

令和2年度

食肉に関する

助成研究調査成果報告書

VOL. 39

公益財団法人

伊藤記念財団

「伊藤記念財団」設立趣意書

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

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

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

第1は、食肉加工団体の指導体制の若返りであり、

第2は、食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

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

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

昭和56年6月

設立発起人 伊 藤 傳 三

Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

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

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

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

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

Denzo Ito, Founder
June 1981

事業のあらまし

(目的)

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

(事業)

本財団は、上述の目的を達成するため、次の事業を行う。

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

(事業実績)

年度	研究調査助成		
昭和57年度	第1回	48件	60,000千円
58	2	52	54,400
59	3	60	49,800
60	4	62	48,000
61	5	70	53,000
62	6	79	58,900
63	7	95	70,500
平成元年度	8	86	74,250
2	9	79	60,000
3	10	70	50,000
4	11	86	60,000
5	12	81	60,000
6	13	81	60,000
7	14	82	65,000
8	15	81	69,100
9	16	78	59,000
10	17	82	60,000
11	18	67	47,000
12	19	57	41,000
13	20	53	37,000
14	21	58	40,000
15	22	55	41,000
16	23	55	48,000
17	24	56	48,000
18	25	11	10,000
19	26	12	10,000
20	27	15	16,900
21	28	11	10,000
22	29	11	10,400
23	30	12	12,000
24	31	13	13,000
25	32	38	37,000
26	33	58	54,800
27	34	69	66,000
28	35	71	69,000
29	36	74	75,000
30	37	84	101,200
31 (令和元年度)	38	74	105,000
2	39	79	105,000

ご 挨拶

当伊藤記念財団は、伊藤ハム株式会社の創業者故伊藤傳三による巻頭の「設立趣意書」に掲げた趣意をもって、昭和56年7月3日に財団法人として農林水産大臣から設立を許可され、平成24年4月1日に公益財団法人伊藤記念財団に移行登記したものであり、事業の内容は、「事業のあらまし」にあるとおりであります。

おかげ様で当財団は、平成24年度からは公益財団法人として活動することとなり、その活動は本年で39年となります。この間、当財団の研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々の中に浸透いたし、事業内容も逐次充実して参りつつあります。

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

本書は、第39回（令和2年度）助成事業における79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6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3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.39 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. 2021
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation



研究助成事業

目 次

和牛肉のおいしさを「見える化」する（Ⅲ） 和牛ブランド間の比較山 田 知 哉 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター)	3
微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した食肉加工技術の開発（Ⅱ）竹 中 慎 治（神戸大学大学院農学研究科）	8
牛枝肉のモモ抜けの非破壊検査用磁気共鳴スキャナーの開発中島 善人 ¹ ・柴 伸弥 ² (¹ 国立研究開発法人産業技術総合研究所地質調査総合センター, ² 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター)	15
イミダゾール化合物が食肉の熟成に及ぼす影響について早 川 徹（北海道大学大学院農学研究院）	22
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（Ⅲ）西村 敏英・山口 千里（女子栄養大学栄養学部）	25
枝肉の3Dグラフィック化システムの製作（Ⅱ）本山 三知代・渡邊 源哉・中島 郁世・佐々木 啓介 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門)	34
乾塩漬ハム中の亜鉛プロトポルフィリンⅡの形成様相と存在形態に関する研究（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）	40
食肉の風味を構成する呈味性化合物の分画およびメタボローム解析水野谷 航・竹田 志郎・森川 里久*・澤野 祥子*・ 齊藤 千佳*・良永 裕子* (麻布大学獣医学部, *麻布大学生命・環境科学部)	46
食肉製品の香気分析に基づく品質管理手法の開発河 原 聡（宮崎大学農学部）	53
次世代の培養肉作製のための骨格筋タイプ変換技術の基礎的研究久保 純 ¹ ・井上 雄介 ² ・山田 昭博 ¹ ・佐原 玄太 ¹ ・ 近藤 貴大 ¹ ・小椋 利彦 ¹ (¹ 東北大学加齢医学研究所, ² 旭川医科大学先進医工学研究センター)	58
畜産副生物から再生医療部材への高付加価値加工神 田 英 輝（名古屋大学大学院工学研究科）	64

産肉量増加を目指した間葉系前駆細胞による新規血管新生機構の解明	山内 啓太郎 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	72
コリン供給源としての食肉機能の評価	三浦 豊 (東京農工大学大学院農学研究科)	77
食肉中に含まれる2-オキソ-イミダゾールジペプチドに関する研究	居原 秀・笠松 真吾 (大阪府立大学大学院理学系研究科)	84
国際基準および国内と畜場の現場実態に適合した牛枝肉の生物的危害要因制御のための内部検証方法の開発	猪島 康雄 (岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)	91
ハム・ソーセージに配合する食品添加物に関するリスクコミュニケーション手法の開発ならびに効果検証	山崎 毅・山崎 深雪・阿紀 雅敏 (特定非営利活動法人食の安全と安心を科学する会)	96
食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究 (Ⅱ)	堀江 正一・渡邊 萌・堀井 千枝 (大妻女子大学家政学部食物学科)	107
牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響 (Ⅱ)	大和 修・矢吹 映・Md Shafiqul Islam・Shahnaj Pervin (鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学分野)	118
肉用牛の枝肉形質および肉質の診断マーカーとしての血中マイクロRNAの動態解析	横井 伯英 (京都大学大学院農学研究科)	124
豚胎児の成長性に影響する生体内因子の探索	谷口 雅章・中島 郁世・荒川 愛作 (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)	129
黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の客観的評価手法の開発	鈴木 洋美 (北海道立総合研究機構畜産試験場)	133
遺伝子情報を用いた黒毛和種の枝肉形質と脂肪酸組成に及ぼす系統と遺伝様式の影響の解明	広岡 博之・井上 慶一*・竹田 将悠規*・井上 喜信** (京都大学大学院農学研究科, *家畜改良センター, **鳥取県畜産試験場)	139
牛子宮内膜での単核球の出現が分娩後の子宮修復に及ぼす影響	三浦 亮太郎・田島 剛 (日本獣医生命科学大学獣医学部)	148
黒毛和種における経腔採卵前のヒアルロン酸添加ブタFSH製剤1回筋肉内注射の効果に関する研究	及川 俊徳 ¹ ・植田 郁恵 ¹ ・沼邊 孝 ² (¹ 宮城県畜産試験場, ² みやぎ農業振興公社)	154
沖縄在来豚アグーを絶滅から守るべきL-カルニチン処理による凍結精子作製技術の改良	建本 秀樹 (琉球大学農学部)	159

抗酸化物質を利用した牛体外受精卵生産技術の高度化とそれを応用した 新規 OPU-IVF-ET による子牛生産システムの開発	日巻 武裕 ^{1,2} ・草薙 志穂 ² ・多治見 弘史 ³ (¹ 岐阜大学応用生物科学部, ² 岐阜大学自然科学技術研究科, ³ 多治見牛ETクリニック) ……	167
牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発 (Ⅱ)	杉 村 智 史 (東京農工大学大学院農学研究院) ……	174
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 (Ⅲ)	木崎 景一郎・金澤 朋美・高橋 透 (岩手大学農学部共同獣医学科) ……	178
妊娠末期の黒毛和種における子宮動脈血流動態および胎盤の血流面積による胎盤機能 および新生子牛の健全性の推定	伊 賀 浩 輔 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター畜産飼料作研究領域) ……	183
糞および尿を検査検体として用いる簡便かつ正確な馬の妊娠診断法の開発	高 橋 透 (岩手大学農学部) ……	189
牛におけるルーメン非分解性ナイアシン給与による子宮、卵巣への血流促進による 分娩後の繁殖性向上	森田 康広*・松山 秀一 (名古屋大学大学院生命農学研究科, *名古屋大学アジアサテライトキャンパス学院) ……	195
発情期における牛子宮内膜機能調節因子および調節機序の解明	杉浦 智親・中田 健 (酪農学園大学獣医学群動物生殖学ユニット) ……	202
温度センサと加速度センサを内蔵する多機能尾部センサの乳牛周産期管理への利用	檜垣 彰吾 ¹ ・櫻井 玲奈 ¹ ・松井 義貴 ² (¹ 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, ² 地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場) ……	207
受胎性を裏付ける黒毛和種牛の分娩後子宮修復指標の確立	久保田 海 雄 (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) ……	215
卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討	小 山 毅 (北海道立総合研究機構畜産試験場) ……	220
ドライ精子による牛生産に関する研究	松 川 和 嗣 (高知大学農林海洋科学部) ……	226
MTT (3[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いた豚精液の 評価法の開発	内倉 健造・田島 茂行・相良 鮎美・豊島 浩一 (愛知県農業総合試験場) ……	231
牛初期黄体における PG 抵抗性の解明—低酸素環境による抗アポトーシス機構—	西村 亮・菱沼 貢 (鳥取大学農学部共同獣医学科獣医繁殖学) ……	237

黒毛和種牛における妊娠期の栄養状態が産子の繁殖能力に及ぼす影響 北原 豪 (宮崎大学農学部)	243
リピートブリーダー牛の原因の多角的解析によるその対策のための基礎情報収集 羽田 真悟・真方 文絵* (帯広畜産大学獣医学研究部門, *東京大学大学院農学生命科学研究科)	249
オリゴクローナルな持続性リンパ球増多症を示す牛白血病ウイルス感染牛の生産性解析 猪熊 壽 (東京大学大学院農学生命科学研究科)	254
牛難治性伝染性蹄病であるヘアリーアタックの病態解析 谷口 喬子 ¹ ・三澤 尚明 ^{1,2} (¹ 宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター, ² 宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室)	259
カンピロバクター・ジェジュニの「生きているが培養できない状態」を復帰させるための 生物学的因子の解明 三澤 尚明 (宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)	266
豚熱 (CSF) ワクチン接種繁殖母豚から初乳摂取条件の異なる子豚への CSF 抗体移行と 存続に関する研究 長井 誠 ¹ ・野口 倫子 ¹ ・鈴木 武人 ¹ ・青木 博史 ² (¹ 麻布大学, ² 日本獣医生命科学大学)	273
尾根部の体表温度から黒毛和種育成子牛の発熱を検知する手法の開発 佐々木 羊介・上松 瑞穂* (宮崎大学農学部, *NOSAI宮崎)	281
牛呼吸器病症候群 (BRDC) 発症機序の解明 (Ⅱ) 帆保 誠二・石川 真悟 (鹿児島大学共同獣医学部)	287
病原性因子を欠損した生後感染アカバネウイルスの作出と生ワクチンへの応用 正谷 達磨・岡島 美鈴 (岐阜大学応用生物科学部)	293
熊本系褐毛和種における地方病性牛白血病抑制メカニズムの解明 稲 永 敏 明 (東海大学農学部応用動物科学科)	299
豚の筋ジストロフィーの病態解明と生前検査法の開発 相原 尚之・野口 倫子 (麻布大学獣医学部)	304
リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法とナノポアシーケンス技術を用いた超迅速な ウイルス塩基配列解読法の開発 堀江 真行 ^{1,2,3} ・安藤 清彦 ⁴ (¹ 京都大学白眉センター, ² 京都大学ウイルス・再生医科学研究所, ³ 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻, ⁴ 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)	310

牛白血病ウイルス由来の非翻訳性 RNA と結合する宿主タンパク質の同定安藤清彦 (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)	316
豚消化器病ウイルスの感染メカニズムを解明するための豚腸管オルガノイドを用いた画期的な インビトロ実験感染系の開発鈴木亨 (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)	321
アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究(Ⅲ)杉浦勝明・芳賀猛(東京大学大学院農学生命科学研究科)	325
肉用牛から分離された新規病原体 <i>Rhodococcus equi</i> の国内感染状況の疫学調査鈴木康規・角田勤・高井伸二(北里大学獣医学部)	333
畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発若尾雅広(鹿児島大学学術研究院理工学域工学系)	341
UV-LED 光殺菌を用いた、鶏病原性大腸菌殺菌システムの開発下畑隆明 ¹ ・粟飯原睦美 ² (¹ 徳島大学大学院医歯薬学研究部, ² 徳島大学大学院社会産業理工学研究部)	347
網羅的ジェノタイピングによる新規牛白血病抵抗性遺伝子の同定(Ⅱ)目堅博久(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)	354
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(Ⅲ)森本素子(宮城大学食産業学群)	359
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究(Ⅱ) —飼養成績と腸内細菌叢に及ぼす影響—勝俣昌也・鈴木武人(麻布大学獣医学部)	363
牧草サイレージの高品質化に向けたバイオガスプラント消化液施用量の評価三谷朋弘 ¹ ・上田宏一郎 ² (¹ 北海道大学北方生物圏フィールド科学センター, ² 北海道大学大学院農学研究科)	368
ルーメンマットスコアを指標にした子牛の免疫強化法の研究保田昌宏 ^{1,2} ・今泉法子 ² ・阿部信介 ^{1,3} (¹ 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科, ² 宮崎大学農学部, ³ 宮崎県農業共済組合)	374
量産可能なオリゴ糖素材を添加した飼料給餌による家畜腸内細菌叢改善効果の検証西本完 ¹ ・遠野雅徳 ² ・山崎信 ³ (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 ¹ 食品研究部門, ² 中央農業研究センター, ³ 畜産研究部門)	380
子牛の健全な発達を目指した消化管の上皮細胞接着微生物叢の相互関係の解明西原昂来(東北大学大学院農学研究科)	386
ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発権藤崇裕(宮崎大学フロンティア科学総合研究センター)	389

牛肉の風味を維持した黒毛和種雌牛の肥育期間短縮技術の開発 庄司 則章 ¹ ・上野 豊 ² (¹ 山形県農業総合研究センター畜産研究所, ² 信州大学農学部)	396
木材クラフトパルプの混合割合の異なる濃厚飼料の給与が黒毛和種去勢牛の飼料消化性および 第一胃内発酵に及ぼす影響 前田 友香 (宮崎県畜産試験場)	404
耕畜連携を目指した国産トウモロコシ子実の高品質サイレージ化に向けた調製条件の探索 神園 巴美・嵯野 英子 (国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター)	411
母子同品種のホルスタイン種および黒毛和種における分娩直後の母牛, 分娩時の臍静脈および 出生直後の子牛のアミノ酸濃度の比較 川島 千帆 ¹ ・草場 信之 ¹ ・山岸 則夫 ² (¹ 帯広畜産大学畜産フィールド科学センター, ² 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻)	416
肉用鶏の成長効率に關与する腸管内 Wnt およびその受容体の探索 伊藤 謙 (秋田県立大学生物資源科学部)	423
ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した採食可能量の予測モデルの開発 (Ⅱ) 谷川 珠子 ¹ ・田中 常喜 ² (¹ 地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場, ² 地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場)	427
国産トウモロコシ子実の乾燥温度および貯蔵条件がトウモロコシの栄養価に及ぼす影響 篠遠 善哉 ¹ ・金井 源太 ¹ ・芦原 茜 ² (¹ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター, ² 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)	434
黒毛和種肥育牛の部分尿による尿中窒素排泄量の推定方法の確立 近藤 誠 ¹ ・股村 真也 ¹ ・岡本 俊英 ² ・梅木 俊樹 ² (¹ 三重大学大学院生物資源学研究科, ² 三重県畜産研究所)	440
ビタミン A 投与が黒毛和種子牛の骨格筋成長に与える影響 二瓶 直浩 ¹ ・佐藤 祐介 ² ・湯澤 裕史 ¹ ・川田 智弘 ¹ (¹ 栃木県畜産酪農研究センター, ² 宇都宮大学)	446
ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与が対馬地鶏肉用交雑鶏の發育および肉質に及ぼす影響 深川 聡・松永 将伍 (長崎県農林技術開発センター)	453

暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレークスルー：筋幹細胞の活性化・増殖因子 HGF の ニトロ化（不活化）の関与の検証（Ⅱ） ……………辰巳 隆一・増原 夏海・Mohamed Zakaria Elhussiny・ Vishwajit Sur Chowdhury・Alaa Elgaabari ¹ ・城戸 潤力・今富 奈々・ 関 美弓・松吉 祐児・鈴木 貴宏・中村 真子・古瀬 充宏 (九州大学大学院農学研究院, ¹ Kafrelsheikh University, Egypt) ……………	460
家畜糞の分解効率に関わる土壌・糞中微生物の関連性～多様性と量の謎を解く～ ……………内田 義崇・龍見（岩岡） 史恵（北海道大学大学院農学研究院) ……………	465
初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性（Ⅱ） ……………松 崎 正 敏（弘前大学農学生命科学部) ……………	470
異なる月齢時の輸送が子牛の福祉性および生産性に与える影響 ……………戸 澤 あきつ（帝京科学大学生命環境学部) ……………	474

CONTENTS

Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality (Ⅲ) Comparison among branded Wagyu beef	
Tomoya Yamada (Central Region Agricultural Research Center, NARO)	3
Developments in technology for meat processing by fungal aspartic protease (Ⅱ)	
Shinji Takenaka (Graduate School of Agricultural Science, Kobe University)	8
Development of a magnetic resonance scanner for the nondestructive quantification of fat contents of the beef round in a carcass	
Yoshito Nakashima ¹ and Nobuya Shiba ² (¹ National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Geological Survey of Japan, ² National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tohoku Agricultural Research Center)	15
Effect of imidazole compounds on the aging of meat	
Toru Hayakawa (Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture)	22
Clarification of the enhancement mechanism of “<i>koku</i> attributes” by lipids in pork sausages (Ⅲ)	
Toshihide Nishimura and Chisato Yamaguchi (Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University)	25
Development of a system for rendering 3D computer graphics of meat carcasses (Ⅱ)	
Michiyo Motoyama, Genya Watanabe, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	34
Studies on the formation and the existence form of zinc protoporphyrin IX in dry-cured ham (Ⅱ)	
Jun-ichi Wakamatsu (Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)	40
Metabolomic analysis of taste components fraction to characterize meat flavor	
Wataru Mizunoya, Shiro Takeda, Riku Morikawa*, Shoko Sawano*, Chika Saito* and Yuko Yoshinaga* (School of Veterinary Medicine, Azabu University, * School of Life and Environmental Science, Azabu University)	46

Development of quality control method of meat products based on flavor analysis	
Satoshi Kawahara	
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	53
Basic research on skeletal muscle type conversion technology for the next generation of cultured meat	
Atsushi Kubo ¹ , Yusuke Inoue ² , Akihiro Yamada ¹ , Genta Sahara ¹ , Takahiro Kondo ¹ and Toshihiko Ogura ¹	
(¹ Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, ² Advanced Medical Engineering Research Center, Asahikawa Medical University)	58
Add value preparation from livestock by-products to regenerative medicine materials	
Hideki Kanda	
(Graduate School of Engineering, Nagoya University)	64
Elucidating a novel mechanism of angiogenesis by mesenchymal progenitor cells	
Keitaro Yamanouchi	
(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	72
Evaluation of meats functions as a choline resource	
Yutaka Miura	
(Institute of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology)	77
Studies on 2-oxo-imidazole dipeptides in meat	
Hideshi Ihara and Shingo Kasamatsu	
(Graduate School of Science, Osaka Prefecture University)	84
Development of internal verification methods for control of biological hazard in beef carcasses adapted to both global standard and domestic slaughterhouses	
Yasuo Inoshima	
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	91
Development and evaluation of smart risk communication method on the food additives formulated in ham and sausage	
Takeshi Yamasaki, Miyuki Yamasaki and Masatoshi Aki	
(NPO, Science of Food Safety and Security (SFSS))	96
Study on awareness of consumers about safety of food additives (II)	
Masakazu Horie, Moe Watanabe and Chie Horii	
(Department of Food Science, Faculty of Home Economics, Otsuma Women's University)	107

Molecular basis of novel genetic disorders in cattle and their adverse impact (II)	
Osamu Yamato, Akira Yabuki, Md Shafiqul Islam and Shahnaj Pervin (Laboratory of Clinical Pathology, Department of Veterinary Clinical Sciences, Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)	118
Analysis of dynamics of circulating microRNAs as biomarkers for diagnosis of carcass traits and meat quality in beef cattle	
Norihide Yokoi (Graduate School of Agriculture, Kyoto University)	124
Investigation of biological factors associated with growth of pig fetuses	
Masaaki Taniguchi, Ikuyo Nakajima and Aisaku Arakawa (Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	129
Research for objective evaluation of forerib conformation of Japanese Beef Cattle	
Hiromi Suzuki (Hokkaido Research Organization, Agricultural Research Department Animal Research Center)	133
Investigation of sire lines and genetic transmission modes on carcass traits and a fatty acid trait in Japanese Black cattle using genomic information	
Hiroyuki Hirooka, Keiichi Inoue *, Masayuki Takeda * and Yoshinobu Inoue ** (Kyoto University, * National Livestock Breeding Center, ** Tottori Prefectural Livestock Research Center)	139
The effect of monocyte appearance in endometrium to uterine involution in cattle	
Ryotaro Miura and Tsuyoshi Tajima (Department of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University)	148
Effect of intramuscular injection of porcine FSH in hyaluron acid prior to ovum pick-up in Japanese Black cattle	
Toshinori Oikawa ¹ , Ikue Ueda ¹ and Takashi Numabe ² (¹ Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, ² Miyagi Agricultural Development Corporation)	154
Improvement of the sperm freezing procedure by treatment with L-carnitine to protect Okinawan native Agu pig from extinction	
Hideki Tatamoto (Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)	159
Improvement of bovine <i>in vitro</i> fertilized embryo production technology using antioxidants and development of calf production system by new OPU-IVF-ET method	
Takehiro Himaki ^{1,2} , Shiho Kusanagi ² and Hiroshi Tajimi ³ (¹ Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, ² Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu University, ³ Tajimi bovine ET clinic)	167

Development of predictive system of chromosomal abnormality on bovine in vitro fertilized embryos (II)	
Satoshi Sugimura	
(Tokyo University of Agriculture and Technology, Institute of Agriculture)	174
Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle (III)	
Keiichiro Kizaki, Tomomi Kanazawa and Toru Takahashi	
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)	178
Estimation of placental function in dams and health of newborn in Japanese Black cattle based on uterine arterial and placental blood flow hemodynamics in late pregnancy	
Kosuke Iga	
(Division of livestock and Forage Research, Tohoku Agricultural Research Center, NARO)	183
Development of simple and accurate procedure for pregnancy diagnosis by using fecal and urine samples in the mare	
Toru Takahashi	
(Faculty of Agriculture, Iwate University)	189
Improvement of post-partum reproductive performance by Rumen protected niacin supplementation in cattle	
Yasuhiro Morita * and Shuichi Matsuyama	
(Graduate School of Bioagricultural sciences,	
* Asian Satellite Campuses Institute, Nagoya University)	195
Study on bovine endometrial function regulator and regulatory mechanism during estrus	
Tomochika Sugiura and Ken Nakada	
(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, Rakunogakuen University)	202
Peripartum management using a multimodal tail-attached device with a thermistor and a triaxial accelerometer in dairy cattle	
Shogo Higaki ¹ , Reina Sakurai ¹ and Yoshitaka Matsui ²	
(¹ National Institute of Animal Health, NARO,	
² Dairy Research Center, Hokkaido Research Organization)	207
Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility	
Kaiyu Kubota	
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	215
Examination of new selection method of recipient cow based on ovarian reserves	
Takeshi Koyama	
(Animal research center, Hokkaido research organization)	220

Studies of cattle production using dried spermatozoa	
Kazutsugu Matsukawa (Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University)	226
The development of evaluation method of porcine sperm using MTT (3[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)	
Kenzo Uchikura, Shigeyuki Tajima, Ayumi Sagara and Koichi Toyoshima (Aichi Agricultural Research Center)	231
The mechanisms of PG-resistance in bovine early corpus luteum	
– hypoxia-induced anti-apoptotic mechanism –	
Ryo Nishimura and Mitsugu Hishinuma (Laboratory of Theriogenology, Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University)	237
Effects of maternal nutritional condition for fertility of their offsprings in Japanese Black cattle	
Go Kitahara (Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	243
Gathering basic information for the solution of repeat-breeder cows by multiple analysis of its causes	
Shingo Haneda and Fumie Magata * (Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, * Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	249
Productivity analysis of cattle infected with bovine leukemia virus which show oligoclonal persistent lymphocytosis	
Hisashi Inokuma (Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	254
Pathophysiological analysis of bovine hairy attack as a refractory infectious hoof disease	
Takako Taniguchi ¹ and Naoaki Misawa ^{1, 2} (¹ Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki, ² Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medical Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)	259
Clarification of biological factors to restore <i>Campylobacter jejuni</i> from “viable but non culturable” status	
Naoaki Misawa (Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)	266
Investigation for classical swine fever virus specific maternal antibody levels and persistence of piglets acquired colostrum under different condition from sow	
Makoto Nagai ¹ , Michiko Noguchi ¹ , Takehito Suzuki ¹ and Hiroshi Aoki ² (¹ Azabu University, ² Nippon Veterinary and Life Science University)	273

Detection of fever of Japanese Black calves by ventral tail base surface temperature	
Yosuke Sasaki and Mizuho Uematsu *	
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, *NOSAI Miyazaki)	281
Breakthrough of pathogenic mechanism of bovine respiratory disease complex (BRDC) (II)	
Seiji Hobo and Shingo Ishikawa	
(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)	287
Establishment of Akabane virus mutant deleted pathogenetic determinant and application for live vaccine	
Tatsunori Masatani and Misuzu Okajima	
(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)	293
Analyses of the susceptibility for Enzootic Bovine Leukosis in Japanese Brown cattle of Kumamoto strain	
Toshiaki Inenaga	
(Department of Animal Sciences, School of Agriculture, Tokai University)	299
Study of pathogenesis and detection method of porcine muscular dystrophy	
Naoyuki Aihara and Michiko Noguchi	
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)	304
Development of a rapid diagnostic system for detection and sequencing of viral nucleic acid using recombinase polymerase amplification and nanopore sequencing technology	
Masayuki Horie ^{1,2,3} and Kiyohiko Andoh ⁴	
(¹ Hakubi Center for Advanced Research, ² Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, ³ Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka, ⁴ National Institute of Animal Health, NARO)	310
Identification of host-derived proteins interacting with BLV non-coding RNA	
Kiyohiko Andoh	
(National Institute of Animal Health, NARO)	316
Development of a new <i>in vitro</i> experimental system using swine intestinal organoid to clarify infection mechanism of porcine enteric viruses	
Tohru Suzuki	
(National Institute of Animal Health, NARO)	321
Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan	
Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga	
(Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)	325

Epidemiological investigation of domestic transmission of a new pathogen, <i>Rhodococcus equi</i>, isolated from beef cattle	
Yasunori Suzuki, Tsutomu Kakuda and Shinji Takai (Kitasato University School of Veterinary Medicine)	333
Development of mucosal vaccine adjuvant for livestock	
Masahiro Wakao (Department of Science and Engineering, Kagoshima University)	341
Development of UV-LED inactivation system for avian pathogenic <i>Esherichia coli</i>	
Takaaki Shimohata ¹ and Mutsumi Aihara ² (¹ Department of Preventive Environment and Nutrition, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School, ² Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University)	347
Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by comprehensive genotyping (II)	
Hirohisa Mekata (Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)	354
A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of parasite control program in cattle (III)	
Motoko Morimoto (School of Food Industrial Sciences, Miyagi University)	359
A study on requirements of lysine in weanling pigs (II) - Effects on growth performances and microbiota -	
Masaya Katsumata and Takehito Suzuki (School of Veterinary Medicine, Azabu University)	363
Optimum application of biogas plant slurry for improving grass silage quality	
Tomohiro Mitani ¹ and Koichiro Ueda ² (¹ Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University; ² Reserach Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	368
Studies on the enhancement of calf immunity appraised by rumen mat score	
Masahiro Yasuda ^{1,2} , Noriko Imaizumi ² and Shinsuke Abe ^{1,3} (¹ Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, ² Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, ³ Miyazaki Agricultural Mutual Aid Association)	374
Verification of the effect of feed supplemented with mass-producible oligosaccharides on the improvement of intestinal flora in livestock	
Mamoru Nishimoto ¹ , Masanori Tohno ² and Makoto Yamazaki ³ (¹ Food Research Institute, ² Central Region Agricultural Research Center, ³ Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	380

Revealing gastrointestinal development by understanding gastrointestinal epithelial attached cells in calves	
Koki Nishihara (Faculty of Agriculture, Tohoku University)	386
Development of high digestibility warm-season forage grass by genome editing	
Takahiro Gondo (Frontier Science Research Center, University of Miyazaki)	389
Development of fattening method that maintain the flavor of beef and shorten the feeding period in Japanese Black cow	
Noriaki Shoji ¹ and Yutaka Uyeno ² (¹ Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, ² Faculty of Agriculture, Shinshu University)	396
Effect of various ratio of wood kraft pulp in concentration feed on feed digestibility and rumen fermentation in Japanese Black fattening steer	
Yuka Maeda (Miyazaki Livestock Research Institute)	404
Exploration of preparation conditions for high-quality silage from domestic corn grain aiming at integration systems between crop and animal production	
Tomomi Kamizono and Eiko Touno (Tohoku Agricultural Research Center, NARO)	411
Comparison of blood amino acid levels in dams immediately after calving, in the umbilical veins at calving, and in their calves immediately following birth between Holstein and Japanese Black cattle	
Chiho Kawashima ¹ , Nobuyuki Kusaba ¹ and Norio Yamagishi ² (¹ Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, ² Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)	416
Search for intestinal Wnt and its receptors involved in the growth efficiency of broiler chickens	
Ken Ito (Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University)	423
Prediction of feed intake capacity based on dynamic models of fiber digestion and passage in the rumen (II)	
Tamako Tanigawa ¹ and Tsuneki Tanaka ² (¹ Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Dairy Research Center, ² Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center)	427

Effects of drying temperature and storage conditions on nutritive value of domestic grain of corn	
Yoshiya Shinoto ¹ , Genta Kanai ¹ and Akane Ashihara ²	
(¹ Tohoku Agricultural Research Center, NARO,	
² Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)	434
Method development to estimate total urinary nitrogen excretion in fattening Japanese black beef cattle	
Makoto Kondo ¹ , Masaya Matamura ¹ , Toshihide Okamoto ² and Toshiki Umeki ²	
(¹ Graduate School of Bioresources, Mie University, ² Mie prefectural Livestock Institute)	440
Effects of administration of vitamin A on skeletal muscle growth in Japanese black calves	
Naohiro Nihei ¹ , Yusuke Sato ² , Hiroshi Yuzawa ¹ and Tomohiro Kawada ¹	
(¹ Tochigi Pref. dairy & livestock experimental research center, ² Utsunomiya University)	446
Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on development and meat quality of Tsushima-Jidori crossbred chicken for meat	
Satoru Fukagawa and Shogo Matsunaga	
(Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center)	453
Breaking-through the heat stress-induced suppression of postnatal muscle growth : possible implication of nitration of myogenic stem cell activation factor HGF (part II)	
Ryuichi Tatsumi, Natsumi Masuhara, Mohamed Zakaria Elhussiny, Vishwajit Sur Chowdhury, Alaa Elgaabari ¹ , Hirochika Kido, Nana Imatomi, Miyumi Seki, Yuji Matsuyoshi, Takahiro Suzuki, Mako Nakamura and Mitsuhiro Furuse	
(Graduate School of Agriculture, Kyushu University, ¹ Kafrelsheikh University, Egypt)	460
Relationship between microbiomes related to the decomposition efficiency of livestock dung - the importance of diversity and the abundance -	
Yoshitaka Uchida and Chikae Tatsumi (Iwaoka)	
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)	465
Colostrum programming of physiological properties related to meat production (II)	
Masatoshi Matsuzaki	
(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)	470
Influence on welfare and production by transporting calves at different ages	
Akitsu Tozawa	
(Faculty of Life & Environmental Sciences, Teikyo University of Science)	474

伊藤記念財団賞

目 次

- 安 部 亜津子**（島根県畜産技術センター 肉用牛科長）
黒毛和種牛肥育経営の収益性向上を目指した短期肥育技術ならびに和牛肉の特性評価に
関する研究 487
- 岩 崎 智 仁**（酪農学園大学農食環境学群 食と健康学類 教授）
食肉加工への超高压利用，新規顕微鏡による食肉の顕微解析ならびに鶏の異常硬化胸肉に
関する研究 488

学会等事業助成

目 次

令和2年度学会等事業助成実施報告書

シンポジウム『豚の感染症と私たちの暮らし—豚熱とアフリカ豚熱の現状と対策』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）…………… 491

日本食肉研究会 令和2年度事業助成の実施報告

日本食肉科学会 理事長 坂田亮一（麻布大学名誉教授）…………… 493

令和2年度事業実施報告書

日本畜産学会第128回大会（オンライン開催）公開シンポジウム

市民公開シンポジウム1「地球温暖化：暑熱ストレスによる家畜・家禽の生産性低下の
科学的理解と対応策の展望」

公益社団法人日本畜産学会 理事長 柏崎直巳（麻布大学）…………… 499

研究助成事業

和牛肉のおいしさを「見える化」する（Ⅲ）

和牛ブランド間の比較

Studies on the new evaluation method of Wagyu beef quality (Ⅲ)
Comparison among branded Wagyu beef

山田 知哉

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業研究センター)

Tomoya Yamada

(Central Region Agricultural Research Center, NARO)

In this experiment, we studied the metabolomic profiling of sirloin samples among branded (A, B) and non-branded (C) Wagyu beef by GC-MS analysis. The principal component analysis score plots showed that the metabolomic profile was divided among three Wagyu groups. Metabolomic analysis showed that metabolites of group A were characterized by the abundance of components such as fumaric acid and malic acid. In contrast, metabolites of group B were characterized by the abundance of components such as citric acid and uric acid. In addition, the present study showed that the metabolites of group C were characterized by the abundance of components such as alanine, proline, maltose, and xylitol. These results indicate that the metabolomic analysis is an optimum approach to identify characteristic chemical components of Wagyu beef.

1. 目 的

メタボローム解析は、癌の早期発見のための特異的な血中バイオマーカーの同定など、これまで主に医学分野において活用されてきた。近年畜産分野においても、食肉の品質特性の解明を目的としたメタボローム解析の適用が試みられている¹⁻⁴⁾が、食肉の品質に影響を及ぼすバイオマーカーに関してはいまだ不明な点が多い。申請者は、伊藤記念財団研究助成課題において和牛肉のメタボローム解析を実施した結果、和牛肉は糖類の含量が多いこと⁵⁾、さらに和牛肉中の旨味成分は、アメリカ産およびオーストラリア産の輸入牛肉より高いこと⁶⁾を見出した。

和牛肉の販売戦略において銘柄（ブランド）は重要な要素であり、日本三大和牛に代表される全国ブランドや、生産地名を冠した地域ブランドを含め、多数の和牛ブランドが設立されている。しかし、和牛ブランド間の特徴を明確に区別する牛肉中成分の指標はいまだ明らかではない。そこで日本国内においては和牛ブランド間の差別化を明確にするため、さらには和牛肉の積極的な輸出によって海外における和牛ブランドを確立するため、今後、脂肪交雑以外の和牛肉の特徴を明確にすることが重要になると考えられる。

そこで本研究では、ブランド和牛肉と非ブランド和牛肉のメタボローム解析結果を比較することにより、ブランド和牛肉に特有な牛肉中成分を同

定することを目的とした。

2. 方法

2.1 サンプル

黒毛和種の、和牛肉Aブランド (A区; n = 4), 和牛肉Bブランド (B区; n = 4), 非ブランド和牛肉 (C区; n = 4) の、サーロイン部位サンプルを用いた。ブランド和牛肉のサンプルは、食肉販売店で購入したものをを用いた。非ブランド牛の和牛肉サンプルは、農研機構那須塩原事業所で生産されたものをを用いた。サンプルは分析時までディープフリーザーで冷凍保存し、以下の解析に用いた。

2.2 メタボローム解析

メタボローム解析は、既報に基づき実施した^{5,6)}。牛肉サンプルは、液体窒素下でパウダー状に粉碎し、粉碎サンプル100mgにメタノールを添加してジルコニアビーズを用いたホモジナイズおよび超音波処理を実施後、遠心分離を行い上清を回収した。上清はMonoSpin C18カラム (GL Science Cat.5010-21701) を用いて精製処理を行った。カラム透過画分は窒素ガス吹付下で濃縮乾固処理を実施後、メトキシム化処理ならびにトリメチルシリル化誘導化処理を行った。これら誘導化サンプルを用い、GC-MS (QP2010Ultra, 島津製作所) にて網羅的解析を実施した ((公財) かずさDNA研究所)。データ解析には、GC/MSsolution (島津製作所) および GC/MS Metabolite Database Ver. 2 (島津製作所) を用いた。

3. 結果と考察

和牛肉Aブランド (A区), 和牛肉Bブランド (B区), 非ブランド和牛肉 (C区) のGC-MS解析を行った結果、各区においてそれぞれ約80の代謝物質が検出された。検出された代謝物質すべて

の情報を解析対象として主成分分析を実施した結果、A, B, Cの3区がそれぞれ分かれてプロットされ、区ごとに特徴的な代謝物質が存在することが明らかとなった (Fig. 1)。PC1軸では正方向にC区が、負方向にA区がまとまってプロットされたことから、PC1はA区とC区の違いを表していると考えられた。またPC2軸方向では、正方向にB区が、負方向にA区がまとまってプロットされたことから、PC2はA区とB区の違いを表していると考えられた。これらの結果から、PC1軸の因子負荷量上位の代謝物質は主にA区とC区の違いを示す代謝物質であり、PC2軸の因子負荷量上位の代謝物質は主にA区とB区の違いを示す代謝物質であると考えられた。A区に特徴的な代謝物質は主にTCA回路関連代謝物質、B区に特徴的な代謝物質は主に核酸代謝関連物質、C区に特徴的な代謝物質は主にアミノ酸と糖類によって構成されていた。

Fig. 2に、階層的クラスタリング解析 (HCA) で得られたヒートマップを示した。A区に特徴的な代謝物質で構成されているクラスターには、TCA回路関連代謝物質であるfumaric acidとmalic acidが含まれていた。B区に特徴的な代謝物質で構成されているクラスターには、TCA回路関連代謝物質であるcitric acidと核酸代謝関連物質であるuric acidが含まれていた。C区に特徴的な代謝物質で構成されているクラスターには、アミノ酸であるアラニンおよびプロリンと、糖類であるmaltoseおよびxylitolが含まれていた。

これら各区に特徴的であると考えられる牛肉中代謝物質を比較した結果、A区ではfumaric acidとmalic acidが他区より高い結果となった。またB区ではcitric acidとuric acidが他区より高い結果であった。またC区ではalanine, prolineとxylitolが他区より高く、maltoseも他区より高い傾向が認められた (Fig. 3)。したがって各区に

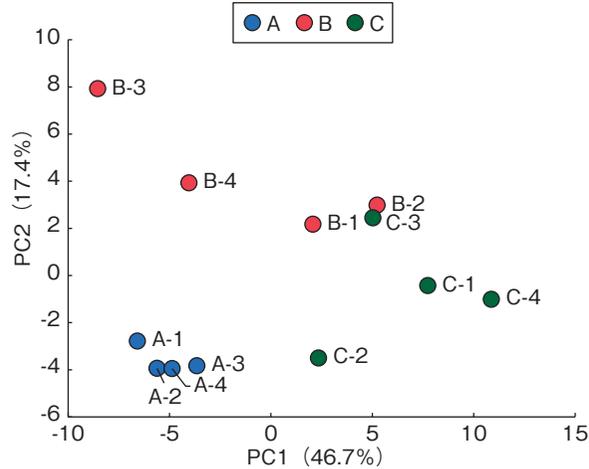


Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of metabolites in sirloin sample among branded (A, B) and non-branded (C) Wagyu beef. A1-A4 : group A (n = 4), B1-B4 : group B (n = 4), C1-C4 : group C (n = 4).

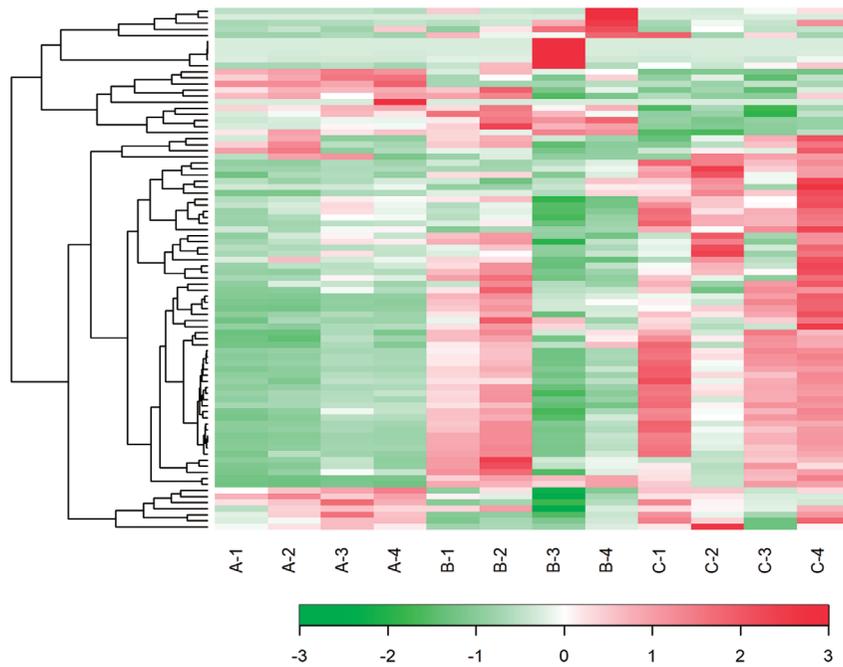


Fig. 2 Heatmap of metabolites in sirloin sample among branded (A, B) and non-branded (C) Wagyu beef. A1-A4 : group A (n = 4), B1-B4 : group B (n = 4), C1-C4 : group C (n = 4).

において特徴的な牛肉中成分は、A区はTCA回路関連代謝物質、B区は核酸代謝関連物質、C区はアミノ酸と糖類であることが明らかとなった。本

研究の結果から、メタボローム解析によってそれぞれの和牛肉を特徴付ける成分の同定が可能であることが示された。今回、A区とB区の和牛肉に

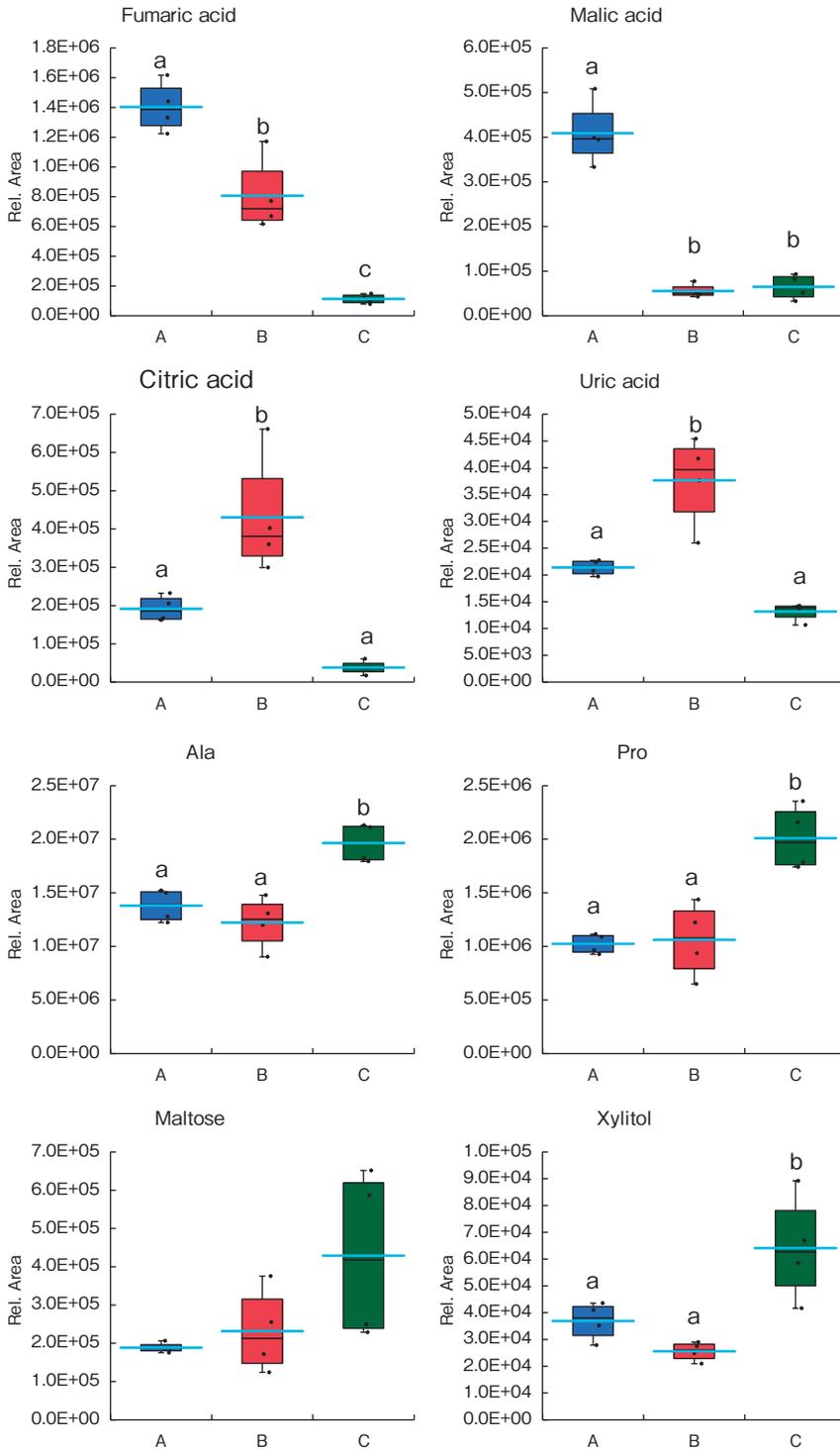


Fig. 3 Relative quantity of metabolites in sirloin sample among branded (A, B) and non-branded (C) Wagyu beef. The middle line in the box plot represents the median, the dotted line indicates the mean value, and the vertical bars indicate the range of data.
a, b, c : Values with different superscripts are significantly different ($p < 0.05$).

において特徴的な成分であったfumaric acid, malic acid, citric acidは主に酸味に関連する成分であった。一方、C区の和牛肉において特徴的な成分であったalanine, proline, maltose, xylitolは甘みに関連する成分であった。したがって、和牛肉中の呈味成分が区によって異なっていることは、それぞれの和牛肉の味の違いに関連している可能性が推察された。

本研究によって、牛肉中成分のプロファイルが和牛肉の間で異なっていることが示された。これらの結果から、和牛肉ブランド間の差別化を明確にしていくうえで、それぞれの牛肉中に特徴的な成分が有効な指標となり得る可能性が示された。牛肉中の成分は、給与飼料条件や肉の熟成過程で変動することから、今後は牛肉中の特徴的な成分を増加させるような飼養管理技術や牛肉熟成方法の開発につなげていくことが重要であると考えられた。

4. 要 約

和牛肉を特徴付ける牛肉中成分を明らかにするため、ブランド和牛肉 (A区, B区) ならびに非ブランド和牛肉 (C区) を用いてGC-MSによるメタボローム解析を行った。検出された代謝物質に対し主成分分析を実施した結果、A, B, Cの

3区がそれぞれ分かれてプロットされ、区ごとに特徴的な代謝物質が存在することが示された。A区に特徴的な代謝物質には、TCA回路関連代謝物質であるfumaric acidとmalic acidが含まれていた。B区に特徴的な代謝物質には、TCA回路関連代謝物質であるcitric acidと核酸代謝関連物質であるuric acidが含まれていた。C区に特徴的な代謝物質には、アミノ酸であるalanineおよびprolineと、糖類であるmaltoseおよびxylitolが含まれていた。以上の結果から、メタボローム解析を行うことによって、それぞれの和牛肉を特徴付ける牛肉中成分を同定することが可能であることが示された。

文 献

- 1) Muroya, S., Oe, M., Ojima, K., Watanabe, A. : *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* **32**, 1172~1185, 2019.
- 2) Ueda, S., Iwamoto, E., Shinohara, M., Shirai, Y., Yamanoue, M. : *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **83**, 137~147, 2019.
- 3) Muroya, S., Ueda, S., Komatsu, T., Miyakawa, T., Ertbjerg, P. : *Metabolites*, **10**, 188, 2020.
- 4) Ueda, S., Yamanoue, M., Sirai, Y., Iwamoto, E. : *Metabolites*, **11**, 56, 2021.
- 5) Yamada, T., Kamiya, M., Higuchi, M. : *Metabolites*, **10**, 95, 2020.
- 6) 山田知哉：平成31年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **38**, 78~81, 2020.

微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した 食肉加工技術の開発（Ⅱ）

Developments in technology for meat processing by fungal aspartic
protease（Ⅱ）

竹 中 慎 治

（神戸大学大学院農学研究科）

Shinji Takenaka

（Graduate School of Agricultural Science, Kobe University）

During postmortem aging and meat processing, endogenous proteolytic degradation of muscle fibers into oligopeptides and release of nucleotides and free amino acids etc. lead to increase meat flavor. In addition, treatment by commercially obtained hydrolytic enzymes is one of efficient methods to improve meat flavor and its texture with reducing conditioning- and processing periods. In the food industry, several proteases such as papain, bromelain, and calpain are widely used for proteolytic hydrolysis, to improve meat tenderness. Aspartic protease from *Aspergillus repens* shows hydrolytic activity not only toward heme proteins and casein but also matrix proteins, elastin and collagen. Our aim is to apply the ability of limitedly hydrolysis of meat proteins by the aspartic protease for meat processing. Hydrolytic profiles toward myofibrillar, myogenic, and extracellular matrix proteins using the recombinant aspartic protease (rPepA) and plant proteases, papain and bromelain were examined. The hydrolysates from several proteins such as commercially obtained collagen and elastin and self-prepared myofibrillar proteins were subjected to SDS-PAGE and tricine SDS-PAGE analyses. The hydrolysates by plant proteases contained much more small molecular peptides than that by rPepA. The hydrolysates by rPepA contained limitedly hydrolyzed polypeptides. LC-MSMS mascot analysis indicated that the peptides were derived from collagen proteins. In further study, the potential of rPepA will be revealed, based on the hydrolytic properties of actomyosin and beef meat.

1. 目 的

香味や食感に優れた食肉やハム、ソーセージ、ベーコン等の食肉加工品を得るためには、低温熟成を一定期間行うことが好ましいとされ、うま味・こく味を増大させるために1週間から1か月以上も熟成させる。長期熟成の目的は、自己のプ

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

食肉やその加工品のおいしさを決める重要な要

因として「肉の柔らかさ」, 「くちどけ」, 「うま味」があげられる。肉はおいしさだけでなく, 咀嚼しやすいやわらかさも消化効率や栄養摂取の面で重要である。特に, 高齢化が進む先進諸国では肉質の改善のためにプロテアーゼが検討されている。例えば, 植物由来のパパイン, プロメライン, アクチニジンやコラーゲンを加水分解する微生物由来コラゲナーゼ等があげられる¹⁻³⁾。一方, うま味の因子のひとつである遊離アミノ酸含量の増大のために, 微生物由来ペプチダーゼも検討されている⁴⁾。近年, 肉を「塩麴」に漬け込むことで「うま味やこく味を増しつつ, 中までしっとりとした深い味わい」を引き出す調理法が注目されており⁵⁾, 食肉やその加工品の高付加価値化はこれからますます重要視されると思われる。

申請者オリジナルの好乾性糸状菌由来アスパルティックプロテアーゼは, ヘムタンパク質を限定分解する⁶⁾。同プロテアーゼとミオグロビンの加水分解によって生じるペプチドの配列を解析した結果, 同酵素がミオグロビンに含まれるヘムの近傍の3か所を加水分解できることから, ヘムの遊離によるミオグロビンの脱色が引き起こされると考えられる⁷⁾。また, 筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解を調べ, エラスチン/カゼインに対する加水分解活性の相対値を算出すると, 同プロテアーゼはパパインやプロメラインと同じく結合組織タンパク質に対する活性は低かった⁷⁾。よって, 同アスパルティックプロテアーゼは, 肉由来のタンパク質を過剰に加水分解することなく, 「肉の柔らかさ」と「うま味」両方をほどよく改善できると期待される。そこで, 本研究では, 既存の食肉加工用酵素として知られているパパインやプロメラインとともに同アスパルティックプロテアーゼについて筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解特性を比較し, その潜在能力を明らかにすることを目的とす

る。

2. 方法

2.1 材料

分解活性試験で使用した基質は, 筋原線維タンパク質以外はSigma Aldrichから購入した。また, 筋原線維タンパク質は, オーストラリア産牛もも肉から調製した。アスパルティックプロテアーゼは, 以下に示す既報の方法に従って調製した⁸⁾。パパインおよびプロメラインは富士フィルム和光純薬株式会社から購入した。

2.2 組換えアスパルティックプロテアーゼの調製

A. repens MK88由来組換えアスパルティックプロテアーゼ (rPepA) は, *Pichia pastoris*-pPICZaA-PepA⁸⁾ をBMMY培地 (100ml/500ml 坂口コルベン) にて0.5% (v/v) となるようにメタノールを添加しながら9日間培養し, 遠心上清を回収した。つづいて, 上清にアセトンを添加し, 沈殿として回収して得られた酵素を20mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) に対して透析することで成熟rPepA (200から250U) を得た。

2.3 筋原線維タンパク質の調製

牛もも肉のミンチ (5 g) に対し, 6倍量のTEK溶液 (0.1M KCl/1 mM EDTA/10 mM Tris-HCl (pH 7.0)) を加え, ホモジナイズ (10,000 rpm, 1 min) (エースホモジナイザーAM-5, 日本精機製作所) した。遠心分離 (600×g, 10 min) 後, 6倍量のTEK溶液で懸濁・再度ホモジナイズし, 遠心して沈殿物を得た。メッシュフィルターで結合組織を除去し, 遠心後の沈殿をTEK溶液で穏やかに懸濁した。Myosin heavy chainおよびactinを主要なタンパク質として含む筋原線維画分を, TEK溶液での懸濁と遠心による上清の廃棄を繰り返して, 均質化した。

2.4 筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質の加水分解と遊離ペプチドの定量

1.0% (w/v) 基質タンパク質-50 mMリン酸ナトリウム-乳酸緩衝液 (pH 5.0) 3.6 mlに対して0.22% (w/v) プロテアーゼ溶液 (精製rPepA, パパインもしくはプロメライン) を添加し, 30℃で1時間反応を行った。基質は, ミオグロビン, ヘモグロビン, コラーゲン, エラスチンおよび筋原線維タンパク質である。遠心分離 (18,000×g, 10 min, 4℃) 後, 上清をSDS-PAGEおよびTricine SDS-PAGEに供した。また, 上清を遠心濾過膜 (Amicon Ultra-30 kDa) にて通過液を回収し, ペプチド量を定量するとともに, 逆相クロマトグラフィーに供した。ペプチド量は, GlyGlyGly換算とした。

2.5 タンパク質分解酵素を用いた牛肉の処理
牛もも肉を繊維方向に平行に切り出した肉片 (10 (縦) × 2 (横) × 0.5 (厚さ) cm) および0.22% (w/v) プロテアーゼ溶液 1 mlをチャック付きポリ袋入れ, 15℃で24時間放置後, 溶液を回収した。遊離したペプチド/タンパク質をSDS-PAGEに供した。プロテアーゼ溶液の代わりに50 mMリン酸ナトリウム-乳酸緩衝液 (pH 5.0) を添加した反応系を対照とした。

2.6 遊離ペプチドの解析

電気泳動は, ATTO社製の既製ゲル (P-T16.5S およびE-12.5% L) および泳動用緩衝液 (AE-1415 EzRunT およびAE-1410 EzRun) を用い, 同社提供のマニュアルに従って行った。メインバンドについては, LC-MS/MS-Mascot解析に供し, *Bos taurus*由来ゲノムデータ (WSG project, NKLS02) およびUniProtKB/Swiss-Protデータを参考にタンパク質同定を行った。また, 逆相クロマトグラフィーの条件は以下である。

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

・溶離液 : Solvent A : 5 mM TFAおよびSolvent B : 5 mM TFA-アセトニトリル (4 : 6, v/v)

・溶出 : Sol. A-Sol. B (100 : 0, v/v) → (75 min) → Sol. A-Sol. B (0 : 100, v/v)

・流速 : 0.5 ml/min, ・検出 : UV 280 nm

3. 結果と考察

3.1 筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質の加水分解

rPepAは, ミオグロビンやヘモグロビンを限定分解する⁸⁾。対照酵素とともに遊離ペプチド量を比較すると (Table 1), ミオグロビンやヘモグロビンの加水分解時は, rPepAとプロメライン処理サンプルにおいて遊離量が同程度であったが, コラーゲンやエラスチンといった繊維状タンパク質に対しては相違が見られた。SDS-PAGEでのバンドパターンを比較すると (Fig. 1), rPepAを添加した反応系では, 限定・部分分解によると考えられる高分子のバンド (Collagen, Elastin, Myofibrils, いずれも lane a) が多く見られた。これらのバンドについてタンパク質同定を行った (Table 2)。エラスチン分解物からは構成タンパク質断片を検出できなかったが, Collagen加水分解サンプルからはCollagen α -1 (I), Collagen α -2 (I), Collagen α -1 (III) が部分分解された (ポリ) ペプチド断片を見出すことができた。植物由来プロテアーゼ類を用いた筋原線維タンパク質画分 (beef topside由来) の加水分解特性が調べられており⁹⁾, 加水分解物の電気泳動パターンからパパインやプロメラインはコラーゲン類やミオシンやアクチンといった筋タンパク質類を分解する⁹⁾。本研究とは基質画分の調製法や加水分解反応条件が異なるが, パパインやプロメラインは筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に幅広く作用したのに対し (Fig. 1, 2), rPepAはこれ

Table 1 Hydrolysis of various natural proteins derived from beef meat.

Protease	Concentration of released peptides (mM)				
	Myoglobin	Hemoglobin	Collagen	Elastin	Myofibrils
rPepA	0.60 ± 0.035	0.28 ± 0.029	0.027 ± 0.002	0.049 ± 0.004	0.20 ± 0.007
Bromelain	0.60 ± 0.078	0.31 ± 0.022	0.068 ± 0.004	0.23 ± 0.012	0.63 ± 0.030
Papain	0.34 ± 0.047	0.21 ± 0.006	0.036 ± 0.002	0.084 ± 0.003	0.35 ± 0.021

Released peptide concentration was measured using ninhydrin method. Standard curve was created using glycylglycylglycine.

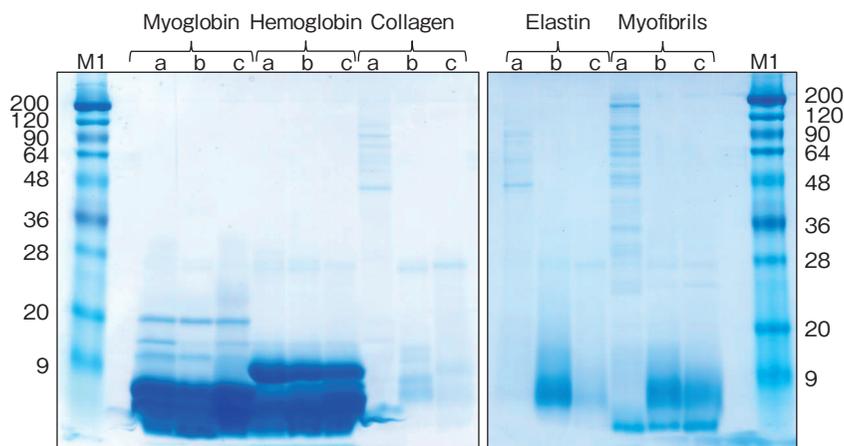


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of hydrolysates from myoglobin, hemoglobin, collagen, elastin, and myofibrils by rPepA (lane a), papain (lane b), and bromelain (lane c).

Table 2 Identified released polypeptides from various natural proteins via hydrolysis by rPepA.

Substrate	Identified protein and its region
Collagen	Collagen α -1 (I) (SwissProt no. CO1A1_BOVIN) ²⁶⁸ Gly- ²⁷⁶ Lys, ³⁵² Gly- ³⁶⁹ Arg, ⁵⁵⁷ Gly- ⁶³⁰ Arg, ⁷⁵¹ Gly- ⁷⁶² Arg, ⁷⁸¹ Gly- ⁷⁹⁵ Arg, ⁹⁸⁴ Asn- ⁹⁹³ Arg, ¹⁰⁶² Ser- ¹⁰⁹² Arg
	Collagen α -2 (I) (CO1A2_BOVIN) ¹⁵⁵ Gly- ¹⁶³ Arg, ⁴¹¹ Ala- ⁴³⁰ Arg, ⁵⁸⁷ Gly- ⁶⁰⁸ Arg, ⁶⁹² Gly- ⁷⁰⁶ Arg, ⁸⁰⁴ Glu- ⁸²⁹ Arg, ⁹⁷³ His- ⁹⁹⁴ Arg, ¹⁰⁶⁶ Ile- ¹⁰⁷⁹ Arg
	Collagen α -1 (III) (CO3A1_BOVIN) ⁴⁴¹ Gly- ⁴⁵⁴ Lys
Elastin	N.D.
Myofibrillar protein	Albumin (ALBU_BOVIN) ³⁵ Phe- ⁴⁴ Lys, ⁶⁶ Leu- ¹⁰⁰ Lys, ¹⁹⁸ Gly- ²⁰⁴ Lys, ²⁸⁶ Tyr- ²⁹⁸ Lys, ³⁴⁷ Asp- ³⁵⁹ Arg, ⁴⁰¹ His- ⁴¹² Lys, ⁴²¹ Leu- ⁴⁵¹ Arg, ⁴⁶⁹ Met- ⁴⁸² Arg, ⁵⁶⁹ Thr- ⁵⁹⁸ Lys

らのタンパク質に対する作用は限定的であり、食肉加工に同rPepAを用いた際、過剰な分解や肉組織が脆くなるといった可能性は低いことが裏付けられた。Haらの牛由来タンパク質調製条件では⁹⁾、Collagen tyepI α -1, chain A, chain B,

γ 等のコラーゲン画分やMyosin heavy chains, actin, tropomyosin, troponin等約18種からなるmeat myofibril画分が得られることから、これらの画分を用いれば、rPepAにおけるmyofibrilタンパク質の分解特性をより詳細に解析できると考え

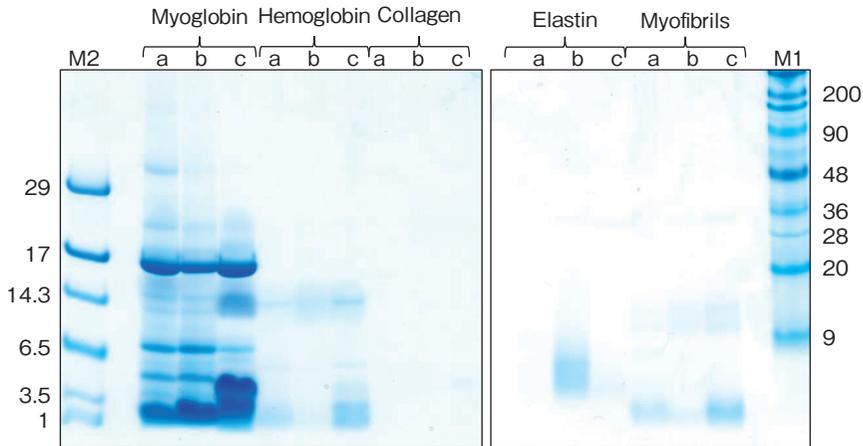


Fig. 2 Tricine SDS-PAGE analysis of small peptide fraction from myoglobin, hemoglobin, collagen, elastin, and myofibrils by rPepA (lane a), papain (lane b), and bromelain (lane c).

られる。

3.2 加水分解によって生じるペプチド類の解析

3.1で調べたサンプルについてフィルター過を行うことで分子質量30 kDa以下のペプチド/タンパク質を回収した。Tricine SDS-PAGEでのバンドパターンを比較するとともに (Fig. 2), rPepAによる加水分解で生じたペプチドについて逆相クロマトグラフィーに供した (Fig. 3)。SDS-PAGE (低分子量領域) と Tricine SDS-PAGEのバンドパターンにおいて相違が見られるのは、フィルター過によるものと考えられる。HPLCクロマトグラムから (Fig. 3), 前報⁷⁾で述べたようにミオグロビン由来加水分解物からは、類似したリテンションタイムにピークが多数観察された。また、サンプル量と感度の関係でN末端アミノ酸配列決定ができなかったが、筋原線維画分加水分解物からは、特徴あるピークが観察された。

3.3 牛もも肉の酵素処理によって生じるペプチド/タンパク質の解析

可溶性タンパク質のバンドパターンから分解度を比較すると、rPepAを添加した反応系 (Fig. 4,

lane a) と対照 (Fig. 4, lane c) とは29 kDa以上のタンパク質バンドが消失しつつあることが確認された。また、パパイイン添加系では低分子領域 (3.5~29 kDa) にスメア状の染色が見られ、ブロメライン添加系では、高分子のタンパク質バンドが減少し、さらに低分子領域 (3.5から6.5 kDa) にスメア上の染色が見られた (Fig. 4, lane b&c)。肉の軟化処理を *Aspergillus* 由来アスパルテックプロテアーゼ (研究対象肉, 牛もも肉, 肩ばら肉)¹⁰⁾ や *Rhizomucor miehei* 由来アスパルテックプロテアーゼ (豚肉)¹¹⁾ とパパイインで行って比較し、処理肉の剪断力 (N) は同程度になると報告されている。しかし、プロテアーゼが筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質いずれに対して働くかの詳細は明らかではない。食肉の硬さは、筋原線維タンパク質 (主にアクトミオシン) と結合組織 (コラーゲン) に起因する。rPepAは、コラーゲンやエラスチンといった繊維状タンパク質をおおまかに部分分解 (限定分解) しており (Fig. 1, 2), 今後、アクトミオシンに対する分解特性や酵素処理した肉の剪断強度等の関連性を明らかにすることで、rPepAが食肉軟化剤としての有用性を訴求できる知見が得られると

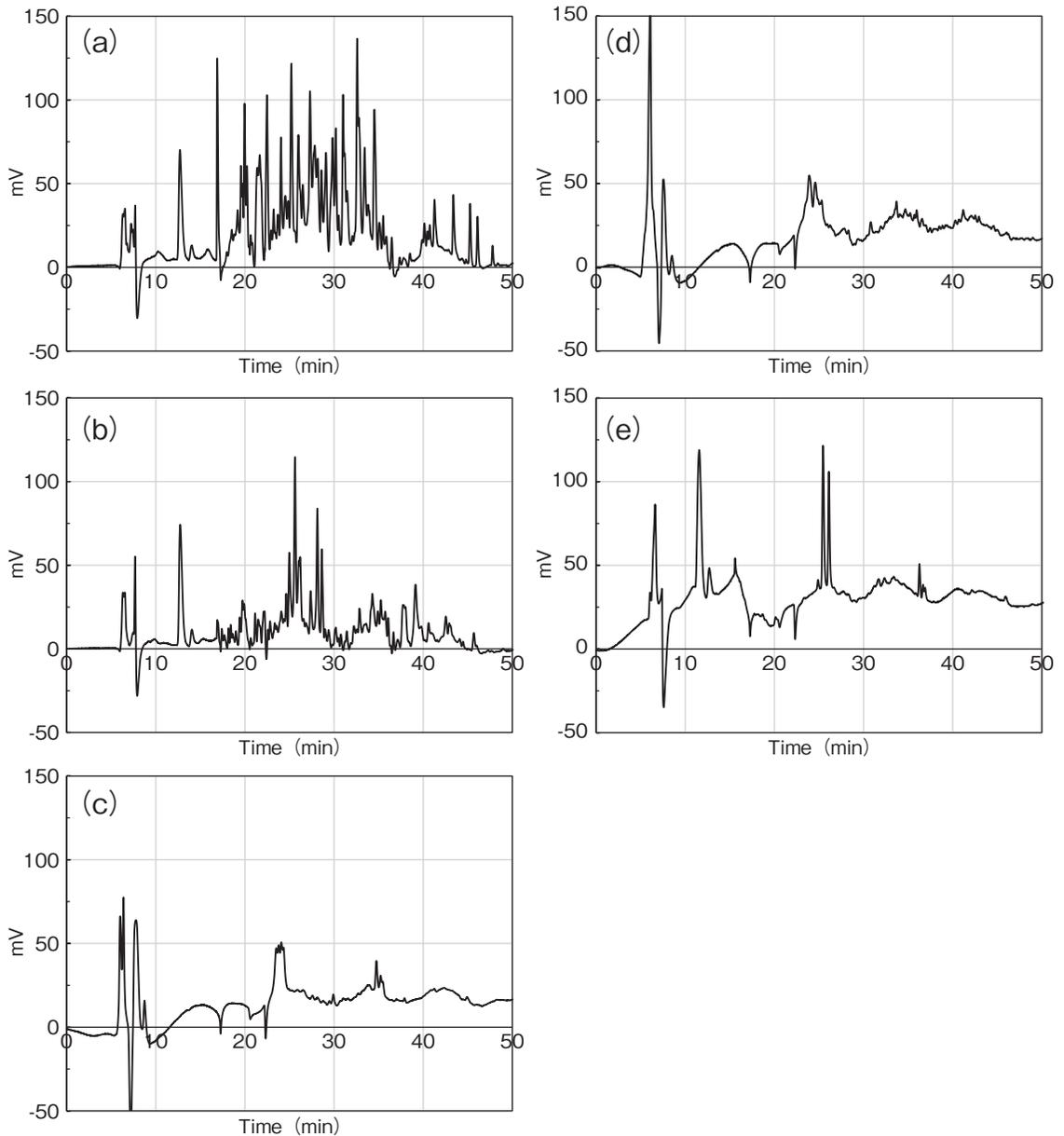


Fig. 3 HPLC analysis of small peptide fraction from myoglobin (a), hemoglobin (b), collagen (c), elastin (d), and myofibrils (e) by rPepA.

考えている。

4. 要 約

香味や食感に優れた食肉やハム、ソーセージ、ベーコン等の食肉加工品を効率よく製造するためには、「肉の柔らかさ」、「くちどけ」、「うま味」

といったおいしさを決める要因を向上しながら熟成期間を短縮化することが重要である。肉質改善法の1つとして酵素処理法があげられる。申請者オリジナルのアスパルティックプロテアーゼ (PepA) は、ミオグロビンに対して限定分解を示す。本研究では、植物系プロテアーゼと比較しな

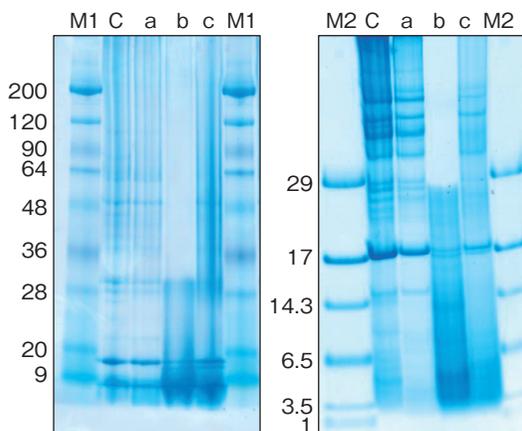


Fig. 4 The ability of rPep A (a), papain (b), and bromelain (c) to hydrolyze meat with analysis by SDS-PAGE. #lanes : C, control (without protease treatment) ; a, rPep A treatment; b, papain treatment ; c, bromelain treatment.

がら、同PepAについて筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質および牛もも肉に対する分解活性を調べ、食肉加工への潜在能力を明らかにすることを目的とした。加水分解物の電気泳動パターンから、植物系プロテアーゼが筋原線維タンパク質や結合組織タンパク質を低分子量ペプチドまで非限定的に分解するのに対し、PepAは前報で考察したようにこれらのタンパク質を限定分解していた。遊離した限定分解物について配列同定を行った結果、確かに、コラーゲンタンパク質の分解物であることが分かった。また、牛もも肉からの分解物の解析からもPepAによる分解は予想どおり限定的であることが分かった。今後、アクトミオシンや酵素処理した食肉の剪断力・テクスチャーを比較することで、食肉加工・熟成工程における熟成の短縮化、呈味性や食感の向上への寄与を明らかにできると考えられる。

文 献

- 1) 味の素株式会社, 特開平05-007476
- 2) 昭和産業株式会社, 特開平05-252911
- 3) エーザイ株式会社, 特開平06-169729
- 4) Flores, M., Toldrá, F. : *Trends in Food Science & Technology*, **22**, 81~90, 2011.
- 5) 阿部真紀, 秋田修: 塩麴に含まれる麴由来酵素および食塩の食肉調理への効果, 日本醸造協会誌, **114**, 258~267, 2019.
- 6) Aoki, K., Matsubara, S., Umeda, M., Tachibanac, S., Doi, M., Takenaka, S. : *J. Sci. Food Agric.*, **93**, 1349~1355, 2013.
- 7) 竹中慎治: 微生物由来アスパルテックプロテアーゼを利用した食肉加工技術の開発, 平成31年度(令和元年度)食肉に関する助成研究報告書, **38**, 9~14, 2020.
- 8) Takenaka, S., Umeda, M., Senba, H., Koyama, D., Tanaka, K., Yoshida, K., Doi, M. : *J. Sci. Food Agric.*, **97**, 95~101, 2016.
- 9) Ha, M., Bekhit, A. E. D. A., Carne, A., Hoplins, D. L. : *Food Chem.*, **134**, 95~105, 2012.
- 10) Ashie, I. N. A., Sorensen, T. L., Nielsen, P. M. : *J. Food Sci.*, **67**, 2138~2142, 2002.
- 11) Sun, Q., Chen, F., Geng, F., Luo, Y., Gong, S., Jiang, Z. : *Food Chem.*, **245**, 570~577, 2018.

牛枝肉のモモ抜きの非破壊検査用磁気共鳴スキャナーの開発

Development of a magnetic resonance scanner for the nondestructive quantification of fat contents of the beef round in a carcass

中 島 善 人¹・柴 伸 弥²

(¹国立研究開発法人産業技術総合研究所地質調査総合センター,

²国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター)

Yoshito Nakashima¹ and Nobuya Shiba²

(¹National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Geological Survey of Japan,

²National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tohoku Agricultural Research Center)

The fat content of beef meat significantly affects consumers' sense of taste and determines price. Thus, it is desirable to nondestructively and noninvasively measure the fat content of a beef round, a large portion of a carcass, using hand-held sensors at meat processing plants to accurately assess the value and price of the carcass. For this in-situ fat quantification of beef round in a carcass, the applicability of a single-sided nuclear magnetic resonance (NMR or MR) scanner is examined. The MR scanner enables us to measure fat contents nondestructively and noninvasively by analyzing the time-series proton relaxation data derived from the fat molecules. An original planar radio-frequency coil (1.3 kg) was developed, and combined with a single-sided Nd-Fe-B permanent magnet (3.7 kg) to be used as a sensor unit of 5 kg. The specification of the MR scanner is as follows. The sensed region is located at 4 to 15 mm (width, 15 - 4 = 11 mm) distant from the surface of the scanner, which is sufficient to probe the meat section beneath the underlying subcutaneous fat layer of 4 mm in thickness. The three-dimensional size of the sensed region is 14 x 15 x 11 mm³. The MR scanner was successfully applied in a laboratory to 26 packed beef meat samples to measure the fat content. The required measurement time was 36 s for each sample. The results of MR scanning were compared with those of conventional destructive food analysis (i.e. Soxhlet extraction method). Reasonable agreement with an error (root-mean-square residual) of as small as 4.8 wt% was obtained for fat quantification. This reasonable agreement demonstrates that the portable MR scanner with a hand-held sensor unit developed is a promising tool for the in-situ nondestructive and noninvasive fat quantification of beef round in a carcass.

1. 目 的

牛肉の脂肪交雑すなわち脂肪含有量は、食味ひいては価格を左右する重要な特性である。現行の

脂肪交雑判定は、枝肉の第6-7肋骨間の切開面のみで実施されている。このため、産肉量の多いモモなど他の部位の脂肪交雑度が正しく評価されていないという問題がある。枝肉のモモ抜け（モ

モ肉に脂肪交雑が伸びているかどうか)を定量的に評価できる非破壊・非侵襲計測技術があれば、枝肉全体の脂肪交雑をより高い信頼度で評価できることになり、枝肉評価の進展に大きく貢献できる。

脂肪分子中のプロトンを計測対象にした核磁気共鳴計測法 (Nuclear Magnetic Resonance, NMR.あるいは略してMagnetic Resonance, MR)は、静磁場のもとで歳差運動をする軽水素の原子核(プロトン)の挙動を共鳴周波数に該当するラジオ波で検出する手法であり、脂肪定量計測の国際純正・応用化学連合(IUPAC)公定法として有用性が広く確認されている。この計測法をさらに改良して、片側開放型¹⁻⁵⁾とよばれる特殊な構造の磁気回路と高周波コイルをセンサーユニットとして採用すれば、計測対象をカットしてサンプル管に挿入する必要はない。枝肉のような大きな物体表面に磁気共鳴センサーを聴診器のように当てるだけで、物体表面から数mm~数cm深部の部位の脂肪含有量を非破壊・非侵襲で定量できる。

そこで、本研究では高周波コイルを新規に製作したうえで、牛肉サンプルの脂肪含有量を片側開放型磁気共鳴スキャナー(MRスキャナー)で実測し、モモ抜け評価への適用可能性を評価する研究を行った。スキャナー開発の具体的な数値目標は以下のとおり。(i)センサーの感度領域の大きさは信号・ノイズ比を改善するためにできるだけ大きく、具体的には $12 \times 12 \times 4 \text{ mm}^3$ 以上の直方体であること。そして、感度領域の位置はコイル表面から4mm以上遠であること。つまり、モモの部位にセンサーを当てた状態で、厚さ最大4mmの皮下脂肪より奥の部位の筋肉組織中の脂肪を定量できること。(ii)センサーユニット(永久磁石と高周波コイル)は、手で持てる重さ(5kg程度)であること。(iii)計測所要時間は短いほど実用的であるが、目安として肉の1部位の計

測所要時間は40秒以内とする(手で持てる小型センサーユニットの開発に関する直近の論文⁴⁾では100秒なので、それを上回るスペックに設定した)。

2. 方法

高周波コイルは当該研究予算で購入した備品であるが、その設計・製作・評価は、以下の手順で実施した。希土類永久磁石が周囲の空間に作り出している3次元磁場分布データをもとに、コイルの感度領域(静磁場と高周波磁場ができるだけ均一な領域)が上記の目標(i)をクリアできるようにコイルの形状や大きさを設計した。コイルの基本デザインは、先行研究⁴⁾の「D型」の平面コイルを向かい合わせた「ダブルD型」といわれる平面型(Fig. 1)にした。完成したコイルの感度領域のサイズや探査深度を確認するために、厚さ1~2mmの薄いシリコンゴムをコイル上に順次積み重ねていき、MR信号強度の増加挙動を計測する実験³⁻⁵⁾を行った(この手法では、規格化したシリコンゴム層の信号強度が10%~90%に対応するゾーンを感度領域と定義している)。

完成したコイルを永久磁石に取り付けて、BNCケーブル経由でMRコンソール(MR分光計本体)に接続して計測システムとした。牛肉サンプルについては、農研機構の研究分担者が提供したモモ肉サンプル(真空パック状態)13個のプロトンMR緩和波形データを取得した(Fig. 2)。ほかにもつくば市内の小売店で購入した国内外の牛肉サンプル13個、合計26個を計測した。計測時のサンプル温度は約30℃であった。

具体的なMR計測・データ解析作業は先行文献²⁻⁴⁾に準じて実施したが、概略は以下のとおり。パルスシーケンスはCarr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)法を採用し、そのエコー間隔は0.5ms、高周波パルス幅は0.06ms、ラーモア周波数は4.5MHz、シーケンス繰り返し間隔は2秒、積

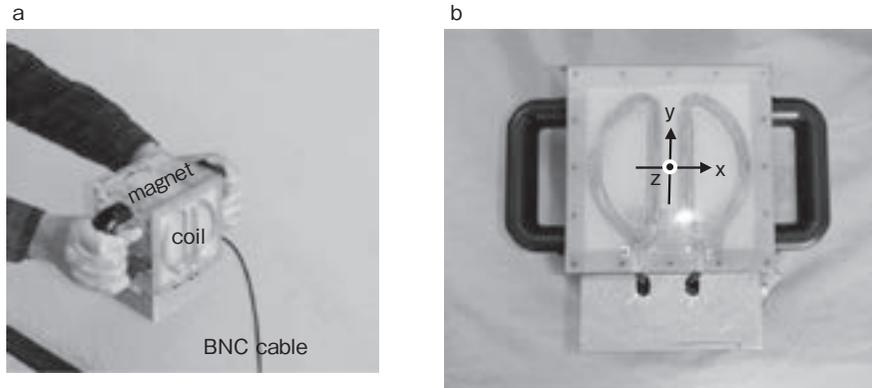


Fig. 1 Photo of the sensor unit (permanent magnet and radio-frequency coil) used in this study. (a) Hand-held shot. (b) Front view. While the z axis is normal to the coil, the x and y axes are parallel to the plane coil.

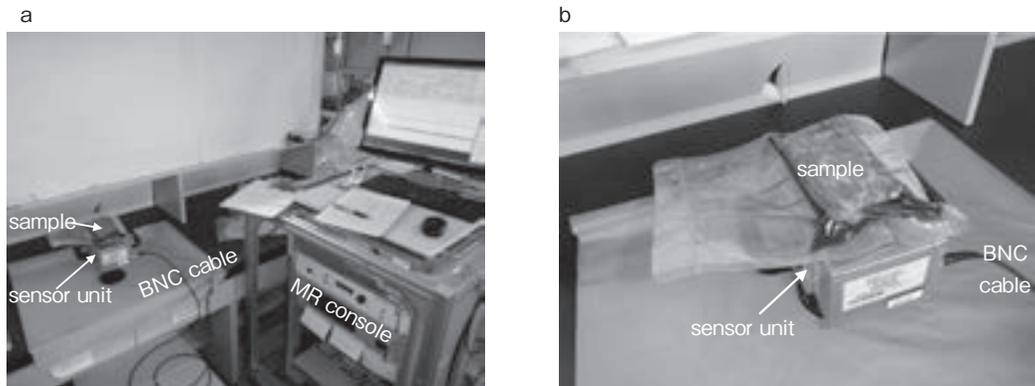


Fig. 2 Photo of an experiment using the single-sided MR scanner system. A packed meat sample is being measured on the sensor unit. (a) Long shot. (b) Magnification of (a).

算回数は18回とした（したがって、1部位の計測所要時間は $2 \times 18 = 36$ 秒となり、40秒以内という目標をクリアしている）。MR計測が終われば、感度領域をカバーする肉の部位を切り取り（切り取ったサイズは約 $4 \times 4 \times 2 \text{ cm}^3$ ）、ソックスレー抽出法による通常の商品分析を行った。

得られた牛肉のプロトンMR緩和波形データ $f(t)$ には脂肪分子由来のMR緩和信号（時定数94 msで減衰）と筋肉中の水分子由来のMR緩和信号（時定数43 msで減衰）が混在しているので分離する必要がある。その分離作業は、先行文献⁴⁾に準じて以下のように実施した（ t はms単位の時

間）。

$$f(t) = A_{\text{fat}} \exp(-t/94) + A_{\text{lean}} \exp(-t/43) \quad (1)$$

ただし、式(1)において A_{fat} と A_{lean} は、それぞれ脂肪分子と赤身中の水分子のプロトンのCPMG信号への寄与度であり、最小自乗法で決定する。そののちに、上記のソックスレー抽出法による脂肪含有量の分析結果と A_{fat} との関係を式(2)でモデル化して検量線とした⁴⁾。

$$A_{\text{fat}} = \frac{(1.06B_{\text{fat}} w_{\text{fat}})}{(92 + 0.14w_{\text{fat}})} \quad (2)$$

ただし、式(2)において、 w_{fat} はソックスレー抽出法による脂肪含有量のwt%値、 B_{fat} は最小自乗法で決定されるパラメタである。最後のステップとして、決定した B_{fat} 値をもちいて式(2)に基づいて A_{fat} をMR法による脂肪含有量の推定値に換算し、ソックスレー抽出法による結果と比較した。

3. 結果と考察

製作した高周波コイルを搭載したセンサーユニットをFig. 1に示す。図中のBNCケーブルを除いた高周波コイルの重量は1.3 kgであった。希土類永久磁石重量が3.7 kgなので、センサーユニット全体では1.3 + 3.7 = 5.0 kgとなり目標(5 kg程度)を達成している。また、シリコンゴムを用いた感度分布計測実験結果によれば、感度領域はコイル表面から4~15 mm離れた空間にあり(したがって、その幅は15 - 4 = 11 mm)、3次元的な感度領域のサイズはFig. 1bの座標系でいえば x, y, z 軸方向にそれぞれ14 x 15 x 11 mm³であった。これらの数値も目標(12 x 12 x 4 mm³以上)をクリアしている。

Fig. 2の計測システムで計測した肉サンプル内部構造の例をX線CT画像としてFig. 3に示す。そのサンプルは皮下脂肪が厚さ4 mm程度あるが、センサーの感度領域は皮下脂肪を外しているため、MR計測で得られた脂肪含有量は筋肉内の脂肪含有量(脂肪交雑としての脂肪含有量)といえる。この例のように、皮下脂肪の厚みが4 mmより薄い箇所については、当該装置は枝肉の脂肪含有量の評価用途として使えそうといえる。

得られたCPMG時系列生データの例をFig. 4に示す。ノイズがあるのでデータ点はばらついていますが、式(1)による2つの指数関数的減衰モデルで最小自乗解析することで A_{fat} を得ることができた。合計26個のサンプルを計測して得た A_{fat} をソックスレー抽出法の結果と対応させたグラフをFig. 5aに示す。Fig. 5aには、式(2)による検量線も描いてある。この検量線をもちいて、MRスキャナーによる脂肪含有量を推定した。その値とソックスレー抽出法の結果をクロスプロットしたものがFig. 5bである。計測誤差の目安としての根平均自乗残差を26個のデータについて算出すると、4.8 wt%であった。いっぽう27個のクロマグロサンプルの脂肪含有量の片側開放型MRスキャナーによる計測では、根平均自乗残差は約2 wt%であった⁴⁾。4.8 wt%は2 wt%よりは若干悪

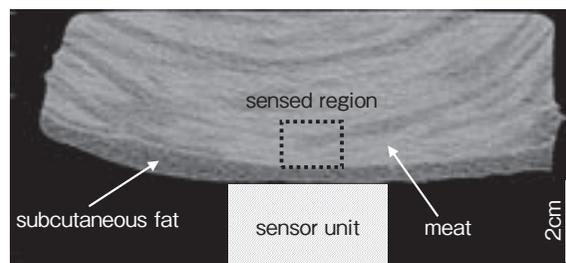


Fig. 3 Two-dimensional X-ray CT image of a meat sample with a subcutaneous fat layer. The sensed region (11 mm x 15 mm) is indicated by a rectangle. The supposed position of the sensor unit based on Fig. 2b is superimposed.

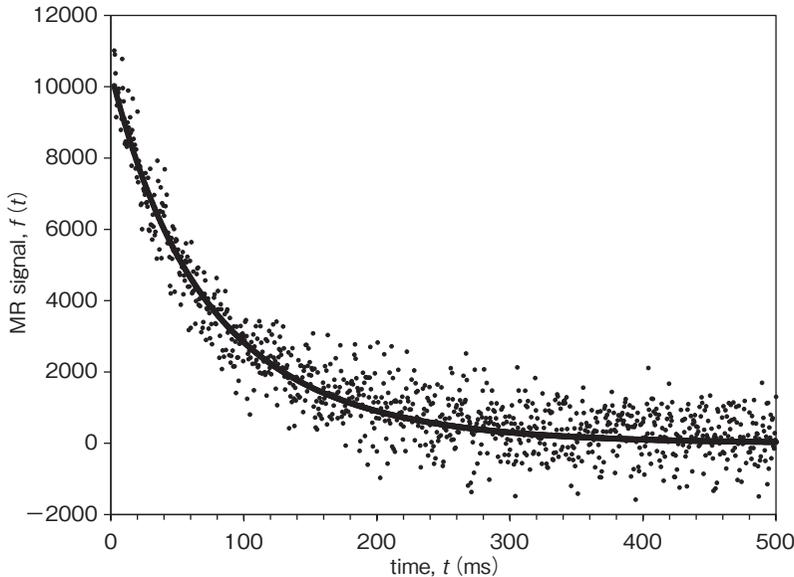


Fig. 4 Example for the time-series CPMG data of a meat sample measured by the system of Fig. 2. Equation (1) was fitted to the data by a solid line.

い結果であるが、電波シールド布で囲うなどの電磁波ノイズ対策を実施すれば²⁾、Fig. 4のノイズも低下することが期待される。ノイズレベルを低下させることができれば、計測所要時間（本研究では1部位36秒）の短縮も可能と思われる。この電磁波ノイズ対策は今後の課題ではあるものの、今回開発したMRスキャナーは、1部位の計測所要時間36秒でコイル表面から4～15 mm離れた位置の肉の脂肪含有量を誤差4.8 wt%で計測することができた。つまり、本研究によって枝肉のモモ抜きの評価用としての適用可能性を示すことができた。

今回の研究の将来展開として、以下を提案したい。開発したシステム（Fig. 2）は、キャストがついており（ポータブル）しかも通常の100 V商用電源で駆動できる。よって、全国の食肉処理施設・保管倉庫等に搬入して枝肉のモモ抜けなどの原位置・非破壊・非侵襲評価を行うことができるであろう。また、ハムやソーセージなどの畜肉製品の加工ラインに常設して脂肪含有量の非破壊

モニタリングをすることもできるであろう。特に皮下脂肪が薄い家畜については、生体でも脂肪含有量を非侵襲計測できる可能性もある。さらに、ヒトの臨床応用で汎用されているように、Fig. 4のプロトン緩和波形は、組織の病変を検出できる可能性もあるので、家畜の健康診断にも使えるであろう。このように、今回開発したMR装置は畜産業への広大な適用ポテンシャルを持っている。

4. 要 約

枝肉のモモ抜きを定量的に非破壊評価するための、片側開放型磁気共鳴スキャナーを開発した。今回新たに設計・製作した高周波コイルをセンサーユニットに搭載したスキャナーシステムのスペックとしては、センサーユニットの総重量は5 kg、センサーの感度領域の3次元サイズは14 x 15 x 11 mm³、特に深度方向の感度としてはコイル表面から4～15 mm離れた位置（幅11 mmのゾーン）の肉の脂肪含有量を計測できる。1部位の計測所要時間36秒で合計26個の牛肉サンプルを

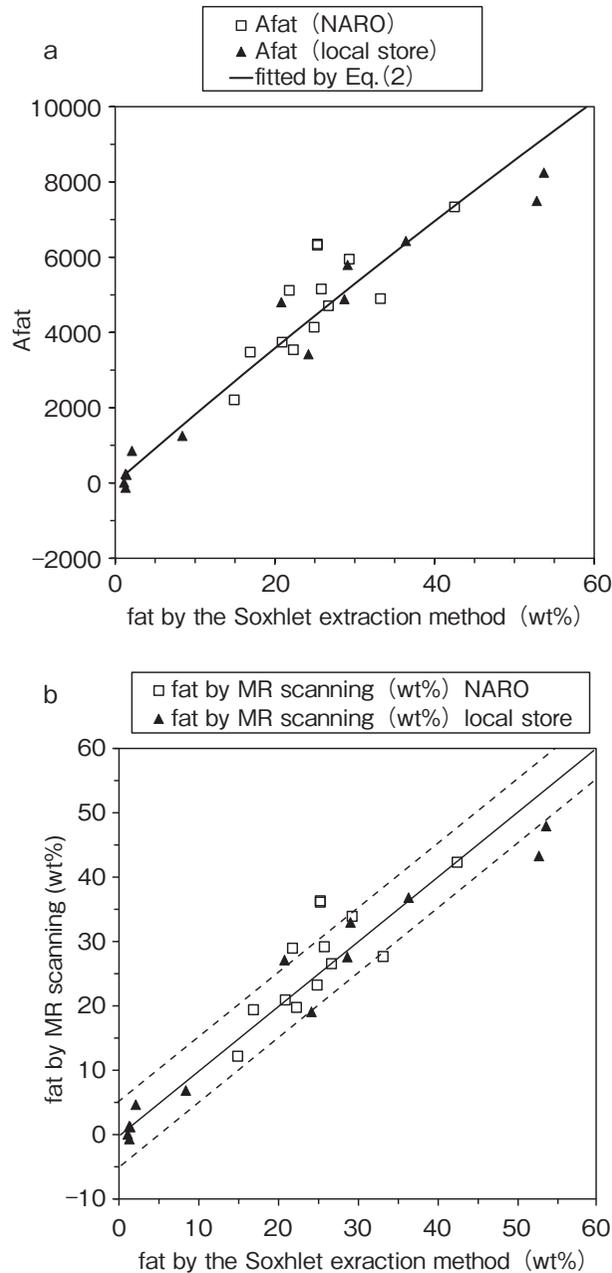


Fig. 5 Summary of the fat quantification by the single-sided MR scanner. “NARO” and “local store” refer to samples provided by the National Agriculture and Food Research Organization, and samples purchased at local stores in Tsukuba city, respectively. (a) Calibration curve. The quantity A_{fat} determined by Eq. (1) was plotted against the fat content (w_{fat}) by the conventional Soxhlet extraction method. The calibration curve, Eq. (2), was fitted to the data by a solid line. (b) Cross-plot of the fat content measured by the MR method against the Soxhlet extraction method. The solid and dotted lines refer to the discrepancy of 0 and ± 5 wt%, respectively.

計測した結果、誤差4.8 wt%で脂肪含有量を定量の評価用としての適用可能性を示すことができた。することができた。このように、本研究によって片側開放型磁気共鳴スキャナーの枝肉のモモ抜け

文 献

- 1) 中島善人：産業技術総合研究所地圏資源環境研究部門十大ニュース2020, p5, 2021.
- 2) Nakashima, Y. : *Journal of Aquatic Food Product Technology*, **28**, 241~252, 2019.
- 3) Nakashima, Y., Sawatsubashi, T., Fujii S. : *International Journal of Coal Preparation and Utilization* (in press), 2021.
- 4) Nakashima, Y. : *Journal of Food Measurement and Characterization*, **14**, 2947~2955, 2020.
- 5) Nakashima, Y. : *Applied Magnetic Resonance*, **46**, 593~606, 2015.

イミダゾール化合物が食肉の熟成に及ぼす影響について

Effect of imidazole compounds on the aging of meat

早川 徹

(北海道大学大学院農学研究院)

Toru Hayakawa

(Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture)

Carnosine is a dipeptide, consisted of β -alanine and L-histidine, and is abundant in skeletal muscle. In order to elucidate the role of carnosine in the transition from skeletal muscle to meat, this study focused on calpain, a Ca^{2+} ion concentration-dependent proteolytic enzyme, to investigate whether it is involved in the tenderization process after rigor mortis. Protease activity of calpain was evaluated by measuring the absorbance of the reaction solution with 10 mM carnosine and 0-1.0 mM CaCl_2 . In the absence of carnosine, the absorbance increased slightly. In the presence of carnosine, the absorbance after 7 days reaction increased compared with that in the absence of carnosine. SDS-PAGE also showed protein degradation of myofibrillar proteins by calpain, but the degraded proteins could not be identified. These results suggested that the addition of carnosine accelerated the degradation of myofibrillar proteins by calpain under low Ca^{2+} ion concentration conditions. In this study, it could be clarified that carnosine activated the proteolysis of calpain.

1. 目 的

イミダゾール化合物はイミダゾール環と呼ばれる五員環構造を含む化合物を指し、骨格筋および食肉においては、 β アラニンとヒスチジンからなるジペプチドであるカルノシンが豊富に存在することが知られている。イミダゾール化合物の生理的な役割については、緩衝作用や抗酸化作用を有するために細胞内の恒常性維持に寄与していると考えられている。また、近年、筋線維モデルを用いた検討で、カルノシンが骨格筋の収縮運動を活性化させるという報告がなされ、これはカルノシンの存在により筋収縮に関与しているタンパク質

であるミオシンのカルシウム感受性を向上させているためであると考えられている¹⁾。このようにカルノシンの機能には不明な部分が多く、新たな機能を明らかにすることで、骨格筋に豊富に存在する理由も解明されるだろう。

一方、骨格筋には種々のタンパク質分解酵素が存在する。これらの酵素は代謝に寄与するだけでなく、死後の硬直状態にあった骨格筋を軟化し、食肉として適した硬さにするとされている。なかでも、カルパインはカルシウムイオン濃度に応じて分解活性が変化し、死後にカルシウムイオン濃度が上昇することで活性化され、骨格筋の軟化、つまり食肉の熟成に関与しているとされてい

る²⁾。しかしながら、死後のカルシウムイオン濃度では活性化されないカルパインも存在するため、カルパインの熟成への関与については明らかになっていない部分も多い。

そこで、カルノシンが死後骨格筋におけるカルパインの活性を制御していることを明らかにし、カルノシンの食肉の熟成への関与について検討する。

2. 方法

2.1 試料調製

カルパインはColleとDoumitの方法にならい調製した³⁾。ひき肉にした鶏浅胸筋に対し、3倍量の抽出液(100 mM Tris, 10 mM EDTA, 10 mM DTT, pH 8.3)を加え、ホモジナイズしたのち、8,800 Gで30分遠心分離した。上清を回収し、牛乳ろ紙でろ過したろ液をカルパイン溶液とした。カルパイン溶液に30%グリセリンとなるよう十分冷却したグリセリンを加え、十分に混和し、分注したものを液体窒素中で急速凍結し、使用時まで -80°C で保存した。

筋原線維タンパク質は、新鮮な鶏浅胸筋からHasselbach-Schneider溶液により抽出し、調製した。鶏浅胸筋をひき肉にし、10倍量の蒸留水を加えホモジナイズ(10,000 rpm, 30 sec)した。遠心分離後(19,000 G, 20 min), 上清を捨て、得られた沈殿に15倍量のHasselbach-Schneider溶液(0.6 M KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Na₂P₂O₇, 0.1 M K-phosphate, pH 6.4)を加え、同様にホモジナイズした。懸濁液を冷蔵庫にて12時間振とうした後、遠心分離(19,000 G, 20 min)によって得た上清を筋原線維タンパク質とした。

2.2 カルパインによる筋原線維タンパク質の分解

筋原線維タンパク質を含む反応溶液(タンパク質濃度1.0 mg/ml)にカルパインを添加すること

で分解反応を開始させた。反応溶液の組成は、いずれも終濃度で、0.5 M NaCl, 0~1.0 mM CaCl₂, 100 mM Tris-HCl pH 6.5とし、カルノシン(終濃度10 mM)の添加したものをCAR群、無添加のものを対照群とした。カルパイン添加の前に 30°C に設定したインキュベーター内で10分間プレインキュベートし、反応開始後も同インキュベーター内で保持した。反応時間は0, 1, 3, および7日間とした。反応の停止は同量の10%トリクロロ酢酸を加えることで行った。反応停止後、 4°C で15分間静置し、上清の280 nmにおける吸光度を測定した。

2.3 SDS-PAGEによるタンパク質分解の確認

上記の分解反応において、反応停止前に一部をサンプリングし、SDS-PAGE用の試料処理を行った。電気泳動には、4%ポリアクリルアミドの濃縮ゲルと12%の分離ゲル、およびLaemmliの泳動用緩衝液を用いた。泳動後のゲルは0.1% Coomassie Brilliant Blue R-250溶液で染色し、現れたバンドを目視で確認した。

3. 結果と考察

タンパク質の分解の指標とした吸光度は、カルノシンおよびCaCl₂無添加の条件においても反応日数を経るごとに緩やかに上昇した。これは反応液に混入するカルシウムイオンの影響と考えられる。また、カルノシンを含まない条件では、CaCl₂の添加によっても吸光度の変化に差はなく、1.0 mM程度のカルシウムイオン存在下では、カルパインによるタンパク質分解反応は促進されないことが分かった。一方、カルノシン存在下では、1.0 mMのCaCl₂添加でも、無添加区およびカルノシン不在下との吸光度の差は反応3日目まで見られなかったが、反応7日目においては、0.2 mMのCaCl₂添加でも吸光度は上昇し、1.0 mMのCaCl₂添加ではさらに吸光度の上昇が見られた。つま

り、カルノシン存在下では、CaCl₂濃度依存的に吸光度の上昇が見られ、カルノシンによってカルパインのタンパク質分解酵素活性が活性化されたと考えられる。

カルパインが筋原線維のどのタンパク質を分解しているのかを調べるために、分解反応後のタンパク質溶液をSDS-PAGEに供した。カルノシンを含まない条件では、CaCl₂濃度にかかわらず得られたバンドパターンに差異は見られなかった。カルノシン存在下ではCaCl₂濃度依存的にタンパク質が分解されている様子が見られた。しかし、反応液中の筋原線維タンパク質濃度が、粗抽出したカルパイン溶液中の夾雑タンパク質の濃度に比べて低く、分解されたタンパク質の同定には至らなかった。

骨格筋に含まれるカルパインには、mMオーダーのCa²⁺イオン存在下で活性化されるカルパイン-1と、μMオーダーのCa²⁺イオン存在下で活性化されるカルパイン-2などがある。しかし、骨格筋中のCa²⁺イオン濃度を考慮するとタンパク質分解に寄与しているのはカルパイン-2であるとされてきた。本研究では、鶏浅胸筋より粗抽出したカルパインを用いたため、これら2種類のカルパインが含まれていると考えられる。しかしながら、カルノシン不在下で1 mM CaCl₂を添加した場合でもカルパインによるタンパク質分解が見られなかったことから、今回の実験系ではカルパイン-2による影響はないと考えられる。この原因としては、カルパイン溶液にカルパイン阻害物質であるカルパスタチンも同時に抽出されたこと

が考えられる。つまり、今回得られた結果は、カルパイン-1によるタンパク質分解が主な要因であるだろう。上述のようにカルパイン-1の活性化にはmMオーダーのCa²⁺イオンが必要であるにも関わらず、カルノシン存在下では1.0 mMだけでなく0.2 mMのCaCl₂を添加した場合でもタンパク質分解の上昇が見られた。このことは、カルノシンがカルパイン-1のカルシウム感受性を高め、低濃度のCa²⁺イオン存在下でも活性化されたためであると考えられる。

4. 要 約

本研究は、骨格筋中に豊富に含まれるカルノシンが骨格筋から食肉への転換期においてどのような役割を担っているのかを解明するために、死後硬直からの軟化(熟成)に関わっているのかどうかについて、Ca²⁺イオン濃度依存性のタンパク質分解酵素であるカルパインに着目し検討した。カルノシンの添加により、カルパインによる筋原線維タンパク質の分解が促進され、また低Ca²⁺イオン濃度条件においてもタンパク質分解が確認された。つまり、カルノシンがカルパインのタンパク質分解を活性化させたことが示された。

文 献

- 1) Dutka, Travis L., Graham, D. Lamb : *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, 25, 203~13, 2004.
- 2) Pomponio, Luigi, René Lametsch, Anders, H. Karlsson, Leonardo Nanni Costa, Alberto Grossi, Per Ertbjerg : *Meat Science*, 80, 761~64. 2008.
- 3) Colle, M. J., M. E. Doumit : *Meat Science*, 131, 142~45. 2017.

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（Ⅲ）

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

西村 敏英・山口 千里
(女子栄養大学栄養学部)

Toshihide Nishimura and Chisato Yamaguchi
(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 lipids in pork sausage give us *Koku* attributes such as mouthfulness and lastingness in the flavor sensation.

In the previous research, 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, Hexanoic Acid, 2-Hydroxy-3-methyl-2-cyclopentenone, Guaiacol, 4-ethyl-2-Methoxyphenol, 1, 2, 4-Trimethoxybenzene, *m*-Cresol, Eugenol, and 2, 6-Dimethoxyphenol. In this research, we tried to clarify which lipid in sausages hold these aroma compounds.

The holding capacity of lipids was evaluated by the measurement of amounts of aroma compounds released from the mixture containing each lipid after heating it. Triolein, one of triacylglycerols in pork sausages did not hold aroma compounds, while cholesterol and lecithin held them. Among 13 aroma compounds identified in pork sausages, β -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllene, and Methyl eugenol were held with cholesterol and lecithin. Furthermore, lecithin held these aroma compounds much larger than cholesterol. However, Hexanoic Acid, Guaiacol, 4-ethyl-2-Methoxyphenol, 1, 2, 4-Trimethoxybenzene, *m*-Cresol, and Eugenol were not held with cholesterol and lecithin. The difference in the binding property of aroma compounds with these lipids seems to be caused by the differences in log P (octanol/water partition coefficient) that each aroma compound possess. Seven compounds that held with lipids possessed log P with value more than 3.

目 的

ポークソーセージは、食品の中でもとりわけ美味なもの1つであり、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。また、最近、食品のおいしさを示す言葉

として、コクがよく使われている。これまでコクの定義がなかったことから、我々は、コクを「味、香りならびに食感のすべての刺激で形成される総合感覚であり、多くの刺激で形成される「複雑さ」、その刺激が口腔内で膨らむ「広がり」ならびに、それが持続する「持続性」の3要素（基本

コク)で形成されるものである」と定義した¹⁻⁵⁾。3要素のうち、複雑さは、熟成、発酵、加熱などの処理により形成される。その複雑な刺激の広がり持続性を増強する物質として、うま味物質と脂質が重要な役割を果たしていることを明らかにしてきた⁶⁻⁹⁾。さらに、コクのある食品に関して、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。ポークソーセージの製造工程では、うま味物質や脂肪を添加していることから、ポークソーセージはコクのある食品といえる。

筆者らは、ポークソーセージの食味性に関する研究をスタートさせた。食品のおいしさを決める要因の中で、香りは特に重要である。食肉製品の香気に関する研究では、Mottram¹⁰⁾やRamarathnam¹¹⁾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-オクテナルなどの香気成分が亜硝酸塩を添加したのから多く検出されることが明らかになっている。また、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。このような背景から、まず、スモークドポークソーセージとノンスモークド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¹²⁾。ノンスモークドソーセージでは16種類の香気成分が検出され、GC/O分析を用いたAEDA法により、16成分のうち、 β -Pinene、3-Carene、D-Limonene、Acetic acid、Copaene、Methyl eugenolが、ノンスモークドソーセージの特徴的な臭いに寄与する候補成分として特定ならびに同定された。これらの6成分は、スモークド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。スモークドソーセージではこれらに加えて、燻煙由来のポークソーセージを特徴付ける香気成分として

p-Cresolと2,6-Dimethoxy-phenolの存在が明らかになった。

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¹²⁻¹⁵⁾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¹³⁾。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。このように、ポークソーセージが、特徴的な香りを有する複雑さを示し、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にした。さらに、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になり、脂質がソーセージの香気成分を保持していることが推察された^{9,15)}。そこで、ヒトがソーセージを咀嚼した時の香気成分の放出を模倣し、十分にすりつぶしたソーセージに生理食塩水を添加した時の香気成分の放出量が、脂質の添加によって変化するか否かを調べた結果、脂肪無添加および脂肪添加スモークドポークソーセージからは、主な香気成分とし

て、 β -pinene, 3-Carene, D-Limonene, Caryophylleneが検出された。これらの4つの成分は、いずれも脂肪添加製品からの放出量が、脂肪無添加製品からのものより約2~4倍多いことが判明した。ソーセージ製品では、添加されている脂肪がこれらの香気成分を保持しているが、生理食塩水の添加により放出されることが明らかになった¹⁶⁾。

そこで、本研究では、ポークソーセージを喫食した時に、放出される香気成分が脂質の種類によって異なる可能性を考え、中性脂質、リン脂質、コレステロールを用いて、これらに対する香気成分の保持効果を検討した。

1. 脂質によるメチルプロピルジスルフィドの保持特性

最初に、脂質による香気成分の保持特性を調べた。すでに、植物ステロールに結合することが明らかになっている香気成分のメチルプロピルジスルフィドの脂質への結合性を調べた。八訂食品成分表2021には、ウインナーソーセージに含まれる脂質含量は30.6%で、そのほとんどは中性脂肪(トリアシルグリセロール)と記載されている¹⁷⁾。コレステロールは、100gのソーセージ当たり60mg含まれている。リン脂質も含まれているがわずかである。中性脂肪を構成する脂肪酸の中では、オレイン酸が最も多く、続いてパルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸の順である(Table 1)。そこで、本項では中性脂肪として、トリオレインを使用することとした。また、コレステロールとの結合性を調べた。

実験方法

(1) 試薬

トリオレインとコレステロール(純度99%以上)はSigma社から、メチルプロピルジスルフィドは富士フィルム・和光純薬(株)から購入した。

(2) 脂質による香気成分の保持特性

試験管に0.05gの脂質を精秤した後、氷水中で5 μ lのメチルプロピルジスルフィドを添加し、攪拌した。この混合物を氷中で10分間静置した後、10mlの冷やした蒸留水を加えた。次に、これを90℃の温浴中で4.5時間加熱した。これは混合溶液が90℃に達してから、加熱時間を計測した。

4.5時間加熱した混合溶液を氷中で冷やした後、10mlにメスアップした。メスアップ後の混合溶液をモノトラップ捕集ビンに移し、混合溶液から放出される香気成分をモノトラップ(シリカモノリス捕集剤: GL Sciences(株))で捕集した。

(3) モノトラップ(シリカモノリス捕集剤)による香気成分の捕集

脂質と香気成分の混合溶液が入ったモノトラップ捕集ビンにモノトラップ1枚を取り付けた後、40℃の温浴で20分間加熱した。なお、加熱時間は、溶液が40℃に達してから20分間加熱した。モノトラップを抽出ビンに移した後、抽出溶媒としてジクロロメタン1mlと内部標準物質(原液の1000倍希釈)を加えて5分間超音波処理をして、香気物質を抽出した。これをGC/MSの分析試料とした。

(4) GC/MSによる香気成分の比較ならびに同定

Mono Trapから得られた試料を以下の条件で分析した。

Table 1 Amount of each fatty acids in 100 g pork sausages (ポークソーセージの可食部100グラム当たりの各脂肪酸量)

脂肪酸	ミリスチン酸	パルミチン酸	パルミト レイン酸	オレイン酸	イコセン酸	リノール酸	α -リノレン酸
含有量 (mg)	390	6800	660	12000	250	3100	200

GC/MSの昇温条件は、40℃(10 min)→(5℃/min)→240℃(20 min)で、合計70分間のプログラムを用いた。検出器には、MS(250℃)を使用した。GC/MSは、GCMS-QP2010(島津製作所(株))で、カラムはTC-wax(長さ60m×内径0.25 mm i.d., 膜厚0.25 μm, 使用温度上限260℃)(GL Sciences(株))を使用した。注入量は、2 μl(スプリットレス)で、内部標準物質としてDimethyl phthalateを用いた。また、各成分の量的な変化は、サンプルに添加した内部標準物質で補正した後、比較した。

結果および考察

脂質は、香気成分を保持できることが分かっている。また、香気成分の種類によって、脂質との結合の強さが異なることも明らかにしてきた¹⁾。そこで予備実験として、これまでに植物ステロールに結合することが知られているメチルプロピルジスルフィドを、中性脂肪であるトリオレイン、あるいはコレステロールに添加し、それぞれに結合するか否かを調べた。各脂質にメチルプロピルジスルフィドを添加した後、90℃で4.5時間加熱した。その後、40℃で加熱した時に放出される香気成分をモノトラップによる捕集方法で調べた。

脂質無添加ならびにトリオレインでは、メチルプロピルジスルフィドの放出はまったく認められなかった(Fig. 1, 2)。このことから、中性脂肪の中で、トリオレインには香気成分の保持効果は弱い可能性が示唆された。今回、トリオレインを使用したのは、動物性脂肪を構成している脂肪酸で最も高いのはオレイン酸であることが分かっていたからである。しかし、メチルプロピルジスルフィドは、中性脂肪の1つであるトリオレインには保持されないことが明らかになった。

一方、コレステロールは、メチルプロピルジスルフィドを保持することが明らかとなった。

我々の研究から、植物ステロールであるβ-シ

トステロールやスティグマステロールは、メチルプロピルジスルフィドを保持することが分かっている。また、前者は、後者よりメチルプロピルジスルフィドの保持力が高いことも明らかになっている。植物ステロールならびに動物コレステロールのステロール骨格は同じであることから、骨格以外の部分の構造がメチルプロピルジスルフィドとの結合性に重要である可能性が示唆された。

2. スモークドポークソーセージに含まれる香気成分の各脂質との結合性

我々の先行研究で、スモークドポークソーセージおよびノンスモークドソーセージの香気成分を解析し¹⁰⁾、スモークドポークソーセージの特徴的な香りに寄与する香気成分として、β-Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Acetic acid, Copaene, Methyl eugenol, *p*-Cresol, 2, 6-Dimethoxy-phenolを候補成分として特定ならびに同定した。このうち、*p*-Cresolと2, 6-Dimethoxy-phenolは、燻煙由来の香気成分であると推定された。

そこで、ポークソーセージに含まれる香気成分が、各種脂質に保持されるか否かを調べた。

実験方法

(1) 試薬

スモークドポークソーセージをジエチルエーテルでダイレクト抽出した場合に検出されたβ-Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllen, Methyl eugenol (Aグループ)、また、ダイレクト抽出物をさらにSAFE蒸留して得られた試料から検出されたHexanoic acid, Guaiacol, 4-Ethyl-2-methoxyphenol, Trimethoxybenzene, *m*-Cresol, Eugenol (Bグループ)を用いて、脂質との保持特性を調べた。これらの香気成分は、いずれも東京化成工業(株)から購入した。また、トリオレインとコレステロール(純度99%以上)はSigma

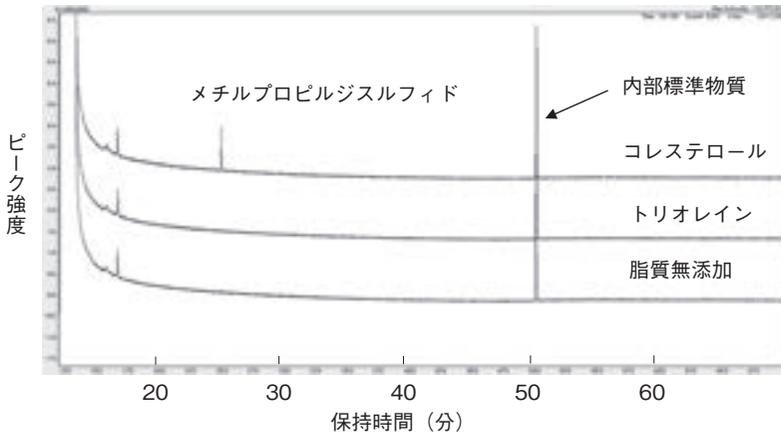


Fig.1 Chromatogram of methylpropyl disulfide released from the mixture containing each lipid after heating

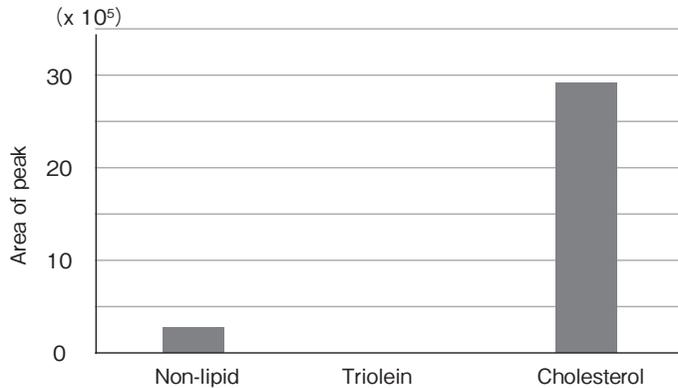


Fig. 2 Amounts of methylpropyl disulfide released from the mixture containing each lipid after heating

社から、レシチン（卵由来）は東京化成工業（株）から購入した。

(2) 脂質による香気成分の保持特性

試験管に0.05 gの各脂質（トリオレイン，コレステロール，卵レシチン）を精秤した後，氷水中で，ジクロロメタンで希釈した7種類（Aグループ）の香気成分を添加し，攪拌した。この混合物を氷中で10分間静置した後，10 mlの冷却した蒸留水を加えた。次に，これを90℃の温浴中で4.5時間加熱した。混合溶液が90℃に達してから，4.5時間を計測した。

4.5時間加熱した混合溶液を氷中で室温まで冷

却した後，10 mlにメスアップした。メスアップ後の混合溶液をモノトラップ捕集ビンに移し，混合溶液から放出される香気成分をモノトラップ（シリカモノリス捕集剤：GL Sciences（株））で捕集した。

Bグループの香気成分に関しても，同条件で結合性を調べた。

(3) モノトラップ（シリカモノリス捕集剤）による香気成分の捕集

1- (3)と同様の方法で実験を行った。

(4) GC/MSによる香気成分の比較ならびに同定

Mono Trapから得られた試料を、1-(4)と同じ条件で分析した。

結果および考察

各種脂質（トリオレイン、コレステロール、卵レシチン）に、7種類の香気成分（Aグループの①～⑦）を添加し、90℃で、45時間加熱した後に、各種脂質混合液から放出される香気成分量を測定し、加熱後に残存している香気成分量を測定した。

Fig. 3と4に示すように、脂質無添加（BLANK）では、⑦Methyl eugenolだけがわずかに検出されたが、それ以外の香気成分は検出されず、ほとんどすべてが加熱により放出されたと推察された。また、トリオレインからは脂質無添加（BLANK）の場合と同様に、香気成分はあまり検出されず、少量の⑦Methyl eugenol、⑥Caryophyllene、⑤Nonanal、③D-Limoneneが検出された。一方、コレステロールとリン脂質である卵レシチンでは、すべての成分が加熱後に検出され、香気成分がこれらの脂質に保持されていることが明らかになった。以上の結果から、Aグループの7成分は、トリオレインとの結合性が弱い、コレステロールと卵レシチンに保持されることが判明した。

次に、各種脂質に6種類の香気成分（Bグループの⑧～⑬）を添加し、同条件で加熱し、加熱後に残存している香気成分を測定した。Fig. 5に示すように、脂質無添加（BLANK）で、加熱後にすべての香気成分が検出された。また、各脂質でも、脂質無添加と同量の6成分が検出されたことから、これら6つの香気成分に対する脂質の保持効果は低いと推察された。

これらの結果をFig. 6にまとめた。①～⑦の香気成分は、脂質により保持される量が異なり、トリオレインには保持されないが、コレステロールと卵レシチンに保持されることが明らかになっ

た。また、①～⑥の香気成分は、コレステロールよりもレシチンに保持されやすいことも分かった。一方、⑧～⑬の香気成分は、加熱後の放出量が脂質無添加のものと同変らなかったことから、いずれの脂質にも保持されないことが明らかになった。本研究で用いた13の香気成分に関して、脂質に対する保持のされ方の違いは、化合物が有するlog P値（オクタノール/水分分配係数）の違いに起因すると推察された。コレステロールやレシチンに保持されたAグループの香気成分のlog Pは、いずれも3よりも大きい値を有していた。一方、それ以外の化合物は、3よりも小さい値であった。Log Pの違いは、構造の違いによる疎水性度の違いを反映していることから、脂質への香気成分の保持への応用を考える場合、log Pを考慮する必要があると考えられる。

次に、コレステロールやレシチンに保持された香気成分のうち、D-LimoneneとOctanalが、4.5時間の加熱中に放出量がどのように変化するかを調べた（Fig. 7）。その結果、D-LimoneneおよびOctanalは、ともに0時間では脂質無添加のBlankで放出量が最も多く、脂質がないと放出量が多いことが明らかになった。2時間および4時間加熱すると、脂質無添加ではほとんど香気成分が放出されなくなり、保持されている香気成分がないと推察された。一方、コレステロールやレシチンが存在すると、2時間以上加熱されても、香気成分が保持されていることが判明した。

要約

ポークソーセージは、美味な食品の1つであり、コクのある食品である。ポークソーセージに添加される脂肪が、ソーセージの特徴を示す香気成分を保持し、味わいの広がりや持続性を強めて、ソーセージのコクを増強することが知られている。

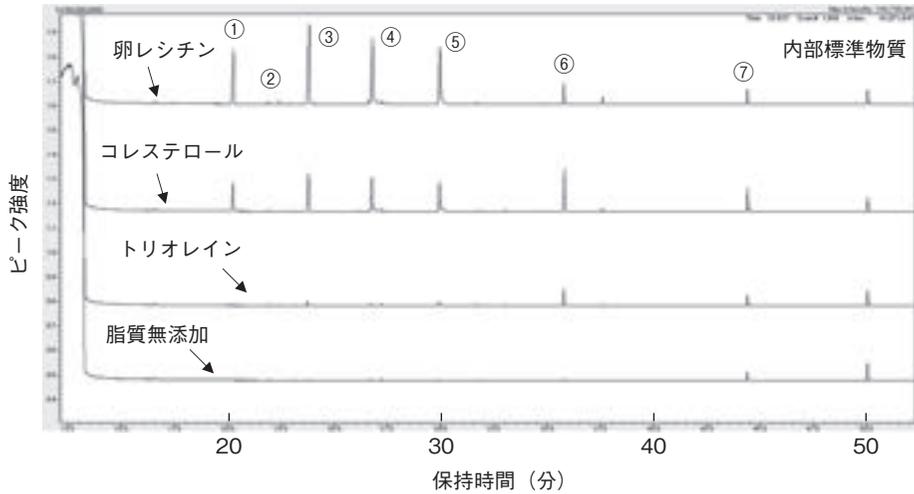


Fig. 3 Chromatogram of aroma compounds (A-group) released from the mixture containing each lipid after heating
 (① β -pinene, ② 3-Carene, ③ D-Limonene, ④ Octanal, ⑤ Nonanal, ⑥ Caryophyllene, ⑦ Methyl eugenol)

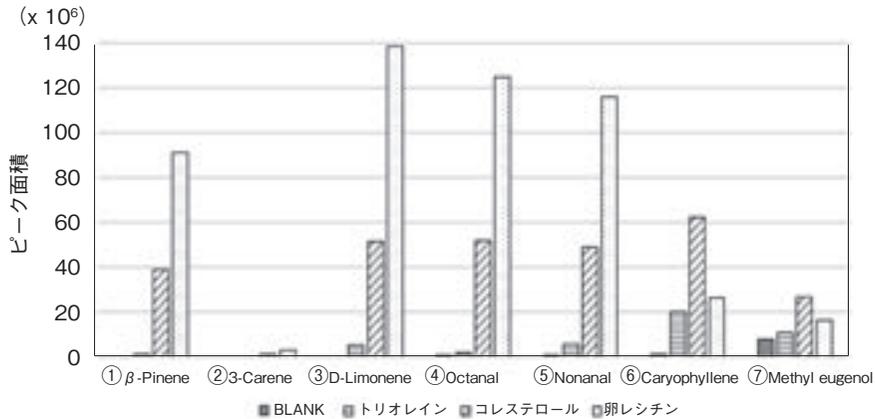


Fig. 4 Amounts of aroma compounds (A-group) released from the mixture containing each lipid after heating

本研究では、ソーセージに含まれている香気成分が、どのような脂質に保持されるかについて検討した。その結果、脂質の中でポークソーセージに最も多く含まれている中性脂肪（トリアシルグリセロール）のトリオレインには、香気成分が保持されにくく、コレステロールやリン脂質であるレシチンに香気成分が保持されやすい可能性が明らかになった。

また、ポークソーセージからダイレクト抽出で

検出された β -Pinene, 3-Carene, D-Limonene, Octanal, Nonanal, Caryophyllen, Methyl eugenol は、コレステロールやレシチンに保持されやすいことが判明した。一方、SAFE蒸留法で抽出された時に検出されたHexanoic Acid, Guaiacol, 4-Ethyl-2-methoxyphenol, 2, 4-Trimethoxybenzene, *m*-Cresol, Eugenolは、脂質に保持されない香気成分であることが分かった。香気成分の保持特性の違いは、化合物が有するlog P値（オクタノー

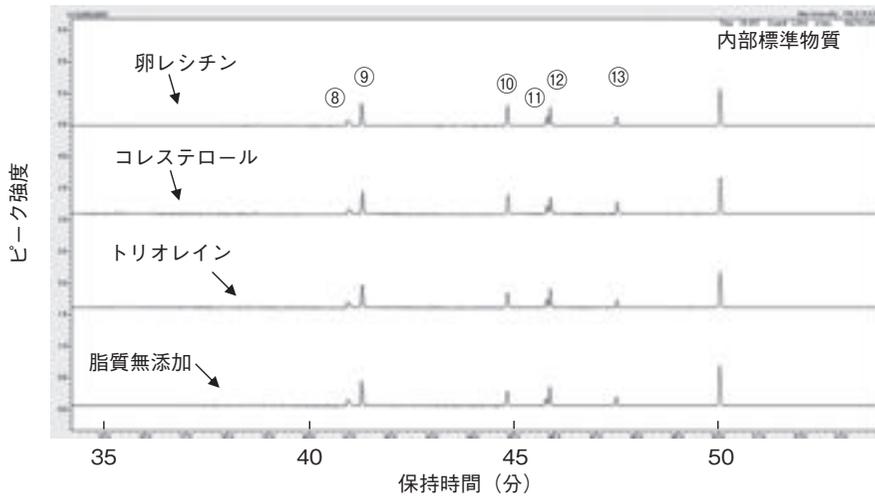


Fig. 5 Chromatogram of aroma compounds (B-group) released from the mixture containing each lipid after heating
 (⑧Hexanoic acid, ⑨Guaiacol, ⑩4-Ethyl-2-methoxyphenol, ⑪1, 2, 4-trimethoxybenzene, ⑫ *m*-Cresol, ⑬Eugenol)

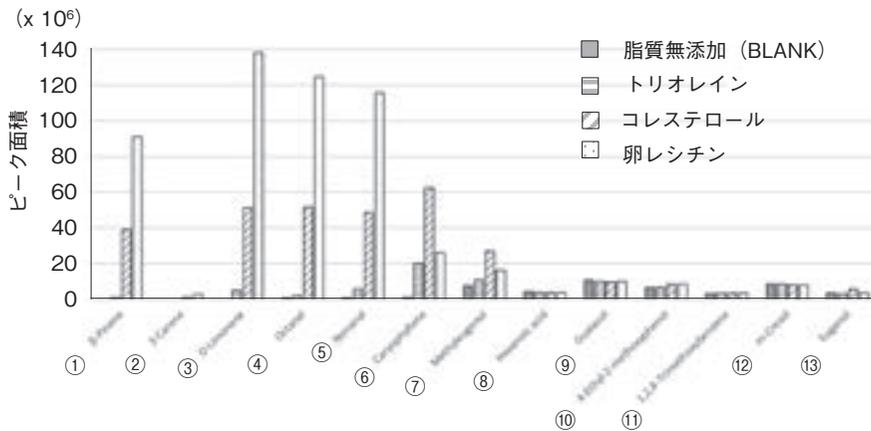


Fig. 6 Amounts of aroma compounds (A and B-groups) released from the mixture containing each lipid after heating

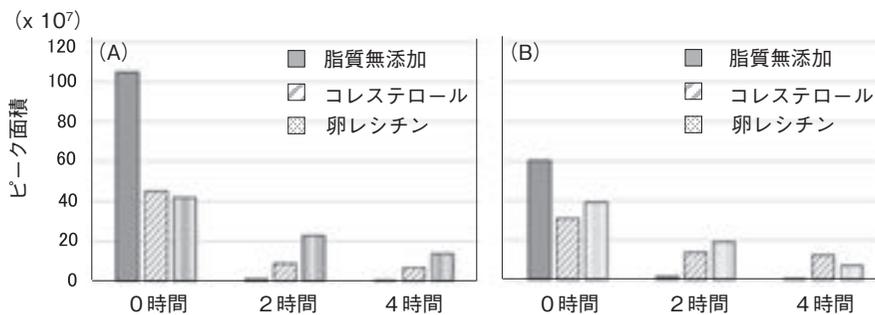


Fig. 7 Changes in amounts of D-limonene (A) and Octanal (B) released from the mixture containing each lipid in heating

ル/水分係数)の違いに起因すると推察された。コレステロールやレシチンに保持されたAグループの香気成分のlog Pは、3よりも大きい値を有していた。

文 献

- 1) Nishimura, T.: Definition of "Koku" Involved in Food Palatability (Koku in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.), Springer Nature, Singapore, 1-16, 2019.
- 2) 西村敏英: 食肉のおいしさとそれを引き出すコクとは!, JATAFFジャーナル, 3(12), 29~35, 2015.
- 3) 西村敏英: 食肉のおいしさを改善するコク増強物質のチョイ足し技術, 月刊フードケミカル, 2017-9, 23~27, 2017.
- 4) 西村敏英: コクの要素と寄与成分を活かした食品開発, 食品と開発, 53(6), 20~23, 2018.
- 5) 西村敏英: 食品のコクとおいしさへの活用, 醤油の研究と技術, 45(3), 161~168, 2019.
- 6) Nishimura, T., Goto, S., Miura, K., Takakura, Y., Egusa, S. A., Wakabayashi, H.: "Umami compounds enhance the intensity of retronasal sensation of aromas from model chicken soups", *Food Chemistry*, 196, 577~583, 2016.
- 7) Nishimura, T., Egusa, S. A., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., Noshio, Y.: "Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute", *Food Chemistry*, 192, 724~728, 2016.
- 8) 西村敏英: 「食肉のおいしさを引き出すうま味物質の役割」, 食肉の科学, 57(2), 177~180, 2016.
- 9) Nishimura, T., Saiga, A.: Umami Compounds and Fats Involved in Koku Attribute of Pork Sausages (Koku in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.), Springer Nature, Singapore, 47-58, 2019.
- 10) Mottram, D. M.: "Organic Nitrates and Nitriles in the Volatiles of Cooked Cured Pork", *J. Agric. Food Chem.*, 32, 343~345, 1984.
- 11) Ramaratnam, N., Rubin, L. J., Diosady, L. L.: "Studies on meat flavor. 3. A novel method for trapping volatile components from uncured and cured pork", *J. Agric. Food Chem.*, 41(6), 933~938, 1993.
- 12) 西村敏英, 江草愛: 「ポークソーセージの『こく』とその寄与因子の解明 (その3)」, 平成28年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 35, 31~39, 2017
- 13) 西村敏英, 江草愛: 「ポークソーセージの『こく』とその寄与因子の解明」, 平成26年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 33, 101~108, 2015.
- 14) 西村敏英, 江草愛: 「ポークソーセージの『こく』とその寄与因子の解明 (その2)」, 平成27年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 34, 72~80, 2016.
- 15) 西村敏英: 「ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割」, 平成29年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 36, 59~67, 2018.
- 16) 西村敏英, 力石麗奈: 「ポークソーセージのコクの形成における香気成分と脂質の役割 (Ⅱ)」, 平成31年度 食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol. 38, 33~41, 2020.
- 17) 「八訂 食品成分表 2021」女子栄養大学出版部, 2021.

枝肉の3Dグラフィック化システムの製作（Ⅱ）

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

本山 三知代・渡邊 源哉・中島 郁世・佐々木 啓介
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）

Michiyo Motoyama, Genya Watanabe, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

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

In the previous year we had developed a basic technology for rendering 3D graphics of meat carcasses and its prototype photogrammetric system. In the present study, the prototype was expanded to a practical system with 40 cameras that enables the measurement of entire carcass 3D shape instantly. Both hardware and software of the prototype were ameliorated to solve the expected problems in the practical use.

The improved system was tested, and we confirmed that the strength of frame structure and the speed of data transfer were adequately ameliorated and also that the newly introduced devices (automatic release mechanism and flashlight) operated without problems. In addition, by checking the quality of the rendered 3D model, we found some further countermeasures to make the system more compatible with various situations in the actual meat carcass production.

We also investigated the countermeasures for applying ICT technology to the system to distribute the carcass 3D graphics. It would be effective to connect the system to a existing or newly constructed computer network that can automatically operate to generate and distribute 3D graphics from the acquired image data from the system.

1. 目 的

近年のコンピュータの性能向上により、物体や空間を二次元のモニタ上に奥行き感（立体感）を持って視覚表現する三次元（3D）グラフィック

技術は、さまざまなゲームやデジタル映像など我々の身近なものとなり、その作製と表示のための技術進歩と低価格化が目覚ましい。枝肉についても3Dグラフィックが作製可能になれば、現在は枝肉の価格形成に活用されていない立体形態や

外観の情報を新たに数値化できるようになるだけでなく、ICT技術と組み合わせることでスマートフォン等でよりリアルな枝肉を確認することが簡単に可能になり、新しい価値の創造に結び付くと考えられる。

申請者らはこれまでに、枝肉の3Dグラフィックを作製するための基盤技術を開発し、本基盤技術を実用化につなげるためのプロトタイプシステムを2019年度に設計・製作した。本プロトタイプ装置は20台のデジタルカメラを具備した枝肉同時撮影システムであり、生産ラインを動く枝肉を静止させることなく計測可能で、得られた3Dグラフィックから、これまで数値化の難しかった枝肉断面形状等の評価が可能となった。

しかし、本プロトタイプシステムはカメラ台数の制約から枝肉の一部分の計測しかできず、実用システムとするためにはカメラを増設して枝肉全体の3Dグラフィック製作を可能にする必要があり、そのためのソフトウェアおよびハードウェアの改良が必要なことが、プロトタイプを用いた検証から明らかになっていた。

また、枝肉3Dグラフィックから今後広く価値を生み出すためには、インターネットを活用して3Dグラフィックを表示・配布可能にすることが有効と考えられる。家畜伝染病の観点から出荷者や買参人でも枝肉を直接見ることが難しくなっており、枝肉3Dグラフィックの早い実用化が必要である。

そこで本年度は、枝肉3Dグラフィックの活用を見据え、昨年度作製したプロトタイプシステムをICT技術と親和性の高い実用システムに改良・発展させることを目的とした。

2. 方 法

申請者らはこれまでに、枝肉の3Dグラフィックを作製するための基盤技術を開発し（特許出願

2件、2019年および2020年）^{1,2)}、本基盤技術に基づいたプロトタイプシステムを本研究助成金等を活用して2019年度に製作した。本プロトタイプの現場での試用により、実用システムへ拡張するために必要な改良点が明らかになっていたことから、これらの点に留意してプロトタイプのハードおよびソフトウェア構成の改良・拡張を以下のように進めた。

2.1 ハードウェアおよびソフトウェア

2.1.1 カメラ

これまでの研究から、枝肉全体について3Dグラフィックを作製する場合、カメラは約40台必要なことが分かっていたことから、プロトタイプシステムに採用したものと同機種の産業用カメラ（Omron-Sentec社STC-MCS312POE、3M画素、カラー）およびレンズ（東京パーツセンター社TPC-GO6F18-3M）を必要な台数（40台）まで自己研究資金（農研機構）により増設した。

2.1.2 コンピュータ

カメラからコンピュータへの画像データの転送に問題が出るのが予想されていた：すなわち、昨年度製作したプロトタイプ（カメラ20台）は一般的な1Gbpsの帯域幅を持つ転送速度125MB/sのシステムであり、このままカメラ台数を40台に増やした場合には画像が転送できない重度のフレーム落ち（カメラからパソコンに転送されるリアルタイム画像が抜け落ちる現象）が想定された。

そこで、10倍の転送速度を持つ次世代高速ネットワーク10GigEの通信規格を採用したネットワークボードをインターフェースとしたコンピュータ（Iiyama社Solution TO39-i9K-XYVI, Windows10 64bit, Intel Core i7, 16GB RAM）を導入した。

2.1.3 PoEハブ

コンピュータと同様にフレーム落ちへの対応として、アップリンク10GigE規格のものとした

(Netgear社GC752XP)。

2.1.4 自動撮像トリガ

プロトタイプでは、枝肉が計測に適切な生産ラインの位置に来たことを人が確認してコンピュータのキーボードから撮像トリガを入力する仕様であったが、トリガ入力失敗の回避と省力化のため、枝肉の位置を自動検知してパソコンに信号を送り、ソフトウェア経由でカメラに撮像トリガを入力するトリガ機構を導入した。位置の検知にはレーザセンサ (MiSUMi社MZL-D) を利用した。

2.1.5 照明の設置

ブレのない画像取得に必要な十分に短い撮影露光時間を達成するために照明を設置した。照明として、ストロボフラッシュ (ライトグラフィカ社GB-150 Studio Flash) およびLED照明 (エコリカ社 ECL-LD2EGD-L3A) の2種類を準備した。ストロボフラッシュの発光信号はコンピュータ (ソフトウェア) からLANケーブルおよびシンクロコードを介して送る仕様とした。

2.1.6 支持フレームの改良

増設したカメラや照明の設置のために、フレームの素材を塩ビ管からより堅牢なアルミ製とし、構造も改良した。

2.1.7 ソフトウェア

前述のとおり、カメラを増設した場合にフレーム落ちが予想され、撮影データの転送に加え、各カメラの位置やピント等の調整も難しいことが想定された。そこで、接続された全カメラのリアルタイム画像を常時転送する現在採用している一般仕様から、ソフトウェア上で選択したカメラについてのみ、リアルタイム画像を転送する仕様を改良した。

2.2 改良したシステムの動作確認

システムの改良が適切であったか確かめるために、動作の検証を行った。新型コロナウイルス流行による出張の自粛と、豚熱の陽性報告が野生イ

ノシシにおいて断続的に続き家畜防疫上の懸念があったため、システムの動作確認は実際の枝肉生産ラインではなく、勤務する事業場内の試験用枝肉生産ラインにおいて、豚枝肉の半丸の立体模型を用いて行った。

また、当システムを用いて撮影した豚枝肉模型の写真から、ソフトウェアZephyr Aerial (3Dflow社) を用いてStructure from Motion法により三次元モデル (テクスチャ付メッシュデータ) を作製し完成度を確認することで、システムから得られる画像データの品質を検証した。

2.3 ICT技術の活用法の検討

枝肉3Dグラフィックから今後広く価値を生み出すためには、インターネットを活用して3Dグラフィックを表示・配布可能にすることが有効と考えられる。そこで、当システムをICT技術と親和性の高いシステムに発展させるための方策について情報収集を行った。

3. 結果と考察

3.1 ハードウェアおよびソフトウェアの改良

改良したシステムの概要および外観をFig. 1とPhoto 1に示す。枝肉の全体について3Dグラフィックを作成するのに必要な台数のカメラ (40台) を備えたシステムとなった。カメラと、今年度新たに追加した自動撮像トリガ機構およびストロボフラッシュとは、ソフトウェアを介して連動する。

フレームはアルミ管製で軽量、かつパイプラックシステムに用いられる強度の高い管とインナージョイントを採用し堅牢で、組み立て分解も六角レンチのみで可能で可搬性にも優れる。また、柱梁を増設し、40台のカメラおよび照明器具等の重量に十分耐える強度を有していた。

改良したソフトウェアのGUI画面をPhoto 2に示す。カメラの露光時間およびゲインの入力や、

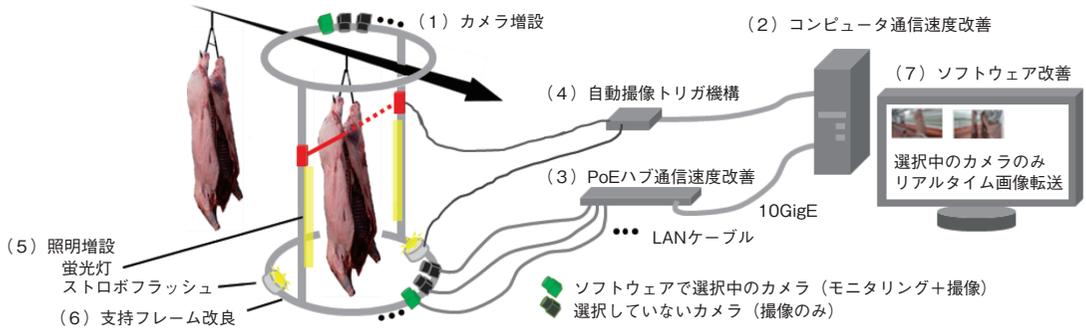


Fig. 1 Schematic diagram of the improved system



Photo 1 Appearance of the improved system with forty cameras.

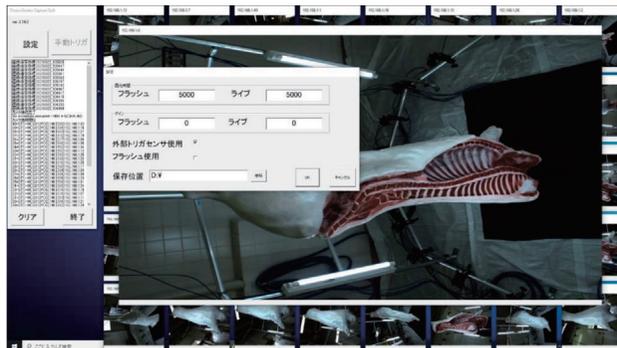


Photo 2 Appearance of the improved software (GUI) and camera windows. From the GUI, settings of camera and flash light can be easily changed.

レーザセンサによる自動トリガ/手動トリガの切り替え、フラッシュ使用の有無などが、一括してGUI画面から簡単に行えるようになった。

また、ソフトウェアで選択した任意のカメラのみリアルタイム画像を転送・表示する仕様であり(Photo 2 中の大きい画像ウィンドウ)、コンピュータおよびハブの転送速度の改善の効果とあわせて、リアルタイム画像も目立ったフレーム落ちなく滑らかに表示され、カメラのピント調整も容易になった。

3.2 動作確認

カメラ40台の同時撮影により取得した画像40枚は、数秒以内にパソコンに転送され指定したフォルダに格納された。枝肉生産ラインの速度は、例えば枝肉計量は枝肉あたり5秒程度以上かかり、これに比べてシステムの処理スピードは速いため枝肉生産ラインの流れには干渉しにくいと考えられる。

レーザセンサによる枝肉の検出と撮像トリガの出力は正常に稼働し、自動撮像することができた。一方、今回動作確認に用いたラインは枝肉を一定の速度で自動搬送できるものではなかったため、枝肉模型を手で押す速度の遅速によってタイミングがずれ、撮影範囲から外れる問題が生じた。自動撮像機能を利用する場合は、システムを自動搬送のライン箇所に導入するか、システムの撮影可能範囲を広くする工夫が必要と考えられた。

改良したシステムを用いて、静止あるいは移動(約0.5 m/s)する枝肉模型を露光時間を変えて撮影し、三次元モデルを作成した結果をTable 1に示す。

静止した枝肉模型を撮像した結果、7msの露光時間で枝肉全体の三次元モデルが問題なく作成できることが確認でき(Table 1 写真)、今回の光条件(模型表面において500~1200 lx)では、露光7msで画像の明るさは十分だったことを示し

ている。しかし、枝肉を移動させた場合は、7msではモデル化が失敗する枝肉部位があったことから、7msという短時間であっても画像にブレが生じ問題となることが分かった。

露光時間をより短くするためにストロボ照明も検討したが、7ms未満の非常に短い時間にタイミングを合わせて発光させることは困難であった。システムを実際の生産ラインに導入する際には、ラインの速度や周囲の明るさ、ライン位置(上流か下流か)による枝肉表面の光学特性(光沢)の違いなどにより、状況に応じた照明の調整が必要であるが、LED照明のような定常光をON/OFF制御可能にして、さらに増設しておくことが最善策と考えられた。

3.3 ICT技術の活用法の検討

本システムを用いて得られる三次元モデルの活用法として、枝肉の品質評価指標や家畜の育種指標の開発などが考えられるが、得られる3Dグラフィックはそれ自体がリアルな品質情報であり、そのまますぐに活用できる。

今回改良したソフトウェアでは、撮影した画像の保存場所にネットワーク上のストレージも指定することができる。本システムを、既存あるいは新たに準備するネットワークに接続することにより、ノード間の接続の通信速度に留意する必要があるが、ネットワーク上のさまざまな計算資源を活用可能になるため、多数の枝肉3Dグラフィックを自動で生成・配布する仕組みを構築できると考えられた。

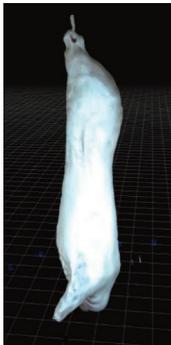
作製した3DグラフィックはPDFファイルとしてメールやインターネットで誰でも簡単に扱え、コロナ下における世界的なオンライン化に対応した新しい食肉品質管理技術として活用できる。

4. 要 約

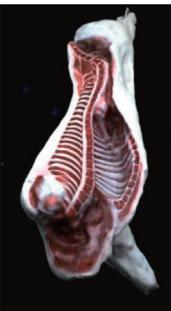
過年度に製作した枝肉の3Dグラフィック化シ

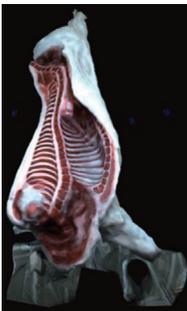
Table 1 Number of image that could not be used for the 3D-model calculation. Images were obtained under different condition of exposure time. Rendered 3D model with the condition of 7-ms exposure time are shown.

露光時間	三次元モデル化計算に利用できなかった画像の枚数 (40枚中)	
	撮影対象 静止	撮影対象 移動
5 ms	11枚	11枚
6 ms	13枚	12枚
7 ms	0枚	9枚









露光時間7msの写真から計算された3Dモデル

ステムのプロトタイプを、枝肉全体の計測が瞬時にできるカメラ40台を具備した実用システムに拡張するとともに、拡張後に予想された問題点の解消のためにハードウェアおよびソフトウェアを改良した。

拡張したシステムの動作検証を行い、新たに導入した自動撮像トリガおよびストロボフラッシュはすべて問題なく稼働し、支持フレーム強度とデータ転送速度も十分であった。また、得られた画像から作成した三次元モデルの品質検証により、実際の生産ラインにおけるさまざまな状況に

対応可能とするための、システムのさらなる改善策を明らかにした。

3Dグラフィックの活用のためのICT技術の利用についても検討し、取得画像データから3Dグラフィックの生成・配布までを自動で行えるネットワーク構築が有効であると考えられたことから、その環境整備を今後進めたい。

文 献

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

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

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

(Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University)

In order to elucidate the mechanism by which zinc protoporphyrin IX (ZnPP) in nitrite/nitrate free dry-cured meat products, we tried to clarify ZnPP-binding proteins which are not water-extractable from Parma ham and to establish a new ZnPP-forming experimental model with high yield of ZnPP. The ZnPP content varied among hams or muscles but the water-extraction ratio of ZnPP positively correlated to pH values of muscles and maximized at pH 9.0. The weak alkali extract from the residue after water extraction was evaluated with the size-exclusion chromatography, western-blotting, and immunoprecipitation and the water-insoluble ZnPP was suggested to exist as complex with hemoglobin and myoglobin. In the experimental model established in this study, water-extractable ZnPP was formed 10-fold higher than that in the previous experimental model. Moreover, since the formed ZnPP complexes existed as complexes similar to those in Parma ham, it was suggested that this new experimental model is useful to elucidate the ZnPP formation mechanisms in nitrite/nitrate free dry-cured meat products.

1. 目 的

パルマハムは発色剤が使用されていない乾塩漬生ハムであるが、鮮やかな赤色を呈する。Wakamatsuら¹⁾は、この赤色色素が亜鉛プロトポルフィリンIX (ZnPP) であることを明らかにした。ZnPPはプロトポルフィリンIX (PPIX) に亜鉛が配位したものであるが、生体にはほとんど含まれていないこと²⁾から、パルマハムの熟成中に生成されるものと考えられる。ZnPPは発色剤無添加の食肉製品の色調改善への応用が期待されるが、パルマハム中での形成機構は完全には明ら

かになっていない。

我々はこれまでに、パルマハムにおけるZnPPの形成機構解明の一環として、ZnPPの存在形態に関する研究を行ってきた。パルマハム中には、水抽出できるZnPPと水抽出できないZnPPが存在することを明らかにし (データ示さず)、水抽出できるZnPPについては、ほとんどがヘモグロビンとミオグロビンと結合していることを明らかにした³⁾。一方、水抽出できないZnPPは、単体あるいは何らかの物質との複合体としてパルマハム中に存在していると考えられるため、その結合タンパク質を調べるには可溶化する必要がある。し

かし、一般的に可溶化に用いられる界面活性剤では、ZnPPとタンパク質との結合が外れる（データ示さず）ため、その詳しい存在形態は明らかにされていない。また、パルマハム中の不溶性ZnPPの割合は相当量存在するため、不溶性ZnPPの存在形態を明らかにすることは、パルマハムにおけるZnPP形成機構解明の一助になる。

一方、パルマハムにおけるZnPP形成機構について、複数の説が提唱されている。細菌由来の酵素による説⁴⁾に加え、Adamsenら⁵⁾は、ZnPPはミオグロビンのヘム由来である説を唱えた。ヘムからの脱鉄および亜鉛の挿入については、嫌気的条件下での非酵素的反応と、酵素的反応の両者が存在する⁶⁾。酵素的反応には、ヘム生成に関わり、ヘムからの脱鉄と亜鉛の挿入を触媒すると考えられているフェロケラターゼの関与が提唱されている⁷⁾。一方、我々は*in vitro*のZnPP形成モデル実験系を構築して、ZnPPの形成機構を検討したところ、豚肉では至適pHの異なる2つの機構が存在することを明らかにし、筋線維型との関係性を示唆した^{1,8)}。しかし、至適pH 4.75の形成機構ではミトコンドリアの多い遅筋型筋線維の割合と正に相関して、多くのZnPPが形成したが、その大部分は水抽出できず、パルマハムにおける存在様相とは異なっていた。一方、至適pH 5.5の形成機構では線維型によらず、水抽出できるZnPPを形成するものの、その形成量は少なく、パルマハムと同様の形態で存在しているか検証ができない。このため、より大量かつ安定にZnPPを形成させるモデル実験系の構築が必要となる。

そこで本研究では、パルマハムにおけるZnPP形成機構解明を目的として、水抽出できないZnPPの存在形態を明らかにすることと、形成量のより多い*in vitro*のZnPP形成モデル実験系を再構築することとした。

2. 方法

2.1 パルマハムからのZnPPの分画・抽出とZnPPの水抽出率の測定

市販のパルマハム原木 (n = 3) から主要な4つの筋肉 (大腿四頭筋 (QF), 大腿二頭筋 (BF), 半膜腰筋 (SM), 半腱様筋 (ST)) を切り出して細切したものに、10倍量の純水を加えて、ホモジナイズした。懸濁液のpHを測定した後、遠心分離して抽出液と残渣に分画した。それぞれを元の体積になるように純水を加えて懸濁した後、3倍量の冷アセトンを加えてZnPPを抽出し、抽出液の蛍光強度 (Ex/Em : 420/590nm) を相当量とした。水抽出液中に存在するZnPPを水抽出できるZnPP、水抽出残渣に存在するZnPPを水抽出できないZnPPとした。両者のZnPP量に対する水抽出できるZnPP量をZnPPの水抽出率とした。また、NaOHによりpHを調整したパルマハム懸濁液を遠心分離して分画し、同様にアセトンで抽出して蛍光強度を測定した。

2.2 サイズ排除高速液体クロマトグラフィー (SEC-HPLC)

パルマハム水抽出残渣を、NaOHを用いてpH 7.5に調整した後、遠心分離を行って上清を得た。これをシリンジフィルターで濾過して、G3000SWカラム (東ソー) を用いてSEC-HPLCに供した。ZnPPの検出は蛍光強度 (Ex/Em : 420/590nm)、タンパク質とヘムの検出はそれぞれ波長280nm, 415nmで検出した。

2.3 ZnPP結合タンパク質の免疫学的同定

パルマハム水抽出残渣を、NaOHを用いてpH 6.0, 7.5および9.0に調整した後、遠心分離を行って上清を得た。上清をSDS-PAGEに供した後、抗ヘモグロビン抗体ならびに抗ミオグロビン抗体を用いたウェスタンブロッティング法に供した。また、pH 7.5および9.0で抽出したものを抗ヘモグ

ロビン抗体ならびに抗ミオグロビン抗体を用いて免疫沈降に供し、得られた免疫沈降物をアセトンで抽出して、ZnPPの結合を検証した。

2.4 ZnPP形成モデル実験系とZnPP形成量の測定

Wakamatsuら⁹⁾が構築したモデル実験系を元に、ZnPP形成に及ぼす豚肉含量、インキュベート温度、pH、およびインキュベート日数の影響を検討した。豚最長筋を純水でホモジナイズして、HClまたはNaOHを用いてpHを調整し、抗生物質を添加したものを嫌氣的に暗所でインキュベートした。インキュベート後に懸濁液を遠心分離して上清と沈殿に分画した。それぞれを元の体積になるように純水を加えて懸濁した後、3倍量の冷アセトンを加えてZnPPを抽出し、抽出液の蛍光強度 (Ex/Em : 420/590nm) をZnPP相当量とした。同様に、上清中に存在するZnPPを水抽出できるZnPP、沈殿物中に存在するZnPPを水抽出できないZnPPとした。

2.5 ZnPP結合タンパク質の分離と同定

上清中のZnPP結合タンパク質は、Laemmliの緩衝液系から0.1% SDSの代わりに4 M尿素を加えた尿素ゲル電気泳動で分離した。なお、泳動緩衝液中のSDSも除いた。電気泳動後、ただちに暗

室内で、ガラス板から外さないで、420nm付近の光を透過するバンドパスフィルターを通して紫色LED (中心波長400nm) を照射して、600nm付近の光を透過するバンドパスフィルターを装着したデジタルカメラでZnPPの蛍光を撮影した。その後、ただちにゲルからPVDF膜に分離タンパク質を転写して、抗ヘモグロビン抗体ならびに抗ミオグロビン抗体を用いたウェスタンブロッティング法に供した。

3. 結果と考察

3.1 パルマハム中のZnPPの存在様相とpHとの関係

パルマハムの各筋肉中から、水抽出できるZnPPと水抽出できないZnPPの量を測定したところ、ばらつきが大きく、筋肉の種類や個体の影響は見られなかった (Fig. 1A)。しかし、ZnPPの水抽出率と各筋肉部位のpHとの関係を調べたところ、両者間に強い正の相関が認められた (Fig. 1B)。そこで、水抽出時のpHを調整してZnPPの水抽出率を検討したところ、pHの上昇に伴い、水抽出できるZnPPの量は増加して水抽出できないZnPPの量は減少し、pH 9付近においてZnPPの水抽出率が最大となり、水抽出できないZnPP

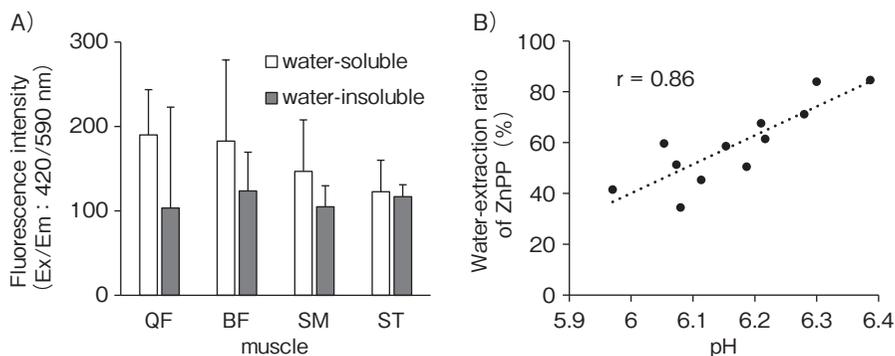


Fig. 1 Water-soluble and water-insoluble ZnPP contents in each muscle (A) and correlation between water-extraction ratio of ZnPP and muscle pH in muscles (B)
Bars represent standard deviation (n = 3).

は大幅に減少した。以上のことから、パルマハム中の水抽出できないZnPPの多くはpHを上げることによって抽出できることが示された。

3.2 パルマハム水抽出残渣から弱アルカリで抽出されるZnPP複合体の解明

パルマハム水抽出残渣の懸濁液をNaOHでpH 7.5に調整した後、遠心分離して得られた上清をSEC-HPLCで分離したところ、ZnPP由来と思われる自家蛍光のピークが複数観察された。これらのピークはヘムタンパク質のピークと一致したことから、ZnPPが複数の異なるヘムタンパク質と複合体を形成している可能性が示された。

次に、食肉に含まれる主要なヘムタンパク質であり、パルマハム水抽出液中でZnPPとの結合が報告されているヘモグロビンとミオグロビンに注目して、パルマハム水抽出残渣の懸濁液をNaOHでpH 7.5または9.0に調整して得られた抽出物をウェスタンブロッティング法に供した。pH 7.5または9.0で抽出したものには、いずれも抗ヘモグロビン抗体と抗ミオグロビン抗体に対する陽性バンドが観察された。このため、抗ヘモグロビン抗体および抗ミオグロビン抗体を用いて得られた免疫沈降物からアセトンで抽出したところ、ZnPP特有の蛍光スペクトルが観察された。このことから、弱アルカリで抽出されるZnPPは、パルマハムのpHでは不溶化して存在するヘモグロビンおよびミオグロビンとの複合体として存在していることが示唆された。

3.3 新規ZnPP形成モデル実験系の構築

我々が以前に構築した至適pH 5.5のモデル実験系の基本プロトコールは、20%の豚最長筋懸濁液を塩酸でpH 5.5に調整し、微生物の生育を抑えるように抗生物質を添加したものを、嫌気的条件下で25℃、7日間インキュベートしたものからアセトンで抽出して全ZnPPを抽出して評価した⁹⁾。しかし、パルマハムでは水抽出可能なZnPPと水

抽出できないZnPPが存在すること³⁾から、本研究で検討したモデル実験系ではインキュベート後に遠心分離を行い、上清と残渣に含まれるZnPPの形成量から評価することにした。

初めに、豚肉の含有量について検討したところ、豚肉の含有量の増加に伴い、水抽出できるZnPPと水抽出できないZnPPはいずれも増加した。含有量が50%を超えると、粘性が高く定容できないことから、豚肉含有量を50%とした (Fig. 2A)。次に、インキュベート温度を変えてインキュベートしたところ、水抽出できるZnPPならびに水抽出できないZnPPのいずれも35℃で形成量は最大になり、それ以上の温度では形成量はやや低下した (Fig. 2B)。次に、豚肉懸濁液のpHを変えたものをインキュベートしたところ、水抽出できるZnPPはpH 5.5で最大になったが、水抽出できないZnPPはpH 4.75および5.0で著しく形成した (Fig. 2C)。上述のパルマハムにおけるZnPPの水抽出率 (40~80%) とパルマハムのpH (6.0~6.4) を考慮して、水抽出できるZnPPが最大になったpH 5.5を選択した。最後に、インキュベート日数について、1~19日まで検討したところ、インキュベート日数の増加に伴い、水抽出できるZnPPと水抽出できないZnPPのいずれも増加した (Fig. 2D)。微生物の混入はZnPP形成を促進することから、モデル実験系には抗生物質を添加しているが、殺菌作用はないため長期間では微生物の増殖する可能性がある。このため、1日間と比べて有意な増加が見られた10日間をインキュベート日数とした。

本研究で構築したモデル実験系でのZnPP形成量を、従来のモデル実験系でのZnPP形成量と比べたところ、水抽出できるZnPPの形成量は約10倍に増加し、水抽出できないZnPPも約5倍に増加した (Fig. 3)。ZnPPの水抽出率も40%程度と、上述のパルマハムのものと同程度であった。さら

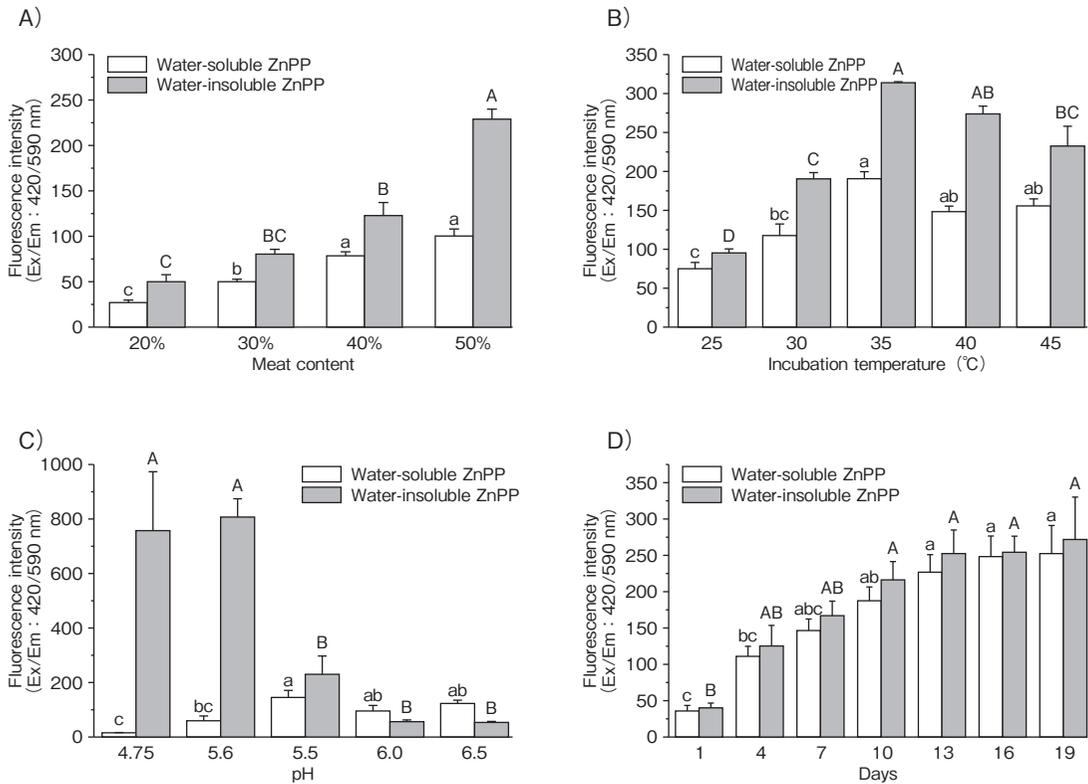


Fig. 2 Effects of meat content (A), incubation temperature (B), pH (C) and incubation days (D) on ZnPP formation in new experimental model

Bars represent standard errors (n = 3). abc : Significant differences among water-soluble ZnPP groups, ABCD : Significant differences among water-insoluble ZnPP groups ($p < 0.05$).

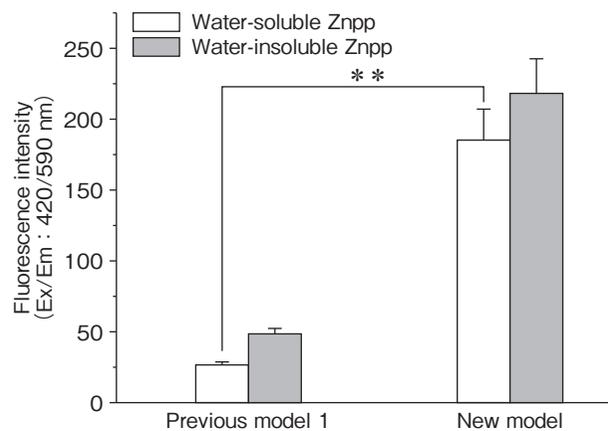


Fig. 3 Fluorescence intensities of water-soluble and water-insoluble ZnPP in previous and new models

Bars represent standard errors (n = 3). ** : $p < 0.01$

に、新しいモデル実験系で形成した水抽出できる ZnPP を尿素ゲル電気泳動に供したところ、パルマハム水抽出物とほぼ同じところに、ZnPP 由来の自家蛍光バンドが観察され、これらはウェスタンブロットリング法により Wang ら³⁾ が報告したヘモグロビンのバンドと一致した。従来のモデル実験系では、形成量が少なく尿素電気泳動で ZnPP のバンドが観察されなかったが、本研究で構築した新しいモデルでは、パルマハムで観察される ZnPP 結合タンパク質と同一のバンドを短期間で ZnPP を形成させることができることから、ZnPP 形成機構の解明に有用なツールとなり得ることが示唆された。

4. 要 約

本研究では、パルマハムにおける ZnPP 形成機構解明を目的として、不溶性 ZnPP の存在形態を明らかにすることと、形成量のより多い *in vitro* の ZnPP 形成モデル実験系を再構築することとした。ZnPP の含有量については筋肉や個体の違いによるばらつきが大きかったが、水抽出率と筋肉部位の pH との間に強い正の相関があり、ZnPP の水抽出率は pH 9 で最大となった。パルマハム水抽出残渣の弱アルカリ抽出液をサイズ排除クロマトグラフィー、ウェスタンブロットリング法およ

び免疫沈降法から、弱アルカリで抽出される ZnPP は、パルマハムの pH では不溶化して存在するヘモグロビンおよびミオグロビンの複合体として存在していることが示唆された。新しく確立したモデル実験系は、従来法よりも ZnPP 形成量はおよそ 10 倍高く、形成された ZnPP はパルマハムと同様の複合体を形成しており、パルマハムにおける ZnPP 形成機構解明に有用であることが示された。

文 献

- 1) Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.* **67**, 95~100, 2004.
- 2) Labbé, R. F., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Labbe, R. F. : *Clin. Chem.* **45**, 2060~2072, 1999.
- 3) Wang, H. C., Hayakawa, T., Kumura, H., Wakamatsu, J. I. : *Food Bioscience.* **40**, 100870, 2021.
- 4) Morita, H., Niu, J., Sakata, R., Nagata, Y. : *J. Food Sci.* **61**, 1021~1023, 1996.
- 5) Adamsen, C. E., Møller, J. K. S., Hismani, R., Skibsted, L. H. : *Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 403~409, 2004.
- 6) Becker, E. M., Westermann, S., Hansson, M., Skibsted, L. H. : *Food Chem.* **130**, 832~840, 2012.
- 7) Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari, Y., Kitajima, S. : *Biochemistry*, **46**, 15054~15061, 2007.
- 8) Wakamatsu, J., Akter, M., Honma, F., Kumura, H., Nishimura, T. : *LWT - Food Science and Technology*, **101**, 599~606, 2019.
- 9) Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A. : *Meat Sci.* **68**, 313~317, 2004.

食肉の風味を構成する呈味性化合物の分画および メタボローム解析

Metabolomic analysis of taste components fraction to characterize meat
flavor

水野谷 航・竹田 志郎・森川 里久*・澤野 祥子*・齊藤 千佳*・良永 裕子*
(麻布大学獣医学部, *麻布大学生命・環境科学部)

Wataru Mizunoya, Shiro Takeda, Riku Morikawa*, Shoko Sawano*, Chika Saito* and Yuko Yoshinaga*
(School of Veterinary Medicine, Azabu University, *School of Life and Environmental Science, Azabu University)

The meaty taste is considered to be a complex group of taste compounds rather than limited known components such as free amino acids and nucleic acid related substances. We fractionated the hot water extracts of beef by medium pressure chromatography, and subjected each fraction to TLC to confirm the separation of the compounds. Beef extract was separated by ODS column and two major broad peaks were observed in UV absorption, the first peak was assigned to Fr. 3 and 4, and the second half peak was assigned to Fr. 5 and 6 in the first sample. Silica gel TLC showed a continuous spots consisting of ninhydrin positive multicomponent at R_f (Relative to front) 0-2 in Fr. 3 and 4. In Fr. 5 and 6, there was a spot near R_f 0.4 that was detected by UV and another spot that showed weak reaction with ninhydrin. By the sensory test comments of the first sample, it was found that Fr. 3 had a salty and meaty taste, but Fr. 5 and 6, which were thought to have less free amino acids, also had a meaty taste. In addition to the free amino acids in Fr.5, other components may also affect the meat taste. We also performed the metabolomic analysis with these fractions. The principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) showed that there were large differences in the groups of compounds among fractions, suggesting that the compounds were separated sufficiently. As a result, there was a remarkable difference in the substances contained in the fractions with different sensory evaluations. In particular, the fraction evaluated as "meat-like" contained about 60 compounds, including many substances in addition to free amino acids.

1. 目 的

食肉を食味評価する際の化学的因子として味と香りがある。食肉の味に関する成分として、アミノ酸、ペプチドと核酸関連物質（イノシン酸等）がよく知られている。アミノ酸は水に溶けると味

を示すものが多い。このアミノ酸は食肉の最も重要な呈味性化合物と考えられている。アミノ酸に加えて、核酸関連物質のイノシン酸も食肉の味の重要な成分である。イノシン酸は単独でもうま味を示すが、アミノ酸と同時添加することでアミノ酸の味覚応答がかなり強化される。このような物

質は味覚調節物質と呼ばれ、イノシン酸だけでなく、いくつかの食肉由来ペプチドにはうま味増強作用や酸味抑制作用があることが知られている¹⁾。アミノ酸は食肉の加熱調理においてメイラード反応の基質となることから、フレーバーの生成にも重要な役割を果たす。食肉ではアミノ酸は熟成中にタンパク質が分解することで増加すると考えられているが、と畜直後あるいは生体でも筋組織には遊離アミノ酸が常に一定量存在している。また含硫アミノ酸代謝物のタウリンも、牛肉のうま味の強さと正の相関を示し²⁾、コク味との関連性も報告されていることから、食肉の呈味性化合物の一種と考えられる。以上より、食肉の風味を構成する化合物について、ある程度分かっているが、まだ未解明の要素が多く残っている。

食品科学分野において、品質管理の最適化や食品の鮮度や加工の評価、食材品種の判別、嗜好性や機能性の因子解明という点で、“フードメタボロミクス”として網羅的成分分析に基づくメタボローム解析を活用した報告が増えている^{3,4)}。食肉でもメタボローム解析の応用は増えている。Jiangらはいくつかの牛挽き肉のメタボローム解析と官能評価の結果を比較し、牛挽き肉の官能評価の違いを生む33の物質（化合物の同定には至っていない）をあげている⁵⁾。また、Muroyaらは牛肉の熟成中に増加する物質の解析にメタボローム解析を応用している⁶⁾。したがって、メタボローム解析は食肉の風味の解析に非常に有用な手法であることが示唆される。

食肉の呈味性化合物の多くは筋細胞に存在する代謝基質（あるいはこれらの物質が加熱により変化した化合物）である。我々は性別や飼育条件、加熱条件が異なる豚肉をメタボローム解析に供して調べた結果、約130の物質についてピークが同定され、これらの組成比は飼育条件や加熱調理で異なることが示され、食肉の風味との関連が推測

された⁷⁾。解析対象物質には遊離アミノ酸や核酸関連物質以外の物質も多数含まれていたが、それらの物質が食肉の風味にどの程度影響を与えているかは、いまだよく分かっていない。

そこで、本研究は肉の熱水抽出物のカラムクロマトグラフィ分画物の官能評価とメタボローム解析を組み合わせることで、食肉の風味を特徴付ける化合物（群）を新規に見出すことを目的とする。本研究の実施から食肉の風味を構成する化合物の全体像を描き出すことができると期待される。

2. 方法

2.1 実験材料

国産ホルスタイン去勢オスの市販の牛モモ肉（試料1）の脂身を包丁で取り除いた後、フードプロセッサーでミンチ状にし、100 g に対し沸騰水600mLを入れ20分間加熱した。このようにして得られた肉熱水抽出液を濾過後、エバポレーターで濃縮乾固を行い、再度蒸留水に溶解させて0.45 μmフィルターで濾過を行い、それを肉抽出液として使用した。次に、交雑種去勢オスの牛ヒレ肉の市販品を購入し、同様に調製した（試料2）。ただし、試料2は脂肪分が多かったため、熱水抽出液を氷水で冷却し固化した脂肪分を取り除く作業を加えた。

2.2 中圧クロマトグラフィーによる肉抽出物の分画

試料1の抽出液1.5mL（牛肉0.4 g相当）をスモールスケールの逆相系ODSカラム（ODS-SM-50A, 山善）に流速1.0mL/minで、10%エタノールでイソクラティックに展開して8フラクション（Frs. 1-8）を分取した。試料2の抽出液2.0mL（牛肉12 g相当）は、ラージスケールの水系逆相ODSカラム（ODS-A-40B, 山善）に流速4.0mL/minで、蒸留水で10分、1%エタノールで6分（Frs. 1-4）、2%エタノールで4分（Frs.

