた全ゲノムリシーケンス解析は、受託会社において行った。DNAの断片化を行い、250–350bpのDNAを精製し、ライブラリを作成した。この際、各個体を同定できるように、アダプター配列を付与した。ペアエンドのシーケンスを行い、ゲノムサイズ（1 Gbp）の5倍のゲノムカバレッジ（約5 Gbp）になるように調整して、次世代シーケンサーの生データ（fastq ファイル）を取得した。

生データ取得後のバイオインフォマティクスは、帯広畜産大学後藤研究室のLinux serverを用

Table 1 Phenotype and genome coverage of high and low groups in egg production (EP) and eggshell strength (SS)

Group	N	Genome coverage	Phenotype	
			EP (%)	SS (kg/cm ²)
Egg production				
High_EP	10	5.2 ± 0.4	88.8 ± 1.9	
Low_EP	10	5.4 ± 0.5	34.4 ± 7.0	
Eggshell strength				
High_SS	9	5.2 ± 0.5		4.0 ± 0.4
Low_SS	9	5.3 ± 0.5		2.9 ± 0.5

Table 2 Number, size, and chromosomes of candidate genomic regions

Target phenotype	Candidate region ($Z\text{-}F_{ST}>4$)					Chromosomes
	No.	Size				
		Median	Min	Ave	Max	
Egg production	53	30 KB	20 KB	232 KB	2.15 MB	1-3, 5-13, 15-19, 23-25, 27
Eggshell strength	42	20 KB	20 KB	123 KB	1.36 MB	1-7, 9-11, 19-20, 23, 25, 27-28

いて行った。Lawal *et al*の手法²⁾のように、GATK, BWA, Picard toolおよびSAMtoolsを用いて、fastqファイルを参照配列 (galGal5) にマッピングすることにより、数百万箇所の遺伝的変異 (SNPs) を同定した。VCFtoolsを用いて、全ゲノム領域を約9万の20-KBウィンドウに分けて、産卵率および卵殻強度の高／低の集団における変異パターンの違いを、 F_{ST} の指標を基にして比較した。 F_{ST} は遺伝的分化の程度を示し、0に近ければ両集団が近い関係性にあり、1に近ければ両集団が遠い関係性にあることを示す。表現型の高／低の集団間の比較を行うことによって、両集団が遠い関係性にあるゲノム領域を明らかにすることができれば、当該表現型に関与する遺伝子座を含む可能性が高い候補領域として検出できる。本研究では、標準化した F_{ST} である $Z-F_{ST}$ の値がきわめて高い領域 ($Z-F_{ST} > 4$) を高低の集団間において有意に異なる候補領域として検出した。

3. 結果と考察

次世代シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンスの結果、名古屋種の雌は、集団として8,563,560 SNPsを保有していることが明らかになった。それらのSNPsを、20-KBウィンドウ単位の染色体領域ごとに集計し、各ウィンドウにおいて30SNPs以上が存在する81,542ウィンドウを対象に、遺伝的分化の程度を明らかにする集団ゲノム解析を行った。

180日から300日齢の産卵率が有意に異なる上位

10個体 ($88.8 \pm 1.9\%$)、下位10個体 ($34.4 \pm 7.0\%$) からなる2集団を用いた集団ゲノム解析の結果、産卵率に関与する計53の候補領域が検出された (Table 2)。これらの候補領域は、第1-3, 5-13, 15-19, 23-25および27染色体上に存在し、候補領域のサイズは、平均232KB、最小20KB、最大2.15MBであった。候補領域サイズの中央値が30KBであることから明らかなように、ほとんどの候補領域は、20-30KBのサイズであり、1MBを超える候補領域は4つであった。

300日齢の卵殻強度が有意に異なる上位9個体 ($4.0 \pm 0.4 \text{ kg/cm}^2$)、下位9個体 ($2.9 \pm 0.5 \text{ kg/cm}^2$) からなる2集団を用いた集団ゲノム解析の結果、計42の候補領域が検出された (Table 2)。それらは、第1-7, 9-11, 19, 20, 23, 25, 27および28染色体上に存在し、候補領域サイズは、平均123KB、最小20KB、最大1.36MB、中央値20KBであった。多くの候補領域は20KBであり、1MBを超える候補領域は1つであった。

これまでに多くの研究グループによって、ニワトリの産卵率および卵殻強度に関与する遺伝子座 (Quantitative Trait Locus ; QTL) を明らかにする試みがなされてきた³⁾。従来のQTL解析は、遺伝子座の信頼区間が広範囲にわたることから、それぞれのQTL領域に多数の候補遺伝子があげられることが課題点とされてきた⁴⁾。本研究の結果、産卵率および卵殻強度に関与する多くの候補領域のサイズは20-30KBであったことから、従来のQTL解析の結果と比較して、きわめてマッピン

グの解像度が高く候補領域を検出することができたことが分かる。このことは、今後計画している大規模な集団を対象にした産卵率および卵殻強度に関する関連解析を効率よく進めるために有益な情報を与えるものと考えられる。さらなる研究によって、本研究において検出された候補領域が名古屋種に特異的なものであるのか、比内鶏などの他の日本鶏においても共通なものであるのかを明らかにしていきたいと考えている。

4. 要 約

肉用地鶏の雌系において、産卵率および卵殻質のさらなる向上は、鶏肉増産に向けた産業上の最重要課題の一つである。本研究では、産卵率および卵殻強度の表現型の多様性に関与する遺伝子座を同定し、今後の雌系名古屋種の集団を効率良く改良するための基礎的知見を得ることを目的とした。次世代シーケンサーを用いた全ゲノムリシーケンスにより、名古屋種の雌は、集団として8,563,560 SNPsを保有していることが明らかになった。産卵率の表現型に基づき上位10個体および下位10個体の集団を対象に、集団間の遺伝的分化の程度をゲノムワイドで比較した結果、第1-3, 5-13, 15-19, 23-25および27染色体上に計53

の候補領域を検出した。卵殻強度の表現型に基づいた上位9個体および下位9個体の集団を対象にした集団ゲノム解析により、第1-7, 9-11, 19, 20, 23, 25, 27および28染色体上に計42の候補領域が検出された。これらの候補領域は、従来のQTL解析と比較して、きわめて高解像度にマッピングされた。今後のさらなる解析によって、名古屋種の集団が保有する、どのような遺伝子における変異が産卵形質に関与しているのかを明らかにするとともに、比内鶏などの他の日本鶏品種において共通する候補領域を探索する計画である。

文 献

- 1) Goto, T., Shiraishi, J.-i., Bungo, T., Tsudzuki, M. : Characteristics of egg-related traits in the Onagadori (Japanese Extremely Long Tail) breed of chickens, *Journal of Poultry Science*, **52**, 81~87, 2015.
- 2) Lawal, R. A., Al-Atiyat, R. M., Aljumaah, R. S., Silva, P., Mwacharo, J. M., Hanotte, O. : Whole-genome resequencing of Red Junglefowl and indigenous village chicken reveal new insights on the genome dynamics of the species, *Frontiers in Genetics*, **9**, 264, 2018.
- 3) Goto, T., Tsudzuki, M. : Genetic mapping of quantitative trait loci for egg production and egg quality traits in chickens : a review, *Journal of Poultry Science*, **54**, 1~12, 2017.
- 4) Andersson, L., Georges, M. : Deciphering the genetics of complex traits, *Nature Reviews Genetics*, **5**, 202~212, 2004.

牛の暑熱ストレス耐性を担う *HSP70.1* 遺伝子多型に関する研究

The study of polymorphism in the bovine *HSP70.1* gene associated with thermotolerance

森 美 幸

(福岡県農林業総合試験場生産環境部)

Miyuki Mori

(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center)

Summer heat stress decreases in the livestock products production and causes low conception in cattle. Strategy of breeding method is required to selection of the individual having heat resistance. Heat shock protein 70.1 is a molecular chaperone that is responsible for cellular protection against heat shock, potential candidate genes for stress susceptibility. In this study, we identified single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in the partial regions of 3' and 5' untranslated regions (UTR) of *HSP70.1* in Japanese Black. One hundred three Japanese Black cows were genotyped; 4 SNPs in 3'UTR and 17 SNPs in 5'UTR were detected with sequence method. One deletion at base position g.895 and three transversions (g.1125 A/C, g.1128 G/T, g.1204 T/C) in 5'UTR have relation of the linkage disequilibrium by clustering analysis. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) derived from Japanese black cows and Holstein cows were isolated from blood samples and incubated at 41°C in thermal bath for 3h. Haplotyping based on these four SNPs (g.895, g.1125, g.1128, g.1204) were significantly influenced the cell viability after heat shock, haplotype B (CC, CC, TT, CC) in SNPs of g.895, g.1125, g.1128, g.1204 had heat resistance. However, the survival rate of PBMCs with haplotype A (CC, AA, GG, TT) and haplotype C (C-, AC, GT, TC) were decreased by heat shock. There were no significant differences in *HSP70.1*-mRNA expressions.

In conclusion, we evaluated that the 3' and 5'UTR of *HSP70.1* gene have polymorphism in Japanese Black. The SNPs of 5'UTR region may be useful as genetic markers contribute to selection for heat resistance in cattle.

1. 目 的

暑熱によるストレスは乳牛では泌乳量や繁殖成績低下、肉用牛では増体量の低下など、畜産物生産の面で大きな損失となっている。暑熱ストレスによる牛の生産性低下や損耗を克服するには、暑

熱環境下でも強健なストレス耐性を有する個体の選抜法開発という新たな視点での育種戦略が望まれる。牛の育種選抜は、血統情報による育種価やSNPs情報を用いたゲノミック評価の活用が進んでいるが、これらの評価対象形質は主に増体や乳量などの量的・質的形質であり、ストレス耐性や

繁殖性についてはいまだ確立されていない。

熱ショックタンパク質HSP70.1は、細胞質に存在するタンパク質の一種で、暑熱ストレスに反応して発現する分子シャペロンタンパク質として知られ、生命活動を担うさまざまなタンパク質を熱変性から保護、修復する役割を持つ。国外では、HSP70.1遺伝子の多型（HSP70.1-SNPs）と乳牛の供用年数や交雑種の子牛生産率、直腸温度との関連について報告があるが¹⁻³⁾、HSP70.1-SNPsのアレル頻度には品種や地域差があり⁴⁾、多型と高温耐性との関係についてはいまだ不明な点が多い。また、国内の黒毛和種、ホルスタイン種ではHSP70.1遺伝子多型についてはほとんど明らかにされていない。

そこで本研究では、耐暑性に着目した個体選抜や育種改良に活用できるDNAマーカーの開発へ向けた基礎的知見を得ることを目的として、HSP70.1遺伝子のSNPs検索および末梢血単核細胞を用いた高温耐性評価とHSP70.1-SNPsとの関連について調べた。

2. 方 法

2.1 黒毛和種におけるHSP70.1遺伝子多型（HSP70.1-SNPs）検索

食肉処理場由来の黒毛和種雌牛の卵巣実質部分より組織片を採取し、-80℃で保存した後NucleoSpin Tissue（タカラバイオ）を用いてDNA

を抽出した。HSP70.1遺伝子の非翻訳領域に相当する3'UTR（GenBank accession No AY626950.1）および5'UTR（M98823.1）の一部配列について特異的プライマー（Table 1）を用いてPCR増幅した。増幅産物をExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents（サーモフィッシュサイエンティフィック）で精製した後、DNAシーケンス（ユーロフィンジェノミクス株式会社）により塩基配列情報を取得し、SNPsの検出およびアレル頻度について調べた。3'UTRは102頭、5'UTRは103頭分の配列情報を取得した。

2.2 HSP70.1遺伝子多型と暑熱ストレス耐性との関連

福岡県農林業総合試験場で飼養している黒毛和種雌牛11頭およびホルスタイン種雌牛23頭より血液を採取し、NucleoSpin Blood（タカラバイオ）を用いてDNAを抽出した。2.1の黒毛和種雌牛卵巣と同様に、HSP70.1遺伝子3'UTRおよび5'UTRの一部配列についてPCR増幅、増幅産物を精製した後にDNAシーケンスにより塩基配列情報を取得し、SNPsの検出およびアレル頻度を調べた。

また、高温負荷に対する耐性評価として、末梢血単核細胞を用いて暑熱期の牛体温と同じ条件を再現した培養試験を行った。末梢血単核細胞の採取にあたっては、BDバキュティナCPTクエン酸Na単核球分離用採血管（日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）を用いて採血を実施した。室

Table 1 Primer information

Region / Gene	Sequence (5'-3')	Product length	Accession number
HSP70.1-3'UTR	F: GGATTGCTCATGTTTGTTATGG R: CTTGGAAGTAAACAGAAACGGG	253	AY626950.1
HSP70.1-5'UTR	F: GCCAGGAAACCAGAGACAGA R: CCTACGCAGG AGTAGGTGGT	539	M98823.1
18rRNA	F: AAACGGCTACCACATCCAAGG R: GCGGAAGGATTTAAAGTGGAATC	138	DQ066896
HSP70.1	F: GACAAGTGCCAGGAGGTGATTT R: CAGTCTGCTGATGATGGGGTTA	117	U09861

温, 3,500rpmで30分間遠心分離して単核細胞を含む層を分離させ, ゲルバリア上に形成された細胞層を15mlチューブに回収した。末梢血単核細胞層を回収したチューブに0.1%PVP加DPBS (シグマアルドリッチ, サーモフィッシャーサイエンティフィック) 10mlを加え, 800rpmで15分間遠心分離して上澄みを吸引除去, この操作を2回繰り返して細胞の洗浄を行った後, $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個の細胞ペレットを10%新生仔牛血清加DPBSに懸濁した。高温負荷培養試験には小型恒温槽 (MD-MINI) を使用し, 暑熱期における生体体温に相当する41℃ (高温区) で3時間培養を行った。対照として, 通常の牛生体の平均体温に相当する38.5℃で3時間培養した区 (対照区) を設定した。培養後の末梢血単核細胞をサンプリングし, 生存率および*HSP70.1*遺伝子発現を調べた。生存率は, 蛍光二重染色 (ヘキスト33342, プロピディウムイオダイド) による核染色を行い, 蛍光顕微鏡を用いて生細胞と死細胞の割合を調査した。遺伝子発現解析については, RNeasy mini kit (キアゲン) のプロトコールに従ってRNA抽出を行い, QuantiTect Reverse Transcription Kit (キアゲン) を用いて逆転写反応を実施した。内部標準遺伝子として18 s リボゾーマルRNA (18rRNA) を用い, *HSP70.1*遺伝子 (Table 1) の発現についてPower SYBR Green PCR Master Mix (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いてリアルタイムPCR (ABI7500, アプライドバイオシステムズ) により解析した。相対発現量の算出については $\Delta\Delta$ CT法を用いて行った。

2.3 統計処理

末梢血単核細胞の生存率および*HSP70.1*遺伝子発現解析については, 対照区と高温区間で対応のあるt検定を実施した。なお生存率については, 逆正弦変換後にt検定を実施した。

3. 結果と考察

3.1 黒毛和種における*HSP70.1*遺伝子多型 (*HSP70.1*-SNPs)

黒毛和種雌牛卵巣から抽出したDNAより*HSP70.1*遺伝子の非翻訳領域3'UTR (参照配列AY626950.1) および5'UTR (同M98823.1) の配列について, 遺伝子多型 (*HSP70.1*-SNPs) の存在箇所検出およびアレル頻度を調査した。3'UTRには, g.101 (A/G), g.176 (C/T), g.210 (G/A), g.215 (A/G) の計4か所に多型が検出された (Table 2)。5'UTRには, g.895 (C/DEL), g.983 (C/T), g.1036 (C/T), g.1045 (G/A), g.1058 (A/G), g.1076 (G/A), g.1096 (A/G), g.1117 (G/A), g.1125 (A/C), g.1128 (G/T), g.1132 (A/G), g.1134 (T/C), g.1138 (C/T), g.1154 (C/G), g.1204 (T/C), g.1228 (C/T), g.1246 (A/G) の計17か所に多型が検出された (Table 2)。黒毛和種において検出された5'UTRのg.1138 (C/T), g.1228 (C/T) については, これまで国外の在来種やホルスタイン種においては報告されていないSNPsであり, 他のSNPsについてもこれらの品種とはアレル頻度が異なっていた^{2, 4, 5)}。本解析で得られた黒毛和種の5'UTRに検出された多型についてクラスター分析を実施したところ, g.895, g.1125, g.1128, g.1204の4か所については類似度が高く, 連鎖不平衡の関係, つまりハプロタイプであると推定された (Fig. 1)。

3.2 *HSP70.1*遺伝子多型と暑熱ストレス耐性との相関

当场飼養の黒毛和種雌牛11頭においては, *HSP70.1*遺伝子の非翻訳領域3'UTRのg.176, g.210, g.215にヘテロ型の多型を有する個体が存在していたがその割合は低かった。5'UTRにはg.895, g.1045, g.1117, g.1125, g.1128, g.1204, g.1246に多型が検出された。ホルスタイン種雌牛

Table 2 Genotype of HSP70.1-SNPs

Region	SNPs	Genotype frequency (%)									
		Japanese Black*				Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center					
						Japanese Black			Holstein		
3'UTR	101	A/G	AA	AG	GG	—			—		
			73.5	24.5	2.0						
	176	C/T	CC	CT	TT	CC	CT	TT	—		
			73.5	24.5	2.0	66.7	33.3	0			
	210	G/A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	—		
5'UTR	215	A/G	AA	AG	GG	AA	AG	GG	—		
			77.5	19.6	2.9	77.8	22.2	0			
	895	C/Del	CC	C/	//	CC	C-	—	CC	C-	—
			59.2	25.2	15.5	54.5	45.5	0	65.2	34.8	0
	983	C/T	CC	CT	TT	—			—		
			90.3	8.7	1.0						
	1036	C/T	CC	CT	TT	—			—		
			90.3	7.8	1.9						
	1045	G/A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	—		
			72.8	17.5	9.7	90.9	9.1	0			
	1058	A/G	AA	AG	GG	—			—		
			90.3	8.7	1.0						
	1076	G/A	GG	GA	AA	—			—		
			89.3	9.7	1.0						
	1096	A/G	AA	AG	GG	—			AA	AG	GG
			77.7	19.4	2.9				91.3	8.7	0
	1117	G/A	GG	GA	AA	GG	GA	AA	—		
			66	20.4	13.6	81.8	18.2	0			
	1125	A/C	AA	AC	CC	AA	AC	CC	AA	AC	CC
			35.9	37.9	26.2	36.4	36.4	27.3	26.1	30.4	43.5
	1128	G/T	GG	GT	TT	GG	GT	TT	GG	GT	TT
			39.8	35.9	24.3	36.4	36.4	27.3	26.1	30.4	43.5
	1132	A/G	AA	AG	GG	—			—		
			90.3	8.7	1.0						
	1134	T/C	TT	TC	CC	—			—		
			72.8	17.5	9.7						
	1138	C/T	CC	CT	TT	—			—		
			90.3	8.7	1.0						
	1154	C/G	CC	CG	GG	—			CC	CG	GG
			78.6	18.4	2.9				91.3	8.7	0
	1204	T/C	TT	TC	CC	TT	TC	CC	TT	TC	CC
			16.5	35.9	47.6	36.4	36.4	27.3	26.1	30.4	43.5
	1228	C/T	CC	CT	TT	—			—		
			90.3	8.7	1.0						
	1246	A/G	AA	AG	GG	AA	AG	GG	—		
			81.6	13.6	4.9	72.7	27.3	0			

*Genotyped from Japanese Black ovaries collected from a local abattoir.

23頭では、3'UTRには多型が検出されなかったが、5'UTRにおいてはg.895, g.1096, g.1125, g.1128, g.1154, g.1204に多型が検出された (Table 2)。

場内の黒毛和種およびホルスタイン種雌牛について、5'UTRのクラスター分析における類似度が高い4か所のSNPs (g.895, g.1125, g.1128, g.1204) について、g.895, g.1125, g.1128, g.1204の塩基

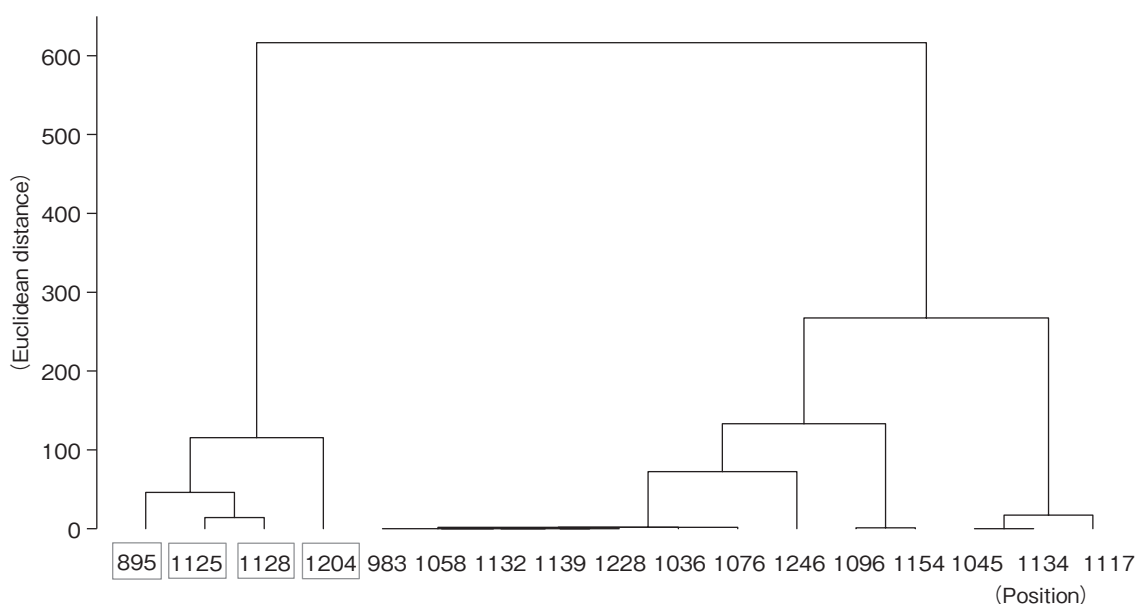


Fig. 1 Dendrogram constructed by *HSP70.1*-SNPs detected at the 5'UTR region.

置換がないハプロタイプ A (CC, AA, GG, TT), g.895の置換がなく g.1125, g.1128, g.1204 がホモで置換しているハプロタイプ B (CC, CC, TT, CC), g.895, g.1125, g.1128, g.1204 のヘテロ置換が起きているハプロタイプ C (C-, AC, GT, TC) の 3 グループに分類して末梢血単核細胞の高温負荷試験を行い、細胞生存率および *HSP70.1*-mRNA 発現量を比較した。高温負荷試験後の末梢血単核細胞の生存率は、ハプロタイプ A と C では高温区 (41℃) の生存率が対照区 (38.5℃) に比べて低下したが、ハプロタイプ B では高温による生存率の低下は認められなかった (Table 3)。 *HSP70.1*-mRNA 発現量は、ハプロタイプ間に有意な差は認められなかった (Fig. 2)。 g.895 のシトシン (C) 欠損型と繁殖性、生産性については負の相関があるという報告が多く、乳牛や交雑種牛の連産性や子牛生産率が低いこと^{1, 2)}、交雑種雄牛の精液性状や凍結融解後の生存性が劣る⁶⁾ことが報告されている。 g.1125, g.1128 については、Rosenkranz らは g.1125

置換型, g.1128 置換型は子牛生産率が低く, g.1204 については相関が認められなかったと報告している²⁾。一方 Basirico らは, g.895 のホモ欠損型, g.1128 置換型は、いずれも高温負荷後の末梢血単核細胞の *HSP70.1*-mRNA 発現と生存率が高いと報告している⁷⁾。これらの報告はいずれも単独の SNPs について検証しており、それぞれ正負の効果についての可能性が示唆されているが、黒毛和種における本解析ではこれらの 4 か所の SNPs については連鎖不平衡の関係を有するハプロタイプであると考えられ、個体の高温耐性については複数の SNPs が連鎖するハプロタイプ効果を評価する必要があることが示唆された。ストレスマーカーである *HSP70.1* は、高温感作により発現が誘導されることが知られるが、本試験の末梢血単核細胞に対する 41℃ 3 時間の高温負荷試験では、 *HSP70.1*-mRNA の差が判然としなかった。末梢血単核細胞を用いた Basirico らの報告では、43℃ の高温下では 1 時間後に *HSP70.1*-mRNA 増加が認められたものの 4 時間後には生存率が大きく低下し、遺

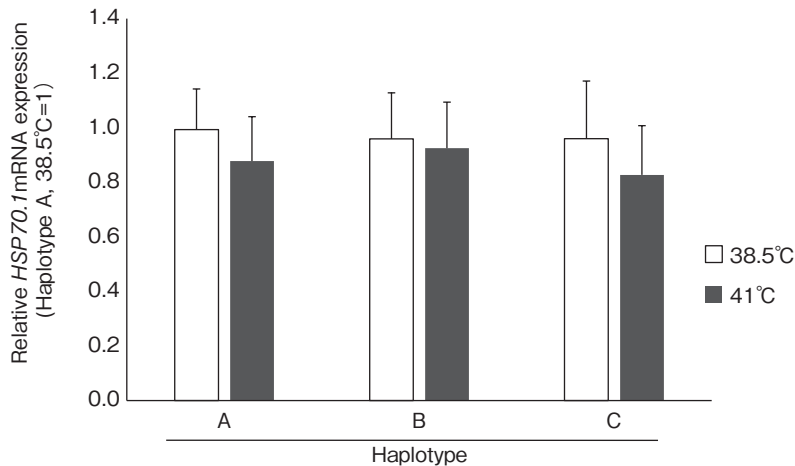
Table 3 The survival rate of bovine peripheral blood mononuclear cells after heat shock.

HSP70.1-SNPs at 5'-UTR							cell viability (%)			
Position		895	1125	1128	1204	n	0h	Cultured 3h		
		CC	AA	GG	TT			38.5℃	41℃	ttest
Haplotype	A	CC	AA	GG	TT	5	95.3±2.0	88.9±3.3	80.6±3.6	*
	B	CC	CC	TT	CC	4	97.7±0.8	90.7±3.0	88.2±2.7	n.s
	C	C-	AC	GT	TC	5	96.2±0.8	89.0±0.9	76.4±3.8	†

n : Japanese Black (JB) and Holstein cows (H) in Fukuoka Agriculture and Research Center.

Haplotype A (n=5; JB 2+H 3), Haplotype B (n=4; JB 1+H 3), Haplotype C (n=5; JB 2+H 3).

* $p<0.05$, † $p<0.1$

**Fig. 2** HSP70.1-mRNA expression of bovine peripheral blood mononuclear cells.

Peripheral blood mononuclear cells were incubated at 38.5℃ or 41℃ for 3h. Results are means ± SEM of the fold change relative to that on Haplotype A cultured at 38.5℃ as a control.

伝子発現量の差も認められていない⁷⁾。牛胚盤胞では、凍結融解後41℃ 6時間の高温条件下で培養するとHSP70.1-mRNAは有意に増加したが、48時間後には差は認められていない⁸⁾。体外培養由来の単層の牛子宮内膜上皮細胞においては、41℃ 3時間でHSP70.1-mRNAの有意な増加が認められている⁹⁾。HSP70.1の遺伝子レベルでの発現変動の発動と持続時間については細胞種や培養形態により異なる可能性があり、末梢血単核細胞のHSP70.1-mRNA発現については本試験での調査時間とは異なる時間帯に変化が起きていた可能性があると考えられた。また、本試験では試験区分によっては高温培養後の生存率が培養前と比較し

て20%前後も低下しており、高温により浮遊細胞である末梢血単核細胞の生存性が損なわれ、熱ショックに対する細胞の応答反応であるHSP70.1増加という分子シャペロンが機能しなかった可能性もあると考えられた。

本研究により、国内の主要な肉用品種である黒毛和種におけるHSP70.1-SNPsに関する遺伝子型とアレル頻度が明らかとなり、ハプロタイプにより高温感受性に差がある可能性が示唆された。今後は、暑熱ストレス検出マーカー選抜へ向け、これらのHSP70.1遺伝子多型が暑熱ストレス関連遺伝子群の発現に及ぼす影響について解明を進めるとともに、暑熱期における個体の生産性、繁

殖性に着目した能力評価を行う必要があると考えられる。

4. 要 約

本研究では、牛耐暑性に関するDNAマーカー開発を目的としたHSP遺伝子のSNPs検索および高温耐性との関連について解析を行った。黒毛和種における熱ショックタンパク質関連遺伝子 *HSP70.1* の非翻訳領域である3'UTR, 5'UTRについて調べたところ、3'UTRに4か所、5'UTRに17か所にSNPsが存在することを明らかにした。そのうち5'UTRに存在する4か所のSNPsは連鎖不平衡の関係が認められ、末梢血単核細胞への高温負荷試験では、ハプロタイプにより細胞生存率への影響に違いが認められた。

文 献

- 1) Schwerin, M., Sanftleben, H., Grupe, S. : *Arch Tierz.* **46**, 178~185, 2003.
- 2) Rosenkrans Jr, C., Banksa, A., Reitera, S., Looper, M. : *Ani Rep Sci*, **119**, 178~182, 2010.
- 3) Xiong, Q., Chai, J., Xiong, H., Li, W., Huang, T., Liu, Y., Suo, X., Zhang, N., Li, X., Jiang, S., Chen, M. : *Cell Stress and Chaperones*, **18**, 711~718, 2013.
- 4) Oner, Y., Keskin, A., Ustuner, H., Soysal, D., Karakas, V. : *S Afr J Anim Sci*, **47**, 424~439, 2017.
- 5) Syahrudin Said, Widya Pintaka Bayu Putra. : *Biodiversitas*, **19**, 1622~1625, 2018.
- 6) Deb, R., Sajjanar, B., Singh, U., Kumar, S., Sengar, G. S., Alex, R., Das, A. K., Tyagi, S., Raja, T. V., Alyethodi, R. R., Singhi, R., Bhanuprakash, V., Prakash, B. : *J Genet*, **95**, 1035~1038, 2016.
- 7) Basirico, L., Morera, P., Primi, V., Lacetera, N., Nardone, A., Bernabucci, i U. : *Cell Stress Chaperones*, **16**, 441~448, 2011.
- 8) Mori, M., Hayashi, T., Isozaki, Y., Takenouchi, N., Sakatani, M. : *Jour Reprod Dev*, **61**, 423~429, 2015.
- 9) Mori, M., Hayashi, T., Ueda, S., Shimomura, K. : *Jour Reprod Dev*, **62** Suppl, P-60, 2016.

DNAメチル化網羅解析法による種雄牛の受胎性の評価

Genome-wide DNA methylation analysis for early evaluation of bulls

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

(Hokkaido University, Graduate School of Veterinary Medicine)

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 utilize the novel genomic screening system for DNA methylation in cow (Bovine DREAM) to investigate association between DNA methylation and conception rate of bovine spermatozoa.

We studied eight spermatozoa from bulls for genome-wide quantitative DNA methylation analysis with next-generation sequencing. We had 22,246 CpG sites that were commonly obtained from all eight samples by Bovine DREAM. Clustering analysis with these CpG sites identified a clearly separated two clusters. Then, we focused on CpG sites that are highly variable and that are located closely to genes reported to be imprinting genes in human and mouse. We performed bisulfite-pyrosequencing to analyze five CpG sites of genomic DNA from another set of 17 spermatozoa samples from bulls. As a result, four out of five CpG sites were successfully analyzed. We found there were two CpG sites that showed higher DNA methylation levels in a group of spermatozoa with high conception rate than those with low. Interestingly, these two CpG sites are found to be close to “gene A”.

Bovine DREAM is found to identify candidate CpG sites that could be associated with conception rate of bovine spermatozoa. Further study should be performed to validate these result with a large number of spermatozoa samples. These results will help identify the mechanism of change in sperm parameters and reproduction performance of bulls.

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を示唆されつつある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事が判明している²⁾。一方、近年シーケンス技術が発展し、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さまざま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さまざま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に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がある。

そこで、本申請者は昨年度の同研究助成によって牛のDNAメチル化のゲノムワイドな検討が可

能となる解析法 (Bovine DREAM) を樹立することに成功した。具体的には、牛精子DNAにおいて100,000箇所にもわたるDNAメチル化レベルを検討することが可能であり、組織特異性と個体特異性を検出することが可能であった。本年度は同解析法をさまざまな受胎性を示す種牝牛由来精液を用いることによって、特に受胎性に関連性が高いDNAメチル化変化領域の特定を試みた。

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

凍結精液サンプルをPBSで洗浄し、 2×10^6 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) による濃度測定と100ngを1%アガロースの電気泳動にて泳動像を確認し、ゲノムDNAに大幅な切断がないことを確認する。

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とともに認識配列とするDNAメチル化感受性／非感受性制限酵素ベア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、シーケンス用アダプター (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、次世代シーケンス用のライブラリ作製を行った。得られたライブラリを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を用いたシーケンスを行った。得られたfastqシーケンスデータの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。精液サンプルと並行し, 血液3サンプルも同時に解析に供した。

2.2 DNAメチル化変化領域に対する確証実験
ゲノムワイド解析によって得られた, 受胎性と関連すると考えられるDNAメチル化の変化領域に対して, 局所のDNAメチル化解析に関して最も信頼性があり, ゲノムワイドな探索解析に比べ比較的 low コストで解析が可能であるバイサルファイトパイロシーケンス法を用いて検討を行った。ゲノムワイド解析に用いたサンプルとは異なる精液17サンプルを入手, DNA抽出後, バイサルファイト変換をinnuCONVERT Bisulfite Basik Kit (Analytik jena) によって行った。対象領域を増幅するようなプライマーを設計後, 増幅させパイロシーケンサー (QIAGEN) によってDNAメチル化レベルを検討した。

3. 結果と考察

はじめに精液サンプル由来のゲノムDNAより作製したライブラリを作製したところ, 前回報告の通り, 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。この現象は牛特異的であり, このバンドパターンの除去方法を現在もPCR条件を変更することで解決策を探っている最中である。これらのライブラリサンプルをシーケンスへと供し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, ライブラリの量に問題がないことが確認された。次にこのfastqシーケンスデータを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。これらの原因としてやはり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法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ケ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。まず種雄牛由来精液サンプルの8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22,246CpGサイトについて検討を行った。その結果, 48%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20%が遺伝子のプロモーター領域由来のCpGサイトであった。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, 今回用いた精液8サンプルが大きく2群に分かれることが判明した (Fig. 1)。

次に, これら22,246CpGサイトの定量的DNAメチル化データを詳細に検討し, 特異的な変化を伴うサイトを同定しようと試みた。受胎率の高低との関連を検討するため, DNAメチル化レベルが本8サンプルにおいて変動が大きい箇所 (標準偏差の大きい箇所), および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メチル化の異常であると報告されているため, ヒト, マウス, また牛においてインプリンティング遺伝子として報告のある遺伝子にまず着目した。その結果, 変動の大きいCpGサイト上位1000箇所のうち, 20箇所のCpGサイトの近傍にインプリンティング遺伝子として報告されているものが含まれていた。このうち, 牛においても真にインプリンティング機構が働いていれば血液サンプルならば50%のDNAメチル化の値を示すはずであるため, この条件に合致した3箇所を優先的に, またこれ以外にも2箇所

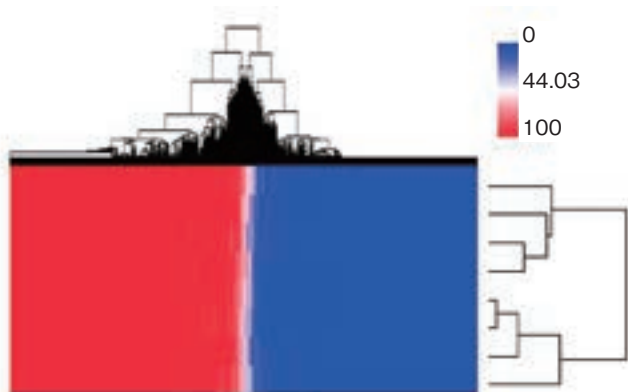


Fig.1 Hierarchical clustering analysis of eight samples used for Bovine DREAM in this study. DNA methylation levels are shown in blue as low to red as high. Note that there two clusters separated clearly.

所を対象領域として後述の検証実験へと進めることにした。なお、Carvalho et al.⁷⁾によって検討されたIGF2R遺伝子の近傍のDNAメチル化レベルは性選別前後だけでなく、種雄牛間においてもまったく変わりなかった。

次に、Bovine DREAMによって抽出された候補領域に対しての検証実験を新たなサンプルセットを用いることで試みた。前項にて同定された、ウシゲノム上におけるDNAメチル化特異的变化候補領域に対して、さまざまな種牡牛、また異なる時期に採精された精液サンプルをその既知の受胎率とともに17サンプルほど入手し、バイサルファイトパイロシーケンス法を用いて検討を行った。なお、Bovine DREAMの値の正確性を確認するため、血液サンプルを含め7サンプルを同時に解析に供した。その結果、解析対象領域5箇所のうち4箇所でDNAメチル化レベルの定量が可能であった。また、パイロシーケンスによって結果の得られた値は、Bovine DREAMにて得られたDNAメチル化のレベルとほぼ同程度の結果を示しており、その正確性が再確認された。

新規の精液17サンプルの受胎率によって、高(10サンプル)および低(7サンプル)にグルー

プ分けを行い、各対象領域のDNAメチル化レベルの違いに関して検討を行ったところ、4箇所中2箇所において受胎率の高いグループにおけるDNAメチル化が高い傾向を示していた(Fig.2, CpG 1, 2)。興味深いことに、これら2箇所は同じ遺伝子Aの近傍に存在するものであり、この遺伝子近傍のDNAメチル化が受胎率の違いに関して何らかの関連をもつことが強く示唆された。その他2箇所に関しては本検討では違いは認められなかった。

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し、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に関する新規項目として樹立を目指す。また当該遺伝子の機能に注目することで、受胎率低下を関連づける根本的メカニズムの解明や、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さまざまな異常なDNAメチル化と男性不妊や胎児発達異常との強

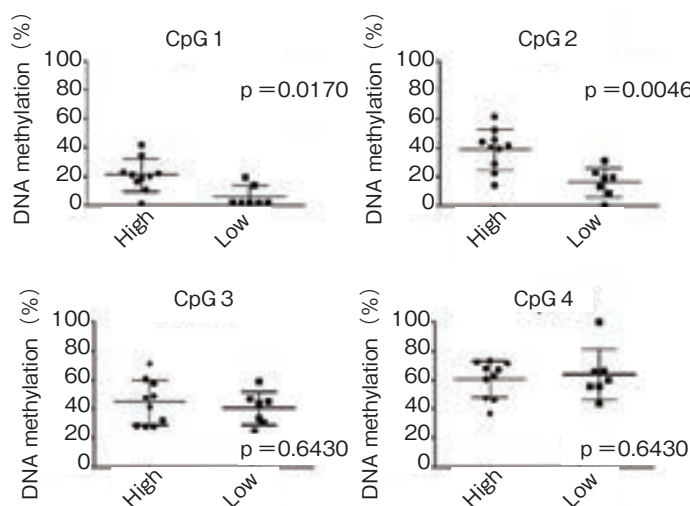


Fig.2 DNA methylation levels of CpG 1, 2, 3, and 4 analyzed by bisulfite-pyrosequencing between conception rates of High and Low groups.

い関連が指摘されている背景から、すでに樹立した牛のDNAメチル化のゲノムワイド解析法により種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下に関連するDNAメチル化の関連性を検討した。本研究ではまず異なる種雄牛由来8サンプルからの精液を用いてDNAメチル化網羅の解析を行った。次世代シーケンスにより全8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22,246CpGサイトについてクラスタリング解析を行ったところ、大きく2群に分けられた。DNAメチル化レベルの変動が大きく、またヒトやマウスにおいてインプリンティング遺伝子として報告されている近傍のCpGサイトについて、新規精液サンプルを用いてさらに検討を行った。本検討では、このうち4領域においてはCpGサイトの局所解析として信頼性の高いバイサルファイトパイロシーケンスによる解析が可能であった。その結果、このうち2箇所のCpGサイトが、受胎率の高いグループと低いグループとの比較においてDNAメチル化レベルにおける差が認められ、興味深いことにこの2箇所のCpGサイトは同一遺伝

子Aの近傍に存在していた。今後対象種雄牛数を増やすことによって今回同定されたCpGサイトの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について確証を得る予定である。また、本研究を基盤として、種雄牛の精液性状の変化と受胎率低下に関連づける根本的メカニズムの解明を目指す。

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., Mehta, 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., Elsie, 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 U S A*, **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.

霜降り豚肉の生成に関わる生体内因子の探索

Investigation of a bio-marker relating to pork meat marbling

谷口 雅章¹・中島 郁世¹・荒川 愛作¹・吉岡 豪²・鈴木 香澄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岐阜県畜産研究所)

Masaaki Taniguchi¹, Ikuyo Nakajima¹, Aisaku Arakawa¹, Go Yoshioka² and Kasumi Suzuki²

(¹Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, ²Gifu Prefectural Livestock Research Institute)

Previously, we identified quantitative trait loci (QTL) for intramuscular fat (IMF) content in Duroc pigs. Introgression of those QTL by marker-assisted selection enabled to establish a novel Duroc strain (Buono-Brown : BB) with twice as much IMF content as a basic strain of Duroc at Gifu prefectural Livestock Research Institute. Today, the BB strain produces pork meat with average IMF of 6%. To identify molecular markers which are associated with IMF content in pork carcass, we aimed to elucidate a broad overview of metabolites profiles which are potentially associated with longissimus dorsi (LD) muscle. Pork carcasses were planned to be produced by Landrace and Large White crossbred sows mated with the BB boars. We aimed to compare the metabolites profiles in serum between 3 groups of fattening pigs : 1) control (0.56% Lysine level in feeding), 2) exp. 1 (0.76% Lysine) and 3) exp. 3 (0.96% Lysine). We planned to obtain blood samples from the fattening pigs at 120 d, 134 d, 148 d and just before slaughter. However, the outbreak of classical swine fever in Gifu prefecture hit directly the pig farm at prefectural Livestock Research Institute in December 2018. Right after that, all the pigs in the institute were ought to be sacrificed. Therefore, our planned examination was forced to be cancelled. However, we intend to start reproducing the BB strain using the basic genomics information in near future.

1. 目 的

一般的な養豚では、繁殖性や保育能力に優れる大ヨークシャー種およびランドレース種を母系とし、産肉性（肉量・肉質）に優れるデュロック種を父系として掛け合わせることで肉豚を生産する。そのため産肉性の高いデュロック種の育種改良が進められている。デュロック種の産肉性を向上させるうえで、筋組織における筋細胞および脂肪細胞の発達のバランスをいかにとるかが重要な

点である。欧米では赤身の多い豚肉生産に重点が置かれているが、我が国では独特の食習慣から豚肉にも霜降りが求められ、そのような豚肉を高品質と捉える向きもある。近年、北米では日本向けに輸出するために霜降りのある豚肉を生産しはじめている。国産の高品質豚肉を安定的に生産するためには、高能力のデュロック種系統豚を開発・普及させることが必須である。

岐阜県は農業生物資源研究所（現農研機構：代表者所属）との共同研究により、遺伝的な特性が

ら霜降り割合が6%を超える（一般的な豚肉は3%）特徴的な肉質を持つデュロック種系統豚であるポーノブラウンを開発した。また栄養学的研究により豚の第一制限アミノ酸であるリジンが要求量より低い飼料（低リジン給与）給与が霜降り割合を増加させる一方、高リジン給与は増体性に優れるが霜降り割合は低くなることが経験的に知られている。しかしながら、その生物学的メカニズムは現在のところ不明である。そこで、高霜降り割合の豚肉を安定的に生産するデュロック種系統豚を供給するためには、あるいは、霜降り割合と増体性の良さのバランスをとった飼養管理を実現するためには、給餌飼料中のリジン含量の違いにより飼料に含まれる栄養・エネルギーがどのように筋肉あるいは脂肪細胞へ変換するか分子生物学的メカニズムを解明する必要がある。本研究では、飼料中のリジン含量が豚枝肉の霜降り割合に影響するメカニズムを解明し、霜降り割合の指標となるバイオマーカー（代謝物・マイクロRNAを含む生体内因子）を同定する。

2. 方 法

2.1 供試豚および材料

岐阜県畜産研究所養豚・養鶏研究部にて生産される三元交雑豚（LWD種）について、120日齢より、リジン含量0.56%（対照区）、0.76%（実験区1）、および0.96%（実験区2）の3群に分け、2週間おきに148日齢まで3回の採血を行う。血液サンプルは遠心分離後、上清を回収して各分析に供試するまで-80℃にて保管した。

2.2 血清中の代謝物分析

Bligh & Dyer法¹⁾により血清中の代謝物を抽出し、オキシム化液およびメトキシアミン塩酸塩により誘導体化したものをガスクロマトグラフィー質量分析計にて代謝物の網羅的な解析を行う。

2.3 統計解析

統計解析は、*t*検定、部分的最小二乗回帰分析（PLS）ならびに主成分分析（PCA）を用いて、飼料中のリジン含量により変動した代謝物を同定する。

3. 結果と考察

試験豚は2018年10月上旬に120日齢となった段階で、順次リジン含量の異なる区に群分けし、飼料給与試験を開始したが、12月5日に同研究所において豚コレラ患畜が確認され、その後ただちに全頭殺処分された。そのため、飼料中のリジン含量による代謝物の変動ならびにIFM等の肉質への効果について検討するための材料が存在しないため、計画していた研究が続行不可能となった。

4. 要 約

豚の肥育期間中において飼料中のリジン含量がIMFに影響することはよく知られているがその分子生物学的メカニズムは不明な点が多い。遺伝的特性としてIMF含量が高い種豚ポーノブラウンの産子を用いたりジン含量の異なる飼養試験を行い、血中代謝物の変動を網羅的に解析し、IMFと関連のある代謝物の同定を検討しようと考えたが、豚コレラ発生により供試豚が殺処分されたため、計画を中止した。

文 献

- 1) Bligh, E. G., Dyer, W. J.: A rapid method for total lipid extraction and purification, *Can. J. Biochem. Physiol.* 37, 911~917, 1959.

※やむを得ない事情により研究は遂行できませんでしたが、助成対象として採択しましたので掲載しました。（事務局）

組織分化制御因子の遺伝子発現プロファイルに基づく 豚体外受精胚の新規培養技術の開発

Improvement of *in vitro* culture system of porcine IVF embryos by gene expression profiles involved in cell differentiation

澤 井 健・三 浦 瑠 璃
(岩手大学農学部)

Ken Sawai and Ruri Miura
(Faculty of Agriculture, Iwate University)

Although the procedure for *in vitro* production of porcine embryos such as *in vitro* fertilization (IVF) has improved, the efficiencies of embryo development and offspring production after embryo transfer are not high. In order to improve the efficiency of offspring production, functional assessment of porcine preimplantation embryos obtained by IVF is required. SOX2 is one of the key factors involved in the differentiation of mouse preimplantation embryos. However, knowledge on the roles of SOX2 in preimplantation development during porcine embryos is currently limited. This study examined the transcript and protein expression patterns of SOX2 and attempted to elucidate the functions of SOX2 during porcine preimplantation development using RNA interference. SOX2 mRNA was found to be upregulated at 2-cell to 16-cell stage, and nuclear localization of the SOX2 protein was detected at the 8-cell stage, as well as in subsequent developmental stage. SOX2 downregulation did not affect embryonic development until the blastocyst stage. Results of gene expression analysis showed that SOX2 downregulation did not affect the expression levels of *TEAD4* and *OCT-4* in 8- to 16-cell stage and blastocyst stage porcine embryos. However, at blastocyst stage, the total cell numbers and the rate of SOX2 positive cells in SOX2 downregulated embryos were lower than that in control embryos. Furthermore, localization of SOX2 signals in the inner cell mass of blastocyst obtained from SOX2 siRNA injection were difficult to detect. Our results indicated that SOX2 is an important factor for the preimplantation development of porcine embryos. In addition, it is possible that SOX2 expression status is a marker for functional assessment of porcine IVF embryos.

1. 目 的

豚は食肉としての利用はもとより、ヒトの疾患モデル動物としての利用や移植用臓器の生産を目的とした利用が期待される有用家畜である。しか

しながら、同じく有用家畜である牛において、胚移植を利用した子畜の生産技術が広く普及していることと比較して、豚における胚移植技術は普及していない。その理由として、牛では過剰排卵技術を利用した移植胚の生産技術が実用化されてい

るが、豚では同技術が実用化されておらず、移植胚の安定的な供給が困難なことがあげられる。そのため豚においては、体外受精 (IVF) を利用した移植胚の体外生産技術が注目されている。しかしながら、豚のIVF胚は、体外発生の効率が低いこと、移植後の受胎率が低いこと、早期胚死滅が高頻度で発生することなどが問題となっており、これら異常の原因解明とその克服が重要かつ緊急の課題となっている。

上記のような豚IVF胚に認められる課題を克服するためには、IVF胚を移植可能な段階 (胚盤胞期) まで体外で効率よく発生させることはもとより、胚移植後の高い受胎率と産子生産率を確保することが重要となる。そのためには、組織分化 (胎子・胎盤形成) や着床などの機能が正常なIVF胚を生産できる体外培養法を開発する必要がある、組織分化や着床など豚IVF胚の機能性を客観的に評価する指標が必要となっている。しかしながら、豚胚における組織分化や着床などの詳細な機構は明らかにされておらず、豚IVF胚の機能性を評価することは困難な状況にある。

哺乳動物胚において、桑実期から胚盤胞期にかけて起こる内部細胞塊 (ICM; 将来胎子になる細胞群) と栄養膜細胞 (TE; 将来胎盤になる細胞群) の分化は、胎子・胎盤形成や着床の起点となる重要なプロセスである。最近、申請者らは転写因子の一種であるOCT-4が豚胚のICMおよびTE形成に必須であることを明らかにし、OCT-4が豚IVF胚の機能性を評価する指標となる可能性を示した^{1, 2)}。一方、初期胚の組織分化はさまざまな因子が相互に作用しながら制御しているとされ、豚胚においてもOCT-4を含む複数の因子が組織分化に関与していると考えられる。

マウス胚においてOct-4と同様に初期胚の未分化性を維持している因子としてSRY-related HMG-box gene2 (SOX2) が知られている³⁾。豚

初期胚においてもSOX2 mRNAが発現していること、また、牛胚においてSOX2タンパク質が胚盤胞期のICMに局在することが明らかになっており⁴⁾、SOX2が豚初期胚の組織分化を制御する重要因子の一つである可能性がある。しかしながら、豚初期胚におけるSOX2の発現動態や、SOX2が豚初期胚の胚発生やICM/TE分化に及ぼす影響については明らかではない。そこで本研究では、豚初期胚の組織分化を制御する因子の新たな探索として、豚初期胚におけるSOX2の発現動態を明らかにするとともに、RNA干渉法を用いたSOX2の人為的発現抑制が豚初期胚の胚発生および組織分化に及ぼす影響について検討を行った。

2. 方 法

2.1 豚卵子の体外成熟、体外受精および体外発生

食肉処理場由来の豚卵巢から未成熟卵子を吸引採取し、1 mM dbcAMP, 10 IU/ml PMSGおよび10 IU/ml hCGを含む修正NCSU-37培地⁵⁾内で20時間培養した。その後、dbcAMP, PMSGおよびhCG無添加の修正NCSU-37培地で24時間培養を継続し、体外成熟 (IVM) 卵子を得た。IVM後の卵子をm-PigFM培地⁶⁾を用いて6時間媒精することによりIVF胚を得た。得られたIVF胚は、PZM-5培地⁷⁾を用いて、体外培養 (IVC) を行った。なお、IVM, IVFおよびIVCは、すべて38.5℃, 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂の気相条件下で行った。

2.2 siRNAの注入

SOX2遺伝子発現抑制用siRNA (SOX2 siRNA) およびいずれの遺伝子の発現も抑制しないコントロールsiRNA (Control siRNA) は、IVF後の1-細胞期胚の細胞質内にFemtojet (Eppendorf) を用いて注入した。

2.3 mRNA発現量解析

IVM後の卵子および各発生段階に発生した胚から抽出したmRNAをQuantitect Reverse Transcription Kit (Qiagen) を用いて逆転写しcDNAを得た。得られたcDNAを用いてQuantitect SYBR Green PCR Kit (Qiagen) によりリアルタイムPCRを行い、各遺伝子のmRNA発現量を測定した。リアルタイムPCRはStep One Real Time PCR system (Applied Biosystems) を用いて行った。なお、各遺伝子のmRNA発現量は、同一サンプル内のGAPDH発現量を用いて補正した。

2.4 蛍光免疫染色

IVM後の卵子および各発生段階に発生した胚を4%パラフォルムアルデヒドを用いて固定した。その後、0.1% Triton X-100を含むPBSで洗浄後、0.5% BSAと1% スキムミルクを用いてブロッキングし、SOX2の1次抗体(sc-365823; Santa Cruz Biotechnology)を用いて処理した後、Alexa488で標識された2次抗体(A11029; Invitrogen)で処理した。その後、VECTA-SHIELD with DAPI (Vector Laboratories) で封入した。

IVM卵子、1-細胞期胚、2-~4-細胞期胚、8-~16-細胞期胚、桑実期胚、胚盤胞期胚におけるSOX2 mRNA発現量の比較解析を行うとともに、IVM卵子、1-細胞期から16-細胞期までの各発生段階の胚、桑実期胚、胚盤胞期胚におけるSOX2タンパク質発現を解析した。次に、1-細胞期胚にSOX2 siRNAを注入する区(SOX2 siRNA区)、Control siRNAを注入する区(Control siRNA区)、siRNAを注入しない区(Uninjected区)を設け、それぞれの胚において8-~16-細胞期でのSOX2 mRNA発現量およびSOX2タンパク質発現を解析するとともに、胚盤胞期までの発生率を調べた。また、上記3区に由来する8-~16-細胞期胚および胚盤胞期胚のTEAD4および

OCT-4 mRNA発現量を解析した。さらに、上記3区における胚盤胞期胚の総細胞数およびSOX2発現陽性細胞率を測定するとともに、SOX2 mRNA発現量およびSOX2タンパク質発現を解析した。

3. 結果と考察

3.1 豚卵子および初期胚におけるSOX2発現動態

豚IVM卵子および各発生段階に発生した豚初期胚のSOX2 mRNA発現量をFig. 1に示した。SOX2 mRNA発現量は、IVM卵子、1-細胞期胚、桑実期胚、胚盤胞期胚に比べ、8-~16-細胞期胚で有意($p < 0.05$)に高い値を示した。一方、SOX2タンパク質は4-細胞期まで発現が認められなかったが、8-細胞期以降の胚の細胞核で発現が認められた。また、胚盤胞期胚ではSOX2のタンパク質発現に局在性が認められ、ICMと思われる部位にSOX2タンパク質発現が局在していた。豚初期胚でのSOX2 mRNA発現においては、胚盤胞期と比較して、4-細胞期から8-細胞期で高い発現量が認められるという報告⁸⁾と、4-細胞期から8-細胞期と比較して胚盤胞期で高い発現量が認められるという報告⁹⁾がある。本研究では、Zangらの報告⁸⁾と一致する結果が得られ、豚初期胚におけるSOX2 mRNA発現は8-細胞期から16-細胞期にかけて最も高いことが明らかとなった。また、マウス胚においてSOX2タンパク質はICMとTE両方に発現することが明らかとなっているが³⁾、本研究において、豚胚盤胞期胚ではSOX2タンパク質発現がICMに局在する可能性が示された。牛の胚盤胞期胚においてSOX2タンパク質発現がICMに局在することが明らかとなっており⁴⁾、本研究の結果から、豚胚と牛胚のSOX2発現の類似性が明らかとなった。

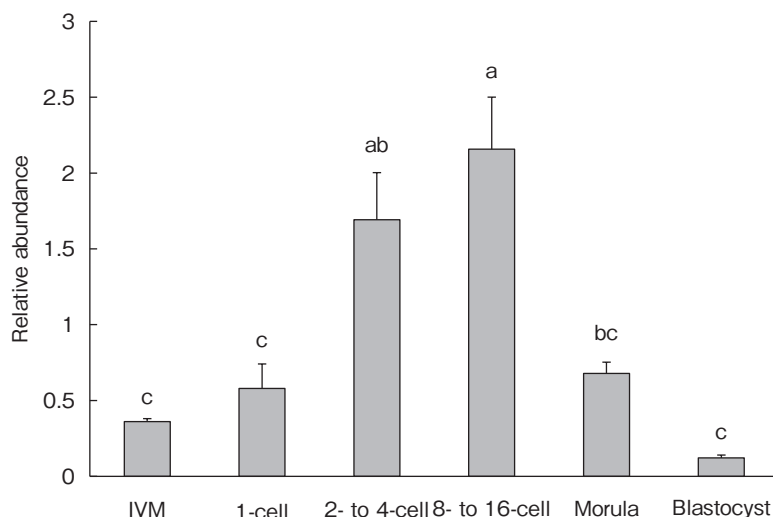


Fig. 1 Relative abundance (mean ± SEM) of SOX2 transcripts in porcine matured oocytes (IVM) and various stage embryos (n = 5).

^{a,b,c} Different superscripts indicate a significant difference ($p < 0.05$).

Table 1 Effect of SOX2 siRNA injection on *in vitro* development of porcine embryos*

Treatment	Number of embryos cultured	No. (%) [†] of embryos developed to			
		Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
		2-cell ≤	4-cell ≤	Morula	Blastocyst
Uninjected	274	215 (78.5) ^a	208 (75.9) ^a	50 (18.2)	65 (23.7)
Control siRNA	271	173 (63.8) ^b	152 (56.1) ^b	32 (11.8)	45 (16.6)
SOX2 siRNA	273	195 (71.4) ^{ab}	179 (65.6) ^b	36 (13.2)	41 (15.0)

* Experiments were replicated five times.

[†] Percentages of the number of embryos cultured.

^{a, b} Different superscripts indicate a significant difference ($p < 0.05$).

3.2 SOX2発現抑制が豚初期胚の初期発生に及ぼす影響

siRNA注入によりSOX2発現抑制を行った結果をTable 1に示した。IVC 3日目において4-細胞期以上に発生した胚の割合は、Uninjected区と比較してControl siRNA区およびSOX2 siRNA区で有意 ($p < 0.05$) に低い値を示したが、IVC 4日目の桑実期およびIVC 5日目の胚盤胞期への発生率では異なる処理区間で差は認められなかった。SOX2 siRNA区においては、8-~16-細胞期にお

いてSOX2 mRNA発現が他の区と比較して有意 ($p < 0.05$) に低い値を示し、さらにUninjected区およびControl siRNA区の16-細胞期胚の細胞核ではSOX2発現が認められたものの、SOX2 siRNA区ではSOX2発現が認められる細胞核が少なかった。これらのことから、SOX2 siRNA注入によりSOX2の発現が抑制されていることが示された。以上の結果から、豚初期胚においてSOX2は胚盤胞期胚への発生に影響を及ぼさない可能性が示された。

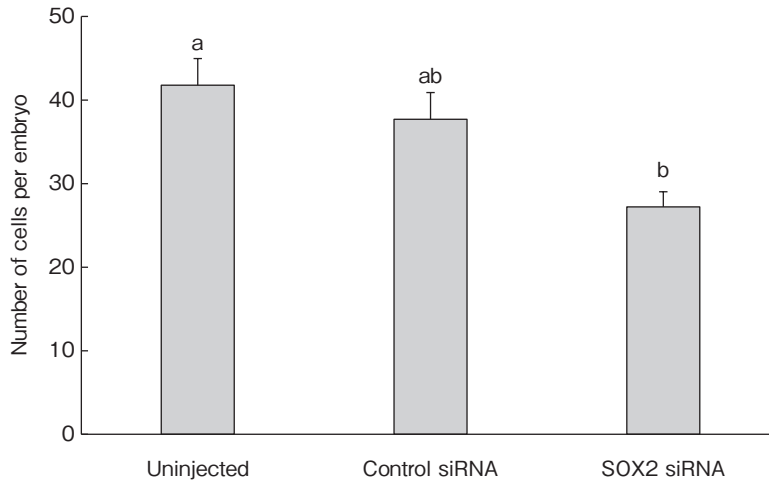


Fig. 2 Average number of total cells in porcine blastocyst stage embryos obtained from Uninjected (n=22), Control siRNA (n=26), or SOX2 siRNA (n=19) injection.

^{ab}Different superscripts indicate a significant difference ($p < 0.05$).

3.3 SOX2発現抑制が豚初期胚の組織分化に及ぼす影響

SOX2 siRNA区の8～16-細胞期胚および胚盤胞期胚における*TEAD4*および*OCT-4* mRNA発現量は、Uninjected区およびControl siRNA注入区と比較して有意な差は認められなかった。一方、SOX2 siRNA区における胚盤胞期胚の総細胞数は、Uninjected区と比較して有意 ($p < 0.05$) に少ない値を示した (Fig. 2)。さらに、胚盤胞期におけるSOX2発現陽性細胞率はUninjected区およびControl siRNA区と比較してSOX2 siRNA区で有意 ($p < 0.05$) に減少した。また、Uninjected区およびControl siRNA区においては、胚盤胞期のICMと思われる細胞群でSOX2タンパク質発現の局在が認められたのに対し、SOX2 siRNA区ではSOX2タンパク質を発現している細胞がきわめて少なく、SOX2タンパク質発現の局在も認められなかった。

マウス胚においては、SOX2とTEAD4の相互的な発現抑制作用が明らかとなっているが³⁾、本研究の結果から、豚胚においてはSOX2とTEAD4

の相互作用は認められないことが明らかとなった。マウスの胚性幹細胞においては、SOX2はOct-4と複合体を形成し、Oct-4を含むさまざまな組織分化制御因子の発現を制御していることが明らかとなっているが¹⁰⁾、豚胚においてはSOX2によるOCT-4の発現制御は認められず、牛胚と同様の結果⁴⁾となった。一方、本研究において、SOX2発現抑制胚では、胚盤胞期での細胞数が有意に減少し、さらにSOX2発現の局在も認められなかった。これらのことは、豚胚では、SOX2が桑実期から胚盤胞期にかけて起こるICM形成に関与し、SOX2発現抑制胚ではICMが形成されていない可能性を示すものである。すなわち、本研究ではSOX2発現抑制胚では胚盤胞期への発生は阻害されなかったが、それら胚盤胞期胚ではTE形成のみが起こっている可能性がある。今後、ICM形成のマーカー遺伝子の発現動態を同時に解析することなどによりSOX2が豚初期胚のICM形成を制御する機構を明らかにする必要がある。

本研究によって、SOX2が豚胚の初期発生、特

にICM形成に重要な役割を担う可能性が示された。これまでに豚胚の組織分化制御因子として明らかとなっているOCT-4などとともSOX2発現動態を指標に、豚IVF胚におけるIVCの条件を検討することで、豚IVF胚の機能性の向上が期待できる。

4. 要 約

本研究では、豚初期胚の組織分化を制御する候補因子としてSOX2に着目し、豚卵子および初期胚でのSOX2発現動態を解析した。また、RNA干渉法により豚初期胚におけるSOX2発現の人為的抑制を行い、SOX2発現抑制が豚胚の初期発生および組織分化に及ぼす影響について検討した。その結果、豚初期胚におけるSOX2 mRNA発現は8～16細胞期で高いことが明らかとなった。また、SOX2タンパク質は8細胞期以降の割球細胞核で発現が認められ、胚盤胞期においてはICMと思われる細胞群に発現が局在することが示された。SOX2発現抑制により、胚盤胞期への発生に影響は認められず、またOCT-4やTEAD4など他の組織分化制御因子の発現動態にも影響しなかった。しかしながら、SOX2発現抑制により、胚盤胞期での細胞数が有意に減少し、さらに胚盤胞期におけるSOX2発現の局在も認められなかつ

た。これらのことはSOX2が豚初期胚におけるICM形成に関与する可能性を示すものである。本研究結果から、豚初期胚の発生においてSOX2が重要な役割を担うことが示唆され、SOX2発現動態が豚IVF胚の機能性を評価する指標の一つになることが示された。

文 献

- 1) Sakurai, N., Fujii, T., Hashizume, T., Sawai K. : *J Reprod Dev*, **59**, 353～360, 2013.
- 2) Emura, N., Sakurai, N., Takahashi, K., Hashizume, T., Sawai, K. : *J Reprod Dev*, **62**, 401～408, 2016.
- 3) Keramari, M., Razavi, J., Ingman, K. A., Patsch, C., Edenhofer, F., Ward, C. M., Kimber, S. J. : *PLoS One*, **5**, e13952, 2010.
- 4) Goissis, M. D., Cibelli, J. B. : *Biol Reprod*, **90**, 1～10, 2014.
- 5) Petters, R. M., Wells, K. D. : *J Reprod Fertil, Suppl.*, **48**, 61～73, 1993.
- 6) Kikuchi, K., Onishi, A., Kashiwazaki, N., Iwamoto, M., Noguchi, J., Kaneko, H., Akita, T., Nagai, T. : *Biol Reprod*, **66**, 1033～1041, 2002.
- 7) Yoshioka, K., Suzuki, C., Onishi, A. : *J Reprod Dev*, **54**, 208～213, 2008.
- 8) Zang, L., Luo, Y. B., Bou, G., Kong, Q. R., Huan, Y. J., Zhu, J., Wang, J. Y., Li, H., Wang, F., Shi, Y. Q., Wei, Y. C., Liu, Z. H. : *Anat Rec*, **294**, 1809～1817, 2011.
- 9) Kumar, B. M., Maeng, G. H., Jeon, R. H., Lee, Y. M., Lee, W. J., Jeon, B. G., Ock, S. A., Rho, G. J. : *J Assist Reprod Genet*, **29**, 723～733, 2012.
- 10) Kuroda, T., Tada, M., Kubota, H., Kimura, H., Hatano, S. Y., Suemori, H., Nakatsuji, N., Tada, T. : *Mol Cell Biol*, **25**, 2475～2485, 2005.

体外胚生産技術を活用した純粋種豚（トウキョウX）の生産性向上に関する研究

Improvement of offspring-productivity on closed-colony pig (Tokyo-X)
using in vitro production technologies

岡田 幸之助¹・鈴木 亜由美²

(¹日本獣医生命科学大学応用生命科学部動物科学科,

²公益財団法人 東京都農林水産振興財団 東京都農林総合研究センター畜産技術科)

Konosuke Okada¹ and Ayumi Suzuki²

(¹School of Animal Science, Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University,

²Tokyo Metropolitan Agriculture and Forestry Research Center)

In spite of several attempts, the embryo transfer in Tokyo-X had been not successful. Thus, not only the procedure of embryo transfer but also the increasing quality of embryo transferred should be improved. We previously indicated that a combination of FSH-LH induced the higher rate of *in vitro* maturation (IVM) in pig (hybrid vs. outbred). In this study, the effect of the hormonal treatments on *in vitro* fertilization (IVF) and *in vitro* culture (IVC) was examined. The follicles were excised from the ovaries and the cumulus-oocyte-complexes were collected. Then, the complexes were cultured for 44 hours with several hormonal treatments; FSH-LH, FSH-LH/LH, and FSH/LH groups. For IVF, after thawing Tokyo X frozen semen, the viable sperms were sorted and co-cultured with matured oocytes at a final concentration of 1×10^6 cells/ml for 6 hours (insemination). After insemination, the oocytes were cultured for farther 12 hours and then fixed-stained to examine the sperm penetration rate. For IVC, the insemination was on day 0 and the first division rate and the blastocyst formation rates were observed on day 2 and 6, respectively. The blastocysts obtained were stained with DAPI to count the cell numbers. As results, there was no significant among the experimental groups on sperm penetration rate and normal fertilization rate, while the FSH-LH groups tended to be higher, compared to the other groups. These results suggest that FSH-LH is suitable for the production of IVF embryos of Tokyo X. Finally, although non-surgical embryos transfer of Tokyo-X blastocysts alone did not yield the offspring, co-transfer with cross hybrid (LWD) embryo could generate the offspring from both pigs. In order to elucidate this reason, the further study is needed.

1. 目 的

東京都の養豚業の再編、輸入肉に負けない付加価値、消費者に喜ばれる豚肉の開発を目的とし、

東京都畜産試験場（現：東京都農林水産財団）は1997年に新規造成系統となるトウキョウXを開発した¹⁾。パークシャー種、デュロック種および北京黒豚を基本豚に肉質重視で開発されたトウキョ

ウX肉は、3品種の肉質長所を余すことなく備えており、その肉質は臭みがなく、風味や味わいに優れ、特に豚肉の味を左右する脂肪は良質である^{1, 2)}。一方、高品位な肉質を優先して開発されたことから、その生産効率（出荷日数延長）や繁殖性（一腹産子数など）は一般的に流通している三元交雑種と比べて劣っている。これらのトウキョウXにおける生産性の特徴（問題点）は系統特有のものであり、肉質維持のためには妥協しなければならない。このような状況下、東京オリンピック開催を機に国内外においてトウキョウX肉をさらに周知させるために、生産性拡大に向けて動き出している。生産性拡大のためには、母豚数増加による仔豚生産上昇に加えて、体外胚生産技術の併用も有効であると考えられる。体外胚生産技術は、食肉処理場由来卵巣より採取した未成熟卵母細胞を体外成熟—体外受精後に体外培養することによって胚を作出する一連の技術であり、この過程により得られた胚を子宮内移植することにより、産仔生産する。しかしながら、豚における本技術の研究は多くなされてきているが、すべての過程において満足できるものは少ない。また一般的な豚の応用技術的研究においては、食肉処理場にて入手しやすい交雑種由来卵巣を用いるため、交雑種で得られた結果をトウキョウXのような純粋種系統（他には黒豚や中ヨークシャーなど）に適用する場合、系統間の差が生じることもある。これはマウスやラットにおいて顕著な例であり³⁾、近交系、クローズドコロニー、交雑種の順で繁殖性が低下し、それぞれに見合った繁殖技術が開発されてきている。このことから、本研究では、本質的に繁殖性が低いトウキョウXへの体外胚生産技術の補完により、生産効率向上を見込める手法開発を試みた。また豚において、純粋種と交雑種間における体外胚生産技術条件の相違が見られるか否かについて検討した。

2. 方 法

2.1 豚卵母細胞の採取および体外成熟

食肉処理場で初回排卵前のトウキョウXおよび三元交雑種雌（LWD：ランドレース×大ヨークシャー×デュロック）から採取した卵巣を25～30℃に保管し、2時間以内に研究室へ持ち帰った。0.1%ポリビニールアルコール含Dulbecco'sリン酸緩衝液（DPBS(-)-PVA）中で卵巣を洗浄後、ガラスシャーレ上で直径4～6mmの卵胞を2枚のメス刃を用いて切り出した。卵胞内が透き通り、浮遊物がなく、卵胞内壁から卵丘（卵母細胞）が脱落していない卵胞を選出した。選出後、HEPES-Naおよび0.1%PVAを含み、pH7.4に調整したHEPES緩衝Chatot-Ziomek-Bavister（H-CZB）液を含むガラスシャーレへ卵胞を移動した。次に実体顕微鏡下で2本のピンセットを用いて卵胞膜をつまんで破り、壁顆粒膜細胞が一部付着した状態の（未成熟）卵母細胞—卵丘細胞—壁顆粒膜細胞複合体（OCGCs：oocyte-cumulus-granulosa-complexes）を採取した。OCGCsをH-CZB液中で洗浄した後、透明感のある卵丘細胞群が周囲に半層以上緊密に付着し、卵細胞質が均一で卵細胞膜が明瞭な卵母細胞を有するOCGCsを選出した⁴⁾。

体外成熟培地には、高性能豚卵子成熟用基本培養液（機能性ペプチド研究所）を、ホルモンには0.5 µg/mlの豚由来FSHおよび0.5 µg/mlの豚由来LHを用いた。4穴滅菌ディッシュ内のHP-POMに洗浄したOCGCsを導入し、39.0℃、100%湿潤、5%CO₂および95%大気的环境下で合計44時間成熟培養した。ホルモン処理として、培養前半（0～22時間）にFSHおよびLHを添加し、培養後半（22～44時間）にはホルモン無添加（対照区：FSH-LH/FREE）あるいはLH添加した区（FSH-LH/LH区）および培養前半にFSHを単独添加し、

培養後半にLH添加した区（FSH/LH区）をそれぞれ設定した。

2.2 体外受精および受精率の評価

成熟培養後、卵丘細胞群が膨潤化したOCGCsを含む培養液中に、0.1%ヒアルロニダーゼを含むDPBS(-)-PVA中でインキュベートした。インキュベート後、H-CZB液に移し、ガラスキャピラリーを用いて卵母細胞に付着している卵丘細胞を一層残す程度に静かに除去した。その後、実体顕微鏡にて第一極体放出が確認できた卵母細胞を成熟卵母細胞として実験に用いた。次に成熟卵母細胞を豚媒精液（PFM；機能性ペプチド研究所）ドロップ中で洗浄後、リプロプレート内のPFMへ移動し、媒精までインキュベートした。

媒精にはトウキョウX凍結精子を使用し、Percoll密度勾配法によって生存精子を分離した。最終精子濃度 1×10^6 個/mlで6時間媒精した。媒精後、卵母細胞を豚胚発生用培地（PZM-5；機能性ペプチド研究所）中に移動し、39.0℃、100%湿潤、5%CO₂および95%大気的环境下において12時間培養した。

受精率を調べるため、卵母細胞を酢酸—100%エタノールに浸漬して固定—脱脂した。次に、酢酸—オルセインで染色して観察した。

2.3 体外発生

媒精6時間後にPZM-5中で洗浄—裸化し、形態学的に正常な推測的受精卵を選別後、PZM-5中で培養した。媒精日を0日目として、2日目に第一分割率を算出し、断片化、変性および退行卵を除去した。4日目に半量のPZM-5をピペットで吸引し、新鮮なPZM-5を添加した。6日目に胚盤胞形成率を算出した。

2.4 胚移植

離乳後あるいは自然発情開始6日後、子宮深部注入用カテーテルセット「匠」（富士平工業）を用いて体外作出した20～40個の発生5日目胚（ト

ウキョウX胚およびLWD×トウキョウX [LWDX]胚）を子宮深部に非外科的に移植した。移植後28日目に、発情回帰のみられなかった個体について超音波画像診断装置により妊娠判断し、産仔を得た場合には、系統比率、性別および新生仔体重を評価した。

3. 結果と考察

トウキョウXの体外受精率および胚盤胞形成率について、いずれの処理区においても有意差は見られなかったが、FSH/LH区においては正常受精率（32.2%）が高く、異常受精率（22.6%）が低い傾向が見られ、胚盤胞形成率（23.2%）も最も高い値を示した（Table 1, 2）。FSH/LH区が良好な数値を示した理由として、LH受容体（LH-R）の関与が推察された。LH-Rは採卵直後の卵丘細胞には存在しないが、FSH刺激後卵丘細胞膜上にLH-Rが形成される⁵⁾。また、成熟開始と同時に添加した場合、LHの作用効果は長時間持続されないため、FSH誘導性LH-Rの形成までにLHの作用が持続されにくいことが考えられた⁶⁾。これらのことから、成熟培養前半でのLHは必須ではなく、トウキョウXの体外成熟時にはFSH/LH処理が適していることが示唆された。

三元交雑種では、FSH-LH/LH区が高い正常受精率（38.2%）および胚盤胞形成率（28.8%）を示したことから、ホルモンに対する感受性についてトウキョウXと異なることが推測された（Table 1, 2）。トウキョウXは、純粋種を長期間にわたって繰り返し交配し、他からの遺伝子移入のない状態で維持するクローズドコロニーであり、系統造成—認定以来、その品質を維持してきている。この系統本来の特性（肉質を優先し、繁殖能を妥協）も併せて、本質的繁殖性は低下しやすい傾向があるのかもしれない。一方、三元交雑種は繁殖性も産肉性も優れ、系統間の交配によ

Table 1 The effect of LH-adding timing on *in vitro* fertilization in pigs.

Strains	Treatments (n)	No. (%) of oocytes		No. (%) of oocytes fertilized		Average no. of sperm/oocyte ³
		examined	penetrated	normally ¹	abnormally ²	
Tokyo-X	FSH-LH/free (9)	167	089 (53.3)	049 (29.3)	40 (24.0)	1.84 ± 0.14
	FSH-LH/LH (5)	101	057 (56.4)	029 (28.7)	28 (27.7)	1.77 ± 0.15
	FSH/LH (5)	115	063 (54.8)	037 (32.2)	26 (22.6)	1.84 ± 0.18
Hybrid	FSH-LH/free (16)	346	187 (54.1)	113 (32.7)	74 (21.4)	1.61 ± 0.95
	FSH-LH/LH (12)	314	194 (61.8)	120 (38.2)	74 (23.6)	1.58 ± 0.91
	FSH/LH (12)	327	202 (61.8)	107 (32.7)	95 (29.1)	1.68 ± 1.00

¹ A female and male pronucleus with 2 polar bodies.² Polyspermy and other nuclear status.³ Means ± SEM.**Table 2** The effect of LH-adding timing on *in vitro* culture in pigs.

Strains	Treatments (n)	No. (%) of oocytes		Development to the blastocyst stage (%)	Average cell no. of blastocyst ²
		examined	divided ¹		
Tokyo-X	FSH-LH/free (5)	110	62 (56.4)	17 (15.5)	33.4 ± 2.7
	FSH-LH/LH (2)	49	23 (46.9)	07 (14.3)	28.6 ± 2.9
	FSH/LH (3)	69	37 (53.6)	14 (20.3)	26.4 ± 1.3
Hybrid	FSH-LH/free (3)	65	38 (58.5)	15 (23.1)	39.6 ± 4.5
	FSH-LH/LH (3)	66	33 (50.0)	15 (22.7)	39.1 ± 2.2

¹ The first division was observed on day 2 and they were ≥ 2 cells.² Blastocyst rate was observed on day 6 and they were ≥ 16 cells.³ Means ± SEM.**Table 3** The production of presumptive Tokyo-X offsprings using non-surgical embryo transfer with hybrid embryos

Transferred embryos	No. of		Average no. of	
	tests	offsprings	litter size	presumptive Tokyo-X offsprings ¹
Tokyo-X alone	3	0	—	—
Tokyo-X and hybrid	2	15	7.5	13

¹ The strains of offsprings were estimated by their coat color.

り、その子豚の能力が両親の平均能力を上回る雑種強勢効果を商業上もたせている。このような各系統の性質が、さまざまな細胞応答における系統間の差異を生じさせていることも考えられる。本研究における三元交雑種との比較は、試験系統に適した体外成熟条件を用いる必要性があることを

示唆している。

安定した胚盤胞発生率の培養系が確立されたため、トウキョウX体外受精卵移植の受胎—分娩を目指した。3頭の受精卵に移植を試みたが、いずれも受胎には至らなかった (Table 3)。また上述の実験において、胚盤胞の細胞数は三元交雑種由



Fig. 1 The piglets derived from co-transfer with Tokyo-X and hybrid embryos produced *in vitro*.

来胚においてが有意に高いことが示されていることから、トウキョウX卵は他品種よりも発生が遅く、発生能が低い可能性があるかもしれない。このため、発生能がより高いと考えられる交雑種由来胚を共移植することにより、トウキョウX胚の着床促進を検証した。この結果、共移植した2例は受胎一分娩に至った。トウキョウX胚単独の移植で受胎に至らなかった原因として、移植胚数が少なかったこと、および初期の移植では手技的問題もあったことが考えられた。分娩2例の産子は体毛色から多くがトウキョウXと推定されるが（Fig. 1）、最終的には遺伝子検査により判定する予定である。

4. 要 約

トウキョウXの生産性向上を目指して受精卵移植を試みているが、いまだ受胎には至っておら

ず、トウキョウX体外受精卵の品質を改善する必要がある。過去に体外成熟時に添加するホルモンについて検討を重ね、FSH/LHの組み合わせが適切であることが示された。本研究では、FSH/LH処理が体外受精および体外発生に及ぼす影響を調べた。卵巣から卵胞を切り出して複合体を採取し、成熟時にいくつかのホルモン処理を実施し、合計44時間培養した。媒精のため、トウキョウX凍結精液を融解後、生存精子を選別して最終濃度 1×10^6 個/mlで合計18時間共培養した。培養後、固定一染色して精子侵入率を調べた。体外発生では、2日目に第一分割率、6日目に胚盤胞形成率を計測した。得られた胚盤胞をDAPI染色して胚盤胞細胞数を計測した。精子侵入率および正常受精率において、実験区間に有意差は見られなかったが、他の区と比較してFSH-LH区が高い傾向を示した。これらの結果は、トウキョウXの体外受精卵作出には、FSH-LH区が適していることが示唆している。次に、得られた胚盤胞を非外科的に移植したところ、トウキョウX胚のみ移植では、産仔を得られなかったが、三元交雑胚との共移植によって、産仔を得られた。この理由を解明するために、今後も検討を継続していく。

文 献

- 1) 東京都農林総合研究センター、トウキョウX：<http://www.tokyo-aff.or.jp/syutiku/01tokyox.html>
- 2) TOKYO-X生産組合、TOKYO-Xについて：<http://tokyox.net/about>
- 3) 古田祐奈、中川隆生、森田真裕、伊藤慧、永井匡、佐東春香、安齋政幸、入谷明： *Institute of Advanced Technology*, 14, 1～8, 2009.
- 4) Okada, K., Krylov, V., Kren, R., Fulka, J. Jr.: *Journal of Reproduction and Development*, 52, 91～98, 2006.
- 5) Shimada, M., Nishibori, M., Isobe, N., Kawano, N., Terada, T.: *Biology of Reproduction*, 68, 1142～1149, 2003.
- 6) 服部眞彰：新動物生殖学，朝倉書店，生殖のホルモン，61～62，2011.

発情発見困難牛の特徴解明による授精率向上方策 の検討

Characterization of estrus-related behaviors in subestrous cattle to
improve submission rate

坂口 実・菊池 元宏・三浦 弘
(北里大学獣医学部)

Minoru Sakaguchi, Motohiro Kikuchi and Hiroshi Miura
(School of Veterinary Medicine, Kitasato University)

In cattle industry, detection of estrus is prerequisite for optimal timing of insemination. Visual observation of standing estrus is often cited as industry standard ; however, it is becoming difficult to detect standing estrus. In this study we tried to evaluate the vocalization during the preovulatory periods as estrus behavior and to characterize the subestrous behaviors in non-restricted beef cows by continuous observation using a video system. Although no vocalization was observed when 2 or more cows were in estrus, it was observed when one cow in estrus. Vocalization can be used for estrus detection in dominant cows. When 2 or more cows were in estrus, 10% of the cows showed subestrus, while 58% of cows showed subestrus when one cow in estrus. To detect these subestrus cows, duration and intervals of visual observation should be increased. It is needed that the fluctuation of activity and characteristics of estrus-related behavior are analyzed in subestrus cows to improve submission rate.

1. 目 的

牛の雌同士の発情兆候の確認は、人工授精実施の前提条件であり、その精度は牛群の繁殖性に大きく影響する。発情兆候には、スタンディング行動をはじめとする発情関連行動と、外陰部からの発情粘液漏出等、発情期に特有な生殖器官の変化がある。発情行動について、過去の本研究助成により、肉用繁殖牛における授精適期の再設定を目的に、同時に発情する頭数や牛群内での個体の順位が発情行動にどう影響するか調べてきた。同時発情と単独発情、および牛群内順位の上位と下位

という二つの条件は、発情行動の発現や持続時間、その後の排卵時刻との関係に大きく影響することが分かり、授精適期設定のための有用な情報を得た^{1,2)}。平成28年度までに得られた、発情スコアに基づくのべ39頭の結果をFig. 1に示す。発情持続時間に若干の差はあるものの、発情開始あるいは終了から排卵までの時間は、発情頭数と牛群内順位の影響を受けないこと、順位にかかわらず同時発情では、最大スコアで示した発情強度が高いことが分かった。

これら一連の解析は各群の平均値を比較したものであり、発情頭数（単独および同時発情）の違

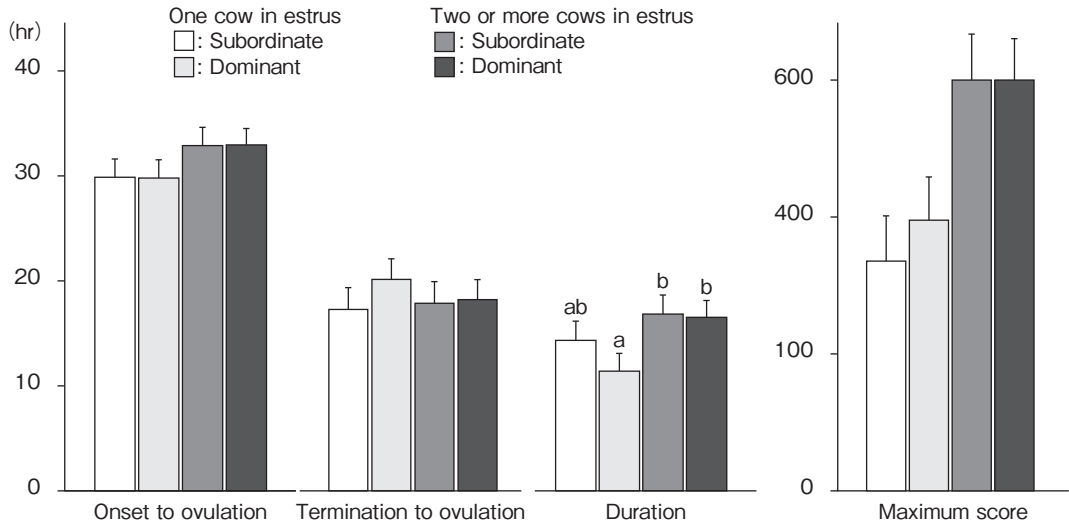


Fig. 1 Intervals from the onset and termination of estrus to ovulation and duration of estrus determined by estrous score and maximum estrous score recorded. Vertical bar presents SD.

a, b : Significantly different ($p < 0.05$).

いや牛群内順位（上位および下位）が平均的にどのように影響するかを示したものである。したがって、各群内での発情行動の強弱や長短のばらつきについてはまったく考慮していない。生産現場では、発情行動が弱くその持続時間も短いため、発情を見つけにくい「発情発見困難牛」が一定の割合で存在しており、発情見逃しや不適期授精が増加する大きな原因となっている。前者は分娩間隔延長に、後者は人工授精受胎率低下に直結していると考えられ、発情発見の困難度に対応した個別の対応が必要である。また、行動が制限されるつなぎ飼いでは、一般的に自由行動可能な条件と比較して、発情発見が困難であり、発情粘液や発情時特有の鳴き声（咆哮）を指標に授精適期を判断することが多いが、発情時の咆哮についてはよく調べられていない。

そこで本研究ではまず、肉用雌牛の発情時（排卵前）の咆哮について、行動制限のない状態で調査することにより、発情行動としてどのような意義を有するかについて考察し、人工授精実施の指

標となり得るか否かについて検討した。次に発情発見困難牛については、発情強度を的確にとらえられる発情スコアをもとに典型的なパターンを設定し、その発生頻度と特徴を明らかにし、適期授精に向け、個別にどのような方策があり得るか考察した。

2. 方 法

2.1 牛群内順位付けと発情誘起

北里大学（青森県十和田市）にて飼養されていた肉用繁殖牛14頭を供試し、平成27および28年度の本研究助成^{1, 2)}での方法と同様に、近藤の提示した餌槽優先法³⁾を一部改変し、あらかじめ牛群内の順位付けを実施した。単独発情および同時発情については過去の実験と同様の方法により、膣内留置型黄体ホルモン製剤およびプロスタグランディンF_{2α}製剤を用いて誘起した。

2.2 発情時の咆哮の記録

上位4頭、下位5頭の計9頭を供試し、同時発情7例（上位2例、下位5例）および単独発情13

Table 1 Scoring scale for estrous behavior

Behavior	Points
Standing heat	100
Mounting head side of other cows	45
Mounting (or attempting) other cows	35
Resting with chin on other cows	15
Mounted by other cows but not standing	10
Sniffing vagina of other cows	10
Restlessness	5
Flehmen	3

例（上位5例，下位8例）について，これまでと同様に歩数計により行動量を記録するとともに，3台のビデオカメラにより発情行動の映像を記録，Van Eerdenburgら⁴⁾の発情スコア表（Table 1）にしたがい，発情スコアを算出した^{1, 2)}。さらに，今回新たに3台のマイクを設置して音声も同時記録した。観察対象牛が咆哮姿勢をとり，その音声が記録された場合に咆哮回数としてカウントした。咆哮記録は，その他の行動と同様に，発情頭数および牛群内順位との関係も含めて解析した。

2.3 発情発見困難牛の検索

平成27年の研究開始からこれまでに得られた，29例の同時発情および24例の単独発情，計53例について，発情スコアを用い以下の4点に着目し解析した。

- ① 発情スコアが100以上にならない
- ② 発情開始から終了までの時間が短い
- ③ 発情スコアが100以上になる回数あるいは頻度が低い
- ④ 発情期間中に発情スコアが0になる時間が多い

3. 結果と考察

3.1 発情時咆哮の特徴

複数頭が発情している同時発情では，全例で発

Table 2 Expression of vocalization behavior during estrus

Cow number	Dominance order	Number of vocalizations
5	Dominant	242
2	Subdominant	122
7	Dominant	81
10	Subdominant	68
7	Dominant	52
14	Subdominant	47
3	Dominant	24
9	Subdominant	4
13	Subdominant	3
12	Dominant	2
9	Subdominant	0
13	Subdominant	0
9	Subdominant	0

情時の咆哮は記録されなかった。一方で，単独発情牛では，77%（10/13）で咆哮が記録された（Table 2）。これらの結果から，自由行動の可能なパドック飼養条件下の同時発情では，咆哮活動は発現しない可能性が高い。同時発情時には，行動の相手に不足はないため，他に相手を求める行動と考えられる咆哮は発現しにくいものと推測される。しかし例数が少ないことから，より多頭数での検証が必要である。

総咆哮回数は最も多いもので242回であったが，3例では2～4回と低頻度とばらつきが大きかった。そこで，咆哮回数10回以上と10回未満に分けてみたところ，上位牛の割合は前者で計7例中4例（57%），後者で6例中1例（17%）であった。したがって，10回以上の咆哮行動が発現する比率は，上位牛の80%（4/5）に対し，下位牛では38%（3/8）となり咆哮行動の発現には牛群内順位が影響する可能性が示された。すなわち，単独発情の下位牛では，上位牛よりも咆哮による発情検出が困難であると推測されるが，これについてもより例数を重ねることによる検証が必要であ

る。

次に、総咆哮回数10回以上（ $n = 7$ ）および未満（ $n = 6$ ）の2群に分けて、スタンディング行動等の他の発情行動の頻度に違いがあるかどうか検討した。その結果、咆哮行動の多寡による他の発情関連行動回数には、違いがないことが分かった。また、発情スコアで示される発情行動の強度の時間的推移と、咆哮行動発現との関係について解析したところ、スコアが低い時に咆哮が多く発現する傾向を認めたが、それ以上の明確な関係性は検出できなかった。これらの結果から、咆哮行動は他の発情行動とは異なる、牛の内的要因により制御されることが示唆された。また、同一牛で2回観察した2頭（牛番号7, 13）と、3回観察した1頭（牛番号9）の結果（Table 2）を見ると、同一牛では一定の傾向を示しており、咆哮行動発現については、それぞれの牛の「個性」ともいえる性質が関与するものと推測できる。

以上の結果から、咆哮行動については同時発情では観察されない可能性、単独発情では上位牛で優先的に観察される可能性、個々の牛が持つ特性（牛の好み）が影響する可能性が示された。同時に発情している牛が存在しない条件下では、8割弱の牛で咆哮行動による発情判定が可能であるが、牛群内順位の低い牛では咆哮が観察されないか、その頻度が低いことに注意が必要である。今後は、今回解析しきれなかった行動量（歩数）上昇との関連など、他の発情関連パラメーターとの関係性も含め、発情検出における咆哮の意義について、より詳しい解析を進める予定である。

3.2 発情発見困難牛

排卵前の発情スコアは、同時発情の全例で100以上を記録したが、単独発情の2例（8%）では100未満で経過し、明らかな発情発見困難牛であった。また、5時間連続して100を超えた例は同時で76%あったが、単独では29%にとどまった。

経時的な発情スコアを解析した結果、発情発見の容易な牛から困難な牛まで4群を設定し、A～Dの各条件をすべて満たしたそれぞれの群に分類した。

1. 容易： $A \geq 5$, $B \geq 10$, $C \geq 10$ ($C \geq 80\%$), $D \leq 3$
2. やや容易： $A < 5$, $8 \leq B < 10$, $8 \leq C \leq 10$ ($60\% \leq C < 80\%$), $D \leq 4$
3. やや困難： $A < 5$, $6 \leq B < 8$, $6 \leq C \leq 8$ ($50\% \leq C < 60\%$), $D \leq 5$
4. 困難： $A < 5$, $B < 6$, $C \leq 6$ ($C < 50\%$)

ただし、Aは連続してスコア100以上を記録した最大時間、Bは発情開始から終了までの時間、Cはスコア100以上を記録した発情期間中の回数あるいは比率（%）のどちらか、Dは発情期間中のスコア0の回数とした。

集計結果をFig. 2に示すように、単独発情で、発情発見困難牛の発生率が高くなった。同時発情では66%で発情発見容易と判定され、やや容易を含めると90%に達したが、単独発情では容易は8%にとどまり、やや容易を加えても42%にとどまった。発情発見困難例は同時発情ではわずか

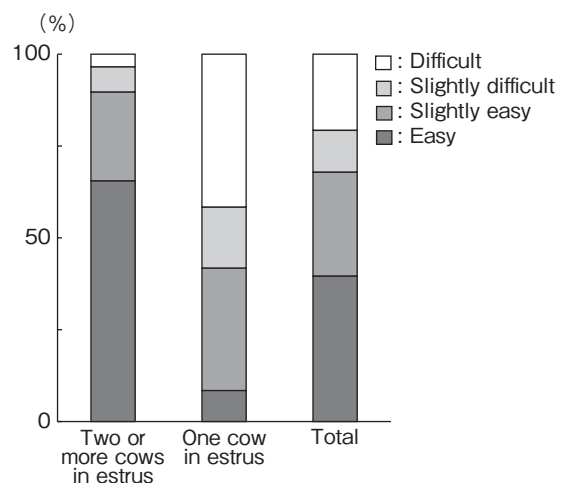


Fig. 2 Effects of number of cows in estrus on difficulty for detecting estrus by visual observation.

3%であったのに対し、単独発情では42%と高率であり、やや困難も含めると、同時の10%に対して59%と半数を越えた。

同時発情において、発情発見困難は1例のみであり発生率は非常に低いと考えられた。この例ではスコア100を超えた回数が2回のみで、その間隔、すなわち開始から終了までの時間も4時間ときわめて短かった。こうした例に関しては、同時に発情している牛との間の行動をよく観察することで、発情発見につなげる必要があるだろう。やや困難と判定された同時発情の1例では、スコア100以上の回数が6回と少なく、その発情期間中に占める割合も50%と低かった。もう1例では、発情期間中にスコアゼロになる回数が5回と多かった。

単独発情の2例(8%)ではスコア100未満で推移し、100以上を連続して5時間以上記録したのも7例(29%)にとどまった。また単独発情では、同時発情(14.9時間)よりも発情開始から終了までの平均時間が短かった(11.0時間)ため、スコアゼロになる例は50%と、同時の69%よりも少なかった。100以上を記録した総時間数も5.8時間と、同時の11.7時間の1/2であった。また、1/3(8例)の発情持続時間は10時間未満と短かった。

このように、単独発情で顕著に見られる発情発見困難牛では、短い発情期間に、発情行動は示すものの、スコアが100以上になる時間がない、あるいは少ないことから、観察のみで対応するには、観察の回数と時間を増やす必要がある。時間帯が夜間の場合はこうした対応は不可能であることから、今回は解析できていない、行動量(歩数)

上昇との関係を詳しく分析し、行動量の変化を加味することによる方法を模索したいと考えている。また、発情発見困難牛の行動の特性やパターンについてより詳細に分類し、それぞれに対応した解決策を提案することによって、授精適期判断の精度を上げていきたいと考えている。

4. 要 約

自由に行動可能な肉用牛の発情に伴う咆哮行動について、音声および映像をもとに記録し解析した。同時発情の条件下では咆哮は記録されず、単独発情では77%で記録された。咆哮は単独発情での指標として取り入れられる可能性が示されたが、社会的順位の低い牛では、観察されない例が多いことに留意が必要である。

発情発見困難牛はやや困難なものを含めても、同時発情では10%程度であるが、単独発情では60%近くに達し、大きな問題であることを再確認した。観察のみによる対応としてはその頻度と時間を増やす必要があることが明らかとなったが、行動量や行動特性等との関連をより詳しく解析して、授精適期の設定に役立てていく必要がある。

文 献

- 1) 坂口実, 菊池元宏, 三浦弘: 平成27年度食肉に関する助成研究成果報告書, 伊藤記念財団, 34, 175~180, 2016.
- 2) 坂口実, 菊池元宏, 三浦弘: 平成28年度食肉に関する助成研究成果報告書, 伊藤記念財団, 35, 171~179, 2017.
- 3) 近藤誠司: 北海道大学農学部紀要, 15, 192~233, 1987.
- 4) Van Eerdenburg, F. J. C. M., *et al.*: *Vet. Quart.*, 18, 52~54, 1996.

牛におけるクロモグラニンAの分泌動態および繁殖障害への関与の解明と子宮内膜における生理機能の解析

Study of bovine chromogranin-A : Plasma profiles between the normal and repeat-breeding animals, and physiological roles in the uterine endometrium

高 橋 透

(岩手大学農学部)

Toru Takahashi

(Faculty of Agriculture, Iwate University)

Chromogranin A (CHGA), an acidic protein secreted by adrenal chromaffin cells, is also expressed in uterine endometrium in the cow. Previously, the investigator of the present study had reported that uterine CHGA expression was suppressed in repeat-breeding cows than in the normal. The objectives in the present study were to establish the assay procedure measuring plasma concentration of bovine (b) CHGA and to evaluate plasma bCHGA profiles between the pregnant and non-pregnant animals. The enzymeimmunoassay for the measurement of plasma bCHGA was established by using synthetic oligopeptides for reference standards, biotinylated tracer and antibody generation. The minimum detectable value, and intra- and inter-assay coefficients of variation were 0.46 nM, 3.0% and 3.4%, respectively. Recombinant bCHGA protein was generated in bacterial lysate and purified by metal affinity chromatography. The standard curve generated by the recombinant protein was well paralleled with that of synthetic peptides. Plasma bCHGA concentrations following insemination were monitored in four cows. There was no consistent trend of plasma bCHGA profiles between the pregnant and non-pregnant animals. In summary, the enzymeimmunoassay for bCHGA was established and plasma bCHGA profiles during four weeks after insemination were monitored.

1. 目 的

本研究では、「特段の異常は認められないが何回授精しても受胎しない」という不受胎の背景を解明して、正常に受胎できる牛と低受胎牛を判別する診断指標を確立することを目的とする。研究代表者は、すでに正常牛と低受胎牛の子宮内膜に差次的に発現する遺伝子の網羅的解析の成績を報

告した中で、低受胎牛では正常牛に比べて子宮内膜におけるクロモグラニンA (bCHGA) の発現が低いことを明らかにしてきた¹⁾。本研究ではこの成果をさらに発展させながら、上記目的を達成するために以下の目標を設定した。[目標1] 子宮における遺伝子発現動態が末梢血中濃度に反映されるマーカータンパク質としてbCHGAを選定して、その血中濃度測定系を開発する。[目標2]

発情周期および妊娠期における血中bCHGA濃度推移を明らかにするとともに、正常牛と低受胎牛の濃度推移の違いを解明する。

2. 方 法

2.1 bCHGA測定系の開発

酵素免疫測定法 (EIA) による牛血中bCHGA濃度測定系の開発を行った。EIAはbCHGAの合成ペプチドを標識用抗原と標準品に使用し、合成ペプチドの抗体をウサギで作成して測定系を構築した。トレーサーは合成ペプチドをビオチン標識して作成した。

抗ウサギIgGを固相化した96穴マイクロプレートに抗bCHGA抗体、測定サンプルまたは標準液、ビオチン標識トレーサーおよびアッセイバッファーを分注し、室温で振盪しながら4–24時間インキュベートした。プレートを洗浄した後に、ストレプトアビジン–西洋ワサビペルオキシダーゼ溶液を添加して室温で2時間インキュベートし、プレートを再度洗浄したのちに発色基質としてオルソフェニレンジアミン溶液を添加して30分間発色させ、発色反応を6 N硫酸で停止してから490nmの吸光度を測定した。

2.2 組換えbCHGAの発現と精製

牛下垂体から抽出した総RNAの逆転写反応で得られたcDNAをテンプレートに用いたPCRを行い、得られた増幅産物をpIVEX2.4dベクターにクローニングしてC末端にHisタグを付加したbCHGA組換え発現の発現ベクターを構築した。この発現ベクターをテンプレートにして大腸菌ライセート系で無細胞系のタンパク質発現実験を行い、反応液中にbCHGAを発現させた。bCHGAタンパク質は不溶性の沈殿を形成したので、6 M尿素を含む変性バッファーで沈殿を可溶化してからニッケルのキレートカラムに吸着させてイミダゾールで溶出させて精製した。精製産物のリ

フォールディングは、0.4 Mアルギニンを含む緩衝液中で尿素濃度を漸減させながら透析することによって行った。

2.3 血中bCHGA濃度の測定

人工授精されたホルスタイン種経産牛4頭から2日おきに尾静脈血を採取し、血漿を測定まで–30℃で保管してから本研究で開発したbCHGA測定系を用いて濃度測定を行った。一部のサンプルはあらかじめ決まった回数の凍結融解を繰り返してから測定を実施した。

過去に牛の血中CHGA濃度測定を実施した研究論文では、市販のヒトCHGA測定キット (矢内原研究所製) を用いて測定した成績が報告されている²⁾。本研究では、同一の牛血漿サンプルを市販のヒト用キット (矢内原研究所製) と本研究で開発した牛用測定系の両方で測定を実施してその測定値を比較した。

2.4 法令への対応

本研究で実施した遺伝子組換え実験と動物実験は、事前に岩手大学動物実験委員会および遺伝子組換え実験安全委員会に実験計画書を提出し、承認を得たうえで実施した。

3. 結果と考察

3.1 EIAの構築

bCHGAの合成ペプチドを用いた競合型EIAの測定系を開発した。標準液の濃度が1–1000 nMの範囲で良好な標準曲線が得られた (Fig. 1)。

96穴プレートに、抗体、トレーサー、標準液/サンプルを分注してインキュベートする時間を4時間から24時間まで変化させ、得られる標準曲線を比較したところ、インキュベーション時間が長くなるにつれて吸光度が上昇した。濃度0 nMの標準液の吸光度を比較すると、4時間のインキュベーションでは0.5程度であったが、24時間の場合には約2.5まで上昇した。これに対して最も濃

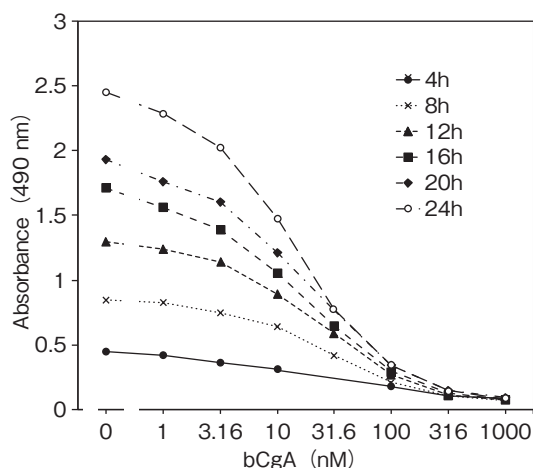


Fig. 1 The standard curves of bCHGA assay ; effects of the incubation period.

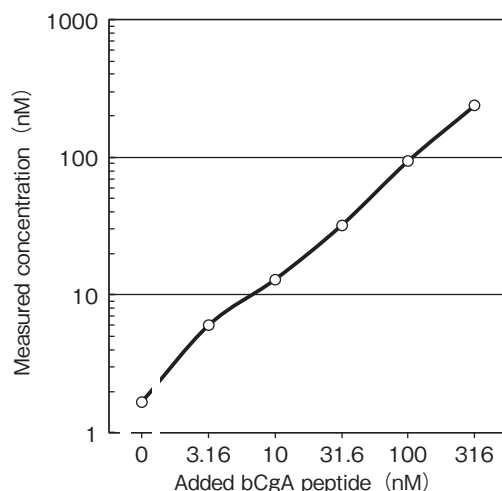


Fig. 2 The recovery test of bCHGA assay.

度の高い1000 nMの標準液の吸光度は、インキュベーション時間に関係なくほぼ一定の値（約0.08）であった。この結果は、インキュベーション時間を延長すると標準曲線の下降が急峻となり、測定精度が向上することを示している。

標準曲線の50%置換量（濃度0の場合の吸光度が半分になる標準液濃度）は、インキュベーション時間が4時間の場合には36.22 nMであったが、インキュベーション時間が長くなるにつれて減少し、24時間インキュベーションの場合には14.23 nMとなった。この結果は、インキュベーション時間を長くすると標準曲線が左にシフトして測定感度が向上することを示している。よって、以下の実験では測定の精度と感度を考慮して、インキュベーション時間を24時間に設定して実験を行った。

本測定系の最小検出限界は0.46 nMであり、測定内および測定間の変動係数は3.0%および3.4%であった。本測定系に既知濃度のbCHGAペプチドを添加して添加回収試験を行ったところ、その回収率は10 nM添加の場合に111%、100 nM添加の場合に92%、316 nM添加の場合に74%であっ

た（Fig. 2）。後述する牛の血中bCHGA濃度は10-40 nM程度の濃度であることから、本研究で開発した測定系は測定の感度や精度、およびその再現性が良好で、牛の血中濃度測定に活用しうる性能を有するものと思われた。

3.2 サンプルの凍結融解の影響

ヒトや実験動物のCHGAの研究によって、CHGAタンパク質は、翻訳後修飾を受けて多様なペプチド断片が派生することが知られている。これらのペプチドの生成はエンドペプチダーゼによる切断によると考えられているが、血漿を凍結保存したり、凍結融解を反復した際のタンパク質の安定性については情報が無い。そこで同一の血漿サンプルにあらかじめ決まった回数の凍結融解処置を施し、その後にbCHGA濃度を測定してサンプルの凍結融解が測定値に及ぼす影響を検討した。

血漿サンプルの凍結が1ないし2回の場合には、その測定値に差が認められなかったが、凍結融解を3回以上反復すると測定値は減少の傾向を示し、10回の凍結融解を経たサンプルのbCHGA濃度は1回凍結の場合の約40%程度にまで低下した（Fig. 3）。この成績から、血中のbCHGAは不

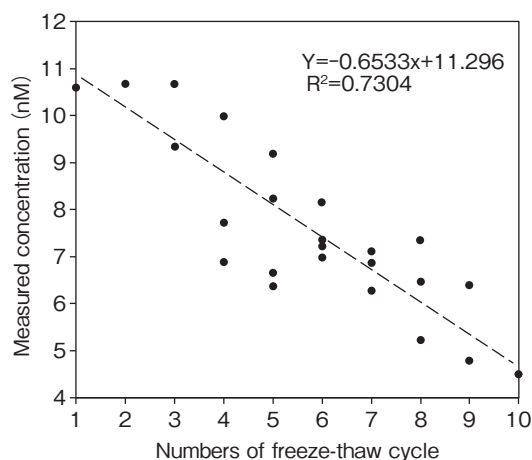


Fig. 3 The effect of freeze-thaw cycles of plasma samples on bCHGA assay values.

安定なタンパク質であり、凍結融解の反復によって容易に分解・変性してしまうことが示唆された。本研究に供した血漿サンプルはすべて凍結保存されているので、測定の時点ですでに1回の凍結融解を経ていることになる。凍結融解2回の場合には1回の場合と差が見られなかったことから、本測定系を用いて牛血中bCHGA濃度を測定する場合には、凍結融解の回数を2回以内にとどめることが必要と思われた。

3.3 組換えbCHGAの発現精製と特性評価

大腸菌ライセートの無細胞発現系でbCHGAを組換え発現させたところ、bCHGAは58 kDaのタンパク質として発現した。発現反応液を試料としたウェスタンブロット解析を行い、EIAに使用した抗体と抗Hisタグ抗体を用いて検出したところ、両者で58 kDaのバンドが検出された。反応液を上清と沈殿に分けてウェスタンブロット解析を行ったところ、上清にはほとんど認められず、発現した組換えタンパク質は不溶性の沈殿を形成していることが分かった。沈殿を可溶化した後にニッケルカラムで精製し、アルギニン存在下で尿素濃度を漸減させながら透析することによって精製タンパク質を得た。

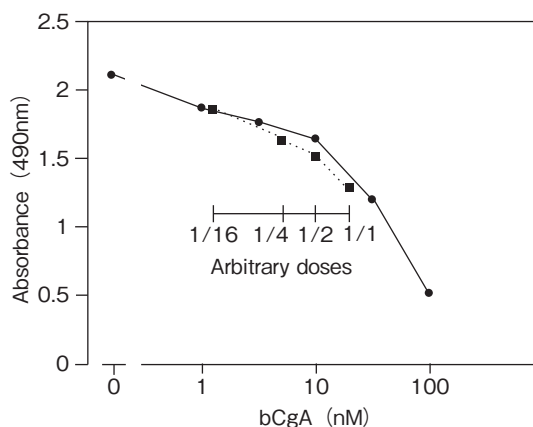


Fig. 4 Parallel displacement curves of reference standards generated by synthetic peptide (solid line) and recombinant protein (dotted line).

精製したbCHGA組換えタンパク質を本研究で開発したEIAに供したところ、用量依存的な吸光度の低下が認められ（破線）、その変化は合成ペプチドを標準品として作成した標準曲線（実線）と平行していた（Fig. 4）。

3.4 血中bCHGAの濃度推移

人工授精された4頭の血中bCHGA濃度の経時変化を調べた（Fig. 5）。4頭のうち受胎した牛は個体Bの1頭で、他の3頭は不受胎であった。グラフの実線は本研究で開発した測定系による測定値を示し、破線は市販のヒト用EIAキットで測定した値を示している。本研究で開発した測定系による血中bCHGA濃度の推移は個体ごとにさまざまで、血中濃度推移と受胎性との間に関連性は認められなかった。個体A（不受胎）、B（受胎）およびC（不受胎）の3頭では、個体ごとに差はあるものの黄体期に血中bCHGA濃度の上昇が認められた。しかし、個体D（不受胎）ではそのような変化は認められなかった。不受胎であった個体Cにおいては、授精後約2週間で一過性の高いピークを形成したが、このピークをもたらしたbCHGA分泌の起源がどこであるかは不明である。

一方、ヒト用キットを用いた測定値は変化に乏

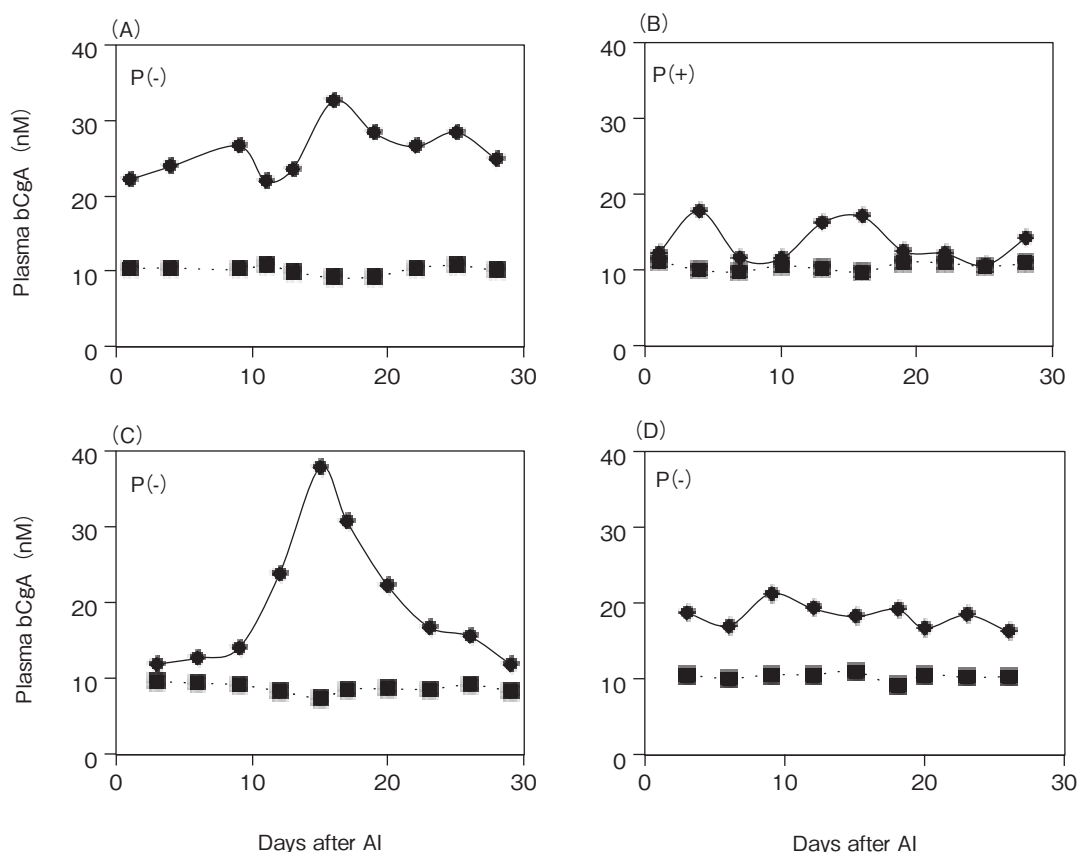


Fig. 5 Plasma bCHGA profiles during four weeks after insemination. In each panels, P(+) and P(-) represent as pregnant and non-pregnant, respectively. Solid lines represent the values measured by bCHGA assay established in the present study, whereas dotted lines represent the values measured by commercial human CHGA assay kit.

しく、すべての牛で採血全期間を通じてほぼ一定の数値を示した。Oginoらは牛に輸送ストレスを負荷した実験を行い、血中bCHGA濃度を本研究で使用したヒト用EIAキットで測定しているが、輸送後の血中bCHGA濃度は上昇したものの有意な差ではなかったと報告している²⁾。しかし、この実験サンプルを本研究で開発した測定系で測定した場合には、輸送前後における血中bCHGA濃度の有意な上昇を検出できるかもしれない。

4. 要 約

牛の子宮内膜で発現して、低受胎牛で発現量が低下するbCHGAを末梢血中で検出することを目

的としてEIAによる濃度測定系を開発した。開発した測定系は血中濃度を測定するのに十分な感度を有し、測定の精度や再現性も良好であった。牛の血中bCHGAを測定した研究はヒト用キットの流用で実施されており、牛用の測定系の樹立に関する報告がないことから、本研究がそのさきがけとなると思われる。

人工授精から4週間の血中濃度推移を受胎牛と不受胎牛と比較したところ、受胎に特異的な濃度変動パターンは認められなかったが、受胎牛1頭と不受胎牛2頭では黄体期の濃度ピークが観察された一方で、不受胎牛の1頭では、そのようなピークが認められなかった。

本研究では、大腸菌の無細胞発現系を用いて組換えbCHGAタンパク質を発現・精製した。本研究で得られた組換えタンパク質は、いまだ不明な点が多いbCHGAの生理機能の解明に活用できるものと期待される。

文 献

- 1) Hayashi, *et al.* : *Reproductive Biology & Endocrinology*, 15(1), 20, 2017.
- 2) Ogino, *et al.* : *Animal Behaviour and Management*, 47(1), 12~20, 2011.

牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基盤的研究

Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle

木 崎 景一郎・高 橋 透

(岩手大学農学部共同獣医学科)

Keiichiro Kizaki and Toru Takahashi

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

Early pregnancy diagnosis in cattle is very important in considering its productivity. However, methods for reliable early diagnosis have not been established. In this study, therefore, we focused on circulating miRNAs and verified the possibility as a novel biomarker for pregnancy diagnosis. In order to determine whether plasma or serum sample is suitable for quantifying blood miRNA, the amount of miRNA recovered from both samples, the quantity of free hemoglobin and miR-2455, used as a reference miRNA (endogenous control), were compared in both samples. The results indicated that 1) plasma is suitable as a sample for blood miRNA quantification than serum, and 2) it is necessary to separate immediately after blood collection. Seven specific miRNAs in plasma were highly detected in the pregnant cow on day 21 gestation than the non-pregnant cow. However, none of miRNA that showed a significant difference between the pregnant and the non-pregnant cow on day 18 of gestation. To examine the hemolysis on miRNA contents in plasma, hemolyzed plasma (0-20%) were prepared by sonication treatment of whole blood. Free hemoglobin concentration and erythrocyte-derived miRNA amounts were increased in a hemolysis-dependent manner, and showed significantly high values at 0.8% and 4%. When eight miRNAs were quantified in these samples, two miRNAs were not affected at all even by high hemolyticity. The other miRNAs were affected only 4%. The present study identified that several miRNAs as novel biomarkers of pregnancy diagnosis on 21 days of gestation, which they are less susceptible to hemolysis. Further studies to identify miRNA species that can verify the accuracy of pregnancy diagnosis are required to making the more earlier diagnosis and lead to the construction of new pregnancy diagnosis technology.

1. 目 的

家畜における早期の妊娠診断は生産効率の向上にとって重要である。特に牛では、発情周期回帰の有無、直腸検査、ホルモン測定および超音波に

よる診断が用いられている。しかし、これらの方法は診断手技の熟練度や牛の正常な発情周期21日を過ぎてしまう問題点もあるため、不受胎牛への次回授精の時期が遅れ、繁殖効率の低下につながっている。家畜生産性の向上を考えるうえで

は、より早期の妊娠の成否判断が望まれるが、現在のところ早期に、確実に診断する方法は確立されていない。一方、分子生物学的手法を用いた診断法、特に末梢血白血球における遺伝子発現を指標とした早期妊娠診断が提唱されているが^{1~3)}、操作手技等の問題点もあり、必ずしも簡便な手法とは言えない。このようなことから、新たな早期妊娠診断バイオマーカーが求められている。

マイクロRNA (miRNA ; miR) は、短鎖の1本鎖RNAであり、臓器特異的な発現様式を示し、エクソソームに内包され血中に分泌されることが知られている。ヒトでは血中エクソソーム由来のmiRNAを測定することにより、各種のがんを早期発見するプロジェクトが開始されているが、miRNA発現動態情報を妊娠診断に応用し、確定できる手法はいまだ開発されていない⁴⁾。

本研究では、牛の血中エクソソームに内包されるmiRNAに焦点をあて、妊娠診断の新規バイオマーカーとしての可能性を検証することを目的とするとともに、候補miRNAの同定、ならびに測定基盤確立のための検討を行った。

2. 方 法

2.1 供試材料

ホルスタイン種牛 (n = 4) からEDTA・2Na採血管およびプレーン採血管を用いて採血後、遠心分離して血漿および血清を得た。全血液から血漿分離までの日数を検討する実験では、採血後のEDTA・2Na採血管を4℃で1日および2日保存後に遠心分離した。当日分については、採血後おおむね2時間以内に分離した。妊娠および非妊娠牛血漿については、発情同期化した黒毛和種牛に人工授精後18日および21日に採血した。授精後約30日および60日後に超音波検査により妊娠鑑定を実施し、妊娠群 (n = 7) と非妊娠群 (n = 4) とした。溶血検体の調製では、黒毛和種牛

(n = 4) から採血した血液を用いた。

2.2 miRNA抽出と定量的リアルタイムRT-PCR

血漿および血清試料からのmiRNA抽出にはmiRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を使用し、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (TAKARA) を用いて逆転写反応を行い、miRNAからcDNAを合成した。定量的リアルタイムPCRには、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、7300リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) により増幅反応および検出を行った。本研究では、研究代表者の先行研究 (科学研究費補助金・挑戦的萌芽研究2015—2017年度) において抽出したmiR-AからJを検証した (現在論文執筆中であることから、ここでは具体名の記載はせず、AからJとした)。なお、リファレンスmiRNA (内在性コントロール) には、同様に先行研究で明らかにしたmiR-2455を使用した。

2.3 溶血検体の調製

採血後の全血液を超音波処理後に遠心分離した血漿を100%溶血検体とした。超音波処理をしていない同個体の血漿を溶血度0%とし、これを用いて5倍段階希釈系列 (0.00128-20%) の検体を作成した。遊離ヘモグロビン濃度は、414nmの吸光度を測定することにより調べた⁵⁾。また、溶血度0%, 0.00128%, 0.0064%, 0.032%, 0.16%, 0.8%, 4%の血漿から上記と同様の方法でmiRNA抽出およびcDNAの合成を行い、溶血評価の指標とされるmiR-23aおよびmiR-451を対象として定量的リアルタイムPCRを実施した⁵⁾。

3. 結果と考察

3.1 血中miRNA解析に供する試料種別の検討

血中miRNAを定量するうえで血漿、あるいは血清試料のどちらが適しているかを調べるために、両試料からのmiRNA回収量、両試料中の遊

離ヘモグロビン量およびリファレンスmiRNA (内在性コントロール) として使用するmiR-2455量を比較した (Fig. 1)。

miRNA回収量は、血清試料において高値を示す傾向であったが、統計学的には有意差は認められなかった (Fig. 1A)。一方、溶血指標となる遊離

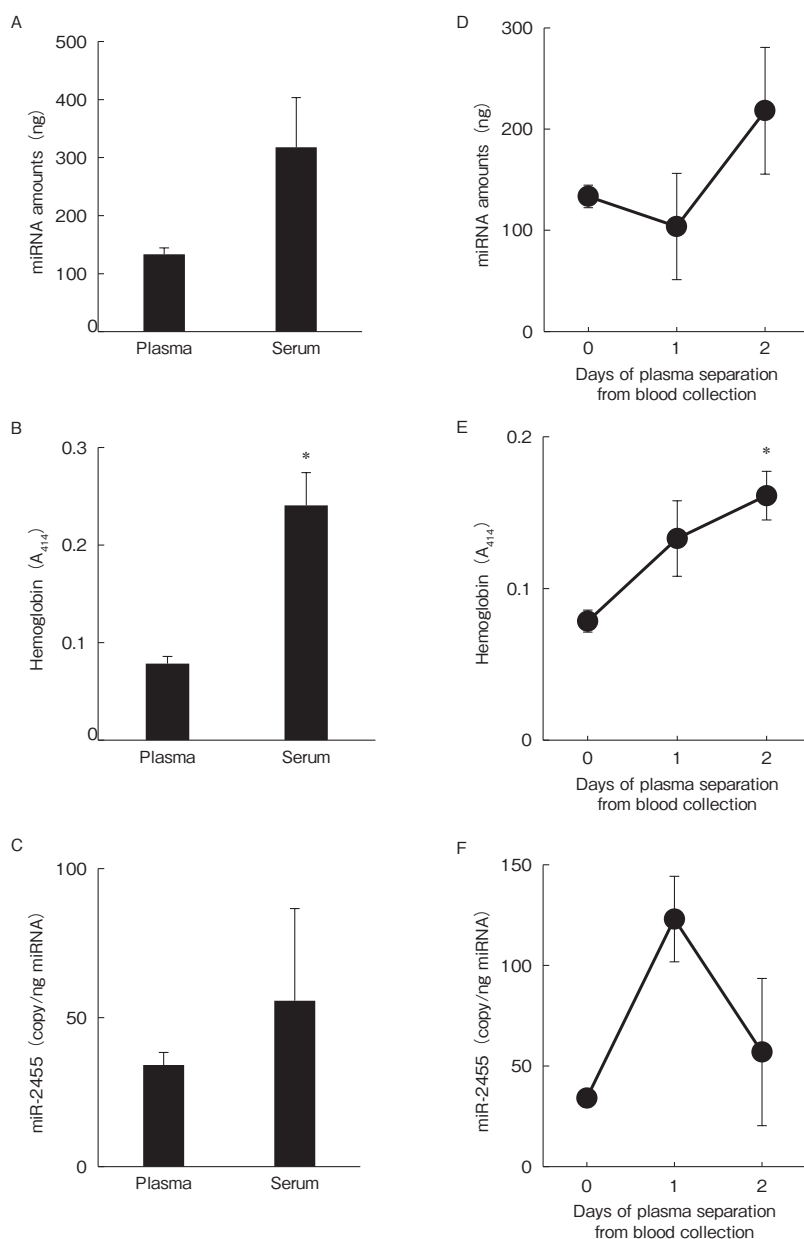


Fig. 1 Comparison of recovered miRNA, free hemoglobin and miR-2455 quantities in plasma and serum.

The recovered miRNA (A and D), free hemoglobin (B and E) and miR-2455 (C and E) quantities were measured in plasma and serum (A, B and C) or plasma separated from whole blood at days 0, 1 and 2 after collection (D, E and F). Data are shown as mean $\pm$ SEM. * $p < 0.05$.

ヘモグロビン量は、血清において有意に高値を示したが (Fig. 1B)、リファレンスmiRNA量は両者で差は認められなかった (Fig. 1C)。回収量およびリファレンスmiRNA量の検体間のバラつきは、血清試料において大きかった。

採血から血漿分離までの日数の関係について調べたところ、miRNA回収量は血漿分離までの日数の経過に伴い増加する傾向にあったが、有意な差ではなかった (Fig. 1D)。しかし、採血後1日および2日後の分離血漿では、検体間のバラつきが大きくなっていた。血漿中の遊離ヘモグロビン量は2日後の分離で有意に増加していた (Fig. 1E)。リファレンスmiRNA量については統計学的な差は認められなかったが、miRNA回収量の結果と同様に検体間の変動が大きかった (Fig. 1F)。

一般生化学検査においては、血漿あるいは血清試料の溶血は問題となることが多い。血中miRNA定量においても赤血球に多量に含まれるmiRNA分子種が知られており、その定量において問題が生じる可能性がある。血清試料では遊離ヘモグロビン量が高値を示していることから、血漿と比べ溶血度合いが高く、これが血清試料での回収量やリファレンスmiRNA量の検体間のバラつきの要因になっていることが考えられた。さらに、血漿試料においても採血から血漿分離までの時間が経過することにより溶血が生じ、回収量やリファレンスmiRNA量に影響が生じている可能性がある。すなわち、より溶血度が低い試料を使用する必要があると考えられる。これらの結果は、牛血中miRNA定量の試料としては血漿が適していること、さらに採血後速やかに分離する必要があることを示している。

3.2 定量的RT-PCRによる妊娠および非妊娠牛の血中miRNA量の検証

前述の3.1で示された条件下で分離した血漿試料を用いて、人工授精後18日 (D18) と21日後

(D21) の妊娠および非妊娠牛の血中miRNA量を定量した (Fig. 2)。miR-A, C, D, F, G, HおよびIの各miRNAについては、D21の妊娠群で有意に高値を示し、miR-A, C, F, GおよびHはD18と比較しても高い値であった。しかし、D18の妊娠群と非妊娠群間で有意差を示すmiRNAはなかった。

以上の結果から、miR-A, C, D, F, G, HおよびIは、妊娠21日齢における妊娠判定のバイオマーカーとしての可能性が示唆されたが、それ以前での判定は難しいことも示された。不受胎牛への次回授精の時期を考慮すると、妊娠21日での診断では遅く、より早期に判定が可能なmiRNA分子種を探索することが必要である。さらに、miR-A, C, F, GおよびHは、D18と比較しても高値であったことから、卵巣由来ステロイドホルモンによる制御を受けている可能性も考えられ、その制御機構の詳細を今後検討する必要がある。

3.3 溶血による血中miRNA量の変動

前述の3.2において、miR-A, C, D, F, G, HおよびIが妊娠21日齢における妊娠判定のバイオマーカーとして有用である可能性が示された。3.1では、可能な限り溶血後が低い血漿を使用することが血中miRNA定量に必須であることを示したが、これらのmiRNAが溶血によって影響を受けるか否かについては明らかではない。そこで、溶血検体 (血漿) を調製し、溶血が血漿中の各miRNA量に及ぼす影響について調べた。

0-4%の溶血検体を調製し、遊離ヘモグロビン濃度および赤血球由来miRNA量を測定した (Fig. 3)。各指標ともに溶血度依存的に増加し、0.8%、4%で有意に高値を示した。これらの検体を用い、miR-A, C, D, F, G, HおよびIを定量したところ、miR-CおよびDは高い溶血度でも測定値にはまったく影響を受けず、他の

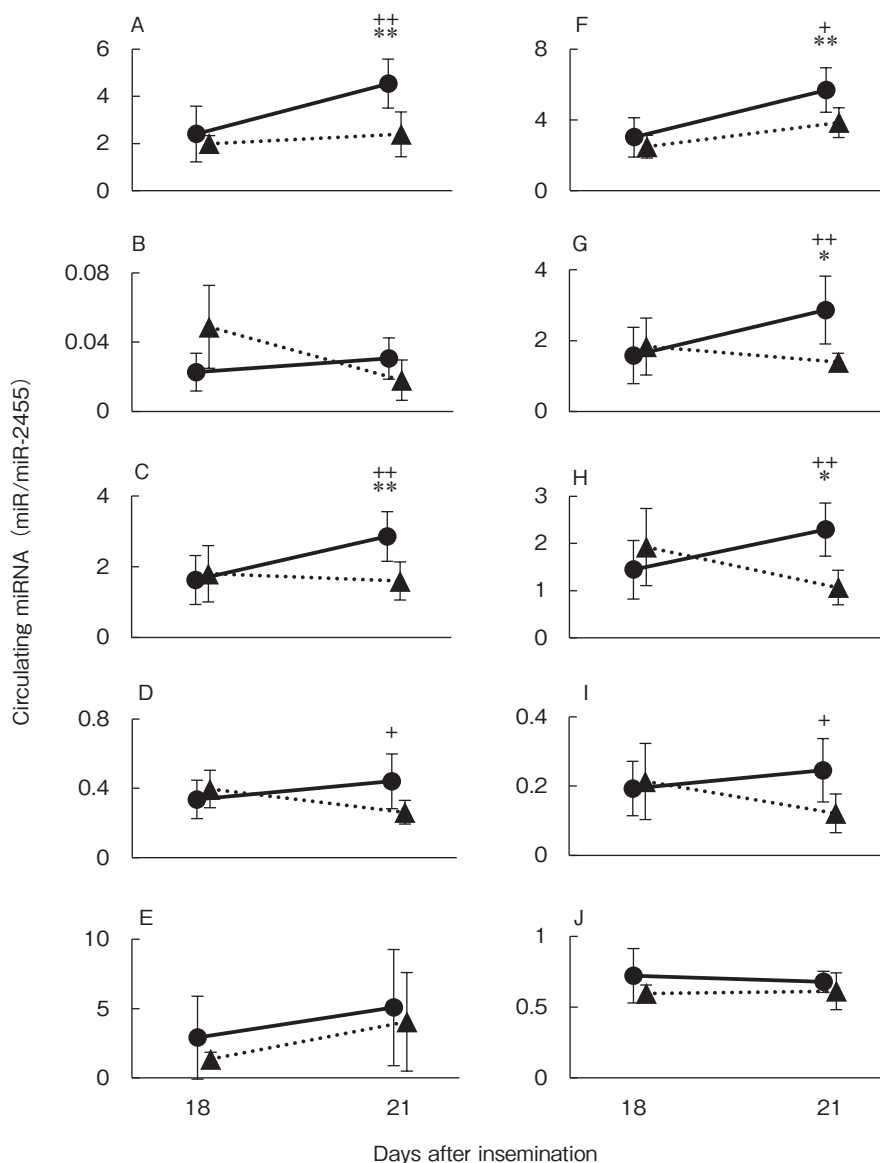


Fig. 2 Circulating miRNA quantities in pregnant and non-pregnant cow on days 18 and 21 gestation.

Closed circle and solid line represents pregnant cows. Closed triangle and dotted line represents non-pregnant cows. A to J indicate miR-A to J. Data are shown as mean ± SEM. *p < 0.05 and **p < 0.01 : D18 pregnant vs D21 pregnant. +p < 0.05 and ++p < 0.01 : D21 pregnant vs D21 non-pregnant.

miRNAについても溶血度が最も高い4%で測定値が高値を示すのみだった。

以上の結果から、今回検証したmiR-A, C, D, F, G, HおよびIは溶血の影響をほぼ受けることがないことが明らかになった。

3.4 今後の展開

今後は、確立した試料条件下および標的miRNAを用いて、より例数を増やした解析を実施し、妊娠診断時の精度（陽性適中率、陰性適中率などの解析）を検証する。また、候補とした各

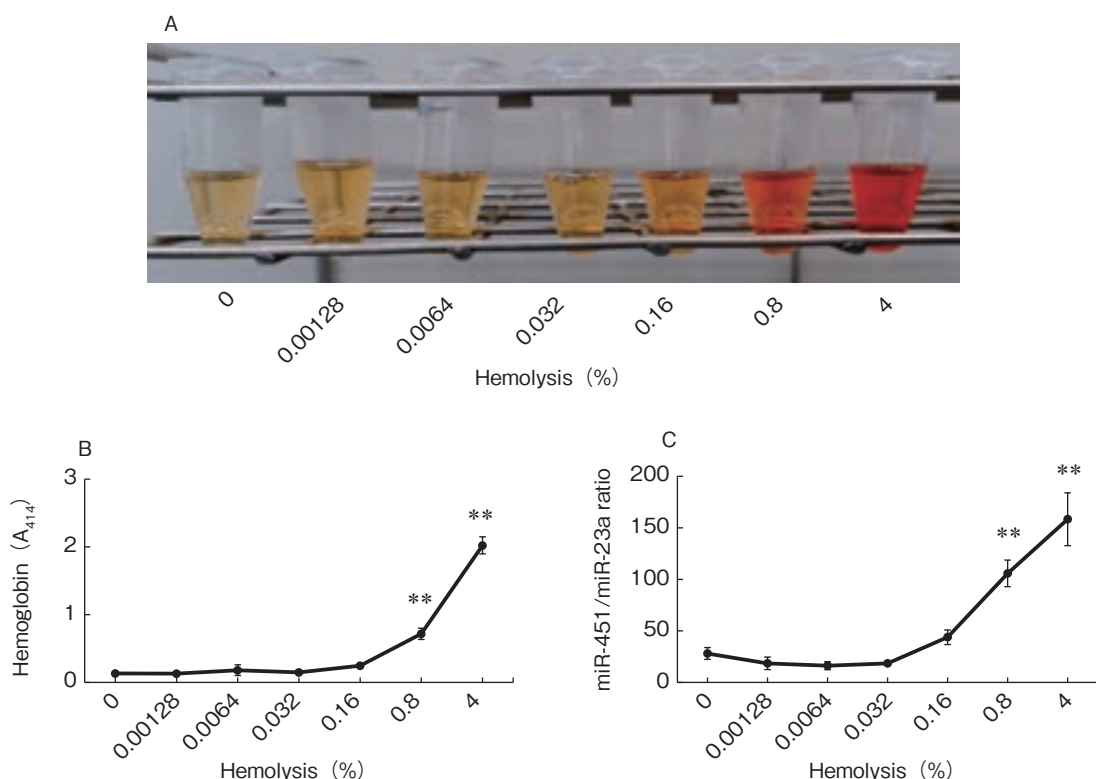


Fig. 3 Visual inspection, free hemoglobin and erythrocyte-derived miRNA in hemolyzed plasma.

Hemolyzed plasma were prepared by sonication treatment of whole blood, and evaluated by visual inspection (A), free hemoglobin concentration (B) and erythrocyte-derived miRNA amounts (C). Data are shown as mean $\pm$ SEM.

** $p < 0.01$.

miRNAは妊娠21日齢における妊娠診断バイオマーカーとしては有用である可能性はあるが、より早期の判定は難しいという結果であった。繁殖効率を高めるためには、妊娠18日以前で判定可能なバイオマーカーが必要であることから、網羅的解析により新たなmiRNA分子種を特定する。

4. 要 約

牛の早期妊娠診断は、その生産性を考えるうえで非常に重要である。しかし、早期、かつ確実に診断する方法は確立されていない。そこで、本研究では血中miRNAに着目し、妊娠診断の新規バイオマーカーとして可能性を検証した。本研究の結果、1) 血中miRNA定量の試料としては血漿

が適していること、2) 採血後速やかに分離する必要があることが示された。さらに妊娠21日における妊娠診断の新規バイオマーカーとしていくつかのmiRNAを同定するとともに、これらが溶血の影響を受け難いことも示された。今後は、妊娠診断の精度の検証やさらに早い時期での判定が可能なmiRNA分子種を特定し、新規妊娠診断技術の構築につなげたい。

文 献

- 1) Gifford, C. A., Racicot, K., Clark, D. S., Austin, K. J., Hansen, T. R., Lucy, M. C., Davies, C. J., Ott, T. L.: *Journal of Dairy Science*, 90(1), 274~80, 2007.
- 2) Green, J. C., Okamura, C. S., Pooock, S. E., Lucy, M. C.: *Animal Reproduction Science*, 121(1-2), 24~33, 2010.

-
- 3) Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K. : *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 6, 2013.
- 4) Wang, J., Chen, J., Sen, S. : *Journal of Cellular Physiology*, 231(1), 25~30, 2016.
- 5) Shah, J. S., Soon, P. S., Marsh D. J. : *PLoS One*, 11(4), e0153200, 2016.

牛における新規腔内薬剤投与技術の確立

Establishment of novel intravaginal drug releasing device in cows

田 中 知 己・遠 藤 なつ美

(東京農工大学農学研究院)

Tomomi Tanaka and Natsumi Endo

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

We improved and evaluated the novel intravaginal drug releasing devices, and revealed the structural characteristics that suppresses their dropout from the vagina and reduces the physical damage to the vagina in cows. In order to clarify the efficacy of the device, progesterone-containing mixtures with the different type of basement compounds were encapsulated and attached to the intravaginal devices. The present study demonstrated the profiles of plasma progesterone concentrations after the insertion of each intravaginal device in ovariectomized and cycling cows. We were able to obtain fundamental data for the establishment of a new intravaginal drug releasing device for the administration of reproductive hormone and/or medical drugs via vagina in cows.

1. 目 的

酪農および肉用牛経営では牛群の大規模化が進み、効率的な乳肉生産を目指した新たな飼養管理技術の開発が大きな課題となっている。特に農家の経営を左右する繁殖管理においては繁殖用薬を効果的に使用し、繁殖効率を向上させたい強いニーズがある。本研究課題は獣医療における新たな投薬技術の開発を目的とするものである。

獣医療において長期間薬剤を投与する方法として経口投与方法があるが、反芻動物（牛、ヒツジ、ヤギ等）での経口投与は胃内の特殊な生理機構の影響を受けるため、多くの薬剤において薬剤の吸収効率がきわめて悪い。また、人医療に比べて獣医療では対象が動物であるという特殊性があるため投薬技術の開発が遅れており、繁殖用薬を含め

多くの薬剤では注射法による投与が一般的となっている。腔内留置型投与具を用いた経腔薬剤持続投与法は家畜での利用においていくつかの利点がある。一つ目は投薬のコントロールが非常に容易になる。投与具を腔内に挿入して抜去するのみで投薬期間をコントロールでき、獣医師や農家にとって大きな負担軽減となる。投与具の抜去後、腔内に残留した薬剤は腔の収縮運動により速やかに腔内から消失する特徴も残留薬物の観点から有利となる。二つ目は投与具による腔内投与法は製造コスト面でメリットがある。投与具に装着した腔内吸収薬は外用薬として投与できるため、注射薬に比べて製造コストを大きく抑えることができる。この他にも、腔と卵巣や子宮は特殊な血管系で結ばれており、腔で吸収された薬物は全身循環を巡ることなく直接卵巣や子宮に到達することか

ら、卵巣や子宮に作用するホルモン剤などの使用では、少ない薬用量で強い薬理効果が見込める。

腔内留置型投与具はこれらの利点を有するにもかかわらず、腔内に投与具を確実に滞留させることの困難さや腔内で薬剤を効率的に吸収させること等の技術的な問題が開発の隘路となっていた。我々は腔内留置型投与具として前進駆動部の形状を特殊化したデバイスの開発を進め、牛での使用を想定した改善を加えることで、従来の投与具を上回る操作性に優れた腔内薬剤投与具の開発を目指している。また、この投与具では溶出性と粘膜吸収性に優れた特殊な基材を組み合わせた丸剤を投与具の先端に取り付けることが可能であり、さまざまな薬剤投与に応用できるメリットがある。本課題では黄体ホルモンであるプロゲステロンをリファレンス剤として用い、投与具および基材の応用性について解析を行った。

2. 方 法

2.1 投与具の腔内滞留性能の評価

我々が開発を進める投与具に改良を加え、改良型投与具の性能評価を行った。ホルスタイン種経産牛延21頭を実験に供試し、改良型投与具を腔内に挿入し、脱落などの不具合の発生や腔内分泌物の状態を観察した。投入具は基本的に薬剤装着部位と前進駆動部からなり、投与具の先端に十分な薬剤（丸剤）が装着できる構造である。投与具は陰門より腔浅部に挿入し、挿入後は腔の脈動と投与具の構造により投与具が自ら前方に進み腔深部に滞留する仕組みとなっている（Fig. 1）。投与具の改良は基本的に前進駆動部について行い、前進駆動部の角度、長さ、開張強度を調整した。投与具の挿入期間は獣医臨床領域における使用を考慮して3日から10日間の範囲とした。投与具の抜去の際に腔内分泌物の分泌量および性状（分泌物への絮状物の混入など）を目視にて検査し、膿様

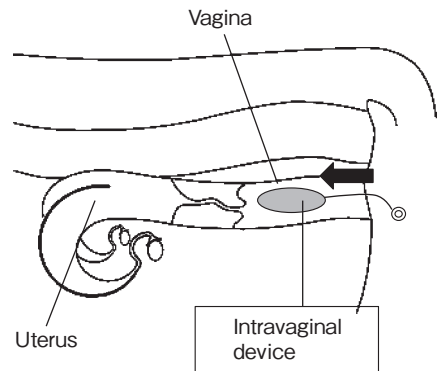


Fig. 1 Schematic illustration of insertion of the intravaginal device in cows (lateral view)

物の混入が疑われる場合には、分泌物を回収して塗抹標本を作成し、細胞学的検査を実施した。

2.2 プロゲステロン含有カプセルを装着した投与具挿入後の血中プロゲステロン濃度の変化

投与具の先端に黄体ホルモンを含有するカプセルを装着して実験牛に挿入（投与）し、プロゲステロンの体内移行性の評価を行った。適切な候補基材を選定することを目的に、5種類の粘度の異なる水溶性基材とプロゲステロンを混合したプロゲステロン含有混合物をカプセルに封入し、投与具の先端に装着した。黒毛和種牛延べ11頭およびホルスタイン種経産牛延べ4頭を実験に供試した。黒毛和種牛については、卵巣からのホルモン分泌の影響を除外するため、外科的な卵巣摘出处置を施し、任意の時期にプロゲステロン含有カプセル装着投与具を挿入した。ホルスタイン種牛については、卵巣機能の影響も考慮し、発情周期の黄体期よりホルモン処置を行い、投与具の挿入を行った。すなわち直腸検査により排卵を確認し、黄体期にプロスタグランジンF_{2α}類似体1.5mg（d-クロプロステノール，ダルマジン，共立製薬株式会社）を筋肉内投与して黄体退行を誘起し、プロスタグランジンF_{2α}類似体投与後2

日に投与具を挿入した。投与具の挿入期間は臨床領域における利用を考慮して14日間とした。投与具挿入後2-3, 6, 9, 12-13日に尾静脈あるいは頸静脈より採血を行い、血漿中プロゲステロン濃度をEnzyomo immuno-assay法¹⁾により測定した。

3. 結果と考察

3.1 投与具の腔内滞留性能の評価

投与具を挿入した21例のうち4例において投与具の脱落が認められ、4例いずれも挿入後3日以内に脱落した。脱落は前進駆動部の角度が小さく開張強度が弱いものについて発生が認められた。一方、分泌物における絮状物の混入の程度は、前進駆動部の角度が大きく開張強度が強い投与具において認められた。これらの条件を分析して改善を加え、本研究課題実施期間の最終段階において、脱落を抑え、かつ、抜去時において腔分泌量の少ない投与具の形状を特定することができた。脱落の発生は、前進駆動部による前進力の強さおよび開張強度の強さによる腔からの排出力に対する投与具の抵抗性によるものと考えられる。一

方、開張強度の強さは腔壁に対して物理的な障害を与え、腔内における炎症の発生につながる恐れがある。臨床現場における活用を考慮して、これら条件の最適化を図ることが重要であり、今回の実験により完成度の高い投与具に改良することができた。一方、課題として、今回は大型品種であるホルスタイン種において検証を行ったが、黒毛和種などホルスタイン種に比べて小型の品種においても最適な条件について検討を加える必要があると考えられる。

3.2 プロゲステロン含有カプセルを装着した投与具挿入後の血中プロゲステロン濃度の変化

プロゲステロン装着投与具挿入後の血中プロゲステロン濃度をTable 1にまとめた。投与挿入直前の血中プロゲステロン濃度はほとんどの例で低い値を示しており、黒毛和種牛においては卵巢摘出が適切に行われていること、およびホルスタイン牛については、プロスタグランジンF_{2α}投与により黄体の退行が誘起されていることが示された。投与具挿入後のプロゲステロン濃度の推移は基材のタイプにより異なっていた。タイプ

Table 1 Changes in the plasma concentration of progesterone after the insertion of intravaginal device attached progesterone-containing capsules

Cow No.	Breed	Type of capsule	Plasma progesterone concentration (ng/ml)				
			Days after insertion				
			0	2-3	6	9	12-13
1	JB	Type 1	0.1	2.1	1.4	0.2	0.4
2	JB	Type 1	0.7	2.5	1.4	0.2	0.4
3	H	Type 1	0.8	264	1.9	0.3	ND
4	JB	Type 2	0.6	1.5	2.8	3.7	0.1
5	H	Type 2	0.7	2.9	0.7	0.1	ND
6	H	Type 2	0.2	1.3	1.6	0.7	ND
7	JB	Type 3	0.1	1.7	1.6	1	0.5
8	JB	Type 3	0.1	0.3	1.1	0.3	0.1
9	JB	Type 4	0.1	0.6	0.7	0.5	0.6
10	JB	Type 4	2.5	0.1	0.6	0.1	0.3
11	JB	Type 5	0.3	0.3	0.1	0.1	0.2
12	JB	Type 5	0.4	0.3	1.1	0.1	4.6

JB : Japanese Black H : Holstein ND : No Data

1 およびタイプ2の基材を用いて作成されたプロジェステロン含有カプセルを装着した投与具を挿入した際には、すべての例で挿入後2～3日において血中プロジェステロン濃度の上昇が起こり、多くの例で挿入後6日まで、1例では挿入後9日まで血中プロジェステロン濃度が高いレベルで維持されていた。一方、タイプ4およびタイプ5のカプセルを挿入された例では血中プロジェステロンの上昇は認められず、挿入期間中は低い濃度で推移した。タイプ3については、血中プロジェステロン濃度が上昇した例と上昇しなかった例が認められた。牛の発情周期において黄体が最も活発に機能する黄体開花期における血中プロジェステロン濃度は5 ng/ml前後であることが示されている²⁾。今回タイプ1およびタイプ2のカプセルによる腔内投与は腔内で溶出したプロジェステロンが腔壁から吸収され、全身循環に移行させることができるものの、黄体開花期のレベルまで血中プロジェステロン濃度を上昇させることはできなかったと考えられる。このことは獣医領域における既存の腔内徐放剤によるプロジェステロン投与後の血中プロジェステロン濃度の推移と類似しており、同様の効果が発現したものと考えられる。一方、異なる基材による血中へのプロジェステロンの移行性の違いは基材の有する粘度と溶出性が関与していると思われる。粘度の低い基材の場合は、短い時間内における腔壁への溶出性は高いが、腔内から排出される速度も早い傾向がある。今回の成績から比較的長期間（7日以上）薬剤投与を行う場合はタイプ1が、短期間（7日未満）

作用されることを目的とした投与の場合、タイプ2あるいはタイプ3の特性を持つ基材が有効であると考えられる。

4. 要 約

我々が開発を進めている新たな腔内留置型投与具に対して改良を加えその評価を行ったところ、脱落を抑え、かつ、腔内に与える物理的障害を軽減する投与具の特徴を明らかにすることができた。また、性質の異なる5つの基材それぞれについて、プロジェステロン含有混合物を作成してカプセルに封入し、それらを投与具に装着して腔内に挿入した場合のプロジェステロンの体内移行の特徴を検証することができた。我々はヤギにおいてプロジェステロンと化学的性状の異なるペプチドホルモンの腔内投与効果を明らかにしている³⁾。今回のプロジェステロン剤において得られた投与具および基材の特性を応用して、プロジェステロン以外の薬剤を用いた新規腔内薬剤投与技術の確立に向けて基盤的な成果を得ることができた。

文 献

- 1) Suganuma, C., Kuroiwa, T., Tanaka, T., Kamomae, H.: *Anim. Reprod. Sci.*, **101**, 285～294, 2007.
- 2) Endo, N., Nagai, K., Tanaka, T., Kamomae, H.: *Anim. Reprod. Sci.*, **134**, 112～118, 2012.
- 3) Rahayu, L. P.: Studies on the clinical application of kisspeptin analog and neurokinin B receptor agonist to improve Reproductive Performance in Goats, PhD thesis, 37～61, Gifu University, Gifu, 2018.