5-8), 3%エタノールで8分 (Fr. 9-13), 5%エタノールで6分 (Fr. 14-16) のステップワイズ法で分画した。最後は100%エタノールで溶出を行った。検出はUV検出器 (254nm) を用いて行った。

2.3 薄層クロマトグラフィー (TLC)

中圧カラムクロマトグラフィーで分画した各フラクションはODSプレート (RP-18 W F254s, Merck) とSiO₂ (シリカゲル) プレート (TLC Silica Gel 60 F254, Merck) で, ODSプレートはエタノール:酢酸:水=1:1:18, SiO₂プレートは, ブタノール:酢酸:水=4:2:1の展開溶媒で展開し, 254nmのUV吸収, ニンヒドリンおよび10%硫酸との加熱による呈色反応で検出した。

2.4 官能試験

各フラクションは蒸発乾固の後, 少量の蒸留水で溶解した。男女7名を被験者とした。各被験者は蒸留水で溶解したフラクション溶液約50 μ Lを口に含んだ後, 各フラクションについて感じたコメントを自由に記載してもらった。試料2については, 評価項目として「肉らしさ」を0~3の4段階で評価した。

2.5 メタボローム解析

官能試験の結果, 風味を感じたフラクションを中心にメタボローム解析に供した。解析したサンプルは試料1からFr. 3とFr. 5, 試料2からFr. 4-6の混合溶液, Fr. 7-9の混合溶液, Fr. 11溶液, Fr. 13溶液, Fr. 14-16の混合溶液, 100%エタノール溶出画分および試料1と試料2のクロマトグラフィー抽出液の合計10検体とした。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 (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。

3. 結果と考察

肉熱水抽出液 (試料1) をODSカラム (ODS-SM-50A) で分離したところ, UVの吸収において2つのピークを確認することができ, 前半のピークをFr. 3, 4, 後半のピークをFr. 5, 6に割り当てた (Fig. 1)。シリカゲルTLCでは, Fr. 3, 4においてRf (Relative to front) 0-2にニンヒドリン陽性の多成分からなる連続スポットが見られた。したがって, Fr. 3, 4ではアミノ基をもち極性の高い成分, すなわちアミノ酸が多く含まれる画分と考えられた (Fig. 2)。Fr. 5, 6においてはRf 0.4付近にUVで検出されたスポットとニンヒドリンで弱い反応を示すスポットが見られた。一方, Table 1に示した試料1の官能検査のコメントを見ると, Fr. 3では塩味や肉様の呈味性があることが分かったが, 遊離アミノ酸が少ないと思われるFr. 5, 6でも肉様の呈味性が見られたことから, 単独の物質が肉の風味を決めているわけではない点と, Fr. 5の遊離アミノ酸以外の成分も風味に影響を与える可能性を示している。

肉熱水抽出液 (試料2) をラージスケールのODSカラム (ODS-A-40B) で, ステップワイズ法で分離したところ, 顕著なUVの吸収は見られなかったが, シリカゲルTLCでは, Fr. 9-12においてRf 0.4付近にニンヒドリン陽性の複数のスポットが見られた (Fig. 3)。したがって, UVの吸収は見られなかったが, 肉熱水抽出液に含まれる化合物の分離はできていることが示唆された。また, Fr. 15, 16はUVとニンヒドリンで検出はなかったが濃縮すると白色沈殿が観察された。Fr. 3, 4ではアミノ基をもち極性の高い成分, すなわちアミノ酸が多く含まれる画分と考えられた。Fr. 5, 6においてはRf 0.4付近にUVで検出されたスポットとニンヒドリンで弱い反応を示すスポットが見られた。Table 2に示した試料2の官

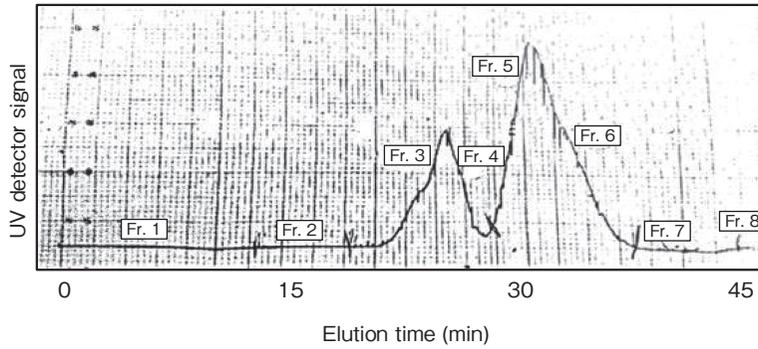


Fig. 1 Chromatogram of medium pressure column chromatography. The hot water extract of beef sample (sample No.1) was separated by ODS column. The 10% ethanol at the flow rate of 1.0 mL/min was used for isocratic elution. Total eight fractions were obtained.

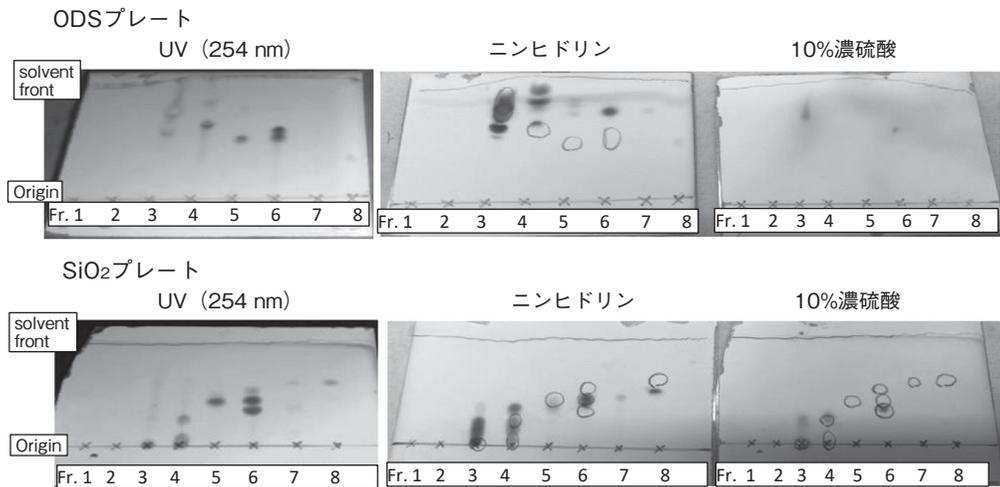


Fig. 2 Thin layer chromatography (TLC) analysis of the fractionated substances derived from beef sample (sample No.1) by the medium pressure chromatography. TLC was done on a regular ODS and silica plate. The plate was eluted with ethanol : acetic acid : water 1 : 1 : 18 (by volume) for ODS plate and butanol : acetic acid : water 4 : 2 : 1 (by volume) mixture followed by exposure to UV light (254 nm), ninhydrin stain and 10% sulfuric acid spray with heating. The circles drew in the plates indicate spots detected by UV light.

Table 1 官能検査のコメント (試料1)

フラクションNo.	評価コメント
1	何も感じない (7名)
2	何も感じない (7名)
3	塩味 (4名), はっきりとした味 (刺激) (1名), だし (1名), 肉の味 (1名)
4	Fr.3より薄い (1名), Fr.3と似ている (1名), 肉の味 (3名), 弱くなったが肉 (1名)
5	におい (強い) が肉 (1名), 味はマイルド (1名), Fr.4より肉 (4名), 肉の味 (4名) 後味がしつこい (1名)
6	何も感じない (7名)
7	あと味のある味 (1名), 表現できない味 (うま味, 甘味) (1名)
8	香り? 喉に何かあるかなという感じ (肉ではない) (2名)

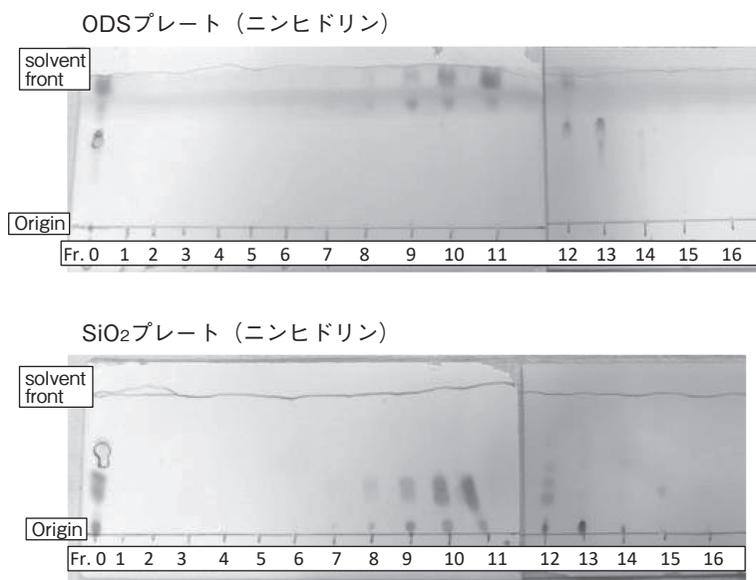


Fig. 3 Thin layer chromatography (TLC) analysis of the fractionated substances derived from beef sample (sample No.2) by the medium pressure chromatography. TLC was done on a regular ODS and silica plate. The plate was eluted with ethanol : acetic acid : water 1 : 1 : 18 (by volume) for ODS plate and butanol : acetic acid : water 4 : 2 : 1 (by volume) mixture followed by ninhydrin stain.

Table 2 官能検査のコメント (試料2)

フラクションNo	評価 平均値	評価コメント
1	0	水ではない (3名)
2	0	べちよっとする味 (1名)
3	0	何かある (1名), 刺激? (1名)
4	1	肉ではないが味はある (3名), 肉っぽいなにか (1名)
5	1	肉ではないが味はある (3名)
6	1	弱い肉に近い (1名)
7	1	何かある (1名), 肉!? (1名)
8	1	Fr.6,7よりは強い肉 (2名)
9	2	うま味 (2名), 塩味 (1名), ねちよ肉 (1名), 何かある (1名)
10	2.5	Fr.9より強いうま味 (1名), 塩味 (2名), ダシっぽい (1名), 肉らしさがある (1名)
11	3	濃厚 (1名), 味が強い (1名), Fr.8,9よりうま味, 塩味が強い (1名)
12	2	11よりは薄い (2名), 肉っぽい (1名), 塩味が弱くなった (1名)
13	1.5	酸味? (3名)
14	1	弱い酸味 (2名)
15	0	何もない (4名)
16	0	何もない (4名)
EtOH	3	何か足りない肉の味 (培地っぽい) (4名)

能検査のコメントを見ると、全体的に試料1と比べ呈味性は弱かったが、Fr. 11で最も強い味刺激が得られた。ただ100%エタノールでカラムを溶

出した溶出液の評価は、培養細胞の培地のよう、という食肉の風味との関連は推測されるが、好ましい評価ではない意見が見られた。

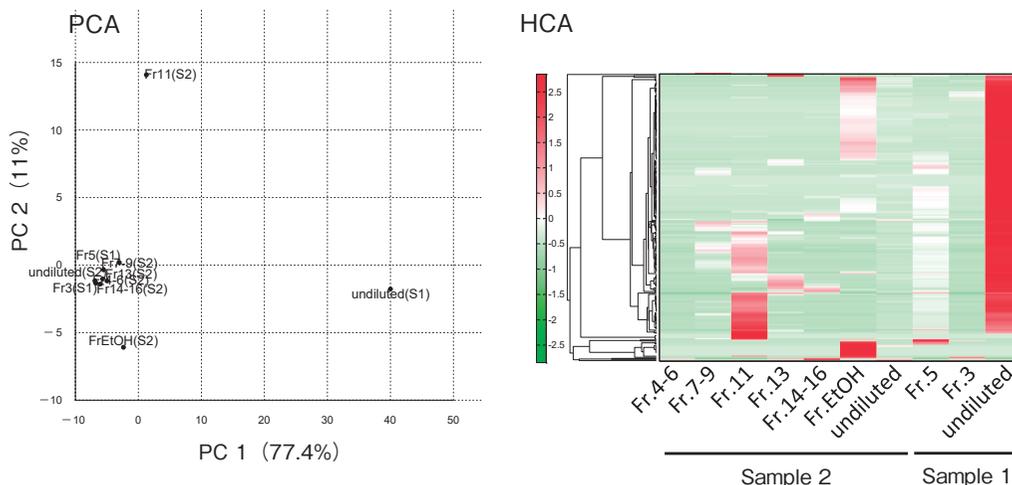


Fig. 4 Principal component analysis (PCA) and hierarchical clustering analysis (HCA) of whole metabolites detected in fractions and/or undiluted beef samples (sample No.1 and No.2).

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) と階層的クラスタリング解析 (HCA) の結果から、フラクションに含まれる化合物群で大きな違いがあることが分かり、化合物の分離はできていることが示唆された (Fig. 4)。一方、肉抽出液の原液では試料 1 と試料 2 で化合物の濃度に大きな違いがあった。この理由は今のところ不明であるが、材料の違い、脂肪分除去操作の影響が考えられた。検出できた各代謝物については、フラクションによって大きく異なっていた。ニンヒドリンの反応から予測されたように試料 1 の Fr. 3 と Fr. 5 にはそれぞれ含まれる化合物群は異なっていた。また、含まれる化合物には複数の種類のアミノ酸が含まれていた。さらに、アミノ酸以外にも多くのジペプチドや有機酸も含まれていた。特にアミノ基を有するペプチド類はニンヒドリンとも反応することから、ニンヒドリンと反応した物質はジペプチドも含まれていた可能性が高い。試料 2 についてもフラクションによって含まれる化合物は大きく異なることが分かった。特に呈味性を示さなかったフラクションにも化合物が多く含まれていたことか

ら、これらの物質は食肉の呈味性については、直接的な影響はないことが示唆された (他の味を修飾する可能性はある)。官能検査で食肉の風味を感じた試料 2 の Fr. 11 には約 60 の化合物が含まれていた。今後は、この物質がどれほど呈味性に影響するかを検証していきたい。

4. 要 約

食肉の呈味成分、いわゆる食肉らしさの特徴づける味は、単独の呈味成分ではなく複合的に含まれている呈味性化合物群であると考えられる。我々は食肉熱水抽出物をクロマトグラフィで分画し、各分画物を TLC に供し化合物の分離が達成できたことを確認するとともに、分画物の官能評価から食肉らしい風味を有する画分を見出し、メタボローム解析を行った。その結果、官能評価が異なる画分では含有物質には大きな違いがあった。特に食肉らしいと評価された画分では約 60 の化合物が見出され、その中には食肉の呈味性に最も重要と思われる遊離アミノ酸以外の物質も多数含まれていた。

文 献

- 1) 岸恭一, 西村敏英編: タンパク質・アミノ酸の科学, 工業調査会, 2007.
- 2) Suzuki, K., Shioura, H., Yokota, S., Katoh, K., Roh, S. G., Iida, F., Komatsu, T., Syoji, N., Sakuma, H., Yamada, S.: *Anim. Sci. J.*, **88**(3), 421~432, 2017.
- 3) Wishart, D. S.: *Trends Food Sci. Technol.*, **19**(9), 482~493, 2008.
- 4) Cevallos-Cevallos, J. M., Reyes-De-Corcuera, J. I., Etxeberria, E., Danyluk, M. D., Rodrick, G. E.: *Trends Food Sci. Technol.*, **20**(11-12), 557~566, 2009.
- 5) Jiang, T., Bratcher, C. L.: *Food Res. Int.*, **90**, 298~306, 2016.
- 6) Muroya, S., Oe, M., Ojima, K., Watanabe, A.: Metabolomic approach to key metabolites characterizing postmortem aged loin muscle of Japanese Black (Wagyu) cattle, *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, **32**(8), 1172, 2019.
- 7) Sawano, S., Oza, K., Murakami, T., Nakamura, M., Tatsumi, R., Mizunoya, W.: *Metabolites*, **10**(1), 10, 2020.

食肉製品の香気分析に基づく品質管理手法の開発

Development of quality control method of meat products based on flavor analysis

河原 聡

(宮崎大学農学部)

Satoshi Kawahara

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The taste of meat products is one of the essential qualities, as is the hygienic quality. This study investigated the relationship between quality evaluation results by typical methods such as sensory tests and aroma component composition.

Among the sausages manufactured by a domestic meat processor, the same lot of sausages whose off-flavor was detected during the quality inspection process within the company was used as samples. As typical quality evaluation items, lipid content and fatty acid composition, TBARS value, product color, and aroma components were analyzed. At the same time, a sensory evaluation of flavor was also carried out.

For the off-flavor samples tested this time, increases in TBARS value and decreases in b^* value (yellowness) on the product surface were observed. In addition, the analysis results of the flavor components showed an increase in the compounds related to lipid oxidation and a decrease in the smoke component. These results were in agreement with the results of the sensory evaluation. Therefore, the above results suggested that it is possible to evaluate the change in taste or quality of meat products by analyzing the flavor component.

1. 目 的

食肉製品の食味性は、衛生品質とならび、最も重要な品質の一つである。食品の食味性は味、香り、食感などで形成されることが知られており、食肉製品においては、原材料や調味料、添加物、製造工程や製造条件など、さまざまな要因により変化する。

食品から生じる香気成分は鼻先香や口中香を形成する要因であり、消費者にも鋭敏に知覚される食味の構成要素である。香気に対する人の嗜好性

は生活環境や食習慣など、経験則に基づく学習により形成され则认为られているが、異臭については生体防御に近い本能的な感覚であるとされている。それゆえ、人の知覚においても比較的感度が高く、検知した際の嫌悪感が強いいため、製品に対する苦情の原因となりやすい。

製品の呈味の評価は一般に官能評価により行われるが、官能評価員の主観に依存した手法のため、その精度や再現性に問題が生じやすい。また、機器分析などから得られる数値データと比較して、官能評価の結果は可視化が難しく、管理手法

として利用しにくい。

そこで本研究では、食品の呈味に直接的な影響を及ぼす食肉製品の香気成分を分析し、その結果により製品の品質を管理することの可能性に着目した。香気成分分析は、その成分の回収操作が煩雑であり、かつ再現性に乏しいことに起因して、食肉製品の品質管理に利用されることは少なかった。しかし、上述のような特性を鑑みて、香気成分に基づく品質管理と品質改善は食肉産業において非常に重要な検討課題である。

本申請課題では上記の観点に基づき、官能検査をはじめとする伝統的な手法による品質評価結果と香気成分組成との関連を検討する。これにより得られる知見に基づき、最終製品の官能的な品質を可視的に、より精度高く推測する手段を考案することを最終的な目的として実施するものである。

2. 方 法

供試材料は、国内の食肉加工業者において製造された食肉製品（ソーセージ）のうち、同社内の品質検査の過程で風味異常（オフフレーバー）が検知されたものと同ロットの製品を提供していただいた。また、比較対照には同社同銘柄の市販製品を用いた。分析までの間、製品は包装状態のまま、 -70°C で保存した。

製品の品質評価項目として、脂質含量、脂肪酸組成、チオバルビツール酸反応物質値（TBARS値）、製品の色調、官能評価および香気成分分析を実施した。脂質含量は重量法で行った。脂肪酸組成分析のための脂肪酸メチルエステルの調製は、Folchらの方法（1957）¹⁾に準じて総脂質を抽出した後、Takenoyamaらの方法（1999）²⁾に準じて、けん化とメチルエステル化を行った。脂肪酸メチルエステルの分析は、Rtx-WAX[®]（0.25 mmID×30m、膜厚0.25 μm 、Restek社）および水素炎イオン化検出器を装着した島津製作所社製

GC-2010を用いて、以下の条件で行った。

キャリアガス：He、流速：25cm/秒、気化室温度：250 $^{\circ}\text{C}$ 、検出器温度：250 $^{\circ}\text{C}$ 、カラム温度：160 $^{\circ}\text{C}$ 、3分保持→240 $^{\circ}\text{C}$ （4 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）

TBARS値の測定は、Yamauchiらの方法（1980）³⁾に準じて行った。

製品色の色調測定は、製品表面および接断面について色彩計（MINOLTA CM-23d）を用いて行った。

官能検査は、本学学生10名をパネルとして、市販製品および異常製品の2点比較法により口中香の質の差異、口中香の強さ、口中香の好ましさを評価した。また、各製品に感じた特徴について自由記述を求めた。官能評価にあたっては、あらかじめ樹脂包材に真空包装した製品をウォーターバス（70 $^{\circ}\text{C}$ ）で20分間湯煎したのち、包材から製品を取り出し、厚さ約3mmの輪切りにして、ただちにパネルによる評価を実施した。パネルに提供する製品の組み合わせは乱塊法により決定し、順序効果は本試験では誤差要因とした。

香気成分の分析試料は、官能評価と同様に、70 $^{\circ}\text{C}$ 、20分間加温した後、流水中で10分間放冷した。その後、包丁で細切し、ブレード型のホモゲナイザー（AM-7、日本精機製）を用いて氷冷下にジクロロメタンで香気成分を抽出した。その後、抽出液をsolvent-assisted flavor evaporation（SAFE、桐山製作所製）にて揮発性成分の減圧蒸留を行った。蒸留物をジクロロメタンに再溶解し、クデルナ・ダニッシュ濃縮器で濃縮した後、GC-MS分析を行った。

GC-MS分析は、Rtx-WAX[®]（0.25mmID×30m、膜厚0.25 μm 、Restek社）を装着したGCMS-QP5050（島津製作所製）により行った。分析条件は、キャリアガス、He；気化室温度、200 $^{\circ}\text{C}$ ；カラム温度、40 $^{\circ}\text{C}$ ～220 $^{\circ}\text{C}$ （40～100 $^{\circ}\text{C}$ まで5 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ 、100～220 $^{\circ}\text{C}$ まで10 $^{\circ}\text{C}/\text{分}$ ）；イオン化電圧、

70eV；スキャンレンジ，33-400m/zとした。各成分の同定は，標準物質（標品）に対する相対保持時間（Kováts, 1958）⁴⁾ およびNISTデータベースにより行った。

3. 結果と考察

市販されている正常製品と製造業者内での官能評価でオフフレーバーが検知されたロットの製品（オフ製品）の品質評価結果をTable 1に示す。原料品質の指標として測定した脂質含量に明確な差異は認められなかったが，脂質酸化の指標であるTBARS値についてはオフ製品が若干高い値を示した。なお，本研究で試料としたソーセージは加熱食肉製品であることを考慮すると，オフ製品で得られたTBARS値は製品不良とするほどの高値ではなかった。

加熱食肉製品においては塩漬やくん煙の作用により，一般に脂質酸化が抑制されると考えられている。塩漬剤に含まれる亜硝酸塩から生成する一酸化窒素（NO）がミオグロビンのヘム鉄と結合することで，食肉製品に特徴的な塩漬肉色を付与する。また，ヘム鉄へのNOの結合は，ヘム鉄の酸化還元電位を安定化し，鉄の酸化に起因する脂質酸化を抑制することが知られている。本研究では，鉄の安定化について直接的な評価を行わなかったが，製品内部の色調（Table 1の断面色）

は，すべての項目で製品間の差異は認められなかった。このことは，すべての製品で適切に塩漬が行われていたことを暗示するものと考えられた。

塩漬やくん煙の状態を推測する指標として，製品の表面および断面の色調を測定した。製品表面の色調（Table 1の表面色）については，明度（L*値）および赤色度（a*値）には顕著な差異は認められなかった。それに対して，黄色度（b*値）はオフ製品でやや低い値を示した。食肉製品表面の色調は主にくん煙により付与され，煙中の成分に由来する褐色に特徴付けられる。オフ製品の表面色におけるb*値の低下は，製造工程においてくん煙成分が製品表面に十分付着していなかったことを示唆すると考えられた。

食肉製品の香りや風味には，脂肪の品質，すなわち脂肪酸組成が大きな影響を及ぼすことが知られている。本研究で用いた試料については，それぞれの平均的な脂肪酸組成に明確な差異は認められなかった（Table 2）。これらの結果および脂質含量の結果から，品質検査時における風味異常あるいは脂質酸化の進行は原材料の品質が主な原因ではないと推測された。

SAFE装置によりソーセージから抽出した香気成分のGC分析結果をTable 3に示す。本研究においては，正常製品あるいはオフ製品を明確に区別できるような，特徴的な成分の変化は観察できな

Table 1 食肉製品の品質評価結果

		正常製品	オフ製品	p
脂質含量 (g/100 g)		29.3 ± 1.69	29.2 ± 0.91	0.948
TBARS値 (mg MDA/kg)		0.034 ± 0.014	0.163 ± 0.080	0.022
表面色	L*	59.66 ± 1.43	60.65 ± 2.53	0.542
	a*	13.30 ± 1.16	12.99 ± 0.74	0.714
	b*	28.52 ± 0.84	25.23 ± 2.61	0.081
断面色	L*	68.20 ± 3.99	67.54 ± 1.97	0.809
	a*	11.00 ± 1.84	10.48 ± 0.80	0.678
	b*	8.68 ± 0.59	8.79 ± 0.61	0.806

pはWelch検定による有意確率を示す

Table 2 総脂質の脂肪酸組成 (g/100g総脂肪酸)

化合物名	正常製品	オフ製品
14:0	1.11 ± 0.02	1.15 ± 0.03
16:0	22.1 ± 0.2	22.6 ± 0.4
16:1 n-7	1.98 ± 0.02	1.98 ± 0.08
18:0	12.0 ± 0.5	12.5 ± 0.7
18:1 n-9	41.8 ± 0.1	40.8 ± 0.9
18:1 n-7	2.72 ± 0.09	2.73 ± 0.08
18:2 n-6	14.5 ± 0.5	14.6 ± 0.8
18:3 n-3	0.78 ± 0.09	0.80 ± 0.12
20:4 n-6	0.34 ± 0.02	0.34 ± 0.01
others	2.59 ± 0.04	2.52 ± 0.08
SFA	35.9 ± 0.7	36.9 ± 1.1
MUFA	47.7 ± 0.2	46.6 ± 1.1
PUFA	16.4 ± 0.7	16.5 ± 0.9

かった。しかし、主に脂質酸化に起因する hexanal などのアルデヒド類や一部のケトン類は オフ製品で増加する傾向が認められた。これは、オフ製品において TBARS 値が比較的高値を与えた事実を裏付けるものであった。また、個々の分量に明確な差異はないものの、くん煙に起因するフェノール化合物や環状ケトン類は、オフ製品で低値を与える傾向が認められた。

学生をパネルとする官能評価において、「正常製品」と「オフ製品」の口中香は、2点比較（食べ比べ）をすれば確実に検出されるほど、明確な違いがあることが示された (Table 4)。また、口中香の「強度」はパネルあるいは被験試料の組み合わせにより揺らぎを生じるものの、「正常製品」がより「好ましい」と評価される傾向にあることが示された (Table 5)。また、官能評価にあわせて実施したアンケートでは、オフ製品について「酸敗臭」や「生臭さ」を感じた、あるいは「スモーク感が弱い」というコメントが寄せられた。対照的に、正常製品については、「食肉製品の風味」や「スモーク感」を強く感じたというコメントがあった。

以上の結果より、製造工程でオフフレーバーが検出された製品では、くん煙が不均一で、くん煙

Table 3 ソーセージに認められた主な香気成分 (ppm)

	正常製品	オフ製品
Lipid oxidation	72.7	80.5
<i>Hydrocarbones</i>		
Heptane	2.4	2.9
Octane	0.7	0.6
<i>Aldehyde</i>		
Propanal	3.7	4.2
Butanal	1.7	2.5
Hexanal	17.0	22.4
<i>Ketones</i>		
2-butanone	8.9	7.6
2-heptanone	10.8	10.1
2,3-octanedione	8.0	9.4
3-methylbutanone	4.3	4.4
<i>Alcohols</i>		
1-pentanol	8.6	8.2
1-penten-3-ol	2.2	3.3
<i>Furans</i>		
2-methylfuran	1.3	1.4
2-ethylfuran	3.1	3.5
Amino acid degradation	27.0	27.3
2-methyl-1-propanol	4.9	6.9
2-methylbutanal	6.4	5.9
3-methylbutanal	15.7	14.5
Smoke	37.1	26.6
<i>Phenolic compounds</i>		
Phenol	2.3	2.5
2-methylphenol	3.6	2.6
2-methoxyphenol	13.8	10.4
<i>Cycloketones</i>		
Cyclopentanone	1.2	1.1
Cyclohexanone	9.8	3.1
3-methylpyridine	4.2	4.5
2-furanmethanol	2.2	2.4
Spices		
Eugenol	7.4	7.9

臭が十分に付与されていない可能性が示唆された。くん煙は、その前後に乾燥および加熱調理の工程を含み、複雑な加工工程である。また、スモークチャンバーの仕様や性能などの要因によって、同じロットの製品でも品質のムラが生じやすいものと推測される。くん煙の不良は製品表面の色調や香気成分、特にフェノール化合物の含量低下に

Table 4 官能評価における「口中香の質の違い」の回答

	ある	ない
パネルの回答数	40	0

総回答数 = 40

Table 5 ソーセージの官能評価結果

	正常製品	オフ製品	p
「強い」という回答数	24	14	0.268
「好ましい」という回答数	26	13	0.081

総回答数 = 40

p: 正常製品を選択する場合の二項確率を示す

より検出することが可能であると推測された。また、脂質酸化の進行についても、脂質酸化により生成するアルデヒド類の増加により検出できるものと予測された。

オフフレーバーの発生原因は多様であるため、今後、同様の性状を示すさまざまな製品の検査点数を増やし、製品の加工不良や脂質酸化などの品質劣化と相関する臭気成分を精査することで、香気成分に基づく品質管理が可能であると考えられた。

4. 要 約

風味異常（オフフレーバー）を呈する食肉製品の品質変動を、その香気成分の変化により評価する方法について検討した。正常な製品およびオフフレーバーが認められた製品について、従来から用いられている品質評価指標および香気成分分析

を行った。その結果、品質評価指標についてはTBARS値の増加、製品表面の黄色度の低下が認められた。また、香気成分の分析結果では、脂質酸化に関連する成分の増加、およびくん煙成分の減少が観察された。これらのことから、本研究で用いた試料では脂質酸化の進行およびくん煙の不良が予測された。これらの結果は、官能評価の結果と一致するものであった。以上の結果から、香気成分を分析することにより、製品の呈味の変化あるいは品質の評価が可能であることが示唆された。

文 献

- 1) Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H.: A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues, *Journal of Biological Chemistry*, **226**, 497~509, 1957.
- 2) Takenoyama, S-I, Kawahara, S., Murata, H., Yamauchi, K.: Investigation of some preparation procedures of fatty acid methyl esters for capillary gas-liquid chromatographic analysis of conjugated linoleic acid in meat, *Animal Science Journal*, **70** (50), 336~342, 1999.
- 3) Yamauchi, K., Nagai, Y., Ohashi, T.: Quantitative relationship between alpha-tocopherol and polyunsaturated fatty acids and its connection to development of oxidative rancidity in porcine skeletal muscle, *Agricultural Biological Chemistry*, **44**, 1061~1067, 1980.
- 4) Kováts, E.: Gas-chromatographische Charakterisierung organischer Verbindungen. Teil I: Retentionsindices aliphatischer Halogenide, Alkohole, Aldehyde und Ketone, *Helvetica Chimica Acta*, **41** (7), 1915~1932, 1958.

次世代の培養肉作製のための骨格筋タイプ変換技術の基礎的研究

Basic research on skeletal muscle type conversion technology for the next generation of cultured meat

久保 純¹・井上 雄介²・山田 昭博¹・佐原 玄太¹・近藤 貴大¹・小椋 利彦¹

(¹東北大学加齢医学研究所, ²旭川医科大学先進医工学研究センター)

Atsushi Kubo¹, Yusuke Inoue², Akihiro Yamada¹, Genta Sahara¹, Takahiro Kondo¹ and Toshihiko Ogura¹

(¹Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University,

²Advanced Medical Engineering Research Center, Asahikawa Medical University)

Controlling the skeletal muscle type of cultured muscle is essential for the production of high-quality cultured meat. In this study, we developed an electrical pulse stimulator that can mimic the activity patterns of various motor nerves from slow to fast muscles, with the aim of establishing a skeletal muscle type conversion technology that does not require genetic manipulation such as viral transduction or genome editing. We were able to reduce the size and cost of the system by designing and manufacturing our own electronic circuit board, which is a significant improvement over our initial system that combines commercial devices. In addition, we recognized that the constant voltage stimulation method that we initially used may have reproducibility problems, so we changed it to a more reproducible constant current stimulation method.

When we performed stimulation experiments using cultured fast-twitch muscle derived from mouse myoblasts on a culture dish, we were able to increase the expression of slow-twitch myosin heavy chain gene, *Myh7*. At the same time, we were able to confirm the activation of transcription factors such as *Nfatc1*. In addition, we identified candidate transcription factors that may be involved in skeletal muscle type conversion. In knockout mice of one gene, the expression of *Myh4*, a fast-twitch myosin heavy chain, was drastically reduced. This gene may be involved in the determination of skeletal muscle type.

In this study, we also investigated a method to efficiently isolate myoblasts from various skeletal muscles. Under the myoblast culture conditions we identified, myoblast proliferation was greatly enhanced. We plan to apply these findings to cultured bovine and porcine muscle to control skeletal muscle type for high-quality cultured meat production.

1. 目 的

我々が食している肉はさまざまな部位からなり、味や食感が異なる。この部位の違いは筋肉と

脂肪組織の比率の違いのほかに、筋繊維ごとの違いにも起因していると考えられる。骨格筋は遅筋から速筋のバリエーションがあるが、代謝の違いから、脂質を主なエネルギー源とする遅筋、糖を

主なエネルギー源とする速筋に分類される（速筋はさらに、2A型、2X型、2B型の3種類に分類が可能¹⁾）。このように骨格筋は、筋繊維レベルで特性が異なっており、これらの特性の違いが食感や味の違いにも寄与していると考えられる。

一方で、次世代の食品加工技術として、動物の個体からではなく、筋肉細胞を培養皿上で培養し、成形した培養肉が近年登場してきた。高品質な培養肉を作製するためには、これらの筋肉のタイプを自在にコントロールする技術が必須といえる。

これまでの研究から、骨格筋タイプは転写因子とよばれるいくつかの遺伝子を操作することで、筋タイプの変換を誘導することが可能であることが分かってきた。しかし、食品という用途のために、分子生物学で汎用されるウイルスやゲノム編集等による遺伝子操作は安全性への配慮、消費者のイメージのために積極的な選択肢とはなりえない。遺伝子操作を用いずに、骨格筋のタイプをコントロールする方法論を確立することが必要である。そこで我々は骨格筋の可塑性に注目した^{2,3)}。骨格筋は神経の発火パターンに適応して、別の骨格筋タイプへと変化しうるということが知られている⁴⁾。この骨格筋の可塑性を利用し、遺伝子操作によらない骨格筋のタイプ変換技術を確立することが本研究の目的である。

2. 方法

2.1 細胞培養

C2C12細胞は牛胎児血清（FBS, Gibco : 10270-106）を10%含む培養液DMEM（nacalai）を用い、37°C、5% CO₂環境下で培養を行った。筋肉への分化誘導は、細胞をコンフルエントにした後、ウマ血清（gibco）を2%含むDMEMに交換し行った。

2.2 電気刺激装置

当初の電気刺激装置は直流安定化電源、ファンクションジェネレーター、オシロスコープを自作の電子回路を用いて接続し、Bipolarの電気パルスを発生できるようにした。装置改良では、上記市販装置が担っていた機能を持つ電子基板を設計・製造し、マイコンにより制御する構成に変更した。上記システムから生成される電気パルスを炭素電極を通じて培養皿上の培養筋肉に負荷した。初期型の刺激方式では定電圧制御であったが、より再現性が高いと考えられる定電流方式に改良した。

2.3 遺伝子発現解析

RNAの抽出はTrizol Reagentを用いた。組織サンプルのホモジナイズが必要な場合には、組織50-100mgに対して、1 mlのTrizol Reagentを用い、ビーズ破碎装置Microsmash MS100R（トミー精工）を用いて、破碎を行った。クロロホルム添加により得られた水溶性成分に対し、イソプロパノール沈殿を行い、RNAを回収した。RNAはReverTraAce qPCR Master Mix with gDNA Remover（TOYOBO）を用いて、逆転写した。合成したcDNAを鋳型として、各遺伝子の発現量を定量PCR装置CFX connect（Bio-Rad）により解析した。

2.4 遺伝子導入

培養筋肉への遺伝子導入はプラスミドを用いたトランスフェクション、またはアデノウイルスを用いた感染により実施した。プラスミドを用いたトランスフェクションの場合、C57BL/6Nマウス由来のRNAから合成した遺伝子全長のcDNAを鋳型として、目的とする遺伝子のタンパク質コード領域をPCRにより増幅し、精製した。これを蛍光タンパク質であるGFP遺伝子がすでに組み込まれているプラスミドなどにIn-Fusion HD Cloning Kit（TaKaRa）を用いて組み込んだ。組み込ま

れたプラスミドは大腸菌に形質転換後、アンピシリンで選択した。得られたコロニーは、液体培地中で振盪培養し、ZymoPURE Plasmid Miniprep Kit (ZYMO RESEARCH) を用いてプラスミドの抽出を行った。プラスミドのトランスフェクションには、ViaFect Transfection Reagent (Promega) を用いた。アデノウイルスを用いた感染の場合、上記のクローニング手法と同様に目的遺伝子をコードするDNAを、アデノウイルスゲノムをコードするコスミドベクターに組み込んだ。制限酵素処理によりアデノウイルスゲノムをコスミドから切り出した後、Adeno-X 293細胞株にトランスフェクションし、アデノウイルスを作製した。抽出したアデノウイルスを細胞培養培地に添加することで、感染を行った。

2.5 ゲノム編集

CRISPR/Cas9システムを用いて、遺伝子の破壊を行った。目的遺伝子のエキソンを標的とするガイドRNAを設計した。同時にガイドRNAが標的とする配列周辺のコドンを終止コドンに変更した一本鎖オリゴDNA (ssODN) を設計した。crRNA, tracrRNA, Cas 9 タンパク質, ssODN を導入し、目的遺伝子内のコドンを終止コドンに変更し、タンパク質が発現しないようにした。

2.6 握力測定

マウス・ラット用握力測定装置GPM-101B/V (メルクエスト) を用いて、水平式での測定を行った。マウスに前肢でバーをつかませ、尾を引っ張ることで最大張力を記録した。測定間のインターバルを1分とし、6回の測定を行った。

3. 結果と考察

3.1 電気刺激装置の開発

研究開始当初に行ったパイロット実験では、直流安定化電源、ファンクションジェネレータ、オシロスコープなどの市販装置を自作の電子回路と

組み合わせて、培養骨格筋への電気刺激装置とした。しかし、この方法では1システムあたりのコストが高く (30-50万円)、またシステム全体も比較的大きく、他の解析装置との連携の面でも柔軟性が低いという欠点があった。またこの装置を用いて行った一連の実験の結果、当初システムで採用していた刺激方式 (定電圧刺激) では、同一電圧値で刺激した場合でも、培養条件や細胞の状態に影響され、誘起できる収縮強度にばらつきがあり、再現性に問題があることが分かった。これらの問題点を解決すべく、我々は自ら電子基板を設計・製造し、当初システムで使用していた市販装置の機能を代替できる新しい電気刺激装置を作製した (Fig. 1)。この電気刺激装置はサイズが非常に小さく、また直流安定化電源も必要としないことから、簡便に使用することができる。また、さまざまな運動神経の活動を模倣する任意の刺激パターンを生成することができる。定電流方式を実装したことにより、多サンプルへの刺激でも常時正確に電流値をコントロールすることで、再現性が大幅に向上した。

3.2 電気刺激による骨格筋タイプ変換の検討 電気刺激のパターンの違いによって骨格筋タイ

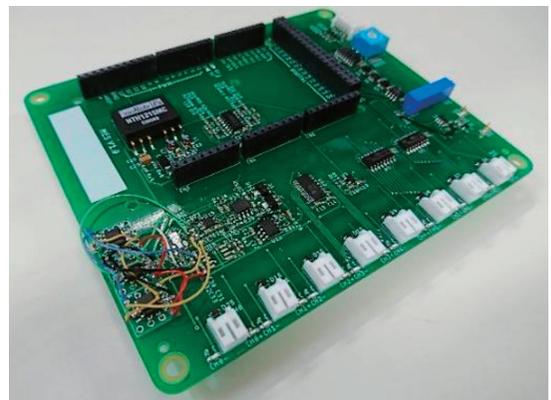


Fig. 1 The electrical pulse stimulator developed in this study. By implementing a constant current stimulation method, reproducibility was greatly improved.

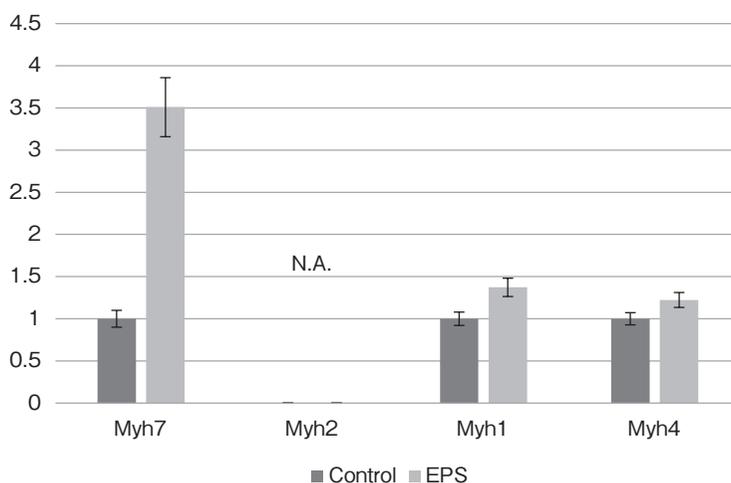


Fig. 2 Cultured skeletal muscle differentiated from C2C12 cells was subjected to slow-muscle-type electrical pulse stimulation and gene expression was examined. Myh7 gene expression was upregulated.

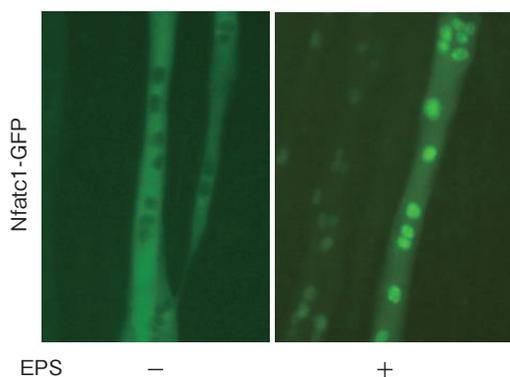


Fig. 3 The transcription factor Nfatc1 moved to the nucleus of the myotube and was activated in response to electrical pulse stimulation.

ブ変換を効率的に誘導できるかどうか検証した。検証にはマウス由来の筋芽細胞であるC2C12細胞株を培養皿上で筋分化させたものを用いた。C2C12細胞株由来の培養筋肉は遅筋型のみオシン重鎖であるMyh7遺伝子やII a型のみオシン重鎖であるMyh2遺伝子はまったく発現しておらず、速筋型と考えられる。電気刺激装置を用いて遅筋型の刺激パターンで刺激を行い、遺伝子発現を解

析したところ、遅筋型のみオシン重鎖であるMyh7遺伝子の発現が上昇した (Fig. 2)。また遅筋型の電気刺激によって、培養筋肉内で起きている現象を調べるために、蛍光タンパク質GFPを付加した転写因子を培養筋肉に発現させ、その局在変化を観察した。その一例として、転写因子Nfatc1の例を示す (Fig. 3)。Nfatc1はC2C12細胞由来の培養筋肉では、細胞質に局在しているが、遅筋型の刺激パターンにตอบสนองして、細胞核に移行した。また複数の転写因子について調べた結果、Nfatc1以外にも局在を変化させる転写因子を複数見出すことができた。

3.3 さまざまな筋肉から安定的に筋芽細胞を単離する方法の確立

これまでの実験では、速筋型のマウス筋芽細胞株C2C12を用いて解析を行ってきたが、骨格筋タイプ変換メカニズムを明らかにし、さらには食肉への応用を模索するためには、牛や豚などさまざまな生物種の、さまざまな部位の筋肉を用いて検証を行わなくてはならない。そのため、生体のどのような筋肉からでも、安定的に筋芽細胞を単離

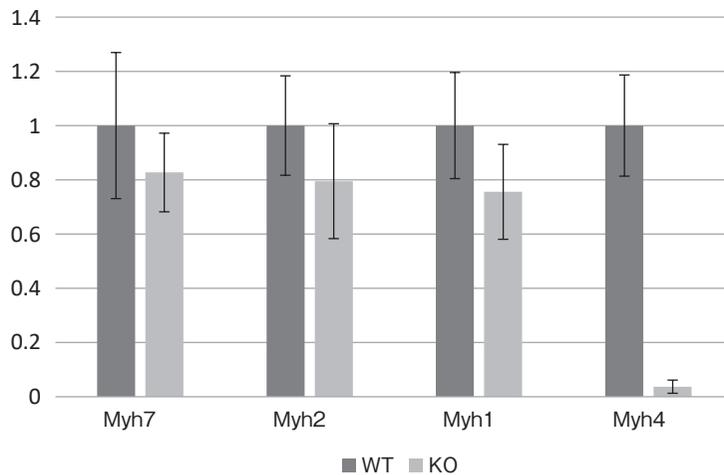


Fig. 4 To examine the effects of the candidate gene on skeletal muscle types determination, expression levels of myosin heavy chain genes in wild-type and knockout mice was compared. In soleus muscle, the expression of the Myh4 gene in KO mice was significantly decreased.

する方法を整備する必要がある。これまでに我々が用いていた生体筋肉からの筋芽細胞の単離方法では、筋芽細胞の増殖が遅く、マウス腓腹筋のような比較的大きな筋肉からはなんとか得ることができても、マウス長趾伸筋のような小さな筋肉からの単離では、短期間のうちに大量に筋芽細胞を調整するのは困難であった。そこで筋芽細胞の培養方法の検討を行った。過去の文献では、培養液の成分として、ニワトリ胚抽出液を添加することで筋芽細胞の増殖を活性化できるという報告があったため、これを検討した。実際に、有精卵を入手し、各発生段階のニワトリ胚からニワトリ胚抽出液を作製した。また筋芽細胞の培養においては、Engelbreth-Holm-Swarmマウスの肉腫由来の基底膜成分を用いて培養器のコートングを行った。以上の検討の結果、筋芽細胞の増殖が大幅に向上し、生体の骨格筋から1週間程度で、腓腹筋であれば、 1×10^8 個、長趾伸筋であっても、 1.5×10^7 個程度の筋芽細胞の調整が可能となった。

3.4 骨格筋タイプに関与する新規転写因子の探索

これまでの研究から、骨格筋タイプ変換に関与する可能性のある転写因子の候補をいくつか見出した。これらの転写因子の中から、遅筋線維に優位に発現している転写因子のノックアウトマウスを、ゲノム編集により作製した。まだ純系化が不十分な面があるものの、ノックアウトマウスではヒラメ筋において*Myh4*遺伝子の発現が顕著に減少しており (Fig. 4)、また握力も低下していた。

3.5 考察

本研究において、電気刺激装置を独自に開発し、それをを用いて効率的な骨格筋のタイプ変換を誘導できるか検討した。また、骨格筋のタイプ変換に関与する可能性のある新規転写因子を見出し、ノックアウトマウスの作製を通じて、骨格筋タイプに与える影響を解析することができた。一方で、本研究期間では、実際の牛や豚の筋肉を用いて、筋芽細胞を単離し、培養皿上で培養筋肉を形成させ、タイプ変換が可能かどうかを検討することはできなかった。食肉卸売業者にコン

タクトし、牛や豚のと殺後短期間での筋肉の入手を試みたが、入手することができなかったためである。

4. 要 約

高品質な培養肉の作製において、培養筋肉の骨格筋タイプを制御することは必要不可欠である。本研究では遺伝子操作によらない骨格筋のタイプ変換技術を確立することを目的として、遅筋から速筋にいたるさまざまな運動神経の活動パターンを模倣できる電気刺激装置を開発し、それを用いて検討を行った。結果、速筋型筋肉において遅筋型ミオシン重鎖の発現を亢進させることができ、Nfatc1などの転写因子の活性化を確認することができた。さらに骨格筋タイプ変換に関わる可能性

がある転写因子の候補を同定した。実際、ある遺伝子を欠損させると、特定の骨格筋タイプのミオシン重鎖の発現が減少することを確認できている。本研究で得られた知見を牛や豚の培養筋肉に適応することで、骨格筋タイプ変換をコントロールできるかどうか、今後検討を進める予定である。

文 献

- 1) Stefano Schiaffino, Carlo Reggiani : *Physiol Rev*, 91(4), 1447~531, 2011.
- 2) Melissa L Ehlers, Barbara Celona, Brian L Black : *Cell Rep*, 25, 8(6), 1639~1648, 2014.
- 3) Katja S C Röckl, Michael F Hirshman, Josef Brandauer, Nobuharu Fujii, Lee A Witters, Laurie J Goodyear : *Diabetes*, 56(8), 2062~9, 2007.
- 4) N Nikolić, S W Görgens, G H Thoresen, V Aas, J Eckel, K Eckardt : *Acta Physiol (Oxf)*, 220(3), 310~331, 2017.

畜産副生物から再生医療部材への高付加価値加工

Add value preparation from livestock by-products to regenerative
medicine materials

神田 英輝

(名古屋大学大学院工学研究科)

Hideki Kanda

(Graduate School of Engineering, Nagoya University)

Porcine aortic tissue was decellularized by subcritical dimethyl ether (DME) used as an alternative to the surfactant sodium dodecyl sulphate. The process included three steps. For the first step, lipids were extracted from the porcine aorta using subcritical DME at 23°C with a DME pressure of 0.56 MPa. Next, the aorta was collected from the extraction column, and DME was evaporated from the aorta under atmospheric pressure and temperature. Residual DME in the aorta was not detected by a headspace GC/MS. The second step involved DNA fragmentation by DNase, which was primarily identical to the common method. For the third step, similar to the common method, DNA fragments were removed by washing with water and ethanol. After 3 days of DNase treatment, the DNA was completely fragmented, and the amount of DNA remaining in the porcine aorta was 40 ng/dry-mg, which was lower than the standard value of 50 ng/mg-dry. Haematoxylin and eosin staining showed that most cell nuclei were removed from the aorta. DNase treatment for 7 days after DME extraction resulted in a more complete removal of DNA. These results demonstrate that introducing subcritical DME into the conventional method of decellularization of porcine aortas eliminates the need to utilize surfactants.

1. 目的

臓器移植は重度の臓器不全患者に対する治療法となっているが、臓器移植は倫理面、移植可能な臓器の欠如、免疫による拒絶反応等の課題がある。特に脳は記憶や人格を司ることから移植が倫理的に不可能である。これらの課題を克服するためには患者自身の細胞を三次元的に培養した臓器の作成が望まれる。三次元培養には他の生物組織から細胞を除去した三次元足場（スキャホール

ド）が有用であり、その材料として主に豚組織が注目されている。脱細胞化は、酸、アルカリによる処理、界面活性剤、酵素消化などの化学的方法に分類される¹⁻⁵⁾。最も広く使用されている界面活性剤による処理は簡便である。典型的な手法では、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）による脂質の抽出、DNaseによるDNA断片化、および水とエタノールでの洗浄によるDNA断片の除去の3つのステップが含まれる。SDSには組織に対して非常に強力な脱脂作用があるが、SDSがスキャ

ホールドに残留するとスキャホールド内の細胞培養が炎症反応で阻害されたり、引っ張り強度などの力学特性が損なわれる懸念があるので、SDSを使用しない新たな手法が望まれるが、代替物質が見つからない状況にある^{6~15)}。

ここで我々は亜臨界ジメチルエーテル (DME) を使用して、種々の湿った微細藻類や植物の細胞から脂質や機能性物質の抽出に成功してきた^{16~26)}。微細藻類の場合、DMEによって脂質のほとんどを抽出できる。特に動物のように細胞壁を持たないミドリムシの場合、亜臨界DMEで抽出された脂質の分子量分布は有機溶媒を使用して得られたものと同じであり¹⁶⁾、すべての脂質が抽出される。さらにDMEには抽出残留物に残らない利点がある。

これらの結果は、DME特有の化学的および物理的特性によるものである。DMEは最もシンプルな形状のエーテルだが、その特性は一般に知られるエチルエーテルとは著しく異なる。DMEの標準沸点は -24.8°C と非常に低い²⁷⁾。つまり、低沸点のため大気圧下では常温で蒸発する。また、DMEは弱い極性溶媒であり部分的に水と混合する^{28,29)}。さらに、欧州食品安全機関はDMEを安全な食品加工溶媒として残留許容値を示している³⁰⁾。米国ではDMEはお菓子の表面をチョコレートでコーティングするための噴射剤として使用される³¹⁾。また、DMEは他のエーテルとは異なり過酸化物をほとんど生成しない³²⁾。

これらの特性に基づくと、SDSの代わりにDMEを使用して高含水の豚組織から脂質を抽出でき、最終的にはDMEは組織に残らないと考えられる。そこで本研究では、DMEを使用した油脂抽出の後にDNase処理と洗浄を施すことで、豚組織 (大動脈, 脳), ダチョウ組織 (頸動脈) の脱細胞化を試みた。本報告書では紙面数の都合上、豚大動脈を例に報告する。

2. 方法

脱細胞化プロトコルは、1) 亜臨界DMEによる脂質抽出、2) DNase処理、および3) 洗浄の3つのステップで構成される。従来の方法との違いは、SDSの代わりに亜臨界のDMEを使用する最初のステップである。ステップ2と3は従来の方法と同じである。

1 cmに切断した新鮮な豚の大動脈から表面の脂質をナイフでトリミングした。DME抽出操作は過去の微細藻類からの脂質抽出の研究と同様のプロトコルである²²⁾。亜臨界DMEで満たされた貯蔵容器から、亜臨界DMEを抽出カラムに流通させた。操作条件は抽出カラムの入口で 23°C および 0.56MPa である。抽出カラムの出口に取り付けられた手動流量制御バルブを使用して、DME流量を $10\text{ml}/\text{min}$ に調整した。5.48 gの湿った大動脈組織をガラス製耐圧容器 (96cm^3) に充填した。亜臨界DMEを流通させることで脂質と水分が抽出された。抽出カラムの出口は、接続SUSチューブを介して空の 96cm^3 圧力容器に接続されている。抽出後のカラムに溜まった抽出液の圧力を減圧弁を開いて下げた。減圧によりDMEを蒸発させた後、抽出した脂質と水を容器内に残した。 107°C で容器内の水分を蒸発させて脂質から分離し、水と脂質の重量を測定した。最後にDMEを60分間流した後、抽出カラムを開放し抽出カラムに残っているDMEを蒸発させた。

DME流通後の豚大動脈1.0 gを30mlのDNase生理食塩水を使用して、DNAを断片化した。生理食塩水は、0.9%のNaClと1%のペニシリンおよびストレプトマイシンを含む脱イオン水で調製した。酵素溶液は0.2% DNaseおよび $0.05\text{mol}/\text{l}$ の $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を生理食塩水に添加して調製した。調製したDNase溶液は、周囲の空気との接触を避けながら、クリーンベンチ内で使用した。DME

抽出後、豚大動脈をDNase-生理食塩水で4℃で1～7日間振とうした。

DNase処理後、サンプルを80/20 (v/v) エタノール/生理食塩水で1時間洗浄した。次に、サンプルを抗生物質を含む80/20 (v/v) エタノール/生理食塩水に浸し、4℃で保存した。洗浄と保管を3日間毎日繰り返した。次にサンプルを抗生物質を含む生理食塩水に4℃で1日間浸漬した。

豚大動脈への残留DME量は、既往研究のプロトコルに従ってガスクロマトグラフィー/質量分析 (GC/MS) ヘッドスペースシステムで検出した^{21,33)}。DME抽出の1日後0.50 gの豚の大動脈を10mlのヘッドスペースバイアルに入れ、GC/MS分析はAgilent 5977A質量分析計に接続されたAgilent 7890B-GCシステムを使用して実施した。Agilent 7697Aヘッドスペースサンプラーを接続し、ヘッドスペースの加熱温度は50℃、バイアルの平衡化時間は10分に設定した。オープン温度は最初に40℃で5分間設定され、その後5℃min⁻¹の速度で260℃まで上昇した。測定質量範囲は29～450 m/zである。

脱細胞化された豚大動脈の核は、1%ヘマトキシリン-エオシン (HE) で染色した。パラフィンブロックを作成後に中心部でスライスし光学顕微鏡で観察した。

DNase処理後の豚大動脈からDNAを抽出した後に精製した。まず5 mgのDME抽出後の豚大動脈組織をマイクロチューブに入れ、200 μ lのプロテイナーゼK溶液 (1 M Tris-HCl水溶液 [pH 7.8], 0.5 M エチレンジアミン四酢酸水溶液 [EDTA, pH 8.0], 蒸留水, SDS = 1 : 2 : 2 : 95 : 0.5 v/v/v/v/w) と混合し、55℃で1日転倒混和した。DNAはフェノール/クロロホルム抽出によって組織から除去され、エタノール沈殿によって精製した³³⁾。

DNAの定量化は、溶解したDNAを含む1 μ lの

TEバッファー水溶液を260nmでUV分光光度法で測定した。フェノールに対応する265nmにピークは観察されないこと、260nmと280nmの強度比は約2 : 1であり、タンパク質がほぼ完全に除去されたことを確認しつつ実施した。

前節で得られたDNA溶液の断片分布は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって決定した。12.5%ゲルのポリアクリルアミド/トリス-HClバッファーのゲル/バッファー組成を使用した。DNA溶液をDNAローディングバッファーと5 : 1 (v/v) の比率で混合した。調整したDNA溶液と塩基鎖長マーカートを泳動槽に滴下し、蛍光染色試薬で染色した。

3. 結果と考察

Fig. 1はDMEを使用した豚大動脈からの脂質抽出挙動である。1.65wt%の脂質が大動脈の乾燥重量の150倍の亜臨界DMEで抽出された。その際、大動脈に含まれていた初期水分の90.1%も抽出されて除去された。Fig. 2は、亜臨界DMEによるDME処理前後の豚大動脈の外観を示している。DME処理後の大動脈は乾燥して白色に変化し、ヘッドスペースGC/MSにより残留DMEは検出されなかった。以前の研究で藻類から脂質を抽出した場合も抽出残渣にDMEは検出されておらず^{21,34)}、今回の結果はこれと一致している。

DNaseでさまざまな日数でDNA分解処理を施して洗浄した後、豚の大動脈組織をHE染色した。Fig. 3aに示す未処理の豚大動脈組織と同様に、DME抽出のみのサンプルでは細胞核が見られた (Fig. 3b)。DNase処理1日後 (Fig. 3c)、ほとんどの細胞核が除去された。Fig. 3d, 3e, 3fに示すように、DME抽出後3～7日間のDNase処理後では細胞核は観察されなかった。これらの結果は亜臨界DMEだけでは細胞核を除去できないが、DNase処理や洗浄と組み合わせると、SDSを使用

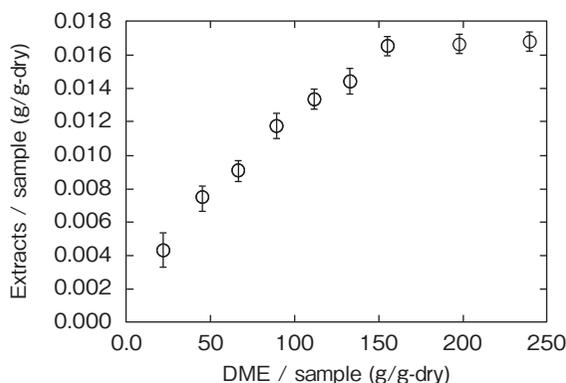


Fig. 1 Amount of lipids extracted by subcritical DME extraction from porcine aortas.

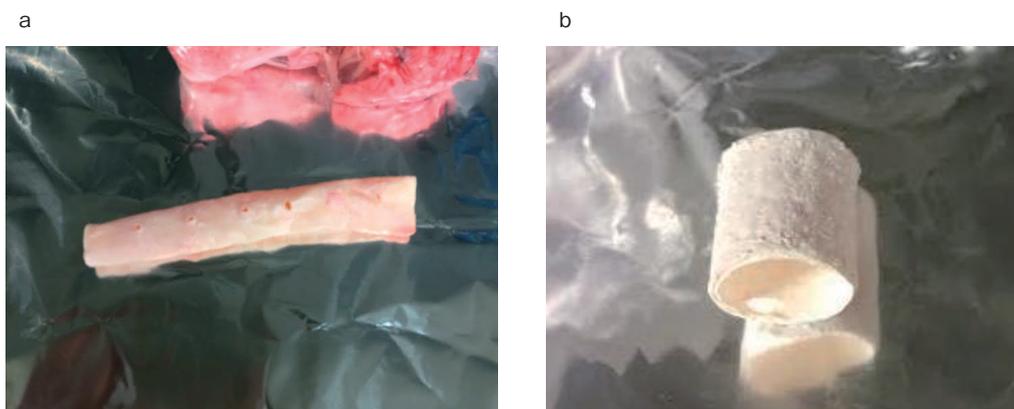


Fig. 2 Porcine aorta before (a) and after (b) subcritical DME treatment.

せずに細胞核を除去できることを示している。

各条件における残留DNA量をFig. 4に示す。DME抽出のみの場合、残留DNA量は1704ng/mg-dryであり、未処理の豚大動脈のDNA量である2295ng/mg-dryと比較してわずかに減少し、亜臨界DMEは低い効力ではあるがDNAを抽出および除去する能力を持っている可能性がある。DNase処理の1日後の残留DNAの量は、未処理の大動脈の32%にあたる量にまで減少しており、DNAが容易に除去され急速に分解されることを示している。DNase処理の3日後に残留DNAの量は40ng/mg-dryだった。これは、脱細胞化後のDNA残存量の目標値である50ng/mg-dry³⁵⁻³⁸⁾

を下回るものである。ただし、Fig. 4に示すようにDNA残存量を測定すると誤差があるので、確実に目標値を下回るには5日間のDNase処理が望ましい。7日間のDNase処理後、残留DNA量は8ng/mg-dryであり、DNAのほぼ完全な除去が達成された。

ポリアクリルアミドゲル電気泳動で検出された残留DNA断片長の分布をFig. 5に示す。左端のレーンはDNA断片の長さの標準値を示す。(a)元の豚大動脈 (b) DME処理のみ (c) DME処理と1日間のDNase処理 (d-f) DME処理とDNase処理を3, 5, 7日間施したサンプルを示す。

Fig. 5aおよび5bに示すように、元の大動脈と

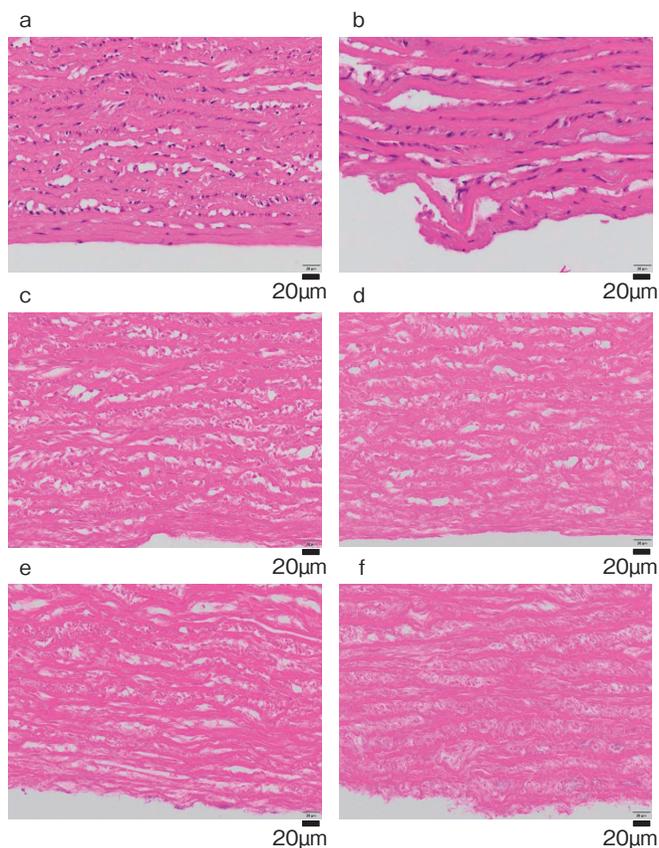


Fig. 3 Haematoxylin-eosin staining : (a) Untreated. (b) DME extraction only. (c-f) DNase treatment for 1 (c), 3 (d), 5 (e), and 7 (f) days following DME extraction.

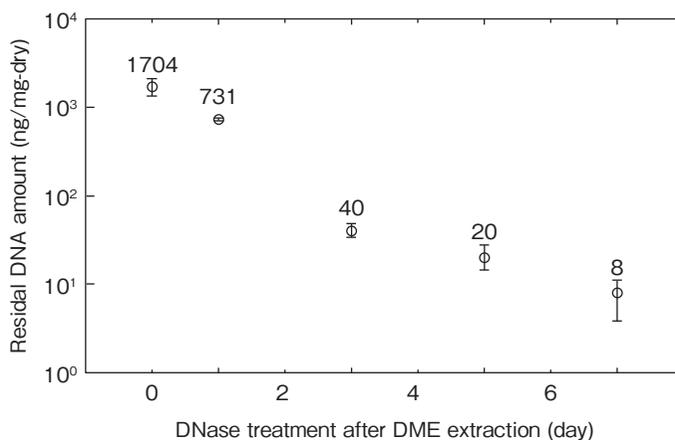


Fig. 4 Residual DNA amounts in the porcine aortas.

DME処理だけのサンプルでは、1000bpを超えるものから200bp未満までの広い範囲でDNAが検出

され、亜臨界DMEはDNAを断片化できないことがわかる。(c)に示すように、DME抽出後1日

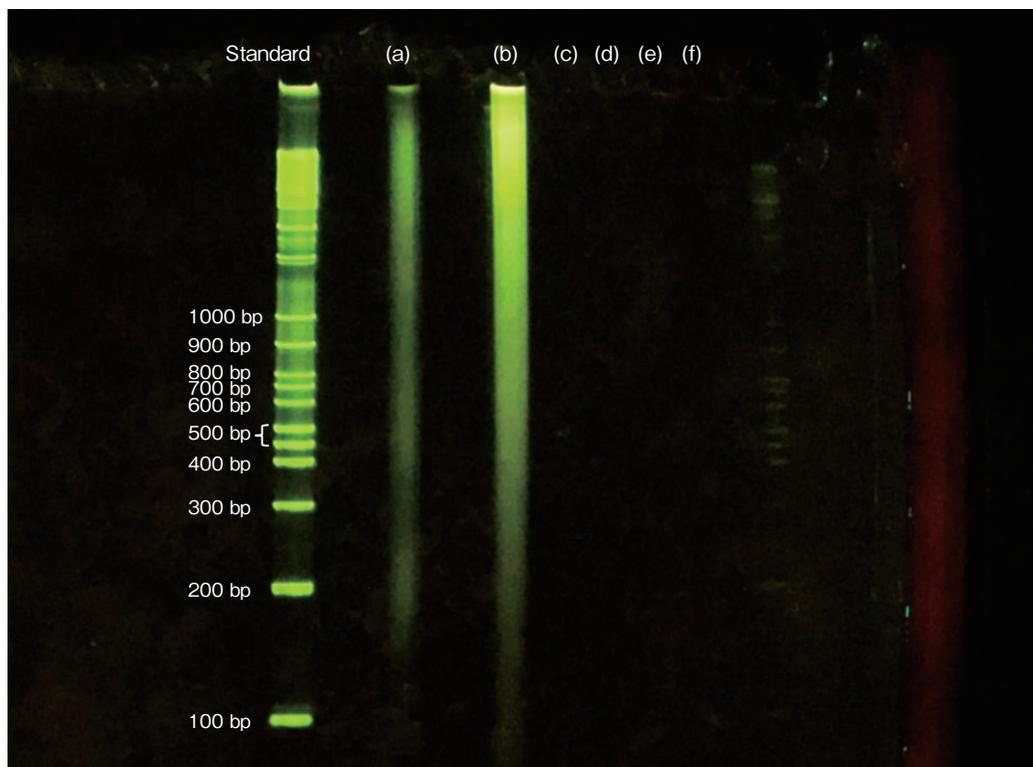


Fig. 5 Fragments of residual DNA in the samples detected by agarose gel electrophoresis : (a) Untreated. (b) DME extraction only. (c-f) DNase treatment for 1 (c), 3 (d), 5 (e), and 7 (f) days following DME extraction.

間DNase処理した場合DNAは検出されず、100bp未滿への完全な分解が明らかになった。同様に、DNaseにより長期間処理した場合、(d-f)に示すようにDNAは検出されなかった。つまり、DNAを200bp未滿に断片化するには1日のDNase処理で十分だったが、Fig. 4に示す残留した断片化DNA量の結果とあわせると、断片化したDNAを洗浄によって除去するには、長時間のDNase処理による断片化が必要であると示唆している。

このように、亜臨界DMEによる脂質抽出とDNaseによるDNA断片化の組み合わせにより、SDSを使用せずに豚大動脈を脱細胞化してスキャホールドを作成できた。

4. 要 約

亜臨界DMEによって豚大動脈から脂質を抽出し、DNase処理と組み合わせることで、細胞核を豚の大動脈から除去し、界面活性剤を用いずにスキャホールドを作成できた。また、紙面数の都合で本報告書での記載を省略したが、同じ手法で豚脳組織やダチョウ頸動脈組織でも成功した。脳は従来、スキャホールド化がきわめて困難であった組織であり、ダチョウ組織は豚が宗教上の禁忌である患者に適用できる。今後は、これらのスキャホールドの引っ張り強度やタンパク質の変性の有無についても研究を進めたいと考えている。

文 献

- 1) Badylak, S. F. : Xenogeneic extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction, *Transpl. Immunol.*, **12**, 367~377, 2004.
- 2) McFetridge, P. S., Daniel, J. W., Bodamyali, T., Horrocks, M., Chaudhuri, J. B. : Preparation of porcine carotid arteries for vascular tissue engineering applications, *J. Biomed. Mater. Res. A.*, **70A**, 224~234, 2004.
- 3) Ketchedjian, A., Jones, A. L., Krueger, P., Robinson, E., Crouch, K., Wolfenbarger, L., Hopkins R. : Recellularization of decellularized allograft scaffolds in ovine great vessel reconstructions, *Ann. Thorac. Surg.*, **79**, 888~896, 2005.
- 4) Rieder, E., Kasimir, M. T., Silberhumer, G. : Decellularization protocols of porcine heart valves differ importantly in efficiency of cell removal and susceptibility of the matrix to recellularization with human vascular cells, *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **127**, 399~405, 2004.
- 5) Sawada, K., Terada, D., Yamaoka, T., Kitamura, S., Fujisato, T. : Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **83**, 943~949, 2008.
- 6) Wu, P., Nakamura, N., Kimura, T., Nam, K., Fujisato, T., Funamoto, S., Higami, T., Kishida, A. : Decellularized porcine aortic intima-media as a potential cardiovascular biomaterial, *Interact. Cardiovasc. Thorac. Surg.*, **21**(2), 189~194, 2015.
- 7) Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., Murakoshi, A., Hashimoto, Y., Niwaya, K., Kitamura, S., Fujisato, T., Kishida, A. : The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials*, **31**, 3590~3595, 2010.
- 8) Sullivan, D. C., Mirmalek-Sami, S., Deegan, D. B., Baptista, P. M., Adoushward, T., Atala, A., Yoo, J. J. : Decellularization methods of porcine kidneys for whole organ engineering using a high-throughput system, *Biomaterials*, **33**, 7756~7764, 2012.
- 9) Keane, T. J., Swinehart, I. T., Badylak, S. F. : Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance, *Methods*, **84**, 25~34, 2015.
- 10) Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F. : An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, **32**, 3233~3243, 2011.
- 11) White, J. K., Agnihotri, A. K., Titus, J. S., Torchiana, D. F. : A stentless trileaflet valve from a sheet of decellularized porcine small intestinal submucosa, *Ann. Thorac. Surg.*, **80**, 704~707, 2005.
- 12) Korossis, S. A., Wilcox, H. E., Watterson, K. G., Kearney, J. N., Ingham, E., Fisher, J. : In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root, *J. Heart Valve Dis.*, **14**, 408~421, 2005.
- 13) Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., Badylak, S. F. : Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, **27**, 3675~3683, 2006.
- 14) Prasertsung, I., Kanokpanont, S., Bunaprasert, T., Thanakit, V., Damrongsakkul, S. : Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, **85B**, 210~219, 2008.
- 15) Sasaki, S., Funamoto, S., Hashimoto, Y., Kimura, T., Honda, T., Hattori, S., Kobayashi, H., Kishida, A., Mochizuki, M. : In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultra high hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas, *Mol. Vis.*, **15**, 2022~2028, 2009.
- 16) Kanda, H., Li, P., Goto, M., Makino, H. : Energy-saving lipid extraction from wet *Euglena gracilis* by low boiling point solvent dimethyl ether, *Energies*, **8**, 610~620, 2015.
- 17) Kanda, H., Li, P., Ikehara, T., Yasumoto-Hirose, M. : Lipids extracted from several species of natural blue-green microalgae by dimethyl ether : extraction yield and properties, *Fuel.*, **95**, 88~92, 2012.
- 18) Kanda, H., Li, P., Yoshimura, T., Okada, S. : Wet extraction of hydrocarbons from *Botryococcus braunii* by dimethyl ether as compared with dry extraction by hexane, *Fuel.*, **105**, 535~539, 2013.
- 19) Kanda, H., Morita, M., Makino, H., Takegami, K., Yoshikoshi, A., Oshita, K., Takaoka, M., Takeda, N. : Deodorization and Dewatering of Biosolid by Using Dimethyl Ether, *Water Environ. Res.*, **83**, 23~25, 2011.
- 20) Li, P., Kanda, H., Makino, H. : Simultaneous production of bio-solid fuel and bio-crude from vegetal biomass using liquefied dimethyl ether, *Fuel.*, **116**, 370~376, 2014.
- 21) Kanda, H., Wahyudiono, Machmudah, S., Goto, M. : Direct extraction of lutein from wet macroalgae by liquefied dimethyl ether without any pretreatment, *ACS Omega*, **5**, 24005~24010, 2020.
- 22) Kanda, H., Hoshino, R., Murakami, K., Wahyudiono, Zheng, Q., Goto, M. : Lipid Extraction from Microalgae Covered with Biomineralized Cell Walls using Liquefied Dimethyl Ether, *Fuel.*, **262**, No. 116590, 2020.
- 23) Subratti, A., Lalgée, L. J., Jalsa, N. K. : Liquefied dimethyl ether (DME) : A green solvent for the extraction of hemp (*Cannabis sativa* L.) seed oil, *Sustain. Chem. Pharm.*, **12**, No. 100144, 2019.
- 24) Subratti, A., Lalgée, L. J., Jalsa, N. K. : Efficient extraction of black cumin (*Nigella sativa* L.) seed oil containing thymol, using liquefied dimethyl ether (DME), *J. Food Process. Preserv.*, **43**, No. e13913, 2019.
- 25) Catchpole, O. J., Grey, J. B., Perry, N. B., Burgess,

- E. J., Redmond, W. A., Porter, N. G. : Extraction of Chili, Black Pepper, and Ginger with Near-Critical CO₂, Propane, and Dimethyl Ether : Analysis of the Extracts by Quantitative Nuclear Magnetic Resonance, *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 4853~4860, 2003.
- 26) Boonnoun, P., Shotipruk, A., Kanda, H., Goto, M. : Optimization of rubber seed oil extraction using liquefied dimethyl ether, *Chem. Eng. Commun.*, **206**, 746~753, 2019.
- 27) Wu, J., Zhou, Y., Lemmon, E. W. : An equation of state for the thermodynamic properties of dimethyl ether, *J. Chem. Eng. Data*, **40**, No. 023104, 2011.
- 28) Holldorff, H., Knapp, H. : Binary vapor-liquid-liquid equilibrium of dimethyl ether-water and mutual solubilities of methyl chloride and water : experimental results and data reduction, *Fluid Phase Equilib*, **44**, 195~209, 1988.
- 29) Tallon, S., Fenton, K. : The solubility of water in mixtures of dimethyl ether and carbon dioxide, *Fluid Phase Equilib*, **298**, 60~66, 2010.
- 30) European Food Safety Authority : Scientific opinion of the panel on food contact materials, enzymes, flavourings and processing aids (CEF) on dimethyl ether as an extraction solvent, *EFSA Journal*, **7**(3), 984 (1-13), 2009.
- 31) Varlet, V., Smith, F., Augsburg, M. : New trends in the kitchen : propellants assessment of edible food aerosol sprays used on food, *Food Chem.*, **142**, 311~317, 2014.
- 32) Naito, M., Radcliffe, C., Wada, Y., Hoshino, T., Liu, X., Arai, M., Tamura, M. : A comparative study on the autoxidation of dimethyl ether (DME) comparison with diethyl ether (DEE) and diisopropyl ether (DIPE), *J. Loss Prevent. Proc.*, **18**, 469~473, 2005.
- 33) Negishi, J., Funamoto, S., Kimura, T., Nam, K., Higami, T., Kishida, A. : Porcine radial artery decellularization by high hydrostatic pressure, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **9**, E144-E151, 2015.
- 34) Hoshino, R., Ogawa, M., Murakami, K., Wahyudiono, Kanda, H., Goto, M. : Extraction of lipids from wet *Arthrospira platensis* by liquefied dimethyl ether, *Solvent Extr. Res. Dev. Japan*, **24** (1), 47~60, 2017.
- 35) Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K. : Autoimmunity and the clearance of dead cells, *Cell*, **140**, 619~630, 2010.
- 36) Manfredi, A. A., Capobianco, A., Bianchi, M. E., Rovere-Querini, P. : Regulation of dendritic- and T-cell fate by injury-associated endogenous signals, *Crit. Rev. Immunol.*, **29**, 69~86, 2009.
- 37) Brown, B. N., Valentin, J. E., Stewart-Akers, A. M., McCabe, G. P., Badylak, S. F. : Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component, *Biomaterials*, **30**, 1482~1491, 2009.
- 38) Zhang, Q., Raoof, M., Chen, Y., Sumi, Y., Sursal, T., Junger, W., Brohi, K., Itagaki, K., Hauser, C. J. : Circulating mitochondrial DAMPs cause inflammatory responses to injury, *Nature*, **464**(7285), 104~107, 2010.

産肉量増加を目指した間葉系前駆細胞による新規血管新生機構の解明

Elucidating a novel mechanism of angiogenesis by mesenchymal progenitor cells

山内 啓太郎

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Keitaro Yamanouchi

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

Mesenchymal progenitor cells (MPC) are present in a variety of organs including skeletal muscle. We previously identified chondroitin sulfate proteoglycan 4 (CSPG4) as a molecule specifically expressed in MPC in skeletal muscle, and its distribution during muscle regeneration suggested a role in microvascular development. In the present study, we aimed to examine whether MPC-derived CSPG4 affects behavior of vascular endothelial cells (VEC). Lack of CSPG4 in MPC resulted in lower migration of VEC in co-culture system, and angiogenesis from microvascular fragments from CSPG4 knockout rats was less than those from wild-type rats. In addition, skeletal muscle growth was retarded in CSPG4 knockout rats compared to wild-type rats. The results obtained suggest that meat production could be improved by controlling the function of MPC-derived CSPG4.

1. 目的

食肉を構成する筋肉は筋線維が集合したもので、その発達や成長を促すことは結果として肉量の増加へとつながる。そのための方策としては、ステロイドや成長ホルモンのように筋線維への直接の同化作用をもつホルモン（いわゆる肥育ホルモン）の利用が古くから考えられてきたが、人体への影響等、考慮すべき課題が多いため、我が国やEU諸国では使用されていない。

筋肉内には筋線維に加えて間葉系前駆細胞(MPC)とよばれる細胞群が存在する。MPCは脂肪細胞への分化能をもち、いわゆる脂肪交雑にみられる脂肪細胞の主たる起源とされる¹⁾。MPCは

また、コラーゲンをはじめとする細胞外基質の主要な供給源である線維芽細胞への分化能をもあわせもつ¹⁾。さらに、我々は未分化なMPCは筋線維の形成過程(筋分化)を促進することを見出している²⁾。我々はMPCの細胞膜上に発現するCSPG4(Chondroitin Sulfate Proteoglycan 4)が、脂肪細胞や線維芽細胞への分化を制御することを明らかにしてきた³⁾。その過程で、ラット筋肉において人為的な損傷とそれに続く筋再生を誘導した際、CSPG4が再生直後の筋線維周囲に一過的に集積し、その近傍にCD31陽性の血管内皮細胞(VEC)が遊走していることを観察した。さらに我々が新たに作出したCSPG4欠損ラットでは、遊走するCD31陽性VECの数が減少していること

を見出した。筋線維自身はCSPG4を発現しないこと、さらにMPCの細胞膜表面に発現するCSPG4の一部は切断されて遊離型としても作用することを考え合わせると、これらの知見は、MPCから遊離したCSPG4が再生直後の筋線維周囲に集積し、それを目標としてVECが遊走している可能性を示すものである。実際、ある種のがん細胞ではCSPG4がVECの遊走を引き起こし、自身の増殖に有利な血管新生を誘導することが知られている。筋線維の発達や成長には、筋肉内に構築される毛細血管網を介した栄養素の供給が大きく影響する。したがって、筋線維の成熟過程で形成される毛細血管網を増加させることができれば、効率的に筋線維の発達や成長を促すことが期待される。

そこで本研究では、MPCから遊離したCSPG4が再生直後の筋線維周囲に集積し、それを目印としてVECが遊走することで、効率的な血管新生が生じ、その後の筋線維の発達に寄与するという仮説の構築・立証を通じて、筋量を効率的に増加させる新たな方法論の開発に資することを目的とした。

2. 方法

2.1 使用動物

CSPG4欠損ラットは、当研究室にてCRISPR/Cas法を用いて作製した。温度23℃、湿度60%に維持された動物室にて飼育し、固形飼料、水は自由に摂取させた。すべての動物実験は東京大学農学部動物実験委員会の承認を受けて行った。

2.2 間葉系前駆細胞と血管内皮細胞の共培養

ラット間葉系前駆細胞2G11細胞⁴⁾とそこから作製したCSPG4欠損細胞(B2G9細胞)および血管内皮細胞のモデルとされるMSS31細胞(JCRB細胞バンクより購入)は、10%牛胎子血清を含むDMEM中で培養維持した。3 x 10⁴個のMSS31細胞

をtranswellの上層に、5 x 10⁴個の2G11細胞もしくはB2G9細胞を下層に、それぞれ播種し、24時間培養した。メンブレンをギムザ染色したのち、その両面に接着しているMSS31細胞数およびメンブレンの下側へと遊走したMSS31細胞数を計測した。

2.3 骨格筋の組織学的解析

野生型およびCSPG4欠損ラットの2ヶ月と5ヶ月齢における体重を測定した。さらに、イソフルラン麻酔の過剰吸入により動物を安楽死させたのち、骨格筋および心筋を採取した。筋重量(前脛骨筋、ヒラメ筋および心筋)を測定し、採取した骨格筋は液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し、使用時まで-80℃で保存した。骨格筋サンプルから凍結切片を作製し、抗ジストロフィン抗体により免疫染色した切片を用いて2ヶ月齢における筋線維径を計測した。

2.4 血管フラグメントの成長測定

野生型およびCSPG4欠損ラットの脂肪組織から、酵素処理により毛細血管の組織片(血管フラグメント)を採取した。これをコラーゲンゲル中に包埋し、6日間培養した。顕微鏡下で、血管フラグメントに由来する血管内皮細胞により形成される新生血管の長さと同分枝数を測定した。

3. 結果と考察

3.1 間葉系前駆細胞に発現するCSPG4が血管内皮細胞の遊走に与える影響

本項目では間葉系前駆細胞におけるCSPG4発現の有無が血管内皮細胞の遊走に影響を与えるかどうかについて検証することを目的とした。血管内皮細胞(MSS31細胞)と間葉系前駆細胞(野生型およびCSPG4欠損2G11細胞(B2G9細胞))をメンブレンにより上下に区切られたtranswellを利用して共培養した。24時間後にメンブレンの上下に付着していたMSS31細胞数は、下層に

2G11細胞もしくはB2G9細胞を播種した群および細胞を播種していない群の間で違いがみられなかった (Fig. 1)。このことから間葉系前駆細胞の有無や、それにおけるCSPG4発現の有無は血管内皮細胞の増殖には影響を与えないことが分かった。この時、メンブレンの下側に付着していたMSS31細胞数、すなわちメンブレン上側から下側に遊走した細胞数は、下層に野生型の2G11細胞を播種した場合に比較してCSPG4欠損2G11細胞 (B2G9細胞) を播種した場合に有意に減少していた (Fig. 1)。このことから間葉系前駆細胞に発現するCSPG4は血管内皮細胞を誘引する作用があることが判明した。

3.2 CSPG4が血管新生に与える影響

本項目ではCSPG4の有無が血管新生に影響を与えるかどうかについて検証することを目的とした。CSPG4欠損ラットから採取した血管組織片 (血管フラグメント) のコラーゲンゲル内培養系における血管新生について、野生型ラット由来のものと比較した。その結果、培養6日後における新生血管の伸長や分岐数はCSPG4ラット由来の血管フラグメントで野生型に比べて有意に低値を示した (Fig. 2)。このことからCSPG4が血管新生に対する促進作用をもつことが明らかとなった。

3.3 CSPG4がラットの体重や筋組織に与える影響

本項目ではCSPG4の有無が実際に生体の筋組織の発達に影響を与えるかどうかについて検証することを目的とした。以上のin vitroの実験で示された、血管内皮細胞の遊走や血管新生に対するCSPG4の作用は、当初予想していたとおりのものであった。そこで、このような作用の有無により実際に筋発達に違いが生じるかどうかについて、CSPG4欠損ラットを用いて検討した。2ヶ月齢および5ヶ月齢におけるCSPG4ラットの体重や骨格筋重量、心筋重量はいずれも野生型ラットに比べて低値を示していたことから、筋組織の発達が低下していることが考えられた (Fig. 3)。

そこで2ヶ月齢における骨格筋発達について知る目的で、速筋線維優位である前脛骨筋と遅筋線維優位であるヒラメ筋をそれぞれ構成する筋線維の径を定量的に比較・解析した。その結果、前脛骨筋、ヒラメ筋ともにCSPG4欠損ラットでは野生型ラットに比べて有意に筋線維径が減少していた (筋線維径の中央値、前脛骨筋：野生型88.4 μm vs CSPG4欠損85.0 μm 、ヒラメ筋：野生型104.3 μm vs CSPG4欠損98.9 μm) (Fig. 4)。このことからCSPG4欠損が筋の発達を低下させる可

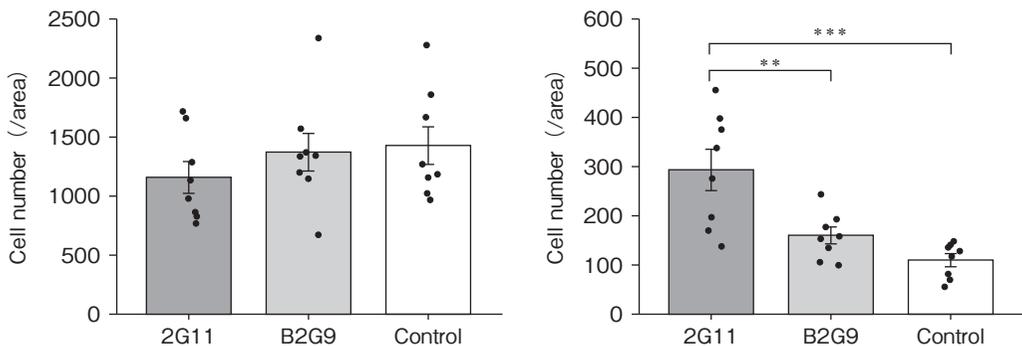


Fig. 1 Effect of mesenchymal progenitor cells with (2G11) or without (B2G9) CSPG4 on proliferation (left) and migration (right) of vascular endothelial cells. Graphed data are means \pm SEM (n=8). ** and ***, $p < 0.01$ and $p < 0.005$ vs 2G11, respectively.

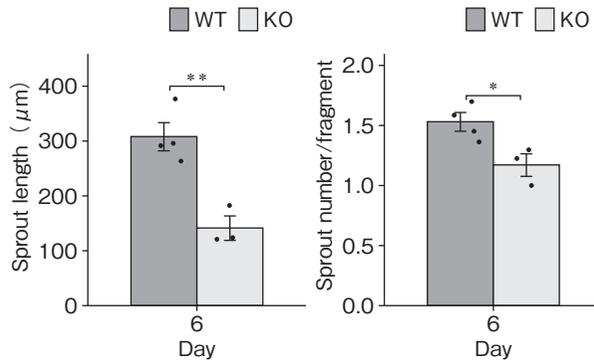


Fig. 2 Effect of CSPG4 on in vitro angiogenesis from microvascular fragments in collagen gel. Angiogenesis was evaluated by measuring sprout length (left) and sprout number (right). WT, wild-type ; KO, CSPG4 knockout. Graphed data are means \pm SEM (WT, n = 4 and KO, n = 3). * and **, p < 0.05 and 0.01 vs WT rats, respectively.

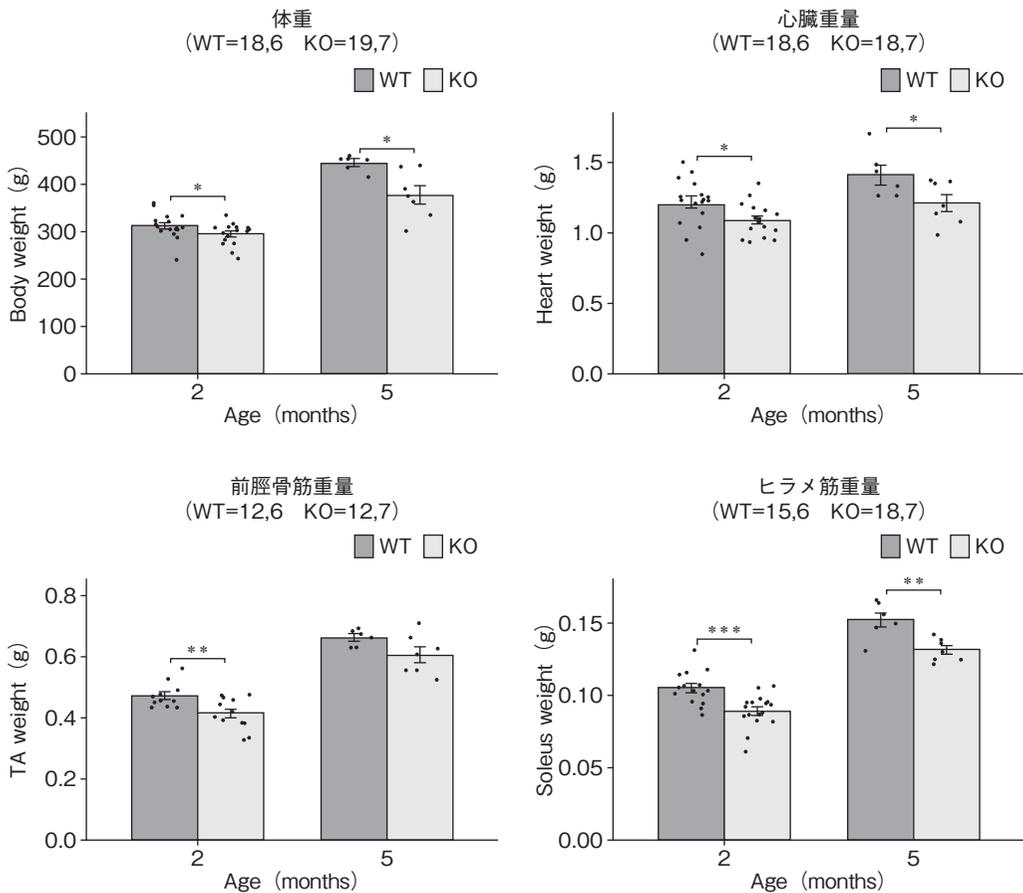


Fig. 3 Body, skeletal muscle and cardiac muscle weight of wild-type (WT) and CSPG4 KO rats. Graphed data are means \pm SEM (number of rats used are indicated in parentheses). *, ** and ***, p < 0.05, < 0.01 and p < 0.005 vs WT, respectively.

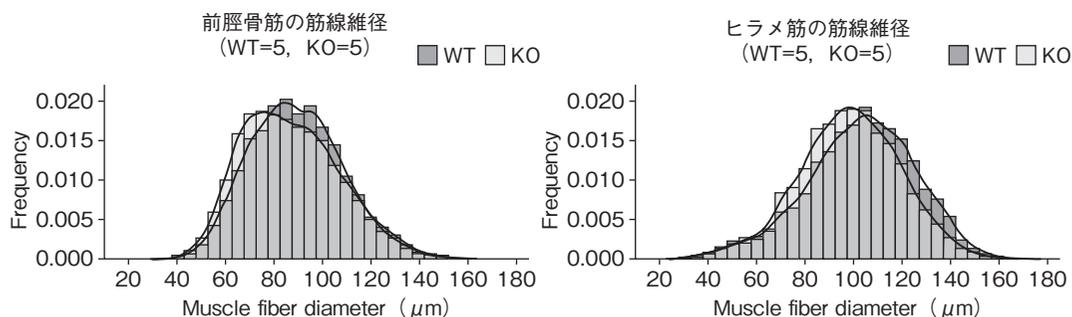


Fig. 4 Distribution of fiber diameters of tibialis anterior and soleus muscles of WT and CSPG4 KO rats. WT, wild-type ; KO, CSPG4 knockout.

能性が示された。

4. 要 約

本課題の仮説は「筋線維の成熟過程で形成される毛細血管網を増加させることができれば、効率的に筋線維の発達や成長を促すことが期待される」というものである。以上で得られた知見は、間葉系前駆細胞による血管新生機構が存在することを示すもので、本課題の仮説にも合致するものであった。今後はin vivoにおける血管発達の詳細な解析や間葉系前駆細胞からCSPG4が切断されて遊離する機序についての解明を進めることで、産肉量の増加に向けた新規のアプローチが可能になることが期待される。

文 献

- 1) Takeuchi, S., Yamanouchi, K., Sugihara, H., Matsuwaki, T., Nishihara, M. : Differentiation of skeletal muscle mesenchymal progenitor cells to myofibroblasts is reversible, *Anim Sci J*, **91**, e13368, 2020.
- 2) Takegahara, Y., Yamanouchi, K., Nakamura, K., Nakano, S. I., Nishihara, M. : Myotube formation is affected by adipogenic lineage cells in a cell-to-cell contact-independent manner, *Exp Cell Res*, **324**, 105~114, 2014.
- 3) Takeuchi, S., Nakano, S., Nakamura, K., Ozoe, A., Chien, P., Yoshihara, H., Hakuno, F., Matsuwaki, T., Saeki, Y., Takahashi, S., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Roles of chondroitin sulfate proteoglycan 4 in fibrogenic/adipogenic differentiation in skeletal muscle tissues, *Exp Cell Res*, **347**, 367~377, 2016.
- 4) Murakami, Y., Yada, E., Nakano, S. I., Miyagoe-Suzuki, Y., Hosoyama, T., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., Nishihara, M. : Establishment of bipotent progenitor cell clone from rat skeletal muscle, *Anim Sci J*, **82**, 764~772, 2011.

コリン供給源としての食肉機能の評価

Evaluation of meats functions as a choline resource

三 浦 豊

(東京農工大学大学院農学研究院)

Yutaka Miura

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

The nutritional properties of meats as the dietary choline resources were evaluated. The contents of choline-related compounds, that is, betaine, free choline, phosphocholine (P-choline), glycerophosphocholine (GPC) and phosphatidylcholine (PC) & sphingomyelin (SPM) in several kinds of beef, pork and chicken meats were determined by LC-MS/MS analyses. Water-insoluble choline (PC and SPM) was the most abundant in beef roast meats, while pork roast meats were rich in water-soluble choline, especially GPC. Chicken breast meats contained much amount of betaine as compared with other meats.

Rats were fed for 16 days with the diets that contained freeze-dried meats powders as all dietary choline source. There was no statistically significant difference in body weights, food intakes and liver weights among all groups, and the serum biochemical parameters were almost equal, although slight hypercholesterolemia and hypertriglyceridemia were observed in chicken-diet group. The serum concentration of PC and SPM was 10 times higher than that of water-soluble choline. Although there was no statistically significant difference, beef-diet group showed the highest serum total choline concentration among all meat-diet groups, suggesting that dietary PC and SPM might be important for the homeostasis of serum choline concentration. However total choline concentration in the control group was almost equal with beef-diet group. This result suggests that free choline is also important as dietary choline source in water-soluble choline compounds.

In conclusion, beef roast meat was proved to be a good resource for a dietary choline resource and dietary free choline and water-insoluble choline might be important for the homeostasis of serum choline metabolism.

1. 目 的

コリンは4級アンモニウムイオンのトリメチルアミノメタノールであり、乳、卵、食肉類に豊富に含まれている。現在、我が国ではコリンは必須の栄養素として扱われておらず、食品成分表への

記載もなく、また食事摂取基準も定められていないが、米国や欧州では食事摂取基準が定められており、また成分表示も行われている。さらに、米国農務省の食品成分データベースには食肉、肉製品のコリン含量が記載されているが、我が国の食品中のコリン化合物の含量は個別に調査されたも

の以外に知られておらず、データベースも存在していない。しかし、コリンは神経伝達物質であるアセチルコリン、細胞膜リン脂質であるフォスファチジルコリンの原料であるだけでなく、タンパク質・核酸のメチル化に関与する一炭素代謝経路を構成する重要な化合物であり、その栄養学的な重要性は明らかである。

本研究は、食事由来コリンの重要な供給源である食肉、特に我が国において主要な食肉である牛肉、豚肉、鶏肉を対象として、コリン含有化合物を部位ごとの違いも含めて測定し、既存のデータベースと比較すること、さらに各食肉の中で比較的高いコリン含量が多い部位の肉を主たるコリン源として実験動物に摂取させた際の血中コリン含有化合物濃度の変化を測定することにより、コリン供給源として優れた食肉を見出し、食肉の食品・栄養学的価値を高めることを目的とする。

2. 方法

2.1 食肉中のコリン含量の測定

コリン含有化合物としては水溶性のものとして遊離コリン (Free Choline)、ホスホコリン (P-Choline)、グリセロホスホコリン (GPC) の3種が、脂溶性のものとしてフォスファチジルコリン (PC)、スフィンゴミエリン (SPM) があり、これらの分別定量にはLC-MS/MSを用いた。測定に用いた食肉は、牛肉 (ロース、モモ)、豚肉 (ロース、ヒレ)、鶏肉 (もも、むね) の6種であり、いずれも地元のスーパーマーケットで購入した。食肉からのコリン測定用サンプルの調製は以下のように行った。各食肉は脂身を入れないように約5 gを精秤し、4倍量のメタノールを添加し、ホモジェナイズした。遠心した上清をそのままコリン測定用のサンプルとしてLC-MS/MS測定に供した。水溶性コリンとして、Free-Choline, P-Choline, GPCに加えてコリン関連化

合物であるベタインを、脂溶性コリンとしてPCとSPMを測定し、サンプルごとに食肉1 gあたりのコリン含有量を求めた。

LC-MS/MSは青木らの手法¹⁾を改変して行った。水溶性コリンの分析条件は以下のとおりである。HPLC (日立LC2000) にカラム (XBridge® HILIC3.5 μm , 2.1 x 100mm (Waters)) を装着し、流速0.2ml/min・カラム温度30°C・サンプル温度10°C、サンプル注入量5 μL の条件で分離した。遊離液はA: 5 mM酢酸アンモニウムpH4.0, B: 100%アセトニトリルとし、0分から3.2分:A. 18.5%, B. 81.5%, 3.2分から5分:A. 80%, B. 20%, 5分から14分:A. 80%, B. 20%, 14分から14.1分:A. 18.5%, B. 81.5%, 14.1分から20分:A. 18.5%, B. 81.5%のグラジエント条件で分離した。質量分析にはBruker daltonics社MicrOTOF-QIIを用いた。分析時に毎回内部標準物質としてギ酸ナトリウム (Bruker社) を最初に質量分析に供し、ピークの分子量を補正して精密分子量測定を行った。イオン化モードはESI/positiveモードとして、各成分のm/z (Free Choline 104.1070, P-Choline 184.0733, GPC258.1101, ベタイン 117.1463) を有する物質のピーク面積をもとに、複数の濃度の各標準品の分析から作成した検量線により濃度を求めた。

一方、脂溶性コリンは以下の条件で分析した。用いた機器は上記と同じである。使用カラムはCAPCELL PAK C8 (OSAKA SODA, Type: UG120, 5 μm , SIZE: 1.5mm I.D. x 150mm) とし、流速: 0.2ml/min, カラム温度: 30°C, サンプル温度: 10°C, サンプル注入量: 5 μL の条件で分離した。バッファーは、A: 5mM酢酸アンモニウムpH4.0, B: 100%アセトニトリルとして、0分から1分:A. 95%, B. 5%, 1分から5分:A. 40%, B. 60%, 5分から10分:A. 15%, B. 85%, 10分から17分:A. 5%, B. 95%, 17分から27分:

A. 5%, B. 95%, 27分から27.2分: A. 95%, B. 5%, 27.2分から30分: A. 95%, B. 5%のグラジエント条件で分離した。標準品(PC, Avanti社製, PC (12:0/12:0))とサンプルを1:9の比率で混合し、内部標準のピーク面積との比較により、検出されたピークの濃度を算出した。PCおよびSPMのピークの検出は、MS/MS分析によりホスホコリンに相当するm/zである184.0733が検出された親イオンの分子量を確認し、その分子量を有する物質のクロマトグラムを作成することで行った。検出された複数のピークをまとめて測定することでPCおよびSPMの濃度とした。したがって、今回の分析では各分子量ごとのPC & SPMの合計として示した。

2.2 食肉をコリン源とした食餌の作製と動物飼育実験

食肉の分析結果から脂溶性コリンが最も多く含有される牛肉(ロース), 水溶性コリンが最も多く含まれる豚肉(ロース), ベタインが多く含まれる鶏肉(むね)を選び、各食肉をコリン源とする食餌を作製して、ラットを飼育した。食肉は食肉メーカーより直接購入した。脂身をできるだけ

取り除き、ロース芯に相当する部分のみを取り出した。食品用チョッパーを用いて、肉をミンチにし、そのまま凍結乾燥後、フードプロセッサーで細粉化した。食餌組成はTable 1に示した。基本組成はAIN93Gに準拠したが、通常添加されている遊離コリン量を食肉のみで添加することは食肉中のコリン含有量から困難であったため、コリン含量を3分の1に減らし、同量のコリンを含む食肉乾燥粉末を計算し、それらに含まれるタンパク質、脂質含量を日本食品標準成分表(七訂)の該当する項目から抽出し、それらの値を用いて、添加する脂質、糖質を調整した。したがって、今回用いた食餌ではタンパク質含量は群ごとに異なる(Table 1に計算による含量比を記載)。

Wistar系雄ラット(5週齢, 日本SLC)24頭を予備飼育の後、一群6頭として平均体重が等しくなるように4群に分け、AIN93G(低コリン, Con), Beef食, Pork食, Chicken食の4群で16日間飼育した。食餌, 水は自由摂取とし、食餌摂取量は毎日、体重は2日ごとに測定した。飼育終了時に麻酔下、下向大静脈より全採血し、血清を調製した。血清中のコリン関連化合物の測定は、

Table 1 The composition of experimental diets

(g/100 g diet)	Control diet (20C)	Beef diet	Pork diet	Chicken diet
β -cornstarch	39.227	41.7	42.2	34.3
Casein	20.0	0	0	0
Beef powder	0	25.6	0	0
Pork powder	0	0	25.1	0
Chicken powder	0	0	0	28.0
α -cornstarch	13.2	13.2	13.2	13.2
Sucrose	10	10	10	10
Corn oil	8	0	0	5
Cellulose powder	5	5	5	5
Mineral mixture (AIN93G)	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture (AIN93G)	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.073	0	0	0
	100	100	100	100

The values are calculated based on the choline contents in meats (Table 2) and other nutrients contents in Standard Tables of Food Composition in Japan (7th ed.). The protein contents are 16.7%, 15.5% and 25.7% for beef diet, pork diet and chicken diet respectively. Fat content is 8% in all diets. The choline contents in all diets are equal.

血清10 μ l にメタノール90 μ l を添加し、10分間超音波処理後に遠心した上清をサンプルとして行った。分析条件は上記と同じである。また、血清中の各種生化学指標を外部に委託して測定した(血糖値, 血中総タンパク質, アルブミン, 総コレステロール, HDL-コレステロール, トリグリセリド, 遊離脂肪酸, リン脂質)。

3. 結果と考察

3.1 食肉中のコリン含量について

Table 2 に分析結果を示した。数値はコリン関連化合物ごとのコリンの量として算出したものである。牛肉は水溶性コリン化合物に比べて、脂溶性コリンを多く含むこと、豚肉は両者の量がほぼ同じであるが、比較的水溶性コリン、特にGPCが多いこと、鶏肉は牛肉と同様脂溶性コリンの方が多いが、その量は牛肉よりも少ないということが明らかになった。Table 2 にUSDAのデータベース²⁾から抜粋した食肉の値も示したが、P-Cholineを除いてほぼ同じ傾向になっている。今回の測定でP-Cholineが高めになった原因は不明であるが、測定法の違い、標準品の純度などが関係している可能性が考えられた。また、USDAのデータベース記載の値は食肉の部位が異なった

り、調理肉の数値が記載されていたりと直接比較することは難しい。我が国の食材の分析を進め、独自のコリンデータベースを構築する必要があると考えられる。なお、今回の分析では脂溶性コリンとして100種前後の分子種が検出されているが、詳細については割愛する。しかし、三浦らの報告³⁾では食肉中に奇数脂肪酸を有するPCが存在することも明らかにされており、今回の測定でも奇数脂肪酸が結合したPCの存在を示唆するデータが得られている。

次に、Table 2 の結果をもとにしてコリン供給源として食肉凍結乾燥粉末のみを用いた食餌を複製し、ラットに摂取させ、食肉のコリン供給源としての評価を実施した。

3.2 食肉由来コリン含有食による飼育実験

16日間の飼育に関する基礎データをTable 3 に示した。体重増加量に関してはChicken群がBeef群よりも有意に高い値を示したが、他の群間では有意な差は認められなかった。コリン量を合わせるためにChicken群ではタンパク質レベルが高くなっていることがその理由の一つであると考えられた。食餌摂取量、肝臓重量に差は見られなかった。

Fig. 1 に血清生化学指標の測定結果をまとめ

Table 2 Choline contents in beef, pork and chicken meats

Meat		Betaine	Free choline	GPC	P-choline	PtdCho & SPM	Total Choline
(mg choline moiety/100 g wet weight)							
Beef	Roast	5.45	2.60	4.53	13.80	42.33	63.72
	Tight	5.02	0.80	3.52	13.34	28.14	46.13
Pork	Roast	7.06	4.04	14.48	14.21	40.82	73.72
	Fillet	2.78	2.40	15.25	13.77	31.85	63.42
Chicken	Breast	12.04	2.77	2.68	8.33	34.89	48.97
	Tight	3.61	3.64	2.20	5.62	38.38	50.13
USDA database ²⁾							
Beef	Shoulder	12.0	1.0	6.1	1.5	66.2	75.0
Pork	Shoulder	4.1	5.4	11.0	1.0	61.0	79.5
Chicken	Broilers	8.5	5.8	1.1	3.5	56.0	66.0

Table 3 Initial body weight, body weight gain, food intake and liver weight

	Con	Beef	Pork	Chicken
Initial body weight (g)	151.8 ± 1.5	152.3 ± 2.0	152.5 ± 1.7	152.7 ± 3.0
Body weight gain (g)	74.8 ± 2.0 ^{ab}	72.0 ± 3.0 ^a	74.0 ± 2.9 ^{ab}	83.7 ± 2.4 ^b
Food intake (g/16 days)	237.5 ± 2.6	226.6 ± 5.4	233.7 ± 5.4	239.3 ± 2.7
Liver weight (g)	8.90 ± 0.26	8.36 ± 0.25	8.68 ± 0.32	9.51 ± 0.36

Values are means ± SEM for 6 rats. Values not sharing a common letter are statistically significant at $p < 0.05$ by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's multiple comparison test.

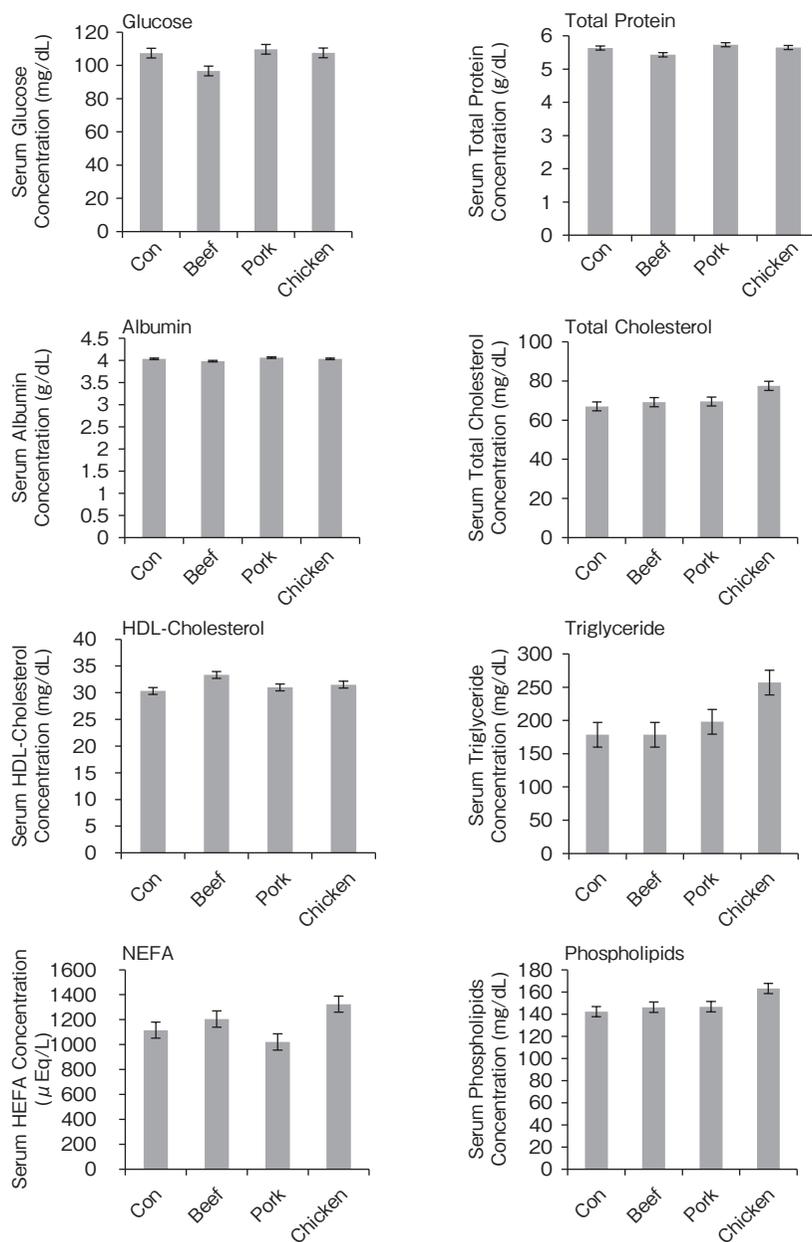


Fig. 1 Serum concentration of biochemical parameters in rats. Values are means ± SEM for 6 rats.

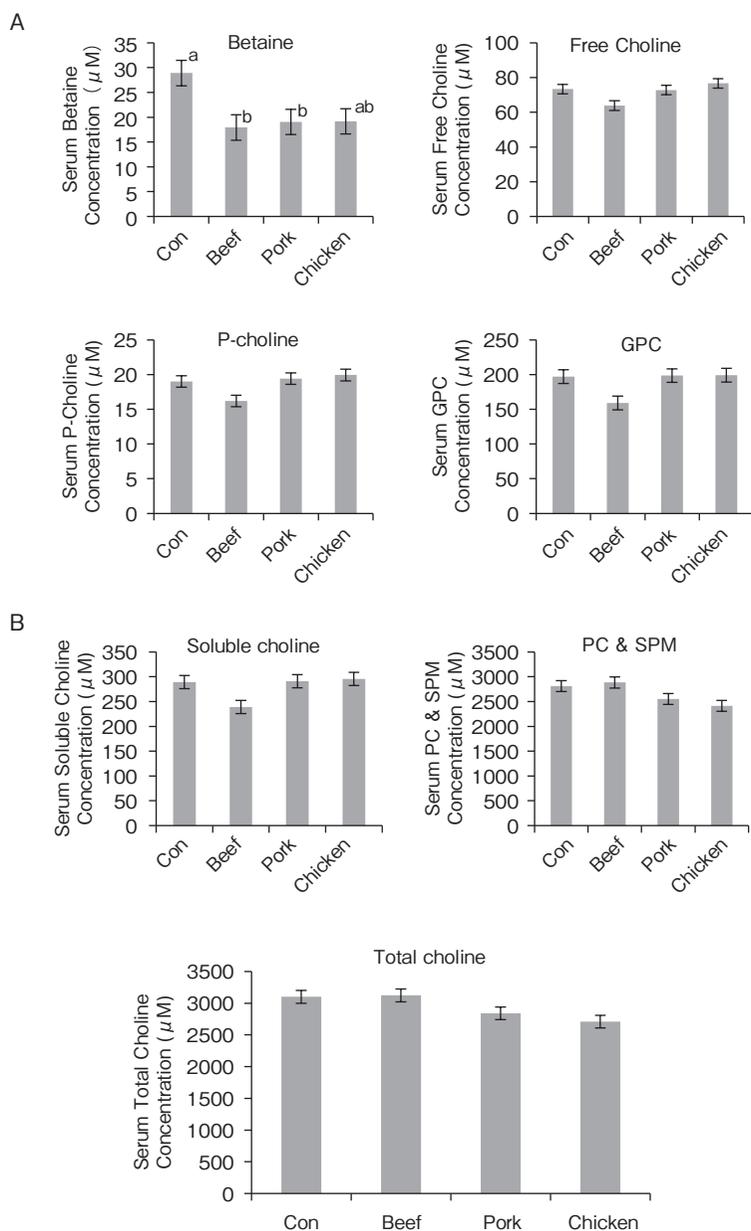


Fig. 2 Serum concentration of choline-related compounds in rats.

A : Betaine and soluble choline-related compounds

B : Total soluble and insoluble choline

Values are means \pm SEM for 6 rats. Values not sharing a common letter are statistically significant at $p < 0.05$ by one-way ANOVA followed by Tukey-Kramer's multiple comparison test.

た。どの指標においても有意差は見られなかったが、総コレステロール濃度、トリグリセリド濃度、遊離脂肪酸濃度、リン脂質濃度においてChicken群が高めの値を示した。

血中のコリン関連化合物濃度の測定結果をFig. 2に示した。血中水溶性コリン濃度は脂溶性コリン濃度の約10分の1程度であり、これまで我々が測定しているラットおよびヒトの血中の存在比と

同様の傾向が見られた（未発表データ）。統計学的に有意な差が見られたのはベタイン濃度のみであり、対照群と比較して食肉群すべてにおいて有意に低い値を示していた。対照群には外因性のベタインは添加されておらず、一方の食肉群には食肉由来のベタインが添加されているにも関わらず、このような結果になった正確な理由は不明であるが、コリンの存在様式が異なる形で食事を摂取することがベタインを含めたコリン代謝経路に影響していることが明らかとなった。

コリン濃度に関しては4群間で有意な差は見られなかったが、Beef群のみが対照群と同程度の値を示し、他のPork群、Chicken群は低めの値を示した。食肉群は脂溶性コリンが最も多く含まれており、そのため血中脂溶性コリン濃度も他の2群に比べて高くなったと推測される。一方、Beef群は水溶性コリン化合物の含有量が少なく、実際に摂取したラットの血中においても水溶性コリン化合物の濃度がすべての化合物において低めの値を示している。一方、対照群はコリン源として遊離コリンである重酒石酸コリンのみを含有した食事であるが、水溶性コリン、脂溶性コリンともに高い値を示している。これらの結果から、コリンを食事から摂取する際には遊離コリンか脂溶性コリンの形で摂取することが望ましく、そうすることで体内のコリン代謝経路が適切に働くのではないかと推測される。さらに、食肉間では脂溶性コリンが豊富な牛肉がコリン供給源として適していると考えられた。今後、食品中で最も多量の脂溶性コリンを含有する卵、特に卵黄を材料として同様の実験を行い、牛肉と比較することが必要である。すでに我々はコリン関連化合物の細胞への吸収や利用効率が化合物ごとに異なることを培養細胞で明らかにしている（未発表データ）。コリン関連化合物ごとの生体利用率を明らかにすることは適切なコリン摂取の基準を定めるためにも重要

であり、今後の課題である。

4. 要 約

食肉のコリン供給源としての栄養学的特性を評価するため、6種類の食肉中のコリン関連化合物含量を定量し、さらに3種類の食肉についてコリン供給源として食肉のみを用いた食餌を作製し、ラット飼育実験を行った。その結果、牛肉（ロース）には脂溶性コリンが、豚肉（ロース）には水溶性コリン（特にGPC）が豊富に含まれていること、鶏肉（胸肉）にはベタインが比較的多く含まれていることが明らかとなった。これらの食肉を用いた食餌をラットに摂取させた結果、牛肉食がコリン供給源として他の食肉よりも優れている可能性が示唆された。

コリンは生体恒常性維持のために重要な栄養素であるが、未解明な点が多く残されている。食肉は食生活上重要なコリン供給源であるため、今後さらに検討を進める必要がある。

最後に、本研究の実施にあたりご支援いただいた伊藤記念財団に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Okudaira, M., Inoue, A., Shuto, A., Nakanaga, K., Kano, K., Makide, K., Saigusa, D., Tomioka, Y., Aoki, J.: Separation and quantification of 2-acyl-1-lysophospholipids and 1-acyl-2-lysophospholipids in biological samples by LC-MS/MS, *Journal of lipid research*, 55, 2178~2192, 2014.
- 2) Kristine Y. Patterson, Seema A. Bhagwat, Juhi R. Williams, Juliette C. Howe, Joanne M. Holden: USDA database for the choline contents in common foods. Release 2, January 2008, <https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80400525/data/choline/choln02.pdf>
- 3) Yamamoto, S., Kato, S., Senoo, N., Miyoshi, N., Morita, A., Miura, S.: Differences in phosphatidylcholine profiles and identification of characteristic phosphatidylcholine molecules in meat animal species and meat cut locations, *Biosci. Biotech, Biochem*, 85, 1205~1214, 2021.

食肉中に含まれる 2-オキソ-イミダゾールジペプチド に関する研究

Studies on 2-oxo-imidazole dipeptides in meat

居原 秀・笠松 真吾

(大阪府立大学大学院理学系研究科)

Hideshi Ihara and Shingo Kasamatsu

(Graduate School of Science, Osaka Prefecture University)

Imidazole dipeptides (IDPs), such as carnosine and anserine, are present in meat at high concentrations. They can act as antioxidants and metal chelators, and are involved in various physiological processes, such as anti-aging and anti-advanced glycoxidation end-product activities. Recently, in mouse tissue samples, we demonstrated the endogenous production of 2-oxo-IDPs, such as 2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine, which exhibited significantly higher antioxidant activities than IDPs. The functional oxidation products of IDPs, 2-oxo-IDPs, are most abundantly found in muscle. However, information has been scarce about 2-oxo-IDPs in meat. In this study, we aimed at quantifying 2-oxo-IDPs in various meats and increasing 2-oxo-IDP content in meat hot water extracts.

We quantified IDPs (carnosine and anserine) and 2-oxo-IDPs (2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine) in meats from various animals and chicken using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a stable isotope dilution method. The analysis of 36 samples showed that IDPs were present in meats at the concentration range of 72.8-397.2 nmol/mg protein, consistent with previously reported results. Furthermore, we identified and quantified the 2-oxo-IDPs in meats, and determined that 2-oxo-IDPs are present in meat at the concentration range of 0.026-0.90 nmol/mg protein. The 2-oxo-carnosine contents in foreign bovine sirloin and 2-oxo-anserine contents in chicken meat were higher than those in other meats.

In addition, we prepared a chicken breast hot water extract as a model of meat processing residue. The hot water extract contained carnosine and anserine in millimolar concentrations. The incubation of the hot water extract with copper ion and ascorbate under oxygen ventilation enhanced 2-oxo-IDPs levels in a copper ion and ascorbate concentration-dependent manner. Under optimum conditions, the 2-oxo-IDPs levels in the extracts increased by 359-fold. When air was ventilated instead of oxygen, the 2-oxo-IDPs levels increased by 140-fold. These results suggest the possibility of effective meat residue application by increasing the functional 2-oxo-IDPs molecules present in the meat processing residue.

1. 目 的

カルノシンやアンセリンなどのイミダゾールジペプチド (IDPs) は、食肉中に高濃度存在することが知られていて、抗酸化能、抗糖化能、抗炎症活性、細胞保護活性などの多様な生理活性を持ち、機能性食品成分として利用されている¹⁾。しかしながら、IDPsの生理活性の発現メカニズムは不明な点が多く残っている。最近、申請者らは、IDPsの機能性酸化生成物である2-オキソ-カルノミンや2-オキソ-アンセリンなどの2-オキソ-IDPsの生体内産生を世界で初めて明らかにし、筋肉に最も多く含まれることを示した²⁾。さらに、2-オキソ-IDPsがIDPsよりもはるかに高い抗酸化活性、細胞保護活性を持つことを示した^{2~4)}。これらの結果は、これまで知られていたIDPsの生理活性の本体が、2-オキソ-IDPsであることを示唆している。したがって、IDPsを機能性食品成分として利用する場合、食品中の2-オキソ-IDPsの存在様式に関する知見が重要となる。

食肉および加工残渣にはIDPsが多く含まれているが、2-オキソ-IDPsに関する知見は皆無である。2-オキソ-IDPsは、強力な生理活性因子としての可能性を秘めた新たな機能性食品成分なので、食肉および加工残渣中の2-オキソ-IDPsの存在様式を明らかにし、さらに含量を高めることができれば、食肉、加工残渣の付加価値を高め、さらに健康増進、疾患予防に適用できることが期待される。本研究では、申請者が開発した高感度定量解析法でさまざまな食肉中の2-オキソ-IDPsを定量することと、申請者が開発した2-オキソ-IDPsの合成法を利用して、食肉加工残渣中の2-オキソ-IDPs量を高める方法を開発することを目的とした。

2. 方 法

2.1 食肉サンプル

本実験で解析した食肉をTable 1に示す。牛6品種14サンプル、ヒツジ2品種2サンプル、シカ2品種2サンプル、豚3品種7サンプル、イノシシ2品種2サンプル、ウマ2品種2サンプル、カンガルー2品種2サンプル、鶏3品種5サンプルの合計36サンプルを解析した。各サンプルはインターネット経由で購入し、冷凍で配送されたものを解析するまで-80℃で保存した。

2.2 安定同位体標識標準物質の調製

安定同位体標識標準物質は、以前に報告した方法で調製した²⁾。安定同位体標識カルノシンは、 $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_1]$ β -アラニンとp-トルエンスルホン酸 (pTsOH) を混合し、さらに塩化チオニルを添加して $[^{13}\text{C}_3, ^{15}\text{N}_1]$ β -アラニンCl \cdot pTsOHを得、また、ヒスチジンとp-TsOHを反応させたヒスチジン \cdot 2pTsOHと反応させて合成した。高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いて分取、精製し、濃度既知のカルノシンを用いて濃度を決定した。

安定同位体標識アンセリンは3-メチルヒスチジンをを用い、同様の方法で調製した。

安定同位体標識2-オキソ-IDPsは、上記で調製した安定同位体標識IDPsを原料にし、硫酸銅、アスコルビン酸存在下で酸素を通気して調製した(銅 \cdot アスコルビン酸法)。

2.3 IDPs, 2-オキソ-IDPsの抽出

食肉100mgに10倍量の安定同位体標識2-オキソ-IDPsを含む80%アセトニトリルを添加し、氷上でホモジナイズした。懸濁液の一部をIDPs解析用およびタンパク定量用に別のチューブに回収した(後述)。残りの懸濁液を遠心し、上清を別チューブに移した。減圧濃縮後、100mM塩酸をホモジナイズ時の体積になるように加え、等量の

Table 1 List of meat samples

サンプル番号	動物	部位	ブランド・品種	産地
1	ウシ	サーロイン	あか牛	熊本県阿蘇
2		ロース	但馬牛	兵庫県
3		ウデ		
4		リブロース		
5		バラ		
6		サーロイン		
7		モモ		
8		ロース	豊西牛	北海道
9		ウデ		
10		リブロース		
11		サーロイン		
12		サーロイン	アメリカ牛	アメリカ
13		サーロイン	オーストラリア牛	オーストラリア
14		サーロイン	ニュージーランド牛	ニュージーランド
15	ヒツジ		ラム	オーストラリア
16			マトン	オーストラリア
17	シカ	モモ	シカ	高知県 梶原
18		モモ	エゾシカ	北海道
19	ブタ	ロース	桜島美湯豚	鹿児島県
20		バラ		
21		モモ		
22		ロース	大和美豚	奈良県
23		モモ		
24		ロース		
25	モモ	TOKYO X	東京都	
26	イノシシ	モモ	長州ジビエ イノシシ	山口県下関
27		モモ	イノシシ	高知県 梶原
28	ウマ	モモ	ウマ	熊本県
29		モモ	ウマ	メキシコ
30	カンガルー	モモ	カンガルー	オーストラリア
31		モモ	カンガルー	オーストラリア
32	ニワトリ	ムネ	ふもと赤鶏	佐賀県
33		ムネ	茶美鶏	徳島県
34		モモ	錦爽鶏	愛知県
35		ウデ		
36		ムネ		

酢酸エチル/ヘキサン (80%/20%) を添加, 混合した。静置した後, 回収した水層を強カチオン交換樹脂カラムに供し, 水, 1 M塩酸で洗浄後, 1 Mアンモニアで溶出した。溶出液を濃縮乾固後, 0.1%ギ酸に溶解し, HPLC-タンデム質量分析で多重反応モニタリング (MRM) 法, 安定同位体

希釈法により定量解析を行った。

分注しておいた懸濁液は遠心し, 上清を安定同位体標識IDPsを含む0.1%ギ酸で希釈し, 同様に定量解析を行った。また, 沈殿を1%ドデシル硫酸ナトリウム 200 μ lに溶解し, BCAタンパク質定量キットを用いて, 牛血清グロブリンを標準

Table 2 MRM parameters

Analyte	Precursor ion (<i>m/z</i>)	Product ion (<i>m/z</i>)	Collision energy (V)
カルノシン	227.0	110.1	20
カルノシン-SI	231.0	110.1	20
アンセリン	241.0	109.1	25
アンセリン-SI	245.0	109.1	25
2-オキソ-カルノシン	243.1	196.1	10
2-オキソ-カルノシン-SI	247.1	198.0	10
2-オキソ-アンセリン	257.2	169.1	15
2-オキソ-アンセリン-SI	261.1	169.1	15

タンパク質として、タンパク質量を定量した。

2.4 高速液体クロマトグラフィー-タンデム 質量分析 (HPLC-MS/MS)

HPLC-MS/MSは、HPLC Alliance e2695(Waters)、三連四重極型質量分析装置Xevo TQD (Waters)を用いた²⁾。IDPsは、Scherzo SS-C18カラム (Imtakt) を用い、0.1%ギ酸と50mMギ酸アンモニウム/50%アセトニトリルの濃度勾配で溶出した。2-オキソ-IDPsは、Intrada Amino Acidカラム (Imtakt) を用い、0.1%ギ酸/アセトニトリルと100mMギ酸アンモニウムの濃度勾配で溶出した。質量分析のMRMパラメーターをTable 2に示す。

2.5 2-オキソ-IDPsを多く含む食肉熱水抽出 液の調製

鶏ムネ肉10gを包丁で2~3mm角になるように刻み、300ml三角フラスコに入れた。水100mlを加え懸濁し、三角フラスコごと沸騰湯浴中で1時間静置した。懸濁液を遠心し、上清を熱水抽出液とした。熱水抽出液にリン酸水素二ナトリウム (終濃度100mM)、硫酸銅、アスコルビン酸を添加し、室温で酸素または空気を1時間通気した後、上記の方法で、カルノシン、アンセリン、2-オキソ-カルノシンおよび2-オキソ-アンセリンを定量した。

3. 結果と考察

3.1 食肉中のIDPs、2-オキソ-IDPsの定量

HPLC-MS/MSを用いたMRM法、安定同位体希釈法によるIDPsの定量結果をFig. 1に示す。IDPsの総量は、72.8~397.2nmol/mg protein (3.3~18.8g/kg 筋肉：筋肉中20%がタンパク質として)であり、大筋で既報の結果と一致していた¹⁾。種間、系統間、部位間で、IDPs総量に大きな違いは認められなかった。牛、豚、ウマではカルノシンが主要なIDPsであり、ヒツジ、シカ、イノシシ、カンガルー、鶏ではアンセリンの含量が多く、既報の結果と一致していた¹⁾。牛とヒツジは哺乳綱鯨偶蹄目ウシ科に、豚とイノシシは哺乳綱鯨偶蹄目イノシシ科に属し、系統的に近縁にあるにも関わらず、カルノシン・アンセリンの組成比は異なっていた。これは、餌や生育環境がカルノシン・アンセリンの組成に影響を与えているためであると考えられる。

2-オキソ-IDPsの定量結果をFig. 2に示す。本結果は、マウス以外の筋肉中における2-オキソ-IDPsの存在を示す世界で初めての結果である。2-オキソ-IDPsの総量は0.026~0.90nmol/mg proteinであり、IDPsの0.02~0.41%に相当する。申請者は、マウス骨格筋におけるIDPs、2-オキソ-IDPsは、それぞれ34.9、0.035nmol/mg proteinであり、IDPsの0.10%に相当することを

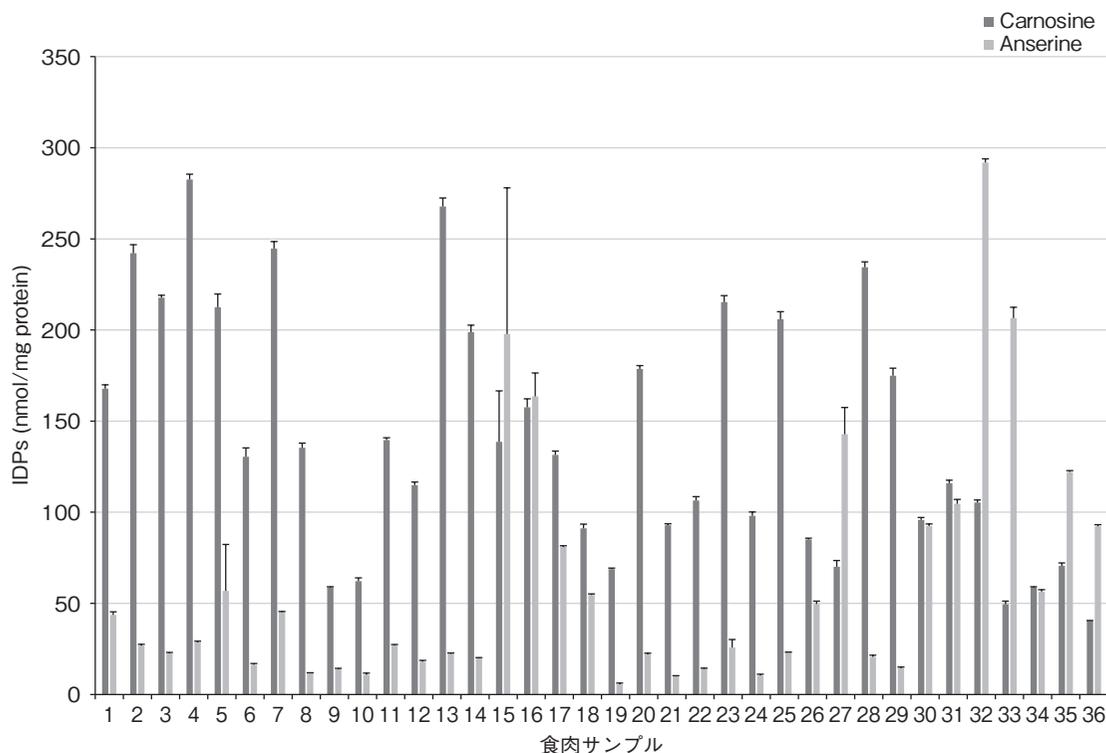


Fig. 1 Quantitative analysis of carnosine and anserine in meats. Carnosine and anserine in meats were quantified using HPLC-MS/MS coupled with a stable isotope dilution method.

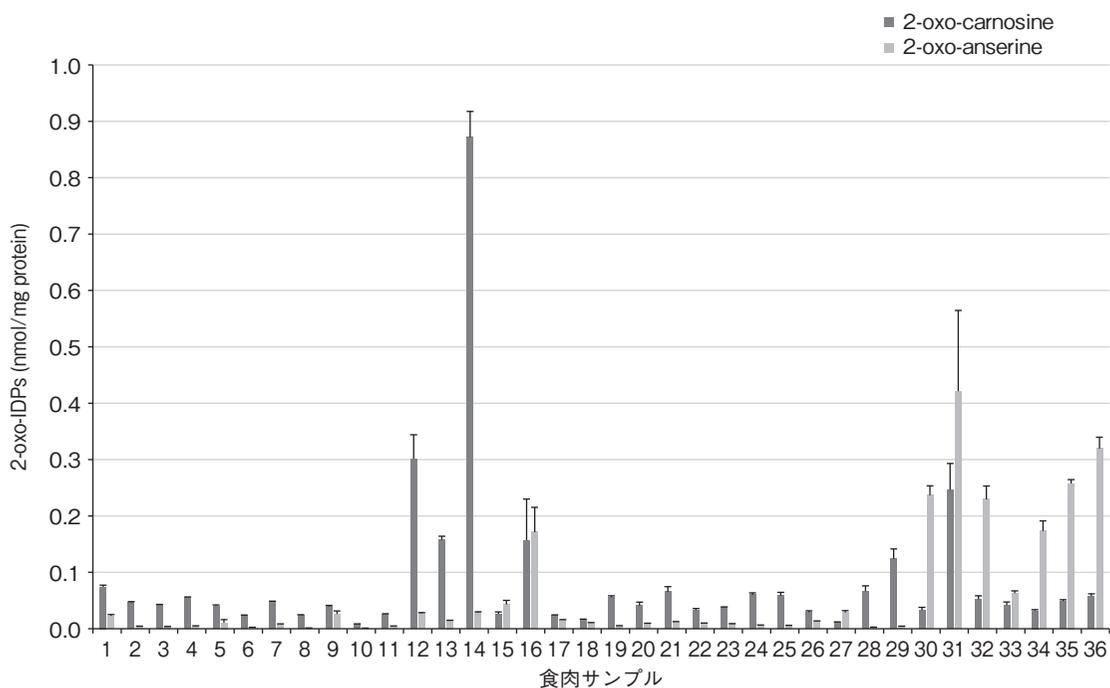


Fig. 2 Quantitative analysis of 2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine in meats. 2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine in meats were quantified using HPLC-MS/MS coupled with a stable isotope dilution method.

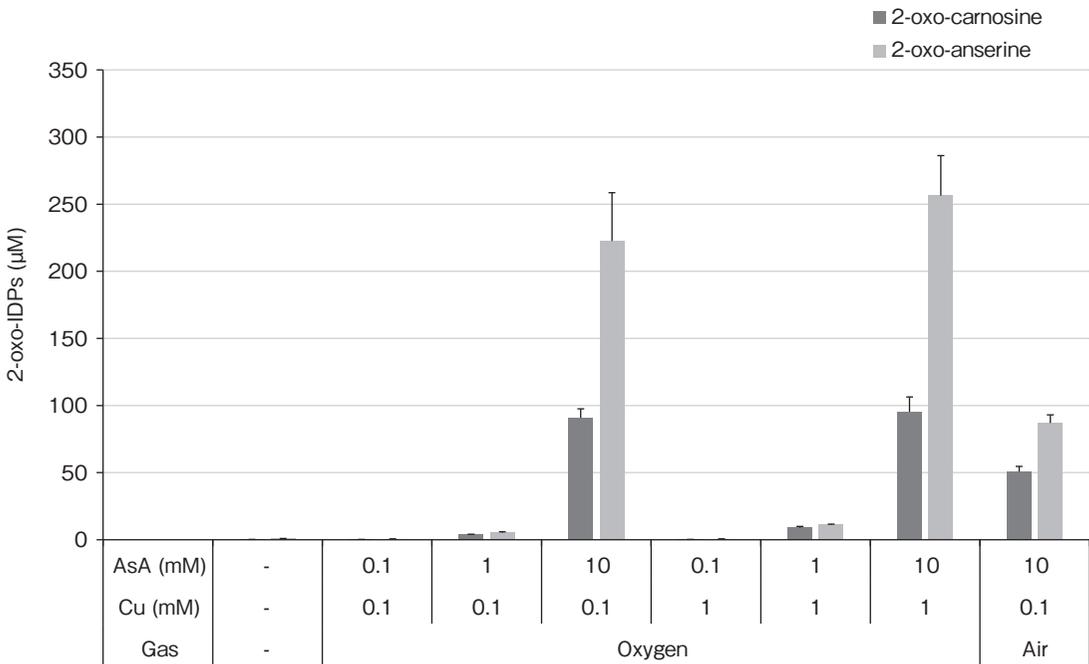


Fig. 3 Production of 2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine in hot water extract of a chicken breast. The hot water extract was incubated with copper ion and ascorbate under oxygen or air ventilation. 2-oxo-carnosine and 2-oxo-anserine in the extract were quantified using HPLC-MS/MS coupled with a stable isotope dilution method. ASA, ascorbic acid ; Cu, copper.

報告している²⁾。本実験の結果と合わせると、哺乳類、鳥類の筋肉中には、IDPsの数百分の1～数千分の1の2-オキソ-IDPsが含まれていると推察される。なかでも、外国産牛サーロインの2-オキソ-カルノシン、鶏の2-オキソ-アンセリンの含量が高かった。この結果から、種、系統、部位、餌、飼育環境、食肉加工方法、保存状態などが2-オキソ-IDPs含量に影響を与えている可能性が考えられる。

3.2 2-オキソ-IDPsを多く含む食肉熱水抽出液の調製法の検討

鶏ムネ肉の熱水抽出液を食肉加工残渣のモデルとして、我々が開発した銅・アスコルビン酸法²⁾を用いて2-オキソ-IDPsの高含量化を検討した(Fig. 3)。本実験で調製した熱水抽出液中には、カルノシン、アンセリン、2-オキソ-カルノシン、2-オキソ-アンセリンが、それぞれ1.30mM、

2.27mM、0.22 μM、0.76 μM含まれていた。熱水抽出液に硫酸銅、アスコルビン酸を加え、酸素を通気したところ、硫酸銅、アスコルビン酸の濃度に依存して2-オキソ-IDPsが増加した。硫酸銅1 mM、アスコルビン酸10mMの場合、未処理の359倍に増加した。

また、酸素の代わりに水槽用エアポンプを用いて空気を通気したところ、酸素通気の場合と同様に、2-オキソ-IDPsが140倍に増加した。この結果から、酸素ガスの代わりに空気を利用することで、簡便に2-オキソ-IDPsの生成が可能であることが示された。

4. 要 約

イミダゾールジペプチド (IDPs) は食肉中に高濃度存在し、抗酸化能などの多様な生理活性を持つことが知られている。最近、申請者らは、

IDPsの機能性酸化生成物である2-オキソ-カルノミンや2-オキソ-アンセリンなどの2-オキソ-IDPsの生体内産生を明らかにし、筋肉に最も多く含まれること、2-オキソ-IDPsがIDPsよりもはるかに高い抗酸化能を持つことを示した。これまでに食肉中の2-オキソ-IDPsに関する知見は皆無である。本研究では、さまざまな食肉中の2-オキソ-IDPsを定量することと、食肉熱水抽出液中の2-オキソ-IDPs含量を高める方法を開発することを目的とした。

哺乳類、鳥類由来の食肉中には、IDPsが72.8~397.2nmol/mg protein含まれていた。また食肉中に、0.026~0.90nmol/mg proteinの2-オキソ-IDPsが存在することを明らかにした。外国産牛サーロインの2-オキソ-カルノシン、鶏の2-オキソ-アンセリンの含量が高かった。また、食肉加工残渣モデルとして鶏ムネ肉熱水抽出液を調製し、硫酸銅、アルコール存在下で酸素または空気を通

気したところ、2-オキソ-IDPsがそれぞれ359倍、140倍に増加した。これらの結果は、食肉加工残渣中に存在する機能性分子2-オキソ-IDPsを増加させることによって、食肉加工残渣の付加価値を高め、有効利用に展開していく可能性を示唆している。

文 献

- 1) A. A. Boldyrev, G. Aldini, W. Derave : Physiology and Pathophysiology of Carnosine, *Physiol. Rev.*, **93**, 1803~1845, 2013.
- 2) Ihara, H., Kakihana, Y., Yamakage, A., Kai, K., Shibata, T., Nishida, M., Yamada, K., Uchida, K. : 2-Oxo-histidine-containing dipeptides are functional oxidation products, *J. Biol. Chem.*, **294**, 1279~1289, 2019.
- 3) 垣花優希, 笠松真吾, 居原秀 : 酸化イミダゾールジペプチドによる生体機能調節, *実験医学増刊*, **38**, 1637~1643, 2020.
- 4) Kakihana, Y., Kasamatsu, S., Uchida, K., Ihara, H. : Distribution and quantitative analysis of homoanserine and its 2-oxo derivative in mouse tissues, *Free Radic. Res.*, 2021 in press.

国際基準および国内と畜場の現場実態に適合した 牛枝肉の生物的有害要因制御のための内部検証方法 の開発

Development of internal verification methods for control of biological hazard in beef carcasses adapted to both global standard and domestic slaughterhouses

猪 島 康 雄

(岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科)

Yasuo Inoshima

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

In slaughterhouses in Japan, the cleanliness of all carcasses (lots) is generally evaluated by examining the viable bacteria count by the “cotton ball method.” In this method, cotton balls are used to wipe the surface of a certain number of carcasses determined according to the number of slaughtered animals. However, the testing accuracy of this method is not high due to its low acquisition of viable bacteria from the carcass surface. In addition, no clear method has been established to evaluate the cleanliness of all carcasses (lots) based on the test result of extracted carcasses. This study compared the viable bacterial counts examined by four test methods: excision (EC), sponge swab (SS), cotton ball (CB), and cotton stick (CS). In addition, the number of samples required to evaluate the cleanliness of all carcasses (lots) at internal verification was calculated by probability estimation based on the three-level method recommended by the International Commission on Microbiological Specifications for Foods.

EC displayed a high value in the comparative quantification of the sample collection methods and was considered appropriate for evaluating the true value. However, the EC method could not be easily performed on multiple samples, and was therefore economically and operationally challenging. The viable bacteria count determined by EC is equivalent to the viable bacteria count measured by the CB multiplied by 50. In addition, the three-level method revealed that 10 samples were required for adequacy evaluation of lot at internal verification. Therefore, microbial testing by CB with 10 samples was considered practical for internal verification.

To control microbial hazards of beef carcasses in slaughterhouses, we successfully developed an internal verification method. Statistical evaluation demonstrated that the method is compatible with the actual situation of domestic slaughterhouses and is scientifically supported by international standards.

1. 目 的

2018年6月、食をとりまく環境変化や国際化等に対応し、食品の安全を確保するため、食品衛生法、と畜場法の一部が改正された。2020年6月からは、規模によらずすべてのと畜場においてHACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) に基づく衛生管理の実施が義務化された(1年間の猶予期間あり)。と畜業者等は、衛生管理計画の妥当性や枝肉の微生物汚染検査について、食肉衛生検査所による「外部検証」を受けることになった。国は、外部検証における微生物汚染検査においては枝肉を一定面積、かつ一定数切除して微生物検査する「切除法」を採用し、全国の食肉衛生検査所に通知している。枝肉の微生物検査方法は国によって異なっており、EUでは「切除法」、米国では表面積の広いスポンジで枝肉の表面を拭き取る「スポンジ法」が採用されている。一方、と畜場管理者が行う「内部検証」については、枝肉を傷つける「切除法」は商品価値を損ない、また、時間と手間を要し、多検体の実施が困難なことから、日常的に実施することは経済的にも運用的にも困難である。外部検証において「切除法」を採用しているEUにおいても、内部検証に「切除法」を適応することは同様の理由により難しい

と報告された^{1,2)}。一般にわが国のと畜場では、と畜頭数に応じて抽出した一定数の枝肉の表面を綿球で拭き取る「綿球法」により、一般生菌数を調べることで枝肉全数(ロット)の清浄度を評価している。しかし、同法は枝肉表面からの生菌の回収性が低く、検査精度が高くない。また、抽出した枝肉の検査結果から枝肉全数(ロット)をどう評価するかについても明確な手法が確立されていない。食品製造においては、原材料搬入および製造から流通に至るまで、すべての関係者の同意なくしては、実際に食の安全に係る検証や見直しを実施することはできない。HACCPの内部および外部検証においても、科学的根拠に基づき、かつ国際基準にも適合し、さらに現場の同意を得て日常的に運用可能であることが必須である(Fig. 1)。

そこで本研究は、と畜場での牛枝肉の生物危害要因のうち微生物危害を制御するために、国際基準に適合し、かつ国内と畜場の現場実態にも適合した内部検証方法を統計学に基づいて開発することを目的とした。

2. 方 法

2.1 検体採取法の比較

国際食品微生物規格委員会 ICMSF

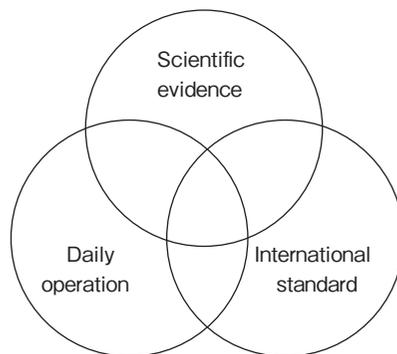


Fig. 1 Requirements for internal and external verifications.

(International Commission on Microbiological Specifications for Foods) およびEUの枝肉の微生物検査方法を参考にした。

と畜場内で解体時に牛伝染性リンパ腫と診断され、廃棄が決定した肥育牛2頭を用いた。1頭は25か月齢の去勢黒毛和種、一般畜として搬入、もう1頭は13か月齢の去勢交雑種、病畜として搬入された。枝肉の温と体の胸部からEUの切除法 (EC, excision), 米国のスポンジスワブ法 (SS, sponge swab), わが国で広く採用されている綿球法 (CB, cotton ball), および綿棒法 (CS,

cotton stick) にて $10 \times 10\text{cm}^2$ ずつ各12検体、合わせて48検体を採取した (Fig. 2, Table 1)。細菌検査は、厚生労働省の要領に従い調整および培養を行い、一般生菌数 ($\log\text{CFU}/\text{cm}^2$) を算出し、多重比較 (Dunnett, $p < 0.05$) を行った。

2.2 内部検証時に必要な検体数の検討

ICMSFの考え方に基づく国立医薬食品衛生研究所の生食用食肉の規格基準の設定を参考に摂食時安全目標値を定め、摂食までの加熱等に伴う増減率を考慮し、と畜場の牛枝肉での一般生菌数の達成目標値 (PO, Performance Objective) を決

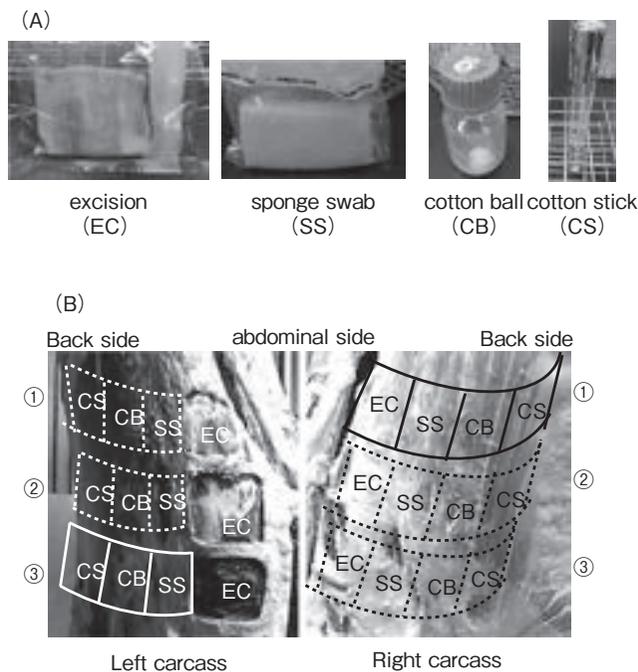


Fig. 2 Sampling methods compared in this study (A) and sampling sites (B).

Table 1 Comparison of sampling methods and sampling number

Method	Japanese Black		Cross bred		Total
	Left	Right	Left	Right	
Excision	3	3	3	3	12
Sponge swab	3	3	3	3	12
Cotton ball	3	3	3	3	12
Cotton stick	3	3	3	3	12
Total	12	12	12	12	48

定した。POより低値側に微生物学規格基準 (MC, Microbiological Criteria) を設け、三階級法によりMC~POの検体数を1とした場合にロットの95%がPOを達成することを90%の信頼度で確認するために必要な検体数を算出した。

3. 結果と考察

一般生菌数 ($\log\text{CFU}/\text{cm}^2$) の平均は切除法 (EC), 3.93; スポンジスワブ法 (SS), 2.49; 綿球法 (CB), 2.23; 綿棒法 (CS), 0.86で、切除法 (EC) 群から見たDunnettでは、スポンジスワブ法 (SS), 綿球法 (CB), 綿棒法 (CS) いずれも、 $p < 0.05$ であり、切除法 (EC) が有意に高値を示した (Fig. 3)。また、1群12検体では正規分布に収まり、等分散であったことから群としてなら各拭き取り検査法から切除法を推定することが可能と考えられた。すなわち、綿球法 (CB) により測定した一般生菌数を50倍することで、切除法 (EC) による一般生菌数に換算できることが明らかとなった。

内部検証時に必要な検体数は、三階級法により10検体と算出された。

今回の研究により、枝肉の微生物検査法として

比較した4種類の検体採取法の中では、EUで採用されている切除法 (EC) が最も多く細菌数を検出できることが明らかとなった。しかし、最初に述べたように、枝肉を傷つけ、商品価値を損ない、また時間と手間を要し、多検体の実施が困難な切除法 (EC) は、経済的にも運用的にも困難である。綿球法 (CB) により測定した一般生菌数を50倍すれば切除法 (EC) による菌数に換算できることが明らかとなったことから、内部検証においては、三階級法により算出された10検体を用いた綿球法による微生物検査が実用であると考えられた。ICMSFは適正な検体数について、微生物学規格基準 (MC), 摂食時安全目標値 (FSO, Food Safety Objective), 達成目標値 (PO) に、検査特性曲線 (OC曲線, Operating Characteristic curve) に基づいた三階級法でのサンプリングプランを提唱している³⁾。

切除法 (EC) を採用しているEU域内のイタリアでは、切除法 (EC) での一般生菌数は、綿球法 (CB) を含む拭取法により測定した菌数の5倍で換算すると規定している²⁾。我々の換算率と大きく異なるのは、拭取法は施設間や作業員間での差が大きいため^{4~6)}、異なる換算率が算出され

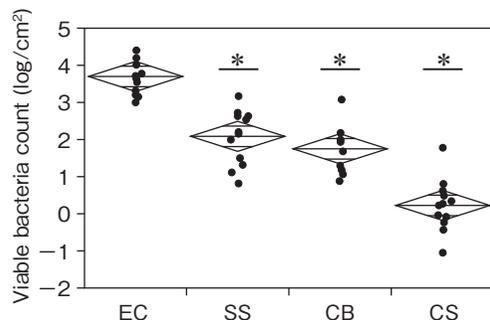


Fig. 3 Comparison of viable bacteria count among four sampling methods. Statistical significance between EC and others was calculated using an ordinary one-way ANOVA test followed by pairwise comparisons using the Dunnett test. *, $p < 0.05$. EC, excision; SS, sponge swab; CB, cotton ball; CS, cotton stick.

たと思われる。

以上より、本研究により、と畜場での牛枝肉の微生物危害を制御するために、国内と畜場の現場実態に適合し、かつ国際基準にも科学的裏付けを持って適合した内部検証方法を、統計学に基づき開発することに成功した。

4. 要 約

一般にわが国のと畜場では、と畜頭数に応じて抽出した一定数の枝肉の表面を綿球で拭き取る「綿球法」により、一般生菌数を調べることで枝肉全数（ロット）の清浄度を評価している。しかし、同法は枝肉表面からの生菌の回収性が低く、検査精度が高くない。また、抽出した枝肉の検査結果から枝肉全数（ロット）をどう評価するかについても明確な手法が確立されていない。そこで今回、切除法（EC, excision）、スポンジスワブ法（SS, sponge swab）、綿球法（CB, cotton ball）、および綿棒法（CS, cotton stick）の各検査法による一般生菌数を比較した。また、内部検証時に、枝肉全数（ロット）の清浄度の評価をするために必要な検体数を、国際食品微生物規格委員会 ICMSF（International Commission on Microbiological Specifications for Foods）が推奨する三階級法に基づく確率推計により算出することを試みた。

検体採取法の比較定量から、高値を示した切除法（EC）が真値を評価するうえで妥当であると

考えられたが、多検体の実施が困難な切除法（EC）は、経済的にも運用的にも困難である。綿球法（CB）により測定した一般生菌数を50倍すれば切除法（EC）による菌数に換算できることが明らかとなり、三階級法によりロットの妥当性評価のために内部検証時に必要な検体数は10検体と算出された。よって、内部検証においては、10検体を用いた綿球法による微生物検査が実用的であると考えられた。

本研究により、と畜場での牛枝肉の微生物危害を制御するために、国内と畜場の現場実態に適合し、かつ国際基準にも科学的裏付けを持って適合した内部検証方法を、統計学に基づき開発することに成功した。

引用文献

- 1) Milios, K. T., Drosinos, E. H., Zoiopoulos, P. E. : *Food Control*, **43**, 74~81, 2014.
- 2) Gallina, S., Bianchi, D. M., Ru, G., Maurella, C., Barzanti, P., Baioni, E., Virgilio, S., Mioni, R., Lanni, L., Migliazzo, A., Losio, M. N., Bove, D., Scuota, S., Goffredo, E., Decastelli, L. : *Food Control*, **50**, 919~924, 2015.
- 3) van Schothorst, M., Zwietering, M. H., Ross, T., Buchanan, R. L., Cole, M. B. : *Food Control*, **20**, 967~979, 2009.
- 4) Lindblad, M. : *International Journal of Food Microbiology*, **118**, 180~185, 2007.
- 5) Martínez, B., Celda, M. F., Anastasio, B., García, I., López-Mendoza, M. C. : *Journal of Food Protection*, **73**, 81~87, 2010.
- 6) Seager, T., Tamplin, M. L., Lorimer, M., Jenson, I., Sumner, J. : *Food Protection Trends*, **30**, 336~339, 2010.

ハム・ソーセージに配合する食品添加物に関する リスクコミュニケーション手法の開発ならびに 効果検証

Development and evaluation of smart risk communication method on the
food additives formulated in ham and sausage

山崎 毅・山崎 深雪・阿紀 雅敏
(特定非営利活動法人食の安全と安心を科学する会)

Takeshi Yamasaki, Miyuki Yamasaki and Masatoshi Aki
(NPO, Science of Food Safety and Security (SFSS))

Risk perception bias on certain food hazards is generated by consumers even when food safety experts evaluated them as safe. In this study, we aimed to verify the effect of “smart risk communication” method targeting the risk perception bias, particularly “confirmation bias” on food additives. We hypothesized the “smart risk communication” that the consumers should understand the proper “risk size” of food hazards calmly when they are sympathized on their risk concerns and get the precise academic explanation on them.

We performed the internet questionnaire survey to 2,500 female consumers (age 20's to 50's) who have health concerns on the processed meat, such as ham, sausage, and bacon due to food additives (who think that the processed meat with food additives is unhealthy). First, we gave them the questions to sympathize their worry on the health risk of food additives, and subsequently, we gave the scientific explanation on their concerns by the food safety expert.

Although there was certain limitation due to internet communication, the health concerns of food additives were corrected up to approximately 30% to 45% of respondents by “smart risk communication”. However, 72% of respondents answered that they are willing to buy the processed meat products without food additives, if available. As a result, we found the strong relevancy of risk perception bias to the cause of the lack of understanding the risk/safety of food additives, which should be expected for good opportunity to develop the new method of “smart risk communication”.

1. 目 的

食品安全の専門家がヒトへの健康リスクが十分小さく安全と評価しているハザードにもかかわらず、一般消費者がリスクを過大に知覚／認識してリスク認知バイアスを生み出し、社会に大きな影

響を与えている。2017年、山崎はリスク認知バイアスの原因をターゲットとした食のリスクコミュニケーション（リスコミ）手法が重要と考え、リスク認知バイアスの社会心理学的原因を具体的に4つあげてそのリスコミ手法のあり方を提案した¹⁾。すなわち、①二者択一の原理²⁾、②Slovic

のリスクイメージ過大因子／未知性因子など³⁾、
③リスク情報発信者への不信感⁴⁾、④リスクコミュニケーションのパラドックス⁵⁾である。

また2018年、山崎らはリスク認知バイアスの一つとして「確証バイアス」を採り上げて調査研究を実施した⁶⁾。「確証バイアス」とは、消費者にはもともと「危険重視の本能」があるので、危険情報のほうを信じる傾向にあり、それが先入観となって肯定する情報ばかりを集めて、そうでない情報は拒絶するという現象に陥るとのことだ。この確証バイアスを補正するために、以下のような仮説を立て、「スマート・リスクコミュニケーション」と命名した。すなわち、まず「確証バイアス」の要因となっている信念や不安に共感した設問を投げかけたうえで、次に専門家から学術的説明を分かりやすく提供することで、市民の不安要因への理解が深まり、自らリスクの大小を冷静に判断できるのではないかの仮説を立てたのだ。インターネット調査の結果、「食品添加物は意識的に使わない」と回答のあった30歳代～40歳代の女性100人において、スマート・リスク手法により79%の回答者で確証バイアスの補正を認めた。

本インターネット調査研究では、ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品における食品添加物の健康リスクに懸念を感じている女性2,500人に対して、このスマート・リスク手法の効果検証を実施したので、以下に報告する。

2. 方法

インターネットアンケート調査は、楽天インサイト（株）の日本人モニターから、最低週1回は料理をする方を抽出し、その中から「ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品は、食品添加物が入っているのが健康によくないと思いますか」という設問に、「たしかにそう思う」または

「まあまあそう思う」と回答した女性2,500人（20歳代／30歳代／40歳代／50歳代：各625人）をランダム抽出し、いくつかの設問に対する回答を得た。

設問は、①加工肉食品に配合される食品添加物の健康リスクに関する不安要因（リスク認知バイアス）、②各不安要因に関する専門家の学術的説明に対する理解度、③各不安要因に関する学術的説明を受けての安心度合い（リスク認知バイアスの補正）について選択肢を与え、回答者に自由に選択させた。また、食品添加物不使用のハム・ソーセージに対する購買意識や食品添加物によるアレルギーや複合影響の可能性に関する不安については、4段階の選択肢による設問を設定して分析した。なお、それぞれの回答傾向の相関関係に関する統計解析については、Microsoft Excelの分析ツール「回帰分析」を用いて単線形回帰分析を実施し、重相関係数（R）、重決定係数（R²）、X値係数、切片、危険率（p value）を求めて、危険率が0.05未満の場合を有意な相関と評価した。

3. 結果と考察

最初に食品添加物が健康によくないという「確証バイアス」にいたった不安要因の選択肢を10項目あげて、回答者の不安に共感する設問を与えた（Table 1a）。その結果をTable 1bに示す。

食品添加物が健康によくないと考える理由に関して、30%以上の回答者が選択した不安要因（Q1-3：添加物の使用目的が不明、Q1-4：無添加と添加物使用を比較すると無添加が安全、Q1-5：添加物でも一部健康によくないものあり、Q1-9：添加物は体内に蓄積する）については、より分かりやすいリスクの説明が必要と思われた。また、年代別（20歳代～50歳代）での不安要因選択率の違いを比較したところ、20歳代において10項目中5項目で全体より5%以上低い選

Table 1a Questionnaire #1 (in Japanese) to ask respondents to select the reasons (anything in 10 choices) why they have health concerns on food additives used in ham, sausage, and bacon.

Q 1. ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品は、食品添加物が入っているため健康によくないと考える理由として、あてはまる項目をすべて選んでください。(いくつでも)	
1	食品添加物が原因で健康被害が起こった事故の歴史があるから
2	過去に家庭科の授業や栄養学の講義で食品添加物はできるだけ使わないように教わったから
3	ハム・ソーセージの食品ラベルを見ると、知らない化学物質（食品添加物）が多く書かれていて、何の目的で使用されているのかよく分からないから
4	無添加食品と添加物使用の加工食品を比較すると、天然の無添加食品の方が安全だから
5	ハム・ソーセージによく入っている食品添加物の中でも、一部ソルビン酸や亜硝酸Naなど、健康によくないものがあるから
6	国際がん研究機関が、ハム・ソーセージを発がん性物質に分類したと聞いた。ハム・ソーセージに配合された食品添加物がその原因と思うから
7	「食品添加物を使用していないから安心して食べられる。」と宣伝販売の店員さんが言っていたし、食品企業も「無添加」が安心として販売しているから
8	食品添加物の入った加工食品は「食べてはいけない・・・」などという書籍や雑誌／インターネット記事を読んだことがあるから
9	食品添加物は体内に蓄積して、食べ続けているうちに後から影響が出るかもしれないから
10	海外で禁止されている食品添加物が、日本では使用許可されているものがあるから
11	上記以外のその他の理由をご記入ください：

択率が認められた。それは、若年ほど不安要因に対する感受性が低いことを意味するものと評価された。なお、子供と同居することや専業主婦であることは、全体の不安要因選択率との明確な差を認めなかった。

次に、上記であげた各不安要因Q 1の10項目に対する食品安全の有識者（大学教授）の見解を提示し、理解度を確認した。その結果をTable 2a, Table 2bに示す。

Table 1であげた10項目の不安要因に対して、それぞれのリスク認知バイアスを補正する学術的説明が食品安全の専門家から与えられると、上記のTable 2bのとおり48%~68%の回答者（おおむね2人に1人から3人に2人）から説明が理解できたとの回答を得た。また年代別で見ると、とくに30歳代の理解率が10項目中8項目で全体平均より5%以上高かったことから、比較的難易度の高い学術的説明に対して理解しようという前向きな姿勢が、30歳代の女性に認めることができたもの

と評価した。なお、子供と同居することや専業主婦であることは、Q 1と同様、全体の理解率との明確な差を認めなかった。

上記の有識者による学術的説明の後、食品添加物が入った加工肉食品を安心して食べられるかどうか聞いた。その結果をTable 3a, Table 3bに示す。

Q 1の不安要因をうかがい共感する設問に続いて、Q 2で各不安要因に関する専門家の学術的説明の設問への理解度を確認したのち、Q 3では各不安要因に対する安心度を確認したが、おおむね各項目に関して30%~45%が「食品添加物の入った加工食品を安心して食べられそうだと回答した。また、「有識者の説明（10項目）を読んでも結局納得できないので、食品添加物の入ったハム・ソーセージなどの加工食品はできるだけ避けたい」という選択肢を選んだ回答者は9.4%で、9割以上の回答者はいずれかの「安心して食べられそうだと」の選択肢を選んでいった。以上の結果より、ほぼ9割の回答者で「確証バイアス」の補正

Table 1b Results of Questionnaire #1 (Q1) : Percentage of respondents who select the reason why they have health concerns on food additives used in ham, sausage, and bacon.

*over 5 % less to average indicates % number with underbar

	The reasons why you have health concerns on food additives used in ham, sausage, and bacon	All	20s	30s	40s	50s	live with children	housewife
	No. of respondents :	2,500	625	625	625	625	1,139	697
1 - 1	Because there were some histories of health accidents by food additives in the past.	15.2	13.6	13.6	17.8	16.0	14.2	13.5
1 - 2	Because I was taught not to use food additives in nutrition class at school in the past.	26.2	29.8	29.1	25.9	<u>20.2</u>	28.2	24.7
1 - 3	Because I see many unknown chemical names on the label of ham and sausage, and do not know the purpose of their role.	36.9	<u>31.4</u>	37.1	39.2	40.0	38.5	37.3
1 - 4	Because the natural food without additives should be safer than process food with additives.	31.2	33.9	33.9	29.1	28.0	31.6	32.4
1 - 5	Because some food additives, such as sorbic acid and sodium nitrite, should be unhealthy.	30.4	<u>21.9</u>	31.7	32.6	35.4	33.0	33.0
1 - 6	Because food additives should be the main reason why International Agency of Research on Cancer (IARC) categorized ham and sausage as carcinogen.	24.4	<u>18.4</u>	24.6	27.7	26.9	25.8	26.4
1 - 7	Because sales persons in supermarkets promote the process food without additives claiming its safety.	7.3	9.6	9.3	5.6	4.6	8.5	5.9
1 - 8	Because I read the books and internet articles claiming that you should not eat process foods if formulated with food additives.	22.7	18.2	25.8	24.6	22.1	23.5	19.9
1 - 9	Because food additives should be accumulated in human body and make the bad influence to your health if you consume every day.	36.5	<u>30.1</u>	38.1	37.0	40.8	38.2	38.5
1 - 10	Because the food additives which are prohibited in overseas can be marketed in Japan.	16.8	<u>10.1</u>	19.4	21.0	17.0	18.0	17.2
1 - 11	Other than above reasons	2.0	2.2	2.4	1.4	1.9	1.5	1.7

が一定程度認められたと考える。

なお、3 - 11で有識者の説明（10項目）を読んでも結局納得できず、食品添加物の入ったハム・ソーセージなどの加工食品はできるだけ避けたい、とした回答者の理由（自由回答：236人）をランダムに抜粋したので、以下でいくつかを参照されたい。

・安心と言っておきながら、後で有害だということ

とが分かってからでは遅い

- ・理解はするが「安心して食べられそうさ」とは言い切れないと思う
- ・まだ安心できないから
- ・信頼できるまで怖いから
- ・生物多様性の観点から食品添加物は人工物であるため、環境によくない
- ・有識者が御用学者でメーカーの都合の良いことしか言わないから怖い

Table 2a Questionnaire #2 (in Japanese) to ask respondents whether or not they understand the scientific explanation about the accurate risk information on food additives by food safety expert (university professor).