牛体内成熟卵を用いた移植用胚生産システムの高度化に関する研究

Study on improvement of *in vitro* embryo production system using oocytes matured *in vivo* for embryo transfer

山 中 賢 一

(佐賀大学農学部)

Ken-ichi Yamanaka

(Faculty of Agriculture, Saga University)

In this study, we examined whether the use of *in vivo*-matured oocytes, collected by ovum pick-up (OPU) from superstimulated Japanese Black cows, can improve the productivity and quality of *in vitro* produced embryos. The cows were superstimulated by treatment with progesterone, GnRH, FSH and prostaglandin F2 α according to a standardized protocol. The resulting *in vivo*-matured oocytes were collected by OPU and used subsequently for the other experiments. The immature oocytes from cows in the non-stimulated group were collected by OPU and then subjected to maturation *in vitro*. We found that the rate of normally distributed cortical granules of the matured oocyte cytoplasm in the superstimulated group was significantly higher than that in the non-stimulated group. The normal cleavage rate (i.e., production of embryos with two equal blastomeres without fragmentation) and freezable blastocyst rate were significantly higher in the superstimulated group than in the nonstimulated group. Among the transferable blastocysts, the ratio of embryos from normal cleavage was also significantly higher in the superstimulated group than in the non-stimulated group. For *in vivo*-matured oocytes, it was observed that the pregnancy rates were significantly higher when normally cleaved embryos were used for transfer. Taken together, these results suggest that high-quality embryos with respect to developmental kinetics can be efficiently produced with the use of *in vivo* matured oocytes collected by OPU from superstimulated Japanese Black cows.

1. 目 的

超音波画像診断装置を用いて生体内卵巣から卵母細胞を採取するOvum Pick-Up (OPU) 法が開発され、雌牛から繰り返し卵母細胞を採取することが可能となっている。OPUと体外受精技術と組み合わせることによって任意の雌雄個体から優

良形質を受け継いだ子牛をより効率的に生産することができるため、優良雌牛の遺伝資源の有効活用の観点から、OPU法の現場レベルでの普及が現在推進されている。さらに、OPU法を利用して体外で胚を生産することは、現在、現場レベルでの活用が広まりつつある黒毛和種牛のゲノム育種価の利用促進にも大いに貢献することから、今

後ますますその需要が高まると考えられる。しかしながら、体外胚生産システムに関して過去数十年にわたって研究がなされてきたにもかかわらず、体外生産胚の移植後の受胎率および凍結保存後の生存性は体内生産胚のそれと比較していまだに低く¹⁾、これらは体外生産胚を利用した子牛生産における最大の問題と言える。体外生産胚の発生能に影響を与える最も重要な要因として卵母細胞の品質があげられ、体外成熟卵では細胞小器官や分子の再分布、タンパク質やmRNAの合成といった細胞質成熟が損なわれていることが示されている²⁾。これらのことを考慮すると、体外成熟技術の改良が必要であると考えられる一方で、OPU-IVPにおいて効率的に高品質な体外生産胚を作製するためには、現時点では体内成熟卵を利用することが合理的であると考えられる。

そこで、本研究では現時点で生産現場への普及が可能で、かつ高い受胎率が望める移植胚生産システムの確立を目的として、体内成熟卵の有用性について検討を行った。

2. 方 法

2.1 過剰排卵処理

発情周期の任意の時期に腔内留置型黄体ホルモン製剤 (CIDR; ファイザー) を挿入し (0 日目), 5.5 日目に性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 類縁体 (酢酸フェルチレリン, スポルネン, 共立製薬) 100 μ g を筋肉内投与した。8 日目に水酸化アルミニウムゲルと混合した卵胞刺激ホルモン (FSH) 製剤 (アントリン AI; 共立製薬) 30 AU を頸部皮下に単回投与し, 10 日目にプロスタグランジン F2 α 類縁体 (エストラメイト; インターベット) 500 μ g を筋肉内投与した。10.5 日目に CIDR を抜去し, 11.5 日目に GnRH 100 μ g を筋肉内投与した。この二回目の GnRH 投与後 25~26 時間に OPU を行った。

2.2 OPU による COCs の採取

事前の処理は行わずに発情周期の任意の時期に未成熟卵を OPU により採取する群を対照区とし、過剰排卵処理後に体内成熟卵を OPU により採取する群を試験区とした。供試牛を柵場に保定し、キシラジン塩酸塩 (セラクター 2% 注射液, バイエル薬品株式会社) 10mg の頸部筋肉内投与による鎮静処理を行った後、塩酸リドカイン (リドカイン注 2%, ファイザー株式会社) 100mg の尾椎硬膜麻酔を行った。OPU は 7.5MHz のコンベックス型プローブを接続した超音波診断装置 (ECHOPAL II, 日立メディコ) と吸引装置 (FV 4, 富士平工業) に接続した 17 ゲージ $\times$ 540mm の採卵針 (COVA Needle, ミサワ医科工業) を用いて一定の陰圧 (120mmHg, 20-25 ml/分) で行った。超音波ガイド下にて採卵針を卵巣に誘導し、直径 2mm 以上のすべての卵胞を穿刺して卵胞液とともに卵胞内卵母細胞を吸引した。また、吸引した卵胞の数および大きさを記録した。回収液には 10 IU/ml ヘパリンナトリウム (ヘパリン Na 注 5 千単位, 持田製薬), 0.5% (v/v) 子牛血清および抗菌薬 (GIBCO) を添加した乳酸加リンゲル液 (ハルゼン V 注射液, 日本全薬工業) を用いた。

2.3 体外生産胚の作出

対照区では、未成熟卵母細胞を 5% (v/v) 牛胎児血清 (FBS; Thermo Fisher Scientific), 0.02 IU/ml FSH (共立製薬) および 50 μ g/ml ゲンタマイシン (ナカライテスク) を添加した TCM-199 (Thermo Fisher Scientific) 培養液を用いて 38.5°C, 5% CO₂ 気相にて 22 時間の体外成熟後に体外受精を行った。一方、試験区では、卵丘細胞が膨化した成熟卵母細胞を 5% FBS および 50 μ g/ml ゲンタマイシンを添加した TCM-199 培養液を用いて 38.5°C, 5% CO₂ 気相にて約 3 時間培養し、供試牛の GnRH 投与から 30 時間後に体外受精を

行った。牛凍結精液を融解し、90% (v/v) パーコール溶液 (GE Healthcare) を用いて2100rpm, 10分間の遠心処理を行った。上清を除去した後、IVF100 (機能性ペプチド研究所) で希釈し、1500rpm, 5分間の遠心処理により洗浄した。さらに精子の最終濃度が 3.0×10^6 個/mlになるようにIVF100にて希釈し、38.5℃, 5% CO₂ 気相にて6時間媒精した。体外発生培養は個々の胚を識別するために個別管理培養ディッシュ (LinKID micro25; 大日本印刷株式会社) を用いて、5% FBS添加CR1aa内で38.5℃, 5% O₂, 5% CO₂ 気相にて8日間行った。

2.4 表層顆粒 (cortical granules : CGs) の染色

対照区で得られた未成熟卵を体外成熟した後の体外成熟卵と試験区から得られた体内成熟卵間でCGs分布の比較を行った。1 mg/mlのアクチナーゼE (ナカライテスク) を添加したTCM-199溶液中でCOCsの膨化した卵丘細胞および透明帯をピペッティングにより機械的に除去した。次に、4% (w/v) パラホルムアルデヒド (pH7.4) にて60分間固定し、0.05% (v/v) TritonX-100を添加したPVP-PBSで5分間の透過処理を行った。PVP-PBSで3回洗浄した後、卵母細胞を1% (w/v) 牛血清アルブミン加PBSにて15分間のブロッキングを行い、10 μg/ml fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled Lens culinaris agglutinin (LCA) (Vector Labs Inc.) にて遮光下で30分間インキュベーションした。卵母細胞をPVP-PBSで3回洗浄した後、スライドガラスに蛍光褪色防止液とともにマウントし、共焦点レーザー顕微鏡 (C1; ニコン) を用いて励起・蛍光波長それぞれ488nm, 515nmの条件下でCGs分布を観察した。

2.5 胚移植および妊娠診断

胚移植にはInternational Embryo Technology

Society (IETS) マニュアルで定められている基準に従ってcode 1と評価した培養から7-8日後の胚盤胞期胚を用いた。受胚牛にはホルスタイン種を用いて、シダーシンク法による排卵同期化処理を行い、発情から7-8日後に黄体側の子宮角に新鮮胚を1個移植した。発情から35-40日後に超音波画像診断装置 (iMAGO; ECM) を用いて妊娠診断を行った。

2.6 統計解析

CGs分布および胚盤胞発生率はカイ二乗検定を用いて試験区間の差の解析を行った。受胎率はフィッシャーの直接確率検定を用いて試験区間の差の解析を行った。また、他のデータについてはStudentのt検定により試験区間の差の解析を行った。%データは解析の前にアークサイン変換を行った。 $p < 0.05$ の場合を統計的に有意な差が認められると判断した。

3. 結果と考察

OPUで採取された卵母細胞に対する過剰排卵処理の影響を調査した研究では、体内成熟卵は体外成熟卵よりも体外発生能が高いことが示されているが³⁾、それらの間で細胞質成熟の状態を比較した研究はほとんどない。したがって、本研究では、細胞質成熟の状態をCGsの分布を指標として調査を行った。CGsの各分布パターンの典型的な画像をFig. 1に示した。CGsが正常な分布を示す卵母細胞の割合は、対照区に比べて試験区で有意に高かった ($p < 0.05$; Table 1)。CGsは卵母細胞の成熟における最終段階では細胞膜付近に分布しており、CGsが細胞質膜直下に存在する場合にのみCGsは卵細胞膜と融合し、その内容物を卵卵腔に放出させることができる^{4, 5)}。このCGsのエキソサイトーシスは多精子受精を防止するために最も重要な事象であると考えられており⁶⁾、細胞質成熟の指標の一つとして用いられている。最近の

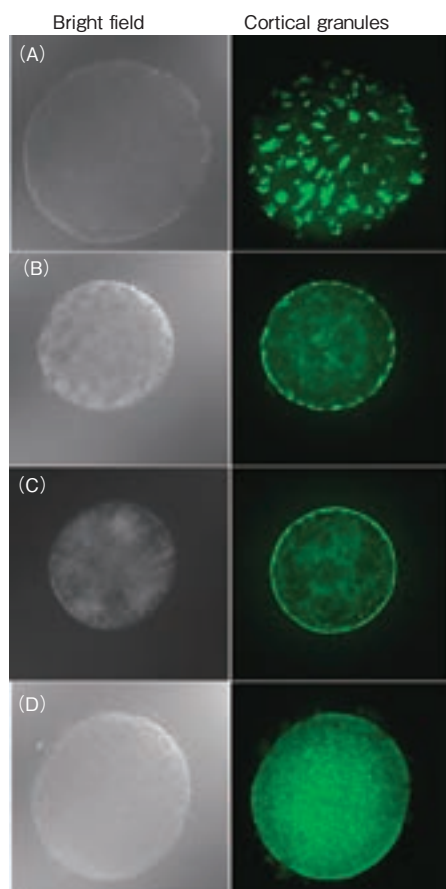


Fig. 1 Representative images of the distribution of cortical granules (CGs) in bovine matured oocytes : The distribution pattern of CGs in bovine ooplasm were classified according to the four patterns described by Hosoe and Shioya⁴⁾ : Pattern I - CGs distributed in clusters or large aggregates (A) ; Pattern II - CGs individually dispersed beneath the plasma membrane and partially clustered or aggregated (B) ; Pattern III - CGs completely dispersed beneath the plasma membrane (C) ; and Pattern IV - no CGs (D)

研究によると、OPU前に過剰排卵処理した牛から採取された卵母細胞は、無処理の牛のそれと比較して多精子受精の割合が低かったことが報告されている⁷⁾。体内成熟卵の多精子受精率に関しては今後検討する必要があるが、体内成熟卵では、体外成熟卵と比較して細胞質成熟がより適切に起こっていることが示された。

対照区の体外成熟卵および試験区の体内成熟卵を用いた体外発生成績をTable 2 に示した。また、本研究で用いた第1卵割のパターンをFig. 2 に示した。分割率および胚盤胞発生率に有意な差は認められなかったが、正常卵割胚および凍結可能胚 (code 1) の割合は対照区と比べて試験区で有意に高かった ($p < 0.05$)。また、移植可能胚 (code 1 および 2) のうち第1卵割が正常な胚の割合は対照区と比べて試験区で有意に高かった ($p < 0.01$)。これらの結果は、体内成熟卵を用いることで高品質胚の産生は可能であるが、体外発生率は改善されなかったという過去の報告と一致していた^{3, 8)}。一方で、本研究で用いたプロトコルはホルスタイン種の過剰排卵処理のために設計されたものを参考にしており、今後は黒毛和種に最適なプロトコルを設計し、得られた卵母細胞およびそれらを用いて生産された胚について再度精査することで、体外発生率の向上につながるかもしれない。

最後に、本研究の体内成熟卵を用いた体外胚生

Table 1 Distribution patterns of cortical granules (CGs) in *in vitro*-(non-stimulated, control) and *in vivo*-(superstimulated) matured oocytes in Japanese Black cows.

Group	No. of oocytes examined	No. of oocytes showing each distribution pattern of CGs				No. of oocytes showing normal CG distribution (%)
		I	II	III	IV	
Non-stimulated	26	11	10	4	1	14 (53.8) *
Superstimulated	31	5	11	14	1	25 (80.6) *

The distribution patterns of CGs in ooplasm were detected after *in vitro* maturation (non-stimulated group) or OPU (superstimulated group), and classified according to the four patterns shown in Fig. 1. Oocytes with CGs distributing cortical cytoplasm (patterns II and III) were classified as normal distribution. Asterisks indicate that values within the same column are significantly different ($p < 0.05$).

Table 2 *In vitro* development of embryos produced using *in vitro*-(non-stimulated, control) and *in vivo*-(superstimulated) matured oocytes.

	Non-stimulated	Superstimulated
No. of putative zygotes cultured	200	204
No. of embryos cleaved (%) ^a	166 (83.0)	160 (78.4)
No. of normally cleaved embryos (%) ^b	86 (51.8) *	105 (65.6) *
No. of embryos developed to blastocyst stage on Day 8 (%) ^b	100 (60.2)	96 (60.0)
No. of IETS code 1 and 2 blastocysts (%) ^b	81 (48.8)	92 (57.5)
No. of IETS code 1 blastocysts (%) ^b	42 (25.3) *	59 (36.9) *
No. of IETS code 1 and 2 blastocysts from normal cleaved embryos (%) ^b	49 (29.5) **	73 (45.6) **

Oocytes collected from non-stimulated and superstimulated Japanese Black cows were subjected to *in vitro* and *in vivo* maturation in the non-stimulated and superstimulated groups, respectively, and used for *in vitro* fertilization. Data for the non-stimulated and superstimulated groups were obtained from 7 and 6 replicates, respectively. ^a The percentages of cleaved embryos at 50 hpi to cultured zygotes was denoted. ^b The percentages of embryos corresponding to each criterion in cleaved embryos was denoted. Asterisks indicate that values within the same row are significantly different (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

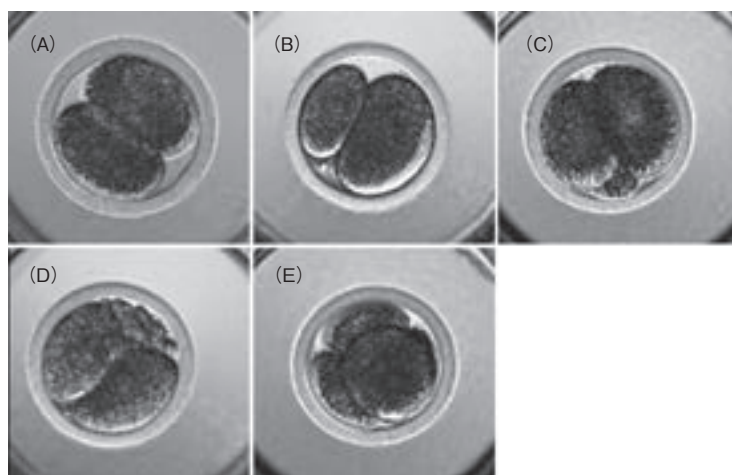


Fig. 2 Morphological classification of cleavage pattern of bovine embryos at the first cell cleavage ; The cleavage patterns of embryos at the first cell division were classified as described by Sugimura et al.⁹⁾ ; Embryos with blastomeres of the same size without fragmentation (A) were classified as having undergone normal cleavage, and embryos with two blastomeres of different sizes (B), two blastomeres with a protrusion (C) or several small fragments (D), direct cleavage from the one-cell stage to three or four blastomeres (E) were classified as having undergone abnormal cleavage

産システムが高品質な移植胚の生産に寄与するかについて評価するため、移植後の受胎率について検討を行った。試験区において、第1卵割が正常卵割または異常卵割由来の胚盤胞期胚を移植した結果、受胎率はそれぞれ61.9% (13/21), 12.5% (1/8) であり、異常卵割由来と比べて正常卵割由

来の胚盤胞期胚で有意に高くなった ($p < 0.05$)。最近の研究によると、第1卵割後に均等な割球を有する正常卵割胚は、異常な卵割を経た胚より受胎率が高いことが報告されており、第1卵割パターンを解析することは胚移植後の妊娠損失の危険性を減らすことができる可能性を示してい

る⁹⁾。本研究の結果はこの報告と一致しており、形態学的に同等の品質の胚であっても、異常卵割胚と比べて正常卵割胚で受胎率が有意に高くなる結果が得られた。一方、対照区において、第1卵割が正常卵割由来の胚盤胞期胚を移植した結果、受胎率は50.0% (5/10) であった。この結果は、高い受胎率を得るためには必ずしも体内で成熟された卵母細胞から胚を生産する必要はなく、単純に正常卵割胚を選択して移植することが重要であることを示唆している。しかしながら、本研究において、体内成熟卵を用いた場合、体外成熟卵を用いた場合と比較して、より多くの正常卵割を経た移植可能胚が得られた。この結果と第1卵割が正常な胚の受胎率が高いという移植試験の結果を考慮すると、体外胚生産に体内成熟卵を用いることで形態学的だけではなく、発生動態の観点からも品質が高い胚を高率で生産することが可能であり、結果として移植可能胚の生産効率、しいては受胎率の向上に寄与することが期待される。

4. 要 約

本研究では、体外胚生産に体内成熟卵を用いることで、第1卵割が正常な胚および凍結可能胚の生産性が向上することを示した。さらに、正常卵割胚を移植することで、高い受胎率が得られた。

このような胚の発生能に対する体内成熟卵の有効性は、正常なCGs分布から示されるように、適切な卵母細胞の成熟によるものと考えられた。これらの結果から、OPUにより採取された体内成熟卵を用いることで、形態学および発生動態的に高品質な胚の生産性を向上させることができ、体外生産胚による効率的な子牛生産に寄与することが示唆された。

文 献

- 1) Galli, C., Duchi, R., Colleoni, S., Lagutina, I., Lazzari, G. : *Theriogenology*, **81**, 138~51, 2014.
- 2) Merton, J. S., de Roos, A. P., Mullaart, E., de Ruigh, L., Kaal, L., Vos, P. L., *et al.* : *Theriogenology*, **59**, 651~74, 2003.
- 3) Matoba, S., Yoshioka, H., Matsuda, H., Sugimura, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., *et al.* : *J Dairy Sci*, **97**, 743~53, 2014.
- 4) Hosoe, M., Shioya, Y. : *Zygote*, **5**, 371~6, 1997.
- 5) Hyttel, P., Fair, T., Callesen, H., Greve, T. : *Theriogenology*, **47**, 23~32, 1997.
- 6) Wang, W., Hosoe, M., Li, R., Shioya, Y. : *Dev Growth Differ*, **39**, 607~15, 1997.
- 7) Ribas, B. N., Missio, D., Junior Roman, I., Neto, N. A., Claro, I. J., Dos Santos Brum, D., *et al.* : *Anim Reprod Sci*, **195**, 284~90, 2018.
- 8) Dieleman, S. J., Hendriksen, P. J., Viuff, D., Thomsen, P. D., Hyttel, P., Knijn, H. M., *et al.* : *Theriogenology*, **57**, 5~20, 2002.
- 9) Sugimura, S., Akai, T., Somfai, T., Hirayama, M., Aikawa, Y., Ohtake, M., *et al.* : *Biol Reprod*, **83**, 970~8, 2010.

黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査

Survey of the low durability of motile sperm in the frozen semen of
Japanese Black cattle

星 野 洋一郎

(京都大学大学院農学研究科附属牧場)

Yoichiro Hoshino

(Kyoto university livestock farm)

Sperm motility of frozen semen affects the conception rate in the artificial insemination in cattle production. The durability of sperm motility differs greatly depending on bulls. In this study, we defined the sperm motility durability score that indicates the degree of keep of sperm motility, and analyzed the motility of frozen semen in 56 Japanese black bulls. Frozen semen of 19 bulls that were produced by the old method or from the bull that was over 8 years old at the time of production were excluded from the analysis due to low sperm motility. There is no correlation between the birth date of 37 bulls and the sperm motility at 0 h or sperm motility durability score. This result indicates that there was no change in sperm motility during the process of breed improvement of Japanese black cattle. On the other hand, the durability of velocity curvilinear (VCL) tends to be lower and the durability of linearity (LIN) tends to be higher in the recent bulls. This result suggests that the onset of the sperm spontaneous hyperactivation of recent bulls getting later. The SNP association analysis with the sperm motility durability score showed that there is a possibility that a SNP which was included in the uncharacterized gene LOC101907140 on the chromosome No. 10 correlate with high sperm motility durability score.

1. 目 的

家畜牛の人工授精受胎率は低下傾向である。家畜改良事業団による凍結精液の受胎率調査では、平成元年の初回授精受胎率は乳用牛精液62.4%、肉用牛精液67.5%であったが、平成26年には44.4%、55.0%に低下したことが報告されている¹⁾。受胎率低下の原因としては、乳用牛においては、雌牛の高泌乳化に伴う繁殖能力低下の影響が大きい²⁾。一方、肉用牛精液の受胎率調査には、

交雑種生産の場合の受胎率も含まれているため、肉用牛間の受胎率は乳用牛ほど低下していないとも言われている。明らかな低受胎率を呈する種雄牛の精液は、精子の形態等に異常があることが報告されているが³⁾、通常、このような精液は人工授精に用いられない。しかし、一定以上の受胎率があり、人工授精に幅広く利用されている凍結精液であっても、種雄牛によって受胎率が異なる⁴⁾。

本研究では、精子の運動性がどの程度長く維持されるかに着目し、これを精子の運動持続性と呼

ぶ。凍結融解精液中の運動精子の割合は、時間経過とともに低下するが、種雄牛によって低下の程度は異なる。運動持続性の低い種雄牛の精液は、雌牛子宮内での生存時間が短いと考えられ、潜在的な受胎率低下要因の一つである可能性がある。もし低運動持続性が遺伝的要因であるなら、育種改良の過程で低運動持続性の増加を防ぐ必要がある。そこで本研究では、一地域でこれまでに造成された多数の黒毛和種種雄牛の凍結精液の精子運動持続性を調査し、種雄牛の生年月日との相関を調べることにより、精子運動持続性に变化傾向があるかどうかを明らかにした。さらに精子運動持続性と関連する可能性のあるゲノム領域について、種雄牛のSNP型との相関を調べることにより調査した。

2. 方 法

2.1 凍結精液の体外培養

凍結精液は岐阜県畜産研究所（岐阜県高山市）がこれまでに製造・保管していた黒毛和種凍結精液の提供を受けた。種雄牛56頭（1966年～2011年生、凍結精液は1982年～2015年製造の74ロット）の凍結精液を3本ずつ解析に用いた。解析結果は3本の結果を集計した。

凍結精液の運動性解析は以下のように実施した。凍結精液ストローを37℃の温水に浸漬して融解し、ストロー1本につき200 μ lを48wellプレートの1wellに入れ、38℃の培養器（高湿度、空気気相）内で培養した。融解直後（0時間）から1時間ごとに4時間後まで、以下のとおり動画を撮影し、精子運動性解析を行った。

2.2 精子運動性の動画解析

精液2 μ lを精子検査用チャンバー（Leja, 8検体用）に注入し、倒立顕微鏡に設置した37℃のマイクロウォームプレート上に置き、顕微鏡に接続したデジタルカメラを用いて約3秒間の動画

（1920×1080, 秒間60フレーム）を撮影した。

自作の精子運動性解析プログラムを用い、動画中1秒間（60フレーム）の精子運動軌跡を解析した。精子の軌跡の最も遠い二点の距離が20 μ m以上であった精子を、運動精子と判定した。動画中で解析した全精子に占める運動精子の割合を運動精子率とした。特に0時間における運動精子率を、融解時運動精子率とした。各運動精子について、WHOラボマニュアル5版⁵⁾に記載された定義に従い、運動性解析項目（VCL, VAP, VSL, LIN, WOB, STR, BCF, ALH）を算出した。運動性解析項目は正規分布しないため、中央値を代表値とした。

2.3 精子運動持続性の指標（持続性スコア）の定義

精子運動の持続性スコアは、各種雄牛の融解時運動精子率の1/2を基準として、運動精子率が基準以上である時間を小数点以下まで求めた。

運動性解析項目の持続性スコアは、培養0時間から4時間後までの全解析精子の中央値を基準として、時間区別の中央値が基準以上である時間を小数点以下まで求めた。

2.4 精子運動性に精液製造時の季節および種雄牛年齢が及ぼす影響の検討

予備実験として、精子運動性に種雄牛の個体差以外に季節、および種雄牛の年齢の影響があるかを検討した。季節の影響は、1年を3ヶ月ずつの期間（春（3～5月）、夏（6～8月）、秋（9～11月）、冬（12～2月））に分け、1年以内に各期で凍結精液が製造された種雄牛3頭の運動精子率を比較した。年齢の影響は、5歳、7歳、9歳、11歳時に凍結精液が製造された種雄牛3頭の運動精子率を比較した。

2.5 黒毛和種種雄牛集団における精子運動持続性の大規模調査

種雄牛56頭の凍結精液について、融解時運動精

子率と精子運動持続性スコアを解析し、種雄牛生年月日との相関を調べた。ただし、凍結精液製造方法および種雄牛年齢が精子運動性に影響している可能性がある19頭は、調査から除外した。

2.6 精子運動に関わる遺伝的要因の探求

各種雄牛について34481個のSNPがタイピングされている。このうちハーディー・ワインベルグ平衡検定の p 値が0.001以下、およびマイナーアレル頻度5%以下のSNPを除外した。融解時運動

精子率および精子運動持続性スコアについて、上位1 σ 以上または下位1 σ 以下を陽性とみなし、ゲノム相関解析ソフトPLINKを用いてSNP型との相関を調べた。

3. 結果と考察

3.1 運動精子率の時間変化と精子運動持続性スコア

Fig. 1 に運動精子率の時間変化と、精子運動持

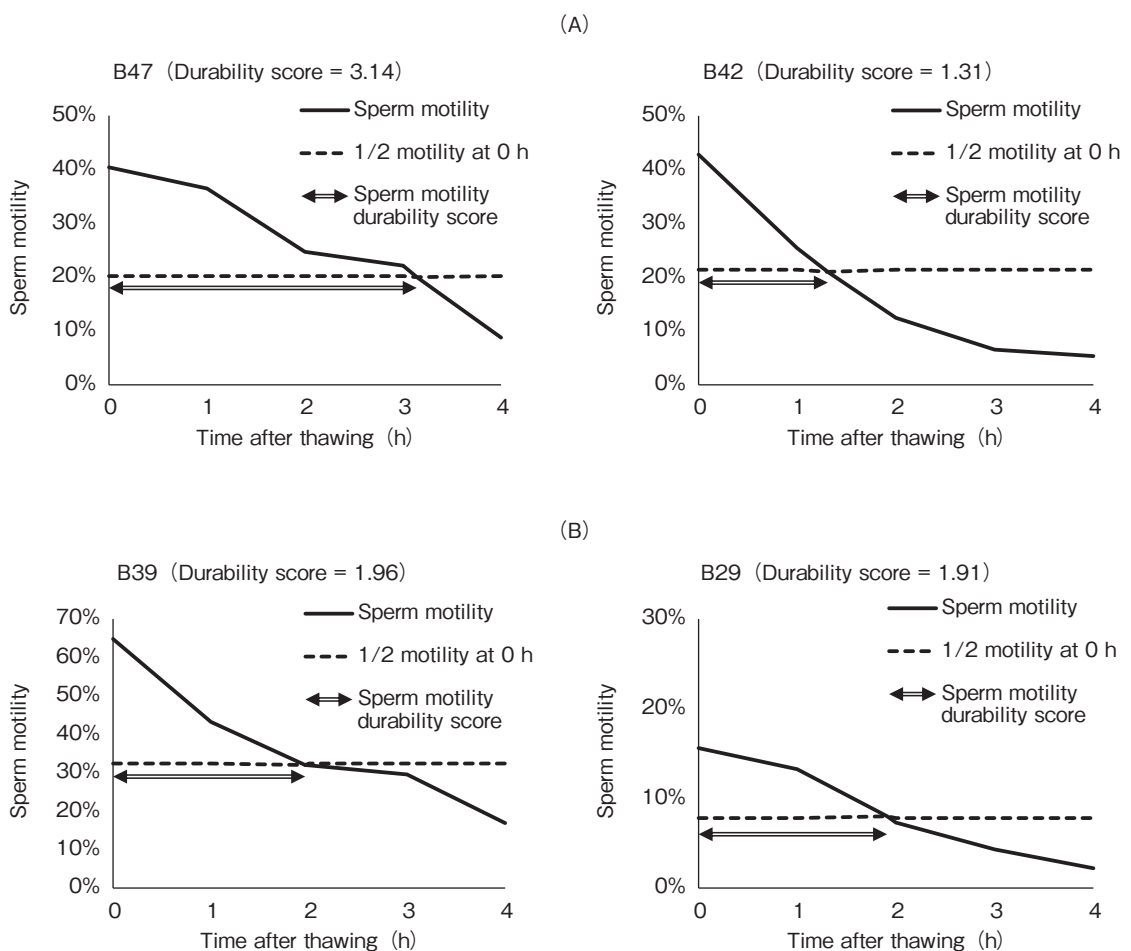


Fig. 1 Illustration of the definition of the sperm motility durability score. The sperm motility durability score is the value of time that the sperm motility becomes the half of sperm motility at 0 h. (A) Sperm motility of frozen thawed semen from two bulls (B47, B42). Although both semen has almost same motility at 0 h (B47 : 40.4%, B42 : 42.8%), semen of B47 (score=3.14) has higher durability than semen of B42 (score=1.31). (B) Sperm motility of frozen thawed semen from two bulls (B39, B29). Semen of B39 (64.8%) has higher sperm motility at 0 h than semen of B29 (15.6%). But sperm motility durability scores of semen from these bulls were almost same (B39 : 1.96, B29 : 1.91).

続性スコアの算出方法の例を示した。Fig. 1Aに示すように、融解時運動精子率が同等であっても、持続性スコアが高い種雄牛は運動精子率の低下が緩やかであり、持続性スコアが低い種雄牛は運動精子率の低下が速い。また、Fig. 1Bに示すように、融解時運動精子率が大きく異なるが、持続性スコアは同等である事例もあった。このように、持続性スコアは精子の運動性の低下の緩急を表す指標になると考えられる。

3.2 精子運動性と季節の関係

凍結精液を製造した季節が精子運動性に及ぼす影響を、3頭の種雄牛の凍結精液を用いて調べたところ、季節ごとに精子運動性の変化は見られたが、3頭の種雄牛に共通した変化は見られなかった。

精巢の造精機能は、体温より低い温度で正常に働く。牛において、夏に採取された精液は冬より形態異常率が高いという報告がある⁶⁾。しかし本研究では、黒毛和種精液の運動性に季節環境が及ぼす影響は、種雄牛によって異なる可能性が考えられた。

3.3 精子運動性と年齢の関係

凍結精液製造時の種雄牛の年齢が精子運動性に及ぼす影響を、3頭の種雄牛の凍結精液を用いて調べた結果をFig. 2に示す。3頭の種雄牛に共通して、加齢に伴い運動精子率が低下する傾向が見られ、5歳時および7歳時の運動精子率は9歳時より高かった。11歳時の運動精子率は、9歳時に比べると向上していたが、この原因は不明である。

3.4 種雄牛生年月日と融解後精子運動率の関係

融解直後の運動精子率と凍結精液製造年月日との相関をFig. 3Aに示す。1998年以前に製造された凍結精液において、運動精子率が低いことが分かった。これは、2000年以前に生産された凍結精液は製造方法が異なるためであると考えられた。具体的には、希釈精液のストローへの充填と封印を、現在は機械を用いて自動で行っているが、2000年以前は手作業でストローに精液を充填し、パウダー（PVA）を用いて封印を行っていた。2000年以前の精液は、製造方法の違いによって生じる作業時間の違いや、希釈液に溶け込んだPVA等が原因となり、凍結融解後の生存率が低

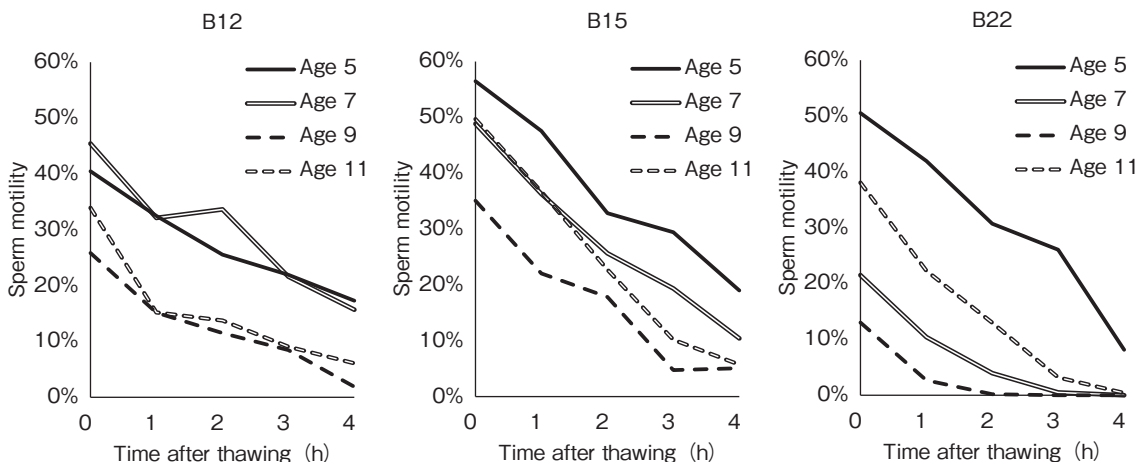


Fig. 2 Effects of the age on sperm motility in three sires (B12, B15, B22). Sperm motility decreased with ageing. In bull B12, Sperm motility at age 9 and 11 were lower than age 5 and 7. In bull B15 and B22, Sperm motility at age 7, 9 and 11 were lower than age 5.

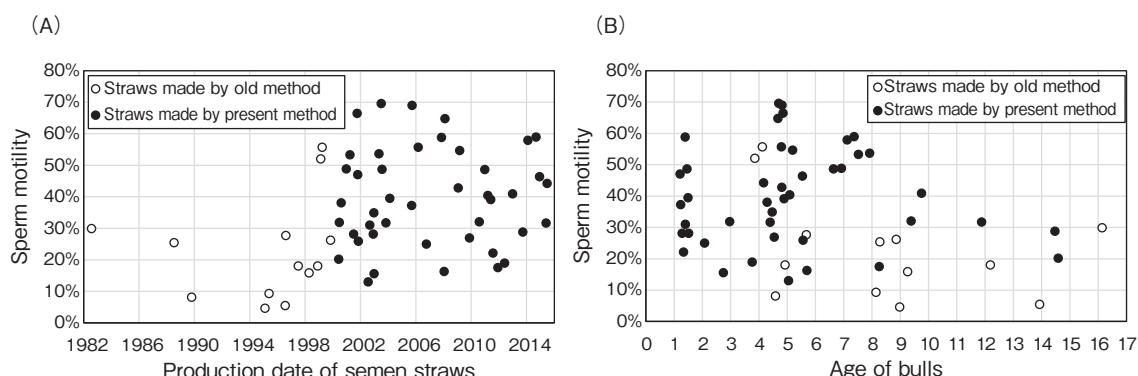


Fig. 3 Correlations between the sperm motility and (A) semen production date or (B) age of bulls at production of semen. Semen straws that were made by the old method (filled with hands and sealed by PVA powder) indicated by blank dots, and present method (filled and sealed by machine) indicated with black dots.

いのではないかと考えられた。

また、融解直後の運動精子率と凍結精液製造時の種雄牛年齢の相関をFig. 3Bに示す。先の実験でも、9歳以降で運動精子率が低下することが示されているが、この結果では8歳以上で運動精子率が低い傾向が見られた。

これらの結果から、以降の解析には、凍結精液が2000年以降製造であり、製造時に種雄牛が8歳以下だった凍結精液（種雄牛37頭）のみを対象とした。

種雄牛の生年月日と融解後運動精子率および精子運動持続性スコアの相関を、それぞれFig. 4A, Bに示す。融解後運動精子率と精子運動持続性スコアは個体差が大きいが、種雄牛生年月日との相関は見られなかった。このことから、運動精子率および運動持続性に育種改良に伴う変化はないと考えられた。

種雄牛の生年月日と精子の曲線速度（VCL）、頭部振幅幅（ALH）、直線性（LIN）の持続性スコアの相関を、それぞれFig. 5A, B, Cに示す。近年の種雄牛の精子ほど、VCLの持続性は低下し、LINの持続性は増加する傾向が見られた。ALHの持続性に变化傾向は見られなかった。

精子が受精するためには受精能を獲得する必要

がある。受精能獲得に伴い、精子の運動性が超活性化と呼ばれる変化を起こす。精子が超活性化すると、VCLが高まり、ALHが大きくなるが、精子尾部の振幅は非対称となり、旋回運動になるためLINは低下する⁷⁾。今回の調査の結果は、近年の種雄牛の精液ほど、VCLが全期間中央値より高い時間が短く、LINが高い時間が長くなっていることを表しており、培養中に超活性化が起こる時間が遅くなっていることを表しているのではないかと考えられる。

3.5 精子運動持続性に関連するゲノム領域の推定

37頭の種雄牛について、SNP型と融解時運動精子率および精子運動持続性スコアとの相関を解析した。その結果、融解時運動精子率とSNP型との有意な相関は見られなかった。一方、精子運動持続性スコアの上位1σ以上（7頭）を陽性とした場合、解析対象となった27559個のSNPのうち、10番染色体上のSNP：ARS-BFGL-BAC-16113との相関が、ボンフェローニ補正されたp値で0.0314であり、5%水準で有意であった。このSNPは、機能未知の遺伝子LOC101907140上に存在することが分かった。

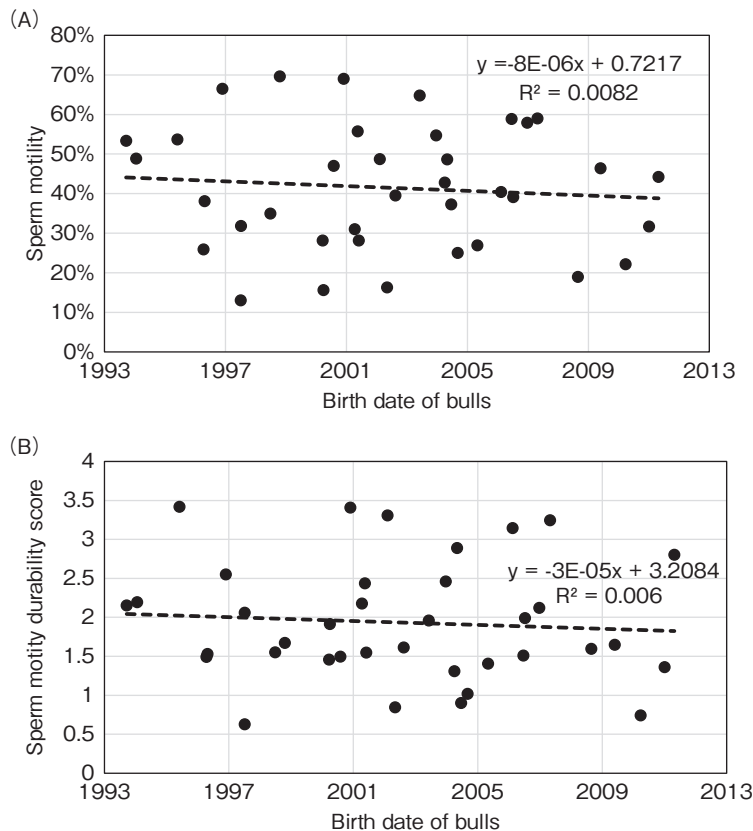


Fig. 4 Correlations between the birth date of bulls and (A) sperm motility or (B) sperm motility durability score. There were large differences in sperm motility and sperm motility durability score between individual bulls. There was no upward trend or downward trend of sperm motility and sperm motility durability score with the birth date of bulls.

3.6 総括

凍結精液の精子運動持続性は種雄牛の個体差が大きい³⁾が、育種改良に伴う変化は見られなかった。一方、近年の種雄牛の精液ほど、自発的超活性化が起こる時間が遅くなっている可能性が見出された。このことが受胎率の低下と関連するかどうかは、今後の研究で調査する必要がある。また、精子運動持続性と関連する可能性のあるSNPが見出されたが、本研究ではまだサンプル数（一地域の種雄牛37頭）が少ないため、今後、他の地域で育種された種雄牛の凍結精液を用いて同様の解析を行うなど、サンプル数を増やす取り組みを実施し、候補SNPとの関連をより詳細に調べる必要が

ある。

4. 要約

牛凍結精液の精子の運動持続時間は人工授精受胎率に影響するが、種雄牛によって持続性は大きく異なる。本研究では精子の運動性が維持される時間を表す精子運動持続性スコアを定義し、56頭の黒毛和種種雄牛の凍結精液の運動持続性を解析したが、古い製造方法で作られた凍結精液と、製造時の種雄牛の年齢が8歳以上だった凍結精液は、運動精子率が低いため解析から除外した。種雄牛37頭の生年月日と融解後運動精子率および精子運動持続性を調べたところ、相関は見られな

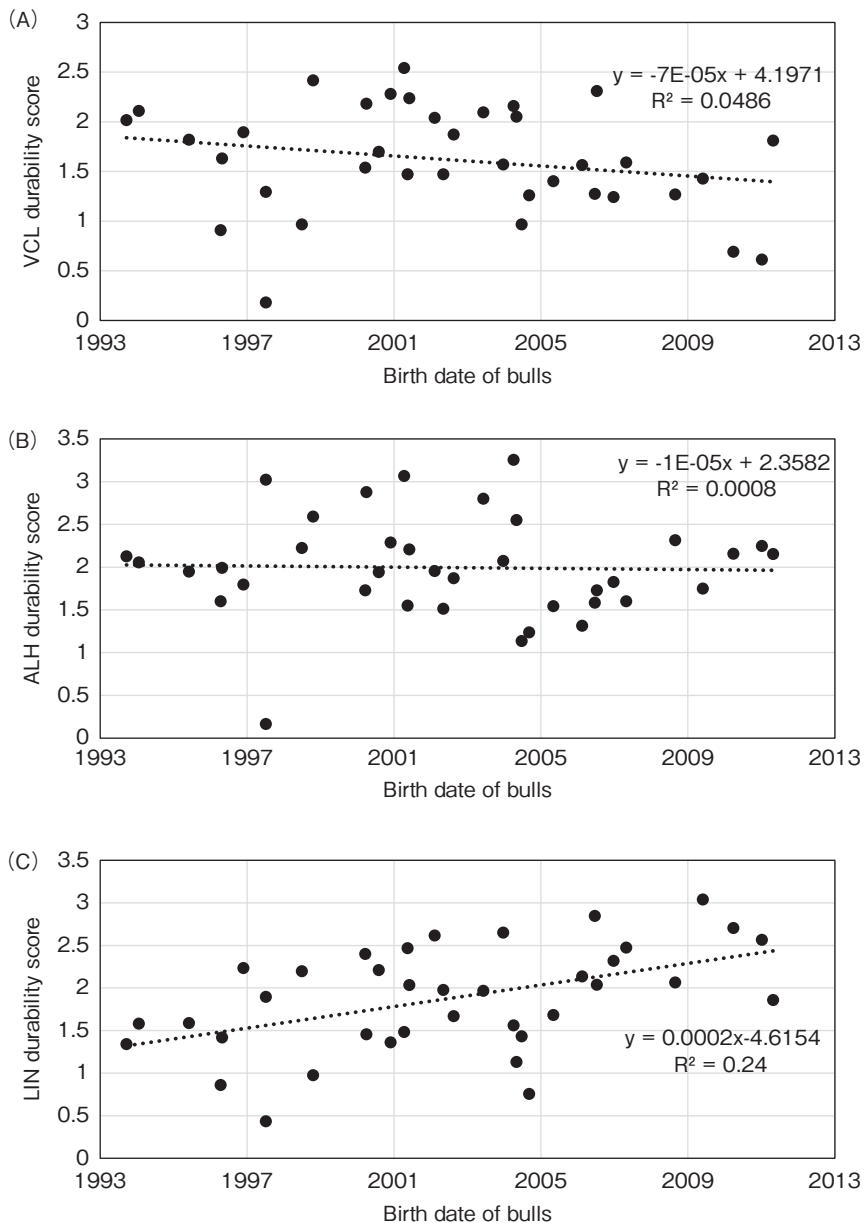


Fig. 5 Correlations between the birth date of bulls and (A) VCL durability score, (B) ALH durability score, or (C) LIN durability score. There were slightly downward trend of the VCL durability score, and slightly upward trend of LIN durability score.

かった。このことから、運動精子率および運動持続性に育種改良過程での変化はないと考えられた。一方、近年の種雄牛の精子ほどVCLの持続性が小さく、LINの持続性が高い傾向があることから、精子の自発的超活性化が遅く起こるように

なっている可能性が示された。精子運動持続性と種雄牛のSNP情報との相関を調べたところ、1つのSNPについて精子運動持続性の高さとの相関が見られた。当該SNPを内部に含む遺伝子の機能は未知であった。

文 献

- 1) <http://liaj.or.jp/giken/hanshoku/jyutai.html>
- 2) Lucy, M. C. : *Journal of dairy science*, 84, 1277~93, 2001.
- 3) Chenoweth, P. J. : *Theriogenology*, 64(3), 457~468, 2005.
- 4) MacMillan, K., Watson, J. : *Animal Science*, 21(3), 243~249, 1975.
- 5) <https://www.who.int/reproductivehealth/publications/infertility/9789241547789/en/>
- 6) Nichi, M., Bols, P. E. J., Zuge, R. M., Barnabe, V. H., Goovaerts, I. G. F., Barnabe, R. C., Cortada, C. N. M. : *Theriogenology*, 66(4) , 822~828, 2006.
- 7) Mortimer, S. T., Mortimer, D. : *Journal of andrology*, 11(3), 195~203, 1990.

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（Ⅱ）

Effect of antioxidant supplementation on quality improvement of
cryopreserved bull semen（Ⅱ）

武田 久美子・西野 景知*・佐藤 伸哉**・今井 昭**

（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，

*茨城県畜産研究センター肉用牛研究所，**広島県立総合技術研究所畜産技術センター）

Kumiko Takeda, Kagetomo Nishino*, Nobunari Sato** and Akira Imai**

（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, Beef Cattle Institute,

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

It is known that spermatozoa suffer various damages by freezing. It is thought that seminal plasma containing excessive reactive oxygen species (ROS) induces oxidative stress and increases DNA damage in sperm during the manufacturing process of frozen semen. The aim of this study was to clarify the efficiency of supplementation of bull spermatozoa with antioxidants, such as reduced glutathione (GSH) and astaxanthin before freezing to improve fertilization ability. The influence of GSH addition on the quality of bovine cryopreserved semen was assessed by sperm motility, DNA fragmentation index (DFI), antioxidant capacity, and the developmental ability of embryos after *in vitro* fertilization (IVF). Addition of GSH to sperm lots characterized with low developmental rates after IVF improved the results in a similar manner using both abattoir and OPU-derived oocytes. GSH addition, before or after cryopreservation, had a similar positive effect on developmental rates after IVF. However, since GSH addition may increase DFI in some semen lots, it is necessary to examine its influence on embryo quality. When astaxanthin powder was dissolved in tetrahydrofuran and then added to cryopreservation extender, its effect on sperm motility was limited. Then we used astaxanthin-rich egg yolks for cryopreservation extender and examined its effects on sperm motility and the developmental rate after IVF. The effect of astaxanthin-rich egg yolk was bull and ejaculate dependent. Using the astaxanthin-rich egg yolks for the extender caused no damage on sperm DNA. Astaxanthin-rich egg yolk is suitable for use as a semen cryopreservation extender.

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20年間で低下し続けている。黒毛和種においても子牛不足の常態化が問題となっており、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。凍結により精子はさまざまなダメージを受け、凍結融解後の

精子は活力が凍結前の25-75%に低下し、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 (Reactive Oxygen Species, 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、DNAダメージを軽減する手法のひとつとして抗酸化物質の添加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、還元型グルタチオン (GSH) やコエンザイム Q10 (COQ10) 等の添加が有効との報告がある^{5, 6)}。そこで申請者は、牛凍結精液製造時にあらかじめ抗酸化物質を希釈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添加方法および効果やマイナス面について詳細な検討はされていない。平成29年度本研究助成の成果として、6頭の種雄牛についてGSH添加効果を検討したところ体外受精胚発生率の低い雄牛もしくは採取ロットでGSH添加効果の程度が高くなることを明らかにした。また、細胞膜保護効果の期待できる脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチンの希釈液への添加方法について検討したところ、有機溶媒や水溶性製品の利用には精子生存性への悪影響がみられたため、凍結希釈液にアスタキサンチン高含有卵黄を用いた方法が有効である可能性を示した。本年度も引き続き、希釈液へのGSH添加による凍結精液受胎性向上効果の解明とアスタキサンチン等脂溶性抗酸化物質の添加による凍結精液品質向上効果について詳細な検討を行った。

2. 方 法

2.1 牛精液の抗酸化力およびGSH濃度の測定の試み

採取した精液の評価項目として一射精 (ロット) ごとの抗酸化力およびGSH濃度を計測する手法の検討を行った。農研機構畜産研究部門で飼養している2頭の雄牛 (N 1, N 2) より採取した3ロットずつの精液の酸化ストレス (d-ROMsテスト) および抗酸化力 (BAPテスト) について (株) ウィスマーへ分析依頼を行った。

精液のGSH濃度の測定は、蛍光法によるGSH定量キット (Total GSH Assay Kit, Fluorimetric, SensoLyte™, Anaspec社) を用いた。N 1 およびN 2 から採取した6ロットずつの精液をそのまま (精子+精漿)、もしくは5000rpm, 5分で遠心した上清 (精漿) を-80℃で凍結保存した。これらサンプルは測定前に凍結融解を3回行い、キットに付属の希釈液で10倍希釈を行った後、12000rpm, 10分, 4℃で遠心した上清を測定に用いた。蛍光強度は蛍光マイクロプレートリーダー (GENiOUS, 励起492nm/蛍光535nm) にて計測した。

2.2 GSH添加凍結精液のDNAダメージ率および抗酸化力測定

精子核DNAダメージの検出には、DNA断片化を標識する方法 (TUNEL法, In Situ Cell Death Detection Kit, Fluorescein, Roche 社) を用いた^{4, 7)}。凍結精液を融解後、既報に従って染色を行い^{8, 9)}、TUNEL陽性精子 (=DNA断片化あり) を蛍光顕微鏡下 (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。

次にN 1 およびN 2 より採取した精液にGSHを1 mM, 5 mM, 10 mMを添加し凍結した精液を融解後、2.1の方法で抗酸化力分析を行った。

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～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にて、種雄牛（H1, H2）や採取ロットの違いが体外受精胚発生率へ与える影響について精査を行った。昨年度、凍結融解後の精液にGSH添加処理を行ったところ、と場由来卵子への体外受精において5 mM添加区に共通して効果がみられた。そこで本年度は受精卵生産現場への実用化を図るため、生体卵子吸引法（OPU）によって採取した卵子を用いた体外受精胚発生へのGSH添加効果を検討した。また、1頭の種雄牛（H2）について採取日の異なる3ロットに対しGSHをあらかじめ添加した（5 mM, 10 mM）凍結精液を製造し、と場由来卵巣より採取した卵子を用いて体外受精試験を行った。

2.4 アスタキサンチン添加による凍結精液の運動性への効果の検討

昨年度は、Ax粉末（WAKO）を細胞毒性が低い有機溶媒であるテトラヒドロフラン¹⁰⁾（THF）に溶解させた（Ax/T）後に希釈液へ添加したところ0.1 μ L/mLの添加による運動性改善への効果がみられた。本年度は、以下について2頭の雄牛（N1, N2）より採取した新鮮精液の運動性への影響を調査した。まずTHFの精子運動性への影響を調査するため、THFのみ2 μ L/mL, 20 μ L/mLを卵黄不含希釈液へ添加し次に1%（w/v）Ax/T溶解液を卵黄不含希釈液へ最終濃度（w/v）を0.0001～0.002%となるように添加した。また、1%（w/v）もしくは4%（w/v）Ax/T溶解液を卵黄含有希釈液へ最終濃度が0.001～0.1%となるよう添加した。それぞれの区を37℃で30分インキュベートした後、精子運動性に及ぼす影響を牛用精子運動解析装置（SMAS牛用、富士平工業）で測定した。

2.5 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた凍結精液の運動性評価

茨城県畜産センター肉用牛研究所にて本年度も引き続き市販のアスタキサンチン高含有鶏卵の卵黄（Ax/E）を用いた凍結精液を製造し、種雄牛や採取ロットごとに運動性への効果の違いを検討した。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。昨年度からのデータも合わせ、6頭の種雄牛（I1～I6）について採取日の異なる3～7ロットの精液について調査を行った。

次にAx/Eを用いて凍結した精液を融解し、2.1の手法と同様に抗酸化力の測定、および2.2の手法と同様にDNAダメージ率を計測した。

2.6 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた凍結精液の体外受精試験

Ax/Eを用いて農研機構畜産研究部門にて製造したN1およびN2の凍結精液、および茨城県畜産センター肉用牛研究所にて製造したI1およびI5の凍結精液を用いて既報に従い体外受精試験を行った¹¹⁾。

3. 結果と考察

3.1 牛精液のGSH濃度および抗酸化力の測定の試み

依頼分析の結果、d-ROMsテストでは検出限界以下となり、BAPテストのみ検出が可能であった。数値は採取ロットにより変動していた。N1とN2の数値に有意差はみられなかったが、精液（精子を含む）ではN1で抗酸化力の数値が低くなる場合があった。N1の精液の品質との関連性を明らかにするためには今後例数を重ねることが必要である。

新鮮精液の全GSH測定を試みた結果、前処理としてタンパク質を沈殿させるスルホサリチル酸処

理を行うと計測不能となったため、本行程を省いて計測を行うこととした。全GSH量は精液から遠心分離により精子画分を除いた精漿のみとすると低くなった ($p < 0.01$)。しかしN 1とN 2の間で有意差はなかった。本手法についても精液の品質との関連性を明らかにするためには今後検討が必要である。

3.2 GSH添加凍結精液のDNAダメージ率および抗酸化力測定

本年度は2.3で製造したH 2種雄牛由来のGSH添加凍結精液について融解後のDFIを調査したところ5 mM以上のGSH添加によってDFI値の著しい増加がみられた。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ダメージを増大していることが示唆される結果となった。

一方、GSHを添加した2頭の種雄牛(N 1, N 2)の凍結精液を融解後、抗酸化力分析を行ったところ有意差はなく、GSH添加による抗酸化力への効果はみられなかった。

3.3 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～

2頭の種雄牛(H 1, H 2)の凍結精液を融解

後、5 mM GSH処理を行った後にOPU卵子の体外受精に用いたところ、1ロットで発生率の向上がみられた (Fig. 1)。

次に胚盤胞発生率の比較的低かった種雄牛(H 2)について凍結前の精液にあらかじめGSHを添加し(5 mM, 10 mM)、凍結精液の製造を行った。体外受精試験の結果、胚盤胞発生率の比較的低いロットでGSH添加の発生率改善への効果が認められた (Fig. 2)。

3.2の結果よりGSH添加によりDNAダメージが増大しても体外受精の結果が向上することが明らかとなった。GSHは精子のS-S結合の還元を促進し、既報によればS-S結合の少ない場合ほど胚発生が良好である一方、精子DNA断片化の程度は胚発生異常と相関することが知られている¹²⁾。GSH添加により精子生存率は下がらないことから、GSH添加により精子に起きる変化の解明および体外受精胚の正常性について今後検討する必要がある。

3.4 アスタキサンチン添加による凍結精液の運動性への効果の検討

THFのみ卵黄不含希釈液へ添加した場合、2

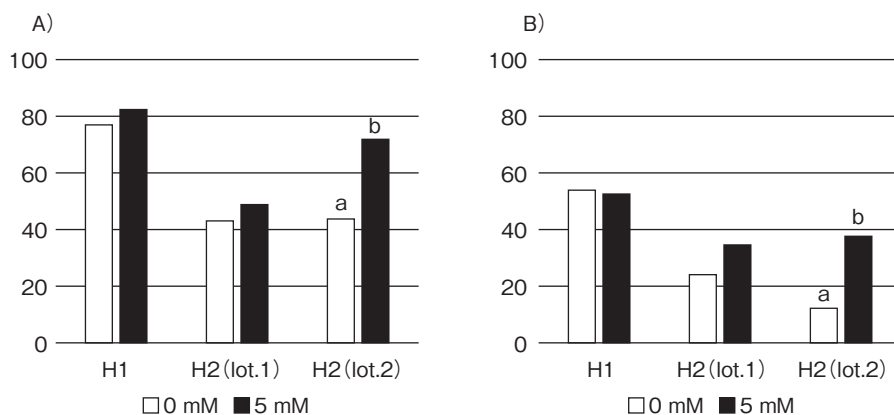


Fig. 1 Comparison of IVF results among bull spermatozoa obtained from two bulls (H1, H2) supplemented with or without GSH (0, 5 mM) just before IVF using oocytes collected by OPU. A) Percentage of embryo cleavage (% of total incubated embryos), B) Percentage of blastocyst development (% of total incubated embryos). ab: Bars within each bull with different letters differ ($p < 0.05$).

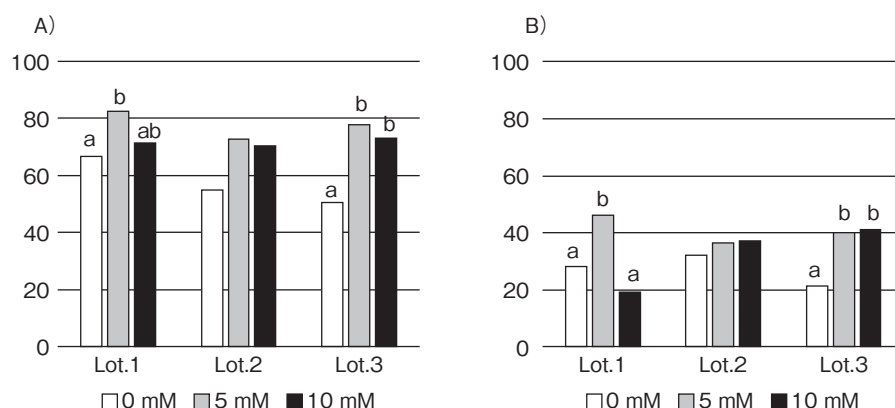


Fig. 2 Comparison of IVF results among bull spermatozoa obtained from one bull (H2) supplemented with or without GSH (0, 5, 10 mM) before freezing steps. A) Percentage of embryo cleavage (% of total incubated embryos), B) Percentage of blastocyst development (% of total incubated embryos). ab: Bars within each bull with different letters differ ($p < 0.05$).

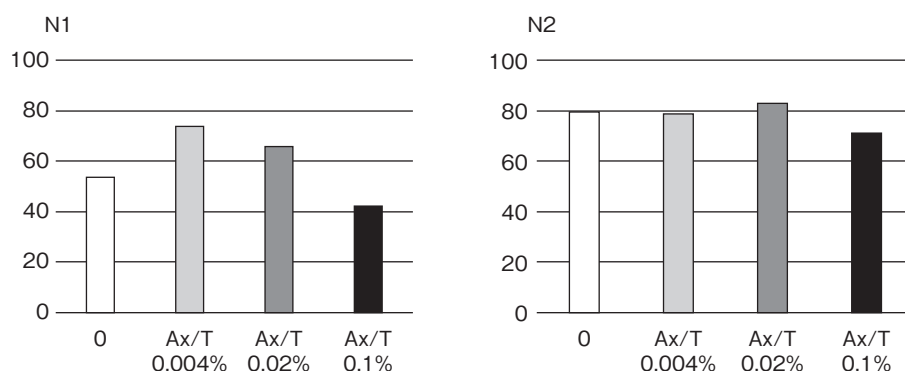


Fig. 3 Motility of fresh ejaculated spermatozoa (N1 and N2) supplemented with astaxanthin dissolved in THF (Ax/T) measured by SMAS.

$\mu\text{L}/\text{mL}$ 添加では運動性に変化はみられなかったが、 $20 \mu\text{L}/\text{mL}$ 添加では著しく運動性が低下した。THFの添加量により精子運動性へ影響のあることが明らかとなった。次に4% (w/v) のAx/Tを卵黄含有希釈液に1, 4, $20 \mu\text{L}/\text{mL}$ 添加したところ (0.004%, 0.02%, 0.1%), N2の精液では運動性への変化はあまりみられなかったが、N1の精液で1~4 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 添加において運動性が向上する傾向がみられた (Fig. 3)。しかし、卵黄含有もしくは不含にかかわらず、Ax/Tを希釈液に添加すると同時にアスタキサンチンの析出がみら

れたことは、今後の課題である。

3.5 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた凍結精液の運動性評価

Ax/E利用が精子生存率および移動速度へ与える効果を調査した結果、Ax/Eの使用により生存率が有意に高くなる雄牛が1頭みられた (I 5)。その他5頭については採取ロットにより精子の生存率および移動速度は異なっており、平均値に対照区との有意差はみられなかった。

次に、Ax/E使用にて製造した凍結精液 (N1, N2, I 4) のDFIを計測した結果、対照区との有

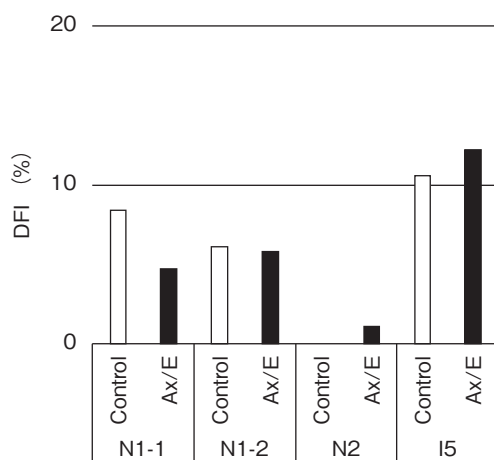


Fig. 4 The DNA fragmentation index (DFI) analyzed by TUNEL in frozen-thawed semen using Ax/E, obtained from three bulls (N1, N2, I5).

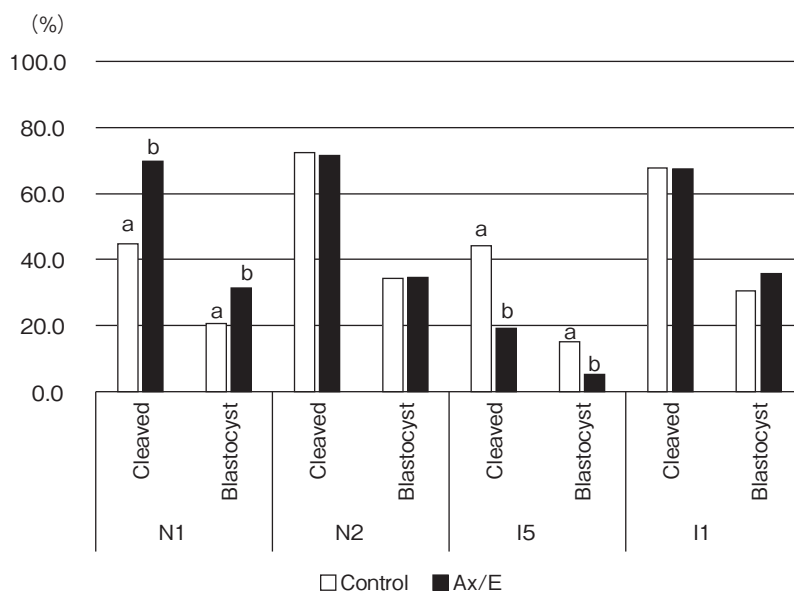


Fig. 5 Comparison of IVF results among bull spermatozoa obtained from four bulls (N1, N2, I5, I1) using control egg yolk or astaxanthin-rich egg yolk (Ax/E) for freezing.

意な差は検出されず, Ax/Eの利用によるDNAダメージ低減効果および悪影響はなかった (Fig. 4)。また, BAPテストによる抗酸化力測定の結果, N 1 および N 2 で対照区と Ax/E の使用間で数値は同程度であり, 差は検出されなかった。

3.6 アスタキサンチン高含有鶏卵を用いた凍結精液の体外受精試験

Ax/Eを用いた凍結精液について体外受精を行った結果, 雄牛 N 1 で胚発生率は高くなったが, N 2, I 1 では効果はみられず, I 5 では胚発生率は低くなる結果となった (Fig. 5)。市販の Ax/E は卵黄における含有量が 0.002 % (w/w)

であり、凍結希釈液では0.0004%となる。至適濃度を調査するためには、アスタキサンチン濃度の異なる卵黄を得る必要がある。また今後、Ax/E利用で効果のみられる場合とみられない場合の検証を行い、利用効果の得られる条件を検討していく必要がある。

3.5および3.6の成果については日本畜産学会第125回大会において「牛精液希釈液への脂溶性抗酸化物質アスタキサンチン添加手法の検討」との演題にて発表を行った。

4. 要 約

本研究は、牛凍結精液の製造過程で抗酸化物質をあらかじめ添加することで、凍結融解時に精子が受ける酸化ダメージを低減させ、受精能を改善することが目的である。我々は、牛凍結精液希釈液への水溶性抗酸化物質である還元型グルタチオン (GSH) の添加と脂溶性抗酸化物質であるアスタキサンチンの添加による凍結精液の運動性、DNAダメージ (DFI)、抗酸化力、体外受精による胚発生率等、凍結精液の品質や受胎性向上効果について検討を行った。希釈液へのGSH添加による品質向上効果について検討した結果、生体吸引卵子を用いた体外受精においても低発生率を示す精液ロットについてGSH添加効果が高いことが示唆された。しかし凍結前添加の場合、精子のDFI値が高くなる場合がみられた。また、GSHの添加時期としては、凍結前添加の場合でも凍結融解後のGSH添加処理と同様の体外受精胚発生率の向上効果がみられた。

アスタキサンチン粉末を有機溶媒であるテトラヒドロフランに溶解後卵黄含有希釈液へ添加したところ、2頭のうち1頭の雄牛で運動性に対し添加効果がみられた。また、6頭の雄牛を用いたアスタキサンチン高含有卵黄利用試験では1頭で精子運動性への効果がみられた。体外受精後の胚発

生率を調査したところ種雄牛ごとに効果が異なっていた。一方でアスタキサンチン高含有卵黄の利用によるDFIへの影響はみられなかった。精液希釈液へのアスタキサンチン添加手法としてアスタキサンチン高含有卵黄は利用可能と考えられた。

文 献

- 1) Chen, 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.
- 2) 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.
- 3) Henkel, R., Hajimohammad, M., Stalf, T., Hoogendijk, 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) 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.
- 11) 武田久美子, 西野景知, 今井昭 : 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, 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **36**, 190~197, 2018.
- 12) Katayose, H., Takayama, T., Suganuma, R., Hayashi, S., Yanagida, K., Sato, A. : Relationship between assessment of sperm nuclear qualities and embryo development in vitro, *Journal of Mammalian Ova Research*, **24**, 153~160, 2007.

牛の卵巣・子宮機能調節に及ぼす不飽和脂肪酸の影響とその利用

Effects of linoleic acids and linolenic acids on ovarian and uterine function
in cows

作 本 亮 介

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門家畜育種繁殖研究領域)

Ryosuke Sakumoto

(Division of Animal Breeding and Reproduction Research, Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

The aim of the present study was to evaluate effects of linoleic acids and linolenic acids on bovine luteal and uterine function using a tissue culture experiment. Effects of continuous administration of linoleic and linolenic acids into intra-uterine horn with ipsilateral to the corpus luteum on the duration of the estrous cycle and plasma progesterone (P4) concentration were also studied. Both linoleic (500 μ g/ml) and linolenic (500 μ g/ml) acids stimulated prostaglandin (PG) E2 but inhibited PGF2 α production by cultured endometrial tissue ($p < 0.01$). In contrast, both linoleic and linolenic acids did not influence P4 secretion by cultured bovine luteal tissues. Intra-uterine administration of linoleic and linolenic acids (5mg/10ml each per day) in the cows between on days 12 and 21 resulted in prolong the estrous cycle in compared with control cows (saline administration) ($p < 0.05$). Moreover, P4 concentration of the cows treated with linoleic and linolenic acids was higher between days 19 and 21 than that of control cows ($p < 0.05$). Based on these findings, both linoleic acids and linolenic acids affect endometrial PG production and the duration of estrous cycle, suggesting that these unsaturated fatty acids may be useful substances to control reproductive performance in cows.

1. 目 的

家畜の生産性を向上し、収益性の高い畜産経営を構築することは喫緊の課題であるが、人工授精における受精不成立や早期胚死滅等による牛の受胎率の低下はいまだ高い障壁となっている。繁殖雌牛を効率的に生産するためには、分娩後に早期かつ正常に卵巣と子宮を回復させ、遅滞なく人工授精を行う必要がある。また、卵巣（黄体）機能

の早期回復にはプロジェステロン（P4）濃度の増強が必要であるとともに、子宮機能の回復には炎症反応の鎮静化とステロイドホルモンへの反応性の回復、プロスタグランジン（PG）合成能の亢進が必要不可欠である。我々はこれまでの研究において、牛の黄体や子宮内膜における妊娠に伴う遺伝子発現変化を網羅的に解析し、妊娠成立のカギとなり得る黄体もしくは子宮由来のケモカイン等の生理活性物質を提唱してきた^{1, 2)}。これら

複数の生理活性物質のうち、不飽和脂肪酸がその発現調節に密接に関わることが示唆されているが、不飽和脂肪酸が牛の黄体や子宮機能に及ぼす影響には不明な点が多く残されている。本研究では、不飽和脂肪酸のうちリノール酸とリノレン酸に注目し、これらが培養牛黄体ならびに子宮内膜組織の内分泌機能に及ぼす影響を解明するとともに、発情周期12~21日の牛にリノール酸とリノレン酸を連日子宮内投与した場合の発情周期への影響と血中P 4濃度の変化を明らかにすることにより、リノール酸やリノレン酸を用いた牛の繁殖制御技術の開発に資する新知見を提唱することを目的とした。

2. 方 法

2.1 牛の卵巣・子宮機能に及ぼすリノール酸、リノレン酸の影響

黄体期（排卵後10-14日）にある牛をと殺し（ $n = 4$ ）、卵巣（黄体）ならびに子宮を採取した後、定法に従い組織片を作成・培養した。4時間の馴致後、濃度の異なるリノール酸（5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ ）とリノレン酸（5, 50, 500 $\mu\text{g/ml}$ ）を添加し、18時間後に培養上清を採取した。また、細胞の生存性と反応性を示すポジティブコントロールとして、腫瘍壊死因子（TNF：50 ng/ml ）添加区を設けた。培養上清中のP 4（黄体）ならびにPGE2（子宮）、PGF2 α （子宮）濃度を酵素免疫測定法（ELISA）により測定した。

2.2 牛の繁殖機能に及ぼすリノール酸、リノレン酸の子宮内投与の影響

正常な発情周期を営む黒毛和種経産牛を実験に供した（のべ11頭）。発情周期12日目に深部注入用移植器を用いて、0.5%エタノールを含む生理食塩水10ml（対照区）、リノール酸（5 mg/10ml ）あるいはリノレン酸（5 mg/10ml ）を黄体側子宮角中央部から深部に注入した。発情周期21日まで

1日1回同様の処置を施し、発情周期への影響を調べるとともに超音波画像診断装置を用いて、処置による卵巣と子宮の状態変化の有無を確認した。また、処置開始日（発情周期12日目）から次回発情周期の12日目まで連日頸静脈より採血し、血中P 4濃度をELISAにより測定した。なお、リノール酸とリノレン酸の子宮内投与濃度は過去の報告³⁾を参考にして決定した。

3. 結果と考察

3.1 培養牛子宮内膜組織のPGE2産生は、リノール酸とリノレン酸（ともに500 $\mu\text{g/ml}$ ）添加によって対照と比較して有意に増加し（Fig.1； $p < 0.01$ ）、PGF2 α 産生はリノール酸とリノレン酸（ともに500 $\mu\text{g/ml}$ ）添加によって対照と比較して有意に減少した（Fig. 2； $p < 0.01$ ）。一方、培養牛黄体組織のP 4産生に及ぼすリノール酸、リノレン酸の影響を調べた結果、いずれの濃度においても対照区と比較して有意な変化は認められなかった。なお、TNF添加区では、PGE2、PGF2 α 濃度ともに著しく増加したことから、本実験で用いた子宮内膜組織ならびに黄体組織の生存性や反応性に問題はないものと考えられた。

3.2 予備実験として、深部注入用移植器を用いて、0.5%エタノールを含む生理食塩水10mlを黄体側子宮角中央部~深部へ注入し、注入直後、1時間後ならびに2時間後に超音波画像診断装置を用いてその動態を確認した結果、投与2時間でほぼ子宮角深部に生理食塩水が拡散吸収されたことを確認した。リノール酸（5 mg/10ml ）を投与した牛において、生理食塩水（10ml）を投与した対照牛と比較して有意な発情周期の延長が認められ（ $p < 0.05$ ）、リノレン酸（5 mg/10ml ）を投与した牛では、対照牛と比較して発情周期の延長する傾向が認められた（Fig. 3）。一方、リノール酸を投与した牛の血中P 4濃度は発情周期19~

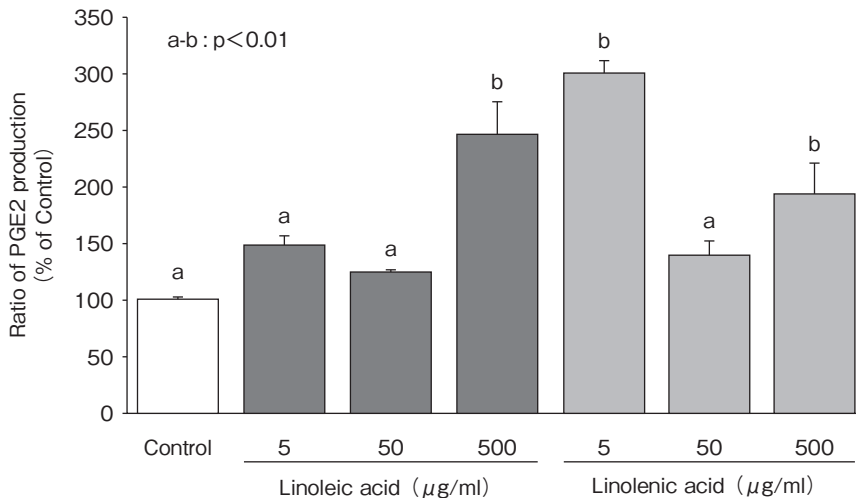


Fig. 1 Effects of linoleic acid and linolenic acid on prostaglandin E2 (PGE2) secretion by cultured bovine endometrial tissue. Data are the means $\pm$ SEM for four cows per stage, and are expressed as relative ratios to control (100%). a-b Bars without common letters differ ($p < 0.01$).

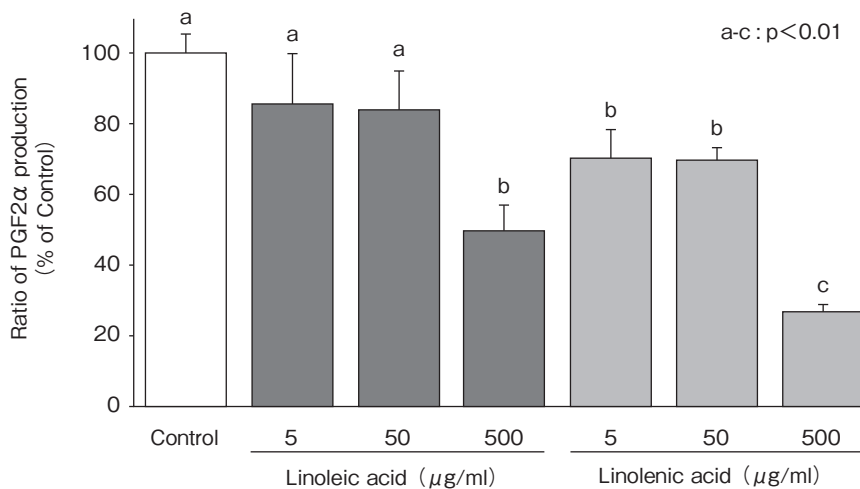


Fig. 2 Effects of linoleic acid and linolenic acid on prostaglandin F2 α (PGF2 α) secretion by cultured bovine endometrial tissue. Data are the means $\pm$ SEM for four cows per stage, and are expressed as relative ratios to control (100%). a-c Bars without common letters differ ($p < 0.01$).

21日において、対照牛の血中P 4濃度と比較して高くなり ($p < 0.05$), リノレン酸を投与した牛の血中P 4濃度は同時期の対照牛と比較して高い傾向は認められたが有意な差は見られなかった (Fig. 4)。さらに、次回排卵後から12日目までの血中P 4濃度を調べたところ、対照牛とリノール

酸、リノレン酸投与牛の間で有意な差は認められなかった。

本実験の結果は、不飽和脂肪酸であるリノール酸とリノレン酸が直接牛子宮内膜のPG産生を制御することを示すものであり、両者の子宮内投与によって発情周期の長さにも影響を与えることを

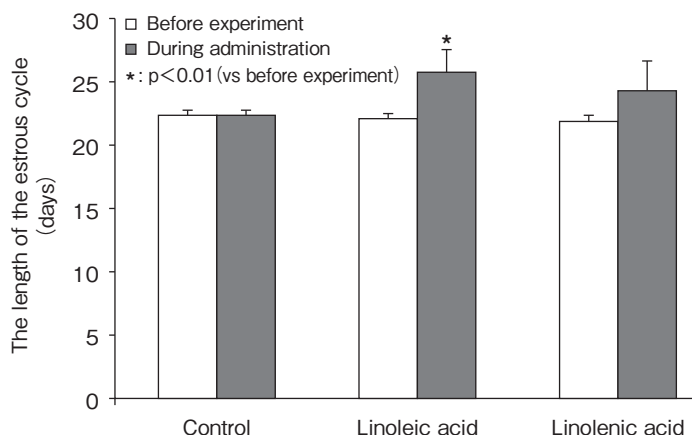


Fig. 3 Effects of continuous administration of linoleic acid and linolenic acid on the length of estrous cycle of Japanese black cows. Linoleic acid (5mg/10ml per day) and linolenic acid (5mg/10ml per day) were administrated intra-uterine horn with ipsilateral to the corpus luteum from day 12 after estrus to the next estrus. The length of estrous cycles of the cows treated with a continuous administration of linoleic acid was significantly extended ($p < 0.01$).

示すものである。*In vitro*の実験から、リノール酸とリノレン酸は培養子宮内膜組織のPGE 2合成を促進し、PGF2 α 合成を抑制することが示唆されたが、PGE 2は黄体のP 4合成を促進する黄体機能亢進作用が知られ、PGF2 α は逆に黄体退行作用が広く知られている⁴⁾。*In vivo*の実験から、リノール酸とリノレン酸の子宮内投与において、発情周期が延長することが示唆されたが、これは子宮内膜のPGE 2合成が促進され、PGF2 α 合成が抑制されたことから、黄体が維持されたものと考えられる。さらに、リノール酸とリノレン酸は直接黄体のP 4合成に有意な影響を与えなかったことから、*in vivo*の実験で見られた血中P 4濃度が維持されたのは、リノール酸とリノレン酸が黄体に直接作用したのではなく、子宮由来のPGを介して黄体が維持されたことにより、発情周期が延長したものと推察される。実際、過去の報告では、肉用牛にリノレン酸をサプリメントとして経口投与した場合、子宮内のインスリン様成長因子2の発現が増加し⁵⁾、リノール酸とリノレン酸給

与で乳用牛の妊娠率が変化したという報告がある³⁾。しかし、どのようなメカニズムで不飽和脂肪酸が卵巣・子宮機能を制御するのか、または子宮内投与が繁殖機能にどのような影響を及ぼすかはまったく明らかにされていなかった。本研究は、これらの疑問に一定の解答を提示するものであり、抗炎症作用を持つことが知られる不飽和脂肪酸を繁殖牛に投与することによって、卵巣や子宮機能を亢進できることを示唆するものである。今後、さらにリノール酸やリノレン酸の効果的な投与手法を確立し、新たな技術開発への展開を進めることで、分娩後の牛の繁殖機能を効率的に制御することが期待できる。

4. 要 約

本研究では、不飽和脂肪酸のうちリノール酸とリノレン酸に注目し、これらが培養牛黄体ならびに子宮内膜組織の内分泌機能に及ぼす影響を解明するとともに、発情周期中期の牛にリノール酸とリノレン酸を子宮内投与した場合（1日1回）の

発情周期への影響と血中P 4濃度の変化を明らかにすることにより、リノール酸やリノレン酸を用いた牛の繁殖制御技術を開発することを目的とした。培養牛子宮内膜組織のPGE2 α 産生は、リノール酸とリノレン酸（ともに500 μ g/ml）添加によって対照と比較して有意に増加することが示された。一方、PGF2 α 産生はリノール酸とリノレン酸（ともに500 μ g/ml）添加によって対照と比較して有意に減少することが示された。リノール

酸（5 mg/10ml）を発情周期12日目から連日子宮内投与した牛では対照牛と比較して有意な発情周期の延長が認められ、同様にリノレン酸（5 mg/10ml）を投与した牛では対照牛と比較して発情周期の延長する傾向が認められた。一方、リノール酸を投与した牛の血中P 4濃度は発情周期19～21日において、対照牛の血中P 4濃度と比較して高くなり、リノレン酸を投与した牛の血中P 4濃度は同時期の対照牛と比較して高い傾向が認めら

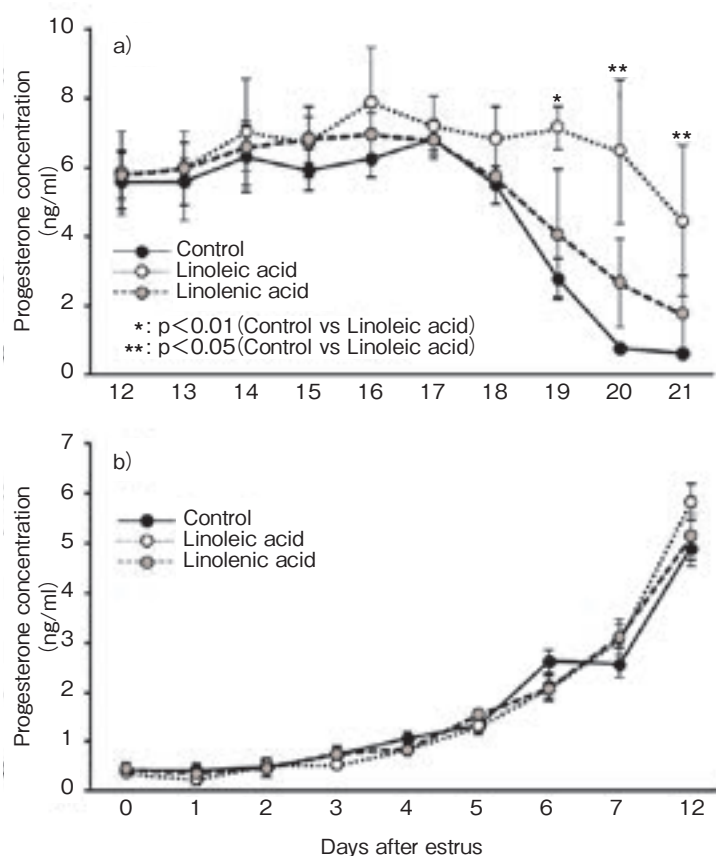


Fig. 4 Effects of continuous administration of linoleic acid and linolenic acid on a) progesterone production from day 12 to 21, and b) day 0 to 12 of the estrous cycle in Japanese black cows. Linoleic acid (5mg/10ml per day) and linolenic acid (5mg/10ml per day) were administrated intra-uterine horn with ipsilateral to the corpus luteum from day 12 after estrus to the next estrus. Progesterone concentration of the cows treated with linoleic and linolenic acids was higher between days 19 and 21 than that of control cows. In contrast, there was no significantly difference among experiment groups at day 0 to 12 of the next estrous cycle.

れた。本実験の結果は、不飽和脂肪酸であるリノール酸とリノレン酸が直接牛子宮内膜のPG産生を制御することを示し、両者の子宮内投与によって発情周期の長さにも影響を与えることを示すものである。今後、さらにリノール酸やリノレン酸の効果的な投与手法を確立し、新たな技術開発への展開を進めることで、分娩後の牛の繁殖機能を効率的に制御することが期待できる。

文 献

- 1) Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Fujii, S., Kanahara, H., Hosoe, M., Furusawa, T., Kizaki, K. : *Int J Mol Sci*, **18**, 742, 2017.
- 2) Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Takahashi, T. : *Reprod Biol*, **14**, 115~121, 2014.
- 3) Silvestre, F. T., Carvalho, T. S. M., Francisco, N., Santos, J. E. P., Staples, C. R., Jenkins, T. C., Thatcher, W. W. : *J Dairy Sci*, **94**, 189~204, 2011.
- 4) Kumar, R., Ramteke, P. W., Nath, A., Kumar Pramod, R., Singh, S. P., Kumar Sharma, S., Kumar, S. : *ISRIN Physiol*, ID854572, 2013.
- 5) Coyne, G. S., Kenny, D. A., Waters, S. M. : *Theriogenology*, **75**, 500~512, 2011.

肝機能と栄養状態解析を用いた牛子宮内膜炎の 新たな予後判定評価法の開発

Development of a new prognostic evaluation method for bovine
endometriosis using liver function and nutritional status analysis

大 滝 忠 利

(日本大学生物資源科学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室)

Tadatoshi Ohtaki

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University)

The relationship between endometriosis development, liver function and nutritional status was analyzed, and it was examined whether blood biochemistry is useful as a prior judgment of endometritis. In Experiment 1, endometrial and blood samples were collected by cytobrush from 11 cows at 2, 3, 4 and 8 weeks postpartum for profiles of PMN%, and blood biochemical properties, Hp and LPS concentration were measured. In Experiment 2, the relationship between the healing status of endometritis at the next examination, blood biochemical parameters, Hp, and LPS concentration was investigated for 16 cows who were diagnosed with endometritis at the time of fresh check. As a result, significant negative correlation was found between albumin, FFA and PMN%, and significant positive correlation between blood LPS concentration and PMN% at 3 weeks after parturition. Albumin and FFA had a significant negative correlation with PMN%, blood LPS concentration had a significant positive correlation with PMN% at 3 weeks after parturition. Also, Albumin had a significant negative correlation with PMN% at 4 weeks, BCS had a significant negative correlation with PMN% at 8 weeks after parturition, γ -GTP had a significant positive correlation with PMN% at 8 weeks after parturition. Hp concentration of endometritis continuation group is significantly higher than the recovery group where the endometritis was cured at the next examination. And γ -GTP and peripheral blood LPS in endometritis group concentrations tended to be high. It is concluded that albumin and Hp concentration may be candidates for markers of pathophysiology and prognosis endometritis.

1. 目 的

高泌乳牛の半数で子宮炎・子宮内膜炎などの炎症性子宮疾患を発症しており¹⁾、子宮内膜炎牛の40%で卵胞の発育遅延や黄体遺残が見られ²⁾、このような牛の受胎率は20%低下すると言われてい

る。しかし、国内の臨床現場では子宮内膜炎を簡易的に診断する実用的な方法がなかったため、検出されない子宮疾患牛の存在により牛群の繁殖成績は十分に向上されていない³⁾。また、子宮内膜炎のリスク要因として、分娩前の血中遊離脂肪酸(FFA)の高値や分娩後のエネルギー不足があげ

られ、子宮修復に係るPGF_{2α}分泌には、ルーメン内の分解性タンパクの利用率や肝機能など栄養代謝状態が影響を与えるとの報告があるが詳細は不明である。一方、多くの乳牛は妊娠末期に糖を胎子や乳腺へ優先的に分配させるようインスリン抵抗性（IR）を持つようになる^{4,5)}が、IRが強い場合には分娩後の生産性を低下することが指摘されている。このIRは肝臓の脂肪化や肝機能の指標と相関が高いことも報告されている。

そこで、本研究では、まず、客観的な子宮内膜炎の診断手法である子宮内膜細胞診（サイトブラシ）による子宮内膜炎の診断を実施する。次に、ここで検出された子宮内膜炎発症と乾乳期の肝機能、特にIRならびに分娩前後の栄養状態との関連を解析し、さらには子宮内膜炎発症時の血液生化学性状、特にCow Side Testとして利用可能な血糖およびβヒドロキシ酪酸（BHBA）値とサイトブラシによる診断結果の推移により予後判定が可能であるかを検討した。

2. 方 法

2.1 子宮内膜炎発症と肝機能ならびに栄養状態との関係

2.1.1 供試動物

日本大学付属農場にて飼養されている乳牛11頭を供試した。

2.1.2 サンプルング

まず、それぞれの供試牛について、分娩前3週にOhtsukaら⁶⁾の報告を一部変更した方法でインスリン感受性試験を実施した。すなわち、インスリン投与前に血糖濃度を簡易血糖測定器（プレシジョンエクシード、アボットジャパン、千葉）で測定し、その後、体重100kg当たり5単位の即効性ヒトインスリン注射液（ヒューマリン® R注U-100、日本イーライリリー、東京）を静脈内投与した。採血は、正中尾静脈よりインスリン投与

後90分まで30分間隔で行った。また、分娩後1, 2, 3, 4, 8週に正中尾静脈より血液20mlを採取し、遠心分離して血清および血漿サンプルを得た後、測定まで-20℃にて保存した。さらに、分娩後2, 3, 4, 8週にメトリチェックによる子宮腔部における粘液性状の記録とサイトブラシによる子宮内膜上皮細胞を採取し、スメア標本をスライドガラスに作製した。

2.1.3 測定項目

インスリン感受性試験については、インスリン投与後における血糖濃度の低下割合を求めた。血液サンプルについては、血液生化学性状として、アルブミン、総タンパク（TP）、血中尿素窒素（BUN）、FFA、Glu、BHBA、総コレステロール（T-Chol）、アスパラギン酸トランスフェラーゼ（AST）、γ-グルタミントランスペプチダーゼ（γ-GTP）を測定した。ハプトグロビン（Hp）濃度は、中村ら⁷⁾のヘモグロビン結合アッセイにより測定した。末梢血中LPS濃度の測定は、Petschら⁸⁾の方法に従ってProteinase K消化による前処理を行った後に、エンドスペシー® ES-50M（生化学工業）を用いて行った。IGF-1濃度はELISA法（IGF-1 Human ELISA kit Quantikine, R&D Systems Inc., U.S.A.）により測定した。

メトリチェックスコアは、McDougallら⁹⁾の報告に基づき測定した。サイトブラシによって採取された子宮内膜上皮細胞と多形核白血球数（PMN）からPMNのパーセント（PMN%）を求めた。また、試験期間中に週1回、ボディコンディションスコア（BCS）の測定を実施した。

2.2 子宮内膜炎予後判定評価のための項目選択

2.2.1 供試動物

藤沢市内2牧場で実施した定期繁殖検診のフレッシュチェック時に子宮内膜炎牛と判定された16頭を供試した。

2.2.2 サンプルングおよび測定項目

フレッシュチェック時および4週間後の再診時にサイトブラシによる子宮内膜上皮細胞を採取し、スメア標本をスライドガラスに作製した。また、初診時に正中尾静脈より血液20mlを採取し、遠心分離して血清および血漿サンプルを得た後、測定まで -20°C にて保存した。血液サンプルについては、前述の血液生化学性状、Hp, LPS濃度を測定した。

2.2.3 子宮内膜炎の予後判定

定期繁殖検診のフレッシュチェック時にメトリチェックならびにサイトブラシを実施し、メトリチェックスコアが2以上またはPMN%が8%以上を子宮内膜炎と判定した。子宮内膜炎牛については、治療は実施せずに無処置で経過観察し、4週後の次回検診時に再度、サイトブラシを実施した。再診時にPMN%が5%未満の場合に子宮内膜炎が治癒したものと判定した。その結果、子宮内膜炎が治癒していた個体を回復群 ($n = 9$)、治癒しなかった個体を子宮内膜炎継続群 ($n = 7$) として区分した。

3. 結果と考察

3.1 子宮内膜炎発症と肝機能ならびに栄養状態との関係

3.1.1 子宮内膜炎牛と正常牛の比較

分娩後4週におけるメトリチェックスコア2以上またはPMN%が8%以上の個体を子宮内膜炎と判定し、子宮内膜炎群 ($n = 5$) と正常群 ($n = 6$) に区分し、各群の血液生化学性状、Hp, LPS, IGF-1 濃度の推移について比較した。その結果、アルブミン濃度が、正常群に比べ子宮内膜炎群では分娩後1~2週で低い傾向が認められた。Hp濃度は、有意な差は認められないものの、分娩後1週において子宮内膜炎群で高値を示す個体が散見された (Fig. 1)。それ以外の項目につ

いては、明らかな差は認められなかった。また、分娩前3週におけるインスリン感受性試験において、インスリン投与後30分の血糖減少率は、正常群が $47.2 \pm 5.4\%$ 、子宮内膜炎群は $27.4 \pm 5.0\%$ と子宮内膜炎牛で有意に低かった ($p < 0.05$)。健康牛の指標である45%を下回っていた頭数は、正常牛で16.7% (1/6) であったのに対し、子宮内膜炎牛では100% (5/5) であった。分娩前3週から分娩後8週にかけてのBCSの減少スコアは、正常牛の 0.63 ± 0.14 に比べ、子宮内膜炎牛では 1.05 ± 0.15 と大きい傾向が見られた。

今回、供試頭数が少なかったこともあり、子宮内膜炎発症と肝機能ならびに栄養状態との明確な関連性を示すことができなかった。乳牛は乳量が多いため、他の哺乳動物に比べ、IRをさらに悪化させ、負のエネルギーバランスの状態を長引かせることが指摘されている^{10, 11)}。また、子宮内膜炎群でBCSの減少が大きかったことから、負のエネルギーバランスの程度が大きく、このことが子宮内膜での感染を容易にさせている¹²⁾ことが推察された。

3.1.2 PMN%と血中パラメーターとの関係

上記で、子宮内膜炎牛と正常牛に明らかな差が認められなかったため、PMN%とBCS、血液生化学性状、Hp, LPS, IGF-1 濃度との相関について検討した。分娩後3週のアルブミンならびにFFAとPMN%との間に有意な負の相関 (それぞれ、 $\rho = -0.85$, $p < 0.05$ および $\rho = -0.93$, $p < 0.01$)、血中LPS濃度とPMN%との間に有意な正の相関 ($\rho = 0.86$, $p < 0.05$) が認められた (Table 1)。また、分娩後4週におけるアルブミンとPMN%との間に有意な負の相関 ($\rho = -0.62$, $p < 0.05$)、分娩後8週のBCSとPMN%との間に有意な負の相関 ($\rho = -0.82$, $p < 0.05$)、 γ -GTPとPMN%との間に正の相関 ($\rho = 0.76$, $p < 0.05$) が認められた。今回の試験では、安価な簡易測定

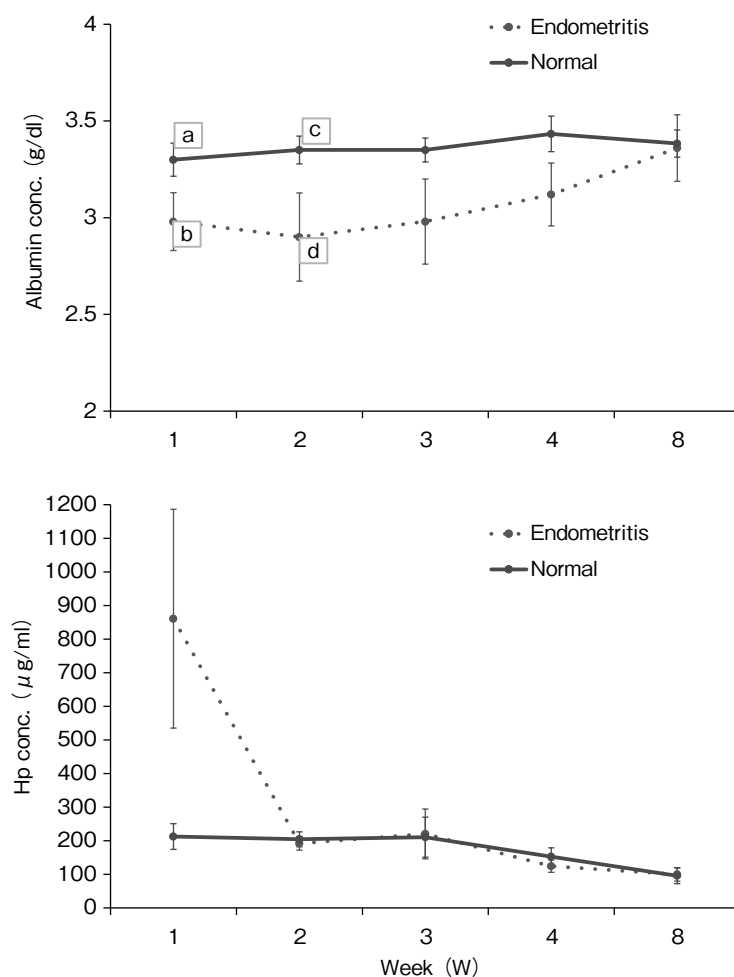


Fig. 1 Comparison of albumin and haptoglobin concentration between normal and endometritis groups in dairy cows. Values are mean $\pm$ SEM. a/b : $p=0.054$. c/d : $p=0.093$

器によるGluおよびBHBA濃度測定では子宮内膜炎の病態を把握することはできなかった。

アルブミン濃度は分娩後の疾患と関連し、クローズアップ牛や産褥牛の病気の危険性の予測に用いることができると報告され、低アルブミン濃度の産褥牛は病気に適切に対応できず、子宮炎、乳房炎その他の疾病に罹患している可能性がある¹³⁾。アルブミンは陰性反応性タンパクであり、その濃度は炎症により減少することが知られている^{14, 15)}、Nazhatら¹⁶⁾の報告によれば、アルブミン濃度が2.5g/dl未満の牛7頭中5頭が高いPMN%

を示しており、低アルブミンレベルは子宮内膜炎発症のマーカーとして利用できることが示唆されており、本研究の結果と一致した。今後は、さらに子宮内膜炎の重症度とアルブミンレベルについても精査する必要がある。

3.2 子宮内膜炎予後判定評価のための項目選択

子宮内膜炎継続群と治癒群の血液生化学性状ならびにHp, LPS濃度をTable 2に示した。初診時のHp濃度は回復群に比べ、子宮内膜炎継続群で有意に高く ($p<0.05$)、 γ -GTPおよび末梢血中

Table 1 Spearman correlation coefficients (ρ) of the relationship between PMN%, concentrations of biochemical parameters, LPS and Hp in postpartum dairy cows (n=11).

Biochemical indices	Week2		Week3		Week4		Week8	
	ρ	p	ρ	p	ρ	p	ρ	p
BCS	0.47	N.S.	0.58	N.S.	-0.21	N.S.	-0.82	p<0.05
Albumin	-0.05	N.S.	-0.85	p<0.05	-0.62	p<0.05	-0.45	N.S.
TP	-0.68	N.S.	-0.36	N.S.	0.13	N.S.	-0.14	N.S.
BUN	0.41	N.S.	0.07	N.S.	0.33	N.S.	-0.05	N.S.
FFA	-0.52	N.S.	-0.93	p<0.01	-0.59	N.S.	-0.10	N.S.
Glu	0.21	N.S.	0.05	N.S.	0.64	N.S.	-0.22	N.S.
BHBA	0.05	N.S.	-0.23	N.S.	0.06	N.S.	-0.05	N.S.
T-Cho	0.14	N.S.	-0.61	N.S.	-0.50	N.S.	-0.31	N.S.
AST	0.11	N.S.	0.29	N.S.	0.12	N.S.	-0.05	N.S.
γ -GTP	-0.46	N.S.	-0.14	N.S.	-0.32	N.S.	0.76	p<0.05
IGF-1	-0.46	N.S.	-0.54	N.S.	-0.30	N.S.	-0.37	N.S.
Hp	0.25	N.S.	0.07	N.S.	-0.12	N.S.	0.00	N.S.
LPS	0.14	N.S.	0.86	p<0.05	0.03	N.S.	-0.29	N.S.

BCS: body condition scores. TP: total protein. BUN: blood urea nitrogen.

FFA: free fatty acid. Glu: glucose. BHBA: β -hydroxybutyric acid. T-cho: Total cholesterol. AST: Aspartate aminotransferase. γ -GTP: Gamma glutamyl transpeptidase. IGF-1: insulin-like growth factor-1. Hp: haptoglobin. LPS: lipopolysaccharide. N.S.: non significant

Table 2 Comparison of blood biochemical parameters, haptoglobin and lipopolysaccharide according to prognosis of endometriotic cows (n=16).

Biochemical indices	Recovery (n=9)			Endometritis (n=7)			p
Albumin (g/dl)	3.24	$\pm$	0.10	3.14	$\pm$	0.02	N.S.
TP (g/dl)	6.84	$\pm$	0.14	6.86	$\pm$	0.13	N.S.
BUN (mg/dl)	10.1	$\pm$	1.3	10.4	$\pm$	1.3	N.S.
FFA (μ Eq/l)	372.2	$\pm$	58.4	398.6	$\pm$	93.2	N.S.
T-Cho (mg/dl)	164.0	$\pm$	17.2	155.3	$\pm$	13.3	N.S.
AST (U/l)	73.3	$\pm$	4.8	74.0	$\pm$	2.2	N.S.
γ -GTP (U/l)	21.0	$\pm$	1.7	24.7	$\pm$	1.8	p=0.11
Hp (μ g/ml)	173.2	$\pm$	12.9	309.3	$\pm$	71.5	p<0.05
LPS (EU/ml)	0.544	$\pm$	0.054	0.686	$\pm$	0.077	p=0.08

Recovery: endometritis at fresh check, it recovered. Values are mean $\pm$ SEM. N.S.: non significant

LPS濃度は高い傾向にあった。

Hpは急性相タンパクの一つで、微生物の感染などの刺激により肝臓で産生、血中に放出される¹⁷⁾、子宮炎で濃度上昇することが知られている¹⁸⁾。今回、乳房炎など子宮内膜炎以外の炎症の有無を確認していないが、子宮内膜炎における炎症の程度が高い個体ほど治癒に時間を有することが推察され、子宮内膜炎の病態把握のマーカーとして有用であることが示唆された。

子宮内に細菌感染が生じた場合には、細菌から

遊離されたLPSは子宮から静脈に移行し、門脈を経て肝臓に達してクッパー細胞により貪食される。また、脂肪肝牛へLPSを静脈内投与すると血中LPSの消失がまったく起こらないことが報告されており¹⁹⁾、末梢血LPSの消失には肝機能が大きく影響していることが示唆される。今回、供試頭数が少なく、子宮内膜炎牛で血液生化学性状において明確な肝機能低下を示す個体がいなかったことから、子宮内膜炎と肝機能との関係については明らかにすることができなかった。今後、子宮内

膜炎の程度、肝機能を含めた個体の健康状態なども考慮にいれ、子宮内膜炎の予後判定指標としてのアルブミン、Hpの判定基準を明らかにする必要がある。

4. 要 約

子宮内膜炎発症と肝機能、栄養状態との関連を解析し、子宮内膜炎の予後判定として血液生化学性状が有用であるかを検討した。試験1では、経産牛11頭を供試し、分娩後2, 3, 4, 8週にサイトブラシにてPMN%を評価するとともに、血液生化学性状、Hp, LPS濃度の検査を実施した。試験2では、フレッシュチェック時に子宮内膜炎と診断された経産牛16頭について、次回検診時の子宮内膜炎治癒状況と血液生化学性状、Hp, LPS濃度との関係を調査した。その結果、分娩後3週のアルブミンならびにFFAとPMN%との間に有意な負の相関、血中LPS濃度とPMN%との間に有意な正の相関が認められた。また、分娩後4週におけるアルブミンとPMN%との間に有意な負の相関、分娩後8週のBCSとPMN%との間に有意な負の相関、 γ -GTPとPMN%との間に正の相関が認められた。また、フレッシュチェック時に子宮内膜炎と診断された経産牛のうち、次回検診時に子宮内膜炎が治癒していた回復群に比べ、治癒していなかった子宮内膜炎継続群のHp濃度は有意に高く、 γ -GTPおよび末梢血中LPS濃度は高い傾向にあった。以上の結果より、子宮内膜炎の病態、予後判定のマーカーとしてアルブミンおよびHpが候補となることが明らかになった。

文 献

1) Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H. J. : *Biol. Reprod.*, **81**, 1025~1032, 2009.

2) Opsomer, G., Groehn, Y. T., Hertl, J., Coryn, M., Deluyker, H., Kruif, A. : *Theriogenology*, **53**, 841~857, 2000.

3) 片桐成二, 大滝忠利, 大澤健司, 小比類巻正幸, 松山秀一, 八木沢拓也 : *臨床獣医* **36**(4), 11~33, 2018.

4) Debras, E., Grizard, J., Aina, E., Tesseraud, S., Champredon, C., Arnal, M. : *Am. J. Physiol.*, **256**, 295~302, 1989.

5) Bell, R. A., Summerson, J. H., Konen, J. C. : *J. Am. Coll. Nutr.*, **14**(2), 144~151, 1995.

6) Ohtsuka, H., Koiwa, M., Hatsugaya, A., Kudo, K., Hoshi, F., Itoh, N., Yokota, H., Okada, H., Kawamura, S. : *J. Vet. Med. Sci.*, **63**, 1021~1025, 2001.

7) 中村正明, 小山毅, 松井義貴, 平井綱雄, 南橋昭, 中田健, 横田博, 宮本亨 : *日獣会誌*, **65**, 628~688, 2012.

8) Petsch, D., Deckwer, W. D., Anspach, F. B. : *Anal. Biochem.*, **259**, 42~47, 1998.

9) McDougall, S., Macaulay, R., Compton, C. : *Anim. Reprod. Sci.*, **99**, 9~23, 2007.

10) Reist, M., Erdin, D. K., von Euw, D., Tschumperlin, K. M., Leuenberger, H., Hammon, H. M., Morel, C., Philipona, C., Zbinden, Y., Kunzi, N., Blum, J. W. : *Theriogenology*, **59**, 1707~1723, 2003.

11) Balogh, O., Szepes, O., Kovacs, K., Kulcsar, M., Reiczigel, J., Alcazar, J. A., Keresztes, M., Febel, H., Bartyik, J., Fekete S. G., Fesus, L., Huszenicza, G. : *Veterinarni Medicina*, **53**(11), 604~616, 2008.

12) Huzzey, J. M., Veria, D. M., Weary, D. M., von Keyserlingk, M. A. : *J. Dairy Sci.*, **90**, 3220~3233, 2007.

13) Van Sun, R. J. : *Proc. Am. Assoc. Bov. Pract.*, **37**, 212~213, 2004.

14) Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M. : *J. Dairy Sci.*, **91**, 3300~3310, 2008.

15) Mazzaferro, E. M., Rudloff, E., Kirby, R. : *J. Vet. Emergency and Critical Care Med.*, **12**, 113~124, 2002.

16) Nazhat, S. A., Kitahara, G., Kozuka, N., Mido, S., Sadawy, M., Ali, H. E., Osawa, T. : *J. Vet. Med. Sci.*, **80**, 302~310, 2018.

17) Murata, H., Shimada, N., Yoshioka, M. : *Vet. J.*, **168**, 28~40, 2004.

18) Huzzey, J. M., Duffield, T. F., LeBlanc, S. J., Veira, D. M., Weary, D. M., von Keyserlingk, M. A. : *J. Dairy Sci.*, **92**, 621~625, 2009.

19) Andersen, P. H., Jarlov, N., Hesselholt, M., Baek, L. : *Zentralbl. Veterinarmed. A.*, **43**, 93~101, 1996.

牛の肝機能障害が炎症性子宮疾患の重篤化に及ぼす 分子メカニズムの解明

Effect of hepatic dysfunction on the molecular pathophysiology of uterine
inflammatory diseases in cows

真 方 文 絵

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Fumie Magata

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

The present study aimed to investigate the effect of liver dysfunction on the pathophysiology of uterine inflammatory diseases and the accumulation of bacterial endotoxin lipopolysaccharide (LPS) in dairy cows. In Experiment I, cows with high concentration of aspartate aminotransferase (AST) and γ -glutamyl transferase (GGT) in serum were defined as liver dysfunction. And the effect of liver dysfunction on the changes of plasma LPS concentration was determined in the peripartum dairy cows. In experiment II, uterine inflammation was diagnosed by the examination of the appearance of the endometrium, and the concentration of LPS, nonesterified fatty acid (NEFA), and β -hydroxybutyric acid (BHBA) in each follicular fluid sample were measured. In experiment III, the effect of combination treatment of BHBA and LPS on the oocyte maturation was determined in vitro. Cumulus-oocyte complexes were aspirated from ovaries of healthy Holstein cows, and BHBA and/or LPS were supplemented to the maturation medium. In experiment I, plasma LPS concentration was higher ($p < 0.05$) in cows with liver dysfunction than that of healthy cows. In experiment II, follicular concentration of BHBA and NEFA were higher ($p < 0.05$) in cows with uterine inflammation than that of cows without uterine inflammation. Also, follicular LPS concentration was higher in cows with high concentration of BHBA and NEFA in follicular fluid ($p < 0.05$). In experiment III, supplementation of BHBA or/and LPS reduced the nuclear maturation rate of oocyte and the blastocyst formation rate after in vitro fertilization ($p < 0.05$). However, there was no synergistic effect of the combination treatment of BHBA and LPS. Results indicate that liver dysfunction is commonly accompanied by uterine inflammation and possibly associated with LPS accumulation. BHBA (ketone body) increased in follicular fluid of cows with uterine inflammation and might impair the developmental competence of oocytes without interaction with LPS.

1. 目 的

乳牛における繁殖障害の主要因に、子宮への細

菌感染によって引き起こされる子宮炎や子宮内膜炎といった炎症性子宮疾患が存在する。炎症性子宮疾患に罹患した牛では、臨床的に子宮が治癒し

でも長期にわたり受胎性が低下するが、分娩後早期に発生する子宮の炎症が繁殖機能に影響を及ぼし続けるメカニズムは不明であった。我々はこれまで、子宮に感染した細菌が放出するエンドトキシンであるリポポリサッカライド (LPS) が牛卵巣内の卵胞に移行し、卵胞の性ステロイドホルモン産生や卵母細胞の成熟機構を阻害することを明らかにしてきた^{1,2)}。本研究では、LPS代謝の主たる器官である肝臓に着目し、炎症性子宮疾患と高い頻度で併発する肝機能障害がLPSの代謝と作用に及ぼす影響を明らかにする。現代の高泌乳牛では分娩後の泌乳開始によって急激に負のエネルギーバランスに陥り、肝機能の低下が避けられない状態である。実際、炎症性子宮疾患に罹患した乳牛では脂肪肝やケトosisといった肝機能障害が頻発しており、予備調査によってその併発率は6割にのぼることが明らかとなった。これらのことから、肝機能障害によってLPS代謝能力が低下するとともに、肝機能障害により産生された物質がLPSと相互作用を示すことで子宮の炎症が重篤化する可能性が考えられる。

以上の背景を踏まえ、本研究では肝機能障害が炎症性子宮疾患の長期化と重篤化に及ぼす分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。炎症性子宮疾患の病態指標としてLPSを取り上げ、① 肝機能障害によってLPSが代謝されずに蓄積する、もしくは、② 肝機能障害により産生された物質がLPSと相互的に作用する、といった2つの要因について精査した。

2. 方 法

2.1 試験Ⅰ：分娩後の乳牛の血中LPS濃度と肝機能との関連性の解析

肝機能障害および炎症性子宮疾患の自然症例を用いて、二つの疾病の併発率を調査するとともに、血中LPS濃度の推移に及ぼす肝機能障害の影響

を検証した。分娩後21日以内に外陰部から悪臭を伴う赤褐色水様の排出液が認められ、さらに39.5℃以上の発熱がみられた場合を子宮炎とした。肝機能障害の診断のため、分娩前1週から分娩後6週の乳牛より週1回の採血を行い、肝機能障害に関連する血液生化学因子として遊離脂肪酸 (NEFA)、 β -ヒドロキシ酪酸 (BHBA)、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST)、および γ -グルタミントランスフェラーゼ (GGT) の血清中濃度を測定した。また、血漿中のLPS濃度を測定し、LPSの濃度推移を肝機能と合わせて評価した。

2.2 試験Ⅱ：乳牛の卵胞液中LPS濃度と肝機能との関連性の解析

肝機能障害による卵胞へのLPS蓄積の可能性について検証した。食肉処理場においてホルスタイン種経産牛の子宮および卵巣を採取し、子宮内膜の充血や腫脹、および膿の貯留が認められた個体を子宮の炎症ありと診断した。また、卵胞液中の肝機能障害関連因子 (NEFAおよびBHBA) 濃度とLPS濃度を測定した。

2.3 試験Ⅲ：卵母細胞の発生能に及ぼすBHBAとLPSとの相互作用の解明

試験Ⅱにおいて子宮の炎症を呈した乳牛の卵胞液において濃度増加が認められたBHBAがLPSと相互作用を示す可能性についてin vitroで検証した。食肉処理場において採取した健康な乳牛の卵巣を用いて、直径2-8mm程度の小卵胞より卵丘細胞-卵母細胞複合体を吸引採取して体外成熟培養に供した。LPS (1 ng/ml, E. coli O111 : B4, Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) とBHBA (100 μ g/ml, DL- β -ヒドロキシ酪酸ナトリウム塩, Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) とを複合的に作用させた培地を使用し、38.5℃、5% CO₂湿度飽和気相下で23時間体外成熟培養を行った。培地に添加したLPSおよびBHBAの濃度は、

試験Ⅱにおいて得られた卵胞液中濃度を参考に決定した。培養後は卵母細胞の核染色を行い、第二減数分裂中期 (MⅡ期) に達したものを成熟卵子として核の成熟率を算出した。また、成熟卵子は体外受精および体外発生培養に供し、媒精後2日に卵割率を、8日に胚盤胞期胚への発生率を算出した。

3. 結果と考察

3.1 試験Ⅰ：分娩後の乳牛の血中LPS濃度と肝機能と関連性の解析

子宮炎に罹患した乳牛において、血中のNEFAおよびBHBA濃度は健康牛と比較して分娩前1週から分娩後4週まで高値で推移した ($p < 0.05$, データ掲載なし)。NEFAの高値はエネルギー不足による体脂肪動員を反映しており、肝臓への過剰なNEFAの動員により脂肪肝を引き起こす。さらに、NEFAの過剰動員により肝機能が低下すると、ケトン体であるBHBAが生成されることでケトosisの原因となる。つまり、子宮炎はケトosisや脂肪肝といった肝機能障害に関連する疾病

の発生頻度を増加させる可能性が示された。ASTとGGTは肝細胞の傷害により産生される逸脱酵素であり、その高値は肝機能障害を直接反映している。肝機能障害に関連するこれらの血中因子において、乳牛における泌乳初期の基準値よりも高値 (AST > 110 U/l, GGT > 25 U/l) を示した牛を肝機能障害群 ($n = 3$), 低値であった牛を健常群 ($n = 7$) として、血中LPS濃度の推移を検証した (Fig. 1)。本研究に供試した肝機能障害群の牛はいずれもNEFAおよびBHBAが高値 (それぞれ $1000 \mu\text{Eq/L}$ および $1400 \mu\text{M}$ 以上) を示しており、肝機能障害によるケトosisの発生が示唆された。肝機能障害群では血中LPS濃度が分娩後1週より上昇し、健常群よりも高値で推移した ($p < 0.05$)。血中からのLPSの消失は、個体の健康状態に大きく影響される。LPSを静脈内投与した場合、健康な乳牛では投与後30分以内に血中からLPSが消失したが、脂肪肝を起こしている乳牛ではLPSの消失がまったく起こらず、死亡する個体がいることが報告されている³⁾。本研究においても、分娩後の乳牛において子宮炎と肝機能障

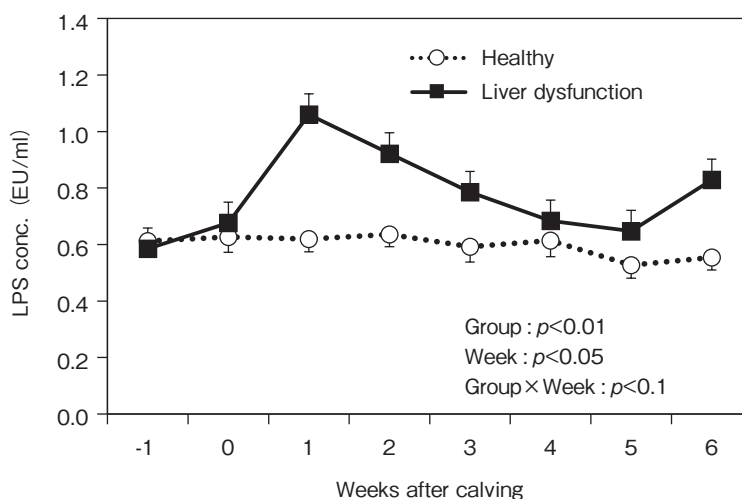


Fig. 1 Changes in plasma lipopolysaccharide (LPS) concentrations in healthy cows (open circles, $n = 7$) and cows with liver dysfunction (solid squares, $n = 3$). All values are shown as the mean $\pm$ SEM.

害とが併発した場合、子宮への細菌感染により産生されたLPSが肝臓で代謝されずに血中に蓄積する可能性が推察された。

3.2 試験Ⅱ：乳牛の卵胞液中LPS濃度と肝機能との関連性の解析

子宮の炎症が認められた牛（ $n = 12$ ）における卵胞液中のBHBAおよびNEFA濃度は、子宮の炎

症なしの牛（ $n = 27$ ）と比較して有意に増加していた（ $p < 0.05$, Fig. 2）。このことから、子宮の炎症によって肝機能障害の発生頻度が増加し、BHBAおよびNEFAが卵胞に移行する可能性が示唆された。さらに、卵胞液中のBHBA濃度およびNEFA濃度が高値であった牛（それぞれ $n = 4$ および $n = 18$ ）では、低値であった牛（それぞれ n

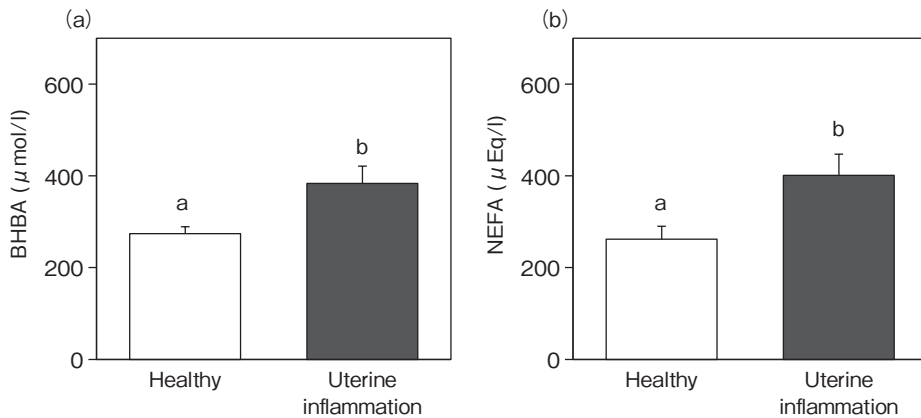


Fig. 2 The concentration of (a) BHBA and (b) NEFA in follicular fluid of ovarian large follicles in cows without uterine inflammation (healthy, $n = 27$) and with uterine inflammation (uterine inflammation, $n = 12$). All values are shown as mean $\pm$ SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($p < 0.05$).

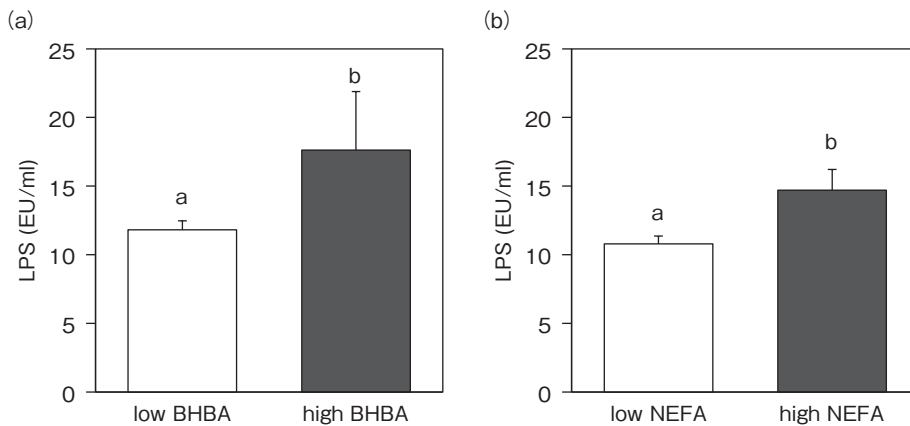


Fig. 3 The concentration of LPS in follicular fluid of ovarian large follicles in cows with (a) Cows with a follicular fluid BHBA concentration of less than $500 \mu\text{mol/l}$ were categorized as 'low BHBA' ($n = 42$) and those with a concentration greater than $500 \mu\text{mol/l}$ were categorized as 'high BHBA' ($n = 4$). (b) Cows with a follicular fluid NEFA concentration of less than $350 \mu\text{Eq/l}$ were categorized as 'low NEFA' ($n = 28$) and those with a concentration greater than $350 \mu\text{Eq/l}$ were categorized as 'high NEFA' ($n = 18$). All values are shown as mean $\pm$ SEM. Values with different letters (a, b) are different between groups ($p < 0.05$).

=42およびn=28)と比較して卵胞液中のLPS濃度が高値を示した(それぞれ $p<0.05$ および $p<0.01$, Fig. 3)。このことは、肝機能障害に関連して産生されたBHBAおよびNEFAが卵胞液中に移行した個体では、LPS産生が増加、もしくは卵胞へのLPS蓄積が生じる可能性を示している。食肉処理場由来の卵巣を用いた研究において、肝機能障害を呈した個体では卵胞液中のBHBA濃度が増加するとともに、内包される卵母細胞の体外受精後の胚盤胞期胚への発生率が低下することが報告されている⁴⁾。また我々は、LPSが卵母細胞の成熟能および卵胞におけるステロイドホルモン産生を阻害することを報告してきた^{1, 2)}。本研究においても同様に、子宮の炎症と併発した肝機能障害により産生されたBHBAおよびNEFAが卵胞に到達し、LPSと相互的に、もしくは独立して卵母細胞および卵胞構成細胞の機能に影響を及ぼす可能

性が考えられた。

3.3 試験Ⅲ：卵母細胞の機能に及ぼすBHBAとLPSとの相互作用の解明

LPSとBHBAを単独および複合的に作用させた培地にて体外成熟培養を行った卵母細胞の核成熟率をTable 1に、体外受精後の卵割率と胚盤胞期胚への発生率をTable 2に示した。コントロール群と比較して、LPS単独処理群とBHBA単独処理群のいずれにおいてもMII期に達した成熟卵子の割合が低下した($p<0.05$)。さらに、体外受精後の卵割率と胚盤胞期胚への発生率においても、コントロール群と比較して、LPS単独処理群とBHBA単独処理群では低下した($p<0.05$)。しかしながら、LPS+BHBA複合処理群の核成熟率、卵割率、および胚盤胞期胚への発生率のいずれにおいてもLPSとBHBAの単独処理群と同レベルであった。以上の結果から、LPSとBHBAはどちら

Table 1 Effect of lipopolysaccharide (LPS) or/and β -Hydroxybutyric acid (BHBA) treatment on nuclear maturation of bovine oocytes

Treatment		No. of oocytes	Replicates	MII oocytes (%)
LPS (1 ng/ml)	BHBA (100 μ g/ml)			
–	–	90	3	64 (71.1) ^a
+	–	92	3	46 (50.0) ^b
–	+	82	3	40 (48.8) ^b
+	+	73	3	35 (47.9) ^b

Values with different superscripts within the same column are significantly different (a, b : $p<0.01$).

Table 2 Effect of lipopolysaccharide (LPS) or/and β -Hydroxybutyric acid (BHBA) treatment on embryo development

Treatment		No. of oocytes	Replicates	Cleaved (%)	Blastocyst (%)
LPS (1 ng/ml)	BHBA (100 μ g/ml)				
–	–	211	3	146 (69.2) ^a	61 (28.9) ^x
+	–	208	3	113 (54.3) ^b	38 (18.3) ^y
–	+	197	3	112 (56.9) ^b	39 (19.8) ^y
+	+	206	3	117 (56.8) ^b	37 (18.0) ^y

Values with different superscripts within the same column are significantly different (a, b : $p<0.01$, x, y : $p<0.05$).

も単独で卵母細胞の成熟および胚発生を阻害するが、相互作用は示さないことが明らかとなった。つまり、LPSとBHBAはそれぞれ異なる機序によって卵母細胞に作用し、その核成熟を阻害することでその後の胚発生能を低下させる可能性が示された。LPSは、細胞膜上に存在するToll様受容体（TLR）4もしくはTLR2により認識されることで卵母細胞に作用することが推察されている²⁾。一方で、BHBAが卵母細胞の成熟と胚発生に影響を及ぼすメカニズムは明らかになっていない。BHBAはTLR4の発現には影響を及ぼさないことが報告されており⁵⁾、LPSによる炎症反応の惹起とは別の経路によって細胞に作用する可能性が推察される。BHBAによる卵母細胞の成熟阻害の発生メカニズムについては今後さらなる検証が必要である。

4. 要 約

本研究では、肝機能障害が炎症性子宮疾患の長期化と重篤化に及ぼすメカニズムを明らかにすることを目的とした。試験Ⅰでは、乳牛における肝機能障害および炎症性子宮疾患の自然症例を用いて、血中LPS濃度の推移に及ぼす肝機能障害の影響を検証した。その結果、ASTとGGTが高値を示した肝機能障害群では血中LPS濃度が健常群よりも有意に高値で推移したことから、子宮炎と肝機能障害とが併発した場合、子宮への細菌感染により産生されたLPSが肝臓で代謝されずに血中に蓄積する可能性が推察された。試験Ⅱでは、食肉処理場で採取した乳牛の子宮および卵巣を用い、子宮の炎症と卵胞液中のBHBAとNEFA濃度、およびLPS濃度との関連性を検証した。その結果、子宮の炎症が認められた個体では、子宮の炎症な

しの個体と比較して卵胞液中のBHBAおよびNEFA濃度が有意に増加していた。また、卵胞液中のBHBA濃度およびNEFA濃度が高値であった牛では、低値であった牛と比較して卵胞液中のLPS濃度が高値を示していた。このことから、子宮の炎症と併発した肝機能障害により産生されたBHBAおよびNEFAが卵胞に到達するとともに、卵胞へのLPS蓄積に影響を及ぼす可能性が考えられた。さらに、試験Ⅲでは、BHBAがLPSと相互作用を示す可能性についてin vitroで検証するため、LPSとBHBAを単独および複合的に作用させた培地を用いて牛未成熟卵母細胞の体外成熟培養を行った。その結果、LPS単独処理群、BHBA単独処理群、およびLPS+BHBA複合処理群のいずれにおいても核成熟率および体外受精後の胚盤胞期胚到達率が低下したが、LPSとBHBAの複合処理による相互作用は認められなかった。以上の結果から、乳牛の炎症性子宮疾患においては肝機能障害が高頻度で併発し、血中および卵胞液中へのLPS蓄積に関与する可能性が推察された。さらに、子宮の炎症と併発した肝機能障害により産生されたBHBAおよびNEFAは卵胞液に到達し、LPSとの相互作用は示さないものの、卵母細胞の性状に影響を及ぼすことが考えられた。

文 献

- 1) Magata, F., Horiuchi, M., Echizenya, R., Miura, R., Chiba, S., Matsui, M., Miyamoto, A., Kobayashi, Y., Shimizu, T.: *Anim Reprod Sci*, **144**, 6~13, 2014.
- 2) Magata, F., Shimizu, T.: *Reprod Toxicol*, **71**, 1~7, 2017.
- 3) Andersen, P. H., Jarlov, N., Hesselholt, M., Baek, L.: *J Vet Med Ser A*, **43**, 93~101, 1996.
- 4) Sarentonglaga, B., Ogata, K., Taguchi, Y., Kato, Y., Nagao, Y.: *J Reprod Dev*, **59**, 168~173, 2013.
- 5) Hillreiner, M., Flinspach, C., Pfaffl, M. W., Kliem, H.: *PLoS ONE*, **11**, e0157774, 2016.

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（Ⅱ）

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

柳 川 洋二郎・菅 野 智 裕*

（北海道大学大学院獣医学院，*社団法人ジェネティクス北海道）

Yojiro Yanagawa and Chihiro Kanno*

（Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University, *Genetics Hokkaido Association）

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 reasons for low fertility is due to short longevity inside the oviduct, but there are 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 ability of sperm binding to oviductal epithelial cell from molecular aspects and for evaluating hyper-activated motility expressed after capacitation, moreover, evaluating sex-sorted sperm by established methods.

After labelling sperm with FITC labelled Lewis-a, the factor binding to sperm those exhibits on oviductal epithelial cell, it was possible to evaluate objectively by flow-cytometry. However, it is not possible to evaluate binding ability of sex-sorted sperm, may be due to fluorescent, Hoechst, used during sorting. On the other hand, it was able to know the ratio of sperm in hyper-activation by cluster analysis using motility data examined by computer assisted sperm analyzer. In sex-sorted sperms, there were high rate of hyper-activated sperm compared to conventional sperm, and this seems one of the reason causing low fertility in sex-sorted sperm.

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。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％）に比べさらに低く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・機能的変化を起こす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る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結合能および受精能獲得能が求められる。これまでに卵管峡部の上皮細胞を培養し、精子と上皮細胞との結合を評価しようと試みたところ、卵管峡部上皮細胞の培養が困難かつ検査実施に十分量の上皮細胞を採取するには国内のと畜場において採取される卵管の数では不十分であることが分かった。そこで上皮細胞と精子の結合やその後の受精能獲得に関わる分子に着目した評価法の開発への転換が適切であると考えられた。

卵管峡部上皮細胞上の線毛側の結合に関わる因子としてはLewis-aという三糖類が精子との結合能が高いことが分かっている⁴⁾。さらに精子が卵

管上皮線毛から離脱するには精子表面タンパクの変質と受精能獲得時にみられるハイパーアクチベーションという活発な運動が必要とされている⁵⁾。これまでに精子とLewis-aに対する結合能について卵管上皮を介して評価した報告はあるが、直接的また客観的に評価した報告はなく、評価法も確立していない。また精子のハイパーアクチベーションについても客観的かつ定量的な評価方法は報告されていない。

そこで本研究では精子の雌生殖道内における卵管上皮結合能およびハイパーアクチベーション運動に関わる評価方法の開発と性選別精子への応用を目的とした。

2. 方 法

2.1 精子の卵管上皮細胞結合能評価

精子の卵管上皮結合能としてはLewis-a-PAA-FITCに対する結合能として評価した。精子に対するLewis-a-PAA-FITCの標識はSuarez et al.⁴⁾に従った。凍結精液を37℃の温湯中で融解させ、5 mlのTyrode albumin lactate pyruvate (TALP) 液で希釈し、400×gで5分間遠心した。上清を吸引したのち、精子濃度をTALP液で $12 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。95 μl の精子浮遊液に5 μl のLewis-a-PAA-FITC (1.0mg/ml in PBS) を加え、遮光、室温下で30分間染色した。5 mlのTALP液を加え、200×g、5分で遠心し、上清を500 μl 残して除去した。PIを4 μl 入れ、5分間遮光、室温下で静置した。蛍光顕微鏡を用いて精子の染色性を確認した後、37℃に加温した400 μl のPBSおよび100 μl の染色後精子を混和し、フローサイトメトリーによる精子染色性の評価を実施した。判定にはFITC (Lewis-a-PAA-FITC) およびPerCP-Cy 5.5 (PI) の2次元プロットを作成し、10,000個の精子について評価を実施した。PI陰性を生存精子、PI陽性を死滅精子と判定した。

2.2 ハイパーアクチベーション運動評価

3頭の種雄牛由来の凍結精液を実験に用いた。凍結精液を37℃の温湯中で融解させ、精子浮遊液200 μ lに対し1 μ Mのカルシウムイオノフォア (A23187) を添加した。精子浮遊液精子運動性解析用チャンバーに入れ、精子運動能自動解析装置 (CASA) により精子運動性を測定した。測定項目は精子運動率、直線速度 (VSL), 曲線速度 (VCL), 平均速度 (VAP), 頭部振幅 (ALH), 頭部振動数 (BCF) および直進性 (LIN; VSL/VCL) とした。測定は1サンプルあたり3視野以上かつ、200精子以上とした。CASAにより測定した精子個々の運動性データを、クラスター解析によるグループ (クラスター) 分類に供した。44,570個の運動精子データを、Ward法による樹形図作成に供した。作成された樹形図の形状からクラスター数を決定した後、k-means法により、個々の精子データを決定したクラスター数に分類した。クラスター解析のパラメータには、運動性項目のうち独立項目であるVSL, VCL, VAP, ALHおよびBCFの5項目を用いた。

2.3 性選別精液における卵管上皮結合能およびハイパーアクチベーション運動

2.3.1 卵管上皮細胞結合能

1頭のホルスタイン種由来の性選別精液を実験に供した。方法は2.1に従ったが、ストロー1本あたりの精子数が少ないことから、精子のロスを防ぐためLewis-aとの反応後の洗浄は行わず、PIによる染色を行った。

2.3.2 ハイパーアクチベーション運動の比較

3頭の種雄牛由来の性選別精液および通常凍結精液を実験に供した。凍結精液を融解後、精子濃度を 10×10^6 /mlに調整した。精子浮遊液を用いて体外受精用の50 μ lのドロップを作製し、パラフィンオイルをかぶせて5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂, 39℃の条件化で培養を行った後、CASAを

用いて精子運動性を評価した。測定は1サンプルあたり6視野以上、かつ100精子以上とした。精子運動性の評価は、培養前、培養2時間および4時間後に実施した。測定により得られた性選別精液および通常精液中の、個々の運動精子データをクラスターに分類した。判別分析は2.2で得られたクラスター解析の結果 (各クラスターにおけるVSL, VCL, VAP, ALHおよびBCFの平均値および標準偏差) をリファレンスデータとして用い、Igor Pro (Wavemetrics社) を用いて作製したプログラムにより実施した。

3. 結果

3.1 精子の卵管上皮細胞結合能評価

蛍光顕微鏡による観察においてはLewis-a-PAA-FITCによってまったく標識されない精子、尾部のみ標識されている精子、全体を標識されている精子などさまざまな状態の精子が観察された (Fig. 1)。フローサイトメトリーによる評価では精子全体の21.9%, 生存精子中では3.7%の精子がLewis-a-PAA-FITCに結合していた。

3.2 ハイパーアクチベーション運動評価

クラスター解析の結果、すべての精子は6つのクラスターに分類することができた。このうちALHが大きく、LINが小さい軌道を示すクラスター3がハイパーアクチベーション運動を呈する精子であると考えられた。これらの精子の軌跡は円形であり、前進性がなかった (Fig. 2)。一方、VSLおよびLINが高いクラスター1精子は活発な全身運動を示す精子であると考えられた。

3.3 性選別精子における卵管上皮細胞結合能およびハイパーアクチベーション運動

性選別精子において全精子のうちLewis-a-PAA-FITCと結合していると判定された精子数は86.1%であり、生存精子中 (全体の87.9%) にあつては78.5%であった。

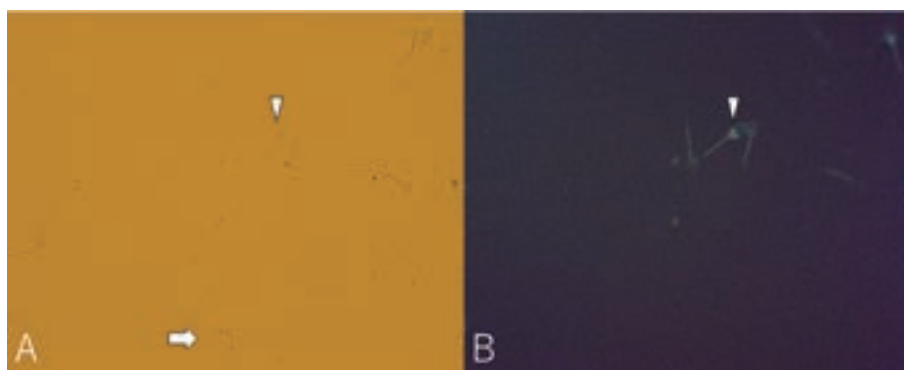


Fig. 1 Bright field (A) and FITC fluorescence (B) images of sperm observed after labelling with Lewis-a-PAA-FITC. Arrow indicates spermatozoa not bound to Lewis-a and arrow head indicates that bound to Lewis-a.

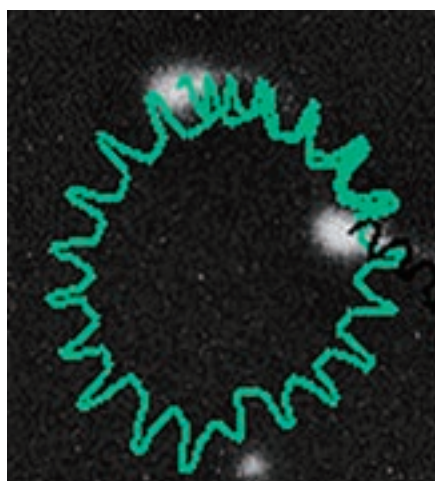


Fig. 2 Typical motility pattern of hyper-activated sperm.

精子の運動性については、ハイパーアクチベーション運動を示すクラスター3の割合は融解直後においては性選別精液（18.8%）の方が、通常精液（8.6%）と比較して高かった。しかしクラスター3精子の割合は培養により減少し、培養2および4時間後では精液による差はなかった。一方クラスター1の精子割合はどちらの群においても融解直後から培養2時間目まで変化がなかった。

4. 考 察

本研究では精子の受精能を評価するため、卵管上皮細胞への結合能およびハイパーアクチベ

ション運動を評価する方法の開発を行った。卵管上皮細胞への結合能は精子のLewis-aへの結合として評価した。通常精液にLewis-aを標識した結果、さまざまな程度で結合する精子が観察されたため、一定の評価が可能であると考えられた。通常精液は生存かつLewis-aに結合する精子の割合が3.7%であり、1本のストロー中において受精に関わると考えられる精子の割合は実はとても少数であることが推察された。一方、性選別精子における生存かつLewis-aに結合する精子の割合は78.5%と高い値を示した。しかし、性選別精子において生存精子は全体の87.9%であり、一般的な凍結融解による障害および性選別精液の運動性を考慮すると異常値であると考えられた。性選別精液は生産過程においてDNAと結合するHoechstにより染色されるが、Hoechstの濃度が高く、また一度染色されたらHoechstを排除することはできないため、Hoechstが結合したまま評価を実施していることとなる。Hoechstの濃度が高い場合、フローサイトメーターではFITC判定時にHoechst発色が漏れ込むことがある。今後はHoechstの影響を考慮して染色法の検討が必要である。

一方、ハイパーアクチベーション運動の評価についてもハイパーアクチベーション運動の特徴で

ある頭部振幅が大きく円運動を示す精子のクラスターの存在が明らかとなった。また、判別分析により各精子の運動性に基づいて各クラスターへの分類が可能であることから、ハイパーアクチベーション運動を呈する精子の定量的な評価が可能となったと考えられた。ハイパーアクチベーション運動を示す精子は時間経過により減少することから、直進運動を示す精子と比較して寿命が短いことが推察された。さらに性選別精液ではハイパーアクチベーション運動を示す精子の割合が通常精液中のよりも高かったことから、性選別の過程で本来であれば卵管内で受精能獲得後に示すべきハイパーアクチベーション運動を示すような障害を受けていること、またこれらの精子の寿命が短いことから性選別精液の受胎率が低い要因の一つであることが推察された。

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、卵管狭部における上皮細胞への結合能および受精能獲得能が求められる。そこで本研

究では精子の卵管上皮結合能を分子学的な側面から評価する方法および受精能獲得時に呈するハイパーアクチベーション運動に関わる評価方法の新規開発と性選別精子への応用を目的とした。卵管上皮に存在する精子と結合する因子であるLewis-aと精子との結合について調べた結果、フローサイトメトリー法により評価が可能であると考えられたが、性選別精子の場合は生産過程に使用されているHoechstの影響により評価が困難であった。一方、ハイパーアクチベーション運動の評価についてはCASAによる精子運動性解析後のクラスター解析によりその割合を算出することが可能となった。性選別精液においては融解後のハイパーアクチベーション運動を示す精子の割合が通常精液と比べ高いことが受胎率が低い要因の一つ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) Suarez, S. S., Revah, I., Lo, M., Kölle, S. : *Biol Reprod*, **59**, 39~44, 1998.
- 5) Suarez, S. S. : *Cell Tissue Res*, **363**, 185~194, 2016.

豚における繁殖性の向上に向けたアミノ酸の効果に関する研究

Research on effects of amino acid for improving reproductive performance
in sow

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)

Go Kitahara

(Theriogenology, Department of Veterinary Sciences, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

In improvement of swine production, the increase of litter size is needed. There are divisions of opinion on the effects of L-arginine (Arg) for reproductive performance in sows. Moreover there is no evidence in the effects of uterine blood flow by Arg until now. In this study, we investigated the effects of Arg in the changes of uterine blood flow and reproductive performances in pregnancy sow.

76 sows were investigated from the first artificial insemination (AI) after parturition (defined as D1), and divided Control group (not given Arg, n=41) and D0-28 group (given Arg, n=35). Plasma Arg, Nitric Oxide (NO), and progesterone (P_4) before and after given Arg or concentrated diet (D56) at D0, 14, 28, 35, 42 and 56 were measured. And also the numbers of corpus luteum (CL) at D14, and the uterine blood flow before given Arg, were individually measured. Finally the litter size was recorded, and then the efficiency of newborn (litter size/the numbers of CL) was calculated. In the result, plasma Arg concentrations in D0-28 group were higher than in Control group throughout the study ($p<0.05$), whereas there were no significant differences in the numbers of CL, plasma P_4 and NO levels. The volumes of uterine blood flow at D28, 35 and 56 in D0-28 group were larger compared with Control group ($p<0.05$). The number of normal neonatal piglets and the efficiency of new born (Litter size/the numbers of CL $\times 100$) in D0-28 group were higher than Control group ($p<0.05$).

In conclusion, the present study has demonstrated that the L-arginine given sow from before AI to 29 days after AI improved uterine blood flow and reproductive performances.

1. 目 的

国際競争力の求められる近年の日本の養豚業において、生産性の向上は重要な課題であり、特に離乳頭数に直接影響する種雌豚の繁殖成績の向上が生産性向上に向けた最重要課題である¹⁾。

豚の産子数を決める要因には、胚死減率および胎子死率があり、妊娠30日頃までに発生する早期胚死減が特に大きな割合を占めている²⁾。また、産子数が15頭を超える多産系豚³⁾において、妊娠早期の胚死減に加え、妊娠中期以降には子宮の物理的な体積、胎盤の表面積、栄養供給およびガス

交換能力が不足し、胎子死を引き起こす^{4,5)}。このため、胎子数の増加に対応した適切な栄養などの供給が必要である⁶⁾。

豚において準必須アミノ酸であるL-アルギニン (Arg) は、一酸化窒素 (NO)、ポリアミン、成長ホルモン、インスリンの合成促進や、哺乳類における尿素回路の中間体としてのアンモニア (NH₃) 代謝促進といった多様な作用を有している^{7,8)}。豚への人工授精 (AI) 前後から妊娠早期におけるArgの経口給与が繁殖成績に与える影響は議論が分かれており、また同時期におけるArgの経口給与が子宮血流動態に与える影響は報告されていない。

以上より、AI前後から妊娠早期の豚へのArg給与が、豚の妊娠期間中における子宮動脈血流動態および繁殖成績や産子に与える影響を明らかにすることを目的に研究を行った。

2. 方 法

2.1 供試動物

宮崎県内の一養豚場にて飼養されているランドレース種×大ヨークシャー種の一代交雑種76頭を用いた。産次は 3.8 ± 0.8 産 (平均 $\pm$ SD) で、23.4 $\pm$ 2.9日の授乳期間を経て正常に発情回帰した。供試豚はストールにて単頭飼育した。また、自由飲水とし、配合飼料を7:30と14:30の1日2回給与し、1回あたりの給与量は、離乳からAIまでは1.5kg、AI後は1.0kgであった。離乳後、発情観察は8:30と16:30の1日2回実施し、初めて発情徴候 (不動反応) がみられた12時間後に初回のAIを行い、発情徴候が消失するまで12時間おきにAIを行った。

2.2 試験デザイン

離乳後初回AI実施日をD 1とし、配合飼料のみを給与する対照群 (n = 41, 産次 = 3.6 ± 0.7)、14:30の配合飼料給与時に、D 0 からD28におい

て20 gのArg (L-アルギニン「あすか」、あすかアニマルヘルス、東京) を与えるD 0-28群 (n = 35, 産次 = 3.8 ± 0.9) の2群に分けた (Fig. 1)。

血液は、供試豚から無作為に抽出した一部の豚において、D 0のArg給与前、Arg給与2時間後、D 14のArg給与2時間後、D 28のArg給与前、Arg給与1時間後、Arg給与2時間後、D 56の14:30の配合飼料給与前に、鼻保定下で頸静脈よりヘパリン加血として採取した。Arg (配合飼料) 給与前の採血は、Arg給与 (14:30) 前5から6時間に行った。採取した血液は氷上にて輸送し、遠心分離機にて4℃, 1,400 g, 15分間にて遠心し、血漿サンプルを測定まで-30℃にて保存した。

血漿中Arg濃度は高速液体クロマトグラフィー法、血漿中NO、プロジェステロン (P₄)、エストラジオール-17 β (E₂)、インスリン様成長因子-1 (IGF-1) 濃度はELISA、血漿中NH₃、BUNおよびグルコース (Glu) 濃度はエンドポイント法で測定した。なお、各物質の測定日および頭数は、Fig. 1に示す。

黄体数と子宮動脈血流動態の測定は、10MHzのリニア型探触子 (I 739-RS, GEヘルスケア・ジャパン、東京) を装着した超音波診断装置 (LOGIQ Book, GEヘルスケア・ジャパン、東京) を用いて経直腸にて検査した。黄体数は、D14 $\pm$ 2に測定し (対照群: n = 19, D 0-28群: n = 17)、Bモードで左右卵巣の動画を録画し、その後再生した画像より黄体数を数えた。左右の子宮動脈血流動態の測定は、対照群 (n = 17)、D 0-28群 (n = 15) について、D 0, D14, D28, D35, D42およびD56のArg (配合飼料) 給与 (14:30) 前3時間と5時間、D28のArg給与後30分に検査した。測定した子宮動脈の位置はFig. 2に示す。子宮動脈の拡張期における血管径 (cm) を計測し、子宮動脈の縦断面を描出し、パルスドプラー法 (4 MHz) にて拍動係数 (PI)、血管抵抗指

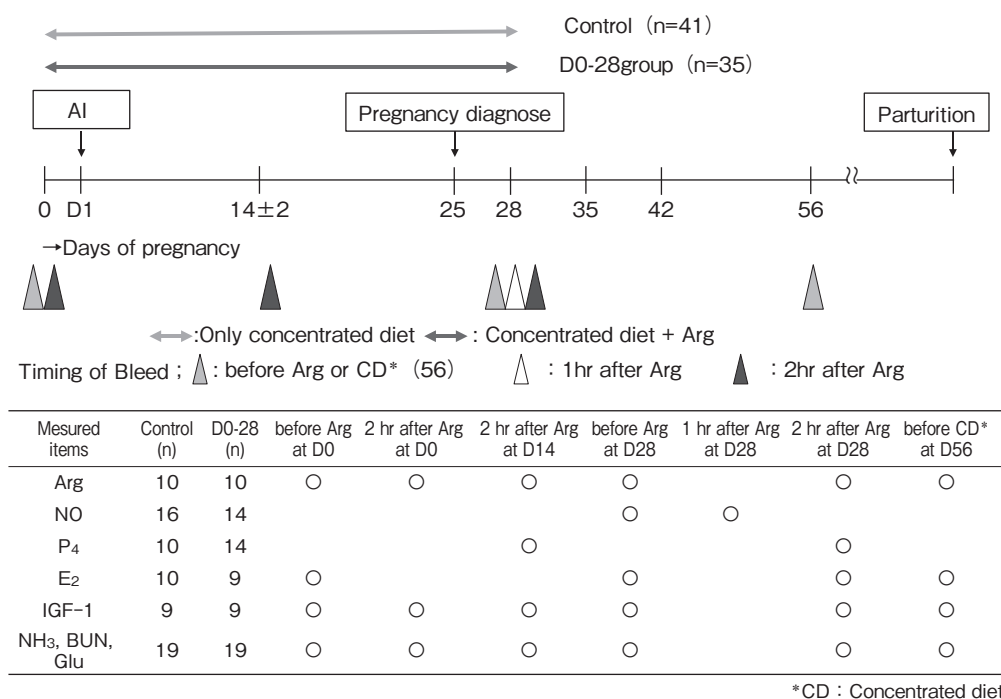


Fig. 1 The experimental schedule and the timing for measuring blood chemicals

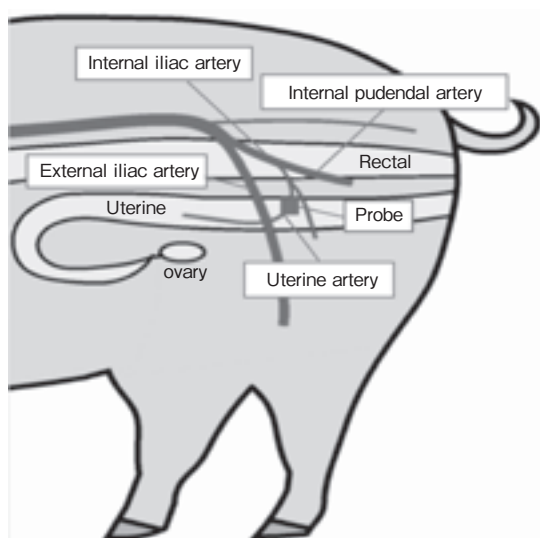


Fig. 2 The position for measuring uterine blood flow by transrectal ultrasonography

数 (RI), 子宮動脈血流量 (ml/分) を算出した。また、各項目においてD28におけるArg給与前後の変化率 (D28におけるArg給与後/D28におけ

るArg給与前) を算出した。

AI後25日の妊娠診断ではすべての供試豚で妊娠を確認したが、その後流産した対照群の1頭を除く豚について、産子状況を記録した。娩出したすべての産子を総産子数とし、生存、死亡に分けた。さらに生存産子は、正常、虚弱 (< 1 kg), 奇形に分け、産子率 (%) は、(産子率) = (総産子数) ÷ (黄体数) × 100の式で算出した。

対照群 (n = 8) とD 0-28群 (n = 7) の産子は、分娩時 (対照群: n = 116, D 0-28群: n = 104) および離乳前日 (対照群: n = 47, D 0-28群: n = 62) に体重を測定した。分娩時および離乳前日の両日に体重が測定できた子豚 (対照群: n = 47, D 0-28群: n = 62) は2回の測定値の差から体重増加量を算出した。

2.3 統計解析

統計処理には統計解析ソフトR studio (Version 1.1.447, <http://cran.us.r-project.org>) を用いた。

正規性の検定にはシャピロ・ウィルク検定, 分散の検定にはF検定を用いた。血漿中Arg, NO, P_4 , E_2 , IGF-1, NH_3 , BUN, Glu濃度および血流動態について, 2群間の比較にはウィルコクソンの順位和検定を用いた。また, 総産子数, 生存産子数, 正常産子数について, クラスカル・ウォリス検定とウィルコクソンの順位和検定を用い, ホルムの方法を用いて補正を加えた。死亡産子数, 虚弱子数, 奇形子数にはチューキー・クレイマー検定を用いた。子豚の体重はT検定を用いた。有意水準は $p < 0.05$ とし, すべての数値は平均値 $\pm$ 標準偏差 (SD) で記載した。

3. 結果と考察

血漿中Arg濃度は, D 0のArg給与後にD 0-28群が対照群より高い傾向にあった ($p < 0.1$)。D 14とD 28のArg給与後にD 0-28群が対照群より高かった ($p < 0.05$) (Fig. 3)。

血漿中NO濃度は, D 28のArg給与前後での変化率は, D 0-28群が対照群より大きい傾向にあった ($p < 0.1$) が, 血漿中 P_4 濃度は有意な差

がみられなかった。妊娠1日目から30日目, 妊娠14日目から25日目もしくは28日目までのArg給与が繁殖成績を向上させた報告^{6, 9~11)}がある一方, 妊娠0日目から25日目の基礎飼料に対して0.8%のArg経口給与によって黄体数, 胎子の総数, 母体血漿中 P_4 濃度が低下した報告¹²⁾がある。この報告ではArgの給与回数を1日2回としていたが, 本試験では1日1回としており, 卵胞発育や排卵を阻害するとされる血中NO濃度が, 過去の報告と比べ, 高濃度に維持される時間が異なっていたため, 結果が違ったかもしれない。よって, 妊娠早期の豚へArgをAI前後から給与する場合, NOによる副作用を考慮し, 十分な給与間隔を設けることが重要である。

血漿中 E_2 濃度について, D 0のArg給与前ではD 0-28群が対照群より高い傾向にあった ($p < 0.1$)。血漿中IGF-1, NH_3 , Glu, BUN濃度は有意な差がみられなかった。

子宮動脈血管径について, D 28ではD 0-28群が対照群より大きかった ($p = 0.07$)。D 35ではD 0-28群が対照群より大きかった ($p < 0.05$)。

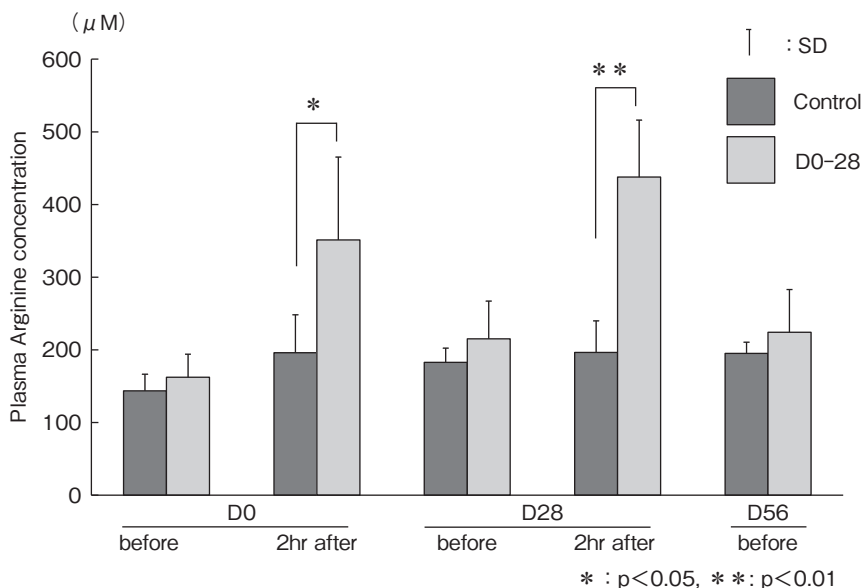


Fig. 3 The changes in plasma Arginine concentrations before and after given arginine or concentrated diet (D56)

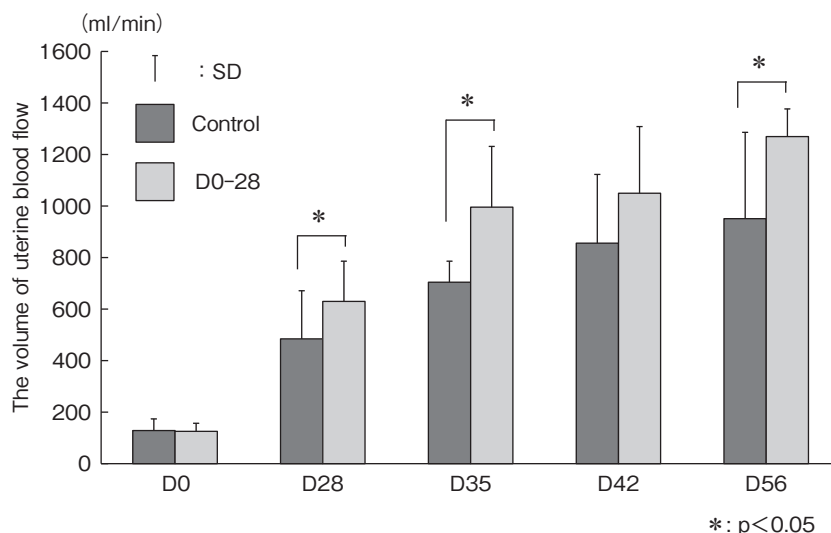


Fig. 4 The volume of uterine blood flow during experimental period

子宮動脈血流量について、D28、D35、D56ではD0-28群が対照群より多かった ($p < 0.05$) (Fig. 4)。D28におけるArg給与前後の変化率について、子宮動脈PI、RIではD0-28群が対照群よりも低く ($p < 0.01$)、子宮動脈血流量ではD0-28群が対照群よりも高かった ($p < 0.01$)。正常な子宮内膜において、非妊娠子宮より妊娠子宮では、著しく小動脈および毛細血管網が増加する¹³⁾。妊娠子宮のNOはこの小動脈および毛細血管網を拡張させる¹⁴⁾ことで母体と受胎産物間の物質交換を促進させている。D28において、Arg給与によりNOが増加し、子宮内膜の豊富な小動脈および毛細血管網が拡張した結果、子宮の血液要求量が増加し、Arg給与前より後で子宮動脈血流量が増加したことが示唆された。さらにArg給与期間終了後のD35における子宮動脈血管径および血流量、D56における子宮動脈血流量は、D0-28群が対照群よりも高く、Arg給与が子宮動脈に及ぼす影響が、一過性のものではなく、少なくとも本研究で調査を行った妊娠中期まで及ぶことが明らかとなった。Argによってポリアミンの産生が促進され、ポリアミンは血管新生作用を有すること

から胎盤の成長や血管新生に必要不可欠である^{13, 15)}。Arg給与終了後も子宮動脈血流量が増加していたことは、Arg給与期間中のポリアミンが増加することで胎盤における血管新生が促進され、妊娠子宮全体の血流量が増加したことが考えられる。

正常産子数および産子率について、D0-28群が対照群より増加した ($p < 0.05$) (Table 1)。分娩した子豚の体重について、有意な差はみられなかった。産子率の増加について、妊娠早期におけるArgの給与により胚や胎子の生存率が増加した報告^{6, 9-11)}と一致していた。豚において産子数が増加すると、子宮容量が不足^{9, 10)}し、子豚1頭あたりの出生時体重との間に負の相関関係を生じた報告^{16, 17)}がある。しかし、本試験では、D0から29日間にわたりArgを給与した結果、産子率および正常産子数は増加したものの、虚弱産子数および出生時体重に負の影響がみられなかった。これは、血管拡張および血管新生作用によって、妊娠期間中に子宮容量が不足せず、胎子体重が著しく増加する妊娠後期¹⁸⁾で、胎子への栄養供給等が十分に行われたからかもしれない。また、授乳期間

Table 1 Reproductive performances

	Control (n=40)	D0-28 (n=35)
Numbers of CL	27.4 ± 4.7 (n=20)	26.0 ± 5.0 (n=17)
Litter size	16.3 ± 3.4	17.6 ± 2.4
The efficiency of newborn (%) (Litter size / the number of CLs × 100)	60.0 ± 14.0* (n=20)	69.3 ± 11.4* (n=17)
Living piglets (heads / a parturition)	14.7 ± 3.3 †	16.1 ± 2.1 †
Normal neonatal piglets (heads / a parturition)	12.9 ± 3.0**	14.8 ± 2.4**
Weak neonatal piglets (heads / a parturition)	1.7 ± 1.8	1.3 ± 1.7
Died neonatal piglets (heads / a parturition)	1.7 ± 2.7	1.4 ± 1.7

† : p<0.1 ; * : p<0.05 ; ** : p<0.01

中の増体量および離乳前体重について差がみられなかったことも、D 0 から29日間のArg給与による正常産子数の増加は、養豚場経営における利益に直接影響する離乳頭数の増加につながるかもしれない。

結論として、繁殖成績の向上を目的とした妊娠早期の豚へのArg給与について、D 0 からD28にかけての1日1回の給与とすれば、Arg給与期間中および給与期間終了後のD56にかけて子宮動脈血流量を増加させ、産子率および正常産子数を向上させることが明らかとなった。

4. 要 約

養豚場の生産性向上には年間離乳頭数増加を目的とした産子数増加が必要である。L-アルギニン (Arg) について、排卵前後の豚へのArg給与が繁殖成績に与える影響は議論が分かれており、子宮動脈血流動態に与える影響も明らかになっていない。本研究では、Arg給与が妊娠豚の子宮動脈血流動態と繁殖成績に与える影響を明らかにすることを目的とした。

種雌豚76頭を供し、離乳後初回AI実施日をD 1 とし、Argを給与しない対照群 (n = 41)、D

0 ~ D28にArgを給与するD 0 -28群 (n = 35) に分けた。血漿中Arg、一酸化窒素 (NO)、プロジェステロン (P₄) 濃度測定のため、D 0 とD 28のArg給与前後、D 14のArg給与後、D56のArg給与前に採血した。D14に黄体数を、D28のArg給与前後、D 0、D14、D35、D42、D56のArg給与前に子宮動脈血流量を測定した。また、産子数を記録し、黄体数と総産子数から産子率 (%) を算出した。血漿中Arg濃度はArg給与期間内の給与後の測定において、D 0 -28群が対照群より高かった (p < 0.05)。黄体数と血漿中P₄濃度は群間に差がなかった。Arg給与前後の血漿中NO濃度変化率は、D 0 -28群が対照群よりも大きかった (p = 0.1)。Arg給与前の子宮動脈血流量は、D35、D56においてもD 0 -28群は対照群よりも多かった。D28のArg給与前後の子宮動脈血流量変化率は、D 0 -28群が対照群よりも大きかった。正常産子数と産子率はD 0 -28群が対照群よりも多かった (p < 0.05)。

以上より、本研究では、AI開始前日から29日間のArg給与は黄体数や血中P₄濃度を低下させず、給与期間終了後も長期にわたって子宮動脈血流動態を向上させ、分娩成績を向上させることが

明らかとなった。

文 献

- 1) Yamane, I., Ishizeki, S., Yamazaki, H. : *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, **67**, 177~182, 2014.
- 2) Pope, W. F. : *Biol. Reprod.*, **39**, 999~1003, 1988.
- 3) Dallanora, D., Marconb, J., Walter, M. P., Biondo, N., Bernardi, M. L., Wentz, I., Bortolozzo, F. P. : *Livestock Sci.*, **197**, 30~35, 2017.
- 4) Vallet, J. L., Leymaster, K. A., Christenson, R. K. : *J. Anim. Sci.*, **80**, E115-E125, 2002.
- 5) Webel, S. K., Dziuk, P. J. : *J. Anim. Sci.*, **38**, 960~963, 1974.
- 6) Li, J., Xia, H., Yao, W., Wang, T., Li, J., Piao, X., Thacker, P., Wu, G., Wang, F. : *J. Anim. Sci.*, **93**, 5291~5303, 2015.
- 7) Stechmiller, J. K., Childress, B., Porter, T. : *Am. J. Crit. Care.*, **13**, 17~23, 2004.
- 8) Wu, G., Morris, S. M. : *Biochem. J.*, **336**, 1~17, 1988.
- 9) Li, X., Bazer, F. W., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Frank, J. W., Dai, Z. L., Wang, J. J., Wu, Z. L., Shinzato, I., Wu, G. : *Amino Acids.*, **46**, 375~384, 2014.
- 10) Berard, J., Bee, G. : *Animal*, **4**, 1680~1687, 2010.
- 11) Madsen, J. G., Pardo, C., Kreuzer, M., Bee, G. : *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **8**, 58~69, 2017.
- 12) Li, X., Bazer, F. W., Johnson, G. A., Burghardt, R. C., Erikson, D. W., Frank, J. W., Spencer, T. E., Shinzato, I., Wu, G. : *J. Nutr.*, **140**, 1111~1116, 2014.
- 13) Reynolds, L. P., Redmer, D. A. : *Biol. Reprod.*, **64**, 1033~1040, 2001.
- 14) Reynolds, L. P., Redmer, D. A. : *Biol. Reprod.*, **48**, 698~708, 1992.
- 15) Wu, G., Bazer, F. W., Datta, S., Johnson, G. A., Li, P., Satterfield, M. C., Spencer, T. E. : *Amino Acids*, **35**, 691~702, 2008.
- 16) Maruyama, J. : *Jpn. J. Swine Sci.*, **27**, 135~139, 1990.
- 17) Bergstrom, J. R., Potter, M. L., Tokach, M. D., Henry, S. C., Dritz, S. S., Nelssen, J. L., Goodband, R. D., DeRouchey, J. M. : *Report of Progress. Kansas State University*, **1020**, 1~7, 2009.
- 18) Reynolds, L. P., Borowicz, P. P., Vonnahme, K. A., Johnson, M. L., Grazul-Bilska, A. T., Wallace, J. M., Caton, J. S., Redmer, D. A. : *Placenta*, **26**, 689~708, 2005.

繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響

Effect of nutrition control on superovulation response and the number of recovered embryo in heifer

林 武司・深水 大・上田 修二・稲田 淳

(福岡県農林業総合試験場畜産部)

Takeshi Hayashi, Dai Fukamizu, Shuji Ueda and Sunao Inada

(Department of Animal production, Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center)

This study investigated the effect of increasing or decreasing the feed on superovulated cattle. Changes in the number of small follicles in the ovaries of cattle, reactivity of superovulation treatment, and normal fertilized embryo rates were examined. After feeding a low-nutritional diet for 2 weeks to Japanese Black cows for which normal estrus cycle was confirmed, they were switched to a high-nutritional diet simultaneously with CIDR insertion and maintained on a high-nutritional diet until uterus flushing (LH group). The control group was fed a standard nutrition diet for the same period as the LH group.

In the LH group, body weight did not decrease with low nutrition feeding, but increased at 1 week after switching to high-nutrition feed. The total cholesterol and BUN decreased during low nutrition and increased during high nutrition, but no significant difference was found for IGF-1. The number of follicles did not change while on a low-nutritional diet, but the number of small and medium follicles tended to increase after a high-nutritional diet. In contrast, there was no difference in the number of large follicles between the LH group and control group. In addition, there was no difference between the total number of embryos and the number of normal fertilized embryos.

In conclusion, short-term changes in feeding content resulted in altered blood components, and suggested an effect on increasing the small and middle follicles. However, there was no effect on the increase in the number of large follicles in response to superovulation treatment and the increase in normal fertilized embryos.

1. 目 的

畜産農家における牛群能力改良は人工授精による雄側からのものと、過剰排卵処置による体内受精胚の採取と移植による雌側からのものがある。なかでも、雌牛の過剰排卵処置は農家内の優良遺

伝子を効率よく活用でき、牛舎内の牛群改良速度を飛躍的に高めることができる。しかしながら過剰排卵処置は少なくない経費がかかるうえ、対象牛によって採取される胚数の安定性を欠くために品質の高い移植可能胚が少数しか取れない場合は、農家の負担が大きくなる。このことは過剰排

卵技術の幅広い普及を妨げる要因になっている。

過剰排卵処置における採胚成績の不安定要因として、投与されるホルモン製剤に対する卵巣内における卵胞の反応性の差があげられる。このことについて過剰排卵処置前の小卵胞数と処置後に反応した大卵胞数には正の相関があることが報告されている¹⁾。また、乳用種育成牛において低栄養状態から高栄養に切り替えることで、小中卵胞の増加が確認されている²⁾。これらの報告は牛の栄養状態をコントロールすることで、過剰排卵処置に反応可能な小卵胞数を増加させ、採胚成績を改善させる可能性を示唆している。

本試験では黒毛和種繁殖雌牛を用い栄養量を増減することで、低栄養状態にした後、高栄養状態に切り替えると同時に過剰排卵処置を行うことで採胚成績が改善可能か調査を行った。

2. 方 法

2.1 栄養コントロールと試験開始のタイミング

栄養コントロールと試験開始のタイミングについて、Fig. 1 に示した。試験開始前に試験牛の体重を測定し、必要養分量を計算したうえで、試験牛の基準栄養量 (TDN : 106 % , CP : 140 %) , 低栄養量 (TDN : 92 % , CP : 105 %) , 高栄養量

(TDN : 120 % , CP : 170 %) を算出した。栄養量を切り替える区を増減区 (LH区) とし、試験開始の1週間前から、基準栄養量の飼料を給与し、試験牛を適応させる期間を設けた。試験開始とともに増減区は2週間 (0 ~ 14日) 低栄養量を給与して試験開始2週間目からCIDRを挿入するとともに採胚による試験終了まで高栄養量の飼料を給与した (15 ~ 31日)。また、対照区は増減区と同期間、基準栄養量の飼料を給与した (Fig. 1)。

2.2 供試牛の頭数および体重測定・血液採取

供試牛は福岡県農林業総合試験場において飼養する黒毛和種雌牛 (経産牛) の8頭を用い、増減区と対照区を反復して試験を行った。過剰排卵処置後の卵巣回復のため、反復試験間は2か月以上の休止期間を設けて実施した。体重測定および血液分析用の採血は飼料給与から2時間後とし、試験開始から1週間ごとと採胚日に測定した (D 0 , D 7 , D 14 , D 21 , D 28 , D 31)。体重については個体差が大きいため、試験開始時を起点として体重の増減について調べた。

2.3 過剰排卵処置および採胚、採取胚の処理

過剰排卵処置方法についてFig. 1 に示した。過剰排卵処置は試験開始2週間目 (D 14) にCIDR (Zoetis) を挿入し、CIDR挿入後6日目 (D 20) からFSH (18AU) (共立製薬株式会社) を漸減投与した。CIDR挿入後8日目 (D 22) の朝に

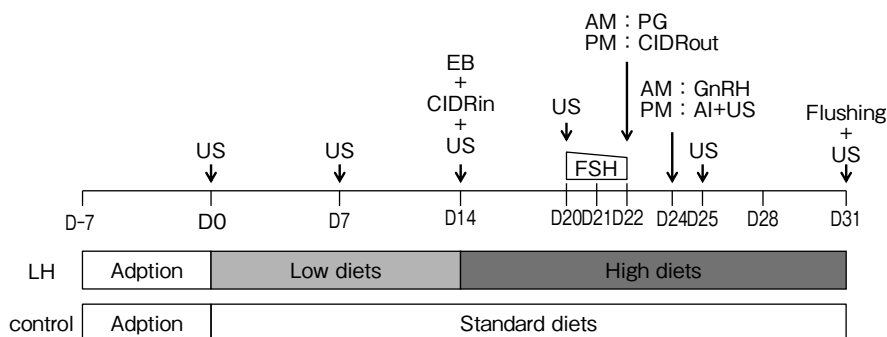


Fig. 1 Schematic illustration of the superovulation protocol and diets stage in embryo donors

PGF2 α (共立製薬株式会社) を 3 ml 筋肉注射し, 同日の夕方にCIDRを引き抜いた。CIDR挿入後10日目 (D24) の朝にGnRH (インターベット) 4 ml を投与し, 同日の夕方に人工授精 (AI) を行った。AIから7日目 (D31) の朝, バルーンカテーテルを用い, 非外科的に子宮を灌流し, 胚を回収した (Fig. 1)。

回収した胚は, 顕微鏡下でInternational Embryo Technology Society (IETS) のマニュアルに従って分類し, 採胚成績とした。凍結保存後移植可能胚をCode 1 胚としてプログラムフリーザーを用いて緩慢凍結した後, 胚移植に供し受胎率を求めた。

2.4 卵胞数の観察

卵胞の観察した時期についてFig. 1 に示した。卵巣の観察は超音波画像診断装置 (HS-101 V, 藤平工業株式会社, 東京) を用い, 卵胞の発育を調査した。試験開始の2週間前にPGF2 α (Zoetis) を 4 ml 投与し, 試験牛の発情周期を整

えたうえで観察を開始した。試験開始からCIDR挿入までの3週間は1週間ごとに観察し (D 0, D 7, D 14), CIDR挿入後はFSH投与前 (D 20), AI時 (D 24), 排卵確認 (AI翌日) (D 25), 採胚時 (D 31) に卵巣の卵胞を観察した (Fig. 1)。卵胞は小卵胞 (2 ~ 4 mm), 中卵胞 (5 ~ 7 mm), 大卵胞 (8 mm以上) に分類し, 記録した。

3. 結果および考察

3.1 体重および血中総コレステロール・BUN・IGF-1の変化

試験開始時を起点とし体重の変動を調べたところ, 低栄養量飼料給与時の2週間 (D 0 ~ D 14) では体重は変化せず, 高栄養量飼料給与を開始した1週間以降 (D 21 ~) に体重増加がみられ, 増減区は対照区に比べ28日目で増加傾向があり, 31日目では有意に体重の増加が確認された (Fig. 2 (A))。

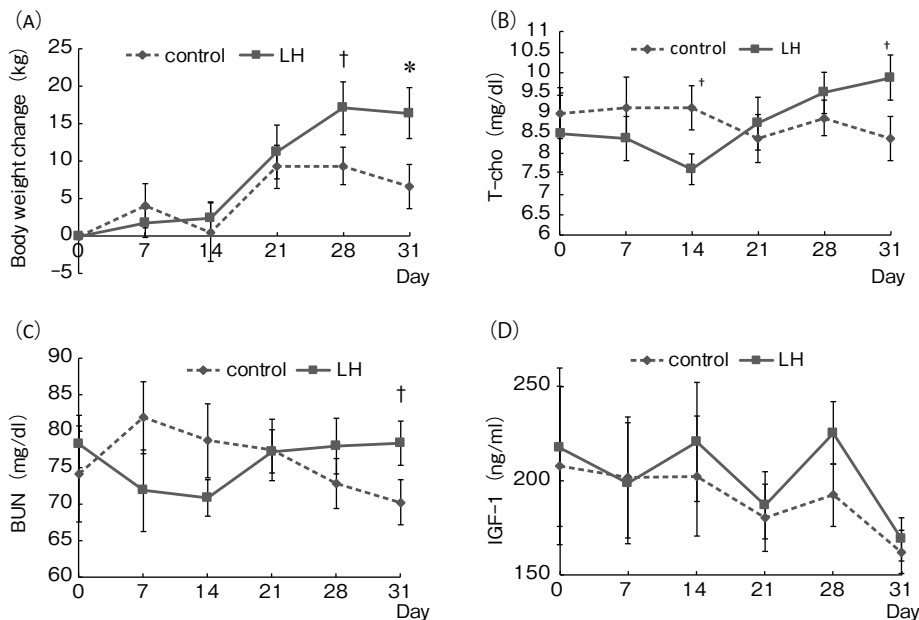


Fig. 2 Relationship between change in feed content and (A) Body weight change, (B) T-cho, (C) BUN, (D) IGF-1 (mean $\pm$ SEM)

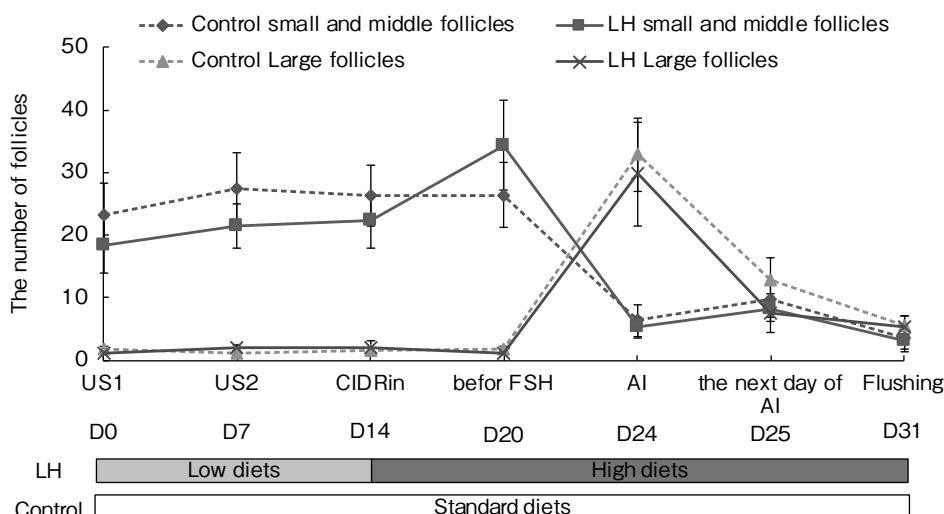


Fig. 3 Relationship between change in feed content and number of follicles (mean ± SEM)

増減区において、総コレステロール (T-cho) は低栄養期間に低下し、高栄養期間に移るとともに増加が確認され、試験開始後から31日目 (採胚時) では対照区と比較して高い傾向にあった (Fig. 2(B))。BUNもT-choと同様に、低栄養量期間に減少し、14日以降の高栄養期間への切り替えとともに増加した (Fig. 2(C))。IGF-1は個体差が大きいため、区間に有意差は得られなかったが、数値的には増減区が対照区に比べて高く推移した (Fig. 2(D))。これらのことについて、血中BUNでは、飼料給与量変更による短期間での血中BUNのコントロールの可能性が報告されている³⁾。さらに飼料給与量と血中IGF-1は正の相関があることが報告されており、本試験と同様の結果となった⁴⁾。

3.2 卵巣内の卵胞数の推移

卵巣内卵胞数の推移についてFig. 3に示した。試験開始後、低栄養量期間では卵胞数に大きな変動はみられなかった。その後高栄養量期間開始1週間目 (D20) に、統計的有意差はないものの増減区では小中卵胞の増加が起こった。一方で、AI時の大卵胞については増減区と対照区に大き

な差は見受けられなかった。これらのことについて、短期間の低栄養後は小中卵胞数の増加と生産される胚の品質を高めることや⁵⁾、低栄養から高栄養への移行により卵巣が賦活化し、小中卵胞の増加につながった報告があり²⁾、本試験と結果が一致する。また過剰排卵処置前の小卵胞数と過剰排卵処置に反応する大卵胞数に正の相関関係があるとする報告もあるが¹⁾、今回の試験では低栄養から高栄養状態に切り替えることに伴う小卵胞数の増加は過剰排卵処置後の大卵胞数の増加につながらなかった。Molloらは過度な乾物飼料給与は血中インスリンの増加を招き過剰排卵処置に対する反応性を低下させる可能性があることを報告している⁴⁾。本試験ではCIDR挿入からFSH投与まで6日間であり、TDN、CPの増加が急激であったため、過剰排卵処置に対する卵胞の反応性が低下したと考えられる。

3.3 採胚成績および受胎成績

採胚成績および胚移植後の受胎成績についてTable 1にまとめた。過剰排卵処置に対して反応した大卵胞数に差がなく、子宮灌流により得られた採取胚数、Code 1胚数、正常受精胚数に差が

Table 1 Embryo production of bovine that was fed LH or control diets and conception rate of collected embryos

	Total embryos	The number of codel embryos (%)	The number of normal embryos (%)	The number of unfertilized oocytes (%)	Conception rate (n)
LH	12.5 ± 4.0	6.4 ± 4.0 (51.0)	7.3 ± 3.0 (58.0)	3.4 ± 2.0 (27.2)	75% (3/4)
Control	19.4 ± 5.7	6.0 ± 5.7 (31.0)	6.8 ± 2.4 (34.8)	11.0 ± 4.0 (56.8)	66.7% (2/3)
P value	0.345	0.916	0.897	0.113	0.714

認められなかった。一方で、有意差はないものの未受精胚数は対照区が高く ($p = 0.11$)、これはAI後の排卵率が高かったためと考えられる。栄養状態と排卵の関係について、乳牛では低栄養状態から高栄養状態に切り替わることで、血中のIGF-1が増加し、排卵が促進されるという報告がある⁶⁾。本試験では排卵時のIGF-1測定を行わなかったが、排卵期に最も近い試験28日目では、有意差はないものの増減区のIGF-1が増加しており、高栄養状態が排卵を促進した可能性がある。採取した胚の受胎率については、例数が少なく、有意差は認められなかった。今後は移植数を増やし、受胎率について調査する必要がある。これらの結果から、短期間の飼料給与で血中成分の変化が認められ、小中卵胞増加への影響が示唆されたが、過剰排卵処置への反応性、採胚によって得られる正常受精胚の増加には伴わなかった。今後は飼料の給与期間の変更等、増加した小卵胞の過剰排卵処置による反応向上につながる方法を探索する必要性があると考えられる。

4. 要 約

本研究課題は過剰排卵処置対象牛に対する栄養状態の切替え（低栄養→高栄養）を行い、卵巣内の小卵胞数、過剰排卵処置の反応卵胞数や正常受精胚数への影響を調べたものである。正常な発情周期が確認された黒毛和種繁殖牛に2週間低栄養（TDN：92%，CP：105%）の飼料を給与した後、CIDR挿入と同時に高栄養（TDN：120%，CP：170%）の飼料給与に切り替え、採胚まで高栄養

飼料給与を維持した（増減区）。一方、対照区は標準的栄養（TDN：106%，CP：140%）の飼料給与を増減区と同様の期間給与した。増減区において低栄養給与時において体重は低下せず、高栄養飼料給与に切り替えたのち、1週間後に増加した。血中成分について総コレステロールやBUNは、低栄養時には低下し、高栄養時に増加したがIGF-1について有意な差はみられなかった。卵胞数の推移について、減量時には変化はなかったが、増量後に小中卵胞数が増加傾向にあった。一方で大卵胞数には増減区と対照区で差は認められなかった。また採胚によって得られた採胚総数と正常受精胚数に差はみられなかった。これらの結果から、短期間の飼料給与で血中成分の変化が認められ、小中卵胞増加への影響が示唆されたが、過剰排卵処置への反応性、採胚によって得られる正常受精胚の増加には伴わなかった。

文 献

- 1) 福田卓己, 大澤健司, 打座美智子, 鷹岡奈々恵, 遠藤保, 大井隆弘, 荒屋幸一, 下村紀夫, 広沢悠子, 居在家義昭: 家畜臨床誌, 31, 137~142, 2008.
- 2) 山之内忠幸, 吉岡一, 橋谷田豊, 今井敬: 日本繁殖生物学会, p-133, 2013.
- 3) 福島成紀, 木曾田繁, 滝本英二: 岡山農総セ畜研報 6, 55~59, 2016.
- 4) Mollo, M. R., Monteiro, P. L. J. Jr., Surjus, R. S., Martins, A. C., Ramos, A. F., Mourão, G. B., Carrijo, L. H. D., Lopes, G. Jr., Rumpf, R., Wiltbank, M. C., Sartori, R.: *Theriogenology*, 92, 30~35, 2017.
- 5) Nolan, R., O'Callaghan, D., Duby, R. T., Lonergan, P., Boland, M. P.: *Theriogenology*, 50, 1263~74, 1998.
- 6) Kawashima, C., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Sasamoto, Y., Takahashi, Y., Matsui, M., Miyamoto, A.: *J Reprod Dev*, 53, 113~20, 2007.

卵巣の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明（Ⅱ） —肝臓の鉄放出能低下と繁殖障害の関係—

Elucidation of reproductive disorders in swine caused by iron deficiency
in ovary (Ⅱ) —Relationship between reduction of iron releasing
capacity of liver and reproductive disorder—

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 investigated that transferrin (TF)-Fe³⁺ specifically accumulates in follicular fluid during follicular development and promotes oocyte maturation in pigs. Since TF-Fe³⁺ is a liver-derived factor, we hypothesized that follicular development-specific tissue-to-tissue communication between liver and ovary existed. Firstly, we investigated the time dependent changes of iron-releasing factor (TF, FPN, HPD) in the liver before or after administration of PMSG and hCG in mice. The results showed that the expression of FPN and TF that acts on iron release and transport, respectively, were increased by PMSG stimulation, and the HPD that inhibits iron release decreased after PMSG stimulation. *Tf* and *Fpn* mRNA expression also increased during follicular development in pigs. *Tf* and *Fpn* mRNA expression also increased by E2-dependent manner in liver in mice and pigs. Furthermore, *Tf* mRNA expression in liver with hepatitis is lower than that in normal liver. Competence of oocyte maturation derived from hepatitis is significantly lower than that derived from normal. Thus, the results suggested that hepatitis induces a decrease of *Tf* mRNA expression in the liver, which is one of the causes of low quality of oocyte condition in pigs.

1. 目 的

家畜の生産性向上のために繁殖形質の改善が必須であり、これまで後代検定やDNA育種により改良がすすめられてきた。しかし、遺伝的には繁殖能力が高い種畜においても育種環境により繁殖成績が異なるのが現状である。したがって、後天的（特に栄養状態や加齢など）な繁殖障害の原因を解明する技術の開発が求められている。申請者はH29年度の伊藤記念財団研究助成により豚の繁殖

障害について研究を行い、以下の成果を得た。

- ・ 8 mm以上の卵胞において、鉄 (Fe³⁺) の担体タンパク質であるトランスフェリン (TF) が蓄積する。
- ・ TF-Fe³⁺は卵胞発育期特異的に卵成熟を著しく促進するが、排卵期に存在すると卵成熟が阻害される。
- ・ 繁殖能力低下は卵胞発育期における卵巣の鉄不足が原因の一つである。

以上から、メス豚の繁殖には卵胞発育（発情）期に卵巣に鉄がTF依存的に十分量存在することが重要であることが明らかになった。さらに、申請者はマウスを用いて卵巣の*Tf* mRNA発現と血中のTF量を測定し比較解析した結果、卵巣において*Tf* mRNAの発現はまったく増加していないが、血中のTF量は著しく増加すること、この増加は卵胞発育刺激（FSH/PMSG）を投与した場合に限定され、その後排卵刺激（LH/hCG）により急激に低下することを明らかにした。体内においてTFの産生は肝臓に依存することから、卵巣のFSH刺激により応じて肝臓がTF-Fe³⁺の供給を促すというこれまでまったく報告されていない組織間コミュニケーションの存在が示唆された。

本研究では、H29年度の助成成果をヒントにして考えられた繁殖障害の原因が卵巣と肝臓との組織間コミュニケーションの破綻にあると仮説を立て研究を進めた。なぜ卵胞発育期特異的にTF-Fe³⁺が卵巣に運搬されるのかを、肝臓の鉄供給システムに注目し、これらの因子が卵巣により時期特異的な調節を受けることを個体レベルおよび細胞レベルで詳細に解析を行った。肝臓からの鉄供給は鉄の運搬に働くTF¹⁾、肝細胞からの鉄の輸送路となるFerropotin（FPN）により促進される²⁾こと、鉄の供給遮断はFPNに特異的に結合するHepcidin（HPD）により促進される³⁾ことが明らかになっている。そこで実験1では、卵胞発育を誘導するFSHと同作用のPMSGを投与し、その後48時間後に排卵を誘導するLHと同作用のhCGを投与し、肝臓におけるTF、FPN、HPDの経時的発現変化を調べた。また発育期と排卵期の卵胞を有する豚の肝臓を採取し、*Tf*、*Fpn*、*Hpd* mRNAの発現変化を調べた。実験2では、肝臓の*Tf*、*Fpn*、*Hpd* mRNA発現が卵胞発育に応じて変化していたことから、卵胞発育期に卵巣で合成されるエストロゲン（E2）が肝臓の*Tf*、

Fpn、*Hpd* mRNA発現に及ぼす影響を調べた。実験3では、肝臓疾患と繁殖性を調べるために、正常個体および肝炎を罹患した豚の卵巣を採取し、卵巣内の卵丘細胞卵複合体（COC）を体外培養し、退行率、卵成熟率により卵巣機能に及ぼす影響を調べた。また肝炎を罹患した豚と正常個体の肝臓における鉄の放出に関わる*Tf*、*Fpn*、*Hpd* mRNA発現を調べた。

2. 方 法

2.1 実験1：卵胞発育期、排卵期における肝臓の鉄放出因子の経時的発現変化

実験1では、まず性周期が人為的に調節可能なマウスを用いてまず研究を行った。3週齢のC57BL6メスマウスに卵胞発育を誘導するFSHと同作用のPMSGを投与し、その後排卵を誘導するLHと同作用のhCGを投与した。各処理時間においてマウスをと殺し、肝臓を採取した。肝臓からTotal RNAおよびタンパク質を抽出し、qRT-PCRにより*Tf*、*Fpn*および*Hpd* mRNAの経時的発現変化を、Western blottingによりTF、FPNおよびHPDのタンパク質発現変化を調べた。また、一部の肝臓はパラフィン包埋後、免疫組織化学染色によりTF、FPNおよびHPDの局在変化を調べた。さらに、食肉市場由来の豚から肝臓、卵巣を採取し、1-3 mm、4-7 mm、8 mm以上の卵胞を有する、あるいは黄体を有する卵巣に分類し、この時期における肝臓の*Tf*、*Fpn*および*Hpd* mRNA発現を調べた。

2.2 実験2：肝臓の鉄放出因子の発現制御機構

3週齢のC57BL6メスマウスにE2非投与（Non-stimulated：NS区）、E2投与（E2区）、E2とE2受容体阻害剤（ICI）（E2 + ICI区）を投与し、肝臓における*Tf*、*Fpn*および*Hpd* mRNA発現をqRT-PCR法により調べた。また肝

臓のTF濃度をELISA法で調べた。さらに、食肉市場由来の肝臓をDMEMを用いてE 2 無添加(NS) 区およびE 2 添加区で24時間培養し、鉄放出因子の*Tf*、*Fpn*および*Hpd*のmRNA発現を調べた。

2.3 実験3：肝臓疾患が肝臓の鉄放出因子の発現と卵巣の鉄受容因子の発現および卵成熟に及ぼす影響

肝臓疾患が卵巣機能に及ぼす影響を調べる目的で、食肉市場において正常、肝炎と診断された肝臓および卵巣を採取した。正常および肝炎の卵巣から顆粒膜細胞を採取し、顆粒膜細胞におけるエストロゲン合成遺伝子(*Cyp19a1*)のmRNA発現を調べた。また、正常および肝炎の卵巣から卵丘細胞卵複合体(COC)を採取し、FSH (1 μ g/ml) およびAmphiregulin (100ng/ml) を添加したNCSU37培地で48時間成熟培養し、卵成熟率(第二減数分裂中期率：MII率)を調べ、肝疾患が卵巣機能に及ぼす影響を調べた。さらに、これらの個体から採取した肝臓における鉄の放出因子(*Tf*、*Fpn*および*Hpd*)のmRNA発現を調べた。

3. 結果と考察

3.1 実験1：卵胞発育期、排卵期における肝臓の鉄放出因子の経時的発現変化

PMSG投与前(Non-stimulated; NS)のマウスの卵巣における*Tf* mRNA発現は低い値を示したが、PMSG投与直後に有意に増加した後に低下し、hCG投与後に再び高い値を示した(Fig. 1A)。*Fpn* mRNA発現は、PMSG投与前まで低い値を示し、PMSG投与後に発現が増加したが、その後hCGを投与するとPMSG投与前と同程度まで発現量が低下した(Fig. 1B)。一方、肝臓における*Hpd* mRNA発現は、PMSG投与前で高い値を示し、PMSGを投与することで低下したが、hCGの投与により増加した(Fig. 1C)。TFのタンパ

ク質発現は、PMSG投与前においても発現が認められるが、PMSGの投与により強いバンドが出現し、hCGの投与により減少した。FPNタンパク質は、PMSG投与前およびPMSG投与後6時間まではバンドはほとんど認められなかったが、12時間において発現が認められ、24時間で強いバンドが認められ、その後バンド強度は低下し、hCGの投与により完全にバンドは消失した。HPDタンパ

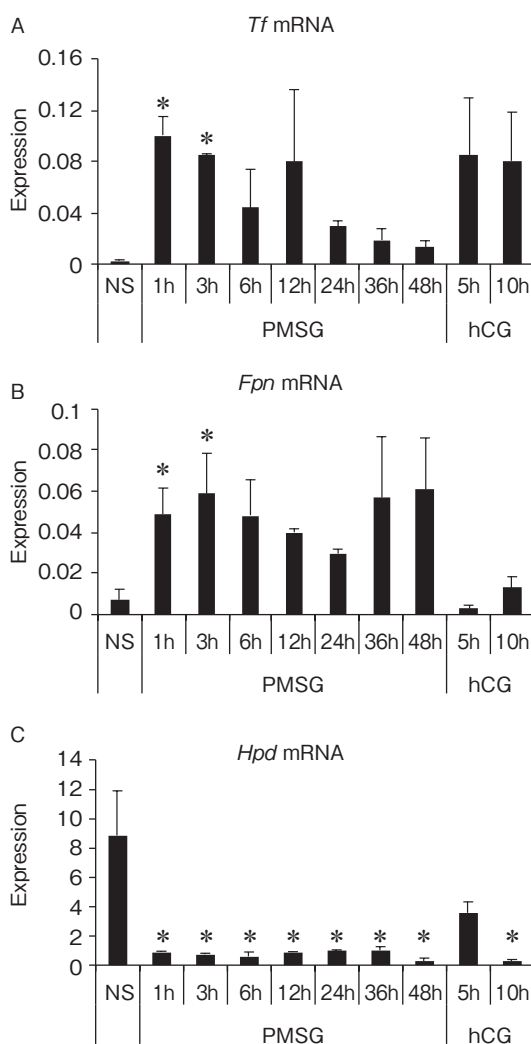


Fig. 1 PMSG投与前、PMSG投与後およびそれに続くhCG投与後のマウス肝臓における*Tf* (A)、*Fpn* (B)、および*Hpd* (C) mRNAの経時的発現変化

NS：刺激あり

*：NSに対して有意差あり ($p < 0.05$)

ク質は、PMSG投与前において強いバンドが出現したが、PMSGの投与により減少し、hCG投与5時間後に再びこの強いバンドが検出された (Fig. 2A)。TFの局在はPMSG投与後の肝臓の細胞質に認められた。FPNは、PMSG投与後に細胞膜に局在が認められ、その後hCG投与後まで細胞膜に認められた。HPDの局在は、PMSG投与前およびhCG投与後の細胞質に認められたが、PMSG投与後においては、染色像は低下していた (Fig. 2B)。

豚の肝臓における *Tf* mRNA発現は、1-3 mmの卵胞直径では低い値を示したが、4-7 mm、有意に増加し、8 mm以上まで高い値を示した。

しかし黄体においては1-3 mmのレベルにまで発現量が低下した (Fig. 3A)。 *Fpn* mRNA発現は、1-3 mmに比べ、4-7 mmで増加し、8 mm以上で1-3 mmと比較し有意に高い値を示した。この高い値は黄体においても維持していた (Fig. 3B)。また *Hpd* mRNA発現は、1-3 mm、4-7 mm、8 mm以上では低い値を示したが、黄体において有意に高い値を示した (Fig. 3C)。

以上のマウスおよび豚を用いた結果から、肝臓における鉄放出は、性周期に同調し、卵胞発育期に活性化されることが明らかになった。一方、排卵期および黄体期においては、卵巣は鉄を必要としないため肝臓におけるHPDの発現を増加させ

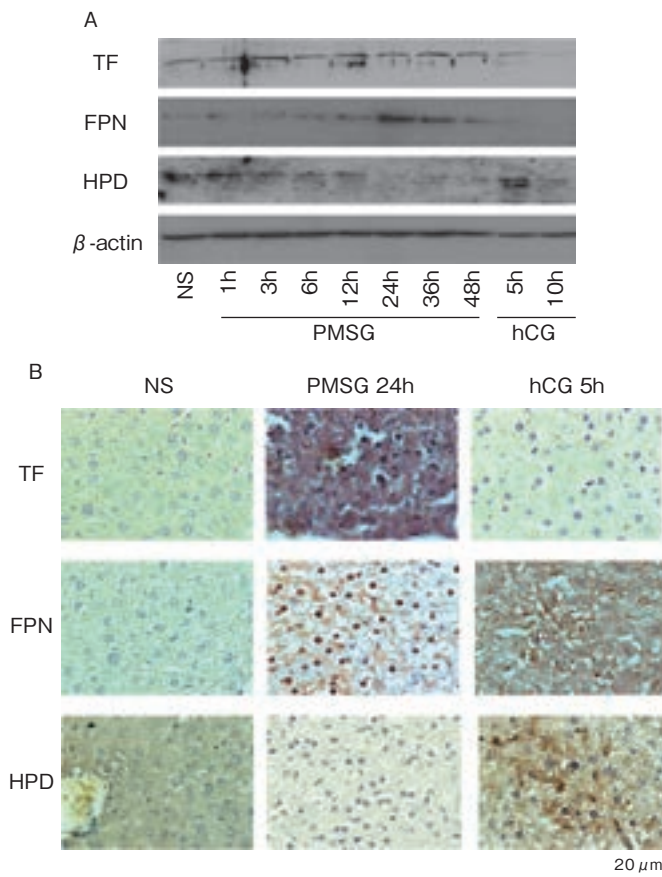


Fig. 2 PMSG投与前、PMSG投与後およびそれに続くhCG投与後のマウス肝臓におけるTF, FPN, HPDのタンパク質発現 (A) と局在変化 (B)
NS: 刺激なし

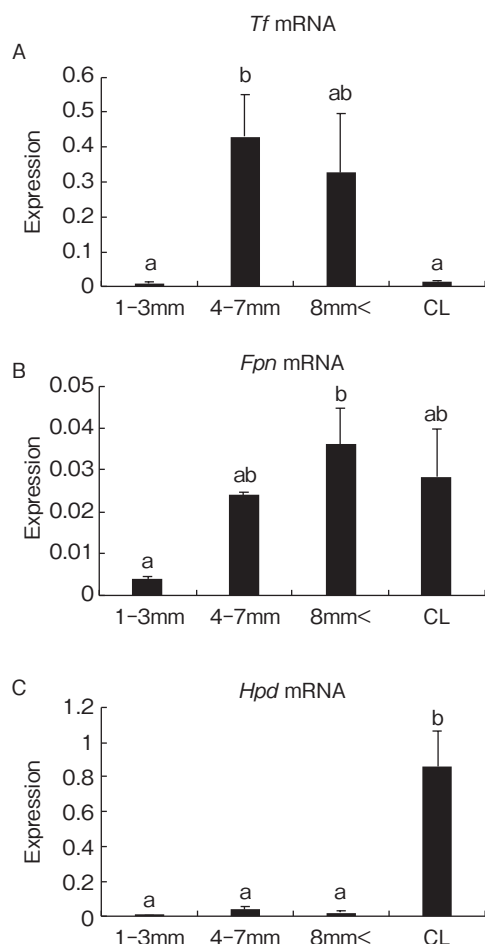


Fig. 3 1-3 mm, 4-7 mm, 8 mm以上の卵胞, および黄体を有する卵巣を持つ豚における肝臓の *Tf* (A), *Fpn* (B), および *Hpd* (C) mRNAの発現
CL: 黄体
a-b: 異符号間に有意差あり ($p < 0.05$)

ることで肝臓からの鉄放出を阻害していると考えられた。

3.2 実験2: 肝臓の鉄放出因子の発現制御機構

実験1において, 卵胞発育期において, 肝臓の鉄放出に関わる因子であるTF, FPNが発現上昇したことから, この時期の卵巣で合成されるE2が肝臓に作用し, これらの因子の発現を増加させると考えられた。このことから, 実験2ではマウスおよび豚を用いてE2が肝臓の鉄放出因子の発

現に及ぼす影響を調べた。その結果, E2非投与のマウス肝臓における*Tf* mRNA発現は低い値を示したが, E2の投与により有意に増加し, この値はE2とともにICIを投与すると有意に減少した (Fig. 4A)。また*Fpn*の発現もE2非投与に比べE2投与区で増加し, E2 + ICI区で低下した (Fig. 4B)。 *Hpd* mRNA発現はE2 + ICI区で, NS区およびE2区よりも高い傾向を示した (Fig. 4C)。肝臓のTF濃度は, NS区に比べE2投与で有意に増加し, E2 + ICI区でE2区に比べ低い傾向を示した (Fig. 4D)。

豚の肝臓においても*Tf* mRNAは培養前の0 hおよびE2無添加区で低い値を示したが, これらに対してE2添加区で有意に高い値を示した (Fig. 5A)。 *Fpn*および*Hpd* mRNA発現にはE2による影響は認められず, すべての処理区で同程度の値を示した (Fig. 5B, C)。

以上の結果から, マウスおよび豚において卵胞発育期に卵巣で合成されるE2が肝臓を刺激し, 鉄放出に関わるTFの発現を亢進するという新たな組織間コミュニケーションが存在することが明らかになった。

3.3 実験3: 肝臓疾患が肝臓の鉄放出因子の発現と卵巣の鉄受容因子の発現および卵成熟に及ぼす影響

顆粒膜細胞におけるエストロゲン合成遺伝子 (*Cyp19a1*) のmRNA発現は, 正常個体に比べ肝臓疾患個体で有意に低い発現を示した (Fig. 6A)。肝炎を罹患した個体の卵成熟率 (MII率) は, 正常個体よりも有意に低い値を示した (Fig. 6B)。一方卵子が正常に減数分裂を誘導していないGV期の割合は, 肝臓疾患個体の方が正常個体に比べ有意に高い値を示した (Fig. 6C)。これらの結果から, 肝臓疾患個体では低エストロゲンにより卵胞発育が抑制されその結果, 卵子の質が低下しているものと考えられた。

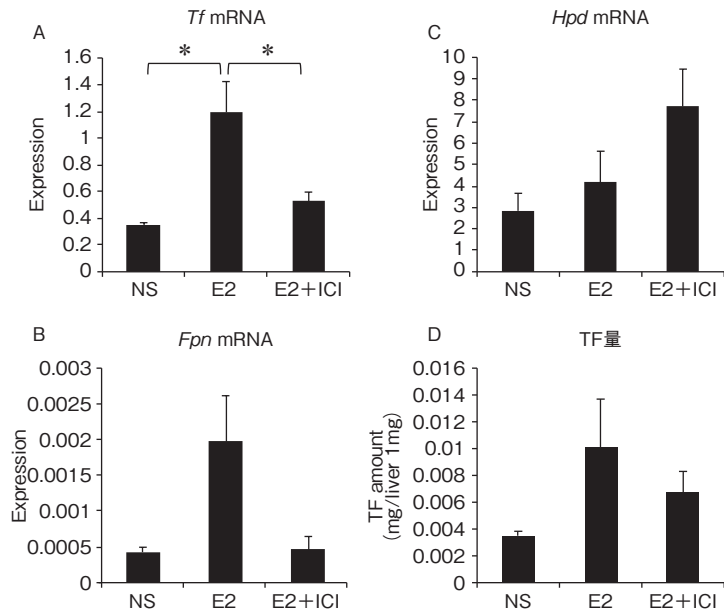


Fig. 4 E2非投与、E2投与、E2とICIの同時投与時のマウス肝臓の*Tf* (A), *Fpn* (B), *Hpd* (C) mRNA発現および肝臓のTF量

NS: E2非投与

*: 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

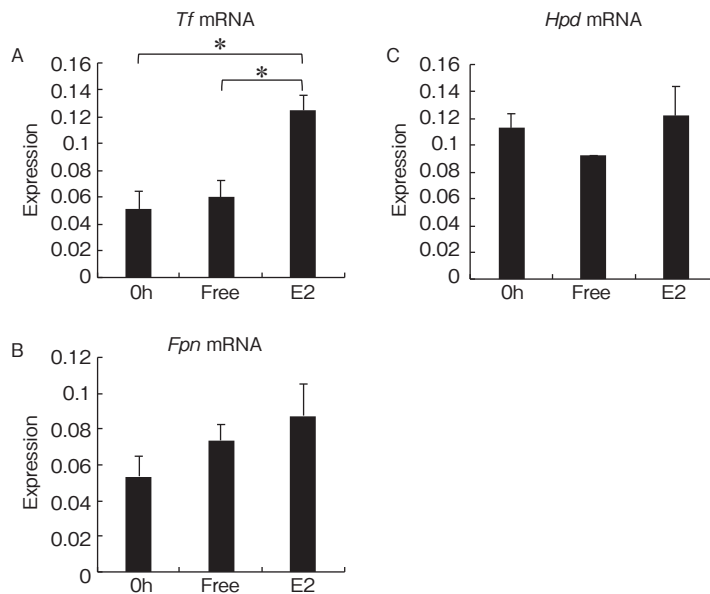


Fig. 5 豚肝臓をE2添加培地で培養したときの*Tf*, *Fpn*, *Hpd* mRNAの発現

0h: 培養前

Free: E2無添加培地で24時間培養

E2: E2添加培地で24時間培養

*: 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

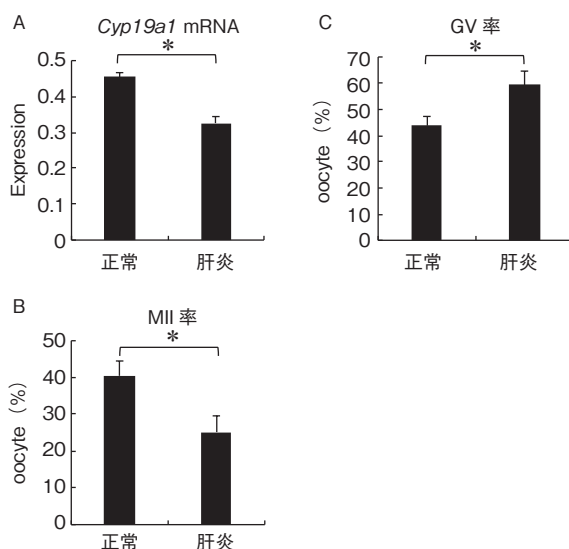


Fig. 6 正常肝臓および肝炎を罹患した豚卵巣の顆粒膜細胞における *Cyp19a1* mRNA発現 (A), 卵子のMII率 (B), GV率 (C)
*: 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

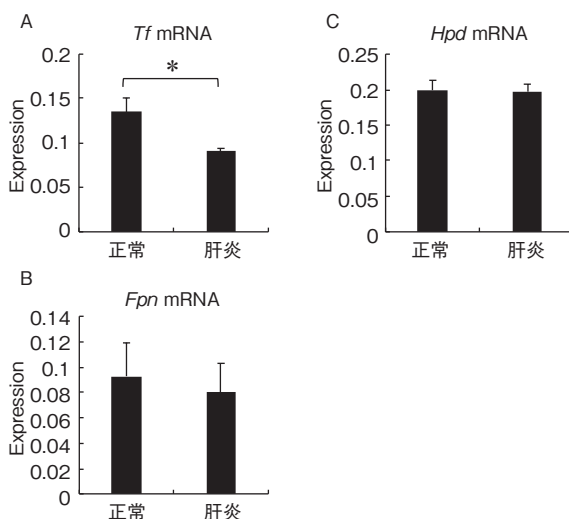


Fig. 7 正常肝臓および肝炎を罹患した豚肝臓の *Tf* (A), *Fpn* (B), *Hpd* (C) mRNA発現
*: 処理区間に有意差あり ($p < 0.05$)

肝臓疾患個体における低卵巣コンディションの原因を追求するために、正常個体と肝炎個体における肝臓の鉄放出因子との関係を調べた。肝炎を罹患した個体では肝臓における *Tf* mRNA の発現は正常個体に比べ有意に低い値を示した (Fig.

7A)。 *Fpn* および *Hpd* mRNA 発現も有意差は認められないが、肝臓疾患個体で低い傾向を示した (Fig. 7B, C)。

以上の結果から、肝臓疾患個体では鉄の輸送に働くTFの発現量が低下することが明らかになっ

た。さらに、肝臓疾患個体におけるTF発現量低下が一因となり卵胞環境のコンディションが低下し、低E2分泌能に伴って卵胞発育が抑制され、卵子の質が低下すると考えられた。

4. 要 約

我々は、H29年度伊藤記念財団研究助成により、トランスフェリン (TF)-Fe³⁺が卵胞発育期の卵胞液に特異的に蓄積し、豚の卵成熟を促進することを明らかにした。この卵成熟を誘導するTF-Fe³⁺は肝臓由来因子であることから、卵胞発育期特異的な肝臓と卵巣の組織間コミュニケーションが存在すると仮説を立て、以下の研究を行った。まず、人為的に性周期を調節できるマウスを用いて卵胞発育刺激 (PMSG) 投与後、その後の排卵刺激 (hCG) 投与後の肝臓における鉄放出因子 (TF, FPN, HPD) の経時的発現を調べた結果、鉄の放出運搬に働くTF, FPNの発現はPMSG刺激により増加し、鉄の放出を阻害するHPDはPMSG刺激前に高く、PMSG刺激後には低下した。また豚においても卵胞発育期に*Tf*, *Fpn* mRNA発現が高い値を示した。さらに、マウスおよび豚において、E2依存的に肝臓の*Tf*, *Fpn*

mRNA発現が増加したことから、卵胞発育期に卵胞内で合成されるE2が肝臓の鉄放出を促進する新たな組織間コミュニケーションが存在することが明らかになった。さらに豚で頻発する肝炎を罹患した肝臓における*Tf* mRNA発現は正常個体よりも低く、このとき肝炎を罹患した個体の卵巣の卵成熟率が著しく低かったことから、肝臓疾患個体では鉄の輸送に働くTFの発現低下が卵巣の卵子のコンディション不良の一員である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Lawrence, C. M. : Crystal Structure of the Ectodomain of Human Transferrin Receptor, *Science*, 286(5440), 779~782, 1999.
- 2) McKie, A. T., Marciani, P., Rolfs, A., Brennan, K., Wehr, K., Barrow, D., Miret, S., Bomford, A., Peters, T. J., Farzaneh, F., Hediger, M. A., Hentze, M. W., Simpson, R. J. : A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation, *Mol Cell*, 5(2), 299~309, 2000.
- 3) Nicolas, G., Bennoun, M., Devaux, I., Beaumont, C., Grandchamp, B., Kahn, A., Vaulont, S. : Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(15), 8780~5, 2001.

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（Ⅱ）

Prediction and control of subacute ruminal acidosis in periparturient dairy
cows（Ⅱ）

佐藤 繁・木崎 景一郎

（岩手大学農学部共同獣医学科）

Shigeru Sato and Kei-ichiro Kizaki

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

The objectives of this project are to clarify the pathogenesis of subacute ruminal acidosis (SARA) in dairy cows using radio transmission pH measurement system, and further, to assess the prediction and control of post-partum SARA at the pre-partum stage. Twenty dry period and multiparous Holstein cows (A herd, $n=10$; B herd, $n=6$; 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, 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, 2 and 6 weeks post-partum, and transcriptomic dynamics were evaluated using microarray method.

As a result, the ruminal pH depressed dramatically at the post-partum, and tended to be lower until 6 weeks post-partum in the SARA cows (diagnosed when pH remained under 5.6 for hr/day) compared with the healthy cows. In addition, the greater differences between the maximum and minimum values within diurnal changes (diurnal deviation) in the ruminal pH were identified in the SARA cows compared with the healthy cows. In the microarray data analysis, PCA plots showed that mRNA expression profiles of the liver tissue had changed during the pre- and post-partum, whereas they were entirely separated between the two groups regardless of parturition stage.

From these findings, an analysis of liver tissue transcriptomic alterations with use of wireless pH sensor revealed the relationship between the occurrence and pathophysiology of SARA during peripartum periods, and it can be possible to predict the post-partum occurrence of SARA at the pre-partum stage in dairy cows.

1. 目 的

乳牛の泌乳量は栄養管理や育種改良の進展によって飛躍的に増加してきた。一方で泌乳量を維

持・向上させるために濃厚飼料が多給され、その結果、潜在性第一胃アシドーシス（SARA）が増加している。SARAは粗飼料の不足と濃厚飼料など易発酵性飼料の多給により、揮発性脂肪酸

(VFA) の産生量と吸収量のバランスが崩れて第一胃液pHが低下し、グラム陰性菌が死滅して細胞壁からのリポポリサッカライド (LPS) 遊離が亢進する病態である¹⁾。分娩後の濃厚飼料多給に伴って発生するSARAは、代謝病 (生産病) や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の発症リスクと病態を明らかにし、さらには分娩前の段階で分娩後SARAの発症予知と制御を目指すことである。これによって、乳牛の周産期に発生する種々の生産病を予防し、乳牛の健康を維持して食品としての牛乳と食肉の安全確保に貢献することが最終的な目標である。

具体的には、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、SARAによるLPSの産生と体内移行が生体反応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第一胃内細菌叢の不安定化を予防し、正常な第一胃発酵機能を維持するため、栄養管理の改善や生菌・酵母製剤の投与による分娩後SARAの制御効果を明らかにする。

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、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した。そのため、平成29年度に実施した10頭に加え、今年度さらに7頭を追加し、計17頭を対象として「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」に取り組んだ。

2.1 供試牛群および供試牛

野外実態と病態解明に関する調査は、前年度と同様、移行期の給与飼料内容や飼養管理状況が明らかな3牛群において、乾乳期の経産牛17頭 (A牛群・7頭、B牛群・6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と分娩後の泌乳量を調査した。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14 G × 115mm 22mmタイプ、タスク (株)、栃木) により分娩前3週と分娩後2週と6週の計3回採取した。



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.

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

一部のサンプルにおいて、LPS活性値はLAL (Limulus amoebocyte 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、Gene Spring GX12.0 (Agilent Technologies, USA) を用いて統計解析した。

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17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、第一胃液pHは分娩日以降に著しく低下して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。なお、3牛群間で第一胃液pHに差異はみられなかった。分娩後2週までの間にSARAを発症したSARA群 (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, $n = 9$) の第一胃液pHは、SARAを発症しなかった非SARA群 ($n = 8$) に比べて、分娩日から分娩後6週までの間、低値で推移し (Fig. 2), 1日あたりpH<5.6の時間はSARA群で非SARA群に比べて有意な高値を示した (Fig. 3)。また、SARA群では非SARA群に比べて、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)}、あるいはSARA予防を目的として種々の菌体製剤や酵母製剤の効果を検討した申請者らの報告^{6~9)}はあるが、分娩前の第一胃液pHおよび第一胃液発酵産物の変動により、分娩後SARAの摘発を目指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の連続的变化との関係を検討した研究はみられない。今回、SARA群の第一胃液pHは、分娩前に非SARA群と差異がみられなかったが、分娩後には6週目まで長期間にわたって低値を示した。このことから、今後詳細な解析が必要であるが、分娩前後の乳牛における第一胃液pHの変動は、給与飼料な

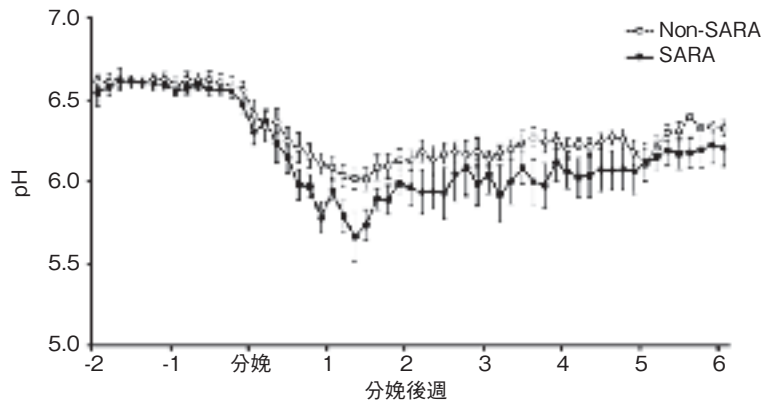


Fig. 2 Changes in the 24-h mean ruminal pH in the Non-SARA group (n=8) and SARA group (n=9) during the peripartum periods.

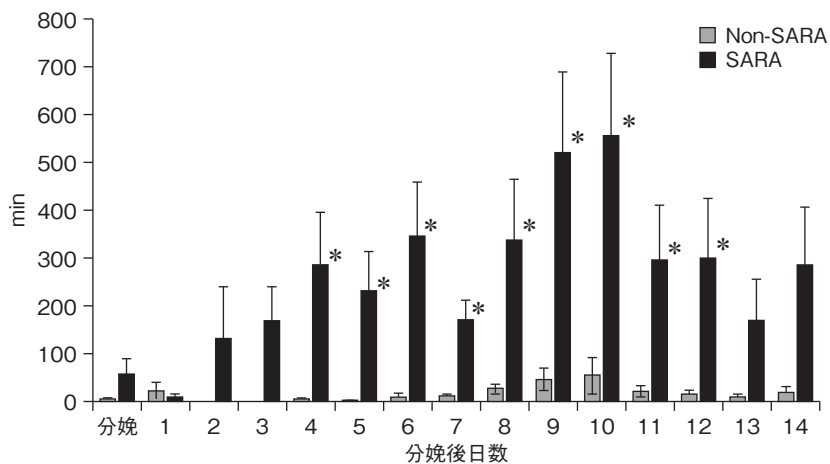


Fig. 3 Changes in the duration of time where pH<5.6 in the Non-SARA group (n=8) and SARA group (n=9) during the peripartum periods.

どの飼養管理状況とこれに対応した第一胃発酵ばかりでなく、濃厚飼料に対する各牛に特有な第一胃発酵の順応性（適応性）とも関連のあることが示唆された。なお、本課題において、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回サンプリングし、いずれもVFA、アンモニア態窒素および乳酸の解析を終了した。LPS活性値のデータを追加し、すべての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

肝組織は生検により分娩前3週、分娩後2週と6週の3回サンプリングを終了し、マイクロアレイ法による網羅的遺伝子解析も終了してデータの解析中である。これまでのPCA解析の結果によると、SARA群（n=6）と非SARA群（n=5）とも分娩前3週、分娩後2週と6週の遺伝子発現は、きわめて類似した変動を示す傾向が認められた。しかし、SARA群と非SARA群では分娩前か

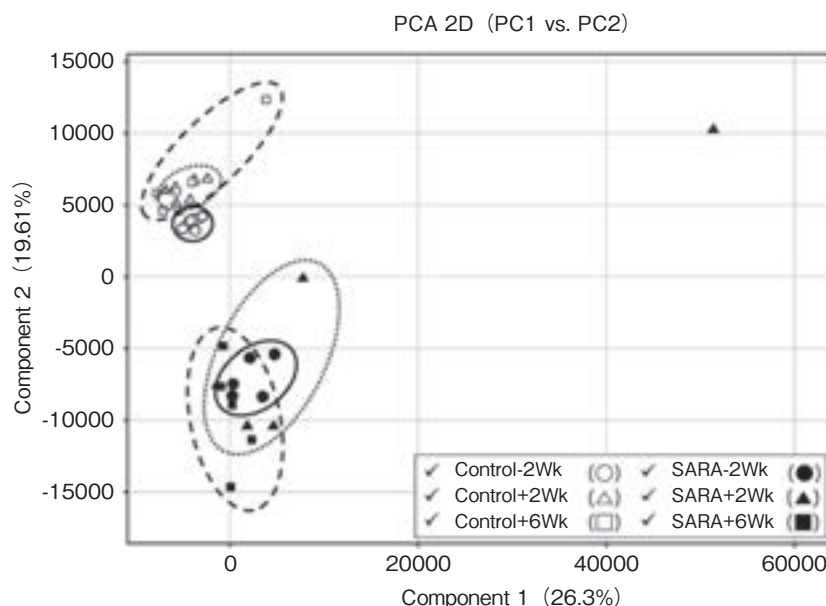


Fig. 4 Principal component analysis plots generated from the microarray data in the Non-SARA group ($n=5$) and SARA group ($n=6$) during the peripartum periods. Open and closed represent the Non-SARA and SARA cows, respectively. Circle (circled by solid line), triangle (circled by dashed line), and rectangle (circled by dotted line) represent 3 weeks pre-partum and 2 and 6 weeks post-partum, respectively.

ら遺伝子発現がまったく異なることが明らかとなった (Fig. 4)。今後、リアルタイムPCR法による特定遺伝子の発現解析を行い、これら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関して分娩前後におけるSARA群と対照群の比較を行い、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、分娩前の発症予知に応用可能な候補遺伝子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¹⁰⁾やSARA牛の第一胃粘膜における遺伝子発現に関する報告^{11, 12)}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考えている。一方、すでに申請者らは、SARA牛では健康牛に比べて、第一胃の細菌叢構成が大きく異なることを明らかにしている^{13, 14)}。したがって、今回検索したSARA群における第一胃細菌叢構成についても、追加検討する必要がある。

4. 要 約

乳牛の分娩後に多発するSARAの発症リスクを明らかにし、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試験を行った。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17頭 (A牛群・7頭, B牛群・6頭, C牛群・4頭) を対象とし、移行期の飼養管理状況、分娩後の泌乳量を調査した。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、アンモニア態窒素および

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、SARA群の第一胃液pHは分娩後に著しく低下し、分娩後6週までの間、非SARA群に比べて低値で推移する傾向が認められた。また、SARA群の分娩前後における第一胃液pHの日内較差は、非SARA群に比べて大きい傾向が認められた。さらに、マイクロアレイ法のデータのPCA解析により、SARA群と非SARA群では分娩前から肝組織中の遺伝子発現がまったく異なることが明らかとなった。

以上のように、周産期乳牛の肝組織における遺伝子発現解析によって、SARAの発症や病態と関連のある遺伝子群が明らかになるとともに、分娩前において分娩後SARAの発症予知ができる可能性のあることが示唆された。

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) Maeda, Y., Nishimura, K., Kurosu, K., Mizuguchi, H., Sato, S., Terada, F., Kushibiki, S. : *Anim Sci J* (In press), 2018.
- 8) Nishimura, K., Kurosu, K., Terada, F., Mizuguchi, H., Sato, S., Kushibiki, S. : *Anim Sci J*, doi : 10.1111/asj.13131, 2018.
- 9) Watanabe, Y., Yo-Han, Kim, Kushibiki, S., Ikuta, K., Ichijo, T., Sato, S. : *J Dairy Sci*, (in Press), 2019.
- 10) Chang, G., Zhuang, S., Seyfert, H-M., Zhang, K., Xu, T., Jin, D., Guo, J., Shen, X. : *Oncotarget*, **6**, 38578~38590, 2017.
- 11) Yo-Han, Kim, Nagata, R., Ohtani, N., Ichijo, T., Ikuta, K., Sato, S. : *Front Microbiol*, doi : 10.3389/fmicb.2016.01575, 2016.
- 12) Yo-Han, Kim, Touji, N., Kizaki, K., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *Physiol Genomics*, doi : 10.1152/physiolgenomics.00086.2016, 2016.
- 13) Nakamura S-I., Yo-Han Kim, Takashima K., Kimura A., Nagai, K., Ichijo, T., Sato, S. : *J Amin Sci*, doi : 10.2527/jas2017-1431, 2017.
- 14) Yo-Han, Kim, Nagata, R., Ohkubo, A., Ohtani, N., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S. : *BMC Vet Res*, **14** : 310, doi.org/10.1186/s12917-018-1637-3, 2018.

食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の開発・評価

Development and evaluation for determination of number of antimicrobial-resistant bacteria in meats

石 原 加奈子・野 村 静 香

(東京農工大学農学部)

Kanako Ishihara and Shizuka Nomura

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

In order to estimate the number of coliform bacteria harbored antimicrobial resistance genes in chicken meats, combined method of most probable number method (MPN) and PCR (MPN-PCR) were applied. Coliform bacteria were also isolated from the same chicken meats and were tested by antimicrobial susceptibilities test. The results of MPN-PCR and antimicrobial susceptibilities of isolates were compared.

The number of bacteria harbored following antimicrobial resistance genes could be estimated for 120 chicken meat samples : *tetA* (average of positive samples, $10^{3.07}$ MPN/100 g), *tetB* ($10^{3.59}$), *bla*_{TEM} ($10^{3.07}$), *bla*_{CTX-M} ($10^{2.80}$) and *bla*_{CMY-2} ($10^{2.87}$). For samples from that ampicillin- (65/120, 54.2%) and tetracycline-resistant coliform bacteria (18/120, 15%) were isolated, the percentage of detected antimicrobial resistance genes were high [*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and/or *bla*_{CMY-2}, 81.5% (53/65) ; *tetA* and/or *tetB*, 100% (18/18)]. These results demonstrated that MPN-PCR is useful to estimate the number of ampicillin- and tetracycline-resistant coliform bacteria. On the other hand, for the samples from that cefazolin-, cefpodoxime, amoxicillin/clavulanic acid- and cefpodoxime/clavulanic acid-resistant coliform bacteria were isolated, the percentages of detection for *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} and/or *bla*_{CMY-2} were low. Tested major coliform bacteria isolates inherently produced β -lactamase and these isolates would harbor different resistance genes from tested genes in this study.

DNA sequence of *tetA* (27 DNA samples) and *tetB* (26 DNA samples) were confirmed to be each tetracycline resistance gene. DNA sequence of *bla*_{CTX-M} were confirmed to be *bla*_{CTX-M-2 group} (2 DNA samples) and *bla*_{CTX-M-36} (3 DNA samples). However, 26 out of 31 gene segments amplified by primers for *bla*_{CTX-M} were identified to *bla*_{OXY}, *bla*_{SED} and *bla*_{hugA}. In order to estimate the number of bacteria harboring *bla*_{CTX-M}, further investigation was needed using improved primer pair.

1. 目 的

食用動物への抗生物質の使用により選択された

薬剤耐性菌が食肉等を汚染し、食肉とともに消費者に摂取され、その薬剤耐性菌がヒトに感染症を引き起こした場合、抗菌剤の治療効果が得られな

いことが危惧される¹⁾。食用動物や食肉を中心に薬剤耐性菌の保菌・汚染割合やその遺伝子型が調査・報告されているが²⁾、薬剤耐性菌の菌数を測定した報告はない。食肉中の薬剤耐性菌の菌数が多いほど、加熱調理を経ても、薬剤耐性菌が食肉に生残しやすく、調理過程で他の食品を汚染しやすい。また、ヒトの腸管内に定着しやすく、他の細菌に耐性遺伝子を伝達するリスクも高い。そこで本研究では、最確数法(Most Probable Number Method, MPN法)に、耐性遺伝子を検出するPCR法を組み合わせる“MPN-PCR法”により、鶏肉を汚染する耐性遺伝子保有細菌の数を推定した。また、同じ検体から、大腸菌群を分離・同定し、薬剤感受性を調べ、MPN-PCR法の結果と比較した。

2. 方 法

2.1 大腸菌群の分離・同定

市販鶏ひき肉120検体を検査材料とし、検体25 gに緩衝ペプトン水225 ml(日水製薬株式会社、東京)を加え、ストマッカー処理し、試料原液とした。これを10倍階段希釈して、1000倍希釈液まで作成し、各濃度1 mlを3本のBGLB発酵管(日水製薬株式会社)に接種した。35℃で24時間培養し、ガスの発生が認められた培養液をEMB培地(日水製薬株式会社)に接種し、大腸菌群を分離した。乳糖ブイヨン発酵管(日水製薬株式会社)で、ガス産生および酸産生を確認後、16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、菌種を同定した³⁾。

2.2 MPN-PCR法による耐性遺伝子保有細菌数の推定

上述のガスの発生が認められ、大腸菌群陽性と推定されたBGLB発酵管の培養液500 μ lを遠心分離し、沈査を滅菌生理食塩水で洗浄後、滅菌TE緩衝液に再浮遊させ、加熱抽出によりDNA検体を得た。これらを鋳型として、*tetA*⁴⁾および*tetB*⁴⁾

ならびに*bla*_{TEM}⁴⁾、*bla*_{CTX-M}⁵⁾および*bla*_{CMY-2}⁴⁾をPCR法により検出した。各耐性遺伝子が検出されたDNA検体の数の組み合わせから、最確数表を用いて、各鶏肉検体の耐性遺伝子保有細菌数を推定した。

2.3 薬剤感受性試験

各鶏肉検体の最も希釈倍率の高い希釈液から分離した大腸菌群1株について、フローズンプレート(栄研化学株式会社、東京)を用い、最小発育阻止濃度を決定した⁶⁾。

2.4 薬剤耐性遺伝子の塩基配列の決定

MPN-PCR法で陽性となった*tetA*⁷⁾、*tetB*⁷⁾および*bla*_{CTX-M}⁵⁾について、それぞれのプライマーペアで増幅しなおし、塩基配列を決定した。

3. 結果と考察

3.1 PCRによる耐性遺伝子の検出

大腸菌群陽性と推定されたBGLB発酵管806本から、DNA検体を得た。これらから耐性遺伝子を検出した結果、*tetB*が最も多く検出され(490/806, 60.8%)、次に*tetA* (208/806, 25.8%)が多く検出された(Table 1)。耐性遺伝子が検出された鶏肉検体の割合も、*tetB* (114/120, 95%)および*tetA* (82/120, 68.3%)が多かった(Table 1)。日本の食用動物の糞便由来大腸菌では、テトラサイクリン耐性株の割合が高く²⁾、その結果と一致した。

耐性遺伝子が検出されたDNA検体の数から、各鶏肉検体の汚染耐性遺伝子保有細菌数を推定した。耐性遺伝子が検出された鶏肉検体の、耐性遺伝子保有細菌数の10を底とする対数の平均および最大値をTable 1に示した。*tetB*の平均値($10^{3.59}$ MPN/100 g)および最大値($10^{5.66}$ MPN/100 g)が検査した耐性遺伝子の中で最も高かった(Table 1)。*bla*_{CMY-2}が検出されたDNA検体(26/806, 3.2%)および鶏肉検体の数(15/120,

Table 1 The antimicrobial resistance genes detected by PCR.

Antimicrobial resistance genes	Number of positive DNA sample (%)		Number of positive chicken sample (%)		Log MPN/100 g	
					Mean *	Max
<i>tetA</i>	208	(25.8%)	82	(68.3%)	3.07	4.97
<i>tetB</i>	490	(60.8%)	114	(95.0%)	3.59	5.66
<i>bla</i> _{TEM}	176	(21.8%)	71	(59.2%)	3.07	4.97
<i>bla</i> _{CTX-M}	51	(6.3%)	29	(24.2%)	2.80	3.97
<i>bla</i> _{CMY-2}	26	(3.2%)	15	(12.5%)	2.87	4.97

MPN, most probable number

*mean of positive samples

12.5%) は、最も少なかったが、*bla*_{CMY-2}保有細菌数の最大値 (10^{4.97}MPN/100 g) は、*tetB*の次に高かった。

MPN法のBGLB発酵管では、複数の細菌が混在し、増殖するため、耐性遺伝子非保有細菌の遺伝子により、耐性遺伝子の検出が阻害されることも想定された。実際に試料原液の培養液からは耐性遺伝子が検出されず、希釈液からは検出された検体も認められた (各遺伝子 2～8 検体、平均5.8 検体)。陽性管数の組み合わせによっては、最確数表により、菌数を推定できないが、本調査では全検体の耐性遺伝子保有細菌数を決定でき、MPN-PCR法が耐性遺伝子保有細菌数を推定するのに有用であると考えられた。

3.2 分離株の同定

鶏肉120検体中117検体から大腸菌群が分離でき、1 検体 1 株を選び、同定した。*Escherichia coli*が最も多く、それに*Buttiauxella agrestis*およ

び*Citrobacter freundii*が続いた (Table 2)。

3.3 分離株の薬剤感受性

上述の117株の薬剤感受性をTable 3にまとめた。アンピシリン耐性株が65株 (55.6%) と最も多く、テトラサイクリン耐性株は18株 (15.4%) と少なかった。

Table 2 Identification of isolated coliform bacteria from chicken meats

Bacterial species	No. of isolates
<i>Escherichia coli</i>	40
<i>Buttiauxella agrestis</i>	21
<i>Citrobacter freundii</i>	20
<i>Klebsiella variicola</i>	16
<i>Shimwellia blattae</i>	7
<i>Enterobacter bugandensis</i>	2
<i>Hafnia paralvei</i>	2
<i>Enterobacter aerogenes</i>	1
<i>Lelliottia aquatilis</i>	1
Unidentified	7
Total	117

Table 3 Antimicrobial susceptibilities of coliform bacteria isolated from chicken meats.

Antimicrobials	MIC range*	Break point*	No. of resistant isolates (%)
Ampicillin	≤1 - >128	32	65 (55.6%)
Cefazolin	≤0.5 - >64	8	56 (47.9%)
Cefpodoxime	≤0.5 - >64	8	12 (10.3%)
Amoxicillin/clavulanic acid	≤8/4 - >64/32	32/16	50 (42.7%)
Cefpodoxime/clavulanic acid	≤2/4 - >16/4	**	5 (4.3%)
Tetracycline	≤0.5 - >64	16	18 (15.4%)

MIC, minimal inhibitory concentration

* μg/ml

** >3 two-fold concentration decrease in an MIC for cefpodoxime/clavulanic acid vs cefpodoxime alone

Table 4 Comparison of percentage between antimicrobial resistance identified by isolation and MIC tests and PCR

Antimicrobials	Antimicrobial resistance bacteria isolated sample No. (A)	Antimicrobial resistance genes detected sample No. (B)	Concordance rate			
			C / A	(%)	C / B	(%)
Ampicillin	65 (54.2%)	83 (69.2%) ¹⁾	53 / 65	(81.5%)	53 / 83	(63.9%)
Cefazolin	56 (46.7%)	41 (34.2%) ²⁾	23 / 56	(41.1%)	23 / 41	(56.1%)
Cefpodoxime	12 (10.0%)	41 (34.2%) ²⁾	6 / 12	(50.0%)	6 / 41	(14.6%)
Amoxicillin/clavulanic acid	50 (41.7%)	15 (12.5%) ³⁾	10 / 50	(20.0%)	10 / 15	(66.7%)
Cefpodoxime/clavulanic acid	5 (4.2%)	15 (12.5%) ³⁾	1 / 5	(20.0%)	1 / 15	(6.7%)
Tetracycline	18 (15.0%)	114 (95.0%) ⁴⁾	18 / 18	(100%)	18 / 114	(15.8%)

1) The sample number was counted that one or more *bla* genes of *bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M} or *bla*_{CMY-2} was detected in.

2) The sample number was counted that *bla*_{CTX-M} or/and *bla*_{CMY-2} was detected in.

3) The sample number was counted that *bla*_{CMY-2} was detected in.

4) The sample number was counted that *tetA* or/and *tetB* was detected in.

C) No. of sample from that both antimicrobial resistant bacteria and antimicrobial resistance genes were identified by isolation, antimicrobial susceptibility test and PCR.

3.4 MPN-PCR法と分離株の薬剤感受性の比較

MPN-PCR法を評価するため、各検体から検出された遺伝子の組み合わせおよび分離株の薬剤感受性の比較を行った (Table 4)。*bla*_{TEM}, *bla*_{CTX-M}および*bla*_{CMY-2}のうちいずれか1遺伝子を保有すると、アンピシリン耐性になるため、この3遺伝子のいずれかが検出された検体数およびアンピシリン耐性株が分離された検体数を比較した。アンピシリン耐性株が分離された65検体のうち、3遺伝子のうちいずれかが検出されたのが、53検体 (81.5%) であったのに対し、3遺伝子のうちいずれかが検出された83検体中、アンピシリン耐性株が分離されたのは53検体で、その割合 (63.9%) は低かった。

同様に、*tetA*または*tetB*のいずれかを保有するとテトラサイクリン耐性になるため、この2遺伝子のいずれかが検出された検体数およびテトラサイクリン耐性株が分離された検体数を比較した。テトラサイクリン耐性株が分離された18検体のすべてから、2遺伝子のいずれかが検出されたのに対し、2遺伝子のいずれかが検出された114検体

中、テトラサイクリン耐性株が分離されたのは18検体 (15.8%) と少なかった (Table 4)。

従来の分離株の薬剤感受性を調べる方法では、1検体1株または数株を選んで薬剤感受性を調べるのが一般的である²⁾。MPN-PCR法では、鶏肉の希釈液中に存在する複数の大腸菌群を混合培養し、その中に耐性遺伝子保有細菌が一定数以上存在すれば、耐性遺伝子が増幅されるため、従来法より高感度に、耐性菌を検出できたと考えられた。

一方、セファゾリン等の抗生物質に対する耐性とそれらに耐性となる遺伝子の検出の一致率は、6.7%から66.7%と低かった (Table 4)。

Citrobacter spp.および*Enterobacter* spp.は、先天的にβ-ラクタマーゼを産生する細菌として知られている。また、*Buttiauxella agrestis*も全ゲノムの塩基配列決定により、β-ラクタム系抗生物質への耐性が報告されている⁸⁾。今回、MPN-PCR法で検出した耐性遺伝子は、主に*E. coli*で多く保有される耐性遺伝子から選出した。*E. coli*は、分離した大腸菌群の中で、最も優勢な菌種だったが、その割合は、34.2% (40/117) であり、上述の先天的にβ-ラクタム系抗生物質に耐性を示す

Table 5 Antimicrobial resistance genes by identified by DNA sequencing

Antimicrobial resistance gene detected by PCR	Antimicrobial resistance gene identified by DNA sequencing	No. of chicken samples	No. of DNA samples
<i>bla</i> _{CTX-M}	<i>bla</i> _{CTX-M-36} ¹⁾	3	3
	<i>bla</i> _{CTX-M-2} group	2	2
	<i>bla</i> _{OXY-6}	9	9
	<i>bla</i> _{OXY-2}	1	3
	<i>bla</i> _{SED} ²⁾	1	1
	<i>bla</i> _{augA} ³⁾	12	13
<i>tetA</i>	<i>tetA</i>	21	27
<i>tetB</i>	<i>tetB</i>	9	26

Concordance rate of DNA sequence, 1) 83-84%; 2) 92%, 3) around 70%

菌種の割合が高かった。これらが産生するβ-ラクタマーゼは、*E. coli*が産生するものとは異なり、MPN-PCR法と分離株の薬剤感受性の結果の一致率が低くなったと考えられた。

3.5 MPN-PCR法により検出した耐性遺伝子の塩基配列の決定

鶏肉28検体由来のDNA31検体から増幅した*bla*_{CTX-M}、鶏肉21検体由来のDNA27検体から増幅した*tetA*および鶏肉9検体由来のDNA26検体から増幅した*tetB*の塩基配列を決定した。BLAST検索により配列の一致率の高い遺伝子と同定した。その結果をTable 5にまとめた。既報の*bla*_{CTX-M}を増幅するプライマーを用いたが⁵⁾、*bla*_{CTX-M-36}および*bla*_{CTX-M-2} groupに加えて、同じクラスAではあるが、*bla*_{CTX-M}とは異なる*bla*_{OXY}、*bla*_{SED}および*bla*_{augA}が増幅され、*bla*_{CTX-M}保有細菌数を決定するには、プライマーの配列を検討する必要がある。

*tetA*または*tetB*が検出された鶏肉114検体のうち、テトラサイクリン耐性株が分離された検体は18検体(15.8%)と少なかったため、当初の研究計画にはなかったが、*tetA*および*tetB*の塩基配列を決定した。いずれの配列も既知のそれらの遺伝子と高い一致率を示し、同遺伝子と同定できた。ただし、一部は波形の重複等により、配列が決定できないものもあった。混合培養液から得た

DNAを鋳型とし増幅した遺伝子のシーケンス解析を行ったため、波形に重複が生じたと考えられた。*tetB*は、陽性検体が多いため、遺伝子のクローニング後の配列決定や、異なるプライマーでの増幅など、精査が必要と考えられた。

4. 要 約

最確数法(Most Probable Number Method, MPN法)に、耐性遺伝子を検出するPCR法を組み合わせた“MPN-PCR法”により、鶏肉中の耐性遺伝子保有細菌数を推定し、同検体より分離した大腸菌群の薬剤感受性を調べた。鶏肉120検体中の*tetA*(陽性検体の平均、 $10^{3.07}$ MPN/100g)、*tetB*($10^{3.59}$)、*bla*_{TEM}($10^{3.07}$)、*bla*_{CTX-M}($10^{2.80}$)および*bla*_{CMY-2}($10^{2.87}$)の保有細菌数が推定できた。アンピシリン耐性株またはテトラサイクリン耐性株が分離された35検体または18検体からは、高率に耐性遺伝子が検出され[81.5%(53/65)または100%(18/18)]、MPN-PCR法は有用であった。一方、アモキシシリン/クラブラン酸およびセファゾリン等の耐性株が分離された検体からの*bla*_{TEM}、*bla*_{CTX-M}または*bla*_{CMY-2}の検出率は低かった。これは、分離株に先天的にβ-ラクタム系抗生物質に耐性を示す菌種が多く含まれ、今回検査した耐性遺伝子とは異なる耐性遺伝子を保有していたためと推察された。*bla*_{CTX-M}の塩基配列を決定し

たところ、*bla*_{CTX-M-36}および*bla*_{CTX-M-2 group}に加えて、同じクラスAではあるが、*bla*_{CTX-M}とは異なる*bla*_{OXY}等と同定された。*bla*_{CTX-M}保有細菌数の推定には、プライマー等の検討が必要である。

文 献

- 1) WHO, Antibiotic resistance, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, 2018
- 2) 動物医薬品検査所 <http://www.maff.go.jp/nval/yakuzai/pdf/h27cyousakekkagaiyou.pdf>
- 3) Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J. : *J. Bacteriol.*, **173**, 697~703, 1991.
- 4) Kozak, G. K., Boerlin, P., Janecko, N., Reid-Smith, R. J., Jardine, C. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **75**, 559~566, 2009.
- 5) Edelstein, M., Pimkin, M., Palagin, I., Edelstein, I., Stratchounski, L. : *Antimicrob. Agents Chemother.*, **47**, 3724~3732, 2003.
- 6) Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, M31-A3, 2008.
- 7) Sengeløv, G., Halling-Sørensen, B., Aarestrup, F. M. : *Vet. Microbiol.*, **95**, 91~101, 2003.
- 8) Jothikumar, N., Kahler, A., Strockbine, N., Gladney, L., Hill, V. R. : *Genome Announc.* **2**, e01060-14, 2014.

筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の検出法

Detection strategy of *Toxoplasma gondii* infected pigs and estimation of cysts burden in muscles

高 島 康 弘

(岐阜大学応用生物科学部)

Yasuhiro Takashima

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

Toxoplasma gondii is an important zoonotic parasite that infects many warm-blooded animals including livestock and poultry. Although approximately 5 % of Japanese pigs showed seropositive for *T. gondii*, it has not yet been known whether these seropositive pigs harbor infectious cysts in the muscle. In this study, to evaluate the relation between antibody production and parasite burden, the number of latent cysts in the tissue, in *T. gondii* infected pigs, a gene modified *T. gondii* (TgCatJpGil/TaJ/GRA red), which expresses a red fluorescent protein, was used. The cysts of this strain in the host tissue can be easily detected by the observation using fluorescent stereoscopic microscope. Although the infected pig produced anti-*T. gondii* antibodies, which reacted with tachyzoites crude antigens, and the antibodies were maintained during entire period of the observation, more than 100 days, any cyst was not isolated from the tissue of the infected pig. In the preliminary experiments, the sera of infected pig did not reacted with a potentially immunogenic bradyzoites/cyst-specific protein. These results showed that seropositive pig does not always harbor infectious cyst in the tissue. It might be possible to establish the serodiagnosis system to distinguish cysts harboring pigs and pigs temporally exposed to *T. gondii*.

1. 目 的

トキソプラズマは豚に肺炎を起こすほか、食肉を介して人にも感染する人獣共通感染性原虫である。家畜衛生状態の改善とともに、わが国における豚での発例は近年激減し「養豚業を経済的に脅かす豚の病気」としては過去のものになった感がある。一方で、今なお5%程度の豚が無症状ながら抗体陽性を示す¹⁾。本原虫はいったん感染すると一生にわたって筋肉中に潜伏するため、一般的

には抗体陽性と虫体保有はほぼ同義と考えられている。また潜伏感染個体は病変を一切形成しないため食肉検査で摘発されることもない。すなわち、年間と畜数(約1600万頭)の5%にあたる80万頭のトキソプラズマ虫体保有個体が食肉として毎年市場に出ているものと危惧される²⁾。一方で抗体陽性個体の筋肉に含まれる虫体の数や位置についてはほとんどデータがない。もし全身の筋肉中に一様に虫体が分布するのであれば、抗体陽性個体から切り分けられた「一人前」の精肉にはほ

は確実に虫体が存在することになる（消費者に届けられる精肉の5%は感染源となる）一方、特定箇所には虫体が集中して感染しているのであれば当該箇所以外から切り出された精肉にはリスクがほとんどない（食肉が感染減となるリスクは5%よりずっと低い）。このように、豚の体内における潜伏虫体の分布状況を知ることは、食の安全の観点から豚肉の安全性を評価する際に非常に重要なデータである。ところが現行の血清学的検査では家畜におけるトキソプラズマ感染歴を確かめることはできるが、可食部における潜伏虫体の有無・数や感染部位を推測することはできない。そこで本研究では実際に豚にトキソプラズマを実験感染し、潜伏感染した虫の数・位置と抗体価の相関を定量的に評価するとともに、その時の抗体の産生状況を合わせて調査する。2つのデータを比べることで、虫体数の多い個体と少ない個体の間で抗体産生にどのような違いがあるのか明らかにできれば、抗体の状況から豚体内におけるトキソプラズマ潜伏虫体の状況を間接的に把握できる可能性がある。

2. 方 法

2.1 実験動物

5か月から1年3か月齢マイクロミニピッグ（富士マイクラ）を用いた。

2.2 寄生虫

豚に対して病原性のないTgCatJpGil/TaJを親株に作成した、赤色蛍光タンパク（DsRed Express）を発現する組換え虫体TgCatJpGil/TaJ GRA red株³⁾、豚に対して強い病原性を示すX株、および世界中で研究用に使用されることの多いPLK株を用いた。これらの株は7.5%FCSを含むRPMI培地で培養したVero細胞にタキゾイトとして感染させて維持した。またTgCatJpGil/TaJ株およびTgCatJpGil/TaJ GRA red株のシス

トは感染マウスの脳から採材した。C57BL/6Jマウスに100虫体のタキゾイトを腹腔摂取し、30日以上たってから脳を採取し脳内に形成されたシストを得た。

2.3 感染

実験1：

1歳齢のマイクロミニピッグ1頭に 10^5 虫体のTgCatJpGil/TaJ GRA red株タキゾイトを皮下接種し経時的に採血した。5か月後に安楽殺し、脳、心臓、肝臓、肺、腎臓、舌、胃、筋肉（バラ、肩、腿、ロース、ヒレ）を採材した。

実験2：

1歳3か月齢のマイクロミニピッグ1頭に1000個のTgCatJpGil/TaJ GRA red株シストを経口摂取させ経時的に採血した。8か月後に安楽殺し、脳、心臓、肝臓、肺、舌、胃、脾臓、筋肉（バラ、肩、腿、ロース、ヒレ）を採材した。

実験3：

5か月齢のマイクロミニピッグ5頭に 10^7 虫体のX株タキゾイトを皮下接種した。死亡時に脳、肝臓、肺、腎臓を採材した。

2.4 虫体の検出

実験1および2：

臓器を厚さ5mm程度に薄切し、2枚のスライドガラスに挟んで圧平したうえで蛍光顕微鏡で観察した。臓器、あるいは筋肉の部位ごとに5cm×5cm程度の薄切を10-22作成して観察した。

実験3：

パラフィン包埋のうえ薄切し、ヘマトキシリンエオジン染色を施して監査付いた。肺については抗トキソプラズマSAG1抗体を用いて免疫染色を行った。

2.5 抗体の検出

抗体の検出は過去に報告された手法に従ってWestern Blotting法にて実施した³⁾。この方法ではVero細胞に感染させて培養したPLK株の粗抗

原をSDSゲルで泳動した後メンブレンに転写し、ここに検体となる豚血清を反応させる。

3. 結果と考察

TgCatJpGi1/TaJ GRA red株のシストを感染させたマイクロミニピッグの各臓器からは虫体が検出されず、また抗トキソプラズマ抗体の産生も見られなかった。これは当該個体に感染が成立しなかったものと思われる。同様の感染条件で本組換え株の親株 (TgCatJpGi1/TaJ株) はマイクロミニピッグに感染していることから²⁾、本組換え株の豚への感染性は親株に比べて若干低下している可能性がある。一方TgCatJpGi1/TaJ GRA red株のタキゾイトを感染させたマイクロミニピッグでは、感染35日目から血中に抗トキソプラズマ抗体の存在が認められ、感染119日たっても消失することにはなかった (Fig. 1)。抗体の存在はタキゾイト粗抗原を抗原としたWestern Blotting法にて検出したが、経時的に採取した血清 (感染後35, 56, 70, 84, 98, 119日) が反応する抗原のバンドパターンは観察期間中を通じてほぼ一定であった (Fig. 1)。実験期間中、感染豚が何らかの症状を示すことはなく、活動性や食欲にも特に変化

は見られなかった。さらにタキゾイトを接種した豚は5か月後に、シストを経口摂取させた豚は8か月後に安楽殺し各臓器に潜伏感染しているシストがあるかどうか観察した。本実験で用いた組換え原虫 (TgCatJpGi1/TaJ GRAred株) のシストは強い赤色蛍光を示すので、存在していれば蛍光実態顕微鏡下で簡単に視認することができる (Fig. 2)。ところがいずれの豚についても、観察したすべての臓器において虫体の存在は確認できなかった。これらの豚の体内には潜伏感染しているシストは存在しないか、きわめて少ない数であることが推測される。以上のことから抗体陽性豚が必ずしも一定数以上のシストを可食部に有しているとは限らないことが明らかになった。わが国では年間約80万頭の抗トキソプラズマ抗体陽性豚が市場へ出ていると試算されるが^{1, 2)}、これらをただちに「筋肉中にシストを含む個体」「ヒトへの感染源」と考えることはリスクを過大に評価することになると思われる。

次に豚に対して強い病原性を示すことが分かっているX株 (国内分離・未発表株) をマイクロミニピッグ5頭に感染させたところ、3頭が2週間以内に死亡した。死亡した3個体ではいずれも感

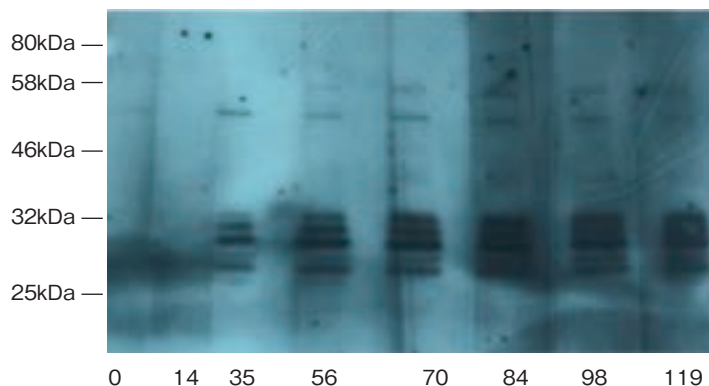


Fig. 1 Production of anti *T. gondii* Antibodies. Western blot analysis using tachyzoite lysate as antigen. Serum samples were collected over time from a TgCatJpGi1/TaJ/GRA red tachyzoite infected micromini pig. The number under each lane indicates days post infection.

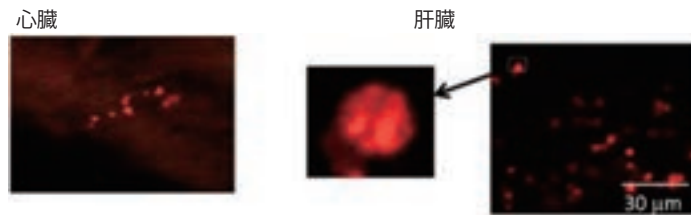


Fig. 2 Red fluorescent parasite in the edible portion of chicken.
TgCatJpGil/TaJ/GRA red parasites in the heart and liver of a chicken.

染後10日程度で抗トキソプラズマ抗体の産生が確認されており、急性症状を示す場合は抗体価の上昇が速いものと推測される。タキゾイト粗抗原を抗原としたWestern Blotting法にこれら個体の血清を供したところ、反応する抗原のバンドパターンはFig. 1 に示したTgCatJpGil/TaJ GRA red株感染個体のものと類似していた。さらに死亡後に各臓器を精査したところ、肺を中心に多数のタキゾイトが見られたがシストの形成は認められなかった。

TgCatJpGil/TaJ GRA red株およびX株を感染させた個体の血清を潜伏期虫体（ブラディゾイト）特異的抗原に反応させたところ、抗原抗体反応は見られなかった。なお精査が必要であるが、潜伏期虫体（ブラディゾイト）特異的抗原と活性期虫体（タキゾイト）特異的抗原を戦略的に使い分けることで、体内にシストを有する個体と一過性の感染を経ただけの個体を区別できる可能性が示された。

4. 要 約

トキソプラズマは多くの種類のほ乳類、鳥類に感染する重要な人獣共通感染症の病原体である。わが国の豚の約5%が抗体陽性であるが、抗体陽性豚が筋肉中にどの程度虫体を保育しているかは

あまり知られていない。そこで本研究では、マイクロミニピッグにトキソプラズマTgCatJpGil/TaJ GRA red株およびX株を感染させたところ、いずれの株に感染した個体においても抗トキソプラズマ抗体の産生が確認された。しかしながらその組織内から潜伏感染中のシストは検出されなかった。本研究により、抗体陽性豚が必ずしも一定数以上のシストを可食部に有しているとは限らないことが明らかとなり、抗体陽性個体と「筋肉中にシストを含む個体」「ヒトへの感染源となる個体」とを区別する必要性が示された。予備的実験では、これらの個体から得られた血清は潜伏期虫体（ブラディゾイト）特異的抗原に反応していない。このような抗原を用いた血清学的検査法を確立すれば、体内にシストを有した個体とそうでない個体を区別できる可能性がある。

文 献

- 1) Matsuo, K., Kamai, R., Uetsu, H., Goto, H., Takashima, Y., Nagamune, K. : *Parasitol. Int.*, **63**, 638~639, 2014.
- 2) 高島康弘 : All about SWINE 50, 16~19, 2017.
- 3) Appiah-Kwarteng, C., Saito, T., Toda, N., Kitoh, K., Nishikawa, Y., Adenyo, C., Kayang, B., Owusu, E. O., Ohya, K., Inoue-Murayama, M., Kawahara, F., Nagamune, K., Takashima, Y. : *Parasitol Int.*, **69**, 114~120, 2019.

牛趾乳頭腫症の性状解明を目指したメタゲノム解析と疫学研究

Metagenomic and epidemiological studies for characterization of papillomatous digital dermatitis

後 藤 恭 宏

(九州大学大学院医学研究院)

Yasuhiro Gotoh

(Faculty of Medical Sciences, Kyushu University)

Papillomatous digital dermatitis (PDD) is a severe infectious disease that causing lameness in dairy cattle worldwide. It is an important animal health and welfare concern, resulting in reduced milk yield and reproductive performance, with substantial costs of treatment and control. Epidemiological evidence, such as geographic spread and healing after antibiotic treatment, shows PDD as bacterial infection. Various bacterial species have been identified, including spirochaetes, *Bacteroides* spp., *Fusobacterium* spp. and *Peptococcus* spp. Now, PDD is considered as causing by multiple bacteria including non-cultivate species, and one of the polymicrobial diseases, new category of infectious diseases.

For metagenomic approach to characterization of PDD, we collected a large PDD lesion and purified total DNA that enriched bacterial DNA from the lesion. Six types of libraries were prepared and sequenced with Illumina MiSeq platform. After removing reads from bovine genome, the remained reads were assembled using metaplatanus and obtained draft sequences with binning. Draft genomes of several bins were performed PCR based gap-filling to obtain high-quality draft genomes. To identify true causative agents, we purified total DNA from another four lesions and sequenced with Illumina HiSeq platform. The reads were performed mapping-based analysis to high-quality draft genomes. As a result, 18 bins were commonly detected with highly redundancy among these lesions. On the 13 out of 18 bins, the complete genomes were succeeded to reconstitute. This is the first step to elucidate the polymicrobial interactions involved in the etiology of PDD. To examine role of each bacterial species or interaction between species (at the presence/absence) on the clinical stage of PDD, the localization of each causative agent clarifies. Specific probes that able to detect causative agents for *in situ* hybridization analysis are in development.

These metagenomic-based approach for polymicrobial disease caused mainly by uncultivated bacteria is a new research strategy and research field. Besides contributing to PDD research and disease control, the results of this study can be applied to other polymicrobial disease research.

1. 目 的

牛 趾 乳 頭 腫 症 (Papillomatous digital dermatitis ; PDD) は、乳牛に見られる趾皮膚表層の伝染性炎症性疾患である。罹患牛は激しい疼痛を伴い、跛行、体重減少、乳量や繁殖成績の低下が見られる。一度発生した牛舎では発生が繰り返され、根絶が困難であることから、治療と管理に多大なコストがかかり、経済的損失および動物福祉の点で重要な問題である。1974年に世界で初めてイタリアから報告され、その後ほぼすべての国で報告されている。日本国内では、北海道全域に加え、北海道からの導入牛により各地の酪農地帯へ発症が拡大している。抗生物質を用いた治療が有効なことから、細菌感染症と考えられており¹⁾、病変部からスピロヘータ様のらせん菌が高頻度に検出されている。しかしながら、菌の分離に成功した例は限られており、これまでに再現試験の成功例の報告もない。このことから真の起因菌は決定されていない。これまでの細菌学および分子生物学的解析により、PDDは難培養性のスピロヘータ様細菌を含む未培養細菌群を主体とした複数の細菌による感染症であると考えられている^{1, 2)}。優勢に存在するトレポネーマだけでも3-5以上であると報告されている (*Treponema medium*/*Treponema vincentii*-like, *Treponema phagedenis*-like, *Treponema putidum*/*Treponema denticola*-like spirochaetesなど)^{3, 4)}。これらのことから、新たな疾患概念である polymicrobial diseaseの1つにあげられている⁵⁾。いずれにおいても、発症に関与する各菌の役割や発症のメカニズムなどの詳細は不明である。多くの菌種の分離培養が望めない、および、公開されたウシゲノム配列がある、という点でPDD病変のメタゲノム解析は非常に有効な解析法である。本研究では、PDD病変のメタゲノム解析から得られた情報を

基盤として、PDD起因菌群の同定と各起因菌の細菌学的特徴を明らかにし polymicrobial disease としての本症の実態を解明する。また、各菌のゲノム情報等を利用して、本症の早期診断やサーベイランス手法を開発し、本症のリスク評価を検討する。

2. 方 法

2.1 メタゲノム解析用 total DNA調製

慢性期の比較的大きなPDD病変を採集し、1 mm³程度の大きさに断片化した。細菌を遊離させるために、断片化したPDD病変に輸送培地を加え、室温で1時間振とうした。その後、細胞ろ過フィルター (メッシュサイズ40 μm) を用いてPDD病変や遊離した牛細胞を除去し、ろ液を遠心分離し、集菌した。集菌した菌体は、次の3つの酵素を用いて処理 (リゾチーム、アクロモペプチナーゼ、プロテイナーゼK) し、さらに10% SDSを加え、完全に溶菌させた。この溶液はフェノール抽出およびエタノール沈殿により、total DNAを調製した。また、ビーズ破碎法による PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) を用いた total DNAの調製も行った。

2.2 PDD病変部の菌種組成解析

メタゲノム解析用 total DNAが標準的なPDD病変であることを確認するために菌種組成解析を行った。すでに日本各地から収集済みの5病変 (IZ, MJ, CH1, CH8, HD) を参照として含めた。16S rRNA full-length clone library (1500 bp程度) は、バクテリア共通プライマー27Fと1492Rを用いてPCR増幅し、pUC118にクローニング後、大腸菌に形質転換し、クローンライブラリを作成した。192程度ずつキャピラリーシーケンスし、sequencerを用いてアセンブリすることでクローンの配列を決定した。得られたクローン配列は、相同性99%でクラスタリングし、operational

taxonomic unit (OTU) 解析した。

2.3 シーケンス解析と高精度ドラフト配列の構築

高精度なドラフト配列の構築を目指すために、6種類のイルミナライブラリ（ペアエンドライブラリ2種類、メイトペアライブラリ4種類；4, 8, 10, 12kb）を調製し、MiSeq（イルミナ）を用いてシーケンスデータを取得した。牛由来のリードは、ウシゲノム配列（GCA_002263795.2）に対してbowtie2⁶⁾によるマッピング解析（相同性 $\geq 90\%$ ）で除去した。得られた非牛由来リードはmetaplatanusを用いてアセンブリした。scaffoldは予測された遺伝子のdi-codon usageによりクラスタリングし、系統推定は、16S rRNA配列の検索およびuniversal single copy geneを用いて行った。

2.4 真のPDD起因菌群の決定

異なる農場および異なる時期に採取した4つの病変は、PowerSoil DNA Isolation Kit（MoBio）を用いてtotal DNAを精製した。HiSeq2500（イルミナ）を用いてシーケンス解析（ペアエンド、150 x2, 1 Flow cell）した。得られたリードデータは、高精度ドラフトゲノム配列を参照配列にしたマッピングし、各病変中の起因菌群の存在量はFPKM（fragments per kilobase per million reads mapped）として算出した。

2.5 病変部における各起因菌の局在の特定

異なる農場および異なる時期に採取した4つの病変は、病期の決定をするために、肉眼的観察による病変部の形態学的診断を行った後、ただちにホルマリン固定し、パラフィン包埋切片を作成（FFPE切片）した。FFPE切片にはヘマトキシリン・エオジン染色を実施し、病理的診断を行い、2つの診断法による知見を照らしあわせ、PDD病変の病期（急性期、慢性期）を決定した。

3. 結果と考察

3.1 total DNAの調製および菌種組成

メタゲノム解析用total DNA調製により、次世代シーケンス解析をするための十分なtotal DNAが得られた。この調製法による菌種組成の偏りがないことを確認するために、PowerSoil DNA Isolation Kit（MoBio）を用いて同じ病変から調製したtotal DNAもあわせて菌種組成の比較を行った。また、メタゲノム解析用のPDD病変が標準的なPDD病変であることを確認するために、すでに日本各地から収集済みの5病変（IZ, MJ, CH1, CH8, HD）を参照として加えた。最近は網羅的な菌種組成解析には次世代シーケンサを使用して行われることが多いが、解析に用いる配列長が400bp程度と短く、解像度が低い。PDD病変のように複数存在する同属菌種間を識別するためには、16S rRNA full-length clone library解析により解像度を高める必要がある。6つの病変から計1547のクローン配列を取得し、相同性99%の閾値でOTU形成したところ391となった。それぞれのOTUについて、菌種同定を行った（Table 1）。メタゲノム解析に用いた病変は、これまでに報告されている菌種組成と同様であり、そのtotal DNAは菌種を網羅的に含むことが確認された。

3.2 高精度ドラフトゲノム配列の構築

MiSeqシーケンサにより計150Gbのデータ量を取得した。牛由来リードを除去するために、ウシゲノム配列を用いてマッピング解析したところ、12Gbの非牛由来リードが得られた。このリードをmetaplatanus（<http://platanus.bio.titech.ac.jp/metaplatanus>）を用いてアセンブリ、クラスタリングした（Fig. 1）。さらにクラスタごとのドラフト配列は、PCRによるギャップフィリングを行い、高精度ドラフトゲノム配列の構築に成功した。

Table 1 Microbial population analysis (OTU abundance, %) using 16S rRNA full-length clone library.

OTUs	Enrich 482	Whole 226	IZ 163	MJ 172	CH1 182	CH8 171	HD 151	PDD 1547	Classification	Ident %
OTU01	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	Luteococcus japonicus-like bacterium	98
OTU02	0.8%	0.4%	2.5%	5.2%	0.0%	0.0%	1.3%	1.3%	Porphyromonas levii-like bacterium	97
OTU03	0.4%	0.9%	0.0%	1.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	Porphyromonas levii	99
OTU04	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	8.6%	0.8%	uncultured bacterium	89
OTU05	1.2%	2.2%	0.6%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	uncultured bacterium	92
OTU09	2.1%	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%	1.8%	0.0%	1.0%	Lachnospiraceae bacterium canine oral taxon 024	96
OTU10	1.2%	0.4%	0.0%	1.2%	0.5%	0.0%	0.0%	0.6%	Peptostreptococcaceae bacterium canine oral taxon 003	99
OTU11	0.4%	0.0%	2.5%	1.2%	0.0%	0.0%	1.3%	0.6%	Peptostreptococcaceae bacterium canine oral taxon 030	99
OTU12	2.7%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	Peptostreptococcaceae bacterium canine oral taxon 065	99
OTU13	4.8%	0.9%	1.2%	0.0%	1.6%	0.0%	0.0%	1.9%	Peptostreptococcaceae-like bacterium	95
OTU14	2.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	Peptostreptococcaceae bacterium canine oral taxon 071	99
OTU15	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	Peptostreptococcaceae bacterium canine oral taxon 135	99
OTU16	1.5%	0.4%	0.0%	0.0%	2.7%	0.0%	0.0%	0.8%	Peptostreptococcus sp. oral clone EX153-like bacterium	95
OTU17	5.2%	1.3%	1.8%	1.2%	0.5%	0.0%	0.0%	2.2%	Selenomonas diania-like bacterium	92
OTU18	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	Selenomonas-like sp. oral clone DM071-like bacterium	91
OTU19	0.4%	0.9%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	Tissierella sp. canine oral taxon 029-like bacterium	89
OTU20	0.6%	0.4%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	uncultured bacterium	93
OTU21	0.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	uncultured bacterium	92
OTU22	0.6%	0.0%	1.2%	4.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	uncultured Catonella sp.	94
OTU23	2.1%	1.3%	1.8%	0.0%	1.6%	1.2%	13.9%	2.7%	uncultured Firmicutes bacterium	100
OTU24	0.2%	0.0%	5.5%	8.7%	0.5%	0.0%	1.3%	1.8%	uncultured Firmicutes bacterium	99
OTU25	2.3%	0.9%	1.2%	0.0%	2.7%	7.6%	0.0%	2.1%	uncultured Firmicutes bacterium	100
OTU26	0.6%	0.0%	2.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	uncultured Firmicutes bacterium	93
OTU27	0.6%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.6%	0.0%	0.3%	uncultured Firmicutes bacterium	96
OTU28	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	uncultured Firmicutes bacterium	89
OTU29	3.1%	0.9%	9.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.1%	uncultured Firmicutes bacterium	100
OTU30	0.2%	0.9%	0.6%	2.9%	1.6%	0.0%	1.3%	0.9%	uncultured rumen bacterium	91
OTU31	0.2%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	uncultured bacterium	99
OTU32	0.2%	0.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	Aerococcus sp. 4101	99
OTU33	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	Aerosphaera taetra	99
OTU34	2.5%	0.0%	0.6%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.9%	Fusobacterium necrophorum subsp. funduliforme 1_1_36S	99
OTU35	0.0%	0.0%	0.0%	4.1%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	uncultured bacterium	99
OTU36	1.7%	4.9%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.2%	Spirochaeta sp. canine oral taxon 314	99
OTU37	0.0%	0.0%	0.6%	0.6%	0.0%	3.5%	0.7%	0.6%	Treponema refringens	99
OTU38	0.0%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	Treponema sp. canine oral taxon 199	99
OTU39	3.7%	4.4%	1.8%	6.4%	0.0%	0.0%	1.3%	2.8%	Treponema sp. canine oral taxon 233	99
OTU40	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	4.9%	1.8%	0.0%	0.8%	Treponema sp. canine oral taxon 233	99
OTU41	0.8%	7.5%	0.6%	8.7%	23.1%	1.8%	0.0%	5.3%	Treponema sp. canine oral taxon 249	99
OTU42	2.7%	2.7%	2.5%	0.0%	0.5%	0.6%	0.0%	1.6%	Treponema sp. canine oral taxon 356	99
OTU43	9.1%	19.9%	3.7%	0.0%	0.0%	0.0%	22.5%	8.3%	Treponema sp. G179	99
OTU44	3.3%	7.5%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	2.0%	2.3%	Treponema sp. G179	99
OTU45	0.4%	4.0%	8.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	1.6%	Treponema sp. G179-like bacterium	97
OTU46	0.0%	1.8%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	Treponema sp. G179	99
OTU47	4.4%	0.0%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	1.4%	Treponema sp. PT2	100
OTU48	2.9%	8.4%	6.1%	9.3%	17.6%	33.3%	18.5%	11.4%	Treponema sp. PT6 (※ <i>T. phagedenis</i>)	99
OTU49	0.0%	0.0%	0.0%	5.8%	15.9%	7.0%	0.0%	3.3%	uncultured Treponema sp.	100
OTU50	0.2%	1.3%	0.0%	0.0%	0.0%	2.9%	3.3%	0.9%	uncultured Treponema sp.	99
OTU51	1.9%	0.9%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.8%	uncultured Treponema sp.	97
OTU52	1.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	uncultured Treponema sp.	99
OTU53	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.5%	0.0%	0.0%	0.3%	uncultured Treponema sp.	99
OTU54	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.2%	uncultured Treponema sp.	97
OTU06	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	6.0%	0.6%	uncultured bacterium	99
OTU07	2.7%	7.5%	14.1%	18.6%	14.8%	12.9%	4.6%	9.1%	uncultured Bacteroidetes bacterium	100
OTU08	2.7%	1.8%	0.6%	0.0%	1.1%	0.0%	0.0%	1.3%	uncultured Bacteroidetes bacterium	100
OTU55	0.8%	0.4%	1.2%	2.3%	0.5%	0.0%	0.0%	0.8%	uncultured Deferribacteraceae bacterium	95
OTU56	0.8%	0.9%	2.5%	0.0%	2.2%	17.0%	0.0%	2.8%	uncultured Tenericutes bacterium	100
OTU57	0.0%	0.4%	0.0%	0.0%	1.6%	1.8%	2.6%	0.7%	Mycoplasma fermentans M64	100
OTU58	0.2%	0.9%	0.6%	0.0%	0.0%	0.0%	0.0%	0.3%	Mycoplasma hyopharyngis	99

3.3 真の起因菌群の決定

1つの病変による菌種の有無や優勢だけでは、
真の起因菌群は決定できない。PDD病変に共通

して見られる菌種を明らかにするために、他の
PDD病変の採取を行った。メタゲノム解析に用
いた病変を採取した牛舎とは異なる地域および異

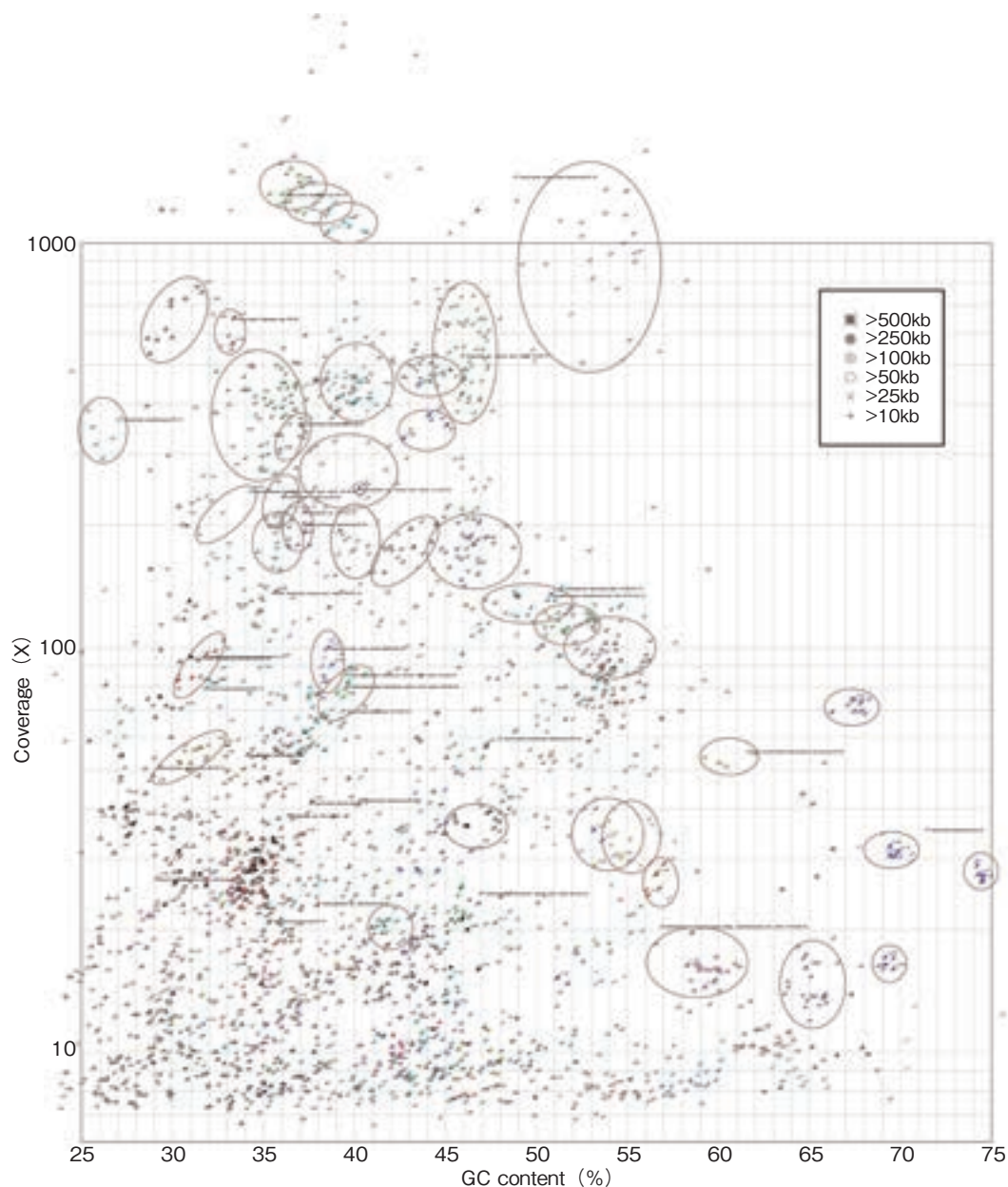


Fig. 1 Coverage-GC plots with binning for PDD metagenome (plot symbols are scaled by scaffold length).

なる時期のPDD病変を4つ採取した。メタゲノム解析が可能な大型のPDD病変を収集できる機会は限られており、多くは小さな病変しか採取できない。そのため、PowerSoil DNA Isolation Kit (MoBio) を用いて、PDD病変を丸ごとからtotal DNAを調整した。本手法では、ウシゲノムの混

入率が高くなることが予想された。そこで、まず小さいスケールでシーケンサデータを取得し (MiSeqシーケンサ)、サンプル中の非牛由来リードの割合を算出したところ、5-10%程度であることが分かった。その割合をもとにデータ量を計算し大型のシーケンサHiSeq2500によりデータ

(150bp x2, 1FC) を取得した。取得したデータは、牛由来リードを取り除いたのち、高精度ドラフトゲノム配列にマッピング解析した。各病変中の起因菌群の存在量は、クラスタごとにマッピングされたリード数とそのクラスタのゲノム配列長から、FPKMとして算出した (Table 2)。その結果、比較的共通して検出されたクラスタは18個になり、これらは真の起因菌群としてPDDの発症に

関与していると考えられた。このうち13クラスタは、完全長ゲノムの再構築に成功していた。

3.4 病変部における各起因菌の局在の特定

異なる農場および異なる時期に採取した4つの病変について、パラフィン包埋切片を作成した。今後、FFPE切片にはヘマトキシリン・エオジン染色を実施し、病理的診断を行う。2つの診断法による知見を照らしあわせ、PDD病変の病期 (急

Table 2 Status of metagenomic assembly and identification of dominant clusters.

Cluster ID	Ranking	Coverage	# scaffolds (≥10kb)	# scaffolds (≥1kb)	Total size (bp)	N50 length (bp)	Max length (bp)	N ratea (%)	GC content (%)	CheckM completeness (%)	FPKM メタゲノム解析用サンプル	FPKM HiSeq#1	FPKM HiSeq#2	FPKM HiSeq#3	FPKM HiSeq#4
66	1	1401.8	7	14	2,969,581	663,380	1,462,589	1.2	36.8	99.7	36.7	0.4	15.2	60.8	40.0
67	2	1217.4	1	1	2,907,490	2,907,490	2,907,490	1.0	37.1	91.1	31.3	8.7	32.7	1.4	0.9
63	3	1097.6	1	1	2,177,299	2,177,299	2,177,299	12.3	54.4	92.3	35.1	62.7	20.2	28.0	5.0
51	4	611.4	1	1	2,265,591	2,265,591	2,265,591	1.4	33.3	99.1	15.2	10.6	32.0	0.1	6.4
126	5	571.6	1	1	1,144,466	1,144,466	1,144,466	24.9	29.4	68.9	16.5	20.5	22.6	1.9	49.7
18	6	560.3	1	1	2,543,537	2,543,537	2,543,537	1.1	39.5	100.0	30.1	108.1	21.8	99.2	70.4
94	7	504.2	23	192	3,366,857	1,210,189	1,538,286	15.4	44.3	87.3	14.0	20.1	9.3	14.3	7.9
10	8	487.3	1	1	2,435,611	1,369,076	1,369,076	16.2	45.2	78.3	18.7	9.1	5.9	12.7	16.5
93	9	470.6	39	322	1,376,306	41,430	144,821	17.1	40.7	0.0	3.1	1.8	4.1	3.7	2.9
73	10	429.3	6	7	2,857,831	1,602,072	1,602,072	23.5	40.1	77.1	11.6	15.4	17.7	24.0	18.4
46	11	384.4	24	129	2,574,261	260,021	567,530	10.1	35.9	85.8	10.2	12.2	10.8	3.0	6.9
29	12	357.9	1	1	3,271,756	3,271,756	3,271,756	2.8	43.5	100.0	10.1	21.3	14.9	2.0	11.8
1	13	347.5	32	123	2,209,266	155,574	454,470	14.6	39.6	89.6	8.5	2.4	3.0	4.1	2.9
99	14	334.5	1	1	2,049,234	2,049,234	2,049,234	3.8	36.7	93.7	8.5	2.5	2.4	1.3	0.7
41	15	294.0	1	1	870,629	870,629	870,629	0.1	26.0	99.3	8.6	0.0	3.0	38.1	26.5
2	16	247.6	1	1	1,824,108	1,824,108	1,824,108	0.3	40.3	99.6	6.5	3.2	6.8	0.0	11.2
109	17	237.0	1	1	2,584,979	2,584,979	2,584,979	1.6	37.2	93.3	5.6	0.6	2.3	0.4	46.4
74	18	227.6	1	1	1,239,348	1,239,348	1,239,348	0.0	33.5	75.7	5.6	12.2	11.8	0.0	21.7
62	19	220.8	1	1	2,573,932	2,573,932	2,573,932	2.6	36.1	95.4	5.6	4.0	0.5	2.9	0.2
44	20	181.3	6	60	1,920,608	576,347	666,637	9.4	36.1	86.1	3.4	2.0	1.2	0.5	0.7
143	21	175.9	7	65	1,127,658	165,965	250,720	5.3	29.7	1.6	4.0	0.5	1.7	0.1	0.7
58	22	165.9	22	226	2,884,632	462,780	606,570	19.0	46.6	79.1	4.4	0.3	2.1	1.0	4.2
12	23	161.0	25	126	917,441	43,020	93,188	11.4	34.0	0.0	3.4	2.2	1.8	1.1	0.6
124	24	145.2	66	409	2,711,684	77,199	288,314	9.9	33.3	15.5	4.1	2.9	3.0	1.5	1.9
49-115	25	130.2	1	1	2,084,690	2,084,690	2,084,690	1.9	48.0	98.6	3.7	0.6	0.6	0.2	0.9
7	26	129.8	1	1	2,095,785	2,095,785	2,095,785	1.4	50.9	98.7	3.7	9.5	7.8	1.4	1.2
80	27	119.1	1	1	1,697,864	1,697,864	1,697,864	1.3	31.9	96.6	3.0	1.5	2.2	0.0	1.1
20	29	112.8	1	1	2,466,406	2,466,406	2,466,406	9.9	50.7	96.7	3.4	1.2	1.5	0.6	0.5
83	30	108.5	47	250	1,560,689	46,406	162,363	5.7	40.9	0.0	2.0	0.7	1.2	1.1	1.1
144	31	107.6	20	218	944,074	53,334	223,463	10.8	44.5	12.6	3.4	4.1	4.7	2.4	2.3

性期，慢性期）を決定する。今後，*in situ* hybridization解析を行い，各起因菌群の局在部位を明らかにする。各起因菌における病期による局在部位の変化（の有無）と病変部での起因菌同士の位置関係（共局在の有無）を明らかにし，PDD発症と進行過程における各菌種の役割や菌種間相互作用の有無などを検討する。現在，*in situ* hybridization解析のための各起因菌に特異的なプローブセットの設計を進めている。

4. 要 約

慢性期の比較的大きなPDD病変1つを用いて，細菌叢がエンリッチされたtotal DNAの調製に成功した。6つのシーケンスライブラリを調製し，シーケンス，アセンブリすることで，高精度ドラフトゲノム配列の決定に成功した。18個のクラスタは完全長ゲノム配列の再構築に成功した。さらに，大型シーケンサHiSeqを用いて，他の4つの病変由来丸ごとのシーケンス情報を大量に取得し，マッピング解析により真の起因菌群を決定した。どの病変でも比較的共通して検出されたクラスタは18個であった。うち13個のクラスタは完全長ゲノムが再構築されていた。これら情報基盤の整備によって，PDDおよび各菌種の性状解明が可能であり，未培養の起因菌群の分離培養につながると考えられ，PDDの発症に関わる複雑な菌種間相互作用を解明するための第一歩となる。また，起因菌群の迅速検出系の構築とそれを用いた

疫学調査から，PDD起因菌群の牛環境での常在部位も明らかにできる。これはPDD発症のリスク評価にも有用であると考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり，病変の採取にご協力いただきましたNOSAIみやざきの上松瑞穂様，橋本岳樹様に深謝いたします。

文 献

- 1) Read, D. H., Walker, R. L. : Papillomatous digital dermatitis (footwarts) in California dairy cattle : clinical and gross pathologic findings, *J Vet Diagn Invest*, **10**, 67~76, 1998.
- 2) Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., Misawa, N. : Identification of candidate pathogens of papillomatous digital dermatitis in dairy cattle from quantitative 16S rRNA clonal analysis, *Vet Microbiol*, **143**, 352~62, 2010.
- 3) Klitgaard, K., Boye, M., Capion, N., Jensen, T. K. : Evidence of multiple *Treponema* phylotypes involved in bovine digital dermatitis as shown by 16S rRNA gene analysis and fluorescence in situ hybridization, *J Clin Microbiol*, **46**, 3012~20, 2008.
- 4) Evans, N. J., Brown, J. M., Demirkan, I., Singh, P., Getty, B., Timofte, D., Vink, W. D., Murray, R. D., Blowey, R. W., Birtles, R. J., Hart, C. A., Carter, S. D. : Association of unique, isolated treponemes with bovine digital dermatitis lesions, *J Clin Microbiol*, **47**, 689~96, 2009.
- 5) Evans, N. J., Murray, R. D., Carter, S. D. : Bovine digital dermatitis : Current concepts from laboratory to farm, *Vet J*, **211**, 3~13, 2016.
- 6) Langmead, B., Salzberg, S. L. : Fast gapped-read alignment with Bowtie 2, *Nature Methods*, **9**, 357~9, 2012.