Q2.	ハム・ソーセージ・ベーコンなどに使用される食品添加物のリスクについて、食品安全に詳しい有識者（大学教授）に見解を伺いました。説明が理解できた番号をすべて選んでください。なお、1つも理解できるものがなかった場合は、その理由を11番にご回答ください。（いくつでも）
1	過去に食品添加物が原因で健康被害が起こった事故の歴史はたしかにあります。もう数十年以上前のことであり、日本国内ではそれ以降、何十年もの間事故は発生していません。反対に食品添加物を使用しなかったことにより、O157などの食中毒死亡事故が何度も発生しており、食品事故を未然に防ぐためには、食品添加物を適切に使用することが望まれます。
2	家庭科や栄養学の教科書には食品添加物を使用しない調理がよいなどの記載があるようですが、これまで文科省の教科書審議会に食のリスクの専門家が含まれていなかったことも要因といえるでしょう。家庭での料理を学ぶ際に、加工食品を使用せず、天然の食材を活かした料理を学ぶこと自体は問題ありません。食のリスクに関して、正しいリスク評価を学ぶ環境の必要性を強く感じます。
3	食品添加物の使用目的は多種多様にわたり、具体的には風味や食感・色調の改善、微生物の増殖を抑制して保存性を向上させるとともに、栄養強化・減塩食品への使用や低カロリーにするために使用されます。ハム・ソーセージに用いられる食品添加物も、食材に適した調味料・発色剤・結着剤・保存料・酸化防止剤・着色料など役割を担って、味、食感の改善、食の安全・安心に貢献し、食べやすい動物性タンパクとして様々なメニューの材料として便利に使用されています。
4	天然の無添加食品と添加物を配合した加工食品を比較すると、「無添加」「天然」が安全そうに見えるかもしれませんが、食の安全の専門家にとっては、むしろ逆です。食品添加物は安全性試験をクリアし、リスクが無視できるものしか認可されていないの比べて、天然の食品は安全性の評価すらされておらず、相対的にみると天然物のほうが健康リスクは大きいと言われてます。1980年代に遺伝毒性試験を開発したエイムズ博士によると発がん物質の99.9%は天然物だと指摘しています。そう考えると専門家のリスク評価では、合成の食品添加物の方が、むしろ安全性が高いといえます。
5	食品添加物のうち「保存料」や「発色剤」など一部の化学物質は健康に悪影響があるとの誤解があるようですが、「毒か安全かは量で決まる“The Dose Makes Poison”」というパラケルススの名言のとおり、食品添加物も使用基準の範囲内では、人体への悪影響が出ない微量の摂取量＝許容範囲のリスク＝「安全」と考えてよいでしょう。なお、これら食品添加物は、毎日食べ続けても安全な1日摂取許容量（ADI：国際的な機関が動物実験により無害と確認した量の1/100量）を下回る使用基準が「食品衛生法」に規定されており、我々がソルビン酸や亜硝酸塩を一般食品からも摂取している事実も考慮されています。
6	食品添加物が発がん性や遺伝毒性が疑われる場合には、内閣府食品安全委員会が専門家を集めて詳しくリスク評価を実施したうえで、使用してもよいかどうかの評価判定をする国の仕組みができています。実際に使用禁止の措置がとられた「アカネ色素」などがありますので、発がん性や遺伝毒性の懸念がある食品添加物は一掃されたと考えてよいでしょう。また、国際がん研究機関（IARC）がハム・ソーセージを「グループ1（発がん性がある）」と分類したことは事実ですが、これは欧米での疫学研究報告をもとに科学的根拠の強さを分類したもので、発がんリスクの大小は摂取量に依存すると考えられます。実際、国立がん研究センターの疫学研究でも、食肉の喫食量が多い人に大腸がんが多いことは確認されたものの、加工肉（ハム・ソーセージ等）では大腸がん発症率の上昇はなく、日本人のような少ない喫食量で心配の必要はありません。ハム・ソーセージに限らずお肉を食べすぎること、野菜をほとんど食べないことなどの偏食が発がんリスク上昇につながることは古くから知られており、バランスのとれた食事が生活習慣病予防には肝要です。
7	食品は、自然界に存在する有毒な微生物やウイルスに汚染されている可能性があり、食品添加物を用いないと、これらが繁殖して食中毒を起こすリスクがあります。とくにハム・ソーセージで食品添加物を使用しないと、万が一ボツリヌス菌※が増殖したら大変危険なのです。無添加が健康に良いと思われがちですが、添加物の小さなリスクを恐れ、食中毒の大きなリスクを抱えることに繋がります。（「リスクのトレードオフ」と呼びます）。※ボツリヌス菌（ウィキペディアより）：ボツリヌスの語源はラテン語のbotulus（腸詰め、ソーセージ）であり、19世紀のヨーロッパでソーセージやハムを食べた人の間に起こる食中毒であったためこの名がつけられた。ハムやソーセージに発色剤として添加される硝酸塩は、発色作用よりもボツリヌス菌の繁殖を抑える目的で使用されている。
8	「食べてはいけない」など食品の裏事情に関する書籍や記事において、食品添加物は危険との不安を煽る誤情報が多く、消費者のリスク認識につながっています。これら主張の決定的な誤りは、摂取量の観点で完全に欠落していることです。動物実験等で添加物を大量に投与した時に起こる障害を、実際の食品でごく僅かに使用している添加物でも健康被害が起るかもしれないと消費者を煽るのは大きな社会問題です。例えば、塩も多く摂り過ぎれば健康被害が出ます。食品添加物も使用基準の範囲内であれば問題ありません。このような記事で「専門家」と称する個人・団体が、ご自身の利害（商売）のため無添加食品を販売していたとしたら、冷静に判断できないでしょう。
9	食品も食品添加物も、含まれる成分の多くは、消化管で消化・吸収され、肝臓で代謝・解毒された後、尿あるいは糞とともに体外に排せつされます。各食品添加物の安全性試験データや文献情報からその代謝・生体内動態は概ね分かっておりますので、体内に長期間にわたって蓄積されるというご心配は不要と考えます。
10	海外と日本では食文化や食材が違うため、使用する食品添加物も同じではありません。たとえば、EUではカツオブシやヒジキが輸入できないなど、一般食品でも使用禁止となっています。逆にEUで使えるのに日本では使用できない食品や食品添加物もあります。したがって、海外で使えないのは食文化の違いから使う必要性がない食材のため、国が認めた食品添加物リストに入っていないものと考えます（たとえば、和菓子によく使用される「クチナシ色素」などの着色料はEUで使用できないそうです）。
11	上記1から10のうち、1項目も理解できるものがなかった。その理由をご記入ください：

Table 2b Results of Questionnaire #2 (Q2) : Percentage of respondents who understand the scientific explanation about the accurate risk information on food additives by food safety expert (university professor).

*over 5 % more to average indicates % number with bold

Percentage of respondents who understand the scientific explanation		All	20s	30s	40s	50s
No. of respondents :		2,500	625	625	625	625
2 - 1	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-1) : Because there were some histories of health accidents by food additives in the past.	68.7	69.0	75.0	66.9	63.8
2 - 2	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-2) : Because I was taught not to use food additives in nutrition class at school in the past.	60.9	61.4	66.7	58.2	57.3
2 - 3	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-3) : Because I see many unknown chemical names on the label of ham and sausage, and do not know the purpose of their role.	59.0	59.0	65.0	54.2	57.8
2 - 4	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-4) : Because the natural food without additives should be safer than process food with additives.	51.6	50.1	57.3	48.6	50.6
2 - 5	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-5) : Because some food additives, such as sorbic acid and sodium nitrite, should be unhealthy.	48.6	45.6	52.6	46.7	49.4
2 - 6	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-6) : Because food additives should be the main reason why International Agency of Research on Cancer (IARC) categorized ham and sausage as carcinogen.	50.7	48.5	53.6	47.7	53.0
2 - 7	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-7) : Because sales persons in supermarkets promote the process food without additives claiming its safety.	50.7	46.4	57.4	47.5	51.4
2 - 8	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-8) : Because I read the books and internet articles claiming that you should not eat process foods if formulated with food additives.	51.0	48.2	57.1	49.3	49.6
2 - 9	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-9) : Because food additives should be accumulated in human body and make the bad influence to your health if you consume every day.	48.9	47.7	55.4	46.9	45.6
2 - 10	Scientific explanation about the following health concerns (Q1-10) : Because the food additives which are prohibited in overseas can be marketed in Japan.	51.8	47.5	57.1	49.8	52.8
2 - 11	Select if you do not understand any of above explanation.	3.3	2.2	2.9	3.7	4.3

- ・証拠がないから
- ・イメージ的に避けたい
- ・完全に安心はしていない
- ・これも1つの見解でしかなく、国も信用できないので、疑念は残る
- ・安心して食べられる、というほどまでは理解できていないと思われる
- ・安心して食べられるとまでの信用性は感じなかったり、説明を読み納得はしたが、「安心」という言葉にはまだ抵抗がある。安心なわけで

- はないが今までよりは手に取りやすくなった
- ・美味しく食べられるけど、安心して食べられそうだとは思わない。無添加は美味しくないのであまり買わないですが…
- ・やはり自然に近いものの方が体への負担が少ない気がする
- ・全ての説明は、食品添加物の有識者の解説であり、反対派の解説がないために説明が偏りすぎて参考にならないため
- ・自分の知らない食品添加物があると思うし、そ

Table 3a Questionnaire #3 (in Japanese) to ask respondents whether or not their health concerns on food additives are cleared by the scientific explanation.

Q 3. 前問の有識者の説明を読んで、あてはまる番号をすべて選んでください。(いくつでも)	
1	食品添加物が原因で健康被害が起った事故の歴史はあるが、説明を読んで、ほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
2	家庭科や栄養学の授業で食品添加物のはできるだけ使わないように教わったが、説明を読んでほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
3	多種多様な化学物質（食品添加物）を使用する必要性がよくわからなかったが、むしろ食の安全・安心が維持される役割があるとの説明を読んで、ほぼ納得したので、ハム・ソーセージも安心して食べられそうだ。
4	天然の無添加食品と食品添加物を配合した加工食品を比較すると、むしろ後者の方が安全という説明を読んで、ほぼ納得したので、ハム・ソーセージなどの加工食品も安心して食べられそうだ。
5	食品添加物の中でも、一部「保存料」や「発色剤」の中に健康によくはないものがあると思っていたが、摂取量の概念や1日摂取許容量などの説明を読んで、ほぼ納得したので、ハム・ソーセージなどの加工食品も安心して食べられそうだ。
6	ハム・ソーセージの発がん性や遺伝毒性を心配していたが、そのような懸念のある食品添加物は使用されておらず、またハム・ソーセージ自体の発がん性も国内では認められていないという説明を読んで、ほぼ納得したので、ハム・ソーセージも安心して食べられそうだ。
7	無添加が安心という広告宣伝などを信じていたが、むしろ無添加では食中毒の危険があるとの説明を読んでほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
8	「食べてはいけない・・・」など食品の裏事情に関する書籍や記事（週刊誌・TV番組・ネット情報など）を読んで、やはり食品添加物は危険と感じていたが、説明を読んでほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
9	食品添加物は体内に蓄積するので怖いと思っていたが、代謝・排せつされるという説明を読んでほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
10	海外で禁止の食品添加物が国内で許可されているのはよくないと思っていたが、食文化の違いによるものとの説明を読んでほぼ納得したので、食品添加物の入った加工食品も安心して食べられそうだ。
11	有識者の説明（10項目）を読んでも結局納得できないので、食品添加物の入ったハム・ソーセージなどの加工食品はできるだけ避けたい。その理由を記入してください：

- ・の添加物が、良いか悪いかも分からないので
- ・とらなくても生きていけるから
- ・家族の持病で、できるだけ加工品を避けるよう言われているから。遺伝性のある病気なので、自分自身も気を付けなければならないから
- ・塩分も多いし不安は残りました
- ・文章がむずい
- ・避けたいとは考えませんが、有識者の意見も様々ありどこまでいっても、このように意見や主張は出てくるわけで、押し付けのようにも感じられ残念な気持ちになりました
- ・一個人の意見では
- ・そもそもあえて買わなくても生活に支障がないので

- ・加工されていない肉を食べることで問題ないので
- ・発色剤などはやっぱり体に悪いと思う
- ・結局まったく害がないとは思えない

上記の不安要因に関する学術的説明に対する設問の後、「食品添加物不使用のハム・ソーセージ・ベーコンを購入するか」など、個別の質問に対して「たしかにそう思う」、「まあまあそう思う」、「あまりそう思わない」、「そう思わない」の4つの選択肢に回答していただいたので、Table 4a, Table 4bを参照いただきたい。

Q 3において、「ハム・ソーセージなどの食品添加物を配合した加工食品を安心して食べられそ

Table 3b Results of Questionnaire #3 : Percentage of respondents where their health concerns on food additives are cleared by the scientific explanation.

	Percentage of respondents where their health concerns on food additives are cleared by the scientific explanation.	All	20s	30s	40s	50s
	No. of respondents :	2,500	625	625	625	625
3 - 1	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-1) : Because there were some histories of health accidents by food additives in the past.	45.2	47.8	48.8	41.8	42.2
3 - 2	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-2) : Because I was taught not to use food additives in nutrition class at school in the past.	38.6	43.5	38.6	35.7	36.8
3 - 3	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-3) : Because I see many unknown chemical names on the label of ham and sausage, and do not know the purpose of their role.	40.5	39.0	45.9	37.9	39.2
3 - 4	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-4) : Because the natural food without additives should be safer than process food with additives.	35.8	32.3	39.2	33.3	38.4
3 - 5	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-5) : Because some food additives, such as sorbic acid and sodium nitrite, should be unhealthy.	41.9	41.6	44.5	39.5	41.9
3 - 6	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-6) : Because food additives should be the main reason why International Agency of Research on Cancer (IARC) categorized ham and sausage as carcinogen.	34.6	30.7	37.8	33.8	36.0
3 - 7	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-7) : Because sales persons in supermarkets promote the process food without additives claiming its safety.	33.4	28.0	37.6	33.6	34.4
3 - 8	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-8) : Because I read the books and internet articles claiming that you should not eat process foods if formulated with food additives.	31.0	28.3	35.2	29.4	31.2
3 - 9	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-9) : Because food additives should be accumulated in human body and make the bad influence to your health if you consume every day.	35.2	31.0	37.0	35.8	37.0
3 - 10	Respondents who claimed no more health concerns (Q1-10) : Because the food additives which are prohibited in overseas can be marketed in Japan.	30.6	26.9	33.0	30.4	32.2
3 - 11	Select if you claim still big health concerns on any of above.	9.4	6.9	9.6	9.9	11.4

うだ」と回答した方がトータルで9割を超えたものの、Q4で「ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品は、食品添加物不使用ならば購入しますか」との設問には、7割以上の回答者が「たしかにそう思う」または「まあまあそう思う」を選択した、という逆の結果となった。またその際に、Q3-1～Q3-10の回答との有意な正の相関が認められたことから、Q3-1～Q3-10の各設問を選択しなかった回答者たち（個別の不安要因の学術的説明を聞いて安心しなかった方々）

が、Q4で「ハム・ソーセージ・ベーコンが食品添加物不使用ならば購入する」と回答する傾向にあったと解釈できるだろう。

また、Q5で食品添加物の複合影響を懸念する回答者が78%を超えたが、Q6での学術的説明の理解の回答と有意な相関が認められなかったことから、複合影響を懸念する確証バイアスに陥った回答者が今回の学術的説明に前向きな理解の姿勢はなかったと評価すべきだろう（今回のリスクコミが確証バイアスの補正に寄与していない）。その

Table 4a Questionnaire #4 to #8 (in Japanese) to ask respondents about other questions about food additives (purchase attitude and extra health concerns).

	その他の設問内容
Q 4	ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品は、食品添加物不使用ならば購入しますか。あてはまる回答を、以下から1つだけ選んでください：①たしかにそう思う、②まあまあそう思う、③あまりそう思わない、④そう思わない
Q 5	複数の食品添加物を摂取することで複合影響が出ると聞いたから、食品添加物は避けたい。あてはまる回答を、以下から1つだけ選んでください：①たしかにそう思う、②まあまあそう思う、③あまりそう思わない、④そう思わない
Q 6	食品添加物の併用に関する安全性は十分に調査し、必要に応じて制限される場合があります。例えば、安息香酸とビタミンCは、どちらも安全な食品添加物ですが、これら2つの化学反応により有害物質（ベンゼン）を生成するとのデータがあるため、国から食品事業者に併用してはならないと通知されています。一方で、体内には生体成分や食品/医薬品成分などに関係する膨大な種類の化学物質が存在し、これらすべての化学物質同士の併用による安全性試験を実施することは不可能です。そのため、化学物質AとBを併用するとこんな毒性（複合影響）が発現したという事故報告情報や文献情報など具体的な根拠データがわかった段階で、それら物質の併用によるリスク評価を実施することで安全性を担保しています。そう考えると、何の具体的根拠もなく「食品添加物とはとにかく複合影響が怖い」という言説がナンセンスだと、わかるのではないのでしょうか。以上の有識者の説明を読んで、あてはまる回答を、以下から1つだけ選んでください：①たしかにそう思う、②まあまあそう思う、③あまりそう思わない、④そう思わない
Q 7	アレルギーの子が増えているのは、食品添加物の入った食品を多く食べるようになったからだ聞いた。あてはまる回答を、以下から1つだけ選んでください：①たしかにそう思う、②まあまあそう思う、③あまりそう思わない、④そう思わない
Q 8	近年、食の欧米化に伴って食材も多様化しています。食品成分の種類が増えれば、アレルゲンとなりうるタンパクや脂質などの化学物質が天然の食品中に増えたと考えるのが自然です。アレルギーを持つ子どもの増加と食品添加物の摂取量に因果関係があるという科学的根拠は聞いたことがありません。それよりも現代社会の衛生環境が改善したことにより、環境中のアレルゲンに曝露されない分、免疫学的に弱い体質の子どもの増加の可能性は十分に疑われるところと考えます（呉艶玲ほか「アレルギーと衛生仮説」化学と生物 Vol44.21-26.2006）。以上の有識者の説明を読んで、あてはまる回答を、以下から1つだけ選んでください：①たしかにそう思う、②まあまあそう思う、③あまりそう思わない、④そう思わない

Table 4b Questionnaire #4 to #8 to ask respondents about other questions about food additives (purchase attitude and extra health concerns).

	Other questions	Yes, certainly	so-and-so	Not really	No way
Q 4	Do you purchase process meat, such as ham, sausage, and bacon, if without food additives? Please select the following choice.	21.8	50.4	24.4	3.4
Q 5	You want to refrain food additives since there should be bad effect on human body when some chemicals are combined with interaction. Please select the following choice.	24.0	54.3	19.7	2.0
Q 6	Scientific explanation about the following health concerns (Q5) : there should be bad effect on human body when some chemicals are combined with interaction. Please select the following choice.	18.5	68.1	10.7	2.7
Q 7	You heard about the possible effect of food additives to cause food allergy. Please select the following choice.	15.4	38.7	37.4	8.5
Q 8	Scientific explanation about the following health concerns (Q7) :there should be bad effect on human body when some chemicals are combined with interaction. Please select the following choice.	16.4	67.1	14.2	2.3

反面、Q7で食品添加物のアレルギーへの関与の懸念を示した回答者は54%にとどまったが、Q8での学術的説明の理解と有意な相関が認められたことから、食品添加物のアレルギーへの関与という確証バイアスに陥った回答者に対して、今回のリスクミがある程度機能したことを意味するものとする。

山崎は2017年の日本リスク研究会にて、リスク認知バイアスの原因をターゲットとした食のリスクミ手法を提案し、①二者択一の原理²⁾、②Slovicのリスクイメージ過大因子／未知性因子など³⁾、③リスク情報発信者への不信感⁴⁾、④リスクコミュニケーションのパラドックス⁵⁾など4つのリスク認知バイアスを逆手に取ったリスクミ手法開発の可能性を考察した¹⁾。また、2018年にも同学会において、食品添加物の健康リスクに対する「確証バイアス」をターゲットとしたスマート・リスクミの開発と効果検証について発表した⁶⁾。インターネットでの無機的な情報伝達に限界はあるものの、相当数の回答者で確証バイアスの補正が認められたことから、スマート・リスクミ手法の有効性が示唆された。このように、安全・安心につながるリスクコミュニケーションのポイントは、消費者市民のリスク認知バイアスの原因である不安要因を具体的なターゲットとした情報発信／議論と我々は考えている⁷⁾。

今回のインターネット消費者アンケート調査においても、ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品に配合された食品添加物の健康リスクについて不安を感じる20歳代～50歳代の女性2,500人を対象として、スマート・リスクミ手法の効果検証を行ったところ、それぞれの不安要因に関する学術的説明に対して、30%～45%の回答者が食品添加物を使ったハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品を安心して食べられるとの選択肢を選んだ。また、最終的に「有識者の説明（10項

目）を読んでも結局納得できないので、食品添加物の入ったハム・ソーセージなどの加工食品はできるだけ避けたい」という選択肢を選んだ回答者は全体の9.4%で、9割以上の回答者はいずれかの「安心して食べられそうだ」の選択肢を選んでいた。以上の結果より、ほぼ9割の回答者で「確証バイアス」の補正が一定程度認められたことから、消費者の不安要因を傾聴により見つけだして共感し、それぞれの不安要因にピンポイントで学術的説明を提供する「スマート・リスクコミュニケーション」の効果検証が一定程度認められ、消費者の「確証バイアス」の補正＝食の安心につながる可能性を示唆する結果と評価したい。

このスマート・リスクミ手法は、すでに食品添加物⁸⁾だけでなく、ゲノム編集食品⁹⁾や食の放射能汚染¹⁰⁾などに関しても社会実装が始まっており、徳島県／消費者庁が主催で開講された消費者大専大大学院の食のリスクコミュニケーション養成講座においても応用が始まっている。今後のスマート・リスクミ手法のさらなる改良／バージョンアップにつながることを期待したい。

4. 要 約

食品安全の専門家がヒトへの健康リスクが十分小さく安全と評価しているハザードにもかかわらず、一般消費者がリスクを過大に知覚／認識しているために、ひとつのリスク認知バイアスを生み出し、社会に大きな影響を与えていることがある。そこで我々は、インターネット調査によりハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉に配合される食品添加物の健康リスクに過敏な20代～50代の女性を抽出し、リスク認知バイアス（とくに確証バイアス）をターゲットとして開発したリスクコミュニケーション手法（スマート・リスクコミュニケーション）の効果検証を実施した。

インターネットでの情報伝達に限界はあるもの

の、30%~45%の回答者が食品添加物を使ったハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉食品を安心して食べられると選択し、リスク認知バイアスの補正が認められた。ただし、食品添加物不使用のハム・ソーセージ・ベーコンを購入するかとの質問には、72%の回答者が「たしかにそう思う」または「まあまあそう思う」と回答した。以上の結果より、スマート・リスクコミュニケーション手法開発の起点となることが期待された。

文 献

- 1) 山崎毅：リスク認知バイアスを逆手にとったリスクコミ、日本リスク研究学会第30回年次大会，滋賀，講演論文集Vol.30, 2017.
- 2) 中谷内一也：リスクのモノサシ，NHK出版，東京，2006.
- 3) 岡本浩一：リスク心理学入門，サイエンス社，東京，1992.
- 4) 広田すみれ，増田真也，坂上貴之：心理学が描くリスクの世界，慶應義塾大学出版会，東京，2006.
- 5) 関谷直也：「災害」の社会心理，ワニ文庫（ベストセラーズ），東京，2011.
- 6) 山崎毅，大瀧直子，富岡伸一，広田鉄磨，山口治子：リスク認知バイアスをターゲットとした食のリスクコミュニケーション手法の開発ならびに効果検証，日本リスク研究学会第31回年次大会，福島，講演論文集Vol.31, 2018.
- 7) 山崎毅：安全・安心とリスクコミュニケーション—食品分野を中心に，一橋ビジネスレビュー 67—No. 3，『特集：安全・安心のイノベーション』，p92-p102, 2019.
- 8) 大瀧直子，山崎毅：食品添加物のスマート・リスクコミュニケーション～社会実装例～，日本リスク学会第33回年次大会，講演論文集Vol.33, p43, 2020.
- 9) 山崎毅，佐々義子，山口治子：ゲノム編集食品のスマート・リスクコミュニケーション，日本リスク学会第33回年次大会 講演論文集Vol.33, p46, 2020.
- 10) 山崎毅：福島原発のトリチウムを含む処理水～海洋放出のリスクはどの程度？～，BLOGOS 2020年10月25日 <https://blogos.com/article/493348/>, 2020.

食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究（Ⅱ）

Study on awareness of consumers about safety of food additives（Ⅱ）

堀江 正一・渡邊 萌・堀井 千枝

(大妻女子大学家政学部食物学科)

Masakazu Horie, Moe Watanabe and Chie Horii

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

It is important to clarify how consumers have fostered or fostered awareness of food additives, and to bridge the large gap between scientific safety and consumer perception. Continuing from last year, in this study, we conducted an awareness survey on food additives through an online survey (1,800 people).

An online survey revealed that younger age groups, and especially individuals in their 20s, tended to have less concern about food additives while women in their 50s to 70s were highly concerned. Women in their 50s to 70s heard frequent media reports of food safety incidents in their early childhood, and women in those age groups often purchase ingredients and prepare meals. Presumably women in their 50s to 70s steadfastly perceive food additives as dangerous. Once one is convinced that "food additives are harmful and dangerous," dispelling that belief is well-nigh impossible, but repeatedly providing accurate information that is easy to understand could lead to a change in one's perception of risk.

1. 目 的

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

にとって食品添加物は「有害なもの、危険なもの」と認識されている¹⁻³⁾。なぜ、「食品添加物は危険である」との認識を払拭できないのかについて明快な回答は得られていない。

昨年度は、栄養士・管理栄養士養成課程に籍を置く学生およびその両親を対象に、食品添加物の安全性に対する意識調査を実施した⁴⁾。その結果、学生と母親の食品添加物に対する認識には大きな相違が見られ、母親の不安度が高いことが認められた。また、インターネット調査(1,700名)においても、食品添加物に対する不安度は、男性より女性が高く、40代から70代と高齢になるほど高くなる傾向が見られた。1960年代から1970年代に

かけては、食品の安全性に関する事件・事故がテレビ、新聞等で頻繁に報道され、学校教育においても食品添加物は良くないものとされていた。このような時期に幼少期を過ごしてきた女性、およびその女性により教育を受けた40代から70代の女性は現在家庭において、食材の購入から調理等を主に担っており、家族の健康を支える立場にある。このような環境が、食品添加物は危険なもの、体に良くないものと認識するに至った原因と思われる。

そこで本年度は、昨年度に引き続き食品添加物に対する科学的な安全性評価と消費者、特に40代から70代の女性の抱くリスク認知の間にある大きな溝（乖離）を埋める手段として、正しい情報を分かりやすく、かつ繰り返し提供する学校教育や市民参加型の双方向的リスクコミュニケーション^{5,6)}の有用性を検証することを目的とする。

2. 方 法

2.1 アンケート調査

2.1.1 調査方法

インターネット調査

2.1.2 調査対象

①インターネット調査（GMOリサーチ株式会社に委託；20代、30代、40代、50代、60代、70代以上、男女各141～142名、合計1,700名（有効回答数1,471名；有効率86.5%，別紙1））、②インターネット調査（GMOリサーチ株式会社に委託；20代、30代、40代、50代、60代、70代以上、男女各150名、合計1,800名（有効回答数1,541名；有効率85.6%，別紙2））

2.1.3 調査期間

①2020年2月、②2021年2月

2.1.4 統計解析

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

3. 結果および考察

3.1 食品の安全性について

食品の安全性について、不安の程度を尋ねたところ、男性に比べ、女性のほうが有意（ $p < 0.05$ ）に高く、年齢階層別に見ると20代が最も低く、年齢が40～70代と高くなるに従い不安度も高くなる傾向を示した。食品添加物に対する不安度も、ほぼ同様の傾向を示した。食品の安全性で具体的に何が不安ですかという質問（3つまで選択可）に対する調査結果の概要をTable 1（2020年度調査1,700名）およびTable 2（2021年度調査1,800名）に示した。2021年の調査では、食中毒（29.4%）、食品添加物（27.1%）、残留農薬（25.4%）、昨年より1年以上国際的にきわめて深刻な問題となっている新型コロナウイルス感染症（24.7%）の順であった。昨年の調査⁴⁾と同様、男女とも不安要因として食品添加物が第2位であったが、男性（22.6%）に対して女性（31.6%）は10ポイント近く高い値であった。女性でも20代では18.7%と低い数値であるが、年齢が増すごとに不安傾向が高くなり、70代以上では40%を占めるに至っている。過去に実施された国内外のアンケート調査でも、昨年度および今回実施したアンケート調査においても消費者の多くが食品の安全性に不安を抱いており、その要因として今なお食品添加物を上位にあげている。食品の安全性に対する事件・事故が頻繁に報道された幼少期を過ごし、かつ食材の購入から調理に携わる機会の多い40代から70代の女性は、食品添加物は危険なものとして認識する傾向が高いと推察される。

なお、国内外できわめて大きな問題となっている新型コロナウイルス感染症に対する不安より、食品添加物に対する不安のほうが高い結果となったが、この結果は驚きである。

別紙1 食の安全性に関するアンケート調査のお願い（2020年2月調査）

性別 1.男性 2.女性

年齢 1.20代 2.30代 3.40代 4.50代 5.60代 6.70以上

同居家族の有無 1.同居家族あり 2.同居家族なし（単身）

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

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

職種（専攻） 1.事務系（文科系）, 2.技術系（理科系）

居住地 1.町村 2.市 3.大都市

1. 食品の安全性についてどう思いますか？

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

2. 食品の安全性で具体的に何が不安ですか？（上位3個まで選んでください）

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

3. 食品添加物の安全性についてどう思いますか？

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

4. 食品添加物は体に悪いと思いますか？

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

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

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

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

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

7. 食品を購入する際に、食品添加物が使用されているか気に掛けますか？

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

8. 食品添加物が使われている食品を購入しますか？

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

9. 食の安全性に関する情報は、主に何処から得ていますか？（複数回答可）

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

10. 食品を購入する際、重視することはなんですか？（複数回答可）

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

11. 化学物質と聞くと有害・危険とってしまいますか？

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

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

ご協力ありがとうございました。

別紙2 食の安全性に関するアンケート調査のお願い（2021年2月調査）

性別 1.男性 2.女性

年齢 1.20代 2.30代 3.40代 4.50代 5.60代 6.70以上

同居家族の有無 1.同居家族あり 2.同居家族なし（単身）

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

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

職種（専攻） 1.事務系（文科系）, 2.技術系（理科系）

居住地 1.町村 2.市 3.大都市

1. 食品の安全性についてどう思いますか？

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

2. 食品の安全性で具体的に何が不安ですか？（上位3個まで選んでください）

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

3. 食品添加物の安全性についてどう思いますか？

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

4. 食品添加物は体に悪いと思いますか？

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

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

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

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

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

7. 食品を購入する際に、食品添加物が使用されているか気に掛けますか？

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

8. 食の安全性に関する情報は、主に何処から得ていますか？（複数回答可）

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

9. 食品を購入する際、重視することはなんですか？（複数回答可）

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

10. 化学物質と聞くと有害・危険とってしまいますか？

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

11. 天然と聞くと“安全・安心”, 合成と聞くと“危険・不安”と思いますか？

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

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

ご協力ありがとうございました。

Table 1 Food safety issues of concern

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

Which of these food issues are you concerned about, if any? Please select 3 that apply. Internet survey (1,700 people, 2020)

Table 2 Food safety issues of concern

Food issue	Male						Female							
	M-Total	M-20s	M-30s	M-40s	M-50s	M-70+	F-Total	F-20s	F-30s	F-40s	F-50s	F-60s	F-70+	
Food poisoning	29.4	29.2	44.7	29.3	34.0	26.7	20.0	20.7	29.6	48.0	38.0	33.3	25.3	20.0
The use of food additives	27.1	22.6	15.3	15.3	18.7	22.0	27.3	36.7	31.6	18.7	27.3	34.7	34.0	34.7
The use of pesticides	25.4	21.1	6.7	8.0	16.7	24.0	28.0	43.3	29.7	10.0	18.0	28.0	34.7	40.0
New corona infection	24.7	22.8	16.7	20.0	29.3	21.3	27.3	22.0	26.6	25.3	28.0	24.0	29.3	27.3
Not particularly	18.7	22.6	28.7	31.3	20.7	18.7	22.0	14.0	14.9	21.3	18.7	13.3	12.7	12.0
Genetically modified (GM) foods	18.6	17.9	10.0	10.7	18.7	22.7	20.7	24.7	19.2	6.0	10.7	18.7	25.3	29.3
Imported foods	14.9	13.6	8.7	8.7	12.0	18.0	16.0	18.0	16.3	10.0	15.3	14.7	26.0	20.0
Hormones, antibiotics in food	11.7	10.1	5.3	6.0	6.0	12.7	12.7	18.0	13.3	5.3	8.7	15.3	10.7	18.0
Chemicals from the environment	11.7	12.3	9.3	10.0	10.7	17.3	11.3	15.3	11.0	6.0	10.0	8.7	8.0	16.7
Best-before date, expiration date	9.7	9.6	17.3	12.0	8.7	6.0	6.0	7.3	9.9	21.3	7.3	7.3	6.0	10.0
Radioactivity in food	8.7	8.0	6.7	8.7	15.3	6.0	5.3	6.0	9.3	4.7	12.0	7.3	10.0	9.3
Food hygiene when eating out	7.6	6.7	8.0	7.3	7.3	4.7	6.7	6.0	8.6	8.0	5.3	12.0	8.7	8.7
Food allergen	6.1	5.8	6.7	8.0	10.0	5.3	3.3	1.3	6.3	9.3	14.7	7.3	2.7	2.7
BSE	2.5	3.1	4.7	4.7	2.7	1.3	2.7	2.7	1.9	1.3	0.7	3.3	2.0	2.7
Food hygiene at home	1.9	1.8	2.7	2.7	1.3	1.3	1.3	1.3	2.1	1.3	2.7	2.7	2.0	2.0
So-called health food	1.1	1.2	0.7	2.0	0.0	1.3	2.0	1.3	1.0	0.7	0.7	0.7	0.7	2.0
Others	0.4	0.7	0.7	0.7	0.0	1.3	0.0	1.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7

Which of these food issues are you concerned about, if any? Please select 3 that apply. Internet survey (1,800 people, 2021)

3.2 食品添加物に対する安全性について

食品の安全性で具体的に「食品添加物に対する安全性についてどう思いますか」と尋ねてみた。全体では、不安である16.4%，やや不安である47.7%，あまり不安でない28.8%，不安でない7.1%であった。インターネット調査者の2/3近くが食品添加物に対して不安感を抱いていることが分かった。Fig. 1に示すように、50代～70代以上の女性では、約8割が「不安である，やや不安である」と不安感を抱いていた。この結果は昨年調査とほぼ同様であった⁴⁾。過去に実施されたアンケート調査でも、最近実施されたアンケート調査においても、消費者の多くが食品添加物の安全性に不安を抱いている。食品の安全性に関する各種アンケート調査では、牛海綿状脳症（BSE）や福島原発事故による放射性物質汚染問題のように、食品の安全性に関する事件・事故により報道される記事数は大きく異なり、消費者が抱く具体的な不安項目も事件や事故の影響を強く受ける⁷⁾。しかし、最近食品添加物による事件・事故等の問題はまったく起こっていないのに係わらず、消費者の食品添加物に対する不安感、不信感は根強いもの

がある。

しかし一方では、食品添加物に対する不安の程度を調べた結果では、女性では、「とても心配」が2.0～8.2%（平均5.1%）、「ある程度心配」が24.6～36.1%，男性では、「とても心配」が1.4～6.7%（平均3.7%）、「ある程度心配」が20.2～28.1%であり、食品添加物の安全性に対して不安を抱くものの、深刻度は高くないものと推測される。すなわち、食品添加物の安全性について問われてみると「なんとなく不安，なんとなく体に良くないもの」と考える割合が高いものと考えられる。しかし、食品添加物に対して、「とても不安」と感じている消費者が2020年調査で4.9%（男性3.9%，女性6.0%），2021年調査で4.4%（男性3.7%，女性5.1%）いることも事実であり、必要以上の不安感については取り去るべき課題である。

3.3 食品添加物に対するリスク認知バイアスについて

今日の豊かな生活は、特に合成された化学物質なしには語れない。しかし、言い尽くされてきているが、メチル水銀による水俣病，ヒ素によるミルク中毒事件，有害金属カドミウムによるイタイ

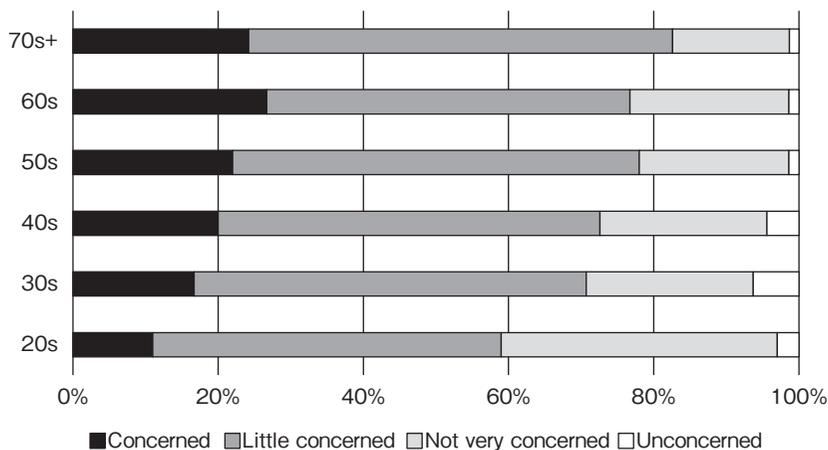


Fig. 1 Differences in women's awareness of the safety of food additives by age.

Age groups : 20s= 20～29 years, 30s= 30～39 years, 40s= 40～49 years, 50s= 50～59 years, 60s= 60～69 years, 70s+ = 70 over years

イタイ病、亜硫酸ガス等による四日市喘息、最近ではダイオキシンや内分泌かく乱化学物質の問題等があげられる。Fig. 2は、化学物質の安全性に対する意識調査の結果を示したものである。やはり男性よりも女性のほうが化学物質に対する不安感は強く、9割前後の女性が不安感を抱いている。私たちは、豊かな生活を得た反面、化学物質によるこれらの事件・事故に遭遇し、大きな被害を受けた人も少なくない。これらの事件・事故による報道などにより「化学物質、特に合成化学物質は有害であり危険である」との情報は、その後「改善されて心配はない」と言われても、一度刷り込まれた「有害・危険」のイメージはなかなか拭い去れないと言える。さらに、今日においても食品に関する事件・事故（豚コレラ、鳥インフルエンザ、異物混入、偽装表示、食品異臭等）が比較的頻繁に報道されている。過去に起こった化学物質や食品添加物に対する事件・事故、今日でも時々報道される食品危害情報が消費者の食品添加物に対するリスク認知形成に大きく関わっている

と思われる。すなわち、食品の安全性に対する事件・事故が頻繁に報道された幼少期を過ごし、かつ食材の購入から調理に携わる機会の多い50代から70代の女性は、化学物質は危険なものと強く認識するに至ったことが推察される。

3.4 リスク認知バイアスの低減化に向けて

世界的に大流行となっている「新型コロナウイルス感染症」でも、科学的に根拠のない情報に翻弄されることが問題とされている。過去の事件・事故や学校教育等で消費者の脳裏に一度刷り込まれた科学的根拠のない「食品添加物を有害なもの、危険なもの」とする考えはなかなか拭い去ることができないでいる⁸⁾。

食品添加物に対する科学的な安全性評価と消費者のリスク認知の間にある大きな溝（乖離）を埋める手段として、学校教育や市民参加型の双方向的リスクコミュニケーションを通して、消費者の科学リテラシーを高めていくことが有効である^{9,10)}。また、科学リテラシーを向上させる手段として正しい情報を分かりやすく、繰り返して提

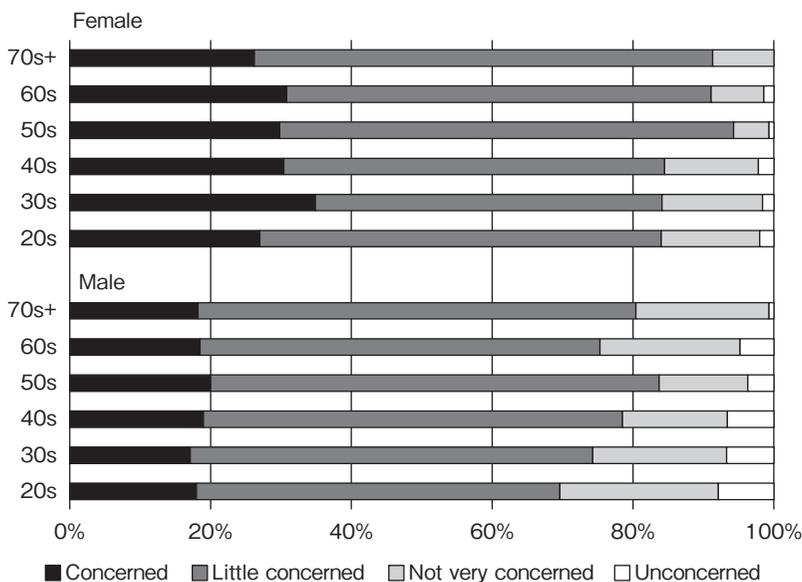


Fig. 2 Differences in awareness of the safety of chemical substances by gender and age.
Age groups : 20s= 20~29 years, 30s= 30~39 years, 40s= 40~49 years, 50s= 50~59 years, 60s= 60~69 years, 70s+ = 70 over years

供することが効果的と考える。そこで、今回の調査においても前回調査⁴⁾と同様に、質問形式による食品添加物の情報の提供を試みた。

「Q12：食品は、栄養成分（タンパク質、炭水化物など）を含め、さまざまな化学物質が集まったものです。食品添加物も化学物質の一種ですが、このことについてどのように思いますか？」

「Q13：毒性の強い化学物質でも、その摂取量が極微量であれば健康に影響を及ぼさないとされています。このことについてどのように思いますか？」

「Q15：生野菜を食品添加物、次亜塩素酸ナトリウムにより処理（最終食品に残らない）することにより、食中毒の発生を少なくすることができます。次亜塩素酸ナトリウムの使用は不安ですか？」

「Q16：豆腐を作る時に「にがり」が用いられます。「にがり」も食品添加物の一種ですが、にがりの使用は不安ですか？」

「Q17：癌の主な原因は、タバコ、普通の食べ物や高齢化が大きく影響しており、食品添加物の影響は無視できるレベルとされています。このことについて信用できますか？」

「Q18：かつて（40～50年前）危険な添加物も使われていましたが、現在使用されている添加物は国により安全性が確保されており、食生活の中で食品添加物を不安視することはありません。どう思いますか？」

「Q19：食品添加物は、使うことにより、消費者にとって利点（保存性や香りを高める）がないと認められません。ご存知でしたか？」等の問いに答えてもらった後に、最後に、「Q20：改めてお聞きします。食品添加物の安全性についてどう思いますか？」と質問を投げかけてみた。その結果の概要をFig. 3に示す。本調査の最初に「食品添加物の安全性についてどう思いますか？」と質

問した時に比べて、男女とも「不安である、やや不安である」と答えた割合が5～10ポイント低くなっている。特に40代以上の女性では、有意な減少を示した（ $p < 0.05$ ）。食品添加物に対して不安感を抱く消費者、特に40代以上の女性にとって、正しい情報を知り、自ら考えることにより、食品添加物に対する不安感がわずかであるが低減化されたと推察される。食品添加物に対するリスク認知を低減する手段として、双方向性のある学校教育や講演会・勉強会などのリスクコミュニケーションを通して、正しい情報を分かりやすく、かつ繰り返し提供することが効果的であると考えられる。

4. 要 約

消費者がどのような経緯で食品添加物に対する認識を醸成してきたか、あるいは醸成していくのかを明らかにし、科学的な安全性と消費者の認識の大きな乖離を埋めていくことは重要である。本研究では、昨年度に引き続きインターネット調査（1,800名）を通して、食品添加物に対する意識調査を実施した。消費者の食品添加物に対する不安感は、50代から70代の女性が高く、20代の若い世代になるほど低くなる傾向が見られた。食品の安全性に対する事件・事故が頻繁に報道された幼少期を過ごし、かつ食材の購入から調理に携わる機会の多い50代から70代の女性は、食品添加物は危険なものとして強く認識していることが推察される。一度脳裏に刷り込まれた「食品添加物を有害なもの、危険なものとする」考えはなかなか拭い去ることができないが、正しい情報を分かりやすく、かつ繰り返し提供することにより、リスク認知の変容が可能であると考えられる。

文 献

- 1) 国政モニター課題報告「食の安全性に関する意識

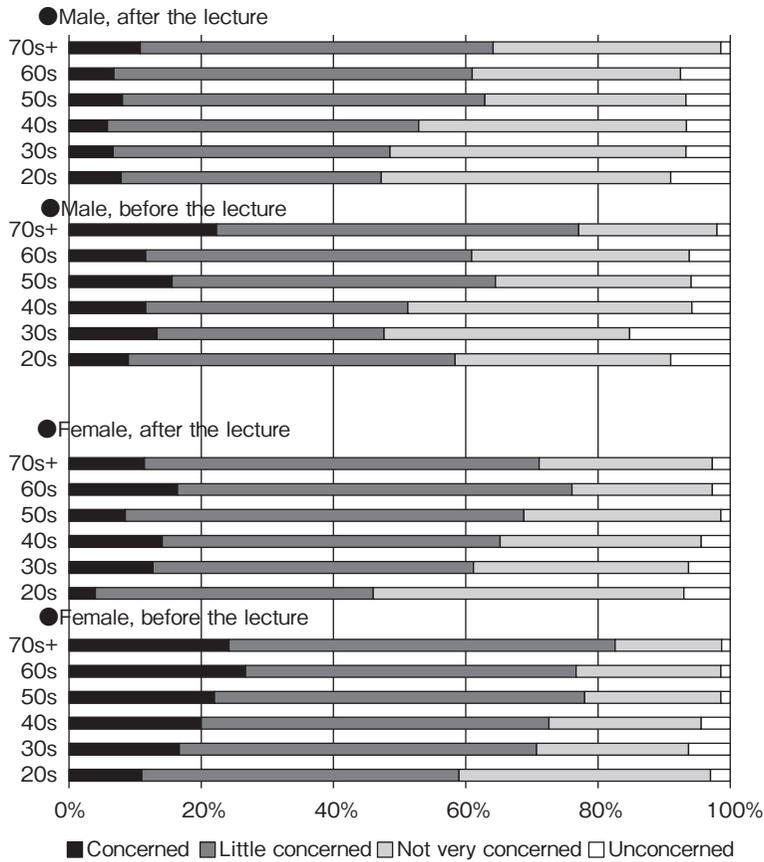


Fig. 3 Effect of correct information on the safety of food additives.
 Age groups : 20s= 20 ~ 29 years, 30s= 30 ~ 39 years, 40s= 40 ~ 49 years,
 50s= 50 ~ 59 years, 60s= 60 ~ 69 years, 70s+ = 70 over years

調査」：内閣府食品安全委員会，<https://www.fsc.go.jp/monitor/1512kokumoni-houkoku.pdf>

2) 東京都平成25年度インターネット都政モニターアンケート：食品の安全性について，<http://www.metro.tokyo.jp/INET/CHOUSA/2013/10/60nat100.htm>

3) Public Attitudes tracker Wave 19, Food Standards Agency, <https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/public-attitudes-tracker-wave-19-final-report.pdf>

4) 堀江正一，渡邊萌，堀井千枝：食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究，食肉に関する助成研究調査成果報告書，38, 88~98, 2020.

5) 楠見孝：日本リスク研究学会誌，23, 298~36, 2013.

6) 荒井祥：食品衛生学雑誌，54, J 319-J 326, 2013.

7) 食品安全モニターからの報告：内閣府食品安全委員会，https://www.fsc.go.jp/monitor/monitor_report.html

8) 山崎毅，大瀧直子，桑原正貴：日本リスク研究学会誌，31, Nov. 9-11, 2018.

9) Zhong, Y., Wu, L., Chen, X., Huang, Z., Hu, W. : *Int J Environ Res Public Health*, 15, 2394, 2018. <https://www.mdpi.com/1660-4601/15/11/2394/html>

10) Kornelis, M., Jonge, J. D., Frewer, L., Dagevos, H : <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1539-6924.2007.00885.x>

牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響（Ⅱ）

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

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

（鹿児島大学共同獣医学部臨床病理学分野）

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

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

The present study was carried out in order to identify the causes in Japanese Black calves with congenital spongiform neurodegeneration and multiple ocular defects, respectively. This study was also carried out to determine the mutant allele frequency of the bovine isoleucyl-tRNA synthetase (*IARS*) gene in the population of Japanese Black cattle, and investigate differences between the carrier and wild-type cows with respect to either metabolic profile test (MPT) results or reproductive performance related to the *IARS* mutation (c.235G>C). Immunohistochemical analyses revealed that the central nervous system in a case with spongiform neurodegeneration might lack two subunits of branched chain keto acid dehydrogenase (BCKDH) : BCKDHA and BCKDHB, suggesting that the calf might be affected with maple syrup urine disease caused by either *BCKDHA* or *BCKDHB* gene. Sequencing analysis of the bovine *WFDC1* gene in a calf with multiple ocular defects revealed that there were no distinct mutations in the exons' region including the known mutation (c.198_199insC), suggesting another novel molecular cause in this calf. Genotyping of the *IARS* mutation revealed that the carrier rate was 6.9% in 2009 and 1.5% in 2018, the difference of which was statistically significant ($p<0.005$). There were no statistically significant differences between the carrier and wild-type cows with respect to either MPT results or reproductive performance, indicating that the carrier cows have necessary *IARS* activity to maintain minimal health and reproductive potential.

1. 目 的

国内の主要牛群である肉用の黒毛和種牛および乳肉用のホルスタイン牛は、近年、その受胎率、出生率および生産性の低下が無視できない問題となっており、乳肉用牛生産現場ならびに牛市場に

深刻な影響をもたらしている。具体的に、北海道人工授精師協会発行の最新報告（2019年度）を例にとると、周産期疾患や泌乳の影響がない未経産牛の初回受胎率は、肉用種牛で59.8%（2008年度は65.7%）、乳用種牛で53.9%（2008年度は59.9%）で、いずれも過去10年間に約6%低下している。

その原因は多様であると推測されるが、潜在する遺伝的不良形質も主因のひとつであると考えられる。

黒毛和種牛においては、現在9種の遺伝的不良形質、すなわち、バンド3欠損症、血液凝固第13因子欠損症、クローディン16欠損症、チェディアック・ヒガシ症候群、眼球形成異常症、モリブデン補酵素欠損症（正確にはキサントニン尿症II型）、イソロイシルtRNA合成酵素欠損症（IARS異常症）、前肢帯筋異常症およびバーター症候群I型が、ホルスタイン牛においては、現在6種の遺伝的不良形質、すなわち、白血球粘着不全症、複合脊椎形成不全症、単蹄、短脊椎症／ブラキスパイナ、HH1およびコレステロール異常症が、一般財団法人家畜改良事業団（家畜改良技術研究所）により指定疾患として検査可能であり、種雄牛の遺伝子型が明らかにされている^{1,2)}。

本研究は、昨年度から、主に黒毛和種新生子で報告された未同定かつ未解明の遺伝的不良形質である2疾患、すなわち、ライソゾーム蓄積病^{3,4)}および海綿状脳症⁵⁾について、その疾患を同定（確定診断）して分子基盤（原因変異と発症機序）を解明するために実施され、今年度もそれらについて調査を継続してきた⁶⁾。さらに、これらの目的に加えて、昨年度からはIARS異常症の原因変異⁷⁾の変異アレル頻度とその牛生産性への影響の調査、ならびに今年度から黒毛和種子牛の新たな眼球形成異常症の未報告症例で、*WFDC1*遺伝子の既知変異（c.198_199insC）⁸⁾を有していない個体における新規原因変異解析についても目的に加えて研究を進めてきた。その結果、海綿状脳症、眼球形成異常症およびIARS異常症に関する解析において、明確な成果が得られたため、それらについて以下に報告する。

2. 方 法

2.1 海綿状脳症の子牛の中樞神経組織に対する免疫染色

先天性の海綿状脳症にて死亡した黒毛和種子牛⁵⁾の脳および小脳のパラフィン包埋ブロックからミクロトームにて薄切した切片を用い、ポリマー法にて免疫染色した。対照として、正常な黒毛和種子牛の中樞神経組織のパラフィン包埋ブロックを使用した。免疫染色のための一次抗体（ウサギ・ポリクローナル、アブカム社）には、抗ヒトアスパルトアミラーゼ（ASPA）、および分枝鎖 α -ケト酸脱水素酵素（BCKDH）を構成する4つのサブユニットタンパクに対する抗体である抗ヒトBCKDHA、抗ヒトBCKDHB、抗ヒトDBTおよび抗ヒトDLD抗体を用い、ならびに二次抗体にはペルオキシダーゼ結合抗ウサギIgG（ヤギ、ニチレイバイオサイエンス社）を用いた。発色基質としては3,3'-ジアミノベンジジン（メルク社）を用いた。

2.2 眼球形成異常症の症例における *WFDC1* 遺伝子エクソンシーケンス解析

最近、臨床的かつ組織病理学的に眼球形成異常症と診断された黒毛和種子牛（未報告）のパラフィン包埋ブロックから抽出したDNAを用いて、過去に黒毛和種子牛の眼球形成異常症の原因として同定された牛 *WFDC1* 遺伝子変異（c.198_199insC）⁸⁾の有無、ならびに7つの全エクソン領域を増幅してサンガーシーケンス法にて配列を解読し、既知変異以外の新規変異を検索した。

2.3 IARS異常症の変異アレル頻度および牛生産性への影響の調査⁷⁾

鹿児島県内の複数の農場で2009年（130検体）および2018年（462検体）に収集した黒毛和種繁殖牛の血液から抽出したDNAを用いた。IARS異常症の原因変異（c.235G>C）の遺伝子型を識別

するTaqMan MGBプローブを用いたリアルタイムPCR法を作成して、それぞれの個体の遺伝子型を決定し、集団におけるキャリア率を算出した。

また、2018年に収集した牛の中で同じ環境で生育した牛群（62頭、平均年齢11.5歳）において、上記の遺伝子型検査で識別された野生型ホモ接合体（58頭）とヘテロ接合体（4頭）の代謝プロファイル試験（MPT）成績および繁殖・生育成績を比較した。MPTでは、総タンパク（TP）、アルブミン（Alb）、グルコース（Glu）、血中尿素態窒素（BUN）、中性脂肪（TG）、総コレステロール（T-Cho）、遊離脂肪酸（FFA）、3-ヒドロキシ酪酸（3-HB）、カルシウム（Ca）、無機リン（iP）、マグネシウム（Mg）濃度、ならびにアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）およびγ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）活性を測定した。アルブミン/グロブリン比（A/G）は、TPとAlbから計算した。繁殖・生育成績としては、出生子牛数、新生子体重、一日増体量、治療回数および治療費を評価した。

統計学的解析として、2009年と2018年のキャリア率はFisher's exact検定を用いて比較し、MPTおよび繁殖・生育成績については、野生型ホモ接合体およびヘテロ接合体群の平均値の差をMann-Whitney U検定で比較した。 $p < 0.05$ を有意差として定義した。

3. 結果と考察

3.1 海綿状脳症の子牛の中樞神経組織に対する免疫染色

免疫染色の結果をFig. 1に示した。症例牛の大脳において、抗ASPAに対する染色する細胞は存在し、対照牛と同程度であった。これは、症例牛の大脳組織はASPAタンパクを対照牛と同程度に有していることを示しており、症例牛はASPAタンパクを欠損していないことを示唆していた。こ

の結果は、以前に本症例のASPA遺伝子のエクソン領域を調査して変異候補が認められなかったことに一致するため⁶⁾、本症例はASPA欠損で生じるカナバン病を発症していない可能性が高いと考えられた。

一方、症例牛の小脳において、抗BCKDHAおよび抗BCKDHB抗体による組織の染色性が対照牛に比較して著しく減弱していた。また、抗DLDおよび抗DBT抗体による神経細胞の染色性は対照牛と同程度であった。この結果から、症例牛がBCKDHを欠損していることを示唆していると考えられた。BCKDH複合体におけるBCKDHAとBCKDHBサブユニットは、そのどちらかが欠損するともう一方が不安定化することが知られており、またBCKDHAとBCKDHBのどちらかが欠損してもDLDとDBTタンパクは安定的に維持されることも報告されている。そのため、本症例牛はBCKDHAあるいはBCKDHBのどちらかを欠損することでメープルシロップ尿症（MSUD）を発症していると推測された。以前の研究では、MSUDの原因となる*BCKDHA*、*BCKDHB*、*DBT*および*DLD*遺伝子について調査したが、変異候補が同定できていなかった。それはDNAの断片化によりすべての領域をシーケンスすることができなかったことが原因と考えられていた。今回、*BCKDHA*および*BCKDHB*遺伝子のどちらかに本症例のMSUDの原因となる変異が存在するのではないかと考えられた。しかし、本症例のDNAは断片化しているため、これ以上の正確な調査は難しいと思われた。

3.2 眼球形成異常症の症例における*WFDC1*遺伝子エクソンシーケンス解析

牛*WFDC1*遺伝子の7つのエクソンを増幅するために、イントロン領域にプライマーを設計してPCR増幅したPCR産物について、サンガーシーケンス法にて配列を解読した。その結果、既知変異

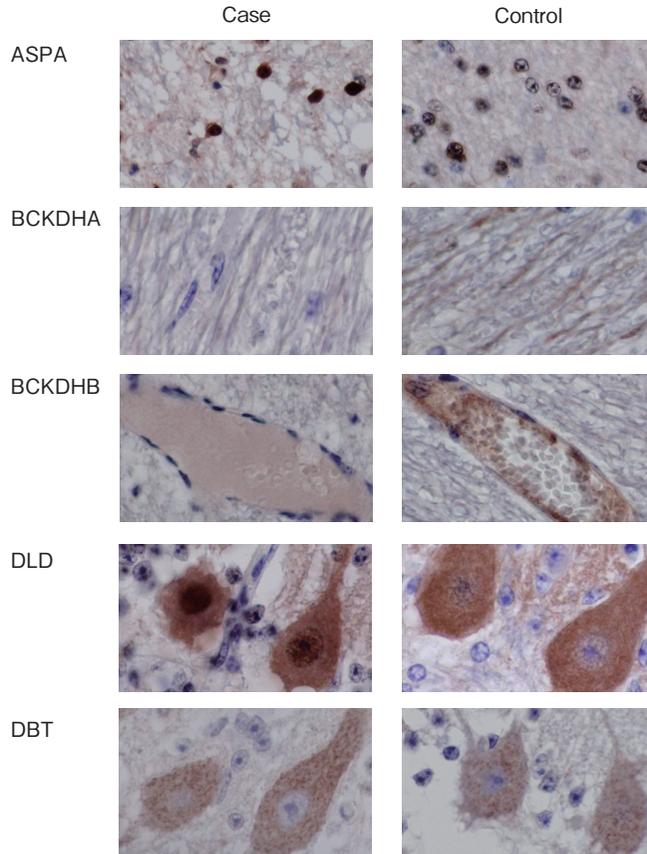


Fig. 1 Immunohistochemistry for the detection of bovine ASPA (cerebral cortex), BCKDHA, BCKDHB, DLD, and DBT proteins (cerebellum) in a calf (Case) with congenital spongiform neurodegeneration and a clinically healthy calf (Control). Counter stain : Mayer's hematoxylin.

およびその他原因候補となる新規変異も認められなかった。この結果は、眼球形成異常症を示す本症例の遺伝的原因として、*WFDC1* 遺伝子が原因である可能性も残されるものの、同遺伝子以外の遺伝子に変異が存在する可能性が高いと考えられた。今後のさらなる解析が必要であると思われた。

3.3 IARS異常症の変異アレル頻度および牛生産性への影響の調査

IARS異常症の遺伝子型調査によって、キャリア率は2009年の調査集団で6.9%、2018年の調査集団で1.5%であった。統計解析の結果、2018年のキャリア率は2009年に比較して有意に ($p <$

0.005) 低下していた。これは、農場ごとの種雄牛の選択性が異なることや、虚弱子牛を産んだ繁殖牛を早期に退役させる傾向など、いつかの要因によってキャリア率が減少したものと考えられた。

キャリアと野生型ホモ接合牛の間には、MPT (Table 1) および繁殖・生育成績 (Table 2) の有意な差が認められなかった。したがって、キャリア牛は野生型牛と最低限変わらない健康状態と生産性は維持していると考えられた。しかし、キャリア牛の中には、脂質濃度が高く血糖値が低い牛も含まれていたことや、治療費は比較的高い傾向を示したため、なんらかの代謝異常や疾患に陥り

Table 1 Results of serum biochemical analyses in homozygous wild-type and heterozygous carrier cows for the *IARS* mutation

Analyte	Wild-type cows (n=58)	Carrier cows (n=4)	Reference range
TP (g/dl)	7.6 ± 0.4	8.0 ± 0.4	6.6-8.1
Alb (mg/dl)	3.4 ± 0.2	3.3 ± 0.2	3.0-3.8
A/G ratio	0.83 ± 0.14	0.72 ± 0.13	0.8-1.3
Glu (mg/dl)	42.2 ± 8.9	38.8 ± 2.4	44.6-67.0
BUN (mg/dl)	8.4 ± 1.5	7.5 ± 1.1	5.0-16.6
TG (mg/dl)	39.8 ± 84.2	252.2 ± 383.0	8.5-43.4
T-Cho (mg/dl)	136.4 ± 37.5	176.2 ± 42.7	76.7-141.7
FFA (mmol/l)	284.7 ± 186.8	340.9 ± 121.7	28.9-354.2
3-HB (μmol/l)	252.3 ± 121.2	224.3 ± 56.8	110.0-545.0
Ca (mg/dl)	8.8 ± 0.4	9.1 ± 0.3	8.8-10.4
iP (mg/dl)	5.2 ± 0.9	5.2 ± 0.4	4.2-6.7
Mg (mg/dl)	2.1 ± 0.2	1.9 ± 0.1	1.5-2.2
AST (U/l)	53.7 ± 8.5	62.6 ± 6.9	44.0-76.8
GGT (U/l)	18.9 ± 4.5	17.8 ± 7.2	11.3-21.6

The results obtained for each parameter are expressed as the mean ± standard deviation. There was no significant difference between the two groups. TP, total protein; Alb, albumin; A/G, albumin to globulin; Glu, glucose; BUN, blood urea nitrogen; TG, triglyceride; T-Cho, total cholesterol; FFA, free fatty acid; 3-HB, 3-hydroxybutyrate; Ca, calcium; iP, inorganic phosphorus; Mg, magnesium; AST, aspartate aminotransferase; GGT, γ-glutamyl transferase.

Table 2 Comparison of the reproductive and developmental status of homozygous wild-type and heterozygous carrier cows for the *IARS* mutation

Performance	Wild-type cows (n=58)	Carrier cows (n=4)
Calf data :		
Number of live births	8.8 ± 0.7	9.0 ± 0.7
Birth weight of male calf (g)	29,730 ± 303	29,538 ± 322
Daily weight gain after castration (g/calf)	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.2
Birth weight of female calf (g)	26,084 ± 298	26,529 ± 25
Daily weight gain of female calf (g/calf)	0.9 ± 0.1	0.9 ± 0.1
Cow data :		
Frequency of treatment (/year/cow)	2.6 ± 1.8	3.3 ± 1.6
Treatment cost (Japanese yen/year/cow)	841 ± 620	1,066 ± 605

The results obtained for each performance parameters are expressed as the mean ± standard deviation. There were no significant differences between the two groups with respect to any of the assessed parameters.

やすい傾向も存在するのではないかと考えられた。今後、分析する頭数を増やしてさらなる調査が必要であると考えられた。

4. 要 約

本研究は、過去に黒毛和種新生子で報告された原因が未解明の先天性海綿状脳症、ならびに最近臨床的かつ組織学的に診断された先天性眼球形成

異常症について、その疾患を同定して原因変異を解明することを目的として実施された。さらに、黒毛和種牛集団におけるイソロイシルtRNA合成酵素欠損症 (IARS 異常症) の原因変異 (c.235G>C) の変異アレル頻度を算出するとともに、同変異のヘテロ接合体キャリアと野生型ホモ接合体において代謝プロファイルテスト (MPT) 成績および繁殖・生育成績についても分析・比較

した。

先天性海綿状脳症の牛の中樞神経組織における免疫染色の結果、分枝鎖 α -ケト酸脱水素酵素(BCKDH)を構成する4つのサブユニットタンパクのうち、BCKDHAおよびBCKDHBに関して、症例牛が対照牛に比較して染色性が著しく減弱していたため、本症例はメープルシロップ尿症を発症していたと推測された。また、先天性眼球形成異常症の牛では、*WFDC1*遺伝子エクソン上に既知および新規変異も認められなかったため、同遺伝子のエクソン以外の領域、あるいはその他の遺伝子に原因が存在すると考えられた。さらに、IARS異常症の遺伝子型調査によって、キャリア率は2009年の調査集団で6.9%、2018年の調査集団で1.5%であり、両キャリア率には有意な($p < 0.005$)差が存在した。キャリアと野生型ホモ接合牛の間には、MPTおよび繁殖・生育成績の有意な差が認められなかったため、キャリア牛は野生型牛と変わらない健康状態と生産性は維持していると考えられた。

文 献

- 1) 黒毛和種の遺伝的不良形質，一般財団法人畜改良事業団畜改良技術研究所，http://liaj.or.jp/giken/usi_gntyp_disease_kuro.html
- 2) ホルスタイン種の遺伝的不良形質，一般財団法人畜改良事業団畜改良技術研究所，http://liaj.or.jp/giken/usi_gntyp_disease_hol.html
- 3) Mikami, O., Anjiki, T., Yamato, O., Nakajima, Y.: A case of suspected lysosomal storage disease in a neonatal Japanese black calf, *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*, 53(2), 77~80, 2006.
- 4) Masoudi, A. A., Yamato, O., Yoneda, K., Tsuji, T., Mikami, O., Kunieda, T.: Exclusion of *NEUI* and *PPGB* from candidate genes for a lysosomal storage disease in Japanese black cattle, *Anim Sci J*, 80(5), 611~615, 2009.
- 5) Kato, K., Uchida, K., Murakami, T., Tateyama, S.: A neurological disease with spongy degeneration in a newborn Japanese Black calf, *J Vet Med Sci*, 67(10), 1067~1070, 2005.
- 6) 大和修, 矢吹映, Islam, M. S., Pervin, S.: 牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響 (II), 平成31年度 (令和元年度) 食肉に関する助成研究調査成果報告書 VOL. 38, pp. 112~117.
- 7) Islam, M. S., Shinya, U., Takagi, M., Akahoshi, T., Yabuki, A., Pervin, S., Rakib, T. M., Rahman, M. M., Tacharina, M. R., Yamato, O.: Carrier rate of the c.235G>C mutation in the bovine isoleucyl-tRNA synthetase (*IARS*) gene of Japanese Black cows at Kagoshima prefecture, Japan, and analysis of the metabolic profiling and reproductive performance of heterozygous cows, *J Vet Med Sci*, 83(2), 254~259, 2021.
- 8) Abbasi, A. R., Khalaj, M., Tsuji, T., Tanahara, M., Uchida, K., Sugimoto, Y., Kunieda, T.: A mutation of the *WFDC1* gene is responsible for multiple ocular defects in cattle, *Genomics*, 94(1), 55~62, 2009.

肉用牛の枝肉形質および肉質の診断マーカーとしての 血中マイクロRNAの動態解析

Analysis of dynamics of circulating microRNAs as biomarkers for
diagnosis of carcass traits and meat quality in beef cattle

横井 伯英

(京都大学大学院農学研究科)

Norihide Yokoi

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University)

To establish the blood microRNA (miRNA)-based diagnosis method of carcass traits and meat quality in beef cattle, we examined the extraction and detection methods of plasma exosomal and non-exosomal miRNAs in Japanese Black cattle, investigated changes in plasma miRNAs between early and late stages during fattening, and tried to detect these miRNAs in skeletal muscle and subcutaneous fat tissue. At first, we examined the internal controls for blood miRNA analysis in Japanese Black cattle and found that bta-miR-15a is appropriate for plasma exosomal miRNA analysis and that bta-miR-15a and bta-miR-93 are appropriate for plasma non-exosomal miRNA analysis. Then, we examined whether the 23 miRNAs found in blood and skeletal muscle in cattle are detected in plasma exosomal and non-exosomal fractions in Japanese Black cattle. We found that 11 and 13 miRNAs are specifically amplified in exosomal and non-exosomal fractions, respectively. Among them, two miRNAs tended to change in plasma between early and late stages during fattening. Finally, we tried to detect these 23 miRNAs in skeletal muscle and subcutaneous fat tissue at the end of fattening. We found that eight miRNAs are specifically amplified in skeletal muscle and subcutaneous fat tissue. Further study is needed to perform longitudinal and comprehensive analysis of plasma miRNAs in beef cattle to identify novel biomarker candidates for carcass traits and meat quality and to examine candidate miRNAs in large populations of cattle.

1. 目 的

近年の遺伝的改良および飼養法の進歩により、黒毛和種牛の脂肪交雑をはじめとする各種枝肉形質は飛躍的に向上した。最近では筋肉内脂肪の量だけでなく、脂肪の質（脂肪酸組成）や筋肉内への入り方（サシ）の細かさも重要視されている。国際競争力が高く、安心・安全・高品質な牛肉を安

定的にかつ低コストで生産するには、生体において枝肉形質および脂肪の質を含めた肉質を的確に評価する技術の開発が必要である。生体における枝肉形質や肉質の評価法としては、超音波などを用いて推定する方法と血液などに含まれるバイオマーカーを用いて推定する方法が試みられている。前者は専用機器を用いることが必要であり、汎用性に難がある。従来、脂肪交雑の向上を目的

として飼料中のビタミンAを制限した飼養とともに血中ビタミンA濃度の測定が行われているが、血中ビタミンA濃度はリアルタイムの脂肪交雑の指標ではない。現状においては、血中バイオマーカーによる枝肉形質や肉質の診断技術は実用化されていない。

最近、血中に存在するマイクロRNAが疾患をはじめとする生体の状態の指標となる新たなバイオマーカーとして注目されている。マイクロRNAは22塩基ほどの一本鎖RNAであり、真核生物において遺伝子発現制御に関与している¹⁾。マイクロRNAは細胞内に限らず、動物においては体液中にも存在しており、血液、尿、および唾液等で検出することができる²⁾。これまで多くの血中マイクロRNAの解析は、血中に存在するエクソソーム（各種細胞から分泌される微小な膜小胞顆粒）の中に存在するマイクロRNAに限定して行われてきた。しかし、血中マイクロRNAはエクソソーム以外にも多量に存在するだけでなく、それが生体制御にも関与していることが明らかになってきた。したがって、血中マイクロRNAをバイオマーカーとして捉えるには、エクソソームに限らず血中に存在するマイクロRNA全体を解析することが必要である。

そこで本研究においては、血中マイクロRNAによる肉用牛の枝肉形質および肉質の診断技術を開発することを最終目標として、黒毛和種肥育牛から採取した血中のエクソソーム画分とそれ以外の画分の両者について、マイクロRNAの抽出および検出方法について検討するとともに肥育初期と後期における存在量の変動について検討した。さらに、血中で検出されたマイクロRNAについて肥育終了時の骨格筋および皮下脂肪での検出を試みた。

2. 方法

2.1 血中エクソソーム内外のマイクロRNAの抽出とqPCRによる定量

京都大学農学研究科附属牧場において飼養中の黒毛和種牛を対象として、肥育初期の15カ月齢（ $n = 4$ ）および肥育後期の30カ月齢（ $n = 3$ ）において経静脈からEDTA採血管（テルモ社）を用いて血液を採取し、低温下での遠心により血漿を分離して凍結保存した。次に、融解した血漿1 mLをサンプルとして、Plasma/Serum Exosome and Free-Circulating RNA Isolation Mini Kit（ノルジェン社）を用いて血漿中のエクソソーム画分およびそれ以外の画分からRNAを抽出した。抽出したRNAからのcDNA合成には、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit（タカラバイオ社）を用いた。

qPCR用のForward Primerは、マイクロRNAデータベース（miRBase, www.mirbase.org）から牛のマイクロRNAの配列を入手し、配列中のウラシルをチミンに置換して作製した。qPCR用のReverse PrimerはMir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit（タカラバイオ社）付属のmRQ3' Primerを使用した。qPCRは、KOD SYBR qPCR Mix（TOYOBO社）を用いて反応液を調製した後、qPCRマシンの（StepOne Plus, Applied Biosystems社）を用いて行った。また、特異的な増幅を確認するため、qPCR後に温度を0.3℃ごとに99℃まで上昇させて融解曲線を作成した。

2.2 肥育終了時における骨格筋および皮下脂肪のマイクロRNAの抽出とqPCRによる定量

京都大学大学院農学研究科附属牧場から京都食肉市場に出荷された黒毛和種去勢肥育牛（ $n = 5$ ）について、と畜後すぐに頸最長筋および皮下脂肪を採取し、RNA later Tissue Collection

(Applied Biosystems社) に浸漬して4℃で一晩保存した後、凍結保存した。次に、QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN社) に頸最長筋サンプル25 mgまたは皮下脂肪100 mgを浸し、ビーズ破砕機(ビーズクラッシャー μ T-12, TAITEC社)を用いて破砕した後、miRNeasy Mini Kit (QIAGEN社)を用いてRNAを抽出した。抽出したRNAからのcDNA合成には、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (タカラバイオ社)を用いた。qPCRは、U6を内部コントロールとして上記の血中エクソソーム内外のマイクロRNAの場合と同様の方法を用いて行った。

3. 結果と考察

qPCRによるマイクロRNA解析を行うには、試料の保存状態、RNAの抽出効率、およびcDNA合成効率の差異等に起因するデータのばらつきを補正するために、内部コントロールとなる遺伝子が必要である。しかし、牛の血中に含まれるマイクロRNA解析を行う際の最適な内部コントロールは確立されていない。そこで本研究では、牛を対象とするこれまでの研究において内部コントロールとして使用されたことのあるU6, bta-miR-15a, -93, -127を候補として、黒毛和種肥育牛の

血中マイクロRNA解析に最適な内部コントロールについて検討した。その結果、qPCR時のthreshold cycle (Ct) 値のばらつきおよび融解曲線による特異的増幅の確認により、血漿中エクソソーム内のマイクロRNA解析においてはbta-miR-15aが内部コントロールとして最適であることが示された (Fig. 1)。また、同様の検討の結果、血漿中エクソソーム外のマイクロRNA解析においてはbta-miR-15aおよびbta-miR-93が内部コントロールとして最適であることが示された (Fig. 1)。

次に、牛の血中および骨格筋に存在することが報告されている23種類のマイクロRNAについて、黒毛和種去勢肥育牛の血漿中エクソソーム内外における検出の可否について検討した。その結果、血漿中エクソソーム内画分では、11種類のマイクロRNA (bta-miR-16a, 18a, 19b, 26b, 27b, 29c, 128, 142-5p, 451, 2373-5p, 2478) が特異的に増幅されたのに対して、それ以外の12種類のマイクロRNAは、今回のqPCR条件では特異的な増幅が認められなかった。一方、血漿中エクソソーム外画分では、13種類のマイクロRNA (bta-miR-16a, 18a, 19b, 26b, 27a-3p, 27b, 29c, 128, 142-5p, 451, 874, 2373-5p, 2478) が特

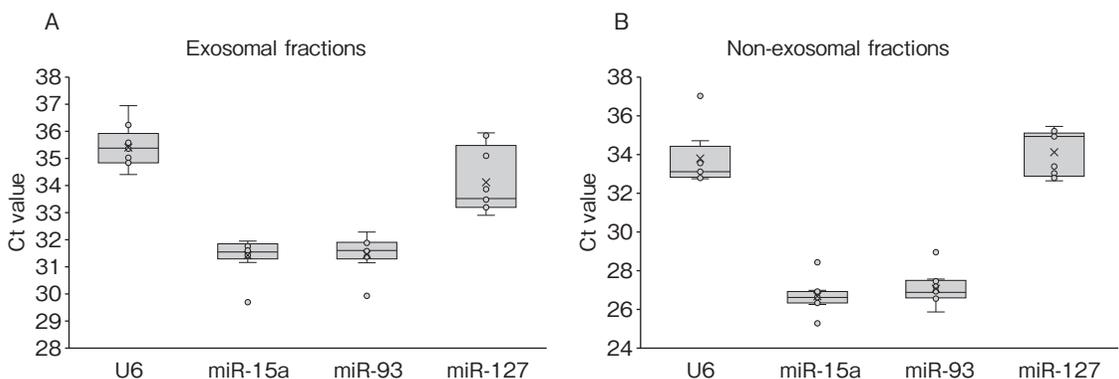


Fig. 1 Examination of internal controls for plasma miRNA analysis in beef cattle

Ct values in qPCR analysis of internal controls in plasma exosomal (A) and non-exosomal (B) fractions are presented as box-and-whisker plots.

異的に増幅されたのに対して、それ以外の10種類のmiRNAは、今回のqPCR条件では特異的な増幅が認められなかった。血漿中エクソソーム外画分のみで特異的に増幅されたマイクロRNAはbta-miR-27a-3pとbta-miR-874の2種類であり、11種類のマイクロRNAは両画分において特異的な増幅が認められた。

さらに、上記の検討により特異的な増幅が認められたマイクロRNAについて、肥育初期と後期における血漿中エクソソーム内外におけるマイクロRNAの存在量の変動について検討した。血漿中エクソソーム内画分においては、肥育初期と比較して肥育後期により多くのbta-miR-2478が存在する傾向が認められた (Fig. 2)。一方、血漿中エクソソーム外画分においては、肥育初期と比較して肥育後期により多くのbta-miR-26bが存在する傾向が認められた (Fig. 2)。

最後に、上記の血漿中に検出されたマイクロRNAについて肥育終了時の骨格筋および皮下脂肪での検出の可否を検討した。頸最長筋および皮下脂肪において、共通して8種類のマイクロRNA (bta-miR-16a, 19b, 26b, 27a-3p, 27b, 29c, 451, 2478) の特異的な増幅が認められた。

血漿および頸最長筋においてともに検出されたマイクロRNAの中で、bta-miR-2478は、牛特有

のマイクロRNAであり脂質生成に関与するstearoyl-CoA desaturase 1 (SCD1) を標的とするとの報告がある³⁾。今回、血漿中のエクソソーム内画分に存在するbta-miR-2478が肥育初期と肥育後期の間で変動する傾向が見られたことから、血漿エクソソーム内のbta-miR-2478が骨格筋における脂質形成のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。また、bta-miR-26bは歩留まり等級とよく相関するとの報告がある⁴⁾。今回、血漿中のエクソソーム外画分に存在するbta-miR-26bが肥育初期と肥育後期の間で変動する傾向が見られたことから、血漿エクソソーム外のbta-miR-26bが歩留まり等級のバイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後、血中マイクロRNAについての経時的かつ網羅的な解析により新たなバイオマーカーの探索を行うとともに、同定されたバイオマーカー候補について多数頭の検討を行う必要がある。

4. 要 約

血中マイクロRNAによる肉用牛の枝肉形質および肉質の診断技術を開発することを最終目標として、黒毛和種肥育牛から採取した血漿中のエクソソーム画分とそれ以外の画分の両者についてマイクロRNAの抽出および検出方法、肥育初期と

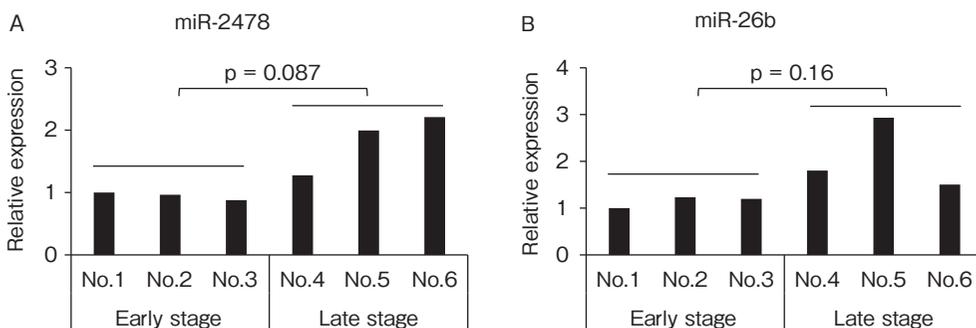


Fig. 2 Changes in plasma miRNAs between early and late stages during fattening

Expression levels of miRNAs in plasma exosomal (A) and non-exosomal (B) fractions are presented as fold-change relative to those of animal No.1. Welch's t-test was used for evaluation of statistical significance.

後期における存在量の変動について検討するとともに、肥育終了時の骨格筋および皮下脂肪での検出を試みた。

まず初めに、黒毛和種肥育牛の血中マイクロRNA解析に最適な内部コントロールについて検討した結果、血漿中エクソソーム内のマイクロRNA解析においてはbta-miR-15aが、また血漿中エクソソーム外のマイクロRNA解析においてはbta-miR-15aおよびbta-miR-93が内部コントロールとして最適であることが示された。

次に、牛の血中および骨格筋に存在することが報告されている23種類のマイクロRNAについて、黒毛和種去勢肥育牛の血漿中エクソソーム内外における検出の可否について検討した。その結果、血漿中エクソソーム内画分では11種類のマイクロRNAが、また血漿中エクソソーム外画分では13種類のマイクロRNAが特異的に増幅された。このうち2種類の血漿中マイクロRNAは肥育初期と後期において変動する傾向が認められた。

最後に、上記の血漿中に検出されたマイクロRNAについて肥育終了時の骨格筋および皮下脂肪での検出を試みた結果、頸最長筋および皮下脂

肪において、共通して8種類のマイクロRNAの特異的な増幅が認められた。今後、血中マイクロRNAについて経時的かつ網羅的な解析により新たなバイオマーカーの探索を行い、同定されたバイオマーカー候補について多数頭の検討を行う必要がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご協力頂きました京都大学農学研究科附属牧場の職員の皆様に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Bartel, D. P. : MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell*, **116**, 281~297, 2004.
- 2) 梅村創 : マイクロRNA解析の臨床応用. 生物試料分析, **39**, 311~320, 2016.
- 3) Muroya, S., Shibata, M., Hayashi, M., Oe, M., Ojima, K. : Differences in Circulating microRNAs between Grazing and Grain-Fed Wagyu Cattle Are Associated with Altered Expression of Intramuscular microRNA, the Potential Target PTEN, and Lipogenic Genes, *PLoS One*, **11**, e0162496, 2016.
- 4) Lee, S., Park, S. J., Cheong, J. K., Ko, J. Y., Bong, J., Baik, M. : Identification of circulating miRNA involved in meat yield of Korean cattle, *Cell Biology International*, **41**, 761~768, 2017.

豚胎児の成長性に影響する生体内因子の探索

Investigation of biological factors associated with growth of pig fetuses

谷口 雅章・中島 郁世・荒川 愛作

(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)

Masaaki Taniguchi, Ikuyo Nakajima and Aisaku Arakawa

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Due to the long-term effort of breeding scheme for genetic improvement of pig reproductive traits, the litter size of pigs has been increased. However, that also increased relatively smaller and weaker fetuses and piglets compared to the other littermates, leading to stillborn and loss of piglets before weaning. In our previous study, we revealed that gene expression differences in liver tissues affected more on pork meat productivity than skeletal muscle and subcutaneous adipose tissues during the earlier periods of pig growth. Therefore, in this study, we focused on investigating potential metabolic pathways which are associated with pig fetus development by the trans-omics approach including metabolomics and transcriptomics. We collected pig fetus liver samples at 63d, 77d, and 98d of gestation. For the metabolomics, we employed a gas chromatography-mass spectrometry (GCMS) due to its wide range of target detection features with reproducibility in analysis data. Additionally, we applied RNA-seq for transcriptomics. The results of our study identified in total 145 metabolites detected by the GCMS. The number of differentially detected metabolites with >2-fold threshold between large and small pig fetuses were 9, 11, and 11 in 63d, 77d, and 98d, respectively. In contrast to the size differences, 27 metabolites were differentially detected among time points. Transcriptomics by RNA-seq showed 20, 12, and 16 differentially expressed genes with >2-fold threshold on 63d, 77d, and 98d, respectively. There are no genes commonly detected through time points. Based on this research, we are going to elucidate the key metabolic pathway that is potentially associated with pig fetus development. Candidate metabolites and genes can be applied as possible biomarkers, for safety and effective fetus growth by a nutritional fine-tuning of sows during the gestation period, and for genetic improvement by detecting causative genetic variants and clarifying gene function.

1. 目 的

豚の生産性向上は、養豚業にとって主要な課題である。そのため多産系統の造成による産子数の増産が図られ、一定の効果が見られている。一方

で、産子間の成長性の差異が顕著となるケースが増え、成長性の劣る産子が離乳に至らず損耗してしまう割合が高まっている。このような子豚きょうだい間の成長性の差異は、いつ頃から、どのような要因により引き起こされるのだろうか？ こ

の点を解明することができれば、将来的に生涯生産性の高い母豚の育種改良、妊娠母豚および授乳産子の効率的・効果的な飼養管理にも寄与する技術開発につながる。そのため養豚における生産性の向上への波及効果は高いと考えられる。

研究代表者らは、豚品種間および成長期間中の採材時期の違いで発現量の異なる遺伝子を骨格筋、肝臓、ならびに皮下脂肪組織を用いて検討した¹⁾。その結果、若齢時の豚では、肝臓組織での遺伝子発現量の顕著な差違が、豚品種間の肉質の差違となって現れる一因となることを示した。

そこで本研究では、豚の胎児期において、最大および最小の胎児間における肝臓組織中の生体内因子を網羅的に検討することで、胎児の成長性と関連するものを同定し、その背景となる生物学的プロセスを解明することを試みることにした。豚胎齢63日、77日および98日において、きょうだいのうち最大および最小の雌胎児より肝臓組織を採取した。生体内因子として低分子代謝物および遺伝子発現量を検討した。

2. 方 法

本研究の材料には、豚胎児の肝臓組織を用いた。採材は胎齢63日、77日、および98日の3時点で行った。全胎児の体重測定を行った (Fig. 1)。

同腹内の最大および最小の雌胎児より、肝臓組織約1gを採取し、液体窒素中で急速凍結した後、 -80°C フリーザーにて保存した。凍結した肝臓組織40mgを用いてメタボローム解析、ならびに、100mgを用いてRNA-seq解析に供した。いずれの解析においても3回繰り返し実験を実施し、最大および最小の胎児間の差の検定は分散分析によって行い、得られたp値をFalse discovery ratio (FDR) 補正した $Q < 0.05$ を有意とした。

メタボローム解析には多種類の代謝物を網羅的に同定することができる、比較的再現性の高い手法であるガスクロマトグラフィー質量分析 (GCMS) により、胎児の大小差と関連する代謝物の同定を実施した。豚胎児の凍結肝臓組織を粉碎したものに、内部標準物質として2-isopropyl malic acidを加え、超純水・メタノール・クロロフォルム前処理液と混和し、遠心分離後の上清を乾固処理したものを誘導体化してから、島津QP2020にてGCMS分析を行った。代謝物データはSmart Metabolite DatabaseおよびMS-DIALを用いて同定した後、MetaboAnalyst²⁾を用いて統計解析、ならびにエンリッチメント解析を行った。

遺伝子発現量の検討には、全RNAを次世代シーケンサーで網羅的に解読するRNA-seq解析により実施した。豚胎児の凍結肝臓組織より抽出した

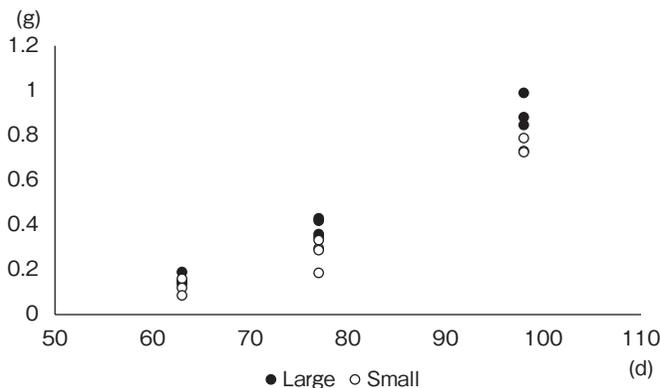


Fig. 1 Difference in body weight of pig fetus between largest and smallest individuals

全RNAからTruSeq Stranded mRNA Libraryを作製し、NovaSeq6000 (Illumina)により、各個体につき4Gb相当の100塩基ペアエンドリードをFastq形式で取得した。シーケンスリードは、HISAT2³⁾によりブタリファレンスゲノム (Sscrofa11.1 : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/84?genome_assembly_id=317145)にマッピングし、発現情報取得にはStringTie⁴⁾を用いた。遺伝子発現量の豚胎児の大小差の比較解析には、edgeRおよびDESeq2を内包したTCCパッケージ⁵⁾を用いた。

3. 結果と考察

豚胎児肝臓組織のメタボローム解析により、最大および最小の胎児間で差を示した代謝物は、胎齢63日、77日および98日を通じて145物質であった。各胎齢において、大小差を比較した結果、2倍以上の差を示した物質数は、63日齢では9

種類、77日齢、ならびに98日齢では、ともに11種類が検出された。一方、時点間で変動する代謝物は27種類が検出され、大小差よりも多くの物質が、時間の推移によって変動した。これらの代謝物に関してエンリッチメント解析も行ったが、代謝物の数が少なかったためか、有意水準 $Q < 0.05$ を満たす代謝物セットは同定されなかった。

RNA-seq解析において、検出したリード数およびクオリティーはそれぞれ十分に高く、遺伝子発現量の比較に耐えるものであった (Table 1)。

RNA-seqリードのブタリファレンスゲノムへのマッピングならびに発現遺伝子情報の取得により、63日齢では32転写物、20遺伝子、77日齢では12転写物、11遺伝子、および、98日齢では29転写物、16遺伝子が同定された。これら発現遺伝子は、豚胎児の大小差により差を示したものの、時点間で共通して検出されたものはなく、大小差に関わる遺伝子発現量は、胎児の発達段階において独

Table 1 Raw data Stats

Sample ID*1	Total read bases (bp)	Total reads	GC (%)	AT (%)	Q20 (%) *2	Q30 (%) *3
63L1	4,239,219,874	41,972,474	52.169	47.83	98.220	94.775
63L2	4,681,564,524	46,352,124	52.403	47.6	98.342	95.077
63L3	4,070,470,690	40,301,690	52.910	47.09	98.391	95.190
63S1	5,717,461,126	56,608,526	52.710	47.29	98.268	94.912
63S2	4,067,365,142	40,270,942	52.667	47.33	98.289	94.996
63S3	4,212,296,506	41,705,906	52.925	47.08	98.237	94.858
77L1	4,701,669,584	46,551,184	52.296	47.7	98.218	94.782
77L2	4,426,511,244	43,826,844	52.281	47.72	98.336	95.041
77L3	4,367,265,048	43,240,248	52.487	47.51	98.318	95.024
77L4	4,099,881,284	40,592,884	52.713	47.29	98.206	94.803
77S1	4,803,701,400	47,561,400	52.260	47.74	98.169	94.680
77S2	4,604,223,774	45,586,374	52.724	47.28	98.338	95.076
77S3	4,340,854,558	42,978,758	52.617	47.38	98.262	94.857
77S4	4,225,204,710	41,833,710	52.726	47.27	98.079	94.453
98L1	4,834,529,428	47,866,628	52.249	47.75	98.268	94.887
98L2	5,350,648,114	52,976,714	52.048	47.95	98.204	94.711
98L3	5,325,731,010	52,730,010	51.914	48.09	98.211	94.671
98S1	6,099,328,592	60,389,392	52.269	47.73	98.196	94.712
98S2	4,718,090,972	46,713,772	52.253	47.75	98.062	94.425
98S3	4,672,899,532	46,266,332	52.468	47.53	98.114	94.531

*1 Sample ID is defined by fetus age, large or small and serial number.

*2 Q20 (%) and *3 Q30 (%) denote ratio of bases that have phred quality score of over 20 and 30, respectively.

立している可能性が考えられる。また、発現変動遺伝子に関するエンリッチメント解析を行ったところ、66および77日齢において有意水準 $Q < 0.05$ を満たす遺伝子セットは見いだせなかったが、98日齢においては3変動遺伝子により構成される4種類の遺伝子セットが同定された ($Q < 0.05$)。

本研究により、豚胎児の成長過程において、大小差を生じさせる要因となりうる代謝物ならびに遺伝子の候補を特定することができた。しかしながら、エンリッチメント解析では、代謝物セットおよび遺伝子セットのいずれも、63日齢ならびに77日齢で有意なものが認められなかった。その原因は、いずれの時点においても、胎児の大小差間で差違が同定された代謝物および遺伝子の数が少なかったためと考えられる。今後は、胎児期の後期である98日齢に焦点を絞り、サンプル数を増大させた解析を実施することにより、本研究で見いだした候補代謝物および候補遺伝子が関わる代謝経路の解明に向けた取り組みを継続し、将来的には母豚の栄養制御による胎児の成長に寄与する代謝物の供給の可能性、ならびに、原因候補となる遺伝子の機能解析、遺伝的変異の探索等、育種改良への適用を検討する。

4. 要 約

豚の生産性は育種により多産系統が作出されるようになった一方、未熟なため出生あるいは離乳

に達しない産子の増加が問題となっている。本研究では豚胎児期の中期から後期にかけて、大小差の原因となりうる代謝経路を検討すべく、栄養代謝の要と考えられる肝臓組織の代謝物および遺伝子発現に関して、GCMSメタボロームおよびRNA-seqにより、それぞれ検討した。これらにより、胎児の大小差に関わる代謝経路は見いだせなかったものの、関連しうる候補代謝物ならびに候補遺伝子を特定した。

文 献

- 1) Kojima, M., Nakajima, I., Arakawa, A., Mikawa, S., Matsumoto, T., Uenishi, H., Nakamura, Y., Taniguchi, M. : Differences in gene expression profiles for subcutaneous adipose, liver, and skeletal muscle tissues between Meishan and Landrace pigs with different backfat thicknesses, *PLoS ONE*, 13(9), e0204135. 2018.
- 2) Chong, J., Wishart, D. S., Xia, J. : Using MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis, *Current Protocols in Bioinformatics*, 68, e86, 2019.
- 3) Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C., Salzberg, S. L. : Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype, *Nat Biotechnol*, 37, 907~915, 2019.
- 4) Pertea, M., Kim, D., Pertea, G. M., Leek, J. T., Salzberg, S. L. : Transcript-level expression analysis of RNA-seq experiments with HISAT, StringTie and Ballgown, *Nat Protocols*, 11, 1650~1667, 2016.
- 5) Su, W., Sun, J., Shimizu, K., Kadota, K. : TCC-GUI : a Shiny-based application for differential expression analysis of RNA-Seq count data, *BMC Research Notes*, 12, 133, 2019.

黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の 客観的評価手法の開発

Research for objective evaluation of forerib conformation of Japanese Beef
Cattle

鈴木 洋 美

(北海道立総合研究機構畜産試験場)

Hiromi Suzuki

(Hokkaido Research Organization, Agricultural Research Department Animal Research Center)

In Japanese beef cattle, the between the backward part of scapula and forward part of rib called “forerib” is observed for estimation of combining form of rib and backbone. However, the method of evaluation of forerib is a visual judgment only and we have no objective measurement method. Therefore, in this study, we verified the validity of the angle of depression at that point of the cow body (forerib angle) as an objective value for the evaluation of forerib. In the 1st study, we measured the forerib angle using the digital level in 66 Japanese black cattle judged body size and shape, and compared forerib angle with the judged results. As a result, there are correlations between forerib angle and body condition score (BCS), and this indicates that forerib angle reflects fatty of cow body. In the 2nd study, we surveyed the variation factor of forerib angle through measurement of forerib angle and body measurement in 1,279 Japanese black calves at the calf market and estimation of genetic parameters. Heritability of forerib angle with the standard error was 0.32 ± 0.10 , and this indicates that forerib angle is a trait that can be improved genetically. In the 3rd study, we examined forerib angle measurement at an early period in calf through forerib angle measurement 6 times from 0 to 12 months after birth in 24 calves born at our farm in 2020. The highest correlation of forerib angle was calculated between 5 mo and 12 mo. This result suggests we can predict forerib angle at 12 mo through one at 5 mo. Therefore, the forerib angle should be examined moreover as an objective value for the evaluation of forerib. The selection using measurements of chest width will lead to improvement of body shape (including forerib angle) of Japanese beef cattle.

1. 目 的

黒毛和種では、個体の能力評価や選抜指標の一つとして体型の評価が古くから行われている。黒毛和種雌牛の登録審査において、資格を持つ登録審査員が体測値と牛体の目視評価をもって、体型

に対して採点する（審査成績）。この評価を通して発育、産肉、繁殖能力を推定する。既往の報告では、審査成績による選抜改良が有効であり^{1,2)}、体測値と枝肉重量および歩留まりなどの枝肉成績との間で高い正の遺伝相関がある³⁾。また、登録審査得点と繁殖性との間での相関性も報告されて

いる⁴⁾。

登録審査における体型の評価項目のうち、産肉能力の評価項目の一つに「中軀(ちゅうく)」がある。登録審査員は胸深や胸幅、体長の体測値とともに特定の部位を目視評価し、体の体積を推定する。大きな体積は産肉性が良いとされる⁵⁾。

中軀の目視評価部位のうち、肩甲骨後方部分と肋骨前方部分の部位は「肋付き」と呼ばれ、肋骨と背骨の付着の形状を推定するために観察される。肋骨がより開いた形で背骨と結合していると、体積や内臓容積が大きいと想定されるためである⁵⁾。肋付きの改良により、肉牛としての能力の改良が期待されることから、肋付きの評価はきわめて重要である。しかしながら、同部位の評価手法は目視のみであり、客観的な測定手法が確立されていない。そのため、肋付きの改良について調査研究報告はない。

そこで本研究では、肋付きの客観的な評価手法の開発を目的として、肋付きの観察部位の角度を測定し(肋付き角度)、それが肋付きの改良に向けて有効な客観的の数値となるかを検討検証した。

2. 方 法

2.1 肋付き角度と審査成績との相関分析

小型デジタル水準計を用いて、牛体の肩甲骨後方部分と肋骨前方部分の水平線からの角度(Fig. 1)を測定し、肋付き角度とした。調査牛は、北海道内で黒毛和種繁殖雌牛の登録審査を受けた基本・本原登録受審牛(36頭)、および高等登録受審牛(30頭)とした。肋付き角度と、登録審査時に登録審査員が測定した体測値および牛体各部位の外貌の目視評価との関係について、相関分析を行った。計算は統計解析ソフトR version 4.0.2⁶⁾およびRStudio version 1.3.1056(RStudio社)を

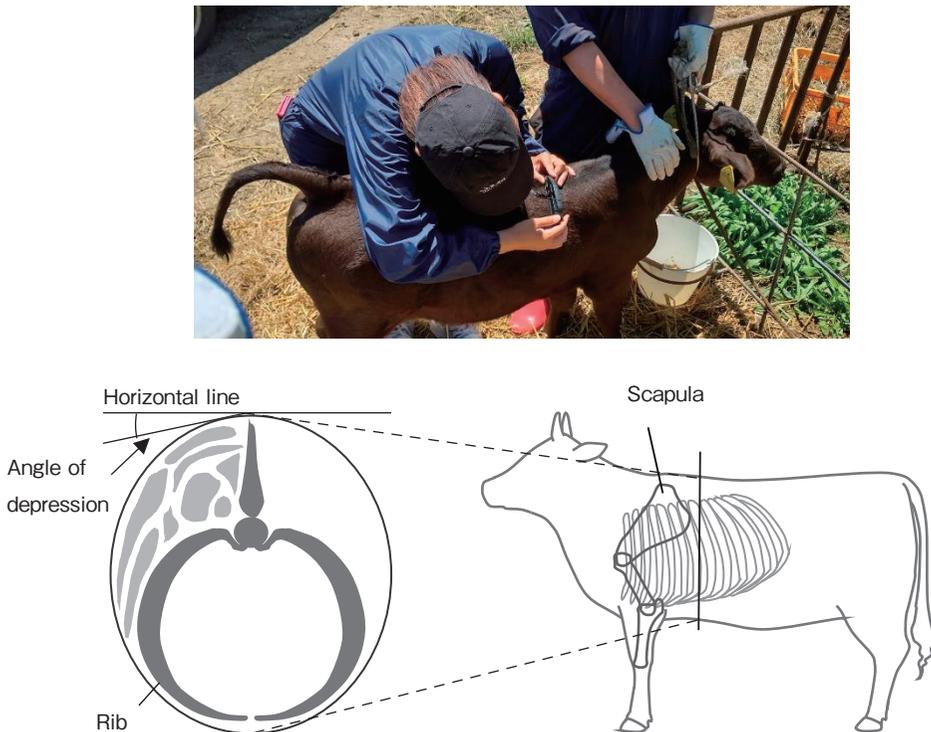


Fig. 1 Measurement of forerib angle (photograph) and the scaled point of forerib angle at cattle body. That point is angle of depression from horizontal line at back (indicated by arrow).

用いて行った。

2.2 肋付き角度における遺伝的パラメータの推定

2019年9月から2021年11月にホクレン十勝地区家畜市場および南北海道家畜市場に出荷された黒毛和種子牛1,279頭（去勢：724頭，めす：554頭）の肋付き角度を測定した。また，体高，十字部高，胸幅，胸囲，および腹囲についても測定を行った。遺伝的パラメータは，PEST version 4.2.3およびVCE-6 version 6.0.2を用いて単形質および2形質アニマルモデルによるREML法により推定した。対象形質は，体重，体高，十字部高，胸幅，胸囲，腹囲，体重体高比および肋付き角度の8形質とした。変量効果として，個体の直接遺伝効果，農家（92水準）および残差を取り上げ，母数効果として，性（2水準），出生年月（17水準），個体の日齢（1次回帰）を取り上げた。血縁遡及個体数は3,163頭（3代祖まで）であった。

2.3 牛の成長過程における肋付き角度の変動

北海道立総合研究機構畜産試験場で2020年に生産された黒毛和種雌子牛24頭を用いて，出生時から1，3，5，9，12ヶ月齢の肋付き角度を測定した。月齢ごとに肋付き角度の相関分析を行い，12ヶ月齢の肋付き角度と高い相関係数を持つ月齢を調べた。

3. 結果と考察

3.1 肋付き角度と審査成績との相関分析

基本・本原登録受審牛の肋付き角度は $25.4 \pm 7.1^\circ$ となり，最大値は 40.6° ，最小値は 10.3° であった。高等登録受審牛では $21.7 \pm 8.4^\circ$ となり，最大値は 39.5° ，最小値は 1.8° であった。いずれも，頻度分布はおおむね正規分布を描いた。このことから肋付き角度は，さまざまな統計的分析が可能な数値であると考えられた。

Table 1 に肋付き角度と体測値および目視評価成績を含む審査成績との相関係数を示した。有意な相関性は認められなかったものの，角度が小さい，すなわち水平に近いと審査成績が向上する傾向が認められた。また，肋付き角度と栄養度との間で最も高い負の相関関係が認められ，胸囲および胸幅との間でもわずかに負の相関関係が認められた。一方で，基本・本原登録受審牛において肋付き角度と体高との間では正の相関が認められたが，高等登録受審牛においては認められなかった。

Table 1 から，肋付き角度は小さいほど良い評価につながると考えられた。したがって，後述のさまざまな相関分析において，肋付き角度との間で負の相関関係にあるものは好ましい関係にあるとした。肋付き角度は栄養度と胸囲および胸幅と連動して減少すると考えられた。栄養度や胸幅，

Table 1 Correlations between forerib angle ($^\circ$) and records of judged body shape.

	withers height	hip height	body length	chest girth	chest depth	chest width	croup length	hip width	thurl width	pin bone width	bsc
standard registry	*0.34	-	-	*-0.40	-0.03	-	-0.01	-	-0.05	-	***-0.55
excellent grade registry	-0.06	-0.07	-0.15	*-0.41	0.14	*-0.40	0.01	-0.29	-0.19	0.00	** -0.56
	body capacity	fore quarter	middle quarter	hind quarter	proportion	feet,hoof	impressiveness	face	quality	dairy	final score
standard registry	-0.26	-0.26	-0.23	-0.01	-0.19	0.02	-0.04	0.15	-0.06	-0.04	-0.16
excellent grade registry	-0.01	-0.01	-0.15	-0.06	-0.10	-0.09	0.02	-0.29	-0.22	-0.08	-0.11

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$

胸囲の充実は良好な産肉性や飼料利用性が推定され、審査成績において牛体の体積や前駆および中駆の評価につながる⁵⁾。一方で、体高の増加に伴い肋付き角度も増加し、評価が低下すると考えられた。過大な体高は正常な発育と見なされず、審査得点の採点においては減点の対象となる⁵⁾。そして、これらの結果は肋付き角度と、審査成績における体積や前駆、中駆との間で認められたわずかな負の傾向を支持すると考えられた (Table 1)。審査成績と肋付き角度との間での有意な関係性を明らかにするためには、調査頭数を増やすことでより精度の高い検証を行う必要がある。

3.2 肋付き角度における遺伝的パラメータの推定

十勝および北海道肉用素牛市場における肋付き角度は $21.0 \pm 7.7^\circ$ となり、最大値は 43.9° 、最小値は 1.2° であった。頻度分布は正規分布を描いた。

Table 2 に各形質の遺伝率および農家分散割合を標準誤差とともに示した。肋付き角度の遺伝率は 0.32 ± 0.10 を示した。体高は比較的高い遺伝率を示した一方で、体重や胸囲などは中程度の遺伝率を示し、これらは既往の報告と同様な結果であった⁷⁾。Table 3 に肋付き角度と各形質との間における遺伝相関と農家効果間の相関および表型相関を示した。肋付き角度と体高との間で、最も高い正の遺伝相関が認められた。一方で農家効果間の相関は、肋付き角度と体重や胸幅、胸囲との間で比較的大きい負の値を示した。また、肋付き角度と胸幅との間では、遺伝相関および農家効果間の相関いずれにおいても同程度の値となった。

Table 2 から、肋付き角度は遺伝的な改良が可能な形質であると考えられた。また、Table 3 から、体高の改良が進むと肋付き角度は悪化することが懸念された。一方で、飼養管理において体重や胸

Table 2 Heritability and ratio of farm variance of each traits.¹

traits	heritability	ratio of farm variance	ratio of residual variance
forerib angle	0.32 ± 0.10	0.23 ± 0.04	0.45 ± 0.09
body weight	0.42 ± 0.13	0.22 ± 0.04	0.63 ± 0.12
withers height	0.54 ± 0.14	0.12 ± 0.04	0.34 ± 0.14
hip height	0.52 ± 0.17	0.14 ± 0.04	0.34 ± 0.15
chest width	0.21 ± 0.08	0.27 ± 0.06	0.53 ± 0.09
chest girth	0.18 ± 0.08	0.31 ± 0.05	0.51 ± 0.08
stomach girth	0.56 ± 0.15	0.15 ± 0.04	0.29 ± 0.14
weight/height ratio	0.36 ± 0.11	0.26 ± 0.05	0.38 ± 0.11

¹ estimation value \pm standard error

Table 3 Genetic, environmental and phenotypic correlations between forerib angle and each traits.¹

traits	genetic correlation	environmental correlation	phenotypic correlation
body weight	0.17 ± 0.23	-0.93 ± 0.45	-0.37
withers height	0.91 ± 0.11	-0.31 ± 0.20	0.17
hip height	0.80 ± 0.18	-0.36 ± 0.19	0.11
chest width	-0.65 ± 0.15	-0.79 ± 0.09	-0.51
chest girth	0.07 ± 0.31	-0.96 ± 0.39	-0.47
stomach girth	0.18 ± 0.23	-0.74 ± 0.10	-0.28
weight/height ratio	-0.04 ± 0.24	-0.95 ± 0.03	-0.49

¹ estimation value \pm standard error

幅、胸囲の改善に取り組むことで肋付き角度も改善できると考えられた。

3.3 牛の成長過程における肋付き角度の変動

Fig. 2 に0ヶ月齢から12ヶ月齢までの肋付き角度の推移を示した。5ヶ月齢の肋付き角度は $34.1^\circ \pm 5.6^\circ$ となり、他の全月齢と有意差が認められた。肋付き角度の推移は、出生時から5ヶ月齢をピークに増加し、以降は減少した。12ヶ月齢における肋付き角度と他の月齢での肋付き角度との相関では、5ヶ月齢との間で最も高くなった(0.64 $p < 0.001$)。したがって、5ヶ月齢の時点で肋付き角度の評価は可能と考えられた。

黒毛和種の体型評価において、目視評価の手法に焦点を当てた研究はほとんどなく、本研究では初の試みとして角度によるアプローチを行った。その結果、肋付き角度は遺伝の影響を受ける形質であり、遺伝的な改良効果があることが明らかとなった。一方で、肋付き角度は審査成績における体積、前駆、中駆との間でわずかに負の関係の傾向があるものの、栄養度との間で有意な相関性を持つことが明らかとなった。これは、肋付き角度には「肋付き」だけでなく、牛の太り具合も反映

されていることを意味する。したがって、肋付き角度を生産現場で活用するには、調査頭数を増やすほか、栄養度の差が少ない牛群において調査するなど、さらなる検討が必要である。

胸幅の改良が肋付き角度の改良につながることを示唆された (Table 3)。胸幅と体高、または十字部高との間では負の遺伝相関を示した (それぞれ -0.26 ± 0.24 , -0.14 ± 0.29) もの比較的小さい。一方で、胸幅と胸囲や体重との間では正の遺伝相関を示した (それぞれ 0.63 ± 0.17 , 0.57 ± 0.16)。したがって、遺伝および飼養管理のいずれの面においても、胸幅の改良を進めることで、他の形質に悪影響を及ぼすことなく、肋付き角度も同時にゆるやかに改良を進めることができると考えられる。

肋付き角度が栄養度との間で明確な相関性が認められたことから、肋付き角度が産肉性の評価につながる可能性が示唆された。デジタル水準計での測定部位は第6-7肋骨周囲に相当し、これは枝肉格付けの際の評価対象となる部位でもある。体型測定値と枝肉成績の分析は向井らの報告があり、体測値と枝肉重量や歩留まりなどとの遺伝相

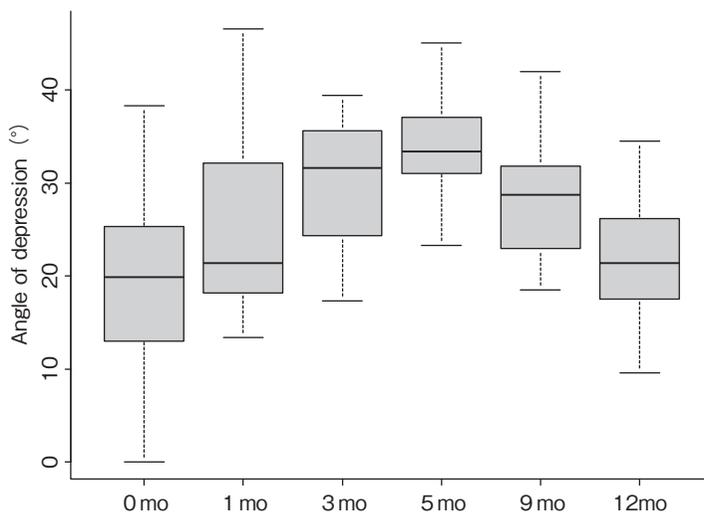


Fig. 2 Changes of forerib angle during growing period. Forerib angle was measured from 0 month after birth (mo) to 12 mo.

関は比較的高く、体型による選抜の改良効果は大きいとしている³⁾。しかし、ロース芯面積と関連性のある体測値は少ない³⁾。肋付き角度は5ヶ月齢で評価可能であり、ロース芯面積改良のための選抜指標として有効である可能性がある。したがって今後、枝肉成績と肋付き角度の関連性の調査が望まれる。

4. 要 約

黒毛和種では、肩甲骨後方部分と肋骨前方部分の部位は、「肋付き」と呼ばれ肋骨と背骨の付着の形状を推定するために観察されるが、同部位の評価手法は目視のみであり、客観的な測定手法が確立されていない。そこで本研究では、同部位の水平からの角度（肋付き角度）が評価に有効な客観的数値となるかを検証した。研究1では登録審査受審牛66頭（基本36頭、高等30頭）を対象に、デジタル水準計を用いて肋付き角度を測定し、肋付き角度と審査成績を比較した。その結果、肋付き角度と最も相関性が高いのは栄養度であった。研究2では、肉用素牛市場において黒毛和種子牛1,279頭（去勢：724頭、めす：554頭）の測定を行い、遺伝的パラメータを推定した。肋付き角度の遺伝率は 0.32 ± 0.10 を示し、遺伝的な改良が可能な形質であると考えられた。研究3では、黒毛和種雌子牛24頭に対して、経時的に肋付き角度の測定を行った。12ヶ月齢における肋付き角度との

相関は5ヶ月齢との間で最も高くなったことから、5ヶ月齢において肋付き角度の評価が可能と考えられた。以上の結果から、体型評価における「肋付き」の評価指標としては、肋付き角度はさらなる検討が必要であるが、胸幅を選抜指標とすることで肋付き角度も含めて、体型の改良につながると考えられた。

文 献

- 1) 佐々木義之, 祝前博明, 向井文雄, 並河澄: 日本畜産学会報, 47(6), 359~370, 1976.
- 2) 佐々木義之, 祝前博明, 向井文雄, 並河澄: 日本畜産学会報, 47(6), 371~377, 1976.
- 3) 向井文雄, 野村英明, 福島豊一: 神戸大学農学部研究報告, 15巻2号, 437~444, 1983.
- 4) 鹿島聖志, 森井泰子, 酒井稔史, 杉本昌仁, 藤川朗, 草刈直仁, 田村千秋, 田川広美: 「繁殖性を考慮した黒毛和種の交配計画法」平成23年度北海道農業試験会議(成績会議)資料, 8~11, (地独)北海道立総合研究機構畜産試験場, (社)北海道酪農畜産協会, 北海道, 2012.
- 5) 公益社団法人全国和牛登録協会, 一般社団法人全国肉用牛振興基金協会: 令和2年度和牛入門セミナー和牛の登録審査と見方, (3), 17~21, 公益社団法人全国和牛登録協会, 2020.
- 6) Douglas Bates, John Chambers, Peter Dalgaard, Robert Gentleman, Kurt Hornik, Ross Ihaka, Tomas Kalibera, Michael Lawrence, Friedrich Leisch, Uwe Ligges, Thomas Lumley, Martin Maechler, Martin Morgan, Paul Murrell, Martyn Plummer, Brian Ripley, Deepayan Sarkar, Duncan Temple Lang, Luke Tierney, Simon Urbanek: R Core Team (2020): <https://www.R-project.org/>.
- 7) 鹿島聖志, 米川武, 遠藤哲代, 佐藤幸信, 山本裕介, 藤川朗: 令和2年肉用牛研究会報, 第108号, 33, 2020.

遺伝子情報を用いた黒毛和種の枝肉形質と脂肪酸組成に及ぼす系統と遺伝様式の影響の解明

Investigation of sire lines and genetic transmission modes on carcass traits and a fatty acid trait in Japanese Black cattle using genomic information

広岡 博之・井上 慶一*・竹田 将悠規*・井上 喜信**

(京都大学大学院農学研究科, *家畜改良センター, **鳥取県畜産試験場)

Hiroyuki Hirooka, Keiichi Inoue*, Masayuki Takeda* and Yoshinobu Inoue**

(Kyoto University, *National Livestock Breeding Center, **Tottori Prefectural Livestock Research Center)

Historically, several divergent sub-populations with sire lines have played important roles as suppliers of breeding animals to the Japanese Black breed. In this study, the effects of three sire lines (Kedaka, Tajima and Fujiyoshi line) and genetic transmission modes on five carcass traits (carcass weight, rib eye area, rib thickness, subcutaneous fat thickness and beef marbling standards (BMS)) and a fatty acid trait (oleic acid) were investigated using conventional pedigree and genomic breeding values. The transmitted modes (genetic contributions of sire and dam) were quantitatively represented based on path coefficients (standardized regression coefficients) of sire and dam breeding values on progeny breeding values. Phenotypic and genomic information of 1,901 fattening progeny and genomic information of their parents were used to estimate both breeding values (pedigree breeding values from BLUP method and genomic breeding values from GBLUP method). There were significant differences among sire lines for carcass weight in both breeding values; Kedaka line had largest breeding values of carcass weight and Tajima line had smallest ones of carcass weight. For BMS, only significant difference was obtained for pedigree breeding values and Tajima line was highest. For the genetic transmission modes, there was no difference for all traits when genomic breeding values were used, but the larger genetic contribution of dam was obtained for BMS when pedigree breeding values were used. The genetic contributions of parents varied among sire lines in the same trait; for instance, with respect to rib eye area, larger genetic contribution of sire was in Kedaka line, larger genetic contribution of dam was in Fujiyoshi line and equal genetic contribution in Tajima line, when genomic breeding values were used. It was suggested that each sire line in the Japanese Black breed may have different type of non-Mendelian transmission modes and further research considering the difference of sire line would be needed to investigate complex genetic mechanisms of inheritance of the breed.

1. 目 的

わが国の黒毛和種には、明治時代に短期間に県別地域別に異なる外国種が交雑された過去があり、その結果、地域的な多様性が生じ、1944年に1つの品種と認定された後でも、同一品種内で系統が残されてきた。実際、現在でも家畜改良事業団では黒毛和種種雄牛が父系統別に主要5系統と希少2系統に分類され、全国各地の生産者に精液が供給されている。

他方、黒毛和種の国や道府県レベルでの育種改良では、20世紀後半からアニマルモデルBLUP法を用いた育種価評価システムが確立され、雌雄とも種牛の遺伝的改良が大いに進んできた。したがって、系統の考え方は前時代の遺物で不確かなものと認識され、現代の家畜育種学では学術的には受け入れがたいものと考えられてきた。しかしながら、生産者や流通業者の間では、系統を重視する風潮が現在でもあり、特に繁殖農家が自分の持つ雌牛への交配相手の種雄牛の選択や肥育農家の子牛市場での肥育素牛の購入の意思決定には、系統が重視される傾向が続いている。現代育種学の理論では、その前提としては、形質はメンデル遺伝様式に従って父と母の遺伝子は等しく1/2ずつ伝わりと仮定されている。しかし、もし黒毛和種の肉質に関連する遺伝子が特殊な遺伝様式で伝達されているのであれば、これまでの理論は不完全となる。実際、最近、申請者らのグループは黒毛和種のBMSナンバー（霜降り）やロース芯面積が、父と母の遺伝子の伝達割合が異なるゲノムインプリント遺伝子の関与を示唆する結果を得ている¹⁾。

近年、わが国の黒毛和種の遺伝子情報（SNP型情報、ゲノム情報）が蓄積され、ゲノム育種が実用化されつつある。このような遺伝子情報によって黒毛和種の種雄牛の系統と肉質などの産肉形質

との関連性を解明できるならば、黒毛和種の遺伝様式の解明と生産現場に対する貢献がきわめて大きいと期待できる。

そこで本研究の目的は、黒毛和種の枝肉5形質（枝肉重量、BMSナンバー、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚）と脂肪酸組成の表現型データと従来の血統情報および遺伝子型情報（父、母、本牛）を用いて、これらの形質の遺伝伝達様式を解明し、さらに系統とこれらの形質との関連性を遺伝子レベルで明らかにすることである。

2. 方 法

2.1 表現型データと血統情報の収集

本研究では、協同研究機関である鳥取県と家畜改良センターの枝肉形質（BMSナンバー、枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚）および鳥取県の脂肪酸組成（オレイン酸）の表現型値（観測値）のデータを測定、収集し、そのデータに関連する血統情報を整理して、以下のさまざまな分析に利用できるように加工・編集した。

鳥取県内および（独）家畜改良センターで肥育された黒毛和種肥育牛1,908頭について、（公社）日本食肉格付協会により格付された枝肉格付成績（枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さ、皮下脂肪厚、歩留基準値、BMS）を得た。また、これら肥育牛のうち、鳥取県内で肥育された個体1,000頭については、ガスクロマトグラフィー（島津製作所、GC-2014）を用い、Nogi *et al.*²⁾の報告に記載する手法によりオレイン酸割合を算出した。

血統情報については、これら肥育牛より5代祖さかのぼった血統情報8,312頭（肥育牛1,908頭含む）を血統育種価の予測に用いた。なお、オレイン酸については鳥取県で飼育された表現型値を持つ肥育牛のデータのみを分析に用いたため、データ数がかなり少なくなったため（肥育牛743頭）、枝肉形質とは別に分析して補足分析として最後に

示すことにした。

2.2 遺伝子情報の収集および処理

上記肥育牛とその両親から、脂肪、血液、または毛根のサンプルを採取し、DNA抽出処理後にSNP遺伝子型を判定した。SNP遺伝子型判定を行うチップは、Bovine GGP LD v4.0を用いた。SNP情報を用いてクオリティコントロール (QC) を実施し、個体自身のコールレートが95%未満の個体を除外した。判定されたSNPのうち、常染色体 (29本) に位置づけられているSNPについて、SNP自身のコールレートが95%以上、マイナーアレル頻度が1%より大きく、ハーディ・ワインベルク平衡が 10^{-4} より大きい条件を満たすSNPを抽出した。これらのQC後の個体について、651頭の肥育牛のリファレンス集団を用いてBeagle3で34,481SNPsにインピュテーションを行った。

2.3 血統育種価とゲノム育種価の予測

血統育種価とゲノム育種価を予測するために、上記血統情報とSNP情報をそれぞれ用いて単形質のアニマルモデルを想定して遺伝的パラメータを推定した。モデルに含めた母数効果は、肥育牛の性 (2水準)、格付年 (13水準)、格付月 (12水準)、出荷市場 (5水準) および格付月齢の1次および2次回帰とし、変数効果は個体および残差とした。なお、血統情報を用いた遺伝的パラメータの推定には、上記血統情報から作成した分子血縁行列を、SNP情報を用いた遺伝的パラメータの推定には、上記肥育牛のみのSNP情報からVanRaden³⁾の方法で作成したゲノム関係行列を用いて、AIREMLF90プログラム⁴⁾によりAI-REML法で推定した。

血統育種価は、上記分子血縁行列を用いてAI-REML法により推定した遺伝的パラメータを用いて、BLUPF90プログラム⁴⁾によりBLUP法で予測した。この結果、肥育牛とその両親を含む血縁個体すべての血統育種価を得た。

ゲノム育種価は、上記ゲノム関係行列を用いてAI-REML法により推定した遺伝的パラメータを用いて、BLUPF90プログラム⁴⁾によりGBLUP法で予測した。ただし、ゲノム育種価予測の際には、肥育牛の両親のゲノム育種価も得るため、肥育牛の両親 (1,743頭) のSNP情報を肥育牛のSNP情報に結合させて作成したゲノム関係行列を用いた。

2.4 系統の設定

わが国の黒毛和種の系統は兵庫県美方郡生まれの田尻を祖先とする田尻系、同じく美方郡生まれの茂金波を始祖とする茂金系、岡山県生まれの第6藤良を祖先とする藤良系、鳥取県生まれの気高を祖先とする気高系などがあるが、本研究では、系統は父系のみをさかのぼった始祖牛で決定した。田尻系と茂金系をまとめて但馬系とし、但馬系、藤良系、気高系の3系統の種雄牛とその後代について分析した。その結果、種雄牛数は233頭、後代肥育牛数は1,901頭となった。

2.5 育種価の分析

本研究では、得られた種雄牛の後代肥育牛について血統育種価とゲノム育種価に関して各枝肉形質間の相関を全体データと系統別に算出した。さらに、父と母の育種価が子に伝達する遺伝的影響の大きさを評価する指標として、Wright^{5,6)}が開発したパス係数 (標準偏回帰係数) を用いた。すなわち、この育種価 (EBV_o) に対する父の育種価 (EBV_s) と母の育種価 (EBV_d) の重回帰式 $EBV_o = b_o + b_s EBV_s + b_d EBV_d$ より、父と母のパス係数 (β_s と β_d) を

$$\beta_s = b_s \frac{\sigma_{EBV_s}}{\sigma_{EBV_o}}$$

$$\beta_d = b_d \frac{\sigma_{EBV_d}}{\sigma_{EBV_o}}$$

として推定した。ここで σ_{EBV_o} 、 σ_{EBV_s} 、 σ_{EBV_d} はそれぞれ後代牛、その父と母の育種価の標準偏差である。この父と母のパス係数を比較することで、

父と母から遺伝的影響度の大きさが評価できる。

3. 結果および考察

Table 1 は種雄牛と後代肥育牛の枝肉形質に関する系統別のゲノム育種価と血統育種価を示したものである。**Table 1** の上部に書かれた種雄牛の育種価については、ゲノム育種価については、枝肉重量に関しては気高系が最も大きく、但馬系が最も小さかった。また、バラの厚さは同じく気高系、藤良系、但馬系の順で小さくなり、皮下脂肪厚については藤良系が最も厚く、但馬系が最も薄かった。BMSナンバーについては有意差が認められなかったものの但馬系が最も高く、藤良系が最も低かった。

他方、血統育種価については、ゲノム育種価の場合とほぼ同じ結果が得られているが、BMSナンバーについては血統の違いによって有意性が認められ、肉質系である但馬系が最も高かった。このことから、血統情報から得られた従来の育種価とその育種価に対する系統の違いの影響は、ゲノム情報に基づく遺伝子レベルの分析では必ずしも一致するとは限らず、その理由については今後十

分な研究が必要と推察された。

後代肥育牛に関する父の系統別のゲノム育種価と血統育種価を見ると (**Table 1** の下部), ゲノム育種価については後代肥育牛の表現型値とSNP値に基づいて育種価が推定されているため、すべてゼロとなっていることがうかがえる。それに対して、血統情報に基づく育種価は血統をさかのぼった基礎集団の育種価がゼロと仮定されているので、現集団における血統育種価は正の値となっている。すべての形質についてゲノム育種価も血統育種価も父の系統の効果は有意で、すべての形質に関して父が気高系の個体がすぐれており、また枝肉重量、ロース芯面積、バラの厚さのような増体に関する形質は但馬系が最も劣っていた。BMSナンバーについては、後代肥育牛に関しては肉質系である但馬系よりも増体系の気高系が勝っていた。**Table 1** の種雄牛の育種価 (上部) と後代肥育牛の育種価 (下部) を比較すると、いずれの形質に関しても後代肥育牛の育種価のほう望ましい方向に高くなっており、これは前世代からの育種改良の効果と考えられるが、特にBMSナンバーについては気高系の改良が進んだ

Table 1 Means of genomic and pedigree breeding values for carcass traits

	No. animals	Genomic estimated breeding value					Pedigree estimated breeding value				
		Carcass weight (kg)	Rib eye area (cm ²)	Rib thickness (cm)	Subcutaneous fat thickness (cm)	BMS no.	Carcass weight (kg)	Rib eye area (cm ²)	Rib thickness (cm)	Subcutaneous fat thickness (cm)	BMS no
Sire											
All data	233	-8.396	-1.149	-0.105	0.004	-0.283	-0.716	2.112	0.151	0.043	1.259
Sire line											
Kedaka	72	18.267 ^a	-0.564	0.1690 ^a	0.085 ^a	-0.264	22.501 ^a	2.416	0.403 ^a	0.098 ^a	1.268 ^a
Tajima	109	-33.196 ^b	-1.263	-0.330 ^c	-0.116 ^b	-0.157	-22.708 ^b	2.331	-0.068 ^b	-0.060 ^b	1.414 ^{ab}
Fujiyoshi	54	6.888 ^a	-1.699	-0.009 ^b	0.141 ^a	-0.570	13.409 ^a	1.254	0.262 ^a	0.183 ^a	0.929 ^b
Progeny											
All data	1901	0.022	-0.007	0.000	0.000	0.002	6.134	3.338	0.240	0.036	1.587
Sire line											
Kedaka	779	9.097 ^a	0.856 ^a	0.120 ^a	-0.038 ^b	0.183 ^a	15.103 ^a	4.150 ^a	0.357 ^a	-0.010 ^b	1.753 ^a
Tajima	734	-10.639 ^c	-0.275 ^c	-0.130 ^c	-0.021 ^b	-0.065 ^b	-4.546 ^c	3.071 ^b	0.106 ^c	0.025 ^b	1.529 ^b
Fujiyoshi	388	1.971 ^b	-1.233 ^b	0.008 ^b	0.118 ^a	-0.235 ^b	8.454 ^b	2.164 ^c	0.262 ^b	0.151 ^a	1.370 ^b

Means with different letters differ significantly among sire lines ($p < 0.05$)

BMS no is beef marbling score which is represented by the 12-point scale with a minimum value of 1 and a maximum value of 12

ことがうかがえる。

広岡と青木⁷⁾は、本研究と異なる集団に関する枝肉成績のデータを用いて父の系統別に表現型値を比較したところ、枝肉重量については気高系が最も大きく、次いで藤良系となり、肉質系である田尻系（本研究では但馬系と定義）が最も小さく、他方、BMSナンバーについては田尻系が最も高いと報告している。この結果は、本研究における血統育種価の結果とよく一致していた。

Table 2 は種雄牛に関する形質ごとの育種価の相関を全体と系統別に示したものである。育種価間の相関は遺伝相関とは異なるものの、形質間の遺伝的能力の関係を示す指標として用いることが

できると考えられる。

全体のデータについては、ゲノム育種価と血統育種価の相関（対角下線）は0.845（ロース芯面積）から0.912（枝肉重量）の範囲にあった。この関係を系統別に見ると、両育種価間の相関は枝肉形質、バラ厚、皮下脂肪厚については藤良系が最も高く、BMSナンバーについては但馬系が最も高かった。各形質に関するゲノム育種価間の相関（上三角）を見ると、枝肉重量とバラ厚の相関は藤良系で相対的に低く、枝肉重量とBMSナンバーの相関は気高系と但馬系ではほぼゼロであったのに対して、藤良系では中程度（0.369）であった。また、BMSナンバーと皮下脂肪厚との相関は、

Table 2 Correlations of sire genomic and pedigree estimated breeding values for the same traits (on diagonal) and sire genomic estimated breeding values among carcass traits (above diagonal) and sire pedigree estimated breeding values among carcass traits (below diagonal)

	Carcass weight	Rib eye area	Rib thickness	Subcutaneous fat thickness	BMS no
All data					
Carcass weight (kg)	<u>0.912</u>	0.245	0.798	0.415	-0.005
Rib eye area (cm ²)	0.135	<u>0.845</u>	0.280	-0.131	0.608
Rib thickness (cm)	0.779	0.243	<u>0.877</u>	0.378	0.073
Subcutaneous fat thickness (cm)	0.422	-0.217	0.343	<u>0.898</u>	-0.031
BMS no	-0.054	0.623	0.075	-0.053	<u>0.893</u>
Kedaka line					
Carcass weight (kg)	<u>0.807</u>	0.292	0.696	0.248	0.035
Rib eye area (cm ²)	0.239	<u>0.863</u>	0.182	-0.297	0.690
Rib thickness (cm)	0.686	0.190	<u>0.813</u>	0.441	0.171
Subcutaneous fat thickness (cm)	0.346	-0.310	0.419	<u>0.897</u>	-0.256
BMS no	-0.009	0.762	0.124	-0.261	<u>0.866</u>
Tajima line					
Carcass weight (kg)	<u>0.856</u>	0.322	0.738	0.355	-0.049
Rib eye area (cm ²)	0.218	<u>0.831</u>	0.385	0.031	0.613
Rib thickness (cm)	0.725	0.408	<u>0.819</u>	0.197	-0.007
Subcutaneous fat thickness (cm)	0.373	-0.091	0.188	<u>0.849</u>	-0.104
BMS no	-0.089	0.591	0.122	-0.089	<u>0.901</u>
Fujiyoshi line					
Carcass weight (kg)	<u>0.876</u>	0.237	0.574	0.399	0.369
Rib eye area (cm ²)	0.151	<u>0.843</u>	0.401	-0.148	0.507
Rib thickness (cm)	0.468	0.298	<u>0.852</u>	0.253	0.389
Subcutaneous fat thickness (cm)	0.378	-0.214	0.221	<u>0.931</u>	0.477
BMS no	0.349	0.458	0.318	0.447	<u>0.902</u>

気高系では-0.256, 但馬系では-0.104, 藤良系では0.447と大きく異なり, 血統育種価(下三角)に関しても同様の傾向があった。また, ロース芯面積と皮下脂肪厚との相関も系統によって大きく異なっていた。このことから, 種雄牛の系統によって一方の形質の改良が他方の形質の改良に及ぼす影響に差があり, 選抜しようとする種雄牛の系統を考慮した育種が必要と考えられた。

表現型値を持つ肥育牛に対する父と母からの遺伝的伝達の寄与度の違いはパス係数(標準偏回帰係数)によって表すことを考え, その結果を示したものがTable 3である。一般的なメンデル遺伝を想定する場合, 父の育種価のパス係数と母の育種価のパス係数は等しくなると考えられ, 両者に差があれば, それが遺伝的伝達能力の寄与度の差と見なすことができる。全体のデータについては, ゲノム育種価を用いた場合, いずれの形質も父と母の育種価のパス係数間の差は小さく, メンデル遺伝と仮定して誤りではないと判断できた。ところが血統育種価に関しては, BMSナンバーについて母の育種価の標準偏回帰係数(0.681)は父からのもの(0.490)よりも0.1以上大きく, 母からの遺伝的伝達の寄与度が父よりも大きいのではないかと考えられた。最近, Okamotoら¹⁾

やInoueら⁸⁾は, 従来の血統情報と表現型値のみを用いる統計育種学的手法から, BMSナンバーに関しては母由来の遺伝子の効果が大きいことを示し, BMSナンバーについては母方ゲノムインプリント遺伝子の関与があるのではないかと考察した。本研究の結果でも血統育種価に関してはこれらの結果を裏付けるような結果が得られた。しかしながら, ゲノム情報を用いた分析ではそのような結果が得られず, 今後, ゲノム情報を用いてゲノムインプリント遺伝子の影響を証明する方法の確立が必要であると考えられた。

次に系統別に見ると, ゲノム育種価では気高系はロース芯面積で父方の遺伝的寄与度が大きい, その他の形質については父母間差は小さかった。しかし, 但馬系は枝肉重量とバラの厚さで母方の遺伝的寄与度が大きく, 藤良系では枝肉重量, ロース芯面積, バラ厚, BMSナンバーで母方の遺伝的寄与度が大きく, 皮下脂肪厚で父方の遺伝的寄与度が大きかった。このように特に藤良系の種雄牛で遺伝的伝達に父母間差があり, 今後, このような結果が得られた理由についての説明が必要と考えられた。同じく, 血統育種価に関しても形質によって系統間で遺伝的伝達に差異が認められた。

Table 3 Path coefficients (standardized regression coefficients) from sire or dam to progeny for carcass traits

	Carcass weight		Rib eye area		Rib thickness		Subcutaneous fat thickness		BMS no	
	Sire	Dam	Sire	Dam	Sire	Dam	Sire	Dam	Sire	Dam
Genomic estimated breeding value										
All data	0.567	0.549	0.571	0.532	0.607	0.565	0.616	0.529	0.546	0.568
Sire Line										
Kedaka	0.458	0.490	0.629	0.498	0.514	0.553	0.595	0.515	0.559	0.574
Tajima	0.437	0.628	0.521	0.559	0.509	0.607	0.587	0.564	0.538	0.550
Fujiyoshi	0.463	0.612	0.415	0.612	0.426	0.624	0.618	0.492	0.425	0.614
Pedifree estimated breeding value										
All data	0.674	0.645	0.598	0.618	0.616	0.650	0.644	0.633	0.490	0.681
Sire Line										
Kedaka	0.555	0.614	0.643	0.602	0.521	0.651	0.633	0.632	0.489	0.681
Tajima	0.471	0.727	0.551	0.627	0.523	0.691	0.611	0.646	0.489	0.635
Fujiyoshi	0.571	0.700	0.474	0.683	0.461	0.698	0.618	0.632	0.405	0.692

本研究では、これまででない以下の3つの視点から分析を行った。まず第1に、近年一般的に用いられているss-GBLUP法^{9,10)}ではなく、GBLUP法と従来のBLUP法を用いて、得られた推定育種価の比較を行った。ss-GBLUP法では、従来の血統情報による分子血縁行列（A行列）とゲノム情報からなるゲノム関係行列（G行列）の融合したH行列を用いて混合モデル方程式を構築しているが、A行列とG行列はそれぞれベースとしている集団が異なり、前者は血統をさかのぼって到達する始祖個体をベース集団としているのに対して、G行列では表現型値とゲノム情報を収集した現集団をベース集団としているため、これらの異なる行列を融合するために経験的な重みづけを設定せざるを得なくなっている。本研究では、血統情報とゲノム情報との相違による推定育種価の違いを調べるためにあえてss-GBLUP法ではなく、BLUP法とGBLUP法の両方を用いることにした。

第2の点は、これまで学術的にはほとんど検討されてこなかった黒毛和種の系統について科学的な視点からその影響を検討した。わが国では閉鎖育種を実施している兵庫県以外の道府県では、種雄牛の精液は広域で流通しており、黒毛和種における系統は、いわゆる他の品種における系統とは異なり、系統と言っても父方と母方が一つの系統で固まっているケースはまれである。しかしそれにもかかわらず、生産現場では種牛の交配は系統を重視して行われていることが多く、遺伝学的にはあいまいで、科学的根拠はないと考えられてきた。ところが、本研究のTable 1で示したように、たとえば増体系である気高系の種雄牛の推定育種価は枝肉重量やロース芯面積、バラの厚さが大きく、生産現場で言われていることとよく一致した。このような結果から、今後このような生産者の知恵から生み出された知見を最先端の手法で解明するような研究の必要と考えられた。

第3は、父と母から子へのパス係数を用いて、父母の遺伝的伝達能力の寄与度の違いを比較した点である。筆者らの知る限り、父と母、およびその後代のSNP情報がそろっているようなデータは家畜においてはほとんどなく、さらにパス係数で親から子への遺伝的伝達様式を表した研究は世界で初めての試みといえる。このような新規の手法を用いることで、これまでメンデル遺伝と決めつけていた家畜のさまざまな形質の遺伝伝達方式を再確認できる可能性を示せたことが、本研究の大きな貢献といえる。

4. 補足分析

本研究では、脂肪酸組成として現在、牛肉のおいしさに関連するものとして注目されているオレイン酸含量も分析対象形質とした。分析方法としては枝肉形質と同様で、得られた育種価のうち表現型値を持つ個体のみを選んだため、種雄牛頭数は52頭、後代肥育牛数は743頭となった。

Table A 1は、オレイン酸含量に関する種雄牛と表現型値を持つ肥育牛のゲノム育種価と血統育種価の平均値を示したものである。種雄牛のゲノム育種価については系統間差が認められ、気高系種雄牛のオレイン酸含量が最も高かった。また、後代肥育牛の育種価はいずれも父の系統が気高系であるものが最も高く、但馬系が最も低かった。このことから、オレイン酸含量に関しては肉質系である但馬系種雄牛の後代肥育牛が最も劣ることが示唆された。

オレイン酸含量に関する父と母のパス係数はTable A 2に示すとおりである。父と母の育種価のパス係数は全体のデータでは、母からの遺伝伝達の貢献度は大きく、さらに父の系統別に見ると父が気高系と藤良系の場合、母からの遺伝的伝達の寄与の大きいことが示された。一方、血統育種価については全体のデータの分析では、父と母の

Table A1 Means of genomic and pedigree breeding values for oleic acid

	No. animals	Genomic breeding value	Pedigree breeding value
Sire			
All data	52	-0.197	-0.174
Sire line			
Kedaka	20	0.251	0.353 ^a
Tajima	21	-0.437	-0.531 ^b
Fujiyoshi	11	-0.554	-0.449 ^{ab}
Progeny			
All data	743	-0.005	0.007
Sire line			
Kedaka	410	0.158 ^a	0.172 ^a
Tajima	203	-0.285 ^b	-0.294 ^b
Fujiyoshi	130	-0.081 ^{ab}	-0.066 ^b

Means with different letters differ significantly among sire lines ($p < 0.05$)

Table A2 Path coefficients (standardized regression coefficients) from sire or dam to progeny for oleic acid

	Sire	Dam
Genomic estimated breeding value		
All data	0.511	0.623
Sire Line		
Kedaka	0.346	0.643
Tajima	0.639	0.583
Fujiyoshi	0.341	0.666
Pedigree estimated breeding value		
All data	0.661	0.688
Sire Line		
Kedaka	0.460	0.752
Tajima	0.727	0.583
Fujiyoshi	0.471	0.738

パス係数はほぼ等しかった。しかし、父の系統別に見るとゲノム育種価の場合と同じく、父が気高系と藤良系では母からの遺伝伝達が強く、他方、父が但馬系では父からの遺伝伝達の強いことが示された。オレイン酸含量においてはこのように系統によって遺伝伝達の様式が大きく異なり、今後、オレイン酸の遺伝的分析には系統も考慮する必要性が示唆された。

5. 要 約

歴史的に、黒毛和種のいくつかのサブ集団(父系統)は種畜の供給源として重要な役割を果

たしてきた。本研究では、父系統と遺伝伝達様式の違いが5つの枝肉形質(枝肉重量, ロース芯面積, バラの厚さ, 皮下脂肪厚, BMSナンバー)と脂肪酸組成のうちのオレイン酸に及ぼす影響を、従来の血統育種価とゲノム情報に基づくゲノム育種価を用いて検討した。遺伝伝達様式は、後代の育種価に対する父と母の育種価のパス係数(標準偏回帰係数)に基づく遺伝的寄与度によって定量的に表した。1,901頭の肥育後代牛の表現型値とゲノムデータとその父と母のゲノム情報を用いてBLUP法から血統育種価を、GBLUP法からゲノム育種を推定した。どちらの育種価を用い

た時も枝肉重量において父の系統間に差があり、気高系が最も大きく、但馬系が最も小さかった。BMSに関しては、血統育種価を用いた時のみに有意な差が得られた。遺伝伝達様式については、ゲノム育種価を用いた場合、いずれの形質においても有意な差は認められなかったが、血統育種価を用いた時にはBMSで母の遺伝的寄与が父よりも大きかった。また、遺伝的寄与は同じ形質でも系統によって異なるケースがあり、たとえばゲノム育種価を用いた時のロース芯面積については、気高系では母の遺伝的寄与が大きく、藤良系では父の遺伝的寄与が大きく、但馬系ではほぼ等しい寄与であった。以上の結果から、黒毛和種の系統は異なるタイプの非メンデル型遺伝様式を有しており、この品種の複雑な遺伝伝達様式のメカニズムを調べるためには、父の系統の差異を考慮したさらなる研究が必要なが示唆された。

文 献

- 1) Okamoto, K., Oishi, K., Nakamura, R., Abe, A., Inoue, K., Kumagai, H., Hirooka, H. : Parent-of-origin effects on carcass traits in Japanese Black cattle, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **136**, 190~198, 2019.
- 2) Nogi, T., Honda, T., Mukai, F., Okagaki, T., Oyama, K. : Heritabilities and genetic correlations of fatty acid compositions in longissimus muscle lipid with carcass traits in Japanese Black cattle, *Journal of Animal Science*, **89**, 615~621, 2011.
- 3) VanRaden, P. M. : Efficient Methods to Compute Genomic Predictions, *Journal of Dairy Science*, **91**, 4414~4423, 2008.
- 4) Misztal, I., Tsuruta, S., Strabel, T., Auvray, B., Druet, T., Lee, D. : BLUPF90 and related programs (BGF90), *Proceedings of the 7th World Congress in Genetic Applied Livestock Production, Montpellier, France*. [CD-ROM] Comm. no.28.07, 2002.
- 5) Wright, S. : Correlation and causation, *Journal of Agricultural Research*, **20**, 557~585, 1921.
- 6) Wright, S. : Path coefficients and path regression : alternative or complementary concepts? *Biometrics*, **16**, 189~202, 1960.
- 7) 広岡博之, 青木義和 : 黒毛和種の枝肉形質の評価に関する系統の再検討, *肉用牛研究会報*, **103**, 32~37, 2017.
- 8) Inoue, K., Nishio, M., Shoji, N., Hirooka, H. : Effects of parent-of-origin models with different pedigree information on beef carcass traits and fatty acid composition in Japanese Black cattle, *Journal of Animal Breeding and Genetics*, **91**, 45~55, 2020.
- 9) Aguilar, H., Misztal, I., Johnson, D. L., Legarra, A., Tsuruta, S., Lawlor, T. J. : Hot topics : A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genetic information for genetic evaluation of Holstein final score, *Journal of Dairy Science*, **93**, 743~752, 2010.
- 10) Misztal, I., Lourenco, D., Legarra, A. : Current status of genomic evaluation, *Journal of Animal Science*, **98**, skaa101, 2020.

牛子宮内膜での単核球の出現が分娩後の 子宮修復に及ぼす影響

The effect of monocyte appearance in endometrium to uterine involution
in cattle

三 浦 亮太朗・田 島 剛

(日本獣医生命科学大学獣医学部)

Ryotaro Miura and Tsuyoshi Tajima

(Department of Veterinary Medicine, Nippon Veterinary and Life Science University)

In our previous study, we found that mononuclear cell (MNC) increased in endometrium after inflammation convergence of endometrium during uterine involution in lactating dairy cows. In the present study, we examined the cell type of MNC, relationship of the timing of MNC increase and uterine involution, and the timing of MNC increase and fatty acid [eicosapentaenoic acid (EPA) and arachidonic acid (AA)]. In Experiment 1, we used 15 lactating Holstein dairy cows. From 2 to 10 week (0 week = 1 ~ 7 day after parturition), we conducted cytobrush for taking samples of endometrial cells and uterine lavage for collecting intrauterine cells to detected CD4⁺T cell using fluorescence-activated cell sorting every week. MNC increase was confirmed 93.3% (14/15) of cows, and CD4⁺T cell was confirmed 93.3% (14/15) of cows. In addition, concordance rate of the timing of MNC increase and CD4⁺T cell detection was 63.3%. Experiment 2, we used 51 lactating Holstein dairy cows. From 2 to 10 week, we examined the timing of MNC increase decrease of polymorphonuclear cells (PMN), vaginal discharge disappearance, equal in diameter of left and right uterine horn, intrauterine fluid disappearance. Timing of MNC increase was 5.4 ± 0.3 week, decrease of PMN was 4.4 ± 0.3 week. vaginal discharge disappearance was 2.8 ± 0.3 week, equal in diameter of left and right uterine horn was 2.8 ± 0.3 week, intrauterine fluid disappearance was 3.0 ± 0.2 week. Experiment 3, we used 23 lactating Holstein dairy cows. From 2 to 10 week, we examined endometrial cells for detecting MNC increase. We collected blood for measuring of EPA and AA on 0 week. There were norelationship between timing of MNC increase and serum EPA and AA concentrations.

From the present study, cell type of MNC which was increase during uterine involution was CD4⁺T cell, and the timing of MNC increase occurred at the end of uterine involution. Therefore, it was suggested that the MNC increase may have an effect to uterine involution.

1. 目 的

肉牛生産や酪農において、繁殖成績の低下は生

産効率を低下させ、経済性を圧迫する要因である。牛においては分娩後に生殖器が正常な状態にまで回復することで、次の繁殖に供することがで

きるため、生殖器の回復、特に子宮修復が早期に問題なく完了することは繁殖成績向上のためにきわめて重要なことである。近年、分娩後の子宮内膜の炎症の有無を評価するにあたり、ブラシ状の器具で子宮内膜の表層細胞を採取し、顕微鏡下で全細胞数に対する多形核白血球（PMN）の割合を算出し評価するサイトブラシという方法が注目されている。サイトブラシを用いて子宮内膜炎の診断を行い、その後の繁殖成績を評価した報告は多数存在する¹⁻³⁾。しかしながら、子宮内膜炎の診断を実施する時期や子宮内膜炎のPMN割合の診断基準は文献により大きく異なり、統一した診断基準が確立していない。この背景には、分娩後の子宮修復の過程における子宮内膜の細胞動態が十分に理解されていないことが考えられる。申請者は、分娩後の子宮内膜においてPMN割合が低下する週に単核球（MNC）割合が上昇すること、また、サイトブラシにより回収した子宮内膜組織に発現するmRNA解析からMNCがCD4⁺T細胞である可能性を示した。しかしながら、子宮内で出現するMNCの種類、MNC増加のパターンと古典的な子宮修復の完了の指標との関係については十分に明らかにされていない。また、不飽和脂肪酸には炎症を抑制するもの（ ω -3脂肪酸）および促進するもの（ ω -6脂肪酸）が存在し、MNCがTリンパ球である可能性が示唆されていることから、MNCの増加時期に分娩後の不飽和脂肪酸の組成が影響を与えている可能性がある。そこで本研究の目的は、『分娩後の子宮内膜に存在するMNCは子宮修復に関与している』という仮説を基に、MNCの種類の特定（試験①）、子宮修復とMNC増加時との関連（試験②）、そしてMNC増加時期と分娩直後の血中脂肪酸組成との関連（試験③）、について調査を行い、分娩後の子宮修復における子宮内膜でのMNCの役割を解明することである。

2. 方 法

2.1 試験① 子宮内に出現するMNCの種類の特定

供試牛：

日本獣医生命科学大学付属牧場（富士アニマルファーム）にて飼養されていた泌乳乳牛（ホルスタイン種：15頭）を用いた。

試験方法：

- 1) 富士アニマルファームに週1回訪問し、前回訪問日から訪問日にかけて分娩した牛を対象とし、分娩2～10週にかけて調査を行った（分娩後1～7日：0週）。
- 2) 子宮内膜に出現するPMNおよびMNCの動態を評価するために、サイトブラシ（メトリブラシ、富士平工業株式会社、東京）により子宮内膜スメアを採取し、スライドグラスに塗布した。その後、定法に従いメイグリュンワルド・ギムザ染色を行い、顕微鏡下にてスライドグラスを鏡検し、子宮内膜上皮細胞、PMNおよびMNCの数を300個計測し、PMN比およびMNC比を算出した。MNCが>5.0%となった週をMNCが増加した週とした。
- 3) 子宮内に出現しているMNCの評価を行うために、子宮内にバルーンカテーテルを挿入し、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）20mlを注入後、子宮内腔を還流した。回収したPBSはその後、遠心分離により細胞を回収し、CD4⁺およびCD8⁺抗体を反応させた。蛍光活性化セルソーティング（FACS）を実施し、CD4⁺Tリンパ球、CD8⁺Tリンパ球の存在を評価した。

2.2 試験② 子宮修復とMNC増加時との関連

供試牛：

日本獣医生命科学大学付属牧場（富士アニマルファーム）にて飼養されていた泌乳乳牛（ホルスタイン種：51頭）を用いた。

試験方法：

- 1) 富士アニマルファームに週1回訪問し、前回訪問日から訪問日にかけて分娩した牛を対象とし、分娩2～10週にかけて調査を行った（分娩後1～7日：0週）。
- 2) 試験1と同様の方法でサイトブラシを用いて、PMNおよびMNC比を算出した。PMN比が $>5.0\%$ である場合を“子宮内膜に炎症あり”とし、炎症が収束した時期を評価した。試験1よりMNCが $>5.0\%$ となった時期をリンパ球の上昇時期とした。
- 3) 超音波画像診断装置（My Lab Alpha Vet, Esaote, Genova, Italy）を用いて、左右子宮角基部の直径を計測し、左右直径が一致した時期を評価した。さらに、子宮内の貯留物（直径 $>3.0\text{mm}$ ）の消失した時期を評価した。
- 4) 腔鏡検査により腔内の膿性排出物の有無を評価した。膿性排出物が確認されなくなった時期を評価した。

2.3 試験③ MNC増加時期と分娩直後の血中EPAおよびAA濃度との関係

供試牛：

日本獣医生命科学大学附属牧場（富士アニマルファーム）にて飼養されていた泌乳乳牛（ホルスタイン種：23頭）を用いた。

- 1) 富士アニマルファームに週1回訪問し、前回訪問日から訪問日にかけて分娩した牛を対象とし、分娩2～10週にかけて調査を行った（分娩後1～7日：0週）。
- 2) 分娩0週に尾静脈より採血（血漿；プレーン管：株式会社テルモ、東京）を行い、エイコサペンタエン酸（EPA）およびアラキドン酸（AA）の測定を行った。
- 3) 試験2と同様の方法で、サイトブラシを用いてPMNおよびMNC比を算出した。PMN比が $>5.0\%$ である場合を“子宮内膜に炎症あり”

とし、炎症が収束した時期を評価した。試験1よりMNCが $>5.0\%$ となった時期をリンパ球の上昇時期とした。

- 4) EPAおよびAAとMNC増加時期との相関関係を評価した。

2.4 統計解析

試験③におけるEPAおよびAAとMNC増加週との相関にはSpearmanの順位相関係数を用いた。危険率 5.0% 未満を有意差ありとした。すべてのデータは平均および標準誤差にて示した。

3. 結果と考察

3.1 試験① MNC種類の特定

試験期間中のMNC増加および CD4^+ Tリンパ球が検出された週をTable 1に示す。試験期間中にMNCの増加が確認された牛は15頭中14頭（ 93.3% ）であった。MNCが増加する時期は牛により大きく異なり、MNCが増加した週が1回の牛は11頭、2回の牛は2頭、3回の牛は1頭であった。子宮内還流液中に CD4^+ Tリンパ球が検出された牛は15頭中14頭（ 93.3% ）であった。 CD4^+ Tリンパ球が検出された時期は牛により大きく異なり、 CD4^+ Tリンパ球が増加した週が1回の牛は12頭、2回の牛は1頭、3回の牛は1頭であった（Table 1）。また、MNCが増加した週の子宮内腔を還流したPBS中に CD4^+ Tリンパ球が検出されたのは18回中12回（ 66.7% ）であり、 CD8^+ Tリンパ球は検出されなかった。

本試験より、およそ 90% の牛で子宮内においてMNCの増加および CD4^+ Tリンパ球の検出されることが示された。また、その増加および出現は牛により異なり、さらに期間を通して観察されるのではなく、短期間のみ限局して観察されることが明らかになった。また、MNC増加と CD4^+ Tリンパ球が検出される時期はおよそ 70% で一致することが示された。このことから、MNCは CD4^+ T

Table 1 The relationship of the timing of MNC increase and CD4⁺T cell during experiment.

Cow No.	End point	Week after postpartum								
		2	3	4	5	6	7	8	9	10
No.1	MNC	-	-	-	+	+	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	+	+	-	-	-	-
No.2	MNC	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	+	-	-	-	-
No.3	MNC	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	+	-	-	-	-	-	-	-
No.4	MNC	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	+	-	-	-
No.5	MNC	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	-	-	-	-
No.6	MNC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	+	+	+	-	-	-
No.7	MNC	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	-	+	-	-
No.8	MNC	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	-	-	-	+
No.9	MNC	-	+	+	-	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	-	+	-	-
No.10	MNC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	+	-	-	-	-
No.11	MNC	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	-	-	-	-	+
No.12	MNC	-	+	+	+	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	+	-	-	-	-	-	-
No.13	MNC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	+	-	-	-	-
No.14	MNC	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	-	+	-	-	-	-
No.15	MNC	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	CD4 ⁺ T cell	-	-	-	+	-	-	-	-	-

(-) : Non MNC increase or CD4⁺T cell negative

(+) : MNC increase or CD4⁺T cell positive

リンパ球である可能で高いことが推測された。

3.2 試験② 子宮修復とMNC増加時との関連
本試験では、子宮修復の指標として使用される、腔からの膿性排出物の有無⁴⁾、左右子宮角の平均直径の一致⁵⁾、子宮内貯留物の消失時期⁶⁾およびサイトブラシによるPMN比の低下⁴⁾する週とMNC増加週との関連を評価した。MNCが増加する週は 5.4 ± 0.3 週であった。子宮内膜の炎症が収束する週は 4.4 ± 0.3 週であった。左右子宮直径

が一致する週は 3.0 ± 0.1 週であった。子宮内貯留物が消失する週は 3.0 ± 0.2 週であった。腔内から膿が消失する週は 2.8 ± 0.3 週であった。これらの結果から、MNCの増加は子宮修復の最終過程で観察される現象であることが示唆された。組織修復過程において、CD4⁺Tリンパ球のTh1, Th2およびTregが関与することが示されており⁷⁾、MNCの増加は子宮内膜修復におけるTリンパ球の出現と活性化を示している可能性が推測された。

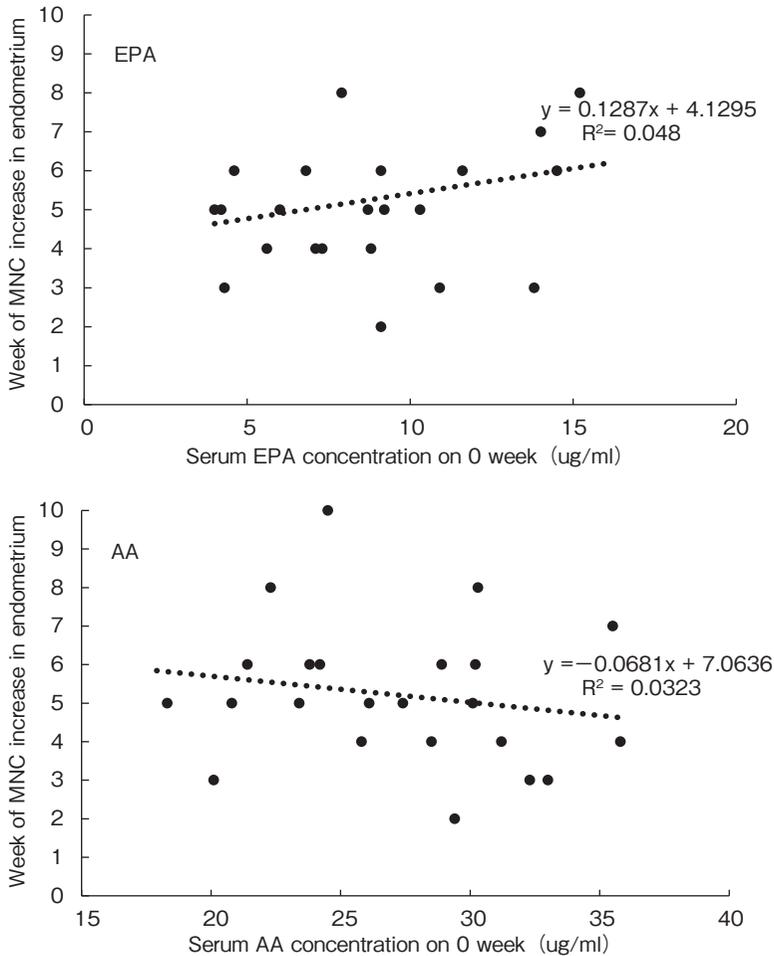


Fig. 1 Relationship between the serum eicosapentaenoic acid (EPA) or arachidonic acid (AA) concentration and week of MNC increase in endometrium.

3.3 試験③ MNC増加時期と分娩直後の血中EPAおよびAA濃度との関連

MNCが増加した週と血中EPAおよびAA濃度に有意な相関関係は認められなかった (Fig. 1)。EPAは ω -3脂肪酸の多価不飽和脂肪酸の1つであり、抗炎症作用、心血管保護作用および脳神経系保護作用を有することが示されている。一方、AAは ω -6脂肪酸の不飽和脂肪酸の1つであり、プロスタグランジンやロイコトリエンなどの脂質メディエーターが産生され、血管透過性の亢進や好中球の浸潤や活性化に中心的な役割を果たすこ

とが示されている。そのため、子宮内膜でのMNCの増加時期に分娩直後のEPAおよびAA濃度が関与する可能性を検討したが、関連は認められなかった。このことから、MNC増加時期と分娩直後の血中EPAおよびAA濃度は関連しないことが示唆された。

4. 要 約

本研究では、分娩後の子宮修復過程における子宮内膜で増加が確認されるMNCの種類の特異、古典的な子宮修復指標との関連および分娩直後の

血中脂肪酸濃度とMNC増加時期との関連を調査した。その結果、MNCはCD4⁺Tリンパ球である可能性が高く、子宮修復の最終段階で増加すること、またMNC増加時期と分娩後の血中EPAおよびAA濃度に関連は認められないことが示された。このことは、子宮修復においてCD4⁺Tリンパ球が重要な役割を果たしていることが示唆された。しかしながら、本調査では子宮修復過程におけるCD4⁺Tリンパ球が子宮内膜に出現するメカニズムや機能的役割について十分に明らかにできなかったことから、今後さらなる調査が必要と考えられる。

文 献

- 1) Kasimanickam, R., Duffield, T. F., Foster, R. A., Gartley, C. J., Leslie, K. E., Walton, J. S., Johnson, W. H. : *Theriogenology*, **62**, 9~23, 2004.
- 2) Barlund, C. S., Carruthers, T. D., Waldner, C. L., Palmer, C. W. : *Theriogenology*, **69**, 714~723, 2008.
- 3) Madoz, L. V., Giuliadori, M. J., Jaureguiberry, M., Plöntzke, J., Drillich, M., de la Sota, R. L. : *J Dairy Sci*, **96**, 4333~4339, 2013.
- 4) Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J. : *J Dairy Sci*, **93**, 5225~5233, 2010.
- 5) Sheldon, I. M., Noakes, D. E., Rycroft, A. N., Dobson, H. : *Theriogenology*, **59**, 1357~1371, 2003.
- 6) López-Helguera, I., López-Gatius, F., Garcia-Ispuerto, I., Herzog, K. : *Theriogenology*, **77**, 1334~1342, 2012.
- 7) 増田治史 : 血栓止血誌, **25**, 593~602, 2014.

黒毛和種における経膈採卵前のヒアルロン酸添加 ブタFSH製剤 1回筋肉内注射の効果に関する研究

Effect of intramuscular injection of porcine FSH in hyaluron acid prior to ovum pick-up in Japanese Black cattle

及川 俊徳¹・植田 郁恵¹・沼邊 孝²

(¹宮城県畜産試験場, ²みやぎ農業振興公社)

Toshinori Oikawa¹, Ikue Ueda¹ and Takashi Numabe²

(¹Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, ²Miyagi Agricultural Development Corporation)

The objective of this study was to compare the efficacy of superstimulation treatment with porcine FSH (pFSH) plus hyaluronic acid (HA) before the ovum pick-up (OPU) on in vitro production (IVP) in Japanese black cattle.

IVP after OPU was compared in untreated Japanese black cattle oocyte donors and those superstimulated with a single intramuscular (IM) injection of pFSH in HA, and pFSH only. The control group received no treatment, whereas the FSH group received 8AU of pFSH. The FSH+HA group received 8AU pFSH in 4mL of saline plus 4ml of a HA solution by a single IM injection. In Experiment I, 6 animals were prepared for each test group and the study was performed. There was no difference among groups in the number of follicles that were aspirated per OPU session. However, p-FSH-treated cows had a higher percentage of medium-sized follicles (6-10 mm) at the time of the OPU than control cows. The FSH+HA group had a higher oocyte collection rate (79.5 % vs. 66.5 %) and blastocyst rate (30.7 % vs. 18.2 %) than the control group. In the field demonstration experiment of Experiment II, the OPU and embryogenesis results were similar to those of the FSH+HA group in Experiment I. In conclusion administration of the hyaluronic acid preparation before OPU is expected to improve the oocyte collection efficiency in OPU and also improve the embryonic development results after in vitro fertilization.

1. 目 的

牛の体外受精技術は食肉処理場由来卵巣を利用することで急速に発展してきたが、近年、牛生体から超音波診断装置でモニターしながら卵子を採取する経膈採卵 (OPU)-体外胚生産 (IVP) 技術が畜産現場でも実施される機会が増えている。肉用牛では、繁殖雌牛の飼養頭数の減少に伴い生産

される子牛が減少し子牛価格の高騰が続いており、牛肉需要はやや回復し枝肉価格は上昇傾向にあるものの、肥育素牛価格の高騰が肥育農家の経営を大きく圧迫している。OPUはホルモン製剤を投与しなくても繰り返し実施することが可能であり、妊娠牛やホルモン剤に対する反応が低い牛にも応用できることから過剰排卵処理に代わる技術として期待されている。

OPUはホルモン製剤を投与せずに実施可能であるが、OPU前に外因性の豚卵胞刺激ホルモン(pFSH)製剤を投与すると卵胞が大きくなり作業がスムーズに行えること¹⁾、良好な胚発生成績が得られること²⁾がメリットとしてある。pFSH製剤の投与は過剰排卵処理で用いられている投与量で連続してOPUを実施した場合には牛生体への影響が考えられるが、我々の先行研究において比較的low容量で連続して実施可能であることを明らかにした。しかし、良質卵子の採取や採取卵子数の増加等の成績を得ることはできなかった³⁾。

ヒアルロン酸製剤は徐放性およびドラッグデリバリーシステムが備わっていることが知られている⁴⁾。Biancucciらは5%ヒアルロン酸溶液を溶媒に用いることで過剰排卵処置におけるゴナドトロピン投与量・頻度が少なくすむこと、受精卵数や譲渡・凍結可能胚が増加することを報告している⁵⁾。

そこで本研究では、OPU前にpFSH製剤とヒアルロン酸を混合し筋肉内投与することが卵巣反応および採取卵子の体外受精後の胚発生成績に及ぼす影響を検討することを目的とした。

2. 方法

2.1 実験I OPU前のヒアルロン酸添加pFSH製剤投与による採取卵子成績および体外受精成績の検討

我々の先行研究結果から、ホルモン製剤の投与はOPU実施48時間前とし、試験区としてpFSH製剤8AUを生理食塩水4mlで溶解し、ヒアルロン酸製剤(ハイオネート:ベーリンガーインゲルハイムアニマルヘルスジャパン株式会社)4mlを加え、筋肉内に投与するFSH+HA区を設定し、またpFSH製剤8アーマーユニット(AU)を生理食塩水4mlで溶解し筋肉内に投与するFSH区を設定した。対照区としてはpFSH製剤未投与区

を設定した。この3区を宮城県畜産試験場で飼養する黒毛和種繁殖雌牛6頭を用いて実施した。OPU実施前に卵胞数をサイズ別に計測した。採取した未成熟卵子は卵丘細胞の付着の程度で分類した(Aランク:卵丘細胞が4層以上付着, Bランク:卵丘細胞が2~3層付着, Cランク:卵丘細胞が1層付着, Dランク:卵丘細胞が部分的に付着, 変性(degenerated):卵細胞質が不均一で変性, 裸化(denuded):卵丘細胞がまったく付着していない, 膨化卵胞(expanded):卵丘細胞が膨化)。採取卵子のうち、A~Dランクの卵子を体外受精に供した。未成熟卵子の体外成熟培地は牛胎子血清(FBS), 上皮成長因子(Epidermal Growth Factor:EGF), 卵胞刺激ホルモン(FSH), ピルビン酸ナトリウムおよびゲンタマイシンを加えたMedium199を使用し、38.5℃, 5%CO₂, 95%空気です約22時間成熟培養を実施した。体外受精は当场繋養の黒毛和種雄牛1頭の凍結精液を使用し、媒精はカフェインおよびヘパリン添加mTALP液を使用し、38.5℃, 5%CO₂, 95%airです約6時間培養した。発生培地はBSA添加mSOF培地を使用し、38.5℃, 5%CO₂, 5%O₂, 90%N₂です体外受精後8日目まで培養を継続した。調査項目はOPU実施前の卵胞数, 採取卵子数, 培養卵子数および胚発生成績とした。

2.2 実験II 現場での実証試験

みやぎ農業振興公社白石牧場で飼養する黒毛和種繁殖牛をランダムに選定しOPU実施48時間前にpFSH製剤8Uを生理食塩水4mlで溶解し、ハイオネート4mlを加え筋肉内に投与しOPUを実施した。採取した未成熟卵子は当场に輸送し体外受精を実施し胚発生成績を検討した。採取した未成熟卵子の輸送については、昨年度検討した輸送ボックスを用いた。すなわち、採取した未成熟卵子は実験Iと同様の体外成熟培地とともにポリスチレン製チューブに入れ、アネロパックCO₂でガ

ス制御を行い、iP-TEC定温輸送ボックスで保温しながら輸送した。輸送後の成熟培養、体外受精および発生培養は実験Iと同様の方法で実施し、OPU実施前の卵胞数、採取卵子数、卵割および胚発生成績を調査した。

統計処理

胚発生成績の卵子数および胚発生数等は一元配置分散分析後にTurkey-Kramer法により多重検定を行った。パーセンテージのデータは χ^2 乗検定にて実施した。統計的な有意差判定に用いたp値は5%未満を有意差ありとした。

3. 結果と考察

実験I

OPU実施前の卵胞のサイズ別割合をFig. 1に示した。中卵胞率は、FSH+HA区およびFSH区が対照区と比較して有意に高い成績であった。小卵胞率は、対照区が他の2区と比較して有意に高い成績であった。我々の先行研究においてもpFSH

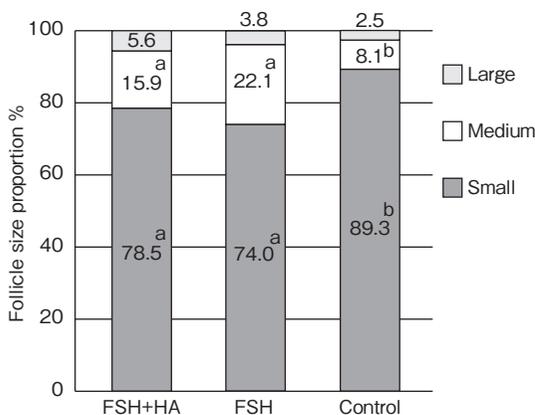


Fig. 1 Proportion of small (<6 mm), medium (6-10 mm), and large (>10 mm) follicles suitable for puncture immediately before ovum pick-up (OPU) in Japanese black cattle submitted to OPU without previous superstimulation treatment (control), after treatment with pFSH (FSH), or pFSH in hyaluronic acid (FSH+HA).

^{a-b} Columns with different superscripts are statistically significant ($p < 0.05$).

8AUを投与した場合に未投与の場合に比較して中卵胞率が高く、小卵胞率は未投与の場合が高い成績であったが¹⁾、本研究においても同様の成績であり、pFSH製剤を投与することで中卵胞の割合が高くなることが明らかになった。OPU時の採取卵子数については、FSH+HA区は卵胞数平均 32.5 ± 2.7 個に対して平均 25.8 ± 2.8 個が採取され、FSH区は卵胞数平均 39.2 ± 5.0 個に対して平均 28.3 ± 3.1 個採取され、対照区は卵胞数平均 32.8 ± 3.7 個に対して平均 21.8 ± 4.1 個が採取され、いずれの区間においても有意な差は認められなかった。卵子採取率はFSH+HA区が79.5%、FSH区が72.3%および対照区が66.5%であり、FSH+HA区は対照区よりも有意に高い成績であった (Fig. 2)。これは、OPU実施前の卵胞のサイズ別割合において中卵胞率が対照区と比較して高い成績であったことから、吸引しやすい卵胞が多く存在したためと考えられた。

採取卵子のランク別割合をFig. 3に示した。Cランクの割合においてFSH区は32.9%であり、FSH+HA区の20.0%と比較して有意に高い成績であった。A、Bランクといったより良質な卵子

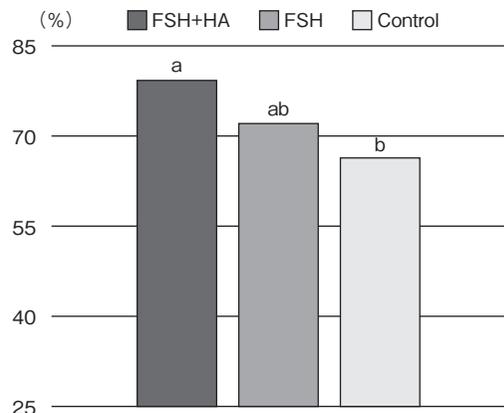


Fig. 2 Proportion of oocyte collection by ovum pick-up in Japanese black cattle

^{a-b} Columns with different superscripts are statistically significant ($p < 0.05$).