簡便・迅速なマダニによって媒介される牛の アナプラズマ症とバベシア症の診断法開発

Development of simple and rapid diagnosis of bovine anaplasmosis and babesiosis transmitted by tick

田仲 哲也¹・Galay Remil Ringgatong¹・山崎 渉²

(¹鹿児島大学共同獣医学部, ²宮崎大学農学部)

Tetsuya Tanaka¹, Galay Remil Ringgatong¹ and Ayumu Yamasaki²

(¹Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, ²Faculty of Agriculture, Miyazaki University)

Anaplasmosis and babesiosis causes great economic losses to animal industry worldwide and designated as an exotic infectious disease. Objective of the present study was to develop new gene diagnostic test against anaplasmosis and babesiosis to do molecular epidemiological survey on anaplasmosis and babesiosis in Philippines, and to contribute for strength of the quarantine system in Japan. As a result, new gene diagnostics was developed against bovine anaplasmosis and babesiosis. The epidemiological surveillance at the surround area of Manila in Philippines demonstrated high prevalence of anaplasmosis and babesiosis in these regions.

1. 目 的

唯一の栄養源が血液という偏性吸血性節足動物であるマダニは、魚類以外のすべての脊椎動物に寄生可能であり、長期間・大量の血液摂取を行うとともに、世界各地で家畜に甚大な被害を与えているアナプラズマ症やバベシア症などの多種多様な病原体の伝播に関与し得る、他に類を見ない優れた疾病媒介能を有している。このため、マダニとマダニ媒介性感染症が世界経済に与える脅威は甚大であり、その防除費用は世界全体で毎年約3兆円にも及ぶと報告されている¹⁾。したがって、マダニおよびマダニ媒介性疾病対策は人を含めた動物の健康と畜産業においては不可欠であり、より有効な対策法の開発は今や世界的な急務である。そのため、マダニ防除のためのワクチン・治

療薬開発に繋がる高度な研究にきわめて重要な情報をもたらすものとして、マダニやマダニ媒介性疾病を公衆衛生学的に再評価する疫学的研究が必要とされている。

特に、*Anaplasma marginale*によるアナプラズマ症や*Babesia bigemina*によるバベシア症は牛に重度の貧血・黄疸を主徴とする致死性感染症を引き起こし、日本では家畜（法定）伝染病として指定されている。これらの疾病は、2007年から2008年に沖縄県で散発的な発生があったが、現在、国内では根絶されている。しかし、*A. marginale*や*B. bigemina*は東南アジアを含む熱帯、亜熱帯を流行地域としているので、近年のグローバル化に伴う国内再侵入が危惧されている。日本にはこれらのリケッチアや原虫を媒介しうるマダニの存在が確認されているために、一度国内に侵入すれば

広く蔓延・浸潤する可能性が大きく、その清浄化は非常に困難と想定される。これらのPCR法による鑑別手法がすでに確立されているが、Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法を開発すれば、さらに簡易・迅速かつ正確な同定が可能となる。LAMP法はPolymerase Chain Reaction (PCR) 法よりも10倍から100倍高感度である。従来は病原体数の少ないサンプル（例えば初期感染個体）においては、診断に苦慮することがあったが（偽陰性）、LAMP法の開発によって、より正確な摘発・病原体鑑別が可能となる。

そこで、本研究では、PCR装置のような現場での特殊な整備などを必要としない遺伝子増幅法－LAMP法を開発することを最終目的とした。

2. 方 法

本研究は国内外におけるマダニ媒介性動物感染症の流行実態を明らかにし、診断・予防対策の向上と普及に資することを最終目標とし、以下のように実施した。まず、GenBankから、アナプラズマ・バベシアに特異的な塩基配列情報を入力し、それぞれを同定できるPCR・LAMPプライマーを設計した。すなわち、研究代表者が保有するアナプラズマ・バベシア陽陰性DNAストックを使用して、設計したプライマーの特異性や検出感度を精査し、PCR・LAMP法による検出系を確立した。アナプラズマについては*A. marginale*を、バベシアについては*B. bigemina*ならびに*B. bovis*を適切に検出できるPCR・LAMPプライマーを設計した。そのうえで、既存のPCR法による検出系と判定所要時間・検出感度・特異性の比較により、有用性を評価した。このように、現地調査によってフィリピン側から提供されたDNAストックについて、LAMP法に向けた基礎診断法を構築した。

3. 結果と考察

3.1 PCR法によるアナプラズマ・バベシアの検出

フィリピンマニラ周辺地域（カラバルソン地方）における農場から250頭の乳・肉牛の血液を採取し、DNAを抽出後、マダニ媒介性感染症の流行実態をnested PCR法で調べた。その結果、アナプラズマ種が90%、バベシア種が20%、タイレリア種が9%の感染率であった。それら陽性検体についてPCR産物のDNA配列を決定したところ、*A. marginal*, *B. bigemina*, *B. bovis*, *Theileria orientalis*, *T. buffeli*の遺伝子と高い相同性が認められた。

これらの結果から、フィリピンの乳・肉牛はマダニ媒介性病原体を高い確率で保持していることが分かった。

3.2 LAMP法によるアナプラズマ・バベシアの検出

フィリピンマニラ周辺地域における農場から採取した乳・肉牛の血液のうち、PCR陽性DNAストックを用いて、LAMP法によるアナプラズマならびにバベシアの検出方法を検討した。その結果、*Anaplasma marginal*については写真のようにPCR陽性DNAストックを検出することに成功した（Fig. 1 No.1～3）。

現在、*Babesia bigemina*, *Babesia bovis*については、LAMP法の確立に向けて条件検討を行っているところである（LAMP用のプライマーは構築済み）。

本研究において、牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症に対するPCR法やLAMP法などの遺伝子診断法が開発された。また、これらの診断法を用いたフィリピンマニラ周辺地域の牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の疫学調査により、これらの地域で高い感染率が認められた。今後、



Fig. 1 The detection of *Anaplasma marginal* by LAMP method. No.1~3 : Positive DNA samples by PCR, No.4 : Negative DNA sample by PCR, No.5 : Negative control (Water)

PCR法やLAMP法などの診断技術や得られた情報が動物検疫体制の強化に貢献することが期待される。

4. 要 約

牛のアナプラズマ症やバベシア症は、世界規模で甚大な被害を与えており、海外悪性伝染病に指定されている。本研究は、新たな診断法を開発するとともに、フィリピンにおける牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の感染状況を明らかにし、日本のアナプラズマ症とバベシア病に対する

検疫体制強化に貢献することを目的として行われた。その結果、牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症に対する新規の遺伝子診断法が開発された。これらの診断法を用いたフィリピンマニラ周辺地域における牛のアナプラズマ症ならびにバベシア症の疫学調査により、高い感染率が認められた。

文 献

- 1) Walker, A. R. : Eradication and control of livestock ticks : biological, economic and social perspectives, *Parasitology*, 138, 945~959, 2011.

消化管寄生性コクシジウム, *Eimeria kriegsmanni* における発育休止期の解析

Analysis of the resting stage in the life cycle of the intestinal coccidian
parasite, *Eimeria kriegsmanni*

松 尾 智 英

(鹿児島大学共同獣医学部寄生虫病学分野)

Tomohide Matsuo

(Laboratory of Parasitology, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

Eimeria spp. cause serious damages especially in cattle and poultry worldwide and their infection is known to be self-limited. However, we clarified that only 2nd generation meronts were remained in the epithelial cells of the caeca after end of oocyst shedding in a mouse intestinal coccidium, *Eimeria kriegsmanni*, which had not been known in the other eimerian parasites. In the present study, in order to investigate reactivation of their development from remained 2nd generation meronts under suppression of host immunity, we administrated the dexamethasone for artificial immunosuppression with experimental infection and estimated the number of oocyst shedding. As the results, reactivation of oocyst shedding was confirmed once even in the non-administrated immunocompetent mice group. On the other hand, in the dexamethasone treatment groups, two or three oocyst shedding periods were observed and the number of shed oocysts was larger than that of immunocompetent mice although relatively differences correlated with the schedule of dexamethasone administration were confirmed. The number and period of oocyst shedding was more increased and extended in innate immunodeficient (nude and SCID) mice. Additionally, during the end of 1st patent period and the beginning of 2nd oocyst shedding period, it was observed histologically that their life cycle restarted from remained 2nd generation meronts. These results suggested that restart of development of zoites was induced by suppression of host immunity and 2nd generation meronts surviving in the epithelium of the caeca were source of the resumption of oocyst shedding.

1. 目 的

世界中に分布し、特に牛および鶏において大きな被害をもたらしている*Eimeria*属原虫は宿主の消化管上皮に寄生し、激しい下痢症を引き起こして宿主を衰弱させることで生産性を低下させ、また時に致死的となるコクシジウム症を引き起こ

す^{1, 2)}。これらに対しては一定の効果のある治療薬や一部の種に対するワクチンはすでに存在し^{3, 4)}、重篤な場合は死に至るケースがあるものの、軽症ならば一定期間で自然治癒する一過性の感染と考えられてきた。そのため新たな研究が停滞しているのが現状である。しかしながら、治療薬・ワクチンの安全性やコストはもちろん、薬剤

耐性株の出現など新たな問題も知られるようになってきた^{5, 6)}。そして何より*Eimeria*属原虫はいまだ各地で蔓延しており、これらによるコクシジウム症を制圧したとは言い難い現状である。

一方、*Eimeria*属原虫は*in vitro*培養によって生活環を完全に再現できず、また牛のような大型動物を用いた感染実験は現実的に困難であるため、申請者はマウス寄生性*Eimeria kriegsmanni*^{7, 8)}を感染モデルとして基礎研究を続けてきた^{9~11)}。その結果、これまで*Eimeria*属原虫感染は「オーシストの経口摂取→無性生殖ステージ→有性生殖ステージ→オーシスト排泄」という生活環を経て、オーシスト排泄終息後には虫体は宿主体内から排除される一過性のものであると信じられてきた常識を覆す新知見を得た。すなわち、無性生殖期の1ステージ、第2代メロントの虫体のみがオーシスト排泄終息後も長期間、寄生部位に留まっていることを確認した¹⁰⁾。このステージの虫体は宿主が感染を耐過して抵抗性を獲得した後だけでなく、オーシスト排泄を完全に抑制することのできる治療薬の投薬下でも残留していることが確認されている。このことは、これまで「治癒」したと考えられていた宿主において感染が継続していることを意味し、宿主の健康状態悪化によって症状が再発する可能性を示唆する。そこで、この潜在的な感染の意義と特定のステージの虫体が残留を可能にするメカニズムを解明する第一歩として、本研究においては、この残留虫体の役割を明らかにするため、宿主免疫抑制または不全状態における虫体の発育の変化をオーシスト排泄状態の評価によって詳細に調べた。

2. 方 法

2.1 実験動物と寄生虫

5週齢、雌のBALB/cマウス、免疫不全モデルであるSCIDマウスおよびnudeマウスが供試され

た。供試された*Eimeria kriegsmanni*は鹿児島大学共同獣医学部寄生虫病学研究室にてマウスを用いて継代維持されている。オーシストは感染マウスの糞便から集められ、25℃、2%重クロム酸カリウム水溶液中でスポロゾイトを形成させた後、使用まで4℃で保管した。本動物実験は鹿児島大学における所定の認可の下で行われた。

2.2 免疫抑制実験

残留虫体の発育再活性化を調べるため、宿主免疫抑制状態での感染実験を行った。免疫抑制剤としてデキサメタゾンを使用し、これを滅菌水に1 mg/mlとなるよう懸濁し、100 μ l/匹/日で皮下投与を行った。デキサメタゾン投与日程により次のように実験群（各5匹）を設定した：感染2日前から第2代メロントの宿主盲腸上皮内における存在が確認されている最長の期間である感染後56日目まで（-2-56DXM群）、感染2日前から感染後一度オーシスト排泄が終了する15日目まで（-2-15DXM群）、感染後15日目から感染後56日目まで（15-56DXM群）、および再感染を行ってもほとんどオーシスト排泄に至らないことが明らかな初感染後21日目から感染後56日目まで（21-56DXM群）、さらに、免疫不全モデルであるSCIDマウスの群（SCID群）とnudeマウス群（nude群）、コントロールとして感染前2日から感染後56日目まで100 μ l滅菌水を皮下投与した群（DW群）も設定した。

2.3 感染の評価

すべてのマウスに 2.0×10^2 個/匹でオーシストを経口的に接種した。感染状態は、体重の推移およびオーシスト排泄数（OPG：oocysts per gram of feces）を毎日計測して評価した。

3. 結果と考察

*Eimeria*属原虫は、宿主体内において無性生殖ステージと有性生殖ステージを経てオーシストを

形成する単一宿主性の発育環をもつ。無性生殖ステージでは、経口摂取されたオーシストに内包されるスポロゾイトが寄生部位である腸管上皮細胞に侵入し、メロゾイトの増殖過程であるメロントを形成、それが崩壊し放出されたメロゾイトが他の宿主細胞に再び侵入するというサイクルを、種によって規定の回数繰り返す。*E. kriegsmanni*は盲腸上皮細胞に寄生し、第4代メロントまで形成していた^{7, 10)}。この無性生殖ステージ後の有性生殖ステージを経てオーシスト排泄に至る生活環により、*Eimeria*属原虫の感染はこれまで「一過性の自己治癒する感染」と信じられてきた。また、初感染耐過後は獲得免疫を得て再感染に対して抵抗性を示すことはよく知られており^{12, 13)}、*E. kriegsmanni*においても再感染への抵抗性は確認されている⁵⁾。

各実験群の体重の推移がFig. 1に、オーシスト排泄数の推移がFig. 2に、それぞれ示されている。マウスの体重はデキサメタゾン投与期間に相関して増加が停止しているが、実験期間を通して著しい衰弱などは認められなかった。DW群、-2-15DXM群および21-56DXM群では2回のオーシスト排泄期、すなわち1度のオーシスト排泄の再開が確認された。また、このオーシスト排泄の陰性期間における組織学的観察により、感染部位において第2代メロントしか観察できないわずかな期間の後、第3代メロント以降の発育ステージが再出現するという現象が観察された (Table 1)。このことから、残留第2代メロントが起点となって発育の休止と再開を繰り返していることが強く示唆された。さらに、同じ2回のオーシスト排泄期を示したこれら3群を比較しても、DW群および21-56DXM群はほぼ同様だったのに対し、-2-15DXM群では2回目のオーシスト排泄数は明らかに多かった。また、-2-56DXM群においては3度のオーシスト排泄期、すなわち2度の

オーシスト排泄の再開が確認された。第2オーシスト排泄期のOPG値のピークは 5.7×10^6 に達し、排泄期間は8日間、第3オーシスト排泄期のOPG値のピークも 1.3×10^5 と高値であり、デキサメタゾン投与群では最もオーシスト排泄数が多かった。同様に3度のオーシスト排泄期が確認された15-56DXM群においては、2回目のオーシスト排泄期のOPG値のピークはコントロール群と同様であったが期間が長く、しかしながら3回目のオーシスト排泄期においてはごくわずかな排泄が2日間観察されたのみであった。この差異には明らかにデキサメタゾン投与期間による宿主免疫状態の違いが影響していると考えられた。

一方、先天性免疫不全モデルであるnude群とおよびSCID群はcontrol群とほぼ同様に2回目のオーシスト排泄期間が終了したが、その後、観察期間の感染後56日までの長期にわたる3回目のオーシスト排泄期間が認められた。この予想を大きく上回る排泄数および期間は、先天的に無胸腺でT細胞が欠損したnudeマウス¹⁴⁾、およびDNA修復異常によりB細胞とT細胞の遺伝子再構成が行えないために成熟したB細胞とT細胞を欠損したSCIDマウス^{15, 16)}における実験的免疫抑制より高度な免疫不全状態によるものであることは明らかである。一方、免疫正常マウス群においてはオーシスト排泄が認められない感染25日以降のこの長期にわたるオーシスト排泄期において、周期的にOPG値が増減する現象も確認された。これもまた第2代メロントにおける発育の休止と再開に基づいていることが強く示唆された^{9, 10)}。

以上のことから、すべての感染マウスで認められた1回目と2回目のオーシスト排泄期の分割は宿主の免疫状態によらず起こる現象であることが示された。それに対し、その後の長期のオーシスト排泄は免疫抑制または不全状態で認められた。すなわち、免疫正常マウスでは再感染に抵抗性を

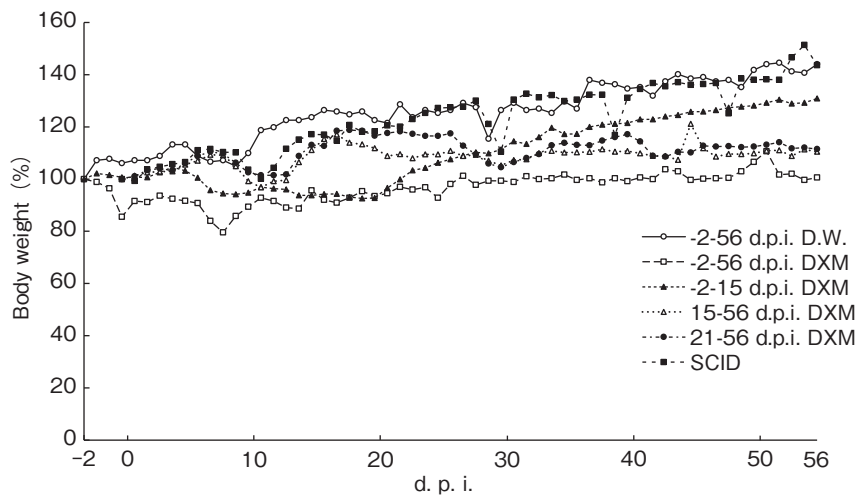


Fig. 1

Change of the average body weight of mice of each experimental group administrated Dexamethasone (DXM). The body weight on 2 days before the infection was shown as 100%. Body weight of DW groups tended to increase until end of experiment. Body weight gain of DXM groups was suppressed only during administration. DXM treatment clearly affected changes of body weight. d.p.i., days post infection.

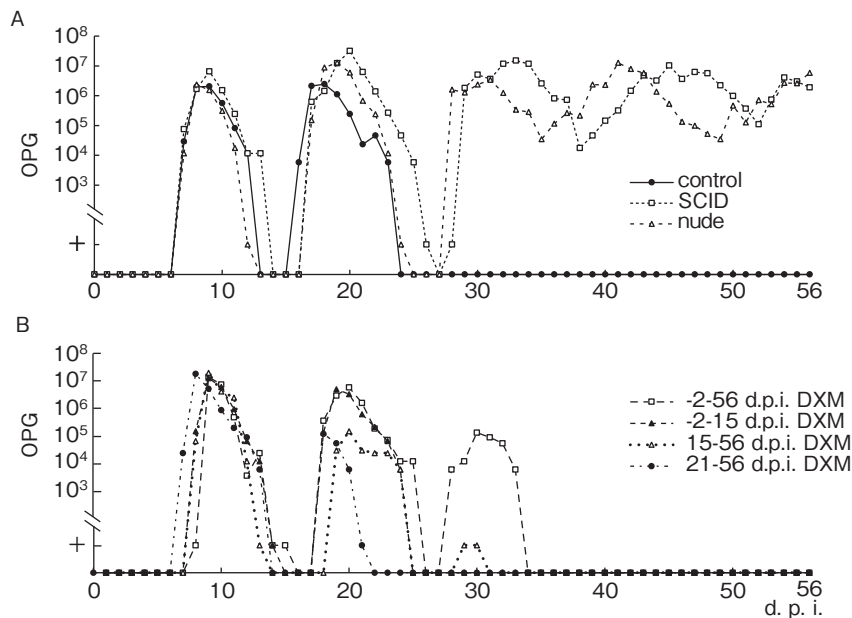


Fig. 2

Oocyst shedding of DW group and immunodeficient mouse (SCID and nude) groups (A), and four groups treated by DXM (B). (A) Twice oocyst shedding periods were confirmed in control (DW) group. On the other hands, three times of oocyst shedding periods were confirmed and 3rd oocyst shedding were remarkably prolonged in SCID and nude groups. (B) Third oocyst shedding period were also confirmed in -2-56 and 15-56 DXM groups but only 2 oocyst shedding periods in -2-15 and 21-56 DXM groups. The number of shed oocysts was clearly different with host immune status. + : Oocyst positive by sugar flotation method. OPG : oocysts per gram of feces ; d.p.i., days post infection.

Table 1 Developmental stages of *Eimeria kriegsmanni* in the caeca of host mice at 14-17 days after primary infection

	14 d.p.i.	14.5 d.p.i.	15 d.p.i.	15.5 d.p.i.	16 d.p.i.	16.5 d.p.i.	17 d.p.i.
1st generation meront	-	-	-	-	-	-	-
2nd generation meront	++	++	++	++	+	+	+
3rd generation meront	-	++	+	++	++	++	+
4th generation meront	-	+	++	+++	+++	+++	++
Microgametocyte	-	-	-	-	+	+++	+
Macrogametocyte	-	-	-	-	+	+++	+
Zygote	-	-	-	-	-	+	+

+, - Meronts or their clusters were found or not ; +++, >10 ; ++, 5-10 ; +, <5 meronts or their cluster by light microscopy (×200). d.p.i., days post infection

獲得した時期に、免疫抑制または不全状態による虫体の発育の活性化が引き起こしているのであろう。それに対して、免疫不全モデルマウスで認められた長期のオーシスト排泄期において、一定間隔で発育の休止と再開を繰り返す現象は、宿主免疫の影響ではなく、虫体の独自の発育周期によるものではないかと予想される。そしてこれらすべての現象は、宿主免疫や薬剤に抵抗性であると推察される第2代メロントの残留によって可能となる潜在的感染継続の戦略だと考えられる。この第2代メロントの特殊な性状および感染に伴う宿主免疫の変化をより詳細に調べることは、*Eimeria* 属原虫感染の確実な予防・治療法開発に貢献できるであろう。

4. 要 約

Eimeria 属原虫は世界各地において、特に牛や鶏における深刻な被害を引き起こしているが、その感染は一過性の自己治癒するものであることが知られてきた。しかしながら、我々はマウス寄生性コクシジウム *Eimeria kriegsmanni* において、オーシスト排泄終息後も第2代メロントだけが寄生部位である盲腸上皮内に残留していることを明らかにした。これは他の *Eimeria* 属原虫では知られていなかった現象であった。そこで、本研究において、宿主免疫抑制下での残留第2代メロント

の発育再開を調べるために、実験的免疫抑制のためのデキサメタゾン投与した感染実験を行い、オーシスト排泄状況を精査した。その結果、デキサメタゾン非投与の免疫正常マウスにおいても1回の発育休止、再開が起こることが確認された。一方、デキサメタゾン投与群では2回または3回の発育休止と再開がみられ、オーシスト排泄数は明らかに免疫正常マウスよりも多かった。また、この発育休止と再開の回数およびオーシスト排泄数の増加は、デキサメタゾンの投与スケジュールによって変動した。さらに、先天性免疫不全モデルマウス (SCIDおよびnudeマウス) において、オーシスト排泄期間および排泄数は、それぞれさらに延長と増加が認められた。さらに、第1オーシスト排泄期と第2オーシスト排泄期の間における組織学的観察によって、このオーシスト排泄の休止と再開は、第2代メロントを起点にした発育環の休止と再開に基づいていることが確認された。これらの結果は、虫体の発育再開が宿主免疫の抑制によって引き起こされ、それによるオーシスト排泄再開は寄生部位で生存している第2代メロントが起点となっていることが強く示唆された。

文 献

- 1) Dauschies, A., Najdrowski, M. : Eimeriosis in cattle : current understanding, *Journal of Veterinary Medicine*, 52, 417~427, 2005.

- 2) Williams, R. B. : A compartmentalized model for the estimation of the cost of coccidiosis to the world's chicken production industry, *International Journal for Parasitology*, **29**, 1209~1229, 1999.
- 3) Philippe, P., Alzieu, J. P., Taylor, M. A., Dorchies, P. : Comparative efficacy of diclazuril (Vecoxan®) and toltrazuril (Baycox bovis®) against natural infections of *Eimeria bovis* and *Eimeria zuernii* in French calves, *Veterinary Parasitology*, **206**, 129~137, 2014.
- 4) Wallach, M. : Role of antibody in immunity and control of chicken coccidiosis, *Institute for the Biotechnology of Infectious Diseases*, **26**, 382~387, 2010.
- 5) Chapman, H. D., T. K. Jeffers, T. K. : Vaccination of chickens against coccidiosis ameliorates drug resistance in commercial poultry production, *International Journal for Parasitology*, **4**, 214~217, 2014.
- 6) Wunderlich, F., Al-Qurashiy, S., Steinbrenner, H., Sies, H., Dkhil, M. A. : Towards identifying novel anti-*Eimeria* against : trace elements, vitamins, and plant-based natural products, *Parasitology Research*, **133**, 3547~3556, 2014.
- 7) Matsui, T., Fujino, T., Kobayashi, F., Morita, T., Imai, S. : Life cycle of *Eimeria kriegsmanni*-like coccidium in the mouse (*Mus musculus*), *Journal of Veterinary Medical Science*, **68**, 331~336, 2006.
- 8) Takeo, T., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Maeda, H., Kusakisako, K., Matsui, T., Mochizuki, M., Matsuo, T. : Molecular and phylogenetic characterizations of an *Eimeria kriegsmanni* Yakimoff & Gouseff, 1938 (Apicomplexa : Eimeriidae) mouse intestinal protozoan parasite by partial 18S ribosomal RNA gene sequence analysis, *Parasitology International*, **63**, 627~630, 2014.
- 9) Hashimoto, K., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Endo, K., Umemiya-Shirafuji, R., Matsui, T., Matsuo, T. : Host specificity and *in vivo* infectivities of the mouse coccidian parasites *Eimeria kriegsmanni*, *Acta Parasitologica*, **59**, 337~342, 2014.
- 10) Ono, Y., Matsubayashi, M., Kawaguchi, H., Tsujio, M., Mizuno, M., Tanaka, T., Masatani, T., Matsui, T., Matsuo, T. : Course of induced infection by *Eimeria kriegsmannni* in immunocompetent and immunodeficient mice, *Parasitology Research*, **115**, 211~215, 2016.
- 11) Takeo, T., Tanaka, T., Matsubayashi, M., Tsujio, M., Umemiya-Shirafuji, R., Tsuji, N., Fujisaki, K., Matsui, T., Matsuo, T. : Evaluation of *Eimeria kriegsmanni* as a murine model for testing the efficacy of anti-parasitic agents, *Acta Parasitologica*, **61**, 195~200, 2015.
- 12) Mesfin, G. M., Bellamy, J. E. C. : Effects of acquired resistance on infection with *Eimeria falciformis* var. *pragensis* in mice, *Infection and Immunity*, **23**, 108~114, 1979.
- 13) Rose, M. E., Wakelin, D., Hesketh, P. : Gamma interferon controls *Eimeria vermiformis* primary infection in BALB/c mice, *Infection and Immunity*, **57**, 1599~1603, 1989.
- 14) Flanagan, S. P. : 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse, *Genetical Research*, **8**, 295~309, 1966.
- 15) Bosma, G. C., Custer, R. P., Bosma, M. J. : A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse, *Nature*, **301**, 527~530, 1983.
- 16) Kirchgessner, C. U., Patil, C. K., Evans, J. W., Cuomo, C. A., Fried, L. M., Carter, T., Oettinger, M. A., Brown, J. M. : DNA-dependent kinase (p350) as a candidate gene for the murine SCID defect, *Science*, **267**, 1178~1183, 1995.

鶏に対する高効率・低負荷な新規サルモネラ粘膜ワクチンの開発

Development of novel salmonella mucosal vaccine with high efficiency and fewer side effects on chickens

谷 浩 行

(大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻獣医内科学研究グループ)

Hiroyuki Tani

(Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

Outer membrane vesicle (OMV) is released spontaneously during growth by many Gram-positive and -negative bacteria and has great potential as a mucosal delivery vehicle for use as a vaccine carrier. The purpose of this research is to provide basic information for applying the OMV in the development of a novel salmonella mucosal vaccine with high efficiency and few side effects on chickens.

OMV designed to express a candidate vaccine antigen in the lumen is useful for vaccine carrier because a recombinant protein in the lumen of OMV is reported to be very stable with respect to temperature changes and chemical substances. In this study, we could newly constructed expression plasmid vector designed to express a fusion protein consisting of *E. coli* lipoprotein signal sequence and partial major outer membrane protein A for anchoring a recombinant protein inside outer membrane of non-pathogenic *E. coli*.

Most of reports for separation of OMV are using ultracentrifugation. However, ultracentrifugation is expensive, labor-intensive, and not easily performed outside of research facilities. Therefore, we studied applying the aqueous two-phase extraction method for the development of efficient separation method of OMV. Aqueous two-phase extraction method has already been used for exosome separation and purification. High amount of OMV could be separated without affecting the antigenicity from non-pathogenic *E. coli* displaying *Salmonella* candidate vaccine antigen on the surface by the modified aqueous two-phase extraction method.

1. 目 的

我が国の食料自給率は低下の一途を辿り、先進国の中で最も低い水準を示している。特に畜産物で著しい中、鶏肉、鶏卵はいまだそれぞれ65%および97%を維持する（平成28年度 農林水産省）。

しかし、飼料自給率を考慮するとそれぞれ9%および13%と低値を示しており、なお一層の生産効率の向上が必要である。サルモネラ属菌を原因とする食中毒は、日本国内においていまだ年間1,000人以上もの患者数が報告されている（平成29年度 厚生労働省）。*Salmonella* Enteritidis (SE) やS.

Typhimurium (ST) は主に鶏肉、鶏卵、およびその加工品を介して感染することから、衛生環境の向上が重要とされるが、その伝搬経路はきわめて多様であり完全な防除が難しいため、ワクチン接種の併用による汚染防御が推奨されている。現在、日本で認可されている不活化ワクチンは、弱毒化生ワクチンに比べ、効果が弱く¹⁾、さらに、細菌の感染防御に重要な粘膜免疫の誘導には効果が低い。鶏は生後2～3週間以上経過すると無症候性キャリアとなる可能性があり、汚染卵を長期に産出するため、早期に、SEの定着自体を阻止し得る粘膜ワクチンの開発が強く望まれている。また、不活化ワクチンに含まれるLPSやアジュバントは、強い副作用を示すことが知られており、世界的な畜産動物の福祉に対する意識の向上から、動物に対する低負荷のワクチンの開発が急務である。

細菌外膜小胞 (OMV) は、生菌が放出する外膜で包まれた袋であり、化学的処理あるいは遺伝子組換え技術を用いることにより、内腔に薬剤や組換えタンパク質を内封し得る。さらに、それ自体がアジュバント効果を示すことから、近年、それらの送達手段として注目されている²⁾。培養液中に放出されるため、比較的簡便な物理的手法を用いて単離精製が可能であることから、大量に、低コストで作製することが可能であり²⁾。特に大量の抗原を必要とする家畜のワクチンとして適していると考えられる。OMVのワクチン応用に関する研究は、主にヒトを対象として盛んに行われている。現在、ヒト用の髄膜炎菌血清群BのOMVを使用したワクチンが開発され、すでに米国、欧州を中心に認可・利用されている (Bexsero[®], ノバルティス)。一方、家畜を対象としたOMVワクチンの開発はヒトと比較すると遅れており、特に家禽を対象としたOMVワクチンに関する報告はいまだ数少ない^{3, 4)}。本研究で

は、非病原性大腸菌OMVの内側にSE抗原を固定・発現する技術の開発、および鶏への粘膜免疫賦活効果について検討することを目的とした。

2. 方 法

2.1 アンカータンパク質発現プラスミドベクターの構築

組換えタンパク質を大腸菌外膜内側 (ペリプラズム腔側) に固定・発現するアンカータンパク質として、既報の大腸菌のゲノム情報をもとに (Genbank accession No. NC_000913, CP028306), 大腸菌リポタンパク質のシグナルシーケンス (Lpp), およびOMVの産生量を増加させる外膜の不安定化を目的として、Lppにそれぞれ大腸菌主要外膜タンパク質 (OmpA) の46-88, 46-132, あるいは46-174アミノ酸残基、およびC末端にヒスチジンタグタンパク質をコードする遺伝子配列を連結し、pBAD30プラスミドベクターに挿入した4種の発現プラスミドベクターを構築した (Fig. 1A)。

2.2 大腸菌外膜内側 (ペリプラズム腔側) への組換えタンパク質の発現の確認

組換えタンパク質の発現には *E.coli* UT5600株 (F^- *ara-14 leuB6 secA6 lacY1 proC14 tsx-67 Δ (ompT-fepC) 266 entA403 trpE38 rfbD1 rpsL109 xyl-5 mtl-1 thi-1*) を用い、すべての培養はアンピシリン (100 μg/mL) を添加した Luria-Bertani (LB) 培養液およびLB寒天培地を用いて、37℃, 150rpmで行った。2.1で構築した発現プラスミドベクターをそれぞれ *E.coli* UT5600株に形質転換し、L-アラビノースを最終濃度0.2%となるように加え、発現誘導した。組換えタンパク質の局在を明らかにするため、発現誘導後の大腸菌菌体から、Lobosら⁵⁾ および Santiviagoら⁶⁾ の方法を参考に外膜を分離した。3時間発現誘導後の菌液を遠心分離し、10mM

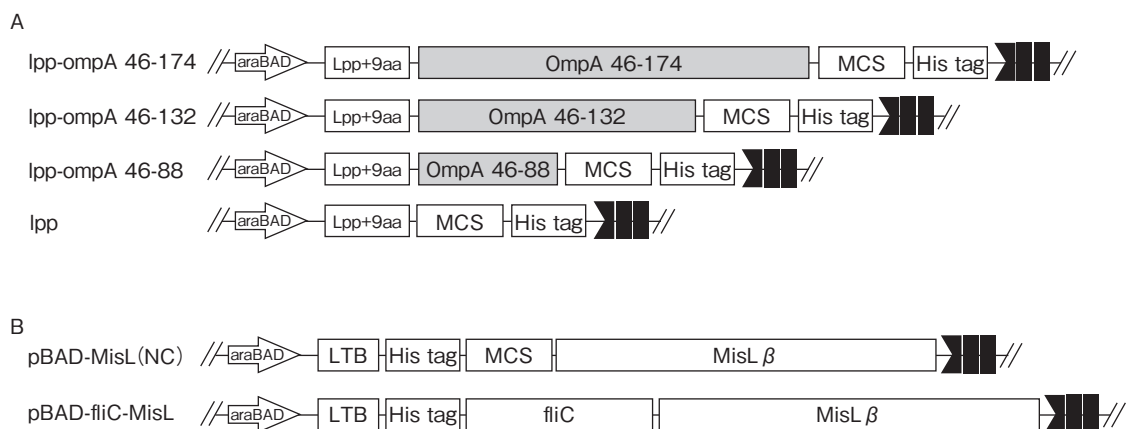


Fig. 1 Gene maps of recombinant protein expression vectors used in this study. Abbreviations : araBAD, araBAD promoter ; lpp+9aa, gene encoding the leader peptide and the first nine amino acids of the major *E. coli* lipoprotein ; LTB, gene encoding the heat-labile enterotoxin chain B (LTB) signal sequence ; MCS, multicloning site.

Tris-HCl (pH8.0) で洗浄, 再懸濁後, 超音波破碎機を用いて菌体を破碎した。破碎した菌液を 4℃, 8,000 × g で 5 分間遠心し, 上清の一部を大腸菌の粗抽出物 (crude extract ; CE), 残りの上清をさらに 4℃, 13,000 × g で 30 分間遠心し, 上清を可溶性画分 (soluble fraction ; SF) として -80℃ で保存した。ペレットに外膜溶出溶液 (10mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 2 % トリトン X-100) を添加し, 37℃ で 30 分間インキュベート後, 4℃, 13,000 × g で 45 分間遠心した。ペレットを 10mM Tris-HCl で洗浄後, 得られた沈殿物に 50 μ l の 2 % SDS/Tris-HCl を添加して, 4℃, 一晚静置することにより完全に溶解させ, 大腸菌外膜 (outer membrane ; OM) として -80℃ で保存した。抽出した各画分について, SDS-PAGE および抗 His tag 抗体を用いた western blotting により解析した。

2.3 大腸菌 OMV の分離・精製条件の検討

2.2 で作製した発現プラスミドベクターの組換えタンパク質の発現効率が予想以上に低く, OMV の精製条件を検討するには, 感度および精度が十分ではない可能性が予想されたため, 研究

計画を変更し, 組換えタンパク質の大腸菌表層ディスプレイ系を用いて OMV の分離・精製条件の検討を行った。本発現系は著者らの研究グループで構築され, 大腸菌の外膜外側 (外膜表層) に任意の組換えタンパク質を発現し得ることをすでに報告しており⁷⁾, 発現した組換えタンパク質は, 特殊な処理を必要とせず, 一般的な免疫学的手法を用いて容易に検出することができる。この発現プラスミドベクターは, pBAD30 プラスミドベクターをベースに, アンカータンパク質として ST の autotransporter MisL の β 領域, その MisL のシグナルペプチドとして既報の heat-labile enterotoxin chain B のシグナルペプチドが組み込まれている (**Fig. 1B**)。本研究では, 大腸菌表層に SE のワクチン候補抗原である fliC を発現する発現プラスミドベクターを用いた。また, OMV の分離・精製には, 動物細胞から放出されるエクソソームやウイルスの分離に用いられる水性二層分配法を応用した。

OMV の産生条件は Schroeder ら⁸⁾ の報告を参考に以下のように設定した。大腸菌表層に SE のワクチン候補抗原である fliC を発現する発現プラ

スミドベクター (pBAD-filC-MisL) を *E.coli* UT5600に形質転換し、L-アラビノースを最終濃度0.2%となるように加え、発現誘導した。OMVの産生に最適な発現誘導時間を検討するために、発現誘導後、3, 6, および10時間培養した。培養後、ゲンタマイシン (最終濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を添加し、37°Cで30分間振盪培養した。培養液を回収し、4°C、4,500 $\times$ gで30分間遠心した後、上清を回収し、0.20 μm シリンジフィルターを用いて濾過滅菌した。浦島らの報告を参考に⁹⁾、0.2容量のポリエチレングリコール溶液 (30% PEG6000, 3M NaCl) を添加し、4°Cで16時間静置した。静置後のサンプルを4°C、9,360 $\times$ gで60分間遠心してOMVを沈殿させ、PEG洗浄溶液 (5% PEG6000, 0.5 M NaCl) に再懸濁した後、同条件で遠心した。沈殿を20mM Tris-HCl (pH8.0) で懸濁し、限外濾過 (MWCO 100,000) を2度行うことで低分子量タンパク質とPEGを除去し、OMVを精製した。各発現誘導時間におけるOMV産生量は、沈殿のタンパク質濃度を測定することで比較した。精製したOMVについて、形態学的変化を透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて観察するとともに、Protease accessibility assayを用いて組換えタンパク質の発現および局在について検証した。Protease accessibility assayはKimら¹⁰⁾の報告を参考に行った。発現誘導後10時間の形質転換体から精製したOMV9 μg を20mM Tris-HCl (pH8.0) に懸濁し、それぞれバッファのみ、SDS (終濃度1%), proteinase K (PK: 終濃度0.1mg/mL), あるいは同一濃度のPKとSDSを混合して加え、37°Cで30分間インキュベートした。プロテアーゼ阻害剤を添加し、PKを完全に不活化した後、SDS-PAGE、抗SE抗体を用いたwestern blottingにより解析した。

3. 結果と考察

3.1 大腸菌外膜内側 (ペリプラズム腔側) への組換えタンパク質の発現の確認

構築した4種の発現プラスミドベクターの形質転換体について、発現誘導3時間後の全菌体を用いたSDS-PAGE、および抗His tag抗体を用いたwestern blottingを行った結果をFig. 2Aに示した。lpp-ompA 46-174, lpp-ompA 46-132, およびlppプラスミドベクターの形質転換体において、いずれも予想される分子量のバンドが検出された。一方lpp-ompA 46-88プラスミドベクターの形質転換体では、バンドは検出されなかった。バンドが検出された3種の形質転換体の、それぞれCE, SF, OMについてSDS-PAGE、および抗His tag抗体を用いたwestern blottingを行った結果をFig. 2Bに示した。lpp-ompA 46-174およびlpp-ompA 46-132の形質転換体において、外膜画分にバンドが検出された。以上の結果から、lpp-ompA 46-174およびlpp-ompA 46-132発現プラスミドベクターは、大腸菌の外膜の内側に組換えタンパク質を固定・発現し得る可能性が示唆された。

3.2 大腸菌OMVの分離・精製条件の検討

各誘導時間の培養液から得られたOMVのタンパク質量は3時間と比較して6および10時間で増加し、6時間では有意な増加が見られた (Tukey Kramer $p < 0.05$) (Fig. 3A)。発現誘導後10時間の培養液から得られた精製物の総タンパク質量は、超遠心法を用いた既報と比較してもほぼ同等の回収効率であった⁸⁾。TEMを用いてOMVの形態観察を行ったところ、すべての誘導時間においてOMVを示唆する球状で二重膜構造を示す小胞が確認され、大きさはおおよそ10~100nmであった (Fig. 3B)。最も多くのOMVが確認されたのは発現誘導後、10時間であった。精製したOMVにつ

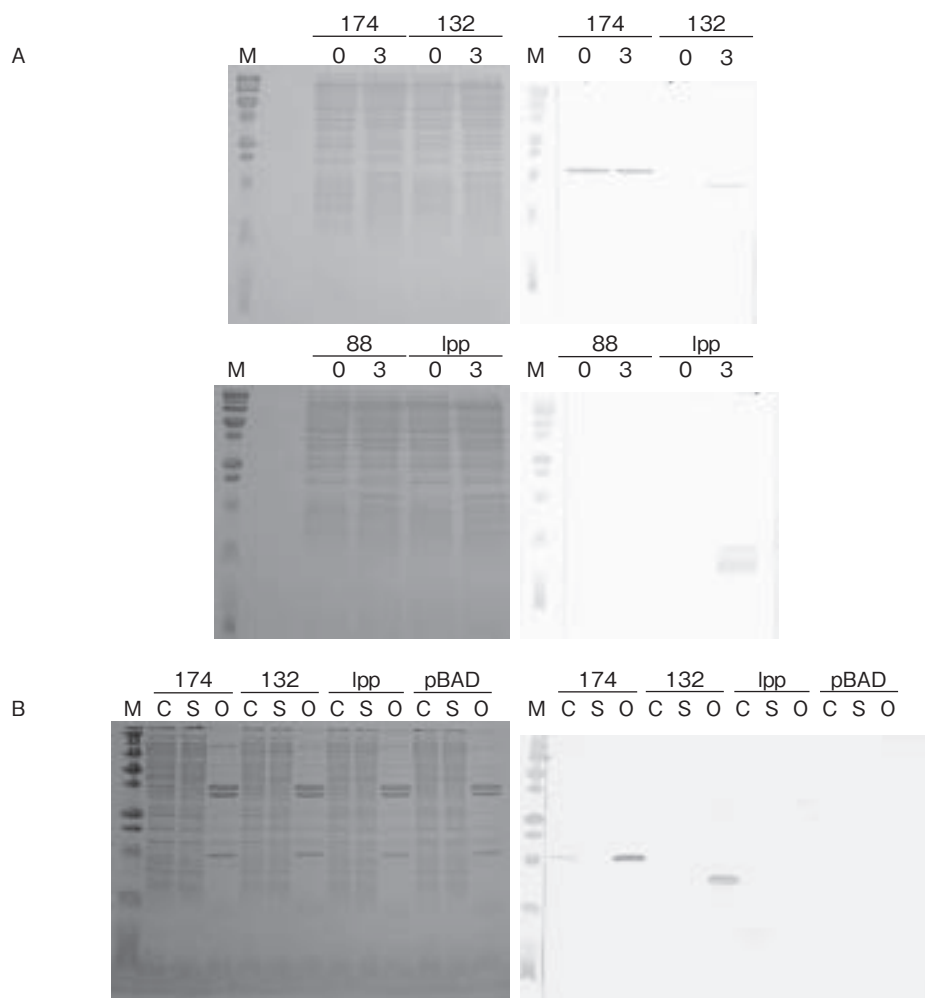


Fig. 2 SDS-PAGE (left panel, stained by CBB) and western blot analysis (right panel) of total cell proteins (A) and outer membrane fractions (B) from transformant of *lpp-ompA* 46-174, *lpp-ompA* 46-132, *lpp-ompA* 46-88, or *lpp* expression vector. The presence of recombinant proteins was confirmed by western blot using anti-His antibody. Abbreviations : 174, transformant of *lpp-ompA* 46-174 expression vector ; 132, transformant of *lpp-ompA* 46-132 expression vector ; 88, transformant of *lpp-ompA* 46-88 expression vector ; *lpp*, transformant of *lpp* expression vector ; pBAD, transformant of pBAD30 plasmid vector ; 0, 3, hours after induction ; C, crude extract ; S, soluble fraction ; O, outer membrane fraction.

いて、fliCタンパク質の局在を確認する目的で、Protease accessibility assayを行った (Fig. 4)。銀染色の結果から、PK、およびPKとSDSを反応させたOMVにおいて、それぞれ30kDa付近にPKと思われるバンドが確認された。PKのみを反応させたOMVでは、37kDa付近にOmpAのバンドが認められた。抗SE抗体を用いたwestern

blottingの結果、バッファーのみを反応させたOMVにおいて、75~100kDa付近にfliCのバンドが確認された。Proteinase Kは大腸菌の外膜を通過して作用することはないため、透過処理を行っていない外膜では外側に存在するタンパク質のみを分解する。PKのみを反応させたOMVにおいて認められたOmpAは、外膜が分解を受けていない

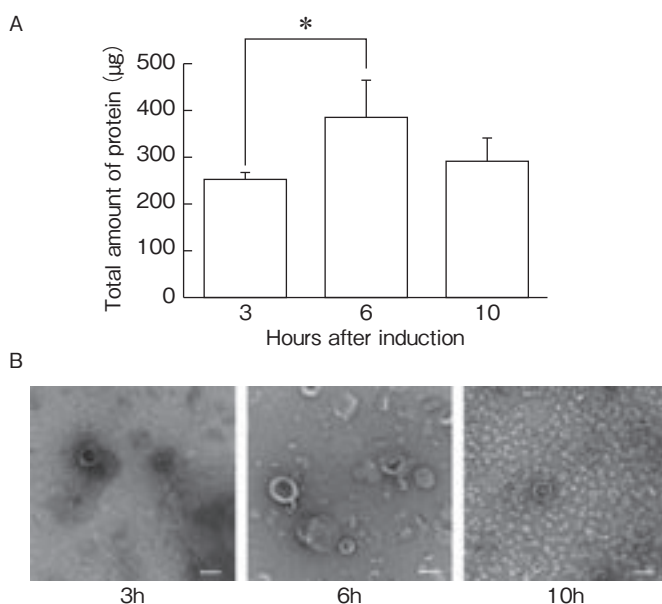


Fig. 3 The total amount of protein (A) and TEM image (B) of OMV separated from pBAD-fliC-MisL transformant of 3, 6, or 10 hours after induction. (A) All data represents means ($\pm$ SD) of triplicate experiments. *indicate $p < 0.05$. Tukey-Kramer test. (B) Scale bar represents 100 nm.

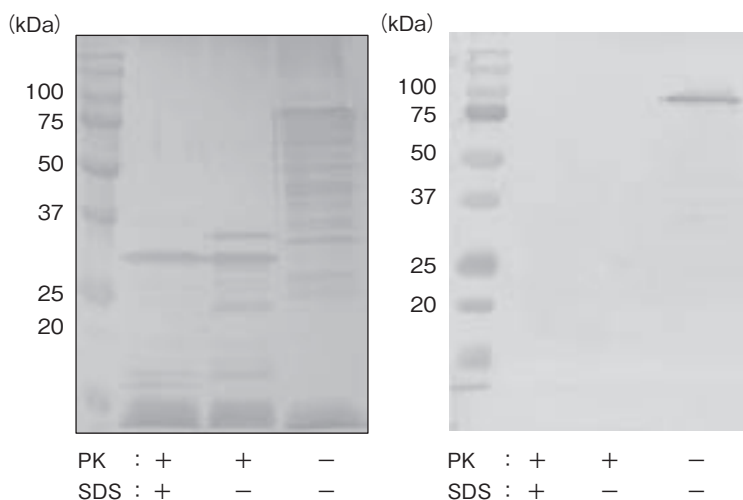


Fig. 4 Analysis of recombinant protein localization in OMV separated from pBAD-fliC-MisL transformant of 10 hours after induction. Purified OMV expressing fliC protein were incubated with and without proteinase K in the presence or absence of 1% SDS. Samples were then subjected to SDS-PAGE (left panel, stained by silver staining) and western blot analysis using anti-SE antibody (right panel).

ことを示しており、同条件のサンプルのwestern blottingでfliCのバンドが確認されないことから、fliCが外膜の外側に発現していることが明らかとなった。以上の結果から、本研究で用いた水性二

層分配法の条件は大腸菌のOMVの分離・精製に有効であり、得られたOMVに発現する組換えタンパク質の抗原性にも影響を与えないことが明らかになった。

4. 要 約

細菌から放出される外膜由来の小胞である外膜小胞 (outer membrane vesicle ; OMV) のワクチン利用を目的に, 大腸菌リポタンパク質のシグナルシーケンス (Lpp), および大腸菌主要外膜タンパク質 (OmpA) をアンカータンパク質として, 非病原性大腸菌の外膜内側に組換えタンパク質を固定・発現し得る発現プラスミドベクターを構築した。また, 水性二層分配法を応用することにより, 組換えタンパク質の抗原性を変化させることなく大腸菌OMVを分離・精製することが可能であった。

文 献

- 1) Barrow, P. A., *et al.* : *Epidemiol Infect*, **104**, 413~426, 1990.
- 2) Farjadian, F., *et al.* : *Biotechnol Adv*, **36**, 968 ~ 985, 2018.
- 3) Persson, G., *et al.* : *Vet Microbiol*, **217**, 104~111, 2018.
- 4) Atalla, H., *et al.* : *PLoS One*, **10**, e0120462, 2015
- 5) Lobos, S. R., Mora, G. C. : *Electrophoresis*, **12**, 448 ~ 450, 1991.
- 6) Santiviago, C. A., *et al.* : *Microbiology*, **147**, 1897 ~ 907, 2001.
- 7) 第160回 日本獣医学会学術集会 (鹿児島, 2017年9月)
- 8) Schroeder, J., Aebischer, T. : *Vaccine*, **27**, 6748 ~ 6754, 2009.
- 9) Urashima, A., *et al.* : *Cellular microbiology*, **19**, e12758, 2017.
- 10) Kim, J. Y., *et al.* : *J mol biol*, **380**, 51~66, 2008.

牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの 実施状況調査

A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of
parasite control program in cattle

森 本 素 子
(宮城大学食産業学群)

Motoko Morimoto
(School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)

Lean meat from pasture grazing cattle has become popular for Japanese consumers as healthy and tasty. However, it is a challenging task to control internal parasites in grazing livestock. When the gastrointestinal nematode infects with the host, intestinal epithelium and innate lymph cells are activated and induce Th2 immune responses. However, it is rare that cattle show extremely severe clinical disease during parasite infection so that many owners fail to recognize the loss of productivity. Ivermectin is a highly effective medication against ticks or nematodes; however, the incidents of anti-parasitic drug resistance increase these days. The field study to investigate an infestation of gastrointestinal parasites has been conducted nation-wide in Japan in the 1990s, but not recently. In this study, the field study was performed to investigate an infestation of gastrointestinal parasites and deworming practice in public pastures in Miyagi. Feces were collected from 10–21 cattle from four pastures and investigated with the modified Wisconsin technique. Parasites eggs were detected from all pasturelands. Infection rates of nematodes were from 29% to 70% each. 85% of the total were infected with coccidia. Next, we reinvestigated one of the pastures which several cattle infected with *Moniezia benedeni*. Deworming practice with ivermectin was performed every month in this pasture, but 30 out of 145 cattle were positive with *Moniezia benedeni* and they were administrated with fulmoxal after the fecal test, then 24 out of 28 cattle (85.7%) were dewormed. It is essential to carry out an appropriate deworming program, especially to start before installing the cattle in pasture.

1. 目 的

近年、生産コストの削減や省力化だけでなく、家畜のアニマルウェルフェアや畜産物の付加価値生産を目的とした放牧が注目を浴びている。放牧牛の赤身肉は健康的で食べ応えがあると、消

費者にも人気が高まっている。しかし、放牧は感染のリスクを高め、その結果甚大な経済的損失をもたらす場合がある。線虫感染により、腸管粘膜下の免疫細胞が活性化し、上皮に作用して粘液産生を増し、平滑筋の運動が活発になって蠕動運動が増す^{1, 2)}。その結果、腸内細菌叢も変化し、他

の病原体に対する免疫応答にも変化をもたらす。しかし一方で臨床に目を移すと、消化管内寄生虫感染では死に至る重篤な病態はまれであり、外観からは家畜のダメージを見極めるのが難しいことも多い。そのため、寄生虫感染が宿主消化管の生理機能の変化をもたらし、潜在的な損耗を与えていることを見逃しがちである。その結果、生産性を上げることが目的に給与される免疫賦活飼料や生菌剤も、期待される効果を発揮することが困難になる。駆虫薬として、イベルメクチン系の製剤が開発され、効果をあげるようになったが^{3~5)}、開発から時間が経ち、近年では適切な駆虫プログラムが行われず、効果が十分得られなかったり、耐性をもつ虫が出現して感染をコントロールできていない例が報告されるようになってきた⁶⁾。わが国では、1990年代に消化管内寄生虫感染についての全国的な疫学調査が行われた⁷⁾が、その後は地域限定的に調べられている程度で、まとまったデータはない。そこで本研究では、まず宮城県を中心に、東北圏内の牧場において駆虫プログラムのヒアリングを行うとともに、採糞して虫卵検査を実施し、消化管内寄生虫の浸潤度を調査することとした。

2. 方 法

調査1：宮城県内の4か所（A，B，C，D）の公営放牧場に調査協力を依頼し、各農場でホルスタイン種または和牛10～20頭から直腸便を採取した。ウィスコンシン変法を用いて虫卵検査を実施し、虫卵数の計測、虫の種類の同定を行った。

同時に、以下の項目についてヒアリング調査を実施した。

- ① 使用している駆虫剤の種類
- ② 投薬時期および回数
- ③ 放牧の時期
- ④ 駆虫プログラムの継続年数

⑤ 消化管寄生虫の感染による家畜への影響についての認識

⑥ 駆虫プログラム実施による診療回数の変化

調査2：調査結果をとりまとめた結果、A農場から全頭調査の依頼があり、146頭の牛から再度採材した。そのうち条虫に感染していることが確認された牛30頭に、家畜保健衛生所が投薬（フルモキサール）を実施した。その後、投薬の効果を確認するためにもう一度糞便検査を行った。

3. 結果と考察

調査1：宮城県内の4か所の公営牧場の消化管内寄生虫の浸潤度

【A牧場】和牛10頭とホルスタイン11頭の21頭から採材した。

消化管内線虫の感染が29%，コクシジウム感染が100%，条虫感染が19%であった（Fig. 1A）。一般線虫，ネマトジュールス，ベネデン条虫が検出された。駆虫薬はイベルメクチン系のアイボメックを使用しており、毎月投薬していた。

【B牧場】和牛10頭から採材した。

消化管内線虫の感染が50%，コクシジウム感染が20%，条虫感染が20%であった（Fig. 1B）。駆虫薬は定期的には使用しておらず、寄生虫の感染症状が出たときにイベルメクチン製剤を使用しているとのことであった。一般線虫，ベネデン条虫が検出された。また、全体的な感染率は低いものの、乳頭糞線虫に濃厚感染している若齢牛が確認された。乳頭糞線虫は毎年感染牛の死亡が報告されており、陽性牛が数頭であっても注意を要する線虫である。

【C牧場】和牛9頭と、ホルスタイン10頭から採材した。

消化管内線虫の感染が58%，コクシジウム感染が95%，条虫感染が5%であった（Fig. 1C）。一般線虫，乳頭糞線虫，牛鞭虫，ベネデン条虫が検

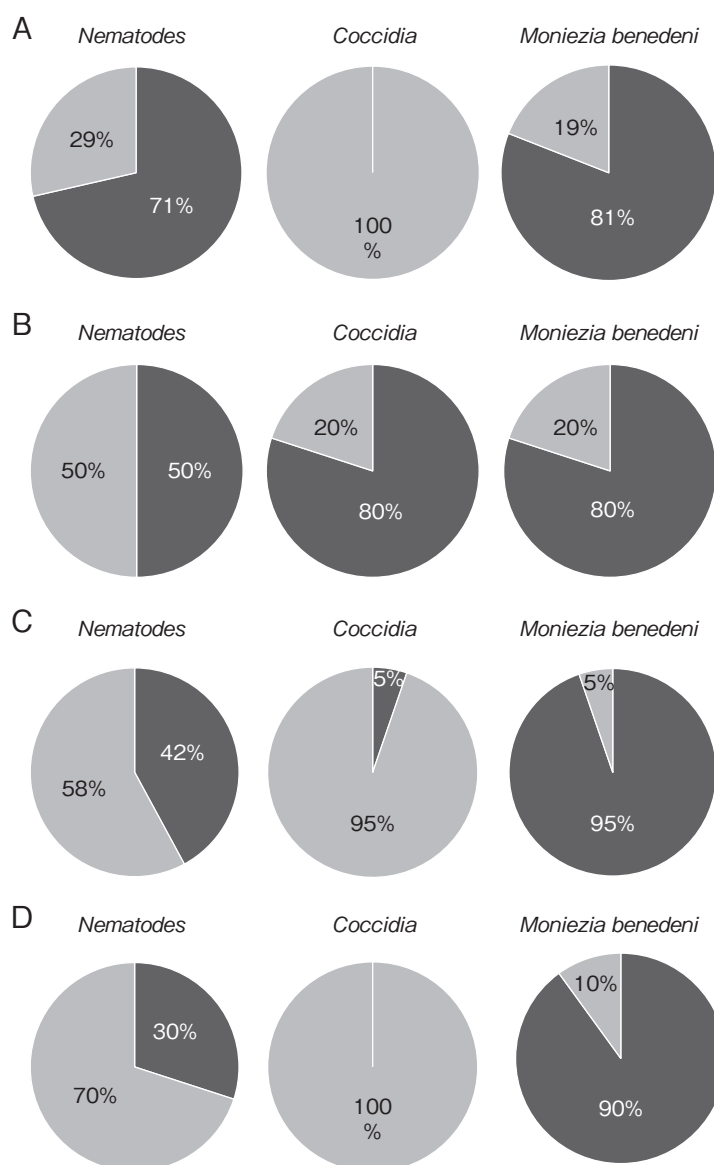


Fig. 1 The ratio of gastrointestinal parasite-infected cattle. (■ : positive ■ : negative)
 Farm A : The positive ratio of nematodes infection was less than other farm. Ivermectin was administered every month. (n=21), Farm B : Deworming was unexecuted. (n=10), Farm C : Flumethrin was poured on every month. (n=19), Farm D : Flumethrin was poured on sometimes. (n=10)

出された。駆虫薬はバイチコールを使用しており、放牧期間中に1回から2回の投与を行っていた。

【D牧場】D牧場は和牛10頭からサンプリングを行った。

消化管内線虫の感染が70%、コクシジウム感染が100%、条虫感染が10%であった (Fig. 1D)。一般線虫、牛捻転胃虫、毛細線虫、ベネデン条虫が検出された。駆虫薬はバイチコールを使用しており、放牧期間中に1回から3回の投与が行われ

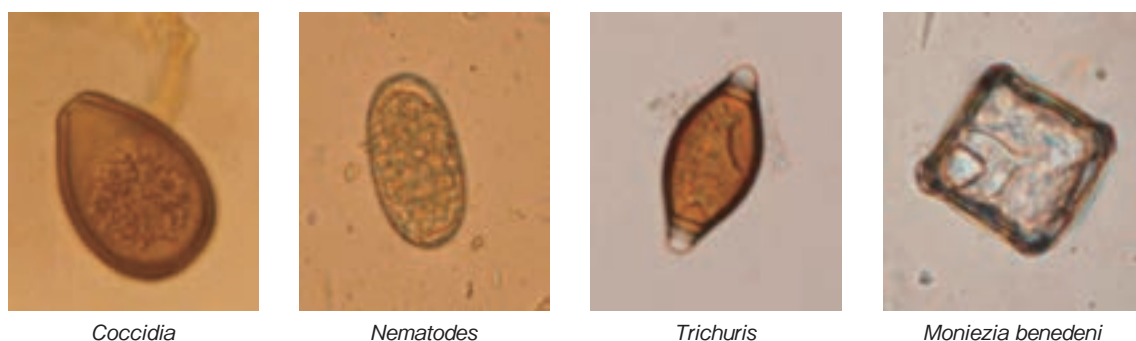


Fig. 2 Microscopy images of eggs or oocysts.

ていた。

検出されたオーシストおよび虫卵の一例を写真に示した (Fig. 2)。一般線虫については、糞便 5 g あたりの虫卵数が100個を超えた個体について培養を行い、子虫にて同定を行ったが、*Oesphagostomum*や*Haemonchus*が同定された。ピロプラズマ感染予防のため、ダニの駆除を行う目的でパイチコールがよく利用されているが、消化管寄生虫には効果が低い。イベルメクチン製剤を適切に使用することが必要であるが、経済的な理由から両剤を使用している牧場はなかった。また、イベルメクチン製剤を使用していたA牧場では、使用頻度が高すぎ、耐性虫が出現している可能性もあり、適切なプログラムに従って使用するよう指導が必要と考えられた。

調査2：A牧場の追跡調査

146頭（和牛42頭・ホルスタイン104頭）の牛から採材した。このうち30頭（和牛4頭：月齢20～48か月・ホルスタイン26頭：月齢11～23か月）がベネデン条虫に感染しており、フルモキサールを経口投与された。約3週間後に28頭について再度虫卵検査を行ったところ、24頭において虫卵不検出となり（85.7%）、改善が見られた。

通常、条虫感染は大きな問題にはならないが、今回陽性牛の中に、育成に課題をかかえた個体が多いことが家畜保健衛生所から指摘され、体重変

化を調べたところ、条虫陽性牛は陰性牛に比較し低値を示した (Fig. 3)。そこで、陽性牛に駆虫目的でフルモキサールを投与した。その結果、85%以上の牛で虫卵不検出となったことから、フルモキサールに一定の効果があることが確認できた。また、調査1および2を比較したところ、寄生虫陽性割合について結果はほぼ同様であった (Table 1) ことから、今後の調査では、まず10～20頭を抽出して検査を行えば、群全体の駆虫の方向性を決めるには十分であることが示唆された。

本研究の結果は、全国的な疫学調査を呼びかける基礎調査になることが期待され、家畜の生産性

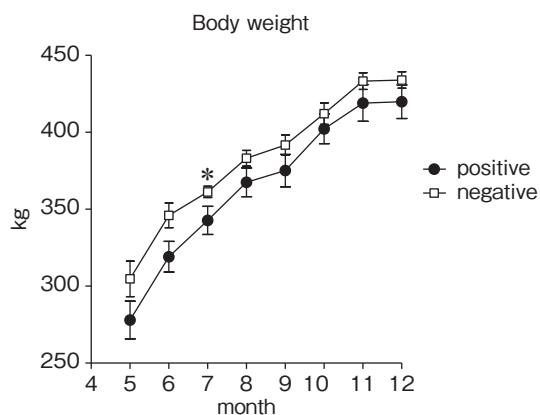


Fig. 3 Changes of body weight from ten (May) to 17 month old (December) in Farm A. The body weight of Holstein infected with *Moniezia benedeni* was kept less than uninfected cattle. n=8, *p<0.05

Table 1 Positive ratio (%) of worm infection in Farm A

	Exp1 (n = 21)	Exp2 (n = 146)
Nematodes	29%	43%
Coccidia	100%	86%
Moniezia benedeni	19%	21%

The ratio of gastrointestinal worm-infected cattle in Farm A didn't show big differences between experiment 1 (n = 21) and 2 (n = 146).

の向上に貢献しうる。今後は、放牧前および投薬後の虫卵調査を実施することにより、経済的かつ効果的な駆虫プログラムが提案できるものと考ええる。また、本研究によって示されたとおり、寄生虫は広く浸潤しており、増体への影響も示唆されたので、今後さらに広い地域の調査を行うことが重要である。

4. 要 約

近年、生産コストの削減や省力化だけでなく、家畜のアニマルウェルフェアや畜産物の付加価値生産を目的とした放牧が注目を浴びているが、放牧は感染のリスクを高め、その結果甚大な経済的損失をもたらす場合がある。駆虫薬として、イベルメクチン系の製剤が開発され、効果をあげるようになったが、近年では適切な駆虫プログラムが行われず、効果が十分得られなかったり、耐性をもつ虫が出現して感染をコントロールできていない例が報告されるようになってきた。わが国では、1990年代に消化管内寄生虫感染についての全国的な疫学調査が行われたが、その後は地域限定的に調べられている程度で、まとまったデータはない。そこで本研究では、まず宮城県内の4か所の公営牧場において、駆虫プログラムのヒアリン

グを行うとともに、採糞してウィスコンシン変法により虫卵検査を実施し、消化管内寄生虫の浸潤度を調査した。

調査1：4か所の牧場からそれぞれ10～21頭のサンプルを採取した。消化管内寄生虫の感染は4か所すべての牧場において確認され、特にコクシジウム感染は蔓延している。蠕虫としては、一般線虫、ネマトジュールス、乳頭糞線虫、牛鞭虫、ベネデン条虫などが検出された。

調査2：今回の調査結果でベネデン条虫の感染が見られた牧場で、引き続き全頭調査を行ったところ、146頭のうち30頭に条虫の感染が確認された。条虫陽性牛の体重変化を調べたところ、陽性牛は陰性牛に比較し、調査期間を通じて低値を示した。続いて、その30頭に対してフルモキサールを投与した後、再調査を行ったところ、28頭中24頭(85.7%)の牛で改善が見られた。すなわち、フルモキサールは条虫感染に対し一定の駆虫効果が認められた。

今後は、入牧前および投薬後の検査を行うことと、イベルメクチン製剤の適切な投与プログラムの実施を助言したいと考えている。

文 献

- 1) 森本素子：家畜感染症学会誌, 5, 63～68, 2016.
- 2) Zhao, A., McDermott, J., Urban, J. F. Jr., *et al.* : *J. Immunol.*, 171, 948～54, 2003.
- 3) 及川伸, 川勾文男, 平賀健二, 本川正人, 千葉由見, 小川徹三, 福本真一郎：日獣会誌, 51, 237～240, 1998.
- 4) 高橋俊彦：家畜診療, 50, 339～347, 2003.
- 5) Nagata, T., Roncalli, R. A., Mishiba, T., Yamada, K., Ura, S. : *Jpn. Bull. Animal Hyg.*, 42, 3～7, 1995.
- 6) Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., *et al.* : *Int J Parasitol Drugs Drug Resist*, 5, 163～71, 2015.
- 7) 高橋史昭：臨床獣医, 36, 14～20, 2018.

ゲノム疫学的手法による豚抗酸菌症のリスク評価と 実態解明

Population genomics and risk assessment of swine mycobacteriosis

大 屋 賢 司・小 松 徹 也*

(岐阜大学応用生物科学部 現：国立医薬品食品衛生研究所, *愛知県中央家畜保健衛生所)

Kenji Ohya and Tetsuya Komatsu*

(Department of Applied Biological Sciences, Gifu University, Present address : National Institute of Health Sciences,

*Aichi Prefectural Chuo Livestock Hygiene Service Center)

Swine mycobacteriosis, mainly caused by *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH), represents chronic proliferative intestinal and systemic lymphadenitis in pigs. In this study, we performed genotyping and genome analysis of MAH isolates derived from different geographical locations and clinical conditions. Instead of typical MAH genotypes and lineages, we found atypical MAH genotypes and lineages in pigs in Japan. In addition, we attempted to risk assessment of swine diseases by analyzing questionnaires to farmers concerning pig-rearing conditions. Furthermore, by *in silico* DNA-DNA hybridization analyses of *Mycobacterium peregrinum* isolates, we revealed that *M. peregrinum* should be one of the causative agents for swine mycobacteriosis, which may infect to a pig from surrounding environment. In the way described above, genome epidemiological study towards to elucidate swine mycobacteriosis has been on-going.

1. 目 的

豚抗酸菌症は、非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria : NTM)のうち、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH)が主要な原因菌となる、内臓や全身の慢性増殖性リンパ節炎である。本症による病変部廃棄（部分・全廃棄）率は全出荷豚数の1%前後であり、経済的損出は年間1.5～2億円であると試算され、蔓延する農場や地域における損害は大きい¹⁾。MAHをはじめとしたNTMは、動物やヒトの体内以外に、土壌や水中などの環境中にも存在する。ヒトの肺NTM症では、患者の使用するバスタブやシャ

ワーヘッドから遺伝子型が同じ菌が分離され、これら環境中のMAHがヒトへ感染することが明らかに²⁾。豚抗酸菌症においても、MAHは、感染母豚から排出された後、オガ粉や土壌で増殖し次の豚（主に新生豚）への感染源となることが知られている¹⁾。そのため、本症の発生と豚の飼育形態の関連も重要であることが分かる。本研究では、日本国内において異なる地域で飼育される豚から分離されたMAHのゲノムおよび遺伝子型解析を行い、ヒトMAH症分離株との比較をした。また、養豚生産者に豚飼育形態のアンケート調査を行い、抗酸菌症をはじめとした廃棄要因とのリスク解析を試みた。さらに、豚抗酸菌症は、

MAH以外のNTMも原因となることが知られているが、その詳細は不明である。本研究では、豚リンパ節炎からMAH以外のNTMである*Mycobacterium peregrinum*を分離した。そこで、豚のリンパ節炎病変から分離した*M. peregrinum*株と周辺の土壌から分離した株のゲノム解析を行い、*M. peregrinum*が周辺環境から豚に感染しリンパ節炎（抗酸菌症）の原因となる可能性について検討した。以上のようなゲノム疫学的アプローチを行い、豚抗酸菌症の実態解明を目指した。

2. 方 法

2.1 供試菌株

MAHに関しては、研究室にて保有していた東海地方のA県の豚のリンパ節から分離された28株、北陸地方B県の豚リンパ節から分離された20株を用いた。*M. peregrinum*に関しては、A県で飼育される豚リンパ節炎および同一農場の土から分離された株合計2株を用いた。*M. peregrinum*の分離は、以前の報告のとおり、以下のように行った^{3, 4)}。小豆大の不透明な白色結節や乾酪様壊死部およびその周辺1 cm³を切り出し、1 mlのダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（D-PBS(-)）中で5 mmステンレス球（アズワン）、400 μ lの2 % NaOHとともに、卓上破砕機 μ T-12(TAITEC)を用いて3,200rpm、30秒間処理し乳剤を調製した。400 μ lの0.5 % N-Acetyl-L cysteine(NALC)-2 % NaOHを加え14時間静置し、D-PBS(-)で洗浄後最終的に1 mlの接種用乳剤とした。これら接種用乳剤100 μ lを2 %小川PS培地(日水製薬)、400 μ lをoleic acid-albumin-dextrose-catalase (OADC ; BD Diagnostics)とPANTA (BD Diagnostics)を加えたMycobacteria Growth Indicator Tube (MGIT) (BD Diagnostics)にそれぞれ接種し37℃で3週間から4週間培養した。得られた抗酸菌は、*rpoB*遺伝子の配列解析により菌種を決定

した⁵⁾。

2.2 MAHの縦列反復配列多型 (variable numbers of tandem repeats : VNTR) 解析

MAHのVNTR解析は、反復配列領域としてMycobacterial interspersed repetitive units (MIRU)-VNTRと*Mycobacterium avium* Tandem Repeats (MATR)-VNTRの計19領域の反復配列領域を対象として行った^{6, 7)}。*M. avium* subsp. *hominissuis* MAH104株を基準株として、供試株の各領域の反復数を算出した。得られた反復数は、Bionumerics ver. 7を用いて、最小全域木 (minimum spanning tree : MST) を作成し供試株と他地域、他宿主から分離されたMAHの疫学的関連性を評価した。

2.3 MAHおよびその他のNTMのゲノム解析

*M. peregrinum*株およびMAH株のゲノムは、PureLink genomic DNA extraction kit (Invitrogen) を用いて調製した。各種株3 μ gのゲノムDNAを用い、平均長350bpのペアエンドライブラリーを調製した。Beijing Genomic Instituteにて、HiSeq X10 システム (Illumina) を用いてリード長2 x 150 bpでデータを取得した。得られたリードの品質チェック、トリミング、アセンブル、ドラフトゲノムの取得は以前の報告のとおり行った^{3, 4)}。アノテーションは、NCBI Prokaryotic genome Annotation pipeline (PGAP) により行った⁸⁾。ゲノム配列を利用した*in silico* DNA-DNA Hybridization (DDH) として、ANI (average nucleotide identity)解析をJSpeciesWS (Richter) 上で行った⁹⁾。

2.4 豚飼育状況のアンケート作成と聞き取り調査の実施

豚飼育状況のアンケートは、家畜衛生の専門家、微生物リスク評価の経験者、東海地方C県の家畜保健衛生所・養豚担当者ら共同研究者と協議し作成した。アンケート内容は、回答者が先入観

をもって回答することのないよう注意して作成した。担当家畜保健衛生所（6ヶ所）が各生産者を訪問し、解析結果を還元する旨を説明しアンケートを実施した。

3. 結果と考察

3.1 国内で飼育される豚から分離されたMAHの遺伝学的特性

MAHはヒト、豚を含むさまざまな動物に感染し環境中にも広く存在する。そのため本菌の感染源、感染経路や疾病の予後、薬剤耐性の有無などを明らかにすることは医学、獣医学上重要である。MAHを遺伝学的に型別する方法として、ゲノム上に複数存在する10bpから100bpの繰り返し配列のコピー数を指標とした、VNTR解析が用いられている。VNTRのパターンはMAHの細菌学的特徴を直接的に表現しているものではない¹⁰⁾。しかしこのパターンを株間で比較することにより、さまざまな地域、宿主、環境を由来とするMAHの遺伝学的関連や性質が明らかとなる。これまでに、MAHのVNTR型別により、日本のNTM症患者より分離されたMAHは、欧米（米国、フランス、フィンランド）のNTM症患者、欧州で飼育される豚から分離されるMAHと遺伝学的に異なることが報告されている。また日本の豚より分離されたMAHは日本のNTM症患者を由来とするMAHよりもフランスやフィンランドのNTM症患者、豚より分離されたMAHと遺伝学的に近いという報告がある^{7, 11)}。

本研究では、東海地方A県において食肉検査場で廃棄処分となったリンパ節より分離されたMAH、同A県のある養豚場で発生した豚抗酸菌症アウトブレイクの際に分離されたMAH、北陸地方B県において食肉検査場で廃棄処分となったリンパ節より分離されたMAHの遺伝学的特性を検討した。これらの株のVNTRパターンを、過去

に国内で、NTM症患者、患者周辺の環境、豚から分離されたMAH株と比較を行い、さらにゲノムデータを取得した。本研究では、VNTR19領域を解析したが、結果がほぼ同等であったVNTR15領域の解析結果をFig. 1に示す。これまでの報告どおり、日本国内で分離されるMAHのVNTRパターンは、患者、バスタブなどの周辺由来株と豚由来株の2グループに分かれる⁷⁾。A県の豚抗酸菌症アウトブレイク株と、B県の豚抗酸菌症由来株は、過去の報告で豚から分離された株（沖縄、大阪などに由来）と同じグループであった。A県のアウトブレイク株はノードの位置から典型的な日本の豚由来株の特性を示した。B県由来株は腸間膜リンパ節炎だけでなく、全身のリンパ節炎を呈した17株を含んでおり、これらは、典型的な豚由来株と同じグループに属したものの、ノードの位置は少し離れたところに配置された（Fig. 1, Pig isolates in B prefecture）。また、A県由来株では、MAHのマーカーとして使用される挿入配列IS1245を持たない8株を含んだが、これら8株は豚由来株のグループではなく、患者および患者周辺環境のグループに配置された（Fig. 1, Particular pig isolates in A prefecture）。

近年、MAHの集団ゲノム解析の結果、MAHは宿主・地域異なる5つの系統（lineage）に分けられることが報告された¹²⁾。この報告によると、日本の患者および周辺環境由来株は、MahEastAsia 1 およびMahEastAsia 2 に属し、日本の典型的な豚由来株は、SC2に属する。VNTR解析で明らかとなった、非典型的な豚由来株がどの系統に属するかについて現在詳細な集団ゲノム解析が進行中である。非典型的なVNTRプロファイルを示す豚由来MAH株、例えば患者由来株と同じグループに属する株がただちにヒト・豚間の感染を示唆するものではない。しかし、さまざまな地域、宿主、病態から分離されたMAH

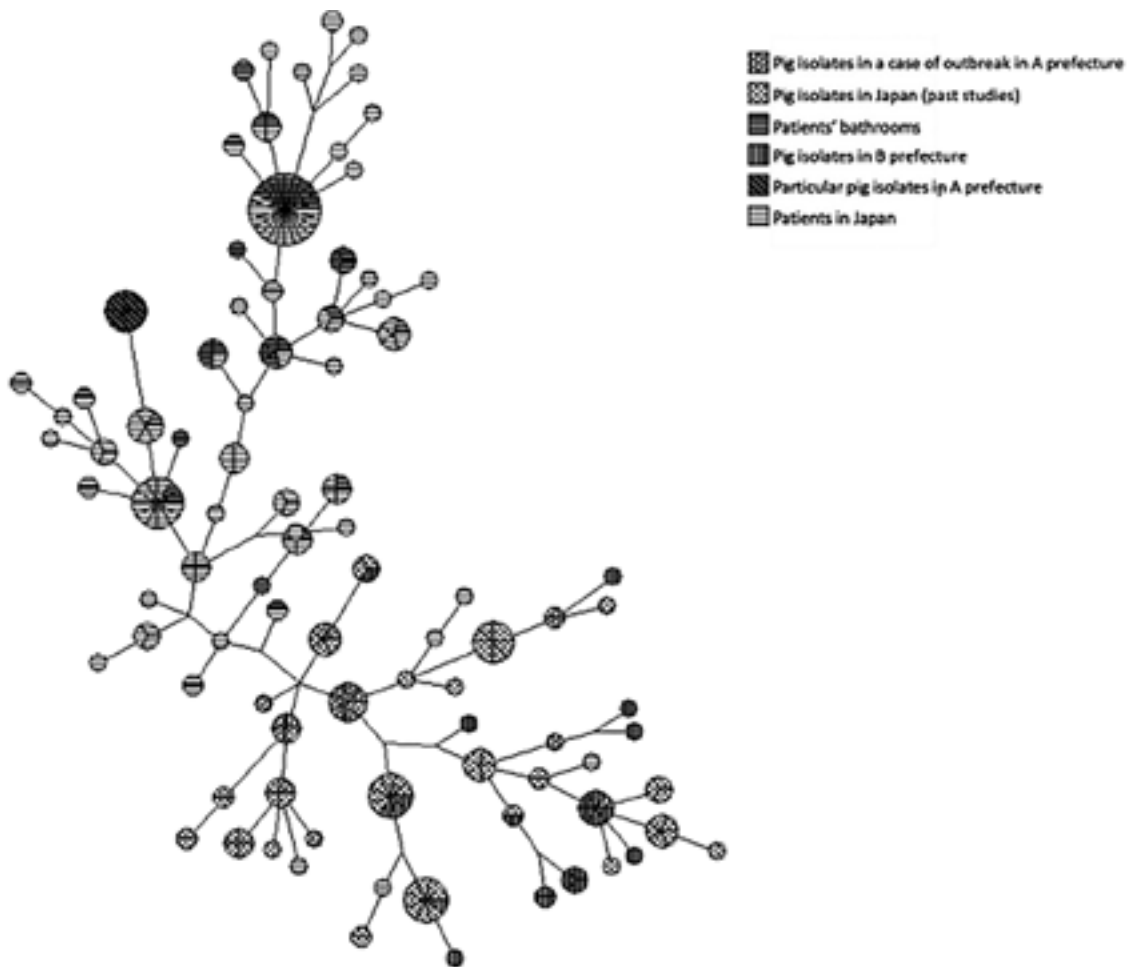


Fig. 1 A minimum spanning tree based on 15 MATR-VNTR genotyping of *M. avium* subsp. *hominissuis* isolates (93 isolates from patients in Japan, 70 isolates from pigs in Japan from past studies, 37 isolates from patients' bathrooms in Japan, 15 isolates from pigs in a case of outbreak in A prefecture, particular 13 isolates from pigs in A prefecture and 20 isolates from pigs).

ゲノムの情報を蓄積することにより、環境に生存し幅広い宿主域、病態を示すMAHの自然界における生存戦略を明らかにできると考えられる。

3.2 豚飼育形態のアンケート調査

本研究では、豚飼育形態のアンケート調査を行い、豚抗酸菌症をはじめとした各種疾病の発生状況との相関を解析しリスク評価を行うことを計画した。調査地域とした東海地方のC県では、6ヶ所の家畜保健衛生所の担当地区に約180件の養豚場が存在する。アンケート調査は順調に進んだ

が、豚抗酸菌症以外の感染症が発生したため、さらなるアンケートの実施、食肉処理施設での廃棄記録の集計を行うことができなかった。2019年3月時点で45件の生産者からアンケートを回収できた。生産規模としては45件中32件(71.1%)が飼育母豚200頭以下であり、全国平均の21.3%¹³⁾に比べるとかなり高い割合を示したが、前述の理由のため大規模な養豚場を訪問することができなかったためであると思われる。敷き材としてオガ粉を使用している生産者は5件(11.1%)であっ

た。生産者へのインタビューでは、オガ粉の使用生産者の中で豚抗酸菌症の発生に苦勞している話をうかがうことはできなかった。引き続き、未実施の生産者へのアンケート実施と食肉処理施設での廃棄要因の集計を行う予定である。いくつかの養豚場では、MAHの分離もできており、MAHの遺伝子型、飼育形態と廃棄要因の相関を検討することにより、豚の飼育形態と抗酸菌症をはじめとした各種疾病のリスク評価を実施予定である。

3.3 豚抗酸菌症から分離した*M. peregrinum*のゲノム解析

豚抗酸菌症は、MAH以外のNTMも原因菌となることがあると言われているが、その詳細は不明な点が多い。実際、食肉処理の現場では、抗酸菌症が疑われる病変部は廃棄され、原因菌の分離、種の同定作業は行われていないのが現状である。本研究を進める過程で、豚のリンパ節炎病変部より、迅速発育菌である*Mycolicibacterium peregrinum*を分離した。*M. peregrinum*は、迅速発育型の抗酸菌であり、HIV陽性患者の結核様病変や野鳥への感染など比較的ヒトや動物への症例報告が多いNTMである¹⁴⁾。*M. peregrinum*も他のNTMと同様に土壌や水などの環境中に生息しているが、ヒトや動物の疾病との因果関係は不明である。リンパ節から*M. peregrinum*が分離された同一農場において、土壌から*M. peregrinum*が分離されたため、ゲノム配列を取得し両者の比較を行った。豚由来株、土壌由来株のゲノムサイズはそれぞれ6,451,733bpおよび6,479,047bpであり、GC含量は両株とも66.4%であった。*in silico* DDHの結果、両株のidentityは100%、ヒト結核様病変からの分離株とのidentityはそれぞれ98.28%および98.27%であった。本研究は、迅速発育菌の*M. peregrinum*が豚抗酸菌症の原因となる可能性を示し、環境中の*M. peregrinum*が動物への感染に関与することを示唆する貴重な研究となった¹⁵⁾。

4. 要 約

豚抗酸菌症は、非結核性抗酸菌(nontuberculous mycobacteria : NTM)のうち、*Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* (MAH)が主要な原因菌となる、内臓や全身の慢性増殖性リンパ節炎である。本研究では、病態、地域の異なる豚由来MAHの遺伝子型別、ゲノム解析を行った。典型的な豚のグループ、系統に属する株以外に、非典型的なグループ、系統に属する株も存在することが示された。また、豚の飼育形態と抗酸菌症をはじめとする疾病の発生状況のアンケート調査によるリスク評価を試みた。さらに、MAH以外に、*Mycolicibacterium peregrinum*が抗酸菌症の原因となる可能性があり、豚由来*M. peregrinum*株は、環境由来株とゲノムの一致率が非常に高く、環境中の*M. peregrinum*が動物に感染する可能性を示唆するデータを得た。ゲノム疫学のアプローチにより、豚抗酸菌症の実態解明にむけた研究が進行中である。

文 献

*の文献は、謝辞に本研究費の成果として記載。

- 1) 大屋賢司, 澤井宏太郎: 豚の抗酸菌症の原因菌とその生態について, *All about Swine*, 51, 33~37, 2017.
- 2) Nishiuchi, Y., Iwamoto, T., Maruyama, F.: Infection sources of a common non-tuberculous mycobacterial pathogen, *Mycobacterium avium* complex, *Front Med* (Lausanne), 4, 27, 2017.
- 3) Ito, T., Maruyama, F., Sawai, K., Nozaki, K., Otsu, K., Ohya, K.: Draft genome sequence of *Mycobacterium virginense* strain GF75, isolated from the mud of a swine farm in Japan, *Genome Announc*, 6, pii : e00362-18, 2018.
- * 4) Ito, T., Sawai, K., Kawai, M., Nozaki, K., Otsu, K., Fukushima, H., Ohya, K., Maruyama, F.: Draft genome sequences of *Mycolicibacter senuensis* isolate GF74 and *Mycobacterium colombiense* isolates GF28 and GF76 from a swine farm in Japan, *Microbiol Resour Announc*, 7, pii : e00936-18, 2018.
- 5) Kim, B. J., Lee, S. H., Lyu, M. A., Kim, S. J., Bai, G. H., Chae, G. T., Kim, E. C., Cha, C. Y., Kook, Y. H.:

- Identification of mycobacterial species by comparative sequence analysis of the RNA polymerase gene (*rpoB*). *J Clin Microbiol*, **37**, 1714~1720, 1999.
- 6) Inagaki, T., Nishimori, K., Yagi, T., Ichikawa, K., Moriyama, M., Nakagawa, T., Shibayama, T., Uchiya, K., Nikai, T., Ogawa, K. : Comparison of a variable-number tandem-repeat (VNTR) method for typing *Mycobacterium avium* with mycobacterial interspersed repetitive-unit-VNTR and IS1245 restriction fragment length polymorphism typing. *J Clin Microbiol*, **47**, 2156~64, 2009.
- 7) Iwamoto, T., Nakajima, C., Nishiuchi, Y., Kato, T., Yoshida, S., Nakanishi, N., Tamaru, A., Tamura, Y., Suzuki, Y., Nasu, M. : Genetic diversity of *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* strains isolated from humans, pigs, and human living environment. *Infect Genet Evol*, **12**, 846~52, 2012.
- 8) Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., Ostell, J. : NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Res*, **44**, 6614~24, 2016.
- 9) Richter, M., Rosselló-Móra, R., Glöckner, F. O., Peplies, J. : JSpeciesWS : a Web server for prokaryotic species circumscription based on pairwise genome comparison. *Bioinformatics*, **32**, 929~31, 2016.
- 10) Iwamoto, T. : Outcome and challenge brought about by molecular epidemiology of tuberculous organisms. *Kekkaku*, **86**, 917~21, 2011.
- 11) Ichikawa, K., van Ingen, J., Koh, W. J., Wagner, D., Salfinger, M., Inagaki, T., Uchiya, K. I., Nakagawa, T., Ogawa, K., Yamada, K., Yagi, T. : Genetic diversity of clinical *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis* and *Mycobacterium intracellulare* isolates causing pulmonary diseases recovered from different geographical regions. *Infect Genet Evol*, **36**, 250~255, 2015.
- 12) Yano, H., Iwamoto, T., Nishiuchi, Y., Nakajima, C., Starkova, D. A., Mokrousov, I., Narvskaya, O., Yoshida, S., Arikawa, K., Nakanishi, N., Osaki, K., Nakagawa, I., Ato, M., Suzuki, Y., Maruyama, F. : Population Structure and Local Adaptation of MAC Lung Disease Agent *Mycobacterium avium* subsp. *hominissuis*. *Genome Biol Evol*, **9**, 2403~2417, 2017.
- 13) 日本養豚協会 : 2016年養豚農業実態調査.
- 14) Omar, S. V., Allam, M., Joseph, L., Mtshali, S., Ismail, N. A., Ismail, A. : Draft genome sequence of *Mycobacterium peregrinum* isolated from an HIV-positive patient in South Africa. *Genome Announc*, **5**, e00759-17, 2017.
- 15) Komatsu, T., Ohya, K., Sawai, K., Odoi, J. O., Otsu, K., Ito, T., Kawai, M., Maruyama, F. : Draft genome sequences of *Mycobacterium peregrinum* isolated from a pig with lymphadenitis and from soil on the same Japanese pig farm. *BMC Res Notes*, **12**, 341~344, 2019.

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（Ⅱ）

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

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 during the period from 2017 to 2018. The results showed that positive rates of *S. aureus* detected in chicken was 81.1 percent. The isolates cultured from head and wing showed high frequency of staphylococcal enterotoxin (SE) genes but a few of leg isolates harbored SE genes. In addition, novel sequence types of *S. aureus* were found, suggesting the existence of chicken-specific *S. aureus* strains. Although MRSA was not detected, many methicillin-resistant coagulase negative staphylococci were detected and some of them were identified. We also clarified that SE causes mast cell degranulation in chickens. Furthermore, in vitro studies showed staphylococcal enterotoxin A (SEA) bind with pyruvate kinase (PK) and SEA induced PK translocation to nucleus, indicating that SEA-PK interaction evoke cell proliferation. These results would reveal the spread of *S. aureus* in chickens and high frequency of virulence genes in the isolates and would lead to the insight into severe symptoms in *S. aureus* infections.

1. 目 的

黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) は、近年、家畜関連メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (LA-MRSA) によるヒトおよび家畜の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, 2)}。

昨年度の本研究助成により、我々は食用鶏にお

ける*S. aureus*保菌状況の調査を行ったところ、これまで知られているよりも高頻度に*S. aureus*が検出された。さらにMRSAは検出されなかったもののメチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌が多数見つかった。また、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) が鶏へ炎症を惹起すること、および鶏マクロファージ由来培養細胞HD11細胞に細胞増殖を引き起こすことを見出した。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、引き続き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および病原遺伝子の解析を行う。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

2018年4月から8月まで食鳥処理場において一月当たり60羽、計300羽の廃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。一部の試料はセフォキシチンを加えた卵黄加マンニット食塩培地に塗抹した。37℃で48時間培養し、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病原遺伝子の検出

*S. aureus*と推定された分離株をコアグララーゼ試験に供した。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ラーゼ陽性または陰性を確認した。コアグララーゼ試験陽性株およびセフォキシチン耐性コアグララーゼ陰性株について、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（*sea-sey*）、表皮剥奪毒素（*eta*および*etb*）、溶血毒素（*hla*, *hly*, *hlg*, *hlg2*および*hld*）およびロイコシジン（*lukE/lukD*, *lukS/lukF-PV*および*LukM*）の各病原遺伝子の検出をmultiplex PCRにより行った^{4, 5)}。さらに一部の株でMLST解析を行い系統を確認した。

2.3 コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の菌種同定

前年度分離されたメチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌を同定するために、生化学性状を

API Staph（バイオメリュー）により解析した。また、一部の株において次世代シーケンサーによる全ゲノム解析に供し、同定を行った。

2.4 ELISAによるブドウ球菌エンテロトキシンA（SEA）とピルビン酸キナーゼ（PK）の結合の検討

前年度の研究より、HD11細胞においてSEAとPKが結合することが示唆されたため、Sandwich ELISA法の変法を用いてSEAとPKの結合を確認した。PKを96ウェルプレートに固着させ、試料としてSEAを0.0625から32 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で加えた。SEAの検出は標識抗SEA抗体および基質であるO-phenyldiamine（和光純薬工業）を用い、マイクロプレートリーダーで吸光度（490nm）を測定した。

2.5 鶏培養細胞内におけるPKの動態

HD11細胞を用いて免疫蛍光染色を行い細胞内の解析を行った。HD11細胞にSEAを30 $\mu\text{g/ml}$ 添加し、9時間培養後、免疫蛍光染色に使用した。1次抗体としてウサギ抗SEA抗体、ヤギ抗PKM2抗体（abcam）を用い、2次抗体としてAlexa Fluor™488標識ロバ抗ウサギIgG抗体、Alexa Fluor™594標識ロバ抗ヤギIgG抗体（Invitrogen）を用いた。核染色にはDAPI（同仁化学研究所）を用いた。

2.6 HD11細胞における定量的PCR

HD11細胞を 2×10^5 cells/mlで播種後、SEAを添加し6および24時間でRNAiso（タカラバイオ）により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。

2.7 鶏へのSEの接種と肥満細胞の解析

8週齢のレイヤーにおいて、背部の羽毛を除去後、皮内にSEA、BSAまたはコントロールとしてPBSを接種した。24時間後に皮膚を切除し形態

学的解析に供した。採取した皮膚を分割しメタノールカルノア液に浸漬して固定後、定法に従いパラフィン包埋を行った。組織を薄切後、トルイジンブルー染色により異染色性（メタクロマジー）陽性細胞数を計測した。

2.8 鶏における黄色ブドウ球菌感染実験

養鶏場より6週齢のレイヤーを購入し、胸部の皮下に 1×10^7 または 1×10^9 CFUの*S. aureus*を接種した。陰性対照群にはPBSを接種した。投与後5日間観察し、死亡鶏を解剖し、皮下の病態を観察した。その後皮膚、脾臓および肝臓を回収し菌数測定に供した。各組織は重量を測定し9倍量のPBSを加え懸濁した。懸濁液を10倍階段希釈し、希釈液を平板培地に塗抹した。培養後、菌数を計測し組織1グラム当たりの菌数（CFU）を算出した。

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

300羽の鶏から分離した菌を解析し、前年度の研究結果（500羽）と合わせて12カ月800羽分の解析結果を示す。*S. aureus*の陽性率はそれぞれ頭部18.8%、翼下30.8%、脚部69.3%、計81.1%であった（Table 1）。つづいてSE遺伝子の保有状況をTable 2に示す。頭部および翼下分離株は90%以上がSE遺伝子を保有していた（Table 2）。一方、脚部からは高頻度で*S. aureus*が分離されたがSE遺伝子保有株は頭部由来株と同程度の頻度であ

り、多くはSE遺伝子非保有株である（Table 2）。なお昨年度の報告でSE遺伝子非保有株とした菌株の一部において、再解析の結果SE遺伝子が検出されたため、SE遺伝子非保有株の数が減少している。また、分離株において他の病原遺伝子の検索を行った。溶血毒素およびロイコシジンは部位にかかわらず高頻度で検出された。特に*hla*、*hlg2*、*hld*および*lukE/lukD*は高い保有率を示した（Table 3）。さらに、分離株のMLST解析を行ったところ、4種類の新規Sequence type（ST）が見出された。また、頭部および翼下分離株は同様のST傾向を示したが、脚部から分離されたSE遺伝子非保有株はその多くが異なる系統の株であった（Table 4）。以上の結果より部位ごとに異なる系統の*S. aureus*が存在し、他の病原遺伝子と比べてSEはその保有状況が部位により異なる可能性が示唆された。今後、全分離株の病原遺伝子保有状況を明らかにし、多変量解析により鶏における*S. aureus*の定着・感染に重要な因子の解明が必要である。

3.2 メチシリン耐性コアグララーゼ陰性ブドウ球菌の同定

11株の生化学性状を確認したところ、*Staphylococcus sciuri*および*Staphylococcus xylosus*が1株ずつ同定された。残る株は*Staphylococcus sciuri*に類似の性状であるが同定不能であった。このうち2株において次世代シーケンサーで全ゲノム解析を行ったところ、*Staphylococcus fleurettii*と同定された。また耐性遺伝子について

Table 1 Prevalence of *Staphylococcus aureus* in Japanese chicken

	Number of <i>S. aureus</i> -harboring chickens (n=800)	(%)	<i>mecA</i> -positive <i>S. aureus</i>
Head	150	18.8	0
Wing	246	30.8	0
Leg	554	69.3	0
Total	649	81.1	0

Table 2 *S. aureus* superantigenic toxin genotypes and its prevalence in this study

<i>S. aureus</i> superantigenic toxin genotypes	Head (n=150)	Wing (n=246)	Leg (n=554)	Total (n=950)
<i>S. aureus</i> harboring superantigenic toxin genes	144 (96.0)	232 (94.3)	130 (23.5)	506 (53.3)
<i>seb</i>	2 (1.3)	2 (0.8)	6 (1.1)	10 (1.1)
<i>sec, ser</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	1 (0.1)
<i>sec, seh, ser</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	1 (0.1)
<i>sed</i>	6 (4.0)	0 (0)	1 (0.2)	7 (0.8)
<i>sed, seg, sei, sem, sen, seo, ser, sey</i>	1 (0.7)	0 (0)	0 (0)	1 (0.1)
<i>sed, seh</i>	2 (1.3)	0 (0)	1 (0.2)	3 (0.3)
<i>sed, seh, selj, ser</i>	0 (0)	0 (0)	3 (0.5)	3 (0.3)
<i>sed, seh, ser</i>	40 (26.7)	56 (22.8)	50 (9.0)	146 (15.4)
<i>sed, seh, ser, sey</i>	2 (1.3)	1 (0.4)	0 (0)	3 (0.3)
<i>sed, seh, sey</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	1 (0.1)
<i>sed, ser</i>	0 (0)	1 (0.4)	0 (0)	1 (0.1)
<i>sed, ser, sey</i>	4 (2.7)	3 (1.2)	3 (0.5)	10 (1.1)
<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	37 (24.7)	44 (17.9)	12 (2.2)	93 (9.8)
<i>seg, sei, sem, seo</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	1 (0.1)
<i>seg, sei, seo</i>	1 (0.7)	0 (0)	1 (0.2)	2 (0.2)
<i>seh</i>	49 (32.7)	122 (49.6)	47 (8.5)	218 (22.9)
<i>seh, ser</i>	0 (0)	2 (0.8)	0 (0)	2 (0.2)
<i>sen</i>	0 (0)	0 (0)	1 (0.2)	1 (0.1)
<i>sey</i>	0 (0)	1 (0.4)	1 (0.2)	2 (0.2)
<i>S. aureus</i> harboring no superantigenic toxin gene	6 (4.0)	14 (5.7)	424 (76.5)	444 (46.7)

Table 3 *S. aureus* virulence toxin gene prevalence in this study

<i>S. aureus</i> virulence toxin genes	Head (n=29)	Wing (n=38)	Leg (n=146)	Total (n=213)
<i>S. aureus</i> harboring one or more virulence toxin genes	29 (100)	38 (100)	142 (97.3)	209 (98.1)
<i>hla</i>	29 (100)	34 (89.5)	118 (80.8)	181 (85.0)
<i>hlb</i>	6 (20.7)	8 (21.1)	83 (56.8)	97 (45.5)
<i>hlg</i>	11 (37.9)	12 (31.6)	18 (12.3)	41 (19.2)
<i>hlg2</i>	29 (100)	31 (81.6)	102 (69.9)	162 (76.1)
<i>hld</i>	29 (100)	34 (89.5)	135 (92.5)	198 (93.0)
<i>lukE/lukD</i>	21 (72.4)	28 (73.7)	131 (89.7)	180 (84.5)
<i>lukS/lukF-PV</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>lukM</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>eta</i>	0 (0)	0 (0)	26 (17.8)	26 (12.2)
<i>etb</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>S. aureus</i> harboring no above virulence toxin gene	0 (0)	0 (0)	4 (2.7)	4 (1.9)

解析したところ *mecA* 遺伝子の他に複数の *SCCmec* 構成遺伝子が保存されていたため、本耐性菌群のさらなる解析が必要である。

3.3 SEA投与によるPKへの影響

PKとSEAの結合を確認するためにELISAを

行ったところ、SEA濃度依存的に吸光度が増加したため、in vitroにおけるPKとSEAの結合が確認された (Fig. 1A)。つづいて、HD11細胞におけるSEA添加後のPKの細胞内動態を観察した。コントロール群ではPKは細胞質にシグナルが観

Table 4 MLST analysis in *S. aureus* isolates in this study

	<i>S. aureus</i> superantigenic genotypes	Number of isolates	Sequence type (ST)
Head	<i>seb</i>	1	12
	<i>sed, seh, ser</i>	2	A
	<i>sed, seh, ser, sely</i>	1	A
	<i>sed, ser, sely</i>	3	B
	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	3	5
	no SE gene	1	12
Wing	<i>sed, ser, sely</i>	1	B
	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	6	5
	<i>seh</i>	2	A
	no SE gene	2	A
Leg	<i>sed, seh, selj, ser</i>	1	A
	<i>seg, sei, sem, sen, seo</i>	2	5
	<i>sely</i>	2	C
	no SE gene	8	D
		1	5

ST A-D : Novel STs identified in this study

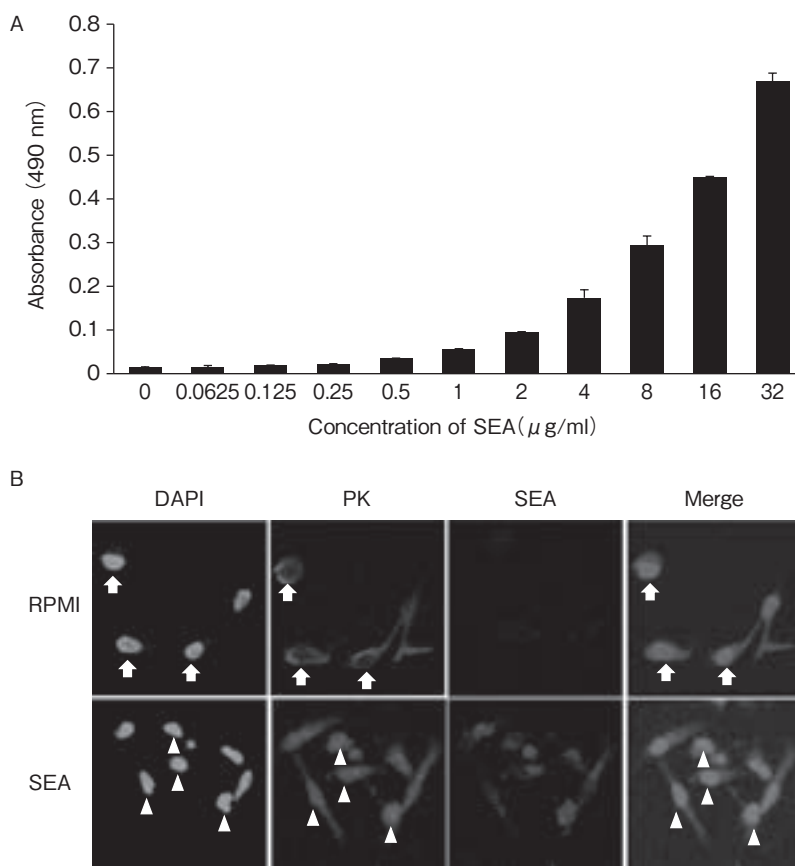


Fig. 1 Interaction of SEA and PK.

A : PK binds with SEA dose-dependently in vitro. B : Immunostaining exhibits colocalization of nuclei and PK under condition with SEA.

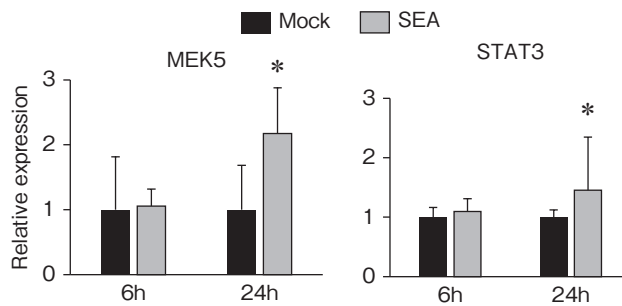


Fig. 2 SEA induces upregulation of MEK5 and STAT3 in HD11 cells.

* $p < 0.05$

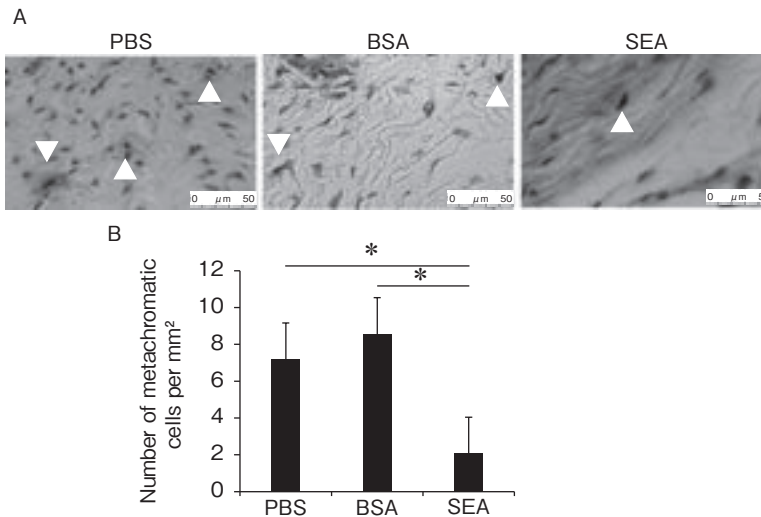


Fig. 3 SEA induces degranulation of subcutaneous mast cell in chicken. A : Toluidine blue staining in chicken skin injected PBS, BSA or SEA. Arrow heads show metachromatic cells in each group. B : Number of metachromatic cells in SEA-injected group significantly decreased in comparison with other groups. * $p < 0.05$

察されるが、SEA投与後9時間ではPKは核においてもシグナルが検出される (Fig. 1B)。さらに、HD11細胞において定量的PCRを行ったところ、SEA添加群において細胞増殖に関わるMEK5およびSTAT3遺伝子の発現上昇が見られた (Fig. 2)。がん細胞においてはPKが核内に移行し、MEK5遺伝子の発現を上昇させることで細胞の増殖が起こる⁶⁾。本研究結果からSEAによる細胞増殖は、SEAがPKに直接作用し、PKの核内移行を惹起することで起こると推測される。今後、SEA誘導性細胞増殖が*S. aureus*の感染にどう影

響するか明らかにする必要がある。

3.4 黄色ブドウ球菌由来物質による鶏への病原性

前年度の研究において、SEA投与により鶏皮膚組織にアレルギー関連細胞の遊走が確認されたため、SEA投与による肥満細胞への影響を検討した。皮膚組織のトルイジンブルー染色像により、SEA投与皮膚における異染色性陽性細胞数の有意な減少が確認され、SEA投与による肥満細胞脱顆粒の惹起が示唆された (Fig. 3)。肥満細胞は脱顆粒によりヒスタミンやプロテアーゼと

いった分子を放出するため、本毒素による肥満細胞脱顆粒の惹起が組織破壊や浮腫形成といった病態に関わる可能性が考えられる。また、感染実験では 1×10^9 CFU 投与個体において12羽中2羽が死亡し、皮下の黄色の滲出液および全身感染が確認された。今後感染モデルのさらなる条件検討が必要である。

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800羽から *S. aureus* の分離を試みたところ、81.1% から *S. aureus* が分離され、鶏特有の *S. aureus* 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、SEA が PK と結合し細胞増殖を誘導することおよび肥満細胞の脱顆粒を惹起し、組織障害に関わる可能性が見出された。本研究により鶏における *S. aureus* の蔓延が明らかになり、*S. aureus* 感染症における重篤な症状の端緒が見出された。

文 献

- 1) Lekkerkerk, W. S., van Wamel, W. J., Snijders, S. V., Willems, 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) Jarraud, S., Mougél, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., Vandenesch, F. : Relationship between staphylococcus aureus genetic background, virulence factor, agr groups (alleles), and human disease, *Infect. Immun.*, **70**, 631~641, 2002.
- 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.

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（Ⅱ）

Analysis for pathophysiology of heterozygous individual with cholesterol deficiency in Holstein cattle（Ⅱ）

猪 熊 壽

（帯広畜産大学畜産学部）

Hisashi Inokuma

（Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine）

The cholesterol deficiency disorder in Holstein Friesian is considered to be autosomal recessive inheritance, but heterozygous individuals may exhibit hypocholesterolemia, thus in the present study productivity of cattle with heterozygote was evaluated. A total of 718 cows from 5 farms were examined, and 93 (14.9%) were found to be heterozygous. The median TC of heterozygous and wild group were 116 mg/dl and 129 mg/dl, respectively, and TC of heterozygous group was significantly lower. In one of the farms where milking data were analyzed, the median 305-day corrected milk yield of 12,269 kg in the heterozygous group was significantly lower than that in the wild group-12,700 kg ($p<0.05$). Because lower milk yield associated with lower TC value was found in the heterozygous group, it is suggested that heterozygous had a negative impact on milk production. However, there was no significant difference in reproductive performance compared with wild group.

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年に見出された遺伝性疾患で、罹患牛は著しい低コレステロール血症から下痢、栄養不良、消瘦を呈して6ヵ月以内に死亡する¹⁾。欧州で初発例が報告され²⁾、2016年には日本でも発症牛が報告された^{3, 4)}。本症ではリポタンパク質Apo B遺伝子（APOB）のエクソン5への塩基挿入が認められ、遺伝様式は常染色体劣性遺伝とされており^{4, 5)}、ホモ個体のみが発症する。しかし近年、ヘテロ保因牛（ヘテロ）においてもコレステロール代謝異常症様の症状を発現する症例が報告され

ている^{6, 7)}。さらに、健康な種雄牛群の中で、ヘテロ群の血清コレステロール濃度（TC）はワイルド群より低値を示すと報告されており⁸⁾、臨床的に健康な成牛であってもTCが低く、生産性に何らかの影響が及んでいる可能性がある。血清TCは乳量と関連することが知られ、泌乳中期の血清TCレベルと乳脂率は関連する⁹⁾。また、TCと授精回数に負の相関があるとの報告もあり¹⁰⁾、低TCが農場の生産性に負の影響をもたらしている可能性が考えられる。しかし、ヘテロの生産性についてはこれまで検討されたことがない。

日本ではコレステロール代謝異常症は2017年3月に「指定遺伝的不良形質」に指定され、ヘテロ

であることが判明している種雄牛の精液販売は中止されている。このため、今後ホモは生産されず、ヘテロ個体数は減少することが予想されるが、ヘテロの根絶には至らない。そこで本研究では、牛群検定成績を用いて農場におけるヘテロ牛の生産性について検討した。

2. 方 法

2017年11月から2018年6月にA農場411頭、B農場76頭、C農場63頭、D農場51頭、E農場117頭、計5農場718頭(哺乳牛2頭、育成牛330頭、搾乳牛386頭)の臨床的に健康なホルスタイン種乳牛から採血した。すべての供試牛について、Menziらの方法によるPCR検査¹⁾によりコレステロール代謝異常症の診断を行い、ホモ、ヘテロ、ワイルドの3群に分類した。

718頭のうち346頭(A農場156頭、B農場76頭、C農場63頭、D農場51頭)において血清TCを測定し、ヘテロ群とワイルド群の値を比較した。なお、血清TCは酵素法(第一岸本臨床検査センター)により測定した。

供試牛のうち、牛群検定成績を確認できたAおよびB農場の牛について、乳量、乳脂率、乳タンパク質率、無脂固形分率、空胎日数および授精回数を、各農場内のヘテロ群とワイルド群で比較した。なお、乳量、乳脂率、乳タンパク質率、無脂固形分率については305日補正值を用いた。

すべての統計解析には、Excel統計を使用し、2群間比較については、有意水準を $p < 0.05$ とし、マン=ホイットニーのU検定で比較検討した。測定値は中央値で示した。

3. 結果と考察

供試牛718頭のうち93頭(14.9%)がヘテロであった。今回調査した農場では、ホルスタイン登録協会の試算一保因率は2013年の8%をピークに

減少傾向という試算を上回ってヘテロが存在していることが明らかとなった。ヘテロの割合は、A農場411頭中71頭(17.3%)、B農場76頭中10頭(13.1%)、C農場63頭中3頭(4.7%)、D農場51頭中9頭(17.6%)、E農場117頭中14頭(11.9%)と、農場ごとにばらつきがみられた。コレステロール代謝異常症の起源牛モーリン・ストームとその後継牛は好体格・高泌乳・高乳質から世界中で多くの精液が販売され、日本でも数多くの娘牛が存在する。ヘテロの割合が高かったA農場およびD農場は、乳牛の改良に熱心に取り組んでいることがコレステロール代謝異常症保因率の上昇につながった可能性が考えられた。

供試牛のTCをFig. 1に示す。ヘテロ群およびワイルド群のTC中央値はそれぞれ、116mg/dlと

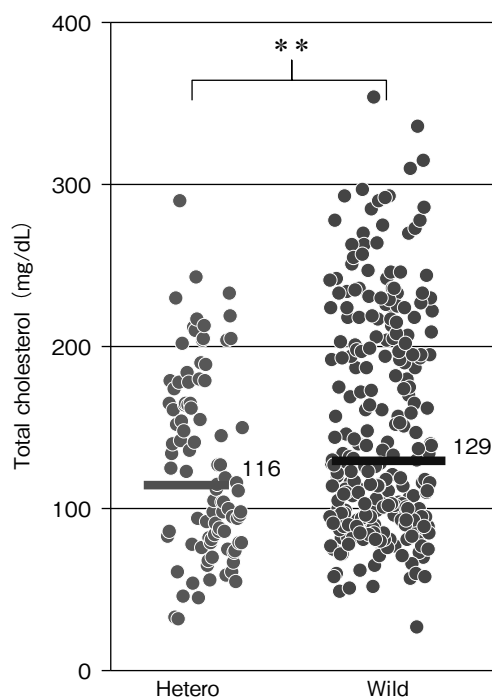


Fig. 1 Comparison of serum total cholesterol (TC) between wild cattle and heterozygotes with autosomal recessive cholesterol deficiency disorder. The median TC value of hetero group was significantly lower than that of wild cattle.

Table 1 Comparison of serum total cholesterol, and performance of milk production and reproduction between wild cattle and heterozygotes with autosomal recessive cholesterol deficiency disorder in farm A and B.

Farm	Group	Total cholesterol (mg/dl)	Milk production (305 days correction)				Reproduction	
			Yield (kg)	Fat (%)	Protein (%)	Solid-not Fat (%)	Open period (days)	Insemination frequency
A	Hetero	134 (n=71)	12269 (n=42)	3.96 (n=42)	3.31 (n=44)	8.83 (n=42)	75 (n=37)	2 (n=44)
		146 (n=85)	12770 (n=43)	3.88 (n=43)	3.25 (n=41)	8.81 (n=43)	87.5 (n=42)	2 (n=52)
	Wild							
	p-value	0.033	0.017*	0.25	0.075	0.61	0.42	0.98
B	Hetero	85 (n=10)	10700 (n=6)	4.87 (n=5)	3.64 (n=5)	9.07 (n=5)	93 (n=4)	2 (n=4)
		104.5 (n=66)	11570 (n=34)	4.00 (n=29)	3.24 (n=29)	8.80 (n=29)	94 (n=29)	1 (n=30)
	Wild							
	p-value	0.075	0.067	0.026*	0.054	0.098	0.86	0.39

* : significant difference

129mg/dlであり、ヘテロ群のTCが有意 ($p < 0.01$) に低値であった。健全なヘテロ群とワイルド群のTCに有意な差が認められたことから、ヘテロ個体では、臨床症状の発現はなく淘汰には至らないものの、何らかのコレステロール運搬機能が低下している可能性が示された。ヒトの家族性低 β リポタンパク血症 (familial hypobetalipoproteinemia ; FHBL) もAPOB変異が原因であるが、ホモ患者が低TC血症に続発する重篤な症状を呈すだけでなく、ヘテロ個体でもTC低下が知られており、常染色体優性遺伝性疾患と考えられている^{12, 13)}。牛のコレステロール代謝異常症においても、多くのヘテロ個体では臨床症状は示さないものの低TC血症を呈する点でFHBLと同様の結果が得られ、コレステロール代謝異常症の遺伝様式についても再検討が必要と考えられた。FHBLでは患者によって種々の大きさの短縮ApoBが生成され、低コレステロール血症の程度も発現するApoBの大きさによって異なる¹²⁾。コレステロール代謝異常症のAPOB変異では97%のアミノ酸が翻訳されないが、その詳細は明らかとなっておらず、翻訳後の短縮ApoBの働きや血中

動態についての検索が必要と考えられた。

AおよびB農場の生産性データをTable 1に示す。A農場においては、ヘテロ群の305日補正乳量中央値12,269kgがワイルド群12,700kgに比べ有意に低値であった ($p < 0.05$)。また305日補正タンパク質率については、ヘテロ群で高い傾向 ($p = 0.08$) がみられた。その他305日補正乳脂率、305日無脂固形分率、空胎日数、授精回数については2群間に有意差が認められなかった。なお、A農場内でのヘテロ群のTC中央値134mg/dlはワイルド146mg/dlより有意に低値であった ($p < 0.05$)。一方、B農場のヘテロ群の305日補正乳脂率中央値4.87%はワイルド群4.00%に比較して有意に高値を示した ($p < 0.05$)。また、305日補正乳量についてはヘテロ群で低い傾向 ($p = 0.07$)、305日補正乳タンパク質率はヘテロ群で高い傾向 ($p = 0.05$)、305日補正無脂固形分率はヘテロ群で高い傾向 ($p = 0.09$) がみられた。空胎日数と授精回数については、2群間で有意な差はみられなかった。なお、B農場のTCに有意差は認められないものの、ヘテロ群で低い傾向がみられた ($p = 0.08$)。

これらの結果から、A農場ではTCの低下が、乳量減少に影響を与えたことが示唆された。また、乳脂率はヘテロ群で低下することが予想されたが、B農場ではヘテロ群で高値を示した。乳脂肪の大部分は乳腺内で、第一胃発酵産物として吸収された酢酸や酪酸から合成される。一般に、泌乳初期や食欲減衰によって負のエネルギーバランスとなった乳牛では、体脂肪動員された遊離脂肪酸から乳脂肪が生成されるため高乳脂率となる。ヘテロ群でエネルギー充足率が低いために体脂肪動員が起こり、乳脂率が上昇した可能性が考えられた。また、ヘテロ群では子牛時にコレステロール代謝異常症様症状を呈して淘汰され、生産に至るまで生存していない個体が存在した可能性がある。つまり、生産性への影響が発現するような個体は、搾乳に至るまでの成長過程で、すでに淘汰されている可能性も考えられた。さらに、今回調査したTC、乳量、乳成分は、産次数や乳期、分娩時期などの要因で変動するため、今後より詳細な解析が必要と考えられた。

4. 要 約

ホルスタイン種のコレステロール代謝異常症は常染色体劣性遺伝とされているが、ヘテロ個体でも低コレステロール血症を示すことがあることから、本研究ではヘテロ群の生産性を検討した。計5農場718頭の乳牛を調べたところ、93頭(14.9%)がヘテロであった。ヘテロ群およびワイルド群のTC中央値は、それぞれ116mg/dlと129mg/dlであり、ヘテロ群のTCが有意に低値であった。乳検データを解析できた1農場において

は、ヘテロ群の305日補正乳量中央値12,269kgがワイルド群12,700kgに比べ有意に低値であった($p < 0.05$)。ヘテロ群ではTC低下と関連した乳量減少がみられたことから、ヘテロが乳生産に負の影響を与えることが示唆された。しかし、ヘテロ群の繁殖成績はワイルド群と比べて有意差がみられなかった。

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., Drogemüller, F., Meylan, M., Regenscheit, N. : *J Vet Intern Med*, **30**, 1369~1375, 2016.
- 3) 錫田直子, 大脇茂雄, 荻野敦, 黒木一仁, 堀内雅之, 猪熊壽 : 家畜診療, **64**, 515~523, 2017.
- 4) Kipp, S., Segelke, D., Schierenbeck, S., Reinhardt, F., Reents, R., Wurmser, C., Pausch, H., Fries, R., Thaller, G., Tetens, J., Pott, J., Haas, D., Raddatz, B. B., Hewicker-Trautwein, M., Proios, I., Schmicke, M., Grünberg, W. : *J Dairy Sci*, **99**, 8915~8931, 2016.
- 5) Schütz, E., Wehrhahn, C., Wanjek, M., Bortfeld, R., Wemheuer, W. E., Beck, J., Brenig, B. : *PLoS One*, **11**, e0154602, 2016.
- 6) 工藤彩佳, 大久保宏平, 互野佑香, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊壽 : 獣畜新報, **71**, 513~516, 2018.
- 7) 工藤彩佳, 田中佑典, 山木博巳, 渡邊謙一, 堀内雅之, 古林与志安, 猪熊壽 : 北獣会誌, **63**, 65~68, 2019.
- 8) Gross, J. J., Schwinn, A. C., Schmitz-Hsu, F. : *J Anim Sci*, **94**, 1761~1766, 2016.
- 9) 佐藤博 : *Anim Sci Technol*, **62**, 996~999, 1991.
- 10) 権五鏡, 小野斉, 山科秀也, 金川弘司 : 乳牛の分娩前後の血液成分および疾病発生と繁殖成績との関係, 家畜繁殖学雑誌, **31**(2), 63~67, 1985.
- 11) Menzi, F., Besuchet-Schmutz, N., Fragnière, M. : *Anim Genet*, **47**, 253~257, 2016.
- 12) Schonfeld, G. : *J Lipid Res*, **44**, 878~883, 2003.
- 13) Welty, F. K. : *Curr Opin Lipidol*, **25**, 161~168, 2014.

エゾシカ由来腸管出血性大腸菌の食品衛生リスクに関する研究

Research on food hygiene risk of enterohemorrhagic *Escherichia coli*
isolated from Sika deer

福本 晋也¹・山崎 栄樹²

(¹帯広畜産大学原虫病研究センター, ²帯広畜産大学動物・食品検査診断センター)

Shinya Fukumoto¹ and Eiki Yamasaki²

(¹National Research Center for Protozoan Diseases, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

²Diagnostic Center for Animal Health and Food Safety, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

In recent years, damage to agriculture and forestry by the increasing of sika deer population in Hokkaido has become serious problem. Therefore, the need for the sika deer population control has been increasing. Effective use of captured deer resources is being sought by providing them for meat use. In this study, we focused on enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) possessed by Sika deer, and aimed at contributing to the improvement of safety for the use of meat by clarifying the risk to its food utilization. As a result of conducting a survey in Hokkaido Tokachi district where high density habitat of sika deer, about 15% of sika deer are EHEC positive, their O-genotypes are rich in variety, and further O26: VT1/2 (+) and eae (+) was detected. These results indicate that EHEC is a risk factor to be noted in the use of Sika deer for meat.

1. 目 的

近年の野生鳥獣被害と捕獲必要性の増加を受け、野生鳥獣肉の食利用への期待が高まっている。しかしながら、その安全性の担保については理想的状態とは言えず、公衆衛生上のリスク要因であると懸念される。研究代表者の福本は獣医学教育・研究に携わったかわら、ハンターとしても活動を行っている。研究者かつハンターの立場から実際の狩猟の場で散見される実態を踏まえ、本研究は、エゾシカの微生物学的リスク要因をより明確にすることで、ジビエの食品衛生管理向上に

資することを目的として実施した。

野生動物による農林水産業被害の爆発的増大が懸念されているが、狩猟者減少による捕獲圧の低下、生息密度上昇による感染症の伝播係数上昇など、さまざまな問題が浮上してきている。そこで近年、野生鳥獣を食肉として有効利用し、付加価値によりその需要を高めることで、結果的に野生動物の生態管理を目指そうとする動向がある。そこで問題となるのが、野生動物という特殊性に起因する食品衛生リスクである。衣食住が管理された家畜とは異なり、野生動物はそのすべてが野放しであることから、一般的な自然で安全とのイ

メージとはまったく異なり、むしろ危険を大きくはらむ可能性を有している。行政による野生鳥獣肉衛生管理ガイドラインの策定や、その周知・徹底などの安全性確保への努力が払われている。その結果として、条例等に基づき適切な処理を経た野生鳥獣肉の流通が拡大してきてはいるが、依然として捕獲鳥獣の一割程度を占めるにすぎず、大部分は廃棄され、その利用は限定的である。その遠因として、捕獲法や捕獲後の処理の問題がある。

一般的に本研究の対象とするエゾシカの場合、捕獲は銃器によって行われる。正規に流通し食利用に用いる場合、肉質への影響・衛生的問題から、射撃部位は一般的に頭部もしくは頸部に限定される。すなわち心臓・肺等の大型バイタル臓器が位置し、体サイズに対して大きな割合を占める胸部は食利用の観点からは狙撃部位として不適である。一般にエゾシカの捕獲に用いられる銃器はライフル銃と散弾銃（ハープライフル銃）に大別される。散弾銃を継続して10年間所持後ライフル銃の所持が許可される。散弾銃はライフル銃と比較すると命中精度、有効射程ともに劣る。したがって、一定以上の技能を有するかつ熟練のライフル所持者以外のハンターにとっては、食利用に供するためのエゾシカの捕獲は容易とは言えないのが現状である。

次に捕獲後の搬送の問題がある。野生鳥獣を食利用に供する場合、肉質の維持のため捕獲後、一定時間以内に剥皮等の一時処理を公的に認可された施設で行う必要がある。一般の食肉処理施設の場合、捕獲後2時間以内の搬入が受け入れ基準となっている。実際の捕獲現場の状況を鑑みるとこの時間基準は容易なものではない。昨今、有害鳥獣捕獲への補助金が増額されたことから、駆除捕獲圧が高まっている。その結果、エゾシカの狩猟可能地域・時間への出没は減少の一途である。しかしながら生息数が減少したのかというところで

はなく、狩猟不可地域および時間での活動が増加している。すなわち、エゾシカの出没は捕獲困難な地域へと移っている。したがって、捕獲圧がより少ない地域、つまりより辺鄙な地域での狩猟を行う必要がある。すなわち、山奥の猟場でエゾシカを銃器で捕獲、100kgを超えることも稀ではないエゾシカを車まで運搬、過酷な山道を移動しエゾシカの受け入れを行っている処理施設への移動、以上のプロセスを2時間以内に行うことは容易ではない。

このようにハンターの立場から見ると捕獲したエゾシカを正しい流通経路に載せることは、一般市民の想像以上に困難なことである。結果として、正規の処理経路を経ない野生鳥獣肉が、レストラン等で商業利用されている実態が散見される。このような安易な取り扱いが喫食リスクに対する知識浸透が不十分なことが原因の一つと考えられる。ガイドライン等の「どのような病原体を保有しているか不明であること等から生食はするべきでなく」の文言から理解されるように、具体的なリスク要因が不明なため明確な注意喚起ができないことが、一般消費者・飲食業者・狩猟者のリスク意識向上への妨げとなっていると考えられる。

そこで本研究では、日本で最も増加が問題となっている野生鳥獣であるシカを対象に、その主要生息地域である北海道東部地方を調査モデル地域として設定し、エゾシカ食品衛生リスクの一端の具体化を試みることにした。現在までの我々の研究により、食中毒起因性病原微生物として最重要の一つである腸管出血性大腸菌（EHEC）をエゾシカが約15%と高率で保菌していることを明らかにしてきた。本研究ではエゾシカが保有するEHECに着目し、より詳細に解析を行うことで、ジビエ利用におけるEHECの微生物学的リスクを明確化することを目的として研究を展開した。

2. 方 法

2.1 エゾシカ糞便サンプルの収集

十勝地方を中心とした北海道東部地域において狩猟または有害鳥獣駆除による許可捕獲によって、銃猟によって射獲後、食肉処理施設等に運ばれた個体より、エゾシカ個体トレーサブルな形で直腸便を採取した。採集エゾシカ糞便は20%グリセロール溶液に懸濁、解析まで4℃または-20℃にて保存した。本研究報告においては主として2016年から2018年にかけて採材した糞便約350サンプルを解析に供した。

2.2 エゾシカ糞便由来DNAのベロ毒素 (VT) 遺伝子スクリーニング

採取したエゾシカ糞便より PureLink Microbiome DNA Purification Kit (ThermoFisher Scientific) を用いて、DNAを精製した。精製DNAについて腸管系病原細菌遺伝子検出キット (TAKARA) を用いたリアルタイムPCR (StepOne, ThermoFischer Scientific) 法により、腸管出血性大腸菌 (EHEC) 陽性糞便サンプルのスクリーニングを行った。

2.3 エゾシカ糞便由来EHECの分離培養

上記リアルタイムPCR法の陽性検体について、EHEC選択培地であるクロモアガーSTEC (関東科学) を用いたEHECの分離培養を試みた。得られたコロニーについて、O-157 (ベロ毒素1型, 2型遺伝子) PCR Typing Set (TAKARA) を用いてEHECコロニーの同定を行った。クロモアガーSTECによってEHECコロニーを分離できなかったEHEC陽性糞便サンプルについてはBHI培地を用いた培養を行い、O-157 (ベロ毒素1型, 2型遺伝子) PCR Typing Setを用いてEHECコロニーの同定を行った。

2.4 エゾシカ糞便由来EHECの性状解析

同定に成功したEHECコロニーについて、井口

らによる*E. coli* O-genotyping PCR法¹⁾によってO抗原型の特定を分子生物学的に行った。また、病原性遺伝子として知られるeae遺伝子²⁾ (SK1: CCCGAATTTCGGCACAAGCATAAGC, SK2: CCCGGATCCGTCTCGCCAGTATTTCG), aggR遺伝子³⁾ (aggRKs1: GTATACACAAAAGAAGGAAGC, aggRKas2: ACAGAATCGTCAGCATCAGC), LT遺伝子⁴⁾ (TW20: GGCGACAGATTATACCGTGC, JW11: CGGTCTCTATATTCCCTGTT) についてもPCR法による検出を試みることで、エゾシカ糞便由来EHECの性状解析を分子生物学的に行った。

3. 結果と考察

糞便由来DNAのリアルタイムPCR法による解析の結果、赤痢菌、サルモネラ菌については全個体において陰性を示した。腸管出血性大腸菌については約350検体中54検体が明確な陽性のピークを示した。陽性検体については、VT遺伝子のサブタイピングをPCR法により実施した結果、VT1およびVT2遺伝子の双方が確認された。また、陽性個体について、関東科学クロモアガーSTECを用いて、糞便よりEHECの分離培養を試みた結果、一部のPCR陽性サンプルよりVT遺伝子陽性コロニーを分離することに成功した (Table 1)。分離株についてPCR法によりO抗原型の同定を試みた。クロモアガーSTECでは分離不可能なEHECも存在するため、さらにBHI培地を用いた単離培養を試みた結果、クロモアガーSTECにより単離したものも含め、15種のO抗原型がエゾシカ由来EHECより検出された (Table 1)。EHEC分離培養成功株について病原性遺伝子の検出を行った結果、aggR遺伝子とLT遺伝子については明確な陽性バンドを呈する検体は得られなかった。一方eae遺伝子については13株が陽性を示した。O26はO157について公衆衛生上の問題とな

Table 1 The properties of EHEC clones isolated from stool samples of Yeso Sika deer.

Sample ID	SEX	AGE	VT subtype	O genotype	eae
12	♀	1	1	O156	+
19	♀	2	1	O98	+
30	♀	3	2	O83	−
51	♀	3	2	O76	+
54	♂	2	1/2	O26	+
54	♂	2	2	O10	−
55	♂	2	2	O83	+
68	♀	3	2	O159	−
17-1	♂	3	2	O22	−
17-8	♀	3	2	O22	−
17-11	♀	3	2	O83	+
17-23	♀	3	2	O83	+
17-39	♀	3	2	O21	−
17-40	♂	2	2	O83	+
17-46	♂	5	2	O10	−
17-52	♂	2	2	O83	+
17-68	♂	3	2	O83	+
17-72	♂	1	2	O22	−
17-87	♀	3	2	O22	−
17-119	♀	3	1	ND	−
17-120	♀	3	2	ND	−
17-136	♀	3	2	O83	−
17-144	♀	3	2	O83	+
17-155	ND	ND	2	O10	−
17-157	♀	2	2	O117	−
17-160	♀	3	1	O7	−
17-163	♂	2	2	O79	+
17-164-1	♀	3	2	O181	−
17-169	♂	2	2	ND	−
17-183	♂	3	2	O10	−
17-192	♂	2	1	O149	+
17-195	♂	2	2	O75	−
17-205	♀	2	2	O22	−
17-207	ND	ND	2	O83	+
17-219	♀	3	2	O28ac	−
17-228	♀	3	2	O83	+
18-2	♀	3	2	O83	+
18-12	ND	ND	2	O10	−

ND : not determined

る抗原型である。本研究でエゾシカから分離されたO26はeae, VT1/2陽性であり、公衆衛生上も重大な被害を起こし得る可能性が示唆され、このようなEHECが検出されたことはエゾシカジビエ利用において重要な知見であると言える。

宮崎大学・井口准教授らの2016年食品衛生動物学会大会等での報告によると、本州ニホンジカで分離されるO抗原型は限定的であるとされている。北海道十勝地方において多様なO抗原型が検出されることは特徴的な現象であり、今後日本の各地方との比較調査の実施が望まれる。エゾシカにおいて比較的高率にEHECが陽性となったことは、食利用以外にも農作物の汚染等についても考慮する必要がある。家畜は一般的に管理された特定箇所での飼育されているため、家畜の糞便由来の病原体は家畜飼育場所以外に拡散しないよう、一定のコントロールがなされている。しかし、エゾシカにはそのような制限はないため、糞便をさまざまな場所にまき散らす。事実、十勝地方においては農作物を荒らすことからエゾシカは有害鳥獣とされており、その姿は繁茂に畑で確認される。したがって、エゾシカの糞便による農作物への汚染は容易に起こるため、生食の対象となる野菜等の衛生管理は重要と考えられる。

以上のことから、エゾシカの保有する腸管出血性大腸菌の疫学については、十勝地方だけでなくより広範囲に、その詳細を明らかにすることが重要であると考えられる。

4. 要 約

近年、エゾシカの個体数増加による農林業被害が深刻化し捕獲必要性が増加している。ジビエ利用に供することで有効な資源利用が模索されている。本研究ではエゾシカが保有する腸管出血性大腸菌に注目しその食利用へのリスクを明確化することでジビエ利用への安全性向上に資することを目的とした。エゾシカの高密度生息地域である北海道十勝地方で調査を行った結果、約15%のエゾシカがEHEC陽性、そのO抗原型はバラエティーに富む、さらにはO157について問題となるO26:VT1/2(+), eae(+)が存在することなどが明らかとなった。これらの結果はエゾシカのジビエ利用においてEHECは留意すべきリスク要因であることを示すものであった。

文 献

- 1) Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Morita-Ishihara, T., Scheutz, F., Ohnishi, M.: *Escherichia coli* O-Genotyping PCR: a Comprehensive and Practical Platform for Molecular O Serogrouping, *J Clin Microbiol*, **53**, 2427~32, 2015.
- 2) Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Gleier, K.: Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period, *J Clin Microbiol*, **42**, 1099~108, 2004.
- 3) 小林一寛, 勢戸和子, 八柳潤, 齊藤志保子, 寺尾通徳, 金子通治, 芹川俊彦, 倉本早苗, 藤沢倫彦, 鈴木理恵子, 山崎貢, 林賢一, 松根渉, 安岡富久, 堀川和美, 村上光一, 河野喜美子, 山田亨, 伊藤健一郎: 下痢原性大腸菌における付着性因子保有状況とそれに基づく大腸菌検査法の一考察, 感染症誌, **76**, 911~920, 2002.
- 4) Stacy-Phipps, S., Mecca, J. J., Weiss, J. B.: Multiplex PCR assay and simple preparation method for stool specimens detect enterotoxigenic *Escherichia coli* DNA during course of infection, *J Clin Microbiol*, **33**, 1054~9, 1995.

産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索（Ⅱ） —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（Ⅱ）

—to identify more effective regions for their vaccination—

市居 修・中村 鉄平・小千田 圭吾・山下 祐輔・池田 哲平

（北海道大学大学院獣医学研究院）

Osamu Ichii, Teppei Nakamura, Keigo Kosenda, Yusuke Yamashita and Teppei Ikeda

（Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University）

In recent years, the development of a mucosal vaccine is progressing rapidly and has been put to practical use in respiratory diseases of chickens such as highly pathogenic avian influenza. These methods target to mucosa-associated lymphoid tissues, in particular the role of “eye-associated lymphoid tissue” would be important for the achievement of effective ophthalmic vaccination. In addition, it is a possibility that the mucosa of genital organs would be a target site to induce the mucosal immunity, but its morpho-functional information is still scarce. Therefore, in the present study, we focused on the mucosa-associated lymphoid tissues of “eye” as well as “genital organs” in cattle and pigs and investigated their morphology. Our histological analysis revealed that the mucosa-associated lymphoid tissues were developed in the conjunctiva and third eyelid in the cattle and miniature pigs. Further, we also clarified the localization of T-cells, B-cells, and Cytokeratin 18-positive cells (M cell-like cells) in eye-associated lymphoid tissue of cows. In genital organs, the mucosa associated lymphoid tissues were observed in vaginal vestibule of both species. Thus, these the mucosa associated lymphoid tissues have the possibility of future development of local mucosal vaccination to induce a host mucosal immunity in these animal species. In further study, we would continue to focus on the possibility of mucosa-associated lymphoid tissue to realize the efficient immunity induction in farm animals.

1. 目 的

産業動物獣医療では乳牛の乳房炎，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問題となる。近年，粘膜免疫を誘導して粘膜への病原体侵入を未然に防ぐことができる“粘膜型ワクチン”の開発に大きな関心が寄せられている。これまで産業動物の感

染症予防においては，全身免疫を誘導する注射型ワクチンが主体だった。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，上述のように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，我々はIgAを主役とする局所粘膜免疫誘導による感染防御がより効果的であると考え，研究を進めている。

粘膜免疫では、MALTが機能的な主役となり、抗原提示細胞、T細胞やB細胞等の細胞集団を上皮細胞周辺に配置し、リンパ球を機能的に成熟させる。これまで、代表的な粘膜関連リンパ組織(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)が注目されてきた。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TSV 2 (牛伝染性鼻気管炎と牛パラインフルエンザ3型) 経鼻ワクチンが実用化され、豚では回虫抗原を応用した粘膜免疫が検討されてきた。さらに近年、点眼ワクチンの開発も日進月歩であり、高病原性鳥インフルエンザ等、鶏の呼吸器疾患で実用化されている。粘膜型ワクチン接種には高価な医療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。

我々は、牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及を想定している。昨年度までの研究において、ワクチンを接種しやすい粘膜免疫誘導部位として“眼と腔”に注目し、特に両動物種の眼球結膜部分にMALTが存在することを明らかにした(結膜関連リンパ組織(CALT)や涙道関連リンパ組織(LTALT)を併せて眼関連リンパ組織(EALT)と呼ぶ)。口や直腸もワクチン接種候補部位となるが、前者は食渣に、後者は糞便に邪魔されるだろう。また、眼と腔の所属リンパ節を考慮に入れると、眼は上部気道疾患に、腔は付近の尿生殖器や乳房等への免疫誘導に有用であると考えられる。MALTには特徴的な胞被蓋上皮が存在し、特に抗原取り込み能を有する“M細胞”が重要である。M細胞は基底膜側に樹状細胞等を集簇させ、外来抗原に対する粘膜免疫誘導に重要な役割を果たす。牛と豚のEALTにおける

M細胞の存在は明らかではないが、これまで両動物種のEALTでは粘膜上皮下に濾胞性あるいは散在性にリンパ球が集簇することを明らかにしてきた。

本年度では、牛のEALTに着目してその形態や構成細胞を調べるとともに、牛とミニ豚を用いてまだ明らかではなかった生殖器関連リンパ組織の探索を実施した。特に、昨年度までの検索では生殖器関連リンパ組織を発見できなかったが、今回腔前庭にMALTを発見した。

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)。ニチロ畜産名寄工場のと体、本学部の実習で安楽死された雌のホルスタイン種成牛、および雌の交雑系成ミニ豚を用いた。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。動物から眼瞼、眼球結膜、第三眼瞼、腔前庭および腔を採取した。

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た。生殖器に関してはホルマウントヘマトキシリン染色を施し、塩酸アルコールで脱色しながら観察した。肉眼観察後、すべての組織を階段希釈アルコール系列で脱水後、定法に従いパラフィン包埋組織を作成した。パラフィンブロックから3 μ m厚の組織切片を作成後、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を施した。

牛の結膜組織を用いて免疫組織化学を実施した。脱パラフィン後の切片をTris-HCl緩衝液(pH9.0)で110℃, 15分間加熱し, 抗原を賦活化した。0.3% H_2O_2 /メタノールに切片を浸漬し, 内因性ペルオキシダーゼを除去した。10%正常ヤギ血清でブロッキング後(ニチレイ, 東京, 日本), T細胞マーカーCD3(ニチレイ, 東京, 日本), B細胞マーカーB220(Cedarlane, Ontario, カナダ)およびM細胞マーカーCytokeratin 18(Progen, Heidelberg, ドイツ)の一次抗体と4℃, 一晚インキュベートした。切片を0.01Mリン酸緩衝液で洗浄後, ビオチン標識抗ウサギIgG二次抗体およびHRP標識ストレプトアビジンビオチン(ニチレイ, 東京, 日本)と反応させ, 3,3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩で発色した。

2.3 画像解析

組織スライドグラスについて, BZ-X710(キーンズ, 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 牛のEALTの形態と構成細胞について

昨年度の検索と同様, 牛の眼瞼結膜および眼球結膜には散在性リンパ組織や集合リンパ小節が存在した(Fig. 1)。第三眼瞼結膜においては散在性リンパ組織を認めたが, いずれの標本も明瞭な濾胞構造や胚中心は認められなかった。結膜については, 上眼瞼と下眼瞼のリンパ組織を比較したが, いずれの所見についても上下の眼瞼で明瞭な差異は認められなかった。

結膜の散在性リンパ組織においてはB細胞とT細胞が混在し, リンパ小節においては中心部にB細胞領域, その周辺にT細胞領域が形成されていた(Fig. 1a, b)。リンパ組織上の粘膜上皮にはCytokeratin18陽性細胞が局在しており, M細胞様細胞の存在が示唆された(Fig. 1c)。特に集合

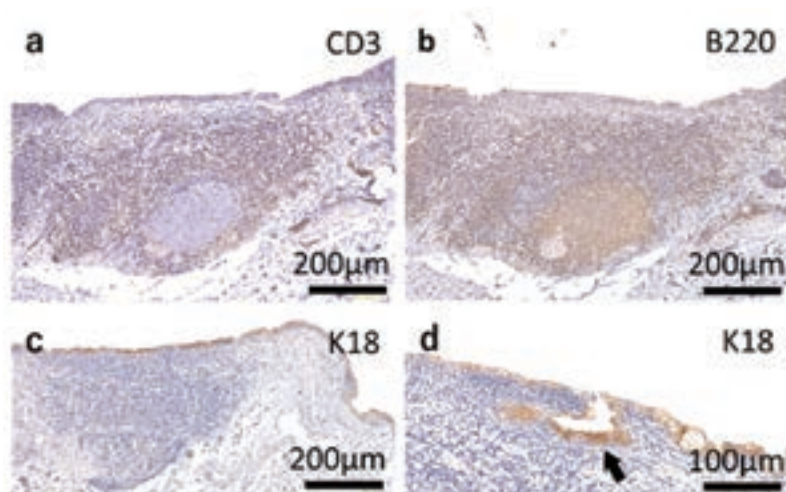


Fig. 1 Comosing cells of eye-associated lymphoid tissue (EALT) in cow.

Panels a-d show the bulbar conjunctiva-associated lymphoid tissues (BCALT). CD3-positive T cells and B220-positive B cells are localized to BCALT. Cytokeratin 18 (K18)-positive epithelial cells are detected in mucus epithelium of bulbar conjunctiva (panel c), and these cells are partially accumulated to crypt-like structures (panel d, arrows). Immunohistochemistry.

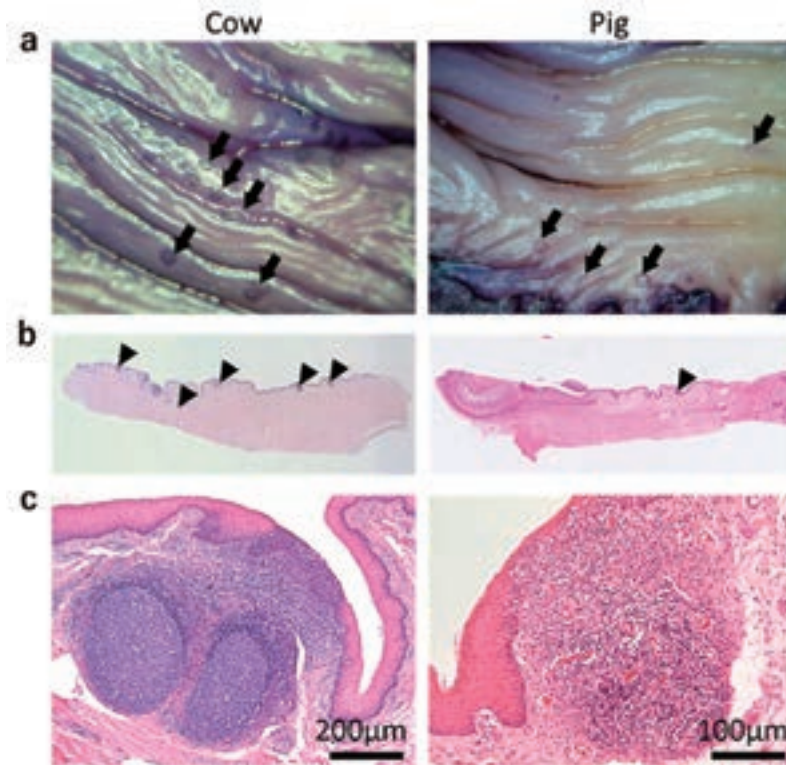


Fig. 2 Morphology of genital organ-associated lymphoid tissue (GOALT) in cow and miniature pig.

Panel a shows the hematoxylin-stained wholemount specimen of vaginal vestibules. Several crater-like structures are observed. For histological sections, crater-like structures in gross anatomy indicated lymphoid follicles (panel b and c, arrowheads). HE staining (panels b and c).

リンパ小節上の粘膜上皮には陰窩様の陥凹部が存在し、Cytokeratin18強陽性上皮細胞が集簇していた (Fig. 1d)。

3.2 牛と豚の生殖器関連リンパ組織について

両動物種の腔前庭部のホルマウント標本を観察した。腔前庭の粘膜部に小円のクレーター状構造が散在性に認められた (Fig. 2a)。本部位のパラフィン包埋組織を作成し、その組織切片を観察したところ、上皮下に散在性および濾胞性のリンパ組織が見られた (Fig. 2b)。濾胞性のリンパ組織の直上では、粘膜上皮が欠損し、リンパ組織が一部粘膜面に露出していた (Fig. 2c)。以降、このMALTを生殖器関連リンパ組織 (GOALT) と

する。

3.3 考察

これまでの予備実験ならびに昨年度の解析から、牛、馬、猫、豚 (ミニ豚) およびマウス¹⁾ 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のEALTについて検索を行い、その組織構成細胞、特にT細胞とB細胞の局在を明らかにした。また、興味深いことにCytokeratin18陽性細胞が結膜上皮に存在し、当該部位にM細胞様細胞の存在が示唆された。過去の報告より、動物のM細胞マーカーとして、マウスではGlycoprotein 2²⁾ 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³⁾, 牛のM細胞はCytokeratin18やCyclophilin Aに陽性を示す⁴⁾。Cytokeratin18に加え, 他のM細胞マーカーの発現, さらにはEALTへの抗原取り込み能を評価し, 牛と豚のEALTにおけるM細胞の存在とその機能的意義を明らかにしたい。

本研究において, 牛とミニ豚の腔周囲, 特に腔前庭部分にGOALTを発見した。これまで動物の腔におけるMALTに関して明確な報告がなく, その機能的意義は非常に興味深い。腔前庭部には大きな種差が存在し, げっ歯目では本部位の発達が悪く, 実験げっ歯目のGOALT研究への応用は難しいのかもしれない。

眼瞼および腔前庭は薬剤の留置に適しており, 人医療では過去に下眼瞼留置型のピロカルピン徐放剤が使用され, また, 産業動物では牛用の腔内留置型プロジェステロン徐放剤が汎用されている。単に, GOALTへの抗原塗布も有用かもしれない。本研究で免疫誘導部位として着目する眼および腔前庭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, 粘膜型ワクチンの開発は日進月歩であり, 高病原性鳥インフルエンザ等, 鶏の呼吸器疾患で点眼ワクチン実用化されている。これらは粘

膜関連リンパ組織 (MALT) を標的としており, 特に点眼ワクチンでは“眼関連リンパ組織 (EALT)”の役割が重要である。加えて, ワクチンを接種しやすい粘膜免疫誘導部位として生殖器も考えられるが, そのMALTに関する報告は皆無である。本研究では, 産業動物, 特に牛と豚 (ミニ豚) の眼と生殖器のMALTに着目し, 形態学的研究を進めた。本解析より, 両動物種ともに結膜および第三眼瞼にEALTを具備すること, また, 牛のEALTにおけるT細胞, B細胞, Cytokeratin18陽性細胞 (M細胞マーカー) の局在を明らかにした。また, 両動物種の腔前庭に散在性および濾胞性のリンパ組織を発見した。眼と腔前庭のMALTは牛と豚における将来の粘膜型ワクチンの発展と普及への可能性を有しており, 今後もこれらを利用して効率的な免疫誘導を実現する可能性に着目したい。

文 献

- 1) Kosenda, K., Ichii, O., Otsuka, S., Hashimoto, Y., Kon, Y. : *Clin Exp Ophthalmol*, **41**, 788 ~ 797, 2013.
- 2) Terahara, K., Yoshida, M., Igarashi, O., Nochi, 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.
- 3) Tohno, M., Shimosato, T., Moue, M., Aso, H., Watanabe, K., Kawai, Y., Yamaguchi, T., Saito, T., Kitazawa, H. : *Vet Res*, **37**, 791 ~ 812, 2006.
- 4) Hondo, T., Someya, S., Nagasawa, Y., Terada, S., Watanabe, H., Chen, X., Watanabe, K., Ohwada, S., Kitazawa, H., Rose, M. T., Nochi, T., Aso, H. : *Cell Tissue Res*, **364**, 585 ~ 597, 2016.

豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明

Mechanisms of progression of severe porcine circovirus associated diseases
by porcine intestinal cell model system

岡 林 環 樹

(宮崎大学農学部獣医学科)

Tamaki Okabayashi

(Department of Veterinary medicine, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) causes a highly contagious enteric infection in swine. PEDV damages pig intestinal epithelial tissues, causing intestinal hyperemia and atrophy of intestinal villi, with formation of intestinal epithelial cell cytoplasmic vacuoles. Porcine circovirus type 2 has been associated with a number of different syndromes and diseases such as postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) and porcine dermatitis and nephropathy syndromes (PDNS). Recently, dual infection with PEDV and PCV2 has been reported in neonatal piglets. Moreover, the clinical course of PEDV diseases was markedly affected in PCV2-transplacenta infected pigs. However, direct interaction of PEDV and PCV2 infections has not been demonstrated yet. The objective of present study was to investigate the effect of PEDV-PCV2-co-infection on porcine intestinal epithelial cells (PIE cells lines) established by Moue et al., 2008.

PCV2 isolation and cells persistently infected PCV2, derived from pig serum with PCV2, has been attempted with PIE cells. Using these PCV2-infected PIE cells, PEDV-coinfection model was established and evaluated the viral propagation by TCID₅₀ and mRNA activation of type I/III Interferons (IFN) by qRT-PCR.

PCV2 was successfully isolated by PIE cells. The persistent infection of PCV2 were established with 3rd PCV2 infected-cell-passage and confirmed the 30% infectivity by indirect immunofluorescence assay. Any cytopathic effects were observed on neither PCV2 nor PEDV infected PIE cells. However, significantly CPE appeared at 2 days post PEDV infection in PIE cells coinfecting with PCV2 and PEDV. Viral copy numbers of PEDV and activation of type I/III IFNs mRNA in coinfection cells were significantly higher than those in single infection cells.

It is concluded that the cell damages and PEDV propagation were markedly enhanced PCV2 infected cells. Our results suggested that PCV2 infection potentiates PEDV-propagation in pig intestine epithelial cells.

1. 目 的

豚流行性下痢ウイルス (PEDV) は小腸上皮細胞を標的とし、日齢に関係なくすべての豚に感染する。特に哺乳豚では、致死的な水様性下痢を引き起こし、壊滅的な被害を及ぼすために、その経済的影響が大きな問題となっている。豚サーコウイルス 2 型 (PCV2) は、単独感染では多くが不顕性に経過する。PCV2 は他病原体との重複感染により、離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) の他に豚皮膚炎腎症候群 (PDNS)、豚離乳後多臓器性発育不良症候群 (PMWS) をはじめとするさまざまな病型との関連性が指摘されている。しかしながら、PCV2 と他病原体との直接的な関連性は明らかにされていないのが現状である。

近年 Hirai らによって、新生哺乳豚における PCV2 と PEDV の重複感染が報告された¹⁾。彼らの報告では、腸管上皮細胞に PEDV の抗原、マクロファージなどの免疫細胞に PCV2 の抗原を検出しているが、同一細胞における重複感染は確認していない。Jung らは PEDV に自然感染した新生哺乳豚の腸管上皮細胞に PCV2 遺伝子を検出し、PCV2 が PEDV 発症豚から多く検出されることを報告した²⁾。また、PCV2 を胎盤経路にて感染させた新生哺乳豚においては、PEDV の症状が長期化し、重症化することを確認している³⁾。しかし、生体内におけるそれぞれのウイルスの動態や腸管上皮細胞に与える影響などは不明である。

Moue ら (Moue *et al.*, 2008) は豚小腸の上皮細胞における免疫反応を解明するために、豚の小腸より腸管上皮細胞 Porcine intestinal epithelial cells (PIE 細胞) を樹立した。この PIE 細胞を豚腸管上皮細胞モデルとして、LPS 刺激に対する TLR 4 経路の細胞情報伝達系が活性することを報告した⁴⁾。そこで本課題においては、この樹立

された PIE 細胞を用いて、PCV2 の分離および PCV2 感染細胞の樹立を試みた。また、この PCV2 感染細胞を用いて、PEDV の重複感染豚腸管上皮細胞モデルの作製を行った。これらの PCV2 と PEDV の重複感染豚腸管上皮細胞モデルを用いて、ウイルス増殖性、細胞障害性および免疫応答への影響を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

PIE 細胞は東北大学の麻生久先生から分与を受けた。これらの PIE 細胞を Moue らの方法を改変し⁴⁾、DEME/F-12 に添加物を加えることにより、さらに栄養リッチな細胞培養液を用いた培養を行った。宮崎県で採集された PCV2 感染豚血清を PIE 細胞に接種し、接種された細胞を 1/3 継代 - 7 日間培養にて 3 代繰り返すことで PCV2 の分離を試みた。また PIE 細胞および PCV2 感染 PIE 細胞に PEDV (Fukuoka-1/Japan/2014 株: 福岡中央家畜保健所より分与) を MOI 1 にて感染させて、ウイルス増殖性、細胞障害性、免疫誘導性への影響を比較した。ウイルス増殖性を定量 RT-PCR 法 (qRT-PCR)、間接蛍光抗体法 (IFA)、TCID₅₀ により解析した。また I 型/Ⅲ型インターフェロン (IFN) mRNA の誘導性を qRT-PCR により測定した。

3. 結果と考察

PCV2 感染豚血清を接種した PIE 細胞の培養上清中に PCV2 遺伝子を検出したことから、PCV2 の分離を確認した。PCV2 の分離は一般的には豚腎臓上皮細胞である PK-15 が用いられている。しかしながら ATCC などの細胞バンク由来の PK-15 細胞にはすでにサーコウイルスが感染していることが明らかになっており、PCV2 の分離には PK-15 細胞集団の中から非感染細胞をクローニングして分離用細胞としてしなければならず、困難

をきたす⁵⁾。本実験結果において、PIE細胞がPCV2分離のための新しい有用な細胞であることを提言することができた。

PCV2感染PIE細胞では、上清中ウイルス遺伝子コピー数が細胞の継代を重ねるごとに増加したことから、PCV2のPIE細胞への持続感染が起こっていると考えられた (Fig. 1)。細胞内におけるPCV2抗原をIFAにて観察すると、30%の細胞がPCV2に感染していた (継代3代目 Fig. 2)。この継代3代目PCV2持続感染PIE細胞にPEDVを重複感染することにより、重複感染しているPIE細胞 (PCV2+PEDV) において、感染2日目に

PCV2やPEDV単独感染では観察できなかった顕著な細胞変性効果 (CPE) の出現が確認できた。

またその培養上清中における感染性ウイルスの存在をVero KY 5細胞を用いたTCID₅₀法によって測定すると、PCV2やPEDV単独感染細胞よりもPCV2とPEDVの重複感染細胞において有意に高い感染性ウイルスの増殖が確認できた (Fig. 3)。これらの条件下における細胞上清中、細胞中のウイルス核酸量をqRT-PCRにて測定すると、TCID₅₀のデータに相関して、PCV2とPEDVの重複感染細胞においては細胞上清中、細胞中ともにPEDVのコピー数が有意に高い値を示した (Fig.

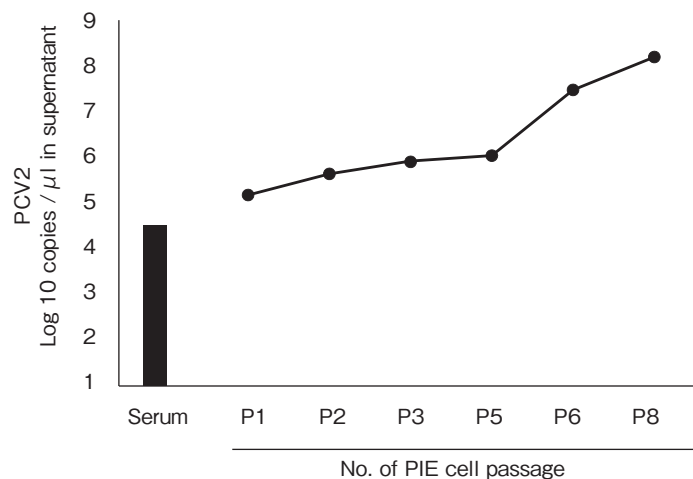


Fig. 1 Isolation of PCV2 and establishment of persistent PCV2 infection with PIE cells.

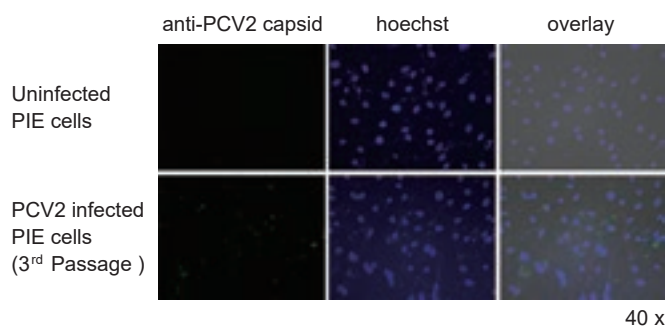


Fig. 2 Indirect immunofluorescence assay images for PCV2 infected PIE cells.

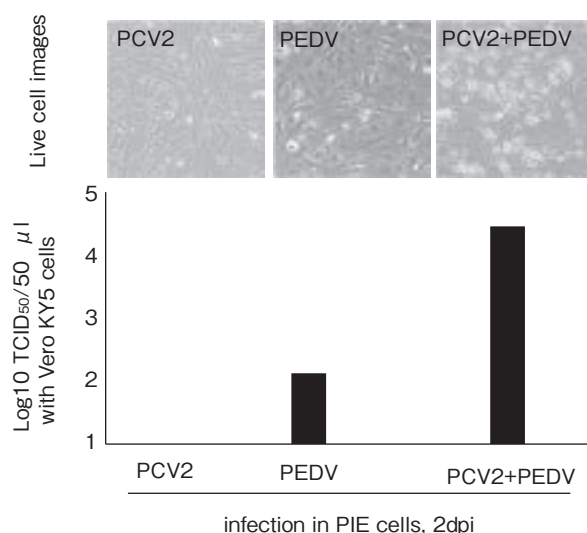


Fig. 3 Live cell images and TCID₅₀ of PCV2 and/or PEDV infected PIE cells.

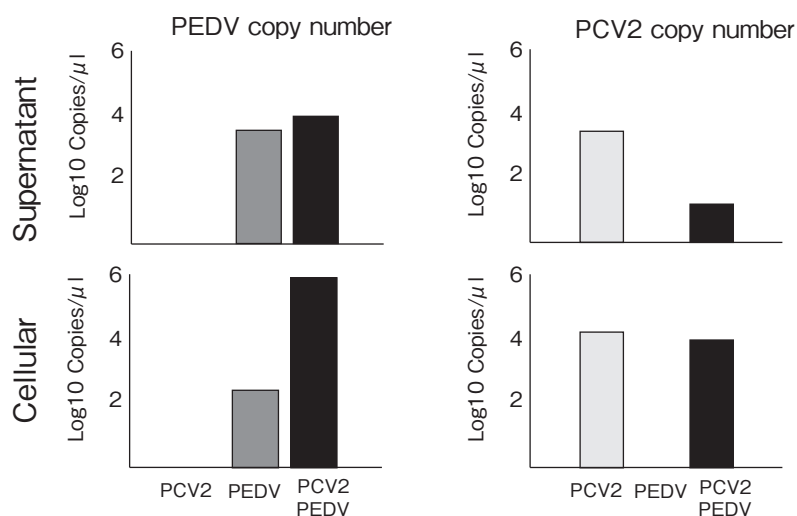


Fig. 4 Viral copies number of PCV2 and PEDV of PCV2 and/or PEDV infected PIE cells.

4)。PCV2とPEDVの重複感染細胞におけるPCV2の細胞内コピー数には変化はなかったが、しかし上清中のPCV2コピー数は減少していた。これらの結果より、PCV2とPEDVの重複感染細胞においては、PEDVの複製および放出が増幅されていることを示した。また重複感染することによりPCV2の細胞内における複製には影響を与え

ないが、PCV2の放出を抑制する作用があることが示唆された。またPCV2とPEDVの重複感染細胞では、I型／III型IFN mRNAの発現が増強されたために、I型／III型IFNがPEDVとPCV2にそれぞれ異なる抗ウイルス効果を与えている可能性が考えられた。

4. 要 約

本研究において、PCV2感染豚血清からPIE細胞を用いてPCV2の分離に成功した。これらのことよりPCV2の新しい分離用細胞としてPIE細胞の有用性を確認することができた。またPCV2が感染した豚腸管上皮細胞にPEDVが重複感染すると、PEDVの増殖性が亢進され、細胞障害性が強く誘導されることが明らかになった。本研究で確立したPIE細胞を用いたPCV2感染モデルが、病原性が明瞭でないPCV2とPEDVやその他の病原体との相互関係により重症化を示唆するような細胞障害、炎症反応を起こすのかを調べるための有用なツールになると考えられた。

文 献

- 1) Hirai, T., Nunoya, T., Ihara, T., Kusanagi, K., Shibuya, K. : Dual infection with PCV2 and porcine epidemic diarrhea virus in neonatal piglets, *Veterinary records*, **148**, 482~484, 2001.
- 2) Jung, K., Ha, Y., Ham, S. K., Kim, J., Choi, C., Park, H. K., Kim, S. H., Chae, C. : Identification fo porcine circovirus type 2 in retrospective cases of pigs naturally infected with porcine endemic diarrhea virus, *The Veterinary Journal*, **171**, 166 ~ 168, 2007.
- 3) Jung, K., Kim, J., Ha, Y., Choi, C., Chae, C. : The effect of transplacental porcine circovirus type 2 infection on porcine epidemic diarrhea virus-induced enteritis in preweaning piglets, *The Veterinary Journal*, **171**, 445~450, 2007.
- 4) Moue, M., Tohno, M., Shimizu, T., Kido, T., Aso, H., Saito, T., Kitazawa, H. : Toll-like receptor 4 and cytokine expression involved in functional immune response in an originaly established porcine intestinal epithelial cells, *Biochim. Biophys. Acta*, **1780**(2), 134~144, 2008.
- 5) Zhu, Y., Lau, A., Lau, J., Jia, Q., Karuppannan, A., Kwang, J. : Enhanced replication of porcine circovirus type 2 (PCV2) in a homogeneous subpopulation of PK15 cell line, *Virology*, **369**, 423 ~ 430, 2007.

アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する疫学研究

Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan

杉 浦 勝 明・芳 賀 猛

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga

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

To identify and rank the potential risk factors associated with the introduction and spread of ASF in Japan, we conducted a rapid risk assessment using a questionnaire composed of 10 questions asking experts in African swine fever (ASF). The 12 experts who participated in this risk assessment considered illegal import of food as the most relevant pathways of ASF introduction into Japan followed by transport routes and foreign workers. Kanto and Kyushu were the regions where ASF is most likely to be introduced. All experts agreed that China is the most likely source of ASF introduction into Japan. Most Japanese experts were of the view that the risk of spread of ASF once introduced in Japan is low, while foreign experts answered that the risk of spread is moderate or high. Most experts answered that the presence of wild boars will play an important role in the persistence of ASF, once the disease spread in Japan. Based on the risk factors identified by this rapid risk assessment, we conducted a questionnaire survey targeting the pig farms in Japan to collect data at farm level on the employment of foreign workers, practice of swill feeding and implementation of biosecurity measures. This survey based on response from 578 farmers of 42 prefectures revealed that the proportion of pig farms with foreign employees is relatively high in Kanto region than in other regions while the proportion of pig farms practicing swill feeding is high in Kansai region. In most prefectures throughout Japan, shower-in-and-out was conducted in less than half of pig farms. These results will provide policy makers, veterinarians and pig farmers with useful information in developing quarantine programs to protect Japanese pig herds from the introduction and spread of ASF.

1. 目 的

アフリカ豚コレラ (ASF) は、アフリカ豚コレラウイルス (ASFV) により起こるきわめて伝播力の強い豚の感染症である¹⁾。ASFは豚やイノ

シシ間の直接または間接的接触により広がり、高い死亡率を示す。ASFVは、環境中およびさまざまな豚肉製品中で長期間生存することから、畜産物を介して遠隔地に持ち込まれることがある。常在国や流行国では、野生のイノシシやヒメダニ

(Ornithodoros) で感染サイクルが形成され、防疫を困難にする²⁾。

ASFは1921年にケニアで最初に報告されて以降、サハラ以南のアフリカ諸国でのみ流行していた。1957年および60年に初めてアフリカ以外の国ポルトガルで発生し、その後一部のヨーロッパ諸国、カリブ海諸国、ブラジルに広がったが、2000年初頭までにはアフリカとイタリアのサルジニア島を除く地域から撲滅された^{3~5)}。2007年にコーカサス地方のジョージアに侵入し、その後、ロシア連邦、アルメニア、アゼルバイジャンなど近隣諸国に広がり、さらに、ウクライナ (2012)、ベラルーシ (2013)、エストニア (2014)、ラトビア (2014)、リトアニア (2014)、ポーランド (2014)、モルドバ (2016)、チェコ (2017)、ルーマニア (2017) と発生が続き、流行地域は拡大している^{5~7)}。2017年3月、ASFはロシア連邦のイルクーツク (中国との国境から1000km) で報告された⁸⁾。2018年8月、ASFは中国の遼寧省瀋陽市近くの農場で最初の発生が報告され、その後全国に広がり、2019年3月15日までに131件の発生が報告されている⁹⁾。このような地理的拡大により、日本への侵入リスクは増大しているが、ASFの侵入に関連するリスク要因や一旦侵入した場合に日本でのまん延を助長する要因を特定するための体系的なリスク評価は行われていない。そこで、我々は日本におけるASFの導入とまん延の潜在的なリスク要因を特定しランク付けするために迅速リスク評価を行うとともに、リスク評価に必要な情報を入手するための農場レベルの評価を実施した。

2. 材料と方法

2.1 迅速リスク評価

日本におけるASFの侵入、拡大、定着に関連する潜在的なリスク要因のランク付けを依頼する

10の質問からなる質問票を作成し、日本および世界のASFの専門家を対象に配布し、その結果をもとに迅速なリスク評価を実施した。質問票は2018年8月31日に電子メールで計15人の専門家に送付し、9月14日までに12人から回答を得た。なお、回答を依頼した専門家には質問票とともにリスク評価に必要な背景情報として、日本の養豚産業、日本に到着する国際航空機、国際船舶などの便数および到着地、生きた豚、豚肉および加熱処理豚肉製品、飼料、飼料原料などの日本への輸入量・輸入先国のデータ、日本への畜産物の違法輸入に関するデータ、日本への海外旅行者および労働者数、日本でのイノシシ生息に関するデータ、日本におけるヒメダニの生息地および日本の養豚場のバイオセキュリティ対策に関する情報を提供した。

2.2 農場レベルの評価

養豚農場のバイオセキュリティ措置の実施状況などに関する10の質問からなる質問票を作成し、9月10日に公益社団法人日本養豚協会を通じ同協会の会員養豚農家1600戸に郵送配布した。11月10日までに588戸から回答を得た。質問票には2.1の迅速リスク評価においてリスク要因として指摘され、情報ギャップの存在が判明した外国人従業員の有無、残飯養豚の実施状況に関する質問を含めた。

3. 結果と考察

3.1 迅速リスク評価

ASFの日本への侵入経路—ASFの日本への侵入経路として最も可能性の高い経路は、畜産物の違法輸入であり、続いて外国人労働者であった (Fig. 1A)。これらの経路による侵入リスクは中程度、他の経路によるリスクは無視できるか、きわめて低いか低いとランク付けされた。ある専門家は、加熱処理肉については、たとえ熱処理条件

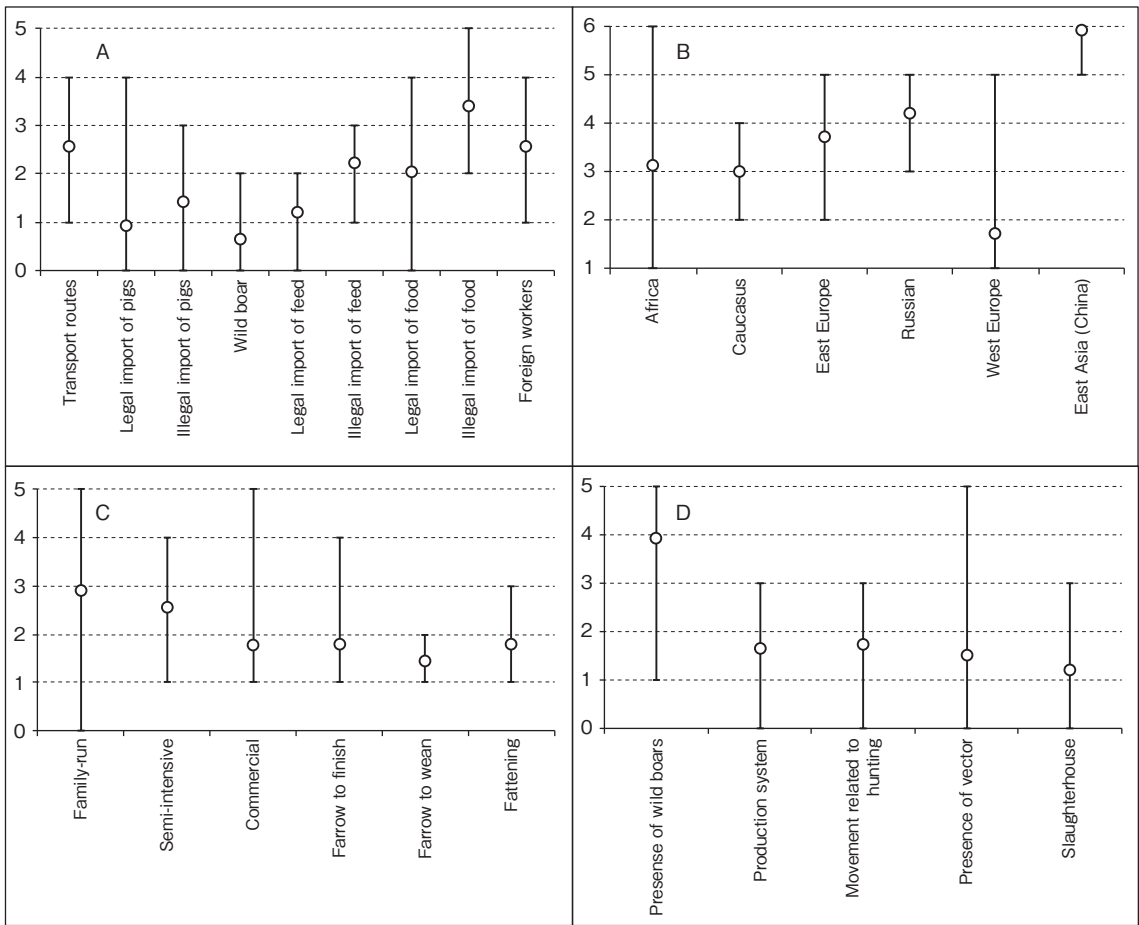


Fig. 1 Most likely way of ASF introduction into Japan (A) ; most likely source of ASF introduction into Japan (B) ; production system mostly affected (C) ; and risk factors associated with the persistence of ASF in Japan (D). The scale on the vertical axis indicates the risk : 0 (negligible risk) ; 1 (very low risk) ; 2 (low risk) ; 3 (moderate risk) ; 4 (high risk) and 5 (very high risk). Open circles indicate the average and error bars indicate the range of expert opinions.

が適用されたとしても、その輸入量を考えると侵入経路となるリスクは高いとの見解を示した。ほとんどの専門家は、海に囲まれていて国境を共有していないという日本の地理的な利点のために、豚やイノシシの輸入による侵入リスクは無視できるか非常に低いとの見解であった。さまざまな輸送機関のうち国際船舶や航空機からの廃棄物の方が外国から到着する車両よりも高い確率でASF侵入に寄与すると考えられたが、仮にASFが韓国に侵入すれば、汚染された車両を通じて日本に持ち込まれる危険性が劇的に高まるという見方を

していた。

日本でのASFの侵入地域—ほとんどの専門家は、関東と九州がASF侵入リスクが高い地域であり、次に近畿地方であるとランク付けした (Fig. 2A)。侵入地域をランク付けする際のリスク要因として、大規模な国際空港の存在、外国人観光客の数、イノシシの生息地および豚の飼養密度が考慮された。

日本へのASFの侵入源国—すべての専門家は、東アジア (中国) がASFの日本への導入元である可能性が最も高いとの見解で一致していた

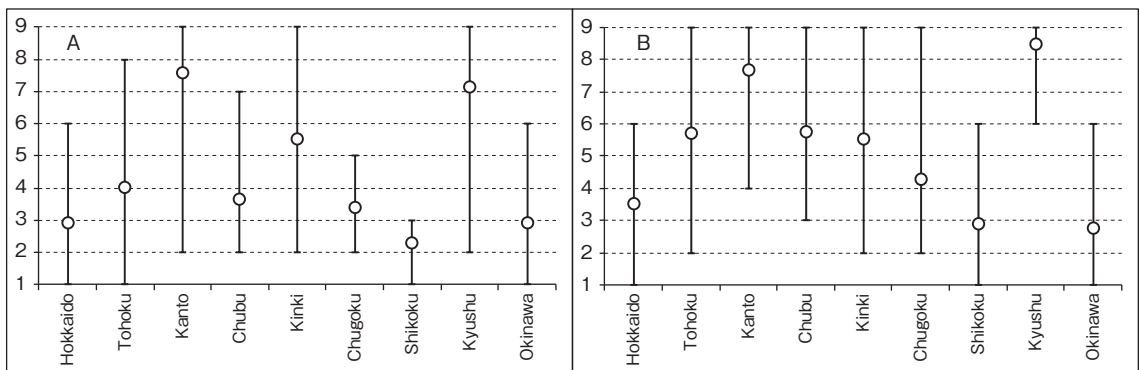


Fig. 2 Regions where ASF is most likely to be introduced (A) ; and regions where ASF is most likely to spread (B). The scale on the vertical axis indicates the rank of regions in terms of the likelihood of introduction, from 1 (least likely to be introduced/spread) to 9 (most likely to be introduced/spread). Open circles indicate the average and error bars indicate the range of expert opinions.

(Fig. 1B)。ほとんどの専門家は、日本とアフリカとの経済関係を考えると、アフリカから日本への侵入リスクは中国に比べ低いとした。

一旦侵入した場合のまん延リスク—ほとんどの日本の専門家は、日本でのASFのまん延リスクは非常に低いとの見解であったが（1～10%）、外国人専門家はそうではないと答えた（30～60%）。一部の外国の専門家は、イノシシの生息により、養豚農家のバイオセキュリティレベルによっては、ASFが早期に発見されずに広がる可能性があるとの見解であった。

ASFのまん延におけるダニの関与—ほとんどの専門家は、日本のASFまん延におけるダニの関与はきわめて低い（1%未満）との見解。ある日本の専門家は、日本のヒメダニ（*Ornithodoros* spp）がASFの媒介になる可能性は低いとの見解であった。

ASFが広がる可能性の高い地域—ほとんどの専門家は、九州と関東がASFが最もまん延する可能性が高い地域であり、四国が最もまん延しにくい地域であるとの見解であった（Fig. 2B）。感染が家畜の豚に現局している限り、流行は起こらないだろうという見方をした。

まん延した場合に影響を受ける農家の経営形態—ほとんどの専門家は、日本でまん延した場合には、企業養豚ではなく家族経営または半集約的養豚場が最も影響を受けると回答した（Fig. 1C）。

ASF定着のリスク—ほとんどの専門家は、ASF定着のリスクは低い～非常に低い（10%未満）との見解であった。

ASF定着に関係するリスク要因—ほとんどの専門家は、一旦日本で広まったら、イノシシの存在が定着において最も重要な役割を果たすと回答した（Fig. 1D）。

このリスク評価を実施する過程で、以下の情報ギャップが確認された。

- ・中国その他の国から違法に輸入される豚肉製品の量。違法に輸入される豚肉製品は、適切に熱処理されていない可能性があり、合法的に輸入された製品よりも感染源になる可能性が高い。動物検疫所が実際に押収した畜産物（2017年は83トン）が氷山の一角であると仮定すると、個人消費または商業目的で、はるかに多くの量が中国や他の国から違法に輸入される可能性がある。

- ・養豚場における残飯給与の頻度。残飯養豚は日本の養豚場では一般的ではないが、禁止されてい

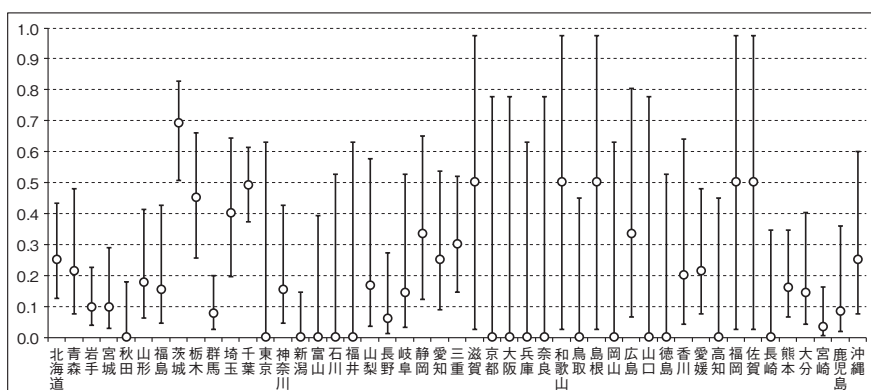


Fig. 3 Probability of a pig farm employing a foreign worker by prefecture. Open circles indicate the average and error bars indicate the 95% confidence interval. There was no data provided from Shiga, Wakayama, Shimane, Fukuoka and Saga prefectures. The probabilities for these prefectures reflect the uninformed prior distribution of Uniform(0,1).

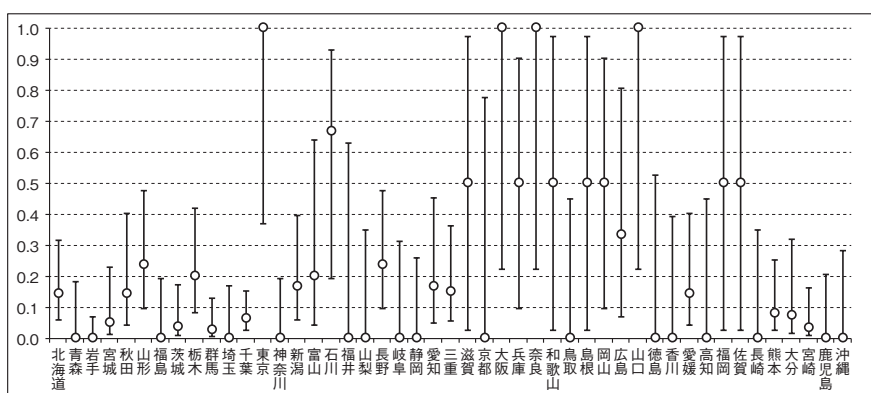


Fig. 4 Probability of a pig farm practicing swill feeding by prefecture. Open circles indicate the average and error bars indicate the 95% confidence interval. There was no data provided from Shiga, Wakayama, Shimane, Fukuoka and Saga prefectures. The probabilities for these prefectures reflect the uninformed prior distribution of Uniform (0,1).

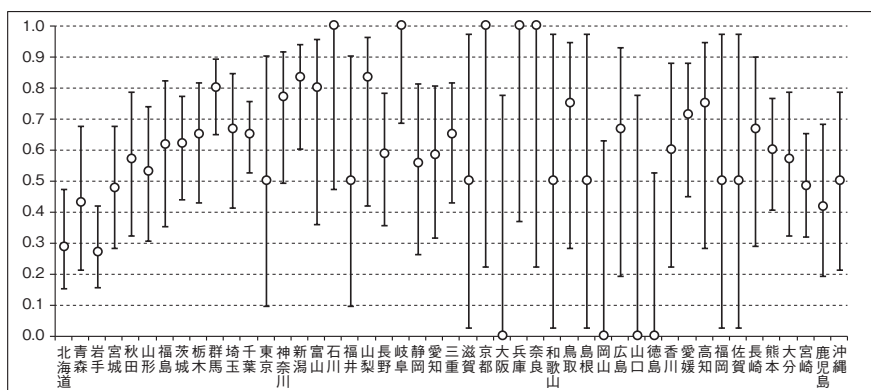


Fig. 5 Probability of a pig farm not practicing shower-in-and-out policy as biosecurity measure by prefecture. Open circles indicate the average and error bars indicate the 95% confidence interval. There was no data provided from Shiga, Wakayama, Shimane, Fukuoka and Saga prefectures. The probabilities for these prefectures reflect the uninformed prior distribution of Uniform (0,1).

るわけでもない。より正確なリスク評価のためには、残飯の給与頻度と適用される処理に関するデータが必要。

・養豚場におけるバイオセキュリティ対策のレベル。多くの専門家は、ASFの導入と拡大を防止するうえで養豚場におけるバイオセキュリティの重要性を強調した。家畜伝染病予防法に従い、すべての養豚農家はASFを含む伝染病の発生から豚群を保護するためのバイオセキュリティ対策を遵守することになっているが、その遵守状況については不明な部分が多い。

3.2 農家レベルのリスク評価

上述の迅速リスク評価の結果を踏まえて実施した養豚農家を対象とするアンケート調査において回収した588戸分のデータのうち、回答項目に欠損がない578戸分のデータを用いて都道府県別の外国人労働者の雇用状況、残飯給与その他のバイオセキュリティ措置の実施状況を分析したところ、関東地方の養豚農家では外国人労働者の雇用割合が高く、関西地方の養豚農家で残飯給与を実施している農家の割合が高いことが分かった (Fig. 3 および 4)。また、バイオセキュリティ対策の1つとしてとるべき従業員のシャワーイン・シャワーアウトについては実施していない農家がほとんどの都道府県において半分以上を占めることが判明した (Fig. 5)。

4. 要 約

本研究では、世界のASF専門家の意見をもとに日本への侵入経路として可能性の高い経路、侵入源として可能性の高い国などを特定した。また、同リスク評価の結果を踏まえて実施した養豚農家を対象とするアンケート調査の結果、養豚場における外国人労働者の雇用状況、残飯給与の実

施状況などに関するデータを入手した。日本へのASFの侵入リスクが増大している状況下で、これらの結果は行政機関および養豚農家によるリスク管理に有用な情報を提供する。これらの結果を踏まえ、今後さらに精緻なリスク評価を進めていきたい。

文 献

- 1) Alonso, C., Borca, M., Dixon, L., Revilla, Y., Rodriguez, F., Escribano, J. M. : ICTV Report Consortium : ICTV Virus Taxonomy Profile : *Asfarviridae*, *Journal of General Virology*, **99**, 613~614, 2018.
- 2) Plowright, W., Thomson, G. R., Naser, J. A., African swine fever. In : Coetzer, J. A. W., Thomson, G. R., Tutsin, R. C., eds. : Infectious diseases of livestock, with special reference to southern Africa, vol 1, pp.567-599, 1st edn, Oxford University Press, Cape Town, South Africa, 1994.
- 3) Costard, S., Jones, B. A., Martinez-Lopez, B., Mur, L., de la Torre, A., Martinez, M., Sanchez-Vizcaino, F., Sanchez-Vizcaino, J. M., Pfeiffer, D. U., Wieland, B. : Introduction of African Swine Fever into the European Union through Illegal Importation of Pork and Pork Products, *PLoS ONE*, **8**, e61104, 2013.
- 4) Montgomery, R. E. : On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya Colony), *J. Comp. Pathol.* **34**, 159~191, 1921.
- 5) Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L., Martínez-López, B. : African Swine Fever : An Epidemiological Update, *Transboundary and Emerging Diseases*, **59**, 27~35, 2012.
- 6) European Food Safety Authority (EFSA) : Scientific opinion on African swine fever, *EFSA Journal*, **8**, 1556, 2010.
- 7) Sánchez-Vizcaíno, J. M., Mur, L., Martínez-López, B. : African swine fever (ASF) : Five years around Europe, *Vet Microbiol*, **165**, 45~50, 2013.
- 8) Kolbasov, D., Titov, I., Tsybanov, S., Gogin, A., Malogolovkin, A. : African Swine Fever Virus, Siberia, Russia, *Emerging Infectious Diseases*, **24**, 796~798, 2017. <https://dx.doi.org/10.3201/eid2404.171238>, 2018.
- 9) MAFF : African fever situation in China as of 15 March 2019. <http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/attach/pdf/asf-467.pdf>

豚増殖性腸炎による可食部位の廃棄防止に向けた 適正な抗生物質使用方法の検討

Study of appropriate usage of antibiotics for preventing the disposal of
edible parts by Porcine Proliferative Enteropathy

岡 田 彩 加

(岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)

Ayaka Okada

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

Proliferative enteropathy (PE) was caused by the obligate intracellular bacterium, *Lawsonia intracellularis* (Li). Porcine PE is a disease with large economic damage in pig industry, such as the disposal of the intestinal tract and the decreased weight gain of pigs. In this study, to control PE, the Li culture method using McCoy cells and the appropriate antibiotics against Li *in vitro* were examined. The Li strain isolated from a Japanese pig had poor growth efficiency by the previously reported culture method, thus, the detailed examinations could not be investigated. However, the different effect against some antibiotic was observed among the Japanese strain and overseas strains. Japanese strains may have different characters from overseas strains. This result suggests that *in vitro* culture method could be useful for investigating the effective antibiotics against Li.

1. 目 的

2017年、養豚農家より原因不明の豚の腸炎の調査依頼を受け、肉眼所見から *Lawsonia intracellularis* (Li) による増殖性腸炎を疑い、病変部を材料としたPCRによる遺伝子診断を実施した。遺伝子診断の結果、13検体中7検体でLiの遺伝子が検出された。臨床症状と遺伝子診断の結果から、Liによる増殖性腸炎が強く疑われ、農場内で広く蔓延していることが示唆された。本と畜場だけでなく、近年、日本の豚においてLiを原因とする増殖性腸炎の疑似症例が増加している。Liは感染していても症状が出ないこともあるが、若

齢の豚だけでなく、今回のケースのように肥育豚で発症することもあり。死亡してしまう重症例だけでなく、軽症であっても豚の増体率が低下することや、と畜場での解体時に可食部である腸管が病変部として廃棄されてしまうため、経済的被害が大きい。

近年、Liによる増殖性腸炎が増加している要因の一つとして、抗生剤の使用低減が考えられている。抗生剤は、薬剤耐性菌の発生リスクの面から、農林水産省より慎重な使用が提言されている¹⁾。そのため、飼料への抗生剤の添加などは行われなくなっており、これが今まで潜在的に存在していたLiが顕在化、被害が拡大してきた要因の一

つだと考えられている。

日本の農場におけるLi汚染率は100%近いとされており、Liを農場から清浄化することは難しい。Liによる被害を防ぐためには、抗生剤との関連性を明確にし、適正な抗生剤使用方法を確立する必要がある。そのため、本研究ではLiによる増殖性腸炎に対する適正な抗生剤使用方法を検証、Liによる腸炎の発生をコントロールする方法を検討することを目的とした。Liは偏性細胞内寄生細菌であり、人工培地での培養ができないため、まず培養細胞を用いた培養方法の検討を行い、その後、培養細胞を用いた抗生剤の検証を行った。

2. 方 法

2.1 定量系の調整

Liは人工培地で生育できないため、培養細胞での増殖効率をリアルタイムPCRによって定量する必要がある。定量法はGoTaq qPCR Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) を使用し、既報²⁾に従った。すなわち、フォワードプライマーとして 5'-GTT CCC GGG CCT TGT ACA C-3'，リバースプライマーとして5'-CCG GCT TTG GGT AAA ACC A-3'，プローブとして5'-FAM-CCG CCC GTC ACA CCA CGA AA-TAMRA-3'を使用した。検量線作製のコントロールとして、PCR産物をpTAC 2ベクターにクローニングしたプラスミドを用いた。PCRミックスチャーの組成、プログラムはqPCR酵素のマニュアルに従った。

2.2 Li分離培養方法の検討

Li分離培養は既報^{3, 4)}に従い、McCoy細胞を用いて行い、一部改変した。McCoy細胞の培養には Dulbecco's modified Eagle's minimal essential medium High Glucose (Wako, Osaka, Japan) に10%牛胎児血清を加えた培地を使用した。Li陽性腸管サンプルの乳剤を作製し、McCoy細胞を用いて乳剤中に存在するLiの分離培養を試みた。分

離培養の際にはDMEM High Glucoseに10%牛胎児血清を加えるとともに、腸管内のその他の真菌、細菌の増殖を抑制するために、2.5 $\mu\text{g/ml}$ のアムホテリシンBおよび50 $\mu\text{g/ml}$ のゲンタマイシンを加えた培地を使用した。24穴プレートに播種したMcCoy細胞をDMEM High Glucoseを用いて洗浄後、作製した乳剤を1穴あたり250 μl 接種し、700 x g, 10分間常温で吸着遠心を行った。その後、6時間、37℃微好気条件で培養し、細菌の細胞内への侵入を促した。その後、接種材料を除去し、新しい培地で培養した。感染直後(0 dpi) および、感染4日後(4 dpi)の細胞および上清を回収し、それぞれ細胞内Liゲノムおよび細胞外Liゲノムの定量に供した。すなわち、回収したサンプルをDNeasy Blood & Tissue Kits (QIAGEN, Hilden, Germany) によってDNA抽出を行い、2.1で検討したリアルタイムPCRによるゲノムDNAの定量を行った。また感染細胞に関しては4%パラホルムアルデヒドで固定し、間接蛍光抗体法に供した。

2.3 効果の高い抗生剤の検討

McCoy細胞にLi陽性腸管サンプルの乳剤を2.2で検討した方法に従い感染させた。6時間感作後、新鮮な培地と交換した。各種抗生物質(カルバドックス、タイロシン、チアムリン、クロルテトラサイクリン、バルネムリン、リンコマイシン)を128 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で添加し、37℃、微好気条件で4日間培養した。感染後0日(0 dpi)、4日(4 dpi)の細胞を回収し、DNAを抽出後、2.1で検討した方法によりLiゲノムDNAの定量を行った。

3. 結果と考察

リアルタイムPCRによるLiゲノムDNAの定量系を確立することができた。検量線を解析した結果、コントロールプラスミドにおいて、 10^2 コピー

が検出限界であった。以後使用するLiゲノムDNAの定量では 10^2 コピー未満の検出は検出限界以下とすることとした。

2.2の方法によるMcCoy細胞へのLi感染実験では、間接蛍光抗体法によりLiの感染を確認することができた (Fig. 1)。一方、LiゲノムDNAの定量において、非感染細胞 (mock) では検出限界以下であったのと比較して、0 dpiではゲノムDNAが検出され、感染が成立していることが確認された。しかしながら、0 hpiと4 dpiではほとんど差が認められず、今回の培養条件ではLiの増殖効率が悪いことが示唆された (Fig. 2)。また、上清中からはほとんどLiゲノムDNAが検出されず、Liは細胞外に放出されていないことが示された。すなわち、間接蛍光抗体法の結果および、リアルタイムPCRによるゲノムDNA定量の結果より、Li感染腸管サンプルからのMcCoy細胞によるLi分離には成功したが、培養にはさらなる条件検討が必要であることが示唆された。海外のLi株に関しては同様の分離培養法でLiの増殖が確認されているものの、日本における分離株での増幅効率の良い培養方法の報告はないため、日本の株は

海外の株とは性質が異なる可能性がある。

Liの増殖効率は悪いものの、感染は成立していたため、抗生剤の効果を上記の感染系を用いて*in vitro*で検証した。最終的には最終発育阻止濃度を求める必要があるが、今回は海外の報告⁵⁾を参考に、効果の有無を判定する最大の濃度として使用されていた $128 \mu\text{g/ml}$ の濃度での検証を行った。また、使用した抗生剤も前述の文献と同様のものを使用した。抗生剤を添加していないLi感染細胞をコントロールとし、コントロールのLiの増殖効率を1とした時のLiゲノムDNA相対値をグラフにした (Fig. 3)。カルバドックスとリンコマイシンにおいては増殖効率がコントロール群よりも高く、効果がないことが示唆された。その他のタイロシン、チアムリン、クロルテトラサイクリン、バルネムリンに関しては増殖効率が抗生剤非添加群よりも低く、効果のある可能性が示唆された。

海外の報告と比較すると、リンコマイシンの効果がないことは一致したものの、カルバドックスについては海外の株は比較的低濃度でも効果が認められていたため、株間で抗生物質に対する感受性の差がある可能性が示唆された。抗生剤に対す

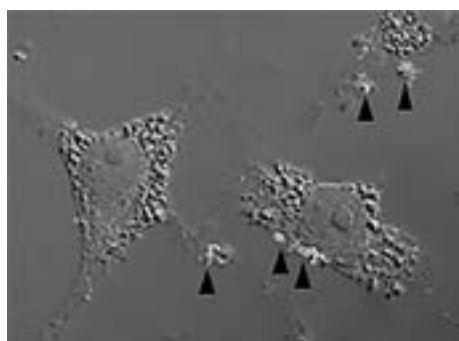


Fig. 1 McCoy cells were infected with 10% suspension of Li-infected intestine. After 6 hours post infection, cells were fixed by 4% paraformaldehyde and indirect fluorescent assay using anti-Li antibody was performed. Arrowheads (green fluorescence) indicate Li.

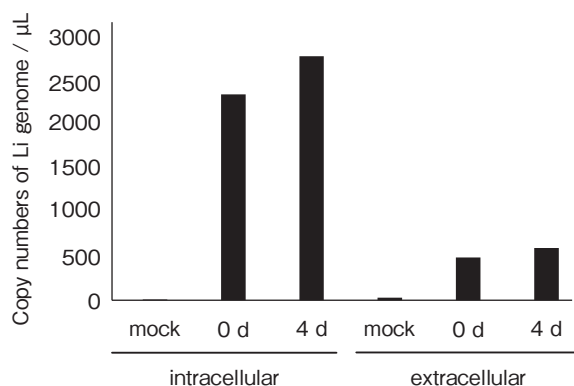


Fig. 2 McCoy cells were infected with 10% suspension of Li-infected intestine. After 0 and 4 days post infection, cells and supernatants were collected separately. Quantitative real-time PCR assay was performed to measure the Li genome DNA.

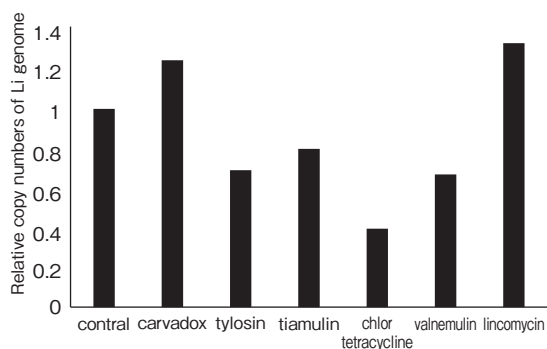


Fig. 3 McCoy cells were infected with 10% suspension of Li-infected intestine. After adsorption, each antibiotic was added to the medium at the concentration of 128 μ l/ml. After 4 days post infection, quantitative real-time PCR assay was performed to measure the Li genome DNA. The relative Li genome copy numbers of 4 dpi were normalized to the copy numbers of 0 dpi and control.

る感受性を検討するという本研究の必要性が実証された。また、馬から分離されたLiを用いた抗生剤の感受性試験のデータも報告されている⁶⁾が、本研究で使用した抗生剤とは異なっていたため、同様の抗生剤の効果を検証することで、豚から分離されたLiと馬から分離されたLiの性状を比較することができる可能性がある。

日本でLiによる増殖性腸炎の治療を行う場合は、チアムリンやタイロシンが使用されることが多いが、それらに対する効果は*in vitro*でも認めることができた (Fig. 3)。今回の実験では高濃度での検証しか行わなかったが、カルバドックス、チアムリン、バルネムリンでは細胞毒性も観察されていたため、正確な評価はできていなかった可能性もある。今後、LiのMcCoy細胞での増殖効率を上げることや、より低濃度の抗生剤の効果を検証し最小発育阻止濃度などを算出していく必要がある。また、より効果的な抗生剤を検証していくとともに、別の農場で分離されたLiに関しても検証をしていくことも必要である。

4. 要 約

近年増加傾向にある豚増殖性腸炎は偏性細胞内寄生細菌である*Lawsonia intracellularis* (Li) によって引き起こされる。可食部位である腸管の廃棄や増体率の現象など、潜在的な経済被害の大きい疾病である。本研究では、Liによる増殖性腸炎を制御するために効果的な抗生剤を*in vitro*で検証することを目的とし、*in vitro*でのLi培養方法の検討および、適正な抗生剤の検証を行った。日本の豚から分離したLi株は既報での培養方法では増殖効率が悪く、詳細な検討は難しかった。しかしながら、抗生剤の効果の検証では、海外の株では効果の認められた抗生剤の効果が日本の株では認められないなど、株間での差異を認めることができた。今後、培養方法を検討し、より詳細な検討を行っていくことで、*in vitro*での適正な抗生剤評価が可能になると考えられる。

文 献

- 1) 農林水産省：家畜に使用される抗菌性物質に対する農林水産省のリスク管理措置，平成29年3月27日。
<http://www.maff.go.jp/j/syouan/tikusui/yakuuzi/attach/pdf/koukinzai-9.pdf>
- 2) Draskovica, V., Bosnjak-Neumuller, J., Vasiljevic, M., Petrujkic, B., Aleksic, N., Kukolje, V., Stanimirovic, Z. : Influence of phyto-genic feed additive on *Lawsonia intracellularis* infection in pigs. *Preventive Veterinary Medicine*, **151**, 46~51, 2018.
- 3) Guedes, R. M. C., Gebhart, C. J. : Preparation and characterization of polyclonal and monoclonal antibodies against *Lawsonia intracellularis*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, **15**, 438 ~ 446, 2003.
- 4) Watarai, M., Yoshiya, M., Sato, A., Furuoka, H. : Cultivation and Characterization of *Lawsonia intracellularis* Isolated from Rabbit and Pig, *Journal of Veterinary Medical Science*, **70**, 731 ~ 733, 2008.
- 5) Wattanaphansak, S., Singer, R. S., Gebhart, C. J. : *in vitro* antimicrobial activity against 10 North American and European *Lawsonia intracellularis* isolates, *Veterinary Microbiology*, **134**, 305~310,

2009.

- 6) Pereira, C. E. R., Resende, T. P., Vasquez, E., Marshall-lund, L., Guedes, R. M. C., Gebhart, C. J. : In vitro antimicrobial activity against equine *Lawsonia intracellularis* strains, *Equine Veterinary Journal*, doi : 10.1111, 2019.

南九州におけるPRRSウイルス変異株の地理的分布 および病理学的解析

Geographical distribution and pathological analysis of PRRS virus variants
in southern Kyushu

平 井 卓 哉

(宮崎大学農学部)

Takuya Hirai

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Geographical distribution of different strains of PRRS virus was investigated in the southern Kyushu, Japan. In addition, comparative pathological analysis of lung lesions due to different strains was examined in this area. Totally 253 samples were collected from 46 farms in Miyazaki, Kagoshima and Kumamoto prefectures. To detect the ORF5, extracted RNA was used for nested RT-PCR and samples of 23 farms were provided for sequence analysis. The lung samples were examined by histopathology and immunohistochemistry (IHC) using Iba-1 antibody. PRRS virus strains which belonged to the cluster IV were detected in 17/23 (74%) farms. In contrast, cluster II strains were confirmed in 10/23 (43%) farms. Most of them were related vaccine strain. In addition, cluster I strain was also identified in the Kagoshima prefecture. Histopathologically, lung lesions consisted of infiltration of macrophages into alveolar septa and alveolar sacs and type II pneumocyte hyperplasia. Macrophages in the cluster IV samples were mainly accumulated in the alveolar septa, whereas macrophages in the cluster II samples were widely distributed in the alveolar sacs. This study revealed that PRRS virus strains which belonged to the cluster IV are widely distributed in southern Kyushu. The same virus strains of cluster IV were detected in the several farms. From these data, swine movement, transport vehicles and people movement are risk factors of PRRS entry to farm. In addition, the distribution of the macrophages may indicate different pathogenesis of PRRS virus strains, which need more investigation.

1. 目 的

豚呼吸器複合感染症は、豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスを基本に、豚インフルエンザウイルス、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他、各種細菌の重感染により起こり、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は最も重要な課題になっている。本症はPRRSウイルスが主となり、上記の複数の病原体が複雑に関与し、子豚に間質性肺炎を引き起こす。本ウイルスの遺伝子変異は高頻度に起こり、異なる型のウイルスに暴露された場合、再び感染する。遺伝子変異が起こりやすい領域はウイルス

表面糖タンパク質GP 5 をコードする Open Reading Frame 5 (ORF5) で、この領域がウイルス株の解析に用いられている。多数の変異株が存在し、日本で検出される株は5つのクラスターに分類されている。クラスターⅣには北米強毒株が属し、他のクラスターが属する株と比較して、病原性が高いとの報告もある。

PRRSウイルスの拡散経路として、車両（家畜運搬車、飼料運搬車および糞尿運搬車）、PRRSウイルス陽性豚および陽性豚の精液の導入などがあげられている。南九州のウイルス株およびそれらの地理的分布は報告されておらず、バイオセキュリティに対する意識が低く、車両消毒体制の整備されていない農場が散見される。このため、他地区から異なる型のウイルスが侵入し、経済的被害を大きくしている。本研究の目的は、南九州におけるPRRSウイルス遺伝子型の地理的分布を明らかにすることである。また、遺伝子型による肺病変の相違についても検討する。

2. 方 法

2.1 PRRSウイルス遺伝子型の解析、クラスター分類およびそれらの地理的分布

宮崎県県西地区の26農場から128検体、県央、県西および県南地区の6農場から62検体を採取した。サンプルは、子豚の血液や鼻腔スワブ、死亡子豚の肺、流産胎子とした。鹿児島県については5農場20検体、熊本県については6農場43検体を同様に採取した。上記の3県で合計43農場253検体を採材した。市販のキットを用いてRNAを抽出し、PRRSウイルスのORF5を増幅するプライマーを用いたRT-PCRを行い、増幅された遺伝子断片についてダイレクトシーケンス法により得られた塩基配列情報を既知のデータと比較した¹⁾。さらに、各農場の代表的な株を用いて分子系統樹を作成し、各株をクラスターⅠ～Ⅴに分類し

た。

2.2 病理組織学的検査

豚呼吸器複合感染症で発育不良を示した豚もしくは死亡した豚の肺を採材後、前記2.1でPRRSウイルスの感染を調べた。その後、ダイレクトシーケンス法にてウイルス遺伝子型の分類されるクラスターを明らかにした。クラスターⅣに分類される遺伝子型の肺炎の病理学的特徴を調べ、クラスターⅡに属するウイルス株の肺炎像と比較・検討した。また、ウイルスの標的細胞であるマクロファージを検出するIba-1抗体を用いて、免疫組織化学的検査を実施した。

3. 結果と考察

3.1 PRRSウイルス遺伝子型の解析、クラスター分類およびそれらの地理的分布

宮崎県県西地区の24農場128検体の内、シーケンス解析できた検体は15農場64検体であった。また、宮崎県県央、県西および県南地区の6農場62検体の内、シーケンス解析できたのは4農場33検体であった。鹿児島県の5農場20検体の内、シーケンス解析できたのは2農場4検体であった。熊本県6農場43検体の内、シーケンス解析できたのは2農場2検体であった。本研究に供した41農場253検体中、シーケンス解析できたサンプルは23農場103検体であった。

宮崎県で検出されたクラスターⅣのウイルス株は19農場の内16農場（約84%）であった（Fig. 1, 2）。県西地区のA農場、B農場およびK農場のウイルス株では塩基配列の相同性が98%以上で、同一のウイルス株と考えられた。また、C農場およびK農場のウイルス株、H農場、I農場およびO農場のウイルス株においても塩基配列の相同性が98%以上で、同一のウイルス株と判断した。さらに県西地区のD農場と県央地区のQ農場およびR農場のウイルス株も同一のウイルス株で

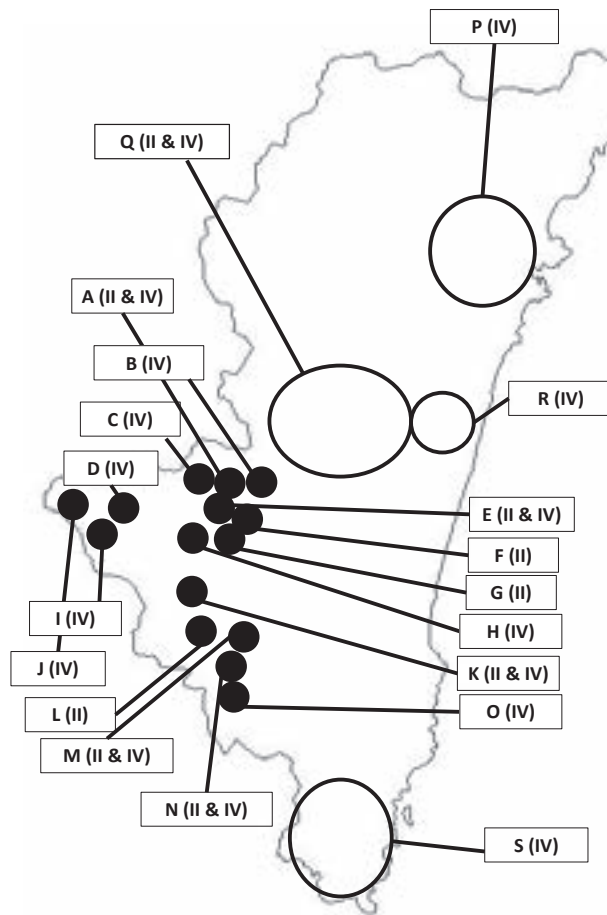


Fig. 1 Geographical distribution of PRRS virus in Miyazaki prefecture during 2018 and 2019. The parenthesis indicates PRRSV cluster.

あった。県央地区のQ農場と県北地区のP農場のウイルス株も同一であった。これらのことから、陽性豚の導入、車両の往来、人の移動などにより他農場から侵入した可能性が推察された。

K農場では、4月に検出されたK P18-602、10月に検出されたK P18-420、12月に検出されたK P18-655のウイルス株は塩基配列の相同性が低く、異なるウイルス株と考えられた (Fig. 2)。すなわち、K農場では1年間に異なるウイルス株が3株農場内に侵入したことになる。農場侵入防止のため、防疫体制を徹底する必要がある。

宮崎県で検出されたクラスターIIのウイルス株は19農場の内8農場 (約42%) であった。Q農場

で検出されたウイルス株を除いた7農場のウイルス株はワクチン近似株であった。Q農場で検出された2種類のウイルス株は、ワクチン株との塩基配列の相同性が低く、野外株と推測された。

熊本県で検出されたウイルス株は2種類で、それぞれクラスターII (野外株) とクラスターIVに分類された。一方、鹿児島県で検出されたウイルス株は2種類で、それぞれクラスターIとクラスターII (ワクチン近似株) に分類された。クラスターIVに分類されたウイルス株は、宮崎県で検出された株との相同性が低かった。

以前は、クラスターIは中国・九州地方で多いと報告されてきた³⁾。しかし、今回の調査では、

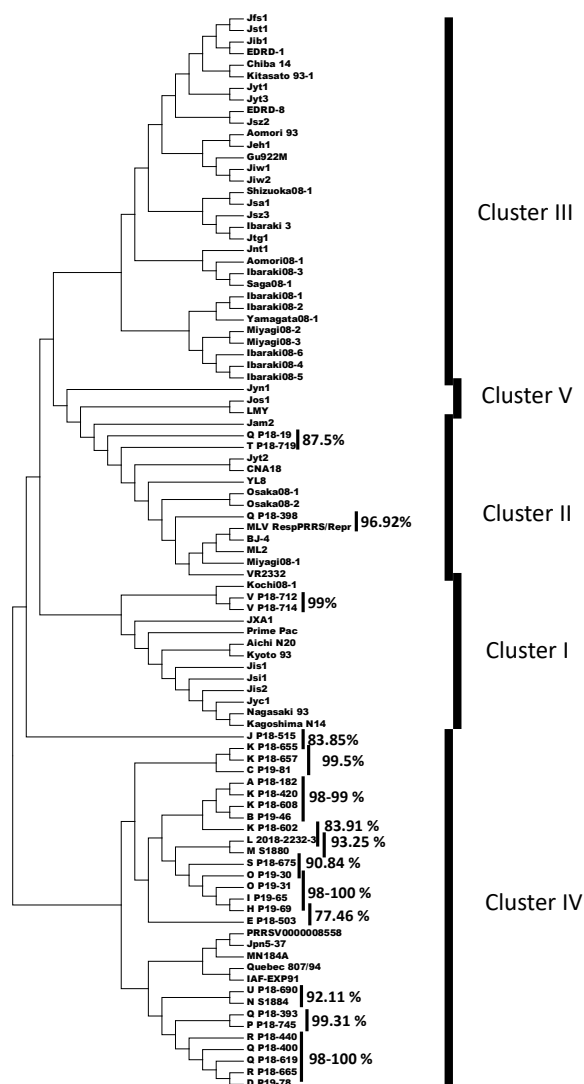


Fig. 2 Phylogenetic tree of NA-type PRRS virus ORF5 nucleotide sequence.

クラスター I に分類されるウイルス株は鹿児島県の 1 農場でしか検出されず、宮崎県ではクラスター IV に分類されるウイルス株が多勢を占めた。ウイルス株の調査に関して、個人情報の絡みがあり、検体の収集が難しかった。どの地区にどのようなウイルス株が存在するかが分かれば、どこから侵入したかを検証でき、今後の農場防疫に役立てることができる。すなわち、他地区からの侵入を予測し、未然に防ぐことができる。検体の収集に関しては、養豚関係者や獣医師の協力が不可欠

であり、今後の課題と思われる。

3.2 病理学的検査

今回、クラスター IV に分類されるウイルス株とクラスター II に属するワクチン近似株との肺病変を比較した。クラスター IV に属するウイルス株では、剖検時にも明らかな肺炎が認められたが、ワクチン近似株の肉眼的な肺病変は軽度であった。両方のウイルス株において病理組織学的に間質性肺炎を認めた。クラスター IV に分類されたウイルス株の病変では、主に肺胞壁にマクロファージが

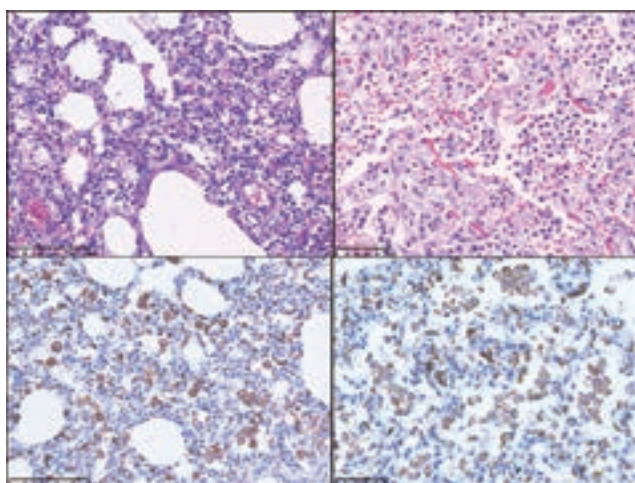


Fig. 3 Interstitial pneumoniae.

- a Lung of cluster IV PRRS virus strain. Note infiltration of macrophages in the alveolar septa. HE.
- b Lung of cluster IV PRRS virus strain. Note infiltration of Iba-1 positive macrophages in the alveolar septa. IHC.
- c Lung of cluster II PRRS virus strain. Note infiltration of macrophages in the alveolar sacs. HE.
- d Lung of cluster II PRRS virus strain. Note infiltration of Iba-1 positive macrophages in the alveolar sacs. IHC.

多数検出され、マクロファージのマーカーである Iba-1 に陽性を示した (Fig. 3)。一方、クラスターⅡに分類されるウイルス株の病変では、主に肺胞腔内にマクロファージが多数認められ、Iba-1 に陽性を示した。今後、症例数を増やし、ウイルス遺伝子陽性細胞を両者で比較・検討する予定である。

4. 要 約

本研究の目的は、南九州におけるPRRSウイルス遺伝子型の地理的分布を明らかにすることであり、ウイルス株による肺病変の相違も病理学的に検討した。2018年1月～2019年2月にかけて宮崎県、鹿児島県および熊本県における46農場の豚の血液・肺などを採取した。これらのサンプルからRNAを抽出後、RT-PCR法によるPRRSウイルスの検出およびORF5遺伝子の増幅を行った。また、

肺については10%中性緩衝ホルマリン固定後、定法に従ってパラフィン包埋し、HE染色標本作製した。また、Iba-1抗体を用いた免疫組織学的検査でマクロファージの局在を調べた。46農場の内、シーケンス解析できた農場は23農場であった。これらの農場の内、クラスターⅣに分類されたウイルス株は17農場 (74%) であった。また、同一のウイルス株が複数の農場で検出された。一方、クラスターⅡに属するウイルス株は10農場 (43%) であり、そのほとんどがワクチン近似株であった。クラスターⅠのウイルス株は1農場であった。肺の病理組織学的検査にて、肺胞壁や肺胞腔内へのマクロファージ浸潤およびⅡ型肺胞上皮細胞の増生が認められた。免疫組織化学的検査にて、肺胞腔および肺胞壁のマクロファージはIba-1で陽性を示した。クラスターⅣに属するウイルス株は肺胞壁に、クラスターⅡのウイルス株

は肺胞腔内に分布する傾向がみられた。本研究から、南九州においてクラスターⅣに属するウイルス株が多いことが明らかになった。また、同一のウイルス株が複数の農場に存在していたことより、豚の導入、車両の往来、ヒトの移動などが農場防疫に重要と考えられた。ウイルス株により、肺病変部のマクロファージの分布に相違がみられ、今後さらなる研究が必要である。

文 献

- 1) Takagi, M. : *Proc. Jpn. Pig Vet. Soc.*, **63**, 1～5, 2014.
- 2) Iseki, H., Takagi, M., Miyazaki, A., Katsuda, K., Mikami, O., Tsunemitsu, H. : *Microbiol Immunol*, **55** (3), 211～6, 2011.
- 3) Yoshii, M., Kaku, Y., Murakami, Y., Shimizu, M., Kato, K., Ikeda, H. : *Arch Virol*, **150** (11), 2313～24, 2005.

北海道の肉用牛における牛ウイルス性下痢症の疫学調査

Epidemiological study of bovine viral diarrhea in beef cattle in Hokkaido

磯田 典和¹・迫田 義博²

(¹北海道大学人獣共通感染症リサーチセンター, ²北海道大学大学院獣医学研究院)

Norikazu Isoda¹ and Yoshihiro Sakoda²

(¹Research Center for Zoonosis Control, Hokkaido University, ²Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Bovine Viral Diarrhea (BVD) is a chronic disease of cattle prevalent worldwide. Transmission of BVD virus (BVDV) to the fetus of pregnant cattle would cause abortion, or induce fetal immune tolerance to BVDV and resulting in the delivery of persistently infected calves (PI). This vertical transmission results in huge economic losses to the livestock industry. In the present study, In order to reveal the epidemiology of BVD among beef cattle, a total of 829 serum samples were collected from 22 beef cattle farms in Hokkaido Prefecture and were investigated for presence of antibodies against BVDV. It is revealed that 20.0% of the animals investigated possessed antibodies against neither BVDV type-1 or type-2 (95%CI : 18.6%-21.4%). There are no significant differences between the negative rate for antibodies against BVDVs among non-vaccinated farms (24.4%, 95%CI : 22.7%-26.1%) and that among animals fed at farms with unknown-vaccination history (19.2%, 95%CI : 16.5%-22.0%). Furthermore, significant association is found between the presence or absence of antibodies against BVDV, and ages of animals investigated, however, both of these are also associated with the status of vaccination (non-vaccination or unknown), independently. In the present study, it is concluded that approximately 80% of the beef cattle are positive for antibodies against BVDV, which is independently from the vaccination status, but significantly and independently associated with age of animals. These results would indicate that, in Hokkaido, the BVDV are prevalent among the beef cattle population as well. We need to promote the basic control measures, including delivery of adequate knowledge of BVD for beef cattle farmers, development of vaccination program, and effective test scheme to transferred animals, for BVD even for beef cattle population in which there are few numbers of BVD cases reported.

1. 背景と目的

牛ウイルス性下痢症（BVD）は主に牛で発生する慢性消耗性疾患であり，BVDウイルス（BVDV）感染によって引き起こされる。BVDの

疫学的特徴として，妊娠時に母牛がBVDVに感染すると，ウイルスが経胎盤感染し胎子の死産および発育遅延を引き起こすことから，本疾病は畜産分野では生産性に密接に関与する重大な疾病である¹⁻³⁾。BVDVに感染した胎子は胎齢により，

BVDVに対して免疫寛容となり、ウイルスに感染したまま持続感染牛（PI）として分娩されることがある。PIの多くは発育障害を引き起こし生産性に影響を与えるが、それ以上にPIの全身から終生BVDVを分泌することによって牛群の汚染源となり、新たなPIを産み出すことがより深刻である^{3, 4)}。このように牛の生産性を著しく減退させる本疾病への対策では欧州の一部ではすでに進められており、2000年代初頭では北欧諸国ではBVD感染抗体陽性牛の摘発淘汰により、本疾病の根絶に成功している。その一方で、アメリカや他の欧州諸国では依然として本疾病の対策に追われている。日本でも平成29年度は222件406頭の発生が報告されており、流行が終息する兆しは見えていない。日本におけるBVDの制御方策はPIの早期摘発および淘汰であるが、感染牛を減少するためのワクチン接種も推奨されている。

申請者らは現在まで、確率論的疾病モデルによるリスク評価により、ワクチン接種率および公共牧場の使用がPI数の推移に多大に影響することを報告した⁵⁾。また、決定木解析を用い、ワクチン接種およびバルク乳を用いた集団モニタリングの有効性、およびこれら疾病対策の有効性はウイルス浸潤率にも影響されることを報告した⁶⁾。しかし、これらの報告は既存の乳用牛に関するBVDの疫学データを基づいて構築した疾病モデルによるものであり、日本の肉用牛におけるBVD浸潤状況について信頼のおけるデータが存在しないことから、現時点では肉用牛におけるBVD制御対策の評価を実施することが非常に困難である。

そこで、本研究では、日本における肉用牛群中のBVDVの浸潤状況を明らかにするために、肉用牛の抗BVD抗体陽性率を算出するための疫学調査を実施することを目的とした。代表研究者は現在まで北海道庁と共同研究を実施していた経緯から、北海道の肉用牛群における抗BVD抗体の保

有率を算出すべく、疫学調査を実施した。

2. 方 法

2.1 調査対象集団の選定

北海道庁を通して道内各家畜保健衛生所をお願いし、全道で合計22の肉用牛飼育農場から血清材料を集め、それらを本調査に用いた。材料提供を受けた22農場のうち、6農場はワクチン接種未実施の農場であり、その他16農場でのワクチン接種に関する情報は不明であった。

2.2 材料収集

材料由来農場について精査を行った結果、最終的に9振興局22農場から得られた829頭の血清材料を本試験に供した。

2.3 血清材料からの抗BVD抗体の検出

採取した血清サンプルを56℃で30分加熱し、血清中に含まれる補体成分を非働化させた。細胞培養用96穴プレート上で、非働化済み血清をウマ血清添加MEM培地を用いて10倍階段希釈し、その血清250 μ lと50%培養細胞感染濃度の200倍濃度の指示ウイルス液とを等量混合させた。混合液を37℃にて1時間で反応させた後、牛胎子筋肉初代培養細胞のトリプシン消化浮遊液を各穴に50 μ l添加し、37℃にて3日間培養した。指示ウイルスの細胞変性効果を指標とし、中和を示した血清の最大希釈の逆数を中和抗体価とした。本試験にて用いた指示ウイルスには、抗原性の異なるBVDV-1型の標準株であるBVDV/Nose-CP（Nose株）およびBVDV-2型のBVDV/KZ-91-CP（KZ株）を用いた。

2.4 統計検定

試験に供した全893検体のNose株およびKZ株に対する抗体価、血清採取時の被検動物の月齢、およびワクチン接種履歴の項目について統計検定（カイ2乗検定、フィッシャーの正確検定およびウィルコクソンの順位和検定）を行った。統計解

析ソフトとしてEZR (バージョン1.27) を用いた。

3. 結果と考察

試験に供した829検体のうち、Nose株に対する抗体を有していないのは187検体、KZ株に対する抗体を有していないのは352検体であった (Table 1)。Nose株およびKZ株どちらに対する抗体も有していないのは166株であった。我々のこれまでの研究結果より、BVDV 1 型と 2 型では抗体反応では若干の交差性が確認されていることから、この166検体を抗体陰性材料とした⁷⁾。血清材料を

採取した22の農家では、材料採取当時合計3,197頭の肉用牛が飼育されていたことから、これら22農家での動物当たり抗体陰性率の (95%信頼区間は18.6%-21.4%となった。

試験に供した829検体について、ワクチン接種履歴について区分すると、ワクチン接種未実施が6農場127検体 (飼育頭数合計: 781頭) およびワクチン接種履歴不明が16農場702検体 (飼育頭数合計: 2,416頭)であった。それぞれのタイプの抗体陰性率は、ワクチン接種未実施で24.4% (95%信頼区間: 22.7%-26.1%) およびワクチン接種履

Table 1 Number of animals categorized by antibody presence against each of two bovine viral diarrhea virus strain in the 22 beef cattle farms.

A total of 829 serum samples of beef cattle in 22 farms were investigated for presence of antibody against BVDV/Nose-CP and BVDV-KZ-91-CP strain. The numbers of animals in each farm were counted according to the categorization of the antibody titer combinations.

Farm ID	Vaccine injection	No. of animals investigated	No. of animals fed at sample correction	No. of animals antibody positive to two strains (%)					Total
				a -Nose a -KZ	- -	- +	+ -	+ +	
A	Unknown	17	25		9 (52.9)	2 (11.8)	3 (17.6)	3 (17.6)	17
B	Unknown	31	80		2 (6.5)	0 (0.0)	5 (16.1)	24 (77.4)	31
C	Unknown	18	50		1 (5.6)	2 (11.1)	0 (0.0)	15 (83.3)	18
E	Unknown	37	45		15 (40.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	22 (59.5)	37
F	Unknown	63	600		15 (23.8)	5 (7.9)	15 (23.8)	28 (44.4)	63
G	Unknown	39	193		21 (53.8)	0 (0.0)	3 (7.7)	15 (38.5)	39
H	Unknown	24	93		3 (12.5)	0 (0.0)	16 (66.7)	5 (20.8)	24
I	Unknown	48	170		2 (4.2)	0 (0.0)	11 (22.9)	35 (72.9)	48
J	Unknown	25	84		1 (4.0)	0 (0.0)	10 (40.0)	14 (56.0)	25
K	Unknown	13	67		11 (84.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (15.4)	13
L	Unknown	18	83		2 (11.1)	0 (0.0)	10 (55.6)	6 (33.3)	18
M	Unknown	12	57		12 (100.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	12
N	Unknown	11	52		5 (45.5)	0 (0.0)	3 (27.3)	3 (27.3)	11
O	Unknown	30	297		22 (73.3)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (26.7)	30
T	Unknown	222	400		8 (3.6)	2 (0.9)	50 (22.5)	162 (73.0)	222
U	Unknown	94	120		6 (6.4)	9 (9.6)	17 (18.1)	62 (66.0)	94
Subtotal		702	2,416		135 (19.2)	20 (2.8)	143 (20.4)	404 (57.5)	702
D	No	99	127		25 (25.3)	1 (1.0)	38 (38.4)	35 (35.4)	99
P	No	5	240		2 (40.0)	0 (0.0)	2 (40.0)	1 (20.0)	5
Q	No	5	36		0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (100.0)	5
R	No	5	190		0 (0.0)	0 (0.0)	3 (60.0)	2 (40.0)	5
S	No	10	180		2 (20.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (80.0)	10
V	No	3	8		2 (66.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (33.3)	3
Subtotal		127	781		31 (24.4)	1 (0.8)	43 (33.9)	52 (40.9)	127
Total		829	3,197		166 (20.0)	21 (2.5)	186 (22.4)	456 (55.0)	829

歴不明で19.2% (95%信頼区間: 16.5%-22.0%) となった。これら2つのタイプの農場における抗体陰性率を比較したところ、有意差は認められなかった (カイ2乗検定: p 値=0.135)。よって、ワクチン接種履歴によらず、試験に供した肉用牛のBVDVに対する抗体陰性率は20.0%前後であると結論づけられた。

次にBVDVに対する抗体陽性もしくは陰性率およびワクチン接種未実施もしくは接種履歴不明について、被検動物の血清採取時の月齢で比較した。6月齢ごとの抗体陽性もしくは陰性の分布、およびワクチン接種未実施もしくは接種履歴不明の分布はFig. 1のとおりである。BVDVに対する抗体陽性もしくは陰性に区分し、月齢分布について比較したところ、抗体陰性動物の月齢平均は抗体陽性動物の月齢平均よりも有意に若かった

(ウィルコクソンの順位和検定: p 値<0.001)。このことから、BVDVに対する抗体の陽性および陰性は、その検査動物の月齢に関連しており、若齢の動物ほどBVDVに対する抗体が陰性である傾向があることが示唆された。次に、ワクチン未接種動物とワクチン接種履歴不明動物それぞれについて、BVDVに対する抗体陽性および陰性動物の月齢分布を比較したところ、ワクチン接種未実施動物においても (ウィルコクソンの順位和検定: p 値<0.001)、ワクチン接種履歴不明動物においても (ウィルコクソンの順位和検定: p 値<0.001)、抗体陰性動物の月齢平均は抗体陽性動物の月齢平均よりも有意に若かった。また、ワクチン接種状況で区分しても、被検動物の月齢分布については2群に有意な差が確認され (ワクチン接種未実施vsワクチン接種履歴不明: ウィルコク

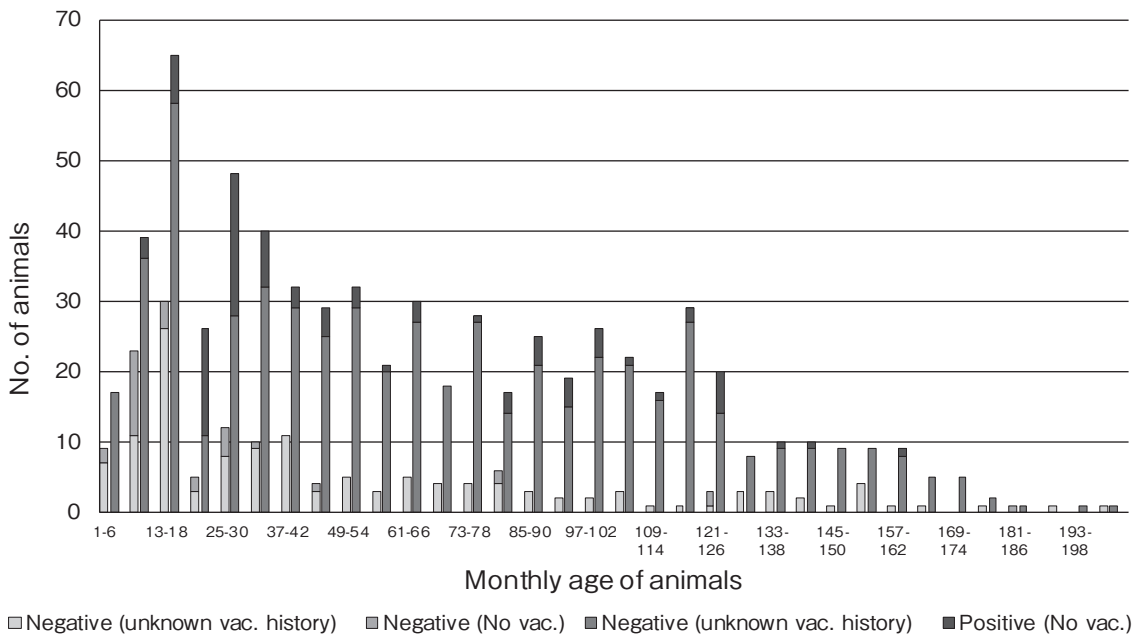


Fig. 1 Age distribution of animals according to presence of antibody against BVDV.

Each of animals was sorted according to the age at sample collection and categorized every six-month-old. In each category, animals were further distinguished by presence or absence of antibody against BVDV and by the vaccination history. Light blue bar: negative of antibody against BVD with unknown vaccination history, deep blue bar: negative of antibody against BVD with no vaccination history, light red bar: positive of antibody against BVD with unknown vaccination history, deep red bar: positive of antibody against BVD with no vaccination history.

ソンの順位和検定: p 値 <0.001), それらが BVDV に対する抗体陽性群および陰性群で区分しても, 両群で有意差は確認された (ウィルコクソンの順位和検定: p 値 $=0.004$ および p 値 <0.001) ことから, BVDV に対する抗体の有無およびワクチン接種履歴は被検動物の月齢に関連はあるが, それらは交絡することなく, 互いに独立な要因となっていることが予想される。

上記統計解析結果より, ワクチン接種履歴が不明な動物集団ではワクチン接種未実施動物集団と比較して有意に BVDV に対する抗体が高いことが棄却されていることから, ワクチン接種が実施されていない集団 (未実施および不明集団) では, BVDV に対する抗体を有していない動物はわずか 20% 程度にとどまることが示唆された。これは, 2004 年から 2006 年にかけて, 226 頭の黒毛和種の抗 BVDV 抗体価を測定したところ, 80.7% が抗体陽性であった結果とほぼ一致していると言えよう⁸⁾。さらに, Nose 株と KZ 株の両株に対して高い抗体価 (100 以上) を示す動物は 14.9% となった。これらのことから, 肉用牛群からの PI 摘発数は多くはないが, これら群内でも BVDV が循環している証拠であり, 乳用牛同様に肉用牛に対しても BVD 対策の積極的推進が望まれる。

本研究で調査に供した検体数は 829 頭であり, 決して少なくはないと思われる。しかしながら, ワクチン接種未実施が確認できたのはわずか 6 農場にとどまり, 検定結果からワクチン接種状況による BVDV に対する抗体保有率に有意差が認められないことは確認はされたが, ワクチン接種を確実に実施していない農場の選定およびその農場内での BVDV に対する抗体価の測定を継続し, より正確なデータを集める必要がある。

4. 要 約

牛ウイルス性下痢症 (BVD) は世界中で流行

している牛の慢性弛緩である。妊娠牛の胎子への BVD ウイルス感染は流産や, 胎子に BVD ウイルスに対する免疫寛容を引き起こし, 持続感染牛を分娩させる。この垂直感染は畜産業界に多大な経済的被害をもたらす。本研究では, 肉用牛群における BVDV の疫学を明らかにするために, 北海道内の 22 の肉用牛飼育農家から 829 頭の血清材料を採取し, BVDV に対する抗体価の有無を調べた。調査した 20.0% (95% 信頼区間: 18.6%-21.4%) の動物は 1 型および 2 型に対する抗体を有していないことが明らかとなった。ワクチン非接種農場の牛における BVD ウイルスに対する抗体の陰性率 (24.4%, 95% 信頼区間: 22.7%-26.1%) とワクチン接種履歴不明の農場の牛における BVD ウイルスに対する抗体の陰性率 (19.2%, 95% 信頼区間: 16.5%-22.0%) の間で有意な差は認められなかった。さらに, BVDV に対する抗体の有無と, 被検動物の月齢にも有意な相関は確認されたが, これら両者はワクチン接種状況とは独立した要因であることも示唆された。本研究では約 80% の肉用牛 BVD ウイルスに対する抗体が陽性であり, これはワクチン接種状況とは独立であり, かつ, 被検動物の月齢には独立であるが相関があると結論づけられた。これらの結果から, 北海道における肉用牛群においても BVDV が流行していることが示唆された。我々は, 肉用牛農家に対する BVD の正しい知識の普及, ワクチンプログラムの樹立, および移動牛に対する有効な検査計画など, 少数の BVD 陽性牛のみが報告されている集団にもそのような基礎的な対策を進める必要がある。

文 献

- 1) illespie, J. H., Baker, J. A., Mc, E. K. : *Cornell Vet.* 50, 73~79, 1960.
- 2) Hessman, B. E., Fulton, R. W., Sjeklocha, D. B., Murphy, T. A., Ridpath, J. F., Payton, M. E. : *Am. J.*

- Vet. Res.*, **70**, 73~85, 2009.
- 3) Houe, H. : *Vet. Microbiol.*, **64**, 89~107, 1999.
- 4) Niskanen, R., Lindberg, A., Traven, M. : *Vet. J.*, **163**, 251~259, 2002.
- 5) Sekiguchi, S., Presi, P., Omori, R., Staerk, K., Schuppers, M., Isoda, N., Yoshikawa, Y., Umemura, T., Nakayama, H., Fujii, Y., Sakoda, Y. : *Transbound. Emerg. Dis.*, **65**, e135-e144, 2018.
- 6) Isoda, N., Asano, A., Ichijo, M., Wakamori, S., Ohno, H., Sato, K., Okamoto, H., Nakao, S., Kato, H., Saito, K., Ito, N., Usui, A., Takayama, H., Sakoda, Y. : *J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 1172~1181, 2017.
- 7) Abe, Y., Tamura, T., Torii, S., Wakamori, S., Nagai, M., Mitsuhashi, K., Mine, J., Fujimoto, Y., Nagashima, N., Yoshino, F., Sugita, Y., Nomura, T., Okamatsu, M., Kida, H., Sakoda, Y. J. : *Vet. Med. Sci.*, **78**, 61~70, 2016.
- 8) Minami, F., Nagai, M., Ito, M., Matsuda, T., Takai, H., Jinkawa, Y., Shimano, T., Hayashi, M., Seki, Y., Sakoda, Y., Sugiura, K., Akashi, H. : *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **34**, 35~39, 2011.

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

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

黒木 香澄・吾郷 良輔・竹下 奈知子・仁田 義弘・門屋 亨介*・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：梶山女学園大学生生活科学部管理栄養学科）

Kasumi Kuroki, Ryosuke Ago, Nachiko Takeshita, Yoshihiro Nitta, Ryosuke Kadoya* and Tsutomu Sekizaki

(Research Center for Food Safety, Graduate School of Agricultural Life Science, The University of Tokyo,

*present affiliation : Department of Human Nutrition, School of Life Studies, Sugiyama Jogakuen University)

Campylobacteriosis is a serious bacterial food-borne disease mainly caused by *Campylobacter jejuni* and *C. coli* which are microaerophilic bacteria. The colonization of *Campylobacter* in the chicken intestine occurring on broiler farms induces the bacterial contamination to chicken meat throughout the food chain from farm to fork. In the previous study, we showed that the bacterial composition of chicken meat was different at each store, and the contamination of *Campylobacter* in processing factories or stores was suggested. We also found that the abundance ratio of *Pseudomonas* was more than 30% and dominant in the microbiota of chicken meat. Since other studies suggested that *Pseudomonas* would help *Campylobacter* to survive for long periods outside the host, chicken meat would be suitable for the survival of *Campylobacter* under the atmospheric oxygen tension. In this study, we compared the bacterial population structure on chicken meat for each store in detail, and estimated the contamination routes of *Campylobacter* from the comparison of bacterial types existing on chicken meat and liver. First, a total of 69 packed chicken products were tested by nested PCR combined with an enrichment culture, with 72% of the products found to be *Campylobacter*-positive. As a result of 16S rRNA gene-based metagenomic analysis, the bacterial composition of chicken meat was different at each store regardless of the purchase date and poultry producing area, and *Pseudomonas* and *Staphylococcus* was found in each store B and C as a characteristic bacterial genus. Also, the bacterial composition was different between liver and meat as our previous study has shown. Furthermore, some bacteria existing in chicken intestines such as *Clostridium* cluster XI and *Lachnospiraceae* were detected from all liver samples and a part of *Campylobacter*-positive meat, and those samples were clustered the same group by a cluster analysis based on unweighted Unifrac distances. From the results, *Campylobacter* was suggested to contaminate liver and chicken meat via contents of chicken intestine. Finally, linear discriminant analysis (LDA) effect size revealed that *Carnobacterium* was the most characteristic in *Campylobacter*-positive meat. Since this bacterial genus is known to cause putrefaction of foods and not to be detected from chicken intestine, it suggested to have contaminated chicken meat via some tools or hands of workers. These

results strongly suggest that cross-contamination occurred in not only slaughterhouses but also retail stores and processing factories.

1. 目 的

カンピロバクターは細菌性食中毒の主要な原因菌であり、下痢や嘔吐などを引き起こす。さらに、本菌に感染した場合には一定の割合で致死的な症状を呈するギラン・バレー症候群を発症することからも、食卓の安全を確保するうえで本菌の汚染防止は喫緊の課題である。本菌はヒトにおいて前述の症状を呈する一方で、鶏の腸管内には無症候的に定着し、養鶏場での飼育段階で感染することが多くの調査により明らかにされている。申請者らの先行研究では養鶏場ごとに本菌の汚染状態が異なることや、同一養鶏場においても時期によって汚染状況が異なることが示されており、本菌の汚染源や汚染経路を同定することで養鶏場での鶏への汚染防止策を提示できると考えている。しかしながら、もし仮に養鶏場の段階で本菌の汚染を完全に排除できたとしても、現状では、養鶏場で本菌に汚染された鶏が多数出荷されているため、食鳥処理場や加工場での鶏肉への汚染を完全に防ぐことは難しい。さらに、平成29年度研究助成課題「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」で申請者らは、小売店で販売されていた鶏肉の75%が本菌に汚染されており、加工場や店舗でも本菌の汚染が拡大する可能性を明らかにした。したがって、小売店での鶏肉加工などの作業中の汚染を排除できれば、より安全な鶏肉を消費者に提供することができ、商品価値を高めることにも繋がると考えられる。しかしながら昨年度の調査は対象店舗数や検体数が十分とは言えず、小売店内での汚染の実態を詳細に把握することまではできなかった。そこで本研究では店舗数と検体数、検体の種

類を追加し、小売店内での本菌汚染の実態とその経路を明らかにすることを目的とした。また、大気中で長期生存が困難な微好気性細菌である本菌が消費者に喫食されるまでの期間を鶏肉表面で生存し続ける機序はいまだ不明である。昨年度の研究助成課題で我々は鶏肉上には本菌の大気中での生存を助ける *Pseudomonas* 属細菌が多く存在すること、鶏肉表面は多種類の細菌によって細菌叢が構成されていること、*Helicobacter* 属などが鶏腸管内からカンピロバクターと挙動を共にしている可能性を明らかにした。本研究では引き続き、鶏肉表面の細菌叢の構成細菌を網羅的に調べることによって、小売店における本菌の動態を調べるとともに、本菌の挙動に関連していると考えられる *Pseudomonas* 属や *Helicobacter* 属など他の細菌群との相互関係を明らかにし、将来的には小売店での鶏肉への本菌汚染防止法の提案や鶏肉上の本菌排除方法の開発を目指す。

2. 方 法

2.1 実験材料

東京都の小売店3店舗 (A, B, C) で鶏肉を購入した。部位はムネ ($n = 30$), モモ ($n = 30$), レバー ($n = 9$) の3種類とした。

2.2 試料調整

購入した鶏肉を125 g量り取り、ストマッカー袋に移した。ただし、125 gに満たない鶏肉は全量を用いた。ストマッカー袋に滅菌生理食塩水を100ml入れ、袋越しに手で鶏肉を30秒揉んだ後の生理食塩水を試料として収集した。ストマッカーを使用せず、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℃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¹⁾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 μ l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℃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 μ T-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法で増幅し、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-TORNADO²⁾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)³⁾ およびR言語⁴⁾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増菌培養とnested PCRを組み合わせた方法で検出したところ、72%からカンピロバクターの遺伝子が検出された(Table 1, 2)。昨年度の成績では75%の汚染率だったことから、店舗A, B, Cで販売される鶏肉は恒常的にカンピロバクターに汚染されていることが示唆された。また*C. coli*よりも*C. jejuni*の検出率が高く、これまでの報告と一致していた。さらに*C. jejuni*の検出率はレバーで100%であり、ムネ肉よりモモ肉から高頻度に検出された。カンピロバクターの鶏肉への汚染は食鳥処理の際の腸管内容物の汚染が主な原因と考えられており、モモ肉の方が汚染されやすいことが示唆された。

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

前年度の研究成果と同様に精肉とレバーでは構成細菌が大きく異なっており、*Pseudomonas*属はモモ肉とムネ肉で約50%の存在率を占める主要な構成細菌だったのに対してレバーでの存在率は約10%だった。またレバーではモモ肉やムネ肉のように特定の細菌が細菌叢を占有することはなく、*Lactococcus*属、*Lactobacillus*属、*Aeromonas*属、*Lachnospiraceae*科など多数の細菌が10%程度ずつ存在していた。モモ肉とムネ肉での存在率が1%以下で、レバーでの存在率が1%以上だった*Lactobacillus*属、*Corynebacterium*属、*Enterococcus*

Table 1 Percentages of *Campylobacter*-positive chicken products in retail stores.

Part	Store	Number tested	<i>C. jejuni</i>		<i>C. coli</i>		<i>Campylobacter</i> spp.
			Number positive	% positive	Number positive	% positive	% positive
Thigh	A	10	8	80	0	0	80
	B	10	6	60	3	30	60
	C	10	10	100	0	0	100
	Total	30	24	80	3	10	80
Breast	A	10	8	80	0	0	80
	B	10	2	20	4	60	50
	C	10	4	40	0	0	40
	Total	30	14	47	4	13	57
Liver	A	5	5	100	4	4	100
	C	4	4	100	0	0	100
	Total	9	9	100	4	44	100
Total		69	47	68	11	16	72

Table 2 Details of chicken samples used in this study.

Store	Date	Area of production	Part	Sample ID	<i>Campylobacter</i> spp.	Store	Date	Area of production	Part	Sample ID	<i>Campylobacter</i> spp.			
A	18/12/2017	Japan	Breast	A1-1	+	B	29/8/2018	Japan	Thigh	B6-1	–			
				A1-2	+					B6-2	–			
				A1-3	+									
			Thigh	A2-1	+				Breast	B7-1	–			
				A2-2	+					B7-2	+			
				A2-3	+					B7-3	+			
		Aomori Prefecture	Thigh	A2-4	+				B8-1	–				
				A3	+				B8-2	–				
			19/6/2018	Japan	Breast			A4	–	28/9/2018	Japan	Thigh	B9-1	+
								A5	–				B9-2	+
													B10	+
	C	24/12/2017	Japan	Thigh	C1-1	+	20/8/2018	Japan	Breast	C5-1	+			
					C1-2	+				C5-2	–			
										C5-3	–			
Iwate Prefecture					Thigh	C2-1				+	C5-4	–		
						C2-2				+	C5-5	+		
						C3-1				+	C5-6	–		
			Breast	C3-2	+	C6-1			+					
				C4-1	–	C6-2			+					
				C4-2	+	C7-1			+					
24/8/2018			Japan	Liver	A6-1	–			24/8/2018	Japan	Liver	C8-1	+	
					A6-2	+						C8-2	+	
					A6-3	+						C8-3	+	
		A6-4			+									
		A6-5			+									
		A6-6			+									
28/9/2018		Japan	Liver	A7	–	28/9/2018	Japan	Liver	C9	+				
				A8-1	+									
				A8-2	+									
	A8-3			+										
B	19/12/2017	Japan	Thigh	B1-1	+	28/9/2018	Japan	Liver	C9	+				
				B1-2	+									
				B1-3	–									
				B2	–									
				B3	+									
				Breast	B4-1				–					
		B4-2	–											
		B4-3	+											
		B4-4	+											
		B5	+											

属は鶏腸管の細菌叢で主要な細菌として知られている⁵⁾。食鳥処理場では内臓と、と体に分けて処理が行われるため⁶⁾、内臓に分類されるレバーはモモ肉やムネ肉よりも腸管からの汚染を受けやすく、腸管内の主要な細菌がレバーにも多く存在していたと考えられた。また、モモ肉とムネ肉の構成細菌の存在率を店舗ごとに平均化したものを比

較すると、特にB店で*Pseudomonas*属の存在率が高かった (Fig. 1)。B店は店舗の規模が小さいことや商品ラベルの加工者欄に外部の工場名が記載されていたことから、切り分けやパッケージ等の加工を店舗のバックヤードではなく工場で行っていると思われる。*Pseudomonas*属の細菌は腐敗菌として広く食肉に存在していることが

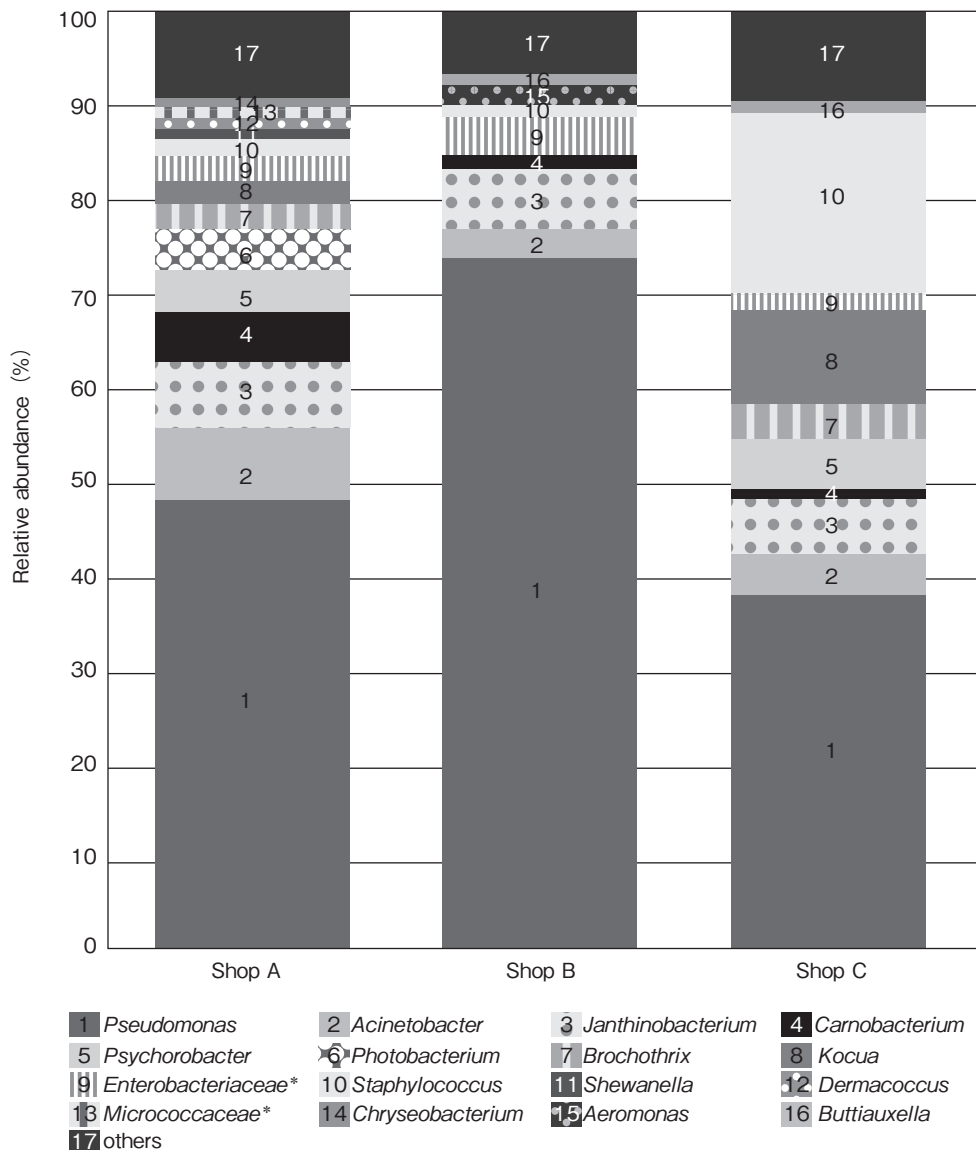


Fig. 1 The bacterial composition in chicken meat (thigh and breast) at the genus level.

Sixteen bacterial genera are shown as the predominant taxa (> 1 %), *These taxa were unclassifiable at the genus level.

知られており⁷⁾, B店の鶏肉では加工後, 店舗で販売されるまでに時間を要したことから *Pseudomonas* 属が増加したと示唆された。また, C店の鶏肉には *Staphylococcus* 属が高率で存在しており (Fig. 1), *Staphylococcus* 属と推定された OTU の中で最も存在率が高かった OTU の配列を Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) による相同性解析に供したところ *Staphylococcus saprophyticus* と高い一致率を示した (Identity 99%)。本菌は尿路感染症の原因菌の一つで, 食品や環境中からも分離されることが知られている⁸⁾。C店では8ヶ月の期間を隔てて2回鶏肉を購入したが, 購入日や肉の産地に関わらず, いずれの肉も *S. saprophyticus* に汚染されていたことから, 店舗のバックヤードに本菌が常在して鶏肉を汚染していると示唆された。ただし, OTU は 97% の相同性を持つ配列をまとめたものであり, OTU の代表配列を用いた BLAST 解析では菌種の推定にとどまる。菌種の同定のためには, 菌分離をして性状を確認するなど他の手法が必要である点を留意しなければならない。

3.2.2 階層クラスター解析

各構成細菌の類似性を調べるため Unweighted Unifrac 距離に基づくクラスター解析を行った結果, 69 個の全検体は 13 のクラスターに分類された (Fig. 2)。すべてのレバーはクラスター 8 に分類され, クラスター 8 の全検体がカンピロバクター陽性だった (Fig. 2)。Unweighted UniFrac 距離は OTU の種類にもとづいたもので OTU の存在率は考慮されない。レバーとクラスター 8 に分類された精肉には, 類似した種類の細菌が存在していたことが示された。クラスター 8 に特徴的な OTU, つまりクラスター 8 の検体に普遍的に存在し他の検体では存在することが少ない OTU には *Clostridium* cluster XI, *Lachnospiraceae* 等と推定されるものがあつた。これらは鶏の腸内細菌

叢に存在することが知られていることから^{9, 10)}, クラスター 8 に属する検体, つまりすべてのレバーと一部のムネ肉やモモ肉が腸管からの汚染を受けたことが示唆された。加えて, クラスター 8 の検体はすべてカンピロバクターに汚染されていたことから, カンピロバクターが *Clostridium* cluster XI, *Lachnospiraceae* 等の鶏腸管に存在する細菌とともに鶏肉に移行したことが推測された。食鳥処理場にて冷却や内臓摘出による微生物汚染の制御を行っているにもかかわらず, 腸内容物の流出等によるカンピロバクター汚染が生じていることは以前より指摘されてきた⁶⁾。上述の成績から, 食鳥処理場で生じた汚染が小売店まで持続している可能性が示された。また, クラスター 8 やその近縁のクラスターに分類された検体以外にもカンピロバクター汚染は生じていた。つまり, 鶏腸管から受けた汚染の程度が比較的低いと推測される検体でも鶏肉にカンピロバクター汚染が生じていたことが示唆される。これらの検体は食鳥処理や加工場, 小売店のバックヤードの器具や肉を扱う人の手, すでに汚染された肉製品などから間接的にカンピロバクターの汚染を受けたと考えられた。

3.2.3 Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) 解析

Unweighted Unifrac 距離に基づく解析は OTU の種類のみを考慮しており, 細菌叢内での存在率までは考慮できない。一方で, Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) 解析は OTU の存在率も考慮して群間の有意差を比較することが可能であり, 本解析でカンピロバクター陽性検体に有意に多いとされた細菌はカンピロバクターの生存に影響を与えている可能性がある。モモ肉とムネ肉の検体を用いて LEfSe 解析を行ったところ, 陽性検体に有意に多く存在する細菌として *Lactobacillus* 属, *Corynebacterium* 属が検出され

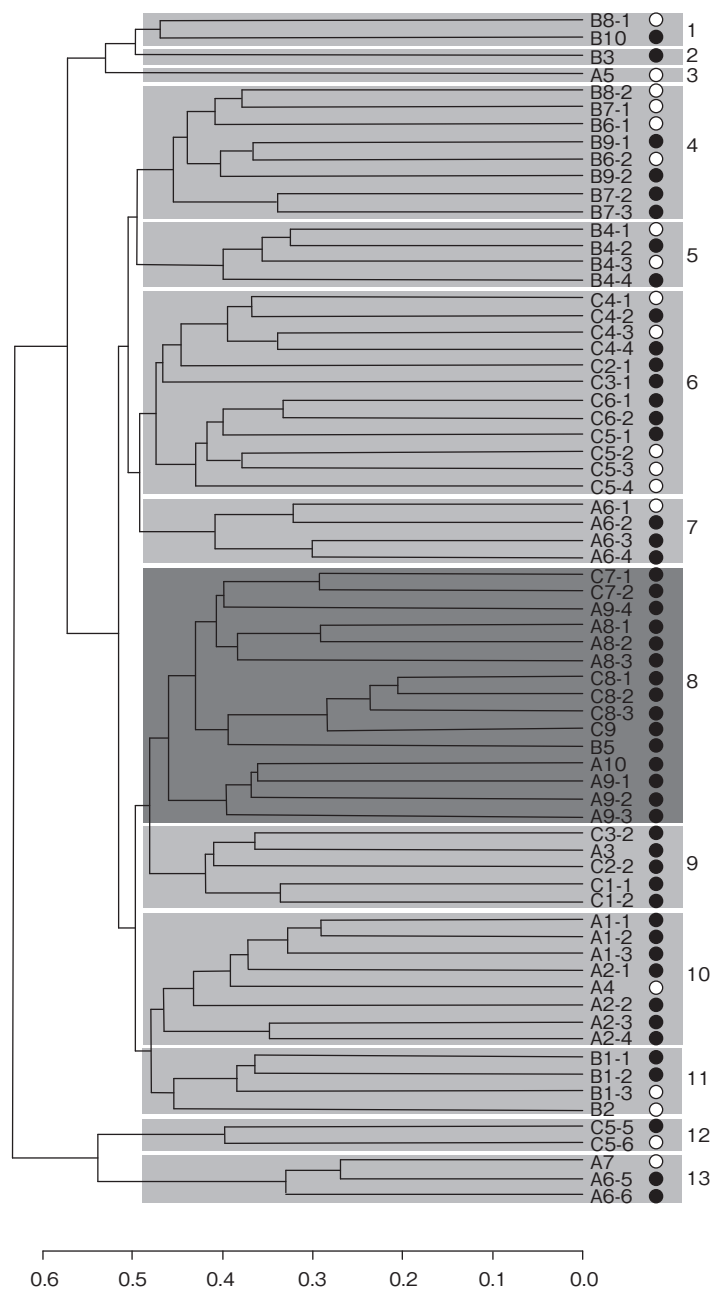


Fig. 2 All samples were clustered into 13 groups based on unweighted UniFrac distances. Open and filled circle means each *Campylobacter*-negative and *Campylobacter*-positive.

た (Fig. 3)。これらは鶏腸管の細菌叢で主要な細菌属として知られていることから⁵⁾、カンピロバクター陽性検体は鶏腸内容物の汚染の影響を大きく受けていたことが考えられた。また、カンピ

ロバクター陰性検体の多くからは検出されなかったことから、*Lactobacillus* 属、*Corynebacterium* 属は鶏腸管からカンピロバクターとともに移行したことが示唆された。一方で

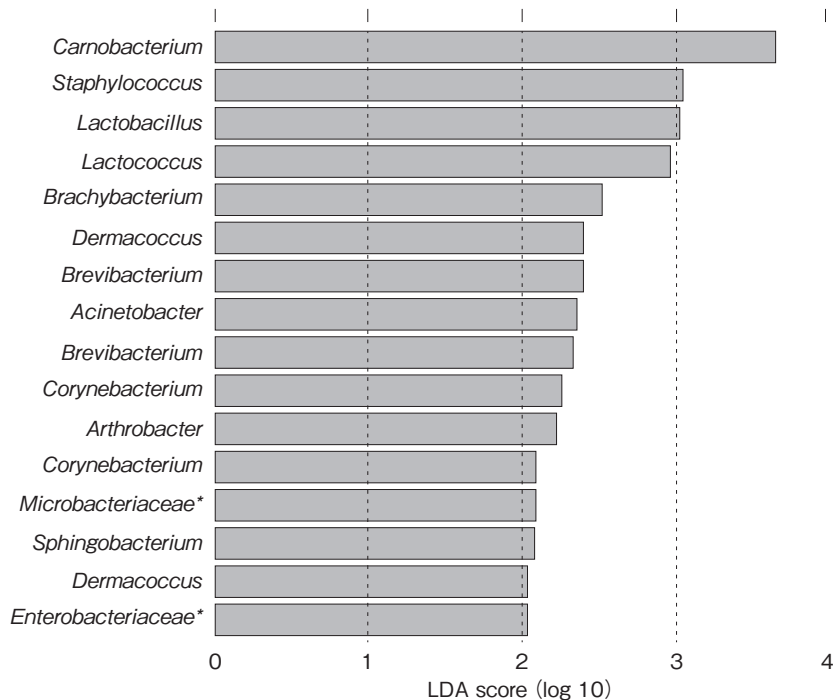


Fig. 3 Linear discriminant analysis (LDA) effect size (LEfSe) identified the most differentially abundant bacteria at the genus level between *Campylobacter*-positive and -negative chicken (LDA score >2, $p < 0.05$).

Campylobacter-positive chicken-enriched bacteria are indicated with black bars. * These taxa were unclassifiable at the genus level.

最も LDA score が大きかった *Carnobacterium* 属は肉や魚などの食品に存在し、食品を腐敗させることで知られる¹¹⁾。また、鳥類や哺乳類の腸管からの分離報告がないことから、本菌は鶏腸内容物を介さない経路で鶏肉上に移行したと考えられた。これは *Lactobacillus* 属、*Corynebacterium* 属がカンピロバクター陽性検体のみ存在しているのに対し、*Carnobacterium* 属は陰性検体も含めた鶏肉に共通して存在していたことから考えられた。また *Carnobacterium* 属は食品上で低温下でも代謝産物を生産することから、鶏肉が低温で保持されている状態でも代謝産物を介してカンピロバクターと何らかの関連を生じる可能性もある。*Carnobacterium* 属は *Listeria monocytogenes* の発育を阻害することでも知られており¹²⁾、実際にカナダでは一部の株が保存料として食肉製品に使用

することが認められている¹³⁾。食肉に添加する微生物製剤として安全に利用するためにも、同じ食肉上に存在する病原微生物であるカンピロバクターとの関連性は詳細に評価すべきだろう。また、前年度の研究ではカンピロバクター陽性の鶏肉に特徴的な細菌として *Helicobacter* 属や *Kocuria* 属が検出されたが、今回の解析では検出されなかった。肉の細菌叢は環境や扱われ方によって変化するものであり、解析に供した検体によって異なる特徴的な細菌が検出されるのは当然のことと考えられる。反対に、前年度と今年度の解析で共通してカンピロバクター陽性の鶏肉に特徴的な細菌として検出された *Lactobacillus* 属や *Arthrobacter* 属は鶏肉に普遍的に存在し、カンピロバクターの生存に影響している可能性が考えられた。

4. 要 約

増菌培養とnested PCR法を組み合わせる鶏肉のカンピロバクター汚染率を調査した結果、72%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、モモ肉とムネ肉では*Pseudomonas*属が構成細菌の約半数を占めていたのに対し、レバーでは*Lactococcus*属と*Lactobacillus*属をはじめとする多様な細菌が存在することが分かった。また、B店では*Pseudomonas*属、C店では*Staphylococcus*属の存在率が高いなど、店舗ごとに構成細菌の特徴に違いがみられた。さらに、その特徴は購入時期や産地に左右されないことから、店舗や加工場に常在する細菌が鶏肉に継続的に交差汚染していることが示唆された。またUnweighted UniFrac距離に基づいたクラスター解析により、カンピロバクター汚染肉の中にはレバーと類似した細菌叢をもつものがあることが分かった。それらはレバーと同様に鶏の腸管に存在する*Clostridium* cluster XIや*Lachnospiraceae*に汚染されていた。またLEfSe解析の結果、カンピロバクターに汚染されている肉に特徴的な細菌として*Carnobacterium*属が検出された。本菌が鶏腸管から分離されたという報告はないことから、腸内容物からの汚染とは違う経路で鶏肉を汚染しカンピロバクターの生存に関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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., Yatsunenkov, T., Zaneveld, J., Knight, R. : QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data, *Nature methods*, **7**, 335~336, 2010.
- 4) Ihaka, R., Gentleman, R. : R : a language for data analysis and graphics, *Journal of computational and graphical statistics*, **5**, 299~314, 1996.
 - 5) Xiao, Y., Xiang, Y., Zhou, W., Chen, J., Li, K., Yang, H. : Microbial community mapping in intestinal tract of broiler chicken, *Poultry Science*, **96**, 1387~93, 2017.
 - 6) 三澤尚明 : 食鳥処理場におけるカンピロバクター制御法の現状と課題, 日本獣医師会雑誌, **65**, 617~23, 2012.
 - 7) Ayres, J. C. : The Relationship of Organisms of the Genus *Pseudomonas* To the Spoilage of Meat, Poultry and Eggs, *Journal of Applied Bacteriology*, **23**, 471~86, 1960.
 - 8) Raz, R., Colodner, R., Kunin, C. M. : Who are you - *Staphylococcus saprophyticus*? *Clinical Infectious Diseases*, **40**, 896~8, 2005.
 - 9) Mohd Shaufi, M. A., Sieo, C. C., Chong, C. W., Gan, H. M., Ho, Y. W. : Deciphering chicken gut microbial dynamics based on high-throughput 16S rRNA metagenomics analyses, *Gut Pathogens*, **7**, 4, 2015.
 - 10) Apajalahti, J., Vienola, K. : Interaction between chicken intestinal microbiota and protein digestion, *Animal Feed Science and Technology*, **221**, 323 ~ 30, 2016.
 - 11) Leisner, J. J., Laursen, B. G., Prévost, H., Drider, D., Dalgaard, P. : *Carnobacterium* : positive and negative effects in the environment and in foods, *FEMS Microbiology Reviews*, **31**, 592~613, 2007.
 - 12) Duffes, F., Leroi, F., Boyaval, P., Xavier, D. : Inhibition of *Listeria* strains in a simulated cold smoked fish system stored at 4°C, *International Journal of Food Microbiology*, **47**, 33~42, 1999.
 - 13) Health Canada [Internet]. Notice of Modification to the List of Permitted Preservatives to Enable the Use of *Carnobacterium maltaromaticum* CB1 as an Antimicrobial Preservative in Certain Meat and Poultry Meat Products Reference Number : NOM/ADM-0097. [cited 2018 Nov 27]. Available from : <https://www.canada.ca/en/health-canada/services/food-nutrition/public-involvement-partnerships/notice-modification-list-permitted-preservatives-enable-use-carnobacterium-maltaromaticum-cb1-antimicrobial-preservative-certain-meat-poultry-meat.html>

野鳥が媒介する家畜のボツリヌス症の分子疫学的解析

Molecular epidemiological analysis of wild bird-mediated botulism in livestock

阪 口 義 彦

(北里大学医学部微生物学)

Yoshihiko Sakaguchi

(Department of Microbiology, Kitasato University School of Medicine)

Clostridium botulinum produces the botulinum neurotoxin (BoNT) that causes botulism, a neuromuscular disease. The potentially lethal toxin causes a range of pathology in humans and animals. *C. botulinum* is conventionally classified into seven serotypes A to G based on the antigenicity of BoNT. Among these serotypes, *C. botulinum* types C and D cause animal botulism. This study aimed to evaluate the possibility that wild birds such as crows may mediate *C. botulinum* transmission to domesticated cattle. Samples were collected from diseased wild birds and from cattle and their rearing environment in eight Japanese prefectures to try to isolate *C. botulinum*. From this sampling, 19 strains could be isolated of which 19 were confirmed to be *C. botulinum* by detection of the BoNT/C and BoNT/D genes (*bont/C* and *bont/D*) using polymerase chain reaction (PCR), determination of the nucleotide sequence of the *bont/C* and *bont/D*, and examination of the lethality of these strains in mice. Next, typing analysis of the genomic DNA of these 19 strains of *C. botulinum* type D using pulse-field gel electrophoresis (PFGE) was performed which produced seven band patterns. *C. botulinum* strains isolated from crows and cattle in the same prefecture showed the same PFGE pattern, suggesting that crows may mediate *C. botulinum* type D strain transmission to cattle. For a full risk assessment in future, it will be necessary to analyze a larger sample.

1. 目 的

当研究課題は、国内で飼育される牛等の家畜のボツリヌス症において、カラス等の野鳥がボツリヌス菌を媒介するリスクを分子疫学の観点から評価を行うことを目的としている。ボツリヌス菌は、グラム陽性の偏性嫌気性菌で芽胞を形成し、土壌や河川、湖沼など自然界に広く分布している。本菌は、きわめて強力な神経毒素（ボツリヌ

ス毒素）を産生し、ヒト、家畜に重篤な感染症（ボツリヌス症）を引き起こす。家畜のボツリヌス症は、ボツリヌス菌またはボツリヌス毒素が混入した飼料や水を摂取することに起因し、世界中で発症が確認されている。農場で飼料、水等を介してボツリヌス症の集団発生が起きると、生産者への経済的な損失や消費者の食の安全に対する不安感を助長させる。したがって、農場におけるボツリヌス菌の感染制御は重要な課題である。ボツ

リヌス菌は、産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いにより、A～G型菌に分類されている。その中で、牛には主にD型菌がボツリヌス症を引き起こすことが知られる。興味深いことに、野鳥、特にカラスの糞便からボツリヌス菌が分離されるが、カラス自身には発症しない。このことから、生産現場である農場において、カラスが媒介動物となつて、ボツリヌス菌を地理的に離れた農場間には伝播する可能性が考えられるが、これまでのところ科学的根拠は報告されていない。牛のボツリヌス症の原因となるD型ボツリヌス毒素遺伝子は、バクテリオファージ（ファージ）により、近縁菌間において伝達されている¹⁻³⁾。本研究課題では、家畜と野鳥のボツリヌス症由来菌株の分子疫学的解析を行った。具体的には、ボツリヌス症の罹患牛およびカラスを含む野鳥の糞便から分離されたボツリヌス菌株のゲノムに対しファージ領域を含めて遺伝学的解析を行い、その比較解析により野鳥から家畜へのボツリヌス菌の伝播の可能性について検討した。本研究成果は、野鳥の防除が家畜のボツリヌス症の感染制御に有用であるか、科学的な証明を試みるものである。

2. 方 法

2.1 ボツリヌス菌の分離

本研究では、2004～2016年に日本の8県で、ボツリヌス症の疑いのあるカラス等の野鳥や牛等の罹患動物または飼育環境から得た57試料を用いて、ボツリヌス症の原因菌であるボツリヌス菌の分離を試みた。カラスまたは牛の消化管内容物や糞便を加熱処理（60℃、15分間または80℃、30分間）し、クックドミート培地、血液寒天培地または卵黄寒天培地に接種し、30℃で4～7日間、嫌気培養を行った。血液寒天培地では厚みが薄く、rough型溶血環を示すコロニー、卵黄寒天培地では真珠層を形成するコロニーをそれぞれクックド

ミート培地に接種し、30℃で、4日間、嫌気培養を行った。培養した菌について、Polymerase chain reaction (PCR) 法によりC型およびD型ボツリヌス毒素遺伝子の有無を調べた。コントロール菌株として、4菌株（CTL01, CTL02, CTL03, CTL04）を使用した。また、菌の培養上清を用いて、マウスによるバイオアッセイ（毒性試験）を行った。

2.2 ボツリヌス毒素遺伝子の検出

分離した種々のボツリヌス菌をクックドミート培地で培養し、DNA精製キットを用いて菌体からDNAを精製した。精製したDNAを鋳型として、C型またはD型ボツリヌス毒素遺伝子に特異的なプライマー対¹⁾を作製しPCRを行った（94℃、1分間、55℃、1分間、72℃、1分間、25サイクル）。ポジティブコントロールとして、C型およびD型ボツリヌス菌の16S rRNA遺伝子に特異的なプライマー対（bot16S-F：GAGAGTTTGATCCTGGCTCAGG, bot16S-R：AAGGAGGTGATCCAAACCGCAGG）を作製し、本プライマー対を用いて16S rRNA遺伝子を増幅させた。PCR後の反応液について、2%アガロースゲルを用いて電気泳動を行い、泳動後のアガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、目的のサイズにDNAバンドが検出されることを確認した。得られたPCR産物を精製し、シーケンス解析によりボツリヌス毒素遺伝子の毒素型を判定した。

2.3 毒性試験

分離した種々のボツリヌス菌をクックドミート培地で培養し、4℃、8,000rpm、20分間遠心した。その上清を0.2%ゼラチン-PBS（phosphate buffered saline）（-）で2倍あるいは10倍段階希釈した後、マウスの腹腔内に投与し、24時間後マウスの生死を判定した。

2.4 ボツリヌス菌のPFGE解析

分離した種々のボツリヌス菌をブレインハート

インフュージョン (BHI) 培地に接種し、37℃で一晩嫌気培養した。培養液を4℃、8,000rpm、20分間遠心し、上清を除去した。沈渣をPBS(-)で懸濁し、その懸濁液を低融点アガロースと混和し、プラグを調整した¹⁾。プラグは2 mg/ml リゾチームで、37℃、16時間処理し溶菌させた。その後、1 mg/ml プロテナーゼ K で50℃、18時間処理し、タンパク質を分解した。さらに、プラグを1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) で50℃、1時間処理し、制限酵素 *Nru* I、*Sac* II または *Xho* I で37℃、一晩反応させDNAを切断した。CHEF MAPPER (Bio Rad) を用いて、種々の制限酵素で処理したプラグについてパルスフィールドゲル電気泳動 (pulsed-field gel electrophoresis : PFGE) を行った。泳動条件は、6 V/cm、パルス角度120度、5~20秒間、20.18時間で行った⁴⁾。DNAサイズマーカーは、ラムダラダーを使用した。PFGE後のアガロースゲルを臭化エチジウムで染色し、DNAバンドパターンを確認した。得られたPFGEパターンを菌株ごとに比較することによって、被験菌株のゲノムDNAの型別を行った。

本研究は、北里大学、大阪府立大学、宮崎大学、国立感染症研究所、麻布大学および岡山大学の他施設共同研究により行った。本研究での二種病原体の取り扱いについては、二種病原体等取扱施設として厚生労働省の承認を得た大阪府立大学で実験を行った。

3. 結果と考察

3.1 ボツリヌス菌の分離

日本の8県で、ボツリヌス症の疑いのある、1) カラス等の野鳥や牛等の罹患動物の消化管内容物、2) 飼育環境から採取した餌、わら、水、土、植物を含む57試料から、ボツリヌス症の原因菌であるボツリヌス菌の分離を試みたところ、19菌株を分離することができた。この中で、カラスの消化

管内容物から1菌株、野鳥の糞便から1菌株、牛から13菌株を分離することができた。

3.2 ボツリヌス毒素遺伝子の検出

通常、ボツリヌス毒素は、軽鎖 (Lc) と重鎖 (Hc) から構成されており、C型ボツリヌス毒素はC型のLc (C-Lc) とC型のHc (C-Hc)、D型ボツリヌス毒素はD型のLc (D-Lc) とD型のHc (D-Hc) からなる。Lcは酵素活性に、Hcはボツリヌス毒素の細胞内への移行およびレセプターへの結合に関わっている。まずは、C-Lc遺伝子に特異的なプライマー対を作製し¹⁾、分離した19ボツリヌス菌株のDNAについてPolymerase chain reaction (PCR) を行ったところ、すべての菌株においてPCR産物が得られなかった (Table 1)。そこで、D-Lc遺伝子に特異的なプライマー対を作製し¹⁾、同じ菌株について調べたところ、いずれの菌株においてもPCR産物が認められた (Table 1)。牛および鶏などのボツリヌス症から分離されるC型およびD型ボツリヌス菌においては、C-LcとD-Hc (C/D)、D-LcとC-Hc (D/C) のボツリヌス毒素 (モザイク毒素またはキメラ毒素) 遺伝子を有することが報告されている⁴⁾。そこで、モザイク毒素遺伝子を検出する目的で、19菌株のC-HcとD-Hcの遺伝子に特異的なプライマー対を作製しPCRを行ったところ、すべての菌株においてDNAバンドが検出された (Table 1)。これらの結果から、分離した19菌株はD/C型毒素遺伝子を有している可能性が考えられた。

3.3 ボツリヌス毒素遺伝子の塩基配列の決定

PCRによりD-Lc遺伝子が陽性を示した19菌株において、得られたPCR産物の塩基配列が、D-Lc遺伝子のものであるかを確認するため、PCR産物の塩基配列の決定を行った。その結果、すべての菌株においてD-Lc遺伝子の塩基配列であった。また、モザイク毒素 (D/C型) の保有が疑われた7菌株についてもシーケンス解析を行っ

Table 1 Detection of botulinum neurotoxin genes in *C. botulinum* types C and D.

Strain	Location	Origin	PCR				Type
			C-Lc	D-Lc	C-Hc	D-Hc	
CTL01	Unknown	Unknown	+	-	+	-	C/C
CTL02	Unknown	Unknown	-	+	-	+	D/D
CTL03	Unknown	Unknown	+	-	-	+	C/D
CTL04	Unknown	Unknown	-	+	+	-	D/C
CB04	A	Unknown	-	+	+	-	D/C
CB05	B	Unknown	-	+	+	-	D/C
CB11	C	Crow, gut content	-	+	+	-	D/C
CB13	C	Bovine, gut content	-	+	+	-	D/C
CB16	D	Bovine, gut content	-	+	+	-	D/C
CB18	E	Bovine, feces	-	+	+	-	D/C
CB22	E	Bovine, feces	-	+	+	-	D/C
CB24	F	Bovine, gut content	-	+	+	-	ND
CB31	D	Bovine, feces	-	+	+	-	ND
CB32	C	Bovine, feces	-	+	+	-	ND
CB36	A	feed	-	+	+	-	ND
CB37	G	Bovine, feces	-	+	+	-	ND
CB38	G	Wild animal, feces	-	+	+	-	ND
CB39	A	Bovine, feces	-	+	+	-	ND
CB41	H	Bovine, gut content	-	+	+	-	ND
CB43	D	Bovine, feces	-	+	+	-	ND
CB45	D	Bovine, gut content	-	+	+	-	ND
CB47	G	Bovine, gut content	-	+	+	-	ND
CB48	G	Bird, feces	-	+	+	-	ND

CTL : control strain, CB : isolated strain, + : positive, - : negative, ND : no data

たところ、D/C型ボツリヌス毒素遺伝子の配列を示すことが明らかとなった。すなわち、PCR陽性を示した19菌株のうち7菌株については、毒素遺伝子型を決定することができた。未解析の12菌株については、現在、シーケンス解析を行っているところである。

3.4 毒性試験

PCRおよびシーケンス解析により、D-Lc遺伝子を有する19菌株をそれぞれ嫌気培養し、その培養上清をマウスに投与したところ、すべての菌株において数時間でボツリヌス症の典型的な症状で死亡した。このことから、PCRおよびシーケンス解析の結果から得た遺伝子解析結果は表現型と合致しており、これらの菌株はボツリヌス菌であることが確定した。

3.5 ボツリヌス菌のPFGE解析

分離した19菌株について、パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) を行い、ボツリヌス菌ゲノムDNAの型別解析したところ、7つのバンドパターンに分かれた。Fig. 1 には、分離した一部の菌株DNAのSac II 消化によるPFGEパターンを示した。PFGE解析では、同じ県内の牛および環境から分離したボツリヌス菌株は、同じPFGEパターンを示した。また、離れた県同士では、DとGで分離されたボツリヌス菌株が、同じPFGEパターンを示した。カラスの消化管内容物から分離したボツリヌス菌株と同じ県で分離した牛の消化管内容物から分離したボツリヌス菌株では、同じPFGEパターンが認められた。この結果から、カラスがボツリヌス菌の媒介動物となり、牛に伝播した可能性が考えられた。今回の研究成果では、

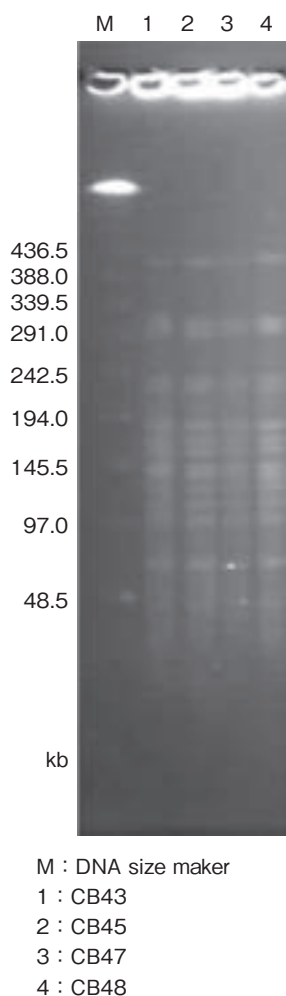


Fig. 1 PFGE genotyping.

まだ事例が少ないため、今後、さらなるカラス由来のボツリヌス菌を分離し、そのゲノムDNA型別解析などの分子疫学的調査が必要である。

4. 要 約

ボツリヌス菌は、きわめて強力なボツリヌス毒素を産生し、ヒトや家畜（鶏、牛）に重篤な感染症（ボツリヌス症）を引き起こす。本菌は、産生するボツリヌス毒素の抗原性の違いにより、A～G型菌に分類されている。その中で、C型菌は鶏に、D型菌は牛にボツリヌス症を引き起こす。本研究課題では、国内で飼育される牛のボツリヌス症に

おいて、カラス等の野鳥がボツリヌス菌を媒介する可能性について、分子疫学の観点から評価した。日本の8県で、ボツリヌス症の疑いのある野鳥や牛の罹患動物、飼育環境から57試料を採取し、ボツリヌス症の原因菌であるボツリヌス菌の分離を試みた。その結果、19菌株を分離することができた。これらの菌株について、PCRによるC型とD型ボツリヌス毒素遺伝子の検出および塩基配列の決定、C型とD型ボツリヌス毒素のマウス致死活性により、19菌株がボツリヌス菌であることが明らかとなった。次に、19菌株について、パルスフィールドゲル電気泳動（PFGE）を用いたボツリヌス菌ゲノムDNAの型別解析を行ったところ、7つのPFGEパターンに分かれた。この中で、同じ県のカラスおよび牛から分離されたボツリヌス菌株は、同じPFGEパターンを示したことから、カラスがボツリヌス菌を媒介している可能性が示唆された。リスク評価を行うためには、今後、さらに試料を追加し、ボツリヌス症の分子疫学的解析を行っていく必要がある。

文 献

- 1) Sakaguchi, Y., Hayashi, T., Kurokawa, K., Nakayama, K., Oshima, K., Fujinaga, Y., Ohnishi, M., Ohtsubo, E., Hattori, M., Oguma, K. : The genome sequence of *Clostridium botulinum* type C neurotoxin-converting phage and the molecular mechanisms of unstable lysogeny, *Proc Natl Acad Sci USA*, **102**, 17472~17477, 2005.
- 2) Oliva, M. A., Martin-Galiano, A. J., Sakaguchi, Y., Andreu, J. M. : Tubulin homolog TubZ in a phage-encoded partition system, *Proc Natl Acad Sci USA*, **109**, 7711~7716, 2012.
- 3) Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Yamamoto, Y., Nishikawa, A., Oguma, K. : Genomics of *Clostridium botulinum* group III strains, *Res. Microbiol.*, **166**, 318~325, 2015.
- 4) Nakamura, K., Kohda, T., Umeda, K., Yamamoto, H., Mukamoto, M., Kozaki, S. : Characterization of the D/C mosaic neurotoxin produced by *Clostridium botulinum* associated with bovine botulism in Japan, *Vet Microbiol.*, **140**, 147~154, 2010.

豚流行性下痢ウイルス感染による致死性を決定する遺伝子の同定

Determination of gene involved in mortality in piglets by PEDV infection

大 橋 誠 一・神 谷 亘*

(国立研究開発法人農業・食品産業技術研究機構動物衛生研究部門,

*大阪大学微生物病研究所感染症国際研究センター臨床感染症学研究グループ)

Seiichi Ohashi and Wataru Kamitani*

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

*Laboratory of Clinical Research on Infectious Diseases, Research Center for Infectious Disease Control, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

We generated recombinant porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) derived from the prototype CV777 strain, as well as chimeric PEDVs in which the original S gene are replaced with two different types of S-mutants by reverse genetics. Eighteen five-day-old piglets were randomly divided into three groups, with six piglets/group. Piglets inoculated with the rPEDV-CV777-NA type-S developed acute severe watery diarrhea within 1 dpi and subsequently developed anorexia, severe dehydration and lethargy at 2-4 dpi. Eventually, all piglets died by 7 dpi. Viral RNA in feces was detected as early as 2 dpi. The highest viral RNA shedding titer in feces was 10^8 - 10^9 genome equivalents/ml at 3-5 dpi. On the other hand, all the piglets inoculated with rPEDV-CV777 or rPEDV-CV777-INDELS type-S showed less severe diarrhea than piglets inoculated with the rPEDV-CV777-NA type-S and survived to the end of the experiment. Viral RNAs in feces were significantly increased at 2-4 dpi. The highest viral RNA shedding titers in feces were 10^7 - 10^8 genome equivalents/ml at 4-7 dpi. The viral RNA shedding in feces delayed compared with the piglets inoculated with rPEDV-CV777-NA type-S.

The results indicate that the S gene is an important determinant of PEDV virulence in piglets. We will, thus, attempt to further map the sequences in the S gene that are critical to virulence.

1. 目 的

2013年, わが国では7年ぶりに豚流行性下痢(PED)が発生し, その後流行はほぼ全国に拡大し, 養豚産業に甚大な被害を与えた。以後, PEDの発生件数は年々減少しているが, 今なお発生は続いている。その流行拡大をもたらした要因の

一つとして, 近年の流行ウイルス株は過去の流行ウイルス株と比べ, 外被タンパク質をコードするS遺伝子に変異をもつ株が複数種存在すること, また自然宿主である子豚を用いた感染実験において, それら変異株間において病原性が大きく異なることを示してきた¹⁻³⁾。しかしながら, これまでの感染実験で用いた株はいずれも野外症例由来

株であることから、病原性の相違にS遺伝子以外の他の遺伝子の影響が関与している可能性は否定できない。そこで、PEDウイルスにおいてリバーシジェネティクス技術を確立し、遺伝子の基本骨格はPEDウイルスの古典株であるCV777株であるが、外被タンパク質をコードするS遺伝子のみが異なる組換えPEDキメラウイルスを作製し、子豚への感染試験を通じて、S遺伝子が病原性を検定する因子であるか否かを検証する。

2. 方 法

2.1 組換えウイルス

元株となる組換えPEDウイルス (rPEDV-CV777) の感染性cDNAは古典株であるCV777株の全長ゲノムをBacterial Artificial Chromosome (BAC) を用いて作製した。さらに、組換えPEDキメラウイルスは、元株のS遺伝子を近年の流行株の代表株であり、子豚に対して致死性が高いと考えられている北米型 (NA type) 由来、またはS遺伝子に特異的な欠損と挿入を複数箇所有し、子豚に対して致死性が低いと考えられているINDELS型由来のS遺伝子に置換した2種類を作

製した (それらのウイルスをそれぞれrPEDV-CV777-NA type-S, rPEDV-CV777-INDELS type-Sと命名) (Fig. 1)。接種のためのウイルスはトリプシン添加Vero細胞で培養した。

2.2 豚への感染実験

元株および2種類の組換えPEDキメラウイルスを病原体に対して感受性が高い子宮切除摘出・初乳未摂取子豚 (5日齢, 6頭/群) に対してそれぞれ経口的に接種 (10^6 TCID₅₀/頭) し、接種後28日目まで子豚の感染動態, 特に死亡率について観察・比較した。ウイルス接種後から7日間, 糞便は毎日, 血液は2日おきに各個体から採取した。7日目以降は, 糞便, 血液ともに3-4日間隔で経時的に採取した。

2.3 リアルタイムRT-PCRによるウイルスRNAの定量解析

採取した糞便はリン酸緩衝液で希釈して20%乳剤を作製し, 遠心分離 ($3000 \times g$, 10分) により夾雑物を取り除いたうえで, 上清をRNA抽出に供した。また, 採取した血液は遠心分離 ($3000 \times g$, 10分) を行い, 血清のみを使用した。ウイルスRNAは市販のキット (QIAmp viral RNA mini

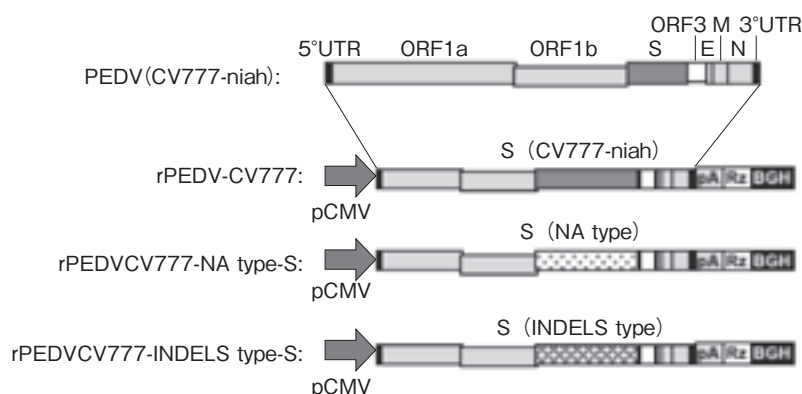


Fig. 1 Structure of recombinant PED viruses

Recombinant PED virus (rPEDV-CV777) carrying full-length genome of the CV777-niah strain, maintained in National Institute of Animal Health was generated using a BAC (bacterial artificial chromosome) system. This virus was modified to generate chimeric viruses (rPEDV-CV777-NA type-S and i rPEDV-CV777-INDELS type-S) in which the S gene is fully replaced with those of NA and INDELS types, respectively.

kit) を用いて、手順書に従って抽出した。抽出したウイルスRNAはPEDウイルスのN遺伝子をターゲットとしたプライマー・プローブセットならびにスタンダードを用いてリアルタイムRT-PCRで定量・解析した。

3. 結果と考察

rPEDV-CV777-NA type-Sはすべての個体が接種後1日目から重度の下痢を示し、2日目以降食欲不振、元気消失、脱水、体重減少、起立不能を呈し1週間以内に死亡した (Table 1)。一方、

Table 1 Summary of mortality and clinical signs in rPEDV-inoculated groups

* Half of numbers in each group necropsied at 2 or 5 days post-inoculation.