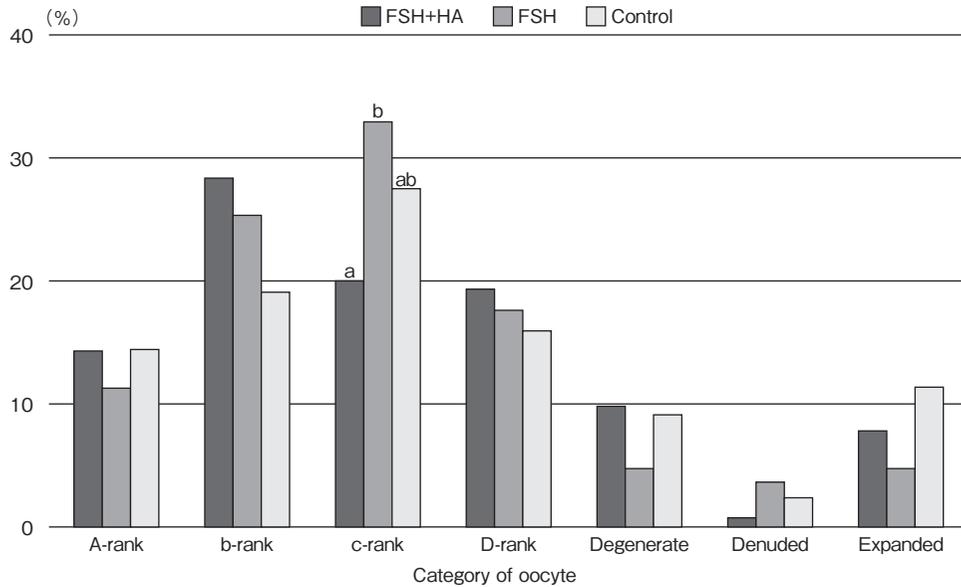


Fig. 3 Proportion of oocyte category recovered after ovum pick-up in Japanese black cattle
 Recovered oocytes were classified into four morphological categories based on the number and density of cumulus cell layers and the color and structure of the ooplasm.
^{a-b} Columns with different superscripts are statistically significant ($p < 0.05$).

の採取割合に有意な差は認められなかったものの、ヒアルロン酸製剤を添加したことで、pFSH製剤のみでの投与よりもより良質な卵子を採取できる可能性が考えられた。

体外受精に用いる培養卵子数はFSH+HA区は平均 21.2 ± 1.7 個、FSH区は平均 24.7 ± 3.0 個および対照区は平均 16.8 ± 3.3 個と有意な差は認められなかったが、培養卵子割合においてFSH区は87.1%であり、対照区の77.1%と比較して有意に高い成績であった。

胚発生成績をFig. 4に示した。平均の卵割卵数および胚盤胞数には有意な差は認められなかったものの、胚盤胞率においてFSH+HA区は30.7%であり、対照区の18.2%と比較して有意に高い成績であった。これはヒアルロン酸製剤のpFSH製剤に対する徐放性の効果が影響していると考えられるが、今後ヒアルロン酸製剤のpFSH製剤に対する徐放効果と胚発生に及ぼす影響について、さ

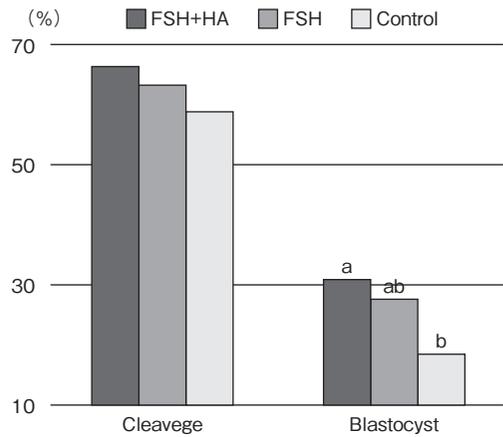


Fig. 4 Proportion of embryo development on *in vitro* fertilization after ovum pick-up in Japanese black cattle
^{a-b} Columns with different superscripts are statistically significant ($p < 0.05$).

らなる検討が必要である。

実験II

黒毛和種繁殖牛6頭を供試したOPUおよび胚発生成績は、実験IのFSH+HA区と同様の成績

Table 1 Results of *in vitro* embryo development using oocyte by ovum pick-up in the field

No. of cows	No. of follicles	No. of collected oocytes (%)	No. of cultured oocytes (%)	No. of cleavages (%)	No. of blastocysts (%)
6	190	150 (78.9)	120 (80.0)	85 (70.8)	49 (40.8)

を示した (Table 1)。

以上のことからOPU実施前に投与するpFSH製剤にヒアルロン酸製剤を添加することで、OPU時の卵子採取効率が向上し、体外受精後の胚発生成績の向上が期待できる。

4. 要 約

本研究は、経膈採卵 (OPU) 技術の効率化を目的とし、OPU実施前に、ヒアルロン酸製剤と豚卵胞刺激ホルモン (pFSH) 製剤を混合し筋肉内投与することが卵巣反応および採取卵子の体外受精後の胚発生成績に及ぼす影響を検討した。実験 I ではOPU前のpFSH製剤投与量は8 AUとし、pFSH製剤のみ投与のFSH区と試験区としてpFSH製剤にヒアルロン酸製剤4 mlを添加したFSH+HA区、対照区としてpFSH製剤未投与区を設定した。OPU前の中卵胞率は、FSH+HA区およびFSH区が対照区と比較して有意に高く、卵子の採取率はFSH+HA区が対照区と比較して有

意に高い成績であった。また、体外受精に供する培養卵子割合はFSH区が対照区と比較して有意に高い成績であった。さらに、体外受精後の胚盤胞率はFSH+HA区が対照区と比較して有意に高い成績であった。実験 II の実証実験においてもOPUおよび胚発生成績は、実験 I のFSH+HA区と同様の成績を示した。以上の結果から、OPU前に投与するpFSH製剤にヒアルロン酸製剤を添加することで、卵子採取効率が向上し、体外受精後の胚発生成績の向上が期待できる。

文 献

- 1) Seneda, M. M., *et al.* : *Animal Reproduction Science*, **67**, 37~43, 2001.
- 2) Vieira, L. M., *et al.* : *Theriogenology*, **82**, 318~324, 2014.
- 3) 及川俊徳, 板橋知子, 沼邊孝: 東北畜産学会報, **66**(3), 57~64, 2017.
- 4) Yu-Jin Jin, *et al.* : *Journal of Pharmaceutical Investigation*, Vol.40, Special issue, 33~43, 2010.
- 5) Biancucci, A., *et al.* : *Theriogenology*, **85**, 914~921, 2016.

沖縄在来豚アグーを絶滅から守るべきL-カルニチン 処理による凍結精子作製技術の改良

Improvement of the sperm freezing procedure by treatment with
L-carnitine to protect Okinawan native Agu pig from extinction

建本 秀樹

(琉球大学農学部)

Hideki Tatamoto

(Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

The present study aimed to evaluate the effect of the addition of L-carnitine (LC) to freezing extender on qualities of frozen-thawed Okinawan native Agu pig sperm. Ejaculated sperm frozen in the extender supplemented with 0, 1, 2.5, or 5 mM LC was thawed, and then evaluated the post-thawed sperm parameters. Treatment with LC effectively improved the mitochondria and plasmalemma integrities and the proteolytic activity of the acrosomal contents among the concentrations tested ($p < 0.05$). In particular, the mitochondrial activity and the proteolytic activity of the acrosomal contents were markedly increased by treatment with 2.5 mM LC during the freezing procedure in all individuals. It was further shown that treatment with 2.5 mM LC remarkably kept higher levels of sperm motility in the post-thaw sperm after 3 h of incubation compared with other doses of LC treatment ($p < 0.05$). Although the addition of LC to the freezing extender had no effect on interference with DNA damage and caspases activity, sperm treated with 2.5 mM LC during freezing possessed significantly higher penetrability levels to matured oocytes in vitro than untreated sperm in all individuals. Therefore, the present findings indicate that the addition of LC to the freezing extender efficiently improves the post-thaw qualities, but not DNA damage and caspases activity, of Age sperm by blocks against the damages of mitochondria and plasmalemma and conservations of the proteolytic activity of the acrosomal contents and sperm motility.

1. 目 的

沖縄在来豚アグーは我が国の唯一の在来豚として沖縄の特筆すべき畜産物である。しかし、現在の雄アグーには長期間の閉鎖的小集団での交配による近交退化が認められ、夏季には精子性状が極端に悪化する。したがって、アグーを通年的に効率的かつ安定的に生産し、その貴重な遺伝子を保

持するためにもアグー精子凍結保存技術を確立することが必要である。しかし、ブタ精子の凍結保存に関してはウシ凍結精液と比べて、凍結処理過程での酸化ストレスやコールドショックなどによる細胞障害の影響を受けやすい。その結果、凍結融解後のブタ精子の運動性および受精能力維持に関する生理学的機能は新鮮精子と比較して著しく低下し^{1~3)}、いまだにブタ凍結精子は実用化には

至っていない。

活性酸素種 (reactive oxygen species ; ROS) によって引き起こされる酸化ストレスは凍結障害の原因の一つである。L-カルニチン (LC) は、脂肪酸がATPのエネルギー基質としてミトコンドリア内で β 酸化される際のミトコンドリア内への脂肪酸の輸送に関わっており、この作用によって脂質の過酸化を抑制している^{4~6)}。同時に、LCにはミトコンドリア機能低下を抑制する能力があることも示されている^{7~9)}。さらに、精巣上体細胞および精子は精巣上体液中に存在するLCの β 酸化の作用機序を介してATPエネルギーを誘導されることから、哺乳動物の精子の成熟および代謝に対してLCは重要な役割を果たすことも知られている¹⁰⁾。また、精巣上体液中の高濃度のLCは、精子原形質膜を安定化させ、さらに代謝機能を維持し、精子運動能力を増加させる作用を有すると示唆されている^{11,12)}。しかし、凍結保護プロセスならびに精子凍結過程で使用される凍結保護物質は、LCの精子細胞内濃度を低下させることが知られており^{13~15)}、ヒト精子において、凍結保存時のLC添加が精子運動性と活性化型前進運動精子率を改善する¹⁶⁾。しかしながら、ブタ精子の凍結保存時の凍結用希釈液へのLC添加による効果は、まだ検証されていない。

したがって、本研究ではアグー精子の凍結用希釈液へのLC添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響を調べるため、さまざまな濃度のLCを凍結用希釈液へ添加し、その効果を検証した。

2. 方 法

特に提示していない試薬を除いて、すべての試薬はSigma-Aldrich (St. Louis, USA) から購入した。

2.1 ブタ射出凍結精子の作成

射出精液は、農業生産法人有限会社我那覇畜産

で繁殖されているアグー3頭 (A-1, A-2およびA-3) から手圧法により採取し実験に供した。

凍結用希釈液には、BF5¹⁷⁾を用いた。採取した精液は2時間以内に研究室に持ち帰り、遠心操作 (1,600×g, 3分間, 30℃) することで精漿を除去し、BTS¹⁷⁾で 2.0×10^8 sperm/ml濃度に精子を懸濁した。その後、ただちに再度遠心 (1,600×g, 3分間, 30℃) して上清を除去した後、一次凍結用希釈液 (1st BF5) で 10×10^8 sperm/ml濃度に希釈した。そして、プログラム低温水槽 (NCB-3100, EYELA, 東京) を用いて2時間かけて25℃から5℃まで冷却し5℃の状態では1.5時間静置した。その後、5% (v/v) glycerolを含む二次凍結用希釈液 (2nd BF5) を等量添加し、素早く攪拌した後、小穴を成型したドライアイス上に100 μ lの凍結ペレットを作製した。凍結ペレットは、ドライアイス上で15分以上静置して完全に凍結した後、液体窒素中に浸漬し保存した。なお、凍結用希釈液へのLC添加が凍結融解後のアグー精子性状に及ぼす影響を調査するため、0, 1, 2.5および5mMになるようにLCを各凍結用希釈液に添加し、凍結処理を行った。

2.2 ミトコンドリア正常性の観察

凍結精子1ペレットをDulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) に1% (w/v) polyvinyl alcohol (PVA) および1mg/ml D-glucoseを加えたPBS-PVA (3ml) 中において39℃で融解した融解精子を処理区ごとに750 μ lを分注した。そして、既報に準じ^{18~20)}、Mito Tracker Red CMXRos (Lifetachologies, DcriveRockville, MD, USA) とSYBR Green I (TaKaRa Bio, 滋賀) で染色した。その後、蛍光顕微鏡 (H600L, Nikon, 東京) 下で観察し、中片部に強い赤色蛍光が認められた精子を正常なミトコンドリアを保持している精子とした。

2.3 精子細胞膜正常性の観察

精子細胞膜正常性の評価は、既報²¹⁾の方法に準じて行った。PBS-PVA (4 ml) 中で凍結精子を39°Cで融解後、精子濃度が 2.0×10^6 sperm/mlになるように調整した。その後、CFDA/PI staining solutionを用い遮光状態の39°Cで15-30分間染色し、0.03% glutaraldehyde (和光純薬工業, 大阪)で固定した。そして、蛍光顕微鏡下で観察し、緑色蛍光のみを呈している精子は正常細胞膜を保持している精子とし、一部もしくは全体的に赤色蛍光を呈している精子は膜障害を受けている精子とした。

2.4 精子先体由来のタンパク質分解酵素活性の測定

スライドガラス上のゼラチン皮膜に塗布した精子により形成される光輪 (halo) を測定することで精子先体由来タンパク質分解酵素活性を測定した¹⁸⁻²⁰⁾。観察は位相差顕微鏡下で、精子先体からゼラチン被膜上に露出したタンパク質分解酵素の作用により形成された光輪 (halo) の直径を、マイクロメーターで各処理区当たり25個以上計測し、その光輪直径を先体由来のタンパク質分解酵素活性すなわち先体正常性として評価した。

2.5 精子運動性の測定

凍結精子を39°Cに加温した2.5 mlのCa, Mg-free Tyrode-HEPES solution中で融解して 2.0×10^7 sperm/ml濃度になるように調整し、39°Cでインキュベートした。そして、融解後0, 1ならびに3時間に精子運動解析装置 (SMAS: Sperm Motility Analysis System, DITECT, 東京) を用いて精子運動性を計測し、「運動精子率」と「活性化型前進運動精子率」を解析した。なお、運動精子率は7 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上の経路平均速度を示した精子の全精子に占める割合とし、活性化型前進運動精子率は50 $\mu\text{m}/\text{sec}$ 以上の直線係数を示した精子の全精子に占める割合とした。

2.6 DNA正常性の観察

精子のDNA障害は既報に従い中性コメットアッセイ法で評価した^{18, 19)}。電気泳動後のアガロース内のDNAのテーリング像を、蛍光顕微鏡下で観察しDNA障害を明らかにした。

2.7 細胞内カスパーゼ活性の測定

精子細胞内カスパーゼ活性の測定は、CaspGLOW™ Red Active Caspase Staining Kit (Bio Vision, Atlanta, GA, USA) を用いて行った^{20, 22)}。凍結精子を融解後、39°Cに加温した8 mlのPBS-PVA中へ懸濁し、その精子懸濁液 (300 μl) に1 μl のRed-VAD-FNK溶液を添加した。その後は、キットのプロトコールに従い、蛍光顕微鏡下で中片部に鮮やかな赤色蛍光が認められる精子を、活性型カスパーゼを有する精子とした。

2.8 体外受精 (in vitro fertilization: IVF) による精子受精能力の評価

卵胞卵の体外成熟 (IVM) ならびに体外受精 (IVF) は既報に準じて行った^{18, 19)}。なお、未經産豚卵巢からの直径2-6 mmの小卵胞から採取した卵丘細胞卵子複合体をNCSU37²³⁾ で44時間培養することでIVMを行った。IVF培地にはmTBM²⁴⁾ を用い、前培養を行った精子をIVF培地で 2.0×10^6 sperm/ml濃度に希釈し、卵丘細胞を除去した裸化卵に媒精した。媒精10時間後に卵子を固定し、位相差顕微鏡下で卵細胞質内に膨化した精子頭部もしくは雄性前核が認められ、同時に精子尾部も認められた卵子を精子侵入卵として判定した。

2.9 統計処理

各試験区におけるすべての操作を計4回繰り返し、データは平均 \pm 標準誤差で示した。また、統計処理は統計解析ソフトR (<http://www.R-project.org/>) を用いて行った。Shapiro-Wilk normality testで正規性を確認した後、パラメトリック関数を適用した一因子もしくは二因子の一

一般化線形モデル (Generalized Linear Model; GLM)-ANOVAを行い, 有意性が認められた場合には, Tukey-Kramer testによる多重比較検定で有意差を検討した。なお, %データには, 二項分布関数を適用したGLM解析を行ったうえでノンパラメトリック型Tukey法²⁵⁾により多重比較検定を行った。そして, すべてのデータにおいて $p < 0.05$ を統計的に有意と判断した。

3. 結果と考察

最近, 水牛精子の凍結保存時に, LCの添加がATP産生量を増加させるとともに, ROSを消去する作用によって凍結融解後の精子の質を改善した²⁶⁾。本研究においても, いずれの個体のアグー凍結精子でも2.5 mM LC処理区で正常なミトコンドリアを有する精子の割合が劇的に増加し保護効果が確認できた ($p < 0.05$) (Fig. 1A)。一方, 5

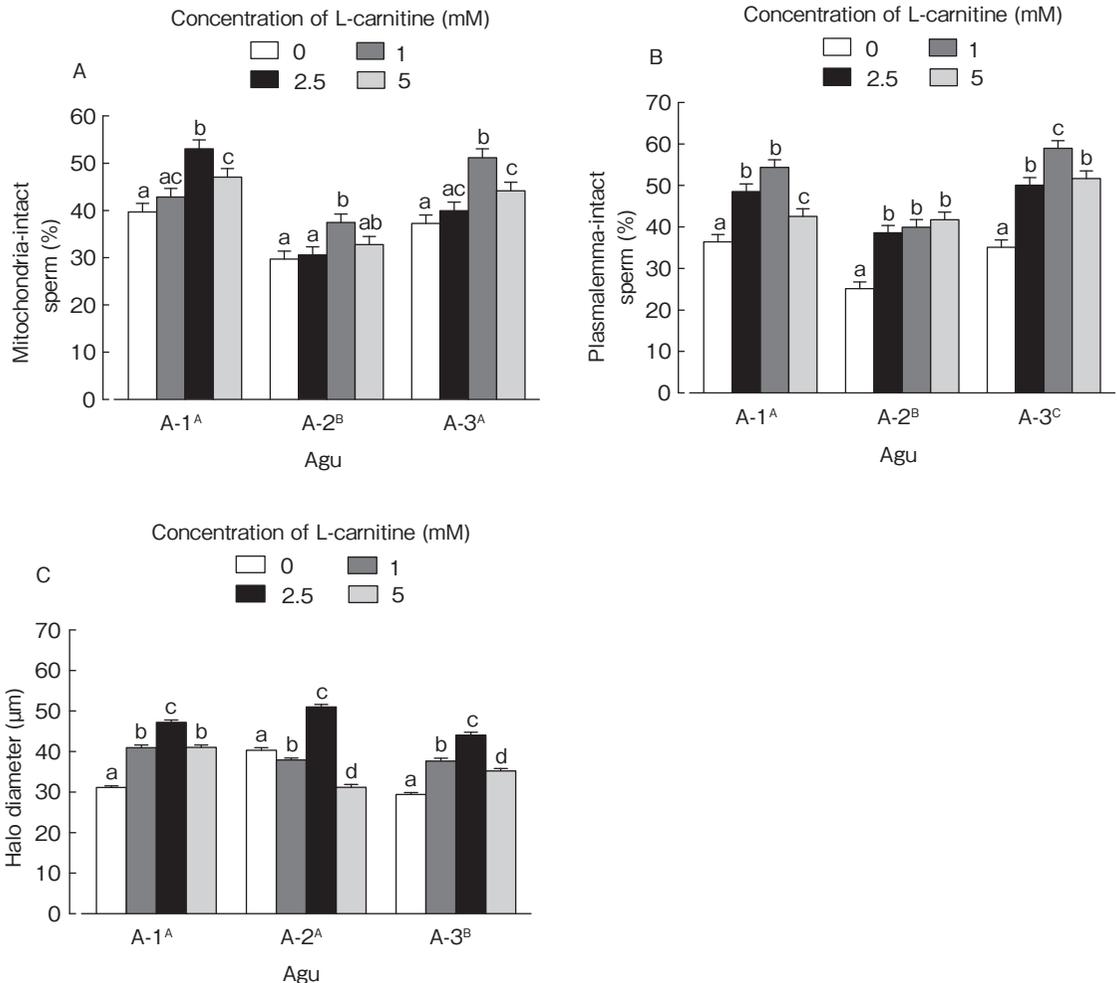


Fig. 1 Effect of various concentrations of L-carnitine (LC) added to the freezing extender on mitochondrial integrity (A), plasmalemma integrity (B), and halo diameter (C) in post-thaw Agu sperm. Values are expressed as the mean \pm SEM for four ejaculates from the three Agu. The total number of sperm examined was 720-726 (A), 720-740 (B), and 103-112 (C) in each treatment group. ^{a-d} Significant differences were observed within the LC treatment groups in the same pigs as determined by a one-way ANOVA ($p < 0.05$). ^{A-C} Significant differences were observed among individuals as determined by a two-way ANOVA ($p < 0.05$).

Table 1 Total motile spermatozoa after freeze-thawing with various concentrations of L-carnitine.

Agu	Concentration of L-carnitine (mM)	Incubation time after thawing (h)		
		0	1	3
A-1 ^A	0	84.9 ± 1.0 ^{a, x}	73.4 ± 1.4 ^{a, y}	22.4 ± 1.4 ^{a, z}
	1	81.1 ± 1.2 ^{b, x}	87.6 ± 0.9 ^{b, x}	34.4 ± 1.5 ^{b, y}
	2.5	87.4 ± 0.9 ^{a, x}	85.4 ± 1.0 ^{b, x}	41.7 ± 1.6 ^{c, y}
	5	68.0 ± 1.5 ^{c, x}	76.4 ± 1.3 ^{a, y}	39.6 ± 1.4 ^{c, z}
A-2 ^B	0	64.5 ± 1.7 ^{a, x}	62.8 ± 1.7 ^{a, x}	24.3 ± 1.9 ^{a, y}
	1	64.6 ± 1.6 ^{a, x}	66.3 ± 1.5 ^{a, x}	32.8 ± 1.5 ^{b, y}
	2.5	69.4 ± 1.6 ^{a, x}	67.4 ± 1.6 ^{a, x}	38.2 ± 1.6 ^{c, y}
	5	67.2 ± 1.6 ^{a, x}	63.2 ± 1.5 ^{a, x}	43.9 ± 1.7 ^{c, y}
A-3 ^C	0	82.8 ± 1.1 ^{a, x}	82.6 ± 1.4 ^{a, x}	24.9 ± 1.4 ^{a, y}
	1	81.1 ± 1.2 ^{a, x}	72.1 ± 1.5 ^{bc, y}	29.1 ± 1.6 ^{ab, z}
	2.5	83.3 ± 1.3 ^{a, x}	78.4 ± 1.3 ^{bc, y}	33.4 ± 1.6 ^{b, z}
	5	81.7 ± 1.2 ^{a, x}	69.6 ± 1.5 ^{b, y}	25.8 ± 1.6 ^{a, z}

Values are expressed as the mean ± SEM for four ejaculates from the three Agu.

^{a-c} Values with different superscripts in the same column are significantly different within the LC treatment groups in the same individuals (p<0.05).

^{x-z} Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05).

^{A-C} Values with different superscripts are significantly different among individuals (p<0.05).

mM LC処理区では、逆にミトコンドリア正常性は有意に低下した (p<0.05)。次に、凍結融解後の精子細胞膜の正常性では、A-1とA-3において2.5 mM LC処理区で最も高い正常な細胞膜を有する精子の値が示された (Fig. 1B)。また、A-2においても2.5 mM LC処理区で対照区と比べ有意に高い数値が見られた (p<0.05)。これまで過剰なROSによる脂質過酸化が膜損傷を引き起こすといった報告がされており²⁷⁾、凍結用希釈液へのLC添加によってROS生成量が減少した結果、凍結融解後の精子細胞膜正常性が改善したと考えられる。また、精子先体由来のタンパク質分解酵素活性について検討したところ、実験に供したすべての個体で2.5 mM LC処理区においてタンパク質分解酵素によってゼラチン皮膜に形成された halo直径が最も増加した (p<0.05) (Fig. 1C)。これらの結果から、LC処理により、ミトコンドリア、細胞膜ならびに先体の正常性が維持されることが確認できた。

凍結融解後の精子運動性では、全個体の融解後3時間の運動精子率が2.5 mM LC処理区で対照区より有意に高い値であった (Table 1)。また、融解後3時間の活性型精子前進運動精子率でも、対照区と比較してLC処理区で有意な増加が観察された (p<0.05) (Table 2)。したがって、LCの添加が精子運動率と活性型精子前進運動精子率に対して改善効果があることが証明された。これは、ヒト精子において凍結保存時のLCの添加によって精子運動性と活性化型前進運動精子率が改善されたといった報告と一致する¹⁶⁾。

一方、凍結融解後の精子のDNA正常性に関しては、明確なLC処理区によるDNA断片化に対する抑制効果は示されなかった。同様に、カスパーゼ活性においてもLC処理により有意に活性が低下することはなかった。DNA断片化は、物理的障害だけでなくカスパーゼ活性に伴うアポトーシス様細胞死によっても誘導される^{28, 29)}。これまでの我々の研究から、アグー精子凍結融解時に凍結

Table 2 Rapid progressive motility spermatozoa after freeze-thawing with various concentrations of L-carnitine.

Agu	Concentration of L-carnitine (mM)	Incubation time after thawing (h)		
		0	1	3
A-1 ^A	0	12.5 ± 0.9 ^{ac, x}	13.9 ± 1.1 ^{a, y}	0.7 ± 0.3 ^{ab, z}
	1	17.0 ± 1.2 ^{b, x}	12.5 ± 0.9 ^{a, y}	1.6 ± 0.4 ^{bc, z}
	2.5	10.0 ± 0.8 ^{a, x}	11.3 ± 0.9 ^{ab, x}	2.9 ± 0.6 ^{c, y}
	5	14.4 ± 1.1 ^{c, x}	13.5 ± 1.0 ^{a, x}	1.7 ± 0.4 ^{bc, y}
A-2 ^A	0	9.8 ± 1.1 ^{ab, x}	15.1 ± 1.3 ^{a, y}	1.8 ± 0.6 ^{a, z}
	1	8.9 ± 1.0 ^{ab, x}	9.5 ± 1.0 ^{b, x}	1.8 ± 0.4 ^{a, y}
	2.5	16.6 ± 1.3 ^{c, x}	17.0 ± 1.3 ^{a, x}	3.0 ± 0.6 ^{ab, y}
	5	6.4 ± 0.8 ^{a, x}	10.0 ± 0.9 ^{b, y}	4.7 ± 0.7 ^{b, y}
A-3 ^B	0	19.8 ± 1.2 ^{a, x}	16.9 ± 1.3 ^{a, x}	0.7 ± 0.3 ^{a, y}
	1	17.0 ± 1.2 ^{a, x}	21.0 ± 1.4 ^{ab, x}	1.7 ± 0.5 ^{a, y}
	2.5	18.5 ± 1.4 ^{a, x}	15.0 ± 1.1 ^{a, x}	1.6 ± 0.4 ^{a, y}
	5	26.7 ± 1.4 ^{b, x}	14.9 ± 1.2 ^{a, y}	0.7 ± 0.3 ^{a, z}

Values are expressed as the mean ± SEM for four ejaculates from the three Agu.

^{a-c} Values with different superscripts in the same column are significantly different within the LC treatment groups in the same individuals Agu ($p < 0.05$).

^{x-z} Values with different superscripts in the same row line are significantly different ($p < 0.05$).

^{A, B} Values with different superscripts are significantly different among individuals ($p < 0.05$).

Table 3 Effects of L-carnitine added to the semen freezing extender on fertilization parameters in post-thaw Agu sperm.

Agu	L-carnitine (mM)	No. of oocytes examined	Oocytes (% : mean ± SEM)			No. of sperm per penetrated oocyte (mean ± SEM)
			Penetrated	Polyspermic ¹⁾	Male pronucleus ¹⁾	
A-1	0	151	28.5 ± 3.7	34.9 ± 7.3	72.1 ± 6.8	1.4 ± 0.0
	2.5	173	48.0 ± 3.8*	39.0 ± 5.4	82.9 ± 4.2	1.5 ± 0.0
A-2	0	143	39.2 ± 4.1	30.6 ± 6.4	57.1 ± 6.6	1.3 ± 0.2
	2.5	128	55.1 ± 4.4*	30.0 ± 4.7	68.6 ± 5.5	1.4 ± 0.1
A-3	0	116	36.2 ± 4.5	42.9 ± 7.6	66.7 ± 7.3	1.6 ± 0.1
	2.5	137	54.0 ± 4.3*	31.1 ± 5.4	66.2 ± 5.5	1.5 ± 0.2

¹⁾ Percentage of oocytes that were penetrated.

* Values are significantly different between two treatments in each individual ($p < 0.05$).

障害を受けた精子では、ミトコンドリア依存型のカスパーゼ活性が惹起されることが明らかになった²²⁾。しかしながら、凍結用希釈液へのLCの添加は、凍結融解後の精子ミトコンドリア正常性を改善したものの、カスパーゼ活性とDNA断片化を抑制することはなかった。すなわち、ミトコンドリア依存型カスパーゼ活性化以外のプログラム細胞死に関わる作用機序が関与している可能性が示唆された。

最後に、2.5 mM LC処理区におけるIVF後の精子侵入率をはじめとする各種パラメーターを観察した結果、すべての個体で対照区と比較して2.5 mM LC処理区の卵子への精子侵入率が有意に増加した ($p < 0.05$) (Table 3)。ブタ精子において正常な精子先体が受精時に必要不可欠であるといった報告がされている³⁰⁾。すなわち、凍結用希釈液へのLCの添加による精子先体への改善効果が卵子への精子侵入率の増加の要因であると考え

られる。したがって、2.5 mM LCを添加した精子凍結用希釈液で凍結処理したアグー精子は、凍結融解後も高い受精能力を維持していることが証明された。

本研究の結果から、凍結用希釈液への2.5 mMのLC添加が、ミトコンドリア障害と細胞膜障害の抑制、ならびに精子先体と精子運動性の維持によって、凍結融解後のアグー精子性状を効果的に改善することが明らかになった。本研究結果は、アグー精子凍結保存技術の確立を促進し、アグーの効率的かつ安定的な増産に貢献できると思われる。

4. 要 約

我が国唯一の在来豚である希少なアグーの年間を通しての生産を行うには、精子凍結保存技術の確立が必要である。そこで、本研究ではアグーにおける凍結用希釈液へのLC添加が凍結融解後の精子性状に及ぼす影響について調べた。2.5 mM LC処理によって正常なミトコンドリアと細胞膜を有する精子の割合が顕著に増加した ($p < 0.05$)。精子先体由来のタンパク質分解酵素活性は2.5 mM LC処理区で増加し、先体の正常性が高められた ($p < 0.05$)。凍結融解後3時間における精子運動性は、2.5 mM LC処理区で対照区より有意に高くなった。しかし、DNA障害と活性型カスパーゼの存在を示す精子の割合に関しては、LC処理による抑制効果は認められなかった。一方、IVF試験を行い凍結融解精子の受精能力を検定したところ、対照区と比べて2.5 mM L-カルニチン処理区の精子侵入率が有意に増加した。すなわち、本研究の結果から、凍結時の2.5 mMのLC処理が、融解後のミトコンドリア、細胞膜および精子先体の正常性と精子運動性を維持し、アグー凍結精子の性状を効果的に改善することが明らかになった。

文 献

- 1) Mazur, P. : Freezing of living cells : mechanisms and implications, *Am. J. Physiol. (Cell Physiol.)*, **16**, 125~142, 1984.
- 2) Rath, D., Neimann, H. : In vitro fertilization of porcine oocytes with fresh and frozen-thawed ejaculated or frozen thawed epididymal semen obtained from identical boars, *Theriogenology*, **47**, 785~793, 1997.
- 3) Chatterjee, S., Gagnon, C. : Production of reactive oxygen species by spermatozoa undergoing cooling, freezing, and thawing, *Mol. Reprod. Dev.*, **59**, 451~458, 2001.
- 4) Gulcin, I. : Antioxidant and antiradical activities of L-carnitine, *Life Sci.*, **78**, 803~811, 2006.
- 5) Matalliotakis, I., Koumantaki, Y., Evageliou, A., Matalliotakis, G., Goumenou, A., Koumantakis, E. : L-Carnitine levels in the seminal plasma of fertile and infertile men : correlation with sperm quality, *Int. J. Fertil.*, **45**, 236~240, 2000.
- 6) Rani, P. J. A., Panneerselvam, C. : Effect of L-carnitine on brain lipid peroxidation and antioxidant enzymes in old rats, *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.*, **57**, 134~137, 2002.
- 7) Furuno, T., Kanno, T., Arita, K., Asami, M., Utsumi, T., Doi, Y., Inoue, M., Utsumi, K. : Roles of long chain fatty acids and carnitine in mitochondrial membrane permeability transition, *Biochem. Pharmacol.*, **62**, 1037~1046, 2001.
- 8) Ooyanagi, E., Yano, H., Kato, Y., Fujita, H., Utsumi, K., Sasaki, J. : L-Carnitine suppresses oleic acid-induced membrane permeability transition of mitochondrial, *Cell Biochem. Funct.*, **26**, 778~786, 2008.
- 9) Ooyanagi, E., Yano, H., Uchida, M., Utsumi, K., Sasaki, J. : Protective action of L-carnitine on cardiac mitochondrial function and structure against fatty acid stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **412**, 61~67, 2011.
- 10) Ford, W. C. L., Rees, J. M. : The bioenergetics of mammalian sperm motility, In : Gagnon C, editor, *Controls of sperm motility : biological and clinical aspects*, Boca Raton : CRC Press, 175~202, 1990.
- 11) Deana, R., Rigoni, F., Francesconi, M., Cavallini, L., Arslan, P., Siliprandi, N. : Effect of L-carnitine and L-aminocarnitine on calcium transport motility and enzyme release from ejaculated bovine spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **41**, 949~955, 1989.
- 12) Jeulin, C., Lewin, L. : Role of free L-carnitine and acetyl L-carnitine in post gonadal maturation of mammalian spermatozoa, *Hum. Reprod. Update*, **2**, 87~102, 1996.
- 13) Suter, D. A., Holland, M. K. : The concentration of free L-carnitine and L-O-acetylcarnitine in spermatozoa and seminal plasma of normal fresh

- and frozen human semen, *Fertil. Steril.*, **31**, 541~544, 1979.
- 14) Reyes-Moreno, C., Gagnon, A., Sullivan, R., Sirard, M. A. : Addition of specific metabolites to bovine epididymal cell culture medium enhances survival and motility of cryopreserved sperm, *J. Androl.*, **21**, 876~886, 2000.
 - 15) Setyawan, E. E., Cooper, T. G., Widiasih, D. A., Junaidi, A., Yeung, C. H. : Effects of cryoprotectants treatments on bovine sperm function and osmolyte content, *Asian J. Androl.*, **11**, 571~581, 2009.
 - 16) Banihani, S., Agarwal, A., Sharma, R., Bayachou, M. : Cryoprotective effect of L-carnitine on motility, vitality and DNA oxidation of human spermatozoa, *Andrologia*, **46**, 637~641, 2014.
 - 17) Pursel, V. G., Johnson, L. A. : Freezing of boar spermatozoa : fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure, *J. Anim. Sci.*, **40**, 99~102, 1975.
 - 18) Yoshimoto, T., Nakamura, S., Yamauchi, S., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., Tatemoto, H. : Improvement of the post-thaw qualities of Okinawa native pig spermatozoa frozen in an extender supplemented with ascorbic acid 2-O- α -glucoside, *Cryobiology*, **57**, 30~36, 2008.
 - 19) Yamauchi, S., Nakamura, S., Lay, K. M., Azuma, T., Yakabi, T., Muto, N., Nakada, T., Ashizawa, K., Tatemoto, H. : Characteristics of Okinawa native Agu pig spermatozoa after addition of low-density lipoprotein to freezing extender, *J. Reprod. Dev.*, **55**, 558~565, 2009.
 - 20) Tatemoto, H., Oshiro, R., Shimada, H., Konno, T., Yamanaka, K., Ashizawa, K. : Addition of casein to the diluents during semen transportation improves the post-thaw qualities of Okinawan native Agu pig spermatozoa, *J. Warm Regional Soci. Anim. Sci., Jap.*, **58**, 75~86, 2015.
 - 21) Brito, L. F. C., Barth, A. D., Bilodeau-Goeseels, S., Panich, P. L., Kastelic, J. P. : Comparison of methods to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro fertilization rate, *Theriogenology*, **60**, 1539~1551, 2003.
 - 22) Shimokawa, K., Oshiro, R., Yamanaka, K., Ashizawa, K., Ota, S., Tatemoto, H. : Improvement of the post-thaw qualities of Okinawa native Agu pig sperm frozen in an extender supplemented with antiapoptotic PTD-FNK protein, *Theriogenology*, **46**~55, 2012.
 - 23) Petters, R. M., Wells, K. D. : Culture of pig embryos, *J. Reprod. Fertil.*, **48** (Suppl.), 61~73, 1993.
 - 24) Abeydeera, L. R., Day, B. N. : Fertilization and subsequent development in vitro of pig oocytes inseminated in a modified Tris-buffered medium with frozen-thawed ejaculated spermatozoa, *Biol. Reprod.*, **57**, 729~734, 1997.
 - 25) Ryan, T. A. : Significance tests for multiple comparison of proportions, variances, and other statistics, *Psychol. Bull.*, **57**, 318~328, 1960.
 - 26) Valentina, L., Angela, S., Giuseppe, C., Raffaele, M., Francesco, P., Milena, V., Gianluigi, Z., Bianca, G. : Carnitine supplementation decreases capacitation-like changes of frozen-thawed buffalo spermatozoa, *Theriogenology*, **88**, 236~243, 2017.
 - 27) Sharma, R. K., Agarwal, A. : Role of reactive oxygen species in male infertility, *Urology*, **48**, 835~850, 1996.
 - 28) Wyllie, A. H., Kerr, J. F., Currie, A. R. : Cell death : the significance of apoptosis, *Int. Rev. Cytol.*, **68**, 251~306, 1980.
 - 29) Tsujimoto, Y. : Bcl-2 family of proteins : life-or-death switch in mitochondria, *Biosci. Rep.*, **22**, 47~58, 2002.
 - 30) Jeong, Y. J., Kim, M. K., Song, H. J., Kang, E. J., Ock, S. A., Kumar, B. M., Balasubramanian, S., Rho, G. J. : Effect of α -tocopherol supplementation during boar semen cryopreservation on sperm characteristics and expression of apoptosis related genes, *Cryobiology*, **58**, 181~189, 2009.

抗酸化物質を利用した牛体外受精卵生産技術の高度化とそれを応用した新規OPU-IVF-ETによる子牛生産システムの開発

Improvement of bovine *in vitro* fertilized embryo production technology using antioxidants and development of calf production system by new OPU-IVF-ET method

日巻 武裕^{1,2}・草薙 志穂²・多治見 弘史³

(¹岐阜大学応用生物科学部, ²岐阜大学自然科学技術研究科, ³多治見牛ETクリニック)

Takehiro Himaki^{1,2}, Shiho Kusanagi² and Hiroshi Tajimi³

(¹Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,

²Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu University, ³Tajimi bovine ET clinic)

One of the factors that influencing the *in vitro* embryo production efficiency is oxidative stress. The objective of this study is to investigate the effect of α -lipoic acid (ALA) treatment, which is a strong antioxidant, on the production of bovine *in vitro* fertilized (IVF) embryos. Oocytes collected from slaughterhouse were cultured for 22 h in maturation medium supplemented with 0, 50, 100 or 200 μ M ALA and IVF embryos were cultured for 7 days. At first, examined the antioxidant efficacy of ALA from the levels of Reactive Oxygen Species (ROS) and Glutathione (GSH) in the cytoplasm of *in vitro* matured oocytes, and revealed that the significant decrease in ROS and significant increase in GSH in the all ALA treated groups compared to the control group. Next, as a result of evaluating the effects on the status of *in vitro* development, the rate of blastocyst formation on Day 7 was significantly higher in 50 μ M ALA treatment than that in other groups. Whereas, the rates of maturation, fertilization, cleavage and apoptotic cells of blastocyst did not differ. On the other hand, the number of total cells and ICM were significantly higher in 50 μ M ALA treatment compared with the control group. In addition, the morphological quality of blastocysts obtained on Day 7 and the survival rate after cryopreservation tended to improve in the 50 or 100 μ M ALA treatment group. Finally, after treating the immature oocytes collected by Ovum Pick Up (OPU) with 50 μ M ALA, IVF embryos were produced, and fresh embryo or freeze-thawed embryo were transferred to recipient respectively. As a result, conception was confirmed in both cases. In conclusion, it was revealed that treatment with 50 μ M ALA during *in vitro* maturation was effective in improving the developmental capacity of bovine IVF embryos and had no negative effects on the developmental potential on *in vivo*.

1. 目 的

牛体外受精 (IVF) 技術は、受精卵の大量かつ安価な生産、雌雄両方からの優良遺伝形質の継承などの利点があり、経膈採卵を介したIVF卵生産と受精卵移植 (ET) による効率的な産仔生産に有効な手段である。しかし、ET可能なIVF卵の生産効率やその品質は、体内受精卵と比べて低く、その要因に体内環境と体外培養環境の違いがあげられる。

初期胚の発生能や品質には、体外培養環境の高酸素条件がもたらす酸化ストレスの影響が大きい。酸化ストレスは活性酸素種 (ROS) が過剰に産生され、細胞内抗酸化力とのバランスが崩れることで引き起こされる。過剰となったROSは、細胞膜やDNAの損傷、正常な遺伝子発現およびシグナル経路を阻害し、アポトーシスカスケードを誘発することで、卵成熟や胚発生能を低下させる¹⁾。IVF卵生産過程の中でも卵子の体外成熟培養 (IVM) は、高酸素条件下で行うため酸化ストレスの影響を受けやすい²⁾。ET後の受胎率においても、移植する受精卵の品質が高いことが不可欠であり、ET技術のさらなる発展には、IVF卵の品質を向上させ、確実に受胎し体内で順調に発生する能力を有することが重要となる。

これまで種々の抗酸化剤添加が酸化ストレスを軽減し、卵子の成熟率や胚発生率を向上させ、胚盤胞期胚における総細胞数の増加やアポトーシス細胞数の減少など胚の品質が改善されることが明らかにされている^{3,4)}。

抗酸化物質の一つである α -リポ酸 (ALA) およびその還元型であるジヒドロリポ酸 (DHLA) は、ROSの生成を抑制または直接除去することで、酸化的損傷から細胞を保護する⁵⁾。また、細胞内のさまざまな所に局在でき、内因性的の水溶性抗酸化物質 (ビタミンC, グルタチオン: GSH)

および脂溶性抗酸化物質 (ビタミンE) の両者を再生できる⁶⁾。さらに、ビタミンCの約400倍の抗酸化力を持つきわめて強力な抗酸化剤である⁷⁾。したがって、IVM過程におけるALA処理が、卵成熟とその後の胚発生能改善に有効であることが期待される。

そこで本研究では、卵子のIVM過程におけるALA処理が牛IVF卵の発生能や品質ならびにET後の体内発生能に及ぼす影響を検討することを目的とした。

2. 方 法

2.1 種々濃度のALA処理によって成熟培養した卵子の品質評価

食肉処理場由来卵巣から卵丘細胞-卵母細胞複合体 (COCs) を採取した。COCsは、10% FBS添加HEPES-M199を基礎培地として、ALAを0, 50, 100または200 μ M添加し、それぞれの成熟培地微小滴でCOCsを22時間培養した。その後、卵丘細胞をすべて剥離し、2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (H2DCFDA) および CellTracker™ Blueにて染色し、ROSおよびGSHの細胞質内含有量を蛍光観察画像における蛍光輝度を数値化することで評価した。

2.2 種々濃度のALA処理によって生産したIVF卵の発生能および品質の評価

各ALA処理区で培養したCOCsは、人工授精用凍結-融解精液をBO液で処理した精子懸濁液中で精子と6時間共培養することでIVF卵を生産した。発生培地には0.3% BSA添加修正CR1aa培地 (発生培養前期2日間) および10% FBS添加修正CR1aa培地 (発生培養後期5日間) を用いた。媒精から12時間後に一部の胚を固定し、成熟状況ならびに受精状況を評価した。残りの胚は、発生培養を継続し、媒精2日後の卵割状況ならびに7日後の胚盤胞形成状況を評価した。得られた胚盤胞

は、1) 国際胚移植学会 (IETS) が定めた基準による形態的品質の評価, 2) Hoechst33342とTUNEL染色による総細胞数とアポトーシス細胞数の評価, 3) 免疫染色法による内部細胞塊(ICM)と栄養外胚葉(TE)の分化比率の評価, 4) ガラス化凍結保存に対する耐凍能(生存性)の評価, を行った。

2.3 ALA処理によって生産したIVF卵のET後の体内発生能評価

本学附属岐阜フィールド科学教育研究センター美濃加茂農場で飼養されている黒毛和種より経陰採卵法(OPU)で採取した卵子を速やかに研究室に持ち帰り, 50 μ M ALAを添加した成熟培地で20時間培養した。その後, IVF卵を生産し, 発生培養7日目に得られた胚盤胞のうち形態的に良好なものを1個選抜し, ホルモン処理にて発情周期を同期化した本学附属岐阜フィールド科学教育研究センター柳戸農場で飼養されている未経産のホルスタイン牛の子宮深部にETした。残りの胚盤胞はガラス化凍結保存し, 自然発情が観察された未経産のホルスタイン牛の子宮深部に融解後の回復が良好な胚盤胞を1個選抜しETした。2頭の受胎牛の妊娠診断はノンリターン法および超音波検査法で行った。ETから14日前後に発情が回帰していないことを確認し, その後, 1頭目はET55日後に, 2頭目はET38日後に超音波画像診断装置を用いて受胎の有無について評価した。

2.4 統計解析

成熟率, 受精率, 胚発生率および凍結融解後の生存性評価ではArc-sin変換後の数値を用いた。Bartlett検定を用いた分散の均一性を確認後, One-Factor ANOVAにて検定を行い, 多重比較としてTurkey KramerまたはSchefféの検定を行った。形態的品質の評価には X^2 検定を行った。総細胞数, アポトーシス細胞数, ROS, GSH, ICMおよびTE細胞数はOne-Factor ANOVAにて

検定を行い, 多重比較としてTurkey KramerまたはSchefféの検定を行った。

3. 結果と考察

3.1 体外成熟培養後の卵子の成熟ならび品質評価

成熟率は, 0 μ M区, 50 μ M区および100 μ M区の間には差は認められなかったが, 200 μ M区において有意 ($p < 0.05$) に低くなった。マウスでは, 高濃度のALA処理が細胞周期を停止させる⁸⁾。本研究でも200 μ M区は, 第1減数分裂中期の卵子が多く観察されたことから第2減数分裂中期に至る減数分裂が途中で停止したことが原因であると考えられる。

成熟卵子の細胞質内におけるROSおよびGSH含有量についてはFig. 1に示した。ROS含有量は, すべてのALA処理区で0 μ M区と比較して有意 ($p < 0.01$) に低くなり, GSH含有量は, すべてのALA処理区で0 μ M区と比較して有意 ($p < 0.01$) に高くなった。ALAはROSを分解できることに加え, GSH合成や酸化型グルタチオン(GSSG)の還元に寄与し, 細胞質内GSH含有量を増加させる。その結果, ROSをより活発的に分解, 除去したことが考えられる。

3.2 体外受精および体外発生能の評価

体外受精率は, 0 μ M区, 50 μ M区および100 μ M区の間には差は認められず, 適度なALA処理は体外受精に影響しないことが明らかとなった。一方, 200 μ M区では, 有意 ($p < 0.05$) な低下が認められ, 成熟卵の減少に起因するものであると考えられる。

体外発生状況についてはTable 1に示した。卵割率は, 各処理区間で差はなかったが50 μ M区が最も高くなった。胚盤胞形成率は, 0 μ M区と比較して50 μ M区が有意 ($p < 0.05$) に高くなった。GSHの合成は卵子成熟過程で起こり, 発生初期段

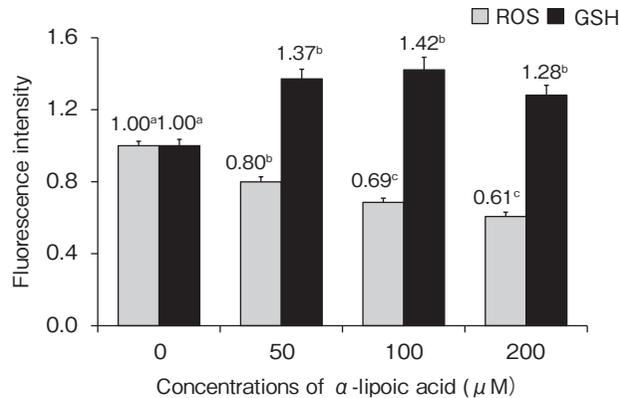


Fig. 1 Effect of α -lipoic acid treatments of the IVM period on intracellular ROS and GSH levels in matured bovine oocytes. Fluorescence intensity are normalized to that of the control. Different superscripts indicate a significant difference ($p < 0.01$). Experiments repeated five times (Sample numbers of each groups = 76).

Table 1 Effect of α -lipoic acid treatments during *in vitro* maturation period on *in vitro* development of bovine embryos*

ALA concentration (μM)	Number of embryos cultured	No. (% \pm SEM)** of embryos develop to		Total cell number (mean \pm SEM)
		Day 2		
		2-cell \leq	Blastocyst \leq	
0	160	99 (61.9 \pm 2.8) ^{ab}	54 (33.8 \pm 1.9) ^a	139.4 \pm 6.0 ^{ab}
50	160	114 (71.3 \pm 2.9) ^a	70 (43.8 \pm 2.4) ^b	143.4 \pm 5.1 ^a
100	160	101 (63.1 \pm 2.9) ^{ab}	48 (30.0 \pm 2.6) ^a	130.8 \pm 5.3 ^{ab}
200	160	91 (56.9 \pm 1.8) ^b	17 (10.6 \pm 3.5) ^c	112.1 \pm 8.4 ^b

*Experiments were replicated seven times.

**Rate to the number of cultured embryos.

a, b, c Values with different superscripts within each column differ significantly ($p < 0.05$).

階の牛胚はGSHの合成が制限されるため、発生初期段階で産生されるROSの分解には成熟卵内に蓄積されたGSHを消費する⁹⁾。卵細胞質内GSHの蓄積がその後の抗酸化能を左右し発生能に影響することから、ALA処理がGSHの合成促進とROS分解によって酸化ストレスを軽減し、細胞オルガネラの機能改善を介して細胞質成熟が促進され、発生能の向上につながったと考えられる。

3.3 胚盤胞期胚の品質評価

形態的品質評価では、Code 1 (Excellent or Good) およびCode 2 (Fair) の数は、各処理区

間で差はなかったが³⁾、Code 1の胚は、0 μM区 (54.1%) と比べて、50 μM区 (60.4%) と100 μM区 (61.0%) で高くなる傾向を示した。一方、総細胞数は、100 μM区や200 μM区と比較して、50 μM区で有意 ($p < 0.05$) に高くなった。アポトーシス細胞数および総細胞数に対するアポトーシス細胞数の割合は、各処理区間に有意な差は認められなかった (Table 2)。

総細胞数にしろICMおよびTE細胞数をTable 3に示した。総細胞数は、50 μM区が他の処理区に比べて有意 ($p < 0.05$) に高くなり、ICM細胞

Table 2 Effect of α -lipoic acid treatments during *in vitro* maturation period on total cell number and apoptotic cell number of bovine blastocysts*

ALA concentration (μ M)	Number of embryos examined	Total cell number	Apoptotic cell number	Apoptotic rate** (% \pm SEM)
0	15	176.7 \pm 7.0 ^{ab}	10.5 \pm 1.2	6.0 \pm 0.7
50	15	195.7 \pm 5.4 ^a	10.6 \pm 1.5	5.4 \pm 0.8
100	15	167.7 \pm 3.8 ^b	9.9 \pm 1.4	5.9 \pm 0.8
200	15	117.8 \pm 8.4 ^c	8.3 \pm 1.1	7.2 \pm 0.9

*Data are mean \pm SEM values for 15 embryos.

**Rate of apoptotic cell number to total cell number.

a, b, c Values with different superscripts within each column differ significantly ($p < 0.05$).**Table 3** Effect of α -lipoic acid treatments during *in vitro* maturation period on inner cell mass, trophectoderm and total cell number of bovine blastocysts*

ALA concentration (μ M)	Number of embryos examined	Total cell number	TE cell number	ICM cell number	ICM cell rate** (% \pm SEM)
0	10	167.3 \pm 9.5 ^a	110.2 \pm 7.4 ^a	57.1 \pm 5.1 ^{ac}	34.9 \pm 2.1
50	10	217.5 \pm 5.7 ^b	129.1 \pm 7.8 ^a	88.4 \pm 6.6 ^b	42.2 \pm 3.5
100	10	172.9 \pm 8.8 ^a	105.2 \pm 6.7 ^a	67.7 \pm 4.1 ^{ab}	40.5 \pm 2.1
200	10	113.1 \pm 14.8 ^c	73.3 \pm 9.3 ^b	39.8 \pm 6.2 ^c	35.0 \pm 2.4

*Data are mean \pm SEM values for 10 embryos.

**Rate of ICM cell number to total cell number.

a, b, c Values with different superscripts within each column differ significantly ($p < 0.05$).

数は、0 μ M区と比較して、50 μ M区において有意 ($p < 0.05$) に高くなった。総細胞数に対するICM細胞数の割合では、各処理区間に差はなかったが、50 μ M区と100 μ M区が高くなる傾向を示した。牛においてICMへの分化には、組織分化関連遺伝子SOX2が関与する¹⁰⁾とされており、ALA処理が当遺伝子の発現動態に影響を及ぼした可能性が考えられる。また、豚やヤギの体外胚生産では、種々の抗酸化剤処理がOCT4、SOX2およびCDX2など組織分化関連遺伝子の発現を増加させ、発生能および分化能を改善することから、本研究でも分子生物学的なアプローチによって発生能改善の理由を探ることは興味深い。

凍結融解した胚の耐凍能は、融解24時間後における胚盤胞期胚の回復率を凍結胚数に対する割合で評価した。回復率は、0 μ M区 (22.6 \pm 9.8%) と比べて、50 μ M区 (27.9 \pm 7.3%) および100 μ M

区 (34.4 \pm 7.0%) で高くなる傾向を示した。凍結融解で起こる細胞損傷の要因に、細胞内脂質があげられる。卵子や初期胚中に存在する脂質は、耐凍性の低下に関連する¹¹⁾。複数の抗酸化剤処理により、脂質代謝またはミトコンドリア活性化関連遺伝子の発現が増加し、脂質量が低下することが報告されており^{12, 13)}、ALA処理がミトコンドリア機能の活性化を介して代謝機能に影響を及ぼし、脂質量を減少させることで耐凍性の向上に寄与した可能性がある。また、初期胚の細胞膜を構成する脂質はROSと反応して過酸化脂質となり、凍結損傷の要因となる。しかし、内因性の抗酸化物質であるビタミンEがROSから細胞膜を保護しており、ALAおよび還元型のDHLEAによるビタミンEの再生⁶⁾が細胞膜を保護し、耐凍性を向上させた可能性がある。以上のことから、ALAは卵子の細胞質および細胞膜機能の増強に働くこと

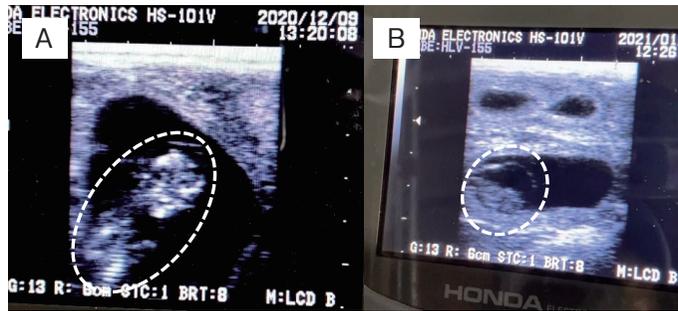


Fig. 2 Ultrasound diagnostic images of the fetus. A : 48 days after ET of fresh embryo. B : 32 days after ET of freeze-thaw embryo. Wavy circle indicates fetus.

で、耐凍性の向上に有効である可能性が示唆された。

3.4 体内発生能の評価

新鮮胚、凍結融解胚を移植した受胎牛の両個体において、発情兆候発現の確認から20~22日後において発情回帰は確認されなかった。超音波画像妊娠診断では、新鮮胚移植した個体AはETから55日後に、胎仔の心拍ならびに形態を確認し、凍結融解胚を移植した個体Bは、ETから38日後に胎膜および胎仔の心拍を確認した (Fig. 2)。ET後の受胎能には、胚の発育段階および形態的品質、胚を構成する細胞や脂質、ミトコンドリアの数および状態など、胚側の要因も多数あげられる。特に、将来胎仔を形成するICM細胞は、胚の着床およびその後の発生に重要なことが明らかとなっており、総細胞数に対するICM細胞の割合が20~40%であることが望ましい¹⁴⁾。本研究では、50 μ M ALA処理区のIVF卵はICM細胞数が最も多く、その割合も40%以上と高い値を示した。したがって、ALA処理によるICM細胞数の増加がET後の受胎能に関与した可能性が考えられる。

4. 要 約

本研究では、強力な抗酸化物質として知られる α -リポ酸 (ALA) 処理による牛体外受精

(IVF) 卵生産技術の高度化を目的として、ALA処理が牛IVF卵の生産効率と得られた受精卵の品質に及ぼす影響ならびに受精卵移植 (ET) 後の体内発生能 (受胎能) に及ぼす影響について検討した。

その結果、体外成熟培養過程における50 μ M ALA処理は、成熟卵子における酸化ストレスを軽減し、細胞質成熟を向上させることで、体外発生能および胚盤胞の品質を改善することが明らかとなった。さらに、50 μ M ALA処理によって生産したIVF卵を用いて、2頭の受胎牛に対して新鮮胚移植ならびに凍結融解胚移植を実施したところ、いずれの場合も十分な受胎能を有することが確認された。

結論として、ALA処理の有効性は、牛IVF卵生産技術の発展に新たな知見を提供し、さらに同技術のさらなる改善に係わる諸要因の解明と産仔生産への応用の可能性が示された。本研究で得られた知見は、牛IVF卵研究の基盤となり、畜産現場における効率のかつ発展的な産仔生産システムの確立に大いに貢献することが期待される。

文 献

- 1) Takahashi, M. : *Journal of Reproduction and Development*, 58, 1~9, 2012.
- 2) Wale, P. L., Gardner, D. K. : *Human Reproduction*

- Update*, **22**, 2~22, 2016.
- 3) Nikoloff, N., Campagna, A., Luchetti, C., Carranza-Martin, A. C., Pascua, A. M., Anchordoquy, J. M., Anchordoquy, J. P., Lombardo, D. M., Seoane, A., Furnus, C. C. : *Theriogenology*, **146**, 152~161, 2020.
 - 4) An, Q., Peng, W., Cheng, Y., Lu, Z., Zhou, C., Zhang, Y., Su, J. : *Journal of Cellular Physiology*, **234**, 17370~17381, 2019.
 - 5) Valko, M., Morris, H., Cronin, M. T. D. : *Current Medicinal Chemistry*, **12**, 1161~1208, 2005.
 - 6) Rochette, L., Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C. : *Molecular Nutrition & Food Research*, **57**, 114~125, 2013.
 - 7) Zhang, H., Wu, B., Liu, H., Qiu, M., Liu, J., Zhang, Y., Quan, F. : *Theriogenology*, **80**, 228~233, 2013.
 - 8) Talebi, A., Zavareh, S., Kashani, M. H., Lashgarbluki, T., Karimi, I. : *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, **29**, 175~183, 2012.
 - 9) Lim, J. M., Liou, S.S., Hansel, W. : *Theriogenology*, **46**, 429~439, 1996.
 - 10) Goisis, M. D., Cibelli, J.B. : *Biology of Reproduction*, **90**, 1~10, 2014.
 - 11) George, F., Daniaux, C., Genicot, G., Verhaeghe, B., Lambert, P., Donnay, I. : *Theriogenology*, **69**, 612~623, 2008.
 - 12) Abe, T., Kawahara-Miki, R., Hara, T., Noguchi, T., Hayashi, T., Shirasuna, K., Kuwayama, T., Iwata, H. : *Journal of Reproduction and Development*, **63**, 455~461, 2017.
 - 13) Chowdhury, M. M. R., Choi, B. H., Khan, I., Lee, K. L., Mesalam, A., Song, S. H., Xu, L., Joo, M. D., Afrin, F., Kong, I. K. : *Theriogenology*, **103**, 173~184, 2017.
 - 14) Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., Gasparrini, B. : *Theriogenology*, **85**, 688~697, 2016.

牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発（Ⅱ）

Development of predictive system of chromosomal abnormality on bovine
in vitro fertilized embryos (II)

杉 村 智 史

(東京農工大学大学院農学研究院)

Satoshi Sugimura

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

Chromosomal abnormalities are one of the causes of low viability of bovine in vitro fertilized (IVF) embryos. This study revealed that >50% of bovine IVF embryos that reached to blastocyst stage have chromosomal aberrations. Chromosomal aneuploidy was confirmed in more than 50% of in vitro fertilized embryos that reached the blastocyst. This was suggested to be a chromosomal aneuploidy of de novo due to in vitro manipulation of the embryo. It was also suggested that it is difficult to predict the chromosomal aneuploidy of bovine IVF blastocysts by conventional morphological quality evaluation or by morphokinetics using time-lapse imaging with light microscope.

1. 目 的

乳用後継牛の激減により、生乳生産量が減少している。他方、和牛繁殖農家戸数の減少により和牛素牛価格が高騰しており、その生産性拡大が急務となっている。そのため、生乳生産を行う雌牛（乳用後継牛）を計画的に確保しつつ、和牛繁殖雌牛や肥育用の和牛子牛（素牛）も増産する必要がある。これらの課題を解決する既存の方法として、乳牛に雌の性選別精液を人工授精して後継牛を生産しつつ、性選別精液を人工授精しない残りの乳牛群には和牛受精胚を移植することで和牛生産する方法が試みられている。これは、農林水産省の「酪農及び肉用生産の近代化を図るための基本方針」にも示されている。現在では受精卵移植による和子牛生産の需要の高まりから、効率的か

つ安価に供給が可能な体外受精卵への期待が高まっている。さらに、世界に目を向けると生産されている受精卵の50%が体外受精卵という報告もあり、本邦でも今後は体外受精卵移植が牛生産技術の一翼を担うことが予想される。しかしながら、牛体外受精卵を移植した場合の受胎率は、30–50%にとどまっており、農家の経済的損失の一因となっている。また、国レベルでもその損失は無視できず、受胎率の向上は農林水産研究基本計画の重要目標の一つとなっている。受胎率の向上において、高品質（生育性の高い）な受精卵を確実に選別することが重要であるが、現在、受精卵の品質は国際胚移植学会（IETS）が推奨する主観的な形態観察でのみ評価されている。そのため、高受胎が期待できる受精卵を客観的かつ確実に選別できる技術の開発が渴望されている。これ

までに、形態学的に良好と判断した牛IVF胚の中にも核や染色体異常を有するものが約半数で含まれていることを明らかにし¹⁾、この染色体異常の有無を予測できないことが受胎率が頭打ちになっている最大の原因であることが示唆されている。したがって、この染色体異常の有無を事前に予測することができれば、受胎率の向上が期待できる。一方で、近年、ヒト生殖補助医療の分野では、次世代シーケンサー (NGS) を用いた染色体異数性解析が注目されているが、解析コストがかかるほか、瞬時に結果が得られないこと、さらに、胚の一部をマイクロマニピュレーターを用いて切除する必要があることが課題としてあげられる。そこで本研究では、染色体異常に関連する新規パラメータをタイムラプスシネマトグラフィ (TLC) を用いて探索することで、牛IVF胚の染色体異常を簡便かつ非侵襲的に予測可能な新技術の開発を目的とする。

2. 材料・方法

2.1 胚の培養とタイムラプス観察

食肉処理場由来卵巣から卵丘細胞卵子複合体 (COCs) を採取した。COCsは5%牛血清および0.1IU/ml卵胞刺激ホルモン添加HEPES-TCM199で20-22時間培養した。その後、BO液により6時間の体外受精を行った。125ul CR1aa培養液を含むマイクロウェル個別培養ディッシュ (LinKID25, 大日本印刷) に受精卵を入れ、タイムラプスシネマトグラフィ (TLC) 搭載インキュベーターで培養および画像所得を行った。TLC画像は15分間隔8日間撮影し、取得した。TLCでは初期卵割のタイミングおよび異常卵割の有無 [Direct Cleavage (DC) : 1細胞から直接3-4細胞に卵割する現象, Reverse Cleavage (RC) : 分裂後に融合する現象, フラグメント : 細胞質の断片化] を解析した。

2.2 受精胚のコピー数多型解析

体外培養後7日もしくは8日の胚盤胞の透明帯を除去し、PVP-PBS 2 μ lを含むPCRチューブに1個ずつ入れた。SurePlex (illumina) により全ゲノム増幅 (WGA) を施した後、VeriSeq PGS kit (illumina) を用いてライブラリーを作成し、次世代シーケンサーMiSeq (illumina) によるシーケンシングを行った。Btau_4.6.1/bos Tau7のY染色体の配列を追加したBos taurus参照ゲノムARS-UCD1.2/bos Tau9にマッピングした。その後、bowtie2を用いて抽出したユニークリードをSAMtools v1.8を用いてBAMファイルに変換した。全29本の常染色体とX染色体において、CNV-seqを用いて解析を行った²⁾。

2.3 統計解析

発生カイネティクスと染色体異数性との関係については、t-検定、それ以外の有意差検定においては、カイ二乗検定を用いた。p < 0.05を統計学的に有意とした。統計解析にはRを用いた。

3. 結果・考察

3.1 体外受精胚および体内受精胚における染色体異数性

国際胚技術学会 (IETS) の基準をもとに、変性部位が50%以下の胚を移植可能胚であると判断した。移植可能と判断した全32個の体外受精胚のうち、Aneuploid胚は18個 (56.25%)、Euploid胚は14個 (43.75%) であった。Aneuploid胚のうち、ICMのみaneuploidの胚は3個 (16.7%)、TEのみaneuploidの胚は9個 (50.0%)、ICMおよびTE双方でaneuploidの胚は6個 (33.3%) であった。移植可能胚のうち、半数以上の胚がAneuploid胚であり、ICMおよびTE双方でaneuploidの胚よりも、ICMもしくはTEいずれかでaneuploidの胚のほうが多く認められた (Fig. 1A)。

移植可能と判断した全8個の体内受精胚のう

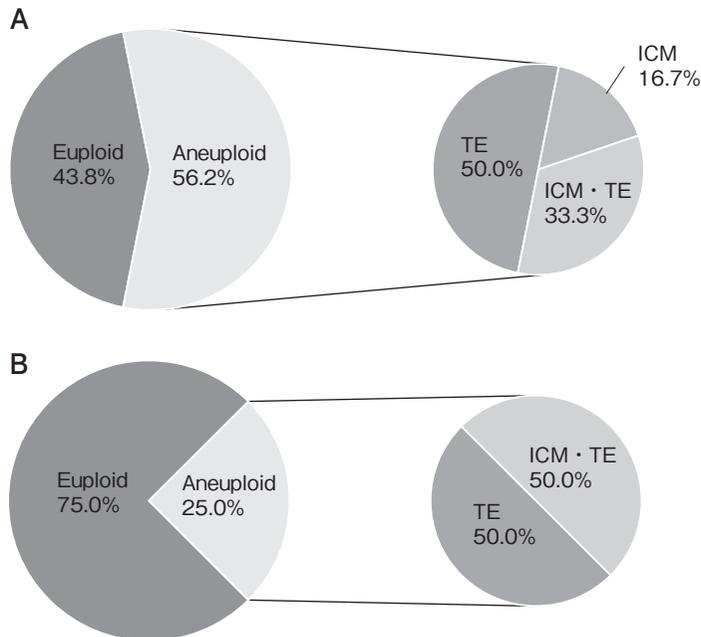


Fig. 1 Frequency of chromosomal aneuploidy in in vitro fertilized (A) and in vivo fertilized embryos (B). ICM, TE, ICM·TE show aneuploid in inner cell mass only, trophoblast only, and both ICM and TE, respectively.

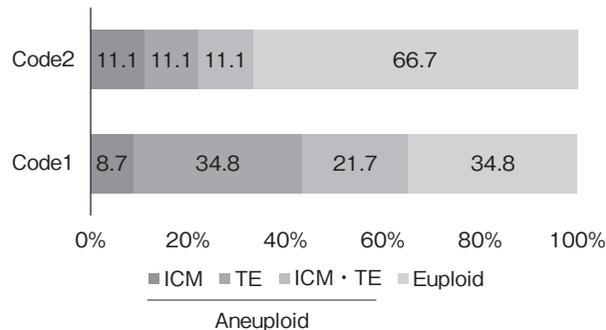


Fig. 2 Relationship between morphological quality and chromosomal aneuploidy. ICM, TE, ICM·TE show aneuploid in inner cell mass only, trophoblast only, and both ICM and TE, respectively.

ち、Aneuploid胚は2個(25%)、Euploid胚は6個(75%)であった。Aneuploid胚のうち、TEのみAneuploidの胚は1個(50%)、ICMおよびTE双方でaneuploidの胚は1個(50%)であった(Fig. 1B)。以上の結果より、胚盤胞における高頻度での染色体異常性は体外受精特有の現象であることが示された。

3.2 形態的品質コードと染色体異常性との関係
IETSによる胚の品質評価基準にしたがって、

移植可能胚をさらに2つのグレードに分けて評価した。変性部位が15%以下のものはCode1、変性部位が50%以下のものはCode2とした。Code1の胚は23個、Code2の胚は9個であった。Code1とCode2の胚で、Euploid胚、ICMのみAneuploidの胚、TEのみAneuploidの胚、ICMおよびTE双方でaneuploidの胚の割合を比較したいずれの群でもCode1とCode2において有意差は認められなかった。計24個のCode1の胚のうち、Aneuploid

Table 1 Duration of each cell cycle of aneuploid and euploid bovine IVF embryos. Values indicate mean \pm SD.

	cc1	cc2	cc3	cc4
Aneuploid	26.34 \pm 1.40	10 \pm 0.81	8.74 \pm 1.07	48.26 \pm 13.41
Euploid	26.51 \pm 1.98	9.86 \pm 1.05	8.21 \pm 0.86	47.34 \pm 1.91

胚は15個 (62.5%) であり, 形態的評価により excellent もしくは good と判断した胚のなかにも, Aneuploid胚が半数以上存在していた (Fig. 2)。以上, 従来の形態学的な品質評価では染色体異数性の可否は予測できないことが示された。

3.3 発生速度と染色体異数性との関係

TLCによって2細胞 (t2), 3細胞 (t3), 5細胞 (t5), 9細胞 (t9) の出現のタイミングを観察し, cc1 (=t2), cc2 (=t3-t2), cc3 (=t5-t3), cc4 (=t9-t5) の期間を算出した。Aneuploid胚とEuploid胚を比較したところ, cc1からcc4のいずれの期間においても有意差は認められなかった (Table 1)。

3.4 異常卵割と染色体異数性との関係

第一卵割でDCを起こした胚は全8個であった。このうちEuploid胚は5個 (62.5%), Aneuploid胚は3個 (37.5%) であった。また, 部位別に見ると, TEのみaneuploidの胚が4個 (80%), ICMとTE双方でaneuploidの胚が1個 (20%) であった。また, RCを起こした胚は1個であり, この胚はICMのみaneuploidの胚であった。フラグメントを放出した胚は2個であった。そのうち1個はEuploid胚であり, 1個はICMのみaneuploidの胚であった。以上の結果から, 必ずしも異常卵割が染色体異数性の原因になるとは限らないことが示唆された。一方で, 胚盤胞に到達した胚の約12%が多前核を有すること³⁾, 異常卵割した多くの胚が混倍数体であることを明らかにしている⁴⁾。今回用いた染色体解析方法では, 半数体や多倍体といった倍数性の異常を検出できな

いことから, 今後は倍数性の解析も含めた染色体の解析が必要である。

4. 要 約

胚盤胞に到達した体外受精胚の50%以上で染色体異数性が確認された。これは, 胚の体外操作に起因するde novoの染色体異数性であることが示唆された。また, 従来の形態学的品質評価が可視光タイムラプスによる発生カイネティクスによる評価では, 牛IVF胚盤胞の染色体異数性を予測することは困難であることが示唆された。

文 献

- 1) Yao, T., Suzuki, R., Furuta, N., Suzuki, Y., Kabe, K., Tokoro, M., Sugawara, A., Yajima, A., Nagasawa, T., Matoba, S., Yamagata, K., Sugimura, S. : Live-cell imaging of nuclear-chromosomal dynamics in bovine in vitro fertilised embryos, *Sci Rep*, 8, 7460, 2018.
- 2) Nagai, H., Okada, M., Nagai, Y., Sakuraba, Y., Okae, H., Suzuki, R., Sugimura, S. : Abnormal cleavage is involved in the self-correction of bovine preimplantation embryos, *Biochem Biophys Res Commun*, 562, 76~82, 2021.
- 3) Suzuki, R., Okada, M., Nagai, H., Kobayashi, J., Sugimura, S. : Morphokinetic analysis of pronuclei using time-lapse cinematography in bovine zygotes, *Theriogenology*, 166, 55~63, 2021.
- 4) Sugimura, S., Akai, T., Hashiyada, Y., Somfai, T., Inaba, Y., Hirayama, M., Yamanouchi, T., Matsuda, H., Kobayashi, S., Aikawa, Y., Ohtake, M., Kobayashi, E., Konishi, K., Imai, K. : Promising system for selecting healthy in vitro-fertilized embryos in cattle, *PLoS One*, 7, e36627, 2012.

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 (Ⅲ)

Study of circulating microRNA as biomarker for pregnancy in cattle (Ⅲ)

木崎 景一郎・金澤 朋美・高橋 透

(岩手大学農学部共同獣医学科)

Keiichiro Kizaki, Tomomi Kanazawa and Toru Takahashi

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

The development of new early pregnancy diagnostic methods is very important in considering livestock productivity. However, the method for early and reliable diagnosis has not been established at present. In this study, we showed that miR-2455 is an optimal reference gene for comparing plasma miRNA content in estrous cycle cows and pregnant and non-conceived cows on day 21 after artificial insemination. In addition, further validation was performed on seven plasma miRNAs, which are candidates for gestational diagnostic biomarkers at day 21 post-artificial insemination in cattle. These results suggest that miR-G has a specific low level in pregnant herds and may be an indicator for diagnosing pregnancy. There was no significant difference in other miRNAs between pregnant and non-pregnant cows, but there was a trend toward higher levels at pregnancy compared to non-pregnant cows when compared individually, suggesting that a possible indicator of pregnancy may be provided by examining comparative methods.

1. 目 的

畜産業において、空胎期間をできるだけ短くすることは繁殖成績の評価や生産性向上のために重要であり、人工授精後に不受胎牛を早期に発見する必要がある。牛においては、発情周期日数である21日以内に受胎していない個体を発見することで次の発情時に速やかに再授精を行うことができる¹⁾。牛の妊娠診断法として、現在日本では主に直腸検査法、超音波診断法、ノンリターン法などが用いられている。直腸検査法では早くても人工授精後30日以降で可能である。超音波診断法では最短で人工授精後25~27日以降で診断が可能で

あるが、早期における正確な診断には熟練した手技が必要である²⁾。こうした背景から、簡易かつ低侵襲的に採取可能な血液の検査による妊娠診断法が求められている。近年では、末梢白血球の遺伝子発現を指標とした手法³⁾や、血液中の妊娠関連糖タンパク質を指標とした手法⁴⁾も提案されている。

マイクロRNA (microRNA, miRNA) は、21~25塩基対の短い一本鎖non-coding RNAであり、遺伝子発現の調節において重要な役割をもっている⁵⁾。miRNAの前駆体はヘアピン構造をもつpre-miRNAで、RNA polymerase IIによって転写されたpri-miRNAがRNase IIIの一種である

Droshaによって切断されることで生成される。pre-miRNAは核内から細胞質へ輸送され、同じくRNase IIIの一種であるDicerによって切断されることで2本鎖miRNAとなる。2本鎖miRNAはArgonaute2 (Ago2) タンパク質と複合体を形成することで1本鎖の成熟型miRNAとなり、さらに標的のメッセンジャーRNA (mRNA) と特異的に結合し、標的mRNAの翻訳抑制や切断を引き起こす。miRNAはこのようにして遺伝子の発現を調節することで、生体内のさまざまな生理的現象を制御していると考えられている。細胞で生成されたmiRNAはその細胞内で働くだけでなく、エクソソームなどの細胞外小胞や高密度リポタンパク質 (HDL) などのリポタンパク質に内包されたり、Ago2タンパク質と結合した状態で細胞外に分泌され、輸送された他の細胞に影響を与える。血液中を循環するmiRNAの種類は生体内の現象を反映しているとされ、がんをはじめとした各種疾病のバイオマーカーとしての利用が盛んに研究されている⁶⁾。一方で、獣医療においては近年、循環miRNAが牛のヨーネ病や乳房炎診断のバイオマーカーとしての可能性が報告されている^{7, 8)}が、実用化された例はまだない。

昨年度までの伊藤記念財団助成研究によって、人工授精後18および21日目における牛血中miRNAのプロファイル、さらには発情周期におけるmiRNAの動態が明らかになった。そこで本研究では、血中miRNAに着目した牛の早期妊娠診断法の基盤確立を目指す。具体的には、昨年度までの成果をもとに、多数例の受胎および不受胎牛の試料を用いた実証試験を実施することによって、標的miRNA分子種を用いた妊娠診断の陽性的中率および陰性的中率の解析を実施し、判定可能日齢を含めた妊娠診断の精度を検証し、基準策定の基盤を構築する。

2. 方 法

2.1 供試材料

人工授精後21日目 (D21) の黒毛和種牛から採血を行い、超音波検査による妊娠診断 (人工授精後40日目頃) の結果により妊娠牛群 (P21, n=22) および不受胎牛群 (NP21, n=15) に分けた。また、人工授精前の発情周期牛から採血を行い、発情周期牛群サンプルとした (E, n=5)。採取した血液サンプルから前述のとおりにして血漿を分離し、-80℃で保存した。

2.2 miRNA抽出と定量的リアルタイムRT-PCR

血漿試料からのmiRNA抽出にはmiRNeasy Serum/Plasma Kit (QIAGEN) を使用し、Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit (TAKARA) を用いて逆転写反応を行い、miRNAからcDNAを合成した。定量的リアルタイムPCRには、KOD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を使用し、7300リアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) により増幅反応および検出を行った。本実験では、昨年度まで本助成研究で同定したmiR-AからDを検証した (現在論文執筆中であることから、ここでは具体名の記載はせず、AからDとした)。なお、リファレンスmiRNA (内在性コントロール) には、同様に先行研究で明らかにしたmiR-2455およびmiR-128を使用した。

2.3 Receiver operating characteristic curve (ROC) 解析

人工授精後21日目の妊娠牛・非妊娠牛群における血漿中含有量に有意差のあったmiRNAに関して、診断の指標とした場合の妥当性を評価した。JMP統計解析ソフトウェア (SAS Institute, USA) によりROC解析を行い、ROC曲線線下面積 (Area under curve: AUC) およびカットオフ値 (Youden's index) を算出した。算出した

カットオフ値と超音波診断による診断結果から感度、特異度、陽性的中率および陰性的中率を求めた。感度 = $(TP/TP + FN) \times 100$ 、特異度 = $(TN/TN + FP) \times 100$ 、陽性的中率 = $(TP/TP + FP) \times 100$ 、陰性的中率 = $(TN/TN + FN) \times 100$ から算出した。TP: True Pregnant, 血漿中miR-126-3pによる診断において妊娠と診断され、かつ超音波診断装置による診断においても妊娠と診断されたもの。FP: False Pregnant, 血漿中miRによる診断において妊娠と診断されたが、超音波診断装置による診断では非妊娠と診断されたもの。TN: True Nonpregnant, 血漿中miRによる診断において非妊娠と診断され、かつ超音波診断装置による診断においても非妊娠と診断されたもの。FN: False Nonpregnant, 血漿中miRによる診断において非妊娠と診断されたが、超音波診断装置による診断では妊娠と診断されたもの。

3. 結果と考察

3.1 血漿中miRNA定量におけるリファレンス遺伝子の検討

昨年度までの研究において、D21妊娠牛群および不受胎牛群間の比較でリファレンス遺伝子として適切であることが示されたmiR-2455、および既報の論文でリファレンス遺伝子として用いられていたmiR-128の2個のmiRNAについて、発情

周期も含めたりファレンス遺伝子としての妥当性を検討した。発情周期0~20日における平均血漿中含量と、D21妊娠牛群および不受胎牛群における血漿中含量を比較したところ、各群の間に有意差は認められなかった (Fig. 1)。

RT-qPCRによる定量では、適切なリファレンス遺伝子によるデータの標準化が重要であり、誤ったリファレンス遺伝子の選択は定量結果に大きく影響する⁹⁾。通常、細胞や組織で発現する遺伝子の発現解析では、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenaseやbeta-actinなどといったハウスキーピング遺伝子が用いられるが、血漿中におけるリファレンス遺伝子についてはまだ確立していない部分が多い¹⁰⁾。本研究では、リファレンス遺伝子としてmiR-2455およびmiR-128の二種類に着目し、血漿中含量を調べたところ、今回比較対象とした三群の間では安定しており、リファレンス遺伝子として適切であった。しかし、miR-128に関しては、miR-2455や測定した他のmiRNA分子種に比べて血漿中含量が少ないことから、発情周期牛と妊娠・不受胎牛の血漿中miRNA含量の測定において、血漿中含量が十分あり安定性の高いmiR-2455のほうがリファレンス遺伝子としてはより適切であるといえる。

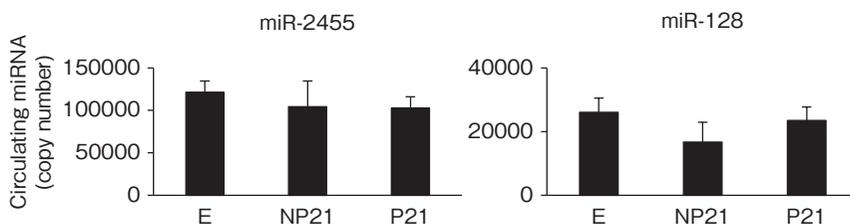


Fig. 1 Abundances of circulating miR-2455 and -128 in estrous, pregnant and non-pregnant cows. Plasma miR-2455 and -128 quantities were measured by quantitative RT-PCR. Peripheral blood was collected from estrous cycle (E), day 21 pregnant (P21) and day 21 non-pregnant (NP21) cows.

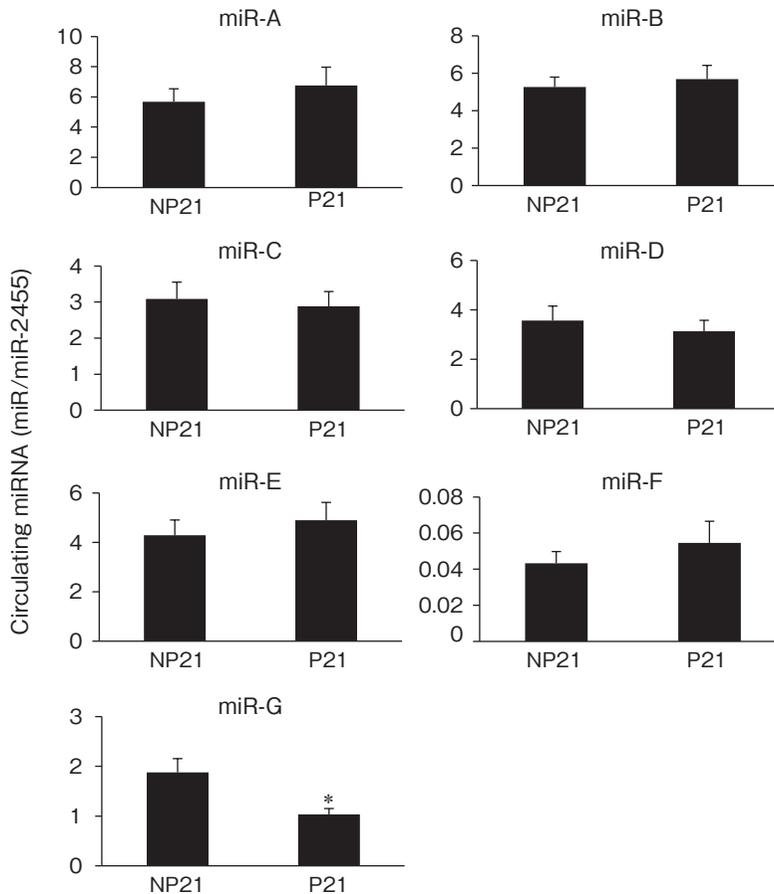


Fig. 2 Circulating miRNA quantities in pregnant and non-pregnant cow on day 21 gestation. Circulating miRNA (miR-A to G) from day 21 pregnant (P21) and day 21 non-pregnant (NP21) cows were analyzed by quantitative RT-PCR. Each values represent number of detected miRNA. Data are shown as mean \pm SEM. * $p < 0.05$.

3.2 小規模実証試験

D21妊娠牛および不受胎牛における血漿中miRNA含有量について、さらに試料数を増やした検証を行った。各種miRNAの血漿中含量については、miR-Gが妊娠牛群で有意に低値を示したが、そのほかのmiRNAに関しては両群で有意な差は認められなかった (Fig. 2)。miR-Gに関して、実際に診断に用いた際の妥当性をROC解析により評価した。算出されたカットオフ値は1.25であった。また、検査法としての診断能の程度を示すAUCは0.75であり、中程度の妥当性であると予測された (Fig. 3)。ROC解析により算出

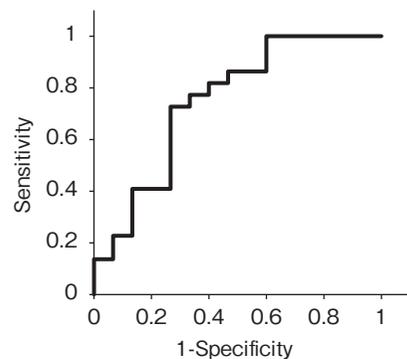


Fig. 3 ROC curve of circulating miR-G as a biomarker for diagnosis of gestation.

The values of circulating miR-G from day 21 pregnant (P21) and day 21 non-pregnant (NP21) cows were analyzed by ROC curve analysis.

されたカットオフ値に基づいて血中miR-G値による妊娠診断を行った結果と、超音波診断法による診断の結果から算出した感度は73%、特異度は73%、陽性的中率は80%、陰性的中率は67%であった。miR-GのROC解析により算出されたAUCは0.75であり、現段階では診断法としての妥当性は高くないことが示された。人工授精後の牛においては、再授精に備えて不受胎牛を早期に摘発することが重要である。したがって、人工授精後21日目における早期妊娠診断法では特異度が高いことが望ましいが、現段階での血中miR-Gを用いた診断の特異度は73%と高くはなかった。診断法としての実用化に向けては、今後さらに検体数を増やした検証を行う必要がある。miR-Gはさまざまな動物種の間で保存されているmiRNAであり、免疫や血管新生の経路に関与しているとされる。一方で妊娠に関連する報告はまだなく、妊娠牛血漿における含有量の低下の機序に関しても今後の課題であると考えている。

さらに、連続して人工授精を行った個体に関して、それぞれのD21における血漿中miRNA含有量を比較した (data not shown)。最初の人工授精で不受胎、次の人工授精で妊娠した個体においては、不受胎時に比べて受胎時にいくつかのmiRが有意に高値、もしくは高値となる傾向がみられた。最初の人工授精で不受胎、次の人工授精でも不受胎であった個体に関しても同様の比較を行ったところ、いずれのmiRに関しても血漿中含量の変化は認められなかった。これらの結果は、各miRの血漿中含量には個体差が存在するが、各個体では妊娠により血漿中含量が増加する可能性を示唆している。

4. 要 約

新たな早期妊娠診断手法の開発は、家畜の生産性を考えるうえで非常に重要である。しかし、早

期にかつ確実に診断する方法は確立されていないのが現状である。本研究では、まず発情周期牛および人工授精後21日目の妊娠・不受胎牛における血漿中miRNA含有量を比較する際のリファレンス遺伝子として、miR-2455が最適であることを示した。さらに、牛の人工授精後21日目における妊娠診断バイオマーカー候補である7個の血漿中miRNAについて、さらなる検証を行った。その結果miR-Gが妊娠牛群で特異的な低値を示し、妊娠診断の指標となることが示唆された。また、他のmiRに関しては、妊娠牛群と不受胎牛群の間で有意な差は認められなかったものの、個体別に比較すると非妊娠時に比べて妊娠時に高値となる傾向がみられ、比較方法を検討することで妊娠の指標となる可能性があることが示唆された。

文 献

- 1) Lucy, M., Green, J., Poock, S. : *Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle (August 31-September 1)*, 367~375, 2011.
- 2) Balhara, A. K., Gupta, M., Singh, S., Mohanty, A. K., Singh, I. : *The Scientific World Journal*, 958540, 2013.
- 3) Kizaki, K., Shichijo-Kizaki, A., Furusawa, T., Takahashi, T., Hosoe, M., Hashizume, K. : *Reproductive Biology and Endocrinology*, 11, 6, 2013.
- 4) Reese, S. T., Pereira, M. H. C., Edwards, J. L., Vasconcelos, J. L. M., Pohler, K. G. : *Theriogenology*, 106, 178~185, 2018.
- 5) Bartel, D. P. : *Cell*, 116, 281~297, 2004.
- 6) Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, R. M., et al. : *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 10513~10518, 2008.
- 7) Farrell, D., Shaughnessy, R. G., Britton, L., MacHugh, D. E., Markey, B., Gordon, S. V. : *PLoS One*, 10, e0134310, 2015.
- 8) Lai, Y. C., Fujikawa, T., Maemura, T., Ando, T., Kitahara, G., Endo, Y., Yamato, O., Koiwa, M., Kubota, C., Miura, N. : *PLoS One*, 12, e0177182, 2017.
- 9) Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., Neuvians, T. P. : *Biotechnology Letter*, 26, 509~515, 2004.
- 10) Liu, X., Zhang, L., Cheng, K., Wang, X., Ren, G., Xie, P. : *Journal of Affective Disorders*, 163, 133~139, 2014.

妊娠末期の黒毛和種における子宮動脈血流動態および胎盤の血流面積による胎盤機能および新生子牛の健全性の推定

Estimation of placental function in dums and health of newborn in Japanese Black cattle based on uterine arterial and placental blood flow hemodynamics in late pregnancy

伊 賀 浩 輔

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター畜産飼料作研究領域)

Kosuke Iga

(Division of livestock and Forage Research, Tohoku Agricultural Research Center, NARO)

In this present study, the relationship between the peripheral blood estrone sulfate (EIS) concentration of Japanese Black cows and the uterine artery blood flow (BFV) dynamics on the pregnant horn side or the placental blood flow area (PBFA) at the end of pregnancy, and the relationship between these blood flow dynamics and the birth weight and vitality of newborn calves were investigated. As a result, peripheral blood EIS and BFV in cows that delivered normal calves (N group : n=9) were increased significantly ($p<0.05$) from day 270 to 290 of pregnancy, and there were showed similar transition pattern. The ratio of PBFA remained in the range of 0.13 ± 0.01 to 0.14 ± 0.01 regardless of the days of pregnancy, and it showed a different transition pattern from the peripheral blood EIS production rate. The peripheral blood EIS concentration in the stillbirth (S group : n=1) remained lower than that in the N group regardless of the days of pregnancy. In addition, the ratio of PBFA was lower than that of the N group and decreased from 0.12 to 0.08 on the 275 to 280 days of pregnancy. On the other hand, with some exceptions in N group, when BFV at the near the day of parturition is high, the birth weight is heavy, and when BFV is low, it is light. In the S group, BFV was lower than in the N group, and the birth weight was the lightest at 29 kg. The ratio of PBFA at the near the day of parturition was concentrated in the range of 0.1 to 0.15 regardless of the birth weight of newborn calves, but it was low (0.08) in the S group. In conclusions, it was suggested that the normality of placental function and fetal development could be evaluated by examining BFV dynamics or the ratio of PBFA on Japanese Black cows in the end of pregnancy.

1. 目 的

2017年度農林水産省家畜共済統計によると、肉用牛の胎子・出生子牛の死産事故のうち新生子牛

常が60%を占めており、そのうち子牛虚弱症候群やその他の胎子異常が大部分を占めている。加えて、難産を起因とする母牛の廃用や分娩後の繁殖機能の回復遅延などを含めると、潜在的な子牛生

産に及ぼす影響は大きく、安定的な子牛生産は期待できない。

妊娠末期に胎盤性ステロイドホルモンであるエストロンサルフェート (E1S) を経時的に測定することで、胎盤発育と機能の正常性だけでなく、新生子牛の体重・活力 (自力で起立・吸乳) を推定できることが報告されている¹⁾。しかしながら、E1S測定系構築に要する時間やコスト、あるいは診断薬として販売されていないことから、臨床現場での利用は限定されている。

近年、繁殖検診に利用する一部のポータブル型超音波画像診断装置に血流動態の測定が可能なカラーおよびパルスドプラ機能が標準装備されている。これらの機能を利用して、牛黄体の血流分布と黄体機能、ならびに受胎性との関係²⁾、妊娠経過に伴う子宮動脈血流量の推移などが報告されており³⁾、最近では、臨床現場においても黄体の血流分布を指標とした黄体機能や受胎性の評価が試みられている。一方、未発表の成果であるが、自力で起立・吸乳できず、その後死亡した生時体重15kgの低体重子を分娩した黒毛和種牛において、妊娠末期の妊娠角側子宮動脈血流量は正常体重子を分娩した群と比較して低く推移する所見を得ている。この結果は、妊娠末期に妊娠角側子宮動脈血流量を測定することで、新生子牛の体重・活力を推定できる可能性を示唆している。

そこで本研究課題では、臨床現場において、胎盤発育と機能の正常性、ならびに新生子牛の体重・活力を簡便に推定できる診断法の開発のため、妊娠末期の黒毛和種牛の末梢血E1S濃度と妊娠角側子宮動脈血流動態、あるいは胎盤の血流面積との関係、これら血流動態と新生子牛の体重・活力との関係を調べた。

2. 方 法

2.1 妊娠末期の黒毛和種牛における末梢血E1S濃度と妊娠角側子宮動脈血流動態、または胎盤の血流動態との関係

妊娠末期の黒毛和種牛10頭を供試し、妊娠270日から分娩まで5日ごとに頸部静脈よりヘパリン加真空採血管を用いて採血した。血液は遠心分離後、血漿を採取しE1S濃度の測定まで -35°C で保存した。血漿中E1S濃度は市販のELISA kit (Estrone-3-sulfate ELISA kit, Arbors Assay LLC, No. K038-H1) を用いて測定した。また、妊娠270日から分娩まで5日ごとにカラーおよびパルスドプラ機能を有する超音波画像診断装置 (ARIETTA 60, 日立アロカメディカル (株)) を用い、妊娠角側子宮動脈血流量 (BFV) の推移を調べるとともに、直腸検査により触知可能な複数個の胎盤の直径および血流分布を調べた。なお、BFVの測定、ならびに胎盤の血流分布の観察に使用したカラーおよびパルスドプラの設定はTable 1に示した。妊娠270日から分娩まで5日ごとにカラーおよびパルスドプラ機能を用い、超音波画像診断装置の自動計測機能を用いて1分間当たりのBFV (ml/min) を調べた。測定した各妊娠日数のBFVは妊娠270日のBFVに対する百分率を算出した。また、カラードプラ機能を用い、直腸検査により触知可能な複数個の胎盤の最大直径における血流分布状況を調べた。カラードプラ画像は保存し、画像解析ソフト (Image J, Wayne Rasband (NIH)) を用いて胎盤面積に占める血流面積の割合 (PBFA) を算出し、末梢血E1S濃度、BFVおよびPBFAとの関係を調べた。

2.2 新生子牛の体重・活力と妊娠角側子宮動脈血流動態、または胎盤の血流動態との関係

2.1の妊娠末期の黒毛和種牛10頭を供試し、末

Table 1 Setting of ultrasound imaging diagnostic apparatus for measuring uterine artery blood flow on the pregnancy horn side and placental blood flow distribution.

		Uterine artery blood flow	Placental blood flow distribution
B mode	Frequency	7.5 MHz	6.5 MHz
	Gain	72	65
	Dynamic range	70	65
Doppler mode	Frequency	1.6-6.25 MHz	1.3-6.25 MHz
	Color gain	115	115
	Velocity	10.0 cm/s	8.18 cm/s
	Angle	60°	

梢血E1S濃度, BFV, またはPBFAと新生子牛の生時体重・活力との関係を調べるため, 新生子牛の生時体重は分娩後8時間以内に測定するとともに, 活力は目視, あるいは分娩監視カメラの画像より自力で起立・吸乳したか否かで評価した。また, 末梢血E1S濃度, BFVおよびPBFAは, それぞれ分娩日直前に測定した濃度, BFVおよびPBFAを解析に用いた。

3. 結果と考察

3.1 妊娠末期の黒毛和種における末梢血E1S濃度と妊娠角側子宮動脈血流動態, または胎盤の血流動態との関係

本研究に供試した妊娠末期の黒毛和種牛の概要, 新生子牛の生時体重や性別, 分娩後の供試牛および新生子牛の所見はTable 2に示した。10頭の供試牛のうち, 1頭は死産であり, 9頭は正常な子牛を分娩した。供試牛 ($n = 10$) の平均妊娠日数は 292.4 ± 1.4 日であったことから, 本研究では, 妊娠270~290日の末梢血E1S濃度, BFVおよびPBFAのデータを用い, 正常な子牛を分娩した群 (N群) および死産した群 (S群) に分類し, 妊娠末期の黒毛和種牛における末梢血E1S濃度とBFV, またはPBFAとの関係を調べた。その結果, N群の末梢血E1S濃度およびBFVは妊娠日数の経過に伴い有意 (それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.03$)

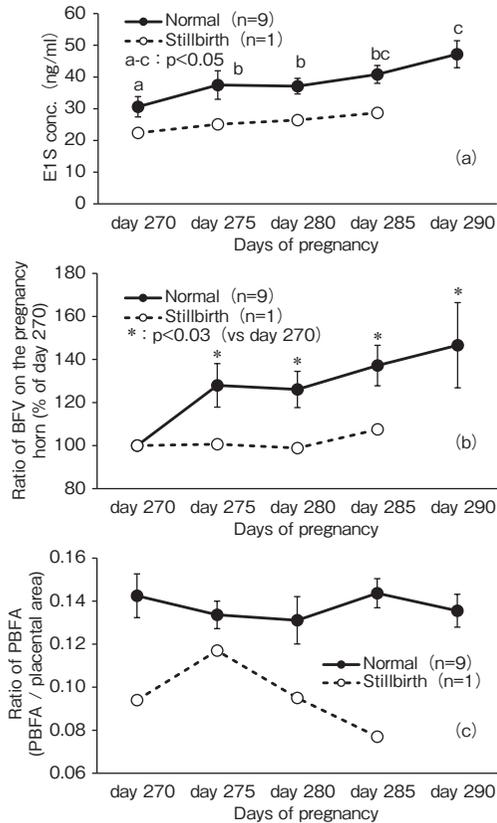
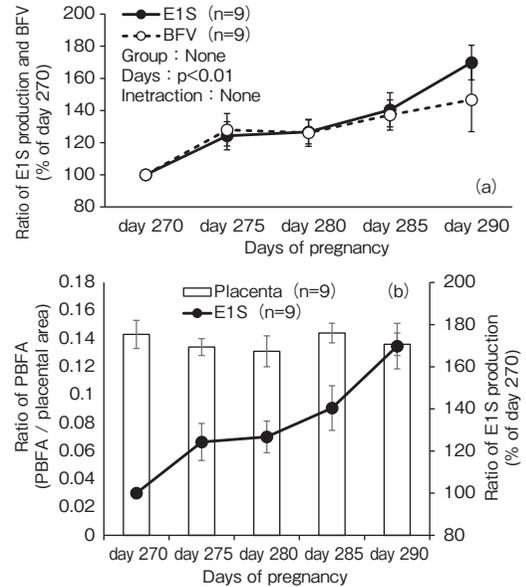
に増加した。しかしながら, S群の末梢血E1S濃度およびBFVは, 妊娠日数の経過に関わらずN群と比較して低値を推移した (Fig. 1a および 1b)。さらに, N群の末梢血E1S産生割合およびBFVは同様の推移パターンを示した (Fig. 2a)。一方, N群のPBFAは妊娠日数が経過しても $0.13 \pm 0.01 \sim 0.14 \pm 0.01$ の範囲を推移し, 妊娠日数間に有意な差は認められなかった。S群のPBFAはN群と比較して低値であり, 妊娠275~285日にPBFAは最大比の0.12から0.08まで低下した (Fig. 1c)。さらに, N群の末梢血E1S産生割合およびPBFAは異なる推移を示した (Fig. 2b)。

3.2 新生子牛の体重・活力と妊娠末期の黒毛和種における末梢血E1S濃度, 妊娠角側子宮動脈血流動態, または胎盤の血流動態との関係

供試牛は3.1と同様にNおよびS群に分類し解析した。その結果, N群において分娩日直近の末梢血E1S濃度が高い (≥ 40.0 ng/ml) と新生子牛の生時体重は重く (31~46kg), E1S濃度が低い (< 40.0 ng/ml) と生時体重は軽い (29kg) ことが示され, 特にS群の分娩日直近の末梢血E1S濃度は28.7 ng/ml, 生時体重は29kgであった (Fig. 3a)。また, N群において一部例外はあるが, 分娩日直近のBFVが多いと新生子牛の生時体重は重く, BFVが少ないと生時体重は軽くなること

Table 2 Age, reproductive history, days of pregnancy, birth weight and sex, and postpartum clinical findings on Japanese Black cows and newborn calves.

Cow No.	Age	Reproductive history	Days of pregnancy	Newborn calf		Postpartum clinical findings	
				Birth weight (kg)	Sex	Cows	Newborn calf
B938	2	1	293	41	♂	Assistance, Released placenta	Stand up and suckling
B920	3	1	286	34	♂	Released placenta	Stand up and suckling
B445	7	5	289	42	♀	Released placenta	ET, Stand up and suckling
B638	6	2	297	46	♂	Released placenta	Stand up and suckling
B849	3	2	300	41	♂	Released placenta	Stand up and suckling
B317	9	7	287	29	♀	Released placenta	ET, Stillbirth
B1852	1	0	292	40	♂	Assistance, Released placenta	Stand up and suckling
B1903	2	0	293	41	♂	Assistance, Released placenta	Died 40 min postpartum
B204	10	8	292	31	♀	Released placenta	Stand up and suckling
B326	10	6	295	39	♂	Released placenta	Stand up and suckling

**Fig. 1** Comparisons of the peripheral blood estrone sulfate (EIS) concentration (a), the ratio of uterine artery blood flow volume (BFV) on the pregnancy horn side (b) and the ratio of placental blood flow area (PBFA) from 270 to 290 days of pregnancy in Japanese Black cows (c) that delivered normal calves and stillborn.**Fig. 2** Relationship between the ratio of the peripheral blood estrone sulfate (EIS) production and uterine blood flow volume (BFV) on the pregnancy horn side (a), or the ratio of EIS and placental blood flow area (PBFA) from 270 to 290 days of pregnancy on Japanese Black cows (c).

が示された (Fig. 3b)。S群においては、N群と比較してBFVが少なく、新生子牛の生時体重も29kgと最も軽かった。一方、分娩日直近のN群におけるPBFAは、新生子牛の生時体重に関わらずPBFAが0.1~0.15の範囲に集中したが、S群の

PBFAは0.08と低値であった (Fig. 3c)。以上の結果から、妊娠末期の黒毛和種牛において、BFVは胎子発育や胎盤機能の評価指標として利用可能であり、また、妊娠末期のPBFAも胎子発育や胎盤機能の評価指標となり得る可能性が示唆された。

妊娠257~271日の黒毛和種牛において、子牛の生時体重が正常および低体重に関わらず母体の血中E1S濃度は増加する。しかし、低体重子では正常体重子と比べてE1S濃度は低く、子牛体重との間に正の相関が認められ、虚弱子では母体の血中E1S濃度は低値を推移する。これらのことから胎

子の発育および活力は胎盤機能と密接な関係があり、母体の血中E1S濃度はこれらを的確に反映する指標となり得ることが報告されている¹⁾。本研究においても、妊娠末期の黒毛和種牛における末梢血E1S濃度は妊娠日数の経過に伴い有意な増加を示し、死産した供試牛では低値を推移 (22.4~28.7 ng/ml) することから、過去の報告と同様に、妊娠末期の黒毛和種牛において、血中E1S濃度は胎子発育や胎盤機能を反映する指標であることが示された。

肉用牛 (アンガス種) において、妊娠の経過に伴いBFVは増加する。妊娠90日以降から妊娠および非妊娠角側のBFVに差が生じ始め、その後、胎子発育に伴い妊娠角側BFVは増加し、分娩前に最大流量に達する³⁾。本研究においても、分娩日直近のBFVは妊娠270日と比較して有意に高く、特に、死産した供試牛において、分娩日直近のBFVは妊娠270日と比較して増加するが、正常な子牛を分娩した供試牛と比較して低値を推移することが示された。新生子牛の生時体重およびBFVとの関係を調べた結果、BFVの低い供試牛が分娩した新生子牛の生時体重は低い。また、未発表の成果であるが、自力で起立・吸乳できず、その後死亡した生時体重15kgの低体重子を分娩した黒毛和種牛において、妊娠末期のBFVは正常体重子を分娩した群と比較して低く推移する所見を得ていることから、BFVと胎子発育や健全性には密接な関係があると考えられ⁴⁾、BFVを指標とした胎子発育の正常性評価の可能性が示唆される。

一般的に胎盤は母体・胎子間で呼吸ガス、栄養素および老廃物の交換が行われる器官であり、胎盤を介したこれらの交換は、子宮および臍帯の血流に依存していることが知られている。ヒツジでは生時体重と胎盤重量に正の相関が認められ、また、子宮や臍帯動脈血流量と胎盤重量にも正の相

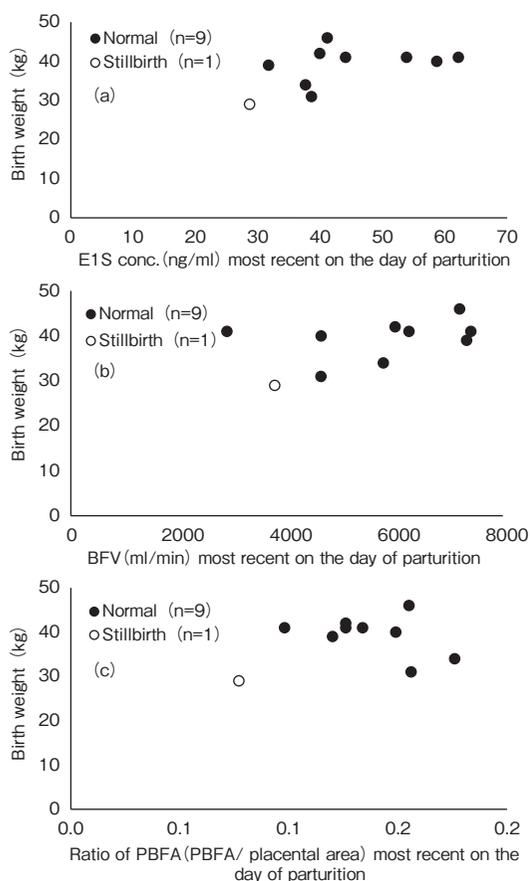


Fig. 3 Relationship between the birth weight of newborn Japanese Black calves and the peripheral blood estrone sulfate (E1S) concentrations (a), uterine artery blood flow (BFV) on the pregnancy horn side (b), or the ratio of the placental blood flow area (PBFA) most recent on the days of parturition (c).

関が認められており⁵⁾、子宮や臍帯動脈血流量の増減が胎子発育や胎盤機能に影響を及ぼすことが報告されている⁶⁾。本研究において、死産した供試牛のPBFAは正常な子牛を分娩した供試牛と比較して低値であり、妊娠日数の経過に伴いに減少する。また、新生子牛の生時体重と分娩日直近のPBFAの関係を調べた結果、正常な子牛を分娩、または死産した供試牛のPBFAは0.1を境界として分類できることから、PBFAを指標とした胎子発育や胎盤機能の正常性評価の可能性が示唆される。今後、妊娠末期の黒毛和種牛のBFV、PBFAおよび新生子牛の体重・活力などの所見を積み上げることで、臨床現場でカラーおよびパルスドプラ機能を有するポータブル型超音波画像診断装置を利用し、胎子発育や胎盤機能の正常性および新生子牛の体重・活力を簡便に推定できる診断法の開発が期待できる。

4. 要 約

本研究では、妊娠末期の黒毛和種牛の末梢血エストロンサルフェート (EIS) 濃度と妊娠角側子宮動脈血流動態 (BFV)、または胎盤の血流面積 (PBFA) との関係、これら血流動態と新生子牛の体重・活力との関係を調べた。その結果、正常な子牛を分娩した群 (N群) の末梢血EIS濃度およびBFVの割合は妊娠日数の経過に伴い有意 (それぞれ $p < 0.05$ および $p < 0.03$) に増加し、末梢血EIS産生およびBFVの割合は同様の推移パターンを示した。PBFAは妊娠日数を通じて $0.13 \pm 0.01 \sim 0.14 \pm 0.01$ の範囲を推移し、EIS産生割合

とは異なる推移パターンを示した。死産した群 (S群) の末梢血EIS濃度は、妊娠日数の経過に関わらずN群と比較して低値を推移した。また、PBFAはN群と比較して低値であり、妊娠275～280日に面積比0.12から0.08まで低下した。一方、新生子牛の生時体重および分娩日直近のBFVとの関係を調べた結果、N群において一部例外はあるが、分娩日直近のBFVが多いと新生子牛の生時体重は重く、BFVが少ないと生時体重は軽いことが示された。S群においては、N群と比較してBFVは少なく、新生子牛の生時体重も29kgと最も軽かった。また、分娩日直近のN群におけるPBFAは、新生子牛の生時体重に関わらず0.1～0.15の範囲に集中したが、S群では0.08と低値であった。以上のことから、妊娠末期の黒毛和種牛におけるBFA、PBFAを調べることで胎盤機能の正常性や胎子発育を評価できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 小形芳美, 高橋浩吉, 阿部浩之, 三澤隆, 加藤敏英, 酒井淳一, 大崎和栄, 南保泰雄, 中田健, 中尾敏彦: *J. Reprod. Dev.*, **42**, j85～j89, 1996.
- 2) Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T.: *Theriogenology*, **86**, 1436～1444, 2016.
- 3) Panarace, M., Garnil, C., Marfil, M., Jauregui, G., Lagioa, J., Luther, E., Medina, M.: *Theriogenology*, **66**, 2113～2119, 2006.
- 4) Van Eetvelde, M., Kamal, M. M., Hostens, M., Vandaele, L., Fiems, L. O., Opsomer, G.: *Animal*, **10**, 1342～1350, 2016.
- 5) Redmer, D. A., Wallace, J. M., Reynolds, L. P.: *Domest. Anim. Endocrinol.*, **27**, 199～217, 2004.
- 6) Ferrell, C. L.: *J. Anim. Sci.*, **69**, 1954～1965, 1991.

糞および尿を検査検体として用いる簡便かつ 正確な馬の妊娠診断法の開発

Development of simple and accurate procedure for pregnancy diagnosis
by using fecal and urine samples in the mare

高 橋 透

(岩手大学農学部)

Toru Takahashi

(Faculty of Agriculture, Iwate University)

The aim of this study was to establish simple and reliable procedure for pregnancy diagnosis in mares. In the present study, the author tried to quantify the urine chemical test that formerly reported by Cuboni as a qualitative assay. Urinary samples were collected from draft mares in Iwate Prefecture, Japan. Collected urine was hydrolyzed by heating with hydrochloric acid to generate free steroids then extracted with toluene. The toluene layer was collected and mixed with sulfuric acid and further heated. The sulfuric acid layer was transferred to the 96-well plate and the fluorescence (355/535) was measured by fluorescence counter. The urine fluorescence was quite greater in pregnant samples. Dose-dependent increments of fluorescent intensity were observed when estrone, estradiol or equilin was added to the charcoal-treated urine, whereas progesterone, testosterone and cortisol did not induce dose-dependent fluorescence. Results in the present study suggested that intense fluorescence in pregnant mare urine was caused by estrogens excreted to the urine. Urinary fluorescence greatly increased from the second trimester of gestation to term and the difference between the pregnant and open samples was quite prominent. Urine samples collected from the pony and miniature breed mares with impracticability of rectal palpation owing to smaller body size were subjected to quantitative fluorescent assay. Although the date of mating were not checked in most mares, all mares (7/7) were diagnosed as pregnant by urine fluorescent assay and confirmed subsequent foaling. Results in the present study showed that the Cuboni test, the urine fluorescent determination for pregnancy diagnosis in the mare, could be quantitatively evaluated by fluorometry. Quantitative Cuboni test could be utilized for pregnancy diagnosis beyond the second trimester of gestation not only in the draft mare but also pony and miniature breed mares with impracticability of rectal palpation owing to smaller body size.

1. 目 的

本研究は、農用馬（ブルトン種、ペルシュロン種および日本輓系種など）の簡便かつ正確な妊娠

判定法の開発を目的とする。農用馬は、春の繁殖期に受胎が確認された後は晩秋まで牧野に放牧される場合が多い。競走馬として手厚く管理されるサラブレッド種に比べて、農用馬は粗放な環境で

飼養される傾向があり、受胎率や分娩率、産駒生産率などの指標は、競走馬よりも劣ることが報告されている¹⁾。

秋の退牧時に妊娠診断を行って「山落ち(牧野での流産)」をチェックすることは、妊娠後期の飼料の増給や、流産の場合に翌年早くからの繁殖を準備するために欠かせないが、秋の妊娠診断は農用馬の生産現場ではあまり普及していない。そこで本研究では、農用馬生産者が容易に採取できる検体を検査試料として、簡便な手法で実施できる妊娠判定法を確立することを目的とする。

2. 方 法

岩手県内で飼養されている農用馬の繁殖牝馬27頭から尿を採取して分析に供した。また、臨床例の実証試験では、岩手県内で飼養されているポニーやミニホースなどの牝馬7頭(いずれも体格が小さく、直腸検査が実施不可能)から採尿し、定量Cuboni反応による妊娠判定を実施し、その後の分娩経過を調べた。

2.1 妊娠馬の尿と硫酸の反応によって生じる

蛍光反応を応用した定量測定法の開発

2.1.1 Cuboni反応²⁾の三宅変法³⁾

100mlのガラスフラスコに被験尿1mlと蒸留水9mlを加え、さらに濃硫酸15mlを添加した。濃硫酸の添加によって溶液が発熱するので、フラスコの外側を水道水の流水で冷却しつつ内容を攪拌した。溶液が室温まで冷えた後にフラスコを強光にかざして蛍光を観察した。

2.1.2 観察法の比較

受胎馬と不受胎馬の尿を試料として上記のCuboni反応を行い、フラスコを、①太陽光、②蛍光灯、③紫外線ランプ、にかざした時の蛍光を観察した。

2.1.3 Cuboni反応の定量評価

尿検体3mlをガラス試験管にとり、これに濃

硫酸0.5mlを加えて攪拌して、90℃で15分間加熱した後に室温に放置して放冷した。室温まで冷えた試験管にトルエン3mlを加えて2分間攪拌した後に3分間静置してトルエン層が明瞭に分離した後にトルエン層2mlを別のガラス試験管に移して濃硫酸0.5mlを加えて攪拌した後に80℃で20分間加熱した。

試験管を室温に放置して放冷し、トルエン層の下の硫酸層0.3mlを透明96穴プレートに分注し、励起波長355nm、蛍光波長535nmの蛍光強度を測定した。

2.2 定量Cuboni反応のステロイド特異性の検討

活性炭処理した馬尿にエストロン、エストラジオール、エクイリン、プロゲステロン、テストステロン、コルチゾールをそれぞれ0.5 μ g/ml、5 μ g/mlおよび50 μ g/mlの濃度になるように添加して、上記2.1.3の方法で蛍光強度を測定した。

2.3 尿検体の加水分解と有機溶媒抽出が蛍光強度に及ぼす影響

上記2.1.3の方法では尿検体を塩酸で加水分解処理した後にトルエン抽出を行ったが、加水分解処理とトルエン抽出が蛍光強度に及ぼす影響を検討した。

2.4 定量Cuboni反応の蛍光強度と尿中エストロゲン濃度との関連性

上記2.1.3の方法で蛍光強度を測定したすべての尿検体を用いて、尿中エストロン濃度を酵素免疫測定法で測定した。測定に先立ち、尿検体を塩酸で加水分解処理し、加水分解物をジエチルエーテルで抽出してエーテル抽出物のエストロン濃度を測定した。

2.5 定量Cuboni反応の妊娠判定精度の検証

馬の妊娠ステージの前期(妊娠120日齢まで)、中期(妊娠121~240日齢)および後期(妊娠241日以降)の尿検体を試料として定量Cuboni反応

による妊娠判定検査を行い、判定精度を検証した。

2.6 臨床例の検証

牡馬と同居しても交配日を確認していなかったり、自然交配を実施しても妊娠診断を実施しなかった妊非不明の小格馬7頭から採尿して定量Cuboni反応による妊娠判定を行い、その後の分娩の有無を調査した。妊娠判定の基準として、蛍光カウントが500万以上の場合を妊娠陽性とした。

3. 結果と考察

3.1 妊娠馬の尿と硫酸の反応によって生じる 蛍光反応を応用した定量測定法の開発

3.1.1 Cuboni反応（三宅変法）

非妊娠馬と妊娠馬（妊娠中期）から採取した尿検体を用いて三宅らの方法によるCuboni反応を実施したところ、妊娠尿を検体としたフラスコを強光にかざした場合に緑色蛍光が観察された。一方、非妊娠馬の検体では蛍光は観察されなかった。蛍光観察の可否は光にかざした際の角度やフラスコの内容を見る眼の位置などによる影響を受け、一つのフラスコを複数人で観察した場合には、全員が同時に蛍光を観察できない場合もあった。また、蛍光はかなり微弱で、肉眼で蛍光ありと判定されてもフラスコを撮影した写真では蛍光が認められない場合が多かった。

3.1.2 観察法の比較

Cuboni反応を観察する際には、フラスコを窓から入射する天空光や蛍光灯に近づけると蛍光観察が容易であった。妊娠馬の尿検体が緑色の蛍光を発することから、その励起波長は緑色光よりも短波長側にあると予想して、UVトランスイルミネーター（核酸アガロースゲル電気泳動の臭化エチジウム染色観察用）の波長365nmの紫外線ランプをフラスコに照射したところ、妊娠馬の尿検体では強烈な蛍光が観察されたが、非妊娠馬の検体では蛍光が認められなかった。

3.1.3 Cuboni反応の定量評価

上記2.1.3に記述した方法で尿を検体としたCuboni反応を行い、蛍光光度計（マルチラベルカウンターSX、パーキンエルマー社）を用いて励起波長355nm、蛍光波長535nmの蛍光測定を実施したところ、強い蛍光が妊娠検体のみで観察された。蛍光光度計による測定は蛍光強度が数値として表されるので、蛍光の判定を定量的に実施することが可能であった。蛍光強度は励起光を上方から照射した場合により強く認められたが、これは下方からの照射では96穴プレートの素材に波長355nmの励起光が一部吸収されてしまい、蛍光強度が弱まるためと思われる。よって、以降の実験は355nmの励起光を上方から照射して535nmの蛍光強度を測定することとした。

3.2 定量Cuboni反応のステロイド特異性の検討

活性炭処理してステロイドを除去した尿にエストロン、エストラジオール、エクイリン、プロゲステロン、テストステロン、コルチゾールをそれぞれ0.5 $\mu\text{g/ml}$ 、5 $\mu\text{g/ml}$ および50 $\mu\text{g/ml}$ の濃度になるように添加して、Cuboni反応を行って蛍光強度を測定したところ、エストロン、エストラジオール、エクイリンについては濃度依存的に蛍光強度が高まったが、プロゲステロン、テストステロン、コルチゾールには濃度依存的な蛍光強度の増大は認められなかった（Fig. 1）。蛍光強度はエクイリン、エストロン、エストラジオールの順に高かった。よって、Cuboni反応の蛍光は尿中のエストロゲンに由来することが示唆された。また、この実験で用量依存的な蛍光が観察されたステロイド化合物は、芳香化されたA環を有するという点とC3に水酸基を有する点で共通していた。

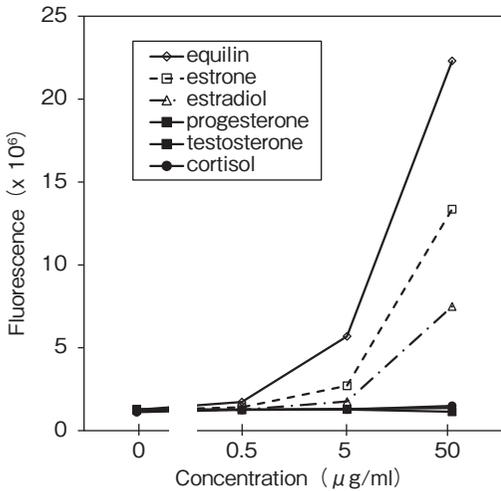


Fig. 1 Effects of steroid hormones on urinary fluorescence

3.3 尿検体の加水分解と有機溶媒抽出が蛍光強度に及ぼす影響

上記の2.1.3に記述した方法で尿を検体としたCuboni反応を行った際に尿検体に塩酸を添加して加熱したが、これは尿中に多量に存在する抱合型ステロイドを加水分解して遊離型ステロイドを生成させることが目的であった。血中や尿中には抱合型のステロイドが遊離型の数十倍の濃度で存在しており、これを加水分解することでCuboni反応に供されるステロイドの量を増やすことができる。妊娠尿と非妊娠尿を検体としてCuboni反応を行い、塩酸を加えて加熱する加水分解、塩酸を加えない加熱処理、および無処理の場合の蛍光強度の違いを検討したところ、塩酸を加えて加熱処理した場合には、塩酸無添加の加熱処理や無処理の場合と比較して、蛍光強度が10倍～100倍以上に増加した。塩酸処理による蛍光強度の増加の程度は非妊娠に比べて妊娠馬の尿で大きかった。この実験の成績から、塩酸で抱合型ステロイドを加水分解して遊離型を生成させることで、Cuboni反応の判定をより明瞭に行えることが示唆された。

加水分解後のトルエン抽出の有無が蛍光強度に及ぼす影響を検討したところ、抽出操作によって非妊娠馬の尿検体の蛍光カウントは低下したが、妊娠馬の尿検体の蛍光カウントは4倍以上に増加した。この実験の成績から、加水分解後のトルエン抽出によって非特異蛍光が減少し、エストロゲンに由来する特異蛍光が効率よく検出されることが示唆された。

3.4 定量Cuboni反応の蛍光強度と尿中エストロゲン濃度との関連

定量Cuboni反応の蛍光強度と酵素免疫測定法で測定した尿中エストロン濃度との間には弱い正の相関が認められた (Fig. 2)。しかし、決定係数 (R^2) は0.245と高いものではなかった。この原因としては、妊娠ステージによってエストロン、エストラジオール、エクイリンの分泌パターンに差があり、イムノアッセイによるエストロンの測定値と定量Cuboni法の蛍光強度が一致しない場合があることが示唆された。

3.5 定量Cuboni反応の妊娠判定精度

妊娠馬と非妊娠馬の尿検体の定量Cuboni反応の蛍光強度を比較すると、妊娠中期 (妊娠121～240日) 以降は発情期や発情休止期と比較して顕著な蛍光が観察され、妊娠馬と非妊娠馬の判別は容易であった (Fig. 3)。

3.6 臨床例の検証

臨床例7頭は、定量Cuboni反応の結果から7頭すべてが妊娠と判定され、後日全頭が分娩した (Table 1)。

4. 要 約

本研究で開発した定量Cuboni法で検査した妊娠中期以降の馬尿の蛍光強度は、発情期や非繁殖季節 (空胎) の場合に比べて著しく高値で、非妊娠との差異はきわめて明瞭であった。本研究の成績から、定量Cuboni法の蛍光は尿に含まれる

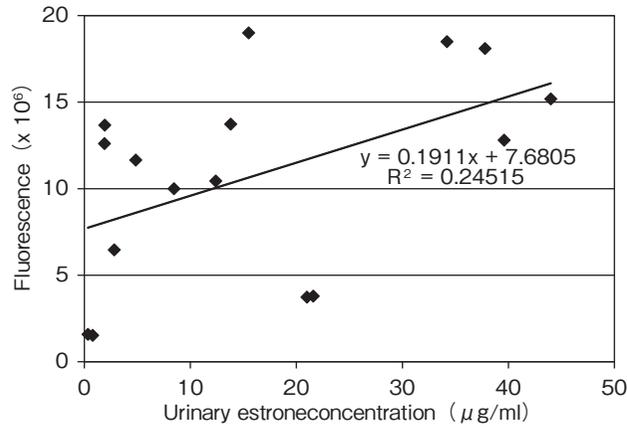


Fig. 2 The relationship between the urinary fluorescence and estrone concentration during pregnancy in the mare

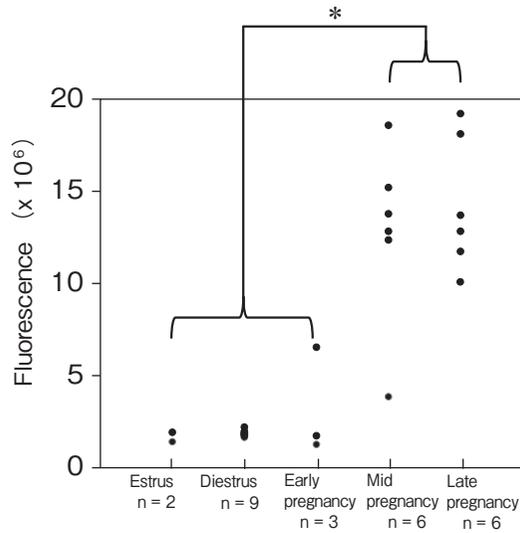


Fig. 3 Urine fluorescence intensities in different reproductive stages in the mare (*p < 0.05)

Table 1 Pregnancy diagnosis by quantitative fluorescent assay

No.	mare	breed	breeding method	fluorescence (x10E6)	diagnosis	foaling
1	pony	crossbred	pairing	12.53	pregnant	foaled
2	pony	crossbred	pairing	13.17	pregnant	foaled
3	pony	crossbred	pairing	12.91	pregnant	foaled
4	pony	crossbred	pairing	15.41	pregnant	foaled
5	pony	crossbred	pairing	12.89	pregnant	foaled
6	pony	crossbred	pairing	12.39	pregnant	foaled
7	miniature	falabella	natural service	6.88	pregnant	foaled
negative control	draft horse	Japanese draft	nonpregnant	1.41		
positive control	draft horse	Japanese draft	6 mo. Pregnant	7.47		

エストロゲンに由来することが示唆された。定量 Cuboni法にはイムノアッセイに必要な抗体やトレーサーが不要で、一般試薬を用いて簡便に実施可能であり、蛍光光度計がない場合であっても紫外線ランプ（ブラックライト）の照射によって定性的な判定が可能という実用上の利点がある。また、ポニーやミニチュアホースなどの小格馬は、直腸検査が困難である場合が多いが、このような場合でも尿が採取できれば妊娠の有無を検査することが可能である。本研究で測定法の開発に供した尿検体は農用馬から採取したが、本検査法は直腸検査の難しい小格馬においても価値があると思われる。

馬は長日季節繁殖動物であるために繁殖季節が春から夏に限定される。受胎後の試料採取と解析の時期が限定され、まず尿試料の解析に注力した結果、当初の研究計画に予定されていた糞中ステロイドの分析まで着手できなかった。糞中の成分分析による妊娠判定法は今後の課題である。

文 献

- 1) 島村嶺花, 和田春菜, 北川アミ, 窪友瑛, 安田出, 暦本学, 居在家義昭, 高橋透: 産業動物臨床医学雑誌, 8, 98~99, 2017.
- 2) Cuboni, E.: *La Clinica Veterinaria*, 57, 85~93, 1934.
- 3) 三宅勝, 佐藤邦忠: 農用馬増産の手引き (私家版), pp36~37, 1992.

牛におけるルーメン非分解性ナイアシン給与による子宮，卵巣への血流促進による分娩後の繁殖性向上

Improvement of post-partum reproductive performance by Rumen protected niacin supplementation in cattle

森田 康 広*・松 山 秀 一

(名古屋大学大学院生命農学研究所, *名古屋大学アジアサテライトキャンパス学院)

Yasuhiro Morita* and Shuichi Matsuyama

(Graduate School of Bioagricultural sciences, *Asian Satellite Campuses Institute, Nagoya University)

Niacin (NA) supplementation as rumen-protected niacin (RPN) in cattle increases milk production and dry matter intake ; moreover, side effects, such as niacin-associated skin toxicity and their effect to reproduction performance, have not been investigated in detail. This study attempts to determine whether oral administration of RPN increases uterine artery blood flow and whether RPN feeding promotes uterine repair and improves fertility in postpartum cattle. Experiment 1 involved 6 non-lactating multiparous healthy Japanese Black cows. The estrus cycles were synchronized and cows were randomly assigned to 2 treatments [control group (0 g RPN, C and supplementation group (60 g RPN, RPN)] and were orally administered once at 1000 h before the morning feeding. Uterine artery diameter was measured by ultrasonography every 4 hours from 2 hours before RPN supplementation to 42 hours later. In RPN group, the uterine artery diameter was significantly increased at 6 hours after RPN administration compared to other time points ($p<0.05$). In addition, there was a significant increase in artery diameter at 6 hours after administration in the RPN group compared with the C group ($p<0.05$). Experiment 2 involved 6 multiparous cows, and cows were randomly assigned to 2 treatments [control group (0 g RPN, ACC and supplementation group (15g RPN, ACRPN)] and were orally administered niacin once at 1000 h every day before the morning feeding from 1 week after calving. There were no significant differences in the reproductive performance, however, RI value in ACRPN was tended to higher than ACC group in 2, 5, and 6 weeks after calving ($p<0.1$). The present study indicates that RPN supplementation could affect uterine blood flow. Moreover, inflammatory tissue needs more blood flow and decreases RI value in related blood vessels, thereby suggesting RPN supplementation could support uterine repair in the postpartum period.

1. 目 的

地球温暖化に伴う気温上昇によって農業生産は世界的に甚大な影響を受けることが予想されてお

り，酪農や肉牛生産においては，暑熱ストレス下での繁殖性や乳汁生産性低下を防ぐことは喫緊の課題である。水溶性ビタミンの一種であるナイアシンは，ルーメンバイパス処理をしたものが暑熱

対策として、一部飼料へ添加されており、乳牛の夏季における乳汁生産量の増加、体温低下作用が報告されている¹⁾。このような効果が報告されている一方で、ヒトにおいて、高濃度のナイアシン摂取はナイアシンフラッシュと呼ばれる表皮直下の過剰な毛細血管の拡張を引き起こすことが知られている²⁾。

ナイアシンは皮膚のランゲルハンス細胞のナイアシンレセプターであるGPR107A受容体に結合し、プロスタグランジン系を介し、毛細血管に作用して血管を拡張させ、皮膚からの熱放散を促す作用がある。また、牛の子宮、卵巣にもGPR107A受容体が存在することも報告されている³⁾が反芻動物の生体にどのように作用しているか、詳しい作用機構ははまだ明らかになっていない。

そこで本研究では、牛においてルーメン非分解性ナイアシンの経口投与によって子宮への血流量が増加するか、また産後の牛に給与することで子宮修復が促進するかを検討するとともに、分娩後の初回排卵が早まるかを検討した。

2. 方 法

2.1 動物

本実験には、名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学研究センター東郷フィールドで飼育されている黒毛和種経産牛を実験1では、発情同期化した牛6頭、および実験2では正常に分娩を行った6頭をそれぞれ用いた。実験1ではコンクリート床にオガクズを敷いたパドックにタイストール形式で3頭ずつ飼養した。実験1では飼料由来のビタミンによる実験結果への影響を考慮し、実験の1週間前から実験期間中は稲ワラのみを飼料として給餌は朝夕の2回(朝9時、夕16時)給与した。また実験2では分娩後1週間まではコンクリート床にオガクズを敷いた単飼の分娩

牛房において子牛と同居させ、子牛の哺乳制限は行わなかった。その後、分娩後1週間で母子分離し、その後は別の牛舎で個別に管理した。給餌は朝夕の2回行い、飼料としてスーダン、チモシーの乾草のみを日本家畜飼養標準(和牛編)に従い規定量給与した。また、水、固形塩は自由に摂取させた。本研究における動物実験は、「名古屋大学における動物実験等に関する取扱規程」に準拠し、名古屋大学大学院生命農学研究科動物実験委員会の審査・承認を得たうえで実施した。

2.2 実験プロトコル

2.2.1 実験1：ルーメン非分解性ナイアシン(RPN)の給与による腹腔内血流の変化

RPN(ナイアコート；日産合成工業株式会社、東京)の給与によって子宮動脈の血流が変化するかを検証した。6頭の実験牛をランダムにRPN給与群(RPN)と対照群(C)に3頭ずつ分け、実験を行った。1回目の投与実験終了後に十分な回復期間(約1ヶ月)をおき、両群の個体を入れ替え同様にもう一度投与実験を行った。供試牛の発情をプロスタグランジン製剤投与後に膈内留置型プロジェステロン製剤を挿入することで、黄体期に合わせ、RPN群はRPN60g(ナイアシンとして31g)を配合飼料100gに混合し、午前10時に経口給与し、C群は配合飼料のみを給与した。RPN給与開始前2時間から4時間ごとに48時間子宮動脈の直径を超音波画像診断装置を使用して、測定し記録した。同時に膈内留置型プロジェステロン製剤に組み込んだ小型の温度ロガーにて膈温を体温として実験期間中に継続的に記録した。

2.2.2 実験2：分娩後のRPN給与が子宮修復に与える影響

供試牛6頭を分娩後1週間から8週間まで1日15gのRPNを朝の給餌に合わせて配合飼料100gとともに給与した群(ACRPN群)、配合のみ給与した対照群(ACC群)にそれぞれ3頭ずつラ

ンダムに振り分けた。その後、1週間に一度、超音波検査による子宮動脈の観察とメトリチェックによる膣内貯留物検査を行った。

2.3 子宮動脈の観察法

実験1では5 MHzリニア型プローブを装着した超音波画像診断装置 (SonoScape[®], S6V, Shenzhen, China) を用いて行った。子宮動脈の観察はAndo (2007) ら⁴⁾の報告をもとに外腸骨動脈、外腸骨静脈、子宮動脈を描出し、その後静止画を保存、画像解析ソフトにて血管径を測定した。実験2では同様に子宮動脈を描出し、ドップラーモードにてマニュアル操作により、血管抵抗 (RI)、拍動係数 (PI)、平均血流速度 (TAMV) を測定した。

2.4 メトリチェック

メトリチェックによる膣粘液スコアは、Sheldon (2006) ら⁵⁾の報告を参考にし、膣粘液に含まれる膿の割合に応じてスコア0からスコア4までの5段階で評価した。

2.5 統計解析

実験1および2における血管径、RI、PI、TAMVの各値、および変化率については同一個

体間における2元配置分散分析を行い、多重比較検定としてHolm法を用いた。すべての統計処理はR version 3.5.1 (<http://www.R-project.org/>)にて行った。

3. 結果と考察

3.1 実験1

3.1.1 臨床変化

実験期間を通して、実験個体に食欲不振などの行動の変化は見られなかったが、RPN投与群の6頭中4頭でRPN投与後6時間から22時間後にかけて一過性の体温上昇が観察された。

3.1.2 血管径の変化

RPN経口投与前後の子宮動脈の血管径の変化率をFig. 1に示す。C群では実験期間を通して子宮動脈径は一定していたが、RPN群ではRPN給与後6時間である16:00において、有意に子宮動脈の血管径が給与前2時間、投与後22, 26, 34, 38, 42時間後に比べ増大していた ($p < 0.05$)。また、C群に比較しRPN群では投与後6時間で有意に血管径の増大が見られた ($p < 0.05$)。

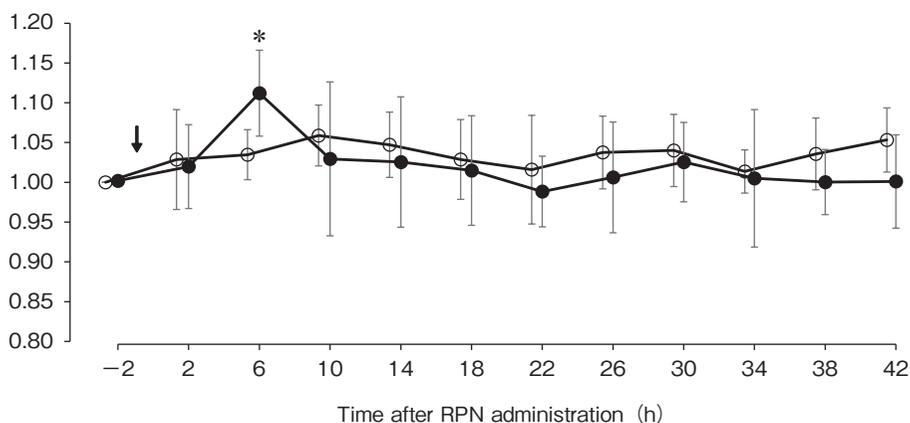


Fig. 1 Change of the diameters of the uterine arteries in six cows in control (C, open circle) and rumen-protected niacin administration (RPN, filled circle) groups. Values are means \pm SD of rate change of both right and left vessels of each six cows from two hours before administration (arrow indicates the time of RPN administration). Values of different parameters with different asterisks (*) on the same day differ between groups ($p < 0.05$).

3.2 実験2

3.2.1 臨床変化

今回実験に供試した6頭すべての個体において、難産、後産停滞、産褥熱などの子宮回復に影響を与えるとされる疾病は観察されなかった。すべての産仔に活力があり、母子分離の産後1週間中に子牛に疾病は観察されなかった。

3.2.2 初回排卵

妊娠黄体の消失および初回排卵後の黄体形成については、ACRPN群： 3.3 ± 3.7 wk, ACC群： 4.0 ± 5.1 wkと両群で差はなかった。

3.2.3 血管径の変化

実験期間中にRPN給与によって子宮動脈の血管径に差はなかった。また、分娩後1週間から8週間の間においても差はなく、ほぼ一定の血管径を示した (ACRPN： 0.81 ± 0.03 cm, ACC： 0.81 ± 0.02 cm, Fig. 2)。

3.2.4 RIとPI

末梢組織の血管抵抗を示すRI値はACRPN群とACC群で差は見られなかったが、wk1を基準とした変化率ではACRPN群では分娩後からACC群に比較し、wk2, 5, 6では有意に高く推移する傾向であった ($p < 0.1$, Fig. 3a)。拍動係数PI値は

RPN給与によって変化せず、また分娩後の時間経過によっても変化しなかった (ACRPN： 1.48 ± 0.19 cm/sec, ACC： 1.63 ± 0.11 cm/sec)。また、wk1を基準とした変化率においても有意な差はなかった (Fig. 3b)。

3.2.5 TAMV

実験期間中にRPN給与によってTAMVは変化せず、また分娩後の時間経過によっても変化しなかった (ACRPN： 23.01 ± 3.72 cm/sec, ACC： 21.62 ± 1.84 cm/sec, Fig. 3c)。

3.2.6 メトリチェック

分娩後1週間ではそれぞれ、ACRPN群ではスコア3が2頭、スコア2が1頭、C群はスコア3が3頭、8週間後ではACC群はスコア1が2頭、スコア0が1頭、C群はスコア1が1頭、スコア0が2頭であり、RPNの給与による差は見られなかった。

3.3 考察

RPN高容量の経口投与によって子宮動脈の血管が拡張することが確認された。また、分娩後からの継続的な低容量のナイアシン投与によっては子宮への血流の増加は観察されなかったが、子宮の炎症反応が減少する可能性が示された。

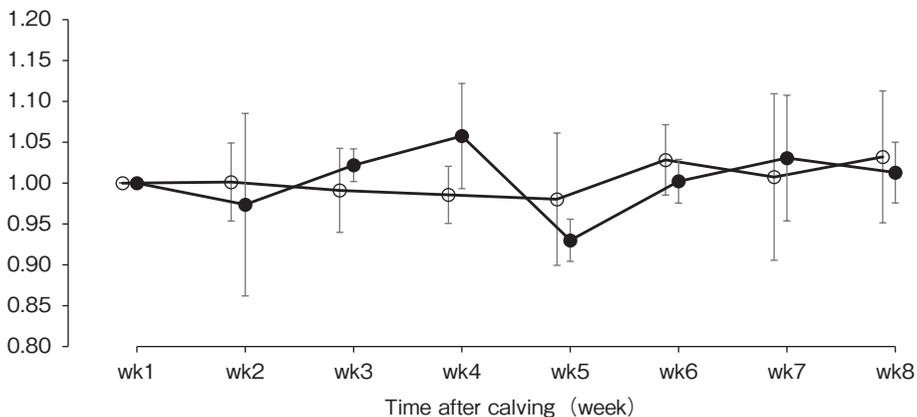


Fig. 2 Change of the diameters of the uterine arteries in three cows in control (C, open circle) and rumen-protected niacin administration (RPN, filled circle) groups. Values are means \pm SD of rate change of both right and left vessels of each three cows from 1 week after calving.

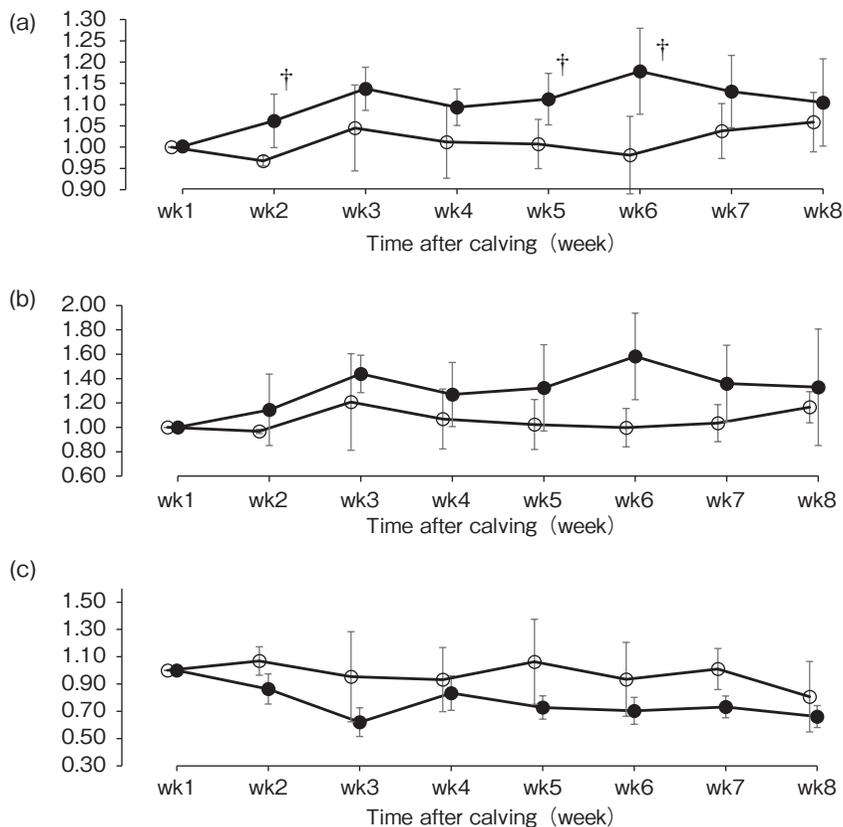


Fig. 3 (a) Change of Resistance Index (RI) values from uterine artery in three cows in control (ACC, open circle) and rumen-protected niacin supplement (ACRPN, filled circle) groups. Values are means \pm SD of rate change of both right and left vessels of each three cows from 1 week after calving. Values of different parameters with different daggers (†) on the same day differ between groups ($p < 0.1$). (b) Change of Pulsatility index (PI) of the uterine arteries after calving in both group cows. Values are mean \pm SD of rate change of both right and left vessels of three cows each. (c) Change of Time-averaged maximum velocity (TAMV) from the uterine arteries. Values are mean \pm SD of rate change of both right and left vessels of three cows each.

ナイアシンの重要な副作用としてナイアシNFLラッシュと呼ばれる一過性の血管拡張が知られており、ヒトでは皮膚の発赤や掻痒感、発汗が見られ、ストレスとなることが知られている。本実験でも牛において動脈の拡張に伴うと推察される体温上昇が観察されたため、60 gは血管の拡張を引き起こすが、副作用も生じる給与量であることが示された。そのため、続く実験2では規定量である15 gの継続給与で実験を行った。また、実験1では血流量の指標であるRIやPI、TAMVを計測できなかったため、実際に血管拡張に伴い子宮へ

の血液供給が増加しているかは不明であった。

以前の報告では分娩直後は子宮の炎症などにより、血液量が多く、血管抵抗は低下し、その後子宮回復に伴って上昇し、安定することが示唆されている⁶⁾。

加えて、以前の本研究室の研究において、黄体期における黒毛和牛の平均腹腔内動脈のRIは0.8前後であることが示されている(データ未掲載)。本研究でも分娩後8週ではACRPN群が0.76、ACC群が0.80と正常範囲であった。また、炎症組織への血流は一般的に上昇することが知られ、そ

の時の血管抵抗も減少すると考えられる。今回の実験ではRIの変化率の推移から、RPN給与によって分娩後1週目から8週目にかけて子宮組織への血流抵抗が上昇すること、すなわち、炎症が早期に収束した可能性が示された。

本研究により、RPN高容量の経口投与によって以前から示唆されている皮膚の毛細血管だけでなく、腹腔内の動脈も拡張することが示唆された。また、RPN低容量の経口投与は子宮の炎症を早期に収束させる効果があることが示唆された。本研究では初回排卵などの繁殖成績には差が見られなかったが、子宮の炎症が早期に収束する可能性があることから、さらなる検討が必要である。

4. 要 約

ルーメンバイパス処理をしたナイアシン給与は乳牛の夏季における乳汁生産量の増加、体温低下作用が報告されているが詳しい作用機序、繁殖改善効果は十分に検討されていない。そこで本研究では、牛においてルーメン非分解性ナイアシン(RPN)の経口投与によって子宮への血流量が増加するか、また産後の牛に給与することで子宮修復が促進するかを検討するとともに、分娩後の初回排卵が早まるかを検討した。本実験には、名古屋大学大学院生命農学研究科附属フィールド科学研究センター東郷フィールドで飼育されている黒毛和種経産牛を実験1では発情同期化した牛6頭、および実験2では正常に分娩を行った6頭をそれぞれ用いた。実験1ではRPN60gの給与によって子宮動脈の血流が変化するかを検証するために6頭の実験牛をランダムにRPN給与群(RPN群)と対照群(C群)に3頭ずつ分け、RPN給与時の子宮動脈径を測定した。実験2では分娩後のRPN給与が子宮修復に与える影響を検討するために、供試牛6頭を分娩後1週間から

8週間まで1日15gのRPNを朝の給餌に合わせて配合飼料100gとともに給与した群(ACRPN群)、配合のみ給与した対照群(ACC群)にそれぞれ3頭ずつランダムに振り分け、1週間に一度、超音波検査による子宮動脈の観察を行った。その結果、実験1のRPN群ではRPN給与後6時間において、有意に子宮動脈の血管径が給与前2時間、投与後22, 26, 34, 38, 42時間後に比べ増大していた($p < 0.05$)。また、C群に比較しRPN群では投与後6時間で有意に血管径の増大が見られた($p < 0.05$)。実験2では初回排卵や子宮修復の指標には有意な差が見られなかったが、末梢組織の血管抵抗を示すRI値は分娩後1週を基準とした変化率はACRPN群ではACC群に比較し、分娩後2, 5, 6週では有意に高く推移する傾向であった($p < 0.1$)。以上の結果から、RPN高容量の経口投与によって子宮動脈の血管が拡張することが確認された。また、分娩後からの継続的な低容量のナイアシン投与による子宮への血流の増加は観察されなかったが、子宮の炎症反応が減少する可能性が示された。

文 献

- 1) Pineda, A., Drackley, J. K., Garrett, J., Cardoso, F. C. : Effects of rumen-protected niacin on milk production and body temperature of middle and late lactation Holstein cows, *Livest Sci*, **187**, 16~23, 2016.
- 2) Banka, S. S., Thachil, R., Levine, A., Lin, H., Kaafarani, H., Lee, J. : Randomized controlled trial of different aspirin regimens for reduction of niacin-induced flushing, *Am J Heal Pharm*, **74** (12), 898~903, 2017.
- 3) Xiao, Y., Rungruang, S., Hall, L. W., Collier, J. L., Dunshea, F. R., Collier, R. J. : Effects of niacin and betaine on bovine mammary and uterine cells exposed to thermal shock in vitro, *J Dairy Sci*, **100** (5), 4025~37, 2017.
- 4) Ando, T., Kamimura, S., Hamana, K., Ohtsuka, H., Watanabe, D. : Uterine and ovarian blood flow in a Holstein Friesian cow with aplasia of one uterine horn, *J Vet Med Sci*, **69**(4), 429~32, 2007.
- 5) Sheldon, I. M., Lewis, G. S., LeBlanc, S., Gilbert, R.

- O. : Defining postpartum uterine disease in cattle, *Theriogenology*, 65(8), 1516~30, 2006.
- 6) Heppelmann, M., Krüger, L., Leidl, S., Bollwein, H. : Transrectal Doppler sonography of uterine blood flow during the first two weeks after parturition in Simmenthal heifers, *J Vet Sci*, 14(3), 323~7, 2013.

発情期における牛子宮内膜機能調節因子および 調節機序の解明

Study on bovine endometrial function regulator and regulatory mechanism
during estrus

杉浦智親・中田 健

(酪農学園大学獣医学群動物生殖学ユニット)

Tomochika Sugiura and Ken Nakada

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, Rakunogakuen University)

Recently, poor reproductive efficiency in cattle has become serious problem. The objective of study was to clarify the physiological function in bovine endometrium, which is the place of conception. The expression of VEGF mRNA was noted as an up-regulator of bovine endometrial thickness that changes throughout the estrous cycle, and the relationship between VEGF mRNA expression and endometrial thickness, and the mechanism of endometrial thickness regulation were investigated. Natural estrus (= Day 0) of 12 cows was observed, and measuring endometrial thickness with ultrasonography, collecting uterine endometrial tissues, and blood sampling were performed on Day 0 and 14. The expression of VEGF, VEGF receptor 1, VEGF receptor 2, estrogen receptor α (E-R α), estrogen receptor β and progesterone receptor in endometrial tissues were measured by quantitative PCR. As a result, the expression of VEGF mRNA in bovine endometrium during the estrous phase was higher than that during the luteal phase, and the expression level showed a positive correlation with the ratio of changes in endometrial thickness. In the estrous cycle, an increase in blood E₂ concentrations and a significant increase in the expression of E-R α mRNA in the endometrium were observed, and a positive correlation was detected between VEGF and E-R α mRNA expression. In conclusion, it was clarified that bovine endometrial thickness during estrus was increased by increasing the expression of VEGF through the increase of blood E₂ concentrations and E-R α in endometrium. Since it has been suggested that the degree of the increase in endometrial thickness is related to fertility, it is necessary to investigate the physiological role of VEGF and the positive effect on conception caused by the increase in endometrial thickness.

1. 目 的

近年、飼養管理の改善や遺伝的改良により家畜としての牛の能力が飛躍し続ける一方で、肉用および乳用牛ともに、その受胎率は低迷し続け、繁

殖雌牛（母体）の確保あるいは生産効率の低下が問題となっている。国内の食用肉牛は90%以上が人工授精による産子であり、雌牛が顕著な発情徴候を示す場合には人工授精が実施されるものの、そのうち約50%は不受胎に終わり、発情が回帰す

る。発情徴候が著明であっても受胎しない要因の一つに子宮内膜機能の異常が推測される。牛子宮内膜は、黄体期の厚さを基本として発情期に血管透過性が亢進し、その厚さが一時的に厚くなる。発情が終了し、排卵が起こった後に子宮内膜は元の厚さに戻るといふ変化を繰り返している。我々のこれまでの研究より、黄体期の子宮内膜厚をベースとして発情期の子宮内膜厚変化が大きいほうが有意に高い受胎率を示すこと、すなわち、発情期の子宮内膜は厚いほうが高い受胎性を示すことが示唆された¹⁾。このことから、発情期の牛子宮内膜厚の増加調節に関与する因子とその発現機序を明らかにすることが、低迷する受胎率の改善に対する新たな知見となる。牛子宮内膜厚の増加には、生体内で最も強力な血管透過性亢進あるいは血管新生作用をもつ因子である血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の関与が推測される。VEGFは胎生期の脈管形成、あるいは悪性腫瘍の血管新生や転移に関与することで知られるが、げっ歯類の子宮内膜にも発現することが報告されている^{2, 3)}。そこで本研究では、このVEGFが牛子宮内膜厚の調節に関与し、その発現が受胎性に影響するという仮説を立て、発情期における牛子宮内膜厚とVEGF発現との関係を明らかにし、VEGFの子宮内膜厚調節因子としての役割とその調節機序を検討した。

2. 方 法

健康なホルスタイン種乳牛 (n = 12, 空胎日数200日以上) に対し、プロスタグランジンF_{2α} 製剤25mg/頭を用いて発情を誘起し、発情を確認した。その約3週間後に到来した自然発情 (のべ14回) を観察し、発情日をDay 0とした。Day 0およびDay 14に超音波検査および子宮内膜採取を実施し、同時に血液も採取した。

2.1 超音波検査による子宮内膜厚の測定

我々のこれまでの研究報告と同様に⁴⁾、経直腸超音波診断装置を用いて牛の左右子宮角の角間膜附着部における横断面像を描出し、画像解析ソフトを用いて計測した。子宮内膜の形態は円形から楕円形を呈することが多いため、子宮内膜領域の長径および短径の平均値を直径として算出した。子宮内腔領域があった場合、子宮内腔領域の長径および短径の平均値を同様に算出し、子宮内膜領域の直径から減じた。この測定方法によって左右角それぞれ子宮内膜厚を測定し、左右子宮内膜厚の平均値を子宮内膜厚とした。また、黄体期の子宮内膜厚は産次数に応じて個体差があることを考慮し、子宮内膜厚の変化を客観的に評価するために実測値を用いるのではなく、黄体期 (Day 14) 子宮内膜厚に対する変化の割合に換算し、発情期 (Day 0) の子宮内膜厚変化率を比較した。

2.2 子宮内膜組織の採取

子宮内膜組織の採取は、2%リドカインによる尾椎硬膜外麻酔処置下でバイオプシーガンを用いて実施した。滅菌したバイオプシーガンを子宮角分岐部から卵管子宮接合部のおおよそ中間地点まで挿入し、直腸壁越しに子宮内膜組織を左右の子宮角それぞれ12時、3時、9時方向の3箇所から採取した。採取した子宮内膜組織は採取後、すぐにRNA安定溶液に浸漬した。

2.3 子宮内膜厚調節因子のmRNA発現

採取した子宮内膜組織中の子宮内膜厚調節因子の発現変化をリアルタイムPCRによって測定した。トータルRNAの抽出にはキットを用い、分光光度計で定量した1000ngのトータルRNAに対し逆転写反応を行い、cDNAを作製した。そのcDNAを鋳型にリアルタイムPCRを行い、子宮内膜組織中のVEGF、VEGF受容体1 (VEGF-R1)、VEGF受容体2 (VEGF-R2)、エストロゲン受容体 α (E-R α)、エストロゲン受容体 β

(E-R β), プロジェステロン受容体 (P-R) の mRNA 発現量を測定した。各種 mRNA の発現量は β actin の発現量を内部標準として補正し, 比較 Ct 値法により mRNA の相対的発現量を比較した。

2.4 性ステロイドホルモン濃度測定

採取した血液から血漿を分離後, プロジェステロン (P₄) およびエストラジオール (E₂) 濃度を酵素免疫測定法により測定した。

3. 結果と考察

3.1 子宮内膜厚変化と VEGF 発現との相関性

Day 14 を基準とし, Day 0 の発情期には子宮内膜厚が 1.5 倍に増加したことが確認された (Fig. 1)。子宮内膜組織中の VEGF mRNA 発現は Day 14 と比較して Day 0 ではその発現に差のある傾向が認められた ($0.05 < *p < 0.1$, Fig. 2a)。また,

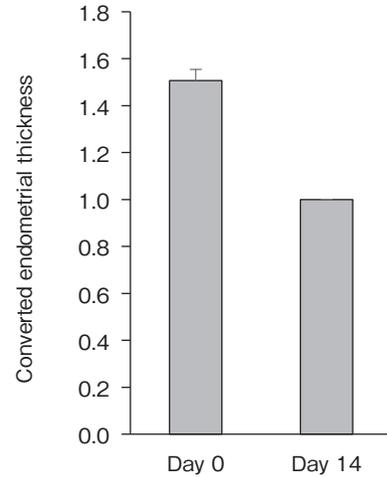


Fig. 1 Changes in endometrial thickness.

Endometrial thickness was converted to a ratio based on the reference day (Day 14). Data were shown as the mean \pm SEM. Peak in endometrial thickness in the Day 0 was 1.5-fold greater than basal level (Day 14 as the reference).

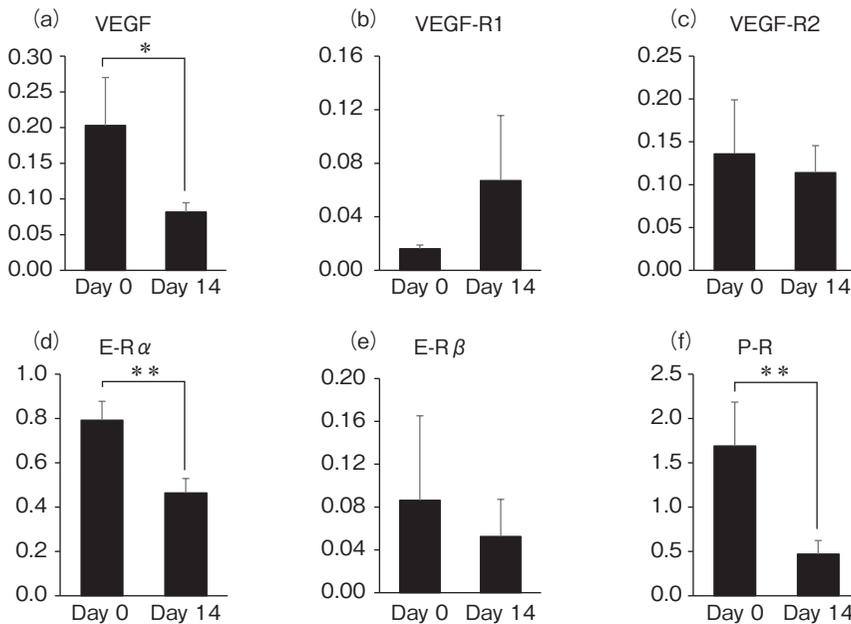


Fig. 2 mRNA expression in the endometrium.

Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), VEGF-Receptor (R)1, VEGF-R2, estrogen (E)-R α , E-R β , and progesterone-R mRNA were compared between the Day 0 and 14 using paired t-test (a-f). Data (mean \pm SEM) were shown as relative values of β actin. $0.05 < *p < 0.1$, $**p < 0.05$.

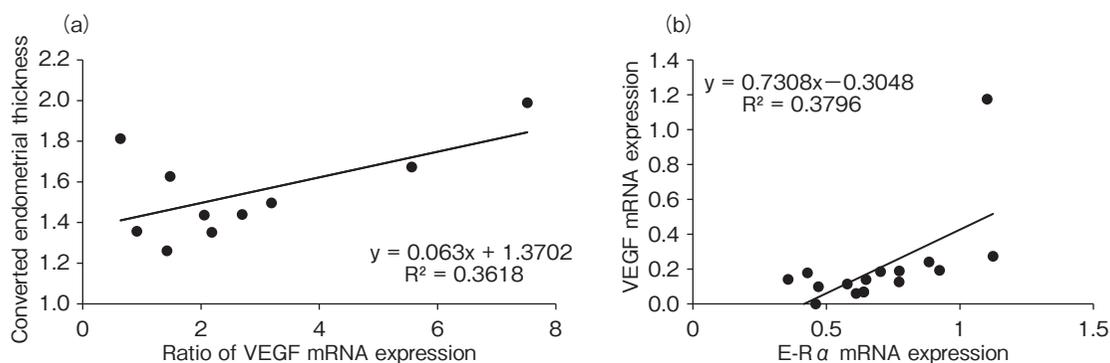


Fig. 3 Correlation between endometrial thickness and expression of VEGF mRNA (a), and expression of VEGF and E-R α (b) on Day 0.

Endometrial thickness and expression of VEGF mRNA were converted to a ratio based on the Day 14 in panel (a). Positive correlation between converted endometrial thickness and ratio of VEGF mRNA expression was suggested. Similarly, positive correlation between VEGF and E-R α mRNA expression was suggested.

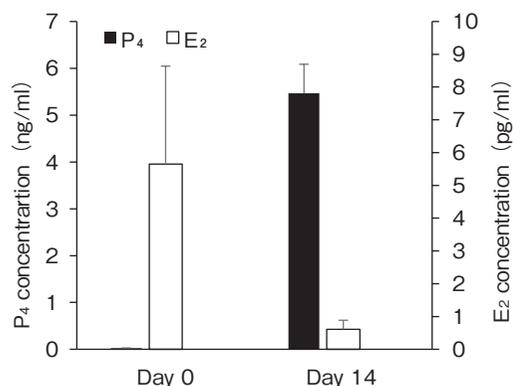


Fig. 4 Progesterone (P₄) and estradiol (E₂) concentrations on the Day 0 and 14.

Black and white bars represent P₄ and E₂ concentrations, respectively. Data were shown as the mean \pm SEM.

Day 14に対するDay 0における子宮内膜変化率およびVEGF mRNA発現変化率との関係を検討したところ、正の相関のある傾向が認められた (Fig. 3a)。なお、子宮内膜厚変化率とVEGF-R1, VEGF-R2, E-R α , E-R β , およびP-Rとの相関性はいずれも認められなかった。

以上の結果より、発情期にはVEGFの発現が増加することにより子宮内膜の血管透過性が亢進し、子宮が浮腫を伴って厚くなることが示唆され

た。さらに、子宮内膜厚の増加の強度はVEGF発現レベルに正比例すると考えられる。これまでに、発情期の子宮内膜厚変化率が大きい牛のほうが有意に高い受胎性を示すことを報告してきた¹⁾。本研究の結果から、発情期の高いVEGF発現レベルが子宮内膜厚のより大きな増加に作用し、高い受胎性に結び付いたことが推測される。

3.2 子宮内膜厚調節機序

子宮内膜組織中の各種mRNA発現をDay 0とDay 14で比較したが、E-R α およびP-RのDay 0における発現量がDay 14よりも有意に高かった (** $p < 0.05$, Fig. 2b-f)。そこで、Day 0におけるVEGF mRNA発現とE-R α およびP-R mRNA発現との相関性を検討した (Fig. 3b)。その結果、VEGFとE-R α mRNA発現との間で正の相関のある傾向が認められた。また、Day 0およびDay 14における平均P₄, E₂濃度をそれぞれ測定したが、Day 0にはE₂濃度が高く、Day 14にはP₄濃度が高かったことが確認できた (0.02 \pm 0.006 vs 5.7 \pm 2.9, 5.5 \pm 0.6 vs 0.6 \pm 0.3, Fig. 4)。

これらの結果より、発情期に子宮内膜厚の増加をもたらすVEGFは単独で作用しているのではなく、E₂濃度の上昇とともに増加するE-R α の増

加を介して作用していることが示唆された。一方で、子宮内膜組織中のVEGF-R1およびVEGF-R2は、Day 0 およびDay 14において一定量発現していたことから、VEGFはVEGF-Rの増加ではなく、VEGFタンパク自体の増加によりその作用を発現すると考えられる。同一個体でも発情周期ごとに子宮内膜厚のピークが異なることから、発情時の子宮内膜厚変化が小さい場合のデータを蓄積し、子宮内膜厚調節機序、すなわちVEGF発現が低調となる要因を検討していくことで受胎性の改善につながる可能性がある。

家畜としての牛の生産効率向上のためには順調な繁殖サイクルの維持が不可欠である。適期の受精および受胎率の改善が求められる中、子宮内膜厚の増加をもたらすVEGFの生理的役割の解明は牛の受胎性の向上につながると考えられる。また、子宮内膜厚増加という生理的反応は、「妊娠への準備」とされているが具体的な意義は明らかにされていない⁵⁾。今後は、発情期の子宮内膜厚増加によりもたらされる妊娠に向けた子宮内膜の生理的变化、あるいは反応について追究する必要がある。

4. 要 約

肉用および乳用牛ともに生産効率の向上には、低迷する受胎性の改善が重要な課題となっている。本研究では受胎の場となる子宮の生理的機能の解明を目的に、発情周期を通して変化する牛子

宮内膜厚の増加調節因子としてVEGF発現に着目し、VEGFと子宮内膜厚との関係ならびにその調節機序について検討した。その結果、発情期の子宮内膜におけるVEGF発現は黄体期よりも増加し、その発現量は子宮内膜厚変化率と正の相関を示した。また、発情期には血中E₂濃度の上昇とともに、子宮内膜におけるE-R α の有意な増加を認め、さらにVEGF発現とE-R α の発現には正の相関性を認めた。以上のことより、発情期における牛の子宮内膜はE₂およびE-R α の増加を介してVEGFの発現が増加することにより子宮内膜厚が増加することが明らかとなった。子宮内膜厚の増加の大きさは受胎性に関係することが示唆されていることから、今後はVEGFの生理的役割ならびに子宮内膜厚増加により生じる受胎に対する正の効果を検討し、受胎性の改善につなげる必要がある。

文 献

- 1) 杉浦智親, 奥山みなみ, 中田健, 片桐成二: 第162回日本獣医学会学術集会講演要旨集, p 264, つくば, 2019.
- 2) Shweiki, D., Itin, A., Neufeld, G., Gitay-Goren, H., Keshet, E. : *J. Clin. Invest.*, **91**, 2235~2243, 1993.
- 3) Cullinan-Bove, K., Koos, R. D. : *Endocrinology*, **133**, 829~837, 1993.
- 4) Sugiura, T., Akiyoshi, S., Inoue, F., Yanagawa, Y., Moriyoshi, M., Tajima, M., Katagiri, S. : *J. Reprod. Dev.*, **64**, 135~143, 2018.
- 5) Rockwell, L. C., Pillai, S., Olson, C. E., Koos, R. D. : *Biol Reprod.*, **67**, 1804~1810, 2002.

温度センサと加速度センサを内蔵する 多機能尾部センサの乳牛周産期管理への利用

Peripartum management using a multimodal tail-attached device with a thermistor and a triaxial accelerometer in dairy cattle

檜垣 彰吾¹・櫻井 玲奈¹・松井 義貴²

(¹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,

²地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場)

Shogo Higaki¹, Reina Sakurai¹ and Yoshitaka Matsui²

(¹National Institute of Animal Health, NARO, ²Dairy Research Center, Hokkaido Research Organization)

In this study, we determine the applicability of a new multimodal tail-attached device to peripartum management in dairy cows, especially to calving prediction. The tail-attached device equipped with thermistor and 3-axis accelerometer can monitor physiological (surface temperature : ST) and behavioral (activity intensity, standing time, posture changes, and tail raising intensity) parameters simultaneously. Sensor data were collected from 50 and 12 pregnant cattle reared in farms A (tie-stall barn) and B (free stall barn), respectively. Since one cattle showed astasia before calving in farm A, the data was omitted and the following analysis were done using the remaining data. Based on the sensor data, substantial changes in physiological and behavioral parameters were detected before calving; namely, decreasing in ST and increasing in activity intensity, standing time, posture change, and tail raising intensity. Two machine learning models were constructed for predicting calving within the next 24 h and 6 h using the randomly selected 30 datasets (training data) of farm A. When the prediction models were applied to the data of pregnant cattle that were not part of the training process in farm A, calving within the next 24 h and 6 h were predicted with 94.7% sensitivity and 94.7% precision, and 68.4% sensitivity and 100% precision, respectively (n = 19). While in farm B, the prediction models were relatively ineffective; sensitivity and precision of the calving prediction models were 75.0% and 45.0% within the next 24 h, and 58.3% and 87.5% within the next 6 h, respectively (n = 12). Since machine learning is the search for algorithms that reasons from externally supplied instances (training data) to produce general hypotheses (models), these results suggest that a tail-attached device may have the potential to achieve effective calving prediction, if enough training data is available.