Groups	N *	Mortality [%]	Clinical signs				
			Diarrhea	Anorexia	Lethargy	Dehydration	Astasia
rPEDV-CV777	6	0 (0/3)	Mild	+	+	−	−
rPEDV-CV777-NA type-S	6	100 (3/3)	Severe	+	+	+	+
rPEDV-CV777-INDELS type-S	6	0 (0/3)	Mild or Moderate	+	+	−	−

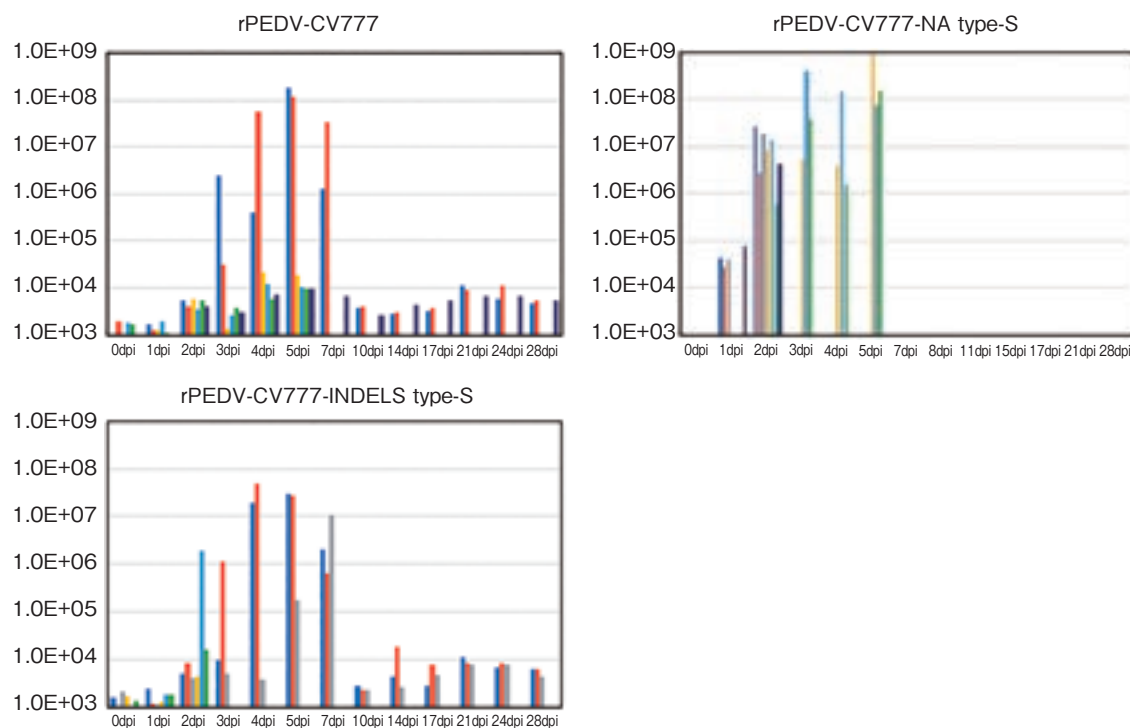


Fig. 2 Virus shedding in feces from piglets inoculated with the recombinant PEDV strain, rPEDV-CV777 and the S-chimeric PEDV strains, rPEDV-CV777-NA type-S and rPEDV-CV777-INDELS type-S. Data are genome equivalents/ml in individuals indicated in different colors as quantified at each time point by a real-time reverse-transcription quantitative PCR for the N gene. Three piglets from each group were necropsied at two days post-inoculation.

rPEDV-CV777 および rPEDV-CV777-INDELS type-Sはすべての個体が接種後2日目から食欲不振、元気消失とともに軽度あるいは中等度の下痢を示したが、接種後7日目から徐々に元気が回復し、観察期間を通じてすべての個体が生存した。

糞便におけるウイルスの排泄に関して、rPEDV-CV777-NA type-Sは接種後2日目から排泄量が急激に上昇して、その後3-5日目にピーク値に達し、死亡するまで高いウイルス排泄量を示した (Fig. 2)。一方、rPEDV-CV777およびrPEDV-CV777-INDELS type-Sは接種後2-4日目から排泄量が急激に上昇して、その後4-7日目にピーク値に達したが、10日目には急激に減少し、観察終了日まで低いウイルス排泄量を示した。

これらの結果は従来の野外分離株を用いた子豚の感染実験結果とほぼ一致していた。すなわち、近年の流行株に対するS遺伝子の解析を通じて見つかった北米型およびINDELS型はそれぞれ子豚に対して高い致死性および低い致死性を示すことが明らかとなった。このことから、PEDウイルスのS遺伝子は病原性を決める重要な因子であることが強く示唆された⁴⁾。

4. 要 約

PEDウイルスは元来RNAウイルスの中で大きいゲノムサイズ (約30Kbp) を有するため、本ウ

イルスのリバーシジェネティクスを確立することは困難であるとされていたが、ヒトコロナウイルスであるSARSコロナウイルス、MERSコロナウイルスでリバーシジェネティクスを確立した実績がある大阪大学微生物病研究所神谷准教授の協力を経て、本ウイルスのリバーシジェネティクスを確立することに成功した。この技術を用いて、遺伝子骨格は共通で、S遺伝子のみ近年の流行株由来に組み換えたPEDキメラウイルスを作製し、子豚への感染試験を通じて、S遺伝子が本ウイルスの病原性を決める重要な因子であることを証明した。

文 献

- 1) Suzuki, T., Murakami, S., Takahashi, O., Kadera, A., Masuda, T., Itou, S., Miyazaki, A., Ohashi, S., Tsutsui, T. : Molecular characterization of pig epidemic diarrhoea viruses isolated in Japan from 2013 to 2014, *Infect. Genet. Evol.*, **36**, 363~368, 2015.
- 2) Masuda, T., Murakami, S., Takahashi, O., Miyazaki, A., Ohashi, S., Yamasato, H., Suzuki, T. : Discovery of a new PEDV variant with a large deletion in the spike gene identified in domestic pigs, *Arch. Virol.*, **160**, 2565~2568, 2015.
- 3) Suzuki, T., Shibahara, T., Yamaguchi, R., Nakade, K., Yamamoto, T., Miyazaki, A., Ohashi, S. : Pig epidemic diarrhoea virus S gene variant with a large deletion non-lethal to colostrum-deprived newborn piglet, *J. Gen. Virol.*, **97**, 1823~1826, 2016.
- 4) Suzuki, T., Terada, Y., Enjuanes, L., Ohashi, S., Kamitani, W. : S1 subunit of spike protein from a current highly virulent porcine epidemic diarrhea virus is an important determinant of virulence in piglets, *Viruses*, **30**, 10, 467, 2018.

反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索

Investigation of the physiological markers indicating 'nausea' in domestic ruminants

青山 真人¹・燕山 由己人²

(¹宇都宮大学農学部生物資源科学科, ²宇都宮大学農学部応用生命化学科)

Masato Aoyama¹ and Yukihito Kabuyama²

(¹Department of Agrobiology and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University,

²Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University)

As well as pain or uncomfortable temperature, nausea is one of the most typical unpleasant experience. The clearest behavioral response to nausea is emesis (vomiting). While, some species, including ruminants, such as cattle, sheep and goats, don't possess the emetic reflex, thus there have been no reports investigating the nausea in domestic ruminants. Author of this report have been investigated the stress responses to road transportation in goats, and built the hypothesis that goats might experience nausea because some of them seemed to be sick during road transportation. The aim of this study is to find the physiological marker(s) for nausea in goats. Six Shiba goats were loaded onto a truck and transported for 60 min. Before 15 min the transportation start, each goats was given diphenhydramine (DH : one of the anti-motion sickness medication) administration, or saline (control for DH). Behavioral observation and the analysis of blood components were conducted. The data of the usual housed goats on other days were also corrected as the control for transportation. Road transportation induced 1) the decrease in the period spent in rumination, 2) the increase in the period spent in lying, and 3) the increase in the blood cortisol level. While, road transportation did not induced any changes in blood concentration of the thyroid hormones (triiodothyronine and thyroxine), nor oxytocin. DH administration reduced the time spent in rumination of usual housed goats, but did not induced any other behavioral and physiological changes both in housed nor transported goats. The comprehensive analysis of goats' plasma were conducted with the two-dimensional electrophoresis, but we still could not find any specific spots to transported goats. Further works are necessary to find specific components in the bloods of the transported animals, and other stimuli can induce nausea.

1. 目 的

「悪心」(吐き気, 気分が悪いこと)は, 「痛み」や「暑さ・寒さ」と同じく代表的な不快感の一つ

である。人を含めたいくつかの動物種において、悪心によって起こる最も明確な反応は「嘔吐」である。一方、嘔吐反射を持たず、嘔吐をしない動物種も少なくない(これらを「非嘔吐動物」とす

る)。非嘔吐動物には、齧歯目、兎、馬などが含まれる¹⁾。これら非嘔吐動物についての悪心の研究はほとんど行われていないが、齧歯目であるラットやマウスは例外的に悪心の研究に供試されている。これら齧歯目では、異食症（カオリンという瀬戸物の原料を摂食する異常行動）が嘔吐に代わる悪心の行動学的指標となると考えられている^{2, 3)}。一方、悪心経験時に特異的に起こる生理学的反応、特に血液中に現れる成分については、いまだ明確な知見が得られていない。

牛や羊、山羊などの反芻動物も非嘔吐動物である。そのため、反芻動物における悪心の研究はこれまで皆無に近い。一方、著者は山羊を反芻家畜のモデルとして家畜の輸送ストレスのメカニズムやその軽減法を研究してきた^{4, 5)}過程から、山羊は嘔吐をしないが、輸送中の様子から動揺病を発症している、つまり、輸送中に悪心を感じているのではないかと考えてきた。家畜が悪心を経験する可能性のある要因は、輸送だけでなく、感染症やカビ毒など多く存在する。そのため、反芻家畜が悪心を経験する可能性は確かめておく必要がある。本研究の目的は、反芻動物において悪心の生理学的指標を見つけ出すことである。特に今回は、トラック輸送を山羊に与え、行動と血中成分への影響について検討した。また、動揺病を軽減する作用が認められているジフェンヒドラミン（以下DH）の効果についても検討した。

2. 方 法

2.1 実験動物

実験にはシバ山羊（*Capra hircus*）6頭（オス4頭、メス2頭、2～7歳）を使用した。実験は、宇都宮大学動物実験委員会の承認（承認No. A18-0008）を得て、同大学動物実験等管理規程に従って行った。

2.2 輸送およびジフェンヒドラミンの投与

9：00～10：00の60分間、山羊を軽トラックの荷台に積載し、輸送した。各山羊に、以下の4種類の処置を行った：生理食塩水を投与して通常飼育（CS区）、DHを投与して通常飼育（CD区）、生理食塩水を投与して輸送（TS区）、DHを投与して輸送（TD区）。DHの投与は、ジフェンヒドラミン塩酸塩（シグマ-アルドリッチ社、D3630）を生理食塩水で60mg/mlとなるよう溶解し、これを山羊の体重1 kgあたりDH2.0mgとなる量を筋肉内注射した。生理食塩水を投与する実験区においては、同量の生理食塩水を投与した。DHまたは生理食塩水の投与は輸送開始15分前（8：45）とした。

2.3 行動

9：00～10：00の間に反芻に費やしていた時間および伏臥位姿勢であった時間を計測し、実験区間で比較した。得られた結果に1を加えた数値を常用対数変換し、二元配置分散分析（輸送×DH投与）により、実験区間の比較を行った。

2.4 血中成分の分析

8：30（輸送30分前）、9：00（輸送開始直前）、輸送開始から15分ごと（9：15、9：30、9：45、10：00）、輸送終了後30分後（10：30）と60分後（11：00）の計8回、頸静脈より血液を採取し、遠心分離で得た血漿を-30℃で保存した。

ストレスの生理的マーカーとして一般に用いられている血中のコルチゾル（Cor）、甲状腺ホルモン（トリヨードチロニン：T3、チロキシン：T4）、オキシトシン（Oxt）の各濃度を測定した。

さらに、血漿からアルブミンを除去した後、等電点と分子量に従った二次元電気泳動を行い、輸送による血中成分の変化を網羅的に解析することを試みた。

血中のCor濃度については4頭の山羊で測定し、反復測定二元配置分散分析（時間×処置）に

より比較した。血中のT3, T4, Oxtの各濃度および二次元電気泳動の結果については、今回は2例ずつしか検討しなかったため、統計解析は行わなかった。

3. 結果と考察

3.1 行動

行動の結果をTable 1に示す。輸送中はTS区、TD区いずれにおいても反芻はまったく観察されなかった。統計解析の結果、輸送中に反芻に費やした時間は、通常飼育時（CS区およびCD区）のそれと比較し、有意に短かった。反芻は、動物がストレスを受けている状況下では起こり難いことが報告されており⁶⁾、輸送によるストレスによって反芻が抑制されたものと考えられた。一方、通常飼育条件下で比較すると、CD区においてはCS区よりも有意に反芻時間が少なく、DHは反芻を抑制する効果があることが示された。

伏臥位姿勢を取っていた時間について、統計的に有意な差ではなかったが、輸送中は通常飼育時よりも伏臥位姿勢が増加する傾向にあった ($p=$

0.07)。通常、伏臥位姿勢は休息中によく観察されるため、通常飼育であったCS区およびCD区において観察された伏臥位姿勢については、休息行動の一環と考えられた。一方、輸送時に観察された伏臥位姿勢については、通常飼育時とは異なる機能を持つものと考えられた。山羊に繰り返し輸送を経験させると、輸送開始から伏臥位姿勢を取るまでの時間が短くなり、個体によってはエンジンをかけるとトラックが動き出す前に伏臥位姿勢を取ろうとすることが観察されている⁵⁾。輸送中の山羊の伏臥位姿勢は休息ではなく、不規則な加速度の影響を緩和する機能があるものと推察できる。一方、CS区、CD区の間には伏臥位姿勢を取っていた時間に違いはなく、DHは伏臥位を取る行動には影響が薄いと考えられた。

3.2 血中コルチゾル濃度

血中Cor濃度は、TC区、TD区のいずれにおいても輸送によって顕著に増加した (Fig. 1A)。血中Cor濃度の増加は、あらゆるストレスの生理的マーカーとして使われており、輸送により血中Cor濃度が顕著に増加することは牛⁷⁾、馬⁸⁾、山

Table 1 The effects of road transportation and diphenhydramine administration in goats

Treatment	Total periods of Ruminantion (sec)	Total periods of Lying position (sec)
CS	1195 ± 372 (351-2403)	411.3 ± 411.3 (0-2468)
CD	424.7 ± 265 [†] (0-1543)	59.0 ± 59.0 (0-354)
TS	0.0 ± 0.0* (0-0)	811.3 ± 597.9# (0-3741)
TD	0.0 ± 0.0* (0-0)	507.7 ± 283.1# (0-1705)

Each data represents the averaged ± SE and (minimum value-maximum value) of six goats. CS : control (usual housing) and saline administration, CD : usual housing and diphenhydramine administration, TS : transportation and saline administration, TD : transportation and diphenhydramine administration.

* or # : Significant or tendency of difference from non-transported treatment (CS or CD) (* : $p < 0.05$, # : $p = 0.07$). † : Significant difference from saline administrated treatment (CS) ($p < 0.05$), Two way ANOVA.

羊^{4, 5)}など、あらゆる家畜で報告されている。一方、TD区とTC区間の血中Cor濃度に統計的な有意差はなかった。今回、輸送によって山羊が動揺病を発症したか否かは定かではないが、仮に動揺病が幾分か軽減されたとしても、輸送によるストレス刺激はそれだけとは考え難く、他の要因に起因するストレスによりTD区においても血中Cor濃度が顕著に増加したのかも知れない。CD区とCS区の血中Cor濃度は、投与前と比べ顕著な変化はなく、また、両区間に有意な差はなかった。DHの投与は反芻の抑制という行動に変化をもたらしたが、DH投与自体はストレスとならないことが考えられた。

3.3 血中甲状腺ホルモン濃度

血中の甲状腺ホルモン濃度の結果をFig. 1Bおよび1Cに示す。いずれの実験区においても、

T3, T4ともに明確な変化はなかった。家畜の輸送による甲状腺ホルモンの変化については、過去にも報告があるが、その結果は一定していない。Ferlazzoらによる総説では、馬においては輸送によって血中のT3, T4濃度がいずれも増加したが、牛においてはT3のみが増加したことを報告している⁹⁾。一方、Tajikiらはカシミア山羊において、輸送によりT3, T4いずれも増減がなかったと報告している¹⁰⁾。今回、我々はシバ山羊で初めて輸送による血中甲状腺ホルモン濃度の影響を検討したが、同じ山羊を用いているTajikiらの報告に類似したものとなった。甲状腺ホルモンは、年齢や季節によって分泌様式が異なることが知られており、今回の結果だけで結論を下すことは早計かも知れないが、山羊においては輸送によって甲状腺ホルモンは影響を受けないことが示唆された。

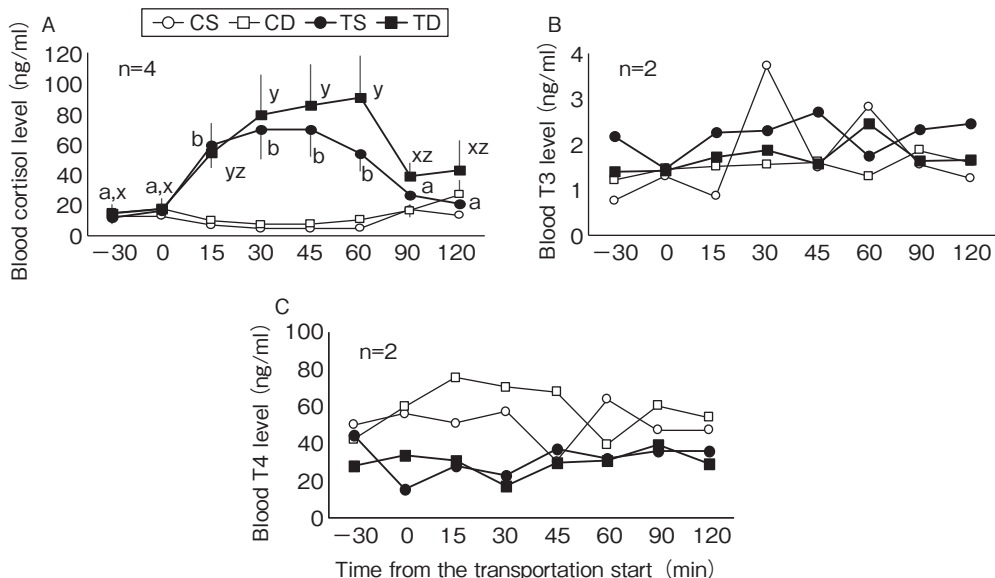


Fig. 1 The effects of road transportation and diphenhydramine (DH) administration on blood levels of cortisol (A), triiodothyronine (T3) (B) or thyroxine (T4) (C). Road transportation was conducted between 0 and 60 min. Each data represents the averaged $\pm$ SE of four or two goats. CS : control (usual housing) and saline administration, CD : usual housing and diphenhydramine administration, TS : transportation and saline administration, TD : transportation and diphenhydramine administration.

'a, b' or 'x, y, z' : Having no same letter represents the significant difference among each time period within TS or TD treatments, respectively ($p < 0.05$, repeated measures two way ANOVA and Tukey's test).

3.4 血中オキシトシン濃度

血中Oxt濃度については、今回は輸送45分後(9:45)のみを測定し、実験区間の比較を行った。2頭のみの結果ではあるが、CS区とTS区の比較から、輸送によって血中Oxt濃度に顕著な変化は観察できなかった(Fig. 2)。また、CS区とCD区、またはTS区とTD区の比較より、DH投与による変化も、見られなかった。これまで、著者が知る限りでは、輸送に伴う血中Oxt濃度の動態を検討した報告はない。人や犬など嘔吐動物においては、血中のアルギニンバソプレシン (AVP) 濃度が嘔吐に伴って増加することから、これが悪心の生理的マーカーになる可能性が指摘されている¹⁾。しかし、非嘔吐動物であるラットにおいては、悪心を引き起こす刺激を与えても血中AVP濃度は増加せず、代わりにOxt濃度が増加することが報告されており¹¹⁾、ラットでは血中のOxt濃度が悪心の生理的マーカーになる可能性が示唆されている。しかし、少なくともトラック輸送によっては山羊のOxtは影響を受けないことが示唆された。

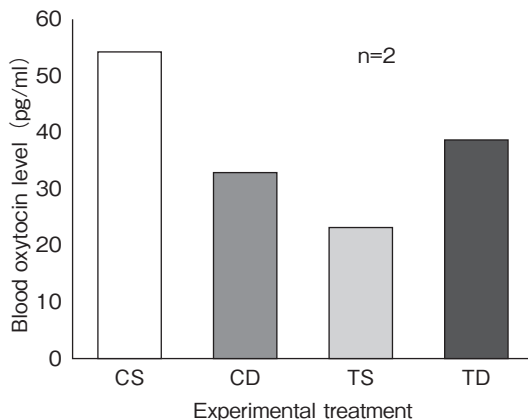


Fig. 2 The effects of road transportation and diphenhydramine administration on blood levels of oxytocin. Blood samples at 45 minutes after the road transportation starts were analyzed. Each data represents the averaged of two goats. See legend of Fig. 1 for the explanation of each treatment.

3.5 二次元電気泳動

山羊の血液をアルブミン除去し、分子量に従って電気泳動を行った例をFig. 3に示す。17.2以下~229.3kDaの間に複数のバンドが確認でき、血漿量100 μ lにおいてのみ確認できたバンドも見られた。この結果を受けて、血漿100 μ lについて、二次元電気泳動を行った。Fig. 4に、例として1個体(2歳のオス)の各実験区の泳動結果を示す。複数のスポットが確認できたが、その数は少なく、実験区間の間で明確な違いも確認できなかった。現在、感度を上げて、さらに研究を進めている。

3.6 まとめ

今回の実験からは、Cor以外に、輸送に伴って変化する血中成分を発見するところまで至らなかった。今後、検討する成分を増やすとともに、輸送以外の、悪心を引き起こす可能性のある刺激の影響や、悪心を起こさないストレス(例えば心理ストレスなど)の影響を比較し、悪心に特異的な血中成分の探索を継続する。

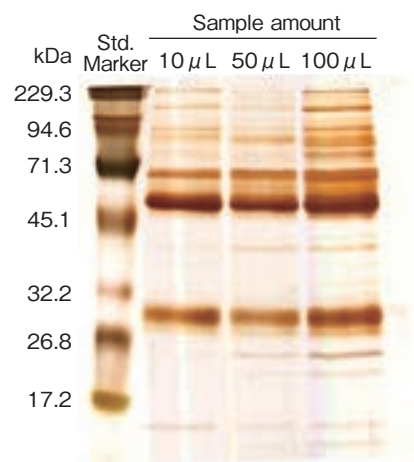


Fig. 3 A result of the electrophoresis of goat's plasma. This analysis was conducted to determine the optimal condition.

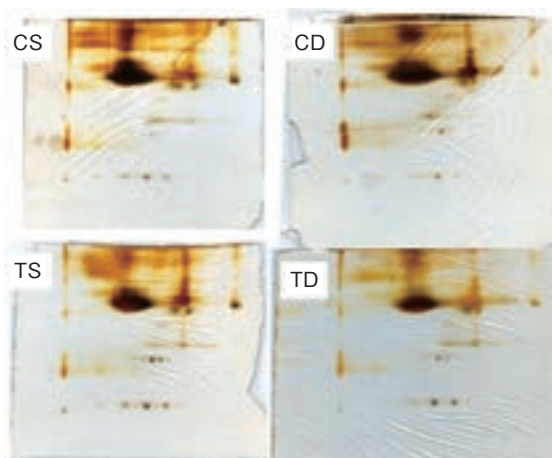


Fig. 4 The results of the two-dimensional electrophoresis of one male goat's plasma. Each treatment was represented on the upper corner of each panel. See legend of Fig. 1 for the explanation of each treatment.

4. 要 約

牛や山羊などの反芻動物は嘔吐をしないため、「悪心」（気分が悪いこと）を経験するとは考えられてこなかった。しかし、著者は山羊を用いて家畜の輸送ストレスを研究してきた経験から、輸送により山羊が「動揺病」（乗り物酔い）を発症している、すなわち、悪心を感じているものと考えに至った。本研究では、反芻家畜における悪心に特異的な生理的マーカーを探索することを最終目的として、山羊にトラック輸送を与え、血中に現れる成分の変化を検討した。また、動揺病軽減効果のあるジフェンヒドラミン（DH）の効果についても検討した。輸送によって山羊に起こった変化は、1）反芻が抑制された、2）伏臥位姿勢でいる時間が長くなる傾向にあった、3）ストレスマーカーとなる血中のコルチゾル濃度が増加した、であった。一方、輸送により、血中の甲状腺ホルモン濃度およびオキシトシン濃度は変化しなかった。二次元電気泳動を試みたが、現時点では輸送に特異的な物質の変化は見つかっていない。今回の実験では、DHの投与は通常飼育時の反芻

を抑制したが、それ以外は輸送時、通常飼育時のいずれにおいても明確な変化をもたらさなかった。

文 献

- 1) Andrews, P. L. R., Horn, C. C. : Signals for nausea and emesis : implications for models of upper gastrointestinal diseases, *Auton Neurosci*, **125**, 100~115, 2006.
- 2) Takeda, N., Hasegawa, S., *et al.* : Pica in rats is analogous to emesis : an animal model in emesis research, *Pharmacol Biochem Behav*, **45**, 817~821, 1993.
- 3) De Jonghe, B. C., Lawler, M. P., *et al.* : Pica as an adaptive response : Kaolin consumption helps rats recover from chemotherapy-induced illness, *Physiol Behav*, **97**, 87~90, 2009.
- 4) Aoyama, M., Negishi, A., *et al.* : Short-term transportation in a small vehicle affects the physiological state and subsequent water consumption in goats, *Anim Sci J*, **79**, 526~533, 2008.
- 5) 佐怒賀琴美, 青山真人他 : トラック輸送の経験がヤギの輸送に対する反応に及ぼす影響, *Anim Behav Manage*, **52**, 123~133, 2016.
- 6) Herskin, M. S., Munksgaard, L., *et al.* : Effects of acute stressors on nociception, adrenocortical responses and behaviour of dairy cows, *Physiol Behav*, **83**, 411~420, 2004.
- 7) Ishiwata, T., Uetake, K., *et al.* : Steer stress levels during long distance transport throughout the year in Japan, *Anim Sci J*, **79**, 510~517, 2008.
- 8) Friend, T., Martin, M. T., *et al.* : Householder, D.

- D., Bushong, D. M. : Stress responses of horses during a long period of transport in a commercial truck, *J Am Vet Med Assoc*, **212**, 838~844, 1998.
- 9) Fazio, E., Medica, P., *et al.* : Effect of long-distance road transport on thyroid and adrenal function and haematocrit values in Limousin cattle : influence of body weight decrease, *Vet Res Commun*, **29**, 713~719, 2005.
- 10) Tajiki, J., Nazifi, S., *et al.* : The influence of transportation stress on serum cortisol, thyroid hormones, and some serum biochemical parameters in Iranian cashmere (Raini) goat, *Veterinarski Arhiv*, **86**, 795~804, 2016.
- 11) Verbalis, J. G., McHale, C. M., *et al.* : Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats, *Behav Neurosci*, **100**, 466~475, 1986.

地方病性牛白血病の簡易鑑別診断法の開発と 若齢発症牛の実態調査への応用

Development of a simple diagnostic criteria for enzootic bovine leukemia
and survey of juvenile bovine leukemia in Japan

岡 川 朋 弘

(北海道大学大学院獣医学研究院)

Tomohiro Okagawa

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University)

Bovine leukemia is a malignant lymphoma in cattle and is classified into enzootic bovine leukemia (EBL) and sporadic bovine leukemia (SBL). EBL is a cancer of bovine B cells infected with bovine leukemia virus (BLV). On the other hand, SBL is B-cell or T-cell type lymphoma, which is not associated with BLV infection. Recently, BLV infection is widely spread in most farms throughout Japan. Accordingly, EBL cases have been increased dramatically in Japan. Previously, it is believed that EBL is occurred in animal more than three years old because more than three years are required to develop tumors in cattle after getting infected the virus. However, recent several studies reported juvenile cases of EBL onset in animal less than three years old. These atypical cases add confusion to differential diagnosis of bovine leukemia. Thus, this study is designed to establish a simple guideline for diagnosis of bovine leukemia and survey occurrence of enzootic bovine leukemia in juvenile cattle around Japan.

In this study, 104 cases of bovine leukemia occurred in Japan during 2013–2019 were diagnosed by expression analysis of lymphocyte markers, quantification of BLV proviral load, and clonality analysis of BLV-infected cells. Out of tested samples, 80 samples (76.9%) were diagnosed as EBL. Among 54 cases of juvenile animals less than three years old, 39 cases (72.2%) were confirmed as EBL, including 23 cases of Japanese black breed, which is expected to be susceptible to EBL onset. Additionally, juvenile EBL cases were found in all of the surveyed areas in this study. Taken together, this study proposes a simple guideline for diagnosis of bovine leukemia and shows that EBL onset in juvenile cattle commonly occurs in several areas around Japan.

1. 目 的

牛白血病は牛に発生する悪性リンパ腫で、牛白血病ウイルス (bovine leukemia virus ; BLV) の感染に起因する地方病性牛白血病 (Enzootic

bovine leukemia ; EBL) と、BLV感染以外の原因に起因する散発性牛白血病 (Sporadic bovine leukemia ; SBL) に大別される。EBLはBLVが牛のB細胞に持続感染することによって引き起こされる、B細胞性白血病である。一方、SBLは臨床

学的に子牛型、胸腺型、皮膚型に分類されるB細胞性またはT細胞性の白血病であり、BLVは発症には関わらない。SBLは3歳以下の子牛や育成牛から成牛に至るまで幅広い年齢で発症が認められる。近年、日本国内の農場ではBLV感染が蔓延しており、2009～2011年の血清調査によると全国の子牛の28.7%、乳牛の40.9%がBLV陽性である¹⁾。BLVの蔓延に伴い、国内でのEBLの発生は急増しており、2017年の牛白血病発生数は20年前の約35倍に達している²⁾。

BLV感染からEBL発症までには通常3年以上を要するため、EBLは3歳以上の成牛に発生すると言われており、実際の疫学調査によるとEBLの好発年齢は5～7歳である³⁾。しかし近年、2歳以下の子牛や肥育牛におけるEBLの発症例が日本国内で報告されている^{4～7)}。ただしこれらは、EBLの若齢発症例について個別に報告したものであり、特定の地域で継続的に調査がなされたことはなく、その発生状況の実態は明らかにされていない。

現在、牛白血病の鑑別診断はさまざまな機関で実施されているが、診断手法や診断基準が統一されていないため、曖昧もしくは不適切な診断基準が用いられ、正しい鑑別診断がなされない場合がある。特に、若齢牛において発生したEBLや、BLV感染牛に偶発的に発生したB細胞性SBLなどは、典型的なEBL症例とはかけ離れており、必要な検査項目を正しく把握して鑑別診断を進めていかなければならない。

このような状況を改善するため、我々は以前、国内の牛白血病検体について18項目を解析し、EBLとSBLを明確に鑑別診断する基準を報告した⁶⁾。この知見を基に本研究では、牛白血病の鑑別診断に必要な最小限の項目のみを解析し、簡易的な鑑別診断基準を確立した。さらに本研究では、日本国内の複数地域において、若齢牛での

EBLの発生状況を調査した。

2. 方 法

2.1 材料

2013～2019年に国内の農場においてリンパ腫の症状を呈した牛104例について、末梢血から末梢血単核球を、各種臓器の腫瘍部から組織由来細胞を分離した。分離した細胞からWizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) を用いてDNAを抽出した。

2.2 リンパ球マーカー解析

腫瘍検体の主な構成細胞を判定するために、B細胞およびT細胞の特異的マーカーをフローサイトメトリーで検出した。まず、細胞と10%ヤギ血清 (Thermo Fisher Scientific) 加PBSと室温で15分間反応させ、検出抗体の非特異的反応を阻害した。次に、Fixable Viability Dye eFluor780 (Thermo Fisher Scientific) を用いて死細胞を染色し、FOXP3 Fix/Perm Buffer Set (BioLegend) を用いて細胞の固定ならびに細胞膜透過処理を行った。さらに、細胞をAlexa Fluor647標識抗CD79aマウス抗体 (Bio-Rad ; HM57) およびAlexa Fluor488標識抗CD3ラット抗体 (Bio-Rad ; CD3-12) と4℃で20分間反応させた。そして、フローサイトメーターFACS Verse (BD) で染色した細胞を解析した。

2.3 BLVプロウイルス量測定

抽出したDNA中のBLVプロウイルス量を測定するため、Cycleave PCR Reaction Mix SPおよび牛白血病ウイルス検出用Probe/Primer/Positive control (Takara Bio) を用いて、LightCycler480 System II (Roche) でリアルタイムPCRを行った。DNA濃度は分光光度計Nanodrop 8000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

2.4 BLV感染細胞クローナリティ解析

腫瘍検体に含まれるBLV感染細胞のクローナ

リティを解析するため、既存のインバースPCR (iPCR) 法⁸⁾に改変を加えて実施した。抽出したDNAを*Bcl*II (New England Biolabs) で切断し、エタノール沈殿により精製した。次に、DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Takara Bio) を用いて遺伝子断片をセルフライゲーションさせ、環状DNAを得た。その後、各検体を96℃で1分間処理した後、BLVプロウイルスのLTRを標的としたプライマー-BMM-F (5'-CAGAAGCGTTCTTC TCCTGAGA-3') およびBMM-R (5'-TTA TCA GCA GGT GAG GTC AGC A-3') およびTaKaRa Ex Taq (Takara Bio) を用いてPCRを行った。PCR反応は、初回の熱変性を95℃、1分間行い、熱変性95℃、30秒間、アニーリング61℃、30秒間、および伸長反応72℃、3分間を50サイクル繰り返し、最終伸長反応を72℃、7分間行った。その後、増幅された遺伝子断片を2%アガロース-TBEゲルを用いた電気泳動で確認した。

3. 結果と考察

本研究では、牛白血病の鑑別診断に必要な最小限の検査項目として、リンパ球マーカー解析、BLVプロウイルス量測定、BLV感染細胞クローナリティ解析を設定し、簡易的な鑑別診断基準を確立した (Fig. 1)。

まず、リンパ球マーカー解析では、B細胞あるいはT細胞のマーカーとしてCD79aおよびCD3を選抜し、腫瘍細胞におけるマーカー発現を解析した。解析した104検体のうち、B細胞性 (CD79a⁺) の腫瘍は90例、T細胞性 (CD3⁺) の腫瘍は6例、その他表現型 (CD79a⁻CD3⁻) の腫瘍 (骨髄性白血病など) は8例であった (Table 1)。ここで、T細胞性の腫瘍はT細胞性SBL (T-SBL) と診断した。

次に、B細胞性の腫瘍について、BLVプロウイルス量を測定した。調べたB細胞性腫瘍90検体のうち85検体でプロウイルスが検出された。BLV

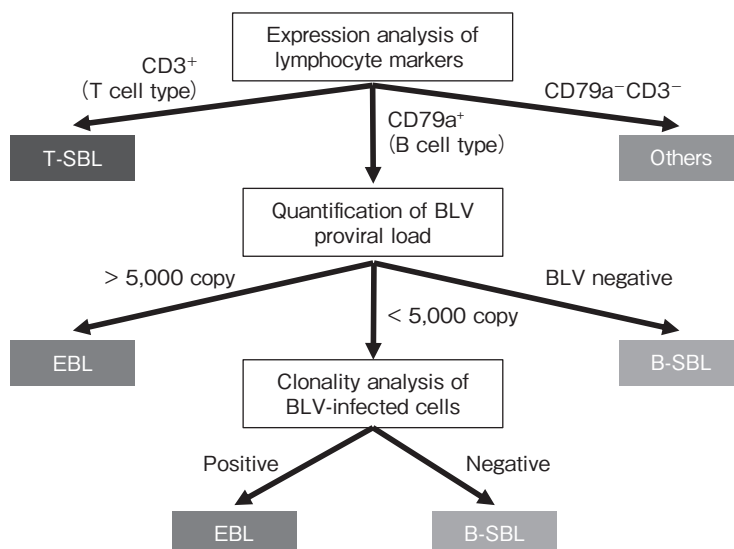


Fig. 1 Flowchart of differential diagnosis of bovine leukemia.

Clinical samples of bovine leukemia were diagnosed by expression analysis of lymphocyte markers, quantification of BLV proviral load, and clonality analysis of BLV-infected cells.

Table 1 Diagnostic result of bovine leukemia cases in this study.

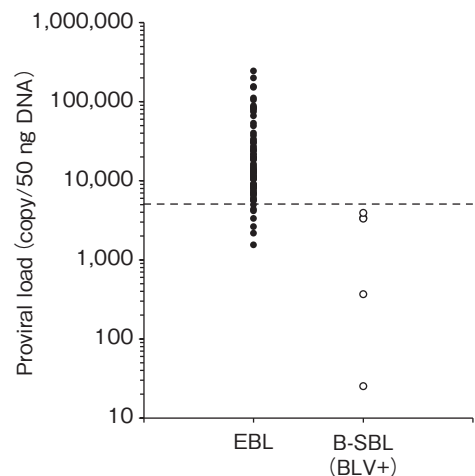
	EBL	B-SBL	T-SBL	Others	Total
BLV+ (> 5,000 copy)	73	—	—	—	73
BLV+ (< 5,000 copy)	7	5	—	—	12
BLV —	—	5	—	—	5
Not tested	—	—	6	8	14
Total	80	10	6	8	104

陰性の5検体は、B細胞性SBL (B-SBL) と診断した (Table 1)。過去の研究によると、EBLの腫瘍化したリンパ節では、プロウイルス量が5,000copy/50 ng DNAを超えていると報告されている⁹⁾。そこで本研究でも、プロウイルス量が5,000copy/50 ng DNA以上の73検体は、EBLと診断した (Table 1)。

さらに、プロウイルス量が5,000copy/50 ng DNA未満の12検体については、BLV感染細胞クローナリティ解析を行った。EBLでは、プロウイルスが宿主DNAに挿入された単一あるいは少数のBLV感染細胞が腫瘍化する。この特徴を利用して、iPCR法を用いて腫瘍検体におけるプロウイルス挿入部位のクローナリティ、すなわちBLV感染細胞のクローナリティを調べることで、EBLとBLV感染牛において偶発的に発生したB-SBLを鑑別した。その結果、12検体中7検体がiPCR陽性であり、EBLと診断された (Table 1)。一方で、残りの4検体については、プロウイルスは陽性だがiPCRが陰性で、B-SBLと診断した (Table 1)。これらの検体におけるプロウイルス量は、iPCR陽性の7検体では1,543～4,962copy/50 ng DNA、iPCR陰性の4検体では25～3,368copy/50 ng DNAであった (Fig. 2)。このように、プロウイルス量5,000copy/50 ng DNA未満の検体については、iPCR法を診断に取り入れることによりEBLとB-SBLの鑑別が可能であった。最終的に、診断した104例のうち、EBLは80例 (76.9%)、B-SBLは10例 (9.6%)、T-SBLは6例 (5.8%)、

その他は8例 (7.7%) であった (Table 1)。

次に、簡易的な鑑別診断基準に基づく臨床検体の診断結果を用いて、地域A～Hにおいて2013～2019年に発生した症例104例について、牛白血病ならびに若齢EBLの発生状況を精査した。若齢発症例を中心に検体を収集したため、若齢牛 (2歳以下) と成牛 (3歳以上) で発症数や割合を直接比較することはできないが、若齢牛における牛白血病54例のうち、EBLは39例 (72.2%)、B-SBLは5例 (9.3%)、T-SBLは5例 (9.3%)、その他は5例 (9.3%) であった (Fig. 3A)。一方、成牛における発生した牛白血病49例のうち、EBLは40

**Fig. 2** BLV proviral load in EBL and B-SBL occurred in BLV-infected cattle.

BLV proviral loads were quantificated in tumor samples of B-cell leukemia, including EBL ($n=80$) and B-SBL ($n=10$). Five of B-SBL samples were positive for BLV infection. Dot line represents 5,000 copy/50 ng DNA of proviral load.

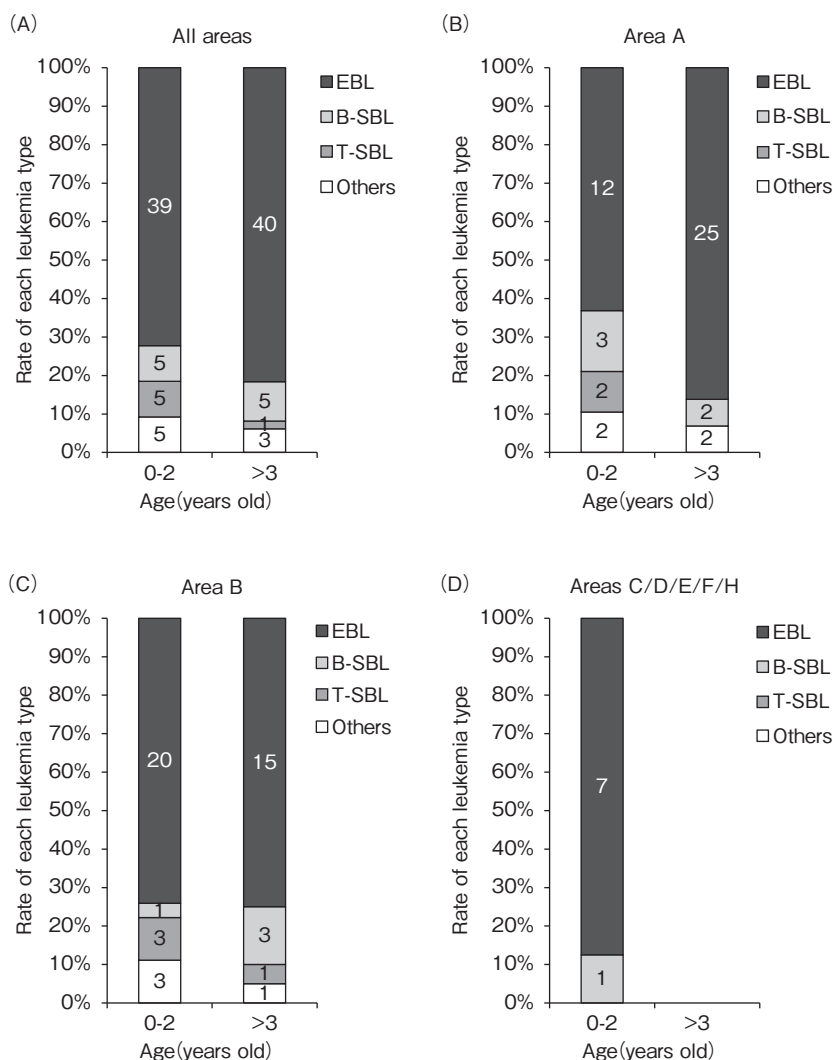


Fig. 3 Rate of each leukemia type in juvenile and adult cattle.

Rates of each leukemia type were compared between juvenile (0-2 years old) and adult cattle (> 3 years old) in (A) all areas, (B) area A, (C) area C, and (D) areas C-H. Percentages of each leukemia type were shown in vertical axis. Numbers in the bars represent case number of each leukemia type.

例 (81.6%), B-SBLは5例 (10.2%), T-SBLは1例 (2.0%), その他は3例 (6.1%) であった (Fig. 3A)。さらに、地理的に離れた地域AおよびBのいずれにおいても、若齢牛におけるEBL発症例が多く認められた (Fig. 3B, C)。加えて、症例数は少ないが地域C～Hにおいても1～2例ずつ若齢牛におけるEBLが認められた (Fig. 3D)。

最後に、EBL発症牛の品種を比較した。若齢

EBLのうち、ホルスタイン種が8例 (20.5%), 黒毛和種が23例 (59.0%), 交雑種が8例 (20.5%) だった (Fig. 4)。一方、成牛のEBLの内訳は、ホルスタイン種が21例 (52.5%), 黒毛和種が16例 (40.0%), 交雑種が1例 (2.5%) だった (Fig. 4)。この結果から、特に黒毛和種において若齢EBLが発生しやすい傾向にあると推測される。ただし、肉用牛である黒毛和種と乳用牛であるホル

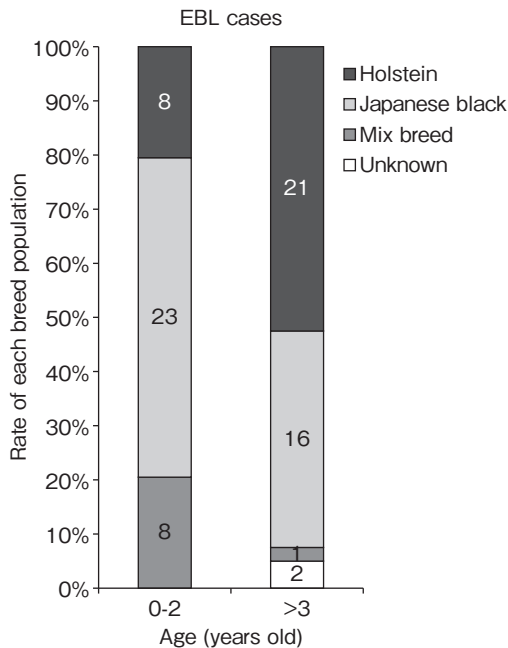


Fig. 4 Rate of each breed population in EBL cases.
Rates of each breed population in EBL cases were compared between juvenile (0-2 years old) and adult cattle (> 3 years old). Percentages of each breed population were shown in vertical axis. Numbers in the bars represent case number of each breed population.

スタイン種（雌）では飼養期間や飼養形態が大きく異なるため、この結果が品種間の遺伝的背景の違いに起因しているか、飼養方法の違いによる影響を受けているのかについては、さらなる検証が必要である。

本研究では、牛白血病の簡易的な鑑別診断基準を確立し、その有用性を示した。さらに、日本国内における牛白血病の発生状況を調査し、若齢EBLが日本国内の広い地域で発生していることが示唆された。今後はEBL若齢発症検体に関して、腫瘍細胞における網羅的遺伝子発現解析やBLVのウイルス株の違いなどを解析し、若齢牛におけるEBL発症メカニズムを探っていきたい。

4. 要 約

牛白血病は牛に発生する悪性リンパ腫で、牛白血病ウイルス（BLV）の感染に起因するB細胞性の地方病性牛白血病（EBL）と、BLV感染以外の原因に起因するB細胞性またはT細胞性の散発性牛白血病（SBL）に大別される。近年、日本国内の農場ではBLV感染が蔓延しており、それに伴い国内でのEBLの発生は急増している。これまでは、EBLは3歳以上の成牛に発生すると言われてきた。しかし、2歳以下の若齢牛におけるEBL発症が日本国内で近年報告されている^{4~7)}。このように非典型的な症例が散見されるようになり、牛白血病の鑑別診断は一層複雑になりつつある。そこで本研究では、牛白血病の簡易的な鑑別診断基準を確立し、さらに日本国内の複数地域において若齢牛でのEBLの発生状況を調査した。

本研究では、リンパ球マーカー解析、BLVプロウイルス量測定、BLV感染細胞クローナリティ解析を検査項目として設定し、2013~2019年に発生した104例の牛白血病症例について鑑別診断を行った。診断した104例のうちEBLは80例（76.9%）であった。特に、2歳以下の若齢牛では、54例のうち39例（72.2%）がEBLであった。このうち、黒毛和種は23例（59.0%）と半数以上を占めており、黒毛和種において若齢EBLが発生しやすい傾向にあることが示唆された。加えて、今回調査したすべての地域で若齢EBL症例が確認された。このように本研究では、牛白血病の簡易的な鑑別診断基準を確立し、その有用性を示した。さらに、日本国内における牛白血病の発生状況を調査し、日本国内のさまざまな地域において若齢EBLが発生していることを明らかにした。

文 献

- 1) Tsutsui, T., *et al.* : *Prevent. Vet. Med.*, **124**, 96～101, 2016.
- 2) 前澤誠希ら : 産業動物臨床医誌, **6**, 161～164, 2016.
- 3) Oguma, K., *et al.* : *Virus Res.*, **233**, 120～124, 2017.
- 4) Nishimori, A., *et al.* : *Clin. Vacc. Immunol.*, **24**, e00067-17, 2017.
- 5) Maezawa, M., *et al.* : *Jpn. J. Vet. Res.*, **66**, 209～213, 2018.
- 6) Murakami, K., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123～1126, 2013.
- 7) 農林水産省ホームページ : 監視伝染病発生状況の累年比較 (届出伝染病), http://www.aff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/attach/pdf/kansi_densen-95.pdf
- 8) Murakami, H., *et al.* : *Virus Res.*, **156**, 107 ～ 112, 2011.
- 9) Somura, Y., *et al.* : *Arch. Virol.*, **159**, 2693～2697, 2014.

ワイン搾汁残渣タンニンを利用したラム肉パストラルフレーバー低減技術の確立

Establishment of reducing technology for pastoral flavor of lamb meat
using tannin in wine pomace

上 田 宏一郎

(北海道大学大学院農学研究院)

Koichiro Ueda

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

This study evaluated effects of supplementation with red wine pomace for fattening sheep under grazing system on body weight gain and pastoral flavor source chemicals of meat. In experiment 1, effect on digestibility and rumen fermentation were assessed for red wine pomace when sheep were supplemented at 200 g/day indoor feeding. Digestibility decreased for crude protein but increased for crude fat. However, the supplementation did not affect rumen fermentation parameters. In experiment 2, twelve lamb were assigned to two treatments : control (CTLG) and red grape wine pomace supplementation (RGPG) of 100 g/day under grazing system. Body weight gain increased for RGPG. Concentration of branched chain fatty acid, neophthadiene, and indole in muscle tissue which all were source of pastoral flavor decreased for RGPG, but in fat tissue such decrease was not observed. Thus, the results clearly showed that 100 g/day red wine pomace supplementation for fattening lambs under grazing system was appropriate to increase body weight gain as well as to reduce pastoral flavor in lamb meat.

1. 目 的

草食家畜の放牧飼育は、生産者と消費者の双方にとって利益となる生産方式である。放牧飼養では、家畜と草地の間の物質循環機能を生かし自給牧草を最大限利用するため、穀物の国際価格の変動に左右されることなく低コストで畜産物を生産できる。また、家畜に適度な運動と自由な行動を発現させることから、家畜の健全性と福祉性を高め、生産物の消費者に対する印象と安心感を向上させる。しかし、放牧飼育により生産した乳や肉

は、畜舎内で穀類を多給する飼育方式によるものとは異なった味や香りを持つことが明らかとなっている。

肉用仔羊を放牧飼育により生牧草を多給して肥育すると、ラム肉のパストラルフレーバーが高まることが知られている。パストラルフレーバーとは食肉から発生する糞臭、樟脳臭、動物臭、農場臭などの総体であり、とくに日本人が嫌悪する香りであることが既往の研究により報告されている^{1, 2)}。パストラルフレーバーの原因成分は、飼料アミノ酸のルーメン内および動物体内の代謝物

にあると報告されている³⁾。具体的には、インドール、スカトール（糞臭、樟脳臭、農場臭）、フェノール（農場臭、樟脳臭）、側鎖中鎖脂肪酸（ヒツジ臭）、硫化物、メルカプタン、チオール（動物臭）などがあげられる。放牧肥育では摂取する生草のタンパク質含量が非常に高いため、タンパク質の摂取量が増加し、その結果アミノ酸の代謝物も多く生成される。これにより、仔羊を放牧肥育するとラム肉のパストラルフレーバーが高まると考えられている。

反芻動物へのタンニンの補給はルーメン内でのタンパク質分解を抑制することが知られている。したがって、放牧肥育仔羊へタンニンを補給することにより、ルーメン内での遊離アミノ酸生成を低減し、肉中のパストラルフレーバー原因成分の生成を抑制できる可能性がある^{4,5)}。申請者は、タンニンを多く含有する補助飼料としてワイン搾汁残渣に着目した。近年、国産ワインの生産量が増えているが、搾汁残渣（ブドウの果皮、種子）はほとんどが廃棄されている現状にあり、その有効利用が求められている。

本研究では、ワイン搾汁残渣タンニンを利用したラム肉パストラルフレーバー低減技術を確立するため、放牧肥育仔羊生産におけるワイン搾汁残渣の適正な給与量を明確にすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 実験1：羊への赤ワイン粕補給が養分利用およびルーメン内発酵に及ぼす影響

テクセル種2頭、コリデール種1頭およびサフォーク種×コリデール種1頭の計4頭の去勢成羊を用いた（平均体重：71.8±8.6kg）。供試羊は代謝ケージの中で管理した。

赤ワイン粕補給区（RGP）および対照区（CTL）の2処理を、2×2のクロスオーバー法に従い、4頭に処理を配置した。試験期は予備期

21日間および本期8日間とした。両処理区において基礎飼料として大麦300gおよび乾草600g給与した。RGP区では追加で乾燥赤ワイン粕を原物200g/d補給した。

糞のサンプルは本期の1から7日目にかけて、排糞量を測定した。糞および飼料サンプルの各種成分を分析し、成分ごとの消化率を算出した。

ルーメン液サンプルは本期の8日目に、飼料給与の4時間後に採取した。採取したサンプルを遠心分離（4℃、3000rpm、20分）し、上清1mlをマイクロチューブに移し、-20℃で冷凍保存した。ルーメン液の上清の揮発性脂肪酸（VFA）およびNH₃-N濃度を分析した。

処理および期間を固定効果とし、個体を変量効果とした。p<0.05で有意、p<0.10で傾向があるとした。

2.2 実験2：放牧肥育期の仔羊への赤ワイン粕補給が肉の臭気成分に及ぼす影響

仔羊12頭（テクセル種およびテクセル種雑種）を用いた。試験開始時の供試仔羊の月齢は平均4.6カ月齢であった。本試験期間終了時に、平均6.8カ月齢でと畜した。1週間に1回、体重計で体重測定を行った。飲水およびミネラルブロックの摂取は自由とした。

仔羊を体重、増体、雌雄および品種に基づいて、赤ワイン粕補給放牧肥育区（RGPG）および対照放牧肥育区（CTLG）2処理の肥育処理に、無作為に割り当てた。試験期間の途中で、体重に合わせて、濃厚飼料給与量を増やした。最終の給与量はRGPG区では大麦400g/sheep/d、乾燥赤ワイン粕100g/sheep/d、CTLG区では大麦400g/sheep/dであった。本試験期間中、濃厚飼料は1日1回、0900hに、各処理区に頭数分、まとめて給与した。試験終了後、RGPG区4頭、CTLG区4頭をと畜した。

と畜した全13頭のロース芯肉を後の分析のため

に、真空包装し、 -80°C で冷凍保存した。筋組織 10 g、または脂肪組織 1 g を切り分け、ホモジナイザーを用いて粉碎した。バイアル瓶にサンプルを入れ、シリカモノリス捕集剤MonoTrap (RGC およびRGPS (ジーエルサイエンス株式会社、東京)) をヘッドスペースに差し込み、 60°C のホットバスで60分間静置し、臭気成分を捕集した後、室温まで冷やした。臭気成分の分析には、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS 2010 Ultra, 島津製作所、京都) を用いた。MonoTrapをGCに挿入し、スプリットレスモードでGCに捕集した臭気成分を注入した。GCの保持時間および質量分析スペクトルを比較することで臭気成分を特定し、内部標準比として濃度を測定した。

増体は処理を固定効果とし、試験開始時の体重を共変量とした。臭気成分は、処理、と体重および雌雄を固定効果とした。 $p < 0.05$ で有意、 $p < 0.10$ で傾向があるとした。

3. 結果と考察

3.1 実験1

飼料成分およびエネルギーの消化率をTable 1 に示した。粗タンパク質 (CP) 消化率はCTL区に比べてRGP区で有意に低く、乾物 (DM)、有

機物 (OM) および総エネルギー (GE) 消化率はRGP区で低い傾向が見られた。しかし、粗脂肪 (EE) 消化率はRGP区で有意に高かった。NDF (中性デタージェント繊維) 消化率は処理間で差はなかった。

ルーメン内発酵産物濃度をTable 2 に示した。すべての項目において、処理間で差は見られなかった。

本実験と同様に、ワイン粕補給によりDM, OM, CP, NDF, GE消化率が低下し、EE消化率が高まる結果が他の研究^{6~8)}によっても報告されている。本実験では、CTL区に比べRGP区ではDM消化率は7%, OM消化率は7%, CP消化率は13%, NDF消化率は9%, GE消化率は7%低下し、EE消化率は17%増加した。Abarghueiら⁶⁾, Baumgartelら⁷⁾ およびZalikarenabら⁸⁾の結果と比較して、本研究における消化率の低下の程度は低かった。Zalikarenabら⁸⁾の実験では350 g および49%, Baumgartelら⁷⁾の実験では800 g および55%, Abarghueiら⁶⁾の実験では762 g および76%であったが、本研究における、赤ワイン粕の給与量は200 g、全給与飼料中に対する赤ワイン粕給与量の割合は18%と低かったことから、全体の消化率に対する赤ワイン粕の消化率の影響は小

Table 1 Digestibility of sheep when supplemented with red wine pomace (RGP : supplemented with red wine pomace, CTL : control).

	RGP	CTL	p value
DM (%)	60.8	67.5	†
OM (%)	62.0	69.3	†
CP (%)	56.0	68.5	*
NDF (%)	48.9	58.2	NS
EE (%)	78.5	61.9	*
GE (%)	59.5	66.9	†

† $p < 0.1$, * $p < 0.05$, NS : Non-significance

Table 2 Rumen fermentation parameters of sheep when supplemented with red wine pomace (RGP : supplemented with red wine pomace, CTL : control).

	RGP	CTL	p value
NH ₃ -N (mg N/dl)	13.6	19.0	NS
Total VFA (mmol/dl)	7.4	7.8	NS
Individual VFAs (mmol/100mmol)			
Acetate	64.25	68.72	NS
Propionate	19.19	18.10	NS
iso-Butyrate	0.91	0.91	NS
n-Butyrate	13.53	11.15	NS
iso-Valerate	0.89	0.45	NS
Valerate	1.24	0.67	NS

NS : Non-significance

さかった。タンニンの摂取量が増加すると、自由摂取量および消化率が低下するので⁹⁾、赤ワイン粕の給与割合が増加するにつれて、消化率は大きく低下する可能性がある。

ルーメン内に流入したタンニンは植物タンパク質と結合し、微生物の活性を抑制するので、ルーメン内NH₃-N濃度が低下すると報告されている^{5, 6)}。しかし、本実験の結果では、RGP区において赤ワイン粕補給によるルーメン内NH₃-N濃度の有意な低下は見られなかった。また、タンニンを給与すると、微生物の活性が抑制され、繊維消化率が低下するので、ルーメン内VFAが減少する可能性があるが、ルーメン内のVFAに赤ワイン粕補給による影響は見られなかった。

以上から、日量200 g以下の補給量であれば乾燥赤ワイン粕の補給のルーメン内発酵に及ぼす影響は小さく、放牧肥育に問題なく用いることができる可能性が示唆された。

3.2 実験2

体重および増体をTable 3に示した。RGPG区の増体はCTLG区に比べて、有意に高かった。

ロース芯肉の筋組織の脂肪酸類および脂肪酸エステル類をTable 4に示した。CTLG区に比べてRGPG区の4-メチルオクタン酸メチル、オクタン酸メチル、ノナン酸メチル、デカン酸メチルが有意に低かった。CTLG区に比べて、RGPG区のナフタレンおよびネオフィタジエンが有意に低く、インドールが低い傾向が見られた (Table 4)。

脂肪組織の臭気成分については、RGPG区およびCTLG区の比較で有意差が見られたものは少なく、RGPG区およびCTLG区の比較において、分岐鎖脂肪酸、インドールおよびスカトールに差は見られなかった。

Minら⁹⁾は、タンニンを給与すると、自由摂取量および消化率が低下し、増体が低くなると述べたが、本研究では、RGPG区の増体がCTLG区に

比べて0.04kg/d高かった。そのため、日量100 g程度の乾燥赤ワイン粕の給与は増体に負の影響を及ぼさないことが示唆された。

ロース芯肉の筋組織の分析では、赤ワイン粕補給により、BCFA (4-メチルオクタン酸メチル、オクタン酸メチル、ノナン酸メチルおよびデカン酸メチル) が有意に減少した。また、インドールで低い傾向が見られた。これらはパストラルフレーバーの臭気成分であり、放牧草由来のタンパク質がルーメン内の微生物の作用を受けて変化したものとされている³⁾。赤ワイン粕補給により、微生物の活性が抑制された結果、ラム肉中のパストラルフレーバーの蓄積が軽減された可能性がある。また、RGPG区において筋組織においてネオフィタジエンが有意に低かった。フィタンおよびネオフィタジエンなどのジテルペノイドはクロロフィルの分解産物として¹¹⁾、あるいは放牧草から直接摂取することで¹⁰⁾、体内に吸収される。そのため、放牧肥育のラム肉では、特徴的な臭気成分である¹²⁾。赤ワイン粕補給の結果、分解および吸収が抑制されたことにより、ネオフィタジエンが低くなったと考えられる。

以上の結果から、放牧飼養の仔羊に日量100 gの乾燥赤ワイン粕を補給することで、増体を高めると同時に、ラム肉中のパストラルフレーバーを軽減できることが示唆された。

4. 要 約

本研究では、放牧肥育期の子羊への赤ワイン粕の補給が増体およびパストラルフレーバ原因成分に及ぼす影響を評価した。実験1において、去勢雄羊4頭を用い、代謝試験を行い、赤ワイン粕が消化率およびルーメン内代謝に及ぼす影響を確認した。その結果、赤ワイン粕の給与により、CP消化率が低下し、EE消化率は増加した。また、ルーメン発酵産物には赤ワイン粕補給の影響は認

Table 3 Body weight and daily body weight gain of lambs under grazing system when supplemented with red wine pomace (RGPG : supplemented with red wine pomace, CTLG : control).

	RGPG	CTLG	p value
Initial body weight (kg)	33.1	32.8	NS
Body weight at slaughtering (kg)	42.7	39.6	NS
Carcass weight (kg)	22.5	21.3	NS
Daily body weight gain (kg/d)	0.15	0.11	*

* $p < 0.05$, NS : Non-significance

Table 4 Pastoral flavor sources of muscle tissue in meat of lambs fattened under grazing system when supplemented with red wine pomace (RGPG : supplemented with red wine pomace, CTLG : control).

	RGPG	CTLG	p value
Butanoic acid, methyl ester	1.15	1.02	
Methyl valerate	0.21	0.29	
Hexanoic acid, methyl ester	3.53	4.59	
Heptanoic acid, methyl ester	1.78	2.64	
Octanoic acid, 4-methyl-, methyl ester	0.08	0.19	*
Octanoic acid, methyl ester	7.64	13.71	*
Nonanoic acid, methyl ester	7.50	10.84	**
4-Decenoic acid, methyl ester	0.19	0.26	
Decanoic acid, methyl ester	35.46	56.84	*
Dodecanoic acid, methyl ester	22.79	27.51	
Tetradecanoic acid, methyl ester	36.64	58.76	
Hexadecanoic acid, methyl ester	72.35	128.10	†
Stearic acid, methyl ester	24.68	19.31	
Oleic acid, methyl ester	7.87	14.46	†
Phenol	0.19	0.22	
Toluene	0.75	0.75	
o-Xylene	1.16	1.57	
Indole	0.77	1.64	†
Skatole	0.71	0.88	
D-Limonene	0.40	0.68	
Naphthalene	10.50	23.33	*
Dihydrophytol	2.28	5.34	
Neophytadiene	2.85	5.61	*
Phyt-1-ene	1.42	1.16	
Phytane	0.15	0.15	
Phyt-2-ene	1.13	1.29	
Dimethyl sulfone	12.77	13.68	

† $p < 0.1$, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

められなかった。試験2において、仔羊12頭を赤ワイン粕補給放牧肥育区 (RGPG) に配置した。日増体量はCTLG区に比べて、RGPG区で高かった。筋組織では分岐鎖脂肪酸、ネオフィタジェンおよびインドールに赤ワイン粕補給による低減効果が見られたが、脂肪組織では差が見られなかつ

た。以上から、放牧肥育仔羊への乾燥赤ワイン粕の日量100 g程度の補給は、増体を改善すると同時にラム肉のバストラルフレーバーを軽減することが明らかになった。

文 献

- 1) Prescott, J., Young, O., O' Neill, L. : The impact of variations in flavor compounds on meat acceptability : a comparison of Japanese and New Zealand consumers, *Food Quality and Preference*, **12**, 257~264, 2001.
- 2) Young, O. A., Lane, G. A., Priolo, A., Fraser, K. : Pastoral and species flavor in lambs raised on pasture, lucerne or maize, *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **83**, 93~104, 2003.
- 3) Schreurs, N. M., Lane, G. A., Tavendale, M. H., Barry, T. N., McNabb, W. C. : Pastoral flavour in meat products from ruminants fed fresh forages and its amelioration by forage condensed tannins, *Animal Feed Science and Technology*, **146**, 193~221, 2008.
- 4) Tiemann, T. T., Avila, P., Ramirez, G., Lascano, C. E., Kreuzer, M., Hess, H. D. : In vitro ruminal fermentation of tanniniferous tropical plants : Plant-specific tannin effects and counteracting efficiency of PEG, *Animal Feed Science and Technology*, **146**, 222~241, 2008.
- 5) Waghorn, G. : Beneficial and detrimental effects of dietary condensed tannins for sustainable sheep and goat production-Progress and challenges, *Animal Feed Science and Technology*, **147**, 116~139, 2008.
- 6) Abarghuei, M. J., Rouzbehan, Y., Alipour, D. : The influence of the grape pomace on the ruminal parameters of sheep, *Livestock Science*, **132**, 73~79, 2010.
- 7) Baumgartel, T., Kluth, H., Epperlein, K., Rodehutsord, M. : A note on digestibility and energy value for sheep of different grape pomace, *Small Ruminant Research*, **67**, 302~306, 2007.
- 8) Zalikarenab, L., Pirmohammadi, R., Teimuriyansari, A. : Chemical composition and Digestibility of dried white and red grape pomace for ruminants, *Journal of Animal and Veterinary Advances*, **6**, 1107~1111, 2007.
- 9) Min, B. R., Barry, T. N., Attwood, G. T., McNabb, W. C. : The effect of condensed tannins on the nutrition and health of ruminants fed fresh temperate forages : a review, *Animal Feed Science and Technology*, **106**, 3~19, 2003.
- 10) Suzuki, J., Bailey, M. E. : Direct sampling capillary GLC analysis of flavor volatiles from ovine fat, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **33**, 343~347, 1985.
- 11) Body, D. R. : The lipid composition of adipose tissue, *Progress in Lipid Research*, **27**, 39~60, 1988.
- 12) Young, O. A., Berdadue, J. L., Viallon, C., Rousset-Akrim, S., Theriez, M. : Fat-borne volatiles and sheepmeat odour, *Meat Science*, **45**, 183~200, 1977.

骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索

Screening for phytochemicals that induce skeletal muscle hypertrophy

米 倉 真 一

(信州大学農学部)

Shinichi Yonekura

(Faculty of Agriculture, Shinshu University)

So far, we have shown from studies using cultured cells that thermal stimulation promotes muscle hypertrophy, and thermal stimulation-induced muscle hypertrophy is through temperature-sensitive transient receptor potential (TRP) channels present on membranes. Interestingly, not only temperature but also phytochemicals are known as ligands as TRP channels. Therefore, in this study we investigated to clarify phytochemicals that promote skeletal muscle hypertrophy. It has been revealed that capsaicin, which is an agonist of TRPV1, enhanced myogenesis by facilitating the fusion of myoblasts. Our study shows that capsaicin increases the expression of *Cdh15* gene which plays a significant role in the fusion of myoblasts and is uniquely expressed during skeletal muscle differentiation. Furthermore, also in the evaluation experiment of muscle regeneration ability using a mouse, it became clear that capsaicin has an effect of enhancing muscle regeneration ability. Together, these results demonstrate that capsaicin, which is an agonist of TRPV1, promotes skeletal muscle differentiation, which was caused by up-regulation of myofusion marker.

1. 目 的

世界規模の人口増加や気候変動によって食料危機が叫ばれるなか、良質な動物性タンパク質の安定供給は我が国のみならず、人類の生存にきわめて重要である。食肉は家畜骨格筋が由来であることから、家畜1個体当たりの骨格筋量を増加させ、食肉の生産性を飛躍的に向上させる技術開発が強く望まれている。

食肉を構成する大部分を占める骨格筋は、筋管の集合体である筋繊維と、それを包む筋膜および結合組織から構成されている。前駆細胞である筋

芽細胞が成熟した筋管に分化するまでには、大きく分けて“融合”と“伸長”という2段階の形態的な変化を辿る¹⁾。まず1つ目のステップである融合ステージでは、MRFs (MyoD, Myf5 など) と呼ばれる筋分化の主要な転写因子群の発現増加を経たのち、互いに融合して多核の筋管細胞となる。そして2つ目のステップである伸長ステージに移行すると、筋管が縦に伸長し、筋タンパクを盛んに合成するようになり、大きく肥大した成熟筋管へと成長していく^{2, 3)}。このように段階的に進んでいく骨格筋分化に関与する分子はいくつか報告されているものの、筋形成を促進する鍵とな

る作用点はまったく不明である。

これまで我々は培養細胞を用いた研究から、温度刺激によって筋肥大が促進することを明らかにしている⁴⁾。具体的には、骨格筋の分化や再生を研究するためのin vitroモデルとして広く利用されているマウス筋芽細胞株C2C12を用いて検討した結果、通常温度(37℃)で培養したC2C12細胞と比べて、マイルドヒート条件下(39℃)で培養した細胞は分化が促進することを明らかにした。39℃の温度刺激は筋芽細胞同士の融合促進および筋管の伸長を促す効果を有していた。さらに、この温度刺激による筋肥大は、骨格筋細胞の膜上に存在する温度感受性Transient Receptor Potential (TRP) 受容体を介して生じることも見出している(成果未発表)。すなわち温度刺激はTRP受容体を活性化させ、そのことがトリガーとなって筋肥大が促進されることを明らかにしている。

TRP受容体は、細胞膜上に存在し温度刺激の感知を行っており、これまで9つの受容体が同定されている⁵⁾。興味深いことに、このTRP受容体は温度のみならず植物由来成分を特異的リガンドとする受容体であることが知られている⁶⁾。よって温度刺激だけでなく、TRP受容体を活性化する植物由来成分もまた筋肥大化を促進することが予想される。筋肥大を促進する植物由来成分は、筋肉量を増やす飼養技術に活用することが可能であると考える。

よって本研究では、肉牛の筋肉量を増加させる飼養技術開発を目指すうえで、骨格筋の肥大化を促進する植物由来成分を明らかにすることを目的に検討した。

2. 方 法

2.1 細胞培養

マウス筋芽細胞株C2C12は、ダルベッコ変性イーグル培地(DMEM, high glucose)に、牛胎

児由来血清(FBS)を10%、抗生物質(ペニシリン-ストレプトマイシン)を1%の濃度になるように添加した増殖用培地を用いて培養した。2% HS (Horse serum) 含有DMEM (分化培地) に置換し、分化誘導刺激を行った。カプサイシンが筋管形成能に及ぼす影響の検討には、1 μ Mのカプサイシンを含む分化培地(コントロールとして溶媒を添加)で分化誘導刺激を行った。

2.2 免疫蛍光染色と画像解析

Anti-Myosin Heavy Chain抗体(1次抗体)とGoat anti-mouse IgG Alexa Flour 488抗体(2次抗体)を用いた免疫染色を行った後、1 μ g/mLのDAPIを細胞に5分間処理し、核染色を行った。洗浄後の細胞は蛍光顕微鏡EVOS® FL Cell Imaging Systemを用いて観察した。Anti-Myosin Heavy ChainおよびDAPI蛍光免疫染色の観察画像を定量解析に供した。Myosin Heavy Chain陽性の細胞体(核を2個以上含む)を筋管とみなし、Fusion indexをImage J softwareを用いて測定した。統計解析には t 検討を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2.3 siRNAを用いたノックダウン実験

TRPV3 siRNAの導入はリポフェクション法を用いて行った。手法はLipofectamine 2000(invitrogen社)のプロトコルに準拠した。トランスフェクションした翌日、分化誘導刺激を行い、刺激後5日目の細胞をAnti-Myosin Heavy Chain抗体を用いた免疫染色によって分化能の評価を行った。

2.4 リアルタイムPCR

トータルRNA抽出にはTRIzolを使用した。TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraserの手順に従い、cDNAを作成した。PCR反応試薬にはTaKaRa SYBR Premix ExTaqを用い、リアルタイムPCRを行った。GAPDHを内部標準として相対定量解析を行った。統計解析には

*t*検討を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

2.5 マウスを用いた筋再生能の評価

障害に伴う筋再生を誘導するためマウス前脛骨筋にヘビの毒素であるカルディオトキシン (CTX) を $10 \mu\text{M}$ 注入した。CTX注入の3日前より毎日 $1 \mu\text{M}$ のカプサイシンを注入し、カプサイシン注入後8日目の筋組織を摘出した。筋線維径当たりの核個数をImage J softwareを用いて測定した。統計解析には*t*検討を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

3. 結果と考察

3.1 温度刺激による筋形成促進とTRPV3との関与について

これまで9つの温度感受性TRP受容体が同定されており、それぞれ活性化する温度域が異なる。この中で、 39°C 以上で活性化し植物由来成分によって活性化することが知られているのは、TRPV1とTRPV3と呼ばれている受容体である。これまで温度刺激による筋管形成の促進は少なくともTRPV1を介することを明らかにしていることから、TRPV3も関与しているのか否か検討を行った。siRNAによってTRPV3発現をノックダウンさせたC2C12細胞を分化誘導刺激した後、 39°C の条件で培養し、Anti-Myosin Heavy Chain抗体を用いた免疫染色により分化能を評価した結果、通常細胞と変わりがなかったことが明らかとなった。すなわち、温度刺激による筋管形成の促進にTRPV3は関与しないことが考えられた。よって、以後の検討はTRPV1のみに着目して検討することとした。

3.2 カプサイシンがC2C12筋芽細胞の筋形成能に及ぼす影響

これまでTRPV1の植物由来の活性化物質としてカプサイシン (トウガラシ由来)、ギンゲロール (ショウガ由来)、アリシン (ニンニク由来)

等が知られている。本研究では、まずTRPV1の代表的なアゴニストと広く知られているカプサイシンがC2C12筋芽細胞の形成能に及ぼす影響を検討した。分化誘導刺激と同時に $1 \mu\text{M}$ のカプサイシンを培地に添加し、 37°C (通常条件) で培養を行った。処理後5日目の細胞をAnti-Myosin Heavy Chain抗体を用いた免疫染色により分化能を評価した。その結果、カプサイシンを処理した細胞では、コントロール (カプサイシン未処理) と比べてより肥大した筋管が観察された (Fig. 1A)。fusion indexを測定した結果、カプサイシン処理群において、未処理群に比べ有意な増加が認められた (Fig. 1B)。またカプサイシン処理により分化48時間後のcdh15の遺伝子発現が、未処理群に比べ、有意に上昇していることも明らかとなった (Fig. 1C)。cdh15はカドヘリンスーパーファミリーの一つであり、骨格筋分化過程で特異的に発現し、筋芽細胞の細胞融合に先立つ細胞接着において、カルシウム依存的なcell-cell間の接着を仲介するという働きを持つ⁷⁾。これまで我々は 39°C の温度刺激によって、cdh15遺伝子発現が上昇し、細胞同士の融合が促進することを明らかにしている⁴⁾。よって、カプサイシンもまたcdh15遺伝子発現を誘導し、筋芽細胞同士の融合を促進させることで筋形成能を高めていることが予想される。

3.3 カプサイシンがマウスの筋再生能に及ぼす影響

培養細胞を用いた実験より、カプサイシンは筋形成能を高める作用を有することが明らかとなった。続いて、マウスモデルを用いた検証を行った。マウス前脛骨筋にCTXを $10 \mu\text{M}$ 注入し、障害に伴う筋再生を誘導した。CTX注入の3日前より毎日 $1 \mu\text{M}$ のカプサイシンを注入し、カプサイシン注入後8日目の筋組織を摘出し、筋線維径当たりの核個数を測定した。その結果、カプサイシンを

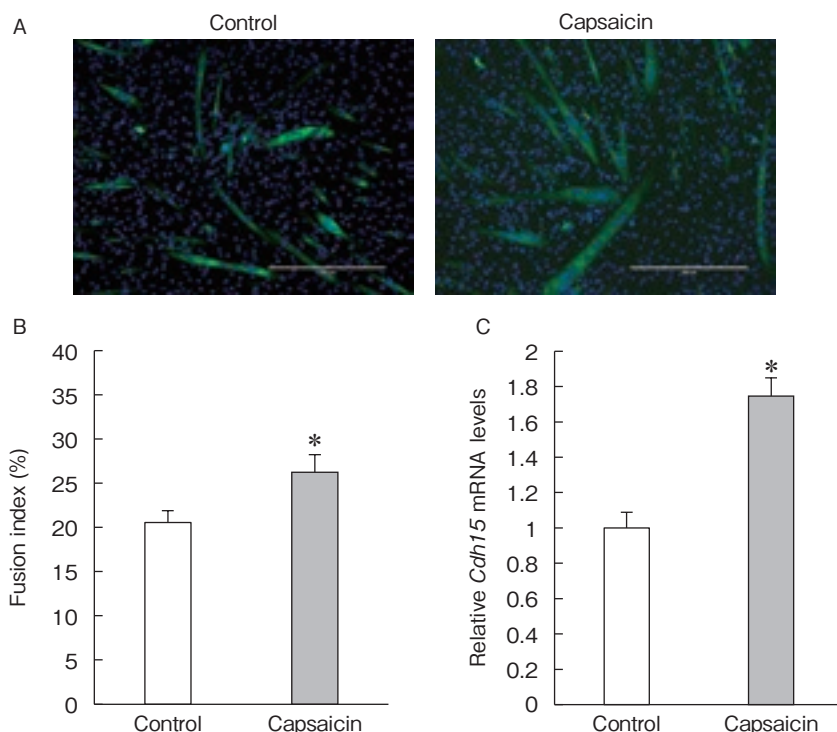


Fig. 1 Capsaicin facilitates differentiation of C2C12 cells. (A) Five days after differentiation, the cells were immunostained using an anti-muscle heavy-chain antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). Scale bar=400 μ m. (B) Fusion index analysis representing the number of nuclei in multinucleated myotubes divided by the total number of nuclei in the field of vision. * $p < 0.05$ compared with the control. (C) Relative expression level of *cdh15* mRNA. * $p < 0.05$ compared with the control.

注入することで、核個数が有意に増加していることが明らかとなった (Fig. 2)。すなわちカプサイシンは、in vivoにおいても筋再生能を高める効果を有することが明らかとなった。筋形成能と損傷に伴う筋再生能はまったく同じに考えることができない。現在、筋形成能について検討中である。

4. 要 約

これまで我々は、培養細胞を用いた研究から温度刺激によって筋肥大が促進することを明らかにしており、また温度刺激による筋肥大は、骨格筋細胞の膜上に存在する温度感受性TRP受容体を介して生じることを見出した。興味深いことに、このTRP受容体は温度のみならず植物由来成分

を特異的リガンドとする受容体であることが知られていることから、TRP受容体を活性化する植物由来成分もまた筋肥大を促進することが予想

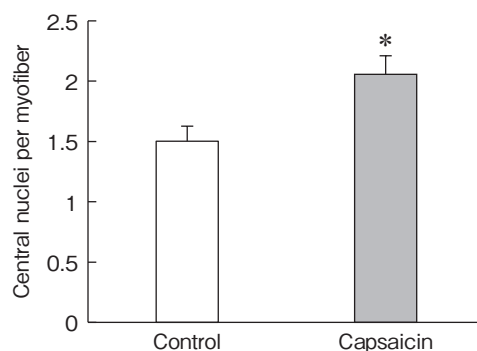


Fig. 2 Capsaicin facilitates muscle repair in mouse TA muscles. Quantification of the number of central nuclei per myofiber in TA muscle at 5 d after injury. * $p < 0.05$ compared with the control.

される。よって本研究では、肉牛の筋肉量を増加させる飼養技術開発を目指すうえで、骨格筋の肥大化を促進する植物由来成分を明らかにすることを目的に検討した。本研究により、TRPV1のアゴニストであるカプサイシンは、筋芽細胞同士の融合を促進させることで筋形成能を高める作用を有することが明らかとなった。またカプサイシンは骨格筋分化過程で特異的に発現し、筋芽細胞の細胞融合に先立つ細胞接着分子であるcdh15遺伝子発現を誘導することで、筋芽細胞同士の融合を促進させていることが示唆された。さらに、マウスを用いた筋再生能の評価実験においても、カプサイシンは、筋再生能を高める効果を有することが明らかとなった。今後、動物個体レベルでカプサイシンは筋再生能のみならず筋形成能も促進する作用を有するのか検討する必要がある。またカプサイシン以外のTRPV1の植物由来アゴニストであるギンゲロールやアリシンも筋形成能を促進する効果があるのか検討することも、将来、家畜の飼料化を考えるうえで重要であると考ええる。

文 献

- 1) Roman, W., Gomes, E. R. : Nuclear positioning in skeletal muscle, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, **82**, 51~56, 2018.
- 2) Smith, C. K., Janney, M. J., Allen, R. E. : Temporal expression of myogenic regulatory genes during activation, proliferation, and differentiation of rat skeletal muscle satellite cells, *Journal of Cellular Physiology*, **159**(2), 379~385, 1994.
- 3) Cooper, R. N., Tajbakhsh, S., Mouly, V., Cossu, G., Buckingham, M., Butler-Browne, G. S. : In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle, *Journal of Cell Science*, **112**(Pt17), 2895~2901, 1999.
- 4) Hayashi, S., Yonekura, S. : Thermal stimulation at 39°C facilitates the fusion and elongation of C2C12 myoblasts, *Animal Science Journal*, in press.
- 5) Tominaga, M., Caterina, M. J. : Thermosensation and pain, *Journal of Neurobiology*, **61**(1), 3~12, 2004.
- 6) Premkumar, L. S. : Transient receptor potential channels as targets for phytochemicals, *ACS Chemical Neuroscience*, **5**(11), 1117~1130, 2014.
- 7) Wrobel, E., Brzoska, E., Moraczewski, J. : M-cadherin and beta-catenin participate in differentiation of rat satellite cells, *European Journal of Cell Biology*, **86**(2), 99~109, 2007.

家畜生産における抗生物質使用量の低減化を目指した 「ミサイル」抗菌剤の創出

Synthesis of a “missile” -antibacterial reagent that can contribute to
reduction of the amount of antibiotics contained in livestock feed

榎 本 賢

(東北大学大学院農学研究科)

Masaru Enomoto

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

As the emergence of drug-resistant bacteria is increasing worldwide, the requirement for novel therapeutic compounds is increasing. Although excessive use of antibiotics is generally considered as the main cause for the emergence of drug-resistant bacteria, it is not well-known that the amount of antibiotics used in livestock is greater than that used in human beings. In fact, veterinary medicines are casually added to feedstock even when the livestock are healthy. Thus, the main origin of drug-resistant bacteria could be ascribable to livestock production rather than to medical sites. It is believed that several kinds of drug-resistant bacteria such as MRSA and VRE have emerged due to improper or excessive use of veterinary medicines, which are also used as human medicines. Therefore, this author reasons that efforts to decrease the use of veterinary medicines could contribute to reduce the emergence of new drug-resistant bacteria. Among the veterinary medicines used as feedstock additives, ionophore antibiotics are very common. Therefore, we aimed to develop a novel ionophore antibacterial agent that is superior to conventional analogs.

Our strategies for reducing ionophore antibiotic use are as follows : 1) enhancement of antimicrobial activity by increasing the affinity for cations ; and 2) improvement of their specificity for the target microbe.

Among ionophore antibiotics, monensin, a naturally occurring sodium ion-selective ionophore produced by *Streptomyces* sp., is the most commonly used. To investigate its modification site, we chemically synthesized some monensin analogs including a monensin dimer, which is expected to show increased affinity for sodium ions, and also evaluated their biological activity. Cytotoxic assays indicated that the C1-carboxylic acid function of monensin is important for its biological activity.

Regarding improvement in the specificity of ionophore antibiotics for *S. aureus*, which commonly causes livestock infection, we planned to utilize small peptides that specifically bind to *S. aureus*. Through a phage display analysis, a heptapeptide was found to be a candidate *S. aureus*-specific binding agent.

1. 目 的

薬剤（多剤）耐性菌への対処は人類にとって喫緊の課題となっている。日本における抗生物質使用の現状として、全抗生物質量の50%以上が家畜生産の現場において使用されている。その目的の過半は治療目的であるものの、飼料添加物としても利用されている。これらの多くはポリエーテル系抗生物質で、製造量全体の59%を占める¹⁾。この種の抗生物質の中で最も使用量の多いモネンシンは人の医療で使用されたことはなく、飼料添加物として家畜に給与された場合に選択される薬剤耐性菌に関する食品健康影響評価においてもリスクは無視できる程度とされている。しかし、薬剤耐性菌に関する詳細な情報は十分とは言えない²⁾。そこで申請者は、ポリエーテル系抗生物質を題材にして薬剤耐性菌出現リスクの低減と抗菌活性の向上を目的として本研究に着手した。

ほとんどのポリエーテル系抗生物質は、細胞膜においてイオノフォアとして作用することで抗菌活性を示す。まず、標的部位が菌体表面（細胞膜）であることに着目すると、ミサイル療法が効果的に適用できると予想した。ミサイル療法は、標的に選択的に薬剤を到達させる手法として注目されている。例えば、癌治療においては、癌細胞に特異的に結合する認識部位（抗体等）と抗癌剤を連結し、正常細胞と区別して選択性を高めることで、抗癌剤使用量と副作用の低減化を実現している。このミサイル療法のコンセプトを利用すれば、抗生物質を標的の菌体に選択的に輸送して、その付近に濃縮できる。効果的な方法であるが、認識部位が結合する場所が菌（細胞）表面であるため、菌体内で作用する抗生物質の場合、取り込みが効果発現の障害になり得る。これを考慮すると、薬剤の作用部位は菌体内よりも表面である方が有利である。細胞膜に作用するポリエーテル系

抗生物質は、このコンセプトの適用が可能と考察できるので、標的を特異的に認識するペプチドをポリエーテル系抗生物質に連結して化合物を「ミサイル化」する。

次に作用機構に着目すると、イオノフォア分子は金属イオンを取り込むことで抗菌活性を示すので、金属イオンとの親和性を高めれば活性の向上が期待できる。そこで、金属イオンの取り込みが有利になるようにイオノフォアを二量化する。実際、Liuらはイオノフォア活性のポリエーテル系抗生物質であるサリノマイシンの二量体が単量体よりも2-5倍強い細胞毒性を示したと報告している³⁾。従来の官能基（構造）変換による生物活性向上戦略と比較して、二量化法はきわめて簡便なアプローチである。

本研究では、ポリエーテル系抗生物質の中で家畜に対する使用量が最も多いモネンシン（Mon）を題材に、家畜感染症起因菌の中で最も一般的な黄色ブドウ球菌を標的として、従来の抗菌物質開発戦略とは一線を画す「ミサイル化」と「二量化」戦略により、特異性と抗菌活性が向上した抗菌剤創出を目指した。

2. 方 法

2.1 候補ペプチドの探索と化学合成

標的細菌（黄色ブドウ球菌）に特異的に結合するペプチドの探索は、研究分担者米山によりファージディスプレイ法を利用して行った。具体的には（Fig. 1A）、NEB社 Ph.D.-7 Phage Display Library Kit（M13 ファージピリオン上にヘプタペプチドを提示したランダムペプチドライブラリー）を用いて、①表面にペプチドがランダムに呈示されたファージライブラリーと標的菌（*S. aureus* SA5）を反応させて、特異的に結合するペプチドを選別、②洗浄、③標的菌から目的ファージを溶出、④大腸菌（*E. coli* ER2738）に

よりファージを増幅, ⑤得られたファージを再度標的と反応させる, というサイクルを繰り返して候補配列を得た。

さらに, シークエンス解析の結果から最も有望と考えられたペプチド配列の化学合成を試み, 目的ペプチドの保護体 **1** を合成した (Fig. 1B)。

2.2 モネンシン (Mon) 修飾部位決定のための構造活性相関

Monの抗菌活性を可能な限り保持してペプチドを連結するために (実際は間にリンカーを挟む), 最適な修飾位置を決定するべく, 誘導体の調製と細胞毒性試験を実施した。Monには修飾可能部位が3ヶ所存在する。このうち, 26位ヒドロキシ基修飾体に関する研究は盛んに行われているので^{4, 5)}, 1位カルボキシ基と7位ヒドロキシ基修飾体について細胞毒性の調査を行った。

1位ヒドロキシ基修飾体Mon-1-アミド (**2**) はFig. 2Aに示した方法で合成した。まず市販のモネンシンナトリウム塩 (MonNa) をプロトン

化してMonを調製した後に, ノルマルブチルアミンと縮合して目的物 **2** を得た。

一方, 7位修飾体 Monensin Methyleneester (MME)-7-アミド (**6**) は次のように合成した。まず, Monに対して3工程の変換で **1**, **25** および **26** 位を保護した化合物 **3** を得た。このものの7位ヒドロキシ基を直接修飾することも試みたが困難を極めた。この原因は7位ヒドロキシ基周辺が立体的に混み合っているためと考えられた。そこで, 既知の方法を参考に1炭素増炭したカルボン酸誘導体へと変換することにした⁶⁾。まず, 化合物 **3** のヒドロキシ基をケトンに変換した **4** を得た。さらにHorner-Wadsworth-Emmons反応により増炭, 続く二重結合への水素添加により所望のカルボン酸 **5** を得た。このものに対して, 26位ベンゾイル基および25位メチル基の除去, ノルマルブチルアミンとの縮合により **6** の合成を完了した。

細胞毒性試験は研究協力者此木の指導の下, 以

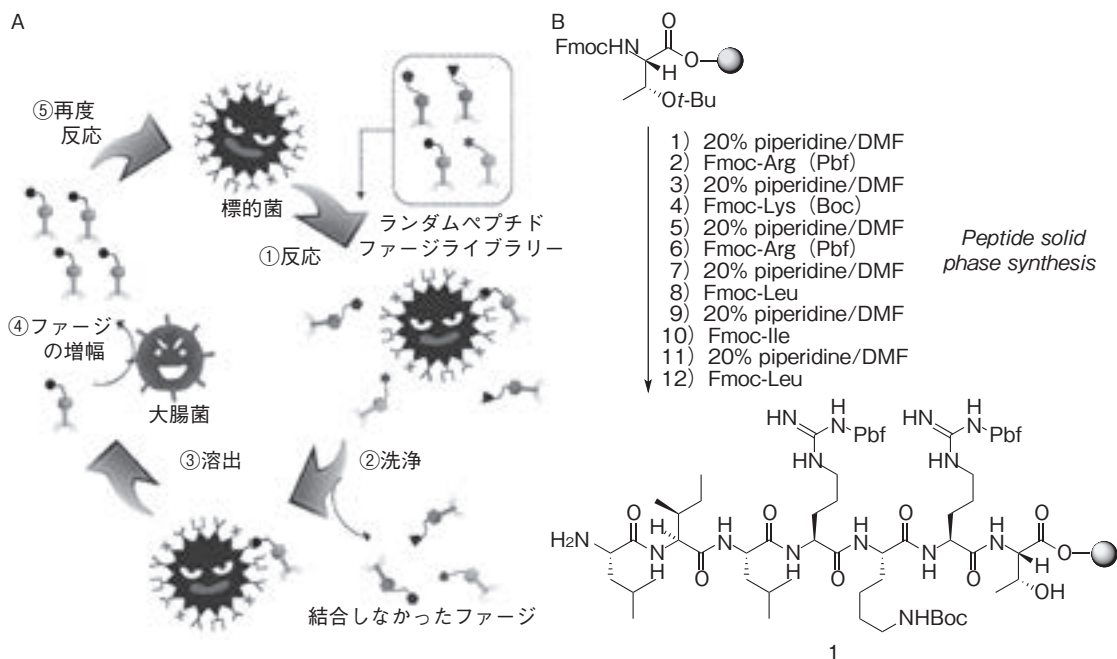


Fig. 1A Phage display method ; Fig. 1B Synthetic study of a candidate *S. aureus*-specific binding peptide.

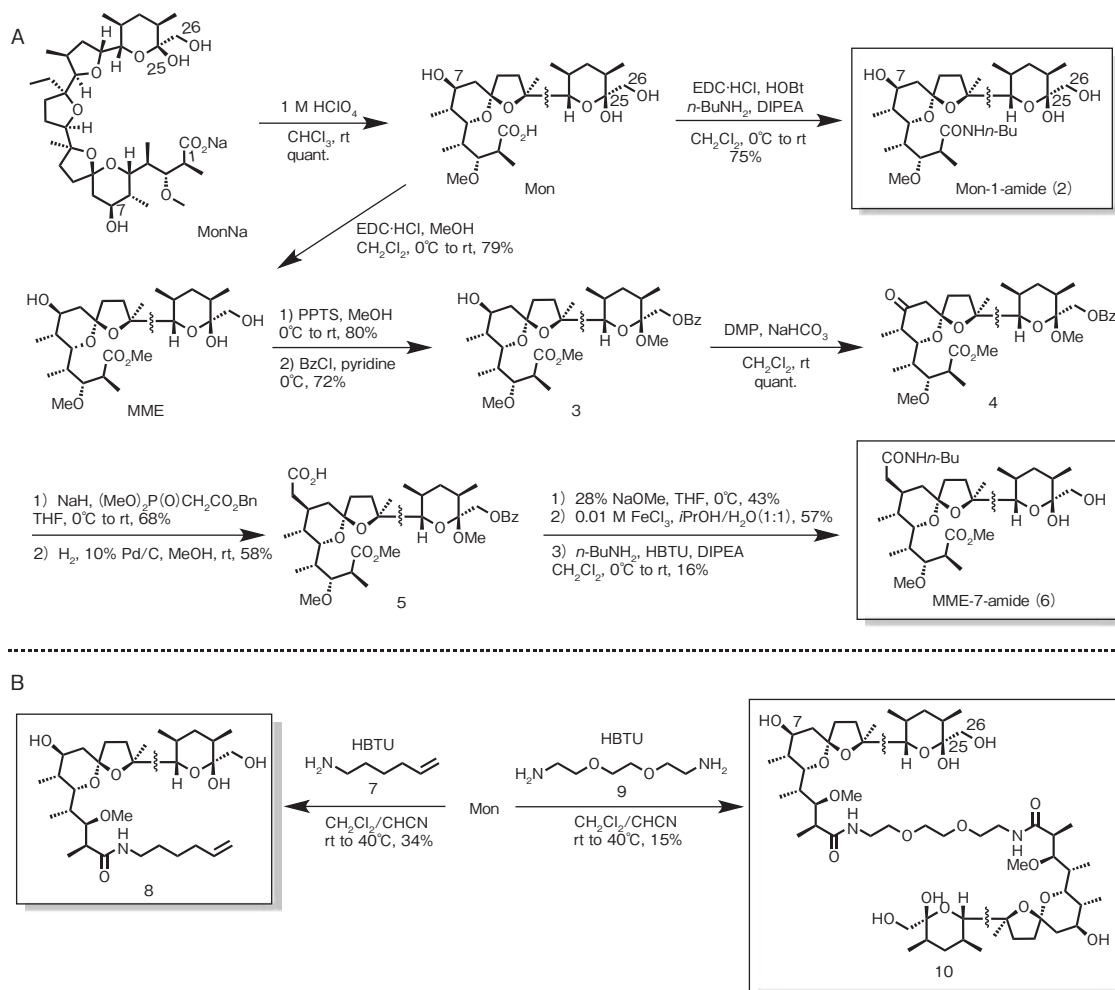


Fig. 2A Preparation of Mon-1-amide (2) and MME-7-amide (6) ; Fig. 2B Preparation of amide 8 and monesin dimer 10.

下の要領で行った。まず、市販のMonNa (Sigma-Aldrich, 純度95%), MME, Mon-1-アミド (2) およびMME-7-アミド (6) の10 μ M, 100 μ M and 1 mMメタノール溶液を2 μ Lずつ96穴マイクロプレート内のP 388細胞液 (5,000 cells/200 μ L) に添加した。37°Cで24時間インキュベート後にWST-8を添加し、さらに3時間後450 nmの吸光度を測定した。

2および6に関するより詳細な細胞毒性試験は以下の要領で行った。まず、MME, 2および6の0.3 mM, 1.0 mM, 3.0 mM, 10 mMおよび

30 mMメタノール溶液を2 μ Lずつ96穴マイクロプレート内のP 388細胞液 (5,000 cells/200 μ L) に添加した。37°Cで24時間インキュベート後にWST-8を添加し、さらに3時間後450 nmの吸光度を測定した。

2.3 モネンシン (Mon) 二量体の調製

Mon二量体の合成に関して、3ヶ所の修飾可能部位のうちどの部位で二量化することが最適か検討する必要があったが、当面の標的として、最も修飾が容易な1位カルボキシ基で二量化した化合物の調製を試みた (Fig. 2B)。当初は、Monをア

ミド8へと導き、このものをクロスメタセシス反応により二量化することを目指した。しかし、二量化には成功したものの、生じた化合物の二重結合の還元が進行しなかった。そのため種々検討した結果、Monをトリエチレンジアミン誘導体9と縮合することで、低収率ながらもMon二量体10を合成することができた。

細胞毒性試験は、以下の要領で行った。まず、市販のMonNa (Sigma-Aldrich, 純度95%), Mon二量体10およびアミド8の10 μ M, 100 μ M and 1 mMメタノール溶液を2 μ Lを96穴マイクロプレート内のNeuro 2A細胞液(41,000 cells/200 μ L)に添加した。37°Cで48時間インキュベート後にWST-8を添加し、さらに3時間後450 nmの吸光度を測定した。

3. 結果と考察

3.1 候補ペプチドの探索と化学合成

バイオパニングで獲得した43種類のファージライブラリーの塩基配列を解析し、21種類の配列を得た。そのうち、複数回現れた配列は6種類で

あった。このうち、頻度1位の配列であるLeu-Ile-Leu-Arg-Lys-Arg-Thrをペプチド固相合成法により化学合成を試みた。現在までに目的ペプチドの保護体1を得ているので、今後は選択的に主鎖アミノ基、もしくはLys側鎖アミノ基にリンカーを導入してMonと連結する予定である。

3.2 モネンシン (Mon) アナログの細胞毒性試験

天然物であるMonNaと調製したMME, Mon-1-アミド(2)およびMME-7-アミド(6)に対して、WST-8を発色試薬とし、P388細胞を用いた細胞毒性試験を行った。その結果、MMEを含む誘導体の細胞毒性は天然物より大幅に低く、0.10-10 μ M間の濃度においては誘導体間の活性強度にあまり差がない結果となった(Fig. 3)。

さらにMME, Mon-1-アミド(2)およびMME-7-アミド(6)間での活性強度の差を比較するべく、詳細な細胞毒性試験を行った(Fig. 4)。その結果、多少の差異はあるものの、0.30 mM-3.0 μ M間の濃度に関しても各誘導体間での活性強度に大きな差はないことが示唆される

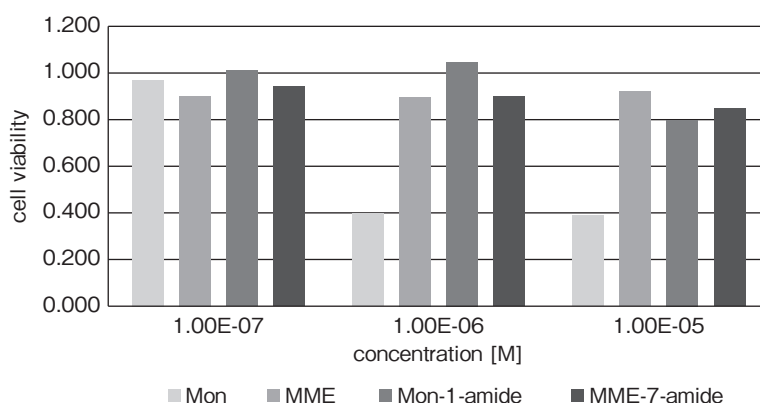


Fig. 3 Growth inhibition of P388 cells in the presence of monensin sodium salt (Mon), monensin methyl ester (MME), monensin-1-amide (1-amide) or MME-7-amide (7-amide). After an aliquot of the cell suspension (5,000 cells/200 μ L) was incubated with monensin sodium salt (monensin), monensin methyl ester (MME), monensin-1-amide (1-amide) or MME-7-amide (7-amide) at the designated concentration for 24h at 37°C and 5% CO₂/air atmosphere. The relative cell viability was measured using WST-8 and plotted against the concentration of the compound.

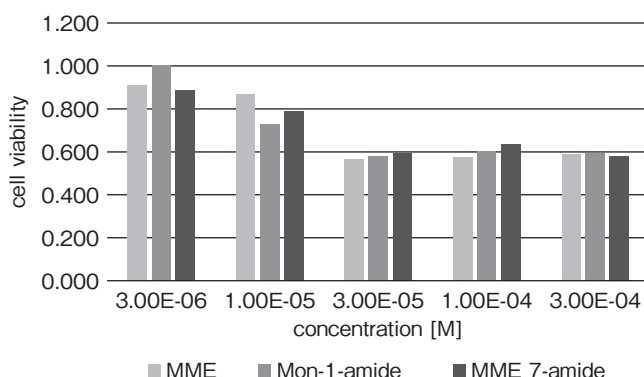


Fig. 4 Growth inhibition of P388 cells in the presence of monensin methyl ester (MME), monensin-1-amide (1-amide) or MME-7-amide (7-amide). After an aliquot of the cell suspension (5,000 cells/200 μ L) was incubated with monensin methyl ester (MME), monensin-1-amide (Mon-1-amide) or MME-7-amide (MME 7-amide) at the designated concentration for 24 h at 37°C and 5% CO₂/air atmosphere. The relative cell viability was measured using WST-8.

結果となった。

誘導体の共通点が1位のカルボキシ基が修飾されているという点であることから、1位のカルボキシ基がMon一量体のイオノフォアとしての活性強度に大きく関係していることが示唆された。

3.3 モネンシン (Mon) 二量体の細胞毒性試験

得られたMon二量体10を、MonNa (monensin) およびアミド8とともに細胞毒性試験に供したところ、8と10は細胞毒性が共にMonの約1/100であるという結果が示された (Fig. 5)。またアミド8と二量体10の活性に大きな差がなかった。イオン輸送試験ではなく細胞毒性試験の結果ではあるものの、1位のカルボキシ基で二量体した化合物は二量化の恩恵を受けておらず、ナトリウムイオンの取り込み能が向上していないことが示唆された。今後は二量化の修飾位置を中心に、リンカーの種類・長さも含めて、さらなる検討を行う予定である。

4. 要 約

本研究では、家畜飼料添加物として使用される抗生物質Monの使用量削減に向けて、「ミサイル化」と「二量化」による選択性と抗菌活性の向上

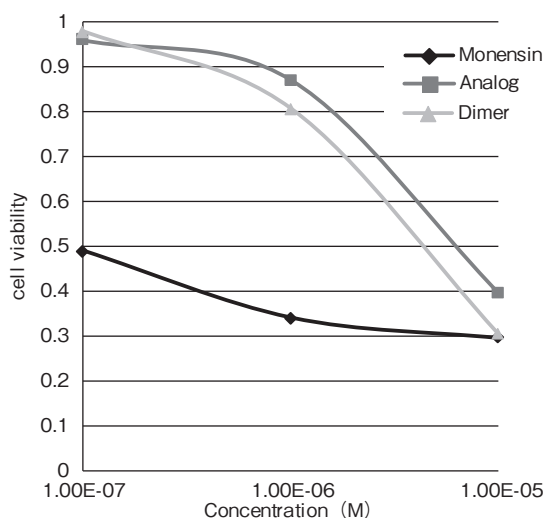


Fig. 5 Growth inhibition of Neuro 2A cells in the presence of monensin sodium salt (Monensin), amide 8 (Analog) or dimer 10 (Dimer). After an aliquot of the cell suspension (41,000 cells/200 μ L) was incubated with monensin sodium salt (Monensin), amide 8 (Analog) or dimer 10 (Dimer) at the designated concentration for 24 h at 37°C and 5 % CO₂/air atmosphere. The relative cell viability was measured using WST-8 and plotted against the concentration of the compound.

を目指して研究を行った。

「ミサイル化」に関しては、研究分担者米山が黄色ブドウ球菌特異的な結合を示す候補配列とし

て同定したペプチド配列Leu-Ile-Leu-Arg-Lys-Arg-Thrの化学合成を実施した。これまでに保護体1の合成に成功しているので今後、Monの連結を実施する。Mon側の修飾に関しては、1位カルボキシ基が活性発現に重要な役割を果たしていることが確認されたので、今後は7位もしくは26位での修飾を目指す。

「二量化」についても、1位カルボキシ基の重要性が再確認されたので、今後はイオン対の形成が促進されるようにカルボキシ基を残した二量体の合成を目指す。

文 献

- 1) 小嶋二三夫：飼料検査, 478, 1～8, 2003.
- 2) 食品安全委員会 評価書：https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/print/kya20070419050
- 3) Huang, M., Deng, Z., Tian, J., Liu, T. : Synthesis and biological evaluation of salinomycin triazole analogues as anticancer agents, *E. J. Med. Chem.*, **127**, 900～908, 2017.
- 4) Westley, J. P., Evans, Jr., R. H., Sello, L. H., Troupe, N., Liu, C.-M., Miller, P. A. : Isolation of novel antibiotics X-14667A and X-14667B from *Streptomyces cinnamonensis* subsp. *urethanofaciens* and their characterization as 2-phenethylurethanes of monensins B and A, *J. Antibiot.*, **34**, 1248～1252, 1981.
- 5) Westley, J. P., Liu, C.-M., Evans, Jr. R. H., Sello, L. H., Troupe, N., Hermann, T. : Preparation, properties and biological activity of natural and semisynthetic urethanes of monensins, *J. Antibiot.*, **36**, 1195～1200, 1983.
- 6) Nagatsu, A., Tabunoki, Y., Nagai, S., Ueda, T., Sakakibara, J., Hikada, H. : Studies on Chemical Modification of Monensins. VI. Preparation of C-7 Modified Monensins via Protected 7-Oxomonensins and Evaluation of Their Ion Transport Activity, *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 966～970, 1997.

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（Ⅱ）

Effects of rice feeding on growth performance and protein (amino acids)
metabolism of weaning piglets (Ⅱ)

高田 良三・田坂 祐介・立原 可南子
(新潟大学農学部)

Ryozo Takada, Yusuke Tasaka 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 using slightly high protein diet. Twenty weaning piglets with an average initial weight of 8.1kg were divided into two groups. One group was fed a corn-soybean meal diet, and the other was fed a rice-soybean meal diet, containing about 45% of corn or rice, respectively. CP contents in the corn diet (23.5%) and rice diet (24.2%) were about 3 % higher than its recommendation. A two weeks growth trial was conducted and growth performance, liver lysine-ketoglutarate reductase (LKR) and threonine dehydrogenase (TDH) activities, plasma urea nitrogen, glucose, insulin and free amino acids concentrations were measured. Liver LKR mRNA and loin muscle branched chain keto acids dehydrogenase (BCKDH) mRNA expressions were also measured. The feed efficiency (gain/feed) in the rice group were significantly higher than that in the corn group. Liver LKR activity was significantly lower ($p=0.013$) in the rice group than that in the corn group. Plasma urea nitrogen concentration in the rice group tended to be lower ($p=0.079$) than that in the corn group. There were no significant differences in plasma insulin and glucose concentrations under the condition of ad libitum feeding. LKR mRNA expression in the rice group tended to be lower ($p=0.091$) than that in the corn group. Plasma free valine concentration was significantly higher in the rice group than that in the corn group. Plasma free isoleucine concentration tended to be higher ($p=0.071$) in the rice group than that in the corn group. In general, these results show that the rice feeding affect the protein and amino acids metabolism as well as improvement of growth performance 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。一方、食料自給率の向上および休耕田の有効利用を目的として飼料用米の利活用が活発になってきた。そこで消化性が優れる特徴を有する飼料用米を離乳子豚に給与することを試みた。海

外ではこれまでにスペインのMateosらのグループ^{1~4)}とオーストラリアのPluskeらのグループ^{5, 6)}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。当研究室においてもYagami and Takada⁷⁾によって離乳子豚への飼料用米給与によって使用成績の改善や、小腸膜酵素活性の上昇を報告している。このような背景下、昨年度の当報告⁸⁾では離乳子豚に飼料用米を給与し、以下のような結果が得られた。飼料用米給与によって、①日増体量の改善のみならず、初めて飼料効率の有意な向上を確認、②血漿中尿素態窒素の有意な低下、③血漿中グルコースおよびインスリンの有意な上昇、④血漿中分岐鎖アミノ酸（バリンおよびイソロイシン）の有意な上昇、⑤肝臓Lysine-ketoglutarate reductase（LKR、リジン分解酵素）活性の低下傾向、以上のような興味ある結果が得られた。そこで、今年度は飼料効率の改善およびアミノ酸分解代謝に焦点を当てて検討を行った。飼料中のタンパク質含量をやや高めにして確実にすべてのアミノ酸が十分量飼料中に存在するようにして飼料効率の改善が確認できるかを試みた。また、採血を不断給餌条件下で行い、より実際の飼養条件下での血中成分の変動を検討した。肝臓LKR活性に加えてThreonine dehydrogenase（TDH、トレオニン分解酵素）活性も測定した。さらにLKR mRNAおよび分岐鎖アミノ酸分解の律速とされているBranched chain keto acids dehydrogenase（BCKDH）mRNA発現量も測定した。ここで得られる結果を基に、飼料用米給与による離乳子豚の飼料効率改善およびタンパク質（アミノ酸）代謝変動のメカニズムを明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

約23日離乳の子豚を実験動物として用い、馴致

期間を5日間とした。飼料用米を約45%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、ロースを採取して各種成分や酵素活性、mRNA発現量を測定した。

2.1 飼養試験

2.1.1 離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45%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

なお、両試験区のアミノ酸含量がほぼ等しくなるように、リジン、メチオニン、トレオニン、およびトリプトファンを添加して調整した。

供試動物：約28日齢の離乳子豚20頭を2試験区に10頭ずつ振り分けた

試験期間：2週間。その間不断給餌、自由飲水

分析項目：

血中尿素態窒素濃度、遊離アミノ酸濃度、およびインスリン・グルコース濃度。なお、採血は不断給餌条件下および絶食再給餌条件下で行い、血中尿素態窒素濃度、遊離アミノ酸濃度は不断給餌条件下のサンプルのみ分析した。

肝臓中のリジン分解酵素（Lysine ketoglutarate reductase, LKR）活性およびトレオニン分解酵素（Threonine dehydrogenase, TDH）活性

肝臓LKR mRNA発現量およびロースBCKDH mRNA発現量

Table 1 Composition of experimental diets (g/kg)

Item	Corn	Rice
Ingredients		
Corn	448.6	—
Brown rice	—	444.7
Soybean meal	125	125
Soybean meal (extruder)	125	125
Dried skim milk	150	150
Concentrated soyprotein	50	60
Soybean oil	60	55
Dicalcium phosphate	15	15
Calcium carbonate	6	6
Sodium chloride	5	5
L-lysine · HCl	3.3	3
DL-methionine	2	1.4
L-threonine	1.4	1.4
L-tryptophan	0.2	0
Vitamin mixture ¹⁾	4.5	4.5
Mineral mixture ²⁾	2	2
Antibiotics ³⁾	2	2
Calculated chemical composition		
ME (MJ/kg)	15.3	15.3
CP (g/kg)	235	242
Calcium (g/kg)	90	90
Phosphorus (g/kg)	70	73
L-lysine (g/kg) ⁴⁾	17.3	17.7
DL-methionine + cystine (g/kg)	9.5	9.7
L-threonine (g/kg) ⁴⁾	10.6	10.8
L-tryptophan (g/kg)	3	2.9

1) Provided the following (per kg of diet) : retinol, 6 mg; cholecalciferol, 100 μ g ; α tocopherol acetate, 200 mg ; thiamine mononitrate, 2.5 mg ; riboflavin, 17.5 mg ; pyridoxine HCl, 1.25 mg ; D-Ca pantothenate, 272.5 mg ; nicotinamide, 15 mg ; choline chloride, 1440 mg.

2) Provided the following (per kg of diet) : Mn, 100 mg ; Fe, 100mg ; Cu, 20mg ; ZnCO₃, 120 mg ; CaI₂, 2 mg.

3) Provided the following (per kg of diet) : avilamycin, 20 mg titre ; colistin sulfate, 20mg titre ; morantel citrate, 30 mg titre

4) Analysed data

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高くなる傾向 ($p=0.053$) を示した。飼料摂取量は両試験区間に差は認められず ($p=0.295$)、結果として飼料効率は飼料用米区で有意 ($p=0.021$) 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は、昨年度の当報告とよく一致した。海外の報告においてはMateosらのグルー

プ^{1~4)}では飼料用米給与による増体量の改善は報告しているものの飼料効率の上昇は確認されていない。今回の実験において、昨年度と同様な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。それを考慮して今回は飼料中のアミノ酸が十分量存在するように、やや高めタンパク質含量とした。また、リジン含量は17.3 g (トウモロコシ区)、17.7 g (飼料用米

Table 2 Growth performance of piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	<i>p</i> -value
Initial body weight (kg)	8.0 ± 0.2	8.2 ± 0.3	0.498
Average daily gain (g/d)			
0 to 1 week	308 ± 36	395 ± 37	0.046
1 to 2 week	620 ± 45	687 ± 40	0.112
0 to 2 week	464 ± 38	541 ± 36	0.053
Average feed intake (g/d)			
0 to 1 week	356 ± 27	410 ± 32	0.084
1 to 2 week	774 ± 46	793 ± 52	0.692
0 to 2 week	561 ± 36	601 ± 41	0.295
Feed efficiency (gain/feed)			
0 to 1 week	0.866 ± 0.05	0.956 ± 0.04	0.098
1 to 2 week	0.795 ± 0.02	0.873 ± 0.03	0.045
0 to 2 week	0.819 ± 0.03	0.903 ± 0.02	0.021

Values are means ± SE (n=10)

Table 3 Plasma glucose, insulin and urea nitrogen concentrations in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	<i>p</i> -value
Glucose (mg/dL)			
ad libitum feeding	145 ± 12	144 ± 6	0.938
fasting	120 ± 4	129 ± 6	0.183
Insulin (μg/L)			
ad libitum feeding	0.134 ± 0.040	0.077 ± 0.022	0.217
fasting	0.029 ± 0.009	0.046 ± 0.013	0.190
Plasma urea nitrogen (mg/dL)			
ad libitum feeding	15.0 ± 0.9	13.0 ± 0.7	0.079

Values are means ± SE (n=10)

区)であり、NRC⁹⁾のリジン要求量(1.53%)を大きく上回っている。飼料効率が改善されなかった我々の以前の報告⁷⁾におけるリジン含量は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。今回および昨年度の結果はいずれも飼料摂取量に差はなく、結果として飼料効率の有意な改善が認められたことから、離乳子豚のアミノ酸要求量はかなり高くなっているものと推測される。

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トウモロコシ区よりも低くなる傾向が見られた($p=0.079$)。この結果は昨年度の結果と比べて p 値は大きくなったが、これは今年度の飼料中タンパク質含量を高めた結果、尿素態窒素濃度の値が高くなり、その結果、差が現れにくくなったものと思われる。しかし両試験区間で傾向は認められるため、昨年度とほぼ同様な結果が得られたものと解釈できる。昨年度は血漿中インスリン、グルコース濃度いずれも有意に飼料用米区で高くなったが、今年度は同じサ

Table 4 Liver lysine-ketoglutarate reductase (LKR) and threonine dehydrogenase (TDH) activities in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	<i>p</i> -value
LKR			
$\mu\text{mole/min/g liver}$	1.34 $\pm$ 0.09	1.01 $\pm$ 0.08	0.013
TDH			
$\mu\text{mole/min/g liver}$	1.56 $\pm$ 0.23	1.24 $\pm$ 0.22	0.323

Values are means $\pm$ SE (n=10)

Table 5 Relative mRNA expressions of liver lysine-ketoglutarate reductase (LKR) and loin muscle branched chain keto acids dehydrogenase (BCKDH) of piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	<i>p</i> -value
LKR	1.000 $\pm$ 0.153	0.684 $\pm$ 0.082	0.091
BCKDH	1.000 $\pm$ 0.355	0.719 $\pm$ 0.162	0.484

The normalized expression ratio in the corn group is set to 1.000

Values are mean $\pm$ SE (n=10)

ンプリング条件下（絶食再給餌）の値においても飼料用米区で数値自体は高くなったが有意差は見られなかった。これもおそらく今年度の高タンパク質飼料が影響しているかもしれない。一方、不断給餌条件下のサンプルでは、インスリン濃度は有意ではないが飼料用米区で逆に低い値を示した。飼養成績や血漿中尿素態窒素濃度、肝臓LKR活性の変動を考慮すると、体内でのインスリン作用は飼料用米区で強く働いているように思われる。それにもかかわらず飼料用米区でインスリン濃度が低かったことは、インスリン感受性が飼料用米区で高まっていたのかもしれない。

肝臓のLKR活性およびTDH活性をTable 4 に示した。LKR活性は飼料用米区で有意 ($p = 0.013$) に低くなり、TDH活性は有意ではなかったが、低い数値を示した。また、肝臓のLKR mRNA発現量およびロース筋肉中のBCKDH mRNA発現量をTable 5 に示した。LKR mRNA発現量は飼料用米区で低くなる傾向 ($p = 0.091$) が認められた。この結果は肝臓でのリジンの分解が抑制さ

れ、リジンの再利用が高まっていることを示唆している。ロース筋肉中のBCKDH mRNA発現量は両試験区間で差は認められなかった。分岐鎖アミノ酸の分解系は筋肉におけるBCKDHのリン酸化によって制御されているとされている。したがってBCKDHリン酸化酵素活性やBCKDHのタンパク質量、さらに筋肉ではなく肝臓におけるこれらの変化も必ずしも明確にはされておらず、詳細な検討が今後必要である。

血漿中の遊離アミノ酸濃度について、バリンのみ飼料用米区で有意に上昇し、イソロイシンは高くなる傾向 ($p = 0.071$) が見られた (Table 6)。この結果は昨年度の結果よりも変動が緩やかであり、尿素態窒素濃度と同様な違いであった。この違いも飼料中の高タンパク質含量が影響し、両試験区間の差が現れにくくなったものと考えられる。

4. 要 約

高タンパク質飼料を用いて離乳子豚への飼料用米給与を飼養成績およびタンパク質（アミノ酸）

Table 6 Plasma free amino acids concentrations in piglets fed a diet with corn or rice.

	Corn	Rice	<i>p</i> -value
Essential amino acids, $\mu\text{mol/L}$			
Threonine	355 $\pm$ 18	408 $\pm$ 49	0.255
Valine	292 $\pm$ 27	390 $\pm$ 52	0.009
Methionine	157 $\pm$ 23	135 $\pm$ 18	0.23
Isoleucine	175 $\pm$ 16	229 $\pm$ 33	0.071
Leucine	223 $\pm$ 13	219 $\pm$ 27	0.844
Phenylalanine	113 $\pm$ 8	115 $\pm$ 16	0.849
Histidine	102 $\pm$ 10	100 $\pm$ 17	0.839
Lysine	217 $\pm$ 10	207 $\pm$ 43	0.849
Arginine	262 $\pm$ 28	226 $\pm$ 46	0.518
Tryptophan	112 $\pm$ 18	99 $\pm$ 18	0.073
Nonessential amino acids, $\mu\text{mol/L}$			
Aspartic acid	26 $\pm$ 7	21 $\pm$ 3	0.320
Serine	212 $\pm$ 17	214 $\pm$ 26	0.929
glutamic acid	174 $\pm$ 22	171 $\pm$ 16	0.820
Glycine	1097 $\pm$ 53	1187 $\pm$ 105	0.463
Alanine	148 $\pm$ 27	428 $\pm$ 44	0.809
Tyrosine	157 $\pm$ 7	171 $\pm$ 17	0.506

Values are means $\pm$ SE (n=10)

代謝に及ぼす影響について検討を行った。高タンパク質飼料を用いた理由はすべてのアミノ酸が確実に十分量満たされるようにしたためである。日増体量および飼料効率も飼料用米区がトウモロコシ区よりも優れる結果を示した。血漿中の尿素態窒素濃度は飼料用米区で低くなる傾向が見られ、また、グルコースおよびインスリン濃度は不断給餌条件下のサンプルでは有意差は認められなかった。肝臓におけるリジン分解酵素（LKR）活性は飼料用米区でトウモロコシ区よりも有意（ $p=0.013$ ）に低くなった。同様にLKR mRNA発現量も低くなる傾向（ $p=0.091$ ）が認められた。このことはおそらく飼料用米給与によって体内でのリジン分解は抑制されているものと示唆される。豚にとってもっとも重要な必須アミノ酸であるリジン（要求量が高く、かつもっとも欠乏しやすい）の分解が抑制され、再利用が高まっていることは豚の栄養状態にとってきわめて好ましいことである。

これらの結果は、離乳子豚に飼料用米を給与す

ると、飼料中のアミノ酸が十分量存在している時は増体のみならず飼料効率も改善され、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方向に変動することを示している。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.
- 7) 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.
- 8) 高田良三, 香川龍太郎, 立原可南子 : 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, 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書VOL.36. 356~361, 2018.
- 9) National Research Council, Nutrient Requirement of Swine, 211, National Academic Press, Washington, D.C., 2012.

カリウムおよびセシウムの含量が低い国産実用牧草品種の選抜と育種に向けた植物生理学的解析

Species and cultivar selection for low potassium and low cesium in grasses

小 林 奈通子・二 瓶 直 登

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Natsuko I. Kobayashi and Naoto Nihei

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

Identifying the low-Cs grass cultivars among the cultivars commercially grown in Japan is an important issue to achieve the recycle-based cattle farming in the radiocaesium contaminated area. For the health of cows, low-K is also the important property of grass. In this study, mineral contents and Cs uptake characteristics in five domestic cultivars were investigated to identify the cultivars having low-Cs and low-K property, which can be good materials for breeding. Plants were grown in pots filled with forest soil contaminated by Cs-137 (9000 Bq/kg) in a plant-growth chamber, and the contents of K, Ca, Mg, Na, and also Cs-137 in shoot parts were determined. The result showed that Potomac (orchard grass) accumulated Cs-137 two times as high as ryegrass cultivars. The K concentration in Regro (meadow fescue) was higher than other cultivars. Regro also showed the lowest Cs/K ratio, suggesting this cultivar can be useful for producing a cultivar having good K selectivity over Cs. Then, three ryegrass cultivars, Hitachihikari (Italian ryegrass), Akiaoba Ⅲ (Italian ryegrass), Yatsuyutaka (perennial ryegrass), were cultivated in the field in Iitate village, Fukushima, for further evaluation. The concentration of K in the three cultivars was not different among them, while the Cs-137 and Ca concentration was higher in Hitachihikari comparing with Yatsuyutaka. Additionally, the experiment using Cs-137 as a radiotracer indicated that root Cs⁺ uptake rate (pmol/mm root length/20 min) was high in Hitachihikari. Considering that the concentrations of available K in forest soil and the field soil were 5.3mg/100g (low-K) and 17.2mg/100g (intermediate-K), respectively, Yatsuyutaka can be a candidate as a cultivar having low-K and low-Cs concentration under various environment. Further experiment is needed to determine the K and Cs uptake properties in this cultivar.

1. 目 的

本研究は、国産でまかなうべき牧草において、牛のために低カリウムで、かつ食の安全に資するために低セシウムである品種を選抜する技術の開

発を目指すものである。飼料作物の安定的かつ低コストでの生産のためには、有用品種を作出することが重要な要素となっている。有用品種に求められる形質には、減肥条件での高い生産性など複数あるが、チェルノブイリでの事故以降、放射性

物質を吸収しにくいことも重要な形質と考えられるようになった。

牧草以外の農作物の生産においては、カリウム (K) を増肥することでCs吸収を十分に抑制できることが学術的な知見とともに認知されているが^{1, 2)}、草地へのK増肥は栽培コストの上昇につながるうえ、牧草中のK濃度の上昇は牛にグラステタニーを引き起こすことから³⁾、持続的な対処法としては不十分である。このような中、国内でも、福島第一原子力発電所の事故のあと2012年度には食品の放射性セシウム (Cs) 濃度に100Bq/kgという基準値が定められたこともあり (https://www.mhlw.go.jp/shinsai_jouhou/shokuhin.html)、いかなる環境においても常にKとCsの含量が低い品種へのニーズが高まっている。そして、有用品種の作出のためには、国内の既存の草種・品種について、KとCsの濃度に関する情報の集積が欠かせない。特に、除染後の農地を使い、飼料生産と合わせた畜産業を再開する動きも広がっていることから、低Cs品種の特定は喫緊の課題と言える。そこで本研究では、国内の実用品種の中でのKとCs濃度の草種・品種間差を明らかにし、さらに、牧草の持つCsの吸収特性を実験的に明示することを通して、変動する栽培環境下においても低K濃度と低Cs濃度という表現型を安定して示す品種を特定し、有用品種作出に向けた材料として提示することを目的とした。

2. 方 法

2.1 植物育成器でのポット栽培試験

福島県飯舘村小宮地区の山林土壌を用いて牧草をポット栽培し、地上部に含まれるCs-137, K, カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), ナトリウム (Na) の含量を調べた。使用した土壌のCs-137濃度は約9000Bq/kgであり、1 M酢酸アンモ

ニウムで抽出される乾土100 gあたりの可給態イオン濃度は、K 5.3mg, Ca 5.0mg, Mg 0.76mg, 水抽出画分のpHは4.0であった。

牧草はポトマック (オーチャードグラス), アキアオバⅢ (イタリアンライグラス), ヤツユタカ (ペレニアルライグラス), リグロ (メドーフェスク), ヒタチヒカリ (イタリアンライグラス) の5種類であり、それぞれを3ポットずつ植物育成器 (25℃, L/D=12h/12h) で栽培した。播種から1ヵ月後に地上部を刈り取り、乾熱器で乾燥させ、プラスチックバイアルに充填し、ガンマカウンター (Wizard2, PerkinElmer) でCs-137を定量した。測定後のサンプルに、硝酸を添加し90℃に加温して完全に分解し、分解液を超純水で適宜希釈した後にICP発光分光分析装置 (Optima 7300, PerkinElmer) で無機元素濃度を測定した。

2.2 畑地での栽培試験

福島県飯舘村小宮地区の畑地でアキアオバⅢ (イタリアンライグラス), ヤツユタカ (ペレニアルライグラス), ヒタチヒカリ (イタリアンライグラス) を栽培し、地上部に含まれるCs-137, K, Ca, Mg, Na濃度を調べた。畑地土壌のCs-137濃度は10000Bq/kg, 交換性K濃度は17.2mg/100乾土, pH6.2であった。2018年6月に播種し、9月に収穫した。無機元素および放射線の測定方法は2.1に記述したとおりである。

2.3 Cs-137を用いたトレーサー試験

寒天培地でヤツユタカ (ペレニアルライグラス), ヒタチヒカリ (イタリアンライグラス) を10日間栽培し、Cs-137を添加した寒天培地 (吸収培地) に移植し、20分後の植物のCs-137含量と根長を測定することで、根の単位長当たりのCs⁺吸収速度を算出した。寒天培地の基本組成は1/2木村氏B液⁴⁾ (0.27mM K) に塩化セシウムを0.1 μM添加したものとした。吸収培地のK濃度は

0.03mM, 0.27 mM, および 3 mM に調整した。Cs-137 を吸収させた牧草の根を純粋で洗浄したあと、地上部と根に切り分け、両面テープを貼り付けた台紙に貼り、ラップで覆い、イメージングプレート (BAS-IP-MS, GE Healthcare) に密着させた。イメージングプレートは FLA5000 イメージリーダー (FujiFilm) を用いて読み取った。Cs-137 のシグナル (PSL) 強度に基づいて 20 分間に吸収された Cs⁺ 量を算出した⁵⁾。

3. 結果と考察

ポット栽培した牧草 5 品種の無機元素濃度の平均値は、K は 3.58mg/g, Ca は 1.21mg/g, Mg は 0.83mg/g, Na は 1.37mg/g であった。また、Cs-137 濃度の平均は 4.2Bq/g であり、移行係数の平均値は 0.47 となった。ポット栽培に利用した山林土壌は K 濃度が 5.3mg/100 g 乾土であり、作物栽培用の農地土壌の K 濃度に比べると非常に低い。したがって、本実験の結果は無施肥で貧栄養条件での牧草の無機元素濃度と捉えることができる。5 品種の無機元素含量を比較したところ、オーチャードグラスであるポトマックの Cs-137 がきわめて高く、5 品種での平均値の 2 倍に達した (Fig. 1)。オーチャードグラスの放射性セシウム含量がイタリアンライグラスよりも高いことは福島県農業センターによる試験結果 (www4.pref.fukushima.jp/nougyou-centre/kenkyuseika/h27_radiologic/h27_radiologic_33_og-ir.pdf) とも一致するものであった。一方、メドーフェスクであるリグロは、K, Ca, Mg 濃度が高い傾向を示した (Fig. 1)。また、Cs 吸収機構の重要な指標である Cs/K 濃度比についてはリグロが 0.34 であり、他の品種が 1 以上であったことから、高い K 選択性を持つ K 吸収機構を備えた品種としてリグロは有望であると思われた。さらに、イタリアンライグラスであるアキアオバⅢとヒタチヒカ

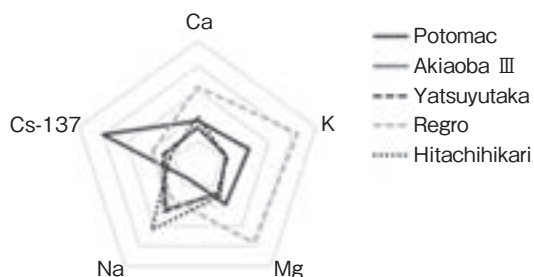


Fig. 1

Relative concentrations of elements in the shoot of 5 grass cultivars. Grasses were grown in the pots placed in the plant growth chamber. Contents of Ca, K, Mg, and Na were measured using ICP-OES, and Cs-137 was determined using Ge semiconductor radiation detector. The concentration values relative to the mean concentration in 5 cultivars were plotted.

り、およびペレニアルライグラスであるヤツユタカは Cs-137 と K 濃度がともに低いことから、低 K 濃度と低 Cs 濃度という表現型を示す品種として有望と思われた。そこでこれら 3 品種を畑地での栽培試験に供することにした。

2018 年の夏季に畑地で栽培した牧草地上部の無機元素濃度と Cs-137 濃度を Table 1 に示す。K 濃度は 3 品種間で有意差はなく、いずれもポット栽培での結果の約 10 倍の濃度であった。これは、畑地土壌の K 濃度はポット栽培で利用した山林土壌の約 3 倍であり、また、pH も 6.2 と高く、根が K⁺ を吸収しやすい土壌環境であったことが原因と考えられた。Cs-137 と Ca 濃度は、ヒタチヒカリが最も高いという結果となった (Table 1)。ヒタチヒカリの移行係数は 0.014、アキアオバⅢとヤツユタカの移行係数はおよそ 0.0085 であった。ポット栽培時よりも移行係数が大きく低下しており、この原因としても土壌中の可給態 K 濃度が高かったことが考えられた。ただし、今回の栽培試験は、播種適期を過ぎてから開始したため、牧草の草勢がやや悪くなってしまった。本試験結果を確認するためにも、今後も数年にわたって繰り返

Table 1

Concentration of elements in the shoot of 3 grass cultivars grown in the grass field. Means and standard deviations (within brackets) were presented (N=3) .

	Ca (mg/g)	K (mg/g)	Mg (mg/g)	Na (mg/g)	Cs-137 (Bq/kg)
Hitachihikari	5.80 (1.44)	32.5 (7.29)	2.32 (0.256)	0.65 (0.037)	136.7 (31.5)
Akiaoba III	2.81 (0.85)	28.8 (1.65)	1.69 (0.440)	0.49 (0.017)	85.1 (16.7)
Yatsuyutaka	3.07 (0.20)	25.3 (6.17)	2.01 (0.260)	0.59 (0.105)	86.0 (65.0)

し栽培試験を行う必要があると考える。

ヒタチヒカリとヤツユタカのCs-137含量の違いが (Table 1) , 根によるCs⁺吸収速度の違いによるものである可能性を検証するため、寒天培地で栽培した幼植物を用いたトレーサー試験を行った。Kを0.27mMとCsを0.1 μM含む完全栄養培地上で生育したヤツユタカのCs⁺吸収速度は0.0037~0.0052pmol/mm/20minであり、共存するKの濃度によらなかった (Fig. 2)。一方、ヒタチヒカリのCs⁺吸収速度は0.0056~0.0073pmol/mm/20minと、ヤツユタカよりも高い傾向を示した (Fig. 2)。また、ヒタチヒカリについては、共存するKの濃度が0.03mMの場合、何本かの根のCs⁺吸収速度が大きく高まる様子が観察された (data not shown)。

植物の根によるCs⁺の吸収に対して、K施肥は抑制的に作用することが知られている。そのメカニズムは完全には解明されていないが、大まかに、①両元素間での競合と、②Cs⁺透過性K輸送体の発現抑制、に分けることができる⁶⁾。イネを用いて行ったCs-137トレーサー実験によると、Cs-137吸収時の溶液中のK濃度が0.02mMの場合のCs⁺吸収速度は、K濃度が0.25mMの場合の約7倍に高まることが分かっている⁵⁾。つまり、イネにおいてはCs⁺とK⁺の競合関係は明白である。ところが今回の研究の結果、ライグラス種では両元素間での競合はイネに比べると緩やかであることが示唆された (Fig. 2)。同様の傾向はコムギでもK欠乏ではない場合に見られることが報告され

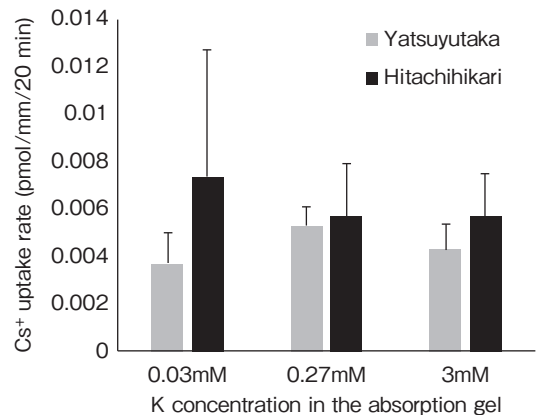


Fig. 2

Uptake kinetics of Cs⁺ in the 2 selected cultivars. Grasses were grown on the nutrient agar-gel plates, and were put on the gel containing Cs-137 for 20 min for absorption. The concentration of K in the absorption gel were varied (0.03, 0.27, 3 mM), while the concentration of Cs was kept to 0.1 μM. Means and standard deviations were presented (N = 4 ~ 6).

ている⁶⁾。したがって、K施肥による牧草のCs含量の低下は、②の作用によるところが大きい可能性が考えられた。この作用は、K輸送体のCs⁺透過能やK環境に応じた発現量など、ゲノム構造によってその大小が定まると考えられる。ヒタチヒカリとヤツユタカが低K土壌でK濃度とCs-137濃度がともに低く、さらに、土壌中のK濃度がやや高くなるとヤツユタカのCs含量がヒタチヒカリよりもさらに低くなったことから、環境条件によらず低K濃度と低Cs濃度という表現型を示す品種としてヤツユタカは有望であり、今後さらに条件を変えて試験を続ける必要性を示したものと

結論付けられた。

4. 要 約

除染後の農地を使い、飼料生産と合わせた畜産業を再開する動きも広がっている現在においては、低Cs品種の特定は喫緊の課題と言える。そこで本研究では、変動する栽培環境下においても牛のために低カリウムで、かつ食の安全に資するために低セシウムという表現型を安定して示す品種を特定し、有用品種作出に向けた材料として提示することを目的とした。そのため、本研究においてはCs-137を含む土壌を用いたポット試験と、福島県飯舘村の畑地での栽培試験、およびCs-137を用いたトレーサー実験を実施し、国内の実用品種の中でのKとCs濃度の草種・品種間差を調べた。ポット試験の結果、ポトマック（オーチャードグラス）のCs-137濃度がライグラス種の約2倍であること、リグロ（メドーフェスク）のK濃度が高いことが分かった。ライグラス種3品種を畑地で栽培したところ、ヒタチヒカリ（イ

タリアンライグラス）のCs-137濃度はヤツユタカ（ベレニアルライグラス）よりも高く、また、トレーサー実験においてもヒタチヒカリのCs⁺吸収速度がヤツユタカよりもやや高い傾向を示した。これら一連の結果は、Csを吸収しにくい実用品種としてヤツユタカは有望な品種であり、今後、より詳細な実験を行っていく必要があることを示すものと考えられた。

文 献

- 1) Kato, N., Kihou, N., Fujimura, S., Ikeba, M., Miyazaki, N., Saito, Y., Eguchi, T., Itoh, S.: *Soil Science and Plant Nutrition*, **61**, 179~190, 2015.
- 2) Zhu, Y-G., Smolders, E.: *Journal of Experimental Botany*, **51**, 1635~1645, 2000.
- 3) Kemp, A., t'Hart, M. L.: *Netherlands Journal of Agricultural Science*, **5**, 4~17, 1957.
- 4) Kobayashi, N. I., Saito, T., Iwata, N., Ohmae, Y., Iwata, R., Tanoi, K., Nakanishi, T. M.: *Physiologia Plantarum*, **148**, 490~501, 2013.
- 5) Kobayashi, N. I., Sugita, R., Nobori, T., Tanoi, K., Nakanishi, T. M.: *Functional Plant Biology*, **43**, 151~160, 2016.
- 6) Zhu, Y-G., Shaw, G., Nisbet, A. F., Wilkins, B. T.: *Plant and Soil*, **220**, 27~34, 2000.

妊娠末期の乳用牛へのバイパスリジン給与がその産子の栄養代謝へ及ぼす影響

Effect of rumen-protected lysine supplementation during late gestation period in dairy cattle on metabolic status in their calves

川 島 千 帆・山 岸 則 夫

(帯広畜産大学畜産学部)

Chiho Kawashima and Norio Yamagishi

(School of Agriculture and Animal Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Holstein heifers are received embryo transfer or artificial insemination of Japanese Black cattle in order to avoid dystocia. However, there is little information on nutritional requirements in the case of difference of breeds between dams and fetuses. The aim of the present study was to compare nutritional parameters in blood of Holstein late-pregnant heifers with same or different breed fetus, umbilical cords and their calves immediately after birth. In addition, we investigated the effect of supplementation of lysine, which is one of the essential amino acid of dairy cattle, on nutritional parameters in blood. We used 25 Holstein late-pregnant heifers. Number of Holstein and beef (Japanese Black cattle and F1) fetuses were 11 (Lysine : n=6, Control : n=5) and 14 (Lysine : n=4 and 3, Control : n=4 and 3), respectively. Blood samples were obtained from dams at 2 and 1 weeks before expected calving and after calving, umbilical cords at calving and their calves immediately after birth for measurement of metabolites, metabolic hormones and amino acids. Statistical analyses were carried out between lysine supplementation and control group in Holstein or beef fetuses for evaluation of the effect of lysine supplementation, and between Holstein and beef fetuses without lysine supplementation for evaluation of the effect of breed. The dams with Holstein fetus were lower energy status compared with the others with beef fetus. On the other hand, mother cattle with beef fetus supplied lysine showed higher blood lysine and total amino acid concentrations at calving. However, blood amino acid concentrations in umbilical cord and calves were lower in beef than Holstein. Overall, our results indicated that energy status of dams and supply of amino acid from mothers to fetuses were differ depending on the breeds of fetuses in Holstein late-pregnant heifers.

1. 目 的

近年、離農数増加による肉用素牛の確保が難しく価格の高騰は続いており、乳牛に肉用種の受精卵や精液を用いて素牛を確保している現状があ

る。牛の多くは群で飼育され一元的な管理を受けるが、同一の飼育管理下でも生まれながらに病気になりにくい牛や繁殖性が良好な牛がいる。ヒトやラットでは妊娠期の低栄養がその産子の疾病罹患率や生殖能力、栄養代謝に悪影響を及ぼすこと

が知られており^{1~5)}、牛においても胎子環境が影響している可能性が考えられる。日本飼養標準では乳牛に肉用種を妊娠させた場合の栄養要求量は、肉用種に同品種を妊娠させた場合に比べてやや高く、一方、乳牛に同品種と肉用種を妊娠させた場合を比較すると、後者では出生時体重が小さく養分要求量も少ないことが示されている⁶⁾。しかし、生産現場では未経産牛に肉用種の精液や受精卵を用いて妊娠させた場合でも、ホルスタイン種を妊娠させた場合と同じ飼育管理が行われている。

牛の胎子における主要な栄養源はグルコースとアミノ酸である⁷⁾。グルコースは母牛と胎子の血中濃度差に応じて供給されるため、妊娠末期の母牛のインスリン抵抗性が強く関与する⁸⁾。一方、アミノ酸は母牛と胎子の血中濃度差に関係なく、能動輸送で胎子に取り込まれるため、あまり重要視されてこなかったが、牛と同様の胎盤構造を持つ羊では、母体が低栄養の場合、胎子へのアミノ酸供給が減少する⁹⁾。未経産牛は生物学的には育成期であり、アミノ酸は胎子への供給だけでなく自身の成長にも必要とされる。そのため、胎子が急成長する妊娠末期の未経産牛は低栄養の可能性がある。

そこで本研究では、乳用種（ホルスタイン種）の母牛に胎子が同品種である場合と肉用種（黒毛和種・F1）である場合の妊娠末期の母牛や分娩時の母牛、臍帯および出生直後の子牛の血液性状の比較に加え、乳牛の必須アミノ酸であり、制限アミノ酸にもなりやすいリジンの給与による血液性状の変化を確認することで、同種または異種妊娠の未経産牛やその胎子におけるアミノ酸の重要性を検討することとした。

2. 方 法

本試験は帯広畜産大学動物実験等に関する規定

に基づき実施した（承認番号#18-127）。2018年5-12月に分娩予定のホルスタイン種未経産妊娠牛25頭とその産子を用いた。胎子の品種はホルスタイン種11頭、黒毛和種8頭、黒毛和種とのF1が6頭であった。実験対象牛にグラスサイレージとコーンサイレージに乾乳用配合飼料を加えた完全混合飼料を給与し、乾草や鈹塩、水は自由摂取とした。分娩予定季節と胎子品種、母牛の体格や月齢に偏りがないようにルーメンバイパスリジン給与群（ホルスタイン種；6頭、黒毛和種；4頭、F1；3頭）と対照群（ホルスタイン種；5頭、黒毛和種；4頭、F1；3頭）を設定した。給与群には、味の素ヘルシーサプライ株式会社のAjipro-L100g/日/頭を米ぬか30gと混合して分娩予定14日前から分娩まで毎日給与した（有効リジン含量、25g/製品100g）。対照群には米ぬか30gを同期間に給与した。血液は、母牛では分娩予定2週前（給与前）と1週前、分娩直後の計3回、尾静脈から採取し、分娩時の臍帯静脈血は娩出直後の臍帯が切れる前に鉗子でクランプし、子牛側の臍帯を鈍性に切断した後、母牛側の臍静脈から採取した。出生直後の子牛は初乳摂取前に頸静脈から採血した。また、分娩状況や出生直後の子牛の体重を記録した。採取した血液から糖代謝、脂質代謝、タンパク代謝および肝機能に関連する代謝物と代謝ホルモン濃度、27種類のアミノ酸濃度を測定した。

リジン給与群のホルスタイン種妊娠牛2頭は予定日より1週間以上早く分娩したため解析から除外した。加えて、リジン給与群のホルスタイン種妊娠牛の産子1頭と黒毛和種妊娠の産子1頭、対照群の黒毛和種妊娠の産子2頭が死産のため臍帯と子牛の血液採取ができず、リジン給与群の黒毛和種妊娠1頭と対照群のホルスタイン種妊娠1頭、F1妊娠2頭の臍帯静脈血を採取できなかったため、黒毛和種とF1を合わせて肉用種として

統計解析を行った。さらにシステインは測定限界値以下のサンプルが多く解析から除外した。リジン給与効果をホルスタイン種妊娠のリジン給与群 (Hol-Lys) と対照群 (Hol-Cnt) 間、肉用種妊娠のリジン給与群 (Beef-Lys) と対照群 (Beef-Cnt) 間、胎子品種間の比較を対照群のホルスタイン種妊娠 (Hol-Cnt) と肉用種妊娠 (Beef-Cnt) 間で確認するため、データの正規性を検定した後、スチューデントの t 検定またはマンホイットニーの U 検定を行った。 $p < 0.05$ を有意差ありとし、データは平均 $\pm$ 標準誤差で示した。

3. 結果と考察

3.1 分娩予定2週および1週前の母牛の血液性状

Fig. 1 に分娩予定2週前と1週前の母牛の血中代謝物およびインスリン濃度を、Fig. 2 に血中リジン、総必須アミノ酸、総非必須アミノ酸、総アミノ酸濃度および総アミノ酸中のリジン割合を示した。

分娩予定2週前の血中インスリン濃度は、両品種ともにリジン給与群に比べて対照群で低かったが (Fig. 1, $p < 0.05$)、1週前に差はなくなり、他の血中代謝物やアミノ酸濃度は両群間に差はなかったため、試験処理設定に問題はないと考えられた。分娩予定1週前の血中AST活性値はホルスタイン種妊娠のリジン給与群に比べて対照群で高くなったが (Fig. 1, $p < 0.05$)、適正範囲内であり¹⁰⁾、肉用種妊娠の母牛では両群間に差はないこと、その他の肝機能指標 (アルブミン、ビリルビンおよびGGT) に差はないことから、リジン給与と肝機能との関連性はないと考えられた。また、両品種ともに分娩予定1週前の各アミノ酸濃度の群間の差はなく、リジン給与の影響は認められなかったが、ホルスタイン種妊娠牛のリジン給与群は対照群に比べて、総アミノ酸中のリジン割

合が高かった (Fig. 2, $p < 0.05$)。乳牛にリジンを給与した既報では、血中リジン濃度が増加する場合や変化しない場合があり、また、リジンを給与することでその他のアミノ酸が利用され、血中の総アミノ酸濃度が減少するなど、対象牛のアミノ酸吸収や組織での利用等のさまざまな要因に影響を受けると考えられている^{11~13)}。本試験のホルスタイン種妊娠のリジン給与群では、有意差はないものの分娩に向けた採食量低下に伴う血中リジン濃度低下やリジン給与による他のアミノ酸利用率増加による血中総アミノ酸濃度低下が起り、総アミノ酸中のリジン割合が高くなったと推察された。一方、肉用種妊娠ではこのような変化が認められなかった。その理由は本試験では明らかにできないが、胎子品種の違いにより妊娠期間中の母体のアミノ酸充足率が異なる等の差異があるのかもしれない。

3.2 分娩直後の母牛、臍帯および出生直後の子牛の血液性状

Fig. 3 に分娩直後の母牛、臍帯および出生直後の子牛の血中代謝物およびインスリン濃度、Fig. 4 に血中リジン、総必須アミノ酸、総非必須アミノ酸、総アミノ酸濃度および総アミノ酸中のリジン割合を示した。

ホルスタイン種妊娠において、分娩直後の母牛はリジン給与群の方が対照群に比べて、血中インスリン濃度が高く (Fig. 3, $p < 0.05$)、NEFAおよびBHBA濃度が低かったが (Fig. 3, $p < 0.05$)、臍帯静脈血のNEFA濃度はリジン給与群の方が高かった (Fig. 3, $p < 0.05$)。肉用種妊娠のリジン給与群では、分娩直後の母牛の血中リジン濃度と総アミノ酸濃度が高かった (Fig. 4, $p < 0.05$)。他の項目において、両品種ともに群間による差はなかった。インスリンはエネルギー状態、NEFAはエネルギー不足時の体脂肪動員、BHBAは脂質代謝異常の指標であることから^{14~16)}、ホルスタイ

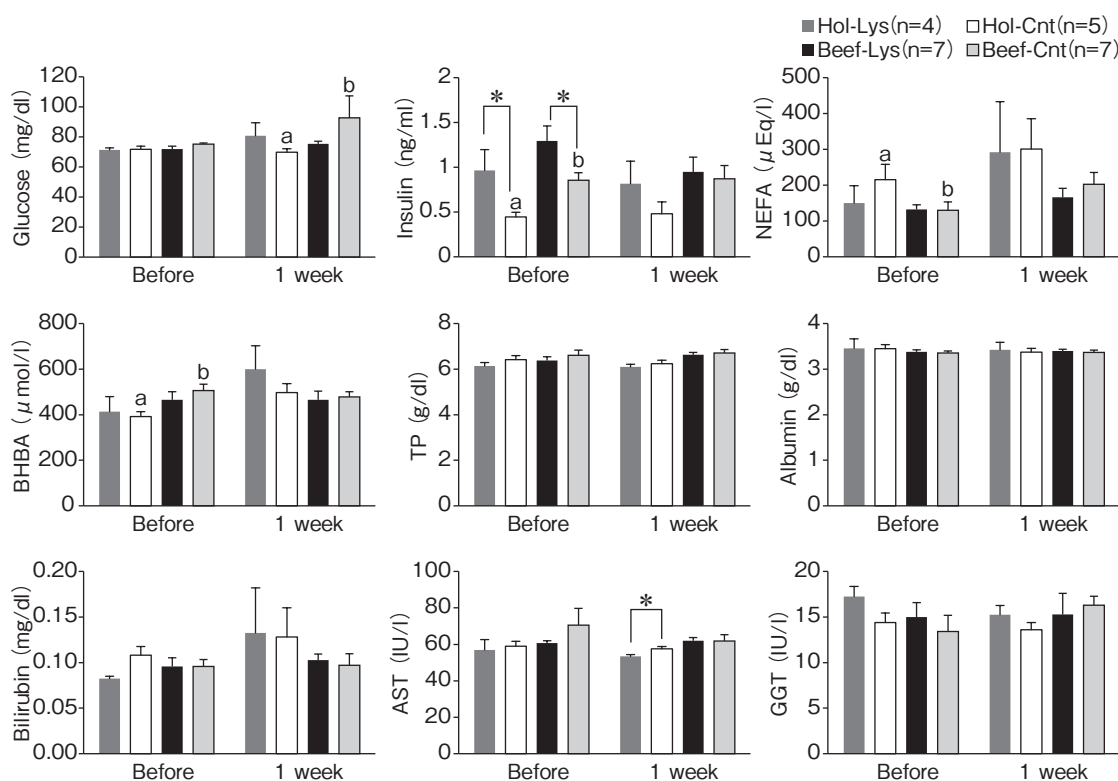


Fig. 1 Blood metabolites and metabolic hormone concentrations before and 1 week after supplementation in dams.

Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

* : $p < 0.05$ (Hol-Lys vs. Hol-Cnt, or Beef-Lys vs. Beef-Cnt)

a, b : $p < 0.05$ (Hol-Cnt vs. Beef-Cnt)

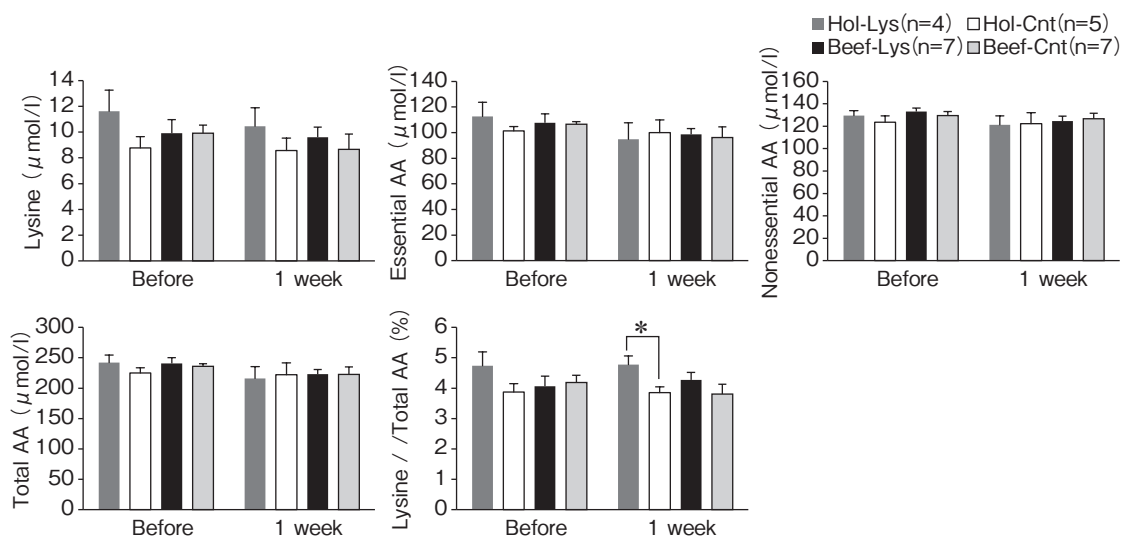


Fig. 2 Blood amino acid (AA) concentrations and the ratio of lysine in total AA before and 1 week after supplementation in dams.

Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

* : $p < 0.05$ (Hol-Lys vs. Hol-Cnt, or Beef-Lys vs. Beef-Cnt)

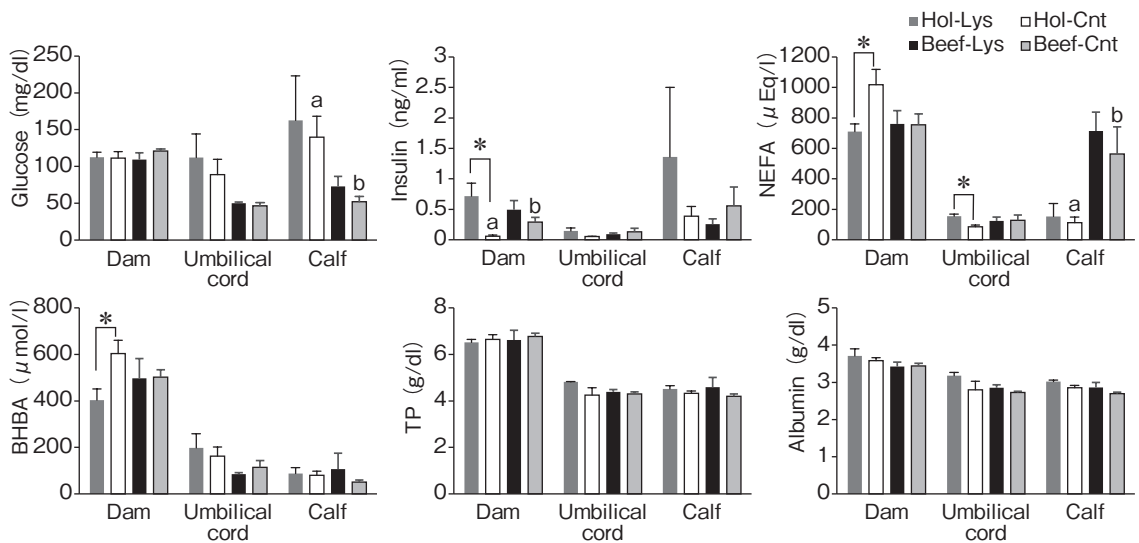


Fig. 3 Blood metabolites and metabolic hormone concentrations immediately after calving in dams, umbilical cords and calves.

Number of dam, umbilical cord and calf were 4, 3, and 3 in Hol-Lys, 5, 4, and 5 in Hol-Cnt, 7, 5, and 6 in Beef-Lys and 7, 3, and 5 in Beef-Cnt, respectively. Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

* : $p < 0.05$ (Hol-Lys vs. Hol-Cnt, or Beef-Lys vs. Beef-Cnt)

a, b : $p < 0.05$ (Hol-Cnt vs. Beef-Cnt)

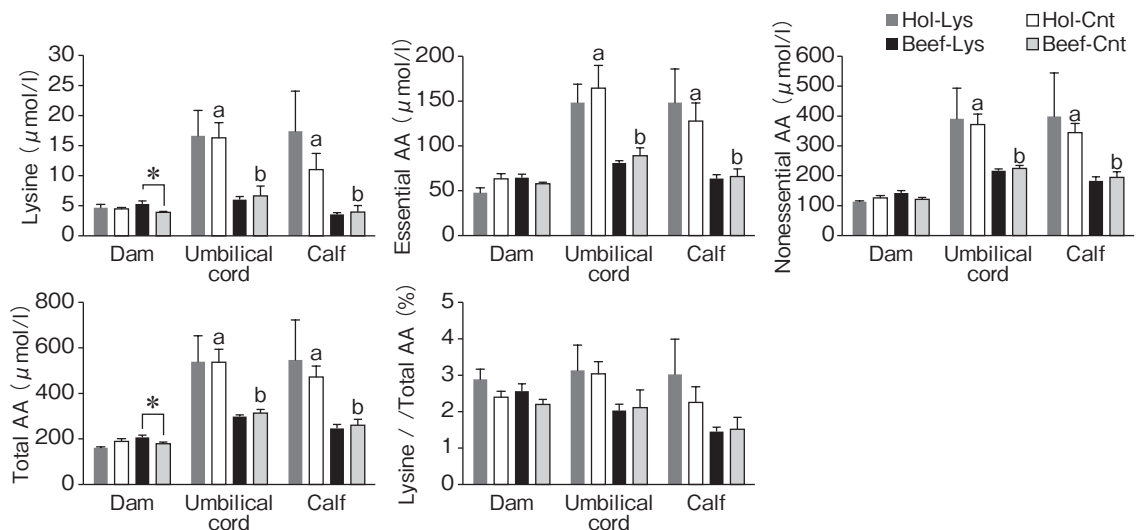


Fig. 4 Blood AA concentrations and the ratio of lysine in total AA immediately after calving in dams, umbilical cords and calves.

Number of dam, umbilical cord and calf were 4, 3, and 3 in Hol-Lys, 5, 4, and 5 in Hol-Cnt, 7, 5, and 6 in Beef-Lys and 7, 3, and 5 in Beef-Cnt, respectively. Data are presented as the mean $\pm$ SEM.

* : $p < 0.05$ (Hol-Lys vs. Hol-Cnt, or Beef-Lys vs. Beef-Cnt)

a, b : $p < 0.05$ (Hol-Cnt vs. Beef-Cnt)

ン種妊娠において、給与されたりジンはエネルギーとして利用された可能性がある。一方、肉用種妊娠では約2週間にわたり給与されたりジンは余剰となり血中濃度に反映されたことが考えられる。また、胎子品種による差異を両品種の対照群間で比較したところ、ホルスタイン種妊娠の方が母牛の血中インスリン濃度は低く (Fig. 3, $p < 0.05$), 一方で子牛の血中グルコース濃度は高く (Fig. 3, $p < 0.05$), また, Fig. 4 で示したすべての臍帯静脈血と子牛の血中アミノ酸濃度はホルスタイン種の方が高かった (Fig. 4, $p < 0.05$)。以上より、本試験における胎子品種間やリジン給与時の血液性状の変化の違いがもたらされた要因として、①ホルスタイン種胎子の体重が重く、より多くのグルコースやアミノ酸を必要とする (ホルスタイン種42kg, 肉用種35kg, $p < 0.05$), ②母牛と胎子の品種の違いが母から胎子への栄養供給を妨げるという2つの可能性があげられ、その特定には臍帯の機能の違いも含めたさらなる検証が必要であると思われる。しかし、本試験の結果だけでも胎子品種の違いにより母牛のエネルギー状態や胎子のアミノ酸要求量が異なることは明白であり、胎子品種に合わせた飼養管理の構築が必要であることが明らかとなった。

4. 要 約

肥育素牛確保や難産回避のため、ホルスタイン種に黒毛和種の精液授精や受精卵移植が行われているが、その場合の母牛や胎子の栄養要求に関する情報は少ない。そこで胎子品種が異なる乳用未經産牛の妊娠末期と分娩直後、分娩時の臍帯やその産子の血中代謝物・代謝ホルモン・アミノ酸濃度を牛の必須アミノ酸の一つであるリジン給与の影響も含めて比較した。胎子がホルスタイン種 (リジン給与; 6頭, 対照; 5頭) と肉用種 (リジン給与黒毛和種; 4頭・F1; 3頭, 対照黒毛

和種; 4頭・F1; 3頭) のホルスタイン種未經産牛25頭に対し分娩予定2週前・1週前および分娩直後、加えて分娩時の臍帯静脈血、出生直後の産子の血液を採取し、代謝物や代謝ホルモン、アミノ酸濃度を各品種のリジン給与群と対照群間、ならびに各品種の対照群間で比較した。その結果、ホルスタイン種妊娠の母牛は肉用種妊娠の母牛よりもエネルギー不足であり、給与されたりジンはエネルギーとして利用された可能性が示された。一方、肉用種妊娠では約2週間にわたり給与されたりジンが母牛の血中濃度に反映されたが、ホルスタイン種妊娠に比べて肉用種妊娠の臍帯静脈血ならびに子牛の血中アミノ酸濃度が非常に低かった。本試験ではこの理由は不明であるが、肉用種の胎子は体重が軽くホルスタイン種に比べてアミノ酸をあまり必要としない、もしくは母牛との品種の違いが胎子への栄養供給を妨げている可能性が示された。しかし、胎子品種の違いにより母牛のエネルギー状態や胎子のアミノ酸要求量が異なることは明らかであり、胎子品種に合わせた飼養管理の構築が必要であることが示された。

文 献

- 1) Rasby, R. J., Wettemann, R. P., Geisert, R. D., Rice, L. E., Wallace, C. R. : *J. Anim. Sci.*, **68**, 4267~4276, 1990.
- 2) Holt, R. I. : *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 392~397, 2002.
- 3) Gluckman, P. D., Hanson, M. A. : *Trends Endocrinol. Metab.*, **15**, 183~187, 2004.
- 4) Kc, K., Shakya, S., Zhang, H. : *Ann. Nutr. Metab.*, **66** Suppl 2, 14~20, 2015.
- 5) Helle, E. I. T., Biegley, P., Knowles, J. W., Leader, J. B., Pendergrass, S., Yang, W., Reaven, G. R., Shaw, G. M., Ritchie, M., Priest, J. R. : *J. Pediatr.*, **195**, 275~278, 2018.
- 6) 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準乳牛 (2017年版), 76~77, 中央畜産会, 東京, 2017.
- 7) 西田武弘：子牛の科学, 31~33, チクサン出版社, 東京, 2009.
- 8) Hayirli, A. : *Vet. Res. Commun.*, **30**, 749~774, 2006.
- 9) Kwon, H., Ford, S. P., Bazer, F. W., Spencer, T. E.,

- Nathanielsz, P. W., Nijland, M. J., Hess, B. W., Wu, G. : *Biol. Reprod.*, **71**, 901~908, 2004.
- 10) Kida, K. : *J. Vet. Med. Sci.*, **64**, 1003~1010, 2002.
- 11) Pereira, A. B. D., Whitehouse, N. L., Aragona, K. M., Schwab, C. S., Reis, S. F., Brito, A. F. : *J Dairy Sci.*, **100**, 6239~6255, 2017.
- 12) Patton, R. A., Hristov, A. N., Parys, C., Lapierre, H. : *J Dairy Sci.*, **98**, 4707~4734, 2015.
- 13) Berthiaume, R., Dubreuil, P., Stevenson, M., McBride, B. W., Lapierre, H. : *J Dairy Sci.*, **84**, 194~203, 2001.
- 14) Armstrong, D. G., Gong, J. G., Webb, R. : *Reprod. Suppl.*, **61**, 403~414, 2003.
- 15) Grummer, R. R. : *J Dairy Sci.*, **76**, 3882~3896, 1993.
- 16) Grummer, R. R. : *J Anim. Sci.*, **73**, 2820~2833, 1995.

乳牛の周産期における肝臓由来の新規タンパク質の 発現と分泌動態

The expression and secretion pattern of new hepatokine during the
peripartum in dairy cattle

盧 尚 建

(東北大学大学院農学研究科)

Sanggun Roh

(Tohoku University, Graduate School of Agricultural Science)

Acute physiological adaptation of lipid metabolism during the postpartum transition period of cows facilitates peripheral metabolic regulation. Hepatokines, which are hormones secreted from hepatocytes, are presumed to play a critical role in systemic metabolic regulation. Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) has been identified as a novel hepatokine associated with circulating triglyceride concentrations in mice and humans. However, regulation of ANGPTL8 and its physiological effects are still unknown in cattle. The present study aimed to reveal changes in ANGPTL8 expression and secretion during the periparturient period, and to investigate its regulatory effect on hepatocytes. In the peripartum period, liver ANGPTL8 mRNA expression was lesser on the day of parturition and 1 week postpartum than it was 1 week before parturition ($p < 0.05$). Moreover, plasma ANGPTL8 concentrations decreased on the day of parturition as compared with that 1 week before parturition ($p < 0.05$). In addition, ANGPTL8 expression in cultured bovine hepatocytes was downregulated after oleate and palmitate treatment but upregulated after insulin treatment ($p < 0.05$). These data suggest that hepatic ANGPTL8 production was downregulated postpartum when the cows experienced a negative energy balance during the peripartum period.

1. 目 的

反芻家畜における糖代謝と脂質代謝の特性は、離乳や泌乳などの代謝移行期に大きく変化するが、その調節メカニズムは代謝産物、内分泌因子、遺伝子発現調節などが関わる複雑なシステムであり、完全な解明はなされていない。肝臓はこれらの代謝の中心として機能するが、近年の研究から内分泌機能を持つことが明らかになりつつある。ヘパトカインと総称される肝臓由来の内分泌因子

は、非反芻動物において糖代謝、脂質代謝やインスリンシグナルを調節する作用を持つことから、ヘパトカインが移行期の代謝調節に関与する新規因子であることが示唆されるが、反芻家畜における具体的な検討は行われていない^{1, 2)}。本研究では、ヘパトカインである Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) について、各組織の発現分布および乳牛の泌乳期における遺伝子発現変化、分泌調節を検討し、代謝移行期における生理的機能を解明することを目的とした。

2. 方 法

2.1

ホルスタイン種仔牛（2～3ヶ月齢，雄）の肝臓，皮下脂肪組織，内臓脂肪組織，腎周囲脂肪組織，生殖器周囲脂肪組織，筋肉，第1胃を採材し，Total RNAとタンパク質を抽出し，ANGPTL8の遺伝子とタンパク質発現量を解析した。

2.2

畜草研那須研究拠点において飼養されたホルスタイン種乳牛6頭から分娩前4週，1週，分娩日，分娩後1週と4週に肝臓を生検し，Total RNAを抽出し，ANGPTL8の遺伝子発現量を解析した。

2.3

牛（5ヶ月齢）の肝臓組織から単離した肝臓細胞を培養・増殖させた後，オレイン酸とパルミチン酸を含む培地で24時間培養し，細胞からTotal RNAを抽出し，ANGPTL8の遺伝子発現量を解析した。

3. 結果と考察

Fig. 1 は各組織でのANGPTL8の遺伝子とタンパク質量を示している。ANGPTL8遺伝子発現量は肝臓と脂肪組織において高発現しており，その他の組織においては検出されなかった (Fig. 1A)。また，ANGPTL8のタンパク質は肝臓においてのみ検出された (Fig. 1B)。Fig. 2 は分娩前後の肝臓組織におけるANGPTL8の遺伝子発現量を示している。血中NEFA濃度は分娩前に比べ，分娩日から4週間後まで上昇していた。また，血中インスリン濃度は分娩4と1週間前より低下し，分娩にて低値を示した後，4週間後まで低下していた。周産期の肝臓においてANGPTL8発現量は分娩前と比べ分娩日と1週間後に有意に減少した (Fig. 2)。培養肝細胞においてオレイン酸とパルミチン酸の刺激によってANGPTL8の遺伝子発現量は減少した (Fig. 3)。インスリン刺激によってANGPTL8の遺伝子発現量は上昇した。

肝臓のANGPTL8発現量はインスリン受容体アンタゴニスト (S 961) を投与し，耐糖能の低下

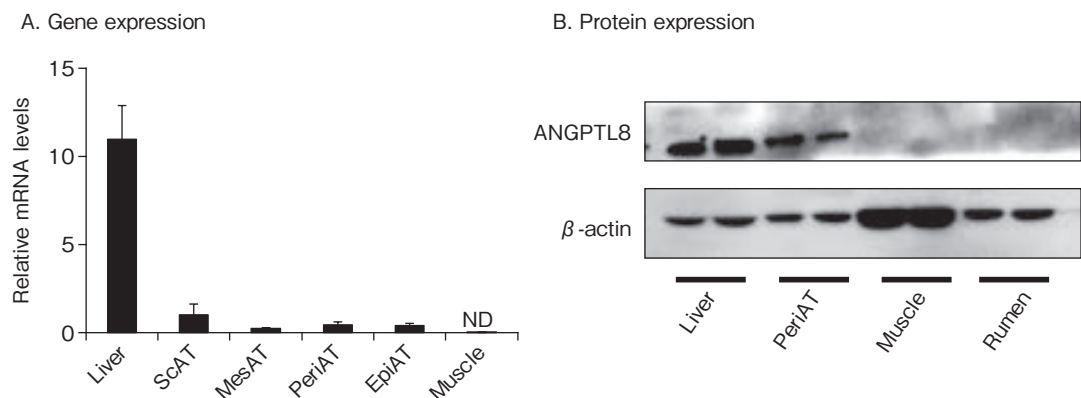


Fig 1 mRNA expression and protein expression of ANGPTL8 in various tissues of Japanese Black cattle. (A) ANGPTL8 expression was quantified in liver, adipose, and muscle tissues of five cattle by qRT-PCR. Data are shown as fold changes relative to expression in the liver tissue. N.D., not detected. (B) ANGPTL8 protein expression was evaluated in the liver, perirenal adipose tissue (PeriAT), skeletal muscle, and rumen of cattle by immunoblotting. β -actin was used as an internal standard.¹⁾

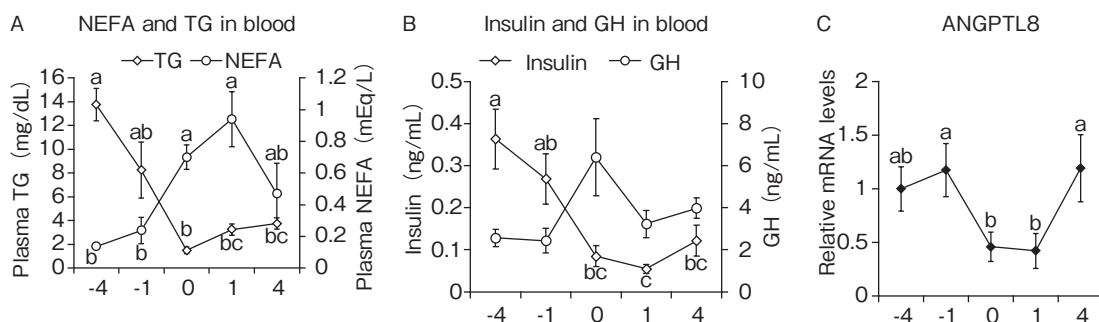


Fig 2 Production of hepatic ANGPTL8 at parturition in dairy cows. (A and B) Plasma was sampled from multiparous Holstein dairy cows around parturition (-4, -1, 0, 1, and 4 weeks from parturition; $n=6$ each time), and metabolite plasma concentrations [non-esterified fatty acid (NEFA) and triglyceride (TG)] and hormones [insulin and growth hormone (GH)] were measured. (C) Biopsied liver tissues from the same cows were subjected to qRT-PCR analysis to determine ANGPTL8 expression. Data are shown as fold change relative to ANGPTL8 expression at -4 weeks. Different letters indicate significant differences between groups ($p<0.05$).¹⁾

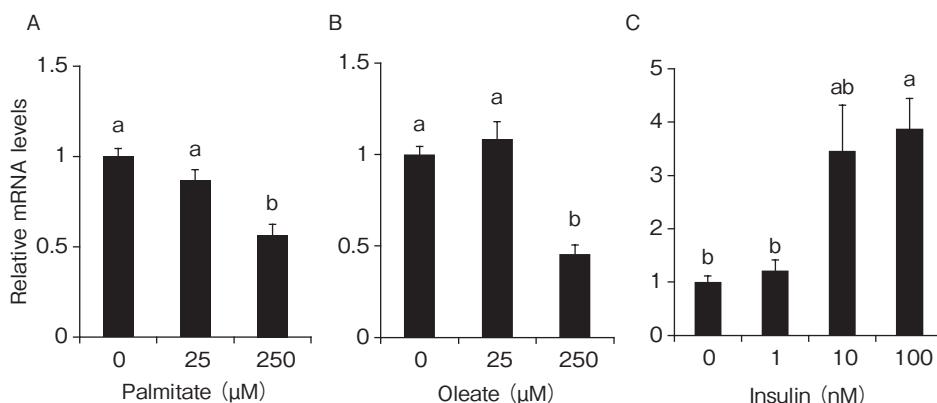


Fig 3 Fatty acid and insulin regulation of ANGPTL8 expression in bovine hepatocytes. Hepatocytes prepared from cattle were cultured and proliferated to approximately 80 % confluence. Cultured primary bovine hepatocytes were treated with palmitate (A), oleate (B), and insulin (C) at the concentrations indicated for 24 h. After treatment, total RNA was extracted from the cells and ANGPTL8 expression was analyzed using qRT-PCR. Data are shown as fold changes in expression relative to untreated control cells. Different letters indicate significant differences between groups ($p<0.05$).¹⁾

したマウスにおいて大きく上昇することが報告されている。また、ob/obマウスや高脂肪食給餌肥満マウスにおいても肝臓におけるANGPTL8の発現が上昇している。したがって、インスリンシグナルが肝臓におけるANGPTL8の遺伝子発現の調節因子の1つであると考えられている。子牛の肝臓におけるインスリン感受性は離乳後に低下する。これは、グルコース利用の低下やプロピオン酸からの糖新生の亢進といった反芻動物特有の代

謝に切り替わるメカニズムであると考えられている。以上のように、ANGPTL8はインスリンシグナルと脂質代謝を結び付ける因子であると考えられる^{1, 2)}。

4. 要 約

牛の分娩後移行期における脂質代謝の急激な変化により肝臓などの末梢組織における代謝調節は促進させる。肝細胞から分泌されるホルモンであ

るヘパトカインは、全身の代謝調節において重要な役割を果たすと推定されている。Angiopoietin-like protein 8 (ANGPTL8) は、マウスおよびヒトにおける血中トリグリセリド濃度に関連する新規のヘパトカインとして同定されている。しかし、反芻動物におけるANGPTL8の調節とその生理学的効果はまだ不明なところがある。本研究は周産期におけるANGPTL8の発現と分泌動態を明らかにし、培養肝細胞においてその調節効果を調べることを目的とした。周産期では、肝臓ANGPTL8 mRNA発現は、分娩前1週間よりも分娩日と分娩後1週間で低下した ($p < 0.05$)。さらに、血漿ANGPTL8濃度は、分娩の1週間前と比較して、分娩直後と分娩後1週に減少した ($p < 0.05$)。さらに、培養牛肝細胞における

ANGPTL8発現は、オレイン酸およびパルミチン酸処理後に下方制御されたが、インスリン処理後に上方制御された ($p < 0.05$)。以上の結果は、分娩後に負のエネルギーになると、脂肪組織から由来する遊離脂肪酸により肝臓のANGPTL8産生が分娩後に下方制御されることを示唆している。

文 献

- 1) Nakano, M., Suzuki, Y., Haga, S., Yamauchi, E., Kim, D., Nishihara, K., Nakajima, K., Gotoh, T., Park, S., Baik, M., Katoh, K., Roh, S. : Downregulated Angiopoietin-like Peptide 8 Production at Calving Related to Changes in Lipid Metabolism in Dairy Cows. *Journal of Animal Science*, **96**, 2646~2658, 2018.
- 2) 鈴木裕, 中野美智, 芳賀聡, 中島恵一, 加藤和雄, 盧尚建: 反芻動物におけるヘパトカインとしての Chemerin と ANGPTL 8 の発現調節, 家畜栄養生理研究会会報, 59(2), 59~68, 2015.

養鶏における個体管理と清掃ロボット導入による IoT型食肉生産技術の開発

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

堀口 健一¹・片平 光彦¹・市浦 茂²・高垣 徹³

(¹山形大学農学部, ²岩手大学大学院連合農学研究科, ³ティーエーシー)

Kenichi Horiguchi¹, Mitsuhiko Katahira¹, Shigeru Ichiura² and Toru Takagaki³

(¹Faculty of Agriculture, Yamagata University,

²The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, ³TAC Inc.)

Consumers prefer to provide reliable, safe and healthy food to meet their food needs. Management techniques for reliable and efficient livestock production is demanded feeding with consideration for the comfort of livestock, maintenance of the hygienic feeding environment and reduction of the burden of its management work. Generally in the meat, broiler's chicken is a food of lower calorie and high protein. Broiler's chicken production system does not have the less effort technology to manage the individual because of the low profits per broiler. So, we need to develop the less effort technology for broiler management. And it is also required to check the health of broilers. From these backgrounds, we conducted several experiments and obtained the following results. It is confirmed that artificial intelligence learned using broiler's behavior image can distinguish among eating, drinking and rest behaviors. The system of body weight measurement using RFID tag and strain gauge, and behavior imaging with camera can be used for feeding management and shipment forecast based on body weight data of broilers. Although RFID is effective for behavioral analysis, it is necessary to consider how to attach a tag and the cost. It is suggested that broiler image obtained from this system can develop inference module of body weight in deep learning framework. By establishing a monitoring function based on deep learning in this system, it is considered possible to realize reduction of monitoring labor and optimization of feeding conditions in broiler farming. As future tasks, it is necessary to study the quantification of the amount of learning work required to create a robust inference module for body weight, and the individual identification technology that does not use RFID. It is confirmed that moving cart of assisting robot for chemical spray can travel following an operator with the control system, and can be stably towed to a hose of about 20kg.

1. 目 的

近年ではアニマルウェルフェアの観点から家畜

飼養時の快適性について配慮が求められていることから、個体管理の重要性が増加している。飼養時の個体管理では飲水や飼料摂取、休息などの家

畜の行動、温度や湿度などの環境情報を総合的に解析して評価することが求められる。これらの情報はこれまで観察や個別でのデータ収集に止まっていたが、もののインターネット (Internet of Things「IoT」) の促進により大容量の画像データとそれに連動した各種センサによる環境データの収集といったビッグデータを活用し、高精度なGPUによる深層学習 (Deep Learning) を用いた人工知能 (Artificial Intelligence「AI」) による解析が可能になっている。しかし、AIの適用については工業面での実装が進んでいるが、畜産業の現場での実装例は少ない現状にある。

国内の肉用若鶏 (ブロイラー) の生産において、飼養戸数は小規模の飼養者層を中心に減少傾向にあるものの、飼養羽数は平成20年の102,987千羽から平成30年の138,776千羽へ増加し、出荷羽数50万羽以上の大規模の飼養者層が全体の12.0% (平成30年) を占めており、大規模化が進んでいる¹⁾。ブロイラーの飼養管理は、開放型やウンドウレス型などの鶏舎にて、その大半が平飼いの群れ (群飼) で行われており、群飼管理下での生産効率や衛生面などに関する技術開発が不可欠であり、大規模化に合わせた適正な飼育環境下で最適な飼養管理を行うことが重要となる。

ブロイラーの生産現場では各種疾病に対応するため、作業施設への立ち入り制限や消毒の徹底などの対策が取り組まれている。鶏の出荷後には防疫の観点から徹底した清掃と消毒を行い、生産施設の衛生管理を厳密に実施している。鶏舎の清掃と消毒には乗用のホイールローダによる敷料の除去、牽引式の散布機による薬剤散布などが行われている。これらの衛生管理は基本的にヒトの立ち入りを制限した条件下において限定された管理作業により実施されている。このような状況下では管理作業者の負担が増す課題を抱えており、清掃や消毒などの管理作業のロボット化に対する要

望が高い。

このような背景から、消費者志向に合致した安全・安心な畜産物生産、家畜の快適性に配慮した飼養、衛生的な飼育環境の整備とその作業の負担軽減などの点を意識した管理技術の必要性が増すと思われる。本研究では大規模飼養が進んでいる養鶏において、飼養管理時の鶏の快適性に考慮し、安全で安心な鶏肉生産を実現することを目的に、畜産業における家畜の個体管理手法と清掃ロボット開発によるIoT型の食肉生産技術を確立する。

2. 方 法

2.1 供試動物と飼養管理

供試動物にはブロイラー (鶏種 チャンキー) を用い、その飼育実験は山形大学動物実験委員会 (学長) の承認を受けた農学部内の動物実験飼養施設で行った。ブロイラーの雛 (雄) を導入し、3週齢まで同一条件下で管理した。飼育実験のための飼養管理は市販の仕切り板 (メッシュ型) で飼育用の囲いを設置し、給餌器と給水器を配置して不断給餌、自由飲水とし、敷料として糞殻を用いて行った。

2.2 鶏の行動識別のための教師データとAI

カメラを用いてブロイラーの行動を撮像して記録用サーバーに保存した。撮像した画像は摂食行動、飲水行動、休息行動の特徴的な行動ごとに分類して教師データを作成し、それを基にDeep Learningのフレームワーク²⁾を用いて学習作業による特徴抽出を行った。各行動の画像 (500枚, 1,000枚, 2,000枚, 4,000枚) を用いて学習させたAIにより、それぞれの行動を識別する精度を評価した。精度の評価は、各行動のテスト用画像 (各20枚) を用いて識別検証を行い、それぞれの識別判定の割合 (識別割合) から判断した。

2.3 鶏の体重計測・行動撮像システム

各ブロイラーを識別しながら体重を計測できるシステム開発のため、RFID受信機能内蔵の体重計を試作した。この試作体重計はロードセル、A/Dコンバータ、マイコンで構成し、SDカードへの記録とWi-Fiへの接続も可能である。得られたデータはテキストデータ（csv形式）で体重計測システムに保存し、動物実験飼養施設内にあるWi-Fiルータを経由してクラウドサーバへ転送した。また同時に、ブロイラーの行動をカメラで撮像した。この行動の動画データはネットワーク内のネットワークアタッチドストレージ（NAS）に保存した。

2.4 鶏の体重判別のための教師データとAI

行動撮像時にはブロイラーのIDと体重をリアルタイムで表示でき、実際の行動映像と同時に録画することが可能なシステムにより、画像再生時に各個体のIDと体重、画像を関連付けたデータを取得し、それをDeep Learningの教師データとした。教師データは体重が1,700 g, 1,800 g, 1,900 g, 2,000 g 程度のブロイラーの画像を各500枚ずつ切り出し、学習用画像（400枚）と検証用画像（100枚）を準備した。学習用画像を用いてDeep Learningのフレームワーク³⁾で学習させた。この学習の重みデータであるAIを用いて体重ごとに検証用画像を読み込ませて学習精度を確認した。その後、作成したAIを別の画像（10枚）を用いて評価した。

2.5 薬剤散布補助ロボット

薬剤散布補助ロボットとしての走行台車は、自作したフレーム台車にインホイールモータ（後輪2輪のみ）と制御用コントローラ（試作機）を組み込んだものを利用した。薬剤散布補助ロボットの走行特性としては主に牽引力、走行速度、重心位置を調査した。

3. 結果と考察

3.1 AIによる鶏の行動識別

ブロイラーの各行動の画像を500枚, 1,000枚, 2,000枚, 4,000枚用いて学習させたAIにおいて、摂食行動の識別割合は0.0%, 99.9%, 99.9%, 100%であり、飲水行動の識別割合はすべて100%であり、休息行動における識別割合は0%, 100%, 0%, 100%であった（Table 1）。画像500枚で学習されたAIでは、摂食や休息の行動を識別する精度がきわめて低かった。画像を1,000枚および4,000枚として学習させたAIでは、各行動とも識別の精度が高く、また、2,000枚で学習させたAIでは、摂食行動と飲水行動の識別の精度が高かった。2,000枚での学習AIは休息行動の識別割合が低い結果であった。これは、AIが各行動を識別するときに使用する基準値（閾値）が変化したことが要因として考えられる。この点は学習用の画像枚数をさらに増やした条件でのAIによる行動の識別精度を確認する必要がある。

Table 1 Recognition percentage of various behavior by artificial intelligence using different numbers of image data.

Numbers of image data	Recognition percentage (%)		
	Eating behavior	Drinking behavior	Rest behavior
500	0.04	100	0
1000	99.94	100	100
2000	99.98	100	0
4000	100	100	100

3.2 RFIDタグの鶏用足環への適用性評価

RFIDの活用はさまざまな分野で増えており、125~135KHz帯、13.56MHz帯、2.45GHz帯などが市販されている。本実験では無線指向性が広く、金属や水の影響を受けにくい125KHz帯を利用した。RFIDタグは、電磁誘導方式を利用して心棒状に巻いたコイルアンテナとして電源を内蔵しないパッシブタイプの超小型タグ（直径2.12mm、長さ12mm）を使用し、市販の鶏用足環にホットメルト接着剤（エチレン酢酸ビニル）で取り付けした。足環に取り付けたRFIDタグは飼育実験中に脱落し、接着部分の耐久性に問題を有した。足環

に接着したRFIDタグは、時間の経過とともに糞尿で接着剤が劣化することに加え、鶏の成長とともに行動が活発となり、鶏の足と足環との摩擦が起こって脱落したと考えられる。その対策として、RFIDタグを熱収縮チューブで足環に固定する方式を考案した。この方式はコストが安く、取り付けが簡単であり、飼育実験でRFIDの脱落が確認されなかった。

3.3 鶏の体重計測・行動撮像システムの評価

試作したRFID受信機能内蔵の体重計は各ブローラーの体重データを記録できた (Fig. 1)。体重データは日別にヒストグラムから算出した。カ

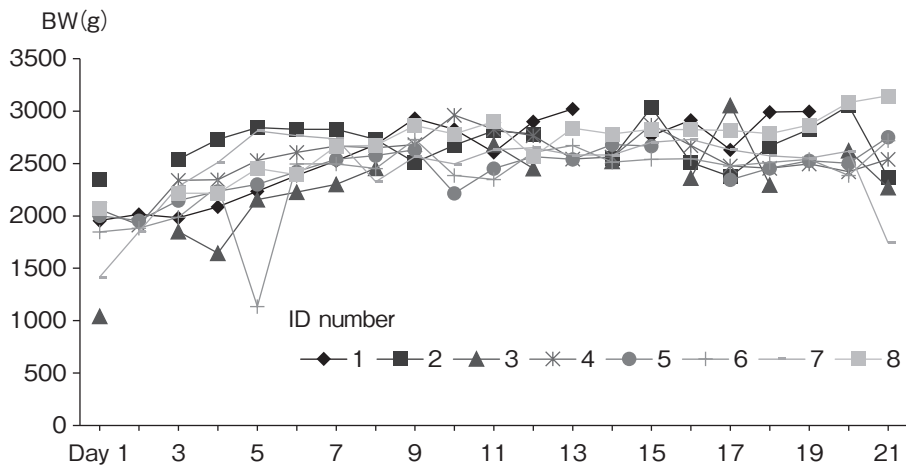


Fig. 1 Changes of individual body weight (BW) of broiler.



Fig. 2 Individual ID number and body weight of broiler.

メラと試作体重計で得られたデータはFig. 2に示すとおり、行動と体重の表示データを同時に録画することが可能であり、各ブロイラーのIDの判別と行動や体重を容易に確認できた。試作体重計で得られたブロイラーの体重は変動を伴い増加しながら推移していた。これはブロイラーが静止して体重計にのることがなく、常に動作状態であることから振動が歪ゲージに受信され、数百グラム単位で測定誤差が発生したことが要因として考えられる。また、体重データは大きく変動する日や欠測日があった。体重が大きく変動したのは、体重計を通過するブロイラーの動作が激しかった場合にロードセルの測定値の変動が大きくなり、これによる影響と思われる。体重データの欠測はブロイラーの活動量が低下した際や2羽が同時に体重計にのった際に、ブロイラーのIDと体重が反応しなくなりデータが取得できなかったことが原因として考えられる。これらは行動の観察記録や前後日の体重の推移から補正することが可能である。よって、本試作システムは、改善すべき点があるものの、ブロイラーの行動と体重の推移をリアルタイムで取得することが可能であり、それを基にブロイラーの標準体重を参考にしながら目標体重への到達予測に利用できると考えられる。

3.4 AIによる鶏の体重判別

作成したAIによるブロイラーの体重の判別結果をTable 2に示した。体重の判別は、飼育実験時にカメラで撮像した画像データと試作したRFID受信機能内蔵の体重計が示した体重データにより、鶏の画像と体重を関連づけて作成した教師データをDeep Learningで学習させた重みデータを用いて行った。その結果、1,700 gと1,800 gの体重区分の認識率は不十分であったが、1,900 gと2,000 gの体重付近の個体では60～90%の精度で判別できた。判別精度が低くなった要因としては、学習用画像の背景や切り出し位置の違いによって認識物を別物と認識してしまうAIになっていたことが考えられる。

3.5 薬剤散布補助ロボットの走行性評価

薬剤散布補助ロボットとして試作した走行台車はFig. 3に示した。走行台車は、高さや質量が139cm、40.4kgであり、牽引力が214 N、走行速度の範囲が0.21～0.47 m/sであった。また、走行台車の重心は、Gxが217 mm、Gyが403 mm、Gzが339 mmであった。試作機の薬剤散布補助ロボットは制御システムで作業者に対して追従した走行が可能であり、速度を無段変速で制御することができる。牽引力は214 Nと約20 kgのホースまで安

Table 2 Recognition percentage of broiler body weight classification by artificial intelligence.

Times of test	Recognition percentage (%)			
	1700g	1800g	1900g	2000g
1	0	0	81	99
2	0	0	86	99
3	0	0	86	99
4	0	0	93	97
5	0	0	96	95
6	0	0	66	96
7	0	0	91	96
8	0	0	0	90
9	0	0	0	83
10	0	0	0	85
Average	0	0	60	94



Fig. 3 Moving cart for chemical spray.

定して牽引可能であったが、車体フレームが軽く、前後のホイールベースが短かったため214Nを超えると転倒のリスクが高まった。実用に際しては、機体フレームとホイールベースを見直し、重心の位置を下げる必要があることが確認できた。

4. 要 約

プロイラーの行動画像を用いて学習させたAIは、摂食、飲水、休息の各行動を識別できること

が確認できた。RFIDタグと歪ゲージを用いた体重計測とカメラによる行動撮像のシステムは、プロイラーの体重データを基にした飼育管理や出荷予測に活用できる。RFIDは行動解析にも有効であるが、タグの取り付け方法やコストを考慮する必要がある。本システムから得られたプロイラーの画像は、Deep Learningのフレームワークで体重の推論モジュールを開発できることが示唆された。本システムにDeep Learningによる監視機能確立することで、養鶏における監視労力の軽減や飼育状態の最適化を実現できると考えられる。今後の課題として、環境に依存しないロバストな体重推論モジュールを作り上げるのに必要な学習作業量の定量化、RFIDを用いない個体認証技術方法について検討が必要である。薬剤散布補助ロボットの走行台車は制御システムで作業者に対して追従する走行が可能であり、約20kgのホースまで安定して牽引できることが確認できた。

文 献

- 1) 農林水産省生産局畜産部食肉鶏卵課：食肉鶏卵をめぐる情勢，<http://www.maff.go.jp/j/chikusan/shokuniku/lin/index.html>, 2019.
- 2) Chainer Documentation Release 1.23.0 Preferred Networks and Preferred Infrastructure. 2017.
- 3) YOLOv3: An Incremental Improvement. Joseph Redmon, Ali Farhadi. University of Washington. 2018.

成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索

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

鈴木 貴 弘

(北海道大学大学院農学研究院)

Takahiro Suzuki

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

After the maturation, skeletal muscle regeneration and hypertrophy are greatly dependent on myogenic stem cells (satellite cells) contribution since myofibers cannot proliferate and supply myonuclei. Recently, authors revealed that myogenic capability of satellite cells may be different depending on localized environments, such as myofiber-type or muscle sites. In the present study, we aimed to search the satellite cell-group with high myogenic capability with broad perspective. So, we focused on the myogenic capability difference of satellite cells in mice strains. In comparative experiments between C57BL/6 (B6) and ICR mouse strain, satellite cells isolated from B6 would form more myotubes and also express the myotube markers and myogenic regulatory factors (MRFs) in higher levels. The expression patterns of myogenin a member of MRFs during differentiation stage were dramatically up-regulated in B6 satellite cells, suggesting that myogenin might be a key factor for detection about satellite cell-group with high myogenic capability. Next, we examined the effect of myogenin knockdown treatment on myogenic differentiation in C2C12 mouse myoblasts. The expression level of myosin heavy chain-embryonic an immature myotube-formation marker was down-regulated, but other markers of myotube were not affected by myogenin knockdown. These results showed that the satellite cell-group with high myogenic capability localize in B6, furthermore myogenin may not be a key factor. Therefore, we will continue this search study focusing on other myogenic factors. These basic scientific knowledges would be beneficial to not only meat science field but also medical and sports sciences.

1. 目 的

家畜の骨格筋は主に食肉の原料となるが、採取できる可食肉量は個体体重の約35%程度にしか至らないことが分かっている。そのため、家畜1個体あたりの骨格筋量が一生を通じて増加し続けることは、効率的な食肉生産へ寄与できると期待さ

れる。しかし、成熟個体内における骨格筋細胞（細長い構造のために“筋線維”と呼称される）は、最終分化しており自身で増殖することができないため、その数や容積を容易に増加させることは困難だと考えられている¹⁾。

一方で、骨格筋には筋再生に重要な役割を担う筋幹細胞（衛星細胞）も局在している。衛星細胞

は、筋線維の基底膜と細胞膜の間隙に位置し²⁾、普段は休止状態にあるが激しい運動などに伴う物理刺激によって活性化状態に入ると³⁻⁵⁾、増殖して筋芽細胞へと分化し、細胞同士で互いに融合して新生筋線維（筋管）を形成し、または既存の筋線維に融合することで損傷部を修復する⁶⁾。このように衛星細胞には、成熟個体内であっても筋線維の数や容積を増加させる能力が備わっている。また最近、著者らの研究グループでは、衛星細胞の筋管形成能が単離した骨格筋部位によって異なる“筋部位特異性”を報告した⁷⁾。つまり、衛星細胞は局在していた環境によってmyogenic capabilityに差が生じる細胞集団であることが示唆された。

そこで本研究では、成熟後においても効率的に筋肥大を誘導できる優れたmyogenic capabilityを有する衛星細胞集団を探索することを目的とした。具体的な探索方法として、成熟したマウスの異系統間における衛星細胞の筋管形成能および筋分化能の比較試験を行うとともに、差が生じた際の要因として筋分化転写制御因子の関与について検証した。

2. 方 法

2.1 実験材料

本研究では、8-10週齢のJcl:ICRマウス（ICR;日本クレア株式会社）およびC57BL/6NJclマウス（B6;日本クレア株式会社）の骨格筋から単離した衛星細胞の初代培養系を、およびノックダウン実験にはマウス骨格筋由来筋芽細胞株C2C12を使用した。本研究における動物実験（動物実験承認番号:15-0173）は、国立大学法人北海道大学動物実験に関する規定に基づく北海道大学動物実験実施マニュアルに従った。

2.2 衛星細胞の初代培養系

本研究では、Allenら（1997年）の方法を参考

に、改良した衛星細胞の単離培養方法を採用した⁸⁻¹¹⁾。ICRおよびC57BL/6マウス骨格筋（脊柱起立筋群、大殿筋、ヒラメ筋、足底筋、腓腹筋、長趾伸筋、前脛骨筋および大腿直筋を含む）を摘出し、37℃に温めたリン酸緩衝生理食塩水（PBS）により洗浄しながら結合組織や脂肪を取り除いた後に、細切した。1.0mg/mlとなるようPBSに希釈したプロテアーゼ（*Streptomyces griseus*; ストレプトマイシスグリゼウス由来）と細切した骨格筋を37℃の恒温槽内で60分間反応させ、遠心分離（1,700x g, 25℃, 4分間）した後に上清を捨てた。反応後の筋組織に37℃に温めたPBSを加えて懸濁し、遠心分離（190x g, 25℃, 10分間）を行った後に上清を回収した。本作業は、遠心分離時間を8分間、5分間に変更して繰り返した。集めた上清を遠心分離（1,700x g, 25℃, 4分間）して、細胞ペレットを回収した。そこに、4℃に冷ました2%FBS-PBS（Wash Buffer）を加えて攪拌した後、100 μ mセルストレーナーを通して不純物を除去し、遠心分離（1,700x g, 4℃, 4分間）を行った。上清を捨て、4℃に冷ました溶血バッファーを3分間反応させた後に、Wash Bufferでメスアップしてから遠心分離（1,700x g, 4℃, 4分間）を行った。上清を捨て、37℃に温めた増殖誘導培養液（20%FBS-F10）を加えて攪拌した後、40 μ mセルストレーナーを通し不純物を除去し、遠心分離（430x g, 25℃, 10分間）を行った。再度20%FBS-F10を加えてよく攪拌した後、fibronectin コーティングした24well poly-L-lysine coated multiplateに骨格筋量0.5-1.0g/mlの濃度となるように調製した細胞懸濁液を500 μ l/wellで播種し、5%CO₂、95%大気、37℃の条件下で細胞密度が50%コンフルエントになるまで培養した。その後、分化誘導培養液（5%HS-DMEM）に切り換えて、筋管形成が認められた分化72時間目まで培養した。

2.3 RNA干渉法を用いたmyogenin knockdown

20% FBS-F10を用いて 1.0×10^4 cells/mlに濃度を調製したC2C12の細胞懸濁液を、Type Iコラーゲン (Cellmatrix Type I-A, 新田ゼラチン) でコーティングした24well multiplateに500 μ l/wellで播種し、5 %CO₂, 95%大気, 37℃の条件下で24時間増殖させた。その後、5 %HS-DMEMに切り換えて分化誘導を行い、筋管形成が認められた分化72時間目まで培養した。分化誘導と同時に、濃度40nMに調製したmyogenin特異的なsiRNA (stealth siRNA, Invitrogen) を siRNA transfection reagent (Screen Fect™, WAKO) を用いてトランスフェクションした。なお、対照群として濃度40nMのControl siRNA (AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN) を同様にトランスフェクションした。

2.4 RNA抽出およびreal-time RT-qPCR

各培養細胞をPBSで洗浄後、RNA抽出試薬 (ISOGEN II, ニッポンジーン) により溶解し、メーカー推奨のプロトコルに従ってtotal RNAを抽出した。衛星細胞の初代培養系においてはtotal RNAの濃度を15ng/ μ lに、C2C12は50ng/ μ lにそれぞれ希釈してから、逆転写に供試して (ReverTra Ace qPCR RT Kit, TOYOBO), cDNAを作成した。作製したcDNAを含む逆転写反応液を鋳型とし、TaqMan Probe Assayを用いたreal-time RT-qPCR (Light Cycler 480 system II, Roche) によって定量的解析を行った。データの分析は、添付のソフトウェアを用いて行った。

2.5 タンパク質の抽出およびWestern Blotting

各培養細胞をPBSで洗浄後、Laemmli sample bufferでタンパク質を抽出した。サンプルは10% ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEに供試し、泳動後のゲルよりPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは、5 % (w/v) のスキムミルクを添加したtween20含有

トリス緩衝液により30分間ブロッキングし、免疫反応促進試薬 (Can Get Signal, TOYOBO) で希釈した1次抗体溶液中で一晩4℃においてインキュベーションした。メンブレンを洗浄後、同様に希釈したHRP標識2次抗体溶液で1時間25℃においてインキュベーションした。その後、ECL Western Blotting Reagents (GE Health care) とメンブレンを反応させ、ChemiDoc™ XRS+システム (Bio-Rad) を用いて化学発光検出を行った。

2.6 統計解析

測定値は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft) を用いて、各測定値から得られたデータをStudentの t 検定によって有意差検定を行い、 $p < 0.05$ をもって統計学的に有意であるとした。

3. 結果と考察

3.1 マウスの系統間における衛星細胞の筋管形成能の違い

これまでに、マウスにおいて筋損傷誘導や筋移植などの処置を行うと、系統間で筋再生能に差異が生じることが報告されている^{12~14)}。すなわち、マウス系統間では衛星細胞のmyogenic capabilityに差が生じる可能性が考えられた。そこで、本項では、ICRとB6のそれぞれから単離した衛星細胞の初代培養系を用いて、系統の違いによる筋管形成能について比較した。まず、位相差顕微鏡像より両系統の衛星細胞において経過時間とともに分化して互いに融合する様子が観察され、分化誘導72時間目では筋管の形成が認められた (Fig. 1)。しかし、48時間目においてB6では筋管の形成が観察され始めたのに対して、ICRでは認められなかった。そこで、筋収縮タンパク質ミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; MyHC) のアイソフォームのうち、筋管形成のマーカーとなるMyHC-embryonicおよびneonatalのmRNA発現量を比較

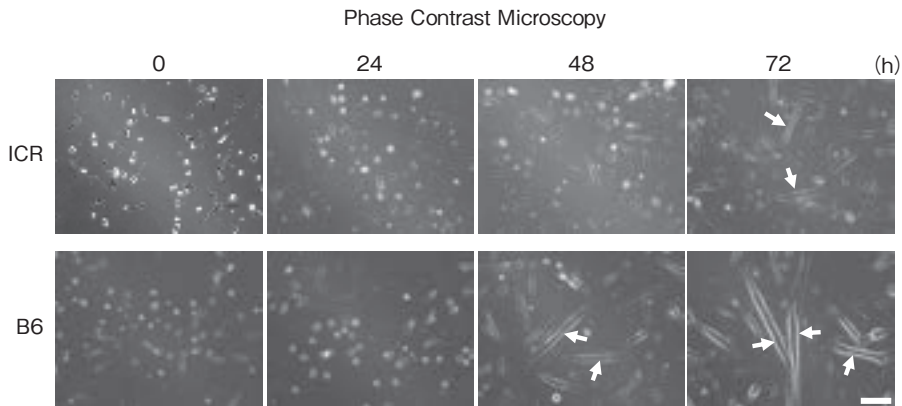


Fig. 1 Satellite cells isolated from each mouse strain formed myotubes during myogenic differentiation. Satellite cells were proliferated about 50% confluence until the beginning of differentiation. During differentiation stage, phase-contrast microscopy was taken for observation of aspects about myotube-formation on every 24 h. Upper panels show satellite cells isolated from ICR, lower panels are from C57BL/6 (B6). White arrows indicate myotubes. Scale bar : 100 μ m.

した (**Fig. 2A, B**)。MyHC-embryonicにおいて、ICRでは分化誘導0時間目では発現が認められなかった。B6は0時間目から発現しており、48時間目以降に発現量が増加し、ICRよりも有意に高い値を示した。MyHC-neonatalにおいては、ICRでは24時間目まで、B6では0時間目で発現が認められなかった。なお、MyHC-embryonicと同様にB6の発現量が48時間目以降で増加し、ICRよりも有意に高い発現量が認められた。次に、筋管マーカーであるtotal MyHCのタンパク質発現量を比較した (**Fig. 2C**)。その結果、ICRではバンドの検出が認められなかったのに対し、B6では明確なバンドが検出された。よって、位相差顕微鏡像で観察されたB6がICRに比べて筋管形成が優勢であった結果とも一致し、B6から単離した衛星細胞はICRと比べて筋管形成能が高いことが明らかとなった。

3.2 衛星細胞における筋分化転写制御因子の発現パターンの比較

本項では、B6において筋管形成能が高い要因を追求するために、衛星細胞の筋分化制御に関わる転写因子 myogenic regulatory factors

(MRFs) の MyoD, myogenin, Myf5 および MRF4 に着目し、各系統の衛星細胞における分化誘導後のmRNA発現量を比較した (**Fig. 3**)。MyoDは、ICRおよびB6両系統で分化誘導0時間目から発現が認められ、その発現量はいずれの時間においてもB6がICRよりも有意に高かった (**Fig. 3A**)。myogeninは、ICRでは0時間目に発現が認められなかったが、B6では0時間目から発現しており、24-72時間目にかけてICRよりも有意に高い発現量であった (**Fig. 3B**)。Myf5は、ICRでは24時間目まで発現が認められなかったが、B6では0時間目から発現しており、72時間目においてはICRよりも有意に高い発現量が認められた (**Fig. 3C**)。また、MRF4はいずれの時間においても有意な差はなく、ICRでは48時間目まで発現が認められなかった。72時間目において、ICRではB6よりも高発現の傾向が認められたが有意な差はなかった (**Fig. 3D**)。よって、B6から単離した衛星細胞はICRよりもMyoD, myogeninおよびMyf5の発現量が相対的に高いことから、筋分化が盛んに起こることで筋管形成能が高いことが推測された。つまり、B6には優れたmyogenic

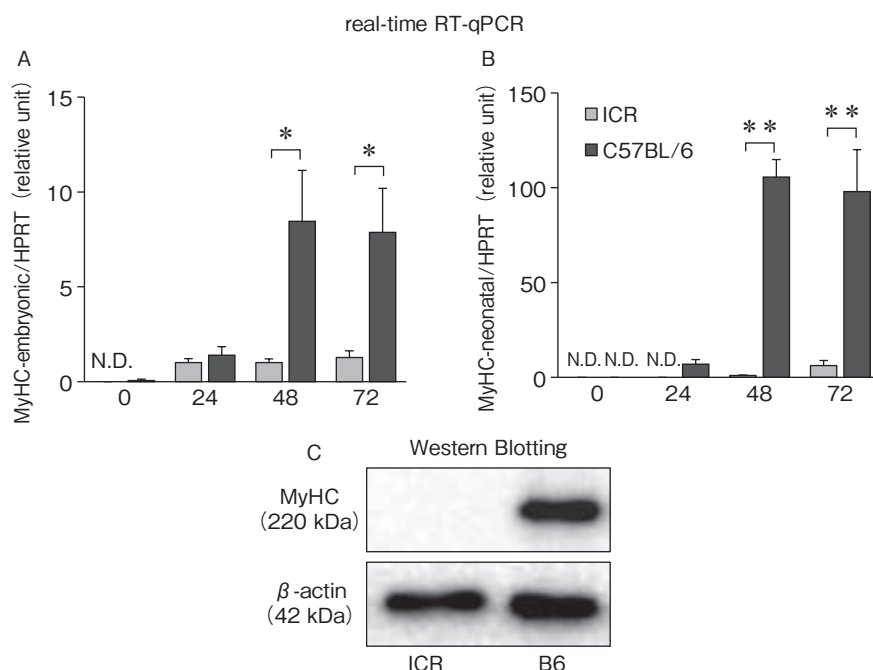


Fig. 2 Comparative analysis about the expression levels of myotube-formation markers between ICR and B6. Each satellite cells prepared from ICR or B6 were differentiated until 72 h as shown in Fig. 1. Cell lysates were collected at indicated time points and evaluated for (panel A) MyHC-embryonic and (panel B) MyHC-neonatal mRNA expression levels by real-time RT-qPCR normalized to HPRT. Bars relative to the means in (panel A) 24-h or (panel B) 48-h differentiated-culture from ICR. The values are expressed as mean $\pm$ SEM from three independent cultures. Significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) between ICR and B6 satellite cells are indicated by single or double asterisks, respectively. N.D. indicates non-detectable mRNA expression level in each culture. (panel C) Protein expression levels of total MyHC were analyzed by Western Blotting of cell lysates collected at each 72-h differentiation culture normalized to β -actin.

capabilityを有する衛星細胞集団が局在することが示唆された。

3.3 myogenin knockdownによる筋管形成能への影響

前項において、B6の衛星細胞ではICRよりもmyogeninの発現量が有意に高く、かつ劇的な発現変動を示すことが明らかとなった。そこで、myogeninがB6の衛星細胞における高い筋管形成能および筋分化能を誘導するkey factorなのではないかと仮説を立てた。本項では、マウス由来筋芽細胞株C2C12において、RNA干渉法を用いたmyogenin特異的なsiRNAのトランスフェクション処理により発現を抑制したknockdown実験を

行い、仮説の妥当性の検証を行った。まず、myogenin knockdownによる筋分化誘導過程を観察したが、対照群と比較して細胞の形態に大きな違いは認められず、分化誘導72時間後においても同程度の筋管が形成されていた (Fig. 4)。続いて、72時間目において回収したサンプルを用いて、myogenin、筋管形成のマーカーであるMyHC-embryonicおよびneonatalのmRNA発現量を比較した (Fig. 5A)。myogeninの発現量は、対照群よりも有意に低くなっており効率的なknockdownを確認した。なお、MyHC-embryonicにおいて有意な発現減少が認められたが、MyHC neonatalについては対照群と同程度

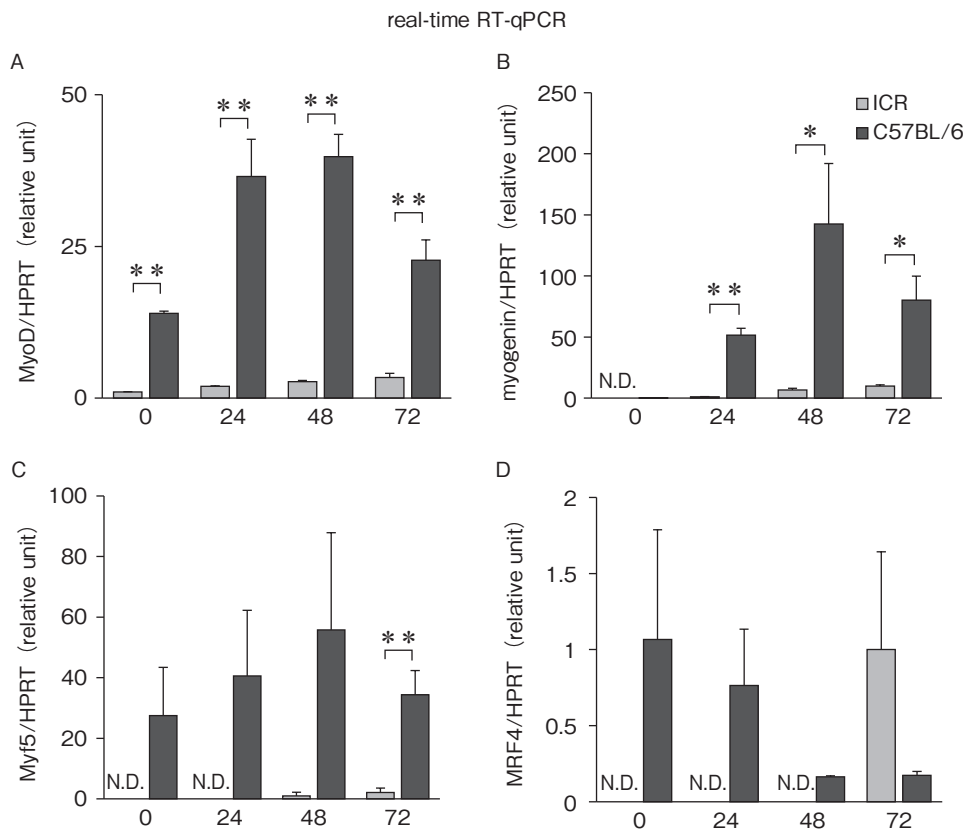


Fig. 3 Comparative experiments about the expression patterns of myogenic regulatory factors (MRFs) in satellite cells isolated from ICR or B6. Each satellite cells prepared from ICR or B6 were differentiated until 72 h as shown in Fig. 1. Cell lysates were collected at indicated time points and evaluated for (panel A) MyoD, (panel B) myogenin, (panel C) Myf5 and (panel D) MRF4 mRNA expression levels by real-time RT-qPCR normalized to HPRT. Bars relative to the means in (panel A) 0-h, (panel B) 24-h, (panel C) 48-h or (panel D) 72-h differentiated-culture from ICR. The values are expressed as mean $\pm$ SEM from three independent cultures. Significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) between ICR and B6 satellite cells are indicated by single or double asterisks, respectively. N.D. indicates non-detectable mRNA expression level in each culture.

の発現量を示した。さらに、筋管マーカーtotal MyHCのタンパク質発現量を比較したところ、対照群とmyogenin knockdown群で同程度のバンド検出レベルであった (Fig. 5B)。よって、myogenin knockdownによって筋管形成の初期段階に何らかの作用があった可能性が推測されたが、筋管形成能には大きく影響しないことが示唆され、骨格筋特異的にmyogeninをconditional knockoutしたマウスを用いた過去の知見と合致していた¹⁵⁾。ゆえに、myogeninは優れたmyogenic capabilityを

有する衛星細胞集団のkey factorとして作用する可能性は低く、他の因子に着目した同定作業を進める必要があることが明らかとなった。

4. 要 約

成熟個体の骨格筋細胞は、最終分化しており、かつ自身で増殖することができないため、細胞容積や数を増加させることが難しい。しかし、骨格筋に局在する筋幹細胞 (衛星細胞) は増殖および筋分化能を有しているため、筋再生時に重要な役

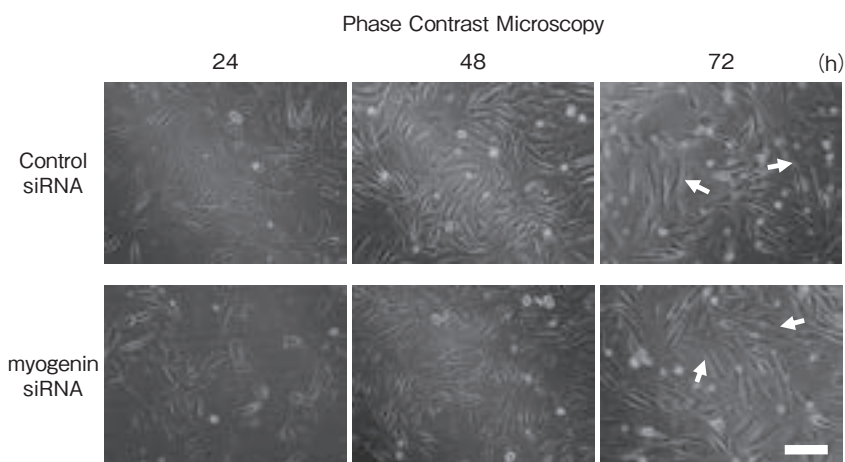


Fig. 4 Normal myotube-formation in myogenin knockdown cultures. C2C12 mouse myoblasts were transfected with myogenin-specific siRNA in differentiation medium. Phase-contrast microscopy was taken for observation of aspects about myotube-formation during 24-72 h differentiation stage. Upper panels show control siRNA transfected cultures, lower panels are myogenin knockdown cultures. White arrows indicate myotubes. Scale bar : 100 μ m.

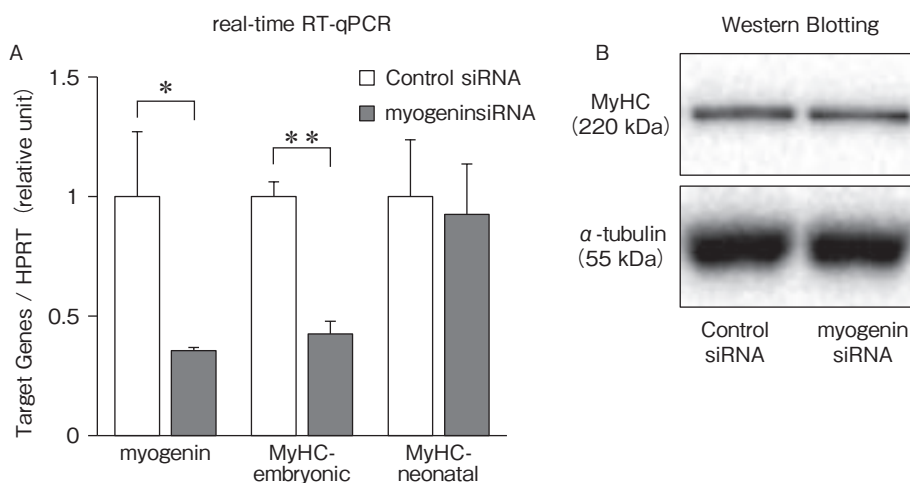


Fig. 5 myogenin knockdown may not inhibit myotube-formation. C2C12 myoblasts were transfected with myogenin siRNA in differentiation medium until 72 h as shown in Fig. 4. (panel A) Cell lysates were collected and evaluated for myogenin, MyHC-embryonic and MyHC-neonatal mRNA expression levels by real-time RT-qPCR normalized to HPRT. Data represent arbitrary units relative to the mean in control siRNA transfected cultures. The values are expressed as mean $\pm$ SEM from four independent cultures. Significant differences ($p < 0.05$ and $p < 0.01$) between control siRNA and myogenin siRNA transfected cells are indicated by single or double asterisks, respectively. (panel B) Protein expression levels of total MyHC were analyzed by Western Blotting of cell lysates collected each siRNA-transfected culture normalized to α -tubulin.

割を担うとともに、超再生を通して筋肥大にも寄与すると考えられている。最近、衛星細胞は局在する環境に応じて筋分化能に差異が生じる可能性

が示されているため、より優れた myogenic capabilityを発揮する細胞集団が存在することが期待される。そこで、本研究ではマウスの系統間

における衛星細胞の筋管形成能ならび筋分化能を比較するとともに、要因探索を行った。その結果、ICRと比較してB6系統において衛星細胞の筋管形成能が高く、また筋分化制御転写因子MRFsのうちMyoD, myogeninおよびMyf5の発現量が相対的に高いことが明らかとなった。特に、B6では分化誘導後のmyogeninの劇的な発現変動も認められたため、筋管形成を促進するkey factorであると予想された。そこで、myogenin knockdown実験を行ったところ、筋管形成マーカーMyHC-embryonicの発現減少は認められたものの、筋管の形成自体には影響がなかった。よって、優れたmyogenic capabilityを有する衛星細胞が局在するマウスの系統は同定されたが、その要因となるkey factorは明らかとならなかった。今後は、MyoD, Myf5ならびにMRFsと協働的に作用する他の転写因子、さらには細胞膜タンパク質などの関与についてもフォーカスをあて、網羅的な探索を行う予定である。

文 献

- 1) 水野谷航：食肉の科学, 57, 7～17, 2016.
- 2) Mauro, A. : *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, 9, 493～495, 1961.
- 3) Tatsumi, R., Allen R. E. : *Anim. Sci. J.*, 79, 279～290, 2008.
- 4) Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, 81, 11～20, 2010.
- 5) Hara, M., Tabata, K., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Mizunoya, W., Nakamura, M., Nishimura, S., Tabata, S., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K., Anderson, J. E., Allen, R. E., Tatsumi, R. : *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 302, C1741-C1750, 2012.
- 6) Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A. : *Physiol. Rev.*, 93, 23～67, 2013.
- 7) 鈴木貴弘：食肉の科学, 59, 33～38, 2018.
- 8) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. : *Methods in Cell Biol.*, 52, 155～176, 1997.
- 9) Tatsumi, R., Sankoda, Y., Anderson, J.E., Sato, Y., Mizunoya, W., Shimizu, N., Suzuki, T., Yamada, M., Rhoads, R. P. Jr., Ikeuchi, Y., Allen, R. E. : *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 297, C238-C252, 2009.
- 10) Suzuki, T., Takaishi, H., Sakata, T., Do, M.-K. Q., Hara, M., Sato, A., Mizunoya, W., Nishimura, T., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, 81, 245～251, 2010.
- 11) Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y., Anderson, J. E., Shibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ojima, K., Nishimatsu, S-I, Nohno, T., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Nishimura, T., Yagi, T., Allen, R. E. : *STEM CELLS*, 35, 1815～1834, 2017.
- 12) Grounds, M., McGeachie, J. : *Cell Tissue Res.*, 255, 385～391, 1989.
- 13) Grounds, M., McGeachie, J. : *Muscle Nerve*, 13, 305～313, 1990.
- 14) Mitchell, C., McGeachie, J., Grounds, M. : *Cell Tissue Res.*, 269, 159～166, 1992.
- 15) Meadows, E., Cho J. H., Flynn, J., Klein, W. : *Dev. Biol.*, 322, 406～414, 2008.

飼料用イネの繊維消化性を左右する要因の解明と 生産現場との技術的連携

Studies on fiber digestibility of forage rice, and development of research-
based cooperative extension service

近 藤 誠

(三重大学大学院生物資源学研究科)

Makoto Kondo

(Graduate School of Bioresources, Mie University)

Whole crop rice silage has been used as feed for dairy cattle in Japan. Indigestibility of unhulled grains in the digestive system of cattle causes an energy loss through excretion. Thus, rice cultivars that produce large shoot biomass with extremely small panicles (small-panicle cultivars) have been developed to reduce the energy loss as well as to supply a large quantity of fibers. Small-panicle cultivars Tachiayaka (TA) and Tachisuzuka (TS) are reported to accumulate a high concentration of sugars and starch in stems during the grain-filling period. While sugars enhance the lactic acid fermentation during ensiling, starch is expected to supply energy to dairy cattle. The large accumulation of non-structural carbohydrates (NSC) in stems during grain-filling is hypothesized to be induced by the small sink capacity in panicles. The present study is aimed at investigating whether panicle size affects the accumulation of NSC in stems during grain-filling and ruminal fermentation afterwards. Large-panicle cultivars Hoshiaoba (HA) and Kusanohoshi (KH) which produce large shoot biomass with large panicles were grown along with TA and TS. A portion of each panicle in HA and KH were artificially cut at the full-heading to mimic small-panicle cultivars (HAc and KHc, respectively). Then, stems were sampled at 4 and 8 weeks after full-heading stage. Both sugar and starch concentrations were significantly higher in small-panicle cultivars (TA and TS) than in large-panicle cultivars (HA and KH). The reduction of panicle size in large-panicle cultivars (HAc and KHc) significantly increased sugar and starch concentrations in stems. NDF contents in TS, TA, HAc and KHc were lower than those in HA and KH. In vitro ruminal total SCFA concentrations were significantly higher in TA, TS, HAc and KHc than in HA and KH. NDF digestibilities of TA, TS, HAc and KHc were also significantly higher than those of HA and KH. These results suggest that rice plants with genetically or artificially small-sized panicles accumulate a large amount of NSC in stems and their fiber digestion in rumen increases.

1. 目 的

水田を活用した国産の飼料生産の必要性が高まる中、乳牛や肉牛に対しては、飼料用イネをサイレージ発酵させたイネホールクロップサイレージ(WCS)が普及している。イネWCS用の品種としては、従来はデンプンを蓄える穂部が大きい品種(穂重型)が選ばれていたが、籾が牛の消化管内で消化しづらく、未消化のまま排泄されることが判明した。そこで穂が小さく(極短穂型)、繊維質に富む茎葉が多いタイプの品種が開発され、たちすずかやたちあやかなどの極短穂型の品種が普及している。たちすずかの栄養的な特徴として、繊維の消化性が従来の穂が大きい穂重型品種のクサノホシと比べて消化性が高いことが報告されている¹⁾。繊維の消化性は、牛による採食性や乳生産性に関連があるため、その性質が近年たちすずかの利用が急拡大した理由の一つと言える。しかし、たちすずかの繊維消化性が高い原因は不明瞭な点が残っている。そこで、本研究では、極短穂型と穂重型の品種を用いて、イネの穂部割合が茎部の繊維消化性に与える影響とその要因を解析することを目的とした。

2. 方 法

2.1 飼料用イネの栽培

試験にはイネWCSとして利用される品種のうち、穂重型のホシアオバ、クサノホシ、極短穂型のたちあやか、たちすずかを用いた。播種後3週目の苗を5月下旬に三重県津市の水田に移植した。なお、出穂直後のホシアオバ、クサノホシの一部の個体で穂を部分的に切除した。各品種、出穂後4週目および8週目に地上部の植物体を収穫し、全重量を測定した。その後、穂、茎(稈+葉鞘)、葉を分けて各部位の重量を測定し、60℃で48時間乾燥させた。

2.2 ルーメン内消化性と含有成分の分析

イネ茎部のルーメン内消化性を評価するため、めん羊からルーメン微生物を採取し、*in vitro*のルーメン培養を行った。基質として各品種のイネ茎部を加え、48時間後に未消化の培養残渣を回収し繊維消化率を測定した。また、ルーメン内での発酵可能な炭水化物量の指標として、培養上清から短鎖脂肪酸(SCFA, short-chain fatty acid)の濃度をHPLCにより測定した²⁾。イネ茎部に含まれる含有成分として単少糖類、デンプン、総繊維(NDF, neutral detergent fiber)、ヘミセルロース、セルロース、リグニンを測定した。単少糖類はフェノール硫酸法³⁾、デンプンはtotal starch assay kit (Megazyme 社)により測定した。総繊維および繊維構成成分はデタージェント法⁴⁾により測定した。

2.3 イネWCSを生産する農業法人における栽培概要の調査

中部地域にてイネWCSを生産する農業法人にて、栽培品種と収穫時期を聞き取りにより調査した。

3. 結果と考察

Table 1 に飼料用イネの茎部の総繊維消化率を示した。極短穂型品種のたちあやか、たちすずかはともに穂重型品種のホシアオバ、クサノホシと比べて、有意に高い消化率を示した。河野ら¹⁾ではたちすずかの繊維消化率がクサノホシと比べて有意に高いことを示しており、今回の結果を支持している。また本研究では、たちあやかについてもたちすずかと同様に繊維消化性が高い特徴を有することが明らかになった。特に穂重型では、出穂後の週数が4週から8週に進むにつれて繊維消化率が低下したのに対して、極短穂型ではその期間での変化はわずかであった。極短穂型品種では、茎部は地上部重量の約7割を占めており、飼

Table 1 in vitro ruminal NDF digestibility, SCFA profiles of stem from rice forage harvested at 4 and 8 weeks after heading.

Treatments	NDFD %	SCFA mM	Acetate mM	Propionate mM	Butyrate mM
4 weeks after heading					
Hoshiaoba (intact)	44.2	42.6	27.2	12.0	3.3
Hoshiaoba (cut)	45.0	50.6	31.5	14.1	5.0
Kusanohoshi (intact)	44.1	38.2	24.6	11.0	2.5
Kusanohoshi (cut)	44.8	49.0	30.7	13.4	4.9
Tachiayaka	47.9	54.7	33.9	15.1	5.6
Tachisuzuka	49.5	56.4	34.5	17.0	4.9
8 weeks after heading					
Hoshiaoba (intact)	38.4	39.7	25.2	11.2	3.2
Hoshiaoba (cut)	43.2	49.7	30.7	13.3	5.7
Kusanohoshi (intact)	38.9	41.4	26.0	11.8	3.6
Kusanohoshi (cut)	44.4	52.0	31.8	14.6	5.6
Tachiayaka	46.2	51.6	31.6	13.7	6.4
Tachisuzuka	46.7	55.0	33.2	15.7	6.1
p-value					
Cultivar	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Harvest	<0.001	0.408	0.015	0.001	<0.001
Cultivar x Harvest	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

NDFD, NDF digestibility ; SCFA, short-chain fatty acid

料価値に影響する主要な部位である。粗飼料の繊維消化率は乳牛にとって飼料摂取量と正の相関が認められており⁵⁾、極短穂型の2品種で茎部の繊維消化率が高いことは粗飼料として重要な特徴と言える。続いて、穂重型品種のホシアオバとクサノホシに対して穂部の一部を切除することで、人為的に穂部割合が小さい草型のイネを作り、その繊維消化率を無処理の場合と比較した。その結果、出穂後4週目では切除した効果は認められなかったが、出穂8週目では無処理に対して、切除により繊維消化率は有意に高い値を示した。以上の結果から、極短穂型品種が有する高消化性の特徴は、繊維の質に関係する遺伝的な性質よりも穂部の大きさの変化による二次的な要因が関与していることが推察された。

Table 2 にイネ茎部に含まれる総繊維含量と繊維構成成分の割合を示した。総繊維含量は、穂重型の2品種が極短穂型の2品種と比べて高い値を示した。これは後述するように、極短穂型では、

茎部に非繊維性の炭水化物が蓄積するため、相対的に繊維含量が少なくなったためと考えられる。繊維構成成分として、ヘミセルロース、セルロース、リグニンの繊維中の割合を比べると、たちあやかとたちすずかはともにホシアオバとクサノホシと比べて、ヘミセルロース割合が高く、セルロース割合が低かった。また、ホシアオバとクサノホシの穂部を一部切除することでも、極短穂型品種と同様に、ヘミセルロース割合が増加し、セルロース割合が低下した。一方、リグニンの割合には、穂部割合の違いによる影響は認められず、ホシアオバとたちあやかが、クサノホシとたちすずかよりも高い傾向を示した。さらに、穂部の一部切除によってリグニンの割合は変化しなかった。リグニンは繊維と強固に結合することで、繊維消化率を低下させる成分であるが⁶⁾、本研究からは、極短穂型品種の繊維消化率とリグニン割合との関係は見出されなかった。イネ科牧草を対象に繊維構成成分の消化率を比較した研究例では、

Table 2 Chemical composition of stem from rice forage harvested at 4 and 8 weeks after heading.

Treatments	NDF %DM	Hemicellulose %NDF	Cellulose %NDF	Lignin %NDF	Sugar %DM	Starch %DM
4 weeks after heading						
Hoshiaoba (intact)	62.0	35.9	57.2	6.9	11.0	3.9
Hoshiaoba (cut)	51.2	38.3	55.8	5.9	15.7	11.3
Kusanohoshi (intact)	68.5	36.4	55.9	7.7	7.7	2.4
Kusanohoshi (cut)	57.8	42.1	50.4	7.5	15.3	10.0
Tachiayaka	50.3	40.6	52.3	7.1	16.7	15.4
Tachisuzuka	47.6	39.1	54.4	6.6	21.9	9.5
8 weeks after heading						
Hoshiaoba (intact)	63.8	36.4	53.3	10.3	12.8	4.3
Hoshiaoba (cut)	51.5	43.1	46.9	10.0	17.6	16.2
Kusanohoshi (intact)	60.8	37.6	55.2	7.2	12.7	5.2
Kusanohoshi (cut)	50.8	44.7	49.2	6.1	18.7	14.9
Tachiayaka	51.9	45.9	43.9	10.1	16.4	20.0
Tachisuzuka	47.2	44.1	50.3	5.6	20.9	16.0
p-value						
Cultivar	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
Harvest	<0.001	<0.001	<0.001	0.004	<0.001	<0.001
Cultivar x Harvest	<0.001	0.004	<0.001	<0.001	0.002	0.019

ヘミセルロースの消化率はセルロースの消化率より高いことが報告されており⁷⁾、ヘミセルロースは繊維の中でもルーメン内で消化されやすい成分である。そのため、極短穂型品種の繊維消化率が高い原因として、ヘミセルロースの割合が高いことが影響していると考えられた。ここで、穂部割合が小さい極短穂型品種でヘミセルロースの割合が高まった原因としては不明であるが、同様の現象は他の先行研究でも示されている。Arai-Sanoh et al⁸⁾では、地上部に占める子実割合が25～53%のイネを対象に、ヘミセルロースの一部である β -1,3:1,4-グルカンの変化量を出穂前後で調べている。同論文では子実割合が多い品種では、出穂後に茎部に残存する β -1,3:1,4-グルカンが少ないのに対して、子実割合が少ない品種では、 β -1,3:1,4-グルカンの残存量が多いことを示している。つまり、イネWCSとして収穫する出穂後の時期には、穂部の大きさにより茎部のヘミセルロース割合が影響を受けることを示唆している。ヘミセルロース割合は茎部の消化性と関連

性が高く飼料用イネとしても重要な要素と判断できるが、その機構を明らかにするためには、今後の追究が必要である。

ルーメン微生物の培養系にて飼料用イネの茎部から産生された短鎖脂肪酸の濃度をTable 1に示した。牛の生体内では、ルーメン内で生じた短鎖脂肪酸を牛が吸収して体内でのエネルギー産生に利用するため、本研究の培養系で示す短鎖脂肪酸濃度は、牛が代謝可能なエネルギー量の間接的な指標として判断できる。飼料用イネの出穂後4週目、8週目ともに極短穂型品種から産生した短鎖脂肪酸が穂重型品種よりも高かった。さらに、穂重型品種において人為的に穂部の一部を切除したことで短鎖脂肪酸が増加した。これらの結果は穂部割合が小さい品種ほど、茎部から得られる代謝エネルギー量が多いことを意味しており、品種としても飼料価値としても高いことが推察される。短鎖脂肪酸はルーメン内で発酵可能な炭水化物量を示しており、主に単少糖類、デンプン、繊維から得られる。そこで飼料用イネの茎部に含ま

れる単少糖類、デンプンを比較したところ、単少糖類は、いずれの収穫時期においても、ホシアオバおよびクサノホシの穂重型と比べて、たちあやかおよびたちすずかの極短穂型で有意に多く含まれていた (Table 2)。Matsushita et al.⁹⁾ でもたちすずかは親品種のクサノホシと比べ、スクロースをはじめ単少糖類が多く含まれていることを報告しており、本研究の結果を支持している。また本研究では、単少糖類に加えて、デンプンも穂重型と比べて、極短穂型で有意に多く含まれていた。単少糖類やデンプンはルーメン内で速やかに微生物により発酵され、短鎖脂肪酸を産生する栄養素である。このように極短穂型品種の茎部に単少糖類に加えてデンプンも多く蓄積していたことが、先に述べた極短穂型品種からの短鎖脂肪酸の産生量が多かった要因として考えられた。また、穂重型品種の穂を一部切除した場合、極短穂型品種と類似して単少糖類およびデンプンを多く含んでいた。これらのことは、穂部割合が小さい飼料用イネでは、穂部のシンクサイズが小さく限定されるため、光合成産物が茎部に単少糖類およびデンプンとして蓄積し、その結果、ルーメン内で産生する短鎖脂肪酸量を増加させることを示した。

イネWCSを生産する農業法人における栽培概要の聞き取り調査を行った結果、複数の法人で20ha以上のWCS用イネを栽培しており、品種は極短穂型品種が過半数を占めていた。特にたちすずかの利用量が最も多かった。また、収穫時期は主に9月中下旬から10月下旬にかけて行われているが、年によっては天候の不順が続くこともあり、その場合は11月に差しかかることもあった。先述の栽培試験の結果では、穂重型品種では生育期間が出穂後4週目から8週目まで4週間延長することで繊維消化率が低下したが、極短穂型品種ではその期間の消化率低下はわずかであった。したがって、広大な面積でイネを栽培する生産現場

では天候不順などにより収穫期間の延長も起こりうるため、繊維消化率が低下しづらい極短穂型品種を利用することは、牛へより飼料価値の高いイネWCSを供給するうえでの利点であることが示された。今後の課題として、本研究では1年分の栽培試験に限定されたため、今後は複数年にわたり調査を継続することが必要である。また、本研究ではサイレージではなく収穫直後のイネを試験に用いたため、実際に畜産農家が牛に給与する際のサイレージとは状況が異なる可能性も想定される。今後、サイレージを用いた試験により繊維消化性やサイレージ内での単少糖類、デンプンの残存性、ルーメン内での短鎖脂肪酸産生について明らかにすることが必要である。

4. 要 約

本研究では、飼料用イネの茎部の繊維消化性がイネの穂部割合により影響を受けることを明らかにした。特に近年利用が拡大している極短穂型の品種は茎部の繊維消化性が高く、その要因としては、繊維中のヘミセルロースとセルロースの存在比率が関与していることが示唆された。また、極短穂型品種では、茎部に単少糖類とデンプンが蓄積することで、ルーメン内で発酵可能な炭水化物量が多く、牛へ供給可能なエネルギー量が多い可能性が示された。特にこれらの特徴は出穂後4週目から8週目まで維持されており、従来の穂重型品種と比べて優位な点として判断できた。イネWCSを生産する農業法人では、栽培面積が広いことや天候により収穫期間が長引くこともあるため、繊維消化率が低下しづらい極短穂型品種を利用することは、牛へより飼料価値の高いイネWCSを供給するうえでの利点であることが示された。

文 献

- 1) 河野幸雄, 新出昭吾, 神田則昭, 城田圭子, 福馬敬紘, 塚崎由子: 日本草地学会誌, **60**, 91~96, 2014.
- 2) Kondo, M., Shimizu, K., Jayanegara, A., Mishima, T., Matsui, H., Karita, S., Goto, M., Fujihara, T.: *J Sci Food Agric*, **96**, 1175~1180, 2016.
- 3) Hall, M. B.: *Anim Feed Sci Technol*, **185**, 94~100, 2013.
- 4) Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A.: *J Dairy Sci*, **74**, 3583~3597, 1999.
- 5) Oba, M., Allen, M. S.: *J Dairy Sci*, **82**, 589~596, 1999.
- 6) Thorstensson, E. M. G., Buxton, D. R., Cherney, J. H.: *J Sci Food Sci*, **59**, 183~188, 1992.
- 7) Jung, H. G., Vogel, K. P.: *J Anim Sci*, **62**, 1703~1712, 1986.
- 8) Arai-Sanoh, Y., Ida, M., Zhao, R., Nishitani, K., Yoshinaga, S., Takai, T., Nakano, H., Iwasawa, N., Kondo, M.: *Plant Prod Sci*, **16**, 335~341, 2013.
- 9) Matsushita, K., Iida, S., Ideta, O., Sunohara, Y., Maeda, H., Tamura, Y., Kouno, S., Takakuwa, M.: *Breeding Sci*, **61**, 86~92, 2011.

黒毛和種肥育牛の安定的ルーメン発酵に貢献する 重要細菌群の特性把握

Determination of factors affecting on growth of rumen bacterial species
contributing to stable rumen fermentation in Japanese Black cattle

小 池 聡

(北海道大学大学院農学研究院)

Satoshi Koike

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

Japanese Black (JB) is the most popular beef breed and accounts for 60% of beef cattle in Japan. In order to produce marbling meat, JB cattle are fed concentrate-based diet for over one year. Therefore, starch degrading bacteria play an important role in stable rumen fermentation in JB cattle. In this study, we aimed to characterize starch degrading bacteria belonging to core phylotypes of rumen microbiota in JB cattle. Ruminal content was collected from fattening JB cattle using the stomach tube and used for isolation of starch degrading bacteria (roll tube method). In the previous study, Lachnospiraceae, Prevotellaceae, Ruminococcaceae, unclassified Bacteroidales and unclassified Clostridiales were identified as core members of the microbiota, and we attempted to isolate starch degrading bacteria belonging to these phylotypes. Among 178 newly isolated strains, 12 strains were classified into either of target phylotypes: 5 strains for Lachnospiraceae, 5 strains for Ruminococcaceae and 2 strains for Prevotellaceae. Based on the phylogenetic positions, representative strains were selected and used for characterization. Under different pH conditions, Lachnospiraceae strain grew at pH 5.5; meanwhile, strains of Prevotellaceae and Ruminococcaceae did not. Strains of Lachnospiraceae and Ruminococcaceae adhere to feed particles within 30 minutes of incubation, and the extent of adhesion was higher in concentrate particles than in hay particles. Although Prevotellaceae strain did not adhere to feed particles within 30 minutes of incubation, amount of particle-adherent cells seemed to gradually increase during 24 h of incubation. Therefore, the strains belonging to core phylotypes of rumen microbiota in JB cattle might be involved in feed digestion in different manners.

1. 目 的

黒毛和種は日本の肉用牛飼養頭数の約65%を占める重要な肉用品種である¹⁾。本品種は良好な脂肪交雑を得るために1年以上にわたって濃厚飼料多給による肥育を行うため、安定生産においては

健全なルーメン発酵を維持することがきわめて重要である。私たちの研究室では、これまでに分子生態的アプローチにより黒毛和種肥育牛のルーメン発酵において重要な役割を担う細菌群の特定を進めてきた。その結果、Lachnospiraceae, Ruminococcaceae, Prevotellaceae, Unclassified

Clostridiales および Unclassified Bacteroidales が肥育ステージによらず主要な構成メンバーであることが明らかとなった。特に前三者には既知の澱粉分解性細菌が含まれ、濃厚飼料多給条件下で重要な存在と考えている。Lachnospiraceae 科には非常に多様性の高い *Butyrivibrio* 属^{2, 3)} が含まれており、澱粉分解性の *B. fibrisolvens* を含め、生理機能の異なる多くの菌種が含まれる。Ruminococcaceae 科にはヒト腸管内の澱粉分解菌として知られる *Ruminococcus bromii*^{4, 5)} が属しており、ルーメン内においても本菌種の近縁菌群の分布量が濃厚飼料多給時に増加することが知られている⁶⁾。Prevotellaceae 科に属する *Prevotella* 属細菌は、さまざまな飼料条件において優勢な菌群であり⁷⁻⁹⁾、全ルーメン細菌の60%を占めることもある¹⁰⁾。さらに *Prevotella* 属細菌の中でも最も多くの割合を占める *P. ruminicola* は、セルロースを分解できないものの、澱粉やヘミセルロースを分解できる^{11, 12)} ことから広食性の糖類利用菌といえる。以上の既知情報より、黒毛和種牛ルーメン内において Lachnospiraceae, Ruminococcaceae および Prevotellaceae に属する細菌が主導的に澱粉分解を担う細菌群 (コア澱粉分解菌群) と考えられる。

一方、分子生態的アプローチでは標的細菌群の生理的特徴を正確に把握することは難しく、コア澱粉分解菌群の役割を解明するためには実際に分離株を取得し、その生理機能を明らかにする必要がある。本研究では、黒毛和種肥育牛ルーメン内のコア澱粉分解菌群に属する新規菌株を分離・培養し、それらの生理機能を把握することを目的とした。

2. 方 法

2.1 コア澱粉分解菌群の分離および系統解析 肥育中期 (20ヶ月齢) の黒毛和種牛8頭から給

餌後4時間のルーメン液を経口採取し、分離源として用いた。ルーメン液を段階希釈した後、マルトースとスターチを基質とする培地に接種してロールチューブを作製した。培養1日から18日に出現したコロニーを釣菌し、マルトース・スターチ培地へ植菌した。グラム染色により純菌であることを確認した菌液よりDNAを抽出し、16S rDNAをPCR増幅後、ダイレクトシーケンシングにより塩基配列を決定した。新規分離株の16S rDNA塩基配列をBLAST検索によりGenBankに登録されているデータベースと照合した。遺伝子解析ソフトウェアCLUSTAL Xを用いて多重比較を行い、近隣結合法により系統樹を作成し、近縁の既知菌情報から新規分離株を同定するとともに分子系統位置を特定した。

2.2 新規菌株の基質利用性、基質への初期付着能および低pH耐性の査定

コア澱粉分解菌群に属することが確認された菌株の中から、分子系統位置から代表菌株を選抜し、異なる炭素源を含む培地を用いて増殖モニタリングを行い、基質利用性を調べた。基質への初期付着能は、各菌株を対数増殖中期まで培養後、菌体を遠心分離により沈殿させ、嫌気性希釈液で1度洗浄してから再懸濁したものを粗飼料および濃厚飼料片へ30分間接触させた。接触後、基質に付着した細菌のみを回収し、Protein Assay Kit (BIO-RAD) により菌体タンパク量を測定した。低pH耐性はpHを6.8, 6.0または5.5に調整したルーメン液培地 (可溶性スターチが唯一の炭素源) を用い、各菌株の増殖を嫌気チャンバー内のプレートリーダーにより継続的にモニタリングした。なお、pH5.5の培地にはpH6.0の培地で一代馴致させた菌液を接種した。

2.3 ルーメン液に含まれるコア澱粉分解菌群 に対する増殖因子の探索

可溶性デンプンを基質とする合成培地に黒毛和

種肥育牛，黒毛和種育成牛またはホルスタイン種肥育牛由来の精製ルーメン液を異なる濃度で添加し，供試菌株の増殖を測定した。

3. 結果と考察

本研究では178菌株を釣菌し，純菌であった84菌株について16S rDNAシーケンシングによる同定を行った。そのうちLachnospiraceaeまたはRuminococcaceaeに属する菌株をそれぞれ5菌株取得した。LachnospiraceaeのYAB-26株は黒毛和種牛ルーメン由来未培養クローンとの塩基配列相同性が100%であった。Ruminococcaceaeに属する菌株のうち，既知*R. bromii*分離株と92～96%の塩基配列相同性を示したYAB-117株およびYAB-127株は，黒毛和種牛ルーメン由来未培養クローンと分子系統樹上でほかの分離株よりも近傍に位置していた。以上より，これら3菌株をコア澱粉分解菌群の代表菌株として選定した。基質利用性を調べたところ，Lachnospiraceae

YAB-26株はスターチおよびマルトースのみを利用し，幅広い基質を利用した*B. fibrisolvens*とは利用性が異なることが明らかとなった（Fig. 1）。*R. bromii*基準株はグルコース，マルトースおよびスターチ培地で増殖したが，*R. bromii*近縁分離株2株はマルトースを利用せず，また増殖の程度も既知菌株よりも低かった（Fig. 1）。したがって，黒毛和種牛ルーメン由来Lachnospiraceae YAB-26株および*R. bromii*近縁菌株（YAB-117株およびYAB-127株）はいずれもスターチもしくはマルトースの利用性が他の糖類に比べて高く，澱粉分解に特化した特性を有する可能性が示された。飼料片への初期付着能において，いずれの菌株も粗飼料に比べて濃厚飼料への付着能が高いことが明らかとなった（Fig. 2）。この結果から，これらの菌株がルーメン内においても濃厚飼料片に速やかに付着することが示唆された。

異なるpH条件における各菌株の増殖モニタリングの結果をFig. 3に示す。Lachnospiraceae

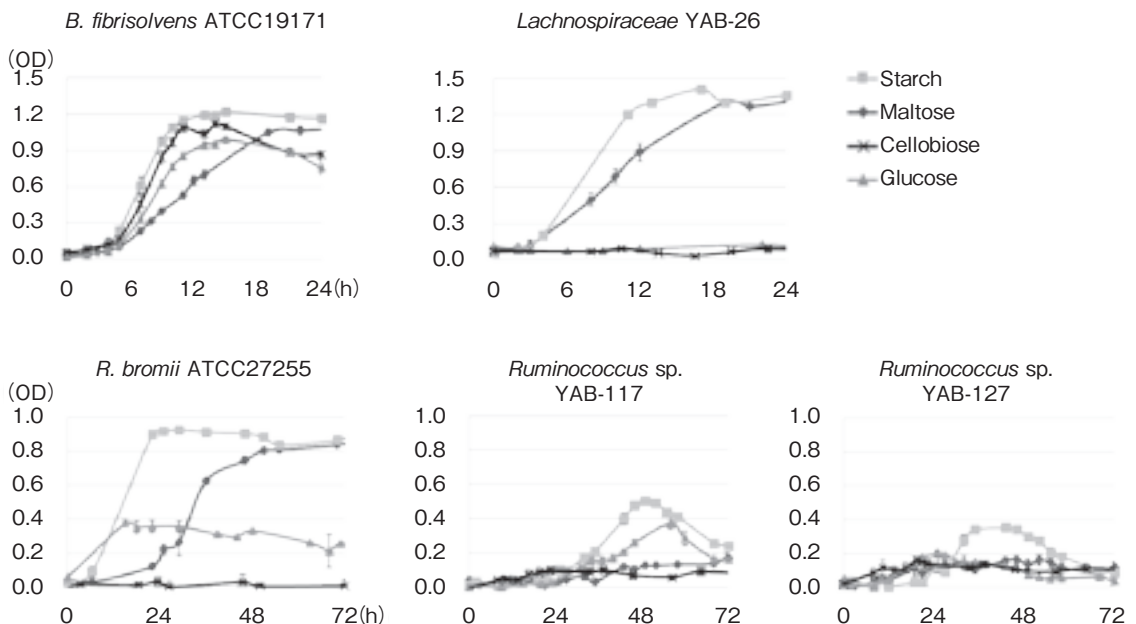


Fig. 1 Growth monitoring of starch degrading bacteria under different carbon sources

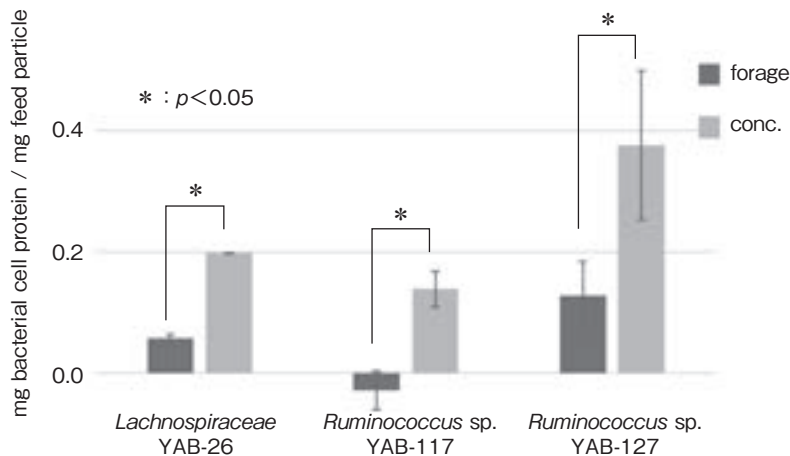


Fig. 2 Attachment of starch degrading strains to feed particle

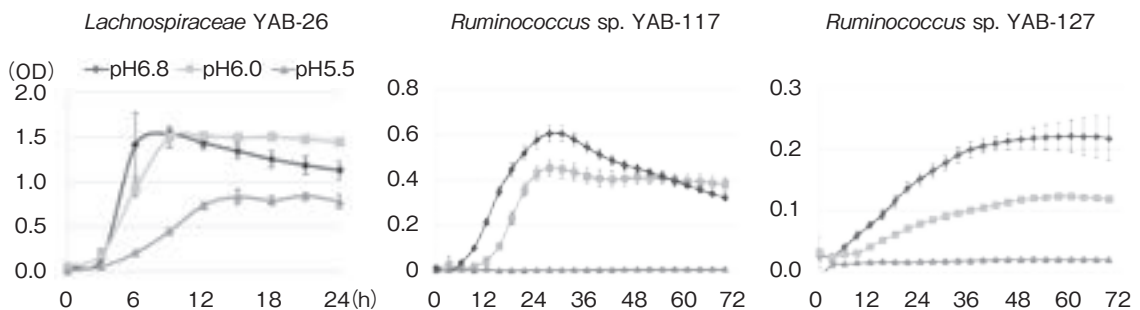


Fig. 3 Growth monitoring of starch degrading bacteria under different pH conditions

YAB-26株はいずれの培地でも増殖し、pH5.5の培地においては最大OD値が1.0に達した。このことからLachnospiraceae YAB-26株は低pHに耐性があり、給餌直後の黒毛和種牛ルーメン内においても増殖を阻害されることはないと考えられる。一方で*R. bromii*近縁菌株はpH6.0までは増殖したもの、pH5.5では72時間後も増殖を示さなかった。この結果から、*R. bromii*近縁菌株はpHへの感受性が高く、pHが低下する給餌直後のルーメン内での活性が限定されることが推察される。一方、両菌株が属するRuminococcaceaeは肥育期間を通じてルーメン内で分布量を維持していることから、本科の細菌は低pHへ段階的に適応していく可能性が示唆された。

品種もしくは生育ステージが異なる3種類のルーメン液を添加した培地において、*R. bromii*基準株の増殖はいずれのルーメン液および添加濃度でも顕著な差は見られなかった (Fig. 4)。YAB-117株では特に黒毛和種肥育牛由来ルーメン液で増殖改善が見られ、YAB-127株ではいずれのルーメン液でも添加濃度依存的な増殖改善が見られた (Fig. 4)。このことから、黒毛和種肥育牛ルーメン液に新規デンプン分解菌の増殖因子が含まれる可能性が高いと考えられる。

4. 要 約

本研究では、黒毛和種牛ルーメン内におけるコア細菌群3科の特徴を把握することを目的とし

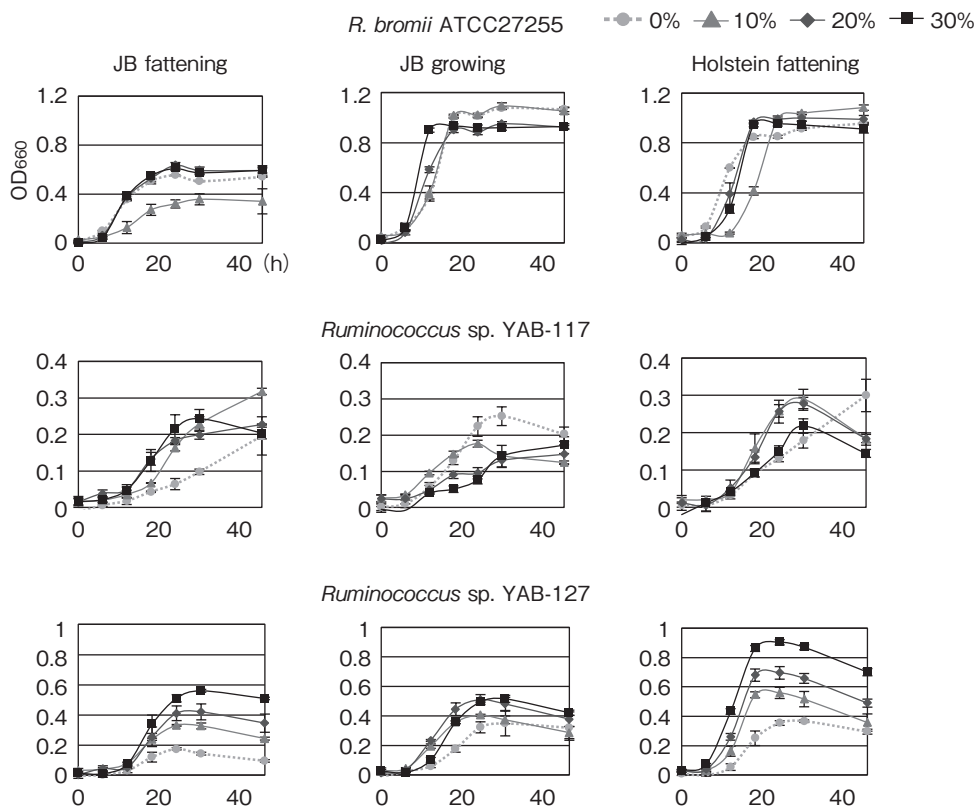


Fig. 4 Effect of rumen fluid addition on growth of starch degrading bacteria

て、黒毛和種牛ルーメンから分離培養した *Lachnospiraceae* YAB-26 株, *Ruminococcaceae* YAB-117 株, *Ruminococcaceae* YAB-127 株および *Prevotellaceae* YAB-131 株を各科の代表菌株として供試し、生理機能解析を行った。異なる pH における増殖モニタリングの結果、*Lachnospiraceae* YAB-26 株は低 pH に耐性があり、濃厚飼料増給によりルーメン内の pH が低下する条件下においても澱粉分解に貢献すると考えられる。初期付着能試験では、*Lachnospiraceae* 科および *Ruminococcaceae* 科の代表菌株が粗飼料片と比較して濃厚飼料片に対して高い付着能を示したことから、ルーメン内においても濃厚飼料片へ優先的に付着するものと考えられる。*R. bromii* 基準株ではルーメン液添加による顕著な増殖促進は認められなかった。一方、*Ruminococcus* sp.

YAB-117 株および *Ruminococcus* sp. YAB-127 株はルーメン液添加により増殖が改善し、その程度は特に黒毛和種肥育牛ルーメン液で顕著だった。

引用文献

- 1) 農林水産省：平成25年度畜産統計調査，東京，2014.
- 2) Forster, R. J., Teather, R. M., Gong, J., Deng, S. J. : *Lett. Appl. Microbiol.*, **23**, 218~222, 1996.
- 3) Kopečný, J., Zorec, M., Mrazek, J., Kobayashi, Y., Marinsek-Logar, R. : *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **53**, 201~209, 2003.
- 4) Ze, X., Duncan, S. H., Louis, P., Flint, H. J. : *ISME J.*, **6**, 1535~1543, 2012.
- 5) Ze, X., Mougén, F. L., Duncan, S. H., Louis, P., Flint, H. J. : *Gut microbes*, **4**, 236~240, 2013.
- 6) Klieve, A. V., O'Leary, M. N., McMillen, L., Ouwerkerk, D. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **103**, 2065~2073, 2007.
- 7) Pitta, D. W., Pinchak, W. E., Dowd, S. E., Osterstock, J., Gontcharova, V., Youn, E., Dorton, K., Yoon, I., Min, B. R., Fulford, J. D., Wickersham, T. A.,

- Malinowski, D. P. : *Microb. Ecol.*, **59**, 511~522, 2010.
- 8) Stevenson, D. M., Weimer, P. J. : *Appl. Microbiol. Biootechnol.*, **75**, 165~174, 2007.
- 9) Tajima, K., Aminov, R. I., Nagamine, T., Matsui, H., Nakamura, M., Benno, Y. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**, 2766~2774, 2001.
- 10) Van Glyswyk, N. O. : *FEMS Microbiol. Ecol.*, **73**, 243~254, 1990.
- 11) Cotta, M. A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 772~776, 1988.
- 12) Cotta, M. A. : *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**, 3557~3563, 1993.

乳用子牛への機能性飼料の給与による亜急性 第一胃アシドーシスの制御と発育向上

Effects of active dry yeast supplementation on subacute ruminal acidosis
and growth performance in Holstein calves

櫛 引 史 郎

(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)

Shiro Kushibiki

(National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

We conducted two experiments to clarify the effects of active dried *Saccharomyces cerevisiae* (ADSC) strain CNCM I-1077 (Levucell® SC ; Lallemand, France) on Holstein calves. In the first experiment, we investigated the impact of ADSC on ruminal pH, fermentation, and plasma metabolites during the short-term high-grain (HG) diet feeding. Four rumen-fistulated Holstein calves (3.6 ± 0.2 months of age) supplemented with (2×10^9 CFU/d ; SC group, $n=4$) or without (Control group, $n=4$) ADSC were fed the HG diet for 2 days. The 1 h mean ruminal pH was significantly depressed during the HG diet feeding in both groups, although the changes were more severe in the SC group compared with the Control group, consistent with a higher proportion of total VFA ($p<0.1$) and butyric acid ($p<0.05$). The results suggest that ADSC supplementation induced the intense decreases in ruminal pH by increased total VFA and butyric acids production through a HG diet. In the second experiment, we evaluated the influence of administered ADSC on ruminal fermentation, plasma hormones and metabolites, and growth performance for seven weeks (from 3 to 10 weeks of age) during pre- and postweaning periods. Ruminal propionate ratio and NH_3 concentration after weaning, and plasma GH and IGF-I concentrations around the time of weaning in the SC group (treated with 2×10^9 CFU/d of ADSC, $n=13$) were higher than the control group (without ADSC treated, $n=13$). These changes may have resulted in greater ADG observed in the SC group, compared with the Control group.

1. 目 的

離乳という過程は、液状飼料から固形飼料への移行だけではなく、単胃動物から反芻動物への移行、つまり代謝・内分泌機能における顕著な変化をもたらす。それゆえ、離乳が発育停滞の誘因となる場合も少なくない¹⁾。その予防策として離乳

期におけるスターターの多給が行われてきた²⁾。

しかし、易発酵性飼料の多給とそれに伴う粗飼料摂取量の低下は第一胃液pHの低下につながる可能性がある³⁾。成牛では、第一胃液pHの低値が一定時間以上持続する状態は亜急性第一胃アシドーシス (SARA) と診断され、乾物摂取量や乳量の低下⁴⁾ などさまざまな病態との関連が指摘さ

れている。子牛における第一胃液pHの変化が第一胃内発酵や生体機能へ及ぼす影響について、多くは明らかになっていない。しかし、離乳前後における粗飼料の無給与は、第一胃液pHの低値だけでなく、第一胃発酵の変化や第一胃液エンドトキシン (LPS) 活性の増加、そして血中成長ホルモン濃度の低下を引き起こすことが分かっている⁵⁾。

Saccharomyces cerevisiae (SC) は牛で広く利用される代表的な酵母である。中でもCNCM I-1077株 (Levucell® SC; Lallemand, France) は反芻動物の第一胃機能を向上させる効果の高さから選抜された株で、成牛で認められる効果のひとつに第一胃液pH低下の軽減作用がある⁶⁾。そこで、子牛におけるこの効果を検証するために、本株を給与した子牛への濃厚飼料多給試験を行った (濃厚飼料多給試験)。

一般に、SC製剤の給与は第一胃内の嫌気状態を維持し、総細菌数、真菌数、プロトゾア数を増加させ⁷⁾、第一胃環境を安定化させる。これにより、線維消化率の向上⁸⁾、乾物摂取量の増加および発育の向上⁹⁾等の効果が認められる。しかし、子牛へのSC製剤給与時における第一胃発酵および発育と、血中の代謝成分やホルモン濃度変化との関連は明らかとなっていない。そこで、離乳前後の7週間における活性酵母SC CNCM I-1077株の給与が、第一胃発酵、代謝・内分泌機能、および発育に及ぼす影響を明らかにした (長期給与試験)。

2. 方 法

2.1 濃厚飼料多給試験

2.1.1 供試牛、給与方法、第一胃液pH測定、および胃液と血液の採材

第一胃にフィステルを装着したホルスタイン種雄子牛4頭 (体重 147 ± 5.8 kg, 3.6 ± 0.2 か月齢；

平均 $\pm$ 標準誤差)を用い、対照区、または活性酵母 (Levucell® SC; 2×10^9 CFU/日)を飼料へ添加給与する活性酵母区に配置した。試験期間は21日間とした。試験開始から15日間は粗濃比57:43の飼料を給与した (CP15.2%, TDN68.4%)。その後2日間は配合飼料および大豆粕を等量混合した飼料のみ給与した (CP15.7%, TDN80.5%; 濃厚飼料多給期間 (Day 0および1))。濃厚飼料多給期間の後、試験終了までの4日間は再び粗濃比57:43の飼料とした。試験期間終了より2週間、乾草を飽食させてから区を入れ替えて同じ処理を行った。試験飼料は乾草 (CP13%, NDF68%)、配合飼料、および大豆粕で構成し、食べ切れる量を給与した。飼料給与は8:00と17:00の1日2回、飲水は自由とした。

第一胃液pHは、研究用に開発された子牛用無線伝送式pHセンサー (YCOW-S; 山形東亜DKK株式会社)を用いて10分間隔で連続測定した。集めたデータから1時間ごとの平均pHおよび1日あたりのpH5.6未満の時間数を算出した。また、濃厚飼料多給の前後においてフィステルから第一胃液を、頸静脈から血液を採取した。

2.2 長期給与試験

2.2.1 供試牛、給与方法、体重測定、および胃液と血液の採材

ホルスタイン種子牛26頭 (雌12頭, 雄14頭)を用いた。試験期間は3週齢から10週齢までの7週間とした。供試牛 (体重 57.8 ± 1.0 kg)は試験開始時に対照区、または活性酵母区 (各区、雌6頭, 雄7頭)へ無作為に配置した。活性酵母区には、朝給与する全乳またはスターターに活性酵母 (Levucell® SC; 2×10^9 cfu/日)を添加して給与した。飼料給与は9:00と16:00の1日2回とした。全乳は、給与上限を9L/日として1日あたり体重の11%量 (朝5%, 夕6%)を給与した。6週齢で哺乳量を2L/日に減らし、7週齢で離

乳した。スターター (CP 21%, TDN 84%) およびカットチモシー (CP 8.1%, NDF 63.5%) は、週齢にあわせて食べ切れる量を給与した。体重は週1回計測し、平均日増体重 (ADG) を算出した。第一胃液は10週齢の11:00に経口採取した。血液は3, 4, 6, 7, 8, および10週齢時の飼料給与前に頸静脈から採取した。

2.3 第一胃液および血液の測定

第一胃液のVFA濃度は、Thermon-3000 3% ガスカラム (進和化学工業株式会社) を用い、ガスクロマトグラフィー (Model135, 日立) にて定量した。第一胃液のLPS活性は、平林ら¹⁰⁾ の方法に準じて測定した。第一胃液のアンモニア濃度は、窒素自動蒸留装置 (kjeltac Auto 1035, Actac) にて測定した。血漿中の代謝成分は自動分析装置 (7070, 日立) にて測定した。血漿中成

長ホルモン (GH), インスリン様成長因子-I (IGF-I), インスリンおよびグルカゴン濃度はRIA, 血漿中急性期タンパク質およびサイトカイン濃度はELISAにより測定した。

2.4 統計処理

統計ソフト (SAS University Edition; SAS Institute, USA) を用いて、各測定項目における処理効果の判定を行った。最小二乗平均および標準誤差を算出し、交互作用が有意であった時にTukeyの検定により同時間または同採材週における処理区の差を判定した。 $p < 0.05$ を有意差あり, $p < 0.1$ を有意傾向ありとした。

3. 結果と考察

3.1 濃厚飼料多給試験

試験期間中、両区とも給与飼料を完食し、飼料

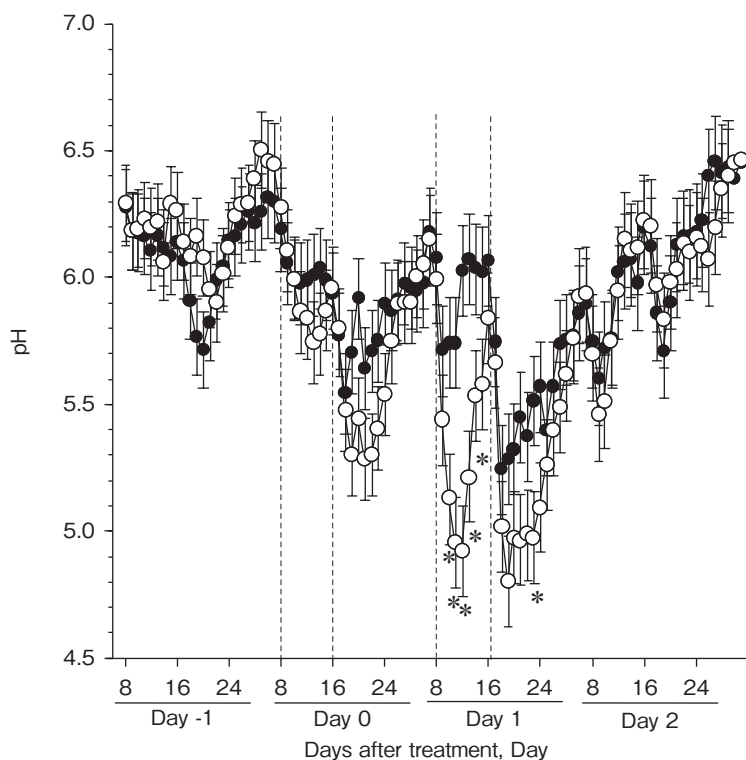


Fig. 1 Diurnal changes in the 1 h mean ruminal pH in Holstein calves supplemented 0 (Control group, ●, $n=4$) or 2×10^9 CFU/day (SC group, ○, $n=4$) of active dried *Saccharomyces cerevisiae*. Dotted lines indicate feeding only concentrate and soybean flakes (0800h and 1700h). Values represent mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$.

摂取量に区間の差はなかった。

試験期間を通して両区の第一胃液pHは、採食

から3時間程かけて低下し、その後次の採食まで
に採食前と同じレベルまで回復する日内変動を示

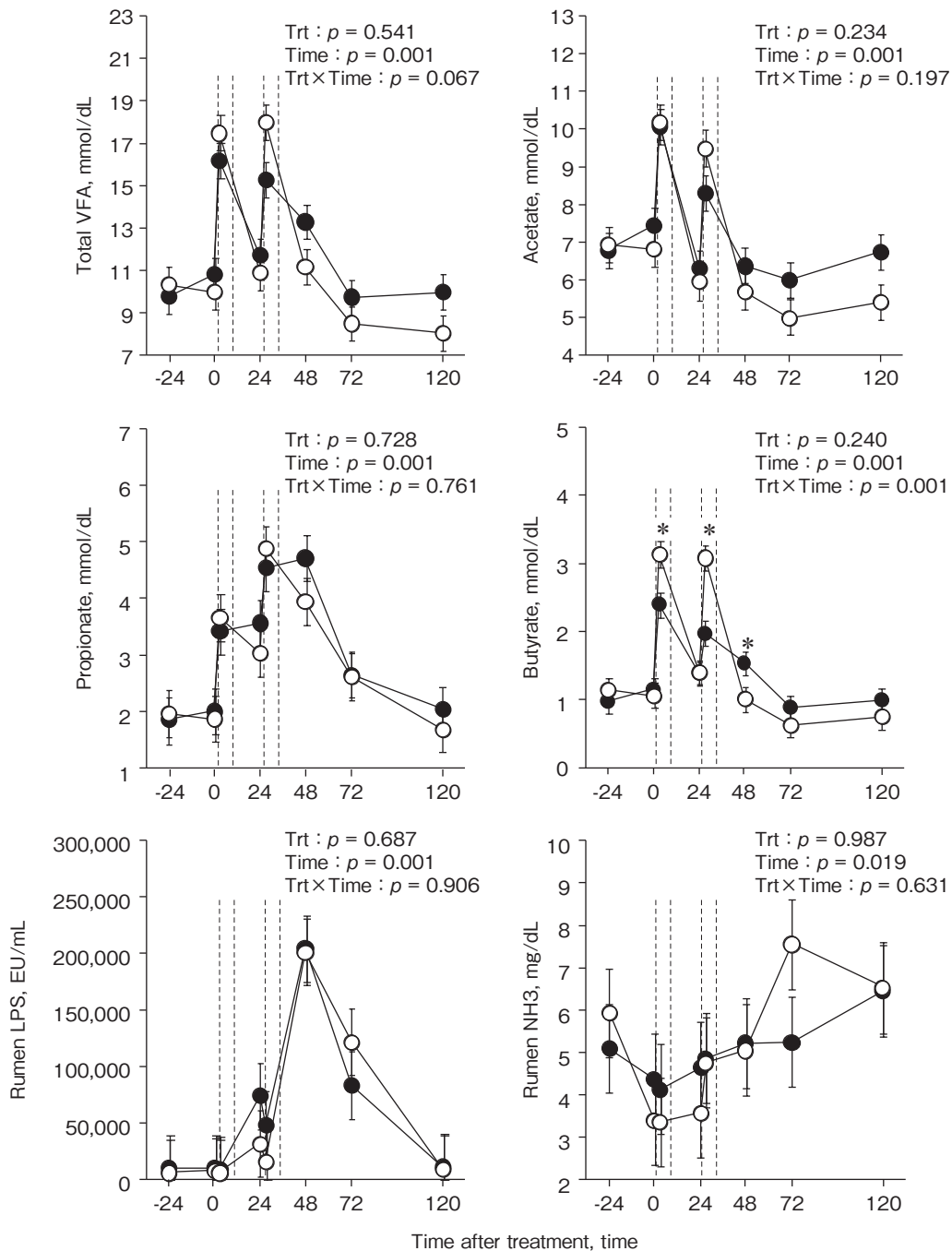


Fig. 2 Changes in ruminal fermentation characteristics of Holstein calves supplemented 0 (Control group, ●, n=4) or 2×10^9 CFU/day (SC group, ○, n=4) of active dried *Saccharomyces cerevisiae*. Dotted lines indicate feeding only concentrate and soybean flakes (0800h and 1700h). Values represent mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$.

した (Fig. 1)。濃厚飼料多給期間には、両区とも採食に伴うpH低下の程度が大きくなった。さ

らに、活性酵母区では、対照区より採食後のpHが顕著に低下した ($p < 0.05$)。しかし、次の採食

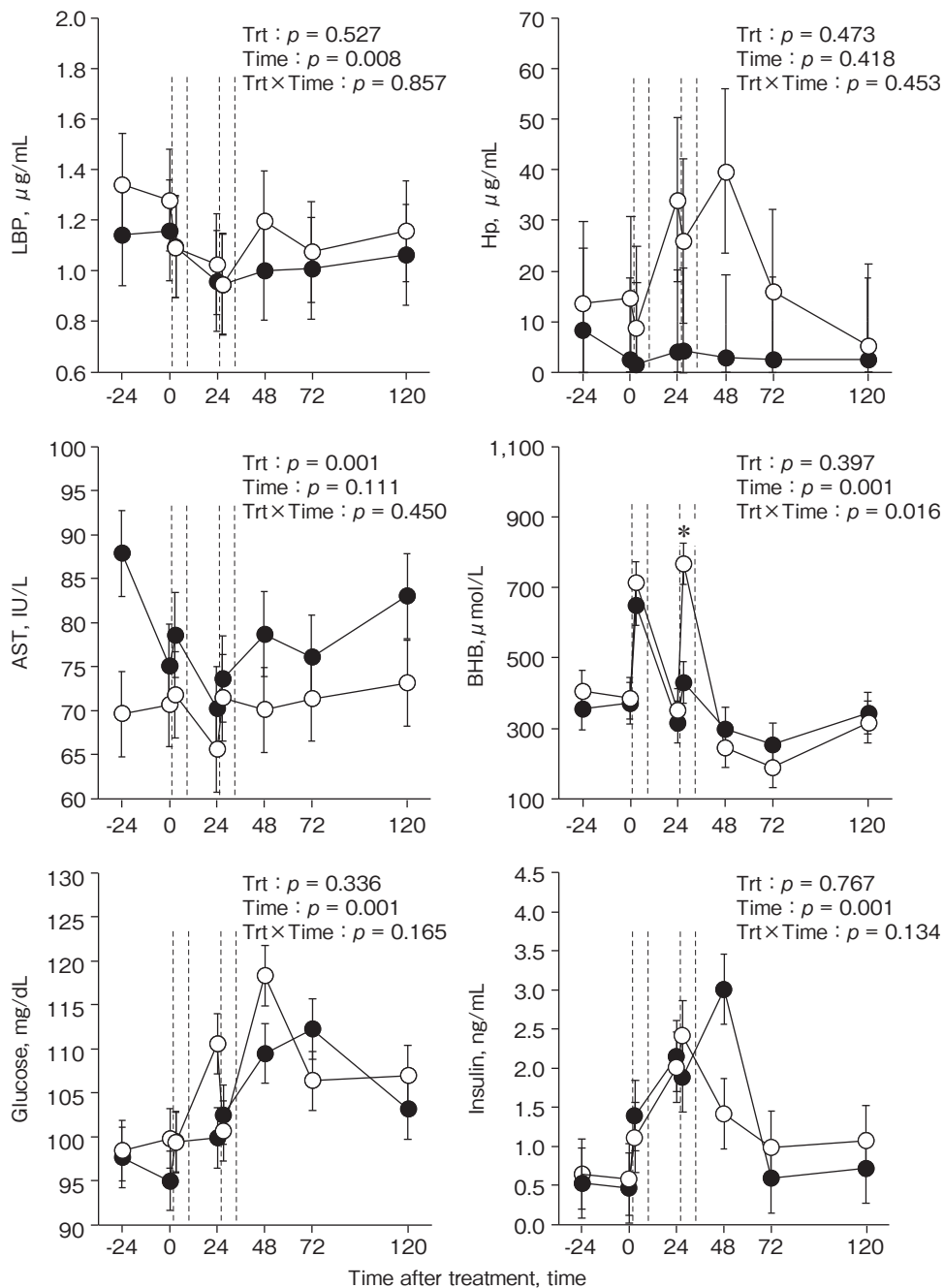


Fig. 3 Changes in plasma metabolites and hormones profiles in Holstein calves supplemented 0 (Control group, ●, $n=4$) or 2×10^9 CFU/day (SC group, ○, $n=4$) of active dried *Saccharomyces cerevisiae*. Dotted lines indicate feeding only concentrate and soybean flakes (0800h and 1700h). Values represent mean $\pm$ SE. * $p < 0.05$.

までには採食前と同程度のpHに回復し、対照区との差も認められなくなった。成牛の基準¹¹⁾を参

考に、1日に3時間を超えて第一胃液pHが5.6を下回る状態をSARAと診断すると、対照区では濃

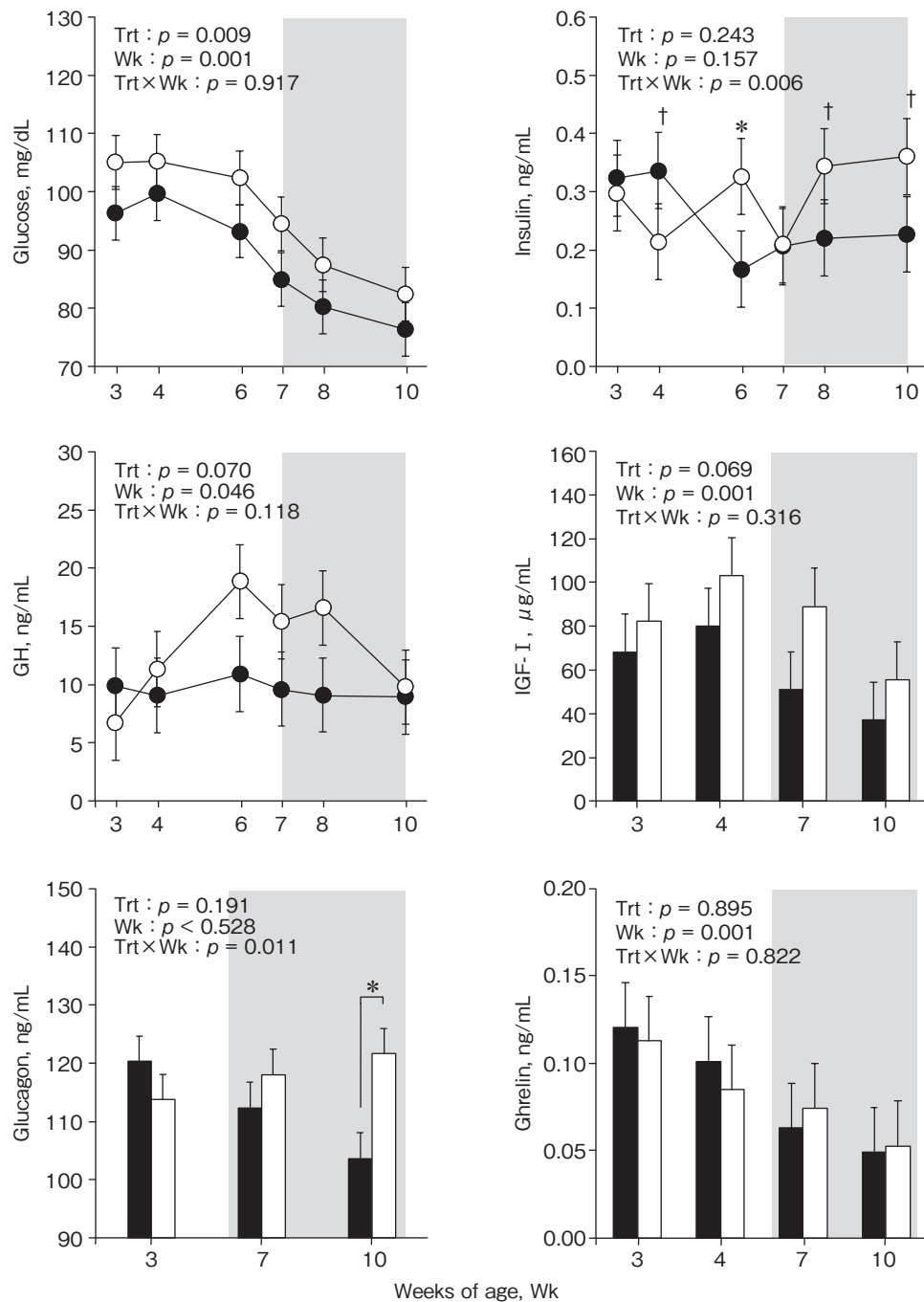


Fig. 4 Temporal changes in plasma metabolites and hormones profiles of Holstein calves treated with (SC group) or without (Control group) active dried *Saccharomyces cerevisiae* supplementation. (●) and (■) represent the Control group, and (○) and (□) represent the SC group. Values represent mean $\pm$ SE ($n=13$). * $p < 0.05$ and † $p < 0.1$. Gray background shows the weeks of after weaning.

厚飼料多給2日目に、活性酵母区では多給した両日ともにSARAが誘発された（データ示さず）。濃厚飼料多給期間の翌日以降は、両区とも第一胃液pHが上昇しSARAから回復した。

濃厚飼料の多給により、第一胃液中の総VFA量および各VFA濃度は両区とも有意に高まった（Fig. 2）。活性酵母区の総VFA量は対照区よりも高い傾向（ $p < 0.1$ ）を示し、酪酸濃度は対照区よりも有意に高まった。なお、両区的第一胃液LPS活性に差は認められなかった。

血漿中急性期タンパク質濃度およびAST濃度は、濃厚飼料多給の影響を受けず、両区の差も認められなかった（Fig. 3）。血漿中BHB濃度は、両区とも濃厚飼料多給により有意に増加した。濃厚飼料多給2日目には、活性酵母区のBHB濃度は対照区よりも高値を示した（ $p < 0.05$ ）。血漿中サイトカイン濃度や、その他の代謝およびミネラル成分に差は認められなかった。

本試験で第一胃液pH低下の軽減効果が認められなかった理由は明らかでないが、我々の先行研究¹²⁾やSC培養物を長期給与した試験¹³⁾など、子牛への給与では同様に第一胃発酵の亢進効果を確認した報告もある。以上から、活性酵母を給与した子牛へ濃厚飼料を多給すると、成牛における報告とは逆に第一胃液中のVFA濃度を高めてpHの低下を増強させることが明らかとなった。

3.2 長期給与試験

10週齢時における両区の総VFA量に区間の差は認められず、活性酵母区のプロピオン酸割合およびアンモニア濃度は対照区よりも有意に高まった（データ示さず）。両区的第一胃液LPS活性、血漿中急性期タンパク質濃度に有意な差は認められなかった。

両区におけるグルコース濃度は週齢とともに緩やかに低下したが、活性酵母区の濃度は試験期間を通して対照区よりも有意に高く推移した（Fig.

4）。活性酵母区のインスリン濃度は離乳前後に対照区よりも有意に高まった。活性酵母区のGH濃度とIGF-I濃度は離乳の前後に増加し、対照区よりも高い傾向が認められた（各 $p = 0.07$ ）。活性酵母区のグルカゴン濃度は週齢に伴い増加し、対照区は逆に週齢とともに低下した。そのため、10週齢時における活性酵母区のグルカゴン濃度は対照区と比較して有意に高まった。両区における他の代謝およびミネラル成分に有意な差はなかった。

両区の飼料摂取量に有意な差は認められず、活性酵母区のADGは、離乳前後とも対照区よりも有意に高まった（Table 1）。この結果は、上述の第一胃液プロピオン酸割合とアンモニア濃度の増加、ならびに血漿中GHおよびIGF-I濃度の増加が関与していると考えられた。

濃厚飼料多給試験での知見を考慮すると、活性酵母の子牛への給与は、第一胃発酵の亢進とエネルギー利用または吸収の向上¹⁴⁾、そして栄養状態向上による代謝・内分泌機能の活性化¹⁵⁾を介して発育向上につながると推察される。しかしその反応機序や、代用乳と全乳給与における効果発現の違い、子牛における飼料消化率への影響などについては今後検討を重ねる必要がある。

4. 要 約

子牛における、活性酵母の第一胃液pH低下軽減効果を検証することを目的として、活性酵母を給与した子牛へ濃厚飼料を多給した。その結果、活性酵母給与子牛では非給与子牛よりも第一胃液中の総VFA量および酪酸濃度が増加し、第一胃発酵が亢進した。そして飼料摂取後の第一胃液pHの低下は、非給与子牛よりも増強され、成牛における報告とは逆の結果が示された。

また、離乳前後の7週間における活性酵母の給与が、第一胃発酵、代謝・内分泌機能、および発育に及ぼす影響を検討した。その結果、活性酵母

Table 1 Performances of Holstein calves fed with (SC group) or without (Control group) active dried *Saccharomyces cerevisiae* supplementation.

Item	Treatment		SEM	<i>p</i> -value
	Control ¹	SC ²		
BW, kg				
Initial	57.00	58.60	0.99	ND ³
Final	94.20	103.50	2.03	ND
ADG, kg/d				
Total ⁴	0.75	0.92	0.04	0.003
Pre-weaning ⁵	0.73	0.92	0.05	0.002
Post-weaning ⁶	0.77	0.92	0.05	0.002

¹ no active dry yeast supplementation. *n*=13.² *Saccharomyces cerevisiae* (Levucell® SC, Lallemand, Toulouse, France) at 2×10^9 CFU/d in the milk or starter. *n*=13.³ not determined.⁴ whole experimental period (21-70d of age).⁵ 21-48d of age.⁶ 49-70d of age.

給与子牛では第一胃液中プロピオン酸割合、アンモニア濃度、そして血漿中GHおよびIGF-I濃度が非給与子牛よりも増加した。これらの変化が総合して、活性酵母給与子牛のADG向上につながったと推察された。

文 献

- 1) Lambertz, C., Farke-Röver, A., Gaulty, M. : *Anim. Sci. J.*, **86**, 345~350, 2015.
- 2) Castells, L., Bach, A., Aris, A., Terré, M. : *J. Dairy Sci.*, **96**, 5226~5236, 2013.
- 3) Laarman, A. H., Oba, M. : *J. Dairy Sci.*, **94**, 5661~5664, 2011.
- 4) Enemark, J. M. D. : *Vet. J.*, **176**, 32~43, 2008.
- 5) Takemura, K., Shingu, H., Mizuguchi, H., Kim, Y-H., Sato, S., Kushibiki, S. : *J. Anim. Sci.*, in press, 2019.
- 6) Bach, A., Igelesias, C., Devant, M. : *Anim. Feed Sci. Technol.*, **136**, 146~153, 2007.
- 7) Ding, G., Chang, Y., Zhao, L., Ren, L., Meng, O. : *J. Anim. Sci. Biotechnol.*, **5**, 24, 2014.
- 8) Guedes, C. M., Gonçalves, D., Rodrigues, M. A. M., Dias-da-Silva, A. : *Anim. Feed Sci. Technol.*, 14527~40, 2008.
- 9) Lesmeister K. E., Heinrichs, A. J., Gable, M. T. : *J. Dairy Sci.*, **87**, 1832~1839, 2004.
- 10) Hirabayashi, H., Kawashima, K., Okimura, T., Tateno, A., Suzuki, A., Asakuma, S., Isobe, N., Obitsu, T., Kushibiki, S., Sugino, T. : *Anim. Sci. J.*, **88**, 1162~1170, 2017.
- 11) Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., Wittenberg, K. M. : *J. Dairy Sci.*, **88**, 1399~1403, 2005.
- 12) Watanabe, Y., Kim, Y-H., Kushibiki, S., Ikuta, K., Ichijo, T., Sato, S. : *J. Dairy Sci.*, in press, 2019.
- 13) Mutsvangwa, T., Edwards, I. E., Topps, J. H., Paterson, G. F. M. : *Anim. Prod.*, **55**, 35~40, 1992.
- 14) Zwaorski, E. M., Shriver-munsch, C. M., Fadden, N. A., Sanchez, W. K., Yoon, I., Bobe, G. : *J. Dairy Sci.*, **97**, 3081~3098, 2014.
- 15) Smith, J. M., Van Amburgh, M. E., Diaz, M. C., Lucy, M. C., Bauman, D. E. : *J. Anim. Sci.*, **80**, 1528~1537, 2002.

豚の未熟産子（ひね豚）の発育遅延をもたらす生理的要因の解明

Factors affecting mortality and growth retardation in runt pigs

中島 郁世・谷口 雅章・芦原 茜・荒川 愛作・渡邊 源哉・本山 三知代・佐々木 啓介

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)

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

(National Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

It is widely accepted that low birth weight in piglets (≤ 1.0 kg) correlates with decreased survival and lower postnatal growth rates than those born with normal body weights. The objective of this study was to figure out whether these problems might come from some kind of disordered physiological condition in runt pigs, such as stress, inflammation or malnutrition. Three-way crossbred female pigs originated from 8~10 litters were categorized in two groups by their birth weights; birth weight of 1.0 kg and under as "runt pig", and the heaviest weight in the same litter as "normal pig". At 10 wk-old of age (approximately 30 kg), blood and saliva samples were collected from both fed and fasted conditions. Circulating levels of amino acids in runt and normal pigs responded similarly when they were fasted, but there was no significant difference in levels of essential nor limiting amino acids between these two groups. Our results also showed that concentrations of stress hormone and inflammatory cytokines in serum and saliva of runt pigs did not differ from those of normal pigs. Interestingly, the effect of birth weight was observed in levels of serum immunoglobulins, which amount was lowered in runt pigs. This finding suggests that the one of the possibilities for greater preweaning mortality associated with runt pigs might be the reduction of antibodies in circulating systems.