1. 目 的

近年、乳牛・肉牛を問わず多頭飼育化が急速に進みつつあり、一農場当たりの平均飼養頭数はこ

の20年間でほぼ倍増して乳牛では90頭程度、肉牛では55頭程度となっている¹⁾。その一方で、畜産従事者の高齢化と後継者不足が深刻な問題となっており、少人数で効率よく多数の牛を管理可能な

技術の開発が喫緊の課題となっている。

周産期（分娩の前徴が現れてから産褥期までの期間）には難産や乳熱、胎盤停滞、乳房炎などの異常・疾病が多発する。分娩に立ち会い、必要に応じて処置を施す看護分娩は、難産による子牛および母牛の損耗防止のほか、周産期疾病の重症化を回避する疾病の早期発見に有効である。しかし、適切なタイミングで分娩に立ち会うためには昼夜を問わない頻回の分娩監視が必要であるだけでなく、周産期疾病の早期発見には妊娠牛・産褥牛を対象とした注意深い観察が必要となることから、従事者への身体的・精神的な負担が大きい。したがって、正確に分娩予測や周産期疾病の早期検知が可能となれば、妊娠牛や産褥牛を対象とした観察に要する労力が大幅に軽減されるだけでなく、難産に伴う子牛・母牛の損耗防止ならびに周産期疾病の重症化予防を通じ、農場全体の生産性向上につながると期待できる。

そこで本研究では、省力的かつ客観的なデータに基づく分娩予測法ならびに周産期疾病の早期検知法を開発するため、申請者らが開発した多機能尾部センサを用い、分娩前や周産期疾病罹患時に特異的な生理学的変化（体表温）や行動の変化を明らかにし、体表温データおよび行動解析データを人工知能（機械学習法）により解析すること

で、正確に分娩時期を予測可能なアルゴリズムならびに早期に周産期疾病を検知可能なアルゴリズムの構築を試みた。

2. 方法

2.1 分娩前後における多機能尾部センサデータの採取

試験は、A農場（タイストール飼育、ホルスタイン種）とB農場（フリーバーン飼育、ホルスタイン種・ブラウンスイス種）の2農場で実施し、それぞれの農場から50頭と12頭、計62頭の妊娠牛を供試した。

多機能尾部センサ（幅20.0mm、長さ26.0mm、厚さ10.0mm、重さ5.4g）（Fig. 1A）は、専用が開発した装着器具に封入した後（Fig. 1B）、尾根部腹側に温度感知部が位置するように、また、尾の左右、上下、前後方向がそれぞれX軸、Y軸、Z軸となるように粘着テープおよび面ファスナーベルトを用いて装着した（Fig. 1C）。センサは分娩予定日の約2週間前（ 14.5 ± 4.0 日）から分娩約1週間後（ 7.8 ± 3.3 日）まで装着し、体表温（3分間隔で測定）、活動量（5 Hzで測定した値の5秒間における最小値の3分間の標準偏差）、ロール角（5 Hzで測定した値の3分間平均値）およびY軸加速度（5 Hzで測定した値の3分間平均値：挙



Fig. 1 Shape of the tail-attached device and the attachment unit, and position of the trail-attached device
 A. Shape of the multimodal tail-attached device. The device characteristics were : 21.0mm×26.0mm×9.7mm and 5.8 g with battery. B. Attachment unit of the tail-attached device. C. Attaching position of the tail-attached device. The device was attached to the base of the tail. Orientation of the x-, y-, and z-axis were lateral, proximal/distal and dorsal/ventral of tail, respectively. Roll indicates rotate the x- and z-axis around the y-axis.

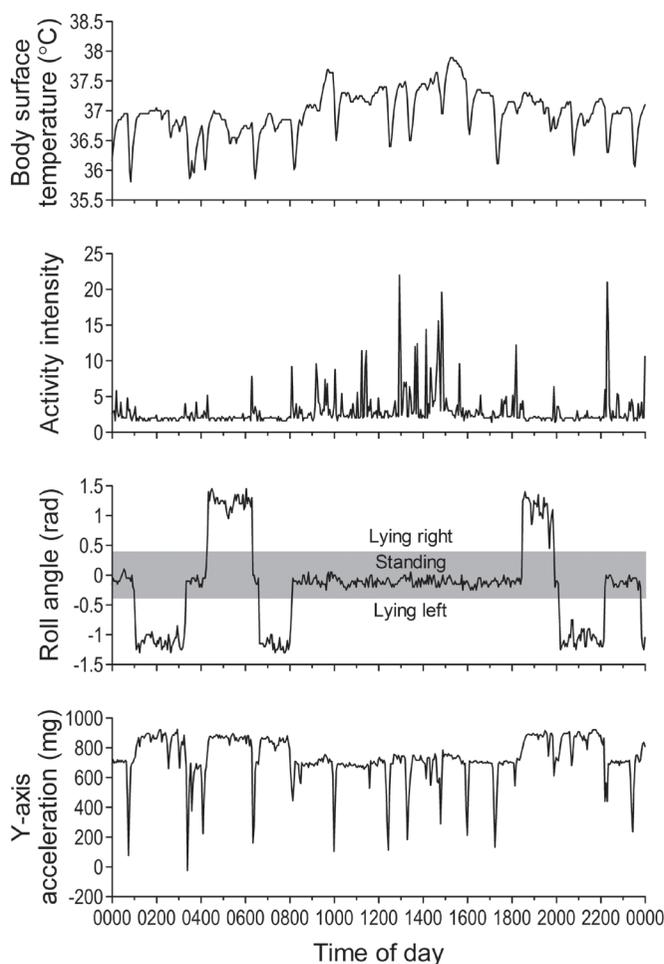


Fig. 2 Representative of sensor data for 24 h obtained by the tail-attached device
Gray horizontal bar indicates the range of roll angle at standing position.

尾の程度を推定可能)を計測した (Fig. 2)。

センサデータは無線通信により専用の受信機で受信し、クラウド上へ収集した。また、試験期間中は目視あるいはビデオ撮影を行うことで正確な分娩時刻を記録するとともに、周産期疾病への罹患の有無ならびに治療の有無・方法についても記録を行った。

2.2 分娩前後におけるセンサデータ変動の解明

体表温データは1時間ごとの最高値、活動量データは1時間ごとの平均値を算出し、解析に用

いた。ロール角の数値から各時点における姿勢(起立あるいは横臥)の判別が可能であることから、ロール角データからは1時間ごとの起立時間ならびに起臥回数を算出し、解析に用いた。また、Y軸加速度データについては、1時間ごとの平均値を算出し、解析に用いた。

それぞれのデータから日内変動等の影響を排除するため、体表温データは前3日間の同時刻平均値との差(体表温差)、活動量データ・起立時間データ・起臥回数データは過去24時間における合計値をその前24時間(過去48時間～過去24時間)

の合計値で割った値（活動量比・起立時間比・起臥回数比）を解析した。また、Y軸加速度データについては、過去3時間における平均値をその前24時間の平均値で割った値（Y軸加速度比）を解析した。

産子が娩出された時刻を0時間として、体表温差・活動量比・起立時間比・起臥回数比・Y軸加速度比のそれぞれについて、分娩240時間前から分娩169時間前の値を対照とし、分娩168時間前から分娩48時間後の各時点との比較を行った。統計学的解析にはSteel法を用い、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。

2.3 機械学習による分娩予測法の開発

多機能尾部センサにより得られた体表温差、活動量比、起立時間比、起臥回数比、Y軸加速度比のデータを指数移動平均法により平滑化した後、それぞれから5個ずつ計25個の特徴量（統計解析の説明変数に相当）を抽出した。なお、特徴量としては、分娩前の特異的な変化を表現可能な値として、現在の値だけでなく、過去12時間や24時間における最高値・最低値などを使用した。これらセンサデータから抽出した特徴量と非センサデータの特徴量である「分娩予定日までの日数」を合わせた計26個の特徴量を用い、分娩予測が可能な機械学習モデルの作成・評価を行った。

具体的には、A農場で採取したデータのうち、分娩前から起立困難となった1頭分のデータを除外した49頭分のデータからランダムに30頭分を抽出後、それらを教師データとして24時間以内の分娩（24-h prediction model）および6時間以内の分娩（6-h prediction model）を予測可能な2つの機械学習モデルを作成し、A農場の残りの19頭分とB農場の12頭分のデータをテストデータとしてモデルの評価を行った。なお、24-h prediction modelは分娩前24時間～分娩後12時間を、6-h prediction modelは分娩前6時間～分娩後6時間

を正例とし、R言語で提供されているニューラルネットワークパッケージ²⁾を用いてモデルを作成した。

分娩前24時間以内あるいは分娩前6時間以内のアラートを真陽性、それ以外のアラートを偽陽性、分娩前24時間以内あるいは分娩前6時間以内にアラートがなかった場合を偽陰性として、分娩予測の感度（真陽性/[真陽性+偽陰性]）、精度（真陽性/[真陽性+偽陽性]）、F1スコア（ $2 \times \text{感度} \times \text{精度} / [\text{感度} + \text{精度}]$ ）を算出した。

3. 結果と考察

供試した62頭の高機能尾部センサの装着期間は平均 22.1 ± 5.1 日間であった。加速度センサを内蔵した市販の尾装着型センサを用いた研究では、装着した牛の約17%で尾の浮腫や疼痛が認められたと報告されているが³⁾、本研究では明瞭な浮腫や疼痛、擦過傷などの異常が認められなかったことから、申請者らの開発した多機能尾部センサは侵襲性が低いと考えられた。

分娩前後における体表温差、活動量比、起立時間比、起臥回数比およびY軸加速度比の推移をFig. 3に示す。既報において、分娩前における二相性の体表温の低下⁴⁾、活動量・起立時間・起臥回数の増加^{5~7)}、挙尾回数・時間の増加⁸⁾が報告されており、本研究においても、多機能尾部センサを用いることでそれらの変化を検知可能であることが示された。すなわち、体表温差は分娩前48時間ごろから徐々に低下し始め、その後、分娩前6時間～分娩まで急激に低下することが確認された。また、活動量比は分娩前24時間ごろから、起立時間比は分娩前48時間ごろから、起臥回数比は分娩前12時間ごろから分娩に向けて増加することが確認された。Y軸加速度は尾が下垂している状態で正の値を示し、水平で0、挙尾の状態で負の値を示すため、分娩前6時間～分娩までのY軸加

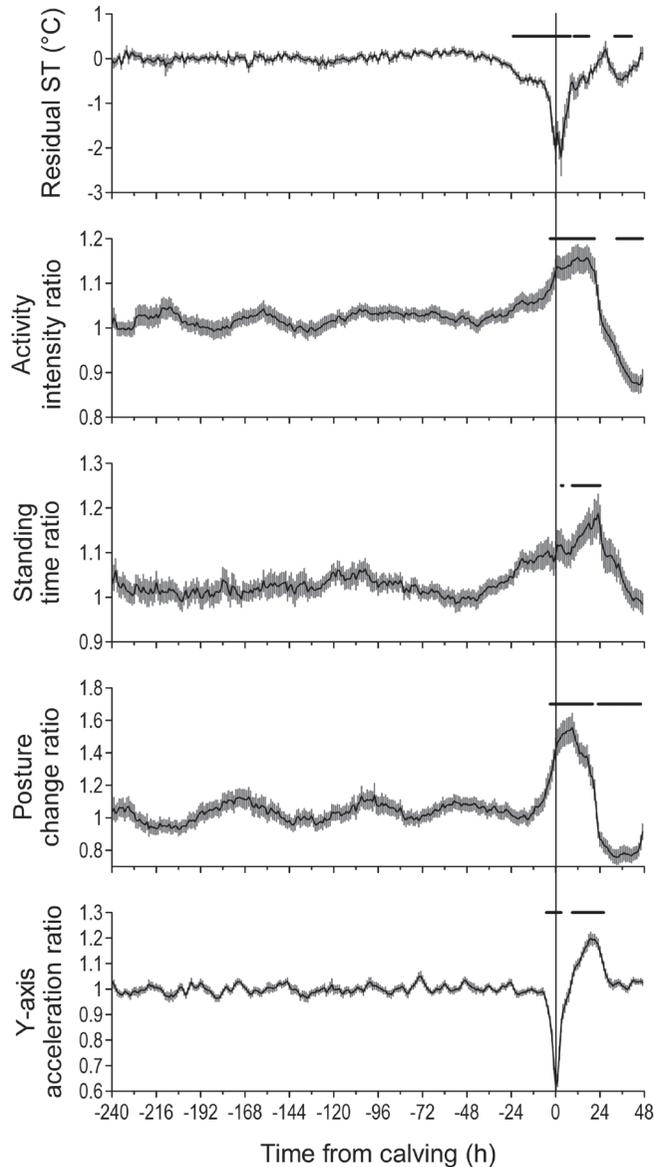


Fig. 3 Changes in residual tail surface temperature (ST) and ratios of activity intensity, standing time, posture change, and Y-axis acceleration throughout a natural estrous cycle

Residual ST was calculated as actual ST-mean ST for the same time on the previous 3 days. Ratios of activity intensity, standing time, and posture change were calculated as sum of hourly values during the last 24 h / sum of hourly values during the last 24 to 48 h. Y-axis acceleration ratio was calculated as average value during the last 3 h / average value during the last 24 h. Data were standardized to calving (0 h : vertical line). Black dots indicate the time points with significant differences between values at the indicated time point and the mean values during the reference period (-240 h to -169 h from ovulation) ($p < 0.05$). Data are expressed as mean \pm standard error ($n = 61$).

速度比の急激な低下は、挙尾回数・時間の増加を示している。

多機能尾部センサデータに基づき24時間以内および6時間以内の分娩を予測した結果をTable 1

Table 1 Calving prediction efficiency based on the data obtained by the tail attached device

Farm*	No. of cattle	Prediction model	True positive	False positive	False negative	Sensitivity	Precision	F1
A	19	24-h	18	1	1	94.7	94.7	0.947
		6-h	13	0	6	68.4	100.0	0.813
B	12	24-h	9	11	3	75.0	45.0	0.563
		6-h	7	1	5	58.3	87.5	0.700
Total	31	24-h	27	12	4	87.1	69.2	0.771
		6-h	20	1	11	64.5	95.2	0.769

Calving prediction models were developed using 30 cattle in Farm A through artificial neural network. Sensitivity, precision, and F1 score were calculated as $TP/(TP + FN)$, $TP/(TP + FP)$, and $2 \times \text{sensitivity} \times \text{precision}/(\text{sensitivity} + \text{precision})$, respectively, where TP, true positive; FN, false negative; and FP, false positive. *Housing system of Farm A (dairy cattle) and B (dairy cattle) were tie-stall and free-stall, respectively.

に示す。A農場において、24時間以内の分娩の予測結果は感度・精度ともに約95%であった。これは、生理学的変化（腔内温度、ルーメン内温度、体表温度：感度62~89%・精度49~80%）^{9~13)}あるいは行動学的変化（歩数や臥位時間ならびにそれらの比や起臥回数：感度50~83%・精度30~35%）^{12,14)}のみに基づいた従来の分娩予測法よりも高値であり、生理学的変化と行動学的変化の両者を評価可能な多機能尾部センサの有用性を示していると考えられる。また、6時間以内の分娩を予測した結果（感度68%・精度100%）についても、尾装着型加速度センサを用いた従来の報告（4時間以内の分娩を予測：感度47~66%、精度34~43%）³⁾に比べて著しく高い精度が得られた。今回の研究では、非センサデータの「分娩予定日までの日数」を特徴量のひとつに利用しており、これは、センサデータだけでなく非センサデータである「分娩予定日までの日数」を特徴量として加えることで、分娩予測性能が向上したとする報告と合致する^{4,5)}。

上記のように、A農場では分娩予測の感度・精度ともに非常に高い値が得られたものの、B農場では低値を示した。機械学習では、与えられた多個体の教師データから共通するパターンを見つけ出し、そのパターンの数式化（モデル化）を行

う。本研究では、A農場で得られたデータのみを教師データとして分娩予測モデルを構築していることから、B農場で予測性能が低かったのは、飼養環境によって分娩前におけるセンサデータの変動が異なっていたことを示唆している。そのため、さまざまな飼養環境下における教師データが十分に蓄積されれば、飼養環境に依存しない、高感度・高精度な分娩予測が可能になると期待される。

本研究の供試牛では、主要な周産期疾病である乳熱やケトーシス、第四胃変位などの罹患は認められなかった。そのため、当初予定していた周産期疾病の予測アルゴリズムの開発には至らなかった。しかし、A農場において、分娩前に起立困難となり、分娩後に斃死した個体について、臨床症状と合致したセンサデータが得られた（Fig. 4）。すなわち、健康牛に比べて活動量が低く、終日横臥しており、挙尾や体表温の変動が著しく不整であることを示す結果が得られた。このことから、周産期疾病罹患牛のデータ収集を進めることで、周産期疾病の検知・予測が可能になると考えられる。

4. 要 約

本研究はA農場（タイストール飼育）とB農場

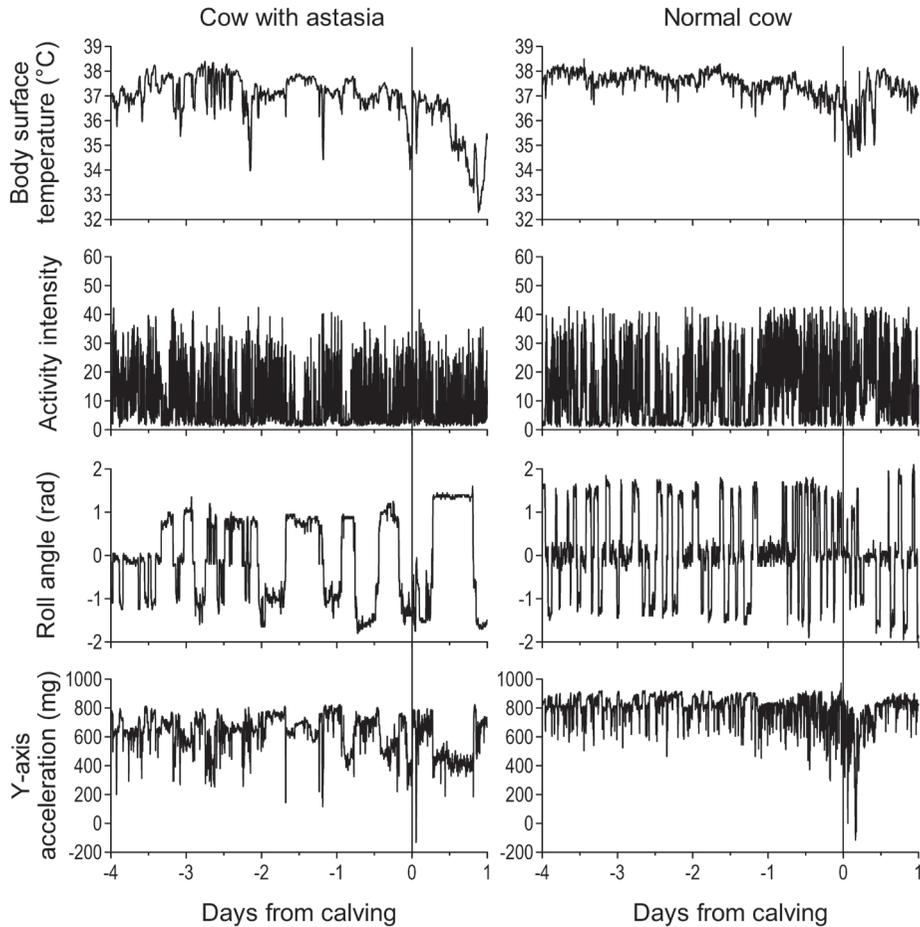


Fig. 4 Representatives of sensor data around calving in cows with and without disease
 Graphs in the left and right column show the sensor data of the cows with and without of disease (astasia), respectively. Data were standardized to calving (0 h : vertical line).

(フリーバーン飼育)の2農場で実施した。申請者らが開発した多機能尾部センサを用い、分娩前後におけるセンサデータを採取・解析した結果、分娩前に特異的な体表温・活動量・起立時間・起臥回数・挙尾に関する変化を検知可能であることが示された。また、A農場で得られたデータの一部を教師データとして機械学習による分娩予測モデルを作成し、A農場の残りのデータおよびB農場で得られたデータを対象に性能評価を行った結果、B農場では予測性能は低かったものの、A農場では24時間以内の分娩を感度・精度ともに約

95%で予測することに成功した。これらのことから、さまざまな飼養環境下における教師データの蓄積を進めることで、飼養環境によらず、高感度・高精度な分娩予測が可能になると期待される。

文 献

- 1) 農林水産省：畜産統計調査, <https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/tikusan/> (accessed : 2021 March 10)
- 2) Ripley, B., Venables, W., Ripley, M. B. : Package 'nnet', R package version, 7, 3~12, 2016.
- 3) Vos, A., Fischer-Tenhagen, C., Bartel, A., Heuwieser, W. : *Journal of Dairy Science*, **104**, 3353

- ~3363, 2020.
- 4) Higaki, S., Koyama, K., Sasaki, Y., Abe, K., Honkawa, K., Horii, Y., Minamino, T., Mikurino, Y., Okada, H., Miwakeichi, F., Darhan, H., Yoshioka, K. : *Journal of Dairy Science*, **103**, 8535~8540, 2020.
 - 5) Borchers, M., Chang, Y., Proudfoot, K., Wadsworth, B., Stone, A., Bewley, J. : *Journal of Dairy Science*, **100**, 5664~5674, 2017.
 - 6) Fadul, M., Bogdahn, C., Alsaaod, M., Hüsler, J., Starke, A., Steiner, A., Hirsbrunner, G. : *Animal Reproduction Science*, **187**, 37~46, 2017.
 - 7) Rutten, C., Kamphuis, C., Hogeveen, H., Huijps, K., Nielen, M., Steeneveld, W. : *Computers and Electronics in Agriculture*, **132**, 108~118, 2017.
 - 8) Krieger, S., Sattlecker, G., Kicking, F., Auer, W., Drillich, M., Iwersen, M. : *Biosystems Engineering*, **173**, 79~84, 2018.
 - 9) Burfeind, O., Suthar, V., Voigtsberger, R., Bonk, S., Heuwieser, W. : *Journal of Dairy Science*, **94**, 5053~5061, 2011.
 - 10) Costa, Jr. J., Ahola, J., Weller, Z., Peel, R., Whittier, J., Barcellos, J. : *Journal of Dairy Science*, **99**, 4839~4850, 2016.
 - 11) Koyama, K., Koyama, T., Sugimoto, M., Kusakari, N., Miura, R., Yoshioka, K., Hirako, M. : *The Veterinary Journal*, **240**, 1~5, 2018.
 - 12) Ouellet, V., Vasseur, E., Heuwieser, W., Burfeind, O., Maldague, X., Charbonneau, E. : *Journal of Dairy Science*, **99**, 1539~1548, 2016.
 - 13) Ricci, A., Racioppi, V., Iotti, B., Bertero, A., Reed, K., Pascottini, O., Vincenti, L. : *Theriogenology*, **113**, 27~33, 2018.
 - 14) Maltz, E., Antler, A. : *Proceedings Precision Livestock Farming*, **7**, 141~146, 2007.

受胎性を裏付ける黒毛和種牛の分娩後子宮修復指標の 確立

Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm
the female fertility

久保田 海 雄

(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)

Kaiyu Kubota

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

Longer post-partum interval causes huge economic loss in the cattle management. Estrus detection followed by certain performance of artificial insemination is the initial step to shorten its duration. After that, the full recovery of the uterus from the damage by parturition, so-called “uterine involution” is required to achieve the embryonic implantation into uterus for pregnancy success. Even to date, the conventional rectal palpation with ultrasonography is the almost only choice to evaluate the genital tract, however, it only gives a gross information, e.g. size of uterus and loss of discharge, but not the details including the probability to become pregnant, i.e. infertility. Therefore, the aim of the present study was to investigate the molecular profile of the endometrium during the uterine involution for the identification of a quantitative and reliable molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility. Endometrial samples from Japanese Black beef cows were collected by the cytobrush continuously during the uterine involution for the RT-qPCR gene expression analysis. Protein localization was also analyzed by immunohistochemistry for the endometrial mass specimen from slaughtered cows. The results showed that expressions of the inflammatory factors such as interleukin 1B were upregulated at the beginning and immediately reduced, indicating its usability as a marker for the condition of the inflammation like metritis but not for the uterine involution. On the other hand, insulin-like growth factor 1 (IGF1) expression was high at first and gradually decreased along with the involution beyond the timing of lochia loss. IGF1 is known to function in cell proliferation and, thus, seems to play a role in involution and be diminished once the process is over, demonstrating its usage as a marker for the involution. In addition, the expression of epithelial membrane marker, MUC1 did not altered throughout the involution period, but increased after involution. Because MUC1 is believed to inhibit the embryonic implantation, it might be used as a marker for uterine receptivity. Taken together, although there are still numbers of bottlenecks to be solved in future, IGF1 and MUC1 could be the potential candidates for the molecular marker of the uterine involution and uterine receptivity.

1. 目 的

分娩間隔の延長は農業経営に負の影響を与えるため、分娩後なるべく早い時期に受胎させることが必要である。近年の分娩後初回人工授精日数は黒毛和種で最頻値55日（平均値73日）、乳牛で最頻値71日（平均値93日）となっているが、実際の初回発情はこれより早期に起こっており、人手不足や外部徴候を見せない発情（鈍性発情）のために見逃されている。近年では各種センサーを活用し、また超音波診断を併用することで、現状の初回人工授精日数より早い時期での発情、特に鈍性発情を検出可能となってきた。この分娩後早期の発情期に確実に人工授精を行うことが分娩間隔短縮につながると期待されている。

発情検出・人工授精実施により妊娠が成立（受胎）するためには、分娩により損傷した子宮が修復される必要がある（子宮修復）。超音波画像診断によると子宮内滞留物は分娩約30日後までに排出され、子宮角・頸は40日後までに妊娠前の大きさに戻るが、分娩50日後においても20%の子宮では子宮滞留物とともに排出される細菌が検出される。つまり、早期に人工授精を実施しても子宮側に問題があれば受胎しないが、現在においては子宮修復を定量的・客観的に評価するシステムが存在しない。ここで、受胎までに要する人工授精の回数は黒毛和種1.5回、乳牛2.5回であり、受胎成立までに複数回の人工授精が必要とされるが、子宮修復が完了していないことも受胎不成立や早期胚死滅の要因の一つとして考えられる。

ヒトにおけるインフルエンザ診断キットや妊娠検査薬は、ウイルスを構成するタンパク質の量や妊娠により胎盤が分泌するホルモン（hCG）のタンパク質量を定量することを原理としている。このように迅速かつ容易な判定法により牛の子宮修復を判定可能となれば、生産現場へ普及し、分娩

間隔の短縮や人工授精実施回数の縮小に貢献することが考えられる。そこで本研究では、分娩後の哺乳中黒毛和種雌牛において、細胞診用サイトブラシにより非侵襲的かつ経時的に子宮内膜検体を採取・解析し、また三次元的な理解のためには子宮内膜片を組織学的に解析することで子宮修復の分子生物学的機構・特徴を明らかにし、その結果として子宮修復の分子指標（マーカー）因子を特定することを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試牛

子宮内膜炎や乳房炎等の外的要因が少ない黒毛和種雌牛を初産・経産の区別なく供試した。本研究に用いた母牛は分娩前後とも臨床上異常所見が見られず正常分娩と考えられた。分娩1週前に分娩房へ移動し、分娩後約10日間は子牛同居の元で分娩房にて管理した。分娩後約10日目に屋外コンクリートパドックへ移し、自由採食（乾草）、自由飲水条件下で集団での親子飼育を分娩後約90日の離乳まで継続した。

2.2 卵巣（発情）周期検出

卵巣周期特定のために2～3日おきに頸静脈から採血を行い、プロゲステロン濃度を測定した。並行してヒートマウントディテクター、活動量センサーを常時装着し発情行動のモニタリングを行った。また、卵巣周期とともに悪露消失を評価するため、分娩後10日目から60日目まで10日おきに卵巣・子宮の超音波診断を行った。

2.3 遺伝子発現解析（RT-qPCR解析）

細胞診用サイトブラシを用いて、分娩後20日目より50日目まで10日ごとに経時的に子宮内膜検体を採取した。また、子宮修復後の分娩後60日目から150日目までに発情期、黄体期の子宮修復後子宮内膜検体を同様に採取した。さらに比較対象として空胎500日以上の子牛から、長期空胎牛とし

て同様に検体を採取した。それぞれの検体より全RNAを抽出し、cDNAに逆転写後に定量的リアルタイムPCRにより*IL1B*, *IL8*, *SAA2*, *EGF*, *IGF1*および*MUC1*遺伝子の発現解析を行った。解析には18S rRNAを内部標準として、 $\Delta\Delta CT$ 法を用いて相対的発現量を評価した。

2.4 タンパク質局在解析（蛍光免疫組織化学染色解析）

分娩後20日目と、60日目以降の黄体期および発情期の計3点においてと殺を行い、子宮小丘および小丘間部位を採取した。検体は速やかに凍結し凍結切片を薄切した。4%パラフォルムアルデヒドにて固定し0.2%TRITONxで透過処理後、4℃で一晩SAA2, IGF1およびMUC1特異的1次抗体(Abcam)と結合させ、蛍光標識した2次抗体(Invitrogen)により染色した。また、DAPIにより核を対比染色した。

2.4 培養細胞系における発現制御解析

卵巣周期変動により発現が変化する*MUC1*遺伝子について、性ステロイドホルモンによる発現制御を培養細胞において解析した。サイトブラシにより子宮内膜上皮細胞を単離し、10%牛血清を含むダルベッコ改変培地/F12培地により培養した。コンフルエント後に血清フリー培地に変換し100nMエストラジオールおよび10 μ Mプロゲステロンで48時間処理し、処理後細胞を回収し*MUC1*遺伝子発現を解析した。

3. 結果と考察

本研究に用いた牛群では、超音波診断による子宮検査の結果から悪露消失は41.0 \pm 1.8日目であり、またその他卵巣周期評価より初回排卵は44.0 \pm 6.2日目、初回発情は53.9 \pm 5.9日目であった。以上の基礎パラメーターを元に、複数の因子について以下に子宮修復マーカーとしての応用性を評価した。

最初に炎症性因子について解析した。炎症性サイトカインであるインターロイキン1B (*IL1B*)、その急性相反応物質である血清アミロイドA2 (*SAA2*) の発現は、分娩後20日目に最も高く、30日目には急速に減少し、以降は低値を維持していた (Fig. 1)。IL1により誘導されるIL8に関しても同様であった。また免疫組織化学染色解析より、*SAA2*は子宮内膜上皮細胞に局在しており、その発現は分娩後20日目に認められるものの、子宮修復後には消失していた。子宮内膜は分娩後2週目をピークに炎症を起し、通常その後すぐに解消されるが、そうでない場合に内膜炎となることがわかっている。これまでも内膜炎では炎症性因子の発現が高いことが報告されている¹⁾。以上より、上記因子は炎症マーカーとして内膜炎の検出には適応可能であるが、子宮修復マーカーとしての適応性は低いことが示唆された。

次に、成長因子について解析した。まず、上皮成長因子 (*EGF*) について遺伝子発現解析を試みたが、検出限界以下であり解析が困難であった。タンパク質発現解析も含め、詳細な条件検討により評価法を改善していく必要がある。続いてインスリン様成長因子1 (*IGF1*) に注目した結果、その発現は分娩後30日目をピークに緩やかに減少した (Fig. 1)。タンパク質発現に関しても子宮内膜上皮細胞において分娩後20日目に強い発現が検出されるが、修復後には減少していた (Fig. 2)。IGF1は細胞増殖に作用し創傷治癒を促進することが広く知られており、ヒト子宮内膜においては月経周期中の内膜の充進に関与すると考えられている²⁾。以上から、IGF1は損傷した内膜細胞を増殖させるために分泌され、悪露消失後に修復が完了するまで緩やかに減少し、修復後に最低値を示す可能性が示唆された。つまり、IGF1を定量することで子宮修復を評価するマーカーになる可能性が期待される。人工授精時にサイトブ

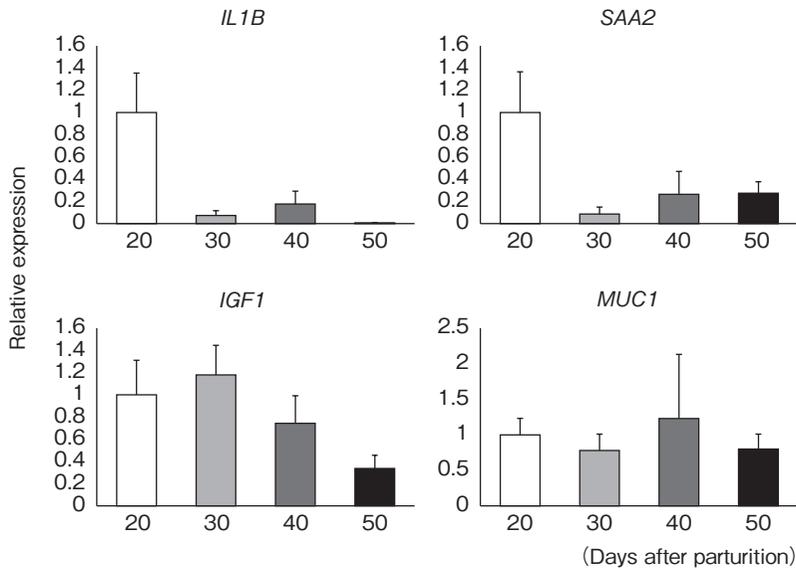


Fig. 1 Time-course expression of *IL1B*, *SAA2*, *IGF1*, and *MUC1* in the endometrium of Japanese Black beef cattle during the uterine involution. Expressions were analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean \pm standard error.

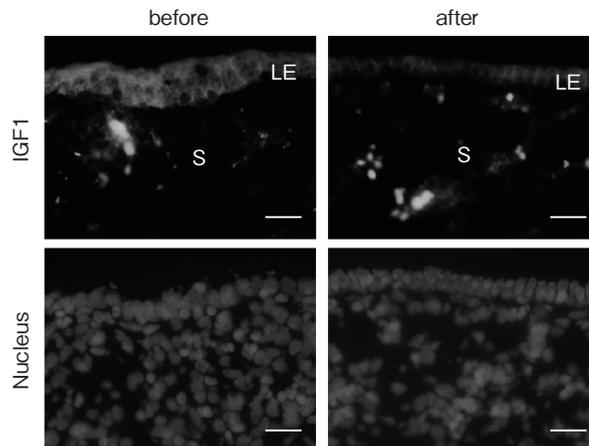


Fig. 2 Localization of IGF1 in the endometrium of Japanese Black beef cattle during uterine involution. A representative picture of IGF1 expression analyzed by immunohistochemistry in the endometrium before (20 days after parturition) or after uterine involution. Nucleus was counter-stained by DAPI. Scale Bar = 20 μ m. LE : luminal endometrium. S : stroma.

ラシによって子宮内膜検体を採取することは受胎率に悪影響を及ぼさないことが報告されており³⁾, IGF1の低発現が人工授精実施の判断材料となり得るか評価するために, 今後は人工授精時におけるIGF1の発現を解析すること, さらに受胎

の成否とIGF1発現の相関性を検討する必要がある。また, IGF1は液性因子であることから臍粘液へ放出されている可能性も考えられる。一方ここで, Fig. 2に示すようにIGF1は子宮内膜間質細胞においても発現が見られ, また受胎にも関与す

る、つまり修復後も子宮内膜で産生されている可能性もあり、単純に低値を良しとすることは安直であるかもしれない。以上より、EIAのような定量検出法の確立、高低判断のための閾値の設定、生産現場に適応し得るデバイスの開発等のさまざまな研究開発が今後は必要とされる。

最後に、上皮細胞膜抗原または粘液糖鎖タンパクとして知られるムチン1 (MUC1) について解析した。MUC1は上皮細胞の頂端側(腔側)表面に細胞膜貫通型タンパクとして局在し、その細胞外ドメインの立体構造から病原体の接触や炎症反応を調節するとされ、またマウスやヒトにおいては子宮内膜への胚の着床を抑制すると考えられている⁴⁾。本研究の結果、分娩後子宮修復前の牛子宮内膜ではMUC1の発現は変動しなかった(Fig. 1)。子宮修復後では発情期において黄体期より高い発現を示した。培養細胞における解析の結果、プロゲステロンがMUC1の発現を抑制していた。その局在は分娩後20日目および黄体期には検出されないが、子宮修復後の発情期子宮内膜上皮細胞内腔側表面に認められた。さらに、子宮修復後の受精適期雌牛の子宮内膜におけるMUC1の発現と比較して、長期空胎牛の子宮内膜では有意に

高い発現が認められた(Fig. 3)。これまでにMUC1はリピートブリーダー牛の子宮内膜で高い発現を示すことが報告されており⁵⁾、本研究結果と一致する。つまり、長期空胎牛等の受胎性の低い子宮内膜でMUC1の発現が高い、もしくはMUC1の発現が高いことから受胎性が低いことが示唆された。前述のIGF1のように、このMUC1に関しても今後、受胎性との相関を比較・評価することで、受胎性マーカーとしての適応が期待される。

4. 要 約

牛の分娩間隔短縮を達成するために、子宮修復を客観的に評価するマーカーを確立することを目指して、黒毛和種繁殖雌牛の分娩後子宮内膜の分子プロファイルを経時的に解析した。その結果、子宮修復に伴い発現が減少するIGF1、そして子宮修復後に発現が上昇するMUC1を同定した。今後、このIGF1やMUC1の発現と受胎性との相関や定量的測定方法、そして基準となる閾値の設定等を検討することによって、子宮修復・受胎性を定量的に評価するマーカーに適応することが期待される。

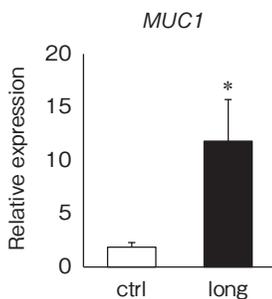


Fig. 3 Upregulation of MUC1 expression in the endometrium of Japanese Black beef cattle without pregnancy for more than 500 days (long). Expression was analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean ± standard error. Asterisk indicates statistical significance compared with control ($p < 0.05$).

文 献

- 1) Dadarwal, D., González-Cano, P., Dickinson, R., Griebel, P., Palmer, C. : *Theriogenology*, **126**, 128~139, 2019.
- 2) Zhou, J., Dsupin, B. A., Giudice, L. C., Bondy, C. A. : *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 1723~1734, 1994.
- 3) Kaufmann, T. B., Drillich, M., Tenhagen, B.-A., Forderung, D., Heuwieser, W. : *Theriogenology*, **71**, 385~391, 2009.
- 4) Meseguer, M., Pellicer, A., Simón, C. : *Mol Hum Reprod*, **4**, 1089~1098, 1998.
- 5) Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Kastelic, J. P. : *Theriogenology*, **81**, 952~958, 2014.

卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討

Examination of new selection method of recipient cow based on ovarian reserves

小 山 毅

(北海道立総合研究機構畜産試験場)

Takeshi Koyama

(Animal research center, Hokkaido research organization)

The purpose of this study was to investigate the effect of ovarian reserve on reproductive physiology after estrus synchronization for embryo transfer and performance of embryo transfer. In experiment 1, the effect of ovarian reserve (antral follicle count (AFC) and anti-Müllerian hormone (AMH)) on reproductive physiology after estrus synchronization for embryo transfer was investigated using 22 Japanese black cows. The mean value of cross-sectional area of right and left uterine horn was larger in cows with high AFC (AFC >62) than that in cows with low AFC (AFC ≤ 62). This result suggested that cows with high AFC had a thicker endometrium after estrus and might have higher fertility. AMH concentration had no effect on reproductive physiology after estrus synchronization for embryo transfer. In experiment 2, frozen thawed in vivo derived embryos were transferred to 32 tested cows to investigate the relationship between ovarian reserve and fertility outcome. The odds ratio of AFC for conception at 40 or 60 days after estrus were 1.21 (95% confidence interval (CI) : 0.94 to 1.56, $p = 0.14$) and 1.24 (95% CI : 0.93 to 1.57, $p = 0.16$), respectively. The odds ratio of AMH concentration for conception at 40 or 60 days after estrus were 1.24 (95% CI : 1.00 to 1.55, $p = 0.05$) and 1.12 (95% CI : 0.93 to 1.34, $p = 0.23$), respectively. These results suggested that cows with high AFC or AMH concentration might be more likely to conceive. Future studies are necessary to increase the number of embryo transfer, as well as a detailed mechanism of the effect of ovarian reserve on endometrium function.

1. 目 的

これまで受精卵移植成績の向上のために、高品質卵回収の効率化や回収卵の保存、培養技術の改良など、供卵牛側からの取り組みが主であった。日本における近年の受精卵移植成績は停滞気味であり、受精卵移植成績のさらなる高位安定化のた

めには別の方法、すなわち受卵牛側からの受胎成績向上のための取り組みが必要である。

近年、牛の繁殖領域において卵巣予備能が注目されている。卵巣予備能は卵巣における卵胞の量と定義され、末梢血中の抗ミューラー管ホルモン (Anti-Müllerian hormone, AMH) 濃度または前胞状卵胞数 (antral follicle count, AFC) に

よって評価することが可能である。卵巣予備能が高い牛は過剰排卵処理における高品質卵の回収成績が良いことが報告されており¹⁾、供卵牛の選定指標の一つとしての活用が期待されている。一方、卵巣予備能と受精卵移植における受胎成績との関係は調査されていないが、卵巣予備能が高い牛では発情周期中のプロゲステロン（P4）やエストラジオール（E2）などの性ホルモン濃度が高く、子宮内膜が厚い²⁾ことが報告されている。これらの特徴から卵巣予備能が高い牛は受胎性が高い可能性がある。

日本では諸外国と比較して牛の飼養頭数が少なく、限りある受卵牛を効率的に使用するために、受胎確率がより高い牛に受精卵を優先的に移植する必要がある。卵巣予備能と受精卵移植における受胎成績との関係が示されれば、受卵牛の選定指標として卵巣予備能が利用できる可能性がある。

本試験では黒毛和種雌牛を用い、胚移植に伴う発情同期化処置後（以下、受精卵移植条件下）において卵巣予備能が繁殖生理状態および受精卵移植成績に及ぼす影響を調査し、卵巣予備能を活用した受卵牛選定技術を開発するための基盤となる研究を行うことを目的とした。

2. 方法

2.1 受精卵移植条件下における受卵牛の卵巣

予備能が繁殖生理状態へ及ぼす影響の解明

本実験では畜産試験場で飼養されていた黒毛和種繁殖雌牛22頭を供試し、受精卵移植のための発情同期化処理を行った。供試牛に対して発情周期の任意の時期に膈内留置型プロゲステロン徐放剤（CIDR）を膈内に挿入し、同時にエストラジオール製剤を投与した。CIDR挿入8日後にプロスタグランジン製剤（PG）を投与し、PG投与2日後にCIDRを抜去した。CIDR抜去から発情後10日目まで毎日尾静脈からの採血、および生殖器に

対する超音波検査を行った。また、発情時に活動量の計測および発情行動の観察を行い、血中ホルモン濃度、左右子宮角の断面積平均、主席卵胞の大きさおよび黄体の数と大きさの測定、左右卵巣の長径平均、発情に伴う活動量の変化および発情スコア³⁾を調査した。AFCは発情後4日目に、左右卵巣に含まれる直径3mm以上の卵胞数を数えることで評価した。血中P4濃度は発情後0～10日目、E2濃度は発情後-1, 0および1日目の血漿サンプルを測定に用いた。有機溶媒を用いてヘパリン血漿サンプルからP4およびE2の抽出を行った後、ELISA^{4, 5)}により測定した。血中AMH濃度は発情後10日目のヘパリン血漿サンプルを用い、牛用ELISAキット（AL-114, Ansh Lab社）により測定した。

2.2 受卵牛の卵巣予備能が受精卵移植における受胎成績へ及ぼす影響の解明

本実験では実験2.1と同じ供試牛に10頭を追加した、合計32頭を受卵牛として用いた。CIDR抜去後に発情観察を行い、発情後8日目に2種類の精液を用いて作出した同品質の凍結体内受精卵を、黄体側の子宮角深部に同一の技術者が移植した。発情後約40および60日目に超音波検査による妊娠診断を行い、卵巣予備能と受胎成績の関係を解析した。

2.3 統計解析

実験2.1において、供試牛22頭のAFCまたはAMHの中央値を算出し、中央値を上回った牛をH群（AFC-H群またはAMH-H群）、中央値以下の牛をL群（AFC-L群またはAMH-L群）とした。発情周期中の左右子宮角の断面積平均、左右卵巣の長径平均、P4濃度、発情前後24時間の歩数変化量は、AFCまたはAMHによる群分けと発情後日数による二元配置分散分析によって解析した。発情スコアおよびE2濃度はt検定により解析した。実験2.2における卵巣予備能と受胎成

績の関係は、発情後40または60日時点の妊娠状態（受胎，不受胎）を目的変数，AFCまたはAMHおよび受卵牛の移植時年齢を説明変数とした一般化線形モデルにより解析した。AFCは10個当たり，AMHは100pg/ml当たりの変化量に対するオッズ比とその95%信頼区間を算出した。AFCおよびAMHは別々のモデルで検討した。

3. 結果と考察

3.1 受精卵移植条件下における受卵牛の卵巣予備能が繁殖生理状態へ及ぼす影響の解明
供試牛22頭の移植時年齢，AFCおよびAMHの

中央値は6.8歳（4.7～14.9歳），61.5個（14～208個），646pg/ml（96～2,325pg/ml）であった。黒毛和種のAFCおよびAMH濃度はホルスタイン種乳牛のそれ⁶⁾よりも大きかった。Fig. 1にAFCとAMHの関係を示した。AFCとAMHの相関係数は0.855であり，高い相関が認められた。Fig. 2にAFC-H群およびL群における発情周期中の左右子宮角の断面積平均の推移を示した。発情直前に両群ともに断面積が大きくなり，時間の経過とともに断面積が小さくなった。発情周期中，左右子宮角の断面積平均はAFC-H群のほうがL群よりも大きく推移した。一方で，発情前後のE2濃度，

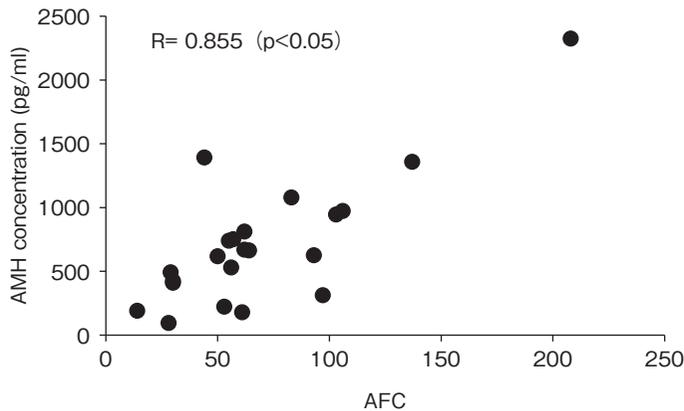


Fig. 1 Relationship between AFC and AMH concentration.

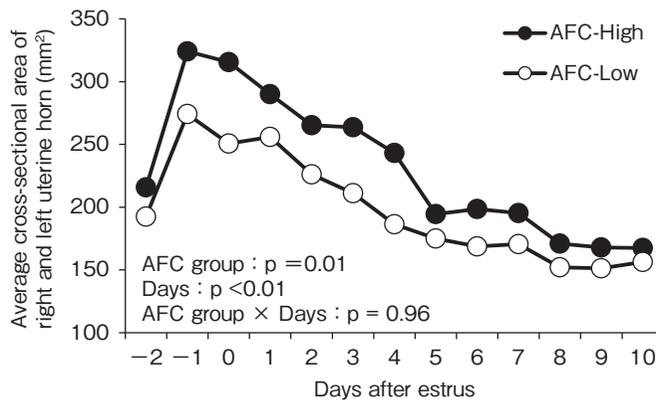


Fig. 2 Effect of AFC level to the average cross-sectional area of right and left uterine horn.

発情周期中の黄体断面積およびP 4濃度は群間で差が認められなかった（データ略）。牛では発情周期中の生理状態の変化に伴い子宮内膜の厚さが大きく変化するため、断面積の変化は子宮内膜の厚さの変化を反映したものと考えられた。乳牛ではAFCが大きい個体では、黄体細胞のP 4産生能力が高く、血中P 4濃度が高くなるため排卵後4日間の子宮内膜面積が大きくなると報告されている²⁾。しかし、本試験ではP 4濃度は両群間で差が認められなかったため、AFC-H群で子宮角断面積が大きくなった機序は不明である。今後、頭数を増やしての検証およびAFCが異なる黒毛和種雌牛由来の黄体細胞を用いたP 4産生能の調査が必要である。

Fig. 3にAFC-H群およびL群における発情周期中の左右卵巣の長径平均の推移を示した。発情後、両群ともに長径平均は漸増した。排卵後の黄体形成および発育、ならびに第一卵胞波における主席卵胞の発育に伴い、卵巣全体が大きくなったと考えられる。一方、AFC-H群のほうが左右卵巣の長径平均が大きく推移した。排卵後に形成された黄体の大きさおよび主席卵胞の大きさは両群間に差は認められなかったことから、H群では卵巣には超音波検査では検出できない小型卵胞を含

め、多くの卵胞が存在したためL群よりも卵巣が大きかったと考えられた。

Fig. 4に、AFC-H群およびL群における発情前後24時間の歩数変化量を示した。発情後の歩数変化量の最大値はAFC-H群のほうがAFC-L群よりも少なかった。また、発情スコアは両群間に差は認められなかった。発情当日（発情後0日目）の血中E 2濃度は群間に差は認められなかった。発情時の活動量は血中E 2濃度の影響だけではなく、同時に発情した個体の頭数等の飼養環境の影響も大きく受けるため、本実験で観察された歩数変化量の差はAFCの差に起因する可能性は低いと考えられた。

AMH-H群とL群間で各変数を比較した結果、すべての項目で群間に差が認められなかった。AMH濃度の個体間差はかなり大きく、統計的検出力が低かった可能性も考えられる。今後、頭数を増やしての検証が必要である。

3.2 受卵牛の卵巣予備能が受精卵移植における受胎成績へ及ぼす影響の解明

供試牛32頭の、発情後40日目および60日目の受胎率は41%（13/32）および34%（11/32）であり、2頭で胚死滅が認められた。AFCまたはAMHが発情後40または60日における受胎成績に

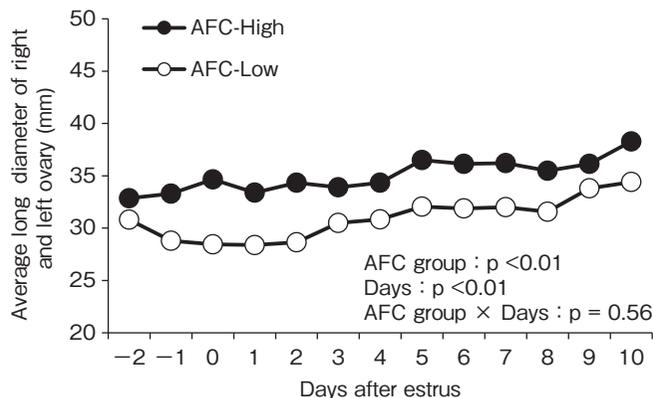


Fig. 3 Effect of AFC level to the average long diameter of right and left ovary.

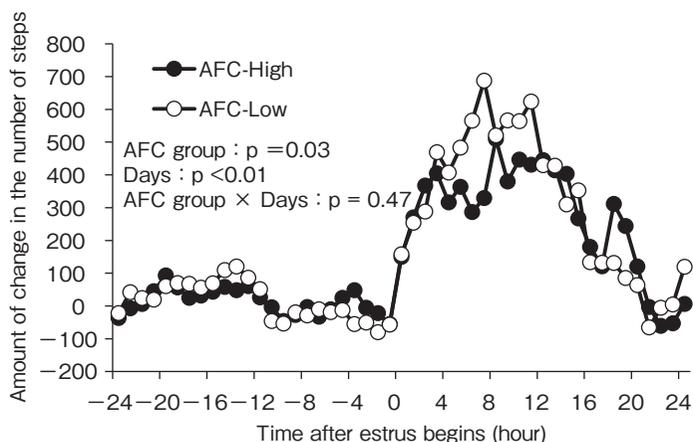


Fig. 4 Effect of AFC level to the amount of change in the number of steps relative to the average number of steps during the 10 days prior to estrus.

Table 1 Association among antral follicle count (AFC) or plasma anti-Müllerian hormone (AMH) concentration and pregnancy by embryo transfer 40 and 60 days after estrus.

Variables	Estimate	Std. Error	Odds ratio (95%CI)	p value
AFC model at 40 days post estrus				
AFC	0.19	0.13	1.21 (0.94 - 1.56)	0.14
Age at embryo transfer	-0.31	0.20	0.74 (0.49 - 1.10)	0.13
AMH model at 40 days post estrus				
AMH concentration (pg/ml)	0.22	0.11	1.24 (1.00 - 1.55)	0.05
Age at embryo transfer	-0.24	0.20	0.78 (0.53 - 1.16)	0.22
AFC model at 60 days post estrus				
AFC	0.19	0.13	1.21 (0.93 - 1.57)	0.16
Age at embryo transfer	-0.46	0.28	0.63 (0.36 - 1.09)	0.09
AMH model at 60 days post estrus				
AMH concentration (pg/ml)	0.11	0.09	1.12 (0.93 - 1.34)	0.23
Age at embryo transfer	-0.37	0.25	0.69 (0.42 - 1.12)	0.14

及ぼす影響をTable 1に示した。いずれのモデルにおいても、AFCおよびAMHのオッズ比の95%信頼区間に1を含んでいるが、信頼区間の下限が0.93~1.00であるのに対し、上限は1.34~1.56であり、AFCが10個またはAMHが100pg/ml上昇することは、受胎する可能性を34%から56%増加しうることを示唆している。また、説明変数を移植時年齢のみにしたモデルと比較して、AFCまたはAMH濃度を説明変数に加えた場合、モデルの適

合度が高くなる場合が多かった(データ略)。このことから、黒毛和種における大きいAFCまたはAMH濃度は、ホルスタイン種乳牛の人工授精における受胎成績と同様に、受胎成績を向上させる可能性があると考えられ、受卵牛の選定に活用できる可能性がある。AFCまたはAMH濃度が大きくなると受胎確率が高くなる要因として、これらが大きい個体では子宮角断面積、すなわち子宮内膜が厚かったことが考えられる。議論の余地は

あるものの、ヒトの生殖医療において、子宮内膜の厚さは着床や妊娠率と正の関係があることが報告されている^{7,8)}。牛においても同様の報告がなされている⁹⁾。今後さらに移植頭数を増やすとともに、卵巣予備能が高い牛における子宮内膜の機能について、組織学、内分泌学および分子生物学的な検討を行う予定である。

4. 要 約

本試験は、卵巣予備能が胚移植に伴う発情同期化処置後（受精卵移植条件下）における繁殖生理状態および受精卵移植成績に及ぼす影響を調べることを目的とした。実験1では黒毛和種22頭を用い、卵巣予備能（前胎状卵胞数（AFC）または抗ミュラー管ホルモン（AMH）濃度）が受精卵移植条件下における繁殖生理状態に及ぼす影響を調べた。AFCが高い群では低い群と比較して、発情後の左右の子宮角断面積平均が大きく推移したことから、AFCが高い個体では発情後の子宮内膜が厚く、受胎しやすい状態になっていたことが推察された。AMH濃度と繁殖生理状態には関連が認められなかった。実験2では32頭の供試牛に対して凍結受精卵を移植し、卵巣予備能と受胎成績の関係を調べた。発情後40日目または60日目時点の受胎に対するAFCのオッズ比は、1.21（95%信頼区間（CI）：0.94-1.56, $p = 0.14$ ）および1.24（95%CI：0.93-1.57, $p = 0.16$ ）、AMH濃度のオッズ比は1.24（95%CI：1.00-1.55, $p = 0.05$ ）

および1.12（95%CI：0.93-1.34, $p = 0.23$ ）であり、AFCまたはAMH濃度が高い個体では受胎する可能性が高くなることが示唆された。今後は受精卵移植頭数を増やすとともに、卵巣予備能が子宮内膜の機能に及ぼす影響について詳細な検討が必要である。

文 献

- 1) Hirayama, H., Naito, A., Fukuda, S., Asada, M., Inaba, Y., Takedomi, T., Kawamata, M., Moriyasu, S., Kageyama, S. : *J. Reprod. Dev.*, **63**, 95~100, 2017.
- 2) Jimenez-Krassel, F., Folger, J. K., Ireland, J. L. H., Smith, G. W., Hou, X., Davis, L. S., Lonergan, P., Evans, A. C. O., Ireland, J. J. : *Biol. Reprod.*, **80**, 1272~1281, 2009.
- 3) Van Eerdenburg, F. J. C. M., Loeffler, H. S. H., Van Vliet, J. H. : *Veterinary Quarterly*, **18**, 52~54, 1996.
- 4) Takenouchi, N., Oshima, K., Shimada, K., Takahashi, M. : *J. Vet. Med. Sci.*, **66**, 1315~1321, 2004.
- 5) Yanagawa, Y., Matuura, Y., Suzuki, M., Saga, S., Okuyama, H., Fukui, D., Bando, G., Nagano, M., Katagiri, S., Takahashi, Y., Tsubota T. : *J. Reprod. Dev.*, **61**, 61~66, 2015.
- 6) Gobikrushanth, M., Purfield, D. C., Canadas, E. R., Herlihy, M. M., Kenneally, J., Murray, M., Kearney, F. J., Colazo, M. G., Ambrose, D. J., Butler, S. T. J. : *Dairy Sci.*, **102**, 11622~11635, 2019.
- 7) Raga, F. R., Bonilla-Musoles, F., Casañ, E. M., Klein, O., Bonilla, F. : *Human Reproduction*, **14**, 2851~2854, 1999.
- 8) Basir, G. S., So, W., So, W. W. K., Ng, E. H. Y., Ho, P. C. : *Ultrasound Obstet Gynecol.*, **19**, 484~489, 2002.
- 9) Souza, A. H., Silva, E. P. B., Cunha, A. P., Gümen, A., Ayres, H., Brusveen, D. J., Guenther, J. N., Wiltbank, M. C. : *Teriogenology*, **75**, 722~733, 2011.

ドライ精子による牛生産に関する研究

Studies of cattle production using dried spermatozoa

松川 和嗣

(高知大学農林海洋科学部)

Kazutsugu Matsukawa

(Faculty of Agriculture and Marine Science, Kochi University)

Currently, sperm, an important genetic resource for mammals, are cryopreserved in liquid nitrogen. However, cryopreservation of sperm has various problems. In this study, I focused on dry storage as a new sperm storage that does not use liquid nitrogen, and examined DNA damage, *in vitro* development, and *in vivo* development of bovine sperm after drying. DNA damage rates of dried sperm of Japanese Black, Holstein, and Japanese Brown Kochi were examined, it was found that the buffer solution containing glycerin and trehalose had low DNA damage. In addition, the blastocyst rate of embryos after intracytoplasmic sperm injection of dried sperm was 10%, which was not significantly different from the development rate of freeze-dried sperm. When the blastocysts were transferred to three cows, conception was not confirmed by embryo transfer.

1. 目 的

現実または潜在的な価値を有する生物遺伝資源は、農業、生命科学、医薬品開発、材料等さまざまな分野で研究・産業発展のために必要不可欠のものであるが、一度失われると再現不可能なためにその保管は非常に重要である。牛精子は、現在では液体窒素中に保存する凍結保存によって人工授精 (*artificial insemination*) あるいは体外受精 (*in vitro fertilization*) に供試され、牛の育種改良、生産、および増頭に重要な役割を担っている。しかし、液体窒素を用いた保存には、生産にかかる環境負荷が発生する、凍結精液の維持には液体窒素を常に供給しなければならずコストやスペースが恒常的に必要である、輸送が容易ではない、

取り扱いには人体への安全面で問題がある、などさまざまな欠点がある¹⁾。さらに、2011年3月11日に発生した東日本大震災では、地震による直接の被害だけでなく、電力や液体窒素の供給が途絶えることによって貴重な生物遺伝資源が多数失われた。また、家畜では口蹄疫など家畜法定伝染病が発生した場合、個体だけでなく液体窒素内に保存された家畜精子も移動や使用が制限され、家畜生産に大きな被害が生じることになる。

家畜品種の多様性は、気候変動による環境への適応力と新たな感染症への抵抗力を高め、生産性の向上や生産者、消費者、社会全体のニーズ対応を目的とする品種改良のための基礎となるものである。国際連合食糧農業機関 (Food and Agriculture Organization of the United

Nations ; FAO) は、2007年に引き続き2015年に「食料・農業のための世界動物遺伝資源白書第2回報告」を発行し、世界的に地域の特徴的な家畜品種の遺伝資源が失われていることに警鐘を鳴らしている²⁾。2005年から2014年までに99品種が絶滅し、絶滅の危機に瀕していると分類される家畜の割合は15%から17%に増加し、その他の58%の品種については不測の危機に直面していると分類されている。また、発展途上国における牛乳および肉類の需要は、2050年までに46%および76%増加すると予測しており、地域に適応した品種の保全対策を講じないと生産性を重視し育種改良された単一の家畜品種が、さらに世界的に蔓延することが考えられる。

家畜における生体試料については、国内では国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が本部として独立行政法人家畜改良センターと連携して、遺伝資源の探索収集から特性評価、保存、配布および情報公開までを行うジーンバンク事業が存在し、家畜の精液・受精卵が凍結保存されている。さらに、大学連携バイオバックアッププロジェクト (IBBP) は、予期せぬ事故や災害等による毀損や消失を回避するために、大学等における生物遺伝資源をバックアップするための体制として東日本大震災後の2012年から新たに開始されたプロジェクトである。近年、このように貴重な動物遺伝資源の大量保管や分散保存の体制が整備されつつあるが、液体窒素保存に替わる哺乳動物遺伝資源の保存技術が望まれている¹⁾。

そこで本研究では、牛精子の乾燥 (ドライ) 保存技術を検討し、ドライ精子による牛生産技術の基盤を構築する。そのためにすでに子牛生産に成功している凍結乾燥 (フリーズドライ) 精子およびそれらを供試して作出した胚を対照区とし、牛精子のドライ技術、胚の体外発生能、および胚移植後の体内発生能を検討した。

2. 方 法

2.1 牛精子の乾燥および凍結乾燥保存

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 (茨城県つくば市) および高知県畜産試験場 (高知県高岡郡) で採精された黒毛和種、ホルスタイン種、および褐毛和種高知系由来の新鮮射出精液を 0℃ で輸送し、実験に供試した。実験室に到着後、各品種の精液からパーコール密度遠心分離法によって運動精子を回収し、8 mM グルタチオン (SIGMA) 添加 BO 培地にて 38.5℃ で 15 分間処理を行った。遠心洗浄後、精子を浮遊させる緩衝液には 50 mM EGTA, 50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl で構成された NaEGTA (コントロール区) を基本緩衝液として用い、10% グリセリン添加区 (+G 区), 200 mM トレハロース添加区 (+Tre 区), 10% グリセリンおよび 200 mM トレハロース添加区 (+G, Tre 区) を設けた。それぞれの緩衝液に精子を浮遊させた精子浮遊液 50 μ l をガラスアンプルに入れ、低温乾燥機 (アズワン) にて 42℃ で 20 時間乾燥しドライ精子を作製した。一方、フリーズドライ精子は精子浮遊液 200 μ l をガラスアンプルに入れ、凍結乾燥機 (CHRIST) にて凍結 2.5 時間、一次乾燥 5 時間、および二次乾燥 3 時間のプログラムで作製した。ドライ精子およびフリーズドライ精子は 20℃ の恒温箱の中で保存した。

2.2 精子の DNA 損傷評価

DNA 損傷精子の割合は、Halo Sperm Test 法により測定した。ガラスアンプルに超純水を加えて復水し (ドライ精子: 50 μ l, フリーズドライ精子: 200 μ l), 1% アガロース (ナカライ) と混合し高撥水性印刷スライド (MATSUNAMI) に貼付した。スライドを冷蔵庫に 5 分間入れアガロースをゲル化させ、Lysis Solution (TREVIGEN) で 15 分間、ジチオトレイトール (DTT) 添加

Lysis Solutionで30分間、および3.5-ジヨードサリチル酸リチウム (Wako) 添加Lysis Solutionで15分間処理した。さらにアルカリ液にて20分間処理し、脱水・乾燥後、SYBR Gold (Life technologies) にて染色し、蛍光正立顕微鏡 (NIKON) で観察した。Haloが認められるものをDNA損傷精子として、スライド1枚当たり75個以上の精子を測定した。乾燥または凍結乾燥直後、1週間後、1カ月後、および2カ月後のDNA損傷を評価した。

2.3 顕微授精 (ICSI) および体外発生培養

食肉処理場由来の褐毛和種高知系卵巣から採取した卵丘卵母細胞複合体 (COCs) を10%牛胎児血清 (FBS) 添加199培地にて22時間体外成熟培養した。ヒアルロニターゼによって卵丘細胞を除去し、第一極体を放出した卵母細胞を顕微授精に供試した。顕微授精は、倒立顕微鏡 (NIKON) に接続したピエゾマイクロマニピュレーター (プライムテック) によって行った。褐毛和種高知系の精子を用い、乾燥および凍結乾燥後1週間20°Cで保存したものを腹水し、卵母細胞に注入した。精子の注入後、カルシウムイオノフォアA23187および6ジメチルアミノプリンによって卵母細胞の活性化処理を行い、SOF培地にて培養した。顕微授精後2日目に卵割率、7日目に胚盤胞期胚発生率を記録した。

2.4 ドライ精子由来胚の胚移植

受胎牛には褐毛和種高知系を供試し、膈内留置

型プロゲステロン製剤 (ファイザー) およびプロスタグランジンFs α 類縁体制剤 (あすかアニマルヘルス株式会社) にて発情の同期化を行った。褐毛和種高知系のドライ精子および卵母細胞の顕微授精によって胚盤胞期胚を作出した。発情発現後7日目の受胎牛にYTガン (ヤマネテック) を用いて胚移植を実施し、発情発現後37日目に超音波画像診断装置により受胎の確認を行った。

3. 結果と考察

乾燥とは、湿った材料に熱を加えて水を蒸発除去する操作であり、乾燥対象物に水の蒸発に必要なエネルギーが供給された結果、熱移動、相変化、および物質移動が起こる。哺乳動物精子は攪拌などの物理的刺激に弱く高温耐性が低いため、材料静置型の対流電熱乾燥機 (定温乾燥機) で乾燥した。その結果、黒毛和種、ホルスタイン種、および褐毛和種高知系由来のドライ精子は+Tre区および+G, Tre区で2か月間保存後にDNA損傷が低率であった (Fig. 3, 4)。一方、+G区では乾燥直後から50%以上のDNA損傷が認められ、2か月間の保存後にはすべての品種で100%の精子がDNA損傷を受けていた (Fig. 2)。NaEGTA区では、ホルスタイン種がほかの品種と比較して1か月後に有意に損傷率が増加した ($p < 0.05$) (Fig. 1)。フリーズドライ精子では、直後では全処理区でDNA損傷が低率であったが (Fig. 5,

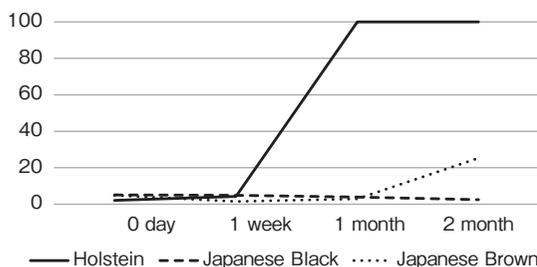


Fig. 1 Rate of DNA damaged sperm in NaEGTA after drying

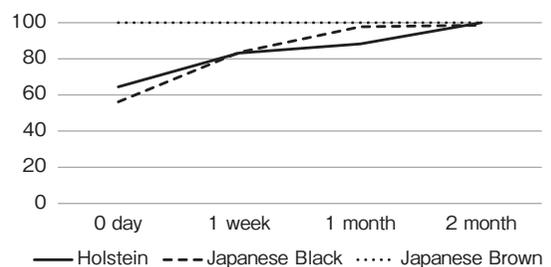


Fig. 2 Rate of DNA damaged sperm in 10% glycerol after drying

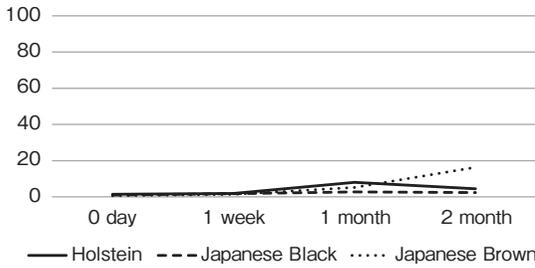


Fig. 3 Rate of DNA damaged sperm in 200 mM trehalose after drying

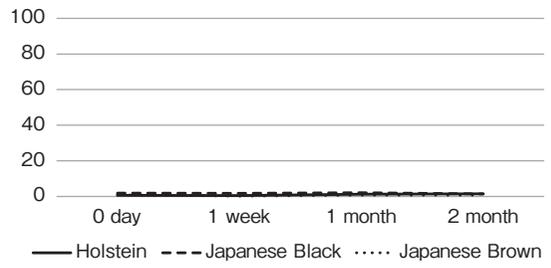


Fig. 4 Rate of DNA damaged sperm in 10% glycerol and 200 mM trehalose after drying

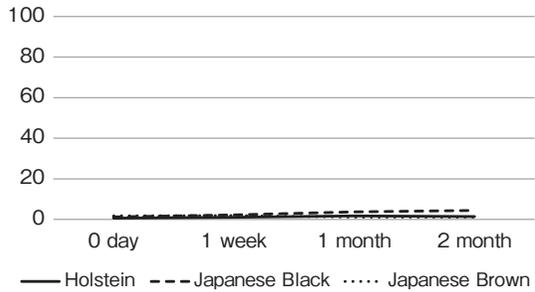


Fig. 5 Rate of DNA damaged sperm in NaEGTA after freeze drying

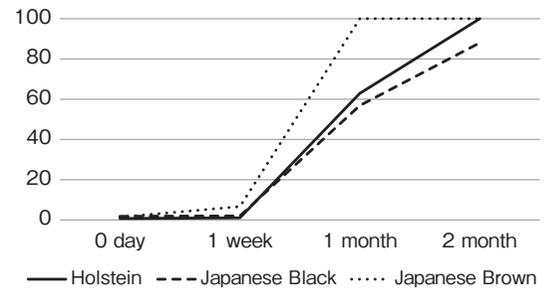


Fig. 6 Rate of DNA damaged sperm in 10% glycerol after freeze drying

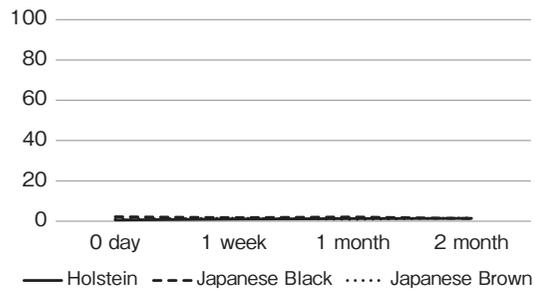


Fig. 7 Rate of DNA damaged sperm in 200 mM trehalose after freeze drying

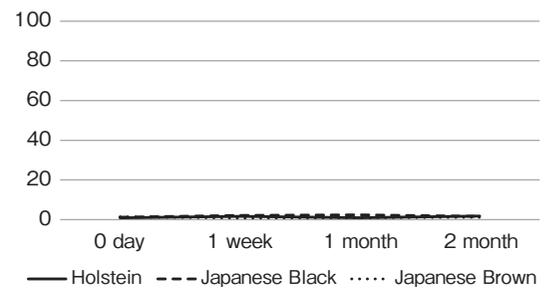


Fig. 8 Rate of DNA damaged sperm in 10% glycerol and 200 mM trehalose after freeze drying

6, 7, 8), +G区では1か月保存後から損傷が増加し, 2か月後にはホルスタイン種と褐毛和種高知系で100%の損傷が認められた (Fig. 6)。

哺乳動物の精子においては, グリセリン, トレハロースともに凍結保存時の凍結保護剤として利用されている。グリセリンは, 添加溶液を高浸透圧化させる, 細胞膜透過に優れるといった特徴がある。そのため, 凍結時精子内部から脱水が生じ,

精子内で細胞内自由水がグリセリンと置換され, 氷晶形成が防止される。また, 水和水の脱水に伴うタンパク質の変性を防止する³⁾。グリセリンの添加濃度は, 牛では約8~10%であり, グリセリン濃度が高すぎると本来の目的である自由水の置換のみならず, タンパク質や脂質に結合しその機能を低下させる。ドライ精子の+G区では, 乾燥直後からDNA損傷率が50%以上となり, 乾燥処

Table 1 In vitro development of bovine embryos injected with dried or freeze-dried spermatozoa by ICSI

	No. of oocytes	No. of cleaved embryos (%)	No. of blastocysts (%)
DRY ICSI	95	43 (45.3)	10 (10.5)
FD ICSI	107	74 (69.2)	14 (13.1)

理中にグリセリンがDNAに悪影響を及ぼしていることが示唆された。乾燥処理によって細胞の脱水が促進され、浸透圧の差でグリセリンが細胞内に多く流入、高濃度のグリセリンに暴露され細胞毒性を受けた結果、精子DNAに損傷を与えた可能性が考えられる。一方、トレハロースの細胞膜保護効果によってグリセリンの作用が抑制され、+G, Tre区で最もDNA保護効果が高かったと推測される。

これまでの研究では、牛のフリーズドライおよびドライ精子による顕微授精後の胚盤胞期胚発生率は18.7% (Keskinetepe *et al.*, 2002)⁴⁾、14.2% (Hara *et al.*, 2014)⁵⁾、15% (Lee and Niwa, 2006)⁶⁾と報告されている。本実験の結果、ドライ精子およびフリーズドライ精子由来の胚盤胞期胚発生率はそれぞれ10%および13%となり、既報とは差が認められなかった (Table 1)。

さらに、ドライ精子由来胚の胚移植による産子生産の可能性について検討した。3頭の雌牛に胚移植したところ受胎が確認されなかった。本実験で評価したDNA損傷以外に産子生産にかかわる要因があると考えられ、今後検討する必要がある。

4. 要 約

現在、哺乳動物の重要な遺伝資源となる精子は、液体窒素内で凍結保存されている。しかし、精子の凍結保存には、液体窒素を恒常的に供給するためのコストおよび環境負荷、自然災害等による遺伝資源の損失、人体への危険性などのさまざまな問題点がある。そこで本研究では、液体窒素

を使用しない新たな精子の保存技術として乾燥保存に着目し、牛精子の乾燥後のDNA損傷、体外胚発生能、および産子生産能力を検討した。黒毛和種、ホルスタイン種、および褐毛和種高知系3品種の乾燥精子のDNA損傷率を検討したところ、グリセリンおよびトレハロースを添加した緩衝液でDNA損傷が低いことが認められた。また、乾燥精子の顕微授精後の胚の胚盤胞期胚発生率は10%となり、凍結乾燥精子の発生率と有意な差は認められなかった。作出した胚盤胞期胚を3頭の雌牛に胚移植したところ、乾燥精子由来胚の胚移植からは受胎が確認されなかった。今後、精子DNAの損傷以外の要因を特定し、乾燥精子を用いた牛産子の成功を目指す。

文 献

- 1) Loi, P., Iuso, D., Czernik, M., Zacchini, F., Ptak G.: *Trends in Biotechnology*, 31, 688~695, 2013.
- 2) FAO.: *The Second Report on the State of the World's Animal Genetic Resources*, 2015.
- 3) 一般社団法人日本家畜人工授精師協会: 家畜人工授精講習会テキスト (家畜人工授精編), p.306, 東京, 平成27年.
- 4) Keskinetepe, L., Pacholczyk, G., Machnicka, A., Norris, K., Curuk, M. A., Khan, I., Brackett, B. G.: *Biology of Reproduction*, 67, 409~415, 2002.
- 5) Hara, H., Tagiri, M., Hwang, I. S., Takahashi, M., Hirabayashi, M., Hoshi, S.: *Cryobiology*, 68, 354~360, 2014.
- 6) Lee, K. B., Niwa, K.: *Biology of Reproduction*, 74, 146~152, 2006.

MTT (3[4,5-dimethylthiazoly]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いた豚精液の評価法の開発

The development of evaluation method of porcine sperm using MTT
(3[4,5-dimethylthiazoly]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)

内倉 健造・田島 茂行・相良 鮎美・豊島 浩一

(愛知県農業総合試験場)

Kenzo Uchikura, Shigeyuki Tajima, Ayumi Sagara and Koichi Toyoshima

(Aichi Agricultural Research Center)

In this study, for establishing a simple evaluation method for the number of motile sperm in porcine semen, we examined various conditions for the reduction reaction of MTT (3 [4,5-dimethylthiazoly]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) by sperm and examined a simpler evaluation method. First, in order to examine the effect of the solution on the MTT reduction reaction, the MTT reduction reaction was performed using a MODENA solution containing a large amount of glucose or PBS, and the absorbance was measured as an index of reduction of MTT. The higher absorbance was observed in MODENA solution compared with PBS. When the MTT reduction reaction was induced at 30°C or 39°C, a high relationship between the absorbance and the number of motility sperm was observed at 39°C. This suggests that a rapid MTT reduction reaction occurs in a glucose-rich solution at a high temperature. For the development of a simple evaluation method, reduction reaction of MTT by sperm was caused in 5 minutes on the filter paper under the conditions determined in this study, and the change of color brightness of the filter paper was investigated using a digital scanner. A regression analysis of brightness for motile sperm revealed that the regression coefficient was significant ($p < 0.05$) and the coefficient of determination of the regression equation was 0.64. It was suggested that rapid evaluation method for the number of porcine motile sperm was able to performed using MTT.

1. 目 的

近年、我が国の養豚産業では急速に人工授精 (AI) の利用が進み、AIを取り入れている農場が70%を超えている。しかし、日本におけるAIは普及途上であると考えられ、半数の農場では自然交配も併用するなど、雄豚1頭あたりの飼養する繁殖母豚数 (雄豚の利用効率) は先行して普及し

ている欧州に比べて低いといわれている¹⁾。雄豚の利用効率の低下は、飼養しなければならない雄豚の頭数を増加させ養豚経営のコスト上昇を招く。1頭の雄から採取した精液をより多くの雌に活用するためには、安定した受胎率および産子数を得られる必要十分の運動精子濃度まで精液を希釈する必要がある。雄豚の利用効率が低い原因の一つとして、農場レベルにおいて豚の精液性状の

正確な評価が難しく、適正な希釈が行われていないことが考えられる。精液中の運動精子の濃度を評価するためには精子活力（運動率）および精子数の2項目の測定を行わなければならない。さらに、顕微鏡下における精子活力の検査には習熟が必要であるとともに、主観的な観測データとなるため検査員ごとにデータがばらつく可能性がある。近年、精子数や運動率などをコンピューターで自動解析する精子運動解析（Computer Assisted Sperm Analysis, CASA）システムが開発され、試験研究機関や一部の種豚場への導入が進んでいる。しかし、CASAシステムは使用する機器が高価であるため、すべての農場で使用することが困難である。

3[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) は水溶性の黄色い試薬であり、細胞内の脱水素酵素により還元され、不溶性の青色のホルマザンを生成する。さまざまな動物種の精子においてMTT還元反応と精子の生存性は関連しているといわれており、豚精子においてもMTTの還元反応が精子の生存性の評価に有効とする報告がある²⁾。近年、MTTを浸透させたクロマトグラフィーペーパー上で精子による還元反応を起こし、その変化が精子の運動性と関連していたという報告³⁾や顕微鏡による観察でMTT還元能をもつ精子の判別が可能という報告⁴⁾がある。これらのことからMTTを用いて簡易な精子検査法を開発できれば、CASAシステムに変わる低コストな豚精液性状の評価法を生産者へと提供できると考えられる。一方で、精子の脱水素酵素の還元反応は反応液中の組成や反応温度によって異なると考えられ、その最適条件は報告されていない。

以上のことから、本研究では、豚精液の簡易的な評価方法の確立を目的とし、精子によるMTTの還元反応のための諸条件を検討するとともに、

より簡便な評価法を検討した。

2. 方法

2.1 精子のMTT還元反応に対する反応液および温度の影響調査

2.1.1 MTT還元反応に与える反応液の影響

豚精液は10ヶ月齢のランドレース種および大ヨークシャー種雄各2頭から採取した。顕微鏡下で精子の85%以上が前進運動を示すことを確認したものを、モデナ液⁵⁾で等倍希釈し、試験に用いるまで24~30時間、15℃で保存した。すべての試験において雄ごとに4回の採精を行い、各精子浮遊液は 1×10^8 個/mlになるようにモデナ液で調整した。MTT還元反応は0.4mg/ml MTT (Sigma-Aldrich) を含んだ900 μ l のモデナ液もしくはリン酸緩衝液 (PBS) に精子浮遊液100 μ l を添加し、30分間反応させ、紫外可視分光光度計 (UV-1800, 株式会社島津製作所) を用いて波長570nmの吸光度を測定した。

2.1.2 MTT還元反応に与える温度の影響

上記と同様に作成した精子浮遊液の一部について液体窒素で凍結、豚体温に近い39℃で融解する行程を2回繰り返し、精子を死滅させた後、通常の精子浮遊液と精子を死滅させた浮遊液とを10:0, 8:2, 6:4の3種類の混合割合のサンプルを作成した。各精子浮遊液は39℃で5分間加温して、精液分析装置 (iSperm, 株式会社ピアアイシイ・バイオ) で精子運動率を測定した。各精子浮遊液100 μ l を0.4mg/ml MTT を含んだ900 μ l のモデナ液に添加し、30もしくは39℃で10, 20および30分間反応させ、吸光度を測定した。3種類の混合割合のサンプルのデータをプールして回帰分析を行った。

2.2 簡易的なMTT検査法の開発

2.2.1 青染精子計数法の開発

ランドレース種2頭から採取した精液を30℃に

保温し、30分以内に実験室に運び試験に用いた。一部の精液は39℃で5分間加温後、精液分析装置で運動精子数を計測した。精液100 μ l を0.4mg/ml MTTを含んだ900 μ l のモデナ液に添加し、39℃で20分間反応させた。反応後に、通常の精子数の計測と同様の手順で血球計算盤を用いて1ml中における中片部が青染した精子 (Fig. 1) と青染していない精子を算出した。

2.2.2 ろ紙反応法の開発

直径2cmの円形に切り取ったろ紙 (ADVANTEC) に4mg/ml MTTを含んだ蒸留水35 μ l を浸透させ、遮光して5分間乾燥させた。2.2.1と同様に採取した精液について、精液分析装置で運動精子数を計測後、モデナ液で2倍、2.5倍もしくは3.3倍に希釈し、スライドガラス上に載せた円形ろ紙に35 μ l 添加し、39℃で5分間反応させた (Fig. 2)。反応後、2枚のろ紙をスキャナー (PM-A920, EPSON) およびデジタルカメラ (COOLPIX A 100, NIKON) で撮影した。記録した画像はパソコン上において、画像処理ソフト (GIMP) を用いてろ紙上の平均明度をデータ化した。3種類の希釈倍率のデータをプールし、回帰分析を行った。

2.3 ろ紙反応法の実証試験

上記の2.2.2で新鮮精液を用いて開発した簡易MTT検査を養豚農場で実施し、精度の検証と作業時間の記録を行った。検証にはデュロック種雄2頭分の希釈精液 (それぞれ新鮮精液および2日間保存した精液) を用いた。

3. 結果と考察

MTT還元反応の指標として吸光度を測定した結果、PBSを反応液としたものに比較してモデナ液で有意に高い吸光度がみられた (Fig. 3)。過去の研究では豚精子の運動性およびMTT還元能は、解糖系でのエネルギー産生と関係していたと

報告されている³⁾。モデナ液はグルコース濃度が27.5mg/mlであり、精子の解糖系の基質であるグルコースを多量に含むことから、今回の実験においては反応液内のグルコースがMTT還元反応を促進したことが考えられた。このことから反応液にはグルコースを含むモデナ液等が適していることが示唆された。

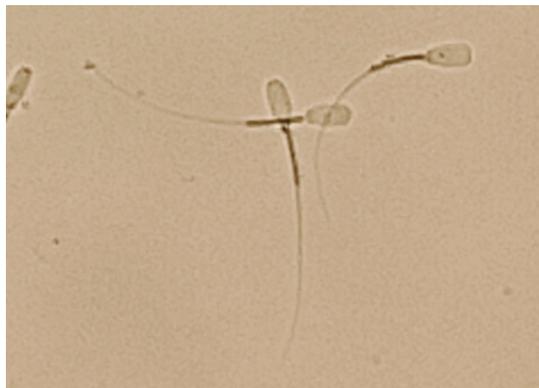


Fig. 1 Porcine spermatozoa that have the midpiece stained by formazan reduced from MTT.

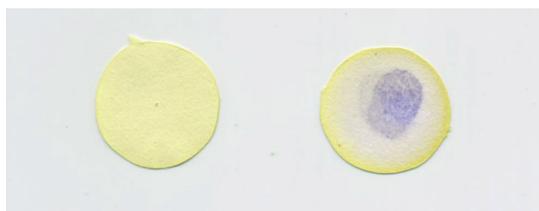


Fig. 2 Round filter paper stained by MTT solution. (Left: control, Right: dropping sperm suspended liquid)

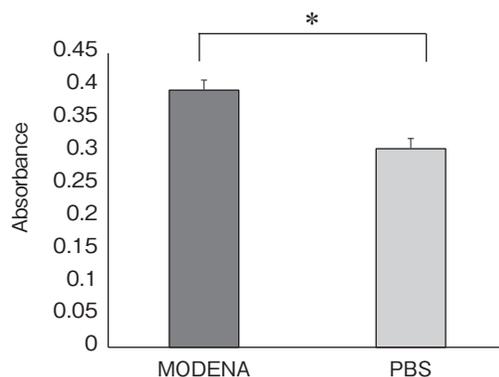


Fig. 3 Absorbance of different MTT reduction reaction solution. * : $p < 0.05$

MTT還元反応に対する反応温度の影響を調査するために30もしくは39℃で精子のMTT還元反応を行い、反応時間10、20および30分でそれぞれ説明変数を運動精子数、従属変数を吸光度として回帰分析を行ったところ、いずれの場合も回帰係数は有意であった ($p < 0.05$, Fig. 4)。また決定係数は30℃ 10、20および30分間でそれぞれ0.45、0.65および0.50、39℃ 10、20および30分でそれぞれ0.83、0.84および0.71であり、39℃で安定して高い値を示した。これは30℃に比較して39℃で精子運動が活発化し、MTT還元反応が速く進み、ホルマザンが十分に生成されたことにより吸光度が上昇したためと推察され、反応温度は39℃が適していると考えられた。

予備実験におけるMTT還元反応後の精子の顕微鏡下観察では、吸光度の測定と異なり、精子中辺部の微少なホルマザン顆粒の有無で青染かどうかを判定するため、反応後20分を経過しないと顆

粒が認識できず、判定することが困難であることが分かった。また、計数する際には、高倍率顕微鏡下での観察を必要とし、計数に時間を要することが示唆された。一方で、反応温度39℃反応時間20分の条件を用いて青染した精子を顕微鏡下計数したところ、運動精子数に対する回帰係数は有意であり ($p < 0.05$)、決定係数0.70の回帰式 $y = 0.78x + 56.24$ が得られた (Fig. 5)。このことから作業性はよくないものの、MTTの還元反応後の精子を計数することで運動精子数を推定することが可能であることが示唆された。

ろ紙上で精子によるMTTの還元反応を起こし、ろ紙の色の変化を調査した (ろ紙反応法)。スキャナーおよびデジタルカメラで読み取ったろ紙画像の明度について、運動精子数に対する回帰係数は有意であった。 ($p < 0.05$, Fig. 6)。スキャナーおよびデジタルカメラでの回帰式はそれぞれ $y = -8.52x + 833.78$ および $y = -3.79x + 323.08$ であ

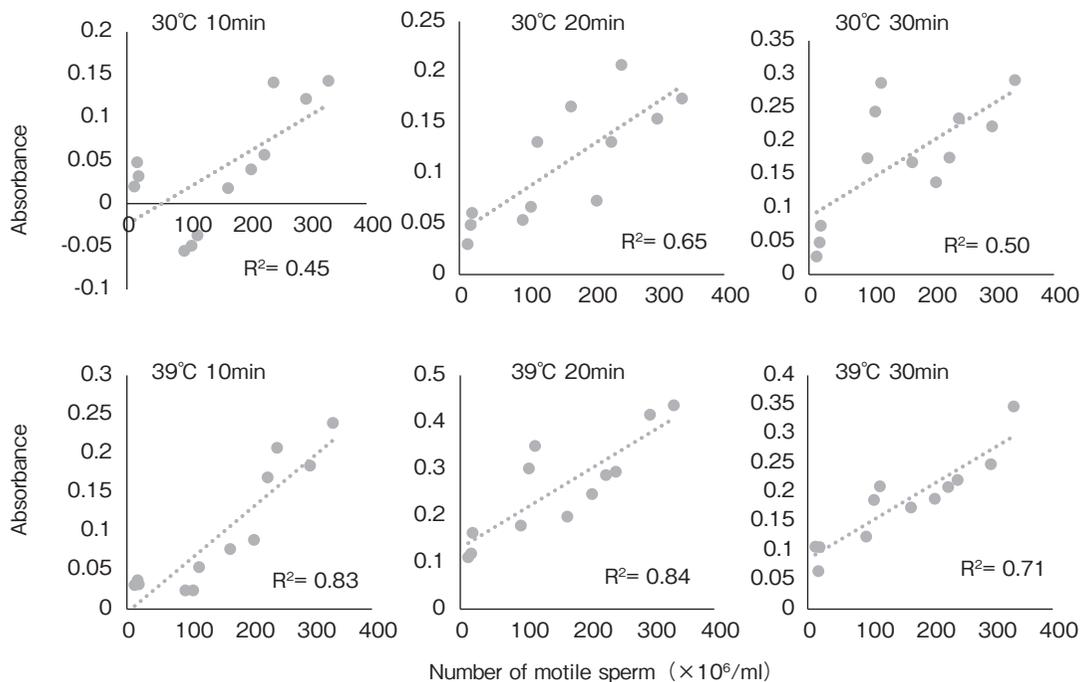


Fig. 4 Relationship between number of motile sperm and absorbance in different temperature and time.

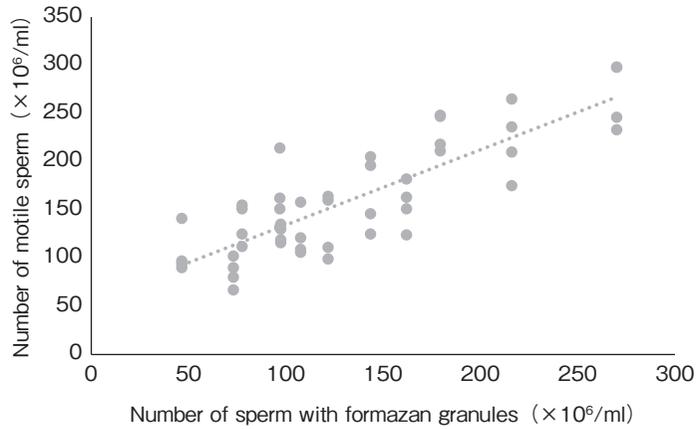


Fig. 5 Relationship between number of motile sperm and sperm containing formazan granules.

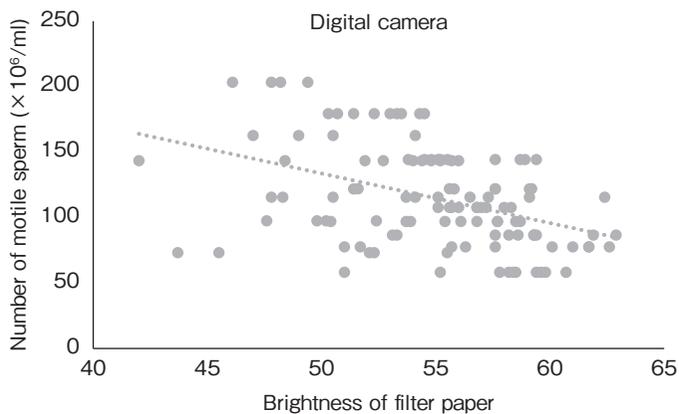
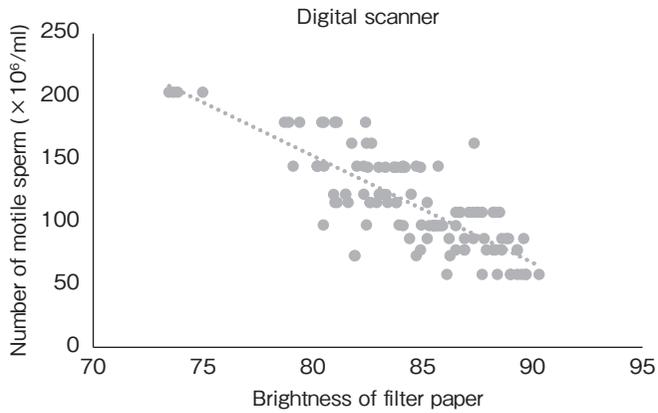


Fig. 6 Relationship between number of motile sperm and brightness of filter paper.

り、決定係数はそれぞれ0.64および0.18であった。
このことから、スキャナーを用いることで本研究

における条件下では運動精子数の推定が可能であることが分かった。一方で、デジタルカメラを用

いる方法では撮影時の誤差が大きいと考えられ、推定に用いることが難しいことが示唆された。

実証実験での養豚農場において、市販の精液性状測定機器を用いた場合、運動精子数の計測に要した時間は、新鮮精液および保存精液でそれぞれ10および19分間であったのに対して、ろ紙反応法では14および17分間であった。複数検体を効率よく処理していくためには、雄豚の採精時間（1頭あたり6分間程度）より短い必要であるため、作業性の向上が求められると考えられる。次新鮮精液および保存精液の運動精子数は、測定機器がそれぞれ 46.8×10^6 および 64.9×10^6 個/mlに対して、ろ紙反応法で推定したものがそれぞれ 46.8×10^6 および 90.3×10^6 個/mlとなり、新鮮精液で同値となった。このことから新鮮精液であれば、本研究で新鮮精液を用いて作成した回帰式を用いて、運動精子の推定が可能であることが示唆された。今後、養豚現場へと普及させるためには、より推定精度を向上させるとともに、作業時間を短縮する方法を検討する必要があると考えられる。

4. 要 約

本研究では、豚精液の簡易的な評価方法の確立を目的とし、精子によるMTTの還元反応のための諸条件を検討するとともに、より簡便な評価法を検討した。まず、MTT還元反応に対する反応

液の影響を検討するため、グルコースを多く含むモテナ液もしくはPBSを用いてMTT還元反応を行い、還元の指標として吸光度を測定したところ、モテナ液で吸光度が高いことが分かった。また、反応温度についても30℃と39℃で比較したところ、39℃において吸光度と運動性指数に正の相関が確認された。このことから反応温度39℃でグルコースを多く含む溶液内で速いMTT還元反応が起こることが示唆された。簡易的な評価法の開発のために本研究で決定した条件下でろ紙上で精子による5分間のMTTの還元反応を起こし、スキャナーを用いてろ紙の色の明度を評価した。運動精子に対する明度の回帰分析を行ったところ、回帰係数が有意（ $p < 0.05$ ）であり、回帰式の決定係数が0.64であった。開発したろ紙反応法を用いて養豚農場において精液の運動精子数を測定したところ、測定時間および測定結果は市販の測定機器と同等であった。

文 献

- 1) 河原崎達雄, 片岡岳志: 日豚会誌, 56, 106~118, 2019.
- 2) Byun, J. W., Choo, S. H., Kim, H. H., Kim, Y. J., Hwang, Y. J., Kim, D. Y.: *Asian-Aust. J. Anim. Sci.*, 21, 494~498, 2008.
- 3) Matsuura, K., Huang, H. W., Chen, M. C., Chen, Y., Cheng, C. M.: *Sci. Rep.*, 7, 46213, 2017.
- 4) van den Berg, B. M.: *Open. Vet. J.*, 5, 58~63, 2015.
- 5) Sone, M., Chikyu, M., Yoshida, M., Bamba, K., Ogasa, A.: *Jpn. J. Swine Sci.*, 29, 41~50, 1992.

牛初期黄体におけるPG抵抗性の解明 – 低酸素環境による抗アポトーシス機構 –

The mechanisms of PG-resistance in bovine early corpus luteum
 – hypoxia-induced anti-apoptotic mechanism –

西村 亮・菱沼 貢
 (鳥取大学農学部共同獣医学科獣医繁殖学)

Ryo Nishimura and Mitsugu Hishinuma

(Laboratory of Theriogenology, Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University)

Transforming growth factor (TGF)- β superfamily is known to play important roles in various reproductive functions including cellular growth, development and angiogenesis, by binding to specific serine/threonine kinase receptors. Betaglycan and endoglin were characterized as a type III receptor for TGF- β superfamily. To clarify possible physiological roles of betaglycan and endoglin in bovine corpus luteum (CL), we examined betaglycan (*TGFBR3*) and endoglin (*ENG*) mRNA expressions in bovine CL corrected at each stage of estrous cycle. We also investigated the effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and hypoxia on *TGFBR3* and *ENG* mRNA expression in cultured bovine luteal cells. Luteal cells obtained from early and mid CL were incubated under different O₂ concentrations (20%, 3% O₂) with or without hCG (1 U/ml) for 24 hr. *TGFBR3* mRNA expression in bovine CL was tended to be higher during developing, mid and late luteal stages, compared with that at the regressed luteal stage. *ENG* mRNA expression in bovine CL was higher during developing and mid luteal stages than at the regressed luteal stage. Furthermore, in early and mid luteal cells, *TGFBR3* mRNA expression was increased by hCG under hypoxic conditions, while *ENG* mRNA expression was affected neither by hCG nor by hypoxia. The overall results suggest that betaglycan induced by cooperative action of hypoxia and luteinizing hormone have a role for luteal formation during early luteal stage, while endoglin support luteal function during developing and mid luteal stages.

1. 目 的

黄体は排卵後に卵胞の構成細胞から形成され、妊娠の成立および維持に必須であるプロゲステロン (P4) を合成・分泌する一過性の内分泌器官である。牛卵巢動脈の血流量は黄体退行期から減少し、排卵後の黄体初期においても低く、初期

黄体細胞 (初期細胞) は低酸素環境に曝されている。低酸素環境に曝された細胞の多くは低酸素誘導性転写因子 (Hypoxia-inducible factor 1 ; HIF1) の活性化を介してさまざまな遺伝子発現を誘導することで低酸素環境へ適応することが知られており、牛の初期黄体においてもHIF1の機能することが明らかにされている¹⁾。

Transforming growth factor (TGF)- β 1は、TGF- β スーパーファミリーに属するサイトカインであり、さまざまな細胞の増殖、分化に関わっている²⁾。TGF- β スーパーファミリーのシグナル伝達には、TGF- β I型受容体 (TGFBRI) とII型受容体 (TGFBRII) の両者が必要である³⁾。これらはヘテロ四量体を形成し、TGFBRIIに結合したTGF- β スーパーファミリーのリガンドが、TGFBRIをリン酸化し、Smadを介した細胞内シグナル伝達が励起される³⁾。TGF- β III型受容体 (補助受容体) であるbetaglycanは、TGF- β のアイソフォームと高い親和性をもって結合することにより、TGF- β のTGFBRIおよびTGFBRIIとの親和性を高め、シグナル伝達を促進することが知られている^{4,5)}。betaglycanはラットの顆粒層細胞において発現が認められており、卵胞刺激ホルモンやプロテインキナーゼAの刺激によって発現が亢進する⁶⁾。ラット卵管において、betaglycanの発現は黄体形成ホルモン (LH) サージのあとに顕著に高まること、また、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン (hCG) によっても増加することが報告されている⁷⁾。しかし、牛の黄体におけるbetaglycanの生理的な役割は明らかにされていない。同じく、TGF- β III型受容体であるendoglinは血管の形成ならびに維持に関与する骨形成因子-9 (BMP-9; GDF2) の補助受容体として知られており⁸⁾、TGF- β スーパーファミリーの受容体でも特に activin receptor-like kinase-1 (ALK-1) およびALK-5と複合体を形成することで血管新生シグナルの調節に関わっている⁹⁾。また、endoglinはヒトの血管内皮細胞において、低酸素環境により発現が増加することで血管新生に関与することが示されている¹⁰⁾。牛の黄体形成においても低酸素環境に起因する血管新生の起こることから¹⁾、endoglinが牛の黄体形成に関与する可能性が考えられるが、endoglinの牛黄体における役

割は明らかにされていない。

本研究では、betaglycanおよびendoglinの牛黄体形成における役割を明らかにする目的で、1) 牛の黄体におけるbetaglycan (TGFBRII) およびendoglin (ENG) の周期的なmRNA発現を調べるとともに、2) 培養した牛の黄体初期の黄体細胞 (初期細胞) および中期の黄体細胞 (中期細胞) におけるTGFBRIIおよびENGのmRNA発現に及ぼす低酸素環境の影響について検討した。

2. 方 法

2.1 牛卵巣の採取

と畜場においてと畜直後の牛より発情周期各期 (初期 (E) : 排卵後2-3日, 形成期 (D) : 5-6日, 中期 (M) : 8-12日, 後期 (L) : 15-17日, 退行期 (R) : 19-21日) の牛黄体を採取し、組織中のmRNA発現解析用に液体窒素中で凍結した。細胞培養用には、初期あるいは中期黄体を有する卵巣を選抜し、氷冷した生理食塩水に浸漬し、研究室に運搬した。

2.2 牛黄体における発情周期を通じたTGFBRIIおよびENGのmRNA発現

発情周期各期 (E : 初期2-3日, D : 形成期5-6日, M : 中期8-12日, L : 後期15-17日, L : 退行期19-21日) の牛黄体組織から抽出したtotal RNAからcDNAを合成し、real-time PCRによりTGFBRIIおよびENGのmRNA発現量を調べた。

2.3 初期および中期細胞のTGFBRIIおよびENGのmRNA発現に及ぼす低酸素環境の影響

黄体初期および中期の黄体を有する牛卵巣 (1回の実験につき2-4卵巣) から初期細胞、中期細胞をそれぞれ単離し、培養プレートに播種して12時間培養後、hCG (1.0 U/ml) を添加し、通常の培養環境 (20% O₂, 5% CO₂, 75% N₂)

および低酸素環境（3% O₂, 5% CO₂, 92% N₂）において24時間培養した。

2.4 total RNAの抽出とcDNAの合成

2.2において発情周期各期の牛黄体組織から、2.3において24時間培養した牛黄体細胞からRNeasy mini kit (Qiagen, 74106) を用いてtotal RNAを抽出した。total RNA (1 μg) から、PrimeScript™ RT reagent Kit (Takara, RR037A) を用いて一本鎖cDNAを合成し、real-time PCRに供した。

2.5 real time-PCR

2.2および2.3におけるreal-time PCRには7500 FAST thermal cycler (Applied Biosystems) およびKAPA FAST ABI prism qPCR kit (KAPA, KK4604) を用いた。内部標準には18S ribosomal

RNA (18S rRNA) を用い、各遺伝子のmRNA発現量は、^{ΔΔ}Ct法で算出した。実験に用いた牛特異的プライマーをTable 1示す。

3. 結果と考察

発情周期における*TGFBR3* mRNA発現は形成期から後期黄体において高く、退行期で低い傾向が認められた (Fig. 1 (A))。また、初期細胞の*TGFBR3* mRNA発現は通常気相においてhCGによって増加し、低酸素環境によりその作用が増強された (Fig. 2 (A) ; $p < 0.05$)。中期細胞においても、低酸素環境でhCGを添加することにより*TGFBR3* mRNA発現が増加した (Fig. 2 (B) ; $p < 0.05$)。BetaglycanはTGF-βスーパーファミリーの中でも卵巣に発現の認められているアイソ

Table 1 Primers used in real-time PCR.

<i>18S rRNA</i>	forward : 5'- TCGCGGAAGGATTTAAAGTG -3' reverse : 5'- AAACGGCTACCACATCCAAG -3'
<i>TGFBR3</i>	forward : 5'- CCTATCCCACAAGCCGAGAT -3' reverse : 5'- GCACACACTTGGGTAGCTTC -3'
<i>ENG</i>	forward : 5'- TGCACCATCAAAAGCCTGAC -3' reverse : 5'- GACCACCTCGTTACTGACCA -3'

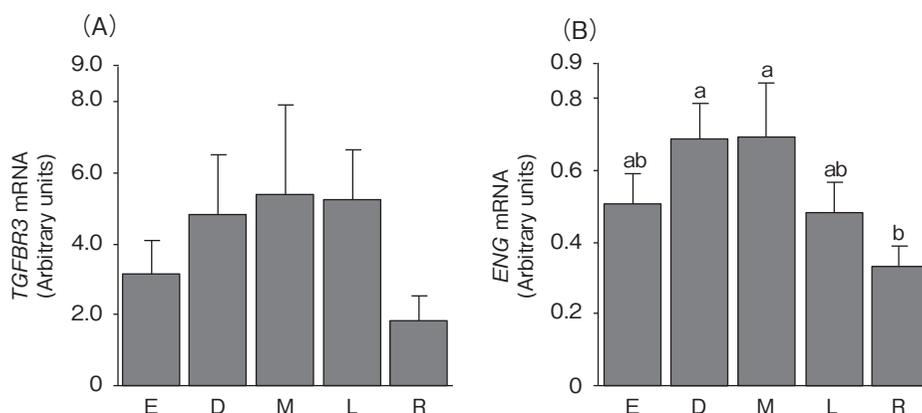


Fig. 1 Change in the relative amounts of *TGFBR3* mRNA (A) and *ENG* mRNA (B) in the bovine CL throughout the estrous cycle (E : early, Days 2-3 ; D : developing, Days 5-6 ; M : mid, Days 8-12 ; L : late, Days 15-17 ; R : regressed luteal stages, Days 19-21). Data are the means \pm SEM for 4 samples/stage and are expressed as relative ratios of *TGFBR3* or *ENG* mRNA to *18S rRNA*. Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

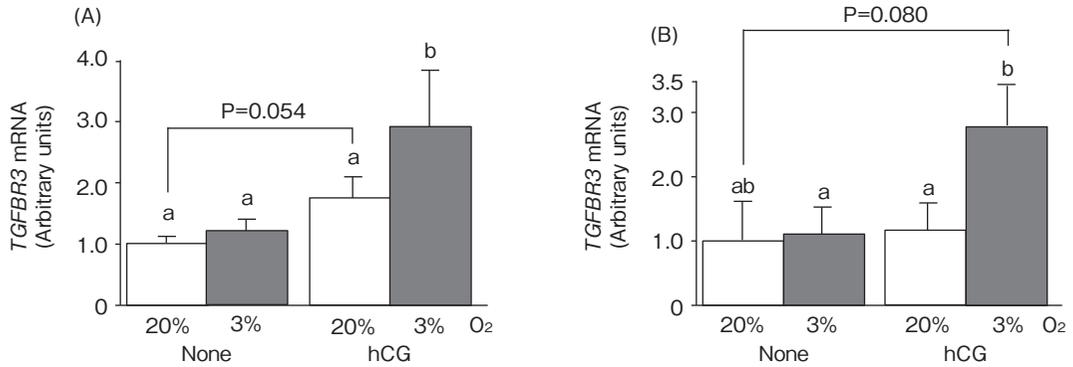


Fig. 2 Effects of hCG and hypoxia on *TGFBR3* mRNA expression in bovine early luteal cells (A) and mid luteal cells (B). The cells were cultured in the medium without or with hCG (1.0 U/ml) under 20% O₂ or 3% O₂ for 24 hr. The amount of *TGFBR3* mRNA is expressed relative to the amounts of *18S rRNA*. Different letters indicate significant differences (p < 0.05), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

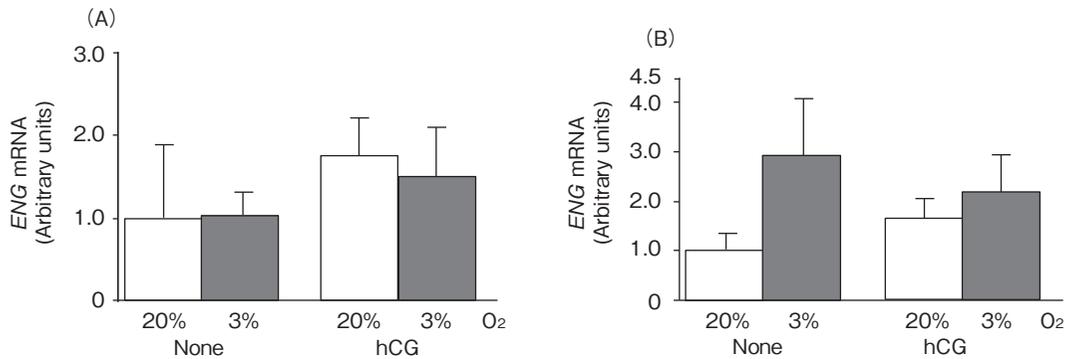


Fig. 3 Effects of hCG and hypoxia on *ENG* mRNA expression in bovine early luteal cells (A) and mid luteal cells (B). The cells were cultured in the medium without or with hCG (1.0 U/ml) under 20% O₂ or 3% O₂ for 24 hr. The amount of *ENG* mRNA is expressed relative to the amount of *18S rRNA*.

フォームTGF- β 1, TGF- β 2およびTGF- β 3の補助受容体である^{4,5)}。TGF- β 1, TGF- β 2およびその受容とシグナル伝達を担うI型受容体(TGFR1)とII型受容体(TGFR2)は豚の排卵後卵胞において黄体化しつつある顆粒層細胞および卵胞内膜細胞において認められており、TGF- β が黄体化に関わることが示唆されている¹¹⁾。本研究において、*TGFBR3* mRNA発現がhCGによって増加し、さらにその発現が低酸素環境によって増強されたことから、牛黄体細胞における*TGFBR3* mRNA発現にはLH/CG受容体シグナルと低酸素環境が関与しており、特に細胞が

低酸素環境に曝される黄体初期において、betaglycanが卵胞構成細胞の黄体化を含めた黄体形成に関与することが推察された。

EndoglinのリガンドであるBMP-9は血管の新生や維持に関わるTGF- β スーパーファミリーの一つである^{12,13)}。発情周期における*ENG* mRNA発現は形成期から中期黄体において高く、退期期で有意に低かった(Fig. 1 (B); p < 0.05)。しかし、初期および中期細胞の*ENG* mRNA発現に及ぼすhCGあるいは低酸素環境の影響は認められなかったことから(Fig. 3)、形成期および中期黄体組織における*ENG* mRNA発現の亢進は黄体細

胞よりも、むしろ黄体内の血管内皮細胞などの黄体細胞以外の細胞におけるものと推察された。endoglinはBMP-9と結合し、血管の形成だけでなく維持にも関与することから^{12,13)}、endoglinは黄体形成における血管新生よりも、発育過程あるいは成熟した黄体機能に必要な血管の維持に関与している可能性が示唆された。

本研究において、牛の初期黄体における低酸素誘導性因子として、betaglycanを見出した。現在、その生理機能、特に初期黄体のアポトーシス抑制への関与について、結合リガンドであるTGF- β 1-3の作用とあわせて検討を進めている。また、低酸素誘導性ではなかったものの、endoglinについても牛黄体の機能維持に関与することを示唆する結果が認められたことから、今後は黄体におけるBMP-9の生理的役割とあわせてendoglin発現の意義について解析する。

4. 要 約

血管形成を調節するTransforming growth factor (TGF)- β III型受容体betaglycan (TGFB3) およびendoglin (ENG) の牛黄体における発現や機能は不明である。本研究では、牛黄体の機能調節におけるTGFB3およびENGの役割を明らかにする目的で、黄体における発情周期を通じたTGFB3およびENGの発現を調べるとともに、その発現量に及ぼすhCGの影響について培養牛黄体細胞（初期細胞・中期細胞）を用いて検討した。排卵直後の黄体内は低酸素環境であることから、黄体細胞のTGFB3およびENG mRNA発現に及ぼす低酸素環境の影響についても検討した結果、TGFB3 mRNA発現は形成期-後期に高く、退行期に低い傾向を示し、ENG mRNA発現は形成期-中期に高く、発現の最も低い退行期と比較して有意に高かった。牛黄体の発情周期を通じたTGFB3およびENG mRNA発

現を定量的RT-PCRにより解析した。初期細胞および中期細胞を通常(20% O₂)または低酸素(3% O₂)の気相条件下において黄体形成ホルモン(LH)作用のあるヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)添加あるいは非添加にて24時間培養し、TGFB3およびENG mRNA発現量の変化を調べた。その結果、初期細胞において、hCGは通常気相でTGFB3 mRNA発現を増加させ、低酸素環境はその作用を有意に増強した。ENG mRNA発現に及ぼす低酸素環境あるいはhCGの影響は初期細胞と中期細胞のいずれにおいても認められなかった。本研究より、低酸素環境とLHによって誘導されるbetaglycanが牛の黄体形成に関与すること、endoglinが黄体の形成と維持に関与することが示唆された。今後、本研究で解析したTGF- β III型受容体betaglycanおよびendoglinそれぞれの結合リガンドであるTGF- β 1-3およびBMP-9の牛初期黄体における生理的役割の解析をあわせて進め、初期黄体における抗アポトーシス機構と低酸素環境の関係を明らかにする必要がある。

文 献

- 1) Nishimura, R., Okuda, K. : *J Reprod Dev*, **56**, 110~116, 2010.
- 2) Topper, J. N. : *Trends Cardiovasc Med*, **10**, 132~137, 2000.
- 3) Groppe, J., Hinck, C. S., Samavarchi-Tehrani, P., Zubieta, C., Schuermann, J. P., Taylor, A. B., Schwarz, P. M., Wrana, J. L., Hinck, A. P. : *Mol Cell*, **29**, 157~168, 2008.
- 4) Massague, J. : *Annu Revl Biochem*, **67**, 753~791, 1998.
- 5) Lopez-Casillas, F., Wrana, J. L., Massague, J. : *Cell*, **73**, 1435~1444, 1993.
- 6) Omori, Y., Nakamura, K., Yamashita, S., Matsuda, H., Mizutani, T., Miyamoto, K., Minegishi, T. : *Endocrinology*, **146**, 3379~3386, 2005.
- 7) Kubota, K., Omori, Y., Ikeda, S., Minegishi, T. : *J Reprod Dev*, **55**, 200~205, 2009.
- 8) Kienast, Y., Jucknischke, U., Scheiblich, S., Their, M., de Wouters, M., Haas, A., Lehmann, C., Brand, V., Bernicke, D., Honold, K., Lorenz, S. : *J Biol*

- Chem*, **291**, 3395~3410, 2016.
- 9) Blanco, F. J., Santibanez, J. F., Guerrero-Esteo, M., Langa, C., Vary, C.P., Bernabeu, C. : *J Cell Physiol*, **204**, 574~584, 2005.
- 10) Tian, F., Zhou, A. X., Smits, A. M., Larsson. E., Goumans, M. J., Heldin, C. H., Borén, J., Akyurek, L. M. : *Biochem Biophys Res Commun*, **392**, 283~288, 2009.
- 11) Sriperumbudur, R., Zorrilla, L., Gadsby, J. E. : *Anim Reprod Sci*, **120**, 84~94, 2007.
- 12) David, L., Mallet, C., Keramidas, M., Lamandé, N., Gasc, J. M, Dupuis-Girod, S., Plauchu, H., Feige, J. J., Bailly, S. : *Circ Res*, **102**, 914~922, 2008.
- 13) David, L., Mallet, C., Mazerbourg, S., Feige, J. J., Bailly, S. : *Blood*, **109**, 1953~1961, 2007.

黒毛和種牛における妊娠期の栄養状態が産子の繁殖能力に及ぼす影響

Effects of maternal nutritional condition for fertility of their offsprings in Japanese Black cattle

北原 豪

(宮崎大学農学部)

Go Kitahara

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

The objective of this study is to clarify the effects for the fertility of the offsprings by nutritional conditions in the dam. Thirteen Japanese Black dam and the female offsprings were examined. The dams' blood in 8, 4, 2 and 1 weeks before parturition were measured on NEFA, total-cholesterol (T-Cho), blood urea nitrogen, albumin, calcium, magnesium, aspartate aminotransferase and gamma glutamyl transpeptidase. The offsprings' blood biweekly collected until 20 weeks old were measured anti-müllerian hormone (AMH). The ten offsprings were investigated the timing of the puberty, which found the first corpus luteum, by transrectal ultrasonography. The blood AMH levels in them which found puberty on and after 360 days old were higher than in them which found puberty before 300 days old. In addition, the dam of the former offsprings had the higher level of NEFA at 4 and 2 weeks before the parturition than them of the latter. The AMH levels in 6 offsprings showed > 800 pg/mL during the neonatal period. The dam of them have the lower T-Cho ($p = 0.09$) at 8 week and the higher NEFA at 4 and 2 weeks ($p < 0.05$) before parturition than the dam of the other offsprings. The three of the 6 offsprings had the puberty on and after 360 days olds. In conclusion, the puberty in offsprings were related by metabolic condition on the third trimester in the dam, especially NEFA and T-Cho. In addition, the AMH levels on the neonatal period in them were changed high, and tended to delay the puberty.

1. 目的

日本では家畜の改良増殖を計画的に行うことを通じ畜産の振興を図るべく、家畜改良増殖目標として、おおむね5年ごとに家畜の能力、体型および頭数などに関する10年後の目標を定めることになっている。令和2年3月の改訂で、肉用牛の繁殖能力目標数値として、初産月齢を24.5カ月から

10年後には23.5カ月に、分娩間隔を13.2カ月から12.5カ月にそれぞれ短縮させることが掲げられた。これまでも同目標に向け、発情誘起や排卵同期化、ICTを活用した飼養管理などの取り組みが行われてきたが、達成できていない。その理由の1つに、個々の雌牛が有する繁殖能力の差異が考えられる。

最近、ヒトではエピジェネティクスと関連し

て、胎児期および新生児期におけるプログラミングやインプリンティングによって、生後の恒久的な変化をもたらすことが着目されている。例えば妊娠中に低栄養状態であった母親から生まれた児は、肥満、心臓疾患、糖尿病や高血圧などになりやすいことが報告されている¹⁾。

日本の固有種である黒毛和種牛では、母牛の妊娠期の栄養状態とその後の産子の免疫能を調べた報告がある^{2,3)}。妊娠第3期(妊娠約180日以降、分娩まで)における母牛の栄養が充足していない場合、産子の免疫機能が低下したと報告されている。繁殖能力についても、雌では卵巣内の卵子の数は胎子期に決定することから、妊娠期における母牛の状態が影響することは想像に難くない。しかし、黒毛和種牛の妊娠期の栄養と産子の繁殖性については、調べられていない。

肉用牛の妊娠期の栄養状態を調整し産子の繁殖性を調べた報告は、国外に1報ある⁴⁾。交雑種未経産牛の交配から妊娠110日までの妊娠第1期の栄養水準を60%と120%に設定し、産子の繁殖能力を調べた結果、卵巣内にある卵胞数に違いはみられたが、春機発動の時期に違いはみられなかったことを報告している。しかし、胎子の成長が著しい時期は妊娠約180日から分娩までの妊娠第3期である。そのため、妊娠第1期における栄養制限を行ったとしても、胎子の成長や出生後の発育に及ぼす影響は、大きくないかもしれない。よって、妊娠第3期の栄養状態の違いによる影響を調査する必要がある。

抗ミュラー管ホルモン (AMH) は、卵胞を構成する顆粒層細胞からのみ合成、分泌されるホルモンで、原始卵胞の過剰な成長の開始や成長した卵胞における卵胞刺激ホルモンの感受性を低下させる作用を有し、卵巣から卵胞を早期に枯渇させないための重要な役割を担っている。我々はこのAMHに着目し、雌雄の繁殖性の指標としての

可能性をこれまで明らかにしてきた。その中で、同一飼養条件下で繋養している黒毛和種雌牛の哺乳および育成期において、1) 春機発動時期の違いによって血中AMHレベルの動態が異なること、2) 生後約2カ月にそのレベルに差異がみられること、を明らかにしている⁵⁾。しかし、AMHの差異をもたらす要因は分かっていない。

本研究では、黒毛和種牛について、妊娠第3期に母牛の代謝プロファイルを行い、産子の春機発動時期を出生後からの血中AMH動態と経直腸超音波検査で確認し、相互関係を明らかにすることで、産子の繁殖能力に及ぼす妊娠期の母牛における栄養評価指標を確立することを目的に調査を行った。

2. 方法

宮崎大学農学部附属住吉フィールドで繋養されている黒毛和種妊娠牛13頭(2産以上、以降は母牛と称す)およびその雌産子を調査した。

2.1 採血

母牛は、妊娠230日、260日および260日以降は分娩するまで1週間隔で採血を行った。産子は、出生後7日以内を生後0週とし、生後0週から2週間隔で20週まで採血を行った。採取した血液は、1,500gで15分間の遠心分離を行い、血漿を分離後、測定まで-30℃で保存した。

2.2 体重計測

産子は、出生時に体重の計測を行った。

2.3 血液化学検査

母牛の分娩前-8週、-4週、-2週および-1週の血液を用い、エネルギー代謝の指標として遊離脂肪酸 (NEFA)、脂質代謝の指標として総コレステロール (T-Cho)、タンパク質代謝の指標として総タンパク (TP)、尿素窒素 (BUN) およびアルブミン (Alb)、ミネラルの指標としてカルシウム (Ca) とマグネシウム (Mg)、肝機

能の指標としてアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) と γ グルタミルトランスアミナーゼ (γ -GT) を、生化学自動分析装置 (JCA-BM8060, JEOL Ltd., Tokyo, Japan) を用いて測定した。

2.4 内分泌学的検査

産子より採取した血液を用い、生後0週から20週までの2週間間隔で抗ミュラー管ホルモン (AMH) 濃度を市販のELISA (AL-114, Ansh Lab, USA) を用いて、測定した。

2.5 経直腸超音波検査

供試した産子のうち10頭は、10カ月齢時より2週間隔で、超音波診断装置 (トリンガリニア VET, Esaote Europe B.V., Netherlands) を用い、経直腸にて卵巣を観察し、黄体が初めて確認できた時を春機発動とした。なお、420日齢を過ぎても春機発動がみられなかった場合、420日とした。

2.6 統計解析

経直腸超音波検査を行った10頭について、300

日齢未満で春機発動が確認できた産子と360日齢までに春機発動が確認できなかった産子に分け、母牛の分娩前の血液化学測定項目を比較した。また、El-Sheikhら⁵⁾の報告を基に、産子の血中AMH濃度が期間中に800pg/mLを超えた産子と、それ以下だった産子に分け、その母牛の分娩前の血液化学測定項目を比較した。群間の比較では、Mann-Whitney U test (JMP[®]16, SAS Institute Inc., USA) を用いた。数値は平均±標準誤差で示す。

3. 結果と考察

産子の出生時体重は 31.7 ± 0.9 kg ($n = 13$, 28.2~37kg)、春機発動は 350 ± 16 日齢 ($n = 10$, 269~420日齢) だった。

Fig. 1 は13頭の産子の生後0日目から147日齢までに採取した血中AMH濃度の推移を個体ごとに示している。春機発動が300日齢未満にみられた産子は2頭 (#201および212; 実線および円の

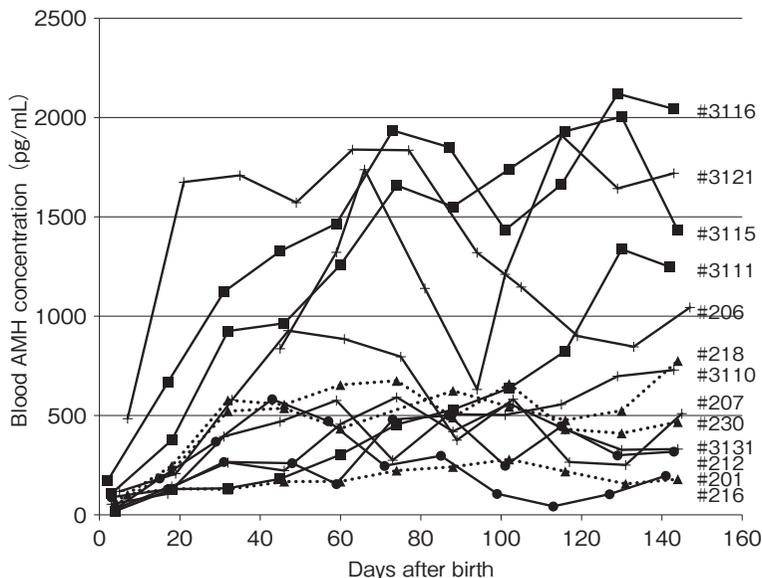


Fig. 1 Blood levels of anti-Müllerian hormone (AMH) in each offspring
 solid line + square : the puberty after 360 days old, solid line + circle : the puberty before 300 days old,
 solid line + cross : the puberty between 300-360 days old, broken line + triangle : not decided the timing of the puberty

マーカー), 360日齢まで春機発動がみられなかった産子は3頭(#3111, 3115および3116;実線および四角のマーカー)だった。300日齢未満で春機発動がみられた産子に比べ, 春機発動が360日齢までにみられなかった産子は, 血中AMH濃度が高く推移した。春機発動が360日齢までにみられなかった産子の母牛は, 分娩前-4週と-2週の血中NEFA濃度が, 春機発動が300日齢未満にみられた産子の母牛に比べ, 高かった (Fig. 2)。乳牛において, 分娩予定前3週にインスリン感受性試験を行い, インスリンに対して反応が悪かった母牛の産子は, 出生時体重, 血中インスリン様成長因子1 (IGF-1) 濃度および血中インスリン濃度が低かったことが報告されている⁶⁾。本研究では, 産子の春機発動が遅れた産子の母牛は, 分娩前4週から2週にかけてのNEFAが, 既報⁷⁾に

あるこの時期の平均+標準偏差の値の0.4mEq/Lより高く推移した。よって, これらの母牛ではこの時期に体脂肪の動員が起っていたことが示唆された。負のエネルギーバランスや妊娠期におけるインスリン抵抗性と相まって, 直接的に, あるいはIGF-1やインスリンなどを介して間接的に, 産子の視床下部-下垂体-性腺軸や卵巣における卵胞動員に対して影響を及ぼしたかもしれない。

産子の血中AMH濃度が, 期間中に800pg/mLを超えた6頭(#3110, #3111, #3115, #3116, #3121および#206)と, 超えなかった7頭に比べて比較したところ, 血中AMH濃度が800pg/mLを超えた産子の母牛は, 超えなかった産子の母牛に比べ, 分娩前-8週の血中T-Cho濃度が低い傾向がみられ ($p = 0.09$), 分娩前-4週と-2週の血中NEFA濃度が高かった (それぞれ $p < 0.01$,

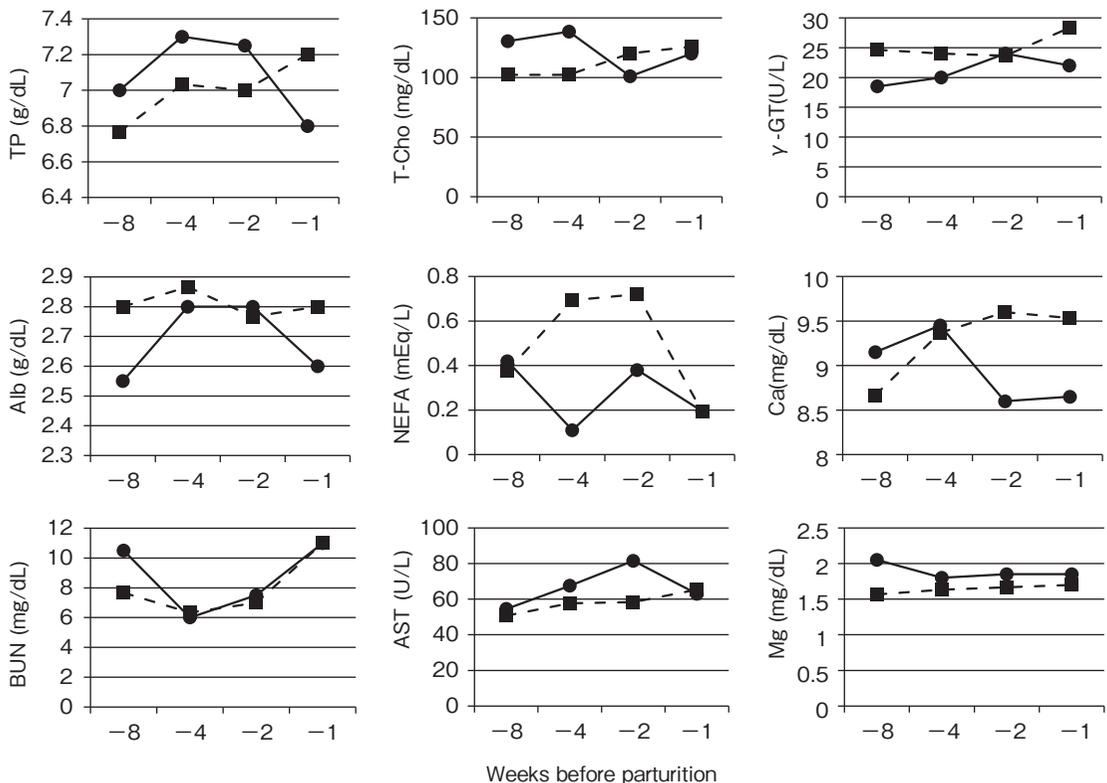


Fig. 2 Metabolic profiles on dam by timing of puberty in the offsprings
solid line (n = 2) : the puberty before 300 days old, broken line (n = 3) : the puberty after 360 days old

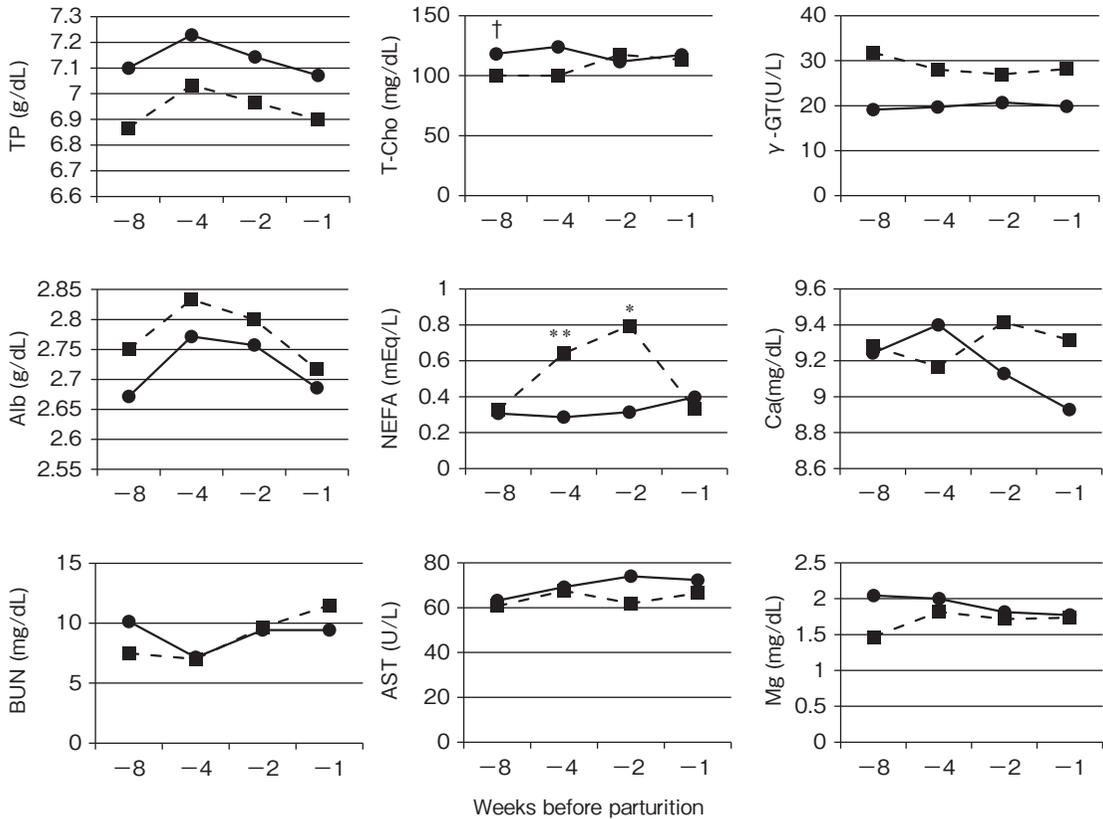


Fig. 3 Metabolic profiles on dam by anti-Müllerian level (AMH) in the offsprings
 solid line (n = 7) ; the AMH levels less than 800 pg/mL, broken line (n = 6) ; the AMH levels more than 800 pg/mL
 † ; p < 0.1, * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01

p < 0.05) (Fig. 3)。さらに血中AMH濃度が800 pg/mLを超えた産子6頭のうち、春機発動が360日齢までにみられなかった産子が3頭いた。一方で血中AMH濃度が800pg/mLを超えなかった産子7頭のうち、経直腸超音波検査を行った4頭すべてで360日齢までに春機発動がみられた。今回、出生後早い段階から血中AMH濃度がこれまでの既報⁵⁾より高く推移する産子がみられ、その中の半数で春機発動が遅延していた。ヒトでは多嚢胞性卵巣症候群 (PCOS) と呼ばれる疾病があり、卵巣に多数の小卵胞を形成し無排卵となる。この場合、血中のAMHレベルが高くなることが報告されている⁸⁾。PCOSにおける卵胞発育が停止する病態として、卵巣局所におけるLH作用の過剰

発現と、それに伴う卵巣アンドロゲン活性の過剰亢進のためとされ、その病因として、インスリン抵抗性による高インスリン血症や高LH血症が考えられている⁹⁾。本研究でみられた生後早期のAMHレベルが高い産子では、このヒトにおけるPCOSと同様の病態も考えられ、その原因として妊娠末期における母牛の負のエネルギーバランスが産子に影響を及ぼした可能性も考えられるが、さらなる調査が必要である。

結論として、黒毛和種牛において産子の春機発動時期は、母牛の妊娠第3期のエネルギー代謝と関係する可能性があること、また、妊娠第3期のNEFAが高く、T-Cholが低かった母牛の産子では、新生子期の血中AMHレベルが高く、春機発動時

期が遅れた。しかし、母牛の代謝状況と産子の繁殖性の関係性は、さらに多くの頭数を調査し、メカニズムも含め、明らかにしていく必要がある。

4. 要 約

本研究では、黒毛和種牛について、妊娠第3期に母牛の代謝プロファイルを行い、産子の春機発動時期を出生後からの血中AMH動態と経直腸超音波検査で確認し、相互関係を明らかにすることを目的に調査を行った。黒毛和種妊娠牛13頭およびその雌産子を調査した。母牛の分娩前-8週、-4週、-2週および-1週の血液を用い、遊離脂肪酸 (NEFA), 総コレステロール (T-Cho), 総タンパク (TP), 尿素窒素 (BUN), アルブミン (Alb), カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ (AST) および γ グルタミルトランスペプチターゼ (γ -GT) を測定した。産子の血液を用い、生後0週から20週までの2週間隔で抗ミューラー管ホルモン (AMH) 濃度を測定した。供試した産子のうち10頭は、10カ月齢時より2週間隔で、経直腸超音波検査を行い、黄体の有無を記録し、黄体が初めて確認できた時を春機発動とした。なお、420日齢を過ぎても春機発動がみられなかった場合、420日とした。春機発動が360日齢までにみられなかった産子 (n = 3) は、300日齢未満で春機発動がみられた産子 (n = 2) に比べ、血中AMH濃度が高く推移し、その母牛の分娩前-4週と-2週の血中NEFA濃度が高かった。産子の血中AMH濃度が期間中に800pg/mLを超えた6頭の母牛は、超えなかった7頭の母牛に比べ、分娩前-8週の血中T-Cho濃度が低く (p = 0.09), 分娩前-4週と-2週の血中NEFA濃度が高かった (それぞれp < 0.01, p < 0.05)。さらにその産子6頭のうち、春機発動が360日齢までにみられなかった産子が3頭いた。

結論として、黒毛和種牛において、産子の春機発動時期は、母牛の妊娠第3期のエネルギー代謝と関係する可能性があること、また、妊娠第3期のNEFAが高く、T-Choが低かった母牛の産子では、新生子期の血中AMHレベルが高く、春機発動時期が遅れた。

文 献

- Langley-Evans, S. C.: Developmental programming of health and disease, *Proc. Nutr. Soc.*, **65**, 97~105, 2006.
- 芝野健一, 大塚浩通, 嵐泰弘, 黒木智成, 斎藤隆文: 黒毛和種牛の周産期における低栄養が出生子牛の血液性状に及ぼす影響, *日獣会誌*, **62**, 538~541, 2009.
- 田波絵里香, 大塚浩通, 向井真知子, 小比類巻正幸, 安藤貴朗, 小形芳美, 川村清市: 妊娠末期における母牛の栄養状態が出生後の黒毛和種産子の末梢血白血球ポピュレーションに及ぼす影響, *日獣会誌*, **62**, 623~629, 2009.
- Mossa, F., Carter, F., Walsh, S. W., Kenny, D. A., Smith, G. W., Ireland, J. L., Hildebrandt, T. B., Lonergan, P., Ireland, J. J., Evans, A. C.: Maternal Undernutrition in Cows Impairs Ovarian and Cardiovascular Systems in Their Offspring, *Biol. Reprod.*, **88**, 92, 2013.
- El-Sheikh Ali, H., Kitahara, G., Takahashi, T., Mido, S., Sadawy, M., Kobayashi, I., Hemmi, K., Osawa T.: Plasma anti-Müllerian hormone profile in heifers from birth through puberty and relationship with puberty onset, *Biol. Reprod.*, **97**, 153~161, 2017.
- 川島千帆: 乳牛における分娩前後の栄養代謝状態が分娩後の繁殖機能回復と産子の体質に及ぼす影響, *家畜感染症学会誌*, **6**, 39~46, 2017.
- 上松瑞穂: 黒毛和種繁殖雌牛の血液代謝プロファイルテスト, *臨床獣医 臨時増刊号 新しい牛の繁殖~新技術の現場応用と近未来の展望~*, 68~74, 2017.
- Stylianou, V., Kaitlyn, E. J., Caitlin, R. S., Jennifer, Y. H., Irene, D., Charles L. B., Irene S.: A patient-specific model combining antimüllerian hormone and body mass index as a predictor of polycystic ovary syndrome and other oligo-anovulation disorders, *Fertil. Steril.*, **115**, 229~237, 2021.
- 折坂誠: 高LH環境はFSH誘導性の卵胞発育を抑制する—アジア系女性に典型的なnon-obese PCOSの病態解明を目指して—, *日本生殖内分泌学会雑誌*, **17**, 27~31, 2012.

リピートブリーダー牛の原因の多角的解析による その対策のための基礎情報収集

Gathering basic information for the solution of repeat-breeder cows by
multiple analysis of its causes

羽田真悟・真方文絵*

(帯広畜産大学獣医学研究部門, *東京大学大学院農学生命科学研究科)

Shingo Haneda and Fumie Magata*

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

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

This study aimed to gather basic information for the solution of repeat-breeder cows by multiple analysis of its causes. Ultrasonographic and hysteroscopic observation, bacterial analysis, cytological (PMN and lymphocyte) count, protein (EGF, IL6 and AOPP) and gene expression (*MUC1* and *IL8*) measurement were performed for 7 milking cows. One cow showed slight accumulation of the fluid in the uterus by ultrasonography. *Corynebacterium renale* was detected from cell debris from uterine flushing and also PMN ratio was high by cytological count. These were clinical finding to diagnose as endometritis. In this cow, *IL8* mRNA expression was also upregulated notably. As findings that not found in common clinical examinations (ultrasonography, bacterial analysis and cytology), discolored endometrium and desquamated endometrial epithelium were observed by uteroscopic analysis. An increase of AOPP was also recognized in the cow with desquamated endometrium. EGF and IL6 protein in uterine flush solution were lower than the minimal level of the assays (for EGF, the solution was concentrated 50 times). Then, rearrangement concentration of the solution was required. These multiple analyses make it possible to diagnose the cause of repeat-breeder cows. Accordingly, reproductive performance will be improved.

1. 目的

牛の繁殖の現場において、超音波検査などの臨床検査で異常が認められるものは、異常に合わせた治療が行われている。臨床検査で異常が認められないものは、細胞診、細菌検査など検査室での検査が実施されるか、そのまま繁殖に供され続けるが、原因が分からず3回人工授精を行っても受胎しないものはリピートブリーダーと呼ばれ、生

産性低下の原因となっている。異常が認められない不受胎は、その要因が上記の検査では診断できないものと考えられる。不受胎の要因を正しく診断することができれば、状態の悪い牛に人工授精を行うなどの無駄な行為を減らすことができ、状態に合わせた治療を行うことで繁殖効率および経済性の改善が期待できる。

他種動物の情報から、生殖器の状態を検査する方法としては、上記以外に、子宮内に分泌されて

いる成分を調べる方法や内視鏡で直接観察する方法がある。分泌物は、炎症に関連するタンパク質¹⁾やそのmRNA²⁾、エキソソーム中のマイクロRNA (miRNA)³⁾が子宮内膜炎時には増加すると考えられることや、炎症の結果生じるタンパク質過酸化物質 (AOPP)⁴⁾などが診断の指標となりうる。内視鏡は、申請者が最近牛における観察方法を確立し、子宮内膜表面の様子を観察することができる。分娩後の子宮の修復を観察した結果から子宮内膜の異常な所見をいくつか得られていることから、臨床現場における診断法として有用である。

以上のことから、本研究では、リピーター牛の生殖器について、細菌検査、細胞診、子宮内分泌物の検査、内視鏡による観察といった多角的な検査を実施し、正常牛および明らかな子宮内膜炎罹患牛と比較することでその病態を把握し、治療方針を検討するための基礎情報を得ることを目的に行った。

2. 方 法

本学畜産フィールド科学センターにて繋養されているホルスタイン種泌乳牛7頭を使用した。検査に最適な発情後日数を検討するために、EGF発現が高いとされるday3, 4, 14 (排卵確認日 = day1, n = 2, 3, 2) に観察および採材を行った。まず、超音波画像診断装置 (MyLabOne VET, esaote) を用いて卵巣および子宮の観察を行った。子宮は、全体をスキャンし、子宮角先端、中部、基部および子宮体部の画像を記録した。次に、ポータブル内視鏡 (aViewおよびaScope Large, Ambu) を人工授精の要領で子宮内に挿入し、片方の子宮角へと進め、炭酸ガスを注入することで内腔を膨らませて観察した。いったんガスを抜き、そのまま25mlの生理食塩水を注入することで液体が充満した状態でも内腔を観察した。注入

した生理食塩水は回収し、解析に用いた。逆側の子宮角も同様に観察および採材を行った。また、重度炎症の陽性対象として、子宮蓄膿症の牛から膿汁を採取した。

回収液は、1,600 xg, 4℃で15分間遠心し、上清をタンパク質の解析に、沈殿物を細菌培養、細胞診、DNA抽出、RNA抽出に用いた。

EGF測定は、限外濾過フィルター (Amicon Ultra-0.5, PLBCウルトラセル-3 メンブレン, 3 kDa, メルク) を使用して回収液 5 mlを50倍濃縮し、ELISAキット (Bovine Epithelial growth factor (EGF) ELISA Kit, CUSABIO) を用いて行った。IL6測定は、ELISAキット (IL-6 Bovine Uncoated ELISA Kit, Invitrogen) を用いて行った。AOPP測定は、アッセイキット (OxiSelect AOPP Assay Kit, CELL BIOLABS) を用いて行った。細菌培養は外注した。細胞診は、沈殿物を懸濁液にし、スライドガラスに塗抹後、ディフ・クイック染色により有核細胞200個中のPMNおよびリンパ球の割合を算出した。DNA抽出は、DNA抽出キット (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN) を用いて行い、細菌DNAをPCR法により検出した。検出用のプライマーは、細菌ユニバーサルな16srDNAを対象にしたものを使用した (fD1 fwd: 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3', rev: 5'-TAC GGT TAC CTT GTT ACG AC-3')。RNA抽出は、RNA抽出用試薬 (ISOGEN II, ニッポンジーン) を用いて行い、続く逆転写反応にはcDNA合成キット (SuperScript IV VILO, Thermo Fisher Scientific) を用いた。得られたcDNAはリアルタイムPCRにより、*MUC1* (fwd: 5'-ATG ACC ACC CGC TCT ATG TC-3', rev: 5'-GGA GGT GGA AAG TGC TAT GC-3') および *IL8* (fwd: 5'-CAC ATT CCA CAC CTT TCC AC-3', rev: 5'-CTT TTC CTT GGG GTT TAG GC-3') mRNA 発現

を比較した。補正には *GAPDH* (fwd: 5'-GAA GCT CGT CAT CAA TGG AAA-3', rev: 5'-CCA CTT GAT GTT GGC AGG AT-3') を使用した。

3. 結果と考察

結果の一覧を **Table 1** に示した。細菌検査により菌が検出されたものは day 4-b のみであった。また、細菌を検出する PCR においても day 4-b のみが陽性であった。細菌の存在にともない、回収液中の PMN 割合も 42% と増加していた。加えて、炎症時に好中球の走化性活性作用を持つ *IL8* mRNA の発現が顕著に増加していた。以上から、この個体は典型的な子宮内膜炎であると考えられる。一方、超音波初見では明らかな貯留物は認められず、子宮内から採材する積極的な検査をしない限り発見しづらい潜在性子宮内膜炎であり、この牛は長期不受胎で繁殖除外されていたので慢性的な潜在性子宮内膜炎が原因であったと推察される。day 3 の 2 頭は、発情時のものと考えられる出血が回収液中に強く認められた。その影響か、PMN およびリンパ球の割合が若干増加していた。また、AOPP の値が高いことも、血中の AOPP はヒトにおいて 100 μ M 程度の濃度であることを考えると、出血の影響で増加していると推察される。その他炎症性の反応はみられなかったが、day 3-b において子宮内膜の変色が一定の範囲

において観察された (**Fig. 1**)。day 3 の 2 頭は、生殖器の異常以外の問題で繁殖除外されていたが、day 3-b にみられた変色部が子宮内膜の正常な機能を発揮できないようなものであった場合、内視鏡でのみ発見できる異常であり、通常の繁殖管理ではリピートブリーダーとなる可能性がある。day 4-a は長期不受胎であったが、炎症等の所見はみられなかった。しかし、超音波所見において子宮内膜内に高輝度な部分が散見された (**Fig. 2**)。内視鏡による観察では特に異常が認められなかったことから、子宮内膜の内部に異常部位があると考えられるが、生体での調査は難しいため、高輝度部位がどのようなになっているかは、と場材料で同様の所見が認められるものを調査する必要がある。もしこれが繁殖機能に影響するものであった場合、超音波画像診断において着目すべき点として認識する必要がある。day 4-c は、*IL8* mRNA 発現がやや増加していた。細菌が未検出であることと PMN 割合が増加していないことから原因は不明であるが、非感染性の弱い刺激物が存在するのかもしれない。day 14-a は、炎症性の反応はみられなかったが、内視鏡所見において、ガス注入時には白色の筋が不規則に走る像がみられ、生理食塩水注入時には子宮内膜上皮が広範囲に剥離する様子が描出された (**Fig. 3**)。生理食塩水注入後に子宮をマッサージすることで

Table 1 The results of multiple analyses in 7 cows and pus.

	細菌検査	細菌 PCR	PMN	Lym	超音波所見	内視鏡所見	EGF	IL6	AOPP μ M	<i>MUC1</i> mRNA	<i>IL8</i> mRNA	繁殖履歴	備考
day3-a	-	-	6	1.5			限界以下	限界以下	23.1	1.0	1.0		出血多
day3-b	-	-	6.5	1.5		変色	限界以下	限界以下	27.2	0.5	1.2		出血多
day4-a	-	-	0	0	内膜内高輝度点		限界以下	限界以下	3.8	1.0	0.4	不受胎	
day4-b	<i>Corynebacterium renale</i>	+	42	0	わずかな貯留		限界以下	限界以下	3.0	1.2	116.2	不受胎	
day4-c	-	-	0.5	1			限界以下	限界以下	10.6	0.8	15.8		
day14-a	-	-	0	0.5	わずかな貯留	上皮剥離	限界以下	限界以下	31.5	1.0	0.4	不受胎	
day14-b	-	-	8	19			限界以下	限界以下	6.8	1.1	4.4		
膿汁	<i>Trueperella pyogenes</i>	+						>10ng/ml	86.3				

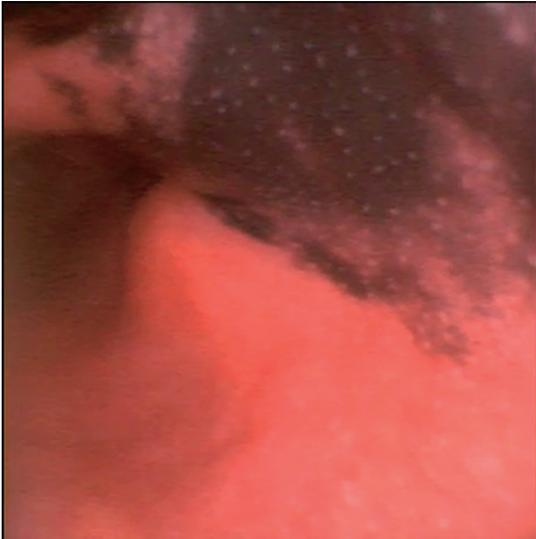


Fig.1 Discolored endometrium.



Fig.3 Desquamated endometrial epithelium.

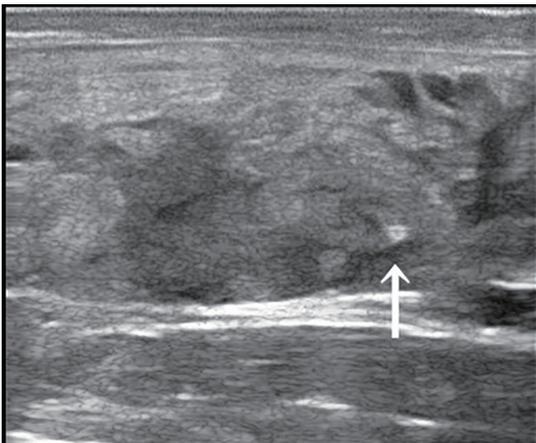


Fig.2 High echogenic structure in the endometrium (arrow).

子宮内膜上皮が剥離していたことを組織学的に示した報告があるが、本実験において、注入するだけで剥離するような状態は他の個体ではみられなかったことから、子宮内膜上皮の機能異常が疑われる。剥離した上皮の性質を確認し異常の原因を推定するために、接着因子の発現状況やアポトーシスの状況などを調査する必要がある。加えて、この個体はAOPP濃度が高かった。AOPPは、好

中球による貪食作用の結果を反映すると言われており⁴⁾、実際濃汁中のAOPPは $86.3 \mu\text{M}$ と高かったが、この個体では炎症細胞の遊走はみられなかったことから、子宮内において別の酸化ストレスがかかっている、それが子宮内膜上皮の剥離と関連したかもしれない。また、この個体は長期不受胎であったことから、このような非炎症性の異常が原因であった可能性が示唆される。day14-bは、PMNと*IL8* mRNAの軽度な増加と、リンパ球の増加が確認された。day 4-cと同様、細菌の存在が検出できなかったため、炎症の原因については不明である。リンパ球の増加についても情報が少なく、どのような病態を反映しているのか、細菌以外の病原体や炎症を引き起こす状態について今後調査していく必要がある。

今回の試験では、回収液中のEGFおよびIL6を検出することはできなかった。EGFは子宮の機能を反映し、リピートブリーダーでは子宮内膜組織での濃度が低いことが知られているため、子宮の機能不全による不受胎予測のマーカーとなりうる。今回の試験では回収液を50倍濃縮して測定し

たが、検出限界以下ではあったものの個体により反応の差がみられた。このことから、濃縮率を上げることにより測定できる可能性がある。IL6は回収液原液で測定したが、子宮蓄膿症の牛から採取した膿汁では検出限界以上の非常に高い値を示した。day 4-bのように明らかに炎症を起こしているような個体でも検出できなかったことから、ある程度濃縮して感度を上げる必要がある。MUC1 mRNA発現は、炎症時²⁾に増加するという報告があるが、今回測定したday 3~14の個体間ではその発現に大きな差はみられなかった。ある条件下では増加するのかもしれないが、そのタイミングなど詳しく調査する必要がある。回収液におけるエキソソーム中のmiRNAの解析は準備中であるが、次世代シーケンサーにより網羅的に発現の解析を行う予定である。

今後の課題として、まず採材日の決定があげられる。EGFを検出する目的で、採材の日を発情後day3, 4, 14に設定して比較したが、EGFが検出できなかったのも、まずはさらなる濃縮を試みる必要がある。一方、day 3では発情後の出血の影響で内視鏡による子宮内の観察が阻害されることや、出血由来の白血球の増加、AOPP濃度が高く検出されることなどの問題が考えられることから採材候補日から除外する。day 4は、内視鏡の挿入が比較的容易になることと、黄体期早期に増加していく血中プロゲステロン濃度の比較もできるメリットがあり、day14では、今回の観察で

みられた子宮内膜上皮の剥離について調査できる可能性がある。また、今回は間に合わなかったが、内視鏡による卵巣の観察を実施することで、癒着など解剖学的な異常を調査する予定である。

4. 要 約

リピートブリーダーの原因を特定するための基礎情報を得ることを目的に、牛7頭に対し画像診断、細菌検査、タンパク質、遺伝子発現と多角的な解析を行った。リピートブリーダーの定義から、現在臨床で実施できる超音波画像診断、細菌検査、細胞診で異常が発見できるものは、それぞれに応じた治療が可能である。一方、本調査から、成分的な要素としてAOPP濃度が長期不受胎の牛で高いことや、内視鏡による肉眼的観察にて異常所見がみられることが分かった。EGFやIL6濃度の測定を改善しつつ、症例を継続して収集することで、現在リピートブリーダーと診断される牛のうち原因が診断できる例を増やすことで繁殖効率の改善を目指す。

文 献

- 1) Brodzki, P., Kostro, K., Krakowski, L., Marczuk, J. : *Vet Res Commun*, 39(2), 143~149, 2015.
- 2) Kasimanickam, R., Kasimanickam, V., Kastelic, J. P. : *Theriogenology*, 81(7), 952~958, 2014.
- 3) Wang, X., Tian, F., Chen, C., Feng, Y., Sheng, X., Guo, Y., Ni, H. : *Reprod Biol*, 19(2), 204~209, 2019.
- 4) Gabai, G., Luca, E. D., Miotto, G., Zin, G., Stefani, A., Dalt, L. D., Barberio, A., Celi, P. : *Antioxidants*, 8(1), 21, 2019.

オリゴクローナルな持続性リンパ球増多症を示す 牛白血病ウイルス感染牛の生産性解析

Productivity analysis of cattle infected with bovine leukemia virus which show oligoclonal persistent lymphocytosis

猪 熊 壽

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Hisashi Inokuma

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

The aim of this study is to clarify the actual percentage of cows which showed oligoclonal B-lymphocyte proliferation in bovine leukemia virus (BLV)-infected individuals with persistent lymphocytosis (PL), and its change over time and examine the effect of oligoclonal status on cattle productivity. B-lymphocyte clonality of 274 cows was analyzed over time by using clonality-PCR. As a result, none showed monoclonality, but 10 showed minor-clonality (3.7%) and 31 oligoclonal (11.3%), that suggested a total of 14.0% of PL cows had some tumors. Onset of Enzootic bovine leukosis (EBL) was not found in all 233 polyclonal cows within 1 year, whereas 2 (6.5%) of 31 specimens that exhibited oligoclonal were confirmed to develop EBL one year later. Oligoclonal status might be a high-risk factor for developing EBL. In addition, 16 of the 31 specimens exhibiting oligoclonal were continuously tested one year later, and found to be 1 minorclonal, 3 oligoclonal, and 12 polyclonal status. It was thought that B-lymphocyte clonality does not always progress in one direction but changes reversibly.

1. 目 的

牛伝染性リンパ腫 (enzootic bovine leukosis : EBL) は牛伝染性リンパ腫ウイルス (旧 : 牛白血病ウイルス bovine leukemia virus : BLV) 感染により生じる疾患で, 近年その発症数が増加している^{1,2)}。BLV感染牛の大部分は無症状だが, 30%は持続性リンパ球増多症 (persistent lymphocytosis : PL) に進行し, さらにうち10%がEBLを発症する²⁾。EBL発症牛のリンパ球は腫瘍化しており, 単一細胞由来モノクローナル増殖であるのに対し, 非腫瘍化PL牛のリンパ球はポ

リクローナル増殖とされている^{3,4)}。しかし, 近年, PLと発症の間にはオリゴクローナルなリンパ球の増殖期, つまりいくつかの腫瘍細胞がクローン化する段階が存在することが明らかとなった⁵⁾。リンパ球のオリゴクローナル増殖はBLV近縁のヒトT細胞白血病ウイルス感染で生じる成人型T細胞白血病 (Adult T-cell leukemia : ATL) でも知られており, ATLでは発症の一病型と認識されている⁶⁾。一方, 牛ではPL牛は腫瘍化していないとして生産に供されている。オリゴクローナルなPL牛が本当に腫瘍か否かについては確認されておらず, またオリゴクローナルなPL牛の

臨床的意義も明らかになっていない。そこで本研究では、オリゴクローナルなBリンパ球増殖を示すPL牛の実態とその経時的变化、および発症との関連を明らかにし、オリゴクローナルな状態が腫瘍発生による全廃棄により、牛の生産性に及ぼす影響を考察することを目的として、BLV感染PL牛274頭について、Bリンパ球クローナリティを経時的に解析した。

2. 方法

茨城県が実施するBLV清浄化対策モデル農家18戸に飼養される牛のうち、2018年度にBLV抗体陽性かつPLを呈した274検体を材料とした。うち168検体はホルスタイン種、106検体は黒毛和種であった。モデル農家とはBLV清浄化のため茨城県家畜保健衛生所の指導のもとに、年1回のBLV抗体検査および感染対策指導を受けている農家である。リンパ球増多症の基準は、ホルスタイン種ではECの鍵、黒毛和種においては黒毛和種用に作成されたAkagamiらの基準を用いた⁷⁾。

2018年度検体のうち2019年度も継続して検査できた検体については継続検査を実施した。継続検査できなかった個体については、その転帰について、個体識別情報検索サービスを用いて死亡の有無を調べた。死亡個体のうち聞き取り等で追跡できるものについてはEBL発症の有無を確認した。

DNAの抽出は、PL牛の末梢血から自動核酸抽出器 (Automate Express Nucleic Acid Extraction System, サーマフィッシャーズ, 日本) を用いて実施した。DNAはクローナリティ解析まで -30°C で保存した。陽性対照として病理学的にリンパ腫と診断された個体のリンパ節および血液を用いた。陰性対照としてBLV陰性PL陰性の4検体のEDTA末梢血を用いた。

Bリンパ球クローナリティ解析は、牛免疫グロブリンH鎖の可変領域を含む領域を標的としたプ

ライマー-BoVHF1: 5'-AGCCCTGAAATCCCCGGCTCA-3'/BoVHR1: 5'-TCCAGGAGTCCTTGGCCCCA-3'を用いたPCRを実施した⁸⁾。PCR産物はキャピラリー電気泳動装置 (Agilent 2100バイオアナライザー, Agilent Technologies, California) および DNA 1000 Lab Chip kit (Agilent Technologies, California) を用いてクローナリティを解析した。ピークを伴わない波形を示すものをポリクローナル、マーカーの高さを超えるピークを持つものをモノクローナルとした (Fig. 1)。また、1つ以上の小ピークが存在するものをオリゴクローナルとした (Fig. 1)。さらに、モノクローナルのような高いピークを示さないが、ポリクローナル波形の高さの最大値より大きく、マーカーの高さを超えないピークが1つ存在するものをマイナークローナルと定義した (Fig. 1)。

解析結果の品種間の差についてはピアソンのカイ2乗検定により検定した。有意水準は5%とした。

3. 結果と考察

2018年度のPL牛274検体を解析したところ、マイナークローナル10検体 (3.7%)、オリゴクローナル31検体 (11.3%)、ポリクローナル233検体 (85.0%) であったが、モノクローナルを示したものはなかった。品種別ではホルスタイン種でマイナークローナル7検体、オリゴクローナル18検体、ポリクローナル143検体であった。一方、黒毛和種ではそれぞれ3検体、13検体、90検体で、品種によるクローナリティの割合に差はみられなかった ($p = 0.796$)。リンパ球のオリゴクローナル増殖は、ヒトのATLでは発症の一病型と認識されていることから⁶⁾、牛においてもPL牛の約15%は、すでに一部の細胞が腫瘍化していることが示唆されるデータである。

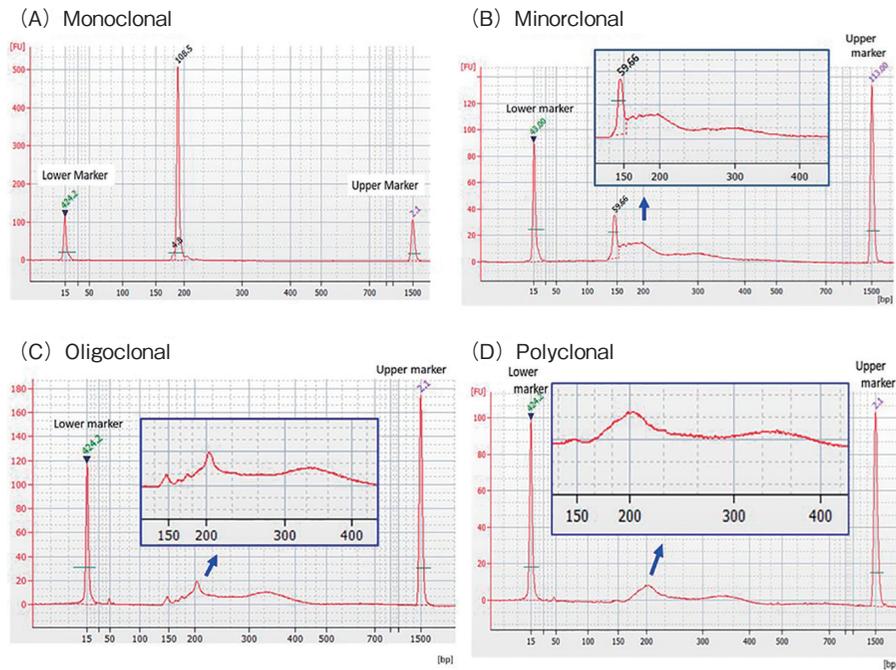


Fig.1 Representative patterns of (A) monoclonal, (B) minorclonal, (C) oligoclonal and (D) polyclonal B-lymphocyte proliferation of clonality PCR by using a capillary electrophoresis device, Agilent 1000.

2019年度にも継続してクローナリティ解析が可能であったのは157検体であった。残り117検体は解析しなかった (Table 1)。

2018年度にオリゴクローナルを呈した31検体を追跡したところ、16検体で2019年度に継続検査が可能であった。内訳はマイナークローナル1検体、オリゴクローナル3検体、ポリクローナル12検体であった (Table 1)。継続検査できなかった15頭のうち、と畜検査でEBL発症が2検体あった。EBL発症2検体は、それぞれ12歳齢の黒毛和種と6歳齢のホルスタイン種であった。

2018年度のマイナークローナル10検体を追跡したところ、5検体で2019年度に継続検査可能であった。内訳はマイナークローナル継続4検体およびオリゴクローナル1検体であった。残り5頭のうち、EBLを発症したものはなかった (Table 1)。

2018年度にポリクローナルを呈した233検体を追跡したところ、136検体で2019年度に継続検査が可能であった。うち131検体はポリクローナルが継続したが、マイナークローナルとなったものが1検体、オリゴクローナルとなったものが4検体であった。継続検査できなかった97検体のうち、と畜検査でEBL発症が確認されたものはなかった。

本研究では、PL牛157検体で約1年後のクローナリティ解析を行うことが可能であった。解析の結果、クローナリティは必ずしも一方向に進行するものではなく、可逆的に変化することが明らかとなった。これは腫瘍発生と宿主免疫の攻防による変化である可能性が考えられた。

EBL発症については、2018年度にポリクローナルを呈した233検体から1年後には発症牛はなかった。一方、2018年度にオリゴクローナルを呈

Table 1 Change of peripheral B-lymphocyte clonality in cattle with persistent lymphocytosis from 2018 to 2019

2018		2019	
Clonality states	Numbers of cattle	Consequence clonality status	Numbers of cattle
Monoclonal	0	–	0
Minorclonal	10	EBL (Slaughtered)	0
		Monoclonal	0
		Minorclonal	4
		Oligoclonal	1
		Polyclonal	0
		Others	5
		Total	10
Oligoclonal	31	EBL (Slaughtered)	2
		Monoclonal	0
		Minorclonal	1
		Oligoclonal	3
		Polyclonal	12
		Others	13
		Total	31
Polyclonal	233	EBL (Slaughtered)	0
		Monoclonal	0
		Minorclonal	1
		Oligoclonal	4
		Polyclonal	131
		Others	97
		Total	233
Total	274	Total	274

した31検体のうち2頭（6.5%）で1年後にEBL発症が確認された。ヒトの慢性リンパ球性白血病においては、末梢血のオリゴクローナルは腫瘍発生を意味する⁹⁾。PL牛におけるオリゴクローナルは、EBL発症のリスク指標となりうると考えられた。

これまでEBL発症牛は食肉検査所にて全廃棄されてきたが、PL牛は淘汰の対象とされていなかった。しかし、本研究によりPL牛の約15%でマイナークローナルまたはオリゴクローナルが確認され、それらはポリクローナル個体に比べてEBL発

症リスクが高く、食肉検査所での全廃棄により生産性に影響を及ぼしていることが示唆された。また、クローナリティは時間経過によりさまざまに変化し、すべてのオリゴクローナルまたはマイナークローナル個体がEBL発症に至るものではないことも明らかとなった。今後は、Bリンパ球のクローナリティ状態の変化とEBL発症の関連をより詳細に調べていく必要があると思われる。

謝辞 検体をご提供ならびに実験にご協力いただいた茨城県農林水産部県北家畜保健衛生所の川上

純子先生をはじめとする家畜保健衛生所の先生方。茨城県畜産センター肉用牛研究所の大内義尚先生。県南家畜保健衛生所の都筑智子先生に深謝いたします。

4. 要 約

本研究は、オリゴクローナルなBリンパ球増殖を示すPL牛の割合を明らかにするとともに、その経時的变化を明らかにすること、またオリゴクローナルな状態が牛の生産性に及ぼす影響を考察することを目的として実施された。BLV感染PL牛274頭のBリンパ球クローナリティをクローナリティPCRにより経時的に解析したところ、モノクローナルを示したものはなかったが、マイナークローナル10検体 (3.7%)、オリゴクローナル31検体 (11.3%) であり、PL牛の14.0%が一部腫瘍化した細胞を保有していることが示唆された。ポリクローナルを呈した233検体からは1年後のEBL発症牛がまったく発生しなかったのに対し、オリゴクローナルを呈した31検体のうち2頭 (6.5%) で1年後にEBL発症が確認されたことから、オリゴクローナルはEBL発症について高いリスクを有していると考えられた。また、オリゴクローナルを呈した31検体のうち、1年後の継続検査を実施できた16検体を解析したところ、マイ

ナークローナル1検体、オリゴクローナル3検体、ポリクローナル12検体であった。クローナリティは必ずしも一方向に進行するものではなく、可逆的に変化することが明らかとなった。

文 献

- 1) 田島誉士：獣医内科学大動物編，第2版，256～258，文永堂出版，東京，2014。
- 2) 村上賢二：動物の感染症 第4版，91～93，近代出版，東京，2019。
- 3) Kettmann, R., Cleuter, Y., Mammerickx, M., Meunier-Rotival, M., Bernardi, G., Burny, A., Chantrenne, H. : *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **77**, 2577～2581, 1980.
- 4) Coulston, J., Daniel, R. C. W., Lavin, M. F. : *Arch. Virol.*, **119**, 13～23, 1991.
- 5) 坂口加奈，前澤誠希，猪熊壽：産業動物臨床医学雑誌，**11**, 1～4, 2020.
- 6) Frouzi, S., Farmanbar, A., Nakai, K., Iwanaga, M., Uchimaru, K., Utsunomiya, A., Suzuki, Y., Watanabe, T. : *Blood Adv.*, **1**, 1195～1205, 2017.
- 7) Akagami, M., Oya, S., Kashima, Y., Seki, S., Ouchi, Y., Hayama, H. : *J. Vet. Diagn. Invest.*, **31**, 568～571, 2019.
- 8) Maezawa, M., Watanabe, K., Horiuchi, N., Matsumoto, K., Kobayashi, Y., Inokuma, H. : *J. Vet. Med. Sci.*, **82**, 61～63, 2020.
- 9) Maria-Luz, S., Julia, A., David, G., Marcos, G., Maria-Antonia, Garcia-M., Ana, B., Maria-Consuelo, Lopez-B., Josep, N., Teresa, V., Marcos, B., Alejandro, M., Pilar, de, la, F., Guillermo, Martin-N., Javier, Fernandez-C., Jesus-Maria, H., Jesus, F., San, M., Alberto, O. : *Blood*, **102**, 2994～3002, 2003.