1. 目 的

養豚業界において、離乳まで十分生存しうる生時体重の子豚をバラツキなく生産することは積年の課題である。近年の大規模養豚農場の種豚は、欧米から導入される驚異的な繁殖成績を示す多産系ハイブリッド種が主流を占め、また農林水産省の家畜改良増殖目標（平成27年3月）において一腹当たりの生産頭数向上を掲げているように、今後多産化傾向が続く。他方で総産子数の増加を

指標とする改良は、死産子数や未熟産子の割合を増すリスクを伴う。肉質形質に比べて繁殖形質そのものの遺伝率が低い中、未熟産子や生時体重のバラツキに関する遺伝率はさらに低いことから育種改良を望むのは非常に困難な形質となっている。

生時体重1 kg以下で生まれる未熟産子（以下「ひね豚」と呼ぶ）は、離乳までの死亡率が40~60%にもなる¹⁾。したがって、死亡率の高いひね豚の存在は、一腹当たりの生存産子数および離乳子豚数を低下させるため養豚農場の繁殖成績に直

結する。また生存したひね豚は発育が遅いため、出荷までの日数が長期化することからやはり養豚農場の収益に悪影響を及ぼす。さらにひね豚は、平均的な体重の子豚に比べてPRRS（豚繁殖・呼吸障害症候群）に罹患しやすく²⁾、ひね豚の感染をきっかけに養豚農場でPRRSが発生すれば甚大な経済被害をもたらすことになる。

日本養豚開業獣医師協会の生産性評価システム PigINFO（2017/4/7現在）によると、平均的な農場では一腹当たりの総産子数と生存産子数の間に1.1頭、さらに生存産子数と離乳子豚数の間に1.3頭の差があり、分娩してから離乳までに一腹当たり2.4頭損失するとされる。いかに一腹当たりの離乳子豚数を総産子数に近づけられるかが、生産性向上のための技術開発において重要な要素となる。我々は、まずは一定の割合で娩出されるひね豚を強健化し、平均的な離乳体重に上げることが問題解決上有効であると考えた。しかしながら、ひね豚の死亡率を高めている虚弱性あるいは増体の低さが何に起因するのか不明である。

そこで本研究では、ひね豚強健化の第一段階としてひね豚の虚弱性および発育遅延をもたらしている生理的要因を明らかにすることを目的とした。具体的には、同腹のひね豚と正常豚の絶食時と飽食時の血液および唾液中の成分を比較することで、ひね豚の虚弱あるいは発育不良要因がストレス・炎症および栄養障害のいずれにあるかを特定する。

2. 方 法

2.1 供試豚および材料

農研機構畜産研究部門にて生産された三元交雑豚（LWD種）10腹から、同腹の雌子豚のうち生時体重が1 kg以下の最小の産子（ひね豚）と最大の産子（正常豚）のペアを選出して飽食給餌にて飼養し、10週齢（正常豚の目安体重約30kg）

でと畜した。採材は、と畜予定の約一週間前に21時間の絶食処理を行い唾液採取および頸静脈より採血を行った（絶食時）。また、と畜前に唾液およびと畜時の放血血液を採取した（飽食時）。いずれも遠心分離後、上清を回収して各分析に供試するまで -80°C にて保管した。

2.2 血清および唾液中ストレス・炎症マーカーの測定

ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法により、ストレスおよび炎症の主要マーカーである血清および唾液中のC反応性タンパク（CRP, R&D Systems）、インターロイキン（IL）-1 β （R&D Systems）、IL-6（R&D Systems）、腫瘍壊死因子（TNF）- α （R&D Systems）、免疫グロブリン（Ig）G（Bethyl Laboratories）とIgA（Bethyl Laboratories）の濃度について測定した。コルチゾール濃度については、Beckman Coulter Access 2 PROイムノアッセイシステムを用いて測定を行った。

2.3 血清中尿素窒素（BUN）および遊離アミノ酸濃度の測定

飽食時および絶食時の血清中BUN濃度は、オリエンタル酵母工業株式会社にて依頼分析を行った。また遊離アミノ酸濃度については、血清と同量の6%スルホサリチル酸水溶液を加えて除タンパクし、上清を限外濾過膜（倉敷紡績）でろ過した後、高速アミノ酸分析計（日立L-8900）を用いて41種類のアミノ酸を解析した。

2.4 統計解析

統計解析は、統計パッケージSAS（ver9.12）プログラムのMIXEDプロシジャを用い、生時体重と摂食の有無を主効果とした一般線型混合モデルで解析した。最小二乗平均値間の多重比較はTuckey-Kramerの方法で行い、 $p < 0.05$ の場合に差が有意であると判定した。

3. 結果と考察

正常豚の生時体重が1.6kgであったのに対してひね豚の生時体重は0.9kgであった。離乳時（4週齢）には正常豚の体重が9.8kgに到達したのに対し、ひね豚の体重は5.9kgであった。最終的にと畜時（10週齢）における正常豚の体重は38.6kgとなる一方でひね豚の体重は30kgに満たず（28.9kg）、生時から10週齢に至るまで両者における体重の大小が逆転することはなかった（Fig. 1）。

血液および唾液成分を分析するにあたって、豚の絶食時と飽食時の両方から採材を行った。飽食時に比べ、絶食時の血清中遊離脂肪酸濃度が6倍高値を示したことから採材試料が絶食状態であることを確認している。本研究では摂食の有無による影響は血清中CRP、唾液中IgAとコルチゾール（Table 1）および多種の血清中遊離アミノ酸濃度において観察された（Table 2）。当然ながら、絶食により大半の遊離アミノ酸濃度は低下した。また早朝空腹時に最もコルチゾール濃度が上昇すると言われているように³⁾、絶食時の唾液中コルチゾールは飽食時よりも高値を示した。絶食時に低下した血清中CRPおよび唾液中IgAについては、これまでに報告のない知見でありその意義は

不明である。

アミノ酸分析計により検出されたのは計31種類の物質であったが、生時体重の違いによる効果が観察されたのは血清中NH₃とPSerのみであり、飽食時および絶食時ともに必須アミノ酸や制限アミノ酸において有意な差が認められなかったことから、ひね豚が極端な栄養障害下にあるわけではないことが示唆された（Table 2）。また、アミノ酸利用率の指標に用いられるBUN⁴⁾においても両方で差は見られなかった（Table 2）。さらに、炎症性サイトカインであるCRPとIL-6およびストレスマーカーであるコルチゾールにおいても血清・唾液ともに生時体重による影響は認められな



Fig. 1 Body size difference of runt pig comparing with the same littermate at 10 wk-old.

Table 1 Effects of feeding and birth weight difference on inflammatory and stress markers in blood and saliva¹⁾

Measurements	Feeding ²⁾		Birth weight ³⁾			
	Serum	Saliva	Serum		Saliva	
			fed	fasted	fed	fasted
CRP	*	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IL-6	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.
IgA	n.s.	*	*	*	n.s.	n.s.
IgG	n.s.	n.s.	*	n.s.	n.s.	n.s.
Cortisol	n.s.	**	n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

1) *p<0.05, **p<0.01, n.s., not significant.

2) Asterisks indicate difference between fed and fasted condition.

3) Asterisks indicate low birth weight piglets different from normal birth weight piglets.

Table 2 Effects of feeding and birth weight difference on serum amino acid concentrations¹⁾

Measurements	Feeding ²⁾	Birth weight ³⁾	
		fed	fasted
a-AAA	n.s.	n.s.	n.s.
a-ABA	****	n.s.	n.s.
Ala	n.s.	n.s.	n.s.
Arg	n.s.	n.s.	n.s.
Asp	n.s.	n.s.	n.s.
b-Ala	***	n.s.	n.s.
Cysthi	n.s.	n.s.	n.s.
Glu	*	n.s.	n.s.
GluNH ₂	****	n.s.	n.s.
Gly	****	n.s.	n.s.
His	**	n.s.	n.s.
Hylys	n.s.	n.s.	n.s.
Hypro	n.s.	n.s.	n.s.
Ile	n.s.	n.s.	n.s.
Leu	**	n.s.	n.s.
Lys	n.s.	n.s.	n.s.
Met	**	n.s.	n.s.
NH ₃	*	n.s.	**
Orn	****	n.s.	n.s.
Phe	n.s.	n.s.	n.s.
Pro	****	n.s.	n.s.
P-Ser	n.s.	*	n.s.
Ser	****	n.s.	n.s.
Tau	*	n.s.	n.s.
Thr	****	n.s.	n.s.
Trp	*	n.s.	n.s.
Tyr	****	n.s.	n.s.
Urea	n.s.	n.s.	n.s.
Val	n.s.	n.s.	n.s.
1Mehis	n.s.	n.s.	n.s.
3Mehis	n.s.	n.s.	n.s.
BUN	n.s.	n.s.	n.s.

1) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, n.s., not significant.

2) Asterisks indicate difference between fed and fasted condition.

3) Asterisks indicate low birth weight piglets different from normal birth weight piglets.

かった。より重度な炎症促進マーカーである IL-1 β および TNF α については両者ともにほぼ検出レベル以下であった。ひね豚と正常豚の間で有意差が認められたのは血清中の IgA と IgG であり、いずれもひね豚の方で低値を示した。

以上の結果から生時体重の小さいひね豚は、慢性炎症や慢性ストレスに暴露されていたり、顕著なアミノ酸代謝不全状態下に置かれていたりする

のではなく、免疫関連機能に問題を抱えている可能性が示唆された。

4. 要 約

生時体重 1 kg 以下で生まれる未熟産子（ひね豚）は、死亡率が高くまた生存したとしても発育が遅いことから養豚農家の繁殖成績や肥育成績に直結する。本研究では、ひね豚の死亡率を高めて

いる虚弱性あるいは増体の低さが何に起因するかを明らかにすることを目的として、ひね豚と同腹の正常豚（いずれも雌）を用いて10週齢時（約30kg）の血清および唾液中の成分を比較し、ひね豚がストレス・炎症および栄養障害の状態にあるか否かを検討した。血清中の遊離アミノ酸とその関連物質について31種類を検出したが、ひね豚において極端に欠乏している必須アミノ酸や制限アミノ酸はなかった。また、血清および唾液中のコルチゾールや炎症性サイトカインについてもひね豚で増加している現象は見られなかった。両者で差が認められたのは血清中の免疫グロブリン濃度であり、ひね豚で有意に低値を示したことが

ら、本研究の結果、ひね豚の虚弱性に抗体量の少なさが関与している可能性が示唆された。

文 献

- 1) 武田浩輝：生時体重の小さい豚，淘汰か？隔離飼養か？，*Pig Journal*, 11, 14～17, 2008.
- 2) 伊藤貢：ヒネ豚が生じないための飼養管理，*Pig Journal*, 9, 84～86, 2006.
- 3) Hucklebridge, F. H., Clow, A., Huezio-Diaz, P., Evans, P. : The awakening cortisol response and blood glucose levels, *Life Sciences*, 64, 931～937, 1999.
- 4) Klindt, J., Thallman, R. M., Wisc, T. : Effects of sire line, sire, and sex on plasma nitrogen, body weight, and backfat thickness in offspring of Duroc and Landrace boars, *Journal of Animal Science*, 84, 1323～1330, 2006.

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（Ⅱ）

Studies on a feed for improving zinc nutrition by the use of zinc transporters (Ⅱ)

神 戸 大 朋

(京都大学大学院生命科学研究所)

Taiho Kambe

(Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

Zinc is an essential trace element as a second most abundant transition metal in biological systems. As zinc plays pivotal roles as a structural, catalytic, and signaling component of many proteins, its deficiency causes diverse pathophysiological symptoms in life. Thus, preventing zinc deficiency is critically important for growth promotion for livestock. Two zinc transporters, ZIP4 and ZNT1, are known to be important for efficient zinc absorption. ZIP4 is essential for take of dietary zinc from the intestinal lumen, which is localized to the apical membrane in the enterocytes, while ZNT1, which is located to the basolateral membrane of the enterocytes, is thought to play a role by effluxing zinc into the portal blood. Thus, Up-regulation of both proteins is thought to increase zinc absorption. In this study, we screened various food extracts possessing such activity by the use of our screening systems, and found novel extracts possessing the activity to increase the processed ZIP4 expression. Moreover, we tried to find enzyme(s), whose activities nicely correlates with zinc levels in body zinc status, because we found it difficult to evaluate whether or not food extracts have positive effects on zinc absorption in rats. We found several enzymes would be useful as a marker for evaluation of zinc absorption rates. Our approaches would provide new information to achieve a feed for livestock by improving zinc nutrition through targeting zinc transporter expression, because the content of zinc is significantly affects the good health and growth of child livestock.

1. 目 的

亜鉛は生命活動に不可欠となる微量栄養素である。タンパク質の構造維持や酵素の補因子、また細胞内外のシグナル因子としても機能しており、その欠乏は生体に大きな影響を与える。家畜の成長にとっても、亜鉛はきわめて重要であり、例えば仔豚においては、亜鉛の添加が、成長促進、下

痢の抑制、免疫力亢進効果など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、ほ乳類における亜鉛吸収効率は30%程度と低いうえ、亜鉛摂取量の増加に反比例して低下する。そのため、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。家畜における亜鉛栄養の効果を十分に発揮させるには、

亜鉛摂取量の増加と同時に、亜鉛吸収効率を改善させることが肝要となる。

消化管からの亜鉛吸収には、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の両亜鉛トランスポーターが重要であると考えられている。ZIP4が消化管内腔に存在する亜鉛を上皮細胞内に取り込み、ZNT1が細胞から門脈への放出を担う。ZIP4はヒトの先天性亜鉛欠乏症・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る。牛においてもlethal trait A46と呼ばれる先天性の亜鉛欠乏症が存在し、その原因は同じくZIP4の変異である³⁾。また、消化管特異的にZIP4を欠損させたマウスは、亜鉛補充なしには成育することができない⁴⁾。このように、ZIP4は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し、亜鉛十分時には速やかに消失すること、さらに重度の亜鉛欠乏では、ZIP4の細胞外アミノ末端が切断される（プロセッシングされる）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、多くの知見は得られていないものの、効率的な亜鉛吸収には、ZIP4とZNT1の発現をとともに高める必要があることが明らかになっている。我々のグループでは、これまでの知見を基に、「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、ZNT1に関しては、その亜鉛吸収における重要性が十分に解析されていないため、発現増強因子の探索と同時に、亜鉛依存的な発現制御に関しても検討を行った。

一方、乳児期の家畜の成長に必須となるのは、母乳中の亜鉛である。これまでに、母乳中に亜鉛を運搬する分子が亜鉛トランスポーターZNT2であることを明らかにしていることから、今回は、母乳中に輸送される亜鉛量を増加させることを目指し、ZNT2の解析を進めた。さらに、食品因子による軽度の亜鉛吸収量の変化を評価することが難しいため、亜鉛の有用性を評価できる系の確立に取り組み、本スクリーニングで得られた食品因子を評価することを試みた。

本研究で見出される種々の亜鉛トランスポーターの発現増強因子は、家畜の健康な成長促進に繋がることが予想されるため、亜鉛栄養改善飼料開発の基盤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

植物や食品サンプルを、滅菌水に100mg/mlになるように調整し、マルチビーズショッカー（安井器械株式会社）を使用して粉碎したものを一晚混和後、上清をサンプルとした。ZIP4-targetingおよびZNT1-targeting用の培養細胞を単層培養し、その培養液に調整したサンプルを終濃度0.1%となるように添加して24時間培養した。細胞を回収して細胞膜画分を調製し、ウェスタンブロットにてZIP4の発現量を定量した。ZIP4の検出には、抗ZIP4モノクローナル抗体を使用した⁶⁾。

2.2 ZNT1の亜鉛依存的な発現変化

腸管上皮モデル細胞CaCo2や他の培養細胞を、亜鉛十分および欠乏培養液で培養し、ZNT1の発現変化について、2.1と同様の解析を実施した。ZNT1の検出には、抗ZNT1モノクローナル抗体を使用した⁷⁾。

2.3 ZNT2の亜鉛輸送活性に重要な領域の同定

ZNT2の特徴的な配列を、ZNT3 (ZNT2に高い相同性を示し、神経細胞特異的に発現する) の相同部分と入れ換えたキメラタンパク質を作成し、各キメラタンパク質の亜鉛輸送活性を評価した。評価には、ZNT2の亜鉛輸送活性を反映することができる変異体細胞を使用し、基準値に対する生存率で各変異体の亜鉛輸送活性を算出した^{8,9)}。

2.4 体内亜鉛量を反映するマーカー酵素の解析

ラットを亜鉛欠乏食 (4 mg zinc/kg)、軽度亜鉛欠乏食 (10mg zinc/kg) および亜鉛十分食 (33.7mg zinc/kg) で一定期間給餌し、十二指腸を回収した。回収した十二指腸をマルチビーズショッカーにて破碎後、膜画分を調整した。調整した膜画分に含有される各亜鉛要求性酵素の活性を常法にしたがって測定した。アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性は、*p*-nitrophenyl-phosphateを基質に使用し、反応により遊離する *p*-nitrophenolを405nmの吸光度で測定して定量した。CD73活性については、酵素反応により遊離されたリン酸を Biomol Green (Enzo Life Science) により発色させ、595nmでの吸光度を測定することで定量した。

3. 結果と考察

昨年度に引き続き、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索した。本スクリーニングでは、対象として、すでに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を使用した¹⁰⁾。これまで我々のグループで見出したZIP4発現増強因子は、ソヤサポニンBbを含めすべて、全長のZIP4の発現を増強させる因子であったが、

今回、初めてプロセシング型のZIP4の発現を増強する因子を含むサンプルを見出すことに成功した (Fig. 1)。プロセシングできない変異を持つZIP4が、先天性亜鉛欠乏症である腸性肢端皮膚炎の原因となることから、プロセシングは亜鉛吸収に重要な役割を果たす制御であると考えられている。したがって、本解析で見出した食品因子は、これまでとは違う新たなアプローチによる亜鉛吸収を増強させる因子であることが期待される。現在、本因子の活性化化合物の単離を試みている。

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。これは、ZNT1の発現変化のレスポンスが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ことが理由であると考えられる。本年度の解析では、食品因子の探索とともにZNT1の亜鉛依存的な発現調節についても解析した。その結果、ZNT1の発現は、これまでに知られていた亜鉛依存的な発現上昇のみならず、亜鉛欠乏下では積極的に分解されることを見出した (Fig. 2)。この応答は、亜鉛欠乏で発現が上昇し、亜鉛十分時に分解されるという性質を持つZIP4とはまったく逆の応答である。すなわち、本解析結果をふまえると、ZIP4により消化管管腔側からの亜鉛吸収量が増加すれば、側底膜側に発現するZNT1の発現も増加すると考えられる。ZNT1に関しては、これまで発現を変化させる食品因子に関する情報がほとんどないが、ZIP4の発現増加と連動させることが重要と考えられている。本結果は、この考えを支持する結果となっており、消化管からの効率的な亜鉛吸収には、ZIP4とZNT1が連動することが重要と考えられる。よって、本研究のようにZNT1の発現制御を明らかにする意義は大きい。

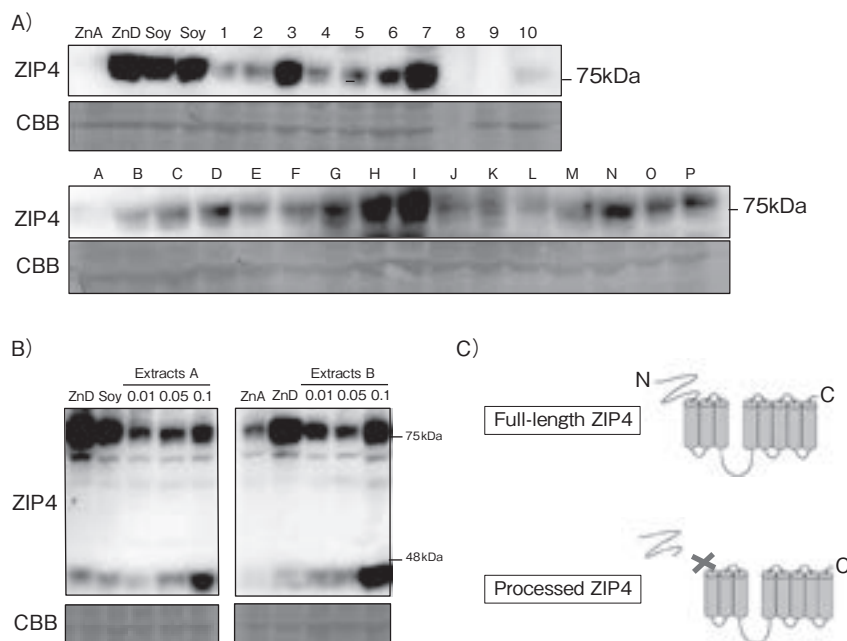


Fig. 1 Screening of component(s) to increase ZIP4 and ZNT1 expression.

A). Screening of food extracts possessing the ability to increase ZIP4 expression. Hepa cells were cultured in the presence or absence of various food extracts for 24 h. B). Two food extracts increased both full-length and processed ZIP4 expression. Hepa cells were cultured in the presence or absence of food extracts of the indicated concentrations for 24 h. In A) and B), Membrane proteins (20 μ g) prepared from the cells were subjected to western blot analysis, and ZIP4 protein was detected by anti-ZIP4 antibody. Soy : soybean extracts as a positive control. The representative results are shown. C). Cartoon of full length ZIP4 (upper) and the processed ZIP4, whose amino-terminal portion is proteolytically released.

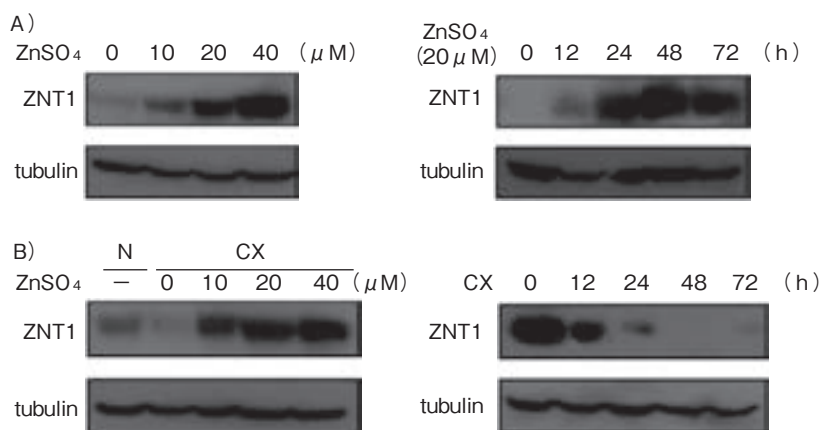


Fig. 2 Zinc-dependent expression regulation of ZNT1 protein.

A). Human HepG2 cells were culture in the presence of indicated concentrations of ZnSO₄ for 48 h (left), or in the presence of 20 μ M ZnSO₄ for the indicated period of time prior to preparation of total cellular lysates (right). B). Human HepG2 cells were culture in normal, zinc-deficient medium (CX) or CX medium supplemented with ZnSO₄ for 48 h (left), or zinc-deficient medium (CX) for the indicated period of time. N : normal medium, CX : zinc deficient medium. In A) and B), 20 μ g total cellular lysates were subjected to immunoblotting. The representative results are shown. Tubulin is shown as a loading control.

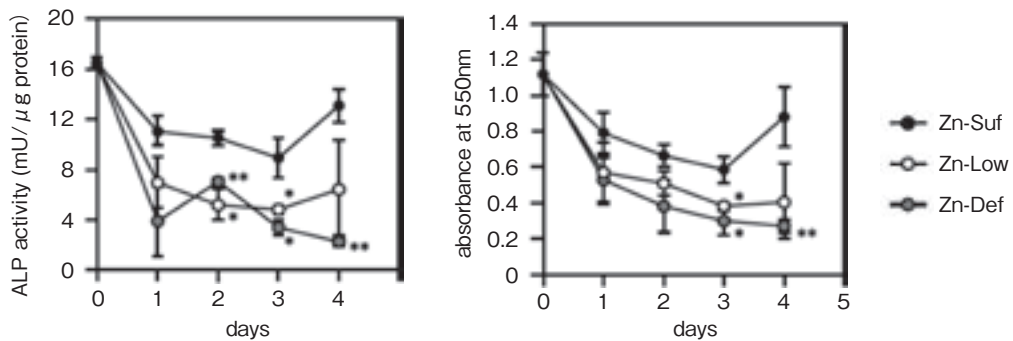


Fig. 3 Regulation of ALP and CD73 activities by zinc deficiency in rat duodenum.

ALP and CD73 activities were measured using the membrane protein prepared from the duodenum obtained from the rats that were fed zinc deficient diet (Zn-Def), low zinc diet (Zn-Low), or zinc sufficient diet (Zn-Suf) for up to 4 days. *Left* ; ALP activity, *Right* ; CD73 activity.

また、母乳中に輸送される亜鉛量を増強することを目指し、亜鉛を輸送する亜鉛トランスポーターZNT2の解析を進めた結果、これまで着目していたZNT2のN末端はそれほど重要ではなく、N末端と細胞質ループの相互作用を促進する因子が重要であることを示す結果を得た¹¹⁾。ZNT2の当該領域を大腸菌で発現させることに成功したため、現在、この領域に相互作用する因子の探索を開始するところである。

昨年度に同定した亜鉛吸収増強効果を有する食品因子の効果を個体レベルで評価するためには、効率的なマーカーを見出すことが重要と考えられた。そこで、本解析では、亜鉛要求性酵素に着目し、このような亜鉛依存的なマーカーの探索も合わせて実施した。異なる亜鉛欠乏食で飼育したラットの十二指腸を調整して、膜結合型および分泌型の亜鉛要求性酵素について解析した結果、同じ亜鉛要求性酵素であっても、亜鉛欠乏に対する応答性が異なることを見出した。応答性が鋭敏なALPやCD73活性は、亜鉛吸収を促進する食品因子の効果をモニターする際に有用であることが予想されたため (Fig. 3)、現在、本酵素活性を指標とした食品因子の効果に関する解析を進めてい

る。今後は、上述の解析で見出した抽出物を含む飼料で飼育した動物を用いてその効果を検証する計画を立てている。また、乳児期の亜鉛栄養に関しては、家畜の成長に重要であるため、特に授乳中のラットに対しての効果の検証を進めたいと考えている。

なお、本解析では、酵素活性の感度をあげるために体内亜鉛レベルを反映する亜鉛要求性酵素を過剰発現するトランスジェニックラットの作出を試みていたが、本年度の解析中に作出することができなかった。乳児期に影響を与える食品因子の評価には、本ラットが必要と考えられるため、現在引き続き作出を試みており、作出でき次第、亜鉛要求性酵素の活性を指標にして、同定抽出物の効果を検証する予定である。

4. 要 約

亜鉛栄養改善飼料の開発に繋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、プロセシング型のZIP4の発現を増強させる活性を有する食品因子を複数見出した。母乳中の亜鉛量を増強させる解析で

は、鍵となるZNT2の亜鉛輸送活性に重要な制御を見出し、現在、活性因子の探索を進めている。また、食品因子の効果を鋭敏に検証するために、亜鉛欠乏を鋭敏に評価できるマーカー酵素の探索を実施し、ALPやCD73活性がマーカーとして有効であることを確認した。本研究での成果を基にして、亜鉛強化飼料の使用時に問題となる糞尿中に排出される余剰量亜鉛の重金属毒性問題を回避した亜鉛栄養改善飼料を開発し、環境の改善や家畜の健やかな成長に繋げることを目指したい。

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

- 1) Wang, Y., Tang, J. W., Ma, W. Q., 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
- 2) Cho, J. H., Upadhaya, 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) 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
- 4) 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
- 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) Fujimoto, S., Itsumura, N., Tsuji, T., Anan, Y., Tsuji, N., Ogra, Y., Kimura, T., Miyamae, Y., Masuda, S., Nagao, M., Kambe, T. : Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm are required for full activation of TNAP in the early secretory pathway, *PLoS One*, **8**, e77445, 2013
- 9) Itsumura, N., Inamo, Y., Okazaki, F., Teranishi, F., Narita, H., Kambe, T., Kodama, H. : Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations : a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant, *PLoS One*, **8**, e64045, 2013
- 10) 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
- 11) Fukue, K., Itsumura, N., Tsuji, N., Nishino, K., Nagao, M., Narita, H., Kambe, T. : Evaluation of the roles of the cytosolic N-terminus and His-rich loop of ZNT proteins using ZNT2 and ZNT3 chimeric mutants, *Sci. Rep.*, **8**, 14084, 2018

半教師あり学習による飼料成分を予測する 新たな近赤外分析法の開発

Semi-supervised learning in near-infrared spectroscopy and chemometrics
for prediction of the nutrient composition of grass silage

田 中 常 喜・出 口 健三郎

(地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場)

Tsuneki Tanaka and Kenzaburo Deguchi

(Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center)

Semi-supervised learning would result in accuracy improvement of prediction and/or expanded scope of application in near-infrared (NIR) spectroscopy and chemometrics. This study demonstrated applications of (i) NIR spectra reconstructed by principle component analysis (PCA) combined with big data of spectra and (ii) imputation of missing value to prediction of the nutrient composition of grass silage. PCA combined with 9,872 data of NIR spectra showed that the cumulative contribution rate of first 33 principle components (PCs) reached at approximately 100%. Partial least squares regression (PLSR) on reconstructed NIR spectra by PCA with first 72 PCs was better than PLSR on the raw NIR spectra or conventional PLSR for undigestible neutral detergent fiber after in vitro fermentation for 48 hours, especially in samples that are far from predictable. These results showed that PLSR on reconstructed NIR spectra have advantage of robust prediction of unknown samples of different derivation from the training data. Some of predictions by imputation of missing value of digestible neutral detergent fiber after in situ fermentation for 48 hours as a target trait showed practical level of accuracy (higher than 2.3 of PRD), although scores of slope in the predictions were smaller than 1. These results suggested that imputation of missing value of target traits could be used in predictions for traits with a small number of data, although there is room of consideration about selection of training data, and/or adjustments of calibration curve in application of imputation of missing values.

1. 目 的

近赤外分析 (NIRS) は、家畜の給与飼料の品質を迅速かつ簡便に測定できるため、フォレージテストの中心的な手法として、全国の飼料分析センターで活用されている。その結果、個別農家単位での粗飼料の飼料成分と栄養価が迅速に把握で

き、飼料設計・給与診断など現場レベルでの対応を可能としている。飼養研究の発展に伴って、分析する草種や成分項目が多様化し、NIRSに求められる分析精度も高まっている。しかしながら、適用範囲が広く、高精度な検量線の早期開発において、基礎となるサンプル収集とその成分値の取得が大きなボトルネックとなっている。

半教師あり学習とは、教師ありデータ（目的値と説明変数がそろったデータ）による予測・判別に、教師なしデータ（説明変数のみのデータ）を加えた統計手法であり、精度・安定性向上、適用範囲の拡大に利点がある。飼料成分のNIRS（近赤外分光法の定量分析）においては、目的とする成分の化学分析値と近赤外スペクトルデータがそろっているものが教師ありデータ、近赤外スペクトルデータのみのものが教師なしデータに該当するが、どのような利点があるかは必ずしも明らかになっていない。

本研究は、牧草サイレージの繊維の消化率の予測を例にとりあげ、(i) 膨大な教師なしデータと合わせた主成分分析により再構築した近赤外スペクトルからの予測、(ii) 関連形質による補完データセットを教師データとした予測の2つのアプローチでの近赤外分光法の定量分析における教師なしデータの活用を試み、近赤外分光法の定量分析での半教師あり学習の有効性を検討した。

2. 方 法

試料は北海道内各地より収集した牧草サイレージ759点を用いた。試料の乾燥粉碎処理および一般化学分析は常法¹⁾により行った。全試料につい

て、中性デタージェント繊維含量 { %DM, NDF (耐熱性 α -アミラーゼあり, 亜硫酸ナトリウムなし, 灰分補正あり) } とホルスタイン種乾乳牛のルーメン液を用いたin vitro 48時間培養未消化中性デタージェント繊維含量 (%DM, in vitro uNDF_{48h}) およびその差分により算出するin vitro 48時間培養可消化中性デタージェント繊維含量 (%DM, in vitro dNDF_{48h}) の分析値が得られている (Table 1)。その他の繊維に関連する形質として、ルーメンフィステル装着牛を用いたナイロンバック法によるin situ dNDF_{48h} (%DM) が77点、めん羊によるin vivo dNDF (%DM) が89点、総繊維含量 (%DM, OCW) が539点、低消化性繊維含量 (%DM, Ob) が537点について分析値が得られている (Table 1)。各種解析は、統計ソフト R (GUN) を用いた。

2.1 主成分分析による情報の要約と近赤外スペクトルの再構築

目的形質をin vitro uNDF_{48h}とした。分析値が得られている759点を、検量線作成候補318点、検量線検証用441点の収集年などの来歴が異なる2群に分割した。従来の検量線作成の手順に従い、検量線作成候補318点のうち189点を検量線作成用として、あらかじめ選抜した。飼料分析セ

Table 1 The number of data (n), mean, minimum value, maximum value, and standard deviation (SD) for traits of grass silage samples used in this study

Traits	Unit	n	Mean	Min	Max	SD
NDF*	%DM	759	65.4	43.8	83.0	5.89
in vitro uNDF _{48h} **	"	759	25.4	8.2	45.7	6.03
in vitro dNDF _{48h} **	"	759	40.1	19.0	53.2	5.85
in situ dNDF _{48h} ***	"	77	43.2	26.9	53.8	6.11
in vivo dNDF****	"	89	42.4	30.2	53.0	5.62
Organic cell wall (OCW)	"	539	68.9	48.6	88.9	5.95
Low digestible fiber (Ob)	"	537	60.1	33.8	81.0	6.69

* Neutral detergent fiber with heat-stable α -amylase, ash correction and without sodium sulfite.

** undigestible/digestible NDF after in vitro fermentation for 48 hours in rumen fluid of dry cow.

*** digestible NDF after in situ fermentation for 48 hours in rumen of dry cow.

**** in vivo digestible NDF in sheep.

ンターで2016～2018年に分析した北海道内産の牧草サイレージの近赤外スペクトルデータ9,872点を収集し、教師なしデータとした。検量線作成用候補318点と9,872点の近赤外スペクトルデータ(1100.0～2499.5nm, 0.5nmピッチ, 2800データポイント)について主成分分析を行い、第1主成分～第X主成分までの主成分得点からスペクトルデータに戻した2,791通り(X:10～2,800)の再構築スペクトルを作成した。検量線作成用189点の再構築スペクトルは、2次微分(window size=11dpt, non-smoothing)処理を行い、部分最小二乗(PLS)回帰(kernel法, 最大ファクター数16, Leave-one-outクロスバリデーション)により検量線を作成し、検量線作成用189点によるクロスバリデーションによる予測誤差(RMSECV)および検証用441点による予測誤差(RMSEP)を求めた。従来法として、検量線作成用189点の原スペクトルに、前処理(Savitzky-Golay 2次微分, 2次曲線, window size=11dpt)を行い、PLS回帰(kernel法, ファクター数12)により検量線を作成し、誤差が最小であった再構築スペクトルによる検量線の寄与率(R^2)および予測誤差(RMSEP), RPD²⁾を比較した。

2.2 成分値の欠測値の補完

目的形質をin situ dNDF_{48h}とし、NDF, in vitro dNDF_{48h}, in vivo dNDF, OCW, Obを関連形質とした。欠測値に対応した主成分分析により、データの補完を行った。欠測値補完のアルゴリズムとして、ベイズ推定によるBayesian PCA³⁾, EMアルゴリズムによるProbabilistic PCA, PCA軸を推定しながら、その結果から線形補正するSVD impute⁴⁾の3通りについて検討した(Table 2)。前項で検量線作成用に選抜した189点の補完データ(目的形質は、すべて補完した値)を基に、単形質PLS(PLS1)および複形質PLS(PLS2)回帰(Factor=12)により、検量線を作成した。近赤外スペクトルは、Savitzky-Golay 2次微分(2次曲線, window size=21dpt)処理を行った。目的形質が得られている77点を検量線の予測精度検証用の試料として用い、 R^2 , Bias, Slope, RMSEPおよびRPDを求めた。

3. 結果と考察

3.1 再構築スペクトルにより作成した検量線の予測精度

教師ありデータと教師なしデータを合わせた主

Table 2 Predictions of in situ dNDF_{48h} of 77 grass silage samples by PLS1 and PLS2 regression on imputation data by principal component analysis with NDF, in vitro dNDF_{48h}, in vivo dNDF, OCW, and Ob content as related traits

Impute algorithm	No. of comps.*	PLS1					PLS2				
		R^2	Bias	Slope	RMSEP	RPD	R^2	Bias	Slope	RMSEP	RPD
Bayesian PCA	4	0.85	0.7	0.7	2.8	2.5	0.77	0.4	0.6	3.2	2.1
	3	0.85	0.7	0.7	2.7	2.5	0.78	0.5	0.6	3.1	2.1
	2	0.81	0.0	0.7	2.7	2.3	0.75	0.2	0.6	3.2	2.0
Probabilistic PCA	2	0.79	-0.2	0.5	3.3	2.1	0.73	0.0	0.5	3.7	1.9
SVD impute	4	0.59	-0.2	0.3	4.5	1.5	0.67	0.1	0.3	4.5	1.7
	3	0.82	0.1	0.8	2.6	2.3	0.72	-0.5	0.7	3.3	1.9
	2	0.82	0.0	0.8	2.6	2.3	0.75	0.4	0.7	3.2	2.0

*Number of components to use estimation or re-estimation.

成分分析を行った結果、累積寄与率は第33主成分ではほぼ100%に達した。再構築スペクトルによるPLS回帰の予測誤差 (RMSECV) は、再構築スペクトルの主成分数が76の時に最小となった (Fig. 1)。検証用441点による予測誤差 (RMSEP) は、主成分数72の時に最小となり (Fig. 2)、クロスバリデーションにより最適であった再構築スペクトルの主成分数とおおむね一致した。今回の結果では、第72主成分より情報量の小さい主成分に、PLS回帰で変数として選択された場合に誤差が大きくなる情報 (ノイズ) が含まれ、そのノイ

ズが再構築スペクトルから除去されていることが示唆された。加えて、その再構築スペクトルは、累積寄与率がほぼ100%の主成分得点から算出されるため、原スペクトルデータの情報の損失がきわめて小さいものであった。

予測誤差 (RMSEP) が最小であった再構築スペクトルによるPLS回帰での分析値と予測値の関係を従来法によるPLS回帰と比較した (Fig. 3)。再構築スペクトルによるPLS回帰は、予測を大きく外す試料が少ないことが確認でき、再構築スペクトルによるPLS回帰は、従来法に比べて、頑健

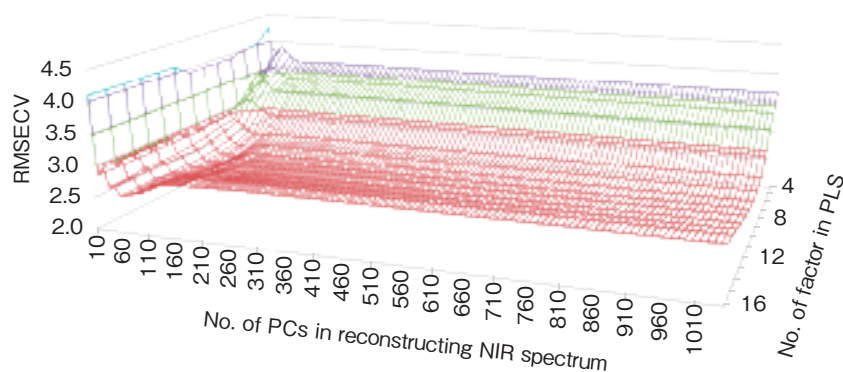


Fig. 1 Root-mean-square of error of leave-out-one cross validation (RMSECV) in kernel partial least squares (PLS) regression for in vitro uNDF_{48h} based on near-infrared (NIR) spectra of 189 samples of training data reconstructed by principal component analysis on 10,190 samples. Kernel PLS regression was performed after preprocessing of Savitzky-Golay second deviation with 11 data points of window size and non-smoothing for reconstructed NIR spectrum. Number of the principal components (PCs) in reconstructing NIR spectra were used from first 10 PCs to first 1010 PCs with a 10-interval.

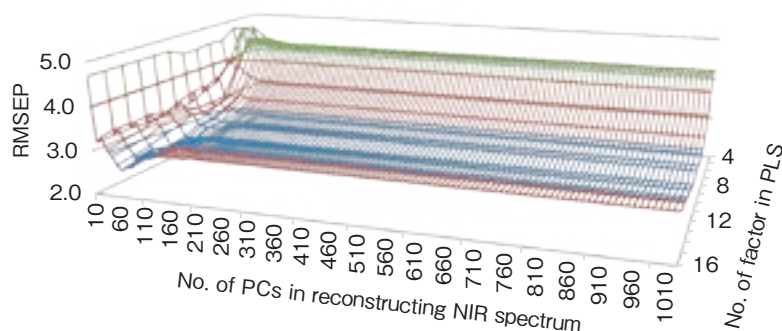


Fig. 2 Root-mean-square of error of prediction (RMSEP) in kernel partial least square (PLS) regression for in vitro uNDF_{48h} based on reconstructed near-infrared (NIR) spectra. Four hundred forty-one samples of test data were used for prediction.

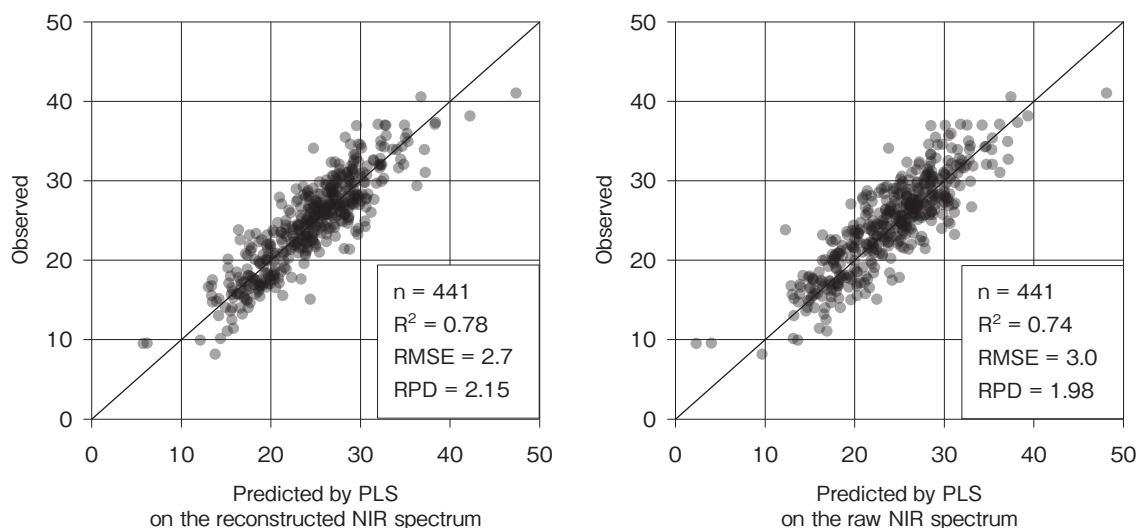


Fig. 3 Observed versus predicted in vitro uNDF_{48h} (%DM) for 441 samples of test data by kernel partial least square (PLS) regression with the reconstructed (Left) and raw (Right) NIR spectra. Preprocessing for the reconstructed NIR spectrum with first 72 PCs was performed by Savitzky-Golay second deviation with 11 data points (dpt) of window size and non-smoothing. For the raw NIR spectrum, Savitzky-Golay smoothing and second deviation with 11 dpt of window size were performed before PLSR. R^2 , RMSE, and RPD showed coefficient of determination, root-mean-square of error of prediction, and ratio of standard deviation of reference data in prediction sample to standard error of prediction, respectively.

な予測ができることが示された。

本研究では、再構築スペクトルの主成分数の最適化の方法として、Leave-one-outクロスバリデーションを採用した。一般に、PLS回帰の潜在変数の数（ファクター数）を決定する場合に過剰適合しやすいとされるため、PLS回帰のファクター数を決定する場合にはk-foldクロスバリデーションで再計算が必要である。

3.2 検量線作成用データの欠測値補完により作成した検量線の予測精度

検量線の検証結果をTable 2に示した。検討した方法の一部では、RPDが2.3以上と実用可能な検量線が作成できた。欠測値の補完方法は、検討した中ではBayesian PCAの精度が高い傾向であった。単形質PLSと複形質PLS回帰では、単形質PLS回帰の精度が明らかに高かった。目的形質としたin situ dNDF_{48h}の値のない試料で検量線を

作成したにもかかわらず、ある程度の精度が確認できたことは、データ数の少ない形質の予測に、本手法が有用である可能性が示唆された。しかしながら、データ数に限りがあったため、検証に用いた試料は欠測値補完の情報としても利用した。今後、未知の試料での再検証が必要である。また、検討したいずれの方法においても、スロープが1より小さいことが確認された。実測値のある試料を検量線作成群に加える、あるいは、検量線を補正して利用するなどの工夫も必要になると考えられる。

欠測値補完によるPLS回帰での予測精度は、(i) 関連形質の有無と相関程度、(ii) 欠測が生じた理由に依存し、欠測値補完による検量線作成の際に留意する必要がある。本研究で扱った目的形質は、相関の高い関連形質が複数あり、それにより実用可能な検量線作成に至ったと考えられ

た。本研究では、完全に無作為に欠測が生じたものとして解析をしたが、実際は家畜に給与するために入手可能な飼料のみのデータが得られているはずで、欠測以外の値に依存して欠測が生じている可能性もある。このことが、スロープが生じた一因の可能性が考えられるが、データ数が限られたため検証できなかった。

3.3 近赤外分光法での半教師あり学習の有効性

本研究は、再構築スペクトルおよび欠測値補完による検量線作成の有効性を示すことができた。それぞれは、従来の検量線作成の近赤外スペクトルの前処理工程と目的形質のデータ処理工程に該当し、両者を組み合わせた利用も可能である。しかしながら、欠測値補完の検証では収集した試料の偏りに由来する予測精度が劣る試料の確保ができなかったため、2つの手法を組み合わせた検証は実施しなかった。近赤外分光法に関する研究は飛躍的な発展を遂げており、ニューラルネットワークやMoving Window PLS⁵⁾など定量分析に利用できるさまざまな手法が提案されている。今後は、本手法による検量線開発と飼料分析機関での利用に向けて、各機関で導入しているソフトウェアでの適用・検証をする予定であるが、併せてさまざまな手法と組み合わせた検量線開発を試みたいと考えている。

4. 要 約

予測精度の向上、適用範囲の拡大が期待される半教師あり学習の粗飼料の飼料成分近赤外分析への適用を試みた。再構築スペクトルを基に作成した検量線は、従来法よりも予測精度がやや高かつ

た。また、関連する分析項目によりデータを補完することで、目的的分析項目がないサンプル群により実用可能な精度の検量線が作成できた。スロープが1より小さくなるなど、データを補完して検量線を作成する際の問題点も確認できた。得られた知見は、試料の由来により予測精度が異なる場合や、データ数が少ない分析項目の検量線開発での活用が期待される。

謝 辞

本実験の実施にあたり、飼料分析センターに収集される粗飼料の近赤外スペクトルデータを提供いただきました十勝農業協同組合連合会 農産化学研究所 岡崎智哉氏、雪印種苗株式会社 北海道研究農場 川越大樹氏、日本甜菜製糖株式会社 興野若菜氏、in situ消化試験データおよび給与粗飼料サンプルを提供いただきました北海道立総合研究機構 酪農試験場 谷川珠子博士に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 自給粗飼料品質評価研究会編：改訂粗飼料の品質評価ガイドブック，社団法人日本草地畜産種子協会，東京，2001.
- 2) Williams, P. C., Norris, K. : *In Near infrared technology in the agricultural and food industries, 2nd edition*, American Association of Cereal Chemists, Minnesota, p145-169. 2001.
- 3) Oba, S., Sato, M., Takemasa, I., Monden, M., Matsubara, K., Ishii, S. : *Bioinformatics*. 19(16). 2088~2096. 2003.
- 4) Troyanskaya, O., Cantor, M., Sherlock, G., Brown, P., Hastie, T., Tibshirani, R., Botstein, D., Altman, R. B. : *Bioinformatics*. 17(6). 520~525. 2001.
- 5) Jiang, J.-H., Berry, R. J., Siesler, H. W., Ozaki, Y. : *Anal. Chem.*, 74(14). 3555~3565. 2002.

黒毛和種の分娩間隔短縮に資する新たな栄養管理指標 の開発～牛体3Dモデルを用いたアプローチ～

The development of alternative indicators of body condition score in
Japanese black cows for shortening calving interval : an approach using
3D model generation of cattle by shape-from-silhouette method

木野 勝敏・児嶋 朋貴・青木 直人・増田 達明

(愛知県農業総合試験場畜産研究部)

Katsutoshi Kino, Tomoki Kojima, Naoto Aoki and Tatsuaki Masuda

(Animal Husbandry Division, Aichi Agricultural Research Center)

The objectives of this study were to derive regression equations to estimate the Body Condition Score (BCS) of Japanese Black cows in accordance with Wagyu Registry Association from heart girth and the information extracted from 3-dimensional models of cows, and to investigate relationships between the BCS and metabolic profile tests. Single regression analysis was performed to estimate the equations using data of difference between heart girth and tightened heart girth ($n=118$) and the ratio of 3-dimensional rump surfaces areas to 2-dimensional rump areas ($n=43$). Following are the derived equations : $Y=0.598G+1.928$ ($R^2=0.80$) and $Y=-6.17X+12.00$ ($R^2=0.31$), where Y is the BCS, G is the difference between heart girth and tightened heart girth, X is the ratio of 3-dimensional rump surfaces areas to 2-dimensional rump areas. Cows that experienced excessive body condition gain or loss were not observed during pre and postpartum periods, which concurred with the results of metabolic profile tests.

1. 目 的

分娩間隔を長期化させないためには、分娩前後の牛体を適正な栄養状態に維持することが重要である¹⁾。黒毛和種の栄養度判定には、公益社団法人全国和牛登録協会（全和）によって定められた6部位（き甲・背骨・肋骨・腰角・臀部・尾根部）を視診・触診する方法²⁾があるが、実施者に豊富な経験が必要とされるため、一般的な農家が自身で実施することは困難である。平成27年3月に農林水産省が公表した家畜改良増殖目標では、

黒毛和種繁殖雌牛の全国平均分娩間隔は405日であり³⁾、1年1産から大きな隔たりがあることから、簡便な栄養度判定法の開発が急務である。

一方、乳牛ではボディーコンディショニングスコア評価法（UVシステム法）⁴⁾が広く用いられており、これは後軀のみで牛の栄養状態を判定する方法である。黒毛和種は血統により体型が多様化しているため、UVシステム法は、牛体全体の栄養度判定法として適していないと考えられる。他方、乳牛で開発された簡便な栄養度推定法の1つに、胸囲差を用いる方法⁵⁾がある。これは脂肪が

多い場合に強く締めた際の胸囲が小さくなることを利用した方法であり、黒毛和種繁殖雌牛にも応用可能であると考えられる。

また、近年のICT関連技術の進歩により、3Dスキャンおよび3Dモデル化を簡易に実施できる機器やソフトウェアが開発され、普及してきている。そこで、3Dモデル化技術を用いた黒毛和種繁殖雌牛の牛体3Dモデルについても栄養度判定ができる可能性がある。

代謝プロファイルテストは、主として乳牛で実施されている血液生化学検査を中心とした牛群検診であるが、近年、繁殖性向上や子牛の損耗防止の観点から黒毛和種繁殖牛にも利用されてきており⁶⁾、黒毛和種繁殖牛の外貌だけではなく、牛体内での実際の栄養状態を確認できるため、有用な手法である。

そこで、本研究では、胸囲差から全和が定める栄養度を推定する簡便な方法の開発、牛体3Dモデルにおいても栄養度を推定する方法の検討および代謝プロファイルテストの結果と栄養度との関連性を調査することを目的とした。

2. 方 法

2.1 胸囲差による栄養度推定式の作成

供試牛は、当試験場を含む愛知県内5農場、延べ118頭の黒毛和種成雌牛とした。調査項目は胸囲差および栄養度とした。胸囲差は通常測定する胸囲ときつく締めた際の胸囲の差 (Fig. 1 A, B) とし、栄養度は全和が定める栄養度判定法に従った。その他、供試牛の情報として生年月日、産次、最終授精日および分娩 (予定) 日の聞き取りを行った。

栄養度推定式は、説明変数を胸囲差、目的変数を栄養度とし、単回帰分析を行った。胸囲差は、畜産現場での汎用性を考慮して1 cm単位とした。栄養度は小数点1位を四捨五入することとされているが、本分析では、数値の連続性を重視し、四捨五入を行わなかった。単回帰分析は、SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) のREGプロシジャを用いて行った。

2.2 牛体3D抽出データと栄養度との相関分析

供試牛は、3Dデータ取得に適した条件下にあった当試験場を含む愛知県内4農場、延べ43頭

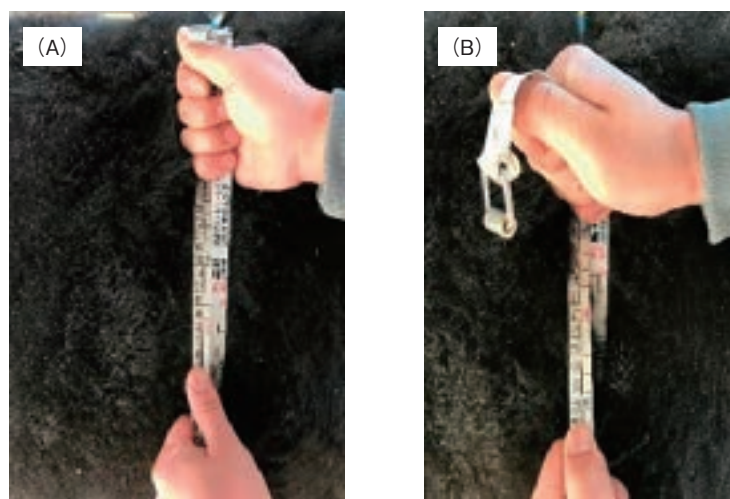


Fig. 1 Examples of measuring heart girth (A) and tightened heart girth (B).

の黒毛和種成雌牛とした。調査項目は、栄養度および牛体の3Dデータとし、3Dデータは3Dスキャナ (Hapimo: 3D, 株式会社ノア) を用いて取得した。栄養度および供試牛の情報は2.1と同様に取得した。高橋ら (2016)⁷⁾ は、牛の腰角、寛骨および坐骨の3部位を結んだ3角形の3D表面積により、牛のボディーコンディションスコアの評価の可能性を示唆している。高橋ら (2016)⁷⁾ の方法に従い、本研究においてもこの3部位にテープを貼り、3Dデータを取得した (Fig. 2 A)。取得した3Dデータの解析には、3D点群データ処理オープンソフトウェアのCloudCompare (v. 2.10.1 (Zephyrus), <http://www.cloudcompare.org/>) を用い、3部位を頂点とする三角形に切り出し (Fig. 2 B)、3D表面積を解析した (Fig. 2 C-1)。供試牛の大きさは個体によって異なるため、3部位の3D表面積のみでは、個体間差の影響が大きく、栄養度との相関が低くなると予想された。そこで、3部位の頂点を結ぶ2Dの面積を解析し (Fig. 2 C-2)、個体間差の影響を相殺することを

目的に3D表面積と2Dの面積の差 (面積差) および比 (面積比) を算出した。ここでの面積差あるいは面積比の値が大きくなると、3D表面の凹凸が激しいことを示し、すなわち、やせていることを示している。栄養度と3D表面積、2Dの面積、面積差および面積比それぞれとの相関関係を、SAS (SAS Inst. Inc., Cary, NC) のCORRプロシジャを用いて行った。

2.3 栄養度と代謝プロファイルテストとの関係性調査

供試牛はおおむね分娩前1か月、分娩後2か月および3か月の3ステージを調査対象とし、当場を含む5農場、延べ75頭の黒毛和種成雌牛とした。栄養度および供試牛の情報は2.1と同様に取得した。採血は尾静脈からテルモ株式会社製のベノジェクトII真空採血管プレインを用いて行い、採血後すみやかに遠心分離し、血清を分離した後、分析まで-30℃で凍結保存した。分析は外部委託により実施した。代謝プロファイルテストの検査項目は渡邉ら (2014)⁸⁾ を参考に、血糖

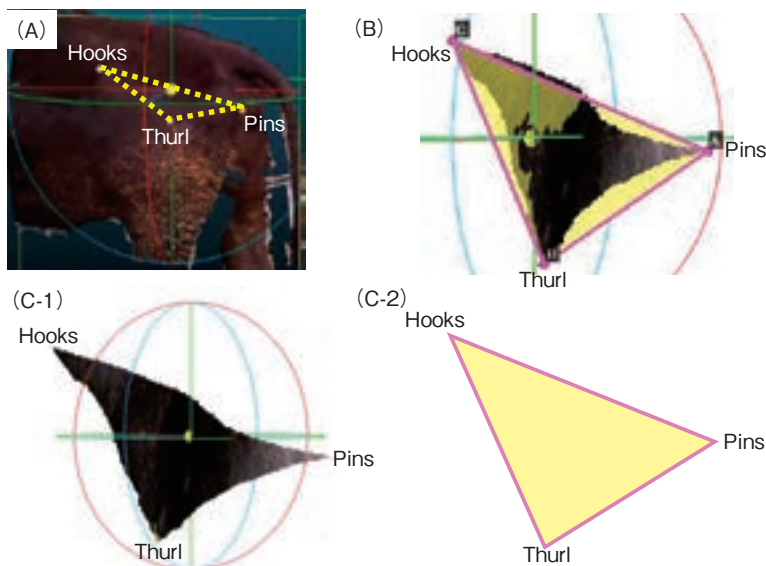


Fig. 2 Localization of the 3 anatomical landmarks Hooks, Pins, and Thurl (A), a triangle cut out from 3-dimensional image (B) used to extract the 3-dimensional surfaces area (C-1) and 2-dimensional area (C-2).

(Glu), 遊離脂肪酸 (NEFA), 尿素窒素 (BUN), アルブミン (Alb), 総コレステロール (T-cho), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST), γ -グルタミルトランスペプチダーゼ (GGT), カルシウム (Ca) の8項目とした。

3. 結果と考察

3.1 胸囲差による栄養度推定式

胸囲差と栄養度の単回帰分析の結果をFig. 3に示す。この単回帰分析によって得られた栄養度推定式は,

$$Y = 0.598G + 1.928$$

となり, 決定係数 R^2 は0.80と高い値であった。ここで, Y は栄養度, G は胸囲差であり, 傾きと切片は有意であった ($p < 0.001$)。全和が定める栄養度判定要領では, 栄養度4から6が普通の体型で, その中でも4がやせ気味, 5が普通, 6が太り気味とされている。本研究で得られた推定式において, 胸囲差が4 cmと7 cmでは, それぞれ推定栄養度が4.3と6.1となることから, 実際の畜産現場で適用される際には, 適正な胸囲差の下限値を4 cm, 上限値を7 cmとし, この範囲内に収

まるように栄養管理をすることが適当と考えられた。本研究で作成した栄養度推定式は, 巻尺で畜産農家が容易に実施でき, 客観的な数字で栄養度を推定できることから, 畜産現場への応用は十分可能であると考えられた。また, 畜産現場へ普及するために, 胸囲測定部の適切な場所や締める際の力の強さといった点について, 今後基準を定めていく予定である。

3.2 牛体3D抽出データと栄養度との相関

栄養度と3D表面積および2Dの面積それぞれとの間には, 有意な相関関係は認められなかったが, 栄養度と面積差および面積比との間には, それぞれ相関係数 R が -0.42 および -0.55 と有意な相関係数が得られた (Fig. 4)。この結果から, 相関係数の高かった面積比による栄養度推定の可能性が示唆されたが, 栄養度を目的変数, 面積比を説明変数とした単回帰分析を行ったところ, 傾きと切片の値は有意 ($p < 0.001$) であったものの決定係数 R^2 が0.31と低く, 面積比での栄養度推定は精度が低いと考えられた。3Dスキャナは非接触でデータを取得でき, ICTによりシステム化されることにより, 日常の栄養管理に应用される

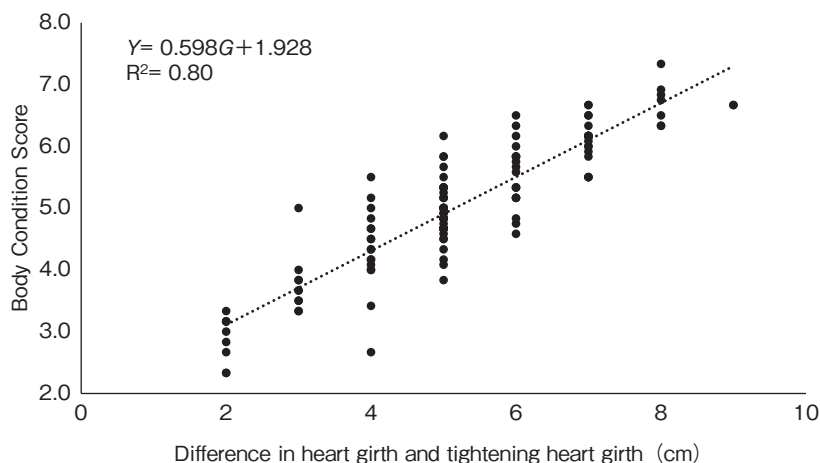


Fig. 3 Relationship between Body Condition Score and the difference between heart girth and tightened heart girth in Japanese Black cows.

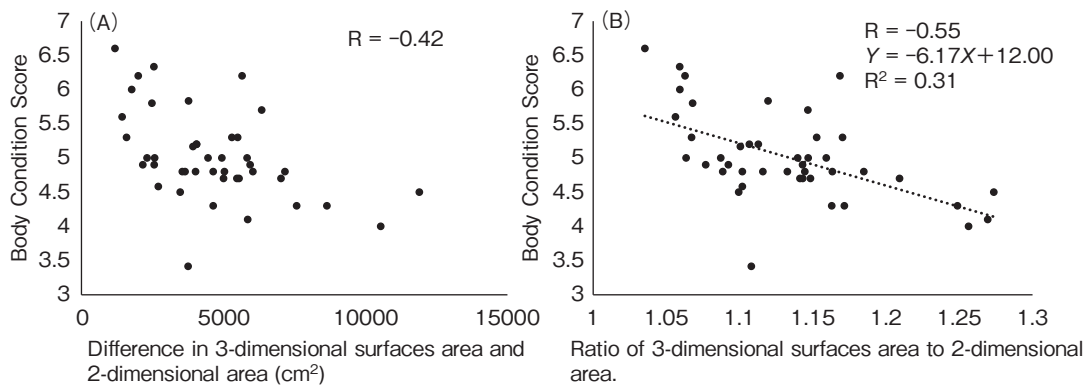


Fig. 4 Relationships between Body Condition Score and the difference between 3-dimensional surfaces area and 2-dimensional area (cm²) (A), and Body Condition Score and the ratio of 3-dimensional surfaces area to 2-dimensional area (B) in Japanese Black cows.

ことが期待される。ホルスタイン種ではすでに実用化されており、飼養管理に役立てられている⁹⁾。本研究では、栄養度と面積比の間には有意な相関が認められたものの、面積比による栄養度推定式は精度が低かったため、今後、他部位の3Dデータを用いた栄養度推定報について検討する必要があると考えられた。

3.3 栄養度と代謝プロファイルテストとの関係性

本研究の代謝プロファイルテストの結果をFig. 5に示す。各項目の上下限値は渡邊ら (2014)⁷⁾の報告に従った。A農場で特徴的なのは、分娩前においてGluは適正値内であるものの、NEFAが上限を超える個体が散見された。この時期は胎児が成長してくる時期であることから、摂取飼料からのエネルギーだけでは不足している可能性が推察された。B農場はGlu、T-CholおよびNEFAについては標準範囲内に収まっており、飼料によるエネルギー摂取量は適切に管理されていることがうかがえた。BUNおよびALBにおいて下限値を下回る個体が多く見られたことが特徴的であり、これが異常値となり得るかは繁殖成績に影響を及ぼしているかを追跡調査する必要があると考えら

れた。C農場は分娩前にGluが低く、BUNが高いことから、エネルギー不足あるいは摂取飼料の粗タンパク質含量が高いことによって飼料中のタンパク質が有効利用できていないことが推察された。また、ASTも上限値を上回っており、タンパク質を有効利用できていない、あるいは余剰のタンパク質由来のアンモニアにより肝障害を起こしている可能性が考えられた。さらに、分娩後においてNEFAが上限値を超える個体が多かった。この農場は昼間放牧を行い、また自然哺乳を行っていることから、慢性的なエネルギー不足が推察された。以上のことから、配合飼料の再検討や放牧地の草種の確認が必要と考えられた。D農場は、B農場と同様の傾向で適切に栄養管理されているように見受けられた。E農場については、分娩前において、Gluは適正範囲内であるもののNEFAが上限値を上回っていたため、分娩前後にややエネルギーが足りていないことが推察された。栄養度については、どの農場においても分娩前後で大きな増減は認められず、栄養度に反映するほどのエネルギーの過不足はなかったと考えられた。代謝プロファイルテストの結果では、個々の農場の特徴が認められ、一部の農場で改善の必

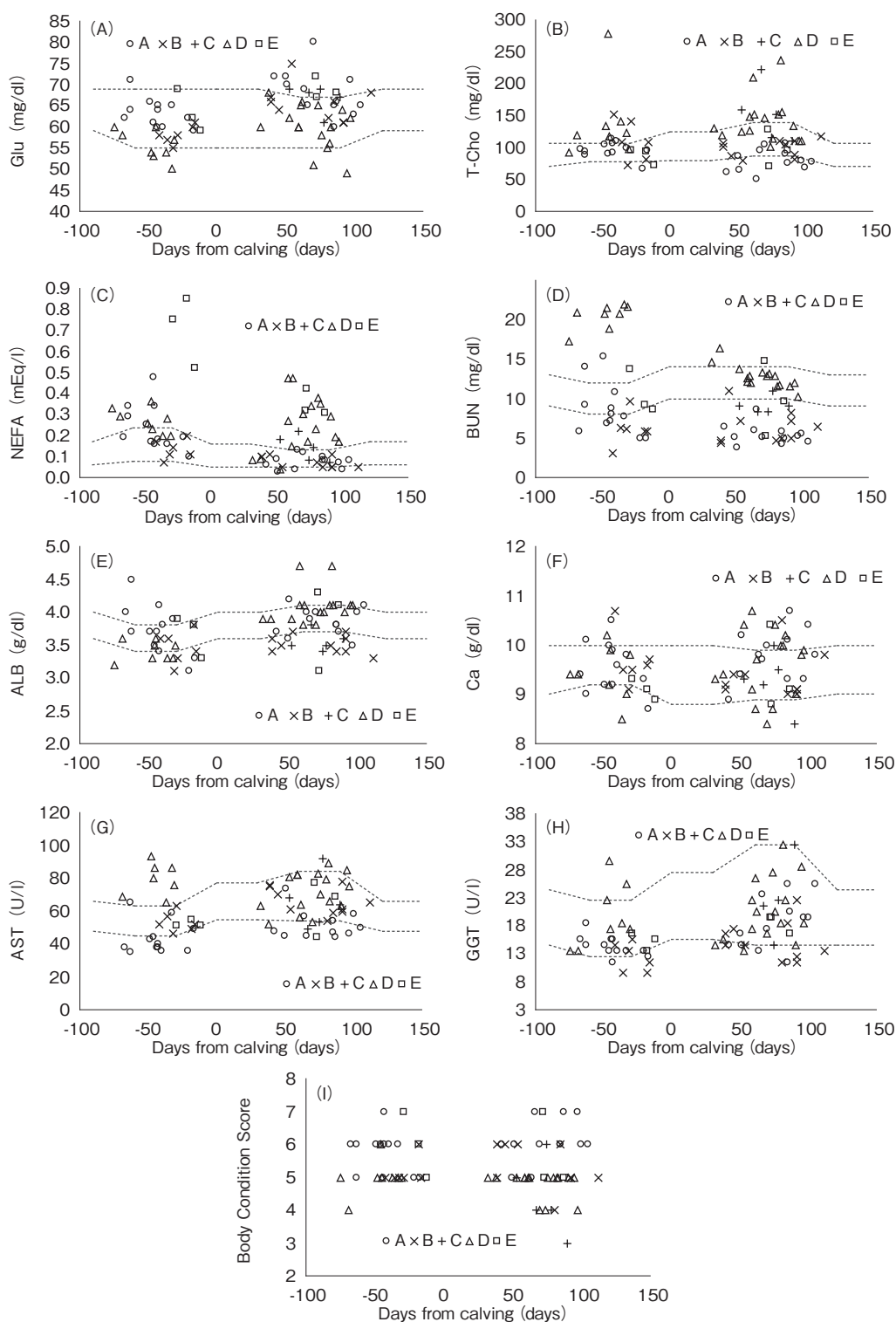


Fig. 5 Concentration of serum glucose (Glu, (A)), total cholesterol (T-Cho, (B)), NEFA (C), BUN (D), Albumin (ALB, (E)), Ca (F), AST (G), GGT (H), and Body Condition Score (I) in Japanese Black cows. Dotted lines : upper and lower limits reported by Watanabe *et al.* (2014).

要性が示唆されたものの、適正な栄養度の個体は代謝プロファイルテストもおおむね標準範囲内となっていた。本研究では、供試牛の調査後の繁殖成績を把握していないため、今後、追跡調査を実施する必要があるが、調査対象農場の農場全体での繁殖成績は良好であったことから、適切な栄養度管理により良好な繁殖成績が期待されると考えられた。

4. 要 約

本研究では、黒毛和種繁殖雌牛の簡易な栄養度推定法の開発と代謝プロファイルテストによる各栄養度との関係性の調査を実施した。 Y を栄養度、 G を胸囲差（通常の胸囲と強く締めた際の胸囲の差）としたとき、得られた栄養度推定式は、 $Y = 0.598G + 1.928$ で決定係数 R^2 は0.80と高く、畜産現場での実用性が高いと考えられた。また、牛体の3Dモデルを用いて、牛の腰角、寛骨および坐骨の3部位を結んだ3角形の3D表面積と3部位の頂点を結ぶ2Dの面積の比（面積比 = 3D表面積 / 2D面積）を算出し、関係性を調査したところ、この面積比と栄養度には有意な相関 ($p < 0.001$) が認められた。栄養度については、どの

農場においても分娩前後で大きな増減は認められず、栄養度に反映するほどのエネルギーの過不足はなかったと考えられた。代謝プロファイルテストの結果では、個々の農場の特徴が認められたものの、適正な栄養度の個体は代謝プロファイルテストの結果もおおむね標準範囲内であったことから、適正な栄養度の管理により、良好な繁殖成績が期待された。

文 献

- 1) Gillund, P., Reksen, O., Gröhn, Y. T., Karlberg, K.: *Journal of Dairy Science*, **84**, 1390~1396, 2001.
- 2) 公益社団法人全国和牛登録協会編：和牛登録事務必携（平成29年度改訂版），241，公益社団法人全国和牛登録協会，京都，2018.
- 3) 農林水産省：家畜改良増殖目標（平成27年3月），13，農林水産省，東京，2015.
- 4) Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomson, N.: *Journal of Dairy Science*, **77**, 2695~2703, 1994.
- 5) 渡辺高俊：二本立給与法虎之巻 理論編，明治乳業株式会社，東京，1988.
- 6) 渡邊貴之，田中佑一，野口浩正，小西一之：肉用牛研究会報，**85**，9~15，2008.
- 7) 高橋茂，河原孝吉，栗生要，今井敬，堂地修：酪農学園大学紀要 自然科学編（Web），**40**，79~86，2016.
- 8) 渡邊貴之，小西一之，熊谷周一郎，野口浩正，武井直樹：日本畜産学会報，**85**，295~300，2014.
- 9) Delaval. Delaval Body Condition Scoring BCS www.delaval.com. 2014.

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 (Ⅱ)

New system development of high fertility by feeding large amounts of a diet
comprising sugar-rich rice whole crop silage in lactating dairy cows (Ⅱ)

山口 昇一郎・柴田 果歩・柿原 孝彦・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, Kaho Shibata, Takahiko Kakihara and Chiho Kawashima*

(Fukuoka Agricultural Research Center,

*Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

‘Tachisuzuka’, a rice cultivar for whole-crop silage (WCS), is characterized by a small panicle and high sugar content in the stem. 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=4) were supplied with 50g of betaine by oral administration daily from 3 weeks pre-partum to 3 weeks postpartum. Control cows (n=5) 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 dry matter intake, milk yield, GOT 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 ($p<0.01$). However, the TDN sufficiency ratio, plasma glucose and total cholesterol in rice WCS cows remained higher than in control cows. Days of the first postpartum luteal formation in rice WCS cows were slightly earlier than in control cows.

In conclusion, the present study suggested that the resumption of postpartum ovarian function was earlier by feeding large amounts of a diet comprising sugar-rich rice WCS and adding a dietary betaine, suggesting that the negative energy balance early post-partum was improved early.

1. 目 的

国内における乳牛の受胎率は低下傾向にあり、その対策は重要な課題である。福岡県における乳牛の平均分娩間隔は、都道府県の平均値と同程度

である約460日であるが、当県におけるトップ5農家の平均値である400日に短縮すると50頭規模の農家換算では子牛生産頭数は、年間で7頭増加する計算となる。生産頭数に加え乳量増加も考慮すると繁殖成績の向上が経営に与える影響は、多

大なるものである。

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¹⁾。従来品種では乳牛に給与した場合において、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3~5 kg程度) 給与している事例が多く、高糖分高消化性という飼料特性を十分に活用しているとは言い難い。また依然としてモミの不消化による食滞が心配されており、多給に懸念を示す農家がいるのが現状である。

一方、分娩後の乳牛は泌乳初期の摂取エネルギーの不足により、体脂肪が遊離脂肪酸として肝臓に過剰動員されることによって脂肪肝になりやすいことが知られている。肝臓では、卵巣からの発情ホルモン分泌に関与するインスリン様成長因子-1が産生されることから、脂肪肝による肝機能低下は、卵巣不活化の要因となる。Kawakamiら²⁾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³⁾はベタインが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がられるかもしれない。

我々は、高糖分イネWCS「たちすずか」を泌乳中後期牛に多給したところ開花期のイタリアンライグラスサイレージに比べ、乾物摂取量が増加したことを報告している⁴⁾。そこで、本研究では前年度に引き続き、高糖分イネWCSを泌乳初期牛に多給して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分娩後の負の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9頭 (対照区: 2産4頭および3産1頭, イネWCS区: 4産1頭, 3産1頭および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。体重は毎日測定し、乳成分は分娩後2週間に1回乳サンプルを用いて、MILKO-SCAN FT+ (Foss Electric, Hillerød, Denmark) で分析した。TDN充足率は日本飼養標準 (乳牛) から算出した⁵⁾。試験期間は、分娩予定の3週間前から分娩後12週目までとした。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、総タンパク、総コレステロール、GOT (グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)、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。対照区のTMRの養分含量は、おおむね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。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いた。イネWCS区のTMRは、おおむね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区のTMRは、分娩予定前1週目から給与を開始した。イネWCS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50 g/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

乾物摂取量および乳量には差が認められず、懸念されたモミによる食滞は認められなかった (Fig. 1)。従来品種ではモミの量が多いため泌乳牛に多給した場合には、未消化モミに起因する食

滞が発生することが報告⁶⁾されているが、モミの少ない「たちすずか」は泌乳初期牛に多給しても問題ないことが明らかになった。またTDN充足率は、イネWCS区が分娩後7週および8週に高くなる傾向を示した ($p < 0.1$)。短期的な栄養状態を示す血中グルコースは、7、10および12週目にイネWCS区が有意に高くなった ($p < 0.01$ または $p < 0.05$, Fig. 2)。また長期的な栄養状態を示す総コレステロールは、4週目にイネWCS区が高くなる傾向を示した ($p < 0.1$)。GOTおよびNEFAは、差が認められなかったが、GGTは0、6および7週目にイネWCS区が有意に高くなった ($p < 0.01$ または $p < 0.05$)。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 43 ± 14 日、イネWCS区 26 ± 7 日であり、

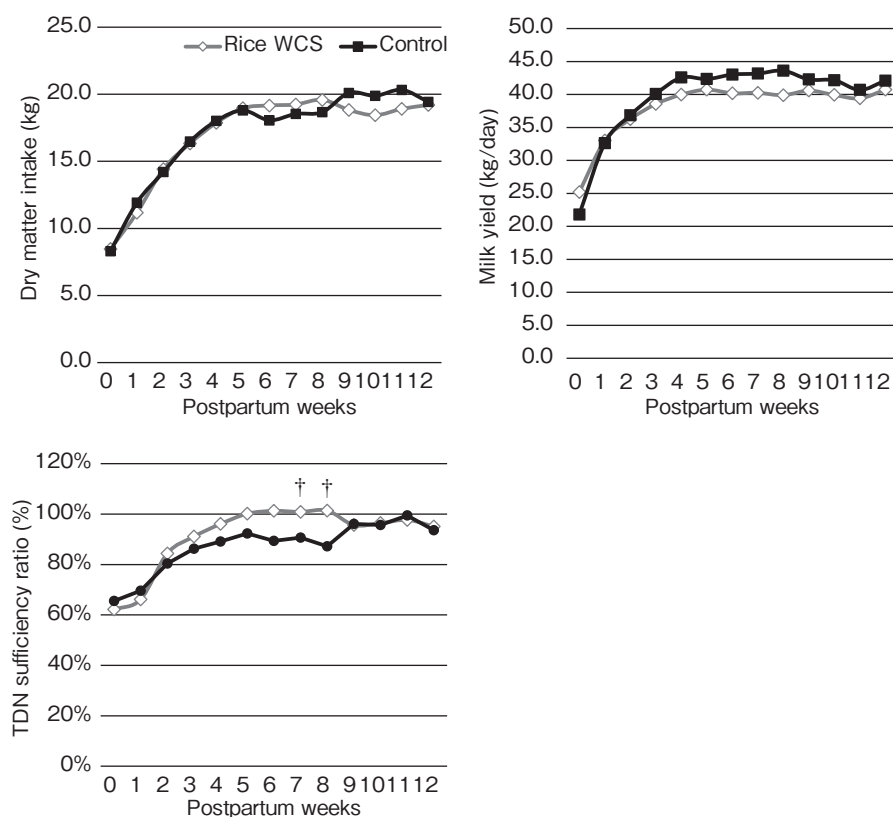


Fig. 1 Dry matter intake, milk yields and TDN sufficiency ratio in control and rice WCS cows from 0 to 12 weeks postpartum. † $p < 0.1$

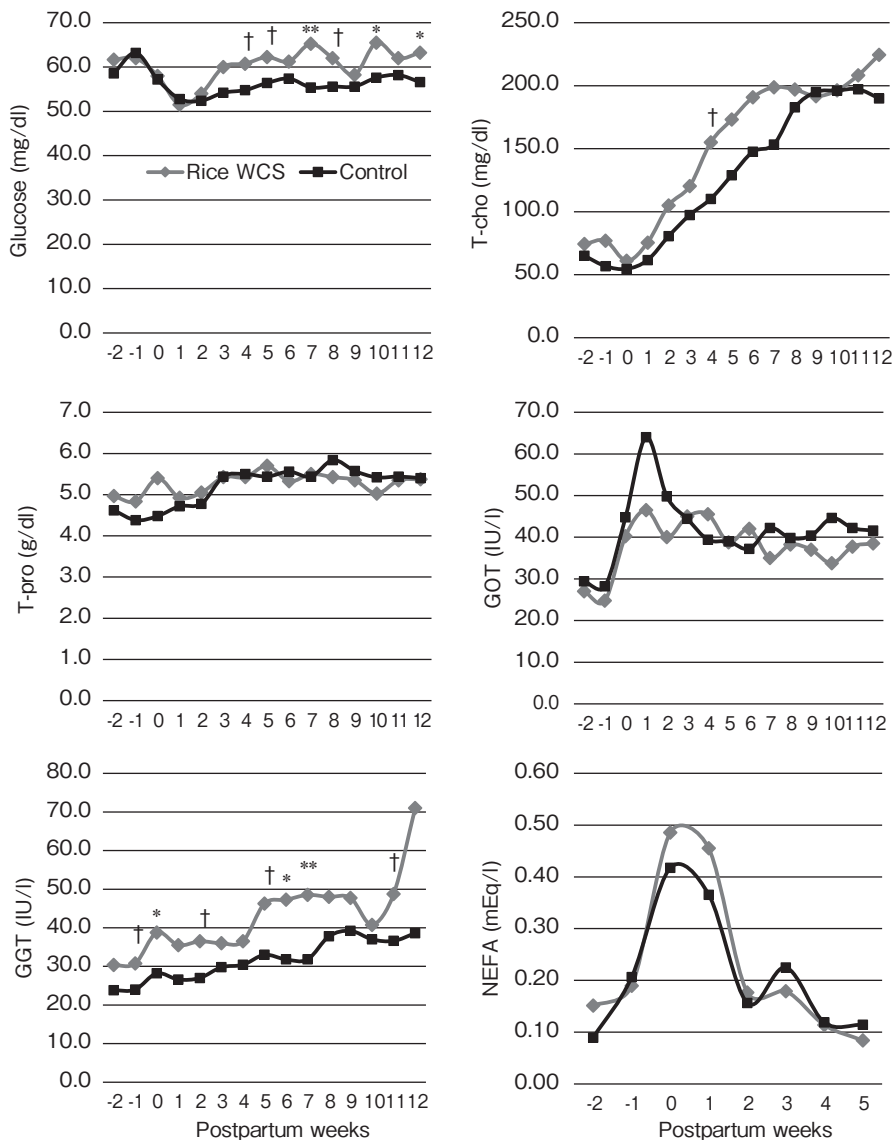


Fig. 2 Metabolic parameters in control and rice WCS cows from 2 weeks prepartum to 5 or 12 weeks postpartum. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$, † $p < 0.1$

有意差はないもののイネWCS区が短くなった (Fig. 3)。

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、高糖分イネWCSを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⁴⁾。また、収穫時期が異なる高糖分イネWCSを泌乳中後期牛に給与した場合において、完熟期刈

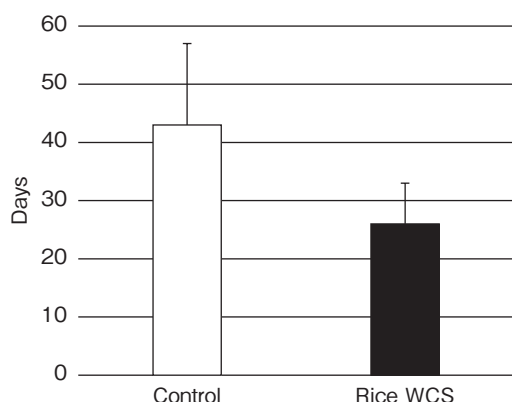


Fig. 3 Days of the first postpartum luteal formation in control and rice WCS cows. Values are mean $\pm$ SEM.

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⁴⁾。本研究では、泌乳初期牛に完熟期刈りの高糖分イネWCSを3割程度TMRに配合して給与したところ、乾物摂取量や乳量は差が認められなかった。一方、栄養状態を示すTDN充足率、血糖値および総コレステロールは、イネWCS区の方が高く推移した。この理由は、ベタインの効果により肝機能が向上した結果と思われる。我々は、乾草主体の酪農家において給与飼料を同一条件とし、ベタインのみを本試験と同様に給与したところ、分娩後の総コレステロールが有意に高くなり、初回発情が早くなる傾向があることを明らかにしている⁷⁾ (データ省略)。このことから本研究においてもベタイン給与による肝機能が向上したため、栄養状態がすみやかに回復したと考える。この分娩後の負のエネルギー状態の改善は、卵巢機能の回復を高め、初回排卵をイネWCS区において早めたものと考えられた。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巢機能回復が早く、早期受胎につながる事が報告されている⁸⁾。一方、GGTが高くなった理

由は不明であるが、イネWCS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。なお、イネWCS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、3.4kg/日の増加が認められた。栄養状態や繁殖への影響については今後さらに検討する必要があるものとする。

以上のことから、泌乳初期牛に「たちすずか」WCSをTMRに乾物割合で3割程度給与しても乾物摂取量および乳量には影響なく、懸念された食滞も認められなかった。分娩前後3週間にベタインを給与すると分娩後の負エネルギー状態が改善され、卵巢機能回復が早まる傾向にあることが明らかとなった。

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($n = 4$)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($n = 5$)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。乾物摂取量、乳量、GOT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区が有意に高くなった($p < 0.01$)。TDN充足率、血糖および総コレステロールは、イネWCS区が高く推移した($p < 0.01$, $p < 0.05$ または $p < 0.1$)。分娩後の初回黄体形成日数は、

有意差は認められないもののイネWCS区が早くなる傾向にあった。

以上のことから、高糖分イネWCSを泌乳牛に多給し、ベタインを給与することによって、分娩後の負の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) 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.
- 2) 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.
- 3) 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: 日獣会誌, **60**, 131~133, 2007.
- 4) 山口昇一郎, 太田剛, 手島信貴, 浅岡壮平, 馬場武志: 福岡県農林業総合試験場研究報告, **5**, 41~46, 2019.
- 5) 農業・食品産業技術総合研究機構編: 日本飼養標準・乳牛 (2006年版), 37~93, 中央畜産会, 東京, 2007.
- 6) 村田美里, 石崎重信: 千葉県畜産センター研究報告, **14**, 1~13, 2014.
- 7) 山口昇一郎, 増田善巳, 柴田果歩, 柿原孝彦, 中村瑞希, 大谷昌之, 川島千帆: 日本畜産学会第125回大会講演要旨, 141, 2019.
- 8) Kawashima, C., Sakaguchi, M., Suzuki, T., Sasamoto, Y., Takahashi, Y., Matsui, M., Miyamoto, A.: *J Reprod Dev*, **53**, 113~20, 2006.

暑熱条件下で陥る肉用鶏の免疫疲弊化を回避する 機能性飼料の探索

Development of feed for improvement of antigen-specific immune response
in heat-stressed chickens

豊水 正昭・平川 良太・野地 智法・喜久里 基

(東北大学大学院農学研究科)

Masaaki Toyomizu, Ryota Hirakawa, Tomonori Nochi and Motoi Kikusato

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University)

Heat stress (HS) is of major concern for poultry industry, especially in the hot regions of the world because of the resulting poor growth performance, immunosuppression, and high mortality : due to feathers and lack of sweat glands on skin, chickens are particularly susceptible to high environmental temperatures. In fact, alterations of immune functions have been observed under the HS conditions : the titer of antibodies that react to Infectious Bronchitis (IB), Newcastle Disease (ND) or Avian Influenza (AI) virus did not increase as expected by such vaccinations. In the present study, in order to clarify a possible mechanism underlying the immunological disorder of broiler under the HS conditions and provide a new idea for dietary manipulation to improve it, a series of experiments were conducted to determine quantitatively the effect of HS on not only the number of lymphocytes and plasma titer of IgY, IgM and IgA induced by BSA immunizations, but also metabolic status on the basis of energy-yielding substrates in lymphoid tissues.

The exposure of 3-week-old chickens to $34.5 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ for 6–7 days resulted in significantly decreased number of lymphocytes in spleen and bursa of fabricius, but not in thymus. HS decreased the relative amount of metabolites in glycolysis and TCA cycles (e.g., lactate, citrate, succinate and glyconeogenic amino acids) in those lymphoid tissues, and increased levels of the gene expression related to fatty acid oxidation (e.g., CPT-1, 3HADH, LCAD, CD36) in thymus and spleen, but not in bursa of fabricius. It was also observed that plasma titer of IgY, IgM and IgA induced by BSA immunizations of chickens exposed to heat for 14 days were weaker than that of the thermoneutral chickens. These results suggest that metabolic alterations in lymphoid tissues might be involved in immunological disorder in heat-stressed chickens.

Then, given these results and previous findings, experimental diets containing L-carnitine (Car) or vitamin B₁ plus amino acid (VB₁/AA) were fed HS chickens. Feeding of VB₁/AA significantly alleviated the decrease in body weight of HS chickens, while weakened plasma titer of IgY and IgM induced by BSA immunizations in HS chickens were not significantly but definitely improved by (Car) or vitamin B₁ plus amino acid (VB₁/AA) respectively, though weakened plasma titer of IgA were not changed at all.

It thus appears that optimization of dietary treatment can play a role, to some extent, in the control of immune functions for heat-stressed birds via metabolic changes.

1. 目 的

近年の地球温暖化の進行に伴う気温上昇は畜産業の生産性及び繁殖性に世界的に大きな被害を与えている。肉用鶏は分厚い羽毛に覆われ汗腺がないため、暑熱ストレス下ではパンティング（浅呼吸）により熱拡散を確保するため、バクテリアやウイルスが鼻腔で過されることなく呼吸するので二次的な細菌感染やウイルス病への感染リスクが高い。このため、近年暑熱下の鶏の免疫機能に関する研究成果が多く報告されている。例えば、暑熱下の肉用鶏において、消化管における病原性細菌の増加や腸管透過性の上昇すること¹⁾、骨格筋や肝臓のサルモネラ感染も認められること²⁾、さらにニューカッスル病や鳥インフルエンザウイルスなどのワクチン抗原を点眼で投与した際に、各抗原に特異的に反応する抗体の産生量が低下すること^{3, 4)}が明らかにされている。

すでに、当研究グループでは、暑熱下の肉用鶏では骨格筋の酸化ストレスの上昇が活性酸素種の過剰産生によることを明らかにしているが^{5~7)}、免疫担当器官である一次リンパ組織（胸腺、ファブリキウス嚢）や二次リンパ組織である脾臓の重量が著しく低下し、脾臓におけるT細胞・ヘルパーT細胞・キラーT細胞・B細胞の数が低下し、また予備実験により抗原暴露時の血中の抗原特異的抗体価が低下することを観察している。さらに、脾臓における解糖系やTCA回路の中間代謝物や糖原性アミノ酸量が欠乏状態にあり、免疫担当細胞のエネルギー基質が枯渇していることが予想された。したがって、獲得免疫応答能が低下している暑熱下の肉用鶏は、細菌などの感染リスクは一層高い状態にある。

そこで本研究では、まず暑熱下の肉用鶏の免疫疲弊化の機序、ならびにこれに関連する栄養学的要因を明らかにし、免疫細胞へのエネルギー基質

供給強化を考え合わせた、免疫システム改善のための飼料開発を試みた。

2. 方 法

2.1 暑熱下の各免疫担当組織における免疫細胞の動態とエネルギー基質代謝動態の調査
実験には22日齢雄肉用鶏（Ross308系統）を供試し、試験区として対照区（TN/24±0.5℃）と暑熱区（HS/34.5±0.5℃）を設定し、試験期間を6日間とした。

2.1.1 免疫細胞の動態解析

放血と殺後、各区より一次リンパ組織（胸腺、ファブリキウス嚢）ならびに二次リンパ組織（脾臓）を回収し、各組織断片をPBSとともにナイロンメッシュを透しながら、50mlチューブに移し、遠心・上澄み除去後、PBSで単核細胞数 1×10^6 /100 μ Lになるように調整した。その後、各種蛍光標識抗CD45, CD3, CD4, CD8, Bu1抗体をそれぞれ添加し、4℃で30分間反応させた。反応後、PBSで細胞を洗浄し、フローサイトメーター（Accuri C6, BD Bioscience）で組織当たりの各種細胞数ならびに細胞割合をそれぞれ算出した。

2.1.2 リンパ組織における代謝関連物質の半定量解析

-80℃で凍結された組織サンプルより抽出した水溶性代謝物質をメトキシアミン塩酸塩ならびにMSTFAを添加することで誘導体化（メトキシシリル化）させ、ガスクロマトグラフィー質量分析装置（GCMS-QP2010 SE/SHIMADZU）で各代謝物質の内部標準（2-イソプロピルリンゴ酸）に対する濃度比を調べた。

2.1.3 リンパ組織における β 酸化関連遺伝子の発現量の測定

-80℃で凍結された組織サンプルよりRNAを抽出し、CPT-1, CPT-2, 3HADH, LCAD, CD36の遺伝子発現量をリアルタイムRT-PCRで

定量した。

2.2 暑熱下の抗原特異的な液性免疫応答の評価

実験には22日齢雄肉用鶏（Ross308系統）を供試し、試験区として対照区（TN/24±0.5℃）と暑熱区（HS/34.5±0.5℃）を設定し、試験期間を14日間とした。この2区に牛血清アルブミン（BSA）を暑熱感作3日後（初回免疫）と10日後（追加免疫）に筋肉内注射を行った（対照BSA区：TN-BSA/24±0.5℃ならびに暑熱BSA区：HS-BSA/34.5±0.5℃）。なお、この2区に加えBSA投与をしない2区も設定した。

2.2.1 血中のBSAに特異的な抗体価の定量

追加免疫4日後に翼下静脈より採血し、ただちに血漿を分離し、-20℃で保存した。その後、ELISA法を用いて血漿中のBSAに特異的なIgY、IgMおよびIgA抗体価を定量した。

2.3 機能性飼料の暑熱下の免疫疲弊化への有効性の検証

実験には22日齢雄肉用鶏（Ross308系統）を供試し、試験期間を14日間とした。試験区として先の2.2の4区に加え、暑熱試験開始の1週間前から、1）脂肪酸のβ酸化律速段階にあるミトコン

ドリアへの脂肪酸の移行速度と酸化的リン酸化の促進を施し、好氣的代謝の強化が期待されるL-カルニチン0.01%添加飼料を給与する暑熱カルニチン区（HS-Car/34.5±0.5℃）、ならびに、2）解糖系の律速段階にあるピルビン酸脱水素酵素（PDH）の賦活化ならびにグルコースと糖源生アミノ酸による糖質源の補給による嫌氣的代謝の改善が期待されるビタミンB₁ 0.01%、グルコース5%、クエン酸0.5%ならびに各種アミノ酸（グルタミン酸1%、グルタミン1%、ロイシン0.8%、バリン0.4%、イソロイシン0.4%、アスパラギン酸0.4%）を添加した飼料を給与するビタミンB₁・アミノ酸強化飼料区（HS-VB₁・AA/34.5±0.5℃）の2区を設定した。なお、対照区と暑熱区ならびに強化飼料区の4区には、BSAを暑熱感作3日後（初回免疫）、10日後（追加免疫）に筋肉内注射を行った（Fig. 1）。

2.3.1 飼養成績

暑熱試験開始前と試験終了後の体重を計測し、暑熱試験期間中の累積資料摂取量も測定した。また、試験終了後に、各区より一次リンパ組織（胸腺、ファブリキウス囊）ならびに二次リンパ組織（脾臓）を回収し、それぞれの重量を測定した。

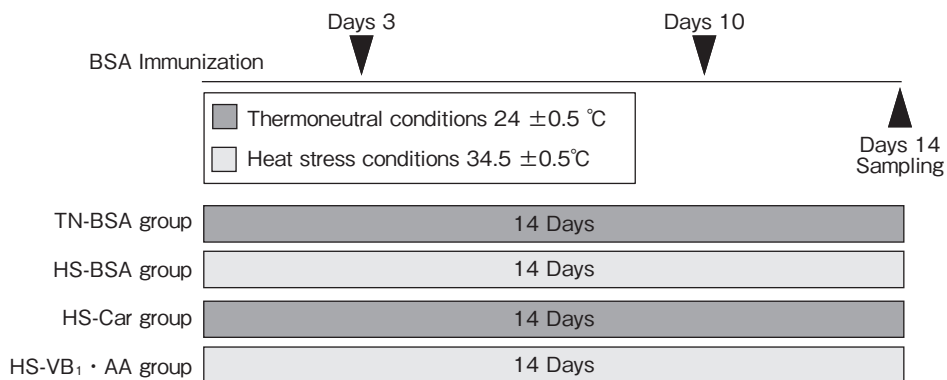


Fig. 1 Experimental design. Broiler chickens were fed either a control diet, an L-carnitine-supplemented diet, or an vitamin B₁ plus amino acids-supplemented diet for 7 days and then exposed either to heat stress (HS : 34.5±0.5℃, 14 days) or kept at a thermoneutral temperature (TN : 24±0.5℃). All chickens were intramuscularly administered BSA on days 3 and 10 of heat exposures.

2.3.2 血中のBSAに特異的な抗体価の定量

牛血清アルブミン (BSA) を暑熱感作 3 日後 (初回免疫), 10 日後 (追加免疫) に筋肉内注射を施す対照BSA区ならびに暑熱BSA区を設定した。追加免疫の 4 日後に翼下静脈より採血し, ただちに血漿を分離し, -20°C で保存した。その後, ELISA法を用いて血漿中のBSAに特異的なIgY, IgMならびにIgAの抗体価を定量した。

3. 結果・考察

3.1 暑熱下の各免疫担当組織における免疫細胞の動態とエネルギー基質代謝動態の調査

3.1.1 免疫細胞の動態解析

暑熱感作によって萎縮したリンパ組織の免疫機能を評価するため, 6 日暑熱感作後の胸腺, ファブリキウス囊, 脾臓における免疫細胞の数・割合をFACS解析で調べた。その結果, T細胞の成熟分化領域である胸腺では, 細胞構成ならびに組織当たりの各CD4⁺CD8⁺T細胞, CD4⁺CD8⁺T細胞, CD4⁺ヘルパーT細胞, CD8⁺キラーT細胞の数に对照区と暑熱区との間に有意な差は認められなかった。一方, B細胞の成熟分化領域である, 鳥類固有の一次リンパ組織ファブリキウス囊におけるCD45⁺白血球のうちのBu1⁺B細胞の割合は, 両区とも約98%と違いは認められなかったが, 組織当たりのBu1⁺B細胞の数は暑熱区で有意な低下が認められた。なお, 二次リンパ組織の脾臓におけるCD45⁺白血球の細胞構成を調べた結果, T細胞ならびにB細胞の割合に違いは認められなかったが, 組織当たりのBu1⁺B細胞, CD3⁺T細胞, CD4⁺ヘルパーT細胞, CD8⁺キラーT細胞の数は暑熱区で有意に低下していた。したがって, 暑熱感作により萎縮したファブリキウス囊ならびに脾臓では, 免疫細胞の構成には変化が認められないが, 組織当たりの数が暑熱で著しく低下することが明らかとなった。

3.1.2 リンパ組織における代謝関連物質の半定量解析

暑熱下のリンパ組織におけるエネルギー基質の存在量を明らかにするため, 各組織における水溶性代謝物質をGC-MSによって網羅的に解析を行った。胸腺では, クエン酸回路のリンゴ酸ならびにアミノ酸であるPhe, Tyrの各量は暑熱区で有意に低下していた。ファブリキウス囊ではGlyが暑熱区で有意な低下が認められた。脾臓では解糖系やクエン酸回路の中間代謝物質である乳酸, コハク酸, クエン酸に加え, 糖原性アミノ酸でもあるTyr, Asn, Pro, Glu, Gly量が暑熱区で有意に低下していた。このように 6 日間暑熱感作したリンパ組織ではエネルギー基質代謝が変化していることは明らかで, 暑熱感作時に血中⁸⁾や肝臓⁹⁾で中間代謝物が変化しているとのこれまでの知見がリンパ組織においても同様にあてはまることが検証された。

3.1.3 リンパ組織における脂肪酸酸化関連遺伝子の発現量

暑熱下のリンパ組織における脂肪酸酸化能を, 各 β 酸化関連遺伝子の発現量によって評価した。胸腺では, 脂肪酸酸化の律速段階である3HADHならびにLCAD, 脂肪酸トランスポーターであるCD36の発現量が暑熱区で有意に増加していた。脾臓では, CPT-1ならびに3HADH, さらにCD36の発現量は暑熱区で有意に増加していた。一方, ファブリキウス囊では, CPT-2ならびに3HADHの発現量は暑熱区で有意に低下していた。したがって, 6 日間暑熱感作した胸腺ならびに脾臓では脂肪酸酸化が促進される一方で, ファブリキウス囊では抑制されていることが明らかとなった。このように, T細胞の数が維持されていた胸腺で脂肪酸酸化が上方制御されており, 逆にB細胞の数が低下していたファブリキウス囊では, 脂肪酸酸化能が低下していた。このことから, 成熟段階

の免疫細胞において脂肪酸酸化は重要なエネルギー供給経路である可能性が示唆された。

3.2 暑熱下の抗原特異的な液性免疫応答の評価

本試験では、暑熱下の液性免疫機能を評価するため、追加免疫後の血漿中のBSAに特異的なIgY、IgMならびにIgAの抗体価をELISA法で調べた。その結果、血漿中のBSA特異的IgYならびにIgM抗体価は両区とも、免疫前と比較して上昇していたが、HS-BSA区の両アイソタイプの抗体価はTN-BSA区と比較して、有意な低下が認められた。血漿中のBSA特異的IgA抗体価は、TN-BSA区でのみ上昇が認められ、HS-BSA区ではその上昇は認められなかった。これらの結果より、暑熱下の肉用鶏では液性免疫機能が低下していることが示された。このことは、脾臓での免疫細胞数が低下している暑熱下において、筋肉内注射によるワクチン接種法では十分な細菌・ウイルス耐性を獲得させることができないことを示唆している。

3.3 機能性飼料の暑熱下の免疫疲弊化への有効性の検証

3.3.1 飼養成績

HS-VB₁・AA区の終体重は、HS-BSA区と比較して有意な増加が認められたが、飼料摂取量ならびに飼料効率には変化は認められなかった。HS-VB₁・AA区の骨格筋、胸腺、ファブリキウス囊の各重量はHS-BSA区と比較して有意な増加あるいは増加傾向を示した。一方、HS-Car区の終体重は、HS-BSA区と比較して増加傾向を示したが、飼料摂取量ならびに飼料効率には変化は認められなかった。HS-Car区の骨格筋、胸腺、ファブリキウス囊の各重量はHS-BSA区と比較して有意な増加あるいは増加傾向を示した。

3.3.2 血中のBSAに特異的な抗体価

暑熱に伴う血液中のBSAに特異的なIgAの抗体

価の低下に対して、HS-VB₁・AA飼料やHS-Car飼料給与による回復効果はまったく認められなかったが、BSAに特異的なIgMとIgYの各低下はHS-VB₁・AA飼料給与とHS-Car飼料給与でそれぞれ軽微な上昇が認められた。このように、通常環境下のブロイラーにカルニチン添加飼料を給与すると一次リンパ組織の重量や抗体価が上昇するとの知見¹⁰⁻¹²⁾を考え合わせると、各添加物質の給与方法ならびに至適添加濃度を今後検討することで、暑熱下の免疫疲弊化を改善できる可能性が期待される。

4. 要 約

本研究は、暑熱ストレス下の肉用鶏における鶏病感染リスクを低減するため、暑熱下の免疫疲弊化の機序に関連する栄養学的要因を明らかにし、免疫システム改善のための飼料開発基盤の構築を目的とした。

暑熱下では、ファブリキウス囊でのB細胞の数、脾臓でのB細胞、ヘルパーT細胞、キラーT細胞の数が著しく低下しており、また筋肉内注射により投与した抗原に対して十分な特異的抗体産生が行われないことが明らかとなった。そこでリンパ組織におけるエネルギー基質動態を解析した。その結果、暑熱感作により各リンパ組織で解糖系やクエン酸回路の中間代謝物質、糖原アミノ酸の各量が低下していることが明らかになった。さらに、胸腺ならびに脾臓では、暑熱感作により脂肪酸酸化の律速段階の酵素3HADHを含む複数の関連遺伝子の活性が上昇していることから、脂肪酸酸化経路におけるエネルギー産生が促進されていることが示唆された。逆に、ファブリキウス囊では、暑熱感作により3HADHの活性が低下しており、脂肪酸酸化経路によるエネルギー供給が制限されていることが考えられた。

これらの結果を踏まえ、解糖系・ATP供給系

アミノ酸代謝の改善が期待されるビタミンB₁・アミノ酸強化飼料ならびにβ酸化によりATP供給の強化が期待されるL-カルニチン添加飼料を暑熱下の肉用鶏に給与し、飼養成績、臓器重量ならびに液性免疫機能に及ぼす影響を検証した。その結果、暑熱下で各種試験飼料を給与した区では、終体重や一次リンパ組織の重量に改善が認められたが、BSAに特異的なIgMとIgYの各低下はHS-VB₁・AA飼料給与とHS-Car飼料給与でそれぞれ軽微な回復が認められた。したがって、今後添加物質の給与法や添加濃度の最適化をはかれば、暑熱下の免疫疲弊化をある程度改善しうるように考えられた。

文 献

- 1) Zhang, C., Zhao, X. H., Yang, L., Chen, X. Y., Jiang R. S., Jin, S. H., Geng, Z. Y. : Resveratrol alleviates heat stress-induced impairment of intestinal morphology, microflora, and barrier integrity in broilers, *Poultry Science*, **96**, 4325~4332, 2017.
- 2) Alhenaky, A., Abdelqader, A., Abuajamieh, M., Al-Fataftah, A. R. : The effect of heat stress on intestinal integrity and Salmonella invasion in broiler birds, *Journal of Thermal Biology*, **70**, 9 ~ 14, 2017.
- 3) Jahanian, R., Rasouli, E. : Dietary chromium methionine supplementation could alleviate immunosuppressive effects of heat stress in broiler chicks, *Journal of Animal Science*, **93**, 3355~3363, 2015.
- 4) Hajializadeh, F., Ghahri, H., Talebi, A. : Effects of supplemental chromium picolinate and chromium nanoparticles on performance and antibody titers of infectious bronchitis and avian influenza of broiler chickens under heat stress condition, *Veterinary Research Forum*, **8**, 259~264, 2015.
- 5) Mujahid, A., Akiba, Y., Warden, C. H., Toyomizu, M. : Sequential changes in superoxide production, anion carriers and substrate oxidation in skeletal muscle mitochondria of heat-stressed chickens, *FEBS Letter*, **581**, 3461~3467, 2007.
- 6) Kikusato, M., Toyomizu, M. : Crucial role of membrane potential in heat stress-induced overproduction of reactive oxygen species in avian skeletal muscle mitochondria, *PLoS One*, **8**, e64412, 2013.
- 7) Azad, M. A., Kikusato, M., Sudo, S., Amo, T., Toyomizu, M. : Time course of ROS production in skeletal muscle mitochondria from chronic heat-exposed broiler chicken, *Comparative Biochemistry and Physiology Part A : Molecular & Integrative Physiology*, **157**, 266~271, 2010.
- 8) Tomonaga, S., Okuyama, H., Tachibana, T., Makino, R. : Effects of high ambient temperature on plasma metabolomic profiles in chicks, *Animal Science Journal*, **89**, 448~455, 2018.
- 9) Jastrebski, S. F., Lamont, S. J., Schmidt, C. J. : Chicken hepatic response to chronic heat stress using integrated transcriptome and metabolome analysis, *PLoS One*, **12**, e0181900, 2017.
- 10) Geng, A., Li, B., Guo, Y. : Effects of dietary L-carnitine and coenzyme Q10 at different supplemental ages on growth performance and some immune response in ascites-susceptible broilers, *Archives of Animal Nutrition*, **61**, 50~60, 2007.
- 11) Takahashi, K., Kitano, A., Akiba, Y. : Effect of L-carnitine on proliferative response and mRNA expression of some of its associated factors in splenic mononuclear cells of male broiler chicks, *Animal Science Journal*, **81**(2), 215~222, 2010.
- 12) Mast, J., Buyse, J., Goddeeris, B. M. : Dietary L-carnitine supplementation increases antigen-specific immunoglobulin G production in broiler chickens, *British Journal of Nutrition*, **83**, 161~6, 2000.

平成30年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉に関する研究または調査（製造加工，食品の価値，食品安全，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， 食品価値， 食品安全				
ミートエクストラクトのkokumiとγ-グルタミルペプチドの関係について	H29～	鈴木 秀之	京都工芸繊維大学 応用生物学系	1,000
地鶏肉の美味しさの決定要因の解明（Ⅱ）		本田 和久	神戸大学大学院 農学研究科	1,200
鹿児島黒豚における血中酸化ストレスと肉質との関連検討		川口 博明	鹿児島大学大学院 医歯学総合研究科 衛生学・健康増進 医学分野	1,000
タンパク質工学によるトランスグルタミナーゼの活性増強と基質認識機構の改変（Ⅲ）	H28～	滝田 禎亮	京都大学大学院 農学研究科 食品生物科学専攻	1,200
豚特有のチアミン三リン酸蓄積機構の解明	H28～	室谷 進	国立研究開発法人 農業・食品産業 技術総合研究機構 畜産研究部門	1,000
和牛肉のおいしさを「見える化」する		山田 知哉	国立研究開発法人 農業・食品産業 技術総合研究機構 畜産研究部門	1,500
ポークソーセージにおける脂質のkokumi増強効果とそのメカニズムの解明		西村 敏英	女子栄養大学 栄養学部	1,300
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（Ⅲ）		市村 さやか	一般社団法人食肉 科学技術研究所	1,300
豚肉の筋繊維タイプ組成と肉質の関連性に関する研究		水野谷 航	九州大学大学院 農学研究科	1,300
軽度認知症改善効果を示した豚肝臓分解物の活性本体の同定とメカニズム解明	H29～	塚原 完	長崎大学 医歯薬学総合 研究科薬学系	1,200
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（Ⅱ）		若松 純一	北海道大学北方生 物圏フィールド科 学センター	1,300
牛心臓由来新規コレステロール代謝改善ジペプチドの作用機構解明および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	1,300

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（Ⅱ）	H29～	林 利哉	名城大学農学部	1,000
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（Ⅱ）	H29～	後藤 孔郎	大分大学医学部	1,000
食肉摂取による，不飽和脂肪酸等の生活習慣病予防効果について（佐久コホートに於ける疫学研究）		山田 晃一	国立研究開発法人 医薬基盤・健康・ 栄 養 研 究 所	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（Ⅱ）	H29～	河合 慶親	徳島大学大学院 医歯薬学研究所	1,200
豚赤血球由来グロビタンパク分解物を用いた高血圧症の改善を目指した研究		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	1,200
ファージおよび食品成分等による食肉の安全確保に関する研究		宮本 敬久	九州大学大学院 農 学 研 究 院	1,000
薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌機構解明に向けた分子論的アプローチ		作道 章一	琉球大学医学部 保健学 生体代謝分野	1,200
電気定数測定に基づく食肉の鮮度評価		齊藤 一幸	千葉大学 フロンティア 医工学センター	1,200
可視・近赤外分光イメージングと深層学習を併用した食肉加工品のスマート品質管理		牧野 義雄	東京大学大学院農 学生命科学研究科	1,500
Ⅱ 遺伝育種				
牛経済形質に関わる新規DNA多型の探索（Ⅱ）	H29～	松本 大和	東海大学農学部 応用動物科学科	900
抗菌性ペプチドを指標とした豚抗病性育種法の開発		上本 吉伸	東北大学大学院 農 学 研 究 科	1,500
肉用地鶏の増産を目指した雌系名古屋種の産卵率および卵殻強度に関する遺伝子座の効率的な探索		後藤 達彦	帯広畜産大学	1,500
牛の暑熱ストレス耐性を担うHSP70.1遺伝子多型に関する研究		森 美幸	福岡県農林業総合 試験場生産環境部	700
DNAメチル化網羅解析法により種雄牛の受胎性の評価		山崎 淳平	北海道大学大学院 獣 医 学 研 究 院	1,500
霜降り豚肉の生成に関わる生体内因子の探索		谷口 雅章	国立研究開発法人 農業・食品産業 技術総合研究機構 畜 産 研 究 部 門	1,300
Ⅲ 繁殖				
組織分化制御因子の遺伝子発現プロファイルに基づく豚体外受精胚の新規培養技術の開発		澤井 健	岩手大学農学部	1,300
体外胚生産技術を活用した純粋種豚（トウキョウX）の生産性向上に関する研究		岡田幸之助	日本獣医生命 科学大学 応用生命科学部 動物科学科	1,300
発情発見困難牛の特徴解明による授精率向上方策の検討		坂口 実	北里大学獣医学部	1,000
牛におけるクロモグラニンAの分泌動態および繁殖障害への関与の解明と子宮内膜における生理機能の解析		高橋 透	岩手大学農学部	950

牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基盤的研究	H29～	木崎景一郎	岩手大学農学部 共同獣医学科	1,500
牛における新規膈内薬剤投与技術の確立		田中 知己	東京農工大学院 農学研究科	1,300
牛体内成熟卵を用いた移植用胚生産システムの高度化に関する研究		山中 賢一	佐賀大学農学部	1,300
黒毛和種凍結精子の低運動持続性に関する実態調査		星野洋一郎	京都大学大学院 農学研究科 附属牧場	1,350
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（Ⅱ）		武田久美子	国立研究開発法人 農業・食品産業 技術総合研究機構 畜産研究部門	1,500
牛の卵巣・子宮機能調節に及ぼす不飽和脂肪酸の影響とその利用		作本 亮介	農研機構 畜産研究部門 繁殖領域	1,200
肝機能と栄養状態解析を用いた牛子宮内膜炎の新たな予後判定評価法の開発		H29～	大滝 忠利	日本大学 生物資源科学部 獣医学科獣医臨床 繁殖学研究室
牛の肝機能障害が炎症性子宮疾患の重篤化に及ぼす分子メカニズムの解明	真方 文絵		東京大学大学院 農学生命科学科 研究	1,300
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（Ⅱ）	柳川洋二郎		北海道大学大学院 獣医学院	1,300
豚における繁殖性の向上に向けたアミノ酸の効果に関する研究	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	1,300
繁殖雌牛における栄養コントロールが過剰排卵処置の反応性および回収胚数に与える影響	林 武司		福岡県農林業 総合試験場畜産部	1,200
卵巣の鉄不足に起因した豚における繁殖障害の解明（Ⅱ）—肝臓の鉄放出能低下と繁殖障害の関係—	山下 泰尚		県立広島大学 生命環境学部	1,300
Ⅳ 動物衛生				
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（Ⅱ）	H29～	佐藤 繁	岩手大学農学部 共同獣医学科	1,500
食肉の薬剤耐性菌による汚染菌数の測定法の開発・評価		石原加奈子	東京農工大学 農学部	1,000
筋肉中の虫体数を予測できるトキソプラズマ感染豚の検出法		高島 康弘	岐阜大学 応用生物科学部	1,500
牛趾乳頭腫症の性状解明を目指したメタゲノム解析と疫学研究		後藤 恭宏	九州大学大学院 医学研究院	1,500
簡便・迅速なマダニによって媒介される牛のアナプラズマ症とバベシア症の診断法開発		田仲 哲也	鹿児島大学 共同獣医学科	1,100
消化管寄生性コキシジウム, Eimeria kriegsmanni における発育休止期の解析		松尾 智英	鹿児島大学 共同獣医学科 寄生虫病学分野	900

鶏に対する高率的・低負荷な新規サルモネラ粘膜ワクチンの開発		谷 浩行	大阪府立大学 大学院生命環境科学科 獣医学専攻 獣医内科学	1,500
牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの実施状況調査		森本 素子	宮城大学 食産業学群	800
ゲノム疫学的手法による豚抗酸菌症のリスク評価と実態解明		大屋 賢司	岐阜大学 応用生物科学部	1,300
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（Ⅱ）	H29～	小野 久弥	北里大学獣医学部	1,300
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（Ⅱ）	H29～	猪熊 壽	帯広畜産大学 畜産学部	600
エゾシカ由来腸管出血性大腸菌の食品衛生リスクに関する研究		福本 晋也	帯広畜産大学 病原微生物研究センター	800
産業動物の粘膜関連リンパ組織の探索（Ⅱ） —より効果的なワクチン接種部位を求めて—	H29～	市居 修	北海道大学大学院 獣医学研究院	700
豚腸管細胞モデルを用いた豚サーコウイルス関連疾病の重症化機序解明		岡林 環樹	宮崎大学農学部 獣医学科	1,300
アフリカ豚コレラの侵入リスク評価に関する疫学研究		杉浦 勝明	東京大学大学院 農学生命科学研究科	1,200
豚増殖性腸炎による可食部位の廃棄防止に向けた適正な抗生物質使用方法の検討		岡田 彩加	岐阜大学 応用生物科学部 共同獣医学科	1,500
南九州におけるPRRSウイルス変異株の地理的分布および病理学的解析		平井 卓哉	宮崎大学農学部	700
北海道の肉用牛における牛ウイルス性下痢症の疫学調査		磯田 典和	北海道大学人獣共通 感染症リサーチセンター	800
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（Ⅱ）	H29～	黒木 香澄	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	1,300
野鳥が媒介する家畜のボツリヌス症の分子疫学的解析		阪口 義彦	北里大学医学部 微生物学	1,300
豚流行性下痢ウイルス感染による致死性を決定する遺伝子の同定		大橋 誠一	国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門	1,300
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索		青山 真人	宇都宮大学農学部 生物資源科学科	1,200
地方病性牛白血病の簡易鑑別診断法の開発と若齢発症牛の実態調査への応用		岡川 朋弘	北海道大学大学院 獣医学研究院	1,300
Ⅴ 家畜飼養、飼料				
ワイン搾汁残渣タンニンを利用したラム肉パストラルフレーバー低減技術の確立		上田宏一郎	北海道大学大学院 農学研究	1,100
骨格筋肥大を促進する植物由来成分の探索		米倉 真一	信州大学農学部	1,500

家畜生産における抗生物質使用量の低減化を目指した「ミサイル」抗菌剤の創出	H29～	榎本 賢	東北大学大学院農学研究科	1,100
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（Ⅱ）		高田 良三	新潟大学農学部	900
カリウムおよびセシウムの含量が低い国産実用牧草品種の選抜と育種に向けた植物生理学的解析		小林奈通子	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,300
妊娠末期の乳用牛へのバイパスリジン給与がその産子の栄養代謝へ及ぼす影響		川島 千帆	帯広畜産大学畜産学部	1,400
乳牛の周産期における肝臓由来の新規タンパク質の発現と分泌動態		蘆 尚建	東北大学大学院農学研究科	1,400
養鶏における個体管理と清掃ロボット導入による異IoT型食肉生産技術の開発		堀口 健一	山形大学農学部	1,100
成熟後の効率的な筋肥大の誘導に寄与する筋幹細胞の探索		鈴木 貴弘	北海道大学大学院農学研究科	1,200
飼料用イネの繊維消化性を左右する要因の解明と生産現場との技術的連携		近藤 誠	三重大学大学院生物資源学研究科	1,100
黒毛和種肥育牛の安定的ルーメン発酵に貢献する重要細菌群の特性把握		小池 聡	北海道大学大学院農学研究科	1,500
乳用子牛への機能性飼料の給与による亜急性ルーメンアシドーシス制御と発育向上	H29～	櫛引 史郎	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門	1,100
豚の未熟産子（ひね豚）の発育遅延をもたらす生理的要因の解明		中島 郁世	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門	1,100
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（Ⅱ）		神戸 大朋	京都大学大学院生命科学研究科	1,600
半教師あり学習による飼料成分を予測する新たな近赤外分析法の開発		田中 常喜	（地独）北海道立総合研究機構畜産試験場	1,200
黒毛和種の分娩間隔短縮に資する新たな栄養管理指標の開発～牛体3Dモデルを用いたアプローチ～		木野 勝敏	愛知県農業総合試験場畜産研究部	1,200
乳牛における高糖分イネWCS（ホールクロップサイレージ）多給により高繁殖型飼養管理システムの確立（Ⅱ）		山口昇一郎	福岡県農林業総合試験場	1,200
暑熱条件下で陥る肉用鶏の免疫疲弊化を回避する機能性飼料の探索		豊水 正昭	東北大学大学院農学研究科	1,400
合 計		84件		101,200

伊藤記念財団賞

林 利 哉

名城大学農学部応用生物化学科 教授

〔業績の課題名〕

筋肉・食肉タンパク質の機能・加工特性に関する研究 —ゲル化特性, 変性・分解挙動, 生理活性—

〔業績の概要（受賞理由）〕

良質なタンパク質を多く含む食肉は、嗜好面と栄養面の両方を兼ね備えるポテンシャルに満ちた食材であるが、現在のところ十分な知見が取得・活用されているとはいえず、食肉・筋肉の未知・既知機能の発掘とさらなる改善が待たれるところである。受賞者の研究内容は大きく以下の三つに分類される。一つ目の領域は、未利用・低利用資源の食肉製品への有効利用を念頭にいた大豆タンパク質と筋肉タンパク質の相互作用に関する研究である。連続的に加熱挙動を追跡できる動的粘弾性測定とタンパク質化学的手法を併用して、異種タンパク質同士が共存することによって生ずる相乗的な分子間反応の帰結として発現される粘弾性特性と理化学的特性の変化から、これらのタンパク質間で生ずる相互作用を論じ、加熱に伴う異種タンパク質間相互作用の発現機構の一部を明らかにした。

二つ目は、食肉の“素”である筋肉の成長・肥大と運動との関連に関する研究である。筋肉の肥大は栄養・運動・成長因子の相乗作用で助長されると考えられており、同氏は、運動とタンパク質栄養が動物の成長に如何に作用するかを動物実験によって検討し、運動と食肉タンパク質摂取の組合せにより、ラットの成長と筋肉の成長因子として知られるインスリン様成長因子-I (IGF-I) の血液中濃度の上昇が促されることを明らかにした。さらに、運動神経支配と、筋肉の成長との関係を、外科的に運動神経を切除したウサギの筋肉の量的および質的变化を調べることによって検討したところ、神経切除による筋萎縮に伴って、分子量12kDaの糖タンパク質因子の量が減少することを見出すとともに、そのアミノ酸配列が新規なものであったことから、本因子をs-myotrophinと命名した。この運動神経依存型の筋肉細胞成長因子は、既知の有力な筋肉細胞成長因子であるIGF-Iに匹敵する培養骨格筋細胞の肥大化活性ならびに骨格筋特異的タンパク質の発現賦活活性を有することも明らかにした。

三つ目は、現在推進している食肉・食肉製品の機能改善に関する研究である。特に、高温殺菌や発酵といった食品加工技術によって、より安全で、おいしく、かつ機能性が強化された高付加価値な製品の開発を志向した研究である。その成果として、発酵やレトルト処理により、食肉タンパク質は、ミオシン等の主要タンパク質の一部分解を伴う極めて特徴的なゲル形成挙動を示すことや、血圧上昇抑制効果や筋骨格系細胞の成長といった種々の機能性を発現する可能性を見出している。

これらの成果は、食肉・食肉製品の付加価値向上に寄与し得る基礎的知見であり、学術面のみならず、産業面においてもその発展に資することが期待される。

今 内 覚

北海道大学大学院獣医学研究院病原制御学分野 准教授

〔業績の課題名〕

食肉の生産現場における牛白血病の新たな制御法の開発

〔業績の概要（受賞理由）〕

牛白血病は、白血球増加や全身性の悪性リンパ腫を症状とする疾病で、発症すると死に至る。牛白血病の発生原因は、ウイルス性と非ウイルス性に大きく二つに分かれ、このうち牛白血病ウイルスを原因とする牛白血病が、本病のほとんどを占める。牛白血病は平成10年に届出伝染病に指定された当初、全国での発生数は100頭にも満たなかったが、平成29年の発生数は3,383頭（うち607頭は北海道での発生）にも至り、当時の34倍以上も急増している状況である。現在、牛白血病に対する有効なワクチンや治療法はいまだなく、的確な診断法および制御法の開発が求められている。ウイルスが原因となる牛白血病は地方病型と呼ばれ、主に3歳以上の牛に発生するとされていた。しかし、若齢牛での発症が示唆され始めたことから食肉衛生検査所と共同研究を実施し、これまで否定されていた若齢牛での地方病型白血病が発生していることを報告した。一方、長年の研究にもかかわらずワクチンの実用化に至っていない牛の難治性疾患、特に免疫抑制状態に陥っていると想定される慢性感染症の宿主免疫機構を明らかにした。すなわち、牛白血病では、ワクチン非働化の機序が免疫抑制因子によるリンパ球の疲弊化であると解明した。この知見により、免疫抑制因子を阻害することでウイルス量を低下させる治療薬の解発にも成功し、今後の牛白血病をはじめとする牛の難治性疾病の新制御法としてなりうることを報告した。本開発技術の応用がなされれば、休眠状態だった抗原特異的リンパ球の機能回復がなされ、ウイルス感染細胞の排除が可能となり、牛白血病発症の抑制のみならず、病態進行に伴う乳量の低下や脂肪沈着量などに及ぼす経済的損失の抑制効果にも寄与する。さらに、免疫低下に付随する他の疾患への易感受性状態からの脱却も図られる。また、本開発技術は、いまだワクチンが成功に至っていない牛の慢性感染症（ヨーネ病、マイコプラズマ症・乳房炎等の経済損失が大きい疾患）にも同様の効果をもたらすと考えられ、北海道をはじめとした日本の生物系特定産業や社会、経済への間接的貢献も期待が大きいと考えられる。

水野谷 航

九州大学大学院農学研究院 助教（現所属：麻布大学獣医学部）

〔業績の課題名〕

筋繊維タイプの解析技術開発と食肉生産への応用に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

骨格筋は動物体のさまざまな運動に関わる組織である。骨格筋を構成する筋線維には遅筋タイプと速筋タイプが存在し、このタイプ組成により動物の運動能力と代謝能力が左右されることがよく知られている。一方と畜後に肉用家畜の骨格筋は死後変化を経て食肉に変わるが、筋線維タイプ組成は保水性や肉色等に代表される食肉の質にも強い影響を与えることが分かっている。水野谷氏は筋線維タイプ組成を効率的に解析できる手法の開発に努め、筋線維タイプの指標分子であるミオシン重鎖アイソフォームを明瞭に分離する電気泳動プロトコルを開発し（Mizunoya et al. Anal Biochem, 2008）、次いでミオシン重鎖アイソフォームに特異的に結合する4種の異なるモノクローナル抗体を新規作成し、抗体に直接蛍光標識することで、単一試料で筋線維タイプを可視化できる免疫染色プロトコルの開発にも成功した（Sawano et al. PLOS ONE, 2016）。

さらに、上記解析技術を駆使し、食品栄養学的な処理によって筋線維タイプ組成を制御できるか検討してきた。まず、脂肪代謝を促進する寒冷環境下での飼育がラット骨格筋の遅筋タイプを増加することを明らかにした（Mizunoya et al. Anim Sci J, 2008）。さらに、魚油あるいはリンゴポリフェノールを搾取したラットの骨格筋では、それぞれの対照区と比較して、有意に遅筋タイプ側へ筋線維タイプ組成が変化することを明らかにした（Mizunoya et al. PLOS ONE, 2013, 2015）。これらの発見は、筋線維タイプ組成は運動によってのみ変化すると考えられていた従来の定説を覆すものである。さらに近年では、遅筋タイプが多い筋組織で脂肪合成系の遺伝子発現が高いこと、蓄積脂肪が多い筋線維は実際は遅筋タイプではなく中間タイプの筋線維であることを見出している（Komiya et al. J Muscle Res Cell M, 2017）。

学会等事業助成

アジア地域の食肉衛生に関する シンポジウムに関する開催報告

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30年11月22日（木）16：00－18：40

〔場所〕国立大学法人東京大学 伊藤国際学術研究センター

本シンポジウムは、公益社団法人日本獣医学会が主催する国際会議「獣医師資格と教育」にアジア諸国、米国、スペインおよび国内の獣医学関係者が参加することに合わせて、そのサテライトシンポジウムとして、一般市民も自由に参加できる公開シンポジウムとして開催した。上記国際会議参加者および一般市民を含めて100名以上が聴講した。以下に、本シンポジウムのプログラムと各講演の概要を報告する。

〔プログラム〕

座長：関崎 勉（東京大学・食の安全研究センター）

1. 「Beta-agonist Control Project : A Case Study in Thailand (β -アゴニスト制御計画：タイにおけるケーススタディ)」：Prawat Rattanaphumma (Department of Livestock Development, Thailand (タイ政府畜産局))
2. 「Helminthic food-borne infection in Japan (日本における食品由来蠕虫症)」：吉田彩子 (宮崎大学)
3. 「The outbreak of Trichinella papuae infection in Ban Rai District, Thailand : Experience of successful control of the disease (タイ国バンライ地域でのトリヒナ症の集団発生：本病制圧の成功経験)」：Teera Kusolsuk (マヒドル大学 (タイ))
4. 「African swine fever ; a great threat to the Asian food security (アフリカ豚コレラ；アジアの食料安全保障に対する重大な脅威)」：津田知幸 (KMバイオロジクス)

〔講演内容〕

1. 「Beta-agonist Control Project : A Case Study in Thailand」

タイ国においては、牛や豚の体重増加を目的として β -アゴニスト薬を飼料添加物として給飼することは2001年から禁止されていた。しかし、相変わらずこれを使用する農家が後を絶たず、食肉に残留した β -アゴニストがヒトの健康に害を及ぼすことが問題となっていた。そこで、2015年から違反した事例に対しては、3年以下の懲役または60,000タイバーツの罰金を科して、その根絶を目指した。計画は3期に分けて、特定の地域から始め、豚の尿検査を実施して β -アゴニストが検出された場合には出荷停止措置をとり、懲役または罰金の処分を下した。この作業を次第に他の地域にまで広げ、2017年には、調べた6,207頭のうちわずか68頭(1.09%)が摘発されるにとどまり、撲滅が着実に進んで消費者に安全な食肉を提供できるようになった。

2. 「Helminthic food-borne infection in Japan」

幼虫移行症候群は、ヒトを終宿主とせず成虫にならない線虫の幼虫によって起こる典型的な人獣共通

感染症である。本症を起こす線虫は多く知られているが、中でもイヌ回虫、ネコ回虫、ブタ回虫によるものが最もよく見られる。ヒトはこれらの寄生虫卵に汚染された土壌がついた食品、野菜、あるいは生または加熱不足の食肉を介して感染する。欧州や北米では、泥遊びを好む子供での症例がよく見られる。一方、日本では成人男性が生または加熱不足の獣肉やレバーを食べることで発症する。したがって、食用家畜におけるこれら寄生虫による汚染度調査が喫緊の課題となっている。同時に、寄生虫の専門家は食肉の生食は寄生虫感染のリスクが高いということを市民に伝えなければならない。

3. 「The outbreak of *Trichinella papuae* infection in BanRai District, Thailand : Experience of successful control of the disease」

トリヒナ症は、世界中、特に欧州での新興再興感染症である。特に北部タイでは、1962年以来 *Trichinella spiralis* による本症が毎年発生している。*T. Pseudospiralis* による症例はチュンホン県での1例のみであったが、2006年と2007年にケンマクロッド村などで2件の集団発生があった。患者の生検組織と血清をマヒドル大学熱帯医学部寄生虫講座で検査し、特異抗体の検出と、生検組織では寄生虫も観察され、遺伝子配列から、*T. papuae* と同定された。ケンマクロッド村では、村民に対して保健教育が行われ、小学校では漫画本を使った教育が、大人によりも高い効果を見せた。そこで、保健担当者やマヒドル大学移動クリニックチームが協力して、村長、子供達の保護者、家族などに対してグループミーティングを行った。その後、10年後の節目にフォローアップ調査を実施したところ、血液検査陽性者は一人も出なかった。村人へのインタビューやアンケート調査で、野生イノシシ肉の生食と本症との関連への関心が続いていることを確認した。今後も野生動物でのトリヒナ汚染の有無を調査するべきである。

4. 「African swine fever : a great threat to the Asian food security」

アフリカ豚コレラは養豚業にとって最も恐ろしい感染症で、直接および間接の強い伝染力、高い致死率を示すだけでなく、ウイルスは豚肉加工品中で長期間活性を保つ。1921年ケニアで報告され、その後、1957年に欧州から東欧やカリブ海諸国、ブラジルに広まったが、イタリア・サルジニア島を除き制圧は成功した。次の発生は、2007年ジョージアから豚と野生イノシシを介して何千キロも離れたロシアに広がった。2018年夏中国での最初の発生報告があってから瞬く間に9つの県に広がった。中国には、世界中の豚の約半数が飼育され消費量も多いことから、本病の発生は食料の安全と確保への影響が大きいだけでなく、東南アジア諸国、朝鮮半島、日本への伝播を引き起こしかねない。本病は有効なワクチンがなく、越境性感染症の中でも制圧が難しい疾病である。したがって、清浄地域であり続けることが重要で、豚および野生イノシシ間への侵入防止と発見後は迅速な制圧が求められる。

日本食肉研究会の平成 30 年度事業助成実施報告

日本食肉研究会 会長 坂田亮一（麻布大学・明治大学）

1. はじめに

標記の事業の項目として、（公財）伊藤記念財団から今回助成を受けたのは（１）海外派遣事業の補助（国際食肉科学技術会議派遣）、および（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、初めに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記す。

2. 日本食肉研究会等の概要

本会は昭和34年（1959年）４月に発足し、食肉に関する分野について広く学界、業界、団体関係者がお互いの研鑽の場として、学術と産業の発展を目指し、活動を行ってきた。

本会では毎年、研究会大会（学術講演会）の開催、ならびに会誌として「食肉の科学」を発行している（平成３年に「肉の科学」を改称）。研究会は通常、日本畜産学会大会の開催に合わせて春に実施され、食肉および食肉加工に関連する分野のエキスパートによる特別講演、ならびに会員による研究発表を行い、活発な意見交換がなされている。「食肉の科学」の主な内容として、総説、解説、海外事情、最近の文献紹介、研究会大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（開催地は神戸）、このICoMSTの成功に向けて国内受入組織である本研究会は重要な役割を担っている。

今年、研究会創設60周年を迎え、３月30日の大会で記念式典が開催された。ヨーロッパからも招待講演者を迎え、会場となった麻布大学に多くの参加者が詰めかけ、盛大なセレモニーとなった。これらの行事に関しても、日本食肉研究会ホームページで紹介している（<http://jmeatsci.org/>）。

なお本年３月の研究会総会時点で、正会員174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６社を擁している。

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64回会議（2018年オーストラリア開催）に本会から会員３名が参加した。このICoMSTは毎年８月中旬に開催され、本会からは、会長、副会長あるいは常任幹事の中から１名を派遣している。その際、代表者会議に出席し、会議報告を研究会機関誌の「食肉の科学」に掲載し内容を会員に周知することが研究会の中で義務づけられている。2018年は８月12日（日）～17

日（金）にメルボルンで開催され、本助成により、有原圭三会員（北里大学獣医学部）、若松純一会員（北海道大学農学部）ならびに竹田志郎会員（麻布大学獣医学部）の3名が派遣された。

会場はメルボルンの中心地区にあり、ヤラ川河口に近いGrand Hyatt Hotel（写真1）で行われた。参加者は489名あり（表1）、日本からは上記3名以外に松石昌典副会長（日本獣医生命科学大学）、西海理之会員（新潟大学）、山之上稔会員（神戸大学）、宮口右二（茨城大学）、渡邊源哉会員（農研機構）らが参加した（写真2）。この会議の詳細は、食肉の科学（2018年2号）中の【海外事情】に報告されている¹⁾。

前回の開催地コーク（アイルランド）は遠かったせいか、日本からの参加者が例年より少なく、3名だけであつたが、それでもデスクを会場に設置し、2022年日本開催のPRに務めた。今回は日本からの参加者が15名あり、ICoMST2022 in神戸の宣伝を大に行うことができた（写真2）。

会期中は終日、ミートサイエンスに関する多くのセッションで、食肉の産地・飼養条件などの由来、食品の安全性と微生物学についての最近の進歩、生体認証（Biometrics）と官能科学（Sensory science）、食肉や副産物の付加価値を増すための技術、食肉の品質を向上させるための新技術、肉質に及ぼす糖代謝とタンパク質代謝の影響に関するトピックス、保存性や品質維持のための包装技術、食肉の栄養的機能と食肉製品における天然由来添加物による有用性、オーストラリアにおける豚肉の品質保証と安全への取り組み、などをテーマに基調講演とディスカッションが展開された。

日本食肉研究会では、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、昨年にICoMST2022準備委員会から組織員会に移行している。2019年のICoMSTはドイツが担当し、ベルリン・ポツダムで8月に開催される。次回も伊藤記念財団からの派遣事業助成によって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すると期待される。



写真1 Grand Hyatt Hotel内の会場(64th ICoMST)

表1 国別参加者数（64th ICoMST）

国・参加者数*		国・参加者数*	
Argentina	1	Netherlands	1
Australia	165	New Zealand	31
Belgium	2	Norway	2
Brazil	11	Philippines	3
Canada	8	Poland	4
Chile	2	Portugal	1
China	40	Russia	2
Costa Rica	1	Serbia	1
Denmark	9	Singapore	4
Estonia	1	South Korea	42
Finland	4	Spain	11
France	6	Sweden	4
Germany	13	Switzerland	1
India	1	Taiwan	1
Ireland	8	Thailand	12
Italy	3	United Kingdom	5
Japan	15	United States	67
Lithuania	1	Uruguay	4
Mexico	2		
* 同伴者、学生も含む。		Total 489	

(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、平成28年度から外国人研究者を日本食肉研究会大会に招き、伊藤記念財団から助成を受けこの事業を行っている。その第1回目は、2年前の2017年3月30日に神戸大学国際文化学部で開催された第58回日本食肉研究会大会の中で特別講演としてドイツからProf. Schwägele (Max-Rubner Institute, Kulmbach副所長)を招き、食肉中の微量残留物質の基準と分析法の話題を中心にセミナーを実施した²⁾。

2018年は東京大学農学部本郷キャンパスで第59回日本食肉研究会大会にて、トルコ共和国からDr. Abdulatef Ahhmed (Yildiz Technical University講師)を招き、「Accreditation of Halal meat products and the diversity of their protein properties」の演題で、ハラールと畜の科学的検証、ならびに食肉とし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、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³⁾。

2019年は、デンマークからDr. Lars Hinrichsen (Danish Technological Institute副所長)、ならびにスペインからDr. Mónica Flores (Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, Valencia)を本助成事業の一環として招聘し、第60回日本食肉研究会記念大会で特別講演を行った(写真3と4、於麻布大学)。Dr. Hinrichsenは「The Industrial Meat Revolution - Advanced technology will change operations as we know it」の演題で、デンマークにおける豚肉解体作業の自動化について動画も交え、最新技術が紹介された。中でもデジタル化とロボット導入での解体、CTスキャンによる肉質判定など、ハイテクによる豚枝肉処理のスピードアップ化に、会場で驚きの声が聞かれた。Dr. Floresは「Aroma of Wet and Dry Cured Meat Products : Implications of current health trends and natural strategies for enhancement」の演題で、塩漬肉製品、特に乾塩漬ハムなどスペインの伝統的加工品の芳香物質に関し、その成分を詳細に丁寧に調べた結果を公表した。両者の講演要旨は、「食肉の科学」本年第1号に



写真2 日本人参加者集合写真(64th ICoMST)



写真3 Dr. Hinrichsen (Denmark) の講演



写真4 Dr. Flores (Spain) の講演

も掲載されている。

4. おわりに

伊藤記念財団からの学会・研究会など学術集団への活動助成は今年で3回目となった。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、あえて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図られた。年々、日本人会員の英語力も向上しており、この助成による成果であると判断する。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ている。その結果、メルボルンでの第64回会議中に2名の研究者に直接本年3月の日本食肉研究会大会での講演を打診でき、以後の正式依頼に快諾が得られ、招聘がスムーズに進んだ。

国際会議参加、食肉研究会への招聘、2022年神戸での国際会議開催（図1）を見据えて諸外国のキーパーソンとの交流など、この海外派遣とセミナーの事業助成効果は確実に上がっている。

ここに、助成をいただいた（公財）伊藤記念財団の皆様に心から謝意を表し、引き続き本助成が継続することを日本食肉研究会として願ってやまない。

参考資料

- 1) 松石昌典・有原圭三・若松純一・竹田志郎. 2018. 海外事情「第64回国際食肉科学技術会議に出席して」食肉の科学. VOL.59 No.2, 149~157.
- 2) 根岸晴夫. 2017. 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.
- 3) 根岸晴夫. 2018. 日本食肉研究会への平成28年度事業助成実施報告. 平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書. VOL.36, 455~457.



図1 第68回国際食肉科学技術会議神戸開催ポスター（英語版）

平成 30 年度事業実施報告書

日本畜産学会第 125 回大会 公開シンポジウム

「スマート畜産：IoT・人工知能およびロボット技術の利活用」

公益社団法人日本畜産学会 理事長 寺田文典（東北大学）

〔日時〕 2019年3月28日（木）13：00～16：30

〔会場〕 麻布大学 百周年記念ホール

〔主催〕 公益社団法人日本畜産学会

〔共催〕 日本学術会議 食料科学委員会畜産学分会・日本畜産学アカデミー

〔プログラム〕

司会進行：柏崎直巳（日本学術会議連携会員・麻布大学教授）

開会挨拶：寺田文典（日本畜産学会理事長・東北大学教授）

基調講演 座長：小深壯行（日本学術会議連携会員・日本獣医生命科学大学教授）

講演Ⅰ：「畜産ビッグデータの処理・活用による新しい畜産生産管理システムの展望」

大和田勇人（東京理科大学教授）

講演Ⅱ：「放牧型畜産への利活用：IT技術を活用した高度放牧管理システム」

後藤貴文（鹿児島大学教授）

講演Ⅲ：「ロボット搾乳・ハードナビゲータシステム導入による生産性の向上」

松下寛（株式会社松下牧場代表取締役）

講演Ⅳ：「日本型豚舎洗浄ロボットの開発」

松野更和（農研機構農業技術革新工学研究センター）

講演Ⅴ：「MIJ-カメラを活用した牛肉質自動解析システムの開発」

口田圭吾（帯広畜産大学教授）

総合討論 座長：眞鍋昇（日本学術会議第二部会員・大阪国際大学学長補佐 教授）

閉会挨拶：渡邊誠喜（日本畜産学アカデミー会長）

〔開催趣旨〕

本シンポジウムは、「スマート畜産：IoT・人工知能およびロボット技術の利活用」をテーマとして、研究者および生産者からの事例報告を中心に、現在、大いに注目を浴びている新たな畜産物生産システムについての議論を行った。とりわけAI・IoT技術の援用による畜産管理システムの現状を踏まえたうえで、これを有効利用している畜産経営主から生産現場の声をくみ上げることにより、畜産の指導者や生産者への各種関連技術の改善に寄与することが期待された。一方、本シンポジウムが企図している「スマート畜産」による生産システムは、畜産物価格のコスト上昇につながるものが懸念されており、当該増加コスト分は販売価格に上乗せ転嫁されることも考えられるため、消費者の理解醸成を有すると

ころである。そこで日本畜産学会および日本学術会議が有する公益性を踏まえ、消費者である一般市民の皆様にもご参加いただき、本邦畜産の広報活動を促進することにより、畜産に対する関心とご理解を深めていただくために一般の皆様も参加できる公開シンポジウムとした。

〔講演概略〕

I：軽労化と生産性向上を目指してロボットやAIを導入することが注目されている中、さまざまなセンサーを導入して畜種の活動や環境を把握することは、スマート畜産におけるデジタル化の第一歩である。これにロボットを組み合わせるとアクティブなセンシングが可能となり、データ収集が加速され、ビッグデータが構築される。さらに、それをAIで解析して効率的な繁殖管理や早期疾病予測が実現できれば、畜産経営に役立つことが期待される。

II：現在の畜産が抱えるさまざまな問題～牛舎内での加工型畜産における過度な輸入飼料への依存、高騰する輸入飼料相場や子牛の価格高騰に翻弄される経営困難、循環不可の過剰糞尿処理、BSE等の食の安全、脂肪過多牛肉志向で硬直したマーケット、さらに集約的飼養による動物福祉等～を、放牧IoT技術を開発・導入することで、未利用な山地、中山間地域等の植物資源を省力的・効率的に活用し、低コストで持続的、そして環境保全型の肉用牛生産が構築される。

III：非常に注目を集めている搾乳ロボットだが、どんな牛でも完璧に搾乳できるわけでもない。しかし搾乳ロボットのことを酪農家が理解し、ロボットが高いパフォーマンスを発揮できる環境を作ることにより、乳量の増加や乳房炎の減少をさせることができ、労働力削減やさまざまなデータを集めることも可能である。

IV：豚舎内の洗浄・消毒は、養豚農家において防疫上不可欠な作業である。その作業時間は農場の管理作業の約1/3にもなるにもかかわらず、洗浄作業そのものは豚の生産工程には含まれず、その重要性は認識しつつも極力手をかけたくない、というところが養豚農家の本音ではないかと思われる。そこで日本型豚舎洗浄ロボットの開発が行われることとなった。

V：肉牛の育種改良を効率的に行うためには、牛枝肉の高精度な品質評価が非常に重要である。客観的な肉質評価手法が求められている中、狭い切開面に対応した新しい牛枝肉撮影装置を開発し、撮影と同時の自動解析を実現したので、その概要ならびに利用の可能性を紹介する。

〔参加者数〕 468名

学会員の畜産学関連研究者、畜産農家の他、IoT・人工知能およびロボット関連の民間企業の技術者・研究者や畜産関連団体・行政関係からも多数（非学会員：156名）ご参加いただいた。このように、畜産分野へもIoT・人工知能およびロボットを利活用しようとする事への関心の高さから、本シンポジウムの内容が幅広く受け入れられたと考えられる。

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30年度 (Vol. 37)

2019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 >