牛難治性伝染性蹄病であるヘアリーアタックの病態解析

Pathophysiological analysis of bovine hairy attack as a refractory infectious hoof disease

谷口 喬子¹・三澤 尚明^{1,2}

(¹宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター, ²宮崎大学農学部獣医学科獣医公衆衛生学研究室)

Takako Taniguchi¹ and Naoaki Misawa^{1,2}

(¹Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki, ²Laboratory of Veterinary Public Health, Department of Veterinary Medical Science, Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

In the last few decades, bovine hairy attack has been reported as a new lesion affecting the dermis of the bovine hoof. Although, as well as papillomatous digital dermatitis, it has been shown to be a polymicrobial infection, predominantly involving *Treponema* sp., the major pathogenic bacterium has not been clarified. We examined such lesions in four cows that had been diagnosed as having hairy attack on two farms, and tested them for *Treponema* sp. and *Treponema phagedenis* by PCR using DNA extracted from them. However, in 1 of the 4 samples PCR amplified neither of the DNAs. In addition, *T. phagedenis* antigen was not detected in 2 of the 4 samples by immunohistochemistry using a rabbit polyclonal antibody against *T. phagedenis*. These results suggest that *Treponema* sp. and *T. phagedenis* may not be present in some hairy attack lesions. Further population analysis using 16S rRNA sequences and metagenomic analysis using next-generation sequencers were conducted to clarify the bacterial species predominantly present in hairy attack lesions. The prevalence of *Treponema* sp. was found to be low, suggesting that *Treponema* sp. may not be a major pathogen of hairy attack. Although *Pseudomonas* sp. was detected at a high rate in all four lesions, it seems unlikely to be the major pathogenic bacterium of hairy attack in view of its biochemical characteristics. It will be important to further analyze not only *Pseudomonas* sp. but also other pathogens that may cause bovine hairy attack.

1. 目 的

牛の趾皮膚炎は、疼痛を伴う蹄の伝染性限局性皮膚炎である。その病変からは多くの細菌が検出されており、難培養性の *Treponema* 属菌を中心とする細菌性複合感染であると考えられている^{1,2)}。全国各地の乳牛で発生が確認されており、

罹患牛は疼痛を伴うため跛行を呈し、体重減少、泌乳量低下等が認められるため、経済的損失の高い感染症として重要視されている。近年、ヘアリーアタックと呼ばれる白帯の真皮を侵す新しい病変が報告されている。ヘアリーアタックの病態については、最初に2008年米国とオランダで、2011年には英国で報告されている^{3,4)}。白帯真皮

の増殖性病変を伴う難治性の局所的肉芽病変で、白帯病や蹄尖潰瘍と併発することが多い。病変部は真皮が赤く充血し、独特な刺激臭を発する。趾皮膚炎同様、疼痛を伴うため、重度の跛行を引き起こし、経済的損失へつながらず。初期報告では、趾皮膚炎の蔓延した農場から生じたため、趾皮膚炎同様 *Treponema* 属菌の関与が疑われ、実際にPCRで高率に病変部から *Treponema* 属菌が検出された³⁾。しかしながら、ヘアリーアタックと趾皮膚炎との明確な診断根拠がなかったため、初期段階ではこれらが混合していた可能性も考えられる。現在では、病変の病歴、局在、臨床所見および特徴的な臭いなどから診断されており、*Treponema* 属菌だけでなく、*Fusobacterium necrophorum*、*Porphyromonas endodontalis* の関与も報告されている⁵⁾。しかしこれらは、病変部DNAからPCR法によって細菌の遺伝子が検出されたものであり、どのような細菌群がどのようなポピュレーションで病変を形成しているのかは明らかになっていない。

そこで本研究では、*Treponema* 属菌がヘアリーアタック病変内に存在するのかを明らかにするとともに、病変内に存在する細菌群を網羅的に検出して優勢菌を特定し、その病態解明に資することを目的として実施した。

2. 方 法

2.1 材料

北海道の2農家においてヘアリーアタックと診

断された乳牛各2頭の病変部生検 (A農場: HD44, HD142, B農場: HD2586, HD2877) を供試した。また、コントロールとして健康な乳牛の蹄踵部皮膚の生検 (C642, C817) を供試した。

2.2 *Treponema* 属菌および *Treponema phagedenis* の検出

病変部約100mgをBlood&Tissue Kit (QIAGEN) を用いて組織中に存在する細菌のDNAを抽出した。これを鋳型として *Treponema* 属菌および *T. phagedenis* を対象とした特異的プライマーを用いたPCRを実施した (Table 1)。抽出したDNAを2 μ l, Taq DNA polymerase (5 U/ μ l) (Takara) を0.1 μ l, 1 \times PCR buffer を2 μ l, 2.5mM の deoxynucleoside triphosphate mixture を1.6 μ l, そして各プライマーを0.16 μ Mになるように加えて合計20 μ lとした。*Treponema* 属菌の検出では、95°Cを30秒, 65°Cを30秒, 72°Cを1分のプログラムを30サイクル, *T. phagedenis* の検出では、95°Cを30秒, 57°Cを30秒, 72°Cを40秒のプログラムを35サイクルで実施した。PCR産物は、1.5%のアガロースゲル電気泳動によって確認した。

2.3 増幅遺伝子のシーケンス解析

PCR産物は、illustra ExoProStar (cytiva) で精製した。ダイレクトシーケンスは、Big Dye 3.1v (Applied Biosystems) を用いて添付のプロトコール通りに行い、3130 DNA sequencer (Applied Biosystems) で実施した。得られた塩基配列データは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) の BLAST (<http://blast>.)

Table 1 Primer used in study

Species	Primer sequence (5'-3')	Predicted band size (bp)	Reference
<i>Treponema</i> sp.	F: TTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAC	657	Asai <i>et al.</i> ⁶⁾
	R: GTCRYMGGCAGTTCCGCCWGAGTC		
<i>T. phagedenis</i>	F: TCCGCCTACGACTGCGATACCA	785	Beninger <i>et al.</i> ⁷⁾
	R: CGGAAGTGTCACTGCGCGGA		

ncbi.nlm.nih.gov/)にて相同性を調べ、98%以上の一致をもってその菌種として同定した。

2.4 病変組織の免疫組織化学的解析

組織を10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定後、常法によって病理組織標本を作製した。この標本について、牛の趾皮膚炎病変部より分離した*T. phagedenis*を家ウサギに免疫して作成した抗血清およびエンビジョンポリマー (Dako) を用いることにより免疫組織化学的検査を実施した⁸⁾。陰性コントロールとしてNormal rabbitの血清を使用した。

2.5 病変部の16S rRNA配列を利用したポピュレーション解析

病変部から抽出したDNAを型として細菌の16S rRNA遺伝子をユニバーサルプライマー (8F : 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3', 15 R : 5'-AAGGAGGTGATCCARCCG CA-3')により増幅し、大腸菌ベクターであるpT7 Blue vector (Takara)にクローニングした¹⁾。得られた形質転換体約100個体をランダムに選択し、アルカリボイル法によりDNA抽出後、クローニングされた遺伝子(16S rRNA)の塩基配列をダイレクトシーケンスにより決定した。得られたデータは、BLASTにて相同性を調べ、98%以上の一致をもってその菌種として同定した。

2.6 病変部の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

病変部から抽出したDNAを鋳型として、プライマー (515 F : 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGAT GTGTATAAGAGACAG-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3', 806 R : 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-GGACTACNVGGTWTCTAAT-3')を用いて、5'末端にアダプター配列が挿入されるよう16S rRNA遺伝子のV4領域を増幅した。Ampure XP Beads (Beckman Coulter)を用いて精製後、Nextera XT Index

Kit (Illumina)を用いて2 nd PCRを実施した。再度、Ampure XP Beadsで精製し、MiSeq (Illumina)を用いて300bpペアエンドシーケンスを行った。すべての工程はIlluminaのプロトコールに従った。得られた配列情報をQiime 2 (<https://qiime2.org/>)により解析した。

3. 結果と考察

3.1 *Treponema*属菌および*T. phagedenis*の検出

*Treponema*属菌特異的PCRでは4検体中3検体、*T. phagedenis*特異的PCRでは4検体中2検体で遺伝子増幅が確認され、ヘアリーアタック病変内に*Treponema*属菌および*T. phagedenis*が存在していることが示唆された (Fig. 1)。*Treponema*属菌特異的PCRの遺伝子産物について、シーケンス解析を行ったところ、HD 2586, HD 2877は、ともに*Treponema pedis*と同定された。*T. pedis*は、趾皮膚炎から高頻度に分離される*Treponema*属菌の1つである。趾皮膚炎の原因菌との報告もあるため⁹⁾、ヘアリーアタックの病原性にも関与している可能性が推測される。HD142については、シーケンスピークが混合しており同定できなかったことから、いくつかの*Treponema*属菌が混合している可能性が考えられる。*T. phagedenis*特異的PCRの遺伝子産物については、HD142, HD2877ともに*T. phagedenis*と同定された。しかしながらHD44については、どちらのPCRでも遺伝子増幅が確認できず、一部のヘアリーアタック病変内には、*Treponema*属菌および*T. phagedenis*が存在していない可能性が示唆された。

3.2 病変組織の免疫組織化学的解析

病変組織の*T. phagedenis*特異的免疫染色の結果、HD 142, HD 2877の2検体から抗原が検出され、病変組織内に*T. phagedenis*の存在が示唆

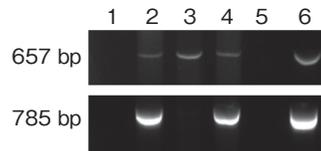


Fig. 1 PCR products obtained by PCR assay for *Treponema* sp. and *T. phagedenis*.
Lanes : 1, HD44 ; 2, HD142 ; 3, HD2586 ; 4, HD2877 ; 5, Negative control ; 6, Positive control.

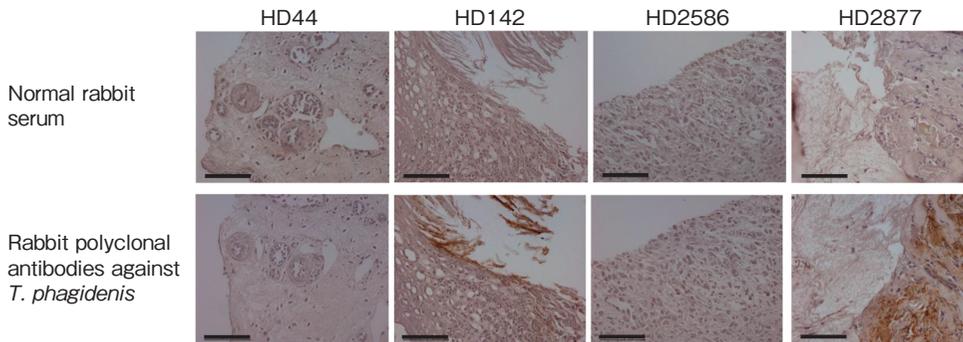


Fig. 2 Immunohistochemical analysis for hairy attack lesions using normal rabbit serum and rabbit polyclonal antibodies against *T. phagedenis*. Scale bar = 200 μ m.

された (Fig. 2)。HD 142 においては, *T. phagedenis* 抗原は主に角質層に分布しており, 顆粒層への浸潤も一部確認できた。HD 2877 においては増生した角質層に広く分布しており, 角質層への好中球の浸潤も確認された。しかしながら HD 44, HD 2586 の 2 検体では抗原が検出されず, この結果は, *T. phagedenis* 特異的 PCR の結果 (Fig. 1) と一致していた。

3.3 病変部の 16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析

4 検体中 3 検体 (HD44, HD142, HD2877) で優勢に検出されたのは, *Pseudomonas fragi* であり, 特に HD44 においては, 51% という高い確率で検出された (Table 2)。*P. fragi* は好気性冷蔵条件で保存された肉の主な腐敗微生物であり, 新鮮肉の物理的損傷, 異臭の発生, および粘液の形成の原因となることが知られている¹⁰⁾。ヘアリーアタックの臨床診断根拠の一つに独特な刺激臭が

あり, *P. fragi* の新鮮肉の腐敗と悪臭のある揮発性化合物の生成能力が, その臨床徴候に関与している可能性が考えられる。また HD2586 から優勢に検出された *Janthinobacterium lividum* は, 土壌由来の好気性グラム陰性菌で, 独特の暗紫色を有している¹¹⁾。しかしながら, これら両菌種とも, 好気性グラム陰性菌で環境中に広く生息しており, 低温でも増殖することから, 採材から組織の固定までの過程で本菌が増殖した可能性も考えられる。

3.4 病変部の次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析

16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析の結果と同様, 病変部からは *Pseudomonas* 属が共通して大きな割合を占めていた (Fig. 3)。次いで *Acinetobacter* 属, *Aeromonas* 属の環境由来菌の相対率が高い傾向にあった。正常な蹄踵部においては, *Acinetobacter* 属, *Psychrobacter* 属の

Table 2 Predominant clones at species level from 5 hairy attack lesions.

Description	Number (%) of clone			
	HD44 (n=103)	HD142 (n=79)	HD2586 (n=107)	HD2877 (n=100)
<i>Pseudomonas fragi</i>	51	10	9	45
<i>Pseudomonas taetrolens</i>	20			14
<i>Aeromonas salmonicida</i>	10	2		
<i>Pseudomonas psychrophila</i>	5			
<i>Pseudomonas syringae</i>	2		2	
<i>Vagococcus fluvialis</i>	2			3
<i>Filifactor villosus</i>		3		
<i>Hericobacter ovis</i>		3		
<i>Moryella indoligenes</i>		3		
<i>Filifactor alocis</i>		3		
<i>Fusobacterium necrophorum</i>		2	4	
<i>Brochothrix thermosphacta</i>		2		
<i>Candidatus Peptoniphilus</i>		2		
<i>Peptostreptococcaceae bacterium</i>		2		
<i>Janthinobacterium lividum</i>			20	4
<i>Comamonas testosteroni</i>			14	2
<i>Buttiauxella agrestis</i>			6	3
<i>Beta proteobacterium</i>			4	
<i>Citrobacter werkmanii</i>			3	
<i>Pseudomonas psychrophila</i>			3	4
<i>Aeromonas veronii</i>			2	
<i>Lactococcus raffinolactis</i>				7
<i>Lactococcus piscium</i>				2
Other	7	15	8	5
unknown	3	53	25	11

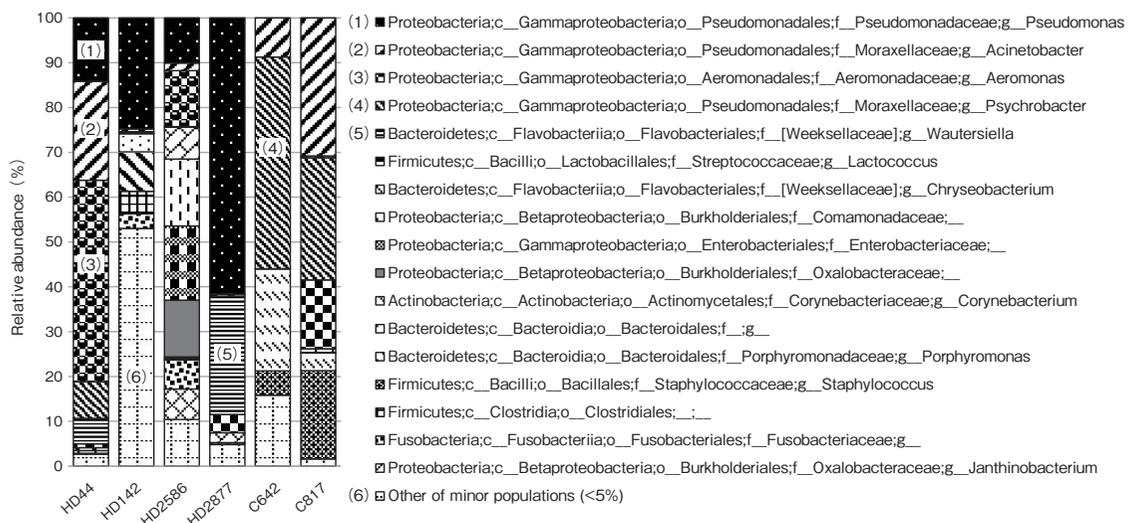


Fig. 3 Population analysis of hairy attack lesion-associated microbiota by next generation sequencing. One box showed single taxonomic classification of microorganisms at genus level.

比率が高く、病変部に高率で存在していた *Pseudomonas* 属は検出されなかった。一方、*Treponema* 属は、HD142で2.6%、HD2586で2.7%、HD2877で1.5%検出され、HD44および正常な蹄踵部であるC642、C817では検出されなかった。牛の趾皮膚炎では、*Treponema* 属菌が10-90%程度の高率で存在することが報告されており、*Treponema* 属菌を中心とする細菌性複合感染であると考えられている^{1,2)}。しかしながら、今回ヘアリーアタックの病変部における *Treponema* 属菌の存在率は非常に低く、検出されない場合もあったことから、ヘアリーアタックへの *Treponema* 属菌の関与の可能性は低いことが示唆された。これまでヘアリーアタックは趾皮膚炎同様、*Treponema* 属菌の関与が疑われていたため、今回の結果は非常に重要な知見であると推測される。16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析および次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって、ヘアリーアタック病変部から優勢に検出された *Pseudomonas* 属菌は、正常な蹄踵部からは検出されなかった。しかしながら、*Pseudomonas* 属菌は好気性グラム陰性菌であるため、単独で蹄踵部に侵入、増殖する可能性は低いと考えられる。蹄踵部に存在する細菌叢との相互作用を利用して感染が成立している可能性もあるため、今後は *Pseudomonas* 属菌だけでなく、発症の原因となる複数の病原体を対象とした解析を進めることが重要である。

4. 要 約

近年、牛の蹄踵部の白帯の真皮を侵す新しい病変としてヘアリーアタックが報告されている。牛の趾皮膚炎と同様、難培養性の *Treponema* 属菌を中心とする細菌性複合感染であると考えられているが、真の原因菌は不明である。我々は、2農家においてヘアリーアタックと診断された乳牛4

頭の病変部生検のDNAを用いて、PCRにより *Treponema* 属菌および *Treponema phagedenis* を検出した。しかしながら、4検体中1検体については、どちらのPCRでも遺伝子増幅が確認できなかった。また、病変組織の *T. phagedenis* 特異的免疫染色においては、4検体中2検体で抗原が確認できなかった。これらの結果より、一部のヘアリーアタック病変内には、*Treponema* 属菌および *T. phagedenis* が存在していない可能性が示唆された。さらに、16S rRNA 配列を利用したポピュレーション解析および次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって、ヘアリーアタック病変部に優勢に存在する菌種を特定した。その結果、*Treponema* 属菌の検出率は非常に低く、ヘアリーアタックへの *Treponema* 属菌の関与の可能性は低いことが示唆された。4検体に共通して高率に存在していたのは *Pseudomonas* 属菌であったが、その生化学的特徴よりヘアリーアタックの真の原因菌とは考えにくい。今後は *Pseudomonas* 属菌だけでなく、発症の原因となる複数の病原体を対象とした解析を進めることが重要である。

文 献

- 1) Yano, T., Moe, K. K., Yamazaki, K., Ooka, T., Hayashi, T., Misawa, N. : *Veterinary Microbiology*, **143**, 352~362, 2010.
- 2) Gotoh, Y., Chiba, K., Sekiyama, Y., Okada, K., Hayashi, T., Misawa, N. : *Microbiology and Immunology*, **64**, 416~423, 2020.
- 3) Evans, N. J., Blowey, R. W., Timofte, D., Isherwood, D. R., Brown, J. M., Murray, R., Paton, R. J., Carter, S. D. : *Veterinary Record*, **168**, 214, 2011.
- 4) Gomez, A., Döpfer, D., Cook, N. B., Burgi, K., Socha, M. : *The Veterinary Record*, **169**, 24, 2011.
- 5) Staton, G. J., Sullivan, L. E., Blowey, R. W., Carter, S. D., Evans, N. J. : *Veterinary Record*, **186**, 14, 2020.
- 6) Asai, Y., Jinno, T., Igarashi, H., Ohyama, Y., Ogawa, T. : *J Clin Microbiol*, **40**, 3334~33340, 2002.
- 7) Beninger, C., Naqvi, S. A., Naushad, S., Orsel, K., Luby, C., Derakhshani, H., Khafipour, E., De Buck, J. : *Vet Res*, **49**, 111, 2018.

- 8) Moe, K. K., Yano, T., Misumi, K., Kubota, C., Nibe, K., Yamazaki, W., Muguruma, M., Misawa, N. : *Microbiol Immunol*, **54**, 338~346, 2010.
- 9) Demirkan, I., Erdoğan, M., Demirkan, A. Ç., Bozkurt, F., Altindis, M., Navruz, F. Z., Köse, Z. : *Journal of Dairy Science*, **101**, 10317~10326, 2018.
- 10) Ercolini, D., Casaburi, A., Nasi, A., Ferrocino, I., Monaco, R. D., Ferranti, P., Mauriello, G., Villani, F. : *Int. J. Food Microbiol*, **142**, 120~131, 2010.
- 11) Friedrich, I., Hollensteiner, J., Schneider, D., Poehlein, A., Hertel, R., Daniel, R. : *Genome Biol Evol*, **12**, 1782~1788, 2020.

カンピロバクター・ジェジュニの「生きているが培養できない状態」を復帰させるための生物学的因子の解明

Clarification of biological factors to restore *Campylobacter jejuni* from “viable but non culturable” status

三澤尚明

(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

Naoaki Misawa

(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

Campylobacter jejuni is the leading cause of foodborne infections in Japan and many other developed countries. When bacterial cells are exposed to a stressful environment, *C. jejuni* can easily enter a “viable but non culturable cell (VBNC)” state accompanied by morphological changes ranging from a spiral to a coccoid form. Furthermore, several reports have shown that some strains of *C. jejuni* are aerotolerant and may survive efficiently under aerobic conditions. Since the importance of the aerotolerant state for food poisoning remains unclear, further studies are required to clarify whether it can revert to a culturable form with restoration of virulence potential. The first experiment was conducted to examine the effect of temperature and suspension on the culturability and viability. When *C. jejuni* strain 81-176 was suspended in phosphate buffered saline (PBS), the culturability was longest compared to the suspensions in distilled water (DW) and in Brucella broth at 4 °C. Next, when the bacterial cells were suspended in DW at 4 °C, the ratio of VBNC increased within a short storage time but not suspended in PBS and Brucella broth, and that the viability decreased by the rise in temperature. Furthermore, the transition to the VBNC state tended to be higher for *C. jejuni* strains with increased aerotolerance. Finally, it was examined whether the *C. jejuni* strain isolated from a broiler chicken in the VBNC state would restore to the culturable bacteria after being exposed to chicken bile, three types of bile acids, hydrochloric acid, pepsin-added hydrochloric acid, and anaerobic conditions. During 14-day culture period, there was no culturable bacteria in response to any exposure stimulus.

1. 目的

厚生労働省の食中毒統計によると、2010年以降カンピロバクターによる食中毒が増加している¹⁾。この増加傾向は多くの先進諸国においても見られており、地球規模では、毎年4～5億人の

感染者があると推定されている²⁾。感染源として重要視されているのは鶏で、養鶏場、食鳥処理場、さらには流通・販売に至る過程において本菌の防除対策を講じることが急務となっている¹⁾。しかしながら、カンピロバクターは多様に変化する環境に対してすばやく適応し、生存できる能力を兼

ね備えているため、その制御は容易ではない。細菌学を扱う者は、菌の生死は人工的培地における増殖の可否で判断していた。しかしながら、近年「生きているが培養できない」生理状態となった細菌の存在が明らかとなり³⁾、英語ではこのような菌の状態を Viable but non culturable cells と表し、その頭文字を取って VBNC と呼んでいる。

主要な食中毒菌であるカンピロバクター・ジェジュニ (*Campylobacter jejuni*) は VBNC 状態に移行することが知られ、菌の形態もラセン状から球状に変化し、条件によっては好気状態で6か月以上 VBNC 状態を維持することが報告されている⁴⁾。しかしながら、人工培地で培養できなくなった菌を培養可能菌に復活させる手法が確立していないため、VBNC が感染性や病原性の発現能力を維持または復元できるかどうかについては不明な点が多い。

カンピロバクター属菌は、家畜、家禽、伴侶動物および野生動物の消化管や生殖器等に広く分布している²⁾。カンピロバクターは保菌動物の腸管内容物や排泄物を介して飲料水や食品等に混入し、ヒトに感染する機会を待つが、微好気性細菌であるので、大気中の酸素分圧下では食品等の中で長時間生残することは困難である。しかしながら、このような菌にとって生存するには厳しいと考えられる環境下においてもカンピロバクターは感染環を維持していることから、多様に変化する環境に適応するための生存戦略として、VBNC への移行と復帰するためのスイッチを兼ね備えていると考えられる。研究代表者は、VBNC からの復帰は動物の消化管内で起こることから、胃酸による pH、胃腸から分泌される消化酵素類、胆汁酸等のさまざまな生体由来の因子が関与しているのではないかとの仮説を立てた。特に、*C. jejuni* は胆汁中で長期間生存することを観察しており⁵⁾、胆汁酸刺激や消化酵素による刺激が重要な

復活因子ではないかとの発想に至った。

このように、カンピロバクター食中毒の成立を考える際には、病原性や発症機序にとどまらず、保菌動物や環境中での生存様式（環境適応機構）などについても理解することが必要であることから、本研究では、VBNC 状態になった *C. jejuni* が培養可能状態に復帰する機序を、宿主側と細菌側から明らかにし、培養を可能とする手法を確立させる。そして、本菌の病原性や発症機序にとどまらず、保菌動物や環境中での生存様式（環境適応機構）について理解することを目的としている。

2. 方法

2.1 供試菌株

基礎的な研究には、VBNC への移行条件がすでに分かっている *C. jejuni* 81-176 株（米国で分離された生乳による食中毒由来株）を用いて実施した。VBNC の培養可能菌への復帰試験には、当研究室で保有する *C. jejuni* 株の中から、由来の異なる菌株（鶏、牛、環境、ヒト）で、好気耐性を有する株（B1, B5, C67）と非好気耐性株（H70, H84, C70）を供試した⁶⁾。

2.2 培養可能期間および VBNC への移行に及ぼす温度と懸濁液の影響

C. jejuni 81-176 株を血液寒天培地に接種し、37℃、48時間微好気培養した菌を $3 \sim 5 \times 10^7$ cfu/ml となるよう蒸留水（DW）、10mM リン酸緩衝液（PBS, pH7.2）および Brucella Broth（日本ベクトン・ディッキンソン・東京）に懸濁し、1.5ml のマイクロチューブに 1 ml ずつ分注した。分注した菌液は、好気条件下で 4、10 および 25℃ で静置保存した。経時的に培養可能菌を 5% 馬脱繊維血液加 Brucella 寒天平板（日本ベクトン・ディッキンソン）に 0.1ml 接種し、37℃ 微好気条件（80% N₂, 10% CO₂, 5% O₂, 5% H₂）で培養し、培養可能菌数を測定した。さらに、生菌と

死菌をLIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (サーモフィッシャー・東京) で染色後、蛍光顕微鏡を用いて計測した。

2.3 VBNCへの移行に及ぼす菌の好気耐性能の影響

*C. jejuni*好気耐性株 (B1, B5, C67) と非好気耐性株 (H70, H84, C70) を 1×10^8 cfu/mlとなるようDWに懸濁し、1.5mlのマイクロチューブに1mlずつ分注した。分注した菌液は、25℃で好気条件下で静置保存し、経時的に培養可能菌を上記と同様に培養法と蛍光法にて生菌と死菌を計測した。

2.4 VBNCの培養可能菌への復帰条件に関する検討

ブロイラー由来*C. jejuni* B1株を4℃、5週間好気培養してVBNC状態にした後、種々の感作刺激を与え、培養可能菌への復帰条件を精査した。

消化管内の環境を想定し、胆汁酸 (デオキシコール酸ナトリウム, コール酸ナトリウム, ケノデオキシコール酸: いずれもナカライテクク・京都) を1%に調整し、VBNC菌の懸濁液1mlに各胆汁酸を10 μ l 添加し、復帰用培地 (Brucella broth, 7%馬脱繊維血, 10%牛胎児血清, カンピロバクター発育サプリメント) 4mlと混合し、37℃、1時間静置させた後、復帰用培地に寒天を1.5%添加した平板に0.1ml接種して、37℃、2週間微好気培養を行い、菌の増殖を確認した。この他に、VBNC懸濁液に10%鶏胆汁、1規定塩酸 (pH 4.0)、0.1%ペプシン添加1規定塩酸の感作および嫌気条件下で37℃48時間暴露を行い、復帰用培地にて培養可能菌への復帰を観察した。対照として、VBNCのみの懸濁液を用いた。

3. 結果と考察

3.1 培養可能期間およびVBNCへの移行に及ぼす温度と懸濁液の影響

C. jejuni 81-176株を3種類の懸濁液に懸濁し、好気条件下で異なる3つの温度で静置保存して、培養可能期間を比較したところ、菌をPBSで懸濁し、4℃で静置した条件が最も長期間 (140日間) 培養可能であり、保存温度が高くなるにつれて培養可能期間が短くなる傾向を示した (Fig. 1A, B, C)。培養可能期間に及ぼす懸濁液の影響は、4℃と10℃においてPBSに懸濁した場合、最も長期間培養可能状態を維持し、次いでBrucella broth, DWの順であった。VBNCの検出は、LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kitによる染色に続く蛍光顕微鏡観察により確認できた。PBSに懸濁直後の菌の多くはラセン形状を示し、生きていることを示す緑色の強い蛍光が検出された (Fig. 2A)。一方、好気条件下で4℃、7週間保存すると、菌の形状の多くは球状菌に変化していたが、約70%の菌が生きていた (Fig. 2A, B)。VBNCへの移行に及ぼす温度の影響を見ると、4℃ではDWに懸濁すると、PBS, Brucella brothに比べ短時間でVBNCとなり、高いVBNC状態の菌数を維持していたが、保存温度の上昇とともにVBNC状態の菌数は減少した。10℃以上の温度で保存すると、Brucella brothに懸濁した菌がDW, PBSよりも長期間VBNC状態を維持していた。

以上の結果から、保存温度と懸濁液の種類が好気条件下において*C. jejuni* 81-176株の培養可能菌の状態に影響を与えることが示唆された。特に低温での保存条件が培養可能状態に強く影響しており、保存温度の上昇に伴って培養可能菌は速やかに減少した。DWの懸濁では培養可能状態が短く、さらに栄養豊富なBrucella broth培地よりも

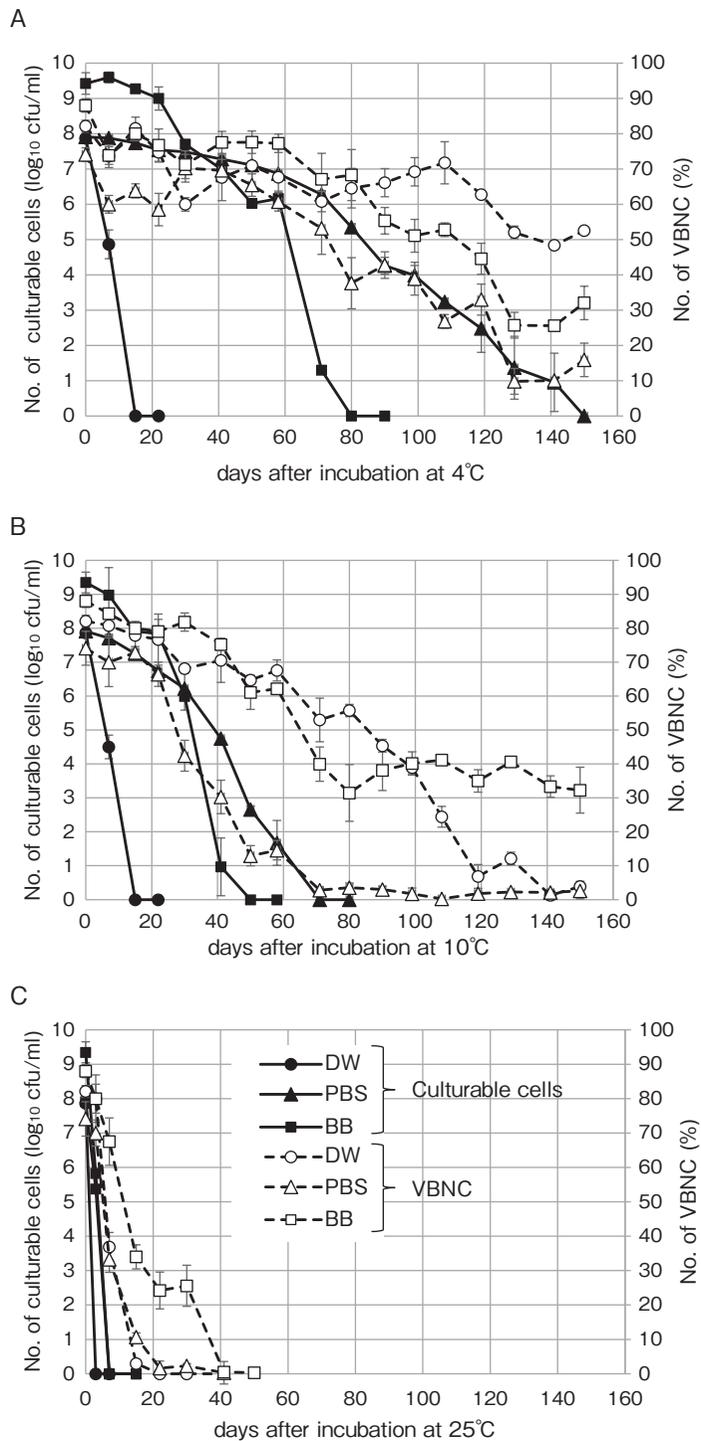


Fig. 1 Number of culturable (solid line) and VBNC (dotted line) cells of *Campylobacter jejuni* strain 81-176 suspended in different suspensions (DW : distilled water, PBS : phosphate buffered saline, BB : Brucella broth) and temperatures. Cells were incubated aerobically at 4°C (A), 10°C (B), and 25°C (C).

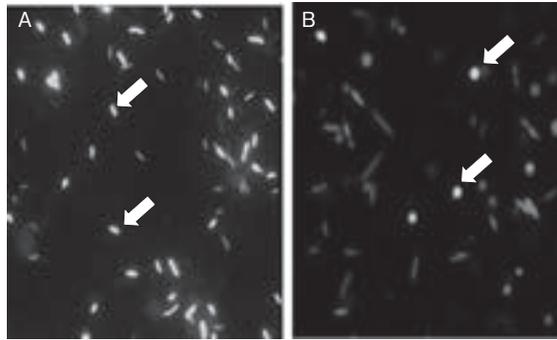


Fig. 2 Detection of viable cells of *C. jejuni* strain 81-176 suspended in PBS by staining with LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit. Viable cells are seen as strong bright (arrows). Bacterial cells were incubated aerobically for 0 hr (A) and 28 days (B) at 4°C.

PBSのほうがより長い期間培養可能状態を維持できる傾向が観察されたことから、浸透圧が培養可能状態の維持にとって重要な因子であることが示唆された。一方、4°Cの保存温度では、DWで菌を懸濁すると最も速くVBNC状態に移行し、観察した150日間高率に生きた状態を維持していたが、10°Cの保存温度ではそのような傾向は認められなかった。したがって、*C. jejuni*の生死や培養可能状態の保持には、複雑な環境要因が関与していると考えられた。

3.2 VBNCへの移行に及ぼす菌の好気耐性能の影響

*C. jejuni*株の中には、好気耐性能を有する菌株と非耐性株が存在する。本研究において、培養可能状態とVBNCへの移行が好気耐性能と関連するか調べた。その結果、好気耐性能は培養可能状態の維持とは関連していなかった。一方、VBNCへの移行は好気耐性能を有する菌株のほうが高い傾向を示した (Fig. 3A, B)。以上の結果から、VBNCへの移行が好気耐性能獲得株に備わっていることが考えられるが、今回の実験では保存温度が25°C、懸濁液がDWであったことから、さらに異なる条件下でのVBNCへの移行に及ぼす菌の好気耐性能の影響を調べる必要がある。

3.3 VBNCの培養可能菌への復帰条件に関する検討

VBNC状態になったプロイラー由来*C. jejuni*株に対し、鶏胆汁液、3種類の胆汁酸、塩酸、ペプシン添加塩酸、嫌気条件の暴露刺激を与えた後に培養可能菌へ復帰するか検討したが、14日間の培養期間中いずれの暴露刺激に対しても、培養可能菌へ復帰することはなかった。これらの試験は、VBNC状態の菌が、動物の消化管内で培養可能菌に復帰することを想定して実施したものである。今後はさらに異なる消化酵素刺激や複数の暴露刺激の組み合わせなどを検討するとともに、環境中における*C. jejuni*の培養可能状態とVBNC状態の発現遺伝子の比較等の解析が必要であると思われる。

4. 要 約

*C. jejuni*の生存様式は2つに分けることができる。一つは活動期で、菌は宿主腸管内を鞭毛により活発に運動し、宿主粘膜上皮に付着する能力を持つ。第2の生存様式は休止期で、増殖した菌体が運動を止め、お互いに接着してバイオフィルムを形成したり、環境の変化に応じて生きているが培養できないVBNC状態に移行する。VBNCの特

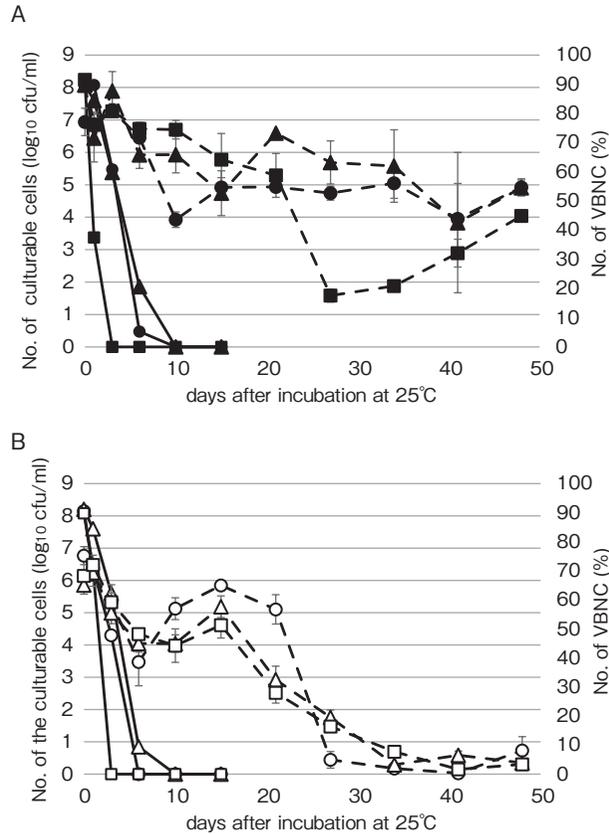


Fig. 3 Number of culturable (solid line) and VBNC (dotted-line) cells of *C. jejuni* strains. Aerotolerant strains (B1—●—, B5—▲—, C67—■—) (A) and Aero-sensitive strains (H70—○—, H84—△—, C70—□—) (B) were suspended in DW and incubated at 25°C.

性は、カンピロバクターによる食中毒発症機序の解明を難しくしている要因の一つとなっている。本研究では、VBNCを培養可能な状態に戻すための生物学的因子を明らかにすることを主目的として実施した。培養可能期間およびVBNCへの移行に及ぼす温度と懸濁液の影響を調べるため、*C. jejuni* 81-176株を3種類の懸濁液に懸濁し、好気条件下で異なる3つの温度で静置保存して、培養可能期間を比較したところ、菌をPBSで懸濁し、4°Cで静置した条件が最も長期間(140日間)培養可能であり、保存温度が高くなるにつれて培養可能期間が短くなる傾向を示した。一方、VBNCへの移行に及ぼす温度の影響を見ると、4°Cでは

DWに懸濁すると、PBS、Brucella brothに比べ短期間でVBNCとなり、高いVBNC状態の菌数を維持していたが、保存温度の上昇とともにVBNC状態の菌数は減少した。次にVBNCへの移行に及ぼす菌の好気耐性能の影響を調べたところ、VBNCへの移行は好気耐性能を有する菌株のほうが高い傾向を示した。一方、VBNC状態になったプロイラー由来*C. jejuni*株に対し、鶏胆汁液、3種類の胆汁酸、塩酸、ペプシン添加塩酸、嫌気条件の暴露刺激を与えた後に培養可能菌へ復帰するか検討したが、14日間の培養期間中いずれの暴露刺激に対し、培養可能菌へ復帰することはなかった。

文 献

- 1) Vetchapitak, T., Misawa, N. : Current status of *Campylobacter* food poisoning in Japan, *Food Safety*, 7(3), 61~73, 2019.
- 2) Ruiz-Palacios, G. M. : The health burden of *Campylobacter* infection and the impact of antimicrobial resistance : playing chicken, *Clinical Infectious Diseases*, 44(5), 701~703, 2007.
- 3) Rollins, D. M., Colwell, R. R. : Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment, *Applied and Environmental Microbiology*, 52(3), 531~538, 1986.
- 4) Buck, G. E., Parshall, K. A., Davis, C. P. : Electron microscopy of the coccoid form of *Campylobacter jejuni*, *Journal of Clinical Microbiology*, 18, 420~421, 1983.
- 5) Enokimoto, M., Kubo, M., Bozono, Y., Mieno, Y., Misawa, N. : Enumeration and identification of *Campylobacter* species in the liver and bile of slaughtered cattle, *International Journal of Food Microbiology*, 118, 259~263, 2007.
- 6) Kiatsomphob, S., Tarigan, P., Taniguchi, T., Latt, K. M., Jeon, B. H., Misawa, N. : Aerotolerance and multilocus sequence typing among *Campylobacter jejuni* strains isolated from humans, broiler chickens, and cattle in Miyazaki Prefecture, Japan, *Journal of Veterinary Medical Science*, 81(8), 1144~1151, 2019.

豚熱（CSF）ワクチン接種繁殖母豚から初乳摂取条件の異なる子豚へのCSF抗体移行と存続に関する研究

Investigation for classical swine fever virus specific maternal antibody levels and persistence of piglets acquired colostrum under different condition from sow

長井 誠¹・野口 倫子¹・鈴木 武人¹・青木 博史²

(¹麻布大学, ²日本獣医生命科学大学)

Makoto Nagai¹, Michiko Noguchi¹, Takehito Suzuki¹ and Hiroshi Aoki²

(¹Azabu University, ²Nippon Veterinary and Life Science University)

Classical swine fever (CSF) is a significant threat for the pig industry. To protect neonatal piglets with CSF infection during lactational period under the prevention using vaccine, it is important to consume a sufficient amount of colostrum containing maternal antibody against vaccine strain. However, owing to a significant improvement in litter size at birth under the current pig raising system, neonatal piglets often fail to consume a sufficient amount of colostrum. In the present study, we investigated antibody level against CSF vaccine strain, blood property, immunoglobulin concentration, and peripheral blood mononuclear cells subpopulations. We also studied CSF virus (CSFV) specific maternal antibody levels and persistence of piglets acquired colostrum from sows with or without vaccination under different conditions.

As a result, two weeks after vaccination of CSF 50% (5/10) sows had neutralizing antibodies against CSF; whereas, antibodies were not detected by a commercially available enzyme immunoassay (ELISA). Antibodies were detected by both the neutralization test and ELISA in all serum samples collected from sows four weeks after vaccination. Relative percentage of CD4, CD8, CD21, and CD4/8DP T-cells, which relate with adaptive immune response of sows, who did not possess the neutralization antibodies against CSF at two weeks after vaccination, were lower than those of seropositive sow. These findings suggest that acquisition of immunity by CSF vaccination may be influenced by immune system variations of sow. IgG and IgM concentrations on days 7, 14, and 21 after birth of piglets, who were restricted consuming colostrum for 6 hours after birth were significantly lower than control piglets. Antibody titers against CSFV of 6 hours colostrum restriction were > 3-fold lower than those of control piglets. Furthermore, piglets of sow, who was vaccinated on 21 days before farrow, did not acquire sufficient maternal antibody against CSF. These results clearly showed that acquisition of colostrum from sufficiently immunized sows within adequate period is important for prevention of CSFV infection.

1. 目 的

豚熱 (CSF) は養豚経営において最も重要な伝染病であり¹⁾、2018年9月に26年ぶりに我が国で発生し、その後、豚における発生は中部地方から、現在、西は近畿地方、東は東北地方にまで広がっている。さらには2020年1月に沖縄県にも飛び火し、国内はどこも等しく発生の危険にさらされていることが示された。関東地方の養豚場で発生したのを機に、国内において地域限定で豚への予防的ワクチン接種による防疫が開始された。しかしながら、ワクチン接種が実施されていた養豚場であるにもかかわらず、ワクチン未接種の子豚にCSFが発生する事例が起り、移行抗体の重要性が改めて認識された。近年、1回あたりの分娩頭数の増加を狙った育種改良が行われ、多産系の種豚が生産現場に普及されてきた。その結果、母豚の乳頭数を超える産子を哺育しなければならないケースが増えてきており、初乳の摂取を確実にするために農場によってさまざまな手法がとられている。CSF清浄化の取り組みが行われていた20年以上前に、CSFワクチン接種に伴うワクチン抗体および移行抗体の推移の調査が行われ、移行抗体の消失の目安が定められている。しかし多産系の豚が普及し、初乳の給与も手法がさまざまである現状では、単に母豚のCSFワクチン抗体価を測定するだけでは十分ではなく、母豚の抗体価と初乳の摂取状況、子豚の免疫機能の状態および抗体価を関連させて調査する必要があると考えられる。

そこで本研究では、CSFワクチンの移行抗体が十分に移行する初乳給与と条件を検討することを目的とし、近年野外で普及している純粋種あるいは交雑種の繁殖母豚にCSFワクチン接種を行い、その後の一般血液性状、免疫グロブリンおよび白血球のサブクラスの比率変化を調べ、さらに子豚の初乳摂取状況、健康状態調査および白血球サブク

ラス解析を行った。これらの成績をもとにCSFワクチンの移行抗体を子豚へ十分に移行させることができる初乳給与の指標を確立することは、我が国の養豚場におけるワクチンによるCSF防疫の効果を向上させるための大きな一助となると考えている。

2. 方 法

2.1 供試繁殖母豚

これまで感染症が疑われる臨床症状を呈した経歴のない、産歴が6~11産のランドレース種 (L種) 8頭および3産のランドレース×大ヨークの交雑種 (LW種) 2頭を用い、オーエスキー病、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) および豚サーコウイルス2型 (PCV 2) のフリーが証明されている豚舎にて試験に供した。CSFワクチンはCSF生ワクチン (スワイバックC、共立製薬株式会社) を使用し、ワクチン接種後2, 4, 6, 8, 10および12週目に採血を行った。

2.2 授乳子豚および初乳摂取制限

分娩した子豚については6時間の初乳摂取制限区と自由摂取区を設定した。CSFワクチン未接種 (LW種1頭) およびワクチン接種後21日目および161日目に分娩したLW種それぞれ1頭について、その産子を試験に供した (ワクチン未接種自由摂取区10頭、ワクチン接種後21日目分娩初乳摂取制限区7頭、161日目分娩初乳摂取制限区7頭および161日目分娩自由摂取区7頭)。初乳摂取量の推定は体重を既報²⁾の公式に当てはめて推定した。出生直後、1, 2および3週後に採血を行った。

2.3 CSFワクチンに対する抗体価の測定

迫田ら³⁾が樹立した無血清培養順応CPK-NS細胞とCSFワクチン株であるGPE⁻株による中和試験でCSFウイルスに対する中和抗体価を測定した。96穴マイクロプレート上で、56°C 30分で非働化した豚被検血清50 μLを培養液で2倍階段希釈

し、200 TCID₅₀に調整したGPE⁻株を50 μ L加え、37°Cで1時間の中和反応を行った。その後、CPK-NS細胞を加え7日間培養を行い、細胞変性効果 (CPE) を阻止した血清の最高希釈倍数の逆数をウイルス中和抗体価とした。

さらに、市販の酵素結合免疫吸着法 (ELISA法) (豚コレラエライザキットII, ニッポン・ジーン) を用いてCSF抗体検査を実施した。判定は、取扱説明書に従ってS/P値を求めた後、同キットの判定基準に従った。

2.4 一般血液学的検査, 免疫グロブリン濃度測定および白血球サブクラス解析

EDTA加およびプレートの採血管を用いて採血を行い、EDTA加で採血した全血は一般血液学的検査、血液塗抹検査および白血球サブクラス解析、プレート採血管で採血した血液は遠心し、CSF抗体測定および免疫グロブリン濃度測定に用いた。得られた全血は自動血球計数機を用いて、白血球数、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値および血小板数を計測した。また血液塗抹標本を作製し、顕微鏡下で有核細胞を200個カウントし、白血球の比率を計測した。末梢血中の白血球サブクラス解析は、フローサイトメーターで白血球5,000個あたりの各標的細胞数を測定して各標的細胞が全体に占める率を計算した。一次抗体は、ヘルパーT細胞が抗CD4抗体、細胞障害性T細胞が抗CD8抗体、単球が抗CD14抗体、成熟B細胞が抗CD21抗体、NK細胞が抗CD335抗体を使用した。さらに、抗CD4抗体と抗CD8抗体の両方に陽性を示す細胞をCD4/CD8両陽性T細胞として測定した。ブタ免疫グロブリン (Ig) GおよびIgM濃度測定は、ELISA法で行った。それぞれ、洗浄した抗ブタ山羊抗体 (A100-104P for IgG および A100-117P for IgM, Bethyl laboratories, Inc.) 固相化プレートのウェルに標準液 (P100-105 for IgG, Bethyl laboratories, Inc.)

および 20017-2-1 for IgM, Alpha diagnostic international) あるいは検体100 μ l を分注して反応させた。各ウェルを洗浄した後、検出物質標識抗体 (A100-104A for IgGおよびA100-117A for IgM, Bethyl laboratories, Inc.) を分注して反応させ、洗浄後発色液 BCL-TMB-01/BCL-TMB-21, Beacle, Inc.) を分注し静置した。15分後に反応停止液 (1 Mリン酸) を重層してマイクロプレートリーダーで450nmの吸光度を測定した。

2.5 統計処理

試験区および週齢間における子豚のIgG, IgM, CSF中和抗体の比較には線形混合効果モデルを用いた。固定効果として試験区および週齢を、変量効果として個体IDを用いた。主効果が有意な差は交互作用を検定した。多重比較にはTukey-Kramer法を用い、有意水準は0.05とした。繁殖母豚における2週齢のサブクラスの割合についてF検定により両群の等分散性の検定を行い、等分散の場合はStudent's t-test, 非等分散の場合はWelch's t-testを用いて、 $p < 0.05$ の時に統計的有意差があると判定した。

3. 結果と考察

3.1 繁殖母豚におけるCSF抗体獲得と免疫動態

繁殖母豚へのCSFワクチン接種後における白血球数は平均10.5~12.1 $\times 10^3 / \mu$ l の範囲内で12週目まで変化は認められなかったが、CSFワクチン接種後6週目に赤血球系パラメータに貧血所見を示す変化が認められた (Fig. 1-A, C)。CSFワクチン接種後のIgGおよびIgM濃度はほぼ一定であった (Fig. 1-B)。CSF中和抗体価は、接種後2週目で上昇している個体の割合は50% (5/10頭) であり、ELISA判定では1頭の擬陽性を除いてすべて陰性であった。4週目以降ではすべての個体で中和抗体の上昇およびELISA判定での

陽性が確認され (Fig. 1-D, Table 1), 抗体産生が安定して起こるまでにはCSFワクチン接種から少なくとも4週間は要することが確認された。CSFワクチン接種により抗体価の上昇が起こってもIgGおよびIgM濃度変化が認められないことは、ワクチン効果をIgGおよびIgM濃度により推定することは不可能と思われた。また、中和試験による抗体検出のほうでELISAよりも早くに抗体上昇を検出することが分かった。

白血球サブクラス解析では、白血球数の変化がみられないもののほとんどの細胞がワクチン接種6週後に比率が大きく減少したが、同じ時点で赤血球系パラメータの減少とあわせてもワクチン接種との関連性は不明瞭であった (Fig. 1-C)。一方、ワクチン接種2週後の中和抗体価は個体差が大きいことが分かったことから、ワクチン接種2週後に中和抗体価が陽性 (≥ 1) を示した群と低い (< 1) 群に分け、白血球動態を解析した結果、 < 1 群では適応免疫に関わる細胞 (CD4, CD8, CD21 および CD4/8DP) が有意に少なく (Fig. 2-A), 特に < 1 群は適応免疫系の細胞の増殖ピークが ≥ 1 群に対し2週間遅れていることが明らかとなった (Fig. 2-B, C)。自然免疫系の細胞では、CD335 (NK細胞) は、 ≥ 1 群が先行して増加し、 < 1 群は2週後に同様に変化するという適応免疫系の細胞と類似した動きが観察され、CD14 (単球) は、 ≥ 1 群が常に低値を示した (Fig. 2-D)。

3.2 授乳子豚における初乳6時間摂取制限区と自由摂取区間のCSF抗体移行状況およびそれぞれの移行抗体半減期および存続の比較

初乳摂取制限したワクチン未接種区、ワクチン接種後21日目分娩区および161日目分娩区の3区は、初乳摂取制限をしなかった区より、生後7日以降のIgG濃度は減少し、6時間の初乳摂取制限が総Igの移行に影響することが確認された (Fig.

3-A, B)。初乳摂取制限を行った3区を比べると、母豚へのCSFV接種の有無は子豚へのIg移行に影響しなかった。IgM濃度についても同様の結果であったが、生後21日目において初乳摂取の有無による濃度の差は認められなかった。また、子豚の体重は4区間で差は認められなかった (Fig. 3-C)。

授乳中子豚の中和抗体の保有量は、初乳摂取状況によって変化した (Fig. 3-D)。CSFワクチンを分娩の161日前に接種した母豚から娩出された子豚に比べ、分娩の21日前に接種された母豚から娩出された子豚ではほとんど末梢血中にCSFワクチン抗体は検出されなかった (Fig. 3-D)。なお、この母豚は、分娩後32日目 (CSFV接種後53日目) では中和抗体価は32倍に上昇していることが確認された。このことから、免疫機能が正常な繁殖母豚であっても、分娩前少なくとも21日目よりも早くワクチン接種が必要であることが示された。また、CSFワクチンを分娩の161日前に接種した母豚から娩出された子豚のうち、初乳摂取制限を受けた子豚では、生後21日目においてELISA判定による擬陽性の割合が57.1% (4/7頭) であり、自由摂取区と比較して移行抗体が減少していることが明らかとなった (Table 2)。このことは、生後初乳を接種するまでの時間が移行抗体獲得に非常に重要であることを示している。近年、多産子の対策として分割授乳が行われているが、摂取量を基準にするのみでは十分ではなく、分娩後に初乳を摂取するまでの時間も重要視しなければならないことが示された。

4. 要 約

CSFは養豚産業界では最も重要な疾病であり、ワクチン使用による防疫が行われている環境下では新生子豚にワクチン抗体を含む十分な初乳を給与することが、CSF発生を予防するうえで重要で

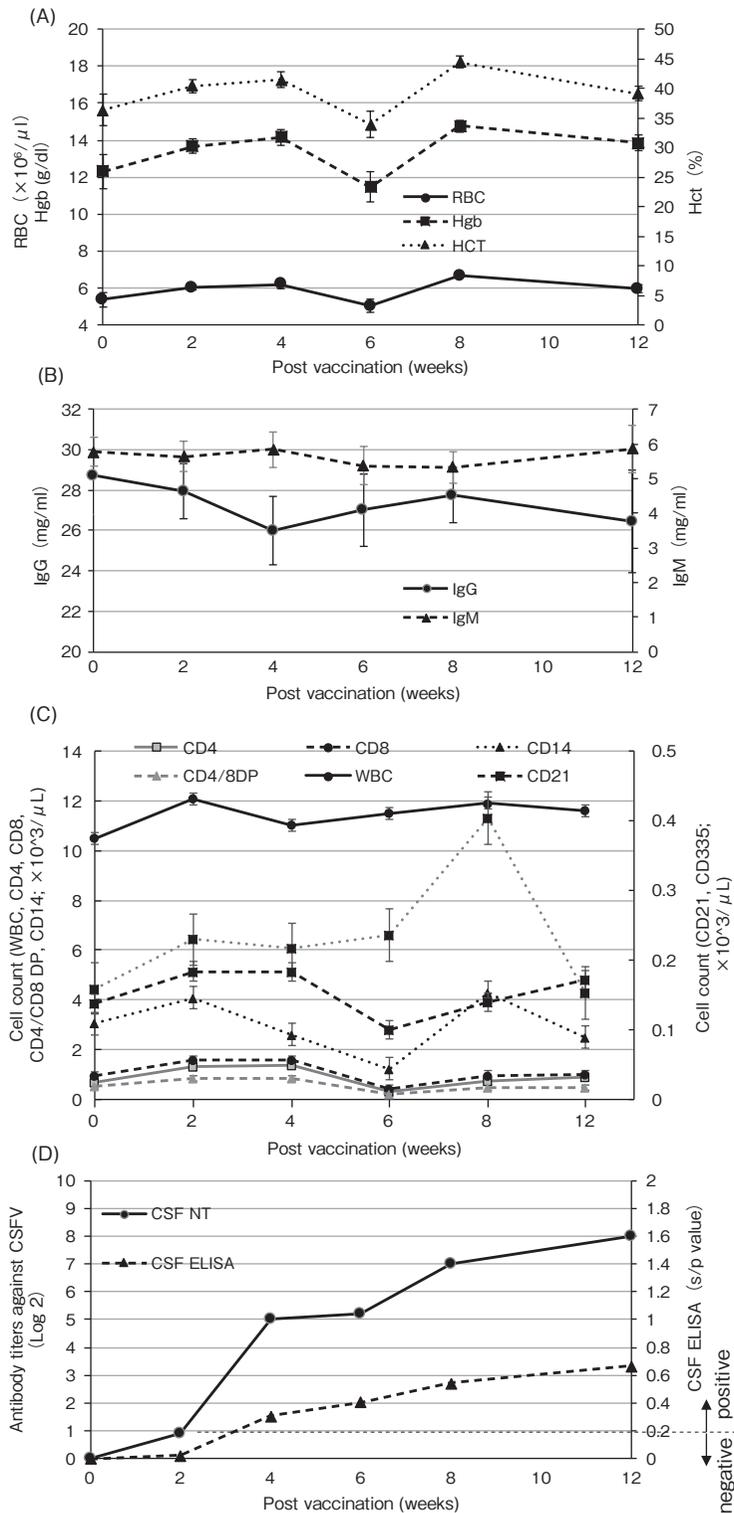


Fig. 1 Red blood cells, hemoglobin, and hematocrit (A), concentration of IgG and IgM (B), white blood cells and peripheral blood mononuclear cells subpopulations (C), and antibody titers against CSFV GPE- (D) of the sows post vaccination with CSF GPE- vaccine.

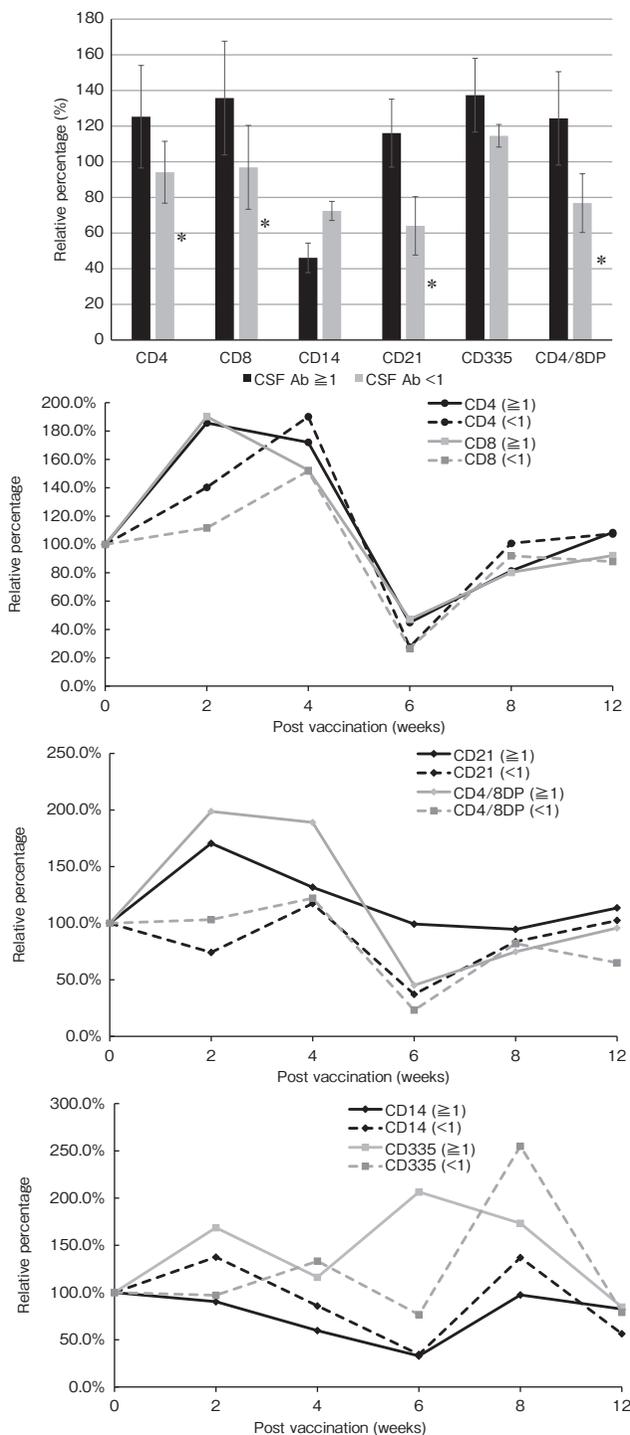


Fig. 2 Comparison of relative percentages of peripheral blood mononuclear cells subpopulations between the neutralization antibody against CSFV positive (≥ 1) and negative (< 1) sows. * indicates $p < 0.05$ compared with ≥ 1 sows, determined by the Student t -Test. (A). Mean relative changes in peripheral blood mononuclear cells subpopulations (CD4 and CD8 (B), CD21 and CD4/8DP (C), and CD14 and CD335 (D)) from CSFV positive (≥ 1) and negative (< 1) sows.

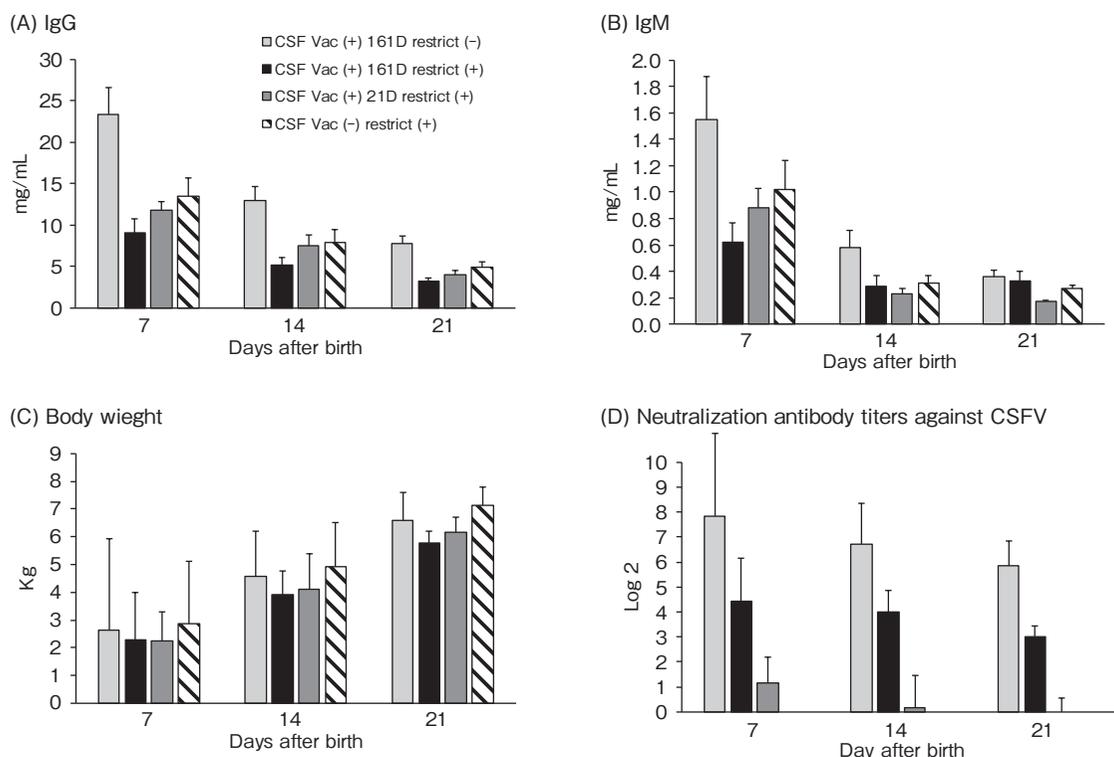


Fig. 3 IgG and IgM concentrations (A and B), body weight (C) and neutralization antibody titers (D) of pigs with and without CSF vaccination and with and without restricted consuming colostrum for 6 hours after birth.

Table 1 Antibody tests against classical swine fever virus of the sows

Breed (reproductive history) Antibody test	L (10)		L (7)		L (8)		L (10)		L (9)		L (6)		L (10)		L (11)		LW (3)		LW (3)	
	NT*	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA
2	<1**	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-	<1	-
4	<1	-	<1	-	1	-	<1	-	1	-	<1	-	<1	-	1	-	3	-	3	±
6	4	+	5	+	4	+	5	+	6	+	4	+	7	+	4	+	5	+	6	+
8	5	+	6	+	5	+	5	+	8	+	3	+	6	+	4	+	5	+	5	+
10	7	+	8	+	8	+	5	+	9	+	8	+	8	+	5	+	6	+	6	+
12	ND***	ND	9	+	9	+	7	+	9	+	8	+	9	+	ND	ND	7	+	6	+

*: neutralization test, **: antibody titer against CSFV (Log 2), ***: not done

Table 2 Antibody tests against classical swine fever virus of pigs with and without CFS vaccination and with and without restricted consuming colostrum for 6 hours after birth

Antibody test	CSF Vac (+)161 D restrict (-)		CSF Vac (+)162 D restrict (+)		CSF Vac (+)21 D restrict (+)	
	NT	ELISA	NT	ELISA	NT	ELISA
7	7/7*	7/0/7**	7/7	7/7	6/7	0/2/7
14	7/7	5/2/7	7/7	7/7	1/7	0/0/7
21	7/7	3/4/7	7/7	7/7	0/7	0/0/7

*: positive pigs / total pigs, **: positive pigs / false positive pigs / total pigs

ある。生産性向上のための改良による1頭当たりの産子数の増加のもとでの近年養豚システムの中においては、新生子豚はしばしば十分量の初乳を摂取できないことがある。本研究では、CSFワクチン接種後の繁殖母豚のワクチン抗体の推移を血液性状、免疫グロブリンおよび白血球サブクラスの推移とともに観察した。また、豚熱ワクチン接種または非接種繁殖母豚から産出された新生子豚が異なる条件下で初乳を摂取した時の豚熱ワクチン株に対する移行抗体のレベルおよび持続について調査を行った。

その結果、繁殖母豚のCSF中和抗体価は接種後2週目で上昇している個体の割合は50% (5/10頭)であったのに対し、ELISA法ではすべて陰性であった。4週目以降ではすべての個体で中和抗体の上昇およびELISA判定での陽性が確認された。適応免疫にかかわるCD4、CD8、CD21およびCD4/8DPは、ワクチン接種後2週目に中和抗体陽性を示した個体と比べ、抗体陰性の個体は

比率が低いことが分かった。これらのことから、繁殖母豚個々の免疫機能の違いがCSFワクチンによる免疫獲得に影響することが示唆された。生後7、14および21日目の授乳子豚のIgGおよびIgM濃度は、生後6時間の初乳摂取制限を行った子豚が自由摂取の子豚より有意に低かった。CSFVに対する抗体価は6時間摂取制限を行った子豚では自由摂取の子豚よりも3管以上低かった。さらに、分娩前21日目にワクチン接種を受けた繁殖母豚は十分な移行抗体を子豚に給与できなかった。これらのことは、適切な時間に十分にワクチンにより免疫された繁殖母豚から初乳を摂取することはCSF感染防止に重要であることが示された。

文 献

- 1) Coronado, L., Perera, C. L., Rios, L., Frías, M. T., Pérez, L. J. : *Vaccines*, **9**, 154, 2021.
- 2) Devillers, N., van Milgen, J., Prunier, A., Le Dividich, J. : *Animal Science*, **78**, 305~313, 2004.
- 3) Sakoda, Y., Hikawa, M., Tamura, T., Fukusho, A. : *J Virol methods*, **75**, 59~68, 1998.

尾根部の体表温度から黒毛和種育成子牛の発熱を検知する手法の開発

Detection of fever of Japanese Black calves by ventral tail base surface temperature

佐々木 羊 介・上 松 瑞 穂*

(宮崎大学農学部, *NOSAI宮崎)

Yosuke Sasaki and Mizuho Uematsu*

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, *NOSAI Miyazaki)

Bovine respiratory disease is the most common and costly disease of beef cattle. Our research goal is to identify sustainable approaches to reducing bovine respiratory disease impacts by assessing fever of Japanese Black calves by ventral tail base surface temperature (ST). The present study investigated appropriate methods for attachment of sensor for calves to measure their ST and evaluated diagnostic accuracy of assessment for fever by the ST. Data were collected from 53 Japanese Black calves aged 4 to 7 months. A wearable wireless ST sensor was attached to the surface of ventral tail base of each calf. Three types of tail-attached methods were performed to compare the effectiveness of the methods: Group 1 used velcro belt, Group 2 used vetrap and Group 3 used athletic supporter. The ventral tail base ST was measured every 10 min for one month. Among three types, Group 1 was the most suitable method to measure ST. However, some calves had hair loss in the position of sensor attached. Since circadian change of ST was found, ST was converted to residual ST that calculated by the ST minus mean ST for the same time on the previous 3 days. Of 53 calves, 8 calves showed clinical sign of respiratory disease during experimental period. Associations of actual rectal temperatures with ST and residual ST was evaluated, and the results showed high agreement if calves had clinical sign of respiratory disease. When defining fever as a calf had $\geq 39^{\circ}\text{C}$ ST or $\geq 1^{\circ}\text{C}$ estimated ST for four consecutive hours, sensitivity was 1.00 in both measurements, but precision in ST and estimated ST were 0.48 and 0.37, respectively. In conclusion, calves with bovine respiratory disease can be detected by ventral tail base ST, but diagnostic accuracy for assessing fever should be modified to improve precision.

1. 目 的

黒毛和種牛の飼養戸数は年々減少する一方で、1農場あたりの飼養頭数は増加傾向にあり、少頭数飼育から多頭経営へと推移してきている¹⁾。この多頭化と反比例して、肉用子牛の呼吸器病によ

る死産事故や病傷事故の多発傾向が続いており、多大な経済損失が発生している。農林水産省の家畜共済統計表によると、平成29年度における呼吸器病を原因とする死産事故および病傷事故はそれぞれ15.8%および35.5%と報告されている²⁾。子牛の肺炎は、主に哺乳期から育成期の子牛に発生

し、呼吸不全により死亡することがあるほか、慢性化し発育不良を呈する症例も多い。育成子牛の預託育成農場では、肺炎を主徴として治療された育成子牛は約50%存在し、治療された子牛はその後の増体成績が低下したと報告されている³⁾。子牛の呼吸器病の発生には、環境・病原体・個体の感染性と複雑な要因が絡むため、一般的には牛呼吸器病症候群と呼称される。牛呼吸器病症候群は、輸送や環境変化等に伴うストレス感作（離乳、群編成、寒暖の変化、換気不良等）や、ウイルス・細菌等の病原微生物による感染が複雑に絡み合って発生する。牛呼吸器病症候群は経済的損失が大きい疾病であり、発症した場合には早期の治療が重要である。そのため、牛呼吸器病症候群やその他発熱を伴う問題を早期に発見するためには、簡易かつ迅速なモニタリング技術を確立する必要がある。疾病の早期発見は、症状の重篤化を防ぐだけでなく、その治療に要する日数およびコストの低減にもつながる。

農林水産省では、近年スマート農業の推進を行っており、農林水産省が公表している「スマート農業技術カタログ」においても、疾病を早期に発見するセンシング・モニタリング、生体データ活用、飼養環境データ活用など、さまざまな技術が紹介されている⁴⁾。その中で、無線小型センサを活用した家畜のモニタリング技術は国内外で数多く開発されており、その用途として、発情を検知するための膣内留置型センサ⁵⁾、反芻状態を測定するための胃内留置型センサ⁶⁾などが報告されている。しかし、これらの無線小型センサは侵襲的センサであり、装着する個体に対して身体的負担を伴うケースが多い。一方、非侵襲的にバイオセンシング可能な無線小型センサとして、体表温度を測定するセンサがあげられる。この無線小型センサを用いた事例として、体表温度の変化により、繁殖雌牛の発情の検知⁷⁾、繁殖雌牛の分娩開

始時期の検知^{8,9)}、膣内温度の変化¹⁰⁾が測定可能であることが明らかにされている。しかし、これらの研究は成牛を対象としており、子牛を対象とした研究は実施されていない。

そこで本研究では、子牛の尾根部の体表温度を無線小型センサによってリアルタイムに測定することにより、黒毛和種育成子牛の発熱を早期に検知する手法を開発することを目的とする。そのために、子牛の体表温度を安定的に測定する方法の検討、および測定した体表温度から呼吸器疾患の異常がみられた個体を検出する方法の検討を行った。

2. 方法

2.1 試験実施農場および供試個体

本研究では、宮崎県内における黒毛和種牛農場で飼育されている育成子牛を対象として、育成子牛の尾根部に無線小型センサを装着した。宮崎県内における複数の黒毛和種牛農場を対象として、試験実施期間における育成子牛の飼養頭数およびその子牛群の日齢や健康状態を調査し、試験実施の協力農場を選定した。試験実施農場は預託育成農場1農場であり、本農場では県内の黒毛和種繁殖農場から3-4ヶ月齢の子牛を導入して10ヶ月齢まで育成していた。子牛はフリーストールで群飼育され、1ストールあたり5-7頭で飼育されていた。

試験は2020年9月から2021年2月までに実施した。上記期間において飼養されていた個体のうち、以下4つの除外条件に当てはまらない牛を選定した。除外条件：①過去1ヶ月の間に治療履歴がある、②同月齢の育成子牛と比較して体重が極端に低い、③同月齢の育成子牛と比較して体重が極端に高い、④将来の種雄牛候補の血統である牛。その結果、本試験には育成子牛53頭（去勢牛21頭、雌牛32頭）を試験に供した。

2.2 試験方法

試験には無線小型センサ（縦26mm×横21mm×高さ9.7mm）を用いた。本センサを子牛の尾根部の体表面に装着し、体表温度のデータを経時的に収集した。センサの装着方法として、以下3つの手法を用いた。方法1：成牛用に用いられている資材⁹⁾を子牛用に改良した資材（脱落防止用腰部補助布およびセンサ梱包用マジックベルト）、方法2：センサを装着後に包帯資材で梱包（Vetrap；3M, St. Paul, MN, USA）、方法3：センサを装着後に医療用伸縮性ゴムサポーターで梱包。また、センサと尾根部の体表面の間には、切傷防止用のためにウレタンゲルカバーを挿入した。

センサ装着時点における子牛の平均日齢は175±32日であった。センサは約1ヶ月間の装着を予定したが、センサのズレや明らかな脱落兆候、もしくはセンサ装着部位やその周囲に明らかな外貌異常がみられた際はセンサを取り外した。また、センサの取り外し後は、センサの接触部位である尾根部の体表面を観察し、切傷の有無を確認した。

データの収集方法として、センサに内蔵されている無線アンテナの受信機を試験農場に設置し、体表温度を装着後10分間隔で収集した。また、食欲不振や呼吸器疾患の異常がみられた際はセンサ装着牛を繋留し、直腸温度を計測した。

2.3 統計解析

統計解析として、分析には一般化線形モデルを用いた（SAS Ver. 9.4, SAS Inst. Inc., Cary, NC,

USA）。装着方法の検討として、3つの装着方法間で非脱落割合および装着日数を比較した。脱落は、体表温度が24時間以上30℃を下回った場合と定義した。次に、収集した体表温度の実測値の変換を行った。異常値の除去（ $\leq 30^{\circ}\text{C}$ 、 $\geq 45^{\circ}\text{C}$ 、連続記録が $\pm 1^{\circ}\text{C}$ 以上等）を行い、1時間幅で最大値を算出することにより、1時間ごとの温度に変換した。また、体表温度の実測値とともに、過去3日間の同時刻平均値も算出し、直腸温度の実測値との関連性を分析した。また、呼吸器疾患による異常が検知された際の感受度（Sensitivity）および陽性反応的中度（positive predictive value）を算出した。

3. 結果と考察

3.1 装着方法間における安定性の比較

本試験に用いた育成子牛53頭のうち、装着予定期間である1ヶ月間の装着ができた個体は17頭であった（32.1%）。3つの装着方法に関する非脱落割合および装着日数をTable 1に示した。3つの装着方法のうち、各方法の非脱落割合は方法1で80.0%（12/15）、方法2で17.2%（5/29）、方法3で0%（0/9）であり、方法1が方法2および方法3よりも有意に非脱落割合が高かった（ $p < 0.05$ ）。このうち、センサが尾根部から完全に脱落し、牛床に落ちた個数は、方法1で0個、方法2で7個、方法3で2個であった。また、装着日数の平均（±標準誤差）は方法1で25.6±2.4日、

Table 1 Comparisons of proportions of calves that not drop their sensor and the number of days from attachment to drop/removal of sensor between three types of tail-attached methods

Types ¹	Proportions of calves that not drop their sensor	Number of days from attachment to drop/removal of sensor
Group 1	80.0% (12/15)	25.6±2.4 days
Group 2	17.2% (5/29)	8.6±1.8 days
Group 3	0% (0/9)	6.1±3.1 days

¹Group 1 used velcro belt, Group 2 used vetrap and Group 3 used athletic supporter.

方法2で 8.6 ± 1.8 日、方法3で 6.1 ± 3.1 日であり、方法1が方法2および方法3よりも有意に装着日数が長かった ($p < 0.05$)。本試験では、センサ装着部位やその周囲に明らかな外貌異常がみられた個体は確認されなかった。一方、センサを取り外した際に、方法1では、一部の個体において、脱落防止用腰部補助布を装着していた箇所に被毛短縮が確認された。方法2および方法3では、センサ取り外し後における装着部分の被毛短縮はほとんど確認されなかった。また、方法1から3において、センサ接触部分における重篤な切傷は確認されなかった。

本試験の結果より、成牛用に用いられている資材を子牛用に改良した資材を用いた方法1が最も安定した装着方法であった。しかし、方法1の欠点として、装着に時間を要すること、取り外した後に装着部分の被毛短縮がみられたことがあげられる。一方、方法2および方法3は、装着に要する時間が方法1よりも短いこと、装着部分の被毛短縮がみられないことが利点としてあげられた。しかし、体表温度を安定的に測定するという観点より、方法2および方法3の活用は困難であることが示唆された。今後はセンサ装着の簡易化および外貌初見への影響を軽減するために、方法1で活用した資材を改良することが求められる。

3.2 実測値と変換値および同時刻平均と直腸温度の関連性

体表温度の実測値に関して、センサ装着後の経時的変化および日内変動の事例として、実験期間中に異常がみられなかった1頭の個体の推移をFig. 1に示した。体表温度の実測値は $37\text{--}39^\circ\text{C}$ の間で推移していた。体表温度の実測値には日内変動がみられ、6時前後に最も体表温度が低くなり、17時前後において最も高くなった。この時間帯は、それぞれ午前および午後の給餌の時間帯であった。これは、夜間において休息行動をしてい

た際に体温が低下し、朝の給餌に伴う活動量の増加によって体温が上がり始めたことが考えられる。

体表温度に日内変動がみられたことより、直腸温度の実測値との関連性を分析するために、体表温度の実測値の他に、体表温度の過去3日間の同時刻平均値も算出した。体表温度の実測値および過去3日間の同時刻平均値と直腸温度の関連性を分析した結果、直腸温度との関連性における決定係数は、体表温度の実測値で $R^2 = 0.16$ 、過去3日間の同時刻平均値で $R^2 = 0.19$ であった。両指標における決定係数は低かったものの、直腸温度の実測値はある1時点における数値であるため、経時的な変化との関連性は反映していない。また、直腸温度が 40°C を超えていた場合、体表温度の実測値および過去3日間の同時刻平均値ともに、その前後において数値の明らかな上昇がみられた。

3.3 異常が検知された際の感度および特異度

本試験に用いた育成子牛53頭のうち、装着期間中に呼吸器疾患による異常がみられた個体は8頭であった。異常の定義として、体表温度の実測値が4時間以上 39°C を超えた場合、または過去3日間の同時刻平均値が4時間以上 1°C を超えた場合としたところ、呼吸器疾患による異常がみられた8頭のすべてにおいて、両指標の異常の基準値を超えていた。そのため、上記指標の定義における感度は100%であった。しかし、上記指標の定義における陽性反応的中度は、体表温度の実測値で0.48、過去3日間の同時刻平均値で0.37であった。

本試験より、尾根部の体表温度を用いることにより、呼吸器疾患の異常を伴う個体をすべて検出することができた。感度は100%であったものの、陽性反応的中度が低かったことより、現状の定義では偽陽性のケースが多くなってしまふことが課題としてあげられた。この点を解決するためには、体表温度を変換する推定式を構築することや、異常の検知を機械学習アルゴリズムによって

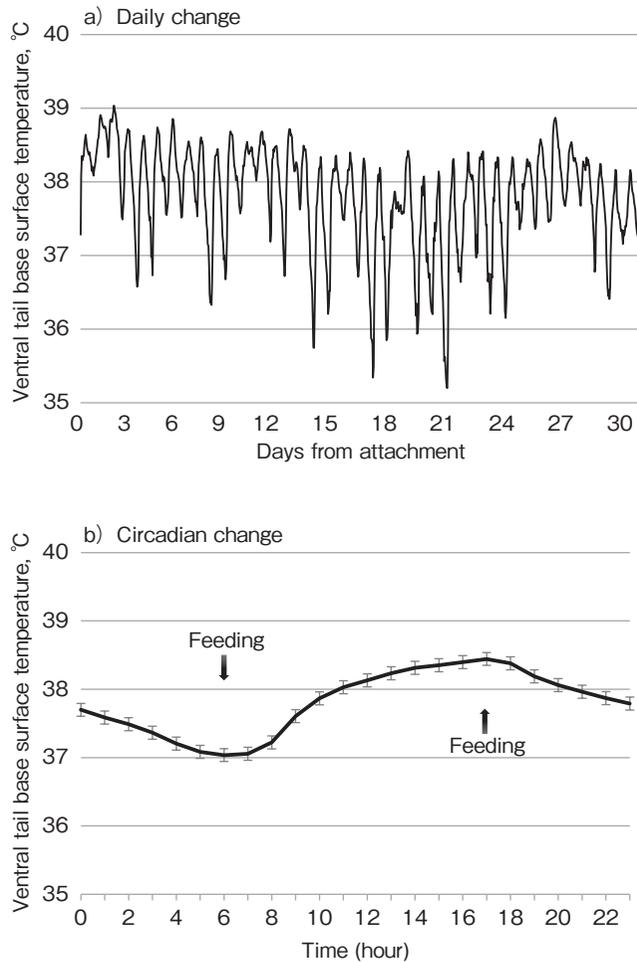


Fig. 1 Daily change (a) and circadian change (b) of ventral tail base surface temperature

自動的に検出する方法などが必要であり、これらの点が今後の課題として考えられる。

本研究の結果より、子牛の尾根部の体表温度を無線小型センサによって非侵襲的にリアルタイムに測定することにより、黒毛和種育成子牛の発熱を早期に検知することが明らかになった。この手法により、発熱を早期に検知することができれば、適切な時期に治療を行うことができ、死廃事故や病傷事故を減少させることが期待できる。さらに、無線小型センサの活用は従業員の労働負担の軽減につながり、畜産における働き方改革の一助となることが期待される。

しかしながら、本研究では安定的な装着方法および取り外し後の外貌所見への影響という課題もみられたことより、本手法を生産現場で普及していくためには、これらの点の改善が必要となる。また、異常の検知の敏感度は高かったものの、陽性反応的中度が低かったことより、体表温度を変換する推定式を構築することや、異常の検知を機械学習アルゴリズムによって自動的に検出する方法の開発が望まれる。

4. 要 約

牛呼吸器病症候群は、経済的損失が大きい疾病

であり、肉用牛において好発する疾病である。本研究では、黒毛和種育成子牛の尾根部の体表温度から発熱を早期に検知する手法を開発することを目的とし、子牛の体表温度を安定的に測定する方法の検討および測定した体表温度から呼吸器疾患の異常がみられた個体を検出する方法の検討を行った。データは4-7ヶ月齢の黒毛和種育成子牛53頭から収集した。無線小型センサを子牛の尾根部の体表面に装着し、体表温度のデータを経時的に収集した。センサの装着方法として、以下3つの方法を用いて有効性を検討した：方法1. 成牛用に用いられている資材を子牛用に改良した資材、方法2. センサを装着後に包帯資材で梱包、方法3. センサを装着後に医療用伸縮性ゴムサポーターで梱包。体表温度は約1ヶ月間、10分間隔で収集した。3つの方法のうち、方法1が最も体表温度を適切に測定できたが、一部の個体において、脱落防止用腰部補助布を装着していた箇所には被毛短縮が確認された。体表温度に日内変動がみられたことより、体表温度の実測値は過去3日間の同時刻平均値に変換した。53頭中、試験期間中に8頭が呼吸器疾患による異常がみられた。子牛に呼吸器疾患による異常がみられた際における体表温度の実測値および過去3日間の同時刻平均値の間には高い相同性がみられた。異常の定義として、体表温度の実測値が4時間以上39℃を超えた場合、または過去3日間の同時刻平均値が4時間以上1℃を超えた場合としたところ、上記指標の敏感度は100%であったが、陽性反応的中度は、体表温度の実測値で0.48、過去3日間の同時刻平均値で0.37であった。結論として、子牛の尾根部の体表温度により発熱を早期に検知できることが明らかになったが、その精度はまだ改善が必要である。

文 献

- 1) 農林水産省：畜産統計調査2020. <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000032029741&fileKind=0>
- 2) 農林水産省：家畜共済統計表2017. <https://www.e-stat.go.jp/stat-search/file-download?statInfId=000031766760&fileKind=0>
- 3) Sasaki, Y., Hashimoto, K., Iki, Y., Anan, T., Hayashi, J., Uematsu, M. : Associations between calf factors of Japanese Black calves arriving at a backgrounding operation and bovine respiratory disease, *Prev. Vet. Med.*, **182**, 105100, 2020.
- 4) 農林水産省：スマート農業技術カタログ (畜産), 2020. https://www.maff.go.jp/j/kanbo/smart/smart_agri_technology/smart_agri_catalog_hinmoku/pdf/catalog_chikusan_20210325.pdf
- 5) Andersson, L. M., Okada, H., Miura, R., Zhang, Y., Yoshioka, K., Aso, H., Itoh, T. : Wearable wireless estrus detection sensor for cows, *Comp. Elect. Agric.*, **127**, 101~108, 2016.
- 6) Hamilton, A. W., Davison, C., Tachtatzis, C., Andonovic, I., Michie, C., Ferguson, H. J., Somerville, L., Jonsson, N. N. : Identification of the rumination in cattle using support vector machines with motion-sensitive bolus sensors, *Sensors*, **19**, 1165, 2019.
- 7) Miura, R., Yoshioka, K., Miyamoto, T., Nogami, H., Okada, H., Itoh, T. : Estrous detection by monitoring ventral tail base surface temperature using a wearable wireless sensor in cattle, *Anim. Reprod. Sci.*, **180**, 50~57, 2017.
- 8) Koyama, K., Koyama, T., Sugimoto, M., Kusakari, N., Miura, R., Yoshioka, K., Hirako, M. : Prediction of calving time in Holstein dairy cows by monitoring the ventral tail base surface temperature, *Vet. J.*, **240**, 1~5, 2018.
- 9) Higaki, S., Koyama, K., Sasaki, Y., Abe, K., Honkawa, K., Horii, Y., Minamino, T., Mikurino, Y., Okada, H., Miwakeichi, F., Darhan, H., Yoshioka, K. : Technical note : Calving prediction in dairy cattle based on continuous measurements of ventral tail base skin temperature using supervised machine learning, *J. Dairy Sci.*, **103**, 8535~8540, 2020.
- 10) Miwa, M., Matsuyama, S., Nakamura, S., Noda, K., Sakatani, M. : Parturition change in ventral tail base surface temperature in beef cattle : comparison with vaginal temperature and behavior indices, and effect of ambient temperature, *J. Reprod. Dev.*, **65**, 515~525, 2019.

牛呼吸器病症候群（BRDC）発症機序の解明（Ⅱ）

Breakthrough of pathogenic mechanism of bovine respiratory disease complex (BRDC) (Ⅱ)

帆 保 誠 二 ・ 石 川 真 悟

(鹿児島大学共同獣医学部)

Seiji Hobo and Shingo Ishikawa

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University)

This study carried out the bronchoalveolar lavage (BAL) for the cattle clinically diagnosed as a disease state of bovine respiratory disease complex (BRDC) in the acute phase, and it was made that the antibiotics susceptibility tests of various bacteria was clarified, while bacteria and virus isolated from the bronchoalveolar lavage fluid (BALF) were investigated to be a purpose. BALF examinations were carried out as well as blood examinations in 38 cattle. As the results, *Pasteurella multocida* and *Mycoplasma bovis* were mainly isolated from BALF, and it was guessed that it was related to the deterioration of the disease state. In the viral genetic screening of BALF, bovine respiratory syncytial virus (BRSV) and bovine herpes virus-1 (BHV1) were mainly detected. From this fact, it was guessed that several kinds of viruses which invaded in the farm were concerned in the crisis of BRDC, and that it became a trigger of the secondary infection of bacteria. And, it was guessed that *P. multocida* and *M. bovis* were concerned in the deterioration of BRDC, and that it chronically shifts to the pneumonia. From them, it was guessed that in the initial disease state of BRDC, these bacteria were not always strongly concerned, and that virus such as BRSV and BHV3 infects respiratory tract mucosa, and that it attenuates the infection resistance, and that crisis and deterioration of BRDC are caused by the involvement of various factors such as general condition and feeding environment of afterwards cattle.

1. 目 的

牛肺炎の病態は、牛呼吸器病症候群（BRDC）として捉えられ、獣医療において最も重要な感染症のひとつとして注目されている^{1,2)}。BRDCはさまざまなストレスによる感染抵抗性（免疫力）の低下、ウイルス感染、細菌感染を主体とした複合的な要因が絡まりあって発症することが知られ

ている^{3~7)}。

これまでに我々は、伊藤記念財団の研究助成を受け、牛での気管支肺胞洗浄（BAL）を確立するとともに、慢性期のBRDCの病態にあると診断された牛に対してBALを実施し、真の肺炎原因菌を特定した^{6~8)}。その結果、*Pasteurella multocida* および *Mycoplasma bovis* が肺炎病態の悪化や慢性化に強く関与していることが明らかとなった。そ

ここで平成31年度に伊藤記念財団の研究助成を受け、8～10ヶ月齢の肥育素牛20頭（のべ30頭）を供試し、セリ市場導入後のBRDC発症機序を解明すべく調査を実施した⁸⁾。その結果、臨床的には40℃以上の発熱と呼吸器症状が認められる牛、および気管支肺胞洗浄液（BALF）から牛RSウイルス（BRSV）遺伝子が検出される牛では、高率にBRDCを発症することが明らかとなった。すなわち、セリ市場導入後のBRDC発症にはBRSVが強く関与し、その病態は40℃以上の発熱および呼吸器症状として出現することが明らかとなった。このことから、セリ市場導入後のBRDC発症を予防するためには、BRSV感染症をはじめとしたウイルス感染症をワクチン接種や飼養環境の改善により抑制することが重要であると考えられた。しかし、BRDCの重症化や慢性化に強く関連する*P. multocida*および*M. bovis*の分離結果とBRDC発症との間に関連性は見いだせなかった。このことを解決するためには、BRSV感染症をはじめとした呼吸器におけるウイルス感染症から、これら細菌を主体とした細菌感染症に移行する病態を捉えることが重要であると思われた。

本研究は、臨床的に急性期のBRDCの病態にある牛に対してBALを実施し、その洗浄液であるBALFから分離される細菌やウイルスについて調査することによりBRDC発症機序を解明するとともに、各種細菌の薬剤感受性を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と方法

2.1 供試材料

臨床的に急性期のBRDCの病態にあると診断された牛38頭（黒毛和種；オス14頭，メス15頭，去勢9頭；検査時日齢：162.8±81.1（平均値±標準偏差）日，中央値130日）を供試した。臨床的なBRDCの診断には、体温測定や聴診を主体とした

身体検査が実施された。

2.2 方法

供試牛に対して、臨床検査、血液検査およびBALF検査を実施した。

2.2.1 臨床検査、血液検査

臨床検査においては直腸温、心拍数および呼吸数を、血液検査においては末梢血中の白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン濃度（Hgb）、ヘマトクリット（Ht）および好中球／リンパ球比（N/L比）を常法により測定した。

2.2.2 呼吸器検体の採取および検査

まず、殺菌消毒液に浸漬した綿花を用いて鼻孔周辺を清拭した。続いて、ビデオエンドスコープを供試牛の鼻孔から挿入し、塩酸リドカインによる気道粘膜の表面麻酔を実施しながら気管および気管支内腔を観察した。その後、ビデオエンドスコープを滲出液が観察される気管支へと進め楔入した。楔入部位にビデオエンドスコープ経由で滅菌生理食塩水を注入し、即座に回収することによりBALFを得た。得られたBALF検体は微生物学的検査に供した。

2.2.3 ウイルス遺伝子検査

牛の肺炎発症に関連すると考えられているBRSV、牛ヘルペスウイルス1型（BHV-1）、牛パラインフルエンザウイルス3型（BPIV3）および牛コロナウイルス（BCoV）について、既報⁹⁾に準じてBALFを検体として、マルチプレックス定量RT-PCR法（Multiplex qRT-PCR）により各種ウイルスの遺伝子の有無を検査した。

2.2.4 細菌分離および同定検査

BALF検体は、5%ウマ血液含有コロンビア寒天培地（BA培地）およびマッコンキー寒天培地（MAC培地）に接種し、BA培地は微好気条件下および嫌気条件下で、MAC培地は好気条件下で培養した。培養後のBA培地から各種細菌を分離し、純培養後にグラム染色検査および細菌同定検

査 (飛行時間型質量分析: Time of Flight Mass Spectrometry: TOF-MS), PCR検査あるいは Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) を常法により実施し, 菌種を同定した。

2.2.5 マイコプラズマ分離検査

マイコプラズマ分離検査は, BALF検体をマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し, 微好気条件下で7日間培養 (直接培養) するとともに, マイコプラズマ増菌培地に接種し, 微好気条件下で2日間培養 (増菌培養) した。その後, 増菌培養液は, 1白金耳をマイコプラズマ分離用寒天培地に塗布し, 微好気条件下で7日間培養した。培養後のマイコプラズマ分離用寒天培地は, 実体顕微鏡で観察するとともに, 培地上の目玉状のコロニーについてTOF-MSあるいはLAMP検査により同定した。

2.2.6 薬剤感受性試験

同定された各種細菌のうち, *Pasteurella multocida*および*Mycoplasma bovis*について, 動物用抗菌剤研究会が定める微量液体希釈法に準じて薬剤感受性試験を実施した。

3. 結果と考察

3.1 臨床検査, 血液検査

供試牛の平均直腸温は39.6℃であり, 健常牛に比較し軽度の高体温であった (Table 1)。このうち, 40.0℃以上の発熱を38頭中8頭 (供試牛の21.1%) で認めた。また, 供試牛の平均心拍数は101.4回/分, 平均呼吸数は48.8回/分であり, 健常牛に比較し高値であった (Table 1)。

末梢血中白血球数は平均9,630/ μ l, 好中球/リンパ球比 (N/L比) は平均0.9であり, 他の血液検査項目も含めおおむね正常範囲内であった (Table 2)。

これらのことから, 臨床的に急性期のBRDCの病態にあると診断された牛であっても, 体温以外の臨床検査所見では, その病態把握が比較的困難であると思われた。

3.2 細菌分離検査およびウイルス遺伝子検査

ウイルス遺伝子検査では, BRSVが供試牛38頭中2頭 (5.3%) から, BHV1が同20頭 (52.6%) から, BCoVが同2頭 (5.3%) から検出されたが,

Table 1 Results of clinical examinations in the tested Japanese black.

	Clinical examinations		
	RT (°C)	HR (/min)	RR (/min)
Mean	39.6	101.4	48.8
Standard deviation	0.6	22.6	15.6
Median	39.6	102.0	52.0

RT: Rectal temperature, HR: Heart rates, RR: respiratory rates

Table 2 Results of blood examinations in the tested Japanese black.

	WBC (/ μ L)	RBC ($\times 10^4$ / μ L)	Hgb (g/dL)	Ht (%)	N/L ratio -
Mean	9,630	1,066.7	11.5	35.2	0.9
Standard deviation	3,240	159.0	0.9	3.8	0.5
Median	8,700	1,068.5	11.4	34.8	0.7

WBC: White blood cells, RBC: Red blood cells, Hgb: Hemoglobin, Ht: Hematocrit, N/L ratio: Neutrophil to lymphocyte ratio

BPIV3は検出されなかった (Table 3)。本研究の供試牛は、BRDC発症から比較的早期の病態であり、BALFから各種ウイルス遺伝子が検出された。特に、BHV1遺伝子が半数以上の供試牛で検出され、同一農場内では同様の検査結果であったことから、牛へのウイルス感染が農場全体で人や物、あるいは牛を介して拡散する傾向が明らかとなった。

BALFを用いた細菌分離検査では、*P. multocida*^aが供試牛38頭中13頭 (34.2%) から、*M. bovis* が同 14 頭 (36.8%) から、*Mycoplasma dispar*が同13頭 (34.2%) から分離されたが、*Mannheimia haemolytica* および *Histophilus somni*は分離されなかった (Table 4)。また、*P. multocida*と *M. bovis*の混合感染が供試牛38頭中4頭 (10.5%) であり、BALFからまったく細菌が分離されなかった供試牛が38頭中8頭 (21.1%) であった。本研究の供試牛は、BRDC発症から比較的早期の病態であったことから、細菌が分離されなかった一方で、混合感染している症例も存在した。このことから、BRDC発症牛の細

菌感染症の治療方針の決定は、BALFの検査を実施しなければ、感染の有無や感染している細菌の種類を予測することは不可能であることも明らかとなった。

分離された細菌の薬剤感受性試験では、*P. multocida*に対してはフルオロキノロン系抗菌薬およびフロルフェニコールが、*M. bovis*に対してはフルオロキノロン系抗菌薬が比較的感受性であった (Table 5)。*M. dispar*は、分離はされるものの純培養の段階でほとんどの株が死滅したため、薬剤感受性試験結果としてまとめることはできなかった。なお、少ないながらも薬剤感受性試験が実施できた *M. dispar* 2 株の薬剤感受性は、*M. bovis*と同様であった。全供試牛に対して、抗菌薬療法が臨床獣医師により実施されていたが、原因細菌に効果的な抗菌薬療法は多くの供試牛で実施されていなかった。このことから、BRDCの病態把握や原因細菌の特定にはBALFを用いた検査の必要性が改めて示された。

BALFから細菌が分離されなかった供試牛のほとんどでは、ウイルス遺伝子が検出されたことか

Table 3 Positive rates of viral genetic testing in the tested Japanese black.

	BRSV ^a	BHV1	BCoV	BPIV3
Positive	2	20	2	0
Negative	36	18	36	38
% of Positive	5.3	52.6	5.3	0.0

BRSV : bovine respiratory syncytial virus, BHV1 : bovine herpesvirus 1, BCoV : bovine coronavirus, BPIV3 : bovine parainfluenza virus type 3

^aThe viruses were identified by a multiplex quantitative reverse transcription-PCR system according to previous reports⁹⁾.

Table 4 Positive rates of bacterial isolations in the tested Japanese black.

	<i>P. multocida</i> ^a	<i>Mycoplasma bovis</i>	<i>Mycoplasma dispar</i>	<i>M. haemolytica</i>	<i>H. somni</i>	Other bacteria
Positive	13	14	13	0	0	4
Negative	25	24	25	38	38	34
% of Positive	34.2	36.8	34.2	0	0	10.5

P. multocida : *Pasteurella multocida*, *M. haemolytica* : *Mannheimia haemolytica*, *H. somni* : *Histophilus somni*

^aBacteria were identified by TOF-MS, PCR or LAMP method after cultivations.

Table 5 Results of antibiotics susceptibility testing of *Mycoplasma bovis* and *Pasteurella multocida* isolated from bronchoalveolar lavage fluid.

Antibiotics	Antimicrobial abbreviations	<i>Mycoplasma bovis</i>		<i>Pasteurella multocida</i>	
		MIC50	MIC90	MIC50	MIC90
Amoxicillin	AMPC	> 16*	> 16	> 8	> 8
Ampicillin	ABPC	> 16	> 16	> 8	> 8
Thiamphenicol	TP	8	> 16	2	8
Florfenicol	FF	4	8	1	2
Tylosin	TYL	> 16	> 16	> 8	> 8
Tilmicosin	TIL	> 16	> 16	> 8	> 8
Kanamycin	KM	8	> 16	4	> 8
Oxytetracycline	OTC	> 16	> 16	> 8	> 8
Chlortetracycline	CTC	4	> 16	1	2
Enrofloxacin	ERFX	0.5	4	0.5	2
Marbofloxacin	MBFX	1	8	1	4
Orbifloxacin	OBFX	2	16	2	4

* $\mu\text{g/mL}$

ら、BRDCの初期病態の形成にはウイルス感染が強く関与し、その後の細菌感染につながる事が確認された。このことは、平成31年に伊藤記念財団の助成で実施した未治療BRDC発症牛でのデータに一致するものであった⁸⁾。しかし、本試験の供試牛には抗菌薬の投与が実施されていたので、一部の細菌はその効果により死滅していた可能性も否定できない。このことから、BRDCとの診断がなされた牛に対しては、ウイルス感染症を念頭とした対症療法を実施するとともに、細菌感染を考慮した抗菌薬療法の実施が必要であると考えられた。

4. 要 約

本研究は、臨床的に急性期のBRDCの病態にあると診断された牛に対して気管支肺胞洗浄 (BAL) を実施し、その洗浄液である気管支肺胞洗浄液 (BALF) から分離される細菌やウイルスについて調査することによりBRDC発症機序を解明するとともに、各種細菌の薬剤感受性を明らかにすることを目的とした。供試牛38頭に対して、臨床検査、血液検査およびBALF検査を実施した。

その結果、BALFからは主に*P. multocida*および*M. bovis*が分離され、病態の悪化に関連しているものと推察された。またBALFのウイルス遺伝子検査では、主にBHV1やBRSVが検出された。このことから、BRDCの発症には農場内に侵入した数種類のウイルスが関与し、細菌の二次感染の引き金になっているものと推察された。またBRDCの悪化には、*P. multocida*および*M. bovis*が関与し、慢性的な肺炎へと移行することが推察された。以上より、BRDCの初期病態では必ずしもこれらの細菌が強く関与するのではなく、BRSVやBHV3のようなウイルスが気道粘膜に感染し、その感染抵抗性を減弱させたところに、牛の全身状態や飼養環境をはじめとしたさまざまな要因が関与して、BRDCの発症や重症化を引き起こすことが推察された。

文 献

- 1) Snowden, G. D., Van Vleck, L. D., Cundiff, L. V., Bennett, G. L. : *J. Anim. Sci.*, **84**, 1999~2008, 2006.
- 2) Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., Stoltman, G. : *J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 932~944, 2012.
- 3) Angen, O., Thomse, J., Larse, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P. M., Enemark, J. M. :

- Vet. Microbiol.*, **28**, 165~171, 2009.
- 4) Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J., Janzen, E. D. : *J. Vet. Intern. Med.*, **25**, 772~783, 2011.
 - 5) 藏前哲郎, 石川真悟, 林淳, 津曲圭太, 乙丸孝之介, 帆保誠二 : 日獣会誌, **73**, 31~36, 2020.
 - 6) 帆保誠二, 野口倫子, 安藤貴朗 : 公益財団法人伊藤記念財団 平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **32**, 215~221, 2014.
 - 7) 帆保誠二, 野口倫子 : 公益財団法人伊藤記念財団 平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **33**, 189~193, 2015.
 - 8) 帆保誠二, 石川真悟 : 公益財団法人伊藤記念財団 平成31年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **38**, 260~265, 2020.
 - 9) Goto, Y., Yaegashi, G., Fukunari, K., Suzuki, T. : *J. Appl. Microbiol.*, **129**, 832~847, 2020.

病原性因子を欠損した生後感染アカバネウイルスの 作出と生ワクチンへの応用

Establishment of Akabane virus mutant deleted pathogenetic determinant
and application for live vaccine

正 谷 達 膳・岡 島 美 鈴

(岐阜大学応用生物科学部)

Tatsunori Masatani and Misuzu Okajima

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University)

There are two strains of Akabane virus (AKAV) : a conventional strain that infects pregnant cows and is pathogenic to the fetus, and a “postnatal” strain that causes fatal encephalitis in adult cattle. The genotypes of the two types differ greatly, and it is considered difficult to prevent the live postnatal strain of AKAV with the current live vaccine for the prevention of the conventional type. In this study, we used the reverse genetics system of AKAV to generate a postnatal AKAV strain lacking the NSs gene, which is considered a virulence-related gene, and evaluated its potential as a live vaccine strain. Two different postnatal AKAV strains (KM and FI) were genetically engineered to generate NSs gene-deficient viruses. Both NSs gene-deficient strains showed the same proliferative ability in Vero cells as the parental strains, indicating that the loss of the NSs gene does not affect the production of infectious viruses. When mice were inoculated intracerebrally, both parental strains caused lethal infections in mice. On the other hand, mice infected with the NSs-deficient FI strain did not die, although the inoculum dose was equal to that of the parental strain. Notably, the pathogenicity of the NSs-deficient KM strain was high and showed the same lethality as that of the parental KM strain. These results strongly suggest that the NSs protein of the FI strain contributes significantly to the virulence, whereas the NSs protein of the KM strain may contribute almost nothing. In the future, it will be necessary to compare and analyze the functions of NSs proteins in various virus strains in detail, as well as to identify other virulence-related gene regions other than NSs for KM strains, to accumulate basic information for the development of live vaccines.

1. 目 的

アカバネ病は、ブニヤウイルス科に属するアカバネウイルス (AKAV) によって引き起こされる牛や山羊の疾病である。AKAVは小型吸血昆虫 (ヌカカなど) によって媒介され、夏季-秋季

に鹿児島・熊本・宮崎県など南日本を中心に毎年流行する。本ウイルスは、通常は成牛に対する病原性は低く、無症状のまま耐過する。しかし、本ウイルスが妊娠牛に感染し子宮内の胎子に到達・増殖した場合、流産・死産および子牛の奇形を生じる。このため、本疾病による牛繁殖農家へ対す

る経済的ダメージは大きい^{1,2)}。AKAVに対するワクチンは存在するものの、いまだに毎年散発的に発生しており、時として数十戸の農家に同時発生して多大な損害を与える。そのため、牛繁殖農家にとっては対策を要する疾病の一つである。特に、流行地である南日本は我が国の重要な肉牛生産基地でもあるため、予防の徹底が求められている。

AKAV株のなかには、胎子のみならず奇形を起こす「従来型」の株とは別に、成牛にも時に致死的な脳炎を引き起こす「生後感染型」と呼ばれるウイルス株が存在し、我が国でもたびたび流行している。生後感染型ウイルスによる被害は従来型ウイルスに比べて甚大であり、2006年に熊本県・鹿児島県で集団流行した際は数百頭を超える被害を出している³⁾。したがって、生後感染型AKAVの発生をコントロールすることは養牛業界において喫緊の課題となっている。

これまでの疫学調査により、生後感染型アカバネ病を起こすウイルスは遺伝子型Iに属し、従来型を引き起こす遺伝子型IIのウイルスとは遺伝的に大きく異なることが示されている⁴⁾。さらに、これら2つは抗原性状が大きく異なり、交差性も低い。そのため、従来型AKAVを予防するために使用されている現行型生ワクチンでは生後感染型アカバネ病を予防することは困難である。一方、最近になって生後感染型AKAV株をもとに不活化ワクチンが販売されることとなったが、免疫原性が弱く複数回の接種が必要であり、手間もコストもかかり煩雑である⁵⁾。

申請者はこれまでに、狂犬病ウイルスにおいて遺伝子組換え技術（リバーズジェネティクス）を駆使し、強毒株と弱毒株の遺伝子を入れ替えたキメラウイルスを作出しその性状（増殖性、病原性、免疫回避能力など）を比較することで、どの遺伝子のどのアミノ酸の変異がウイルスの病原性

を決めているかを明らかにしてきた⁶⁾。本技術をAKAVに適用することで、病原性因子を欠損させることで著しく病原性が欠落した、弱毒生ワクチン候補株を作出することも可能となる。さらに生ワクチンであれば、従来の不活化ワクチンに比べ単回接種でより高い抗体価を得られると期待できる。

以上より、生後感染型AKAVの病原性決定遺伝子を遺伝子組換え技術により欠損させることで、病原性復帰が起こらない安全なワクチン候補株の人工的創出が重要である。本研究ではこの技術を駆使し、病原性関連遺伝子を欠損した生後感染型AKAVを作出し、その生ワクチン株としての可能性を評価することを目的とする。

2. 方 法

2.1 細胞

ハムスター肺由来HmLu-1細胞およびBHKT7-9細胞（岐阜大学・伊藤直人博士より分与⁷⁾）はともに10% Tryptose phosphate broth, 5%牛胎子血清およびペニシリン・ストレプトマイシンを含むイーグル最小必須培地（EMEM, Wako）で培養した。アフリカミドリザル腎由来Vero細胞は、10%牛胎子血清およびペニシリン・ストレプトマイシンを含むEMEMで培養した。

2.2 ウイルス

2006年に熊本県で集団流行した際に分離されたKM-2/Br/06株（KM株²⁾、2008年に福井県で分離されたFI-1/Br/08株（FI株³⁾）は、それぞれ動物衛生研究所および福井県家畜保健衛生所より供与されたものを使用した。遺伝子操作による組換えウイルスおよびNSs遺伝子欠損ウイルスは後述の方法で回収した。これらウイルスはすべてHmLu-1細胞で増殖させたのちストックウイルスとして分注し、使用するまで-80℃にて保存した。

2.3 フルゲノムプラスミド

T7プロモーター配列およびデルタ肝炎ウイルス由来リボザイム配列を有するpT7riboSM2⁸⁾(Friedemann Weber教授:ギーセン大学より分与)に、各種ウイルス株の完全長のゲノム分節(L, MおよびSの3分節ずつ)をそれぞれ組み込んだものを使用した。S分節の中で、N遺伝子とオーバーラップして存在するNSs遺伝子の欠損は次のように行った。

2.4 感染性ウイルスの回収

BHK7-9細胞へ、各株のフルゲノムプラスミドを既報に準じてトランスフェクションした⁸⁾。なお、トランスフェクション試薬はTransIT-X2を使用した。トランスフェクション後4日目に明瞭な細胞変性効果を認めた細胞の培養上清を回収し、新たにコンフルエントになるよう培養したHmLu-1細胞に接種しストックを作成した。ストックウイルスの力価は、抗AKAV Nタンパク質モノクローナル抗体(東京大・堀本泰介教授より分与)を使用して間接蛍光抗体法に基づくフォーカスアッセイにより測定し、フォーカス形成単位(FFU)として算出した。

2.5 培養細胞における各種ウイルスの増殖曲線

Vero細胞を6穴プレートに培養した。コンフルエントとなった後、各細胞に対し、「細胞数100個あたり1FFU」となるようEMEMで希釈した各ウイルスを接種した。1時間の吸着後、ハンクス氏液で洗浄し、通常培養に用いている培地を入れた。感染後12, 24, 48時間後の上清を回収し、-80℃にて保存した。これら上清中のウイルス力価を、TCID50法によって測定した。

2.6 各種ウイルスのマウスへの接種

EMEMで希釈した各ウイルスを、麻酔下の4週齢雌ICRマウス(日本クレア)に脳内接種した。接種後14日間観察し、症状および生残率を記

録した。本実験は鹿児島大学動物実験委員会によって承認された上で実施した(承認番号:VM19032)。

3. 結果と考察

アカバネウイルスが属するブニヤウイルス目ウイルスの多くにおいて、非構造タンパク質の1つであるNSsタンパク質が宿主自然免疫を抑制する重要な病原性因子であることが示されている⁹⁾。そこで、NSs遺伝子を欠損した生後感染AKAVは、病原性が著しく減弱した生ワクチン候補株になると考え、その作出を試みた。NSs遺伝子のオープンリーディングフレームはN遺伝子の内部に存在し、N遺伝子とは異なるフレームで翻訳される。そこで、KM株およびFI株のS分節フルゲノムプラスミドに対し、N遺伝子のコードするアミノ酸を変化させないように、NSs遺伝子の開始コドン除去し、さらに複数の終始コドンを導入した(Fig. 1)。得られたプラスミドを用いてウイルス回収を試みたところ、いずれの株も回収することができた。

得られたNSs遺伝子欠損ウイルスの増殖能を調べるため、Vero細胞におけるKMΔNSs株およびFIΔNSs株と、それぞれの組換え親株ウイルス(rKM株およびrFI株)のVero細胞における増殖曲線を作成した。その結果、いずれの株も、その増殖能は親株と欠損株との間で大きな差はみられなかった(Fig. 2)。すなわち、NSs遺伝子欠損によって感染性ウイルス粒子の形成が抑制されることが示された。このことより、安定したワクチン生産に不可欠なウイルス株の性状の1つである「高効率のウイルス増殖能」に、同遺伝子操作による影響はほぼないと考えられた。

次に、得られたNSs遺伝子欠損ウイルスのマウスに対する病原性を調べるため、4週齢マウスに各株を脳内接種し、その致死性を検討した(Fig.

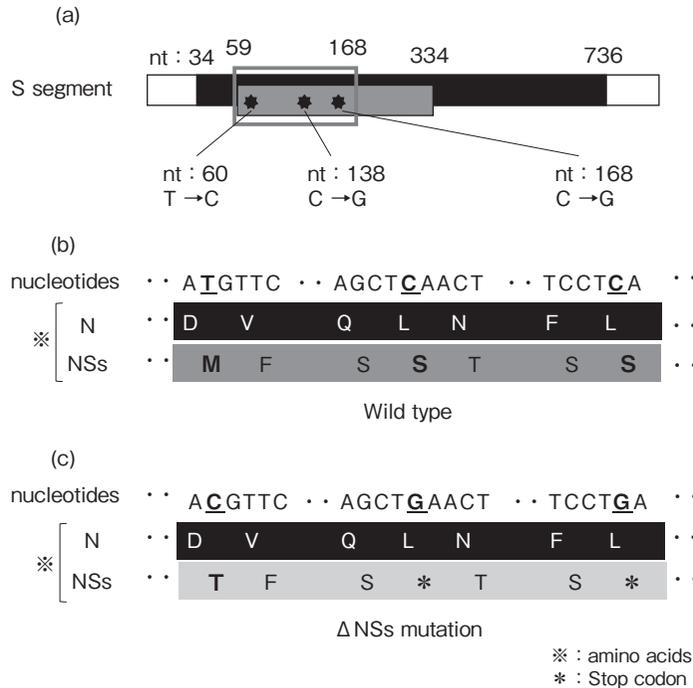


Fig. 1 Mutagenesis for deletion of NSs protein. (a) Three single nucleotide mutations were introduced to delete the NSs protein : T to C in nt : 60, C to G in nt : 138, and C to G in nt : 168. This mutation resulted in the loss of the start codon of the NSs protein and the change of the 27th and 37th amino acid positions to the termination codon. The area enclosed by the square box is described in detail in (b) and (c). (b, c) The nucleotide sequence and amino acid sequence before (b) and after (c) the mutations are shown. Under bar and Bold letters indicate targeted nucleotides and amino acids respectively.

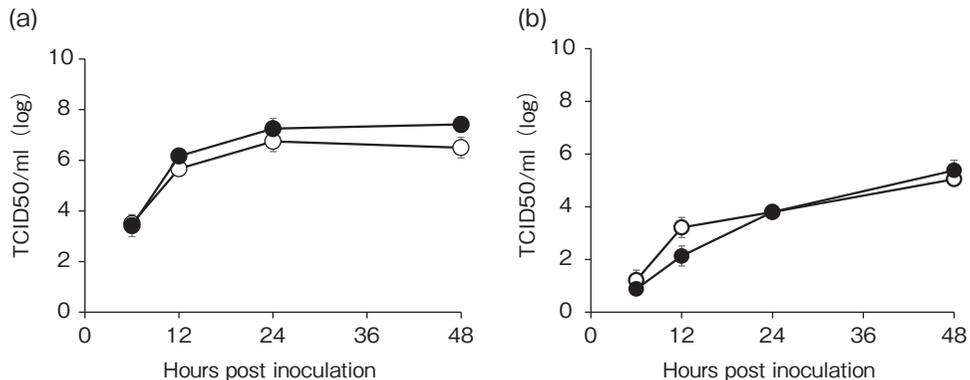


Fig.2 Growth curves of (a) rKM, KM2 ΔNSs, (b) rFI and FIΔNSs strains in Vero cells. Cells were inoculated with each strain at a multiplicity of infection 1. White, parental strains ; Black, NSs-deficient strains.

3)。親株であるrKM株およびrFI株のいずれの株も、マウスに対して致死感染を引き起こした。一方、FIΔNSs株感染マウスは親株と等量の

接種量であるにもかかわらず、死亡個体はみられなかったのに対し、KMΔNSs株の病原性は高く、親株であるrKM株と同等の致死率を示した。以

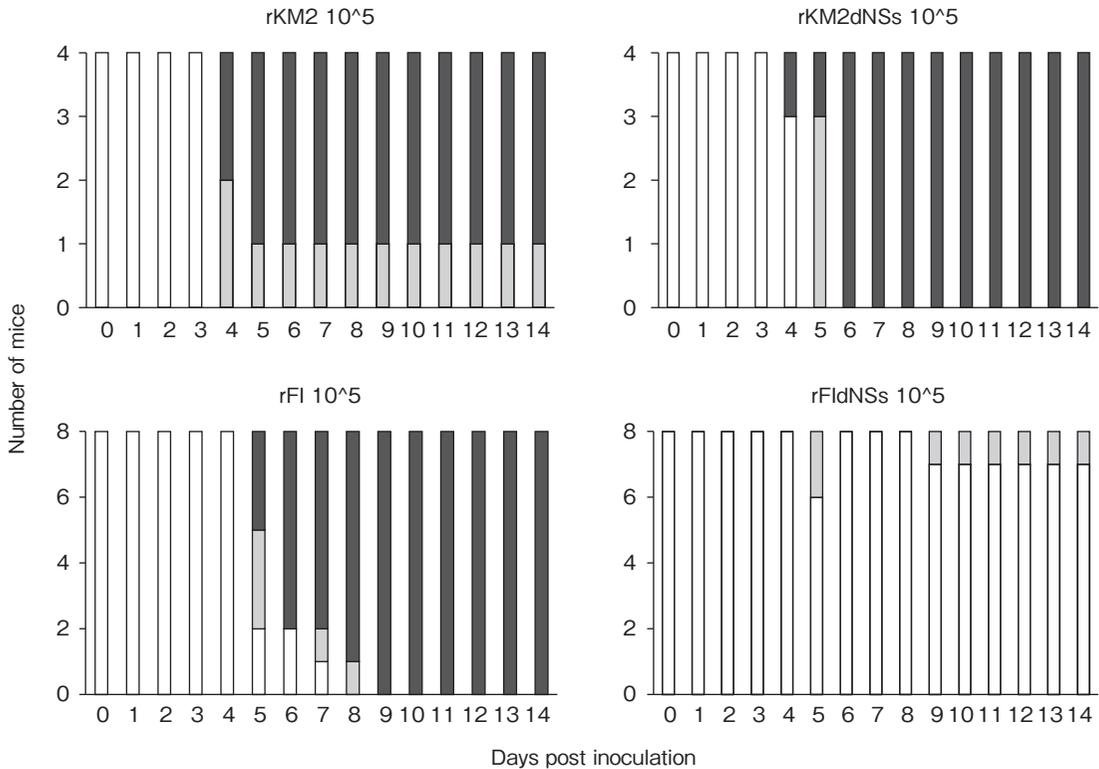


Fig.3 Morbidity and mortality changes in adult mice inoculated intracerebrally with rKM, KM2ΔNSs, rFI and FIΔNSs strains. Four or eight mice per group were inoculated with 10^5 FFU of each strain. The mice were observed for neurological symptoms for 14 days and classified into three grades: normal (white), neurological symptoms (such as motor incoordination, paralysis, seizure and coma) (gray) and dead (black).

上より、異なる2株の生後感染AKAV株のうち、FI株のNSsタンパク質は病原性に大きく寄与するのに対し、KM株のNSsタンパク質はほぼ寄与しない可能性が強く示された。

本研究より、NSsタンパク質はウイルスの株によって病原性に対する役割が大きく異なることが示された。KM株は生後感染を起こすとされる遺伝子型Iに属し、100頭以上の牛に生後感染が拡大した2006年の事例において発症牛から分離された株である⁴⁾。一方、FI株は、生後感染における発症牛から分離されたものの、これまで生後感染を起こさないとされてきた遺伝子型IIに属する、数少ない生後感染AKAV株である。同じ遺伝子型IIであり哺乳マウスに致死性を示すものの成熟マウスへの病原性を持たない、現行ワクチン株の

元となったOBE-1株のNSs欠損変異体が、哺乳マウスへの病原性を失ったことから¹⁰⁾、同遺伝子型ウイルスの病原性にはNSsタンパク質が寄与している可能性がある。一方、KM株がNSs遺伝子欠損によっても病原性を維持したことから、同株の病原性には別の遺伝子領域が重要な役割を担っていると考えられた。

KM株とFI株のNSsタンパク質はともに91アミノ酸で構成されており、その間には4アミノ酸の相違がある。今後、両株NSsタンパク質の病原性への寄与の差、とくに自然免疫抑制機能にこれらアミノ酸のいずれの違いが関与するかどうか検討していく必要がある。

今後、さまざまなウイルス株におけるNSsタンパク質の機能を詳細に比較・解析するとともに、

KM株に関してはNSs以外の別の病原性関連遺伝子領域を特定し、生ワクチン開発へ向けた基礎的情報を蓄積していく必要がある。

4. 要 約

アカバネウイルス (AKAV) には、妊娠牛に感染し胎子に病原性を発揮する従来タイプの株と、成牛に対しても致死的な非化膿性脳炎を引き起こす「生後感染型」と呼ばれるタイプの株が存在する。両タイプは遺伝子型が大きく異なり、従来型AKAV予防のための現行型生ワクチンでは生後感染型アカバネ病を予防することは困難とされる。本研究ではAKAV遺伝子操作技術を駆使し、病原性関連遺伝子とされるNSs遺伝子を欠損した生後感染型AKAVを作出し、その生ワクチン株としての可能性を評価することを目的とした。異なる2株の生後感染型AKAV株 (KM株およびFI株) について、遺伝子操作によりNSs遺伝子欠損ウイルスの作出に成功した。これらのVero細胞における増殖能はいずれも親株と同等であったことから、NSs遺伝子の欠損が感染性ウイルス粒子形成に影響を与えないことが示された。マウスへ脳内接種したところ、両株の親株はいずれも、マウスに対して致死感染を引き起こした。一方、FI株のNSs遺伝子欠損ウイルス感染マウスは親株と等量の接種量であるにもかかわらず、死亡個体はみられなかったのに対し、KM株のNSs遺伝子欠損ウイルスの病原性は高く、親株であるKM株と同等の致死率を示した。以上より、異なる2株の生後感染AKAV株のうち、FI株のNSsタンパク質は病原性に大きく寄与するのにに対し、KM株のNSsタンパク質はほぼ寄与しない可能性が強く示された。今後、さまざまなウイルス株におけるNSsタンパク質の機能を詳細に比較・

解析するとともに、KM株に関してはNSs以外の別の病原性関連遺伝子領域を特定し、生ワクチン開発へ向けた基礎的情報を蓄積していく必要がある。

文 献

- 1) Miyazato, S., Miura, Y., Hase, M., Kubo, M., Goto, Y., Kono, Y. : Encephalitis of cattle caused by Iriki isolate, a new strain belonging to Akabane virus, *Nippon Juigaku Zasshi*, **51**, 128~136, 1989.
- 2) Kato, T., Yanase, T., Suzuki, M., Katagiri, Y., Ikemiyagi, K., Takayoshi, K., Shirafuji, H., Ohashi, S., Yoshida, K., Yamakawa, M., Tsuda, T. : Monitoring for bovine arboviruses in the most southwestern islands in Japan between 1994 and 2014, *BMC Vet Res*, **12**, 125, 2016.
- 3) 山川睦, 筒井俊之 : アカバネ病の最近の流行動向と対策, *家畜診療*, **59**, 395~401, 2012.
- 4) Kono, R., Hirata, M., Kaji, M., Goto, Y., Ikeda, S., Yanase, T., Kato, T., Tanaka, S., Tsutsui, T., Imada, T., Yamakawa, M. : Bovine epizootic encephalomyelitis caused by Akabane virus in southern Japan, *BMC Vet Res*, **4**, 20, 2008.
- 5) 水戸康明, 富永由香, 高岡亜沙子 : Genogroup I に属するワクチン株を使用するアカバネ病不活化ワクチンの効果的なワクチネーションプログラムの検討, *日本獣医師会雑誌*, **70**, 584~588, 2017.
- 6) Masatani, T., Ito, N., Shimizu, K., Ito, Y., Nakagawa, K., Sawaki, Y., Koyama, H., Sugiyama, M. : Rabies virus nucleoprotein functions to evade activation of the RIG- I -mediated antiviral response, *J Virol*, **84**, 4002~4012, 2010.
- 7) Ito, N., Takayama-Ito, M., Yamada, K., Hosokawa, J., Sugiyama, M., Minamoto, N. : Improved recovery of rabies virus from cloned cDNA using a vaccinia virus-free reverse genetics system, *Microbiol Immunol*, **47**, 613~617, 2003.
- 8) 三竹博道, 生水誠一, 武田佳絵, 加藤信正, 田中省吾, 梁瀬徹, 加藤友子, 山川睦 : アカバネウイルス genogroup II による育成牛の非化膿性脳脊髄炎, *日本獣医師会雑誌*, **64**, 140~144, 2011.
- 9) Ly, H. J., Ikegami, T. : Rift Valley fever virus NSs protein functions and the similarity to other bunyavirus NSs proteins, *Virology*, **13**, 118, 2016.
- 10) Ogawa, Y., Sugiura, K., Kato, K., Tohya, Y., Akashi, H. : Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I, *J. Gen. Virol.*, **88**, 3385~3390, 2007.

熊本系褐毛和種における地方病性牛白血病抑制 メカニズムの解明

Analyses of the susceptibility for Enzootic Bovine Leukosis in Japanese
Brown cattle of Kumamoto strain

稲 永 敏 明

(東海大学農学部応用動物科学科)

Toshiaki Inenaga

(Department of Animal Sciences, School of Agriculture, Tokai University)

Enzootic bovine leukemia (EBL), induced by bovine leukemia virus (BLV)-infection, is reported many times in these years and becomes one of large problem threatening livestock hygiene in this country. Because most infected cattle show no symptoms for many years, it is suggested that the susceptibility for lymphoma is affected by the heritable factor of each animal. In order to elucidate these genetic factors, I conducted this study using Japanese Brown cattle of Kumamoto strain, which could be suggested to have resistance for the elevation of the blood proviral loads (PVL) after BLV-infection. I selected 21 candidate genes by RNA sequencing analysis and from the information about related viruses. Using real-time quantitative PCR analyses, I compared the expressions of these genes among non-infected, infected (low PVL), and infected (high PVL) cattle of Japanese Brown or Japanese Black, rearing in some commercial farms in Kumamoto prefecture. It was detected that the expression of 5 genes significantly varied dependently on PVL level in Japanese Brown. Among these 5 genes, 3 genes' expression levels were significantly affected by the difference of breed (Japanese Brown or Japanese Black). More studies are needed to confirm whether these differences fundamentally bring the variation of PVL after BLV-infection.

1. 目 的

地方病性牛白血病 (EBL) は牛白血病ウイルス (BLV) 感染が原因で起こる牛の伝染病である。EBLを含む牛白血病の発生数は、平成10年は日本全国で99頭であったが、令和元年は4,110頭と、増加の一途を示している。EBLの原因病原体であるBLVはレトロウイルスであり、血液中のBリンパ球に感染し、宿主細胞のゲノムに「プロウイルス」として組み込まれ、やがてBリンパ球の腫

瘍化を起こし、感染牛の30%程度に持続性リンパ球増多症をもたらす。感染牛にはこの段階でもとくに症状はないものの、一部は全身に多発性のリンパ腫を発症し、起立不能や食欲不振といった牛白血病の症状を発症する¹⁾。現在のところ、本疾病に対するワクチンや治療法はなく、農場で発症すると自衛殺処分に、と畜検査で判明した場合は全部廃棄となる。近年、感染率 (抗体陽性率) が地域や農場によってはかなり高いため、生産現場で非常に問題となっており、対策方法が強く求め

られている家畜伝染病の一つとなっている。

本研究では、多くが熊本県内で飼養されている和牛の一品種である熊本系褐毛和種（褐毛和種）において、牛白血病の発生が非常に稀であることに注目した。2018年度より、熊本県と共同で疫学調査を行ったところ、褐毛和種の抗体陽性牛において、血中プロウイルス量が、黒毛和種やホルスタイン種と比べて顕著に低く保たれていることを明らかにした。

たとえ感染していても、血中プロウイルス量が低い牛は、農場内で他の牛への感染源にならないことが分かってきたが²⁾、血中プロウイルス量の制御機構の全容ははまだ明らかにされていない。したがって、褐毛和種抗体陽性牛で血中プロウイルス量が低く抑えられるメカニズムが解明されれば、予防や治療の手掛かりとなりえる。さらに、このような牛の遺伝的なマーカーが分かれば、それを指標に選抜淘汰することが可能である。

これらのことから、本研究は、褐毛和種のBLV感染牛における血中プロウイルス量が低いレベルで保たれるメカニズムを解明することで、EBLに対する新たな対策を提案することを目的とする。

2. 材料と方法

2.1 供試牛

2019年度から2020年度にかけて、熊本県内の一般農場計24農場で飼育されている褐毛和種および黒毛和種繁殖雌牛計798頭の採材および調査を行い、本研究にはそのデータおよびサンプルの一部を用いた。なお、これらの一般農場には、熊本県の各家畜保健衛生所を通じて研究への協力を依頼し、了承が得られた農家を選定した。また本研究は、東海大学動物実験委員会の承認を受けて実施された（承認番号202040）。

2.2 採材およびウイルス検査

供試牛の尾静脈から採取した血液より、BLV

抗体検査、DNA抽出～ウイルス検査を行った。BLV抗体検査は、熊本県の各家畜保健衛生所にて実施され（BLVエライザキット、ニッポンジーン）、抗体陽性牛については、血液より抽出（QIAmp DNA Blood Mini Kit、キアゲン）したDNAを用いて、熊本県中央家畜保健衛生所検査課にて、CoCoMo-BLV検出キット（理研ジェネシス）により血中のプロウイルス量（PVL）の測定が行われた。抗体検査結果および測定したプロウイルス量をもとに、供試牛を陰性牛、低PVL牛、高PVL牛のグループに分類した。なお、分類の基準は、低PVL牛を検出限界以下～数百copies/10⁵cells程度、高PVL牛を20,000copies/10⁵cells～35,000copies/10⁵cells程度とした。

2.3 RNA抽出～RNAシーケンス解析

血液からのRNAの抽出は、Paxgene RNA採血管（日本ベクトン・ディッキソン）に分注した血液を用い、「PAXgene Blood RNA Kit」（キアゲン）によりRNAを抽出し、供試牛の中から、褐毛和種のBLV抗体陰性牛4頭、抗体陽性牛8頭（低PVL牛4頭、高PVL牛4頭）の血液から抽出したRNAを用い、外注にてRNAシーケンス（RNA-seq）解析（富士フィルム和光純薬）を行った。この結果、とくに高PVL牛と低PVL牛の発現レベルに差があった遺伝子から解析対象とする候補遺伝子を選抜した。

2.4 リアルタイム定量PCR

候補遺伝子の発現レベルの差を検出するため、抽出したRNAより合成（ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover、東洋紡）したcDNAを鋳型に、リアルタイムPCR装置「Step One Plus リアルタイムPCRシステム」（ライフテクノロジーズジャパン）を用いて実施した。試薬はTHUNDERBIRD NextSYBR qPCR Mix（東洋紡）を使用した。

リアルタイムPCRは、供試牛の中から5農場由

来の褐毛和種18頭および黒毛和種6頭 (Table 1) を用い、実験1と実験2に分けて行った。実験1は褐毛和種の陰性牛6頭、低PVL牛7頭、高PVL牛5頭の3区間で比較し、実験2は月齢やPVLの量が同等な、褐毛和種の低PVL牛3頭、高PVL牛2頭を、また黒毛和種の低PVL牛3頭、高PVL牛3頭を用い、二元配置の計4区間で比較した。

いずれも得られた結果のうち、GAPDHのCt値との差である Δ Ct値を用いて、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDHの発現量を1としたときの各遺伝子の相対発現量を算出した。

2.5 統計処理

統計処理プログラムRを用い、実験1については、褐毛和種のみを要因とした陰性牛、低PVL牛と高PVL牛の3区の比較のため、一元配置の分散分析を行い、有意差があった場合、多重比較検定を行った。実験2については、PVLレベルに加え品種の違いを要因とした、二元配置の分散分析を行い、有意差があった場合、多重比較検定を行った。有意水準は5%未満とし、p値が $p < 0.1$ であれば傾向あり、 $p < 0.05$ であれば有意差あり、として表した。

3. 結果と考察

RNA-seq解析結果については、とくに低PVL牛と高PVL牛の間で発現レベルに差の見られた遺伝子やGene Ontology (GO) 解析の結果、有意に発現変動遺伝子が多く含まれていたGOより候補遺伝子を選抜した。また、近縁なウイルスであるヒトT細胞指向性リンパ腫ウイルス1型 (HTLV-1) の知見からも候補遺伝子を選抜し³⁾、2020年度は、遺伝子A~Uまでの、計21個の候補遺伝子についてリアルタイム定量PCRによる発現レベルの解析を実施した。なお、遺伝子名については都合により伏せており、実験1と実験2で同じ遺伝子名のもは同一遺伝子である。

3.1 実験1 褐毛和種間での比較

21個の候補遺伝子のうち、一元配置分散分析の結果、 $p < 0.1$ まで含めると遺伝子A~Eまでの5遺伝子に、発現レベルの差が認められた。遺伝子A：陰性牛vs低PVL牛vs高PVL牛 (平均相対発現量 \pm 標準偏差, 以下同様) = 0.0169 ± 0.0079 vs 0.0189 ± 0.0086 vs 0.0071 ± 0.0017 ($p < 0.05$), 遺伝子B： 0.0002 ± 0.0000 vs 0.0001 ± 0.0000 vs 0.0002 ± 0.0001 ($p < 0.05$), 遺伝子C： 0.1912 ± 0.0316 vs 0.1323 ± 0.0488 vs 0.0481 ± 0.0236

Table 1 The information of cattle used in the real-time quantitative PCR tests.

A				
Test 1		sample number	PVL (copies/ 10^5 cells)	age (month-old)
not-infected		6	not tested	18.4~108.3
infected	low PVL	7	not detected~286	29.0~67.8
	high PVL	5	27122~34510	18.1~177.9
B				
Test 2		sample number	PVL (copies/ 10^5 cells)	age (month-old)
Japanese Brown	low PVL	3	6~19	60.9~67.0
	high PVL	2	27122~27568	65.0~68.5
Japanese Black	low PVL	3	10~12	50.7~59.5
	high PVL	3	29881~34680	50.7~71.2

PVL : proviral loads

age : months from the birth day until the sampling day

($p < 0.001$), 遺伝子D : 16.8932 ± 3.4748 vs 15.7634 ± 3.9229 vs 10.5748 ± 1.2537 ($p < 0.05$), 遺伝子E : 0.1444 ± 0.1016 vs 0.1708 ± 0.1025 vs 0.0447 ± 0.0187 ($p < 0.1$). 多重比較検定の結果もあわせると, 遺伝子A, D, Eは高PVL牛が他の2区に比較して発現量が低く, 遺伝子CはPVLが上がるにつれて発現量が低下していた。また, 遺伝子Bは低PVL牛に比べて高PVL牛で発現量が上昇していた。これらの遺伝子については, BLVの感染が起こっても発現レベルが維持されることでPVLの上昇を抑制している可能性が考えられる。その一方で, これらの現象が, PVLの差による結果である可能性も考えられ, またサンプル数も十分とは言えない。このため, サンプル数を追加するとともに, これらの遺伝子のタンパクレベルや, さらに, これらの遺伝子の上流にあたる遺伝子の発現レベルを比較する必要がある。また, あわせて, PVLの差による影響を排除するために, PVLが同程度の褐毛和種および黒毛和種を比較することを目的として, 実験2を実施した。

3.2 実験2 褐毛和種および黒毛和種間の比較

供試牛の中から, 褐毛和種および黒毛和種の, それぞれPVLを同程度とした低PVL牛と高PVL牛を選抜し, 実験1と同様に, 21個の候補遺伝子の発現レベルの比較を行った。二元配置であるが, 実験2の目的から, 品種の差による影響が有意であった3遺伝子(遺伝子A, BおよびC)の発現レベルのデータをFig. 1に示した。遺伝子AおよびBは, 黒毛和種に比べて褐毛和種で有意に低く, 遺伝子Cは逆に, 褐毛和種で有意に高かった(いずれも $p < 0.01$)。これらの遺伝子は, いずれも実験1における, 褐毛和種間での比較でも差が見られており, これらの遺伝子の発現レベルの差はPVLの差による結果ではない可能性が示唆され, 本研究の目的である, 褐毛和種と黒毛和

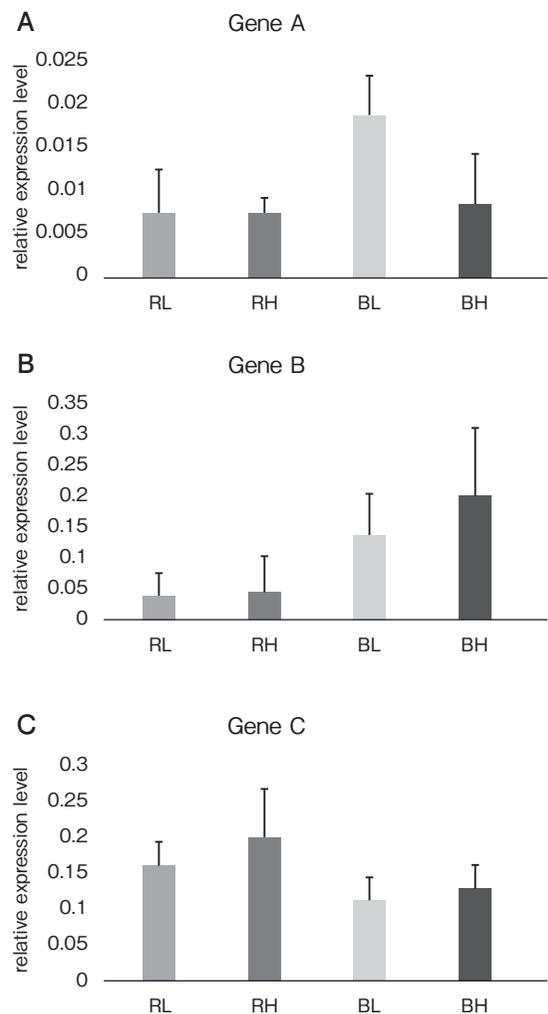


Fig. 1 Relative expression levels of 3 genes which significantly differed between 2 breeds.

data are mean \pm standard deviation (SD)

RL : Japanese Brown with low PVL

RH : Japanese Brown with high PVL

BL : Japanese Black with low PVL

BH : Japanese Black with high PVL

種におけるBLV感染牛におけるPVLの差に影響を及ぼしている可能性がある。実際に, これらの遺伝子は, HTLV-1やその他のレトロウイルスの細胞から細胞への伝播などへの関与が知られているため, BLVの伝播において, これらの遺伝子が関与していることが考えられる。ただし, これらの遺伝子の発現量の差が, 本研究の最終的な目

的である、褐毛和種と黒毛和種のBLV感染牛におけるPVLの差に影響を及ぼす根本原因であるとは断定できず、一現象を捉えているに過ぎない。このため、これらの遺伝子においても、サンプル数を増やすとともに、これらの遺伝子のタンパクレベルや、さらに、これらの遺伝子の上流にあたる遺伝子の発現レベルを比較する必要がある。

以上のことから、本研究では、2020年度に上記のような調査・採材および解析を行い、本研究の目的である褐毛和種と黒毛和種のBLV感染牛におけるPVLの差に影響を及ぼす遺伝因子の探索の手がかりとなる現象をつかむことができたと考えているが、上記でも述べたとおり、この現象が根本原因となっているかどうかを見極めるには、SNPなどのゲノムDNAレベルや、上流の遺伝子の発現レベルを調査することで、この現象が、どのようなメカニズムで起こっているかを解明する必要がある。また、生産現場での問題を解決するためには、これらの現象が、どのようにBLV感染後のPVLの変動の差に影響を与えるかを、タンパクレベルや細胞レベルで解析する必要があり、これらによって、育種や予防技術への応用の手掛かりとなる知見が得られるものと考えている。

4. 要 約

地方病性牛白血病（EBL）は牛白血病ウイルス（BLV）によって引き起こされ、近年、発生件数の増加が大きな問題となっている。しかし、BLV感染牛のほとんどは悪性のリンパ腫を発症せず無症状のままである。このため、リンパ腫発症に対する感受性は、牛側の遺伝的要因により変動する可能性がある。これを解明するため、遺伝的にEBLに対する発症抵抗性やBLV感染後に示す血中プロウイルス量の上昇の抵抗性を持つと考えら

れる熊本系褐毛和種（以下、褐毛和種）に注目し、褐毛和種を用いたRNAシーケンス解析および近縁なウイルスにおける知見から、21個の候補遺伝子について、褐毛和種の陰性牛、低PVL牛、高PVL牛間および、褐毛和種と黒毛和種の低PVL牛、高PVL牛間で、リアルタイム定量PCRにより発現量の比較を行った。その結果、5遺伝子がPVLによって発現量に差が見られ、うち、3遺伝子については、品種間での比較においても発現レベルに有意差が認められた。ただし、これらの遺伝子の発現レベルに差があることが、PVLの差の根本的な原因となっているとは断定できないため、さらなる解析を行う必要がある。

文 献

- 1) Della Libera, A. M., de Souza, F. N., Batista, C. F., Santos, B. P., de Azevedo, L. F., Sanchez, E. M., Diniz, S. A., Silva, M. X., Haddad, J. P., Blagitz, M. G. : Effects of bovine leukemia virus infection on milk neutrophil function and the milk lymphocyte profile. *Veterinary Research*, **46**, 2, 2~8, 2015.
- 2) Juliarena, M. A., Barrios, C. N., Carolina Ceriani, M. C., Esteban, E. N. : Bovine leukemia virus-infected cows with low proviral load are not a source of infection for BLV-free cattle. *J Dairy Sci*, **99**, 4586~4589, 2015.
- 3) Kataoka, K., Nagata, Y., Kitanaka, A., Shiraishi, Y., Shimamura, T., Yasunaga, J., Totoki, Y., Chiba, K., Sato-Otsubo, A., Nagae, G., Ishii, R., Muto, S., Kotani, Y., Watatani, Y., Takeda, J., Sanada, M., Tanaka, H., Suzuki, H., Sato, Y., Shiozawa, Y., Yoshizato, T., Yoshida, K., Makishima, H., Iwanaga, M., Ma, G., Nosaka, K., Hishikawa, M., Itonaga, H., Imaizumi, Y., Munakata, W., Ogasawara, H., Sato, T., Sasai, K., Muramoto, K., Penova, M., Kawaguchi, T., Nakamura, H., Hama, N., Shide, K., Kubuki, Y., Hidaka, T., Kameda, T., Nakamaki, T., Ishiyama, K., Miyawaki, S., Yoon, S-S., Tobinai, K., Miyazaki, Y., Takatori-Kondo, A., Matsuda, F., Takeuchi, K., Nureki, O., Aburatani, H., Watanabe, T., Shibata, T., Matsuoka, M., Miyano, S., Shimoda, K., Ogawa, S. : Integrated molecular analysis of adult T cell leukemia/lymphoma. *Nat Genet*, **47**(11), 1304~1318, 2015.

豚の筋ジストロフィーの病態解明と生前検査法の開発

Study of pathogenesis and detection method of porcine muscular dystrophy

相原 尚之・野口 倫子

(麻布大学獣医学部)

Naoyuki Aihara and Michiko Noguchi

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

Porcine muscle degeneration characterized by excessive fat deposition within muscles has been detected in pigs which had no clinical symptoms in meat inspection centers. Among these lesions, a case of human Becker muscular dystrophy-like myopathy characterized by decreased dystrophin staining at the sarcolemma was previously reported. The present study histologically and molecularly analyzed porcine muscle degeneration lesions and investigated the antemortem inspection method of pig muscular dystrophy. The distribution of macroscopic lesions was classified into four types: mainly in the gracilis, localized in the tongue, mainly in the trapezius, and mainly in the heart. Histologically, all types of lesions had severe fibrosis and fat infiltration. The muscular fibers in skeletal muscles exhibited necrotic and regenerative features. Immunofluorescence using antidystrophin antibody showed focal and severely weak staining at the sarcolemma. Analysis of dystrophin mRNA showed that point mutations on different sites were detected in two cases, 62 base pairs insertion was detected in one case, and deletion of 1,041 base pairs was detected in two cases. Based on these findings, all cases were diagnosed as dystrophinopathy (Becker muscular dystrophy). In addition, a muscle biopsy of six male piglets was done from carrier sow. Three piglets showed muscular regeneration and weakened dystrophin immunoreactivity, diagnosed with Becker muscular dystrophy. Pig dystrophinopathy is caused by various dystrophin mutations, and the distribution of macroscopic lesions may be related to its dystrophin mutation. These dystrophin mutations may be latent in pigs because of the mild clinical symptoms. Muscle biopsy can be used as an antemortem dystrophinopathy inspection method for screening at selective pig breeding.

1. 目 的

健康豚としてと畜場に搬入された豚において、食肉検査時に脂肪浸潤と褪色を特徴とする筋病変が発見されることがある。このような病変は古くから知られているが、その原因は不明であった。

著者は、このような変性性筋病変の中にジストロフィンの発現異常による筋症が存在することを明らかにした¹⁾。ジストロフィンは細胞内骨格と筋細胞膜、細胞外マトリックスを繋ぎ、筋細胞の構造安定化に関与しており、ジストロフィンの機能異常は筋細胞を変性、壊死に至らせ、臨床的には

筋力低下を呈する。

ジストロフィンの発現異常（ジストロフィン異常症）は、ヒトの遺伝性筋疾患（筋ジストロフィー）の最大の原因である。ジストロフィン遺伝子はX染色体上に位置するため、伴性劣性の遺伝様式を取り、保因母親を持つ男性で発症する。ヒトのジストロフィン異常症は、重症型で早期発症のデュシェンヌ型と比較的軽症で遅発性のベッカー型筋ジストロフィーに大別される²⁾。食肉検査時に発見される豚のジストロフィン異常症は、生前に運動機能に異常はみられないことから、ヒトのベッカー型筋ジストロフィーに類似する病態を示すと考えられる。

脂肪浸潤と褪色を特徴とする豚の筋病変は日本、米国等で発生があることから^{1,3)}、その原因の一つと考えられる豚の筋ジストロフィーは、潜在的に広く存在している可能性がある。また、その病態は十分に明らかになっておらず、生前検査法も検討されていない。本研究では、ジストロフィン異常症を疑う豚を全国各地から収集し、病理学および遺伝子学的性状を解析するとともに、生前検査法を検討した。

2. 方法

本研究に関わる動物実験は、麻布大学動物実験委員会の許可を受け（承認番号：191108-2）、麻布大学動物実験指針を遵守して実施した。

2.1 動物および検査材料

と畜場に健康畜として搬入され、食肉検査時に変性性筋病変として摘発された約6ヶ月齢の豚24頭（雄12頭、雌12頭）を対象に、筋病変の肉眼的分布を記録し、病変部から筋肉を採取した。また、本学で飼育中に心不全で死亡した母豚とその家系の雄子豚6頭の計7頭から、骨格筋および心筋を採取した。正常対照には7週齢の雄豚2頭の骨格筋を用いた。

2.2 病理組織学的検索

採材した材料を10%中性緩衝ホルマリンで固定後、常法に従いパラフィンブロックに包埋した。マイクロームを用いて3 μmに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を実施した。また必要に応じて、アザン染色を実施した。

2.3 免疫組織学的検索

免疫組織染色により、上記解析材料中のジストロフィン発現を評価した。抗ジストロフィン一次抗体には、Ab15277（希釈倍率500倍、C末端認識抗体）を用いた。二次抗体には、Alexa fluor 488標識抗ウサギIgG抗体（希釈倍率1,000倍）を用いた。

2.4 遺伝学的検索

採材した筋肉はドライアイスとともに粉碎し、RNeasy Plus Micro Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出した。逆転写反応はReverTra-Plus-（東洋紡）を用い、付属説明書に従って行った。得られたcDNAテンプレートとして、Table 1に示すプライマーを用いてPCRを実施した。PCR産物は1%アガロースゲルで電気泳動し、目的のバンドをNucleoSpin Gel and PCR Clean-up（タカラバイオ株式会社）を用いて精製し、シークエンス解析（ユーロフィンジェノミクス株式会社）を実施した。

2.5 生前検査法の検討

心不全を示した母豚から確立した豚家系の雄子豚6頭を対象に、生前検査法の検討を行った。生後70日齢において、麻酔下で薄筋から1 cm大の筋肉を採取し、2.2、2.3に示す方法で病理学的、免疫組織学的解析を行った。

3. 結果と考察

3.1 病変の肉眼分布と形態学的特徴

筋病変の発現部位として、以下の4つのタイプが認められた。

Table 1 PCR primer pairs used for amplification of the dystrophin gene.

NM_001012408.1_604-623F	GAGCTGGGTCCGACAATCAA
NM_001012408.1_1475_1496_R	CACTTGCTACCCGTGAGGCATTC
NM_001012408.1_1029_1048_F	CGCAGGGCTATGAACGAACT
NM_001012408.1_2474_2494_R	GGCTTTTTCTCGCTCTATGGC
NM_001012408.1_2027_2048_F	ACCATGGACAAACTCAGTTCAC
NM_001012408.1_3437_3457_R	CCTGCACTGTTTCAGCTGTTT
NM_001012408.1_3002_3021_F	CCAATGCGCTATCAGGAGAC
NM_001012408.1_4470_4491_R	GCAGCTTCCTTTCCCTGGTAAT
NM_001012408.1_4068_4088_F	CTGGTGGAGCTGAGGAAATCT
NM_001012408.1_5468_5489_R	TGTGAGAAATGGCTGCAAAATCG
NM_001012408.1_5016_5036_F	TCTGGGAAAGGCTACTCAGA
NM_001012408.1_6403_6422_R	GCTGTGAGAGAGCTTCCTGT
NM_001012408.1_6046_664_F	CTGGCGGAAATTGAGAGC
NM_001012408.1_7450_7471_R	AGGTGCTTCAATAGTGGTCAGT
NM_001012408.1_7025_7044_F	CCCATAAGCCGAGAAGAGCA
NM_001012408.1_8461_8480_R	GGATGGCATCATCGGAACCT
NM_001012408.1_8158_8176_F	CAATGCCTCCTGGGCAAACT
NM_001012408.1_9382_9402_R	GTTGTTTGGGTCTCGTGGTTG
NM_001012408.1_9166-9185F	CACCACATTGGGCATTACG
NM_001012408.1_10413_10430_R	AGGCAGGCGAGAATCTA
NM_001012408.1_10111-10130F	GGAGTGTCCAATCATCGGCT
NM_001012408.1_11236-11255R	GCTCTGCCAAATCATCTGC

3.1.1 病変が主に薄筋・腹直筋に出現するタイプ (n = 21)

食肉検査時に変性性筋病変として摘発された24頭のうち21頭が本タイプであり、4つのタイプの中で最も多くみられた。

肉眼所見：薄筋と腹直筋を中心に全身の筋肉の褪色、脂肪浸潤が顕著であり、筋肉以外に著変は認められなかった。

組織所見：骨格筋への脂肪浸潤が高度であり、残存する筋線維は好酸性を増し円形化し、大小不同が顕著であった (Fig. 1)。変性壊死した筋線維をマクロファージが貪食するような像も観察された (Fig. 2)。肥大した筋線維を区画するように線維が入り込む分割線維や核の中心化といった再生性変化を認めた。

免疫染色：抗ジストロフィン抗体を用いた免疫染色により、正常個体では筋線維膜に一致して全周性かつ均一にジストロフィンの発現が認められた (Fig. 3)。一方、本タイプの21症例すべてにおいて、

ジストロフィンを発現する筋線維が著しく減少していた (Fig. 4)。発現を認める筋線維においても、断続的な発現となり発現量も減弱した。

3.1.2 病変が主に舌に出現するタイプ (n = 1)

食肉検査時に変性性筋病変として摘発された症例のうち1頭がこのタイプであった。

肉眼所見：舌は高度に腫大し、口腔から突出していた。その他の部位に著変は観察されなかった。

組織所見：舌において、脂肪浸潤と筋線維の変性、壊死および再生性変化を認めた。また、アザン染色標本では、変性した筋線維の周囲に青く染色される膠原線維の増生 (線維化) が確認できた。肉眼的には著変がみられなかった骨格筋においても、軽度な筋線維の変性と線維化が観察された。

免疫染色：抗ジストロフィン抗体による免疫染色において、舌筋ではジストロフィンがほとんど発現しておらず、ごく一部分が弱い発現を示した。

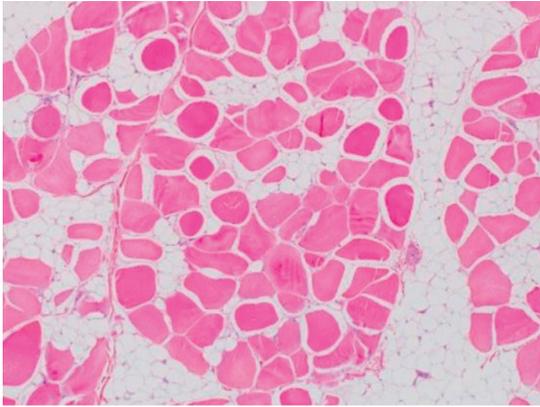


Fig. 1 Microscopic findings after staining with hematoxylin and eosin from the skeletal muscle of a pig with Becker muscular dystrophy. Severe fat infiltration and varied diameters and rounded shapes of the remaining muscular fibers.

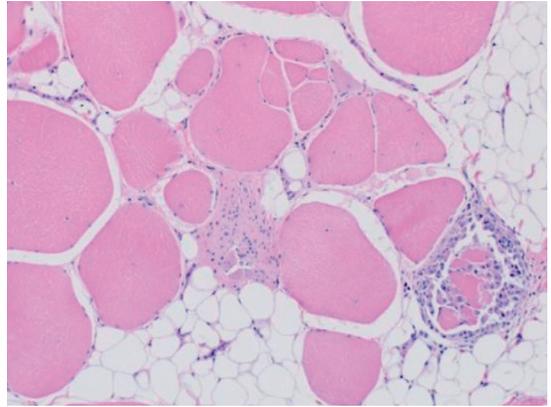


Fig. 2 Microscopic findings after staining with hematoxylin and eosin from skeletal muscle of a pig with Becker muscular dystrophy. Hyalinized fibers, accumulation of macrophages, internal disposition of nuclei, and fiber splitting.

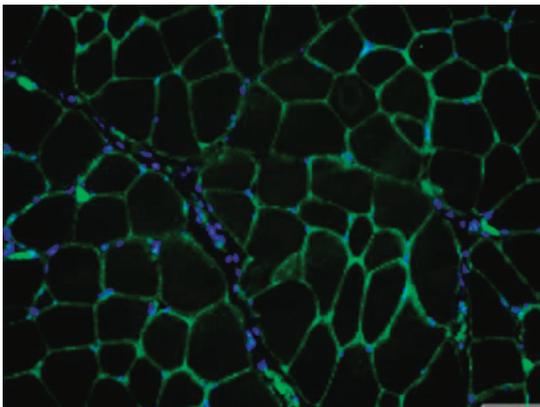


Fig. 3 Immunohistochemistry for dystrophin. Staining is intense and continuous in healthy pigs.

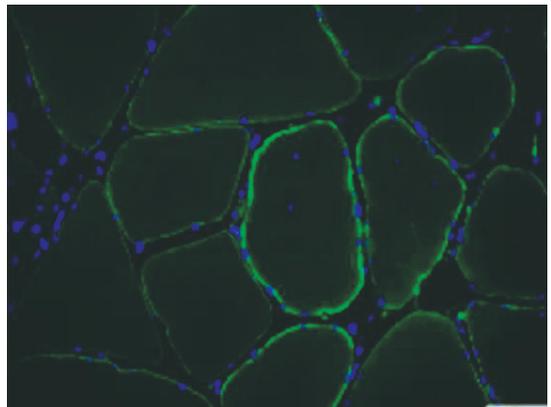


Fig. 4 Immunohistochemistry for dystrophin. Staining is focal and severely weak in the Becker muscular dystrophy case.

骨格筋では一部で発現の減弱が認められた。

3.1.3 病変が主に僧帽筋・広背筋に出現するタイプ (n = 2)

と畜場で変性性筋病変として摘発された豚のうち2頭がこのタイプに属した。

肉眼所見：僧帽筋に高度な脂肪浸潤がみられ、広背筋の一部にも浸潤が観察された。一方、最長筋には病変がみられなかった。

組織所見：薄筋タイプと同様に、病変部に脂肪浸潤と筋線維の変性壊死が認められた。

免疫染色：抗ジストロフィン抗体による免疫染色では、一部の筋線維が弱いジストロフィンの発現を示した。

3.1.4 病変が主に心筋に出現するタイプ (同一家系)

麻布大学で飼育され、心不全で死亡した母豚とその雄子豚で観察された。

母豚の肉眼所見：心内膜に多数の出血を認めた。

母豚の組織所見：心筋線維の萎縮と変性がみられ、右心室で高度であった。また、薄筋でも筋線

維の変性や再生性変化が観察された。

母豚の免疫染色：抗ジストロフィン抗体を用いた免疫染色では、心筋における顕著なジストロフィン発現の低減を認めた。

子豚の所見：麻酔後に異常を示した雄子豚では、心筋線維の萎縮および薄筋の変性、壊死、再生所見を認めた。また、心筋および骨格筋のジストロフィン発現の低減を認めた。

以上より、検査したすべての豚は、骨格筋における変性、壊死、再生所見と免疫染色におけるジストロフィンの低減の所見からジストロフィン異常症と診断した。筋病変の発現分布は、大きく4つのタイプに分類されることが示された。

3.2 ジストロフィン遺伝子の変異解析

病変が主に薄筋・腹直筋に出現するタイプの6頭、病変が主に舌に出現するタイプ1頭、病変が主に僧帽筋・広背筋に出現するタイプ2頭の計9頭を解析した。

薄筋・腹直筋に出現するタイプ6頭のうち2頭

において、アミノ酸置換を伴う点変異を確認した。1頭目は、exon20において827番目のアミノ酸がアルギニンからスレオニンに、834番目のアミノ酸がグルタミンからヒスチジンに変化する一塩基置換が検出された。2頭目ではexon22において939番目のアミノ酸がアルギニンからヒスチジンに変化する一塩基置換が検出された。病変が主に舌に出現するタイプでは、exon26, 27間に62塩基の挿入が確認された (Fig. 5)。病変が主に僧帽筋・広背筋に出現するタイプでは、2頭ともに正常なジストロフィン遺伝子配列に加え、exon21~28領域に1041塩基の欠損を持つジストロフィン遺伝子が検出された (Fig. 6)。

以上より、複数のジストロフィン遺伝子の変異が豚のジストロフィン異常症には含まれることが示された。過去、豚ではexon41の1アミノ酸置換によるジストロフィン異常症が1例報告されている⁴⁾。豚ではさまざまなジストロフィン遺伝子変異が淘汰されることなく存在し、食肉検査時に

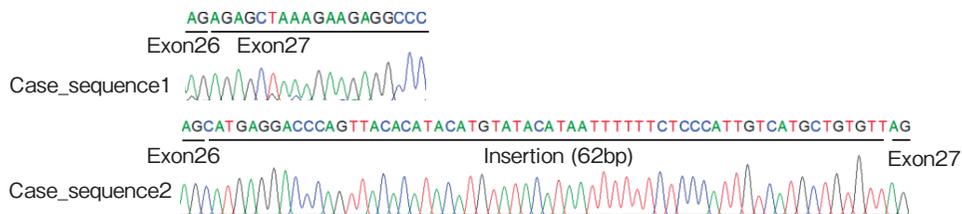


Fig. 5 Sequencing of the reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) of the dystrophin gene. A 62 base pair insertion between exons 26 and 27 was detected.

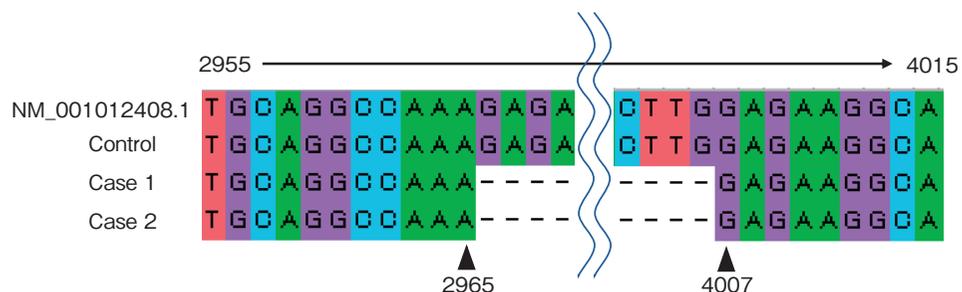


Fig. 6 Sequencing of the RT-PCR of the dystrophin gene. A 1,041 base pair deletion from 2,966 to 4,006 of dystrophin gene was detected.

変性性筋病変として摘発されることが示唆された。

3.3 生前検査法の検討

心不全で死亡した母豚から確立した家系は、ジストロフィン遺伝子変異の保因家系であることが明らかになった。そこで保因母豚から生まれた雄子豚6頭について、薄筋の筋生検を実施したところ、3頭において病理組織学的に筋線維の変性、壊死を認め、免疫染色ではジストロフィン発現の低減を認めた。残り3頭は、病理組織学および免疫組織学的に著変を認めなかった。以上、筋生検を実施することにより、生後70日齢の時点で保因豚を検出することが可能であった。筋生検は、種豚の選抜などでジストロフィン遺伝子の変異の有無を検査する方法として有用であると考えられるが、今後より侵襲性の少ない検査法を検討していくことが汎用性の高い生前検査法としての課題と考えられる。

4. 要 約

健康豚としてと畜場に搬入された豚において、食肉検査時に脂肪浸潤と褪色を特徴とする筋病変が発見され、このような筋病変の中にジストロフィンの発現異常によるベッカー型筋ジストロフィー様筋症が存在することが明らかになった。本研究では、ジストロフィン異常症を疑う豚の筋病変を全国から収集し、その病理学および遺伝子学的性状を解析するとともに、生前検査法を検討した。その結果、筋病変の発現部位はさまざまで、と畜場では病変が主に薄筋にみられるもの、病変が舌に限局するもの、僧帽筋にみられるものが摘発され、心不全死亡豚では病変が心筋に高度に、骨格筋で軽度のみられた。組織学的には、全症例

に共通して筋への脂肪浸潤、筋線維の変性・壊死、再生性変化が観察された。免疫染色では、ジストロフィンを発現する筋線維が正常筋肉と比較して著しく減少または発現強度が減弱していた。遺伝子解析を実施した症例のうち、2症例では症例ごとに異なる部位でアミノ酸置換を伴う点変異、1症例では62塩基の挿入、2症例では同一部位で1041塩基の欠損を確認した。ジストロフィン遺伝子変異を持つ母豚の雄産子6頭で筋生検を行ったところ、3頭で筋線維の変性・壊死およびジストロフィンの発現低減を認め、生前に変異保因豚が特定された。豚のジストロフィン異常症は、病変発現部位が異なるさまざまなタイプがあり、それぞれに異なる変異が認められた。豚のジストロフィン異常症は、と畜まで運動障害を認めないために摘発されることなく潜在的に広く存在している可能性が示唆された。筋生検を実施することで、筋肉の変性、壊死病変、およびジストロフィンの発現低減の所見により、生前に変異保因豚を検出することが可能であり、この方法は種豚の選抜などに活用できる可能性がある。

文 献

- 1) Horiuchi, N., Aihara, N., Mizutani, H., Kousaka, S., Nagafuchi, T., Ochiai, M., Ochiai, K., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Asai, T., Oishi, K. : *J. Vet. Med. Sci.*, **76**, 243~248, 2014.
- 2) Flanigan, K. M. : *Neurol Clin*, **32**(3), 671~688, 2014.
- 3) Cooper, B. J., Valentine, B. A. : *Pathology of Domestic Animals*, 6th ed, 164~249, Elsevier, Missouri, 2015.
- 4) Nonneman, D. J., Brown-Brandl, T., Jones, S. A., Wiedmann, R. T., Rohrer, G. A. : *BMC Genomics*, **13**, 233, 2012.

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法とナノポア シーケンス技術を用いた超迅速なウイルス塩基配列 解読法の開発

Development of a rapid diagnostic system for detection and sequencing of
viral nucleic acid using recombinase polymerase amplification and
nanopore sequencing technology

堀江真行^{1,2,3}・安藤清彦⁴

(¹京都大学白眉センター, ²京都大学ウイルス・再生医科学研究所, ³大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻,
⁴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)

Masayuki Horie^{1,2,3} and Kiyohiko Andoh⁴

(¹Hakubi Center for Advanced Research, ²Institute for Frontier Life and Medical Sciences, Kyoto University, ³Division of
Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka, ⁴National Institute of Animal Health, NARO)

Diagnosis of viral infections in livestock is essential for the control of infectious diseases. Various methods were used to diagnose viral infections, and one of the most frequently used methods is nucleic acid detection, such as PCR and LAMP. These nucleic acid detection methods are relatively sensitive and easy to perform, and their product can be subjected to sequencing, which can be helpful in epidemiology. However, these nucleic acid detection methods are time-consuming, high cost, and/or complex to analyse the data. In this study, we integrated the rapid isothermal nucleic acid amplification method, recombinase polymerase amplification (RPA), and the Nanopore sequencing technology to develop a viral diagnostic method that overcomes the above shortcomings. Using bovine RS virus as a model, we succeeded in developing a method that can complete the process from nucleic acid extraction to sequencing analysis within four hours. The method developed in this study is useful for the diagnosis of viral infections, and further investigations would lead to a more rapid, simple, and robust method for the diagnosis of viral infections.

1. 目 的

家畜のウイルス感染症の診断は感染症の制御に必須である。ウイルス感染症の診断にはさまざまな手法が用いられる。ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) を代表とするウイルス核酸検出法は、比較的簡易かつ高感度にウイルス核酸を検出できる。さらには得られた

増幅産物の塩基配列を解析することによって疫学的対策へと役立てることができ、感染症の制御に非常に効果の高い診断法である。

現在使用されている主なウイルス核酸検出法は、PCR法あるいは逆転写PCR (RT-PCR) 法である。PCRは比較的感度が高く、増幅産物の塩基配列の解析も容易であるため、幅広いウイルス感染症の診断に用いられている。しかし、PCR反応

には「変性、アニーリング、伸長」の3段階の厳密な温度管理が必要であり、サーマルサイクラーのような比較的高価な機器が必要である。また、検出にかかる時間も比較的に長いという欠点がある。

上記の欠点を克服した核酸検出法として、Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法が知られている¹⁾。LAMP法は4つのプライマーと鎖置換型ポリメラーゼによって、標的核酸の増幅を行う。鎖置換型ポリメラーゼを用いるため、一定の温度(約65度)で伸長反応を行うことが可能な等温増幅法であり、PCRのような高価な機械を必要としない。さらに、反応時間も約1時間程度と平均的なPCR法と比べて短いという利点も有する。しかし、LAMP法によって増幅されたDNAはPCR産物のように単純ではなく、その後の塩基配列解析を行うには複雑な処理が必要となる。

リコンビナーゼポリメラーゼ増幅(Recombinase polymerase amplification: RPA)法は、上記の核酸検出法の種々の問題点を改良した手法である^{2~4)}。RPA法はPCR法のように2つのプライマーを用いる核酸増幅法である。RPA法では大腸菌由来リコンビナーゼおよび一本鎖DNA結合タンパク質によって二本鎖DNAの解離と一本鎖DNAの安定化を行うため、PCRのような熱変性ステップを必要としない。そのため等温増幅が可能である。さらに、RPA法はLAMP法と比較して低温(37—42度)で反応が可能であり、反応時間も20分以内ときわめて短い。また、得られる増幅産物はPCR産物と同様に、電気泳動による増幅産物の確認や、塩基配列の解析に容易に用いることができる。このようにRPA法は迅速かつ簡便なウイルス核酸検出法として有用であると考えられ、実際にいくつかのウイルス感染症の診断法の開発も行われている⁴⁾。

現在、PCR産物の塩基配列解析には主にサン

ガーシーケンス法が用いられている。サンガーシーケンス法は十分な実績のある信頼性の高い手法であるものの、シーケンスの準備に時間がかかるうえ、シーケンスには非常に高価な機械を必要とする。近年は比較的安価でかつ迅速な受託解析が増えているものの、結果を得るまでは数日を要する。

ナノポアシーケンスはタンパク質であるナノポアを用いたシーケンス技術である。代表的な製品であるMinIONは小型(長さ105mm、厚み23mm、幅33mm)であり、ノートPCにUSB接続してシーケンスが可能な革新的デバイスである。近年はFrongleという安価なフローセル(約10,000円程度)も開発されている。シーケンスも高速で、増幅産物の場合は数分で解析に十分な数のリードが得られることも報告されており⁵⁾、PCR産物やLAMP産物の迅速な塩基配列の解読に応用されてきた。これらのことから、RPA法によって核酸増幅を行い、その増幅産物をナノポアシーケンスに供することによって、きわめて迅速なウイルス感染症の診断法へと応用可能であることが考えられる。

本研究では、RNAウイルスであるウシRSウイルス(BRSV)をモデルとして、上記のRPA法とナノポアシーケンスを組み合わせ、ウイルス感染症の検出から塩基配列の解読までを含む、超迅速診断法の開発を目的として行った。

2. 方法

2.1 核酸抽出

BRSVの研究室株であるNMK株をVero細胞で培養した。培養上清から、Viral RNA mini kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出した。牛パラインフルエンザウイルス3型の研究室株であるBN-1株をMDBK細胞で培養し、同様に培養上清からRNAを抽出した。

臨床検体については、家畜保健衛生所から送付されたスワブ液 (n = 32) からViral RNA mini kitを用いてRNAを抽出した。

2.2 Nested RT-PCRによるウイルス核酸検出

8 μ l の抽出RNAとReverTra Ace[®] qPCR RT Master Mix (TOYOBO) あるいはSuperScript[®] IV Reverse Transcriptase (Thermo Fisher Scientific) を用いて、説明書の通りに逆転写反応を行った。得られたcDNAとTks Gflex[™] DNA Polymerase (TaKaRa) を用いてnested PCR反応を行った。プライマーはValarcherらによって設計されたもの⁶⁾を用いた。得られたPCR産物をアガロースゲル電気泳動によって解析した。

2.3 2-step RT-RPAによるウイルス核酸増幅
逆転写反応は上記のNested RT-PCRの項と同様に行った。RPA法はTwistAmp[®] Basic (TwistDx) を用いて説明書の通りに行った。39度4分の反応後に10回の転倒混和を行い、さらに39度で16分の反応を行った。得られたRPA産物をアガロースゲル電気泳動によって解析した。

2.4 1-step RT-RPAによるウイルス核酸増幅
TwistAmp[®] Basic, SuperScript[®] IV Reverse Transcriptase, RNaseOUT[™] Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Thermo Fisher Scientific) を用いてRT-RPA法を行った。42度5分の反応後に10回の転倒混和を行い、さらに42度15分の反応を行った。得られたRPA産物をアガロースゲル電気泳動によって解析した。

2.5 ナノポアシーケンスと配列解析

innuPREP PCRpure Kit (Analytik Jena) を用いて得られたRPA産物の精製を行った。精製したRPA産物とLigation Sequencing Kit (Oxford Nanopore) を用いてシーケンスライブラリを作成した。その後、Frongleフローセル (Oxford Nanopore) を用いてナノポアシーケンスを

行った。

得られたfastqファイルからSeqkit⁷⁾を用いて、得られたリードの1%を抽出し、さらに280-380塩基長のリードを抽出した。MAFFT⁸⁾を用いて多重配列アライメントを行い、得られたアライメントのコンセンサス配列を配列解析に用いた。

得られたコンセンサス配列を用いて、BLASTn (megablast, ntデータベース, webインターフェース) 解析を行った。BLASTn解析ではデフォルトのパラメーターを用いた。

3. 結果と考察

3.1 BRSV標準株を用いたRT-RPA法の確立

RPA法ではPCR法と比べて長いプライマー(30塩基程度)が必要となる。はじめにプライマーを設計するため、既知のBRSVの配列の多重配列アライメントを行った。本研究ではBRSVのRT-PCR診断に用いられる領域を参考にして、G遺伝子にプライマーを設計した。なお、すべての既知のBRSV配列に100%一致するプライマーの設計は困難であったため、縮重プライマーの設計も行った (Table 1)。

Vero細胞によってBRSV NMK株から抽出したRNAと上記のプライマーを用いて、2-step (RT反応とRPA反応を別々に行う) RT-RPA法を行った。その結果、どちらのプライマーセットにおいてもBRSV由来のRNAサンプルでのみ、特異的な増幅産物が得られた (Fig. 1)。この結果から、設計したプライマーを用いたRT-RPA法はBRSVの検出に使用可能であることが示された。

3.2 2-step RT-RPA法による臨床検体からのBRSV核酸の検出

確立した2-step RPA法によって、臨床検体由来のRNAからBRSVの核酸の検出を試みた。既知の診断法との比較のため、標準診断法の1つであるNested RT-PCRも行った。呼吸器病の牛から

Table 1 Primers used in this study.

Name	Sequence (5' - 3')
BRSV.RPA.F1	AACACAACAGCCCCAAAACCATACCTCACC
BRSV.RPA.R1	AGAGTGATAAGCAAGCAAGATTACCTTCAC
BRSV.RPA.F2	AACACAACAGCCCCAAAACCWTTACCTCACC
BRSV.RPA.R2	AGAGTGATAAGCADGCAAGATTACCTTCAC

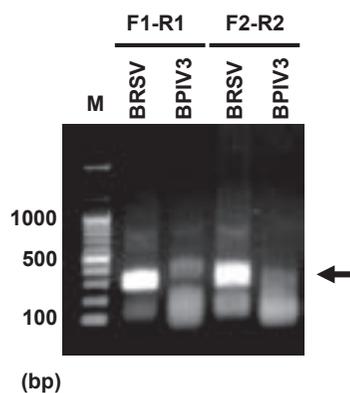


Fig. 1 Development of a two-step RT-RPA for detection of BRSV

Two primer pairs (sequences are available in Table 1) were tested for a two-step RT-RPA. RNAs extracted from the lab strains of the indicated viruses were used. RT-RPA products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The arrow indicates the expected size of RPA amplicon. M, 100-bp ladder marker; BRSV, bovine respiratory syncytial virus; BPIV3, bovine parainfluenza virus 3.

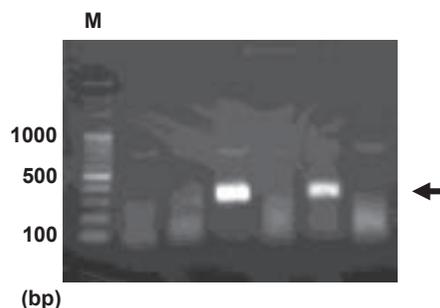


Fig. 2 Representative results of two-step RT-RPA for detection of BRSV

A two-step RT-RPA was performed using RNAs extracted from clinical samples. RT-RPA products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The arrow indicates the expected size of RPA amplicon. M, 100-bp ladder marker.

採材した32検体中、RT-RPA法では4検体が陽性であった(代表例をFig. 2に示す)。一方、nested RT-PCR法では5検体が陽性であった。これらのことから、本研究によって確立した2-step RT-RPA法は従来のnested RT-PCR法と比較してわずかに感度が劣ると考えられた。

3.3 1-step RT-RPA法によるBRSV核酸検出

RT反応とRPA反応を1つのチューブで同時に行う1-step RT-RPA法の確立を試みた。はじめに、細胞上清より抽出したBRSV NMK株由来RNAを用いて検討を行った。その結果、特異的な増幅産物が得られ(代表例をFig. 3に示す)、1-stepでもRPA法が機能することが示された。

次に臨床検体由来のRNAを用いて、1-step RT-RPA法を検討した。多くの検体ではスメアが目立ち、判定が困難であった。一方で、一部の検体では陽性と判定できる増幅産物も得られた(代表例をFig. 3に示す)。

これらの結果から、本研究において作成した1-step RPA法はBRSVの核酸検出が可能であるものの、今後は詳細な条件検討を行う必要があると考えられた。

3.4 ナノポアシーケンスによる配列解析

最後に、2-step RPA法によって得られた増幅産物について、ナノポアシーケンスによる塩基配列の解析を行った。本研究では2つの増幅産物

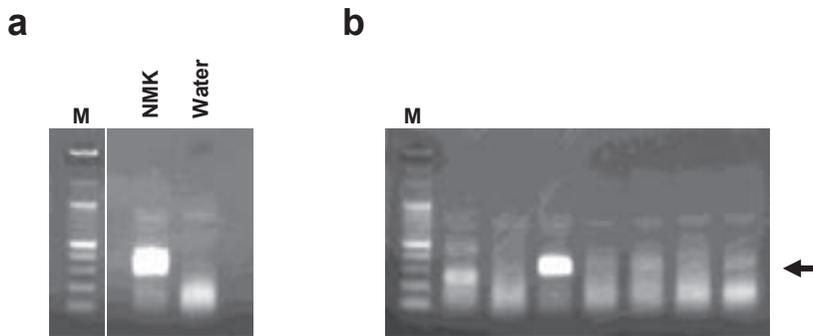


Fig. 3 Development of a one-step RPA for detection of BRSV

A one-step RPA was performed using RNAs extracted from (a) the strain NMK or (b) clinical samples. M, 100-bp ladder marker. (a) This figure was extracted from a picture. (b) Representative picture is shown.

について解析を行ったが、ここでは1例の結果のみを示す。

約2日のシーケンスによって、約125,000リードが得られた。これらのリードの一部（1120リード）からコンセンサス配列を作成し、BLAST検索を行った。得られたコンセンサス配列は、2019年に日本の牛から検出されたBRSVの塩基配列（アクセッション番号：LC549485.1）と99.2%一致であり、正しくシーケンスができていると考えられた。今後はサンガーシーケンスを行い、ナノポアシーケンスによって得られた配列の正確性を検討する必要がある。

本研究では2日間にわたるシーケンスを行ったが、得られたリードの約1%（1120リード）のみを解析に用いた。今回のシーケンスでは、シーケンスの開始から少なくとも1時間以内に1200以上のリードが得られており、今後はシーケンス時間についても大幅な短縮が可能であると考えられる。これらも含め、今後より詳細に検討する必要がある。

3.5 本研究によって浮かび上がった課題、今後の展望

本研究で確立したRT-RPA法は、従来のnested RT-PCRと比べて感度がやや劣っていた。また、

1-step RT-RPA法ではスミアが目立った。これらのことから、より多くのプライマーを設計し、改良する必要がある。しかし、公共データベースにおけるBRSVの配列の登録数はきわめて少なく、他の部位にプライマーを設計するのは困難であった。例えば、NCBI GenBankに登録されているウイルスゲノムの全長配列は海外から登録された4エントリのみである。また、日本のBRSVは独自の進化をしていることも報告されており⁹⁾、上記の4つの全長配列をもとに設計したプライマーが、国内の流行株でワークしないということも十分に考えられる。今後、日本国内においても定期的にBRSVの全ゲノム配列の解読を進めていくことによって、より良い診断法の開発へとつながるであろう。

本研究ではすべてが開発段階であるため、RNA抽出や増幅産物の精製、ライブラリの作成にはごく一般的な試薬を用いた。驚くことに、このような一般的な試薬を用いた方法であっても、全行程を4時間以内（RNA抽出に約30分、逆転写に約30分、RPA法に約30分、RPA産物の精製に10分、ライブラリ作成に1時間、シーケンスに1時間）に終わることができる。現在、これらのすべての過程において、より迅速なキット・試

薬も販売されている。例えば本研究ではライブラリの作成において約1時間を要するLigation Sequencing Kitを使用した。Oxford Nanopore社からは約10分でライブラリを作成可能なRapid sequencing kitも販売されている。今後、上記の1-step化およびより迅速な試薬等の使用によって、さらに時間を短縮し、迅速・簡便かつ頑強なウイルス検出法へとつながるであろう。

4. 要 約

家畜のウイルス感染症の診断は感染症の制御に必須である。診断方法にはさまざまなものが存在し、頻繁に用いられる手法としてPCRやLAMPのようなウイルスの核酸検出法があげられる。これらの核酸検出法は比較的感度が高く、比較的容易であり、またその塩基配列を解読することによって疫学的対策へと役立てることができる。しかし、これまでに使用されている核酸検出法は時間、コスト、解析の複雑さなどの面で欠点があった。本研究では、迅速な等温核酸増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法（RPA法）と、迅速かつ簡便なナノポアシーケンス技術を統合し、上記の欠点を克服した迅速・簡便なウイルス診断法の開発を行った。ウシRSウイルスをモデルとし、種々の検討を行った結果、核酸の抽出からシーケンス解析までをおよそ4時間で終えることのできる手法の開発に成功した。本研究によって開発した手法は、今後のウイルス感染症の

対策に有用であり、今後のさらなる検討によって、より迅速・簡便かつ頑強なウイルス感染症の診断法となる可能性を秘めている。

文 献

- 1) Notomi, T., Mori, Y., Tomita, N., Kanda, H. : Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) : principle, features, and future prospects, *J Microbiol.* **53**, 1~5, 2015.
- 2) Piepenburg, O., Williams, C. H., Stemple, D. L., Armes, N. A. : DNA detection using recombination proteins, *PLoS Biol.* **4**, e204, 2006.
- 3) Daher, R. K., Stewart, G., Boissinot, M., Bergeron, M. G. : Recombinase Polymerase Amplification for Diagnostic Applications, *Clin Chem.* **62**, 947~958, 2016.
- 4) Li, J., Macdonald, J., von Stetten, F. : Review : a comprehensive summary of a decade development of the recombinase polymerase amplification, *Analyst.* **144**, 31~67, 2018.
- 5) Kai, S., Matsuo, Y., Nakagawa, S., Kryukov, K., Matsukawa, S., Tanaka, H., Iwai, T., Imanishi, T., Hirota, K. : Rapid bacterial identification by direct PCR amplification of 16S rRNA genes using the MinION nanopore sequencer, *FEBS Open Bio.* **9**, 548~557, 2019.
- 6) Valarcher, J. F., Schelcher, F., Bourhy, H. : Evolution of bovine respiratory syncytial virus, *J Virol.* **74**, 10714~10728, 2000.
- 7) Shen, W., Le, S., Li, Y., Hu, F. : SeqKit : A Cross-Platform and Ultrafast Toolkit for FASTA/Q File Manipulation, *PLoS One*, **11**, e0163962, 2016.
- 8) Katoh, K., Standley, D. M. : MAFFT multiple sequence alignment software version 7 : improvements in performance and usability, *Mol Biol Evol.* **30**, 772~780, 2013.
- 9) Kumagai, A., Kawachi, K., Andoh, K., Hatama, S. : Sequence and unique phylogeny of G genes of bovine respiratory syncytial viruses circulating in Japan, *J Vet Diagn Invest.* **33**, 162~166, 2021.

牛白血病ウイルス由来の非翻訳性RNAと結合する 宿主タンパク質の同定

Identification of host-derived proteins interacting with BLV non-coding RNA

安藤清彦

(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)

Kiyohiko Andoh

(National Institute of Animal Health, NARO)

Bovine leukemia virus (BLV) infects bovine B-cells and causes a malignant lymphoma, resulting in severe economic losses in livestock industry. Although a number of studies have been intended to clarify molecular mechanisms of BLV pathogenesis, the detail of the mechanism is still enigmatic. Currently, viral non-coding RNAs are attracting attention as a novel player for BLV pathogenesis because these transcripts can evade from host immune response and persistently express in latently infected cells. BLV genome encodes novel long non-coding RNA, AS1, in its antisense strand, and the AS1 consists of two isoforms, AS1-L and AS1-S. Previous reports showed that the AS1-S RNA was persistently expressed in both lymphoma cell and persistently infected cell line, suggesting that AS1-S RNA might play an important role in BLV life cycle. In the present study, we intended to identify host-derived proteins which bind to AS1-S RNA for clarifying molecular functions of AS1-S. Combination of RNA-protein pull-down assay and LC-MS/MS technique revealed that host derived protein X specifically bound to AS1-S RNA. Protein X is an RNA-binding protein and is also involved in mRNA processing and innate immunity. MDBK cells expressing AS1-S RNA decreased expression of interferon-stimulated genes, *OAS1*, *ISG15* and *Mx1*, compared with mock cells in the presence of poly (I : C), suggesting that AS1-S RNA may modulate innate immune system by interacting with protein X. These findings might contribute to understand the molecular mechanism of BLV lifecycle.

1. 目的

本研究は、牛白血病ウイルス (BLV) がコードする非翻訳性RNA AS1-Sと結合する宿主タンパク質を同定することを目的としている。

BLVはレトロウイルスに属する腫瘍ウイルスであり、牛のB細胞に感染した後、長い潜伏期を経て致死性のリンパ腫である牛伝染性リンパ腫を

引き起こす。BLVに感染した個体は生涯ウイルスを保持するが、すべての感染個体がリンパ腫を発症するわけではなく、大半は無症状でありリンパ腫を発症するのはわずか数%のみであることなど、BLVの病態進行やリンパ腫発症機構にはいまだ不明な点が多い。日本においては、2011年の全国調査で約35%の牛がBLVに感染していると報告されており、2019年度には牛伝染性リンパ腫

の届出件数が4,000件を超えるなど、その発生は年々増加している^{1,2)}。リンパ腫を発症した牛は廃棄対象となり畜産業に大きな経済的被害を引き起こすため、BLV対策は臨床現場において重要な課題となっている。しかしながら、いまだ有効なワクチンや治療薬の実用化には至っていないため、現在の対策は一般的な衛生対策など限定的なものにとどまっている。

BLVは、そのゲノム中にタンパク質に翻訳されない非翻訳性RNAをコードしていることが知られているが、その機能はいまだ解明されていない。この非翻訳性RNAの一つであるAS1-Sは、潜伏感染状態である腫瘍細胞やBLVが持続感染している細胞株でも恒常的に発現しているため、BLV感染において重要な役割を果たすことが示唆される^{3,4)}。一般的に、非翻訳性RNAは宿主タンパク質と複合体を形成することでさまざまな遺伝子の発現を制御するため、その機能解明には結合パートナーとなる宿主タンパク質の同定が必要不可欠である。AS1-S RNAと結合する宿主タンパク質の同定は、BLVの病態進行や発症メカニズムの解明に大きく貢献することが期待される。

2. 方法

2.1 AS1-S cDNAのクローニングと発現プラスミド構築

BLV感染性クローン (pFLK-BLV) を導入した293T細胞から抽出したRNAをテンプレートとして、PrimeScrip One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いてAS1-S RNAのcDNAを増幅した。増幅した遺伝子断片をQIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) により精製し、In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech) を用いて発現プラスミドpCAG neoにクローニングした (pCAG/AS1-S)。さらに、pCAG/AS1-S から制限酵素処理によってAS1-S 遺伝子断片を切り

出し、RNA合成用プラスミドpSPT19に挿入した (pSPT19/AS1-S)。

2.2 AS1-S RNAの合成とビオチンラベル付加
RiboMAX Large Scale RNA Production Systems (Promega) を用いて、pSPT19/AS1-SのT7およびSP6プロモーターからAS1-S RNAおよびその相補RNAをそれぞれ合成した。合成したRNA断片にPierce RNA 3' End Biotinylation Kit (Thermo Fisher) を用いてビオチンラベルを付与したものをRNAプローブとした。

2.3 RNA-protein pull-down assay

BLV持続感染牛B細胞株であるBL3.1細胞 (ATCC CRL-2306) をRIPAバッファー (Thermo Fisher) で処理して調製した細胞抽出液をRNAプローブと混合し、Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit (Thermo Fisher) を用いてRNAプローブと結合する宿主タンパク質をpull-downした。

2.4 nanoLC-MS/MSによるタンパク質同定

2.3で調整したサンプルに4×Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad) を加えて95℃で5分間熱変性させ、SDS-PAGEで分離後、銀染色MSキット (Wako) で染色した。銀染色したゲルからAS1-S RNAプローブと特異的に結合したタンパク質バンドを切り出し、nanoLC-MS/MSによりタンパク質を同定した。

2.5 ウェスタンブロット解析

SDS-PAGEで分離したサンプルをPVDF膜に転写し、5%スキムミルクでブロッキング後、抗protein Xウサギ抗体または抗beta-tubulin抗体 (Merck) で室温1時間感作した。その後、HRP標識抗ウサギ抗体 (Zymed) または抗マウス抗体 (abcam) で室温1時間感作し、SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate (Thermo Fisher) でタンパク質を検出した。

2.6 AS1-S 持続発現MDBK細胞の作出

Nucleofector 2b (Lonza) を用いて pCAG/AS1-S を牛腎由来細胞株である MDBK 細胞に導入し, G418 (gibco) 存在下で培養して AS1-S 持続発現細胞 MDBK/AS1-S を作出した。コントロールとして, 空プラスミド pCAG neo を導入した MDBK/CAG 細胞を作出した。導入した遺伝子の発現確認のため, 培養細胞から抽出した RNA をテンプレートとして, PrimeScrip One Step RT-PCR Kit Ver.2 (TaKaRa) を用いて AS1-S RNA および beta-actin mRNA を検出した。

2.7 Poly (I : C) 刺激下における自然免疫関連遺伝子の発現量の解析

MDBK/AS1-S および MDBK/CAG 細胞を 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の poly (I : C) (Invivogen) 存在下で一晩培養し, RNA を抽出した。One Step PrimeScrip RT-PCR Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用いて自然免疫関連遺伝子である *OAS1*, *ISG15* および *Mx1* の発現量を測定し, *GAPDH* の発現量で補正して比較した。

3. 結果と考察

3.1 AS1-S RNA プローブの調製と AS1-S RNA が結合する宿主タンパク質の同定

BLV 感染性クローンを導入した細胞中の RNA から AS1-S cDNA 断片をクローニングし, T7 および SP6 ポリメラーゼを用いた *in vitro* 合成とビオチンラベルにより RNA プローブを調製した (Fig. 1)。調製した RNA プローブを BL3.1 細胞の抽出液と混合して pull-down した結果, SDS-PAGE/銀染色で 70kDa および 15-20kDa 付近に AS1-S 特異的に結合するタンパク質バンドが確認された (Fig. 2a)。興味深いことに, AS1-S の相補 RNA をプローブとしたコントロール RNA にも, 30kDa および 50kDa 付近に特異的なバンドが認められた。AS1-S 特異的に結合した 70kDa

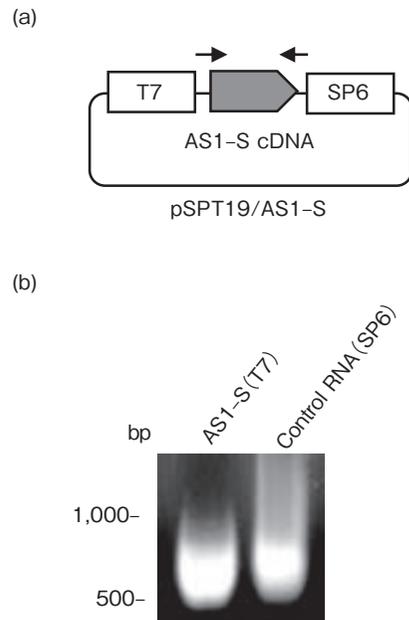


Fig. 1 (a) Schematic diagram of constructed plasmid. AS1-S cDNA was flanked by T7 or SP6 promoters and transcribed from both strands. (b) Gel electrophoresis of synthesized RNA.

および 15-20kDa 付近の 2 本のバンドを切り出し nanoLC-MS/MS 解析に供試した結果, 70 kDa 付近のバンドが protein X として同定された。15-20kDa 付近のバンドについては, 本解析では有意な結果を得ることができなかった。ウェスタンブロットによる解析の結果, AS1-S RNA で pull-down したサンプルにのみ protein X が検出され, protein X が AS1-S RNA と特異的に結合することが示された (Fig. 2b)。

protein X は核内に存在する RNA 結合タンパク質であり, mRNA のプロセッシングなどに関与するとともに, ウイルス感染時の自然免疫経路においても重要な役割を果たすことが報告されている。そのため, AS1-S RNA は protein X と結合することでその機能に干渉し, さまざまな遺伝子発現を上流工程から制御している可能性が示唆された。

なお, 相補 RNA サンプルに特異的に認められ

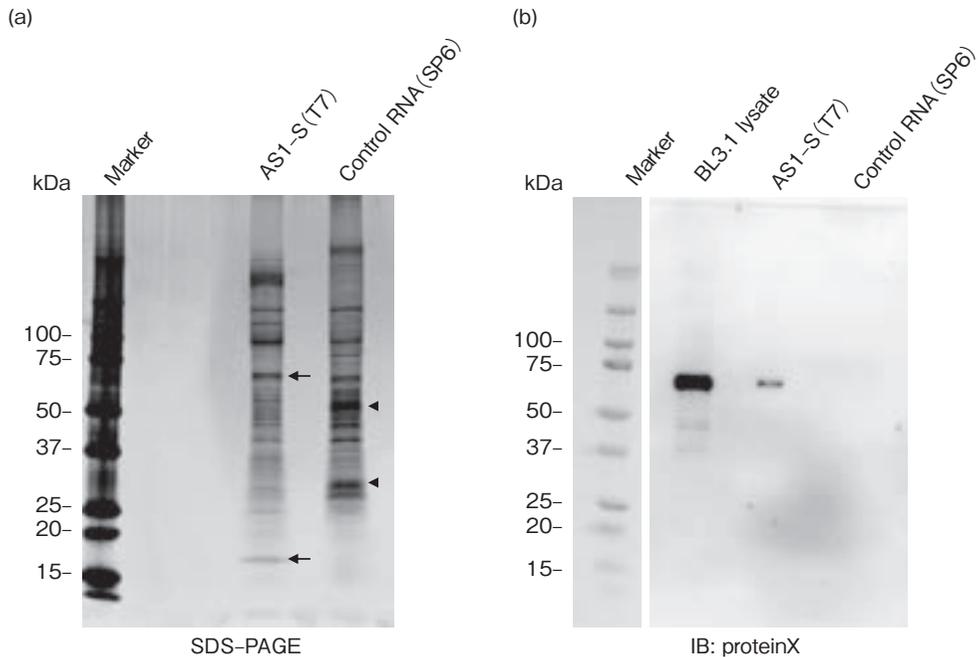


Fig. 2 SDS-PAGE or immunoblot analysis of precipitated samples. Precipitated samples were separated by SDS-PAGE, followed by silver stain (a) or immunoblot analysis using anti-protein X antibody (b). Arrows or arrow heads indicate specific bands in AS1-S or control RNA, respectively.

たバンドについては、相補配列中に含まれるBLV LTR由来配列が何らかの宿主由来プロモータータンパク質と結合したのではないかと考えられたが、今回は解析を実施しなかった。

3.2 AS1-S RNAを持続発現するMDBK細胞の解析

AS1-S RNAを持続発現するMDBK細胞のprotein X発現を解析した結果、ウェスタンブロット解析ではMDBK/AS1-SおよびMDBK/CAG細胞でprotein Xの発現量に差は認められなかった (Fig. 3)。Poly (I : C) 刺激時の自然免疫遺伝子発現を比較すると、MDBK/AS1-S細胞は対照細胞であるMDBK/CAG細胞と比較して*OAS1*、*ISG15*および*Mx1*の発現量が低下していた (Fig. 4)。

Poly (I : C) 刺激条件下で*OAS1*、*ISG15*および*Mx1*の発現量に有意な差が認められたことから、AS1-S RNAがprotein Xと結合することで感

染細胞における自然免疫シグナルに干渉している可能性が示唆された。

4. 要 約

牛白血病ウイルス (BLV) は、牛のB細胞に感染して致死性のリンパ腫を引き起こし、畜産業に大きな経済的被害を与える病原体である。BLVの病態メカニズムを解明するためにこれまでさまざまな研究が行われてきたが、その発症メカニズムの詳細はいまだ解明されていない。近年、BLVが潜伏感染している細胞において宿主免疫に捕足されずに恒常的に発現しているウイルス由来非翻訳性RNAが重要な病原因子ではないかと注目を集めている。BLVは、そのゲノムのantisense鎖にAS1-SおよびAS1-Lという二つのアイソフォームからなる非翻訳性RNA AS1をコードしており、AS1-S RNAはリンパ腫細胞とBLV持続感染細胞株の両方において恒常的に発現している

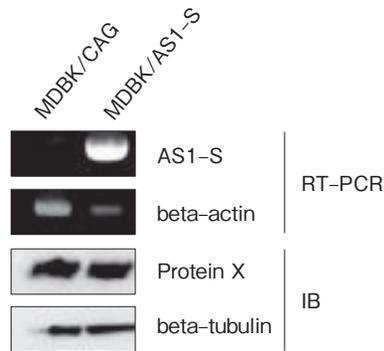


Fig. 3 Confirmation of the expression of AS1-S RNA and protein X in established cells. Expression of AS1-S RNA and control mRNA (beta-actin) were confirmed by RT-PCR, and expression of protein X and control protein (beta-tubulin) were detected by immunoblot analysis.

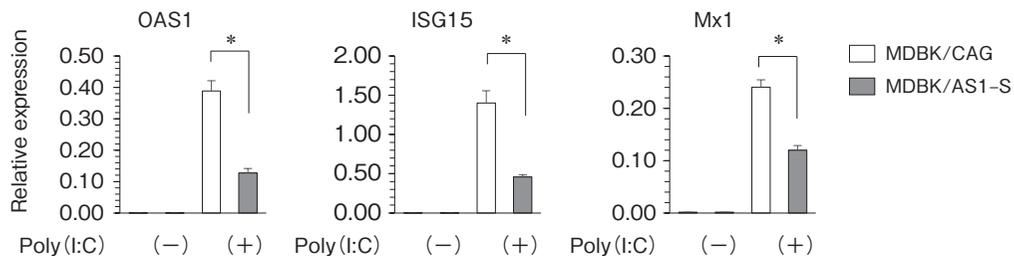


Fig. 4 Quantitative RT-PCR of interferon-stimulated genes in established cells. Expression of *OAS1*, *ISG15* and *Mx1* in the presence or absence of poly (I : C) were normalized to the expression of GAPDH. t-test was used for the statistical analysis (n=3).

ことが過去の報告により明らかとなっている。この事実は、AS1-S RNAがBLV感染細胞において重要な役割を担っていることを示唆している。本研究において、我々はAS1-S RNAの機能の一端を解明するためにAS1-S RNAと結合する宿主由来タンパク質の同定を試みた。その結果、RNA-protein pull-down assayとLC-MS/MS解析の組み合わせにより、宿主タンパク質XがAS1-S RNAと結合することを明らかにした。タンパク質XはRNA結合タンパク質の一種であり、mRNAのプロセッシングや自然免疫に関与することが報告されている。AS1-S RNAを持続発現

するMDBK細胞は、対照細胞と比較してpoly (I ; C) 刺激条件下におけるインターフェロン誘導性遺伝子*OAS1*、*ISG15*および*Mx1*の発現が低下していた。この結果は、AS1-S RNAがタンパク質Xとの相互作用により自然免疫シグナルに干渉していることを示唆している。これらの発見はBLVの感染動態の理解に役立つものと思われる。

文 献

- 1) Murakami, *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123~1126, 2013.
- 2) 農林水産省：監視伝染病発生年報
- 3) Durkin, *et al.* : *Retrovirology*, **13**, 33, 2016.
- 4) Andoh, *et al.* : *Arch. Virol.*, **165**(12), 2869~2876, 2020.

豚消化器病ウイルスの感染メカニズムを解明する ための豚腸管オルガノイドを用いた画期的な インビトロ実験感染系の開発

Development of a new *in vitro* experimental system using swine intestinal organoid to clarify infection mechanism of porcine enteric viruses

鈴木 亨

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構動物衛生研究部門)

Tohru Suzuki

(National Institute of Animal Health, NARO)

Diarrheas that caused by mainly swine enteric viruses, are one of major diseases in pigs, resulting in severe economic losses. It is important for uncovering of their infection mechanisms in order to control and treat enteric viruses in pigs. However, it is often difficult to cultivate swine enteric viruses using a cell culture in laboratory. It is also difficult to conduct experimental infections of swine enteric viruses using animals, because of animal welfare in addition to huge costs, labors, and specific facility. Therefore, it is important to establish a new experimental tool that can observe infectious dynamics of swine enteric viruses.

Intestinal organoid, mini organ that mimic *in vivo* intestine produced in three dimensions *in vitro* have been recently constructed in mice, pigs, and humans. In addition, a previous study reported that human norovirus which had yet been isolated for a long time using various cell cultures could cultivate in human intestinal organoid. In this study, I attempted to validate whether swine intestinal organoid that derived from a natural host is useful to cultivate effectively swine enteric viruses. In experimental infection into swine intestinal organoids using two major swine enteric viruses (porcine epidemic diarrhea virus and porcine deltacoronavirus), the analysis with quantitative real-time RT-PCR revealed that their virus loads reached at peak (increase of over 10^2 - 10^3 times from initial doses) on 24 hours after infection, and then kept on the level. Moreover, the data showed that two swine enteric viruses isolated from swine intestinal organoid had also their infectivity after passage. These findings demonstrated that swine intestinal organoid would be a useful experimental tool to observe infectious dynamics of swine enteric viruses.

1. 目 的

家畜の下痢は、発育や体調管理の阻害要因であり、生産活動に影響を与えるため容易に看過することはできない。下痢は肺炎とともに、家畜の2

大疾病に位置付けられ、我が国の下痢による被害額は年間100億円を上回ると試算されている。家畜に下痢を引き起こす大半の原因はウイルスであり、ウイルスの制御法を確立するためにはその性状や感染メカニズムを知ることが重要である。従

来は実験室内で維持・管理できる単層の培養細胞を用いたインビトロ実験感染系あるいは家畜への感染実験を通じて、それらウイルスの性状解析や感染メカニズム解明が行われてきた。しかしながら、消化器病ウイルスは一般的に培養細胞で分離することが困難である。また仮に分離できたとしても、ウイルスが増殖する細胞は本来の自然宿主に由来するものではなく、異種動物に由来するものが多いことから、細胞環境の相違に伴いウイルスの性状や反応が変化するという問題点を含んでいる。一方、家畜を用いた感染実験は一度に多くの動物を必要とすることやそれに伴う多大な費用と労力、特殊な施設や設備を必要とすることから、豚や牛などの中・大型動物での実施は困難である。そのうえ、家畜に消化器病ウイルスを接種しても感染が成立しないことや無症状のまま経過するといったリスクを伴うなどの問題点を含んでいる。さらに、社会環境の変化に伴い、動物福祉の観点から動物実験の削減が強く求められているとともに、リスク管理の観点からも中・大型動物を用いた感染実験の実施は今後ますます困難となる。

本研究では、ヒトなどに比べて研究が遅れている豚消化器病ウイルスの感染メカニズムの研究を飛躍的に進展させるため、本来の自然宿主である豚の腸管に由来する豚腸管オルガノイド^{1,2)}に注目し、それを用いた消化器病ウイルスのインビトロ実験感染系を開発することで豚の感染実験に代わる画期的な研究ツールを開発することを目的とする。なお、腸管オルガノイドは腸管構造を疑似した3次元構造体であり、これまで分離がきわめて困難であったヒトノロウイルスの分離に初めて成功している^{3,4)}。

2. 方 法

豚消化器病ウイルスである豚流行性下痢ウイル



Fig. 1 Photo of swine intestinal organoid

ス (PEDV)、豚デルタコロナウイルス (PDCoV) は通常それぞれVero細胞 (アフリカミドリザル腎細胞)、ST細胞 (豚精巢細胞) で分離することが可能である。しかしながら、それらウイルスの分離を本来の自然宿主である豚の腸管由来細胞を用いて試みた報告はない。そこで、ウイルス分離における豚腸管オルガノイドの有用性について以下のように解析・検討した (Fig. 1)。

2.1 ウイルスとインビトロ接種試験

豚消化器病ウイルスとして、PEDV OKN/JPN/2014分離株 (ウイルス力価 10^4 TCID₅₀/mL) とPDCoV YMG/JPN/2014分離株 (ウイルス力価 10^6 TCID₅₀/mL) を使用した。96ウエルプレートに播種した豚小腸オルガノイドに対して上記2種類のウイルス1/100希釈液をそれぞれ接種 (37°Cで1時間吸着) した後、経時的に次の6点 (接種後0時間、8時間、24時間、32時間、48時間、56時間) で培養上清を回収した。

2.2 ウイルスRNAの定量解析

回収した培養上清の一部からQIAamp Viral RNA Mini Kit (キアゲン社、オランダ) を用いて、プロトコルに従ってウイルスRNAを抽出した。それらRNAについて、PEDVあるいはPDCoV特異的プライマーおよびプローブを用いたリアルタイムRT-PCR定量解析を実施し、ウイルスの増殖性を観察・解析した。なお、リアルタイムRT-PCRはQuantStudio[®] 3リアルタイムPCRシステム (Thermo Fisher Scientific社、アメリカ) を

使用し、それぞれのウイルスに対するリアルタイムRT-PCRの詳細はTable 1にまとめた。

2.3 感染性の確認

経時的に回収した培養上清の残りを再度豚腸管オルガノイドに接種して、分離ウイルスの感染性を検証し、インビトロ実験感染系としての有用性を確認した。

3. 結果と考察

3.1 ウイルスRNAの定量解析

経時的に回収した培養上清より抽出したウイルスRNAを用いて、それぞれのウイルスについて上記の方法に従ってリアルタイムRT-PCRによる定量解析を実施した。その結果、いずれのウイルスも接種後24時間をピークとするウイルスの増殖（接種後0時間と比べ $10^2 \sim 10^3$ 倍以上）が認めら

Table 1 List of primers and probes used in quantitative real-time RT-PCR

Virus	Target gene	Primers and probe sequence*	Reaction condition Reagent : Luna Universal Probe One-Step RT-qPCR kit (NEB)
Porcine epidemic diarrhea virus (PEDV)	N	Forward : 5'-GAA TTCCAAGGGCGAAAAAT-3'	55°C for 10 min and 95°C for 1 min, followed by 45 cycles of 95°C for 10 sec and 60°C 30 sec
		Reverse : 5'-TTTTCGA-CAAATTCGCATCT-3'	
		FAM-G TAGCAGCTTGCTTCGACCCA-TAMRA	
Porcine deltacoronavirus (PDCoV)	M	Forward : 5'-ATCGACCACATGGCTCCAA-3'	55°C for 10 min and 95°C for 1 min, followed by 45 cycles of 95°C for 10 sec and 60°C 30 sec
		Reverse : 5'-CAGCTCTTGCCCATGTAGCTT-3'	
		FAM-CACACCAGTCGTTAAGCATGGCAAGCT-TAMRA	

*See reference^{5, 6)}

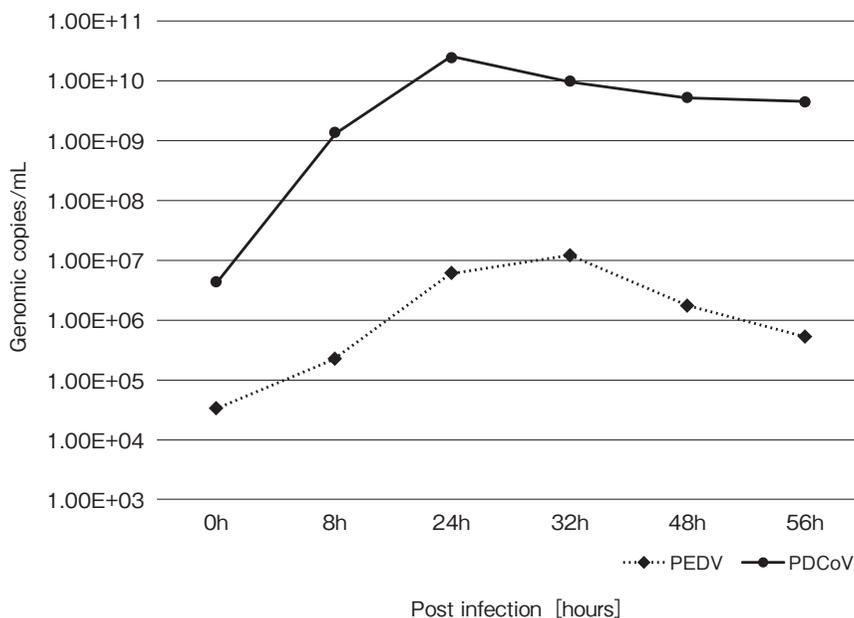


Fig. 2 Growth curves of porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) and porcine deltacoronavirus (PDCoV) in swine intestinal organoid

れ、その後プラトーに達することを確認した (Fig. 2)。このことは豚腸管オルガノイドが豚消化器病ウイルスの分離に適していることを示しており、今後それが豚消化器病ウイルスのインビトロ実験感染系の有用なツールとなり得ることを示唆している。

3.2 感染性の確認

回収した培養上清を再度豚腸管オルガノイドに接種し、その感染性を検証した結果、分離されたウイルスは感染性を維持していることを確認した。このことは豚腸管オルガノイドが性質上、生体に近い環境を有していることを示唆している。

4. 要 約

豚消化器病ウイルスによって引き起こされる下痢は豚における重大疾病の1つであり、その経済的被害は甚大である。豚消化器病ウイルスの制御法および治療法を開発するためには、それらの感染機構を明らかにすることが重要である。しかしながら、豚消化器病ウイルスは単層の培養細胞での分離が難しく、また生体を用いた感染実験は労力や費用、施設の問題に加えて、動物福祉の観点から実施は困難である。そのため、豚消化器ウイルスの感染機構を解明するための新たな研究ツールの開発は急務の課題である。

近年、生体の腸管構造を模倣した3次元構造体である腸管オルガノイドがマウス、豚、ヒトでそれぞれ樹立された。また、この腸管オルガノイドを用いることで、これまでさまざまな培養細胞で分離が困難であったヒトノロウイルスが初めて分離された報告がある。本研究では、本来の自然宿主に由来する豚腸管オルガノイドが豚消化器病ウイルスの効率的な分離に有用であるか否かを検証

した。豚腸管オルガノイドに2種類の豚消化器病ウイルス（豚流行性下痢ウイルスおよび豚デルタコロナウイルス）を感染させ、経時的にそれらの増殖性を定量リアルタイムRT-PCRで解析した結果、いずれのウイルスも豚腸管オルガノイドで効率的に増殖することが明らかとなった。また、豚腸管オルガノイドで豚消化器病ウイルスを継代した後もその感染性が維持されることを確認した。以上のことから、豚腸管オルガノイドは今後、豚消化器ウイルスの感染機構を解明するうえで有用なツールとなることが示された。

文 献

- 1) Sasaki, N., Sato, T., Clevers, H. : Chapter 8-Intestinal Epithelial Lgr5⁺ Stem Cell Niche and Organoids, In : *Biology and Engineering of Stem Cell Niche* (Academic Press), pp.111-125, 2017.
- 2) Sugimoto, S., Sato, T. : Establishment of 3D intestinal organoid cultures from intestinal stem cells, *Methods Mol Biol*, **1612**, 97-05, 2017.
- 3) Ettayebi, K., Crawford, S. E., Murakami, K., Broughman, J. R., Karandikar, U., Tenge, V. R., Neill, F. H., Blutt, S. E., Zeng, X. L., Qu, L., Kou, B., Opekun, A. R., Burrin, D., Graham, D. Y., Ramani, S., Atmar, R. L., Estes, M. K. : Replication of human noroviruses in stem cell-derived human enteroids, *Science*, **353**, 1387-1393, 2016.
- 4) Ramani, S., Crawford, S. E., Blutt, S. E., Estes, M. K. : Human organoid cultures : transformative new tools for human virus studies, *Curr Opin Virol*, **29**, 79-86, 2018.
- 5) Suzuki, T., Shibahara, T., Yamamoto, T., Nakade, K., Yamaguchi, R., Miyazaki, A., Ohashi, S. : Pig epidemic diarrhoea virus S variant with a large deletion non-lethal to colostrum-deprived newborn piglets, *J Gen Virol*, **97**, 1823-1828, 2016.
- 6) Suzuki, T., Shibahara, T., Imai, N., Yamamoto, T., Ohashi, S. : Genetic characterization and pathogenicity of Japanese porcine deltacoronavirus, *Infect Genet Evol*, **61**, 176-182, 2018.

アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究（Ⅲ）

Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan

杉浦 勝明・芳賀 猛

(東京大学大学院農学生命科学研究科)

Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga

(Laboratory of Global Animal Resource Science, Department of Global Agricultural Sciences, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

A risk assessment was conducted to assess the risk of ASFV entry into Japan through pork products illegally brought in by air passengers from China and fed to pigs in Japan. Scenario tree modelling was used with the following entry and exposure pathway considered to be the most likely route of ASF entry : an ASFV infected pork product is illegally brought into Japan by air travellers from China ; this pork product is then used in a restaurant where scrap waste is recycled for animal feed and subsequently fed to pigs without being heat-treated. Input parameter values were based on surveys conducted by the authors, scientific data gathered from the literature and official data published by government agencies. The annual probability of ASFV entry into Japan via this pathway was predicted to be 0.20 (90% prediction interval : 0.00-0.90). The wide prediction interval was mainly caused by the uncertainty regarding the dose response relation of ASFV, followed by the probability of an ASF infected pig dying on affected farms, the loading of ASFV in an infected pig and the probability of an illegally imported pork product being heat-treated in China and used in restaurants. The results of scenario analysis revealed that the annual probability of ASFV entry into Japan will increase with an increase in the number of ASF affected farms in China. The probability of ASFV entry will increase substantially even if only a small proportion of Ecofeed is not heat-treated during the production process. The probability will decrease if an increased proportion of farms that feed swill apply heat-treatment before feeding swill to their pigs. These findings indicate that stringent application of heat-treatment of Ecofeed and swill is key to protecting the Japanese pig industry from the introduction of ASFV.

1. 目 的

アフリカ豚熱（ASF；旧名称：アフリカ豚コレラ）は、ASFウイルスによって引き起こされる豚やイノシシの感染症である。きわめて伝播力

が高く、ダニや感染動物との直接的または間接的接触により感染する。発症すると発熱や全身性のチアノーゼを呈し致死率が高い。有効なワクチンや治療法は存在せず、国内で発生した場合には養豚産業に甚大な被害をもたらすため、家畜伝染病

予防法に基づき家畜伝染病に指定されている。

ASFウイルスは動物の感染症の原因となるウイルスでは最も複雑な構造をしたウイルスの1つである。大型のDNAウイルスで、ゲノムサイズは170~190キロバイトである。ウイルスの直径は200nmで、100以上の構造タンパクを有する。さまざまな遺伝子変異が認められており、現在22のジェノタイプが存在する。

ASFウイルスが感染する宿主はさまざまであり、複雑な関係にある。アフリカではイボイノシシが感染するが、ウイルスの血中濃度はイボイノシシの体内では高くなく、症状を表さない。血中濃度は1 ml中に数百個程度であるが、ヒメダニが吸血し感染するには十分な濃度で、ヒメダニが感染すると体内でウイルスが増殖する。ヒメダニがほかのイノシシや豚を吸血すると、イノシシや豚は感染する。このようにして、アフリカではウイルスが長期間にわたり維持されている。ヨーロッパではアフリカと少し異なる様相がみられる。ウイルスは家畜の豚のほかイノシシにも感染するが、アフリカと異なり、イノシシも豚と同様の臨床症状を示す。ヨーロッパにもヒメダニが生息しており、感染しASFウイルスを媒介することが判明している。また、ヒメダニを介さずにASFウイルスが広がることも知られている。

ASFウイルスは加熱に弱く、70℃30分の加熱により死滅するが、他の処理には抵抗性を示し、豚肉や豚肉製品中には長期間生存する¹⁾。感染した豚の糞、尿、血液などにも長期間生存し、これらにより汚染された衣服などは感染源となる。ASFに感染した豚の組織中のウイルス濃度は、ウイルスが赤血球に吸着していることもあり、きわめて高いことが分かっている^{2,3)}。このこともASFの伝搬力の強さに影響していると考えられる。

ASFは2006年まで主にアフリカで発生が確認

されていたが、2007年コーカサス諸国に侵入後、東欧諸国およびロシアに広がっている。2018年中国で初めて確認され、2019年にはアジア13か国に広がり、日本への侵入リスクはかつてなく高まっている。

ASFウイルスは、前述のとおり豚肉や豚肉製品中に長期間生存することから、かつて豚肉製品の違法持ち込みにより侵入を許した事例が多数報告されている（スペイン、キューバ、ブラジル、モーリシャス、ジョージアなど）。我々の先行研究においても豚肉製品の違法輸入が侵入経路として最も可能性が高いことが指摘され、中国からの航空旅客の2.8%が豚肉製品を違法に持ち込んでいることが確認されている⁴⁾。本研究では、中国からの航空旅客によって不法に持ち込まれた豚肉製品が加熱されずに残飯として日本の豚に給与されることが最も可能性の高いASFの侵入経路と考え、この経路による侵入確率を定量的に予測した。

2. 材料と方法

2.1 リスク評価モデル

本研究で使われたリスク評価モデルの考え方はFig. 1のとおりである。最終的に加熱処理されずに残飯として豚に給与される感染豚肉製品重量に、単位重量あたりのウイルス量（ウイルス濃度）を乗じることで、国内の豚が摂取するウイルス量（ $L_{exposure}$ ）を計算し、この値とドーズレスポンスの関係と給与される豚の頭数（ n ）から、少なくとも一頭の豚が感染豚肉製品を含む残飯を給与されて感染する確率（ $P_{introduction}$ ）を予測した。

$$P_{introduction} = 1 - (1 - P_{infection})^n$$

ここで $P_{infection}$ は、感染豚肉製品を含む残飯を摂取した豚が感染する確率で、以下のドーズレスポンスの関係から推定した（ c は係数）。

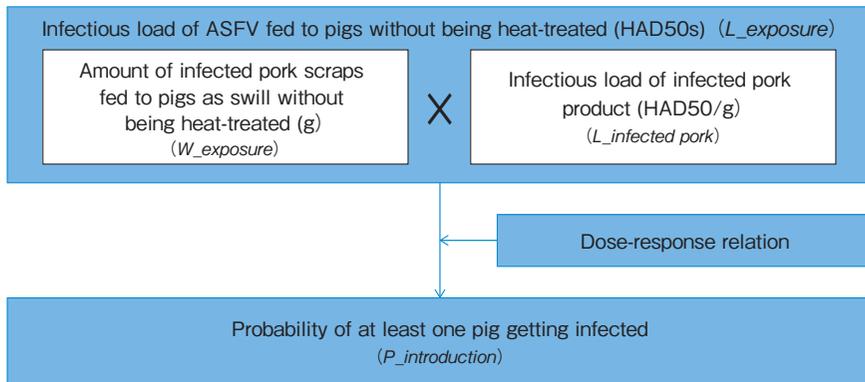


Fig. 1 Model structure for assessing the probability of ASF introduction

$$P_{infection} = 1 - \exp(-c \times L_{exposure}/n)$$

中国から違法に輸入される感染豚肉製品のうち最終的に加熱されずに残飯として豚に給与される感染豚肉製品の重量の推定にあたっては、感染豚から生産された豚肉を原料として製造された豚肉製品が中国国内で十分な加熱処理されておらず、また、日本国内に持ち込まれて外食産業で調理残差として排出され、最終的に飼料として再利用されるケースを想定した (Fig. 2)。

2.2 入力変数の値

輸入される感染豚肉重量の推定にあたっては、昨年度の研究成果⁴⁾をもとに中国からの航空旅客の2.8%、すなわち、約18万人の中国人が豚肉製品を違法に持ち込むと予測した。一人あたりの持ち込む重量は、動物検疫所の公表データから平均0.834kg、標準偏差1.139の対数正規分布 (Fig. 3) に従うと仮定し、さらに別の先行研究⁵⁾からこのうち2kg以上の場合にはレストランで使われると仮定した。

感染豚肉製品の単位重量あたりのウイルス量については、ASFVはさまざまな処理に対し抵抗性があり、環境中にも長く生存することから、残飯として給与される時点の豚肉製品中には感染豚の筋肉中と同一の濃度でウイルスが存在すると仮定し、先行研究の結果から1mlまたは1gあたり

103.8~105.0HAD₅₀と仮定した (HAD₅₀は50%の確率で血球凝集を生じさせるウイルス濃度)。

ASFVのドーズレスポンスの関係については、過去にさまざまな感染実験が実施されている。1990年代には感染を起こすには105HAD₅₀のウイルス量が必要とされていたが、最近では液体で給与すると100HAD₅₀で感染が成立したという研究報告があり、これらの知見を反映させた確率分布を用いた (Fig. 4)。

このリスク評価モデルの変数に入力するデータについては、上述のとおり文献調査のほか、政府公表統計資料に基づき推定した。エコフィードについてはベースラインモデルでは製造工程で100%加熱処理されると想定した。一部の変数については、データの不確実性を反映した確率変数を入力して、統計ソフト@Risk (Palisade社)を用いて繰り返し計算することにより、確率論的な評価を行った⁶⁾。

3. 結果と考察

中国から違法に輸入される豚肉製品が加熱されずに残飯として豚に給与されることで、ASFが日本に侵入するリスクは20%と予測された (90%予測区間: 0~90%)。予測区間が広く不確実性が高いのは、主にASFウイルスのドーズレスポ

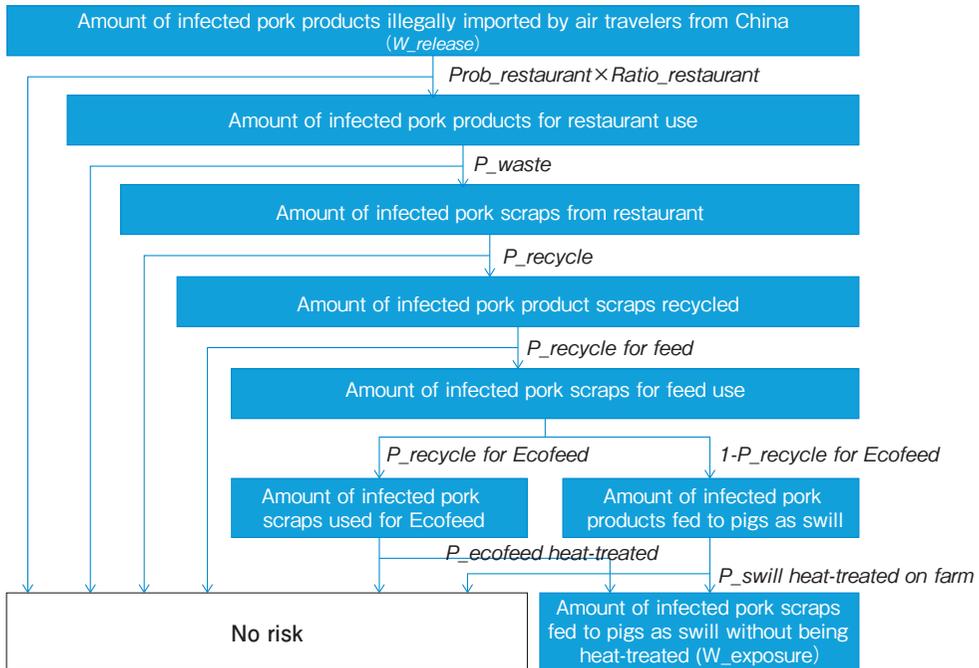


Fig. 2 Model structure for estimating the amount of infected pork scraps fed to pigs as swill without being heat-treated ($W_{exposure}$)

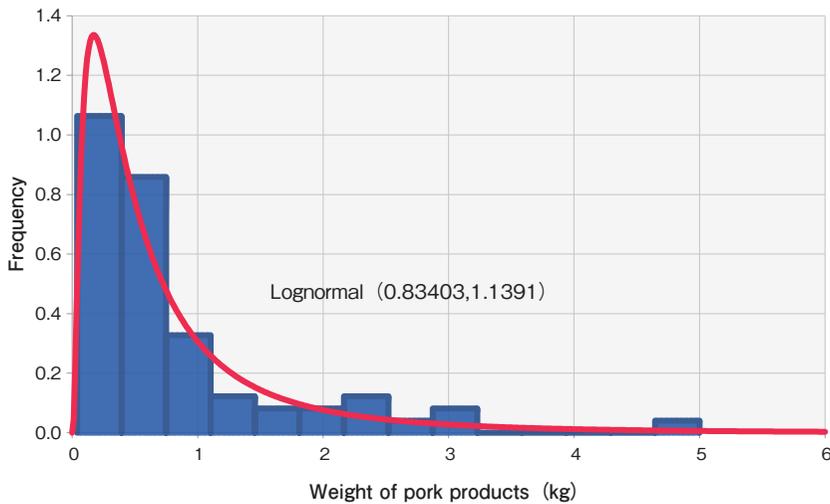


Fig. 3 Frequency distribution of the weight of pork products tested positive by the Japanese Animal Quarantine Service during the period from 1 October to 18 February 2020 (columns), fitted with a log-normal distribution (line) with a mean of 834g and a standard deviation of 1,139g.

ンス関係の不確実性、ASF発生農場における豚の死亡率、感染豚の筋肉中でのASFウイルス量および違法に輸入された豚肉製品が中国で十分に

加熱されている確率の不確実性に起因している。また、シナリオアナリシスを行い、中国におけるASF発生農家数、豚肉製品の違法持ち込み率、

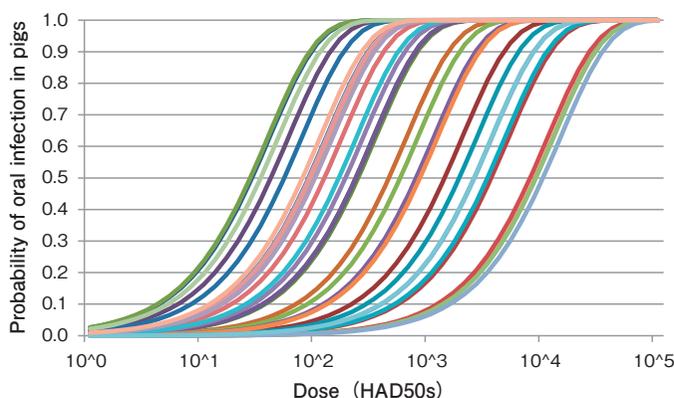


Fig. 4 Dose response curves depicting the model $P_{infection} = 1 - \exp(-c \times \text{dose (HAD}_{50}\text{s)})$, where $c = 10^4 \text{Uniform}(-4.155, -1.558)$. This dose response model assumes any doses between 25 HAD₅₀s and 10^3 HAD₅₀s as a median infectious dose. 30 dose response curves randomly selected from the model are shown to provide a visual image of the distribution.

エコフィードの十分な加熱処理の確率、養豚農家における残飯の加熱確率の値を変化させると侵入リスクがどのように変化するかについても検証した (Fig. 5)。中国でのASF発生の農家数が増加すると日本への侵入リスクが高まることが分かった。例えば、中国でのASF発生農家数が10倍になると日本への侵入リスクは現在の20%が51%に上昇する。

豚肉製品が違法に輸入される確率が上がると、日本へのASFの導入リスクが上がる事が分かった。豚肉製品の違法輸入率がベースラインの2.8%から1%に減少すると、侵入リスクは10%に減少するが、違法輸入率が10%に増加すると侵入リスクは35%に上昇する。

エコフィードの製造過程での加熱処理が不十分であるとASF侵入リスクは上昇する。ベースラインモデルでは、エコフィードはすべて製造過程で70℃30分で加熱されておりウイルスは不活化されると仮定したが、仮に1割が加熱不十分であった場合、侵入リスクは38%に上昇することが分かった。ASFVは実験により56℃70分または60℃20分で不活化されることが示されているが、エコ

フィードの原料となる食品廃棄物の成分によっては、この加熱処理を行ってもASFVが不活化されない可能性があるとしてされている。また、エコフィードの原料として使われる食品廃棄物は多様であるため、均一な加熱が行われない可能性があり、一部の成分はASFVを保護する可能性があるからである。このため、国際獣疫事務局 (OIE) は残飯の加熱処理方法として、継続的に攪拌しながら90℃60分間または3 bar 121℃10分間の加熱を推奨していることを考えると、熱処理条件の強化も検討する必要があると考えられた。

残飯を給与する農場では、残飯の加熱処理を行うことで侵入リスクを大幅に下げることができると分かった。ベースラインモデルでは残飯給与農家の57%が加熱処理を行っているとして仮定したが、99%が加熱処理すれば侵入リスクはゼロに近づく。

さらに、エコフィードの加熱処理と農家における加熱処理のどちらが重要かを検証するために二次元シナリオ分析の結果、エコフィードの加熱処理が不十分だと急激に侵入リスクが上がる事が分かり、エコフィードの加熱処理を確実に実施することが重要であることが判明した (Fig. 6)。

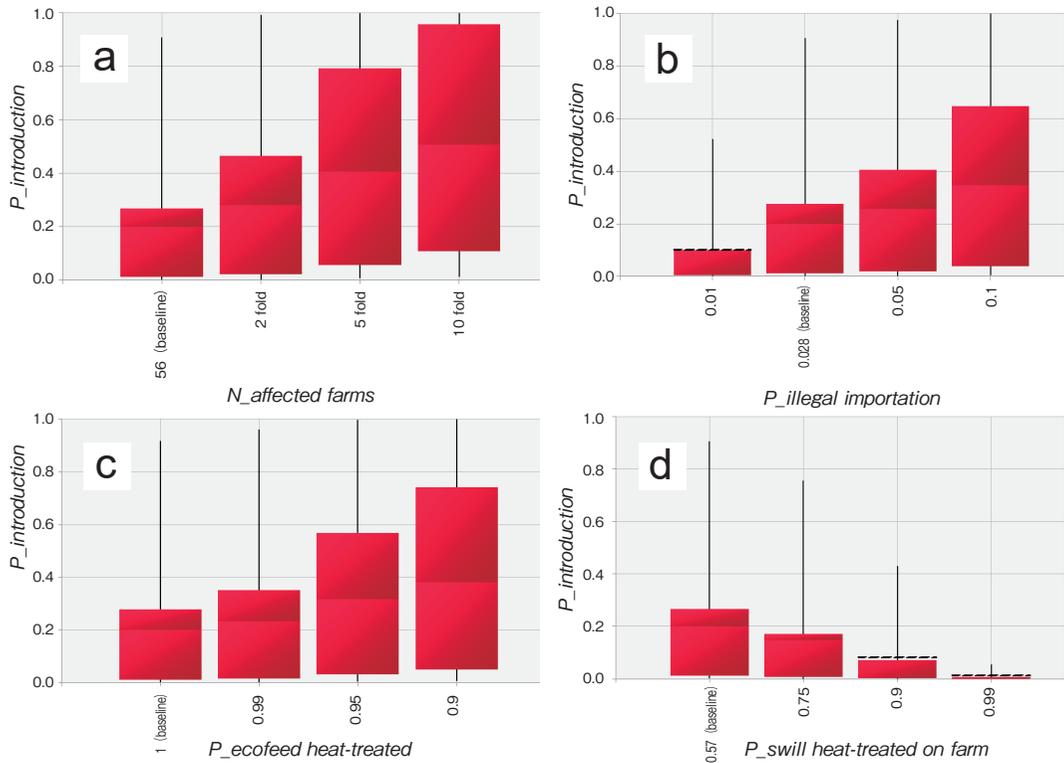


Fig. 5 Scenario analysis depicting the effects of tested scenarios on the probability of at least one pig becoming infected by consuming untreated swill originating from pork products illegally imported by air travelers from China ($P_{introduction}$). For each box-whisker plot, the line in the box indicates the mean; the length of the box indicates the inter-quartile range; the whiskers indicate the 5th percentile and the 95th percentile respectively. For Fig. 5b and Fig. 5d, fixed values of 0.028 and 0.57 were used as the baseline respectively.

2020年に入り新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) 流行下でさまざまな水際対策, 国内での流行防止対策がとられた結果, 侵入リスク評価モデルで使われた入力変数のうち, 中国からの航空旅客数の減少およびレストランの営業時間短縮に伴う食品廃棄物量の減少が考えられた。そこで, これらの入力変数を変化させて今年に入ってからからの侵入リスクの予測を行った⁷⁾。

すなわち, COVID-19の防疫対応の一環として, 日本政府は2020年2月14日のCOVID-19を検疫法に基づく検疫対象疾病に指定し, 日本への旅行者に対して入国制限を課すなどの措置をとった結果, 2020年の最初の6か月間, 中国からの航空旅客数は対前年比で, 1月+22.6%, 2月-87.9%,

3月-98.5%, 4月-99.97%, 5月-99.996%, 6月-99.97%と, 2月以降大幅に減少した。

レストランの営業時間短縮については, 2020年2月最終週の日本政府による大規模なイベントの中止要請, 3月下旬の東京都知事による外出制限要求, 4月7日の総理大臣による東京その他6県の住民への不要不急の外出制限の緊急要請, レストランの営業時間短縮の要請などにより, レストランの活動は大幅に減少した。日本フードサービス協会の調査によると, 2020年1~6月のダイナーレストランの売上高は対前年比で, それぞれ102.3%, 97.4%, 59.5%, 16.0%, 28.5%, 57.0%であった。違法輸入された豚肉製品を含む食品廃棄物は, これらの割合で減少したと仮定した。

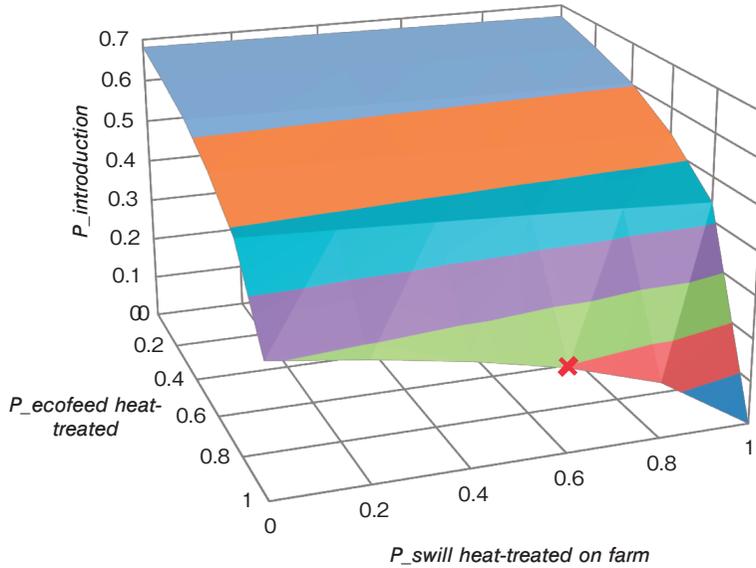


Fig. 6 Two-way scenario analysis depicting the effects of $P_{ecofeed\ heat-treated}$ and $P_{swill\ heat-treated\ on\ farm}$ on the mean value of $P_{introduction}$. The red X indicates the mean value of $P_{introduction}$ with $P_{ecofeed\ heat-treated}$ and $P_{swill\ heat-treated\ on\ farm}$ taking the baseline values (1.0 and Beta (8, 6) respectively).

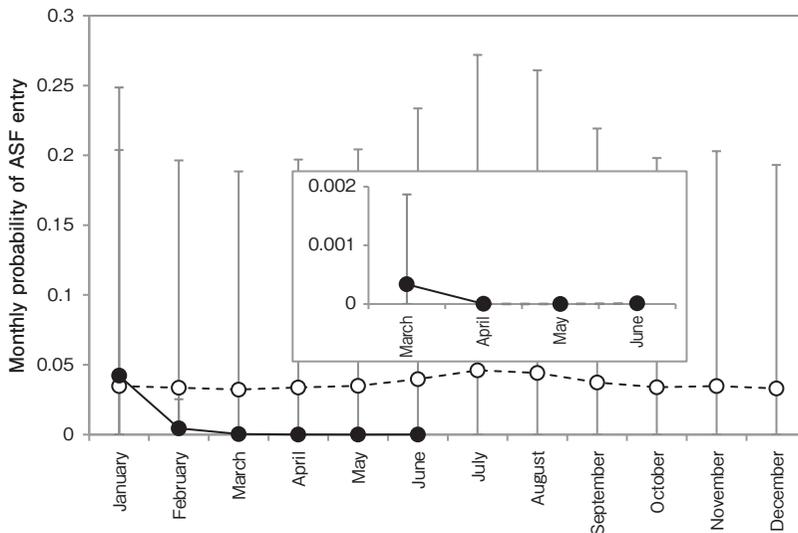


Fig. 7 Monthly risk of ASF entry into Japan during 2019 (dotted line with open circles) and 2020 (solid line with filled circles). Circles indicate the mean and error bars 90% prediction intervals. Inset shows the months March-June 2020 in more detail.

これら2つの入力変数を変化させて、月間侵入確率を計算したところ、2020年1月4.2% (90%予測区間: 0.0~24.9%), 2月0.45% (0~2.5%), 3月0.03% (0~0.2%), 4月0.0002% (0~

0.001%), 5月0.00005% (0~0.0003%), 6月0.0009% (0~0.005%)であった (Fig. 7の実線)。前年の月間侵入確率が4%前後であった (Fig. 7の破線) ことを考えると、10分の1から

7万分の1に減少したことになる。

4. 要 約

中国からの航空旅客によって不法に持ち込まれる豚肉製品によりアフリカ豚熱が日本へ侵入するリスクを予測するためリスク評価を行った。以下の侵入および曝露経路による侵入リスクが最も高いと考え、シナリオツリーを作成しモデルを構築した。すなわち、アフリカ豚熱ウイルスに汚染された豚肉製品が中国からの航空旅客により違法に日本に持ち込まれ、その豚肉製品が外食産業で使用され、その調理残渣が飼料の原料として再利用され、加熱処理されずに豚に供給される場合に侵入すると仮定した。入力パラメータの値は、著者が先行して実施した調査結果、文献調査および政府機関公表のデータに基づき推定した。その結果、この経路によりアフリカ豚熱が日本に侵入する年間確率は0.20 (90%予測区間: 0.00-0.90) と予測された。広い予測区間は、アフリカ豚熱ウイルスの用量反応関係に関する不確実性が最大の原因であり、続いて発生農場における感染豚の死亡確率、感染豚の筋肉中のアフリカ豚熱ウイルス濃度、違法に輸入される豚肉製品が中国内で加熱処理されている確率の不確実性が原因であった。また、シナリオ分析の結果、中国でのアフリカ豚熱発生農場数が増えると、日本に侵入する年間確率が上昇し、製造工程で十分に加熱処理されていないエコフィードが一部でも存在すると、アフリカ豚熱の侵入確率は大幅に上昇する。残飯を給餌する際に加熱処理をする農場の割合が増えると、侵入確率は低下することが判明した。これらの結果

から、エコフィードおよび残飯の加熱処理の徹底がアフリカ豚熱の侵入防止のために最重要であることが示された。

文 献

- 1) EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW), Scientific Opinion on African Swine Fever EFSA Journal, 8(3), 1556, 2010.
- 2) Mebus, C. A., *et al.* : Survival of foot and mouth disease, African swine fever, and hog cholera viruses in Spanish serrano cured hams and Iberian cured hams : shoulders and loins, *Food Microbiology*, 10, 133~143, 1993.
- 3) Mebus, C., *et al.* : Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products, *Food Chemistry*, 59(4), 555~559, 1997.
- 4) Zhihao, L., Takeshi, H., Hiroko, O., Hiroki, S., Satoshi, S., Amy, H., Miho, F., Lisha, L., Shin, H., Xiyang, Z., Iori, I., Yamato, A., Takeshi, S., Katsuaki, S. : A questionnaire survey of the illegal importation of pork products by air travelers into Japan from China and exploration of causal factors, *Preventive Veterinary Medicine*, 177, 104949, 2020.
- 5) Adkin, A., Coburn, H., England, T., Hall, S., Hartnett, E., Marooney, C., Wooldridge, M., Watson, E., Cooper, J., Cox, T., Seaman, M. : Risk assessment for the illegal import of contaminated meat and meat products into Great Britain and the subsequent exposure of GB livestock (IIRA) : foot and mouth disease (FMD), classical swine fever (CSF), African swine fever (ASF), swine vesicular disease (SVD) Veterinary Laboratories Agency, New Haw, 2004.
- 6) Sugiura, K., Lei, Z., Holley, C., Haga, T. : Assessing the risk of ASFV entry into Japan through pork products illegally brought in by air passengers from China and fed to pigs in Japan, *PLoS One*, 2020 May 5 ; 15(5) : e0232132. doi : 10.1371/journal.pone.0232132.
- 7) Sugiura, K., Kure, K., Kato, T., Kyutoku, F., Haga, T. : Change in the ASF entry risk into Japan as a result of the COVID-19 pandemic, *Transbound Emerg Dis*, 2020 Sep 24. doi : 10.1111/tbed.13836.

肉用牛から分離された新規病原体*Rhodococcus equi*の 国内感染状況の疫学調査

Epidemiological investigation of domestic transmission of a new pathogen,
Rhodococcus equi, isolated from beef cattle

鈴木 康規・角田 勤・高井 伸二
(北里大学獣医学部)

Yasunori Suzuki, Tsutomu Kakuda and Shinji Takai
(Kitasato University School of Veterinary Medicine)

Rhodococcus equi, which has long been known in veterinary medicine as the causative agent of pyogenic pneumonia in foals, has recently been shown to be pathogenic to ruminants. This study aimed to elucidate the infection status of ruminant-pathogenic (RP) *R. equi* and to analyse the molecular biological characteristics of RP *R. equi* isolated from infected cattle. We established a serodiagnostic method for the RP *R. equi* infection that specifically detects anti-VapN antibodies in a small amount of serum sample by chemiluminescence ELISA using rGST-VapN and rGST as a solid-phase antigen (VapN is a major virulence factor for RP *R. equi*). Using this method, we conducted screening tests in nine farms in Oita Prefecture using 207 serum samples collected during 2019–2020. We found that 96.6% of the animals did not show a significant increase in the antibody titer, suggesting that the RP *R. equi* infection had not been established. However, individuals with high antibody titers were found in three farms, including the farm where the infected cattle were raised in 2017, suggesting that the establishment of RP *R. equi* in Oita Prefecture is progressing and intermittent infections may be occurring. The strains isolated from the infected cattle in 2017 had almost identical genome structures, suggesting that one type of RP *R. equi* spread to multiple organs and caused lesions in this case. However, the Oita1907 strain harbored a virulence plasmid pVAPN, but did not express the VapN protein, which induced growth inhibition within cultured macrophages. Genome analysis revealed that the change in virulence in Oita1907 was not due to mutations in the pVAPN sequence. Because there may be factors affecting VapN expression in the mutated regions between the expressing and non-expressing strains, further characterisation of the RP *R. equi* genome is required to elucidate the regulatory mechanism of VapN expression.

1. 目 的

*Rhodococcus equi*は、土壤中に広く存在する常在菌であるとともに、子ウマの化膿性肺炎の起原菌として獣医学領域では古くから知られている。

近年、豚やイノシシ、ヒトなどさまざまな動物種からの分離例が報告され、宿主域の広い病原性細菌であることが分かってきた¹⁾。本菌の病原性は、特定のプラスミド（病原性プラスミド）上に存在する毒力関連抗原（Virulence-associated protein

Antigens ; Vap) 群がリソソーム内のpHを中性とする細胞内ニッチを作成し、菌の増殖を促進することで発揮される²⁾。病原性プラスミドは存在するVap遺伝子の違いによりの3種類 (pVAPA, pVAPBおよびpVAPN) に分類され、これらのプラスミドと宿主との間には疫学的に密接な関連性が存在する。すなわち、VapAなどが存在するpVAPAはウマ、VapBなどが存在するpVAPBは豚の病変部からそれぞれ検出される¹⁾。さらに、2015年に牛の肺膿瘍・肉芽腫性リンパ節炎からの分離菌株が新規毒力関連抗原VapNをコードするpVAPNを保有することがヨーロッパで初めて報告された (pVAPN 保有 *R. equi* ; Ruminant-pathogenic (RP) *R. equi*)³⁾。RP *R. equi* 感染症は、肺の多発性腫瘍および全身のリンパ節に肉芽腫を形成し結核様の病相を示す感染症であり、特にと畜検査における牛結核病との鑑別・精査が必要な新たな病原体と考えられる。また、結核と似た臨床症状を示す人獣共通感染症の病原体である本菌のヒトへの感染源として公衆衛生学上においても重要視される。このため、牛の汚染率や罹患率などの疫学的特性を明らかにすることは喫緊の課題である。

2016年以降、わが国でも牛やヤギの膿瘍病変部からのRP *R. equi* の分離が報告され^{4~6)}、反芻動物における世界的な分布が示唆されている。2017年には、大分県の肥育農場において黒毛和種の感染例が報告された。本事例は、腸骨下リンパ節の腫大と間欠的な排膿が認められ予後不良となり、肉芽腫および乾酪壊死様病巣が顕著であった組織 (肺、腸骨下リンパ節、内腸骨リンパ節および鼠径リンパ節) から *R. equi* が分離された。本研究では、国内の牛におけるRP *R. equi* の感染状況の把握ならびに分離菌株の分子生物学的特性を解析することを目的とし、まずは大分県内の肉用牛飼育農場の抗VapN抗体価を測定することによる血

清疫学調査と本菌感染症発症牛から分離されたRP *R. equi* の病原性ならびに遺伝学的特性の検討を実施した。

2. 方 法

2.1 使用菌株および血清

2017年に大分県のB農場で発生した本菌感染症発症牛の肺 (Oita1901, Oita1906, Oita1908株)、鼠径リンパ節 (Oita1902株)、内腸骨リンパ節 (Oita1903, Oita1905, Oita1907株)、腎臓 (Oita1904株) から分離された *R. equi* 8 菌株を使用した。また、本発症牛の血清ならびにB農場を含む大分県の9農場207個体から2019年から2020年に採取した血清を使用した。

2.2 ELISAを用いた血清診断法の確立

先行研究においてヤギの血清疫学調査に使用したELISA⁶⁾ を一部改良して実施した。組換えGST融合VapNタンパク質 (rGST-VapN) を10ng/ウェル、組換えGST (rGST) を20ng/ウェルをWhite 96-Well Immuno Plates, PolySorp (Thermo Fisher Scientific) に固相化した。一次血清には上記ウシ血清をCan Get Signal Solution 1 (東洋紡) で1,000倍希釈したもの、二次抗体にはHRP標識抗ウシIgG抗体 (フナコシ) をSolution 2 (東洋紡) で100,000倍希釈したものをそれぞれ使用し、化学発光基質 (LumiFlash Ultima ; フナコシ) およびInfinite 200 PRO (Tecan) を用いて検出した。rGSTを固相化したウェルとPBSのみ添加したウェルの数値を比較し、rGSTに対する抗体反応がないことを確認した後、rGST-VapのウェルとrGSTのウェルとの差を各血清の抗VapN抗体価とした。

2.3 パルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE)

PFGEは既報の方法⁴⁾ に従って実施した。上記菌株をBHI液体培地で36時間振盪培養した。菌体を回収し、1.5%アガロースと1 : 1で混合して

プラグを作製した。プラグを18時間リゾチーム処理した後、24時間プロテイナーゼK処理を行った。制限酵素未消化のプラグおよび*PshBI* (タカラバイオ) で消化したプラグをアガロースゲルに埋め込み、A CHEF Mapperパルスフィールド電気泳動システム (Bio-Rad) を用いて電気泳動を行った。

2.4 ウェスタンブロット

上記8菌株のVapN発現量をウェスタンブロットを用いて定量した。各菌株をpH6.5または8.0に調整した自家調整液体培地 (20g/Lペプトン, 8g/LNaCl, 300mL/L馬肉エキス) で48時間培養した。菌体を回収し、Laemmliサンプルバッファー (Bio-Rad) に溶解した。各サンプルをSDS-PAGEで分離した後、PVDF膜に転写した。一次血清には先行研究で作製したマウス抗rGST-VapN血清⁶⁾を1,000倍希釈したもの、二次抗体にはHRP標識抗マウスIgG抗体 (MP Biomedicals) を100,000倍希釈したものをそれぞれ使用し、化学発光基質ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare) およびiBright Imaging System (Thermo Fisher Scientific) を用いて検出した。

2.5 分離菌株の培養マクロファージ内増殖の比較

Oita1901, Oita1902, Oita1905およびOita1907株にEGFPを発現させマウス培養マクロファージ内での増殖を比較した。当研究室で作製したEGFP遺伝子補完用プラスミドpINT::P_{aphII}-egfp⁷⁾を各株に形質転換し、アプラマイシン添加LB寒天培地で形質転換体 (EGFP発現株) を選択した。カバーガラスを置いた24ウェル細胞培養プレートにマウスマクロファージ様細胞株J774A.1を 1.5×10^5 細胞/ウェルで播種し、10%FBS添加DMEM (培養用DMEM) で24時間培養した。各EGFP発現株を多重感染度が10 (MOI=10) とな

るように培養用DMEMで調整し、細胞に添加した。37°Cで1時間培養後、PBSで3回洗浄し、細胞外の菌体を除去するために20 μ g/mLのアミカシン添加培養用DMEMを用いて37°Cで24および48時間培養した。培養後、細胞をPBSで3回洗浄し、カバーガラスを逆さにして細胞側が下になるようにスライドグラスに載せ、蛍光顕微鏡を用いて観察した。

2.6 全ゲノム解析

Oita1901, Oita1905およびOita1907株のゲノムDNAをQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いて抽出した。DNAの濃度はQubit dsDNA HS Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定し、純度はNanoDrop One^c (Thermo Fisher Scientific) を用いて評価した。全ゲノム配列は、MiSeq (Illumina) とMinION (Oxford Nanopore Technologies) の両シーケンサーから得られた配列データを組み合わせて (ハイブリッドアセンブル) 決定した。MiSeqによるシーケンスは、Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) を用いてDNAライブラリーを調製し、300bpのペアエンドリードを用いた。また、MinIONシーケンスは、Ligation Sequencing KitとNative Barcoding Expansion 1-12 (Oxford Nanopore Technologies) を用いてDNAライブラリーを調製し、フローセルはR9.4.1を使用した。MinIONから得られたFast5データのベースコールとバーコーディングはGuppy (Oxford Nanopore Technologies) を用いて行った。各々のシーケンサーから取得したリードについて、Unicycler⁸⁾を用いてハイブリッドアセンブリを実施し、ゲノム配列を決定した。決定したそれぞれの塩基配列からの遺伝子の抽出およびアノテーションはDFAST⁹⁾を用いた。また、全ゲノム配列マップはCGview Serverを用いて作製した。

3. 結果と考察

3.1 VapN抗体価測定のためのELISAの確立と血清スクリーニング

当初、血清中VapN抗体へ特異性向上のため、タグを除去したrVapNタンパク質を作出し、固相化抗原とした検出系を検討した。しかし、本抗原はPolySorp処理プレートへの吸着が悪く、PBSのみ添加したウェルの数値と差が認められなかったことから、上述のrGST-VapNとrGSTを用いた方法を採用した。陽性対照である発症牛の実測値はそれぞれ462,226 (rGST-vapN), 13,465 (rGST), 7,434 (PBS) であり、陰性対象である市販のウシ胎児血清の平均値はそれぞれ29,359 (rGST-vapN), 3,515 (rGST), 2,814 (PBS) であった。以上の結果から、本法は少量 ($1 \mu\text{l}$) のウシ血清で抗VapN抗体価を特異的に検出し、RP *R. equi*

*equi*感染症のスクリーニング検査として利用できることが示された。

続いて、本法を用いて大分県内の肉用牛計207血清中の抗体価を測定した。発症牛と同等もしくはそれ以上の抗体価を示した個体が、3農場計4頭 (高値から1,018,072, 920,817, 783,257, 435,550) 存在した一方で、今回調査した96.6%の個体の実測値は200,000以下であった (Fig. 1)。多くの個体で抗VapN抗体価の大幅な上昇が認められず、本菌の感染が成立していないことが推測された。しかし、高い抗体価を示した牛が異なる農場で散見され、また発症牛が飼育されていたB農場で2019年にも高い抗体価を保有する牛が存在したことから、大分県内におけるRP *R. equi*の定着が進行し、間欠的な感染が起こり得ることが示唆された。また、これらの高い抗体価を示した牛は、体内におけるRP *R. equi*の増殖が強く疑わ

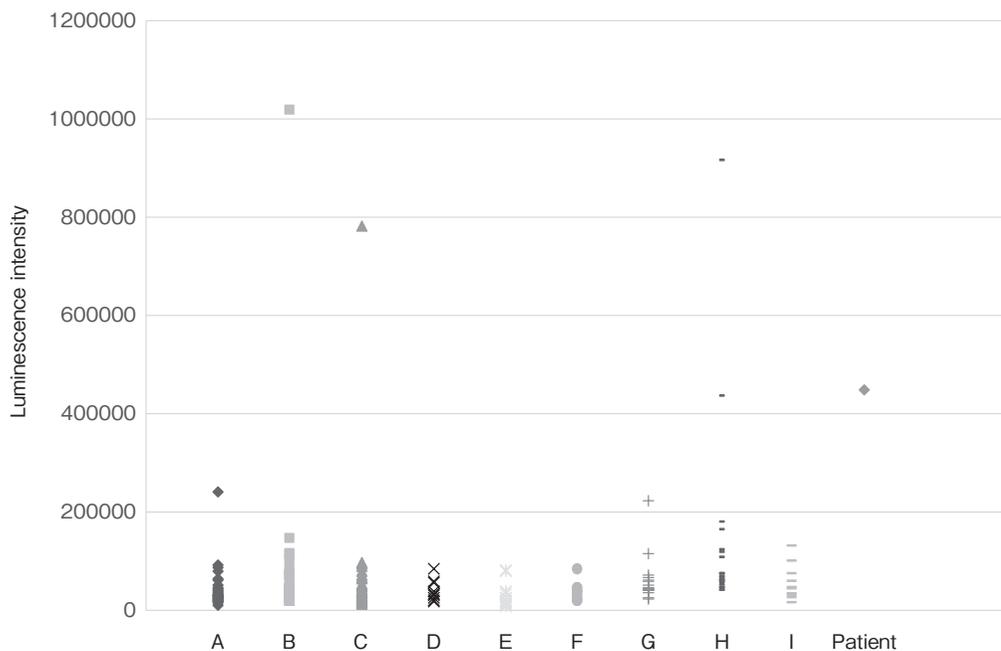


Fig. 1 Anti-VapN antibody titers in beef cattle raised in nine farms in Oita Prefecture. The vertical axis indicates the luminescence intensity and the horizontal axis indicates the farm. The number of beef cattle tested at each farm is as follows : Farm A (n = 30), Farm B (n = 40), Farm C (n = 40), Farm D (n = 10), Farm E (n = 20), Farm F (n = 20), Farm G (n = 17), Farm H (n = 20) and Farm I (n = 10).

れ、肉眼的な臨床症状はないが、臓器内にRP *R. equi*の増殖を伴う肉芽腫病変を形成している可能性が推測された。実際に、三重県で発生した国内初事例⁵⁾では、生体検査では著変が認められない一般畜として搬入され、解体後検査にて肺をはじめとした臓器に多発性腫瘤が認められたため全廃棄（敗血症）されており、今後本菌が蔓延した場合、経済的損失も示唆される。特に陽性農場では今回確立した血清診断法を活用した網羅的抗体価測定を定期的実施し、陽性の疑いのある個体の隔離や飼育環境の除菌など感染拡大の防除に努める必要がある。また、今後調査対象を国内全域に広げ、RP *R. equi*の感染状況を明らかにする必要がある。

3.2 発症牛分離菌株の病原性と遺伝学的特性

プラグを*Psh*BI処理した後、電気泳動した結果、どの菌株もほぼ同一の制限酵素切断パターンが認められたが、Oita1907株のみ100kb付近のバンドが検出されなかった（Fig. 2A）。一方、プラグを制限酵素処理せず電気泳動した結果、Oita1907株

のみ100kb付近のバンドが検出されなかった（Fig. 2B）。このことから、当該症例は1種類のRP *R. equi*が複数の臓器に播種し、病変を引き起こしたと考えられる。また、筆者らは先行研究において、RP *R. equi*が保有する100kb付近のバンドはpVAPNプラスミドであることを報告している⁴⁾。すなわち、Oita1907株はpVAPNを欠落していることが明らかとなった。

ウェスタンブロット法の結果、Oita1901, Oita1902, Oita1903, Oita1904, Oita1906, Oita1908株において、既報のVapN発現条件⁶⁾である37℃、pH6.5で培養した場合、VapNタンパク質を最も多く産生した。一方で、Oita1905およびOita1907株ではいずれの培養条件においても、VapNタンパク質を発現しなかった（Fig. 3A）。また、培養マクロファージ内増殖を比較したところ、VapNを発現したOita1901およびOita1902株では培養48時間後にマクロファージ内での菌体増殖が認められた。一方で、Oita1905およびOita1907株はマクロファージ内での顕著な増殖が

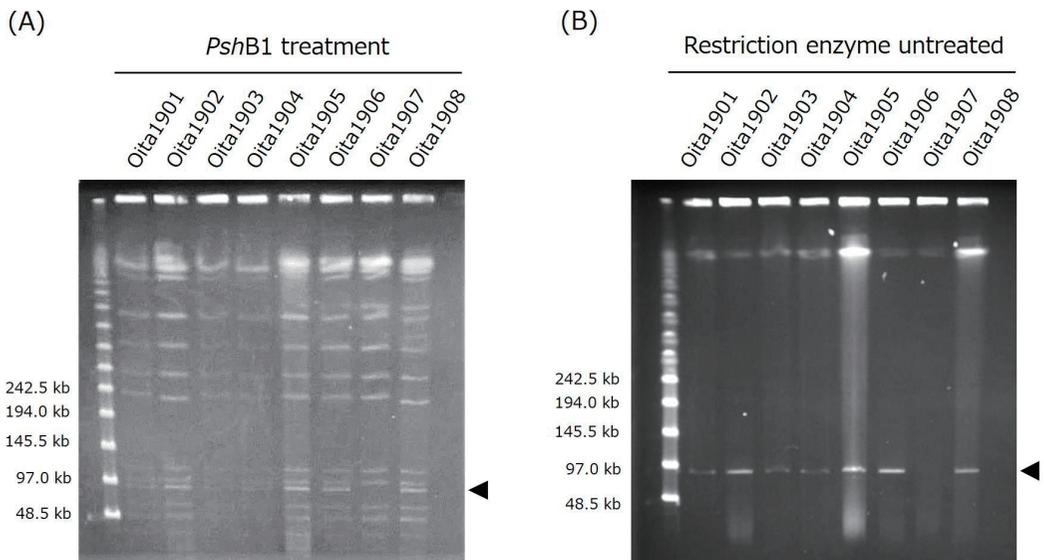


Fig. 2 PFGE images of eight *R. equi* strains isolated from lesions of infected cattle. (A) *Psh*BI digested and (B) restriction enzyme untreated were shown. Lambda PFG ladder was used as a marker. Arrowheads indicate the positions of pVAPN in each strain.

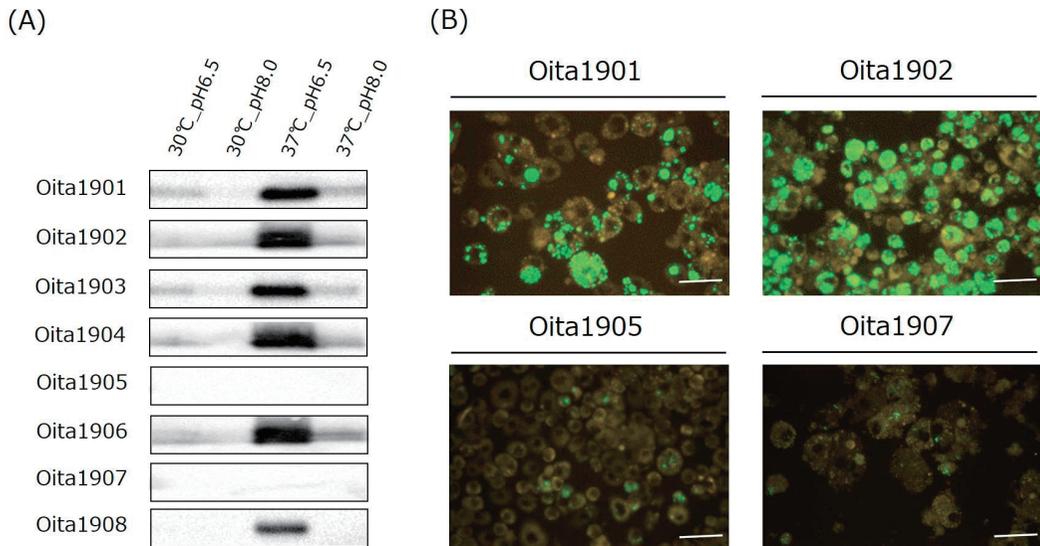


Fig. 3 Pathogenicity evaluation of *R. equi* strains isolated from lesions of infected cattle. (A) Detection of VapN protein produced by these strains. Western blotting was conducted using self-made mouse anti-GST-VapN serum. Each cell lysate was separated via sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide electrophoresis and then transferred onto PVDF membranes. (B) The growth of these strains in J774A.1 macrophage was observed via fluorescence microscopy at 48 h post infection. Bar = 50 μ m.

認められなかった (Fig. 3B)。興味深いことに、pVAPN保有株であるOita1905株が、いずれの培養条件においてもVapNタンパク質が発現しないことが明らかとなり、マクロファージへの感染実験の結果とも一致していた (Fig. 3)。VapNタンパク質を発現しない要因を明らかにするため、Oita1901、Oita1905およびOita1907株の全ゲノム解析を行い、それぞれの配列を比較した。全ゲノム配列の概要をTable 1に示す。Oita1907株はプラスミドを保有しておらずPFGEの結果と一致した。Oita1901株およびOita1905株が保有するpVAPNの塩基配列は99%以上一致しており、Pathogenicity island内の変異は認められなかった。このことはOita1905株がVapNを発現しない要因として、*vapN*遺伝子自体や*vapN*遺伝子の発現に関与するPathogenicity island内の転写制御遺伝子に変異が入ったために起きたものではないことを示している。続いてクロモゾームの配列を比較した結果、3株の配列は99%一致したが、総

塩基長や遺伝子の数に若干の相違が認められた (Table 1, Fig. 4)。アノテーションの結果、株間の変異領域には機能が解明されていない遺伝子も含まれており、例えばOita1901株の機能不明のCalcium-binding proteinをコードするLocus_17590は他の2株ではその塩基配列に変異を生じていた (Fig. 4B)。クロモゾームの変異領域にVapN発現に影響する因子が存在する可能性があるため、その機能解析を含め引き続きRP *R. equi*ゲノムの特性の解析を進めていく必要がある。

4. 要 約

*R. equi*は、子ウマの化膿性肺炎の起因菌として獣医学領域では古くから知られていたが、近年、反芻動物に対する病原性が明らかになってきた。本研究は、国内におけるRP *R. equi*の感染状況の把握ならびに分離菌株の分子生物学的特性を解析することを目的とした。rGS-VapNとrGSTを固相化抗原とし、化学発光系を用いたELISA

Table 1 Whole-genome information for *vapN*-harboring *Rhodococcus equi* isolated from infected cattle

Strain and genome information	Data for <i>vapN</i> -harboring <i>Rhodococcus equi</i> strain :		
	Oita1901	Oita1905	Oita1907
Origin	Lung	Internal iliac lymph nodes	Internal iliac lymph nodes
Chromosome description*			
Genome size (bp)	5,267,390	5,259,097	5,258,530
G+C content (%)	68.7	68.7	68.7
No. of CDSs**	4,931	4,941	4,934
No. of rRNA	15	12	12
No. of tRNA	61	61	61
No. of CRISPRS	0	0	0
pVAPN description*			
Genome size (bp)	≤109,877***	≤109,562***	Not found
G+C content (%)	65.6	65.6	
No. of CDSs**	127	128	
No. of rRNA	0	0	
No. of tRNA	0	0	
No. of CRISPRS	0	0	

* All genomic stats are output from DFAST pipeline.

** CDSs, coding sequences.

*** The number of bases may be slightly extended due to the undetermined intron sequence at both the 3' and 5' ends.

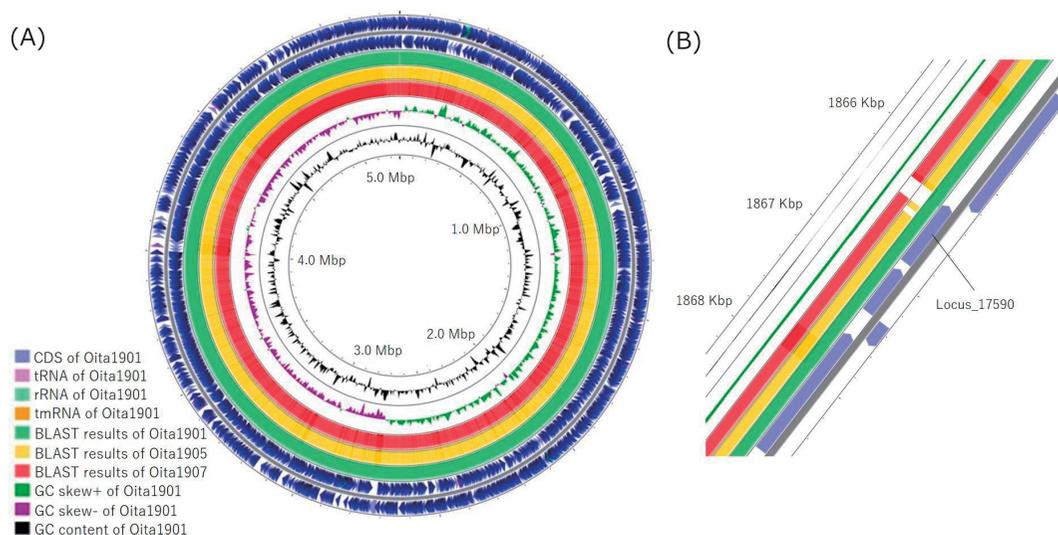


Fig. 4 Comparative genomics of *R. equi* strains isolated from lesions of infected cattle. (A) Comparisons of three genome sequences (strain Oita1901, Oita1905 and Oita1907) were performed using the CGView server. The outermost and next rings show features of the Oita1901 genome. The next three rings show the positions of BLAST hits detected through blastn comparisons of the sequence against itself and two genomes. The height of each arc in the BLAST result rings is proportional to the percent identity of the hit. Overlapping hits appear as darker arcs. The next two rings show the GC content and GC skew of the Oita1901 genome. (B) Enlarged view around Locus_17590. As shown in BLAST results, Oita1905 and Oita1907 did not harbor homology in 5' side sequence of Locus_17590.

により、少量の血清サンプルから抗VapN抗体を特異的に検出するRP *R. equi*感染症の血清診断法を確立した。本法を用いて、2019年から2020年に大分県内の9農場で採取した207血清のスクリーニング検査を実施した。96.6%の個体では抗体価の顕著な増加は認められず、感染が成立していないことが推測された。しかし、発症牛が飼育されていた農場を含む3農場で高い抗体価の個体が確認されたことから、大分県内におけるRP *R. equi*の定着が進行し、間欠的な感染が起こり得ることが示唆された。また、発症牛から分離された菌株はほぼ同一のゲノム構造を持ち、当該症例は1種類のRP *R. equi*が複数の臓器に播種し、病変を引き起こしたと考えられた。しかし、分離菌株の一つであるOital907株は病原性プラスミドpVAPNを保有するにもかかわらずVapNタンパク質を発現せず、培養マクロファージ内で増殖が抑制された。ゲノム解析の結果、Oital907株の病原性の変化は、pVAPN上の塩基配列の変異によるものではないことが判明した。発現株と非発現株間の染色体の変異領域には、VapNの発現に影響を与える因子が存在する可能性がある。VapN発現の制御機構解明のため、引き続きRP *R. equi*ゲノムの特性の解析を進めていく必要がある。

文 献

- 1) Vázquez-Boland, J. A., Meijer, W. G. : The pathogenic actinobacterium *Rhodococcus equi* : what's in a name?, *Mol Microbiol*, **112**, 1~15, 2019.
- 2) von Bargen, K., Scraba, M., Krämer, I., Ketterer, M., Nehls, C., Krokowski, S., Repnik, U., Wittlich, M., Maaser, A., Zapka, P., Bunge, M., Schlesinger, M., Huth, G., Klees, A., Hansen, P., Jeschke, A., Bendas, G., Utermöhlen, O., Griffiths, G., Gutschmann, T., Wohlmann, J., Haas, A. : Virulence-associated protein A from *Rhodococcus equi* is an intercompartmental pH-neutralising virulence factor, *Cell Microbiol*, **21**, e12958, 2019.
- 3) Valero-Rello, A., Hapeshi, A., Anastasi, E., Alvarez, S., Scortti, M., Meijer, W. G., MacArthur, I., Vázquez-Boland, J. A. : An invertron-like linear plasmid mediates intracellular survival and virulence in bovine isolates of *Rhodococcus equi*, *Infect Immun*, **83**, 2725~2737, 2015.
- 4) 中尾聡子, 石塚駿, 川島豪, 中川竜太郎, 佐々木由香子, 角田勤, 鈴木康規, 高井伸二 : 2015年に沖縄で山羊とその飼育環境土壌から分離されたロドコッカス・エクイの毒力の再検討, **73**, 582~584, 2020.
- 5) Nakagawa, R., Moki, H., Hayashi, K., Ooniwa, K., Tokuyama, K., Kakuda, T., Yoshioka, K., Takai, S. : A case report on disseminated *Rhodococcus equi* infection in a Japanese black heifer, *J Vet Med Sci*, **80**, 819~822, 2018.
- 6) Suzuki, Y., Takahashi, K., Takase, F., Sawada, N., Nakao, S., Toda, A., Sasaki, Y., Kakuda, T., Takai, S. : Serological epidemiological surveillance for vapN-harboring *Rhodococcus equi* infection in goats, *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, **73**, 101540, 2020.
- 7) Sangkanjanavanich, N., Kawai, M., Kakuda, T., Takai, S. : Rescue of an intracellular avirulent *Rhodococcus equi* replication defect by the extracellular addition of virulence-associated protein A, *J Vet Med Sci*, **79**, 1323~1326, 2017.
- 8) Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., Holt, K. E. : Unicycler : Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads, *PLoS Comput Biol*, **13**, e1005595, 2017.
- 9) Tanizawa, Y., Fujisawa, T., Nakamura, Y. : DFAST : a flexible prokaryotic genome annotation pipeline for faster genome publication, *Bioinformatics*, **34**, 1037~1039, 2018.

畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発

Development of mucosal vaccine adjuvant for livestock

若尾 雅 広

(鹿児島大学学術研究院理工学域工学系)

Masahiro Wakao

(Department of Science and Engineering, Kagoshima University)

Infectious disease outbreaks of farm animals cause serious problems not only in the livestock industry but also in the economy and human health. Vaccination is one of the effective strategies to prevent infectious animal diseases, and various vaccines have been developed. Among vaccines, mucosal vaccines have been attracted much attention since they can induce immune responses that mimic the infection route of pathogens and can activate not only local mucosal immune responses but also systemic immune responses including humoral and cellular immunity. To elicit immune responses effectively by mucosal vaccination, selective targeting and activation of immune cells are of importance. Therefore, various adjuvants such as synthetic polymers and natural polysaccharides that can be easily taken up by immune cells have been studied. Recently, we have developed glyco-adjuvants, which activate immune cells via innate immune receptors such as Toll-like receptors (TLRs) and C-type lectin receptors (CLRs) and sugar moiety is involved in targeting of immune cells. In this study, in order to apply our glyco-adjuvant as a mucosal vaccine adjuvant for farm animals, we investigated the improvement of glyco-adjuvants and their *in vitro* and *in vivo* immunostimulatory activities. In the synthesis of sugar and TLR ligand moieties, several kinds of novel structures were synthesized on the basis of the methods reported previously. The conjugation of ligand moieties was performed by amidation or click reaction to produce glyco-adjuvants efficiently. *In vitro* study with mouse bone marrow-derived dendritic cells (mBMDCs), glyco-adjuvants have higher potencies than that of unconjugated ligand moieties. In the *in vivo* immunization study using ovalbumin (OVA) as a model antigen, the glyco-adjuvant significantly induced the production of OVA-specific IgA and IgG both in nasal and serum samples. The results indicate that our glyco-adjuvants are useful for the mucosal vaccine adjuvant. Further optimization of glyco-adjuvant can lead to the development of a novel mucosal vaccine.

1. 目 的

畜産産業において、飼育動物の感染症対策は重要な課題である。伝染性感染症の発生は、飼育動

物の損耗や畜産物の生産性の低下を招き、大きな経済的損失につながる。また、我々にとっては、人獣感染や食中毒、畜産物の安定供給などの公衆衛生、食品衛生上の課題が生じる。飼育動物の感

感染症対策ではワクチンによる予防が有用であり、生ワクチンをはじめ、不活化ワクチン、抗原成分を含むコンポーネントワクチンなどが開発されている。生ワクチンは効率よく免疫誘導できるものの、弱毒化した病原体を使用するため感染症のリスクをあわせ持つ。一方、抗原などを含む不活化ワクチンは、ワクチンによる感染症のリスクはないが、免疫誘導能が低く、アジュバントによる活性化が必要である。ワクチン開発においては、より安全で、かつ、より効果的に免疫を誘導できるワクチンが求められており、これら両機能を持つワクチンとして、近年、粘膜ワクチンが注目されている。粘膜ワクチンでは、自然感染による免疫応答プロセスに沿って粘膜の局所免疫応答ならびに全身免疫応答が誘導される。また、病原体が感染する際の第一段階である粘膜での感染予防も期待される。しかし、粘膜組織の免疫細胞へワクチン成分を送達し、活性化する方法は確立されておらず、その手法の開発が求められている。

一方、近年のワクチンのアジュバント開発においては、パターン認識受容体 (PRRs) が関与する自然免疫を活性化するリガンド分子の利用が注目されている¹⁾。PRRsは、病原体などの外来性の分子パターン (PAMPs) や細胞などが傷害を受けた際に生じる内因性の分子パターン (DAMPs) を認識する受容体で、免疫応答初期の自然免疫を活性化する。自然免疫の活性化は、抗体産生などの液性免疫やT細胞などが関与する細胞性免疫などの獲得免疫も誘導する。そのため、自然免疫を活性化できるリガンド分子はワクチンアジュバントとして有望と考えられている。

我々の研究グループでは、PRRsの中でも、糖鎖を認識するC型レクチン受容体 (CLR) と、脂質、核酸由来のPAMPs、DAMPsを認識するトール様受容体 (TLR) に着目し、これまでに糖鎖とTLRリガンド (TLRL) を複合化した糖鎖-

TLRL複合体 (以下、グライコアジュバント) を開発してきた。このグライコアジュバントは、糖鎖機能による細胞へのデリバリー能を有しており、複合化していないTLRL単体に比べ低濃度で、樹状細胞などの免疫細胞を活性化できる²⁾。近年の研究では、CLRとTLRの協働作用によって、サイトカイン産生などの免疫シグナルが増強されることが報告されており、CLRとTLRのリガンド成分の精査によって、高機能性のグライコアジュバントの創製が可能になると考えられる。本研究では、グライコアジュバントを粘膜ワクチンのアジュバント成分として活用することを研究目的とし、グライコアジュバントの改良と粘膜投与型ワクチンのアジュバントとしての評価を行った。

2. 方法

本研究では、粘膜用ワクチンアジュバントの開発に向け、1) グライコアジュバントの合成、2) グライコアジュバントのin vitroでの免疫増強活性評価、3) グライコアジュバントのin vivoでの免疫増強活性評価について検討した。

2.1 グライコアジュバントの合成

グライコアジュバントの糖鎖成分には、C型レクチン様受容体 (CLR) に結合すると考えられる糖鎖を使用した。トール様受容体 (TLR) に結合するリガンド (TLRL) には、TLR4リガンド (TLR4L) とTLR7リガンド (TLR7L) を使用した。TLR4Lは、ピリミドインドール骨格をもとに、これまでの方法³⁾を改良して合成した (Fig. 1A)。TLR7Lの合成は、プリン骨格をもとに既法⁴⁾を参考にFig. 1Bの経路にしたがって合成した。グライコアジュバントへの誘導は、in vitroの免疫増強活性評価で高い効果を示したリガンドを用いて検討し、アミド縮合またはクリック反応によって行った (Fig. 1C)。

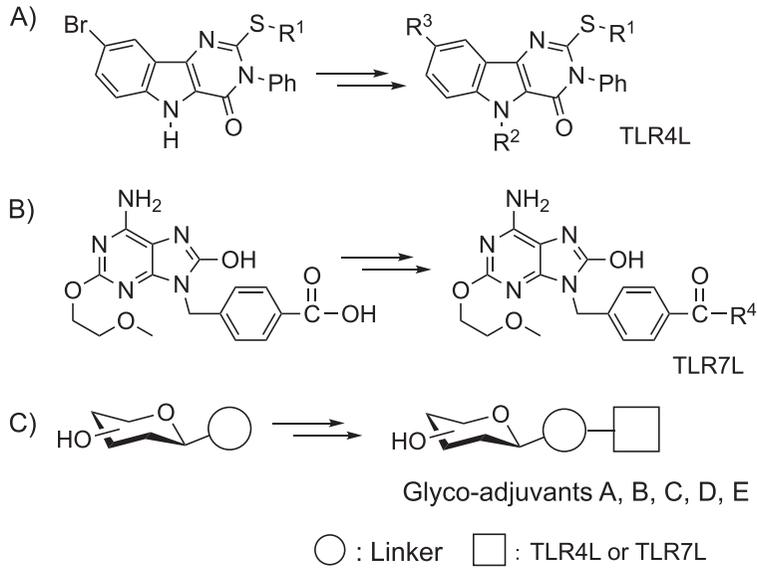


Fig. 1 Synthesis of glyco-adjuvant A, B, C, D and E. A) Synthesis of TLR4L, B) Synthesis of TLR7L, C) Conjugation of glycan with TLR.

2.2 グライコアジュバントのin vitroでの免疫増強活性評価

合成したグライコアジュバントの免疫増強活性は、マウス骨髄由来樹状細胞 (mBMDC) を用いて評価した。mBMDCは既法⁵⁾に従い、マウス骨髄細胞を、顆粒球単球コロニー刺激因子 (GM-CSF) を含むRPMI培養液で7日間培養して調製した。その後、96穴プレートに播種し、グライコアジュバントを段階希釈で添加し、18時間培養した後、培養上清を回収し、産生されたインターロイキン-6 (IL-6) をELISA法により測定した。

2.3 グライコアジュバントのin vivoでの免疫増強活性評価

高い免疫増強活性を示したグライコアジュバントと抗原を混合してワクチン製剤を調製し、マウス (Balb/C, 7週齢, 雌) への投与実験を行った。抗原にはオボアルブミン (OVA) を使用した。グライコアジュバントの投与量については3段階で検討した。ワクチン製剤の投与は、マウス経鼻より行い1週間ごとに3回実施した。最終投与の

1週間後にサクリファイし、鼻腔洗浄液、血清を回収して、それぞれのサンプル液中に存在するIgA, IgM, IgG抗体成分を分析した。抗体成分の評価はELISA法によって行い、任意単位 (arbitrary unit, AU) で評価した。

2.4 統計解析

データは、GraphPad Prism 7 (GraphPad Software) を用いて解析した。データは、平均値 ± 標準偏差で示した。一元配置分散分析で解析し、多重比較にはDunnett法を用いた。p < 0.05 を統計学的に有意であるとした。

3. 結果と考察

畜産動物である豚, 牛, 鶏に対するワクチン開発を目指すことから、それぞれの動物に発現が確認されている受容体を標的にグライコアジュバントを設計・合成した。すなわち、糖鎖成分の受容体には、CLRであるデクチンやマンノース受容体に結合すると予想される、グルコースやガラクトース, キシロース, アラビノースから構成され

る糖成分に加え、それらのオリゴ糖を選択した。TLRL成分には、ピリミドインドール骨格を有するTLR4L成分とプリン骨格を有するTLR7L成分を選択した。TLR4L成分の合成では、構造改変を行ってTLR4L-1, TLR4L-2を調製した。TLR7L成分の合成では、カルボキシル基の改変を行い、TLR7L-1, TLR7L-2を調製した。調製したそれぞれの糖鎖成分とTLRL成分との縮合を行い、グライコアジュバントA, B, C, D, Eを合成した。

合成したグライコアジュバントA, B, C, Dについては、mBMDCを用いて、IL-6の産生量を指標に免疫増強活性の評価を行った。その結果、糖鎖と複合化したグライコアジュバントが、複合化していないTLR7Lに比べ、高い免疫増強活性を有することが分かった (Fig. 2)。糖構造による活性増強効果は観察されなかったことから、縮合の際に構築される架橋構造が、活性増強に寄与したと考えられる。今後、糖鎖の多価(クラスター)効果を利用することで、さらなる活性向上が期待される。

グライコアジュバントEについては、ワクチンアジュバントとして利用できるか、in vivoでの免疫活性評価を行った。モデル抗原にはOVAを

使用した。免疫活性は、OVAに対して誘導される、IgAやIgM, IgGの抗体産生量で評価した。まず、グライコアジュバントEとOVAを混合してワクチン製剤を調製した。ワクチン製剤の調製においては、相分離が起こることなく均一な水溶液として製剤化できることが分かった。この溶液をワクチン製剤として用いて、マウス経鼻への投与を行った。投与は1週間おきに3回行い、最終投与の1週間後にサクリファイし鼻腔洗浄液と血清を回収した。それぞれのサンプル液に含まれるOVA特異的な抗体の産生価は、OVAを固定化したプレートを用いてELISA法によって算出した。結果をFig. 3に示す。IgA, IgGの産生価については、鼻腔洗浄液、血清ともに、高容量のアジュバントを添加したときに抗体価の増強が見られた。一方、IgMに関しては、いずれの容量においてもあまり変化が見られなかった。鼻腔洗浄液中のIgAの抗体価が増強されていることから、グライコアジュバントEは、鼻腔粘膜における局所免疫を誘導できると考えられる。また血清中のIgG抗体価も増強されることから、全身性の免疫も誘導できると考えられる。IgMに関しては、最初のワクチン製剤投与後から3週間経過しており、IgG産生も増強されていることから、クラススイッチ

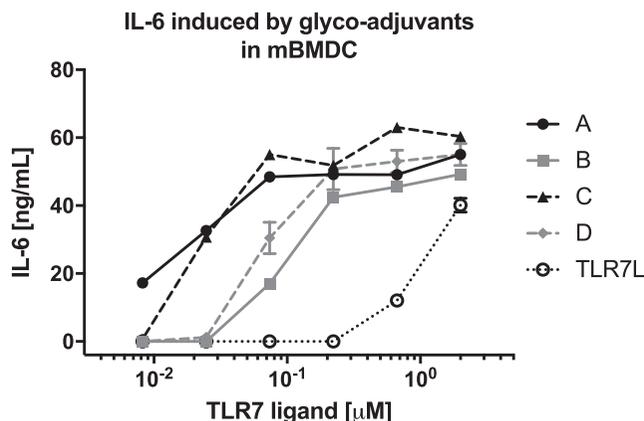


Fig. 2 IL-6 production by glyco-adjuvants in mBMDC (1×10^5 cell/well). IL-6 was measured by ELISA.

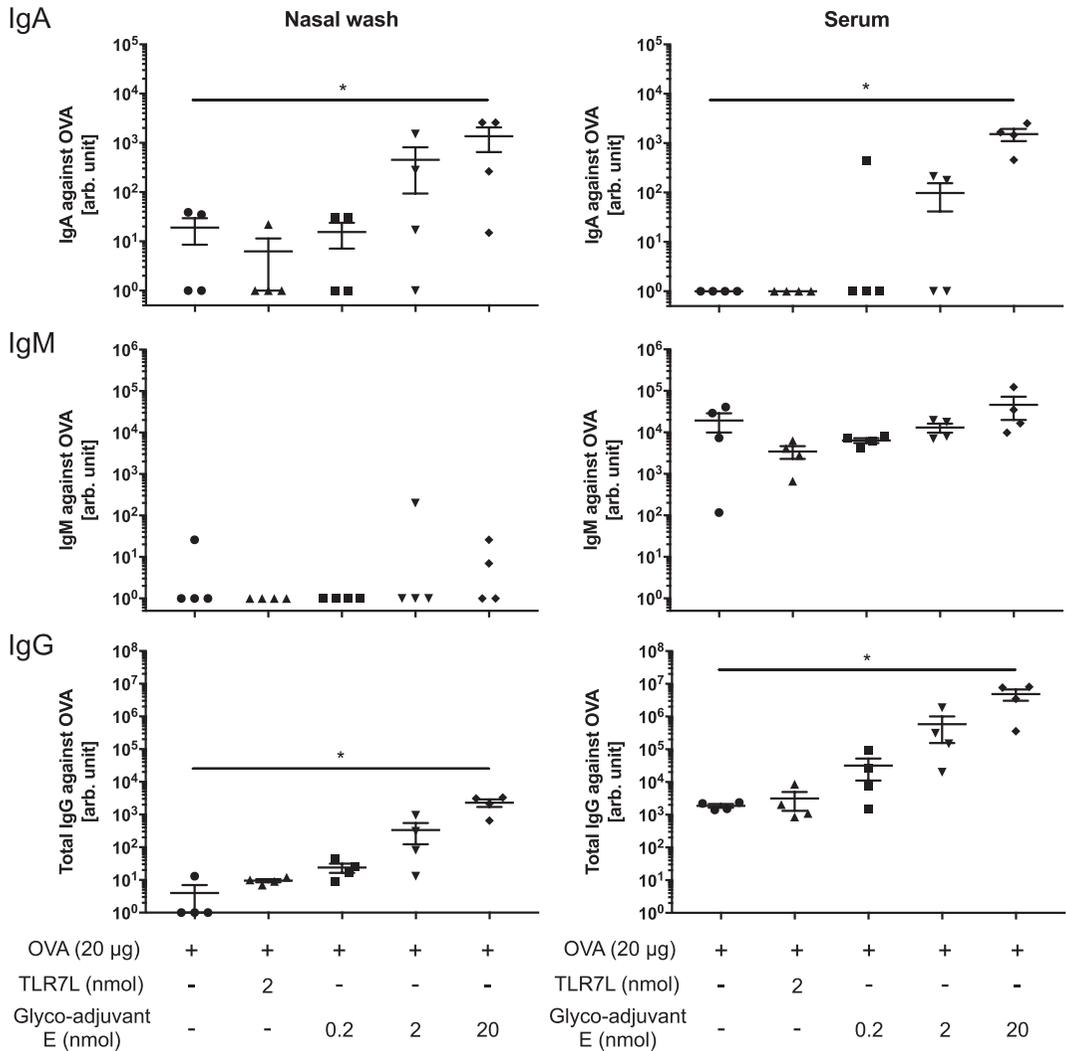


Fig. 3 In vivo adjuvant activities of glyco-adjuvant E. Balb/C mice (n=4) were immunized with OVA protein (20 µg) and TLR7L (2nmol) or glyco-adjuvant E (0.2nmol, 2nmol, 20nmol) on days 0, 7, and 14. Nasal wash and blood was collected on day 21 and nasal and serum OVA-specific IgA, IgM, or IgG antibodies were evaluated by ELISA. One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison test was performed to determine the statistical differences (*p<0.05) using GraphPad Prism 7 (GraphPad Software).

が起こり、通常の抗体価を示したと考えられる。

4. 要 約

畜産動物の感染症に対する防疫対策は、畜産産業だけでなく、地域の公衆衛生や食環境の維持の面においても重要である。畜産動物の感染症対策としては、ワクチンが有効であることからさまざまなワクチンが開発されてきた。不活化ワクチン

は、生ワクチンに比べ、感染症のリスクがなく安全に使用できることから、現在でも精力的に研究されており、既存ワクチンの改良が進められている。一方、不活化ワクチンは、効率よく免疫誘導できないことから、アジュバントの開発や投与経路の探索も進められている。近年、投与経路の探索では、粘膜を介した投与経路が注目されており、さまざまな粘膜ワクチンの開発が行われてい

る。粘膜ワクチンは、病原体の感染経路を模倣した免疫誘導が可能で、粘膜の局所免疫を誘導するだけでなく、液性免疫、細胞性免疫を含めた全身性免疫応答の誘導が期待できる。粘膜ワクチンによる免疫誘導では、粘膜の免疫細胞への抗原成分のデリバリーと担当組織での免疫細胞の活性化が重要となるため、免疫細胞へのデリバリー機能を持つ合成高分子や天然多糖などのさまざまなアジュバントが検討されているが、実用化に至っていない。

一方、我々の研究グループでは、自然免疫の活性化機構に着目し、免疫細胞へのデリバリー能と免疫細胞の活性化能を持つグライコアジュバントを開発している。本研究では、これまでに開発してきたグライコアジュバントを畜産動物用粘膜ワクチンのアジュバントとして利用することを研究目的とし、グライコアジュバントの改良と活性評価について検討した。糖成分、TLRL成分の合成においては、これまでの方法を参考に、数種類の新規なりガンド成分を合成することができた。また、合成したなりガンド成分を複合化してグライコアジュバントへの誘導も行った。グライコアジュバントのmBMDCを用いた免疫増強活性評価にお

いては、優れた活性を有する新規化合物を得ることができた。また、マウスを用いたin vivo活性評価では、アジュバントとモデル抗原の経鼻投与によって、鼻腔中のIgAの抗体産生誘導に加え、血清中のIgG抗体の産生誘導を行うことができた。本結果は、今後、アジュバントと不活化抗原を用いた粘膜ワクチンの開発につながると期待される。

文 献

- 1) Coffman, R. L., Sher, A., Seder, R. A. : *Immunity*, **33**, 492~503, 2010.
- 2) Baba, A., Wakao, M., Shinchi, H., Chan, M., Hayashi, T., Yao, S., Cottam, H. B., Carson, D. A., Suda, Y. : *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **30**, 126840, 2020.
- 3) Chan, M., Kakitsubata, Y., Hayashi, T., Ahmadi, A., Yao, S., Shukla, N. M., Oyama, S., Baba, A., Nguyen, B., Corr, M., Suda, Y., Carson, D. A., Cottam, H. B., Wakao, M. : *J. Med. Chem.*, **60**, 9142~9161, 2017.
- 4) Wu, C. C. N., Hayashi, T., Takabayashi K., Sabet, M., Smee, D. F., Guiney, D. D., Cottam, H. B., Carson, D. A. : *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **104**, 3990~3995, 2007.
- 5) Chan, M., Hayashi, T., Mathewson, R. D., Yao, S., Gray, C., Tawatao, R. I., Kalenian, K., Zhang, Y., Hayashi, Y., Lao, F. S., Cottam, H. B., Carson, D. A. : *Bioconjug Chem.*, **22**, 445~454, 2011.

UV-LED光殺菌を用いた、鶏病原性大腸菌殺菌システムの開発

Development of UV-LED inactivation system for avian pathogenic
Escherichia coli

下 畑 隆 明¹・粟飯原 睦 美²

(¹徳島大学大学院医歯薬学研究部, ²徳島大学大学院社会産業理工学研究部)

Takaaki Shimohata¹ and Mutsumi Aihara²

(¹Department of Preventive Environment and Nutrition, Institute of Biomedical Sciences, Tokushima University Graduate School,

²Graduate School of Technology, Industrial and Social Sciences, Tokushima University)

Breeding of broiler is becoming more systematic and larger in Japan. According to large-scale of poultry houses, it can be severely damaged by the invasion of external pathogens, so that poultry houses are changing conventional open house to semi-windless or windless poultry to prevent infections. In the windless type of poultry house, the infectious risks are significantly reduced, but when pathogens contaminated in poultry house, it will spread into the dramatically. UV-LED is a light emitting diode that emits light in the ultraviolet region. UVA-LED, involved in sunlight, emitting light indicates mild bacterial killing ability and it can be used for inactivation of bacteria in food suppling systems and animals or organisms existing conditions. In this study, we estimated the killing ability of UVA-LED for avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), which often causes infectious disease in poultry houses. UVA-LED irradiation shows the effective bactericidal killing ability for APEC as well as clinical or food isolated *Escherichia coli*. Here we applied UVA-LED into the poultry house and estimated difference of hygienic condition. UVA-LED did not affect the number of bacterial cells but it changed bacterial composition in the bedding of the poultry house. The genomic study revealed that UVA irradiation reduced the Gammaproteobacteria, which contains many types of pathogenic bacteria for humans and chickens. From these results, we showed the benefit of UVA-LED light irradiation device into the poultry house, it may help an effective means for improvement of hygiene in poultry house.

1. 目 的

鶏肉は肉類の中で安価である以外にも、高タンパク質低脂質で健康視点から好まれ、また宗教による摂食制限がないことから世界的に安定的に消費されている。また今後も発展途上国の経済成長に伴って、世界規模での摂取量増加が見込まれて

おり、世界的な需要の増加が見込まれている。世界的な鶏の需要に対応するため、鶏の生産技術向上に向けて、飼育環境や飼料の選択などさまざまな検討がこれまで行われている。

日本におけるブロイラー肉養鶏の生産は微増傾向にある。近年では鶏舎のシステム化・大規模化が進み、農家あたりの生産量が増加している。大

型鶏舎においては、鳥インフルエンザなどの外部からの病原体の侵入で大きな打撃を受けてしまうため、感染予防の観点から、従来の開放型の鶏舎から、セミウインドレス、ウインドレスの鶏舎へと環境の移行が進んでいる。ウインドレス鶏舎では、外部との接触が極端に低減するため感染症のリスクを著しく低下させることができるが、一度病原体が混入すると一気に鶏舎内に拡散してしまうリスクもはらんでいる。

UV-LEDは紫外(UV)領域の光(400nm以下の光)を発する、発光ダイオード(LED)であり、特に太陽光に近い紫外線(UVA)を発するLEDライトは市販され、さまざまな分野に応用されている。UVAを発光するUV-LEDは、水銀発光管による紫外線殺菌(UVC)に比べ殺菌効果は弱いものの、食品や生物が存在する環境下でもマイルドな殺菌効果を発揮することができるため衛生環境を向上させる新しい殺菌システムとして注目を集めている。

LED光源は水銀発光管と異なり廃棄時に水銀が生じない環境に優しい光源となっている。またLED光源は点灯後すぐに安定した発光を行うことができ、熱線を出さないため熱に弱い食品や生物にも適応が可能であり、必要な波長のみ効率的に照射することもできる。さらにLEDは衝撃に強いいため応用性が高く、寿命も長く経済的であるため、照射の用途によってさまざまな利点が存在する。

我々の研究グループでは、近年開発が進んでいるUVA-LEDの有用性に着目し、これまでにさまざまな病原性細菌に対してUVA-LEDの殺菌効果を研究してきた^{1~10)}。

本研究では、鶏舎で問題となる鶏病原性大腸菌をターゲットに、UVA-LEDによる殺菌効果を評価し、UVA-LEDを導入した鶏舎で、床敷中に含まれる大腸菌群の分布変動から衛生環境の変化を評価した。

2. 方法

2.1 鶏病原性大腸菌に対するUVA-LED殺菌評価

鶏に病原性を示す大腸菌に対し、UVA-LEDが有効な殺菌効果を示すのかを調べるため、鶏大腸菌症の起原菌(6株)を用い殺菌試験を行った。実験に使用する大腸菌は-80℃で保管し、実際に使用する際には菌を少量採取し、LB培地で一晚振盪培養したものを実験に使用した。12,000rpm 3分間の遠心により、菌を沈殿させ、上清の培養液を取り除いた。リン酸バッファー(PBS)を加えて菌体を洗浄し、遠心、PBS洗浄操作を3回繰り返して、細胞外成分を取り除き、菌体を洗浄した。殺菌実験にはOD600=1.0の懸濁液に調整した菌懸濁液を用いている。異なる背景の大腸菌間でUVA感受性に違いが生じるのかを調べるため、臨床分離株、食品から分離された大腸菌株を用い、96wellプレートのUVA同時照射モデル(0.1mlの菌液に対して0.23 A設定で5分UVA照射:38.85J/cm²)で殺菌評価を行った。鶏病原性大腸菌のUVA感受性を調べる検討では、効率よくUVAを照射するため、ステンレス製容器を用いた照射モデル(0.3mlの菌液に対して0.5 A設定でUVA照射)で検討を行った。殺菌効果については得られたCFUの数値からLog生存比{Log(UVA照射で得られたCFU/コントロールで得られたCFU)}を算出した。

2.2 UV-LED照射による床敷菌叢の変化

徳島県立農林水産総合技術支援センター鶏舎にUVA-LED光源を導入し、UVA照射区と、コントロールとしての非照射区の2区画を作成し鶏の飼育を行った。肉用鶏(ブロイラー)は1回の実験につき飼育密度が1 m²あたり11.5羽となるように雌雄を混合させ部屋に入れた。UVA照射区におけるLEDのUVA放射照度は15.1 μW/cm²と

なるように設置した。6週間の飼育期間中、床敷状態をモニタリングするため、床敷中の水分量の測定を行った。また各週床敷を採取し（鶏飼育期間1-6週間）、これをサンプルとして菌数・菌叢の解析に用いた。

床敷は秤量後、リン酸バッファー（PBS）を加えて床敷懸濁液を作成した。床敷懸濁液をPBSで希釈し、標準寒天培地に塗抹し、37°Cで48時間培養を行い、菌数をコロニー数（colony forming unit：CFU）で定量的に評価した。殺菌効果については得られたCFUの数値からLog生存比{Log(UVA照射区で得られたCFU/非照射区で得られたCFU)}を算出し、グラフ化している。

また、床敷よりバクテリアのゲノムDNAを抽出し、次世代シーケンサーを用い、雑菌組成についても解析を行った。

3. 結果と考察

3.1 鶏病原性大腸菌に対するUV-LED殺菌評価

鶏病原性大腸菌、臨床由来の大腸菌、食品由来

の大腸菌について、UVAに対する殺菌効果について評価を行った。同条件のUVA-LED照射（0.23A設定で5分UVA照射：38.85J/cm²）による同条件でUVA照射し殺菌効率を評価した結果、鶏病原性大腸菌は、食品由来の大腸菌、臨床由来の大腸菌などと同程度の感受性（殺菌効率）を示すことが明らかとなった（Fig. 1）。この実験結果からUVA-LEDはヒトに対して病原性を示す大腸菌同様に、鶏病原性大腸菌に対しても有効な殺菌効果を示すことが確認できた。また、おおむね1桁大腸菌の生菌数を減らすためには15-30J/cm²の光量（放射照度）のUVAが必要となることも明らかとなった（Fig. 2）。

3.2 鶏舎へのUVA-LED導入による床敷中雑菌数の変化、および床敷中菌組成の変化

3.1の検討の結果からUVAはしっかり照射することで、大腸菌を殺菌することはできるが、短時間の照射で殺菌効果を得ることが難しいことが明らかとなった。そこで実際に徳島県立農林水産総合技術支援センター鶏舎にUVA-LED光源を導入し、照射区非照射区で床敷中の雑菌数と菌組成

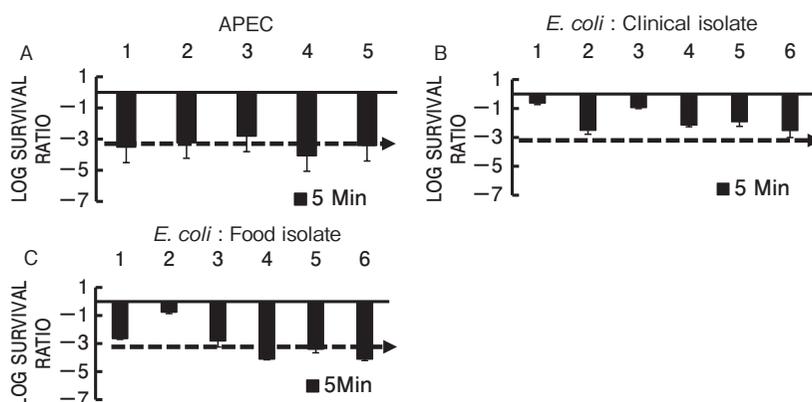


Fig. 1 Bacterial killing ability of UVA irradiation in several type of *E. coli*.

Different type of *E. coli* were categorized in 3 groups, (A) Avian Pathogenic *E. coli*, (B) Clinical isolated *E. coli*, and (C) food isolated *E. coli*. Bacterial cells were suspended in PBS and irradiated same power of UVA-LED (0.23A for 5min : 38.85 J/cm²). Each number (1-5, 1-6) indicated different strain of *E. coli*. Values are shown as means ± SD ($n=3$, n =number of independent replicates)

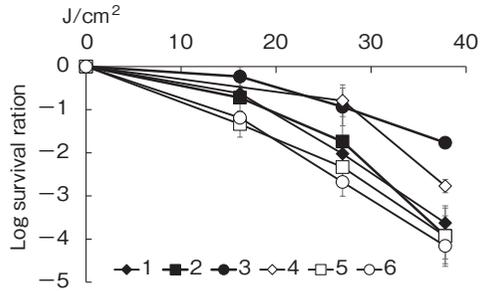


Fig. 2 Bacterial killing ability by UVA irradiation in APEC strains. Each number (1-6) indicated different strain of APEC. UVA irradiations decreased living APEC cells number (CFU) energy (J/cm^2) dependently. According to Log survival ration, 15-30 J/cm^2 energy were required for 90% (Log-1) bacterial killing. Values are shown as means \pm SD ($n=3$, n =number of independent replicates)

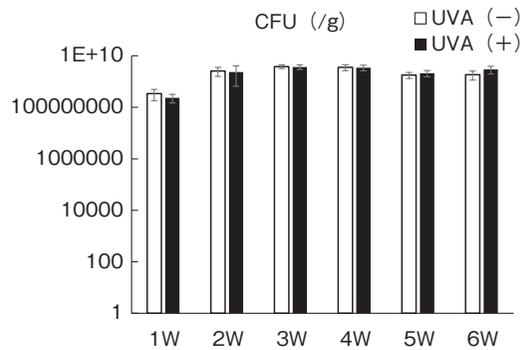


Fig. 3 Bacterial cell number of bedding in the poultry house. The bacterial cell numbers were estimated by colony forming unit on standard agar plate. The bedding were collected each week, but we could not find any colony in 0 week. Bacterial cell number of 1 week to 6 week were indicated 1 g of bedding. Values are shown as means \pm SD ($n=3$, n =number of independent replicates)

(菌叢)について比較検討を行い、UVA-LED光源導入による衛生環境の改善効果を調べた。床敷中の雑菌数を継時的に評価した結果、UVA照射区と非照射区の間で菌数に大きな変化は認められなかった (Fig. 3)。一方で床敷懸濁液からDNAを抽出し、次世代シーケンサーで菌組成について評価すると、興味深いことにUVA照射区では、特に6週で *Proteobacteria* 門-*Gammaproteobacteria* 綱の菌組成が減少していることが明らかとなっ

た。またシーケンサーデータから *γ-proteobacteria* を抽出し、UVA照射区と非照射区での比較検討を行った結果、6週の床敷で有意に減少していることが明らかとなった (Fig. 4)。*γ-proteobacteria* には大腸菌など、鶏や人に対して病原性を示す菌が多く含まれている。実際にUVA照射で減少した菌を特定するために、さらに目レベルでの解析を実施した結果、大腸菌などが含まれる *Enterobacteriales* では有意な変化は認められな

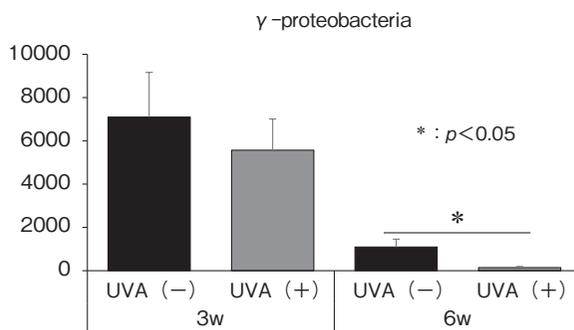


Fig. 4 Different composition of bacterial flora in bedding of the poultry house.

The next generation sequencer revealed different composition of bacterial flora in the bedding of poultry house. The “Class” level data of Gammaproteobacteria were extracted and indicated in 3 weeks and 6 weeks bedding. Values are shown as means \pm SD ($n=3$, n =number of independent replicates)

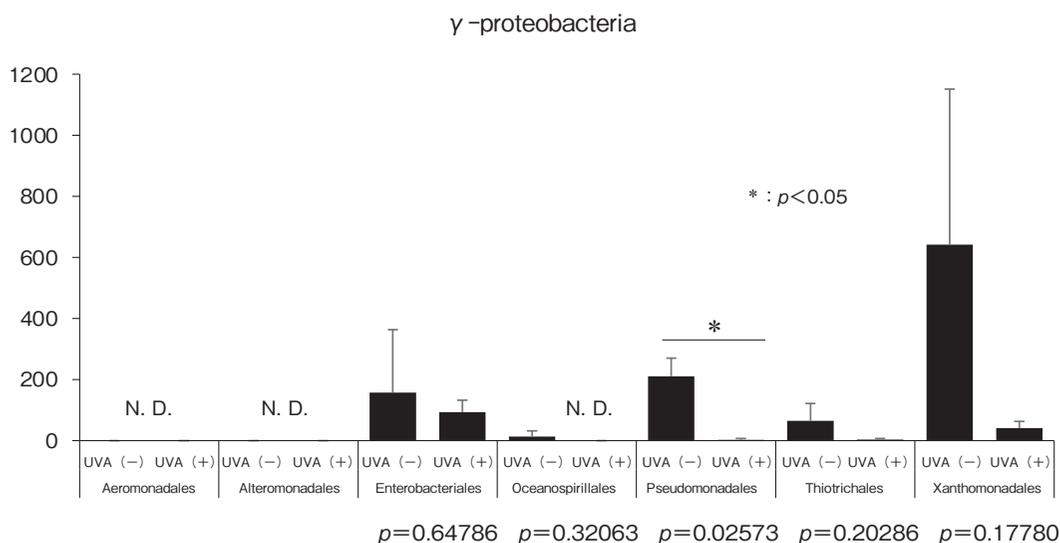


Fig. 5 Different composition of bacterial flora in γ -proteobacteria.

The next generation sequencer revealed different composition of bacterial flora in the bedding of poultry house. The Class of γ -proteobacteria were analyzed in “Order” level. Values are shown as means \pm SD ($n=3$, n =number of independent replicates)

かったが、日和見感染の起因菌として知られている、*Pseudomonadales*で有意な減少が確認された (Fig. 5)。次世代シーケンサーの解析から、Fig. 3で示した寒天培地上でのCFUによる生菌数の評価では判断できない、床敷中の病原性細菌の組成の変化を見出すことに成功した。今回の実験

からは γ -proteobacteriaに特有の変化を見出すことに成功したが、その中でヒトや鶏に対して高い病原性を示す*Enterobacteriales*では有意な変化は認められなかった。しかしながら、全体的にUVAの導入によって減少傾向を示していたことから、今後サンプル数を増やすことや、UVAの

照射エネルギーの適正化を図ることで再評価を続けていく必要があると考えている。また、しばしば雛鶏で感染拡大が問題となる日和見菌 *Pseudomonadales* はUVAの導入によって明らかに減少していたため、UVAによって鶏舎内の衛生環境は部分的ではあるが改善傾向にあることが確認できた (Fig. 5)。

4. 要 約

日本におけるブロイラー肉養鶏の飼育は、システム化・大規模化が進んでいる。大規模鶏舎は、鳥インフルエンザなど外部からの病原体の侵入により、大きな打撃を受けてしまう可能性があるため、感染予防のため従来の開放型鶏舎から、セミウインドレス、ウインドレスの鶏舎へと環境の移行が進んでいる。ウインドレス鶏舎では、外部との接触が極端に低減するため感染症のリスクを著しく低下させることができるが、一度病原体が混入すると一気に鶏舎内に拡散してしまうリスクもはらんでいる。UV-LEDは紫外領域の光を発光する発光ダイオードであり、特に太陽光に近い紫外線 (UVA) を発するUVA-LEDライトは、マイルドな殺菌効果を発揮することができるため、食品や生物が存在する環境下で衛生環境を向上させる新しい殺菌システムとして注目を集めている。本研究では、近年開発が進んでいるUV-LEDの有用性に着目し、鶏舎で問題となる鶏病原性大腸菌をターゲットにUV-LEDによる殺菌効果を評価し、UVA-LED導入による鶏舎内の衛生環境の変化を、床敷中の菌数・菌の分布から評価した。UVA-LED照射は、臨床由来の大腸菌や食品由来の大腸菌と同様に、鶏病原性大腸菌に対しても有効な殺菌効果を示すことが確認できた。実際に鶏舎にUVA-LEDを導入して実証検証を行った結果、UVA-LEDは鶏舎内床敷中の雑菌数に影響しなかったが、菌叢 (菌組成) に着目して評価す

ると、ヒトや鶏に対して病原性を示す菌が多く含まれる、*Gamma*proteobacteria綱の菌を減少させることが明らかとなった。これらの結果から鶏舎内へのUVA-LED光照射装置の導入は、衛生状態の改善に有効な手段となる可能性が示された。

文 献

- 1) Le, N. T., Nagata, H., Aihara, M., Takahashi, A., Okamoto, T., Shimohata, T., Mawatari, K., Kinouchi, Y., Akutagawa, M., Haraguchi, M. : Additional effects of silver nanoparticles on bactericidal efficiency depend on calcination temperature and dip-coating speed, *Appl Environ Microbiol*, Aug 15, 77(16), 5629~34, 2011.
- 2) Nhung le, T. T., Nagata, H., Takahashi, A., Aihara, M., Okamoto, T., Shimohata, T., Mawatari, K., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Haraguchi, M. : Sterilization effect of UV light on *Bacillus* spores using TiO₂ (2) films depends on wavelength, *J Med Invest*, 59(1-2), 53~8, 2012.
- 3) Aihara, M., Lian, X., Shimohata, T., Uebanso, T., Mawatari, K., Harada, Y., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Takahashi, A. : Vegetable surface sterilization system using UVA light-emitting diodes, *J Med Invest*, 61(3-4), 285~90, 2014.
- 4) Nakahashi, M., Mawatari, K., Hirata, A., Maetani, M., Shimohata, T., Uebanso, T., Hamada, Y., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Takahashi, A. : Simultaneous irradiation with different wavelengths of ultraviolet light has synergistic bactericidal effect on *Vibrio parahaemolyticus*, *Photochem Photobiol*, Nov-Dec, 90(6), 1397~403, 2014.
- 5) Hou, Y., Nakahashi, M., Mawatari, K., Shimohata, T., Uebanso, T., Harada, Y., Tsunedomi, A., Emoto, T., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Takahashi, A. : Combined treatment of UVA irradiation and antibiotics induces greater bactericidal effects on *Vibrio parahaemolyticus*, *J Med Invest*, 63(1-2), 63~7, 2016.
- 6) Tsunedomi, A., Miyawaki, K., Masamura, A., Nakahashi, M., Mawatari, K., Shimohata, T., Uebanso, T., Kinouchi, Y., Akutagawa, M., Emoto, T., Takahashi, A. : UVA-LED device to disinfect hydroponic nutrient solution, *J Med Invest*, 65(3. 4), 171~176, 2018.
- 7) Nishisaka-Nonaka, R., Mawatari, K., Yamamoto, T., Kojima, M., Shimohata, T., Uebanso, T., Nakahashi, M., Emoto, T., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Wada, T., Okamoto, M., Ito, H., Yoshida, K. I., Daidoji, T., Nakaya, T., Takahashi, A. : Irradiation by ultraviolet light-emitting diodes inactivates influenza A viruses by inhibiting replication and

- transcription of viral RNA in host cells, *J Photochem Photobiol B*, Dec, 189, 193~200, 2018.
- 8) Shimohata, T., Mawatari, K., Uebanso, T., Honjo, A., Tsunedomi, A., Hatayama, S., Sato, Y., Kido, J., Nishisaka, R., Yoshimoto, A., Yamashita, T., Amano, S., Maetani-Yasui, M., Iba, H., Harada, Y., Nakahashi, M., Yasui-Yamada, S., Hamada, Y., Nakagawa, T., Sogabe, M., Emoto, T., Akutagawa, M., Okahisa, T., Kinouchi, Y., Takahashi, A. : Bacterial Contamination of Hemodialysis Devices in Hospital Dialysis Wards, *J Med Invest*, 66(1.2), 148~152, 2019.
- 9) Maria, U., Azuma, M., Sato, M., Shimohata, T., Fukushima, S., Kido, J., Nakamoto, M., Uebanso, T., Mawatari, K., Emoto, T., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Takahashi, A. : Inactivation of Extended-spectrum β -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* by UVA-LED irradiation system, *J Med Invest*, 67(1.2), 163~169, 2020.
- 10) Kojima, M., Mawatari, K., Emoto, T., Nishisaka-Nonaka, R., Bui, T. K. N., Shimohata, T., Uebanso, T., Akutagawa, M., Kinouchi, Y., Wada, T., Okamoto, M., Ito, H., Tojo, K., Daidoji, T., Nakaya, T., Takahashi, A. : Irradiation by a Combination of Different Peak-Wavelength Ultraviolet-Light Emitting Diodes Enhances the Inactivation of Influenza A Viruses, *Microorganisms*, Jul, 8 ; 8(7), 1014, 2020.

網羅的ジェノタイピングによる新規牛白血病抵抗性 遺伝子の同定 (II)

Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by
comprehensive genotyping (II)

目 堅 博 久

(宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター)

Hirohisa Mekata

(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki)

Bovine leukemia virus (BLV) is an etiological agent of malignant lymphoma in cattle which is called enzootic bovine leukosis (EBL). Approximately 35% of cattle in Japan have been infected with BLV. BLV can cause lifelong infection, and no vaccines or therapeutic procedures are currently available to prevent BLV infection or the development of EBL. Therefore, novel control methods to reduce the incidence of EBL are required from livestock industries. Cattle with higher BLV proviral loads represent a higher risk of both horizontal and vertical transmission. Thus, development of methods reducing the proviral load in cattle should be effective to protect BLV-free cattle. A genome-wide association study to identify single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with BLV proviral load was conducted in this study. The study examined 142 cattle with a low proviral load and 146 with a high proviral load. Single SNP (ID : AX-168291905) on chromosome 1 was significantly correlated with proviral load. The result indicates the SNP could be associated with proviral load. We believe that this study will promote the construction of effective measures to prevent BLV infection and control the spread of BLV.

1. 目 的

牛伝染性リンパ腫は、最も報告数が多い牛の監視伝染病であり、その多くを牛伝染性リンパ腫ウイルス (bovine leukemia virus : BLV) の感染を原因とする地方病型が占める。BLV感染牛の多くは症状を示さないが、約5%が感染から数年後に牛伝染性リンパ腫を発症して死亡もしくは全廃棄処分となる。BLVは生涯持続感染するうえ、感染や発症に対するワクチンや治療薬はない。そのため、BLV感染を防ぐことが農場でできる唯

一の対処法である。2009-11年に行われた全国調査の結果、日本では約35%の牛がBLVに感染していた¹⁾。発症届出数も20年間、増加の一途をたどっており、新しい対策法が求められている (Fig. 1)。

BLVは主に昆虫の吸血活動、血液や体液が付着した器具の使い回し、胎盤や初乳を介して伝播する。感染から半年ほど経過すると、血液中のプロウイルス量は安定するが、その量は個体ごとに大きく異なる (Fig. 2)。我々は長期に及ぶ農場での試験から、500 copies/50 ng (of genomic

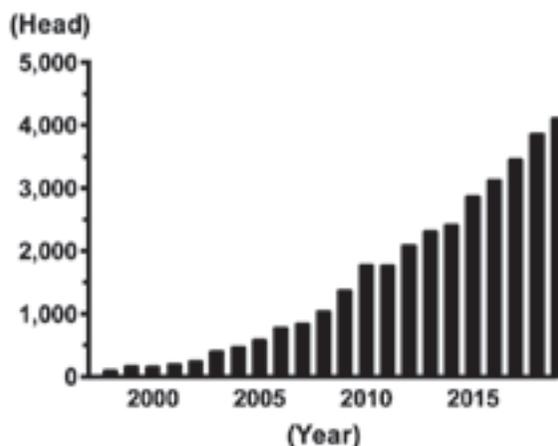


Fig. 1 Year change of the notification number of bovine leukemia in Japan
The figure was made by data from the occurrence of the monitored infectious diseases in MAFF (https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html).

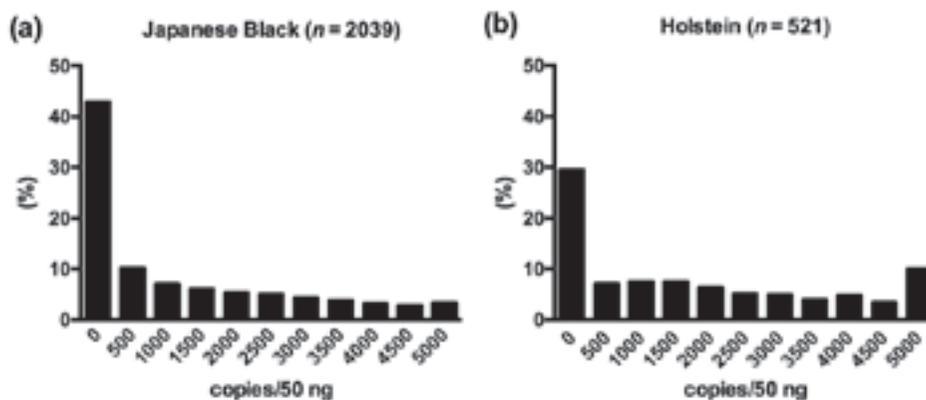


Fig. 2 Histogram of bovine leukemia virus proviral load in Japanese Black and Holstein cattle.
BLV proviral load in a total of 2,560 BLV-infected cattle are depicted in frequency distributions.
The median values were 572.0 and 1,679 copies/50 ng in Japanese Black and Holstein cattle, respectively. (Mekata, H. : The Journal of Farm Animal in Infectious Disease, 7, 163-168, 2018)

DNA) 以下の感染牛が日本の飼養環境下において、ほぼ感染源とならないことを証明した²⁾。つまり、すべての感染牛を対象とした牛白血病対策ではなく、プロウイルス量が高い高リスク牛を対象を絞った牛白血病対策が効率的である。感染率が高い農場では、経営を維持するためにも高リスク牛による繁殖が欠かせない。しかし、高リスク牛は約40%の確率でBLVを母子間伝播するた

め³⁾、新生子牛を新たな感染源としない、すなわち、新生子牛のプロウイルス量を抑える方法が必要である。細胞表面に発現するMHC class II分子はウイルス由来の抗原ペプチドを免疫担当細胞へと提示し、獲得免疫反応の惹起につながる。牛のMHC class II遺伝子の一種であるBoLA class II *DRB3*0902*遺伝子 (0902遺伝子) をヘテロもしくはホモで持つ牛は、プロウイルス量が極端に低

い⁴⁾。つまり、高リスクの母牛に0902遺伝子を持つ種牛を交配することで、新生子牛を50%以上の確率で低リスク牛にすることができる。一方で、特定の遺伝子への偏りは、遺伝的多様性の消失につながり、異なる感染症等に対して重篤な被害をもたらす可能性が否めない。そこで、0902遺伝子以外にもプロウイルス量を制御できる牛白血病抵抗性遺伝子の特定が望まれる。

これまでの調査で、0902遺伝子は6.8%の牛が保有していた⁴⁾。一方、感染牛の33%は非常にウイルス量が低い。つまり、0902遺伝子以外にも牛白血病抵抗性遺伝子が存在する可能性がある。そこで本研究では、プロウイルス量と宿主遺伝子一塩基多型 (SNPs) とのゲノムワイド関連解析から、新規牛白血病抵抗性遺伝子を同定することを目的とした。

2. 方法

2.1 検体

2018年4月から2020年10月までに採取したBLV感染牛 (黒毛和種, 12ヶ月齢以上, 雌) の血液を使用した。指示書に従いELISA法 (牛白血病エライザキット; ニッポン・ジーン, 東京, 日本) により抗BLV抗体を検出した。抗BLV抗体陽性の検体については, Wizard Genomic DNA Purification Kit (プロメガ, マディソン, 米国) もしくはmagLEAD 12gc (プレジジョン・システム・サイエンス, 松戸, 日本) を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したDNAは分光光度計 (NanoDrop8000; サーモサイエンティフィック, ウォルサム, 米国) を用いてDNAの純度および濃度を測定した。抽出DNAを鋳型にして既報のプライマー/プローブ配列を用いてリアルタイムPCRを行い, プロウイルス量を定量した⁵⁾。本研究では, ELISA法とqPCR法とともに陽性の検体をBLV感染とし, 以後の解析に用いた。

2.2 SNP Array解析

リアルタイムPCRの結果, 2,000copies/50ngを超えた146検体を高リスク群, 100copies/50ng以下の142検体を低リスク群とした。なお, 遺伝的な偏りを防ぐため, 1農場あたり最大3検体をSNP Arrayに供した。SNP Array (GeneTitan, Axiom Bovine Genotyping v3 Array; サーモサイエンティフィック社) はタカラバイオ社 (草津, 日本) およびサーモサイエンティフィック社に受託解析した。データ解析はSNP & Variation Suite (ゴールドンヘリックス社, ボーズマン, 米国) を用いた。サンプルデータのクオリティチェックはCall rate > 0.95を, ジェノタイピングデータのクオリティチェックはCall rate > 0.95, Minor allele frequency > 0.01, Hardy Weinberg平衡 $p > 0.001$ を条件とした。本研究では, ヘテロでプロウイルス量に寄与する遺伝子を探索することを目的としたため, 優性および劣性モデルによるSNP関連解析を行った。統計解析はフィッシャーの正確確率検定で行い, ボンフェローニ補正より算出した値 (= 0.05/比較したSNP座位数) 未満を有意差ありとした。

3. 結果と考察

SNP Arrayに供した全288検体がサンプルのクオリティコントロールを満たした。また, Axiom Bovine Genotyping v3 Arrayに配置された65,003個の常染色体上のSNPsのうち, 39,338個がクオリティコントロールを満たした。そこで, これら39,338個のSNPsについてプロウイルス量との関連解析を行った。優性モデルによるSNP関連解析において, 有意水準である $p < 1.27 \times 10^{-6}$ を満たすSNPが1つ存在した (Fig. 3a)。また, 劣性モデルでは, 有意水準を満たすSNPは存在しなかった (Fig. 3b)。有意差があったSNP (ID: AX-168291905) は1番染色体上95, 193, 165bpに位

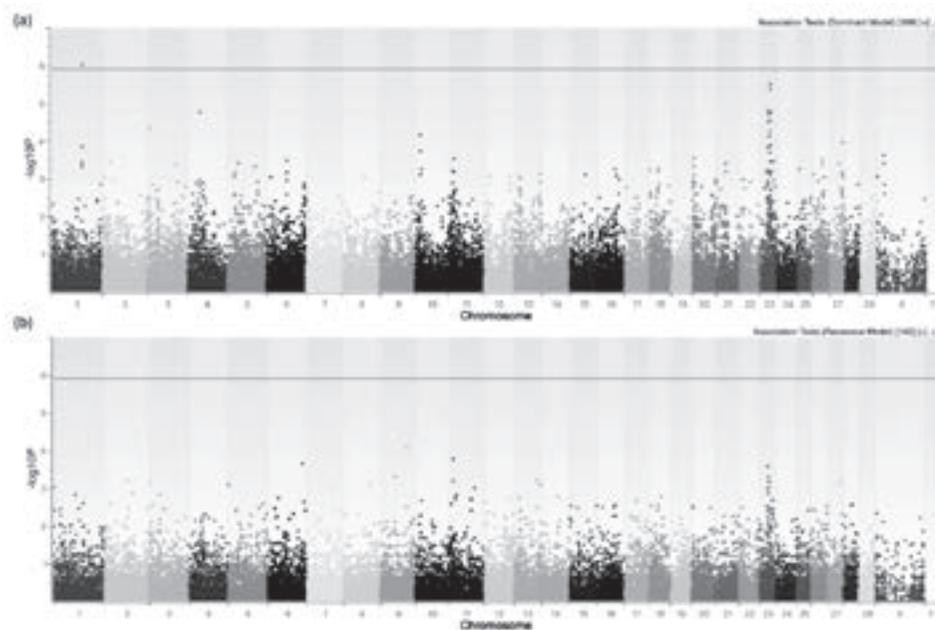


Fig. 3 Manhattan plot of a genome-wide association study on bovine leukemia virus proviral load in 288 cattle.

Manhattan plot of dominant and recessive model are depicted. The number of chromosomes and the negative logarithm of the association p values are displayed along the x -axis and y -axis, respectively. p value was calculated by Bonferroni correction and the line indicated the p value of 1.27×10^{-6} .

Table 1 Allele type of AX-168291905 SNP among cattle with high and low BLV proviral load.

	A_A	A_G	G_G	Total
High proviral load (>2000copies/50 ng)	69	60	13	142
Low proviral load (<100copies/50 ng)	111	31	3	145
Total	180	91	16	287*

*1 sample could not be identified the allele

置し, epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2) をコードする遺伝子にある。メジャーアレルはA, マイナーアレルはGであり, このSNPとプロウイルス量の関係はTable 1 のとおりであった。オッズ比は3.45, $p=9.75 \times 10^{-7}$ であった。つまり, このSNPにおいて, Gをホモもしくはヘテロで持つ牛は, Aをホモで持つ牛に比べて, 有意に低リスク群が多いことを示す。一方で, このSNPの近傍では, 小さな p 値が観測されな

かった (Fig. 3)。一般的に, DNAチップはSNP座位を密に観測するため, 真の関連座位であれば, その付近の座位も小さな p 値を示すことが多い。このことから, AX-168291905は偶然に有意水準を満たした可能性も考えられる。牛のSNPアレイは, 一般的なヒトやマウスでのSNPアレイ (50 - 100万座位) と比べて, 座位数が圧倒的に少ない。このことが, マウスやヒトのアレイとは異なる傾向を示した可能性も考えられる。今後は,

このSNPとプロウイルス量との相関について、SNPを検出するプローブを作成したうえで、リアルタイムPCR法もしくはデジタルPCR法によって検体数を増やして検討する必要がある。本研究では、23番染色体において、少ないp値が多く検出される傾向にあった。BLVでは、23番染色体にコードされているBoLA class IIの多型領域がプロウイルス量と相関を示すことが多くの研究で明らかにされている^{6,7)}。このことから、SNPアレイに供した検体数としては、十分な数だったと判断できる。

4. 要 約

牛伝染性リンパ腫ウイルス (BLV) の感染を原因とする牛伝染性リンパ腫は、2008年以降、最も多い牛の監視伝染病である。日本では30-40%の牛がBLVに感染していることから、新たな対策法の開発が必要である。すべての感染牛がBLVの感染源となるのではなく、プロウイルス量が高い牛のみが感染源となる。そこで、プロウイルス量を遺伝学的手法で抑えるアプローチが有効である。牛のBoLA class IIの多型領域は、個体により大きく異なり、それがプロウイルス量の決定に寄与することが明らかとなっている。そこで、それ以外の宿主遺伝子にもプロウイルス量に寄与する遺伝子があるのかを、宿主遺伝子の一塩基多

型 (SNP) とのゲノムワイド関連解析から明らかにすることを本研究の目的とした。本研究では、高ウイルス牛と低ウイルス牛の血液146および142検体をSNP Array解析に用いた。その結果、1番染色体上の1つのSNP (ID: AX-168291905) にのみ有意差が認められた。AX-168291905は1番染色体上95, 193, 165bpに位置し、epithelial cell transforming sequence 2 (ECT2) をコードする。本研究の結果、BLVプロウイルス量に関与する可能性があるSNPを1つ同定することができた。しかし、近傍の座位ではプロウイルス量との相関が認められないことから、偶然の可能性も否定できない。今後は、本研究で特定したSNPとプロウイルス量との相関について、さらに検体数を増やして解析を継続する必要がある。

文 献

- 1) Murakami, K., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123~1126, 2013.
- 2) Mekata, H., *et al.* : *Jpn. J. Vet. Res.*, **66**, 157~163, 2018.
- 3) Mekata, H., *et al.* : *Vet. Rec.*, **176**, 254, 2015.
- 4) Hayashi, T., *et al.* : *J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 1552~1555, 2017.
- 5) Takeshima, S.-N., *et al.* : *Arch. Virol.*, **160**, 1325~1332, 2015.
- 6) van Eijk, M. J., *et al.* : *Anim. Genet.*, **23**, 483~496, 1992.
- 7) Lo, C. W., *et al.* : *Viruses*, **12**, 352, 2020.

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（Ⅲ）

A survey of gastrointestinal parasites infection and implementation of
parasite control program in cattle（Ⅲ）

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 the host, intestinal epithelium and innate lymph cells are activated and induce Th2 immune responses. However, cattle rarely 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, antiparasitic drug resistance incidents increase these days. The field study investigating 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 so far.

This year, we conducted a survey in prefectures other than Miyagi and compared it with the results in Miyagi. Rectal stools were collected from 10 to 20 cattle in 6 pastures (A, B, C, D, E, F) in Iwate, Akita, Ehime (2 locations), Oita, and Miyazaki prefectures. An egg test was performed using the modified Wisconsin method, the type of insect was identified from the morphology of the egg, and the number of eggs was measured. The test targeted nematodes, coccidia, and *Moniezia benedeni* in the gastrointestinal tract. Gastrointestinal nematode eggs were detected at a relatively high rate in farms that did not use ivermectin, and it was considered necessary to review the anthelmintic program. It is important for pastures hygiene to actively conduct parasite egg tests on grazing cattle to understand the actual situation and implement an appropriate anthelmintic program.

1. 目 的

近年、生産コストの削減や省力化だけでなく、家畜のアニマルウェルフェアや畜産物の付加価値生産を目的とした放牧が注目を浴びている。放牧

牛の赤身肉は健康的で食べ応えがあるとして、消費者にも人気が高まっている。しかし、放牧は感染のリスクを高め、その結果甚大な経済的損失をもたらす場合がある。線虫感染により、腸管粘膜下の免疫細胞が活性化し、上皮に作用して粘液産

生を増し、平滑筋の運動が活発になって蠕動運動が増す^{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が、期待される効果を発揮することが困難になる場合がある。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い例や、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、昨年度までに宮城県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した。本年度は他県の状況を調査して、宮城県の状況と比較することとした。

2. 方 法

岩手県、秋田県、愛媛県（2か所）、大分県、宮崎県の6か所（A、B、C、D、E、F）の放牧場で10~20頭を抽出し、直腸便を採取した。ウイスコンシン変法を用いて虫卵検査を実施し、虫卵の形態から虫の種類を同定し、虫卵数の計測を行った。消化管内線虫、コクシジウム、ベネデン条虫を対象とした。

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牧場規模
- ②使用している駆虫剤の種類
- ③投薬時期および回数
- ④放牧の時期

3. 結果と考察

【A牧場】放牧地面積は14ha、採草地は14.6ha、放牧牛は黒毛和種8頭、日本短角種21頭を飼育している。このうち黒毛和種4頭、短角種18頭を供試した。消化管内線虫卵は9%（2/22）の牛が陽性であった。コクシジウムオーシストは73%（16/22）が陽性であった。ベネデン条虫卵は検出されなかった。駆虫薬として、イベルメクチン製剤であるパイメクトピカルが月に一度の割合で投与されていた。今回の調査は最終投薬日から13日後であった。

【B牧場】放牧地面積1.3ha、黒毛和種成牛39頭、育成牛13頭、日本短角種成牛13頭を飼育している。このうち黒毛和種13頭、日本短角種3頭を供試した。消化管内線虫卵は31%（5/16）が陽性であった。コクシジウムオーシストは69%（11/16）が陽性であった。ベネデン条虫は検出されなかった。放牧直前にフルメトリン製剤が投与され、その後8月中旬に再度投与されていたが、採材直前に投薬は実施されていなかった。

【C牧場】放牧地面積9ha、ホルスタイン種51頭を飼育している。このうち10頭を供試した。消化管内線虫卵は40%（4/10）が陽性であった。コクシジウムは70%（7/10）が陽性であった。ベネデン条虫は検出されなかった。駆虫薬は投与されていなかった。

【D牧場】放牧地面積3ha、褐毛和種15頭を飼育している。このうち10頭を供試した。消化管内線虫卵は検出されなかった。コクシジウムは70%（7/10）が陽性であった。ベネデン条虫は10%

(1/10) が陽性であった。6月末にイベルメクチンブアオン剤が投与されていた。採材日は投薬40日後であった。

【E牧場】放牧地面積は150ha, 乳用牛(ホルスタイン種・ブラウンスイス種)3,000頭以上, 肉用牛(黒毛和種, 交雑牛)1,000頭以上を飼育している。このうちブラウンスイス種5頭, ホルスタイン種12頭を供試した。E牧場では, 入牧前にイベルメクチン製剤が投与され, その後は2週間間隔でバイチコールが投与されていた。今回は1回目の採材と同時にイベルメクチン製剤を投与し, 10日後に2回目の採材を行って投薬の効果を評価した。1回目の調査では76% (13/17) の牛に消化管内線虫卵が検出され, 全頭100% (17/17) の牛にコクシジウムオーシストが検出された。ベネデン条虫卵は検出されなかった。2回目の調査では, 糞便がうまく取れなかった1頭を除く16頭(ブラウンスイス種5頭, ホルスタイン種11頭)を供試し, 75% (12/16) の牛に消化管内線虫卵が検出され, コクシジウムオーシストは100% (16/16) の牛で陽性であった。E牧場ではイベルメクチン製剤の効果が低下しており, 薬剤の変更など対策が必要であると考えられた。

【F牧場】放牧地面積15ha, 採草地面積25ha, ホルスタイン種30頭, 黒毛和種繁殖母牛50頭, 子牛60頭, 肥育牛45頭を飼育している。このうち黒毛和種22頭を供試した。90.1% (20/22) の牛に消化管内線虫卵が検出され, コクシジウムオーシストが9% (2/22) の牛に検出された。ベネデン条虫卵は検出されなかった。F牧場ではイベルメクチン製剤は投与されておらず, フルメトリン製剤が3月と10月に投与されていた。F牧場では消化管内線虫の保有率が高いので, イベルメクチン製剤の使用を検討する必要があると考えられた (Table 1)。

昨年までの調査で, 宮城県において高率に消化

Table 1 The ratio of gastrointestinal parasites positive cattle

farm	date of sampling	medicine	date of medication	the number of samples	average age of months (minimum-maximum)	positive ratio (%) (positive/total)		
						Nematodes	Coccidia	Moniezia benediti
A	2020.8.13	ivermectin	2020.7.30	22	55 (12-161)	9 (2/22)	73 (16/22)	0 (0/22)
B	2020.8.4	flumethrin	2020.4.15-7.20	16	88 (44-164)	31 (5/16)	69 (11/16)	0 (0/16)
C	2020.8.10			10	25.5 (24-79)	40 (4/10)	70 (7/10)	0 (0/10)
D	2020.8.9	ivermectin	2020.6	10	78.1 (18-136)	0 (0/10)	70 (7/10)	10 (1/10)
E	2020.8.20	ivermectin	2020.5	17	14 (13-14)	76 (13/17)	100 (17/17)	0 (0/17)
	2020.8.31	ivermectin	2020.8.20	16	14 (13-14)	75 (12/16)	100 (16/16)	0 (0/16)
F	2020.12.1	flumethrin	2020.1	22	135 (65-209)	90.1 (20/22)	9 (2/22)	0 (0/22)

管内寄生虫感染が広がっていることが明らかになった^{8,9)}。今回の調査により, 全国各地の放牧場においても消化管内寄生虫感染対策についての関心は高くなく, 一定の管理がなされていない牧場が存在する実態が明らかになった。その中でも, E牧場を除き, イベルメクチン製剤を使用している牧場では線虫卵陽性率が低い傾向が認めら

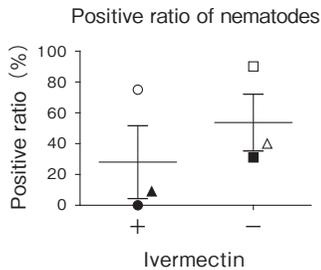


Fig. 1 Positive ratio of nematode with (+) /without (-) administration of ivermectin. Comparison of nematode egg positive rates between farms treated with ivermectin and farms not treated with ivermectin (mean \pm SEM)
 Farm A : ▲ B : ■ C : △ D : ● E : ○
 F : □

れたことから、イベルメクチン製剤の適切な投与が牧野衛生に重要であることが示唆された。一方、E牧場では、イベルメクチン製剤に対する耐性を獲得した虫が出現している可能性があり、薬剤の感受性についてさらに調査して、駆虫薬を選択していく必要があると考えられた (Fig. 1)。

本研究の結果、多くの放牧場で消化管内寄生虫が広く浸潤していること、その原因の一つとして、適切な駆虫プログラムに従った投薬が行われていない現状が明らかになった。今後は生産農家、家畜保健衛生所および自治体担当者への情報提供や粘り強い啓蒙が重要であると考えられた。

4. 要 約

放牧牛の赤身肉は、健康的でおいしいとして日本の消費者に人気がある。しかし、放牧家畜の寄生虫駆除は容易ではない。消化管線虫が宿主に侵入すると、消化管上皮や自然免疫細胞が活性化され、Th2免疫応答を誘導する。しかし、寄生虫感染は重篤な臨床症状を示さないことが多く、飼養者は生産性の低下を認識しにくい。イベルメクチンはダニや線虫に対して効果の高い薬剤だが、最

近では耐性を示す虫の事例が報告されている。消化管寄生虫の浸潤状況を調べるため、1990年代には全国的な調査が行われたが、近年は実施されていない。

本研究では、これまでに宮城県の放牧場における消化管寄生虫の浸潤度と駆虫状況を調査した。今年度は、宮城県以外の県において調査を実施し、宮城県の結果と比較した。岩手県、秋田県、愛媛県 (2か所)、大分県、宮崎県の6か所 (A, B, C, D, E, F) の放牧場で10~20頭を抽出し、直腸便を採取した。ウイスコンシン変法を用いて虫卵検査を実施し、虫卵の形態から虫の種類を同定し、虫卵数の計測を行った。検査は消化管内線虫、コキシジウム、ベネデン条虫を対象とした。イベルメクチン製剤を使用していない牧場では比較的高率に消化管内線虫卵が検出され、駆虫プログラムの見直しが必要と考えられた。放牧牛は積極的に寄生虫卵検査を行って実態を把握し、適切な駆虫プログラムを実施することが牧野衛生に重要であると考えられた。

文 献

- 1) 森本素子：家畜感染症学会誌, 5, 63~68, 2016.
- 2) Zhao, A., McDermott, J., Urban, J. F. Jr., et al. : *J. Immunol.*, 171, 948~54, 2003.
- 3) 及川伸, 川匂文男, 平賀健二, 本川正人, 千葉由見, 小川徹三, 福本真一郎：日獣会誌, 51, 237~240, 1998.
- 4) 高橋俊彦：家畜診療, 50, 339~347, 2003.
- 5) Nagata, T., Roncalli, R. A., Mishiba, T., Yamada, K., Ura, S. : *Jpn. Bull. Animal Hyg.*, 42, 3~7, 1995.
- 6) Geurden, T., Chartier, C., Fanke, J., et al. : *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 5, 163~71, 2015.
- 7) 高橋史昭：臨床獣医, 36, 14~20, 2018.
- 8) 平成30年度 食肉に関する助成研究調査報告書 VOL.37, 2019.
- 9) 平成31年度 (令和元年度) 食肉に関する助成研究調査成果報告書 VOL.38, 2020.

離乳育成豚のリジン要求量に関する研究（Ⅱ） —飼養成績と腸内細菌叢に及ぼす影響—

A study on requirements of lysine in weanling pigs (Ⅱ)

- Effects on growth performances and microbiota -

勝 俣 昌 也・鈴 木 武 人

(麻布大学獣医学部)

Masaya Katsumata and Takehito Suzuki

(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

We conducted this study in order to determine lysine requirements of weanling-growing pigs estimated from their growth performances. Further, we also determined the effects of dietary lysine concentrations on cecal microbiota in weanling-growing pigs. We prepared four test diets of which concentrations of total lysine were 0.95, 1.20, 1.70, and 1.95%, respectively and fed these diets to 5-week old barrows for 3 weeks. We estimated lysine requirements of weanling-growing pigs from feed efficiencies during the latter 2 weeks of the feeding trial using broken-line regression analysis; the estimation is 1.54% as the concentration of total lysine in diets and 1.46% as the concentration of standardized ileal digestible lysine. The dietary lysine concentrations did not affect the cecal microbiota in this study; supplementation of antibiotics to test diets may be a reason of this.

1. 目 的

本研究は、離乳育成豚のリジン要求量を、飼養成績と腸内細菌叢、2つの切り口から明らかにすることを目的として実施した。

日本飼養標準・豚（2013年版）¹⁾と米国のNRC飼養標準（2012年版）²⁾に記載されている体重10～25kg程度の豚のリジン要求量を比較すると、NRC飼養標準に記載されているリジン要求量のほうが20%以上高い。NRC飼養標準では多産系などタンパク質蓄積能力が高い豚を視野に入れて新しいデータを採用したことがこの差の一因である。さらに、日本飼養標準、NRC飼養標準、ともに出版からやがて10年が経過する。この間、日

本国内でも豚の育種改良は進んでいる。したがって、日本飼養標準に記載されているリジン要求量を参考にして飼料を調製すると、リジン不足に陥るおそれがある。そこで本研究では、日本国内で飼養されている豚のアミノ酸要求量を再検討する一環として、離乳育成豚のリジン要求量を明らかにすることを目的とした。令和元年度の3反復分のデータから、体重10～20kgの豚のリジン要求量は飼料の総リジン濃度として推定値1.69%を得た。さらに推定値の精度を高くするため、令和2年度はさらに3反復の飼養試験を実施した。

ところで、腸内細菌叢に関わる研究は近年の進展が著しい研究分野であり、摂取する食餌の内容が腸内細菌叢に影響を及ぼし、ひいては宿主のエ

エネルギー代謝の制御に関わっていることが分かってきた³⁾。豚でも飼料中のタンパク質濃度の制限や、タンパク質源の違いによって、腸内細菌叢が影響を受けることが報告されている^{4~6)}。これらの知見は、豚の飼料中の単一のアミノ酸の濃度の違いが、豚の腸内細菌叢に影響を及ぼすことを示唆している。本研究では、飼料のリジン濃度が離乳育成豚の腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにするため、盲腸内容物を採取して腸内細菌叢を解析した。

2. 方 法

本研究は麻布大学動物実験委員会により審査され、承認を受けて麻布大学の豚舎施設で実施した(承認番号190701-4)。4週齢の去勢雄豚(品種名スイートマミー)を株式会社シムコの館山農場から導入した。導入後の1週間は市販人工乳を給与して予備飼育期間とし、その後、総リジンとして0.95%、1.20%、1.70%、1.95%の4種類の飼料を給与して3週間飼育した。標準化可消化(SID)リジン含量の設計値は0.86%、1.11%、1.61%、1.86%である。これらの試験飼料は試験担当者が設計し、一般社団法人科学飼料協会に配合を依頼した。Table 1に供試飼料の化学組成の設計値と

測定値を示した。なお、試験期間中は1豚房に1頭を収容し、不断給餌、自由飲水、午前7時点灯・午後7時消灯の条件とした。飼育室の気温は制御しなかったが、床暖房とコルツヒーターを使い、床暖房直上の温度は33~34℃となるようにした。試験飼料は、トウモロコシ、大豆粕、魚粉、脱脂粉乳をベースとし、リジンを含めた結晶アミノ酸を添加して調製した。後半2週間の飼料効率を指標としてSASのNLINプロシジャーで折れ線モデル(ガウス・ニュートン法⁷⁾)にあてはめ、総リジン要求量を推定した。さらに、飼養試験終了時に供試豚から盲腸内容物を採取し、16S rRNAコード領域の系統的シーケンスにより盲腸内細菌叢を解析した。解析は(株)マイクロバイオータに依頼した。

飼養成績に関する統計処理：反復をブロック、飼料のリジン濃度を要因とし、乱かい法にのっとり1元配置の分散分析をSASのGLMプロシジャーで実施して、飼養成績に及ぼす飼料のリジン濃度の影響を検定した。リジン濃度の影響を検出した後半1週間の飼料摂取量と飼料効率については、SASのGLMプロシジャーでTukey-Kramer法により、平均値間の差を検定した。

リジン要求量の推定：SASのNLINプロシ

Table 1 Concentrations of crude protein, total lysine, standardized ileal digestible lysine, digestible energy in diets in fed basis.

	Lysine 0.95	Lysine 1.20	Lysine 1.70	Lysine 1.95
Calculated values				
Crude protein (%)	16.9	17.2	17.9	18.3
Total lysine (%)	0.95	1.20	1.70	1.95
SID lysine* (%)	0.86	1.11	1.61	1.86
DE** (Mcal/kg)	3.43	3.43	3.42	3.41
Analyzed values				
Crude protein (%)	15.5	16.2	17.7	19.0
Total lysine (%)	0.88	1.07	1.63	1.83
SID lysine† (%)	0.80	0.99	1.54	1.75

* Standardized ileal digestible lysine

** Digestible energy

† Calculated from analyzed value of total lysine

ジャーを使い、ガウス・ニュートン法で折れ線モデルにあてはめて、リジン要求量を推定した。この推定には、総リジン濃度の測定値、総リジン濃度の測定値から計算したSIDリジン濃度を用いた。そして、折れ線モデルにより得た推定値と標準誤差を用いて95%信頼区間を計算し、95%信頼区間の上限をリジン要求量の推定値とした。

なお、SASによる解析は、京都大学学術情報メディアセンターのスーパーコンピュータを使って実施した。

3. 結果と考察

Table 2 に後半2週間の飼養成績を示す。飼料摂取量に飼料のリジン濃度の影響はなかったが、0.95%と1.20%の平均値が高かった。一方、平均値間の差は検出できなかったが、後半1週間の飼料摂取量に及ぼす飼料のリジン濃度の影響を分散分析で検出した。すなわち、飼料のリジン不足を補うために、飼料摂取量を高くすることで、必要とするリジンを摂取しようと供試豚が反応した可能性がある。飼料摂取の影響を受けたためか、日増体量には飼料のリジン濃度の影響は検出できなかった。飼料効率は飼料のリジン濃度の影響受け ($p < 0.05$)、0.95%と他の3つの濃度の間には差があった ($p < 0.05$)。

Table 3 と Fig. 1 に飼料効率を反応指標として折れ線モデルにあてはめた結果を示す。総リジン濃度の要求量として推定値1.27%を得た。ガウス・

ニュートン法による解析では推定値と標準誤差が示される。本研究では推定値と標準誤差から95%信頼区間を計算した。総リジン要求量推定値の95%信頼区間の高いほうの値は1.54%であった。要求量の推定値は安全率も考慮する必要があると考え、本報告では総リジン要求量の推定値は1.54%を採用する。SIDリジン要求量は1.19%と推定され、95%信頼区間を考慮すると1.46%となった。前述したように、日本飼養標準¹⁾に記載されている体重10~20kg (期待増体量470g/d) の豚の総リジン要求量は1.14%、SIDリジン要求量は0.96%である。本研究の供試豚の飼養試験後半2週間の体重は10~20kgに相当するが、日増体量は660~723g/dだった (Table 2)。本研究のリジン要求量の推定値が日本飼養標準より高くなった理由として「日増体量から分かるように供試した系統の遺伝的能力が高い」をあげることができる。現在日本国内で飼育されているほかの系統の豚も一多産系品種は言うに及ばず一遺伝的能力は高くなっていると考えるのが妥当であろう。以上のことから、日本飼養標準に記載されている体重10~20kgの豚のリジン要求量は、日本国内で現在飼育されている豚には低すぎると結論する。日本国内で飼育されている豚のリジン (ほかの栄養学的必須アミノ酸も含めて) 要求量を見直すために、日本国内でのデータ蓄積が必要である。

Fig. 2 は各供試豚の盲腸内細菌叢の結果である。凡例は示していないが、*Prevotellaceae*科に

Table 2 Growth performances of pigs during the latter two weeks of experiment period.

	Lysine 0.95	Lysine 1.20	Lysine 1.70	Lysine 1.95	SE	P Value
Daily feed intake (g/d)	1324	1209	1117	1080	77	0.1545
Daily feed intake during the last week (g/d)	1461	1421	1207	1130	88	<0.05
Daily body weight gain (g/d)	705	723	713	660	43	0.739
Feed efficiency	0.54 ^b	0.61 ^a	0.64 ^a	0.62 ^a	0.02	<0.01

a, b ; $p < 0.05$

Table 3 Results of broken-line regression analysis.

	Estimation	SE	95% confidence limits	p value
Concentration of total lysine	1.2737	0.1340	1.011 1.536	0.1766
Concentration of SID lysine	1.1937	0.1340	0.9311 1.456	

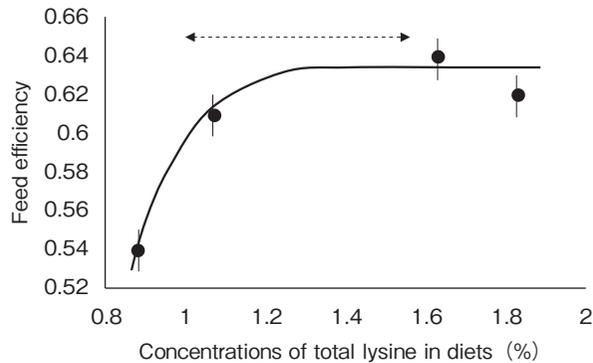


Fig. 1 A quadratic broken line for estimating requirement of total lysine of weanling-growing pigs.

Bars are SEs.

←-----→ 95% confidence limits of concentration of total lysine

属する菌種の割合がもっとも高く、それ以外では、*Bacteroidaceae*科、*Lactobacillaceae*科(*Lactobacillus taiwanensis*)、*Lachnospiraceae*科、*Ruminococcaceae*科、*Veillonellaceae*科の菌種の割合が高かった。Fig. 2の結果からは飼料のリジン濃度が盲腸内細菌叢に影響を及ぼしたようにはみえない。吟味するために主成分分析を実施した(データは示していない)。1頭をのぞき、飼料のリジン濃度に関係なく、ほかの供試豚は1つのクラスターを形成した。したがって、本研究の飼料のリジン濃度の違いは供試豚の盲腸内細菌叢に影響を及ぼさなかったと考えている。もっともリジン濃度が低い供試飼料ともっとも高い供試飼料のリジン濃度は測定値で約2倍(0.88%と1.83%)の差があるが、粗タンパク質濃度は1.2倍(15.5%と19.0%)と差が小さい。Fanら⁵⁾の報告では、飼料の粗タンパク質濃度を16%から10%に低くすると回腸の細菌叢の多様性が低下している。粗タンパク質濃度に

これぐらいの差がなければ腸内細菌叢は影響を受けないのかもしれない。また、リジン要求量の推定が本研究のもっとも重要な目的なので、供試豚の体調を整えるために、合成抗菌剤と抗生物質(クエン酸モランテルとアピラマイシン)を供試飼料に添加している。先行研究⁴⁻⁶⁾では供試飼料に抗菌剤は添加していないことも結果が違った理由かもしれない。

4. 要 約

本研究は、飼養成績を指標とした時の離乳育成豚のリジン要求量を明らかにするとともに、飼料中のリジン濃度が離乳育成豚の腸内細菌叢に及ぼす影響を明らかにすることを目的として実施した。総リジンとして0.95%、1.20%、1.70%、1.95%の4種類の飼料を5週齢の去勢雄豚に3週間給与した。給与期間の後半の2週間(体重10~20kgに相当)の飼料効率を反応指標とし、折れ線モデ

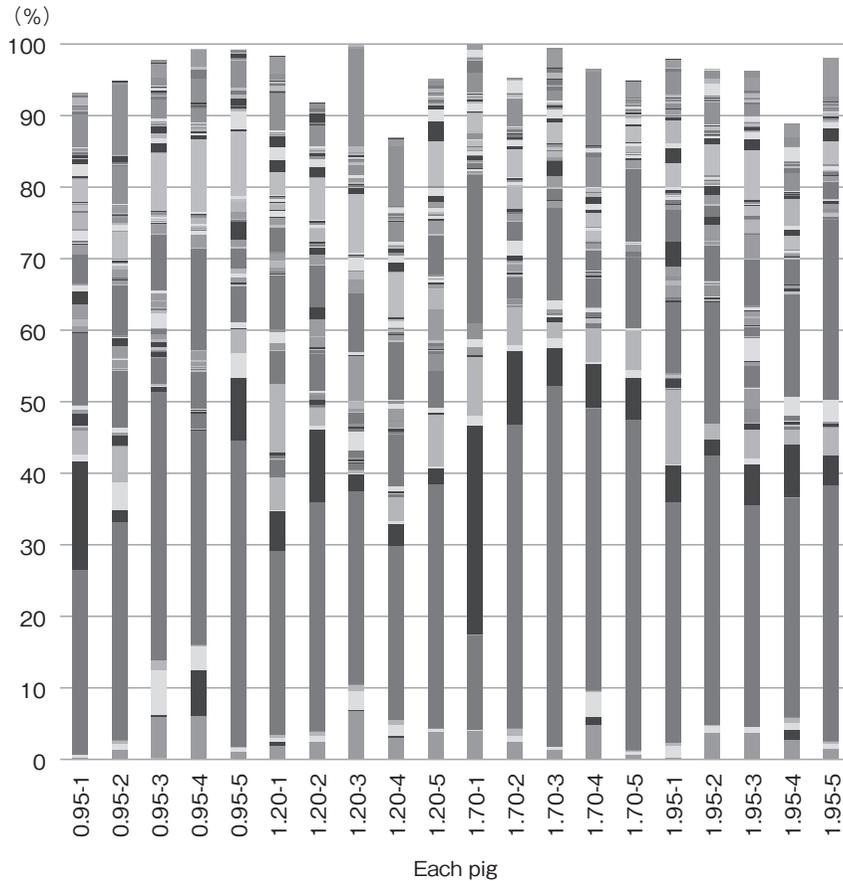


Fig. 2 Cecal microbiota of each pig.

ルにあてはめてリジン要求量を推定したところ、総リジンとして1.54%, SIDリジンとして1.46%を推定値として得た。腸内細菌叢(盲腸内細菌叢)に飼料のリジン濃度の影響はなかった。供試飼料に合成抗菌剤と抗生物質を添加したことが一因かもしれない。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準・豚，2013年版，18，中央畜産会，東京，2013。
- 2) National Research Council of the National Academies, Nutrient Requirements of Swine, 11th Revised Edition, 211, The National Academies Press, Washington, D.C., 2012.
- 3) 木村郁夫：実験医学，37(2)，263～270，2019。
- 4) Rist, V. T. S., et al. : *Anaerobe*, 25, 72～79, 2014.
- 5) Fan, P., et al. : *Scientific Reports*, 7, 43412, 2017, DOI : 10.1038/srep43412.
- 6) Chen, X., et al. : *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8, 246, 2018, doi : 10.3389/fcimb. 2018. 00246.
- 7) Robbins, K. R., et al. : *Journal of Animal Science*, 84, E155-E165, 2006.

牧草サイレージの高品質化に向けた バイオガスプラント消化液施用量の評価

Optimum application of biogas plant slurry for improving grass silage quality

三谷 朋弘¹・上田 宏一郎²

(¹北海道大学北方生物圏フィールド科学センター, ²北海道大学大学院農学研究院)

Tomohiro Mitani¹ and Koichiro Ueda²

(¹Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, ²Reserach Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

To assess an optimum application of biogas plant slurry (BGPS) for making high-quality grass silage, the effect of amount of BGPS application on orchardgrass sward mass, silage quality, intake and digestibility in sheep were investigated. The results clearly showed that, when using BGPS, the doubled nitrogen of the standard application (360 kg N/ha/year) was required to obtain the same amount of sward mass by the standard nitrogen application of chemical fertilizer. However, this doubled nitrogen application of BGPS significantly decreased the fermentation quality of grass silage and decreased organic matter digestibility in sheep when compared with the grass silage harvested from the sward applied with standard nitrogen by both chemical fertilizer and BGPS. Thus, it was concluded that less than 360 kg N/ha/year BGPS application to the sward was favorable to obtain a moderate grass yield as well as available grass silage quality.

1. 目 的

家畜糞尿バイオガスプラントとは、家畜の糞尿をメタン発酵させ、メタンガスをエネルギーとして利用する施設である。家畜糞尿バイオガスプラント消化液 (BGPS) は肥料成分 (窒素, リン, カリウム) を豊富に含んでいるため、適正に扱えば良質な耕種作物や飼料作物の肥料として利用できることが明らかにされている。

消化液は炭素が主にメタンとして回収されるため炭素/窒素比が他の堆肥やスラリーといった有機性肥料に比べると低く、窒素のほとんどはアンモニア態窒素の形で溶解しているため作物成長に

とっては即効性の高い肥料となる。このような特性により、乳牛糞尿BGP消化液の飼料作物の肥料として利用に関するいくつか報告では、デントコーン¹⁾、オーチャードグラス²⁾およびチモシー³⁾の圃場に乳牛糞尿BGPSを施用すると、同窒素量を施用した化学肥料と同様に十分利用できることが実証されている。

家畜糞尿バイオガスプラントによるエネルギー回収システムの有効利用は、副産物としての消化液を飼料生産と家畜生産の循環系に有効に組み込むことが必要条件である。しかしながら、家畜糞尿BGPS施用の飼料作物の収量に及ぼす研究は比較的多くなされてきたものの、乳肉牛の飼料とし

での品質や家畜の生産性の評価はこれまでほとんど報告されていない。BGPSは堆肥やスラリーとは著しく異なる成分的組成を有することからも、消化液を施用して収穫・調製した飼料の品質、家畜による採食量および消化性への影響を明らかにしつつ、最適な施用方法について明確にしておく必要がある。

本研究では、乳牛糞尿BGPSの施用量の違いが、サイレージの発酵品質、ヒツジによる採食量および消化性に及ぼす影響を化学肥料施用の場合と比較しつつ検討することで、牧草サイレージの高品質化に向けたBGPSの最適施用量を明らかにすることを目的とする。

2. 方法

オーチャードグラス主体草地内に約3.5 aの小区画を3つ設置し、施肥標準窒素量(180kg/ha/年)の化学肥料を施用する区(CF-180)、乳牛糞尿BGPSを施肥標準窒素量施用する区(BGPS-180)、およびBGPSを施肥標準窒素量の2倍量施用する区(BGPS-360)に配置した。各区画への化学肥料とBGPSの施用は、本実験で用いる1番草の刈り取り前に3回(前年5月26日、前年7月4日、当年5月10日)に分けて行い、各回につき年間施肥量の半量ずつ散布した。

1番草を6月20日にモアコンディショナーで刈り取った。予乾せずにフォーレージハーベスタで設定切断長6mmに細切し、実験用サイロ(200L)に詰め込み密閉し実験用サイレージを調製した。なお、刈り取り直前に牧草地の草量を地際で刈り取って重量を測定、あわせて草高、冠部被度を測定した。

サイロを調製3か月後に開封し、ヒツジを用いた消化試験のためにビニール袋に1kgずつ小分けして脱気して冷蔵保存した。同時に、サイレージのサンプルを採取した。サンプルの一部は60℃

の通風乾燥機で48時間乾燥し、1mmのスクリーンを通過するように粉碎し化学成分分析に供した。サイレージの発酵品質を測定するため、新鮮サンプルを蒸留水に浸し抽出液を得た。抽出液を用いてpH、揮発性塩基態窒素(VBN)および各種有機酸を測定した。VBNの測定には原子吸光度計を用い、有機酸の測定にはガスクロマトグラフを用いた。また、サイレージの発酵品質を総合的に表すV2スコアをFukawaga et al.⁴⁾の方法により算出した。

牧草サイレージ中の乾物(DM)、有機物(OM)、粗タンパク質(CP)、無灰分中性デタージェント繊維(NDFom)、水溶性炭水化物(WSC)、硝酸態窒素(NO₃-N)およびミネラル(Ca, Mg, K, P)の含量を測定した。

コリデール種去勢雄ヒツジ6頭を供試し、3種のサイレージの消化率と物質出納を測定した。ヒツジは代謝試験ケージで飼養管理し、全糞採取法による予備期間9日、本期間5日の消化代謝試験を実施した。3処理を3×3ラテン方格法により供試ヒツジに割り当てて実験を行った。

サイレージは1日の給与量を2等分し朝9:30および夕方18:00の1日2回給与した。残食がある場合には計量し、毎日の飼料摂取量を測定した。水および固形塩は自由摂取させた。代謝ゲージにより回収される糞と尿を毎日計量し、サンプルを採取した。サイレージと同様に糞サンプルの乾燥と粉碎を行ったのち化学成分含量を測定した。尿サンプルについては窒素含量を測定した。ヒツジの血液を本期間の最終日に頸静脈から採取した。血液成分(尿素態窒素(BUN), P, K, Ca)は各種分析キットを用いて測定した。

採食量、消化率、窒素利用、血液成分に及ぼす影響については、ヒツジ個体を変量効果とし時期と処理を固定効果とする混合モデルにより処理の影響を検討した。5%水準で有意な差が認められ

た場合にTukeyの多重比較を行った。

3. 結果と考察

3.1 牧草収量への影響

牧草収穫前の草地構造および収量をTable 1に示した。収量は、CF-180区では8.7tDM/haであったが、これに比べBGPS-180区では等量の窒素施用を行ったにも関わらず、6.2tDM/haと2.5t/haも少なかった。一方、CF-180区の2倍量の窒素を施用したBGPS-360区ではCF-180区と同等の牧草

収量が得られた。

Table 2にサイレージの化学成分と発酵品質を示した。CF-180区とBGPS-180区を比較すると、BGP-180区ではCP含量が低く、NDFom含量が高く、硝酸態窒素およびミネラル含量については大きな差はなかった。一般的に、イネ科牧草の葉部にはCPが多く含まれ茎部にはNDFomが多く含まれることから、BGPS-180区の原料草は葉部が少なく茎部が多かったことが推察される。一方、BGPS-360区ではCP含量はCF-180区と同等であ

Table 1 Effect of fertilizer source (BGPS : biogas plant slurry, CF : chemical fertilizer) and nitrogen application (180, 360 kg/ha/year) on mass and structure of orchardgrass sward

	CF-180	BGPS-180	BGPS-360
Herbage mass (tDM/ha)	8.68	6.15	8.81
Grass height (cm)	106.9	104.9	104.8
Tiller density (tillers/m ²)	1024	1124	1120
Canopy coverage (%)			
Grass	96.7	98.3	100.0
White clover	1.7	0.0	0.0
Weed	1.7	1.7	0.0
Bare area	0.0	0.0	0.0

Table 2 Effect of fertilizer source (BGPS : biogas plant slurry, CF : chemical fertilizer) and nitrogen application (180, 360 kg/ha/year) on chemical composition and fermentation quality of orchardgrass silage

	CF-180	BGPS-180	BGPS-360
DM (%)	24.5	25.8	21.8
OM (% of DM)	90.5	90.4	88.7
CP (% of DM)	10.6	8.4	10.2
NDFom (% of DM)	63.8	69.1	68.6
NO ₃ -N (% of DM)	0.0020	0.0026	0.0069
Ca (% of DM)	0.37	0.30	0.43
Mg (% of DM)	0.26	0.22	0.25
K (% of DM)	2.67	2.67	2.86
P (% of DM)	0.26	0.28	0.34
pH	3.98	4.37	4.83
Lactic acid (%)	0.85	0.65	0.14
Actic acid (%)	0.24	0.50	0.32
Propionic acid (%)	0.00	0.08	0.12
Butyric acid (%)	0.00	0.58	1.19
VBN (mg/100g)	33.0	28.6	68.7
V2-score	97.9	54.7	44.6

DM : dry matter, OM : organic matter, CP : crude protein, NDFom : ash free neutral detergent fiber, V2-score indicates fermentation quality of silages with judging by the score of good (above 80), fair (60-80) and poor (below 60).

り、NDFom含量はCF-180区より高かった。BGPS-360区では葉部の成長はCF-180区と同等であったが、茎部の成長に対してもCF-180区より肥料効果が高かったため、CF-180区と同等の収量が得られたと思われる。

BGPSからは無機態Nであるアンモニア態窒素が揮散することが報告されている⁵⁾。松中ら²⁾は、その程度を30~55%程度と報告している。スラリーにおいても同様に、アンモニア態窒素が揮散すると報告されている⁶⁾。BGPSは牧草地に施用しても利用可能な窒素が投入量より少ない可能性が示唆され、施肥標準窒素量の化学肥料施用と同等の牧草収量をBGPSによって得るためには、BGPSの施用量は施肥標準窒素量の2倍量が必要であると考えられた。

サイレージ中のNO₃-Nの含量は、BGPS-360区はCF-180区およびBGPS-180区よりも、2~3倍程度高かった。窒素施与量を増やすと牧草のNO₃-N含量が高まり、硝酸塩中毒を引き起こす可能性がある。本試験において散布量の増加とともにNO₃-N含量は増加傾向を示したが、危険値である0.1%より著しく低い値であった。また、BGPS-360区のCa、Mg、K、P含量は、CF-180区およびBGPS-180区のものとは比べ、同等もしくは高い値を示した。これらのことから、BGPSを施肥標準窒素量の2倍量を施用すると、飼料中の硝酸態窒素と各種ミネラル含量が高まることが示されたが、その程度は家畜に悪影響をもたらすほど大きなものではなかった。

牧草サイレージの発酵品質は、BGPSの散布により明確に低下した。CF-180区では乳酸含量が高く、嫌気性乳酸発酵が十分に行われたものであった。一般的に良質サイレージの調製にあたってはpHを4.2以下とすることが必要とされている。本実験におけるサイレージのpHは、CF-180区では3.98と下回っていたが、BGPS-180区と

BGPS-360区のいずれとも4.2を上回っていた。さらに、BGP-360区はBGP-180区に比べpHが高く、乳酸含量もBGPS-360区では0.14と低かった。また、乳酸以外の有機酸の含量およびVBN含量は、BGPS-180区およびBGPS-360区でCF-180区のサイレージよりも高く、BGPS-360区はBGPS-180区より高かった。これらの結果、サイレージの発酵品質を総合的に評価する指標であるV2スコアは、BGPS区はCF区よりも顕著に低く、BGPS-180区よりBGPS-360区で低かった。

本実験で調製したサイレージをヒツジに給与し、採食量、全消化管消化率および窒素出納を測定して結果をTable 3に示した。サイレージの乾物摂取量は、サイレージ間で差はなく、1日あたり800gDM程度であった。DMおよびOMの消化率は、BGPS-360区で他区より低く、CF-180区とBGPS-180区の間には差はなかった。NDFom消化率は、サイレージ間で差はなかった。BGPS区のサイレージは発酵品質が低下したため摂取量、可消化エネルギーの供給量の点では、BGPS-180区はCF-180区と同等の飼料価値を有するものと推察される。

CP消化率については、CF-180区とBGPS-360区の間には有意な差はないが、これらに比べてBGPS-180区では低い値を示した。窒素摂取量および糞中窒素排泄量は、サイレージ間に有意差はなかった。しかし、尿中窒素排泄量は、CF-180区に比べBGPS-180区は有意に低く、BGPS-360区は両者と有意差がなかった。蓄積窒素量については、サイレージ間に有意差はなかった。CF-180区で尿中排泄量が少なかったのは、CP消化率が低く体内に吸収される窒素量が少なかったためであるが、そのことが体蓄積窒素バランスに大きな負の値をもたらすことはなかった。本実験では供試動物として成熟したヒツジを用いたため、CF-180区における低CP消化率は蓄積に負の影響をも

Table 3 Effect of fertilizer source (BGP : biogas plant slurry, CF : chemical fertilizer) and nitrogen application (180, 360 kg/ha/year) on silage intake, total tract digestibility, and nitrogen balance in sheep

	CF-180	BGP-180	BGP-360
DM intake (g/day)	818	858	771
Digestibility (%)			
DM	58.3 ^a	56.5 ^a	50.6 ^b
OM	55.3 ^a	50.0 ^a	48.9 ^b
CP	54.6 ^a	47.7 ^b	53.1 ^a
NDFom	50.2	49.3	49.6
N balance			
Intake	12.0	11.8	12.6
Feces	5.4	6.2	6.0
Urine	7.6 ^a	5.3 ^b	7.0 ^{ab}
Retained	-1.0	0.3	-0.3

DM : dry matter, OM : organic matter, CP : crude protein, NDFom : ash free neutral detergent fiber,
^{ab}p<0.05

Table 4 Effect of fertilizer source (BGP : biogas plant slurry, CF : chemical fertilizer) and nitrogen application (180, 360 kg/ha/year) on nitrogen metabolites and minerals in blood plasma in sheep

	CF-180	BGP-180	BGP-360
BUN (mg/dl)	9.1	7.1	8.1
NH ₃ -N (μg/dl)	220 ^a	163 ^b	130 ^b
Mg (mg/dl)	2.2	2.1	2.1
Ca (mg/dl)	10.7	10.4	10.3
P (mg/dl)	5.3	5.4	6

BUN : blood urea nitrogen
^{ab}p<0.05

たらさなかった。生産動物にBGPS-180区を給与する場合にはCP消化率が低いため、生産に負の影響をもたらす可能性があり、飼料配合等に注意を要するであろう。

ヒツジの血液中の窒素代謝物およびミネラル濃度をTable 4に示した。BUN含量にサイレージ間に差はなかったが、アンモニア態窒素含量は、CF-180区はBGPS-180区およびBGPS-360区よりも有意に高い値を示した。血液中のアンモニア態窒素は、主に第一胃において微生物によってタンパク質に再合成されなかったアンモニアが吸収されたものである。BGPS-180区およびBGPS-360区のサイレージについては、NDFom含量が高いことから、サイレージ中のCPのうち繊維中に結

合したから形態のものが多かったものと思われ、これにより第一胃での分解が遅延し、血液中に吸収されるアンモニア態窒素の量が少なかったと考えられる。

血液中のMg, Ca, およびP含量には、サイレージ間に有意な差は認められなかった。牧草中のK含量が著しく高いとCaおよびMgの吸収が低下し、このような牧草を摂取した牛は低Mg血症となる。本研究におけるBGPS-360区ではK含量が高い傾向にあったが、低Mg血症に対してはすべての番草およびサイレージで安全範囲にあった。また、BGPS-360区のサイレージを摂取したヒツジの血液中のCaやMg濃度は他区よりも低下することはなかった。

以上の結果から、施肥標準窒素量の化学肥料を施用した牧草地と同等の収量を得るためには、乳牛糞尿BGPSは標準窒素量の2倍程度の施用が必要であるが、この施用量では牧草サイレージの発酵品質は大幅に低下することが示された。ヒツジへのBGPSの2倍量施用サイレージによって採食量、窒素出納およびミネラル代謝に負の影響はなかったものの、有機物消化率は化学肥料およびBGPSを標準窒素量施用した場合よりも低いことが明らかになった。これらから、BGPSを草地肥料として用いサイレージ生産する場合には、サイレージの消化率や発酵品質を低下させない標準窒素施肥量の2倍以下での施用が好ましいことが示唆された。

4. 要 約

乳牛糞尿BGP消化液の施用量の違いが、サイレージの発酵品質、ヒツジによる採食量および消化性に及ぼす影響を化学肥料施用の場合と比較し、牧草サイレージの高品質化に向けたBGP消化液の最適施用量を検討した。施肥標準窒素量の化学肥料を施用した牧草地と同等の収量を得るためには、乳牛糞尿BGPSは標準窒素量の2倍程度の施用が必要ではあるが、この施用量では牧草サイレージの発酵品質は大幅に低下することが示された。ヒツジの有機物消化率は化学肥料および

BGPSを標準窒素量施用した場合よりも低かった。BGPSを肥料として用いサイレージ生産する場合には、サイレージの消化率や発酵品質を低下させない標準窒素施肥量の2倍以下での施用が好ましいことが示唆された。

文 献

- 1) 善平大樹, 鈴木清恵, 山中七瀬, 成瀬佳代, 松中照夫: サイレージ用トウモロコシに対するバイオガスプラント消化液の施肥効果, 日本草地学会誌, 48, 378~379, 2002.
- 2) 松永照夫, 熊井実鈴, 千徳あす香: バイオガスプラント消化液由来窒素のオーチャードグラスに対する肥料的効果, 日本土壤肥料学会雑誌, 74, 31~38, 2003.
- 3) 三枝俊哉, 渡部敢: 乳牛ふん尿を主原料とするバイオガスプラント消化液のチモシー採草地に対する肥効と効果的分施肥法, 北海道立農業試験場集報, 90, 29~39, 2006.
- 4) Fukagawa, S., Kataoka, K., Ishii, Y.: Round-bale silage harvesting and processing effects on overwintering ability, dry matter yield, fermentation quality, and palatability of dwarf napiergrass (*Pennisetum purpureum* Schumach), *Agronomy*, 7, 10~16, 2017.
- 5) Sommer, S. G., Jensen, L. S., Clausen, S. D., Sogaard, H. T.: Ammonia volatilization from surface-applied livestock slurry as affected by slurry composition and slurry infiltration depth, *Journal of agricultural Science*, 144, 229~235, 2006.
- 6) Amberger, A.: Ammonia emission during and after land spreading of slurry. In: Odour and ammonia emissions from livestock farming, V. C. Nielsen, J. H. Voorburg, and P. L'Hermite (eds), pp 126-131, Elsevier Applied Science, London, 1991.

ルーメンマツスコアを指標にした子牛の 免疫強化法の研究

Studies on the enhancement of calf immunity appraised by rumen mat score

保田 昌宏^{1,2}・今泉 法子²・阿部 信介^{1,3}

(¹宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科, ²宮崎大学農学部, ³宮崎県農業共済組合)

Masahiro Yasuda^{1,2}, Noriko Imaizumi² and Shinsuke Abe^{1,3}

(¹Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki,

²Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, ³Miyazaki Agricultural Mutual Aid Association)

Effect of ruminal mat formation (RMF) to peripheral blood leukocyte subsets and phagocytosis in pre-weaned calves were evaluated. The score of RMF was measured by giving manual repeated pressures to the ventral sac of rumen 10 times. The examination was performed every month for three months. Healthy Holstein Friesian and Japanese Black crossbred pre-weaned calves in a commercial farm were divided according to the score of RMF. The number of B-cell in high score calves were significantly increase compared to that in low score calves. The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ cells in high core calves were increase compared to those in low score calves. In addition, the phagocytosis of monocytes and granulocytes in high score calves were higher than that of low score calves. In the peripheral blood of high score calves, the phagocytosis of monocytes and granulocytes responsible for natural immunity was higher, the number of T cells and B cells responsible for secondary immunity was also higher than those of low score calves. In conclusion, the evaluation of score of RMF can be useful for understanding health condition of calves. In addition, the feeding management for making high score of RMF calves may be possible to reduce antimicrobial agent usage and production loss due to disease.

1. 目 的

肺炎, 下痢, 関節炎などの慢性炎症性疾患で廃用となる子牛は多く, NOSAI連みやぎきの平成30年度家畜共済事業実績表によると, 新生子異常を除いたとき, 肥育子牛や肉子牛の死廃理由の約50% (約4,500頭) が慢性炎症性疾患であり, それによる損失は膨大な額に及んでいる。これまでに申請者は, 慢性炎症性疾患で廃用認定された子

牛の剖検を年間に約100頭実施してきた。その結果, 肺炎, 下痢および関節炎が子牛の三大炎症性疾患であり, そのほとんどの個体で胸腺が矮小化していることが明らかになった。つまり慢性炎症性疾患は, 獲得免疫系の機能低下により自然免疫系の著しい亢進を誘導していると考えられた (Yasuda et al., submitted)。よって多くの子牛の事故は, 飼養管理の不行き届きによって起こると考えられ, 疾病に強い子牛にする飼養管理方法

の確立が求められている。

牛の第一胃内容物は、気体層、固体層および液層からなる階層構造をなしており、液層に浮いた状態で存在する固体層はルーメンマット (RM) と称される。乳用種成牛のRMは給与飼料によって固さと厚さが変化することや、固さと厚さが1日の総反芻時間と正の相関があることが示されている^{1,2)}。一方、子牛のRM形成に関する報告はほとんどなく、子牛の粗飼料給与の是非については見解が分かれている。しかしながら近年、阿部ら³⁾によって、離乳後子牛群のRMスコアと哺育育成期の死亡事故率と給与飼料の粗飼料割合の関係が調査され、第一胃が粘土状で固い子牛が多くなるように給餌管理すると、疾病の発症率が有意に減少することが報告された。つまり、RMスコアの利用は牛群の管理に有用で、事故発生リスクの評価に使えと考えられるが、抗病性に関わるメカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、子牛のRMの固さをスコア化した基準を用いて、離乳後の子牛群について、RMが固い群と、軟らかい群において、末梢血サブセット解析、顆粒球や単球の貪食能などを指標にして、両群の自然免疫および獲得免疫を比較評価した。

2. 材料と方法

2.1 試験農場

民間農場で飼育される健康な交雑種 (ホルスタイン×黒毛和種) の子牛群 (58日齢から173日齢, 24頭) について、RM形成状況を月に1回、3ヶ月間計測した。RM形成状況は、第一胃腹囊上部を拳あるいは手のひらで10回反復圧迫する間に、波動感を検出したものをRM形成不良、波動感を検出なかったものをRM形成良好とした。頸静脈から7mlの血液をEDTA-2Na採血管で採取し免疫学的な検査を実施した。本研究では、最初と

最後の計測時のRM形成状況によって次の4群に分けた。①RM形成良好→RM形成良好群、②RM形成不良→RM形成良好群、③RM形成良好群→RM形成不良群、④RM形成不良→RM形成不良群である。なお本研究の供試牛には、呼吸器病や下痢症などを発症した例は用いなかった。

2.2 免疫学的検査方法

血液サンプルを比重遠心分離して末梢血単核球を回収した。赤血球を溶血させリン酸緩衝液で洗浄したのち、細胞を蛍光標識した抗体と4℃で1時間反応させ洗浄後、リンパ球ゲートを用いフローサイトメーターで陽性細胞率を測定した。リンパ球サブセット解析の表面抗原と標識は、T細胞のマーカーとして抗CD4抗体 (ILA11A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University, Pullman, WA, USA)、抗CD8抗体 (CC63, Bio Rad, Tokyo, Japan) および抗 γ δ T抗体 (GB21A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) を、NK細胞のマーカーとして抗CD335抗体 (AKS1, Bio Rad) を、B細胞のマーカーとして抗MHC class II抗体 (TH14B, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) および抗IgM抗体 (P-PIG45A2, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) を用いた。各サブセット細胞数は、サブセット比率 (%), 白血球数 (個/ml) およびリンパ球比率 (%) から実数値を算出した。貪食率の解析は、バフィーコートを採取し、赤血球を溶血後、細胞数を調整し10%牛胎子血清添加RPMI1640溶液に、 ϕ 1 μ mの蛍光標識したラテックスビーズ (No. 1030, Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA) を加え、37℃で1時間培養しラテックスビーズを貪食させたのち洗浄して、蛍光標識した抗体でリンパ球サブセットと同様に細胞を染色した。顆粒球のマーカーとして蛍光標識した抗顆粒球抗体

(CH138A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University), 単球のマーカーとして蛍光標識した抗MHC class II抗体(TH14B)を用いた。単球と顆粒球ゲートを用いて各細胞分画の陽性率を算出した。

2.3 統計処理

体側結果, サブセット結果, 貪食結果はそれぞれ Welch's T test, Mann-Whitney U testあるいは共分散分析を用いて解析し, $p < 0.05$ を有意, $p < 0.1$ を傾向ありと評価した。

3. 結果と考察

3.1 胸囲および腹囲

胸囲および腹囲は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 1)。今回④RM形成不良→RM形成不良群が2頭しか認められなかったため, 平均値で一番低値であるものの, ④RM形成不良→RM形成不良群と他の群の統計解析はできなかった。①

RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群の3群間で有意差はなかった。

3.2 リンパ球数および単球数, 単球数の推移
リンパ球数は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 2)。①から③の3群間で有意差はなかった。次に, 単球数の平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 2)。①から③の3群間で有意差はなかった。さらに単球数を測定前と後の増加曲線の傾きで比較すると, ①RM形成良好→RM形成良好群が③RM形成良好群→RM形成不良群に比べて高くなる傾向があった ($p = 0.08$)。

3.3 サブセット解析

CD4⁺細胞数, $\gamma\delta$ T細胞数およびB細胞数は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好

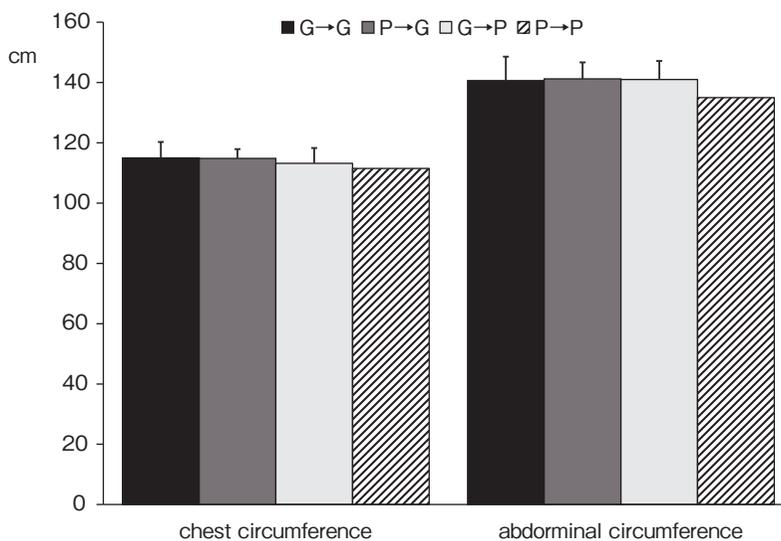


Fig. 1 chest and abdominal circumference

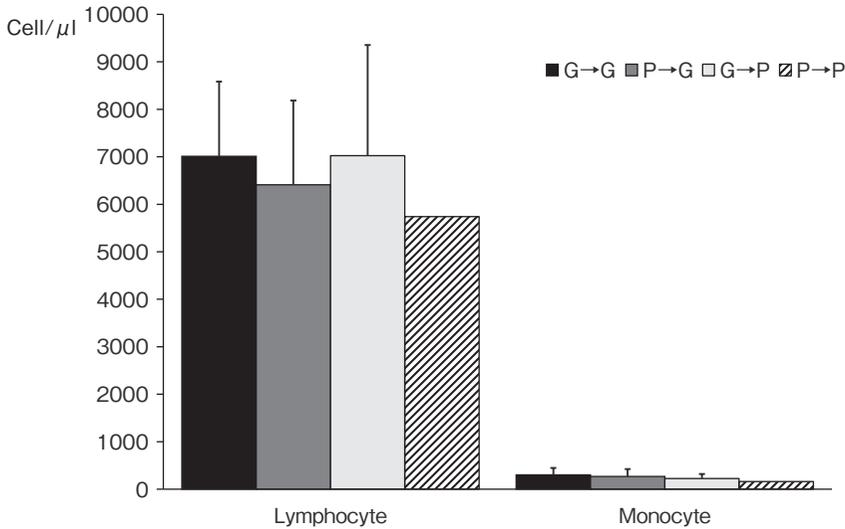


Fig. 2 lymphocytes and monocyte counts

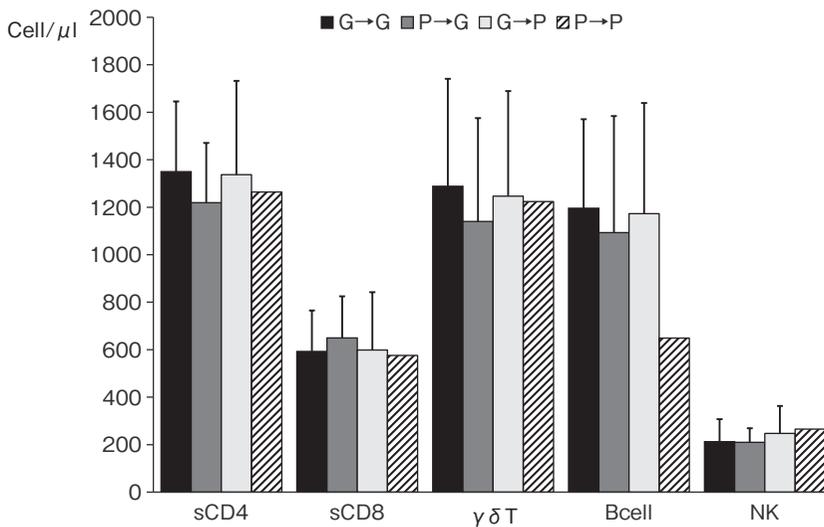


Fig. 3 lymphocyte subsets analysis

→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群, ②RM形成不良→RM形成良好群となった (Fig. 3)。特に, ④RM形成不良→RM形成不良群のB細胞数が著しく低値を示した。①から③の3群間で有意差はなかった。CD8⁺細胞数は平均値が高い群から並べると, ②RM形成不良→RM形成良好群, ①RM形成良好→RM形成良好群, ③RM形成良好群

→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 3)。②RM形成不良→RM形成良好群の平均値が高いのは興味深い結果である。次に, NK細胞数は平均値が高い群から並べると, ④RM形成不良→RM形成不良群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群であった。RM形成不良群でNK細胞数が高くなったことは

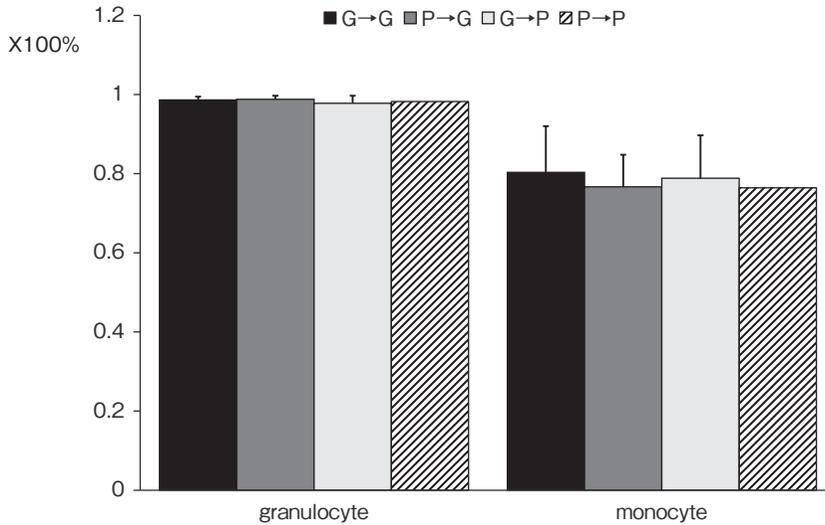


Fig. 4 phagocytosis of granulocyte and monocyte

他のリンパ球サブセット数が低いことによる代償作用かも知れない。

3.4 顆粒球と単球の貪食率

顆粒球の貪食率は各群でほとんど差がなかった (Fig. 4)。単球の貪食率は平均値が高い群から並べると、①RM形成良好→RM形成良好群、③RM形成良好群→RM形成不良群、②RM形成不良→RM形成良好群、④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 4)。①から③の3群間で有意差はなかった。

3.5 月齢、胸囲および腹囲を同一条件にした場合の各解析

さらに月齢、胸囲および腹囲が同じ値である子牛 (81.0±5.0日齢) を選別してRM形成良好群とRM形成不良群について各パラメータを比較した。B細胞数はRM形成良好群で有意に多い結果が得られた ($p = 0.03$)。CD4⁺細胞数 ($p = 0.069$)、CD8⁺細胞数 ($p = 0.073$)、MHC class II⁺細胞数 ($p = 0.069$) はRM形成良好群で多い傾向が認められた。RM形成良好群の顆粒球の貪食率は有意に高かった ($p = 0.017$)。さらにRM形成良好群の単球の貪食率も高い傾向が認められた ($p =$

0.052)。試験全体を通して各群間の比較では有意な結果が得られなかったが、個々の状態をまったく同一条件にすると、RM形成良好群でRM形成不良群に比べて各パラメータに有意あるいは傾向ありの結果が得られた。また、RM形成不良群は亜急性ルーメンアシドーシスによく似た病態であるといえよう。つまり、CD4⁺細胞数やCD8⁺細胞数など細胞性免疫の低下が報告されている^{4,5)}。単球や顆粒球の貪食能についてはこれまでに報告がなく、今回RM形成良好群で有意に貪食率が高くなったことは初めての報告となる。現在、本研究結果を取りまとめ投稿準備中である。

3.6 今後の展望

これまでにRM形成不良の生産農家は事故率が高いことが明らかになっている³⁾。そこで事故率の高い農家を選定して、RM形成状況を検査し、RM形成不良の状態からRM形成良好の状態での飼養管理を実施した場合の抗病性と生産性も評価していきたい。さらに、自然あるいは特異的な抗体価やサイトカインの発現量比なども評価していくことで、RM形成と免疫強化の関係をさらに詳細に明らかにし、家畜生産の向上へ貢献していきたい。

たい。

4. 要 約

本研究では、離乳後の子牛群について、RMが固い群（RM形成良好群）と、軟らかい群（RM形成不良群）において、末梢血サブセット解析、顆粒球や単球の貪食能などを指標にして、両群の自然免疫および獲得免疫を比較評価した。体格や月齢を同じ条件にした子牛で比較すると、RM形成良好群ではRM形成不良群に比べてB細胞数が有意に多く、CD4⁺細胞数、CD8⁺細胞数、MHC class II⁺細胞数に高い傾向が認められた。さらにRM形成良好群ではRM形成不良群に比べて、顆粒球の貪食率は有意に高く、単球の貪食率は高い傾向があった。よって本研究結果より、離乳後の子牛群について、RMが固い子牛では自然免疫系も獲得免疫系の増強作用が認められた。RM形成を良好にした牛の飼養管理方法により、抗生剤の使用や病気の発症や事故などを低減させることができると思われた。

文 献

- 1) Izumi, K., Unno, C. : Effects of feeding ratio of beet pulp to alfalfa hay or grass hay on ruminal mat characteristics and chewing activity in Holstein dry cows, *Anim. Sci. J.*, 81, 180~6, DOI : 10.1111/j.1740-0929.2009.00724.x, 2010.
- 2) Izumi, K., Tamura, T., Fujii, R., Nakatsuji, H., Morita, S. : Effects of substituting kraft pulp with corn silage on dry matter intake, ruminal mat formation, rumen fermentation, and rumination activity in non-lactating cows, *Anim. Sci. J.*, 90, 205~213, 2019.
- 3) 阿部信介, 出口祐一郎, 壺岐佳浩 : ルーメンマットスコア低値持続子牛における血液性状の特徴と病態生理, *家畜診療*, 66(2), 87~96, 2019.
- 4) Sato, S. : Subacute ruminal acidosis (SARA) challenge, ruminal condition and cellular immunity in cattle, *Jpn. J. Vet. Res.*, 63, S25-36, DOI : 10.14943/jjvr.63.suppls25, 2015.
- 5) Schnabel, K., Schmitz, R., Frahm, J., Meyer, U., Breves, G., Dänicke, S. : Functionality and DNA-damage properties of blood cells in lactating cows exposed to glyphosate contaminated feed at different feed energy levels, *Arch. Anim. Nutr.*, 74, 87~106, DOI : 10.1080/1745039X.2020.1718474, 2020.

ルーメンマツスコアを指標にした子牛の 免疫強化法の研究

Studies on the enhancement of calf immunity appraised by rumen mat score

保田 昌宏^{1,2}・今泉 法子²・阿部 信介^{1,3}

(¹宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科, ²宮崎大学農学部, ³宮崎県農業共済組合)

Masahiro Yasuda^{1,2}, Noriko Imaizumi² and Shinsuke Abe^{1,3}

(¹Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki,

²Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, ³Miyazaki Agricultural Mutual Aid Association)

Effect of ruminal mat formation (RMF) to peripheral blood leukocyte subsets and phagocytosis in pre-weaned calves were evaluated. The score of RMF was measured by giving manual repeated pressures to the ventral sac of rumen 10 times. The examination was performed every month for three months. Healthy Holstein Friesian and Japanese Black crossbred pre-weaned calves in a commercial farm were divided according to the score of RMF. The number of B-cell in high score calves were significantly increase compared to that in low score calves. The numbers of CD4⁺ and CD8⁺ cells in high core calves were increase compared to those in low score calves. In addition, the phagocytosis of monocytes and granulocytes in high score calves were higher than that of low score calves. In the peripheral blood of high score calves, the phagocytosis of monocytes and granulocytes responsible for natural immunity was higher, the number of T cells and B cells responsible for secondary immunity was also higher than those of low score calves. In conclusion, the evaluation of score of RMF can be useful for understanding health condition of calves. In addition, the feeding management for making high score of RMF calves may be possible to reduce antimicrobial agent usage and production loss due to disease.

1. 目 的

肺炎, 下痢, 関節炎などの慢性炎症性疾患で廃用となる子牛は多く, NOSAI連みやぎきの平成30年度家畜共済事業実績表によると, 新生子異常を除いたとき, 肥育子牛や肉子牛の死廃理由の約50% (約4,500頭) が慢性炎症性疾患であり, それによる損失は膨大な額に及んでいる。これまでに申請者は, 慢性炎症性疾患で廃用認定された子

牛の剖検を年間に約100頭実施してきた。その結果, 肺炎, 下痢および関節炎が子牛の三大炎症性疾患であり, そのほとんどの個体で胸腺が矮小化していることが明らかになった。つまり慢性炎症性疾患は, 獲得免疫系の機能低下により自然免疫系の著しい亢進を誘導していると考えられた (Yasuda et. al., submitted)。よって多くの子牛の事故は, 飼養管理の不行き届きによって起こると考えられ, 疾病に強い子牛にする飼養管理方法

の確立が求められている。

牛の第一胃内容物は、気体層、固体層および液層からなる階層構造をなしており、液層に浮いた状態で存在する固体層はルーメンマット (RM) と称される。乳用種成牛のRMは給与飼料によって固さと厚さが変化することや、固さと厚さが1日の総反芻時間と正の相関があることが示されている^{1,2)}。一方、子牛のRM形成に関する報告はほとんどなく、子牛の粗飼料給与の是非については見解が分かれている。しかしながら近年、阿部ら³⁾によって、離乳後子牛群のRMスコアと哺育育成期の死亡事故率と給与飼料の粗飼料割合の関係が調査され、第一胃が粘土状で固い子牛が多くなるように給餌管理すると、疾病の発症率が有意に減少することが報告された。つまり、RMスコアの利用は牛群の管理に有用で、事故発生リスクの評価に使えと考えられるが、抗病性に関わるメカニズムは明らかにされていない。

そこで本研究では、子牛のRMの固さをスコア化した基準を用いて、離乳後の子牛群について、RMが固い群と、軟らかい群において、末梢血サブセット解析、顆粒球や単球の貪食能などを指標にして、両群の自然免疫および獲得免疫を比較評価した。

2. 材料と方法

2.1 試験農場

民間農場で飼育される健康な交雑種 (ホルスタイン×黒毛和種) の子牛群 (58日齢から173日齢, 24頭) について、RM形成状況を月に1回、3ヶ月間計測した。RM形成状況は、第一胃腹囊上部を拳あるいは手のひらで10回反復圧迫する間に、波動感を検出したものをRM形成不良、波動感を検出なかったものをRM形成良好とした。頸静脈から7mlの血液をEDTA-2Na採血管で採取し免疫学的な検査を実施した。本研究では、最初と

最後の計測時のRM形成状況によって次の4群に分けた。①RM形成良好→RM形成良好群、②RM形成不良→RM形成良好群、③RM形成良好群→RM形成不良群、④RM形成不良→RM形成不良群である。なお本研究の供試牛には、呼吸器病や下痢症などを発症した例は用いなかった。

2.2 免疫学的検査方法

血液サンプルを比重遠心分離して末梢血単核球を回収した。赤血球を溶血させリン酸緩衝液で洗浄したのち、細胞を蛍光標識した抗体と4℃で1時間反応させ洗浄後、リンパ球ゲートを用いフローサイトメーターで陽性細胞率を測定した。リンパ球サブセット解析の表面抗原と標識は、T細胞のマーカーとして抗CD4抗体 (ILA11A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University, Pullman, WA, USA)、抗CD8抗体 (CC63, Bio Rad, Tokyo, Japan) および抗 γ δ T抗体 (GB21A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) を、NK細胞のマーカーとして抗CD335抗体 (AKS1, Bio Rad) を、B細胞のマーカーとして抗MHC class II抗体 (TH14B, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) および抗IgM抗体 (P-PIG45A2, Monoclonal Antibody Center at Washington State University) を用いた。各サブセット細胞数は、サブセット比率 (%), 白血球数 (個/ml) およびリンパ球比率 (%) から実数値を算出した。貪食率の解析は、バフィーコートを採取し、赤血球を溶血後、細胞数を調整し10%牛胎子血清添加RPMI1640溶液に、 ϕ 1 μ mの蛍光標識したラテックスビーズ (No. 1030, Sigma-Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA) を加え、37℃で1時間培養しラテックスビーズを貪食させたのち洗浄して、蛍光標識した抗体でリンパ球サブセットと同様に細胞を染色した。顆粒球のマーカーとして蛍光標識した抗顆粒球抗体

(CH138A, Monoclonal Antibody Center at Washington State University), 単球のマーカーとして蛍光標識した抗MHC class II抗体 (TH14B) を用いた。単球と顆粒球ゲートを用いて各細胞分画の陽性率を算出した。

2.3 統計処理

体側結果, サブセット結果, 貪食結果はそれぞれ Welch's T test, Mann-Whitney U testあるいは共分散分析を用いて解析し, $p < 0.05$ を有意, $p < 0.1$ を傾向ありと評価した。

3. 結果と考察

3.1 胸囲および腹囲

胸囲および腹囲は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 1)。今回④RM形成不良→RM形成不良群が2頭しか認められなかったため, 平均値で一番低値であるものの, ④RM形成不良→RM形成不良群と他の群の統計解析はできなかった。①

RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群の3群間で有意差はなかった。

3.2 リンパ球数および単球数, 単球数の推移
リンパ球数は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 2)。①から③の3群間で有意差はなかった。次に, 単球数の平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 2)。①から③の3群間で有意差はなかった。さらに単球数を測定前と後の増加曲線の傾きと比較すると, ①RM形成良好→RM形成良好群が③RM形成良好群→RM形成不良群に比べて高くなる傾向があった ($p = 0.08$)。

3.3 サブセット解析

CD4⁺細胞数, $\gamma\delta$ T細胞数およびB細胞数は平均値が高い群から並べると, ①RM形成良好

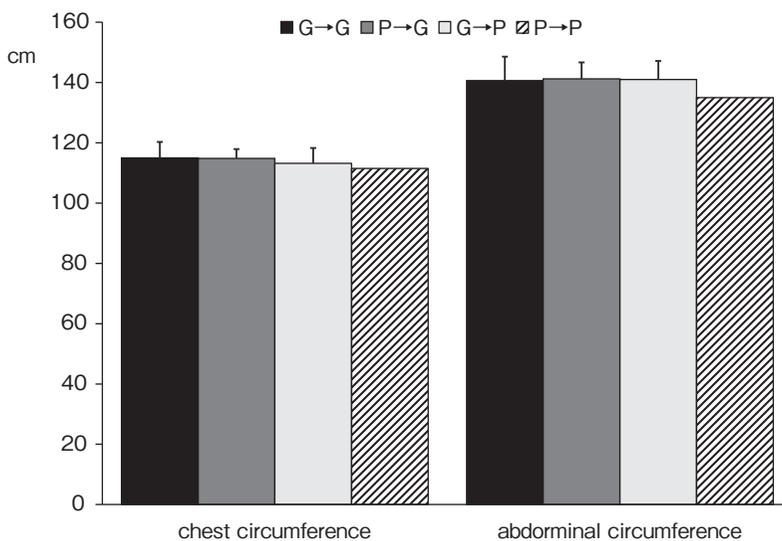


Fig. 1 chest and abdominal circumference

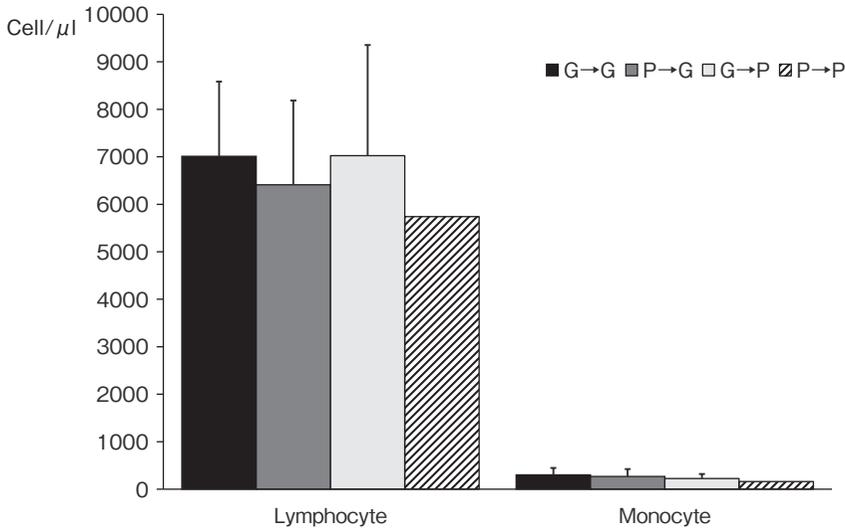


Fig. 2 lymphocytes and monocyte counts

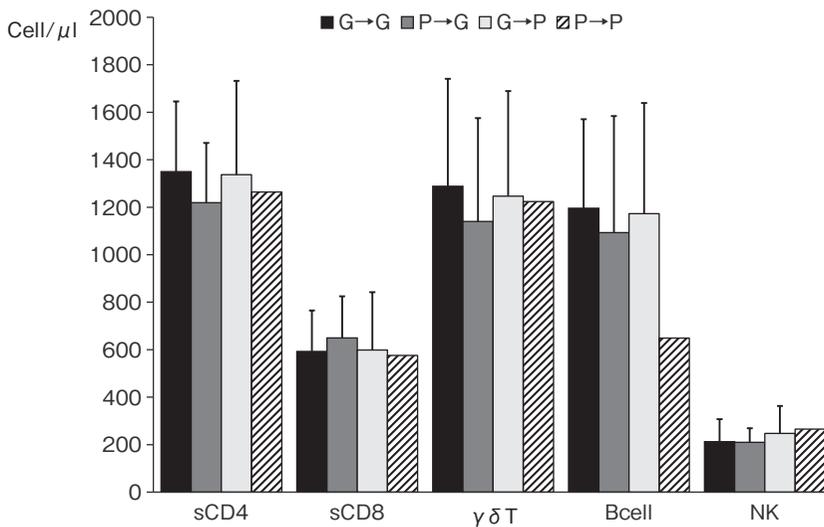


Fig. 3 lymphocyte subsets analysis

→RM形成良好群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群, ②RM形成不良→RM形成良好群となった (Fig. 3)。特に, ④RM形成不良→RM形成不良群のB細胞数が著しく低値を示した。①から③の3群間で有意差はなかった。CD8⁺細胞数は平均値が高い群から並べると, ②RM形成不良→RM形成良好群, ①RM形成良好→RM形成良好群, ③RM形成良好群

→RM形成不良群, ④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 3)。②RM形成不良→RM形成良好群の平均値が高いのは興味深い結果である。次に, NK細胞数は平均値が高い群から並べると, ④RM形成不良→RM形成不良群, ③RM形成良好群→RM形成不良群, ①RM形成良好→RM形成良好群, ②RM形成不良→RM形成良好群であった。RM形成不良群でNK細胞数が高くなったことは

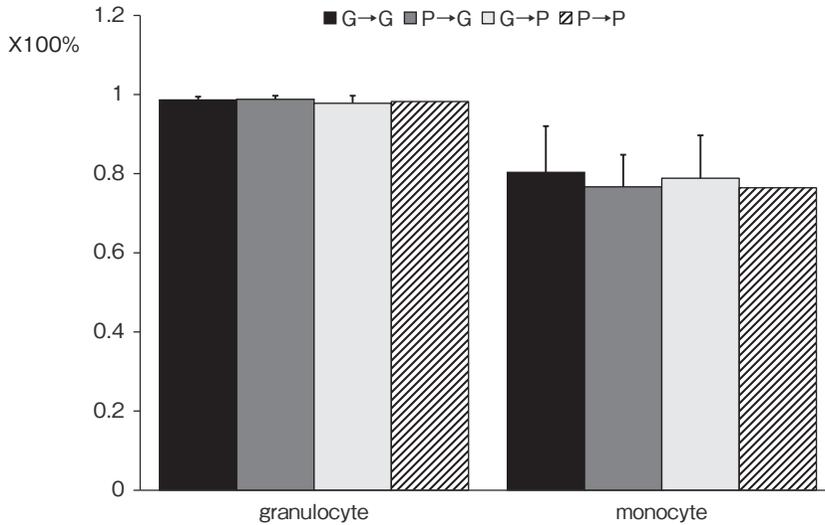


Fig. 4 phagocytosis of granulocyte and monocyte

他のリンパ球サブセット数が低いことによる代償作用かも知れない。

3.4 顆粒球と単球の貪食率

顆粒球の貪食率は各群でほとんど差がなかった (Fig. 4)。単球の貪食率は平均値が高い群から並べると、①RM形成良好→RM形成良好群、③RM形成良好群→RM形成不良群、②RM形成不良→RM形成良好群、④RM形成不良→RM形成不良群となった (Fig. 4)。①から③の3群間で有意差はなかった。

3.5 月齢、胸囲および腹囲を同一条件にした場合の各解析

さらに月齢、胸囲および腹囲が同じ値である子牛 (81.0±5.0日齢) を選別してRM形成良好群とRM形成不良群について各パラメータを比較した。B細胞数はRM形成良好群で有意に多い結果が得られた ($p = 0.03$)。CD4⁺細胞数 ($p = 0.069$)、CD8⁺細胞数 ($p = 0.073$)、MHC class II⁺細胞数 ($p = 0.069$) はRM形成良好群で多い傾向が認められた。RM形成良好群の顆粒球の貪食率は有意に高かった ($p = 0.017$)。さらにRM形成良好群の単球の貪食率も高い傾向が認められた ($p =$

0.052)。試験全体を通して各群間の比較では有意な結果が得られなかったが、個々の状態をまったく同一条件にすると、RM形成良好群でRM形成不良群に比べて各パラメータに有意あるいは傾向ありの結果が得られた。また、RM形成不良群は亜急性ルーメンアシドーシスによく似た病態であるといえよう。つまり、CD4⁺細胞数やCD8⁺細胞数など細胞性免疫の低下が報告されている^{4,5)}。単球や顆粒球の貪食能についてはこれまでに報告がなく、今回RM形成良好群で有意に貪食率が高くなったことは初めての報告となる。現在、本研究結果を取りまとめ投稿準備中である。

3.6 今後の展望

これまでにRM形成不良の生産農家は事故率が高いことが明らかになっている³⁾。そこで事故率の高い農家を選定して、RM形成状況を検査し、RM形成不良の状態からRM形成良好の状態での飼養管理を実施した場合の抗病性と生産性も評価していきたい。さらに、自然あるいは特異的な抗体価やサイトカインの発現量比なども評価していくことで、RM形成と免疫強化の関係をさらに詳細に明らかにし、家畜生産の向上へ貢献していきたい。

たい。

4. 要 約

本研究では、離乳後の子牛群について、RMが固い群（RM形成良好群）と、軟らかい群（RM形成不良群）において、末梢血サブセット解析、顆粒球や単球の貪食能などを指標にして、両群の自然免疫および獲得免疫を比較評価した。体格や月齢を同じ条件にした子牛で比較すると、RM形成良好群ではRM形成不良群に比べてB細胞数が有意に多く、CD4⁺細胞数、CD8⁺細胞数、MHC class II⁺細胞数に高い傾向が認められた。さらにRM形成良好群ではRM形成不良群に比べて、顆粒球の貪食率は有意に高く、単球の貪食率は高い傾向があった。よって本研究結果より、離乳後の子牛群について、RMが固い子牛では自然免疫系も獲得免疫系の増強作用が認められた。RM形成を良好にした牛の飼養管理方法により、抗生剤の使用や病気の発症や事故などを低減させることができると思われた。

文 献

- 1) Izumi, K., Unno, C. : Effects of feeding ratio of beet pulp to alfalfa hay or grass hay on ruminal mat characteristics and chewing activity in Holstein dry cows, *Anim. Sci. J.*, 81, 180~6, DOI : 10.1111/j.1740-0929.2009.00724.x, 2010.
- 2) Izumi, K., Tamura, T., Fujii, R., Nakatsuji, H., Morita, S. : Effects of substituting kraft pulp with corn silage on dry matter intake, ruminal mat formation, rumen fermentation, and rumination activity in non-lactating cows, *Anim. Sci. J.*, 90, 205~213, 2019.
- 3) 阿部信介, 出口祐一郎, 壺岐佳浩 : ルーメンマットスコア低値持続子牛における血液性状の特徴と病態生理, *家畜診療*, 66(2), 87~96, 2019.
- 4) Sato, S. : Subacute ruminal acidosis (SARA) challenge, ruminal condition and cellular immunity in cattle, *Jpn. J. Vet. Res.*, 63, S25-36, DOI : 10.14943/jjvr.63.suppls25, 2015.
- 5) Schnabel, K., Schmitz, R., Frahm, J., Meyer, U., Breves, G., Dänicke, S. : Functionality and DNA-damage properties of blood cells in lactating cows exposed to glyphosate contaminated feed at different feed energy levels, *Arch. Anim. Nutr.*, 74, 87~106, DOI : 10.1080/1745039X.2020.1718474, 2020.

量産可能なオリゴ糖素材を添加した飼料給餌による 家畜腸内細菌叢改善効果の検証

Verification of the effect of feed supplemented with mass-producible
oligosaccharides on the improvement of intestinal flora in livestock

西本 完¹・遠野 雅徳²・山崎 信³

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 ¹食品研究部門, ²中央農業研究センター, ³畜産研究部門)

Mamoru Nishimoto¹, Masanori Tohno² and Makoto Yamazaki³

(¹Food Research Institute, ²Central Region Agricultural Research Center, ³Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

With the international population increase, there is an urgent need to increase the production of livestock products. On the other hand, the addition of antibiotics to feed for the purpose of promoting the growth of livestock has begun to be significantly restricted due to the spread of drug-resistant bacteria, and a material that can replace antibiotics is required.

To collect and accumulate basic data on health functionality for the early commercialization of new oligosaccharide materials, lacto-*N*-biose I (LNB), which an enzyme synthesis method was developed, and ryegrass seed, which contains specific oligosaccharides, loliose, we investigated the health function of livestock by adding these materials. When the LNB-added feed was fed to chicken chicks, no difference was found in their feeding results. However, when bifidobacteria isolated from various livestock were cultured in a medium containing LNB, strain-specific growth was observed. Although bifidobacteria could not be isolated from the cecal contents of the chicks tested, the possibility was suggested that the intestinal flora improvement effect will be exhibited in livestock carrying the strain. Furthermore, when a feed containing a loliose composition prepared from ryegrass seeds was fed to chicken chicks, a significant body weight gain effect was observed. Further verification tests are expected for practical use of this composition as a new feed additive.

1. 目 的

国際的な人口増加を受け、畜産物の生産量増大は急務である。一方で、家畜の成長促進を目的とした抗生物質の飼料への添加は、薬剤耐性菌の蔓延を招くことから著しく制限され始めており、抗生物質の代替となる素材が求められている現状がある。近年、腸内細菌叢の改善が、ヒトも含めた動物の健康に重要な働きをすることが明らかにさ

れつつあり、善玉菌によるプロバイオティクスやそれらを増やすオリゴ糖を利用したプレバイオティクスが畜産業界においても注目を集めている。実際に酵母や乳酸菌等の生菌剤や機能性オリゴ糖を添加した飼料が国内、海外を問わず販売されている。したがって、飼料に添加する機能性素材に関する研究分野は非常に注目度が高く、さまざまな研究が実施されている。しかしながら、どれほど優れた機能を有する素材であっても、飼料

用添加物に見合った価格でなければ実用化にはたどり着けないことから、実際に市販されている機能性素材はその数が限られている。本研究の目的は、低コストでの供給が見込める新たなオリゴ糖素材の早期実用化に向けた健康機能性に関する基礎データを収集・蓄積することである。具体的には、ヒトの母乳に含まれるビフィズス菌増殖因子¹⁾でありながらも、これまで大量調製法が確立していなかったラクト-N-ビオース I²⁾ (以下, LNB), および研究が立ち遅れていて機能が未知であるロリオース³⁻⁵⁾ を含有するライグラス種子を、実用化が未達のオリゴ糖素材候補として、それらの家畜に対する健康機能性を検証する。

2. 方法

2.1 オリゴ糖素材の調製

LNBは以前開発された方法に従って調製した高純度粉末(純度99%)を使用した⁶⁾。ロリオースを含有するイタリアンライグラス種子は、市販のワセアオバ(雪印種苗株式会社)を用い、嗜好性試験には種子そのものを、第一次給与試験では、種子を超遠心粉碎機(ZM-100, レッチェ社)にて、1 mmメッシュのスクリーンで粉碎したライグラス種子(粉)を用いた。また、3.2に後述するように、ライグラス種子(粉)においてエネルギー不足が示唆されたことから、第二次給与試験では、粉碎前に低速攪拌によるもみすりを行うとともに、粉碎後に180 μmのふるいを通過した画分を除去したものをライグラス種子(製粉)として用いた。これによりロリオース含有量を維持したまま、不要な成分を除去した組成物を給与試験に用いた。

2.2 嗜好性試験

31日齢のロードアイランドレッド種の雄ヒナを10羽供試して嗜好性試験を行った。平均体重がおおよそ等しくなるように2羽ずつ5区画のケージ

に収容し、それぞれのケージに市販の採卵鶏幼雛用飼料(対照飼料, アジャスト幼雛, 豊橋飼料株式会社), 対照飼料とライグラス種子を等量配合した飼料(ライグラス飼料(粒))の双方を自由摂取できるように餌箱を設置した。試験期間は6日間とし、奇数日は対照飼料を向かって左側, ライグラス飼料(粒)を右側に、偶数日はその逆になるように毎日餌箱の位置を入れ替え、6日間のそれぞれの飼料の摂取量を測定した。

2.3 第一次給与試験

35日齢の白色レグホーン種の雄ヒナを供試した。卵用鶏育成幼雛期の養分要求量を満たすように設計した、トウモロコシ・大豆粕主体の対照飼料(Table 1), 対照飼料と粉碎したライグラス種子を等量配合した飼料(ライグラス飼料(粉)), 対照飼料にLNBを1%添加した飼料の合計3種類の飼料を調製した。それぞれの飼料に、平均体重が等しくなるようにヒナを5羽ずつ割り付け、8日間給与した。配合したライグラス種子の代謝エネルギー(ME)含量および回腸アミノ酸消化率を酸化クロムによるインデックス法により求めた。

2.4 第二次給与試験

16日齢の黄斑プリマスロック種の雄ヒナを供試した。卵用鶏育成幼雛期の養分要求量を満たすように設計した、トウモロコシ・大豆粕主体の対照飼料, 2.1に記述したように精製したライグラス種子を50%配合し、栄養素含量が対照飼料と同等になるように調製したライグラス飼料(製粉)(Table 1), LNBを0.1%および1.0%添加した飼料を調製した。それぞれの飼料に、平均体重が等しくなるようにヒナを5羽ずつ割り付け、16日間給与した。なお、本研究における動物実験は、農研機構動物実験委員会の承認を受け、農研機構動物実験等実施規程に従って行った。

Table 1 Composition of experimental diet

	Control diet	First trial Milled seed diet	Second trial Dehulled seed diet
Ingredients, %			
Corn	65.63	32.82	21.00
Milled rygrass seed	-	50.00	-
Dehulled ryegrass seed	-	-	50.00
Soybean meal	31.14	15.57	16.10
Corn gluten meal	-	-	4.00
Vegetable oil	-	-	5.00
Dicalcium phosphate	1.27	0.64	1.50
Calcium carbonate	1.22	0.61	1.05
Sodium chloride	0.34	0.17	0.35
L-Lysine-Cl	-	-	0.35
DL-Methionine	-	-	0.15
L-Threonine	-	-	0.10
Vitamin mixture	0.20	0.10	0.20
Mineral mixture	0.10	0.05	0.10
Chromic oxide	0.10	0.05	0.10
Calculated value (%)			
Metabolizable energy (kcal/g)	2.90	2.59	2.90
Crude protein	19.00	n.d.	19.00
Calcium	0.86	n.d.	0.88
Total phosphorus	0.62	n.d.	0.64
Non-phytate phosphorus	0.40	n.d.	0.40
Methionine + Cystine	0.61	n.d.	0.60
Lysine	1.06	n.d.	1.05
Threonine	0.73	n.d.	0.73

2.5 LNB資化性試験

19種類の*Bifidobacterium*属細菌種の基準株を理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室より入手し、これらのLNBに対する資化性を検討した。Man-Rogosa-Sharpe培地(55g/L)にPhytone peptone(5g/L)とL-cysteine HCl(0.5 g/L)を加えた液体培地を用いて24時間嫌気条件で前培養後、糖源フリー基礎培地[tryptone(5.0 g/L), yeast extract(5.0 g/L), peptone(10 g/L), K₂HPO₄(2.0 g/L), diammonium citrate(2.0 g/L), sodium acetate(5.0 g/L), manganese sulfate monohydrate(0.25 g/L), magnesium sulfate heptahydrate(0.58 g/L), Tween 80(1 ml/L)およびL-cysteine HCl(0.5 g/L)]にLNBを最終濃度1%(w/v)添加した条件にて72時間嫌気培

養した。ネガティブコントロールとして糖質無添加区、ポジティブコントロールとしてグルコース添加区、機能性オリゴ糖の比較対象としてフラクトオリゴ糖添加区についても同時に試験を行った。培養終了後の培養上清pHと濁度(OD600)を測定することにより、各菌株の各種糖質資化性を判定した。

3. 結果と考察

3.1 嗜好性試験

ライグラス種子の飼料利用性を検証するため、市販の飼料とライグラス飼料(粒)の嗜好性を比較した。その結果、給与期間中の摂取量は、対照飼料=332±15 g、ライグラス飼料(粒)=304±25 g(平均値±標準誤差, n=5)であり、有意な差

Table 2 Effect of feeding ryegrass seeds and LNB on growth performance in Laying-type chicks

First trial				
	Control	+LNB (1.0%)	+Ryegrass seed (Milled)	
Body weight gain (g/8 days)	124 ± 3 ^a	123 ± 8 ^a	80 ± 16 ^b	
Feed intake (g/8 days)	428 ± 20	410 ± 22	418 ± 31	
Feed efficiency	0.291 ± 0.010 ^a	0.300 ± 0.011 ^a	0.185 ± 0.026 ^b	
Second trial				
	Control	+LNB (0.1%)	+LNB (1.0%)	+Ryegrass seed (Partially Purified)
Body weight gain (g/16days)	245 ± 7 ^b	254 ± 12 ^b	267 ± 8 ^{ab}	301 ± 14 ^a
Feed intake (g/16days)	586 ± 9	616 ± 19	684 ± 39	675 ± 38
Feed efficiency	0.418 ± 0.010	0.412 ± 0.010	0.394 ± 0.022	0.449 ± 0.018

Mean ± S.E., n=5

Means within rows with no common superscript differ significantly ($p < 0.05$)

は認められなかった。供試したヒナは、試験前より対照飼料を摂取していたのにもかかわらず両区の間には差が見られなかったことを考えると、ライグラス種子の嗜好性は悪くないと推察される。

3.2 第一次給与試験

LNBおよびライグラス種子（粉）を添加した飼料を用いて給与試験を行った。ライグラス種子は飼料の形状をそろえるため、2.1に記述のとおり粉砕したライグラス種子（粉）を用いた。飼養成績についてTable 2に示す。飼料摂取量は各区間に差は認められなかったが、増体量はライグラス区が他区よりも有意に低かった。飼料効率についてもライグラス（粉）区が他区よりも有意に低かった。配合したライグラス種子のME含量は、 $2.22 \pm 0.06 \text{ kcal/g}$ と推定された。ライグラス（粉）区を増体量および飼料効率が低かった理由として、飼料中のエネルギーが不足したことが考えられる。対照飼料のME含量の実測値が 2.97 kcal/g であったのに対して、ライグラス（粉）区は 2.59 kcal/g と約 0.4 kcal/g ほど低かった。飼料摂取量は区間に差が見られなかったことから、ライグラス飼料中のエネルギーを対照飼料と同等になるように調製することにより、対照区と同程度の飼料成績が期待できると考えられた。LNB区につ

いては、対照区と有意な差は認められなかったものの、飼料効率が良くなる傾向が見られた。ライグラス種子の回腸アミノ酸消化率は50%前後と一般的な飼料原料よりもおおむね低く、配合設計する際にはアミノ酸消化率を加味する必要があると考えられた。

3.3 第二次給与試験

LNBおよびエネルギーを調整したライグラス（製粉）を添加した飼料を用いて給与試験を行った。ライグラス種子は飼料の形状およびエネルギーをそろえるため、2.1に記述のとおり粉砕後に製粉したライグラス種子（製粉）を用いた。なお、ライグラス種子の製粉処理により繊維性成分が除去され、ロリオース含有量にほぼ変動がなかったため、ロリオース含有率は1.4倍に向上していた。飼養成績についてTable 2に示す。LNB区については、対照区と飼料摂取量および増体量が向上する傾向が認められたものの、有意差がつかずではなかった。一方、ライグラス（製粉）区においては、増体量に5%水準の有意な向上が観察された。なお、飼料摂取量および飼料効率は区間において差は認められなかった。ライグラス（製粉）区の飼料を調製する際、エネルギー源となる油脂および不足する一部のアミノ酸を配合

Table 3 Growth of bifidobacteria in the presence of various sugars

Bifidobacterium species	Strain	Isolation source	Acid production from:			
			none	Glc	FOS	LNB
<i>B. animalis</i> subsp. <i>animalis</i>	JCM 1190 ^T	Rat feces	-	+	+	-
<i>B. breve</i>	JCM 1192 ^T	Intestine of infant	-	+	+	+
<i>B. catenulatum</i> subsp. <i>catenulatum</i>	JCM 1194 ^T	Human feces	-	+	+	-
<i>B. dentium</i>	JCM 1195 ^T	Dental caries	-	+	+	-
<i>B. pseudocatenulatum</i>	JCM 1200 ^T	Feces of an infant	-	+	+	+
<i>B. thermophilum</i>	JCM 1207 ^T	Swine feces	-	+	+	-
<i>B. boum</i>	JCM 1211 ^T	Rumen of cattle	-	+	-	-
<i>B. longum</i> subsp. <i>longum</i>	JCM 1217 ^T	Intestine of adult	-	+	+	+
<i>B. longum</i> subsp. <i>infantis</i>	JCM 1222 ^T	Intestine of infant	-	+	+	+
<i>B. bifidum</i>	JCM 1255 ^T	Feces of a breast-fed infant	-	+	-	-
<i>B. adolescentis</i>	JCM 1275 ^T	Intestine of adult	-	+	+	-
<i>B. pullorum</i> subsp. <i>gallinarum</i>	JCM 6291 ^T	Chicken cecum	-	+	+	-
<i>B. angulatum</i>	JCM 7096 ^T	Human feces	-	+	+	-
<i>B. merycicum</i>	JCM 8219 ^T	Bovine rumen	-	+	+	-
<i>B. ruminantium</i>	JCM 8222 ^T	Bovine rumen	-	+	+	-
<i>B. gallicum</i>	JCM 8224 ^T	Human feces	-	+	+	-
<i>B. scardovii</i>	JCM 12489 ^T	Human blood	-	+	+	+
<i>B. psychraerophilum</i>	JCM 15958 ^T	Porcine caecum	-	+	+	-
<i>B. porcinum</i>	JCM 16945 ^T	Piglet feces	-	+	+	-

し、対照区と同等の栄養素となるようにした。その結果、第一次給与試験で観察された増体量の低下は解消され、さらに対照区よりも良好な増体が確認された。その要因として、有意差はなかったものの、ライグラス（製粉）区の飼料摂取量は他区よりも多かったことがあげられる。第一次給与試験においても、ライグラス配合飼料区の増体量は低かったものの、飼料摂取量は他区と比較して遜色がなかったことから、ライグラス自体の嗜好性が良好であることを推察された。なお、対照飼料およびライグラス配合飼料のME含量は、それぞれ3.09および3.05kcal/gと、ほぼ同等であった。

3.4 LNB資化性試験

ヒトや家畜を分離源とするビフィズス菌株19株に対して、培地中にオリゴ糖を添加した資化性試験を実施した。その結果、5株においてLNBの資化性が認められた（Table 3）。機能性オリゴ糖として知られるフラクトオリゴ糖（FOS）を添加した場合はほぼすべて（19菌株中17菌株）において資化性が観察されたのに対し、LNBを添加

した場合は、同一の分離源であっても菌種によって資化性が異なることから、菌種・菌株依存的な資化性の多様性が示唆された。このビフィズス菌のLNB資化における高い選択性について、特徴的な代謝経路の存在が報告されている²⁾。今回、LNB資化性を示した5菌株はゲノム中にその代謝関連酵素遺伝子を保有していたことから、本試験結果はその代謝経路の重要性を支持するものである。本データを基礎知見とし、LNBの飼料用オリゴ糖素材単独利用時の対象家畜の選定や、オリゴ糖資化性に優れる有用ビフィズス菌と飼料用オリゴ糖素材の共利用（シンバイオティクス）につなげられるだろう。

以上、LNBについてはそのビフィズス菌選択的増殖機能を活用したシンバイオティクスとしての飼料添加の可能性が、また、調製したライグラス種子組成物については、増体効果を活用した新たな飼料添加物としての可能性が示唆された。これらを新たな飼料用素材として実用化するため、さらなる実証試験等に取り組んでいきたい。

4. 要 約

新たなオリゴ糖素材の早期実用化に向けた健康機能性に関する基礎データを収集・蓄積するため、酵素合成法が開発されたラクト-N-ビオース I (LNB), および特異的なオリゴ糖を含有する牧草ライグラス類を対象として、それらの家畜に対する健康機能性について検証した。LNBを添加した飼料を鶏ヒナに給与したところ、飼養成績に大きな違いは認められなかった。しかしながら、さまざまな家畜より分離されたビフィズス菌を、LNBを含む培地で培養したところ、菌株特異的な増殖が認められ、当該菌株を保有する家畜において腸内細菌叢改善効果を発揮する可能性が示唆された。さらに、ライグラス類の種子から調製した組成物を添加した飼料を鶏ヒナに給与したところ、有意な増体効果が認められた。本組成物の新たな飼料添加物としての実用化に向け、さらなる実証試験の実施が期待される。

文 献

- 1) Kiyohara, M., Tachizawa, A., Niahimoto, M., Kitaoka, M., Ashida, H., Yamamoto, K. : Prebiotic effect of lacto-*N*-biose I on bifidobacterial growth, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 73(5), 1175~1179, 2009.
- 2) Kitaoka, M., Tian, J., Nishimoto, M. : Novel putative galactose operon involving lacto-*N*-biose phosphorylase found in *Bifidobacterium longum*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(6), 3158~3162, 2005.
- 3) Macleod, A. M., McCorquodale, H. : Trisaccharides of *Lolium* and *Festuca*, *Nature*, 182(4638), 815~816, 1958
- 4) Chatterton, N. J. : Loliose—a novel trisaccharide in leaves of *Lolium* and *Festuca* species, *Plant Physiology (Life Science Advance)*, 12, 113~116, 1993.
- 5) Amiard, V., Morvan-Bertland, A., Billard, J. P., Huault, C., Keller, F., Prud'Homme, M. P. : Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass, *Plant Physiol.*, 132(4), 2218~2229, 2003.
- 6) Nishimoto, M., Kitaoka, M. : Practical Preparation of Lacto-*N*-biose I, the Candidate of the Bifidus Factor in Human Milk, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71(8), 2101~2104, 2007.

子牛の健全な発達を目指した消化管の上皮細胞 接着微生物叢の相互関係の解明

Revealing gastrointestinal development by understanding gastrointestinal
epithelial attached cells in calves

西原 昂 来

(東北大学大学院農学研究科)

Koki Nishihara

(Faculty of Agriculture, Tohoku University)

The objective of this study was to reveal the relationship between diarrhea, gastrointestinal development and immunology. In this study, Holstein male calves (n=6) were randomly assigned to pre-weaning group (Day35) and weaned group (Day63). Calves were raised and slaughtered at 35 and 63 days of age. Calves were weaned at 56 days of age. Rumen tissues were obtained after slaughter. The length of rumen papillae was higher in Day63 group than that in Day35 group. The mRNA expression of tight junction and antimicrobial peptides were analyzed using qRT-PCR. No changes were observed in the expression of tight junction and antimicrobial peptides between Day35 and Day63. The correlation between fecal score, body weight, the length of rumen papillae, gene expression of tight junction and antimicrobial peptides were analyzed using R software. There were no correlations between fecal score and these factors. From these results, there were no relationship between diarrhea and gastrointestinal development and immunology during weaning period. In the future, we plan to analyze the relationship between fecal score and gastrointestinal attached microbiota, and sample gastrointestinal tissues at younger age to clarify process of microbiota attaching to epithelial cells.

1. 目 的

離乳前の子牛を健全に育てることは、肉用牛と乳用牛の生産において重要な課題である。アメリカ・カナダといった畜産が発展している国においても、消化器病は離乳前子牛の死産原因の3割、罹患する疾病の約半分を占める¹⁾。消化器病の代表的な症状は下痢であり、原因としては、E. coli, ロタウイルス, コクシジウムといった細菌・ウイルス・寄生虫感染や飼料の衛生状態が不適切

であることなどが考えられる。下痢を呈した子牛は、のちに発育不良になりやすいことも知られている。これらの損失を合わせると、離乳前子牛の消化器病は農家に大きな経済的損失を与える。一方で、下痢等の症状は離乳後には少なくなることから、早期に離乳させる、もしくは消化管を早期に発達させることで消化器病による損失を減らせるのではないかと考えられる。そのためには、上皮の発達、消化管免疫の獲得、消化管内容物の微生物叢、消化管上皮と微生物叢の関係といったこ

とを包括的に理解し、応用することが必要であろう。

消化管上皮細胞には微生物が接着し、宿主とwin-winな共生関係を築いていることが示唆されてきた。例えば、反芻動物のルーメン上皮細胞にはSCFA産生菌が接着し²⁾、ルーメン上皮細胞に接着する微生物は宿主の栄養獲得にポジティブに働くと考えられる。マウスの回腸パイエル板に接着するセグメント細菌は、IgA産生細胞の増加³⁾や、パイエル板からの細菌侵入・ウイルス感染の阻止⁴⁾といった作用を持つ。また、マウスにおいては離乳前にはセグメント細菌が観察されず、離乳に伴い菌数が増える⁵⁾ことが知られる。これらの報告から、離乳前子牛が下痢をしやすく、発育不良になる要因の一つとして、宿主に対してポジティブに働く微生物が上皮細胞に接着していないからではないかと考えた。この場合、消化管上皮細胞に接着する微生物の同定や接着する時期の解明は、新規の飼料・飼料管理法開発のヒントになる可能性がある。また、他の哺乳類と異なり出生した翌日には固形飼料を摂取し始める牛において、いつから消化管上皮細胞に微生物が接着するかは比較生物学的に興味深い。よって本研究の目的は、1) 出生から離乳までの期間における牛消化器の上皮細胞接着微生物叢の形成過程を明らかにし、2) 下痢や消化器発達・免疫との関連を明らかにすることである。

2. 方 法

本研究の動物実験は東北大学動物実験センターに承認を得た上で行った。

新生ホルスタイン(雄: $n = 6$)を供試した。出生日をDay 0とし、Day56の離乳日までは代用乳を給餌した。消化管の発達を促すため、Day 1の9:00よりスターター(固形飼料)を給餌した。給餌は一日二回(9:00と17:00)とした。

給餌量は過去の文献を参考にした⁶⁾。飼養中は、朝の給餌前に糞スコアを測定した。また、毎週、体重測定を行った。Day35, 63の8:00にランダムに3頭ずつ解剖した。解剖時にルーメン組織を採材した。採材したルーメン組織より組織切片を作製し、ルーメン絨毛の長さを測定した。また、ルーメン組織よりルーメン免疫に関わる遺伝子発現量、解剖時に得られた消化管組織の抗菌ペプチド遺伝子発現量をqRT-PCRにより測定した。結果は、Student's *t*-test (Day35 vs Day63, 有意水準 $p = 0.05$)により解析した。また、糞スコアと他の項目について、ピアソンの積率相関係数を解析した(有意水準 $p = 0.05$)。また、ルーメン上皮を含む組織からはDNAを抽出した。現在、16S rRNA解析中である。なお、1. 目的のために、今後、サンプル数を増やす予定である。

3. 結 果

実験期間中の糞スコアの平均は、 1.6 ± 0.4 (Day35), 0.8 ± 0.3 (Day63)であった。解剖時の体重は、 58.7 ± 1.9 kg (Day35), 86.3 ± 5.2 (Day63)であった。組織切片よりルーメン絨毛の長さを測定したところ、 $571.3 \pm 40.9 \mu\text{m}$ (Day35), $1155.1 \pm 160.1 \mu\text{m}$ (Day63)であった($p < 0.01$)。Day63のルーメン絨毛長が有意に長かったことから、離乳により消化管が発達したと考えられる。採材したルーメン組織において、タイトジャンクション(OCLD(オクルディン), CLD(クローディン)1, CLD4, CLD7)の遺伝子発現量を解析したところ、発現に有意差の見られるものはなかった($p = 0.10$, $p = 0.82$, $p = 0.35$, $p = 0.74$)。また、抗菌ペプチド(S100A2, S100A7, S100A8, S100A9)の遺伝子発現量をqRT-PCRで解析したところ、発現に有意差の見られるものはなかった($p = 0.15$, $p = 0.20$, $p = 0.22$, $p = 0.08$)。糞スコアと解剖時体重、ルーメン絨毛長の相関関係を解

析したところ、相関関係は見られなかった ($r = -0.53$ and $p = 0.28$, $r = -0.68$ and $p = 0.13$)。また、糞スコアとタイトジャンクション・抗菌ペプチドの遺伝子発現量との相関関係を解析したところ、相関関係は見られなかった。これらの結果より、糞スコアの平均と各項目の相関関係は見られなかった。バイオブシーなど⁷⁾で糞スコア測定している各時点でのルーメン組織の遺伝子発現量を検討すると差が見られる可能性がある。今後、ルーメン上皮に付着している微生物叢を解析し、糞スコアと相関関係のある微生物を解析する予定である。また、糞中のIgA濃度を測定し、糞スコアとの相関関係を解析する予定である。また、空腸、回腸、結腸組織に関しても、組織片の観察、遺伝子解析を行う予定である。

4. 要 約

本研究の目的は、下痢や消化器発達・免疫との関連を明らかにすることである。本研究では、ホルスタイン子牛(雄, $n = 6$)を35日齢と63日齢まで飼養した。63日齢まで飼養した牛は56日齢で解剖した。解剖後、これらの牛よりルーメン組織を採材した。ルーメン絨毛長はDay63で有意に長くなっていたため、離乳により消化管機能が発達したと考えられる。試験期間中の各個体の糞スコアの平均と、体重、ルーメン絨毛長、タイトジャンクション・抗菌ペプチドの遺伝子発現量との相関関係を解析したところ、糞スコアとこれらの間

に相関関係は見られなかった。また、Day35とDay63日齢でタイトジャンクション・抗菌ペプチドの遺伝子発現量を比較したところ、発現量に有意な差は見られなかった。これらのことから、離乳期間中のルーメン絨毛の成長やルーメン上皮の免疫に関わる因子は、下痢と因果関係がないものと考えられる。今後、消化管の微生物叢と糞スコアの相関関係を解析し、また、より若い日齢でのサンプリングすることで、上皮に接着する微生物叢の形成過程を明らかにする予定である。

文 献

- 1) Urie, N. J., Lombard, J. E., Shivley, C. B., Koprak, C. A., Adams, A. E., Earleywine, T. J., Olson, J. D., Garry, F. B. : *Journal of Dairy Science*, **101**, 9229~9244, 2018.
- 2) Liu, J. H., Bian, G. R., Zhu, W. Y., Mao, S. Y. : *Frontiers in Microbiology*, **6**, 167, 2015.
- 3) Klaasen, H. L., Van der Heijden, P. J., Stok, W., Poelma, F. G., Koopman, J. P., Van den Brink, M. E., Bakker, M. H., Eling, W. M., Beynen, A. C. : *Infection and Immunity*, **61**(1), 303~306, 1993.
- 4) Shi, Z., Zou, J., Zhang, Z., Zhao, X., Nriega, J., Zhang, B., Zhao, C., Ingle, H., Bittinger, K., Mattei, L. M., Puijssers, A. J., Plemper, R. K., Nice, T. J., Baldrige, M. T., Dermody, T. S., Chassaing, B., Gewirtz, A. T. : *Cell*, **179**(3), 644~658, 2019.
- 5) Snel, J., Hermsen, C. C., Smits, H. J., Bos, N. A., Eling, W. M., Cebra, J. J., Heidt, P. J. : *Can. J. Microbiol.*, **44**, 1177, 1998.
- 6) Nishihara, K., Suzuki, Y., Kim, D., Roh, S. G. : *Animal Science Journal*, **90**, 1287~1292, 2019.
- 7) Van Niekerk, J. K., Middeldorp, M., Steele, M. A. : *Journal of Dairy Science*, **101**, 7212~7218, 2018.

ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発

Development of high digestibility warm-season forage grass by genome editing

権 藤 崇 裕

(宮崎大学フロンティア科学総合研究センター)

Takahiro Gondo

(Frontier Science Research Center, University of Miyazaki)

Genome editing has now become a powerful tool for plant breeding. In this study, we attempted to develop high forage digestibility for warm-season grasses by genome editing of the cinnamyl alcohol dehydrogenase (CAD) genes involved in lignin biosynthesis by transformation in bahiagrass (*Paspalum notatum*) as a model. The plasmid vector for particle bombardment was constructed by inserting sgRNA which is the target sequence of the CAD gene into the genome editing vector. A total of 720 pieces of calli was treated with particle bombardment and 44 transformed callus lines were selected under bialaphos, seven of them found mutations in the target sequence. This mutation efficiency was 15.9% (7/44), which was almost the same with the other crops. Three out of the seven transformed callus lines (T9, T13, T26) were regenerated into complete plants and almost all had mutations. As a result of sequence analysis, the T9 and T13 lines were both heterozygous mutants in which a mutation was inserted on one side of the allele. On the other hand, the T26 line was a biallelic mutant in which different mutations were inserted in both alleles. Only the T26 line showed a significantly lower lignin content than the wild type in both pseudostems and leaves. It is accepted that a decrease in lignin synthesis is due to knockout of the targeted CAD gene. In addition, this line was more of a creeping phenotype than the other lines, which suggest that decrease in lignin content affect the morphology of plants. Henceforth, it is expected that the novel forage grass cultivar will be created with genome editing by removing the vector.

1. 目 的

暖地型イネ科牧草は、乾物生産性は高いものの、家畜による消化性に問題があるため、消化性の向上は重要な育種課題の一つである。飼料成分の一つであるリグニンは、牧草の消化性に深く関わっており、その含量は草種や生育段階で大きく

異なるが、約5～10%に満たない。家畜の肉質および生産性は、飼料の品質に大きく左右され、牧草のリグニン含量を1%減少させた場合、消化率が約10%上がると試算され¹⁾、牧草のリグニン含量の減少は、家畜生産性の飛躍的な向上につながると考えられる。

これまで、遺伝子組換えによりリグニン生合成

遺伝子を逆方向（アンチセンス）または逆位反復（RNAi）に導入することで標的遺伝子の発現を抑制し、リグニン含量を低下させた成功例がトールフェスク²⁾、ペレニアルライグラス³⁾、スイッチグラス等⁴⁾で報告されている。また著者らも、バヒアグラスにおいてリグニン生合成のキー酵素であるシンナミルアルコールデヒドロゲナーゼ（CAD）の発現を抑制した高消化性暖地型イネ科牧草の開発に成功している⁵⁾。しかしながら、これら開発した遺伝子組換え体については、外来遺伝子の拡散や安全性などの規制が厳しく、また、社会的にも容認されていないため、品種として実用化することは困難である。

ゲノム編集技術は、任意の配列を認識できる人工ヌクレアーゼ（CRISPR/Cas9）の働きにより、狙った遺伝子をピンポイントで切断することができ、遺伝子のノックアウトを自在に行うことができる画期的な技術である。医学、理学、農学系などのさまざまな研究分野で活用されつつあり、植物の分野については、作物の品種改良への利用が試みられ、遺伝子組換え技術とは異なる実用化を見据えた新しい育種技術として注目されている。この技術は外来遺伝子の導入を伴わないため、これまでの遺伝子組換えの規制を受けず、日本では2019年度より、ゲノム編集により開発された食品は、遺伝子組換えの規制対象外として流通が認められている（厚生労働省、2019年9月13日発表）。そのため本技術により、牧草の実用化を見据えた品種開発が現実のものとなっている。

本研究は、ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草を開発するため、バヒアグラスをモデルに形質転換によるCAD遺伝子のゲノム編集を試み、標的遺伝子のノックアウトを行った。また、作出された編集個体についてリグニン含量を調査し、（1）ゲノム編集技術が暖地型イネ科牧草に適用できるのか、（2）リグニン含量が低下した

暖地型イネ科牧草が開発できるのかを明らかにする。

2. 方法

2.1 ゲノム編集ベクターの構築

標的配列であるガイドRNAは、バヒアグラスのCAD遺伝子の塩基配列から検索し、PAM配列（NGG）の手前に制限酵素サイトを有する配列を公開ソフトウェアCRISPRdirect (<https://crispr.dbcls.jp>) より選定した。設定したガイドRNAは、*Mlu*I 制限酵素サイトを含む5'-GGGCGCGGACGCGTACC-3'の17bpであり（Fig. 1）、この配列をゲノム編集ベクター（CRISPRPL, Sigma）に挿入し、導入ベクターとして用いた。

2.2 エンブリオジェニックカルス（Eカルス）の誘導と形質転換

バヒアグラスは、完熟種子を用い、種子の内・外穎を取り除き、滅菌処理後（70%エタノール2分、2%次亜塩素酸ナトリウム15分）、滅菌水で3回洗浄し、実験に供した。カルスは、滅菌種子を2 mgL⁻¹2,4-D、0.1 mgL⁻¹BAP、50 μM CuSO₄ および0.3%ゲランガムを添加したMS固形培地（DBCH培地）に置床し、31℃、明条件下にて誘導した。形成されたEカルスはコンパクトで増殖旺盛なカルスのみを選抜し、同培地に14日間隔で継代を行い、形質転換に用いた。

形質転換は、Gondoら⁶⁾のパーティクルガン法により行い、ガン処理後、カルスはDBCH培地で3日間培養した後、5 mgL⁻¹ビアラホス添加の同培地で60~70日間選抜培養した。ビアラホスに耐性を示す形質転換カルスは、標的配列の変異を確認した後、5 mgL⁻¹ビアラホス添加のMS培地で21日間、2 mgL⁻¹BAP、0.01 mgL⁻¹NAAおよび5 mgL⁻¹ビアラホス添加のMS培地で30日間培養することで植物体再分化を行った。再分化した植

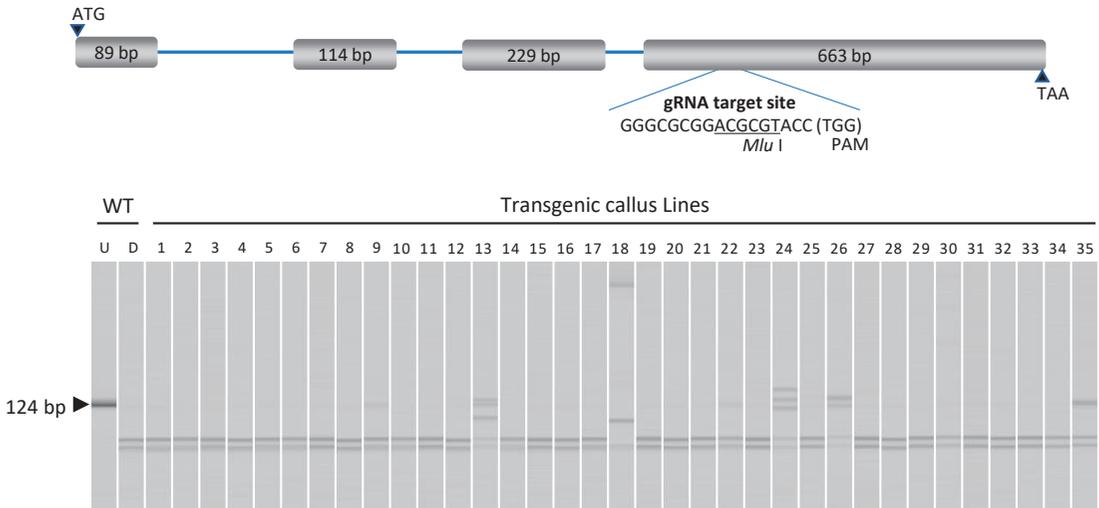


Fig. 1 Sequence of an sgRNA designed with target site of *CAD* gene and confirmation of mutations of 35 transgenic callus lines by PCR and restriction with *Mlu* I in bahiagrass.

Bahiagrass *CAD* gene has four exons, which was estimated from the genetic information of sorghum. The protospacer-adjacent motif (PAM) sequence is indicated brackets and the *Mlu* I restriction site is underlined. PCR products amplified by primers F626 and R749 were digested with *Mlu* I. Lanes labelled D and U of WT are PCR fragments amplified from WT plants with and without *Mlu* I. Lanes 1-35 show blots of PCR fragments amplified from transgenic callus lines digested with *Mlu* I. The bands marked arrows of transgenic callus lines are caused by CRISPR/Cas9-induced mutation.

物体は、 5 mgL^{-1} ピアラホス添加の1/2MS培地で発根を促し、土へと順化した。

2.3 形質転換カルスおよび植物体の変異挿入の解析

形質転換カルスにおける標的配列の変異は、PCR/RE解析により評価した。すなわち、カルスよりDNAを抽出した後、標的配列を含むDNA領域でPCRを行い、変異が挿入される配列に位置する制限酵素 (*Mlu* I) で処理した後、バンドパターンの違いにより、変異の有無を確認した。変異が認められたカルス系統は、PCR産物をサブクローニング後、シークエンス解析を行い、標的配列を確認した。形質転換カルスより再分化した植物体についても、PCR/RE解析を行い、PCR産物をExoSAP-IT処理後、ダイレクトシークエンスを行い、遺伝子型配列を決定した。

2.4 リグニン含量の測定

リグニン含量は、島田ら⁷⁾の迅速チオグリコー

ル酸リグニン定量法 (rTGA法) により行った。非形質転換体 (WT) と形質転換体 (T) の未展開葉と展開葉を採取し、乾燥・粉碎・脱脂した後、20mgを用いて解析を行った。最後に溶解したサンプルは、1N NaOHで希釈した後、OD: 280nmの波長で計測し、イネ科全般の検量線 ($y = 127.12x$) を用いて⁸⁾、細胞壁成分中のリグニン含量を換算した。

3. 結果と考察

3.1 形質転換カルスの獲得とゲノム編集

パーティクルガンによりゲノム編集ベクターをカルスに導入し、ピアラホス存在下で形質転換カルスを選抜した。合計720個のカルスにガン処理を行ったところ、ピアラホスに耐性を示す形質転換カルスが44個得られ、その形質転換効率は6.1%であった。Fig. 1は、形質転換カルスのPCR/RE解析による変異の有無を示したものである。7個

の形質転換カルス系統において、非形質転換カルスとは異なるバンドパターンが認められ、ゲノム編集による制限酵素サイト (*Mlu* I) の変異により、消化されないバンドやそれらがシフトしたバンドが確認された。

その後、ゲノム編集が確認された形質転換カルスのPCR産物を用いて、サブクローニングを行い、得られたクローンをシーケンスすることで標的配列の変異パターンを調査した。7系統の形質転換カルスについて、標的配列に変異が認められるクローンの割合は、22~100%の範囲であった (Fig. 2)。このことから、編集されたカルスは、ほとんどが形質転換初期に標的配列に変異が挿入

されたことが推察された。また、シーケンスによる標的配列の解析では、1~2 bpの塩基の挿入や欠失が多く、なかには数十塩基の欠失や数百塩基の挿入も認められた。

3.2 再分化植物体における変異の確認

上記のゲノム編集された形質転換カルスを再分化培地に移植したところ、7系統のカルスのうち3系統 (T 9, T 13, T 26) で植物体再分化が認められ、それらは発根し、土へと順化した。これらの個体について、RCR/RE解析を行ったところ、再分化したほとんどの個体でPAM配列手前の制限酵素配列の変異による不消化のバンドが認められ、個体レベルで標的配列の変異が確認できた

TC Line #9	Mutation 2/9 (22.2%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 7
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGT <u>I</u> AC TGGT GAGCTCGGA	+1 × 2
TC Line #13	Mutation 3/6 (50%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 3
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCG-----TCGGA	-20 × 3
TC Line #18	Mutation 16/17 (94.1%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 1
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	+30 × 13
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	+364 × 3
TC Line #22	Mutation 4/11 (36.4%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 7
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGT <u>I</u> AC TGGT GAGCTCGGA	+1 × 4
TC Line #24	Mutation 9/9 (100%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 0
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGAC----AC TGGT GAGCTCGGA	-4 × 5
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGT <u>I</u> AC TGGT GAGCTCGGA	+1 × 4
TC Line #26	Mutation 12/12 (100%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 0
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGC--AC TGGT GAGCTCGGA	-2 × 6
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGT <u>I</u> AC TGGT GAGCTCGGA	+1 × 6
TC Line #35	Mutation 5/14 (35.7%)
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGTAC TGGT GAGCTCGGA	WT × 9
AAGCGCGGGAGGCGATGGACCACCTGGGCGCGGACGCGT <u>I</u> AC TGGT GAGCTCGGA	+1 × 5

Fig. 2 Sequence of target site in transgenic calli detected band patterns with mutation on fig. 1. Alignment of target region sequences was obtained by colony sequencing of PCR products. The wild type (WT) sequence is shown at the top, and the PAM sequence is indicated bold. DNA deletions and insertions are shown as dashes and underlines, respectively. The arrow shows the place of the nucleotide insertion. The net changes in length are shown on the right of each sequence (+, insertion; -, deletion; ×, number of clones).

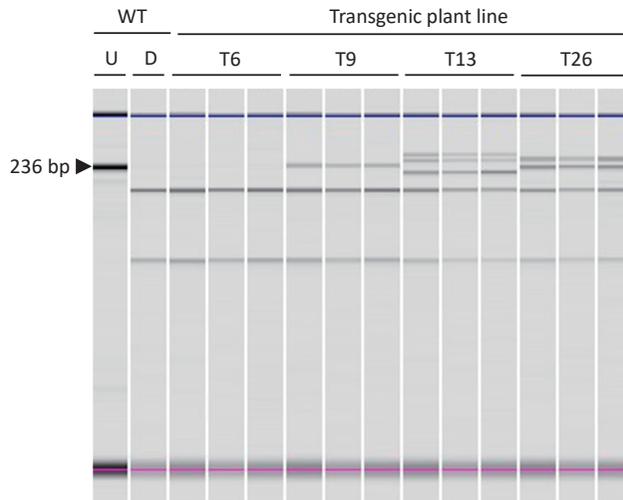


Fig. 3 Confirmation of mutations by PCR and restriction with *Mlu* I in bahiagrass transgenic plant lines.

PCR products amplified by primers F514 and R749 were digested with *Mlu* I. Lanes labelled D and U of WT are PCR fragments amplified from WT plants with and without *Mlu* I. Lanes T6, T9, T13, T26 show blots of PCR fragments amplified from independent regenerated transgenic line digested with *Mlu* I. The number corresponds with the transgenic callus number in Fig. 1. The bands marked arrows of transgenic plant lines are caused by CRISPR/Cas9-induced mutation.

(Fig. 3)。また、そのバンドパターンは、カルスでのRCR/RE解析の結果 (Fig. 1) と同様であった。

Fig. 4は、再分化植物体のPCR産物を用いたダイレクトシーケンシングの結果である。T 9系統はPAM配列の上流4塩基目に1塩基 (T) の挿入が、T 13系統はPAM配列も含めて20塩基の欠失が認められ、どちらも対立遺伝子の片方に変異が挿入されたヘテロ変異体であった。T26系統は、PAM配列の上流4塩基目に変異が挿入され、対立遺伝子の一方は1塩基 (T) の挿入が、他方は2塩基 (GT) の欠失が認められ、対立遺伝子の双方に異なる変異が見られるバイアレリックな変異体であった。標的とした*CAD*遺伝子は、この変異の挿入により、塩基のフレームシフトによるコドンの読み枠のずれが生じ、アミノ酸の配列が変化するだけでなく終止コドンの位置も変わり、

完全な酵素タンパクが翻訳されないため、発現がノックアウトされると推測できる。

3.3 ゲノム編集された形質転換体のリグニン含量

リグニン含量は、出穂前の野生型 (WT) と標的配列に変異の挿入がない形質転換体T 6系統および変異の挿入が認められたT 9, T 13, T 26系統を用いて測定した (Table 1)。その結果、T 26系統のみが未展開葉と展開葉のどちらも野生型に比べ、1%水準で有意に低いリグニン含量を示した。本系統は、対立遺伝子の双方に変異が挿入されており、標的とした*CAD*遺伝子の発現がノックアウトしたため、リグニン合成が低下したものと考えられる。また、本系統の形態は、他の系統に比べ、匍匐性が強く、リグニン含量の低下は、植物の形態にも影響することが推察された。

以上のことから、本研究において、暖地型イネ

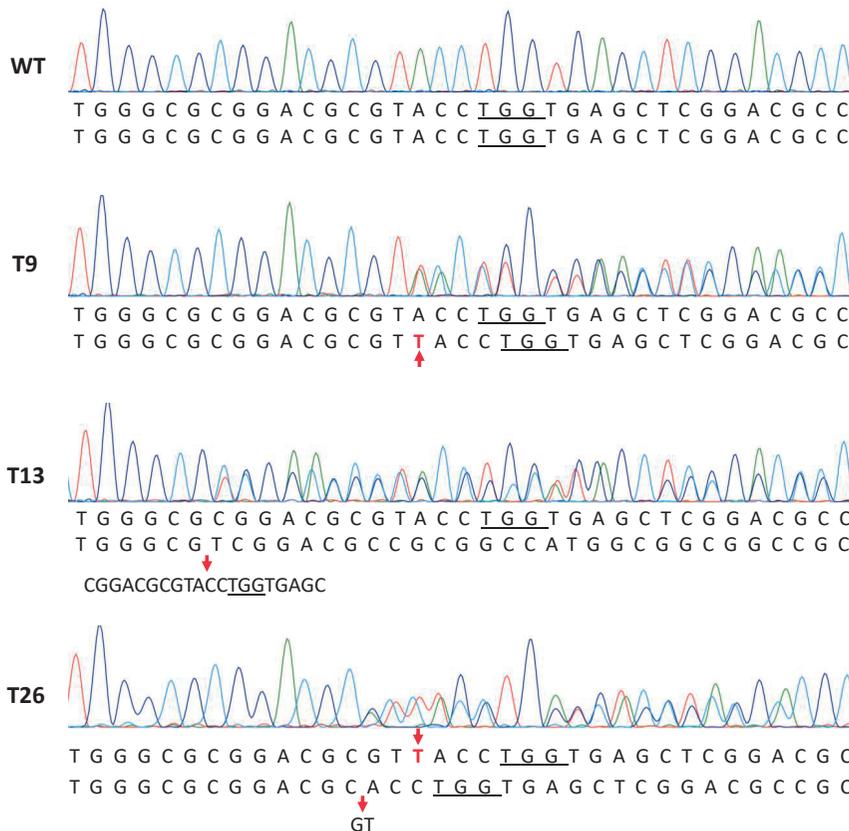


Fig. 4 Chromatograms of DNA sequencing of target region of WT and three mutated transgenic plant lines.

Sequences from target region were obtained by direct sequencing of PCR products. PAM sequence is underlined; the arrowhead indicates the insertion and deletion. The sequence is shown allelic information.

Table 1 Lignin content (% dry cell wall residues) of wild type, non-mutant transgenic plant (T6) and mutant transgenic plants (T9, T13, T26).

Line	Pseudostem	Leaf
WT	6.2±0.3	8.7±0.6
T6	5.4±0.2*	6.8±0.4
T9	6.9±0.5	8.8±0.7
T13	6.6±0.4*	6.4±0.4**
T26	4.8±0.2**	5.3±0.6**

Values are average and standard deviation of three biological replicates. Asterisks indicate a significant difference (*t* test) relative to the wild-type control (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)

科牧草のゲノム編集個体の作出に成功した。このゲノム編集効率は15.9% (7/44) であり、他の作

物の報告とほぼ同様の結果であったことから⁹⁾、本手法は、牧草のゲノム編集に十分適用できると

判明した。また、標的配列のバイアレリックな変異体 (T26) では、リグニン含量の減少が認められたことから、配列の変異が形質に作用したことを確認できた。今後は、交配によりゲノム編集個体の導入ベクターを除去し、新しい育種素材を開発するとともに、飼料特性やリグニンモノマーの分析を進めていきたい。

4. 要 約

本研究は、ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草を開発するため、バヒアグラスをモデルに形質転換によるCAD遺伝子のゲノム編集を試みた。パーティクルガンに用いる導入ベクターは、CAD遺伝子の標的配列であるgRNAをゲノム編集ベクターに挿入し、構築した。合計720個のカスをガン処理したところ、44系統の形質転換カスが得られ、そのうち7系統で標的配列に変異の挿入が認められた。このゲノム編集効率は15.9% (7/44) であり、他の作物の報告とほぼ同様の結果であった。植物体再分化は、変異が挿入された形質転換カス7系統のうち3系統 (T9, T13, T26) で認められ、シーケンス解析の結果、T9, T13系統は、どちらも対立遺伝子の片側に変異が挿入されたヘテロ変異体であった。一方で、T26系統は、対立遺伝子の双方に異なる変異が挿入されたバイアレリックな変異体であった。リグニン含量は、バイアレリックな変異

体であるT26系統のみが未展開葉と展開葉のどちらも野生型に比べ、1%水準で有意に低い値を示した。このことは標的としたCAD遺伝子のノックアウトにより、リグニン合成が低下したものと考えられた。また、本系統の形態は他の系統に比べ、匍匐性が強く、リグニン含量の低下は、植物の形態にも影響することが推察された。今後は、交配によりゲノム編集個体の導入ベクターを除去することで、牧草における新しい品種育成が期待される。

文 献

- 1) Halpin, C. : *Current Opinion Biotech*, **56**, 223~229, 2019.
- 2) Chen, L., Auh, C. K., Dowling, P., Bell, J., Chen, F., Hopkins, A., Dixon, R. A., Wang, Z. Y. : *Plant Biotechnology Journal*, **1**, 437~449, 2003.
- 3) Tu, Y., Rochfort, S., Liu, Z., Ran, Y., Griffith, M., Badenhorst, P., Louie, G. V., Bowman, M. E., Smith, K. F., Noel, J. P., Mouradov, A., Spangenberg, G. : *The Plant Cell*, **22**, 3357~3373, 2010.
- 4) Nelson, R. S., Stewart, J. C. N., Davison, B. H. : *Biotechnology for Biofuels*, **10**, Article No.309, 2017.
- 5) Muguerza, M., Gondo, T., Ishigaki, G., Akashi, R. : *Asian Journal of Plant Sciences*, **13**, 8~17, 2014.
- 6) Gondo, T., Tsuruta, S., Akashi, R., Kawamura, O., Hoffmann, F. : *Journal of Plant Physiology*, **162**, 1367~1375, 2005.
- 7) 島田菜津美, 津山濯, 亀井一郎 : 木材学会誌, **65**, 25~32, 2019.
- 8) Suzuki, S., Suzuki, Y., Yamamoto, N., Hattori, T., Sakamoto, M., Umezawa, T. : *Plant Biotechnology*, **2**, 337~340, 2009.
- 9) Bortesi, L., Fischer, R. : *Biotechnology Advances*, **33**, 41~52, 2015.

牛肉の風味を維持した黒毛和種雌牛の肥育期間短縮技術の開発

Development of fattening method that maintain the flavor of beef and shorten the feeding period in Japanese Black cow

庄 司 則 章¹・上 野 豊²

(¹山形県農業総合研究センター畜産研究所, ²信州大学農学部)

Noriaki Shoji¹ and Yutaka Uyeno²

(¹Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, ²Faculty of Agriculture, Shinshu University)

In order to develop a technique for shortening the fattening period that can maintain carcass weight, BMS, and beef flavor, we examined the feeding effect of SF (feed fermented by adding sake lees to steamed grain mixed feed) using Japanese Black cows. Compared with Group C, which was fed the conventional diet, in the 50% SF group in which 50% of the compound feed was replaced with SF, the daily gain increased after 4 months and showed good growth. In addition, plasma GGT, which is an index of liver dysfunction, was low in the 50% SF group. It is considered that this effect was brought about by the suppression of liver dysfunction caused by sake lees and the stabilization of pH in the rumen due to the diversification of feeding and feeding behavior by combining feeds with different fermentation rates. Furthermore, the low concentrations of amino acids, monosaccharides and nucleic acid-related substances in the rumen solution and feces in the 50% SF group suggested that the availability of feed nutrients may be increased. This study is ongoing, and the group 50% SF will be slaughtered at the end of Reiwa 3 at the age of 29 months, which is 3 months earlier than the group C.

1. 目 的

肥育経営のコスト低減には肥育期間の短縮が効果的である。令和2年3月に公表された「家畜改良増殖目標」においても、黒毛和種の現在の出荷平均29.5ヵ月齢を26～28ヵ月齢に短縮することを目標としている。出荷月齢の短縮については以前より目標とされてきたものの、直近10年間の全国平均はほとんど変動していない。去勢牛では肥育開始月齢を早めたり肥育前期の粗タンパク質(CP)含量を高めたりするなどの対応により、

3ヵ月齢程度の早期出荷が可能であることが報告されている。しかし生産現場では、肥育期間短縮への取り組みが広がらない。その理由として、子牛市場から肥育素牛を導入する場合には肥育開始月齢を早めることが困難であること、肥育開始月齢が変更できない場合には枝肉重量や脂肪交雑量を確保するために飼料の増給速度を速めたり給与量を増量したりして肥育期間の短縮を図る必要があるが、ルーメンアシドーシスや肝機能低下、ビタミンA欠乏等のトラブルが生じやすくなること、また脂肪交雑量は十分であって

も、経験的に肥育期間を短縮することにより牛肉の風味が低下することが知られており、去勢牛よりも風味が重視される黒毛和種雌肥育では特に肥育期間の短縮を望まない枝肉購買者が多い。

牛肉の風味向上には「炊いた飼料」を給与することが効果的であることが経験的に知られており、枝肉成績もよいことから市場取引でも高い評価を得ている。一方で、なぜそのような効果が現れるのかについて、科学的な検証はなされていない。我々は飼料を蒸して軟らかい状態に維持する新たな飼料調製技術（以下「膨潤発酵技術」という）を開発した^{1,2)}。本技術により調製した飼料は消化性が高いうえ、既存配合飼料と組み合わせることで給与することにより、肥育牛のルーメンアシドーシスを抑制できる。また、酒粕を加工して飼料に添加し発酵させる飼料調製技術（以下「酒粕発酵技術」という）も開発しており³⁾、本技術により調製した飼料を肥育牛に給与することにより、肥育期間中の肝機能を向上したり、と畜時の肝臓廃棄率を低減したりすることができる。

この2つの技術を組み合わせた新たな飼料（以下「膨潤酒粕発酵飼料」）を肥育牛に給与することにより、高い消化性や疾病低減により良好な枝肉格付成績が得られるとともに、肥育期間短縮時の風味低下を抑制できる可能性が高い。そこで本研究では、本飼料を既存配合飼料と組み合わせることで給与することにより、従来の肥育開始月齢を維持したまま、枝肉重量と脂肪交雑量に加えて牛肉の風味も維持するとともに、肥育期間中の疾病が少なく生産現場で受け入れやすい黒毛和種雌牛の短期肥育技術を確立する。

2. 方 法

本研究では、黒毛和種雌肥育牛において一般的な10ヵ月齢程度より肥育を開始したうえで肥育期間を3ヵ月間短縮し、枝肉重量、脂肪交雑量、牛

肉の風味を慣行と同等の成績とすることを目標とし、現地農場の協力を得て給与試験を実施した。農場で利用している配合飼料を105℃で40分間蒸煮し、酒粕溶解液を添加して水分率約45%に調製した後、外気の逆流防止弁のあるビニール袋に20kgずつ包装し、常温で2週間程度発酵させて膨潤酒粕発酵飼料を調製した。農場の慣行体系の飼料を給与するC区、慣行体系で給与する配合飼料の原物重量50%を膨潤酒粕発酵飼料で代替する50%SF区を設定した。宮城県子牛市場より約10ヵ月齢の黒毛和種雌子牛を18頭導入して3頭ずつの群飼とし、C区ならびに50%SF区に9頭ずつ配置した。導入後3週間を馴致期間とし、約11ヵ月齢より給与試験を実施した。

飼料摂取量（牛房ごと）、体重（導入時、15ヵ月齢時）より牛房ごとの飼料要求率を算出した。血液ならびに糞は11, 13, 15ヵ月齢時、ルーメン液は15ヵ月齢時、それぞれ朝の飼料給与6時間後に採取した。血液は一般生化学検査とメタボローム解析、ルーメン液は細菌叢構成、一般性状検査、メタボローム解析、糞はVFA含量とメタボローム解析を行った。メタボローム解析では、メタボロミクス前処理ハンドブック⁴⁾の方法によりサンプル調製を行い、島津製作所製GCMS-QP2010plusおよびSmart Metabolites Databaseにより測定した。メタボローム解析におけるサンプル定量では、分析対象サンプルすべての抽出液から一定量を分取して混合させたQCサンプルを調製し、定期的に分析するとともに、LOWESS平滑化とSplineによりQC定量値を補間し、その補間値によりサンプルの定量値の標準化を行った⁵⁾。細菌叢構成の測定では採取ルーメン液から微生物ゲノムDNAを抽出後、リアルタイムPCR法により細菌16S rRNA遺伝子配列に基づくプライマーセットを用いて総細菌数を、古細菌特異的遺伝子配列に基づくプライマーセットを用いて古

細菌数をそれぞれ求めた。また、抽出ゲノムDNAを用いて次世代シーケンシング (MiSeq) により網羅的塩基配列情報を取得し、アンブリコン解析ソフトウェア (QIIME) により細菌叢構成を定量した。ルーメン液と糞のVFAは高速液体クロマトグラフィーにより定量した。

3. 結果と考察

発育成績をTable 1 に示した。試験開始4ヵ月後となるおおむね15ヵ月齢時点での体重ならびに日増体量は、50%SF区391kg, 0.78kg/日, C区357kg, 0.63kg/日であり、50%SF区が良好であった。また、牛房ごとの飼料要求率は50%SF区7.08, C区9.81であった。阿部らは、飼料用米を40% (丸粒玄米25%, 粗碎玄米15%) 配合した穀物原料による膨潤発酵飼料を黒毛和種雌肥育牛に給与し、28ヵ月齢時までの日増体量が良好であったことを報告している⁶⁾。膨潤酒粕発酵飼料を給与した本研究においても、肥育途中経過ではあるが同様の傾向を示しており、肥育期間の短縮に向けて今後の発育が期待される。

血液性状の推移をTable 2 に示した。給与4ヵ月後の50%SF区において、肝機能の指標であるGGTはC区よりも有意に低かった。蒸煮した飼料用米に酒粕を添加して発酵させた飼料を肥育牛に給与したところ、血中GGTが低下し、と畜時の肝臓廃棄率は大きく低減したとの報告²⁾や、酒粕に多く含まれるS-アデノシルメチオニンは抗

肝障害効果を有するとの報告⁷⁾があることから、膨潤酒粕発酵飼料中の酒粕の効果により肝機能が良好に推移したものと考えられた。また、本研究では採食行動調査を行っていないが、農場担当者によると「C区に比べて50%SF区の飼料摂取速度は緩やかである」とのことであった。肥育牛に発酵TMRを給与すると飼料採食行動は分散し、一般的な分離給与に比べて消化器疾病および肝機能障害による治療頭数および回数が低減する⁸⁾。また、濃厚飼料中の膨潤発酵飼料割合が高まるにつれて、肥育牛のルーメン内pHが上昇し日内変動幅も小さくなる (未発表データ)。本研究において50%SF区の飼料摂取速度が緩やかであることや、消化速度が異なる配合飼料と膨潤酒粕発酵飼料を組み合わせることで給与することにより、ルーメンアシドーシスやエンドトキシン産生が抑制されている可能性が考えられる。膨潤酒粕発酵飼料の給与においては、酒粕による肝機能障害の抑制、発酵速度の異なる飼料の組合せ給与や採食行動の分散化によるルーメン内pHの安定化の両効果により、肝機能が良好に保たれているのかもしれない。血漿メタボローム解析では、50%SF区のクレアチニン濃度が給与4ヵ月後で有意に増加した。血清クレアチニンは筋肉量にほぼ比例⁹⁾し、50%SF区では体重が有意に大きかったことから、筋肉量の増加が血漿クレアチニンの増加の要因と考えられた。

飼料給与6時間後に採取したルーメン液性状を

Table 1 Weight gain and feed conversion ratio

Group ¹	Number	At the start		4 months later					
		months old	body weight (kg)	months old	body weight (kg)	Daily gain (kg/day)	Average weight gain (kg/head)	Dry matter intake (kg)	Feed conversion ratio
50%SF	9	10.1	280	14.7	391*	0.78+	111	780	7.08
C	9	10.2	268	14.8	357	0.63	89	814	9.81

Group¹: 50%SF: 50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed, C: Grain mixed feed

Significant difference *: p<0.05, +: p<0.1

Table 2 Transition of plasma biochemical components

Elapsed months		0		2		4		
Months old		11		13		15		
Group ¹		50%SF	C	50%SF	C	50%SF	C	
Number		9	8	9	8	9	8	
General biochemical test	GGT	(U/L)	30	26	36	33	27	32 *
	Urea nitrogen	(mg/dL)	8.7	9.9	8.9	8.7	12.3	11.2
	Albmine	(g/dL)	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
	Total protein	(g/dL)	7.1	7.7	7.0	6.6	7.0	7.2
	Ammonia	(μ g/dL)	94	96	63	68	79	84
	Total cholestrol	(mg/dL)	91	86	109	100	128	140
	Triglyceride	(mg/dL)	22	25	15	13	17	21
	Glucose	(mg/dL)	92	94	82	84	79	83
	Retinol	(IU/dL)	80	69	75	61	72	72
	α -Tocopherol	(μ g/dL)	102	88	153	147	257	278
	β -Carotene	(μ g/dL)	22	19	5	3 *	12	10
Amino Acid	5-Oxoproline-2TMS		0.99	1.10	0.89	0.95	0.91	0.92
	Alanine-2TMS		0.96	1.26	1.09	0.97	1.06	1.02
	Glutamine-3TMS		1.18	0.83 *	1.04	0.97	1.11	0.94 ** *
	Glycine-3TMS		0.90	0.88	1.05	1.01	1.11	1.03
	Isoleucine-2TMS		0.84	0.98	1.01	0.89	1.10	1.11
	Leucine-2TMS		0.79	0.91	0.99	0.88	1.11	1.20
	Lysine-4TMS		0.83	0.83	0.95	0.92	1.23	1.18
	Ornithine-4TMS		0.73	0.79	0.98	0.98	1.40	1.29
	Phenylalanine-2TMS		0.87	0.93	1.04	0.91	1.06	1.10
	Proline-2TMS		0.74	0.84	1.04	0.97	1.26	1.20
	Serine-3TMS		0.75	0.72	0.98	0.88	1.23	1.29
	Threonine-3TMS		0.83	0.75	0.97	0.95	1.11	1.12
	Tyrosine-3TMS		0.92	0.80	0.99	0.97	1.17	1.12
	Valine-2TMS		0.82	0.87	0.99	0.94	1.16	1.15
	Suger	Glucose-meto-5TMS (1)		1.11	1.01 *	1.03	1.03	0.97
Glucose-meto-5TMS (2)			1.04	1.01	0.94	1.04 *	0.94	0.97
Mannose-5TMS (2)			1.07	1.13	1.08	1.21	1.00	0.92
Mannose-meto-5TMS (1)			1.32	1.52	0.97	1.01	0.73	0.78
Xylose-4TMS (2)			0.81	1.08 ** *	0.95	1.04	0.88	0.97
Fatty Acid	Lauric acid-TMS		1.26	1.24	1.33	1.31	1.09	1.20
	Margaric acid-TMS		1.09	1.04	1.08	1.03	1.12	1.09
	Myristic acid-TMS		1.13	1.08	1.08	1.01 *	1.13	1.07
	Palmitic acid-TMS		1.11	1.09	1.09	1.02	1.13	1.07
	Stearic acid-TMS		1.07	1.11	1.08	1.00 *	1.12	1.11
Other	3-Hydroxybutyric acid-2TMS		1.08	1.03	0.98	0.84	0.99	0.93
	3-Hydroxypropionic acid-2TMS		1.01	0.85	0.77	0.96	0.84	0.98
	Citric acid-4TMS		1.24	0.71 *	0.97	0.93	1.14	0.71 ** *
	Creatinine-3TMS		0.91	0.81	0.90	1.17	1.59	0.94 ** *
	Inositol-6TMS (2)		1.06	1.22	0.97	0.99	0.94	0.95
	Lactic acid-2TMS		0.96	1.22	1.11	1.09	1.30	1.04
	Phosphoric acid-3TMS		0.98	0.88	0.98	0.83	1.11	0.99
	Pyruvic acid-meto-TMS		0.79	1.08 *	0.98	1.18	1.14	1.12
	Succinic acid-2TMS		1.06	0.99	1.05	0.95 ** *	1.13	1.08
	Taurine-3TMS		0.54	0.86 *	0.89	0.98	1.12	1.33
	Urea-2TMS		0.91	0.92	0.90	0.86	1.27	1.09 *
Uric acid-4TMS		1.03	0.76	1.00	0.79	1.27	1.25	

Group¹ : 50%SF : 50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed, C : Grain mixed feedMetabolomic analysis² : Standardized data by Quality Control sample

Significant difference ** : p<0.01, * : p<0.05

Table 3 Rumen liquid properties

Group ¹			50%SF	C	
Number			9	8	
pH			6.77	6.67	
Volatile fatty acid	Total VFA (mmol/ml)		69.17	67.42	
	Acetate (mol%)		61.57	57.25	*
	Propionate (mol%)		22.64	24.24	
	Butyrate (mol%)		15.78	18.51	*
Ammonia nitrogen (mg/dL)			1.11	0.61	
Amino Acid	5-Oxoproline-2TMS		0.75	1.33	*
	Cysteine-3TMS		0.97	1.38	
	Glycine-3TMS		0.96	1.07	
	Lysine-4TMS		0.79	1.30	**
	Ornithine-4TMS		0.75	1.30	**
	Threonine-3TMS		0.83	1.19	
	Valine-2TMS		0.87	1.11	
Pentose	Arabinose-meto-4TMS		0.60	1.73	*
	Lyxose-meto-4TMS (1)		0.72	1.91	
	Ribose-meto-4TMS		0.70	1.38	*
Suger	Hexose	Glucose-meto-5TMS (1)	0.36	1.95	
		Glucose-meto-5TMS (2)	0.37	1.92	
		Mannose-meto-5TMS (1)	0.46	1.71	*
Disaccharide	Maltose-meto-8TMS (1)		0.62	1.68	
	Maltose-meto-8TMS (2)		0.53	1.76	
	Trehalose-8TMS		0.61	1.68	
Fatty Acid	Elaidic acid-TMS		0.81	1.26	
	Lauric acid-TMS		0.96	1.08	
	Margaric acid-TMS		0.95	1.04	*
	Myristic acid-TMS		0.98	1.01	
	Palmitic acid-TMS		0.95	1.01	
	Stearic acid-TMS		0.96	1.06	**
Metabolomic analysis ²	Nucleic Acid Rerated Substance	Adenine-2TMS	0.84	1.27	
		Hypoxanthine-2TMS	0.72	1.32	**
		Inosine-4TMS	0.88	1.30	
		Uracil-2TMS	0.79	1.29	*
Other	2-Hydroxyglutaric acid-3TMS		0.58	1.66	
	3-Hydroxyphenylacetic acid-2TMS		0.70	1.57	**
	3-Hydroxypropionic acid-2TMS		1.30	0.79	*
	5-Aminovaleric acid-3TMS		1.06	0.93	
	Azelaic acid-2TMS		1.06	0.90	
	Benzoic acid-TMS		0.98	1.04	
	Dodecanedioic acid-2TMS		1.14	0.97	
	Glutaric acid-2TMS		0.63	1.49	**
	Inositol-6TMS (2)		1.17	1.26	
	Malic acid-3TMS		0.84	1.30	
	N-Acetylneuraminic acid-6TMS		0.62	1.71	
	Nicotinic acid-TMS		0.80	1.22	
	Phosphoric acid-3TMS (1)		1.02	1.02	
	Phosphoric acid-3TMS (2)		1.01	0.99	
	Putrescine-4TMS		0.84	1.32	
	Sebacic acid-2TMS		1.19	0.75	**
	Spermidine-5TMS		1.01	1.54	**
	Succinic acid-2TMS		0.75	1.34	
	Tryptamine-3TMS		0.92	1.20	
	Xanthine-3TMS		0.63	1.46	*

Rumen liquid was collected 6 hours after feeding at 15months old.

Group¹ : 50%SF : 50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed, C : Grain mixed feed

Metabolomic analysis² : Standardized data by Quality Control sample

Significant difference ** : p<0.01, * : p<0.05

Table 4 Rumen fluid bacterial flora composition

Group ¹	50%SF	C	
Number	9	8	
Proportions of respective groups			
Bacteroidetes	0.783	0.708	* *
Prevotellaceae	0.622	0.568	
RF16_f	0.077	0.061	
AC160630_f	0.040	0.039	
AY244965_f	0.027	0.023	
other Bacteroidetes	0.015	0.016	
Proteobacteria	0.067	0.093	
Gammaproteobacteria : Aeromonadales : Succinivibrionaceae	0.064	0.087	
Alphaproteobacteria : Rhodospirillales : Rhodospirillaceae	0.002	0.004	+
Firmicutes	0.068	0.089	* *
Clostridia : Clostridiales : Ruminococcaceae	0.029	0.035	+
Clostridia : Clostridiales : Lachnospiraceae	0.014	0.018	+
Negativicutes : Selenomonadales : Selenomonadaceae	0.011	0.009	
Negativicutes : Acidaminococcales : Acidaminococcaceae	0.006	0.007	
other Firmicutes	0.008	0.020	
Spirochaetes	0.021	0.037	*
Tenericutes	0.014	0.022	
Fibrobacteres	0.004	0.005	
Cyanobacteria	0.023	0.028	
Verrucomicrobia	0.011	0.008	
Others	0.010	0.010	

Rumen liquid was collected 6 hours after feeding at 15months old.

Group¹ : 50%SF : 50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed, C : Grain mixed feed

Significant difference * * : p<0.01, * : p<0.05, + : p<0.1

Table 3, 細菌叢構成を**Table 4**に示した。

細菌叢の一部が変化しており、特にFirmicutes門に属する繊維分解菌を含む菌(Ruminococcaceae, Lachnospiraceae)が50%SF区で減少傾向にあった。このことは、膨潤酒粕発酵飼料は易消化性炭水化物割合が高いことを反映しているのではないかと考えられた。また、50%SF区では酪酸モル比率が低下しており、酪酸を発酵産物の一つとするLachnospiraceaeの減少が要因の一つと推察された。なお、ルーメン液中細菌数に対するメタン生成菌比率は50%SF区1.5%、

C区2.4%となっており、有意差は認められなかった。メタボローム解析では、50%SF区でアミノ酸、糖類、脂肪酸、核酸関連物質が少ない傾向が認められた。黒毛和種去勢牛に配合飼料と膨潤発酵飼料を等量ずつ混合して給与し、1時間ごとにルーメン液を採取してpHならびにVFA産生量を調査したところ、配合飼料のみを給与した場合に比べて次の飼料給与時までpHとVFA産生量は常に高く推移していた(未発表データ)。本研究では酒粕を添加して発酵させた飼料という点は異なるが、膨潤発酵飼料の給与によってルーメン内の

Table 5 Transition of fecal properties

Elapsed months		0		2		4		
Months old		11		13		15		
Group ¹		50%SF	C	50%SF	C	50%SF	C	
Number		9	9	9	8	9	8	
Volatile fatty acid (mol/dL)	Total VFA (mmol/g)	37.1	36.0	35.8	43.7 *	53.8	45.8	
	Acetate (mol%)	74.1	72.1	63.3	65.6	61.8	59.7	
	Propionate (mol%)	15.1	16.0	17.6	20.4 *	16.3	20.9 **	
	Butyrate (mol%)	10.8	11.9	19.1	14.0 *	21.9	19.4	
Amino Acid	3-Aminopropanoic acid-3TMS	0.46	0.39	1.56	0.72	1.25	2.20	
	4-Aminobutyric acid-3TMS	1.15	0.46 *	1.83	1.27	1.35	0.44	
	5-Oxoproline-2TMS	0.71	0.91	0.87	1.04	0.84	1.53 **	
	Alanine-2TMS	0.78	0.83	0.92	1.04	0.84	1.52 **	
	Glycine-3TMS	0.97	1.15	0.89	1.09	0.79	1.43 **	
	Isoleucine-2TMS	1.22	1.27	1.23	1.59	0.64	1.23 **	
	Lysine-4TMS	0.87	0.94	1.02	1.20	0.87	1.19 *	
	Ornithine-4TMS	0.66	0.75	1.17	1.21	1.24	1.69	
	Phenylalanine-2TMS	1.13	1.10	0.88	1.20	0.62	1.23 **	
	Threonine-3TMS	1.03	1.11	0.92	1.17	0.64	1.23 **	
	Valine-2TMS	1.05	1.11	0.92	1.13	0.61	1.28 **	
Pentose	Arabinose-meto-4TMS	0.38	0.42	1.42	1.24	1.50	2.20	
	Ribose-meto-4TMS	0.57	0.74	0.97	1.53	0.86	1.54 **	
	Xylose-4TMS (2)	0.82	0.72	3.22	1.43	3.19	2.97	
Suger	Hexose	Fructose-meto-5TMS (1)	0.78	0.85	1.09	0.83	0.67	1.85 *
		Fructose-meto-5TMS (2)	0.71	0.82	1.14	0.83	0.65	1.68 *
		Fucose-meto-4TMS (1)	0.89	1.12	1.39	0.57 *	0.74	1.62 *
	Disaccharide	Glucose-5TMS (1)	0.45	0.94	1.53	1.56	6.85	2.67
		Glucose-meto-5TMS (1)	0.83	1.05	3.45	1.01	1.50	0.99
		Glucose-meto-5TMS (2)	0.41	0.37	1.84	0.86 *	1.41	1.69
Mannose-meto-5TMS (2)	0.82	0.89	1.09	1.16	0.89	1.26 *		
Maltose-meto-8TMS (1)	0.27	0.19	2.88	0.52 *	2.21	0.52 *		
	Maltose-meto-8TMS (2)	0.38	0.22	2.72	0.59 *	2.13	0.58 *	
Metabolomic analysis ²	Fatty Acid	Lauric acid-TMS	0.89	0.89	0.98	0.97	1.04	1.27 *
		Margaric acid-TMS	0.87	0.89	0.99	1.05	0.94	1.00
		Myristic acid-TMS	0.88	0.91	1.04	1.06	1.01	1.09
		Nonanoic acid-TMS	0.69	0.90 **	1.06	0.82 *	0.91	1.06
		Palmitic acid-TMS	0.90	0.89	1.02	1.00	0.96	1.08
		Stearic acid-TMS	0.84	0.90	1.03	1.02	0.95	1.04
Nucleic Acid Related Substance	Hypoxanthine-2TMS	0.77	0.73	1.06	1.21	0.83	1.14 *	
	Inosine-4TMS	1.33	1.22	1.16	1.17	0.73	0.99	
	Thymine-2TMS	1.05	0.95	1.13	1.25	0.74	1.03 *	
	Uracil-2TMS	0.91	0.91	1.10	1.35	0.77	1.22 **	
Other	4-Hydroxyphenylacetic acid-2TMS	2.47	1.57	0.85	1.36	1.19	1.55	
	Azelaic acid-2TMS	1.13	1.40	1.36	0.77	0.82	0.69	
	Benzoic acid-TMS	0.91	1.26 **	0.84	0.99	0.87	1.13	
	Galacturonic acid-5TMS (1)	0.31	0.60	1.66	1.36	2.10	2.45	
	Galacturonic acid-meto-5TMS (1)	0.57	0.76	1.92	1.24	0.84	2.75 **	
	Glutaric acid-2TMS	1.51	0.95	1.06	0.98	0.84	0.68	
	Glyceric acid-3TMS	0.66	1.06 *	1.14	0.70 **	1.09	1.81	
	Glycerol-3TMS	0.91	0.77	1.21	1.13	1.08	1.41	
	Glycolic acid-2TMS	1.34	0.88	1.14	2.35 **	1.22	1.15	
	Malic acid-3TMS	0.72	0.73	0.84	1.15	0.64	1.81 **	
	N-Acetylmannosamine-meto-4TMS(1)	0.79	0.88	1.09	1.08	0.94	1.31	
	N-Acetylmannosamine-meto-4TMS(2)	0.99	1.75	1.08	1.30	0.91	1.29	
	Nicotinic acid-TMS	0.67	0.62	1.14	1.15	1.15	1.43	
	Phosphoric acid-3TMS	1.25	1.16	1.04	0.93	1.15	1.05	
	Putrescine-4TMS	0.54	0.46	1.25	1.20	1.47	1.68	
	Succinic acid-2TMS	0.81	0.80	0.99	1.00	1.00	1.05	
	Urea-2TMS	0.80	1.07	0.92	1.99	0.99	1.08	
	Ureidosuccinic acid-3TMS	0.35	0.29	1.70	0.81 *	1.34	1.58	
	Xanthine-3TMS	0.91	1.01	1.01	1.13	0.69	0.97 *	

Group¹ : 50%SF : 50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed, C : Grain mixed feedMetabolomic analysis² : Standardized data by Quality Control sample

Significant difference ** : p<0.01, * : p<0.05

微生物活性が高位安定して代謝産物の利用率が高くなり、飼料給与6時間後のルーメン液のアミノ酸や糖類などの濃度が低下したのかもしれない。今後、人工第1胃発酵法により、ルーメン液内代謝産物の経時変化を調査することにより、膨潤酒粕発酵飼料のルーメン内発酵特性を明らかにしていく計画である。

糞の性状をTable 5に示した。50%SF区においてプロピオン酸モル比率が低くなるとともに、アミノ酸、糖類、核酸関連物質が少ない傾向が認められた。犬¹⁰⁾やウサギ¹¹⁾に好熱菌を給与したところ、糞中のアミノ酸や糖が減少し栄養利用率が上昇したとの報告があり、本研究でも同様に糞中のアミノ酸や糖類が少なかったことから、50%SF区では飼料消化率が向上している可能性が示唆された。これには腸内細菌叢の変動に伴い下部消化管発酵特性が変化した可能性が考えられることから、次年度に腸内細菌叢の調査を実施していきたい。

本給与試験は継続中であり、次年度は18, 21, 24ヵ月齢時の血液および糞について同様の調査を実施する計画である。また、50%SF区は29ヵ月齢となる令和4年3月に、C区は農場の慣行である32ヵ月齢となる令和4年6月にと畜し、枝肉格付ならびに牛肉食味成分を取りまとめるとともに、消費者型官能評価を実施して、膨潤酒粕発酵飼料による肥育期間短縮効果を明らかにする予定である。

4. 要 約

枝肉重量、BMS、牛肉の風味を維持できる肥育期間の短縮技術を開発するため、黒毛和種雌牛を用いて、膨潤酒粕発酵飼料（SF：蒸煮した穀物混合飼料に酒粕を添加して発酵させた飼料）の給与効果を検討した。慣行体系の飼料を給与したC区に比べ、配合飼料の50%をSFで代替した

50%SF区では、4ヵ月後に日増体量が向上して良好な発育を示した。また、50%SF区では、肝機能障害の指標である血漿GGTが低かった。この効果は、酒粕による肝機能障害の抑制と、発酵速度の異なる飼料を組合せ給与と採食行動の分散化に起因するルーメン内pHの安定化、がもたらしたものと考えられた。さらに、50%SF区ではルーメン液および糞のアミノ酸、単糖、核酸関連物質濃度が低かったことから、飼料中栄養素の利用性が高まる可能性が示唆された。本研究は継続中であり、50%SF区はC区よりも3ヵ月早い29ヵ月齢で令和3年度末にと畜する予定である。

文 献

- 1) 庄司則章, 野川勝弘: 穀物発酵飼料の製造方法, および, それによる穀物発酵飼料, 特許第5391506号, 2013.
- 2) 庄司則章, 野川勝弘: 膨潤化穀物発酵飼料の製造方法, および, それによる膨潤化玄米発酵飼料, 特許第5887673号, 2016.
- 3) 庄司則章, 野川勝弘: 酒粕添加発酵飼料の製造方法, 特許第6547959号, 2019.
- 4) 島津製作所, <https://www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/ckeditor/apl/lifescience/metabolomics/c146-2181a.pdf>
- 5) ESI友の会編: メタボロームデータの標準化方法, <https://sites.google.com/site/esitomonokai/jie-xi-bu-wu/metaboromudetano-biao-zhun-hua-fang-fa/2-lowesstosplineno-li-lun>
- 6) 阿部正博, 小松正尚ら: 膨潤発酵飼料の給与が黒毛和種雌肥育牛の発育性および飼料効果に及ぼす影響, 山形農業研報, 11, 31~40, 2019.
- 7) 藤井力, 伊豆英恵, 松原主典: 発酵食品「酒粕」による老化抑制および脳機能活性化の検討, 生物工程, 97(10), 595~598, 2019.
- 8) 安部亜津子, 成相伸久ら: 黒毛和種去勢牛26ヵ月齢出荷体系における発酵TMR給与が肥育成績および牛肉品質に及ぼす影響, 日本畜産学会報, 90(2), 121~131, 2019.
- 9) 孫大輔, 南学正臣: BUN, クレアチニン高値を認めたとときの鑑別診断の進め方, 日本内科学会誌, 97(5), 21~25, 2008.
- 10) 栢岡久志, 井藤俊行ら: 好熱菌*Bacillus hisashii*を経口給与した犬の糞中の代謝物の網羅的解析, ペット栄養学会誌, 20, 39~40, 2017.
- 11) 栢岡久志, 中西裕美子ら: 好熱性細菌*Bacillus hisashii*の経口給与がウサギの腸内環境に与える影響評価, ペット栄養学会誌, 20, 41~42, 2017.

木材クラフトパルプの混合割合の異なる濃厚飼料の 給与が黒毛和種去勢牛の飼料消化性および第一胃内 発酵に及ぼす影響

Effect of various ratio of wood kraft pulp in concentration feed on feed
digestibility and rumen fermentation in Japanese Black fattening steer

前田 友香

(宮崎県畜産試験場)

Yuka Maeda

(Miyazaki Livestock Research Institute)

The effects of feeding various ratio of wood kraft pulp in concentrated feed on feed digestibility and rumen fermentation in Japanese Black (JB) fattening steer was examined in this study. The feeding experiment was carried out a replicated 3×3 Latin square design using 6 JB steers (16.2 ± 0.8 months of age). Steers were fed rice straw and three concentrated feeds: commercial formula feed (control), formula feed containing 7.5% KP on a dry matter (DM) basis (7.5% KP), and formula feed containing 15% KP on a DM basis (15% KP). Feed digestibility and rumen fermentation parameters were measured on 3-day during the measurement period after an 11-day adaptation period. There was no significant difference in DM intake per day among diets. In steers fed 15% KP, a slightly higher digestibility of neutral detergent fiber was observed compared with steers fed other diets ($p=0.059$). The composition of butyric acid in rumen fluid was higher in steers fed KP diets than in steers fed control ($p=0.083$). The average ruminal pH was unaffected by KP diets. This study suggested that there is little effect on feed digestibility and rumen fermentation by replacing 7.5% and 15% of concentrated feed with KP for JB fattening steer.

1. 目 的

わが国において、黒毛和種牛の肥育では、デンプン等の易発酵性炭水化物を多く含む濃厚飼料を多給する¹⁾。しかしながら、反芻家畜が易発酵性炭水化物を多量に摂取した場合、あるいは粗飼料の摂取量が少ない場合には、第一胃内のpHが低下し、第一胃内発酵の恒常性が阻害される²⁾。第一胃内発酵の不安定化は、食欲不振や下痢といった代謝障害を引き起こすリスクを高め、発育停滞

等の生産性低下につながる。したがって、黒毛和種肥育牛を飼養する場合、飼料のエネルギーレベルを低下させることなく、第一胃内発酵を安定的に維持することを考慮する必要がある。

木材クラフトパルプ (KP) は、木材由来の繊維からリグニンを選択的に除去するクラフト処理によって製造される、セルロース主体の飼料である。KPはトウモロコシと同等の可消化養分総量 (TDN) を有し、その消化速度は粗飼料と濃厚飼料の中間程度である³⁾。そのため、KPは粗飼料⁴⁾

だけでなく、濃厚飼料の代替として牛へ給与することが可能である⁵⁾。さらに、最近の研究では、ホルスタイン種泌乳牛へトウモロコシの代替としてKPを給与すると、第一胃内pHの低下を抑制し、結果として胃液エンドトキシン (LPS) 活性値が減少することが報告されている⁵⁾。一方で、我々のこれまでの研究では、濃厚飼料の10%をKPに置き換えた飼料を肥育後期の黒毛和種去勢牛へ給与しても、第一胃内発酵にはほとんど影響がないことを確認している⁶⁾。しかし、他の肥育ステージの黒毛和種牛へKPを給与した場合の影響や、KPの代替割合を変えた場合の影響については不明である。そこで本研究では、KPの配合割合を10%よりも低下 (7.5%) または増加 (15%) させた濃厚飼料を黒毛和種去勢牛へ給与した場合の、飼料消化性および第一胃内発酵に及ぼす影響について検討した。

2. 材料および方法

2.1 供試牛, 処理区, および飼養方法

黒毛和種去勢牛6頭 (体重 520.0 ± 20.3 kg, 月齢

16.2 \pm 0.8か月齢) を用いて、1期14日間 (予備期11日間, 本期3日間) とする3 \times 3ラテン方格法による給与試験を反復して実施した。供試牛には、稲わらと以下の3つの濃厚飼料を給与した。すなわち、市販の配合飼料 (対照), 市販の配合飼料に乾物 (DM) あたり7.5%のKPを含む飼料 (7.5%KP), そして、市販の配合飼料にDMあたり15.0%のKPを含む飼料 (15%KP) である。各飼料の配合割合および化学成分をTable 1に示した。なお、KP配合飼料には、CP含量を調節するために、非タンパク態窒素 (NPN) を配合した。各飼料の給与量は、日本飼養標準¹⁾に基づいて、日増体量0.75kgに要するTDNを充足するよう設定した。給与飼料の粗飼料と濃厚飼料の比率は1:9とし、各飼料は1日量を半量ずつ9:00と16:00に給与した。試験期間中、供試牛はラバーマットを敷いた単房で飼養し、水とミネラルブロックは自由摂取とした。

2.2 サンプルの採取と分析

本期3日間では、全糞全尿採取による消化試験を実施した。本期間中に採取した残餌、糞、およ

Table 1 Ingredients and nutritional compositions of the experimental diets

	Concentrate feed			Roughage
	Control	7.5% KP	15% KP	
Ingredients, %DM				
Commercial formula feed [†]	100.0	92.2	84.5	—
KP	—	7.5	15.0	—
NPN [‡]	—	0.3	0.5	—
Rice straw	—	—	—	100.0
Nutritional composition				
DM, %	87.0	86.8	86.5	84.0
OM, %DM	96.8	96.9	97.3	79.1
CP, %DM	13.9	13.5	13.2	4.6
EE, %DM	3.3	3.3	2.9	1.9
aNDFom %DM	22.2	26.8	31.9	63.8
Starch, %DM	53.0	47.7	43.7	3.0

KP, Kraft pulp; DM, dry matter; OM, organic matter; CP, crude protein; EE, ether extract; aNDFom, α -amylase treated ash-free neutral detergent fiber.

[†]Miyazaki shimofuri tokugou shiageyou, Minami nihon kumiai shiryo.

[‡]Optigen, Alltech Japan godo kaisha.

び尿をそれぞれ計量した。そして、残餌および糞は、60℃で24時間乾燥させた後、1mmメッシュのウィリーミルで粉碎し、分析サンプルとした。各サンプルのDM、有機物(OM)、粗タンパク質(CP)、粗脂肪(EE)、および非繊維性炭水化物(NFC)は常法⁷⁾により測定した。耐熱性 α -アミラーゼ処理中性デタージェント繊維(aNDFom)はVan Soestら⁸⁾の方法により、デンプンは市販のキット(TOTAL STARCH ASSAY KIT; Megazyme, Wicklow, Ireland)を用いて、それぞれ定量した。乾燥前の糞および尿のCP含量も常法により測定した。

第一胃液および血液は、本期最終日の朝の飼料給与前の9:00と、飼料給与4時間後の13:00に採取した。第一胃液は、経口胃液採取器(NFM90, 富士平工業株式会社, 東京)を用いて採取し、滅菌4重ガーゼでろ過した後、ろ液の一部を用いてHirabayashiら⁹⁾の方法によりLPS濃度を評価した。残りのろ液はチューブに入れ、1,840×g 4℃で10分間遠心し、その上澄みを揮発性脂肪酸(VFA)およびアンモニア態窒素分析に供した。胃液中のVFAは、高速液体クロマトグラフィー(CTO-10, 島津工業株式会社, 京都)を用いてBTBポストラベル法により測定し、胃液中のアンモニア態窒素濃度は、市販のキット(アンモニアテスト, 富士フィルム和光純薬株式会社, 大阪)により定量した。血液は、ヘパリン入り採血管とEDTA入り採血管(Venoject II VP-H100KとVenoject II VP-DK050K, テルモ株式会社, 東京)を用いて採取し、1,840×g 4℃で15分間遠心した。採取した血漿は、各血漿成分分析まで-30℃で保管した。ヘパリン入り採血管で採取した血漿では、総タンパク質(TP)、アルブミン(Alb)、アルブミン/グロブリン比(A/G比)、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)、尿素窒

素(UN)、遊離脂肪酸(NEFA)、および総ケトン体をHITACHI7070(株式会社日立製作所, 東京)を用いて、VAをHPLC L-2130(株式会社日立製作所, 東京)を用いて、それぞれ測定した。EDTA入り採血管で採取した血漿では、LPS結合タンパク質(LBP)、血清アミロイドA(SAA)、およびハプトグロビン(Hp)を市販のキット(HK503 kit; Hycult Biotech, The Netherlands, TP-802; Tri-Delta Diagnostics Inc., USA、およびHAPT-11; Life Diagnostics, Inc., USA)を用いて、それぞれ定量した。

胃液pHの測定には、学術研究用に開発された無線伝送式pHセンサー(YCOW-S; 山形東亜DKK株式会社, 山形)を用いて、10分間隔で連続的に測定した。得られた本期3日間のデータについて、1時間ごとのpHの平均値を算出した。

2.3 統計解析

解析にはSAS MIXEDプロシジャ(JMP[®] 13.2.1; SAS Institute Inc., USA)を用いた。

飼料摂取、飼料消化率、窒素出納、および胃液pHに関する項目は、以下の混合モデルにより解析した。

$$Y_{ijkl} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{ij} + \gamma(\alpha)_{ik} + \delta_l + \varepsilon_{ijkl}$$

Y_{ijkl} : 測定値

μ : 総平均

α_i : 時期*i*の効果(変量効果)

$\beta(\alpha)_{ij}$: 時期*i*における個体*j*の効果(変量効果)

$\gamma(\alpha)_{ik}$: 時期*i*における期間*k*の効果(変量効果)

δ_l : 処理*l*の効果(母数効果)

ε_{ijkl} : 誤差*ijkl*

血液性状、胃液性状、胃液pHの日内変動は、以下の混合モデルにより解析した。

$$Y_{ijklm} = \mu + \alpha_i + \beta(\alpha)_{ij} + \gamma(\alpha)_{ik} + \delta_l + \varepsilon_{ijkl} + k_m + \delta_{klm} + \varepsilon_{2ijklm}$$

Y_{ijklm} : 測定値
 μ : 総平均
 α_i : 時期 i の効果 (変量効果)
 $\beta(\alpha)_{ij}$: 時期 i における個体 j の効果 (変量効果)
 $\gamma(\alpha)_{ik}$: 時期 i における期間 k の効果 (変量効果)
 δ_l : 処理 l の効果 (母数効果)
 ε_{ijkl} : 一次誤差
 k_m : 採取時間 m の効果 (母数効果)
 ε_{2ijklm} : 二次誤差

そして、処理の効果が有意であった場合に、Tukeyの検定により処理区間の差を判定した。 $p < 0.05$ を有意差あり、 $p < 0.10$ を有意傾向ありと

した。

本研究は「産業動物の飼養及び保管に関する基準」(昭和62年10月9日総理府告示第22号)に基づいて実施された。

3. 結果と考察

飼料摂取量、飼料消化率、および窒素出納を **Table 2** に示した。1日当たりのDM摂取量は、飼料間に差はなかった。しかし、代謝体重当たりのDM摂取量およびCP摂取量は、対照飼料給与時に比べて15%KP給与時に有意に少なかった。反芻家畜のDM摂取量は、飼料中のNDF含量に影響を受け、飼料中のNDF割合が30%を超えると、低下する^{1,9)}。さらに、繊維成分の摂取量が増える

Table 2 Effect of feeding kraft pulp on nutrient intake, digestibility, and N metabolism in the Japanese Black fattening steers

Parameter	Treatment			SEM [†]	p-value
	Control	7.5% KP	15% KP		
Feed intake, kg/day					
DM	7.92	7.83	7.54	0.12	NS
Feed intake, g/BW ^{0.75} /day					
DM	70.95	70.44	68.07	1.70	†
CP	9.28 ^a	8.93 ^{ab}	8.44 ^b	0.21	**
aNDFom	18.46 ^c	21.31 ^b	23.51 ^a	0.36	**
Starch	34.35 ^a	30.61 ^b	27.35 ^c	0.86	**
TDN	55.84	54.61	53.37	1.02	NS
Concentrate feed ratio [‡] , %	90.83	90.65	91.42	0.64	NS
aNDFom ratio [§] , %	26.02 ^c	30.26 ^b	34.58 ^a	0.63	**
Digestibility, %					
DM	77.7	76.4	77.3	1.6	NS
OM	79.7	78.4	79.3	1.5	NS
CP	71.6	71.4	72.6	1.9	NS
EE	72.6	72.9	70.1	2.9	NS
aNDFom	63.9	63.4	67.2	1.9	†
NFC	89.8	89.8	90.5	2.4	NS
Starch	97.0	97.0	97.4	1.7	NS
Ratio of N intake, %					
Feces N excretion	28.4	28.6	27.4	1.9	NS
Urine N excretion	26.1 ^b	37.6 ^{ab}	41.7 ^a	4.6	*
N retention	45.5 ^a	33.9 ^{ab}	30.9 ^b	4.4	*

KP, Kraft pulp ; DM, dry matter ; CP, crude protein ; aNDFom, α -amylase treated ash-free neutral detergent fiber ; TDN, total digestible nutrients ; OM, organic matter ; EE, ether extract ; NFC, non-fibrous carbohydrate ; NS, not significant ; †, $p < 0.10$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

[†] Standard error of the mean. [‡] The ratio of concentrate feed to dry matter intake. [§] The ratio of aNDFom to dry matter intake. ^{abc} Means within a row with different superscript letters differ ($p < 0.05$).

と、飼料片の消化管内滞留時間が増加するため、DM摂取量は減少する¹⁰⁾。本研究では飼料中のNDF割合は、対照飼料と15%KPで、それぞれ22.2%と31.9%であり、これがDM摂取量の違いに影響したと考えられた。

飼料消化率では、NDF消化率が対照飼料給与時に比べて15%KP給与時に高い傾向であった。KPはそれ自体が消化性に優れた飼料であるため³⁾、市販の配合飼料摂取時よりも高い消化率を示したものと考えられる。

Table 3に血液性状を示した。血中UN濃度は、KPの配合割合が増加すると高まる傾向が認められた。第一胃液性状を**Fig. 1**に示した。このうち、胃液中アンモニア態窒素濃度はKP給与により有意に増加した。本研究では、KPの配合割合が増えると窒素代謝が変動を示した。一般に飼料中のCPやNPN含量が増加すると、窒素代謝は影響を受け、本研究と同様に尿中窒素含量の増加、血中UN濃度や胃液中アンモニア態窒素濃度の上昇が生じることが確認されている¹¹⁾。このことから、KP飼料へのNPN添加が本研究の結果に影響しているものと考えられる。しかしながら、我々の前回の研究では、尿素添加による窒素代謝への影響は認められていない。結果が一致しなかった原因は不明であるが、本研究と前回の研究では、供試牛の月齢に違いがあり、このことが影響している可能性もある。

本研究では、胃液中の総VFA含量や酢酸／プロピオン酸 (A/P) 比にKP給与の影響は認められなかった (**Fig. 1**)。乳用牛へKPを給与した場合、胃液中のVFA組成は粗飼料多給時と類似することが分かっている⁵⁾。具体的には、胃液中の酢酸割合とA/P比が高まる。我々の前回の研究でも、KP給与後8週目において胃液中のA/P比が高まった⁶⁾。結果が一致しなかった原因として、KP給与期間が本研究と前回研究で差がある点が

あげられ (前回研究vs.今回研究 = 84日間vs.14日間)、KPの給与期間の違いが第一胃内発酵に影響する可能性が示唆された。

Fig. 2に胃液pHの日内変動を示した。本研究では、胃液pHおよび胃液LPS活性値にはKP給与の効果は認められず、乳用牛へ給与した場合⁵⁾と異なる結果であった。黒毛和種の肥育では、濃厚飼料を多給する飼養が一般的であり¹⁾、本研究でも給与飼料の粗濃比は1 : 9と設定している。これに対して、乳用牛を対象としたKP給与に関する報告では、給与飼料の粗濃比は4 : 6程度であった⁵⁾。したがって、濃厚飼料の一部をKPに置き換えても、肥育牛は依然としてデンプンの摂取が多く、胃液pHに対する影響はほとんどなかったものと考えられた。

以上より、濃厚飼料の一部をKPに置き換えることで、黒毛和種肥育牛の飼料消化性へ影響を及ぼすことが示された。しかし、第一胃液性状や胃液pH等の第一胃内発酵に対する影響は、7.5%や15%程度の代替では弱いものであった。この原因として、肥育が進行した肥育中期および後期では、濃厚飼料の給与量がきわめて多いことがあげられる。したがって今後は、濃厚飼料多給の開始時期であり、肥育中期や後期に比べて濃厚飼料の給与量が少ない、肥育前期におけるKP給与の効果を検討する必要がある。

4. 要 約

黒毛和種肥育牛の第一胃内発酵の安定化を目的に、肥育中期の黒毛和種肥育牛へ濃厚飼料のDM当たり7.5%もしくは15%をKPに代替した飼料を給与した。その結果、KPの配合割合を15%まで高めると、DM摂取量が減少することと繊維消化率が向上することが示された。しかし、第一胃液性状、胃液LPS活性値、および胃液pH等の第一胃内発酵に関する項目については、KP給与によ

Table 3 Effect of feeding kraft pulp on blood profiles in the Japanese Black fattening steers

Parameter	Treatment			SEM [†]	p-value
	Control	7.5% KP	15% KP		
TP, g/dl	7.0	6.9	7.1	0.7	NS
Alb, g/dl	3.5	3.5	3.5	0.6	NS
A/G ratio	1.12	1.11	1.08	0.06	NS
T-Cho, mg/dl	130	132	134	17	NS
AST, U/l	91	129	128	39	NS
UN, mg/dl	11.4	13.1	15.2	2.0	†
Glu, mg/dl	77.0	72.2	76.1	6.4	NS
VA, IU/dl	81	79	79	7	NS
LBP, ng/ml	426.1	546.3	489.3	233.0	NS
SAA, μ g/ml	24.19	5.05	10.58	9.60	NS
Hp, μ g/ml	0.79	0.43	0.65	0.25	NS

KP, Kraft pulp ; TP, total protein ; Alb, albumin ; A/G, albumin/globulin ; T-Cho, total cholesterol ; TG, triglycerides ; AST, aspartate transaminase ; UN, urea nitrogen ; Glu, glucose ; Ins, insulin ; NEFA, non-esterified fatty acid ; T-KB, total ketone bodies ; IP, inorganic phosphorus ; Ca, calcium ; VA, vitamin A ; LBP, lipopolysaccharide binding protein ; SAA, serum amyloid A ; Hp, haptoglobin.

[†] Standard error of the mean.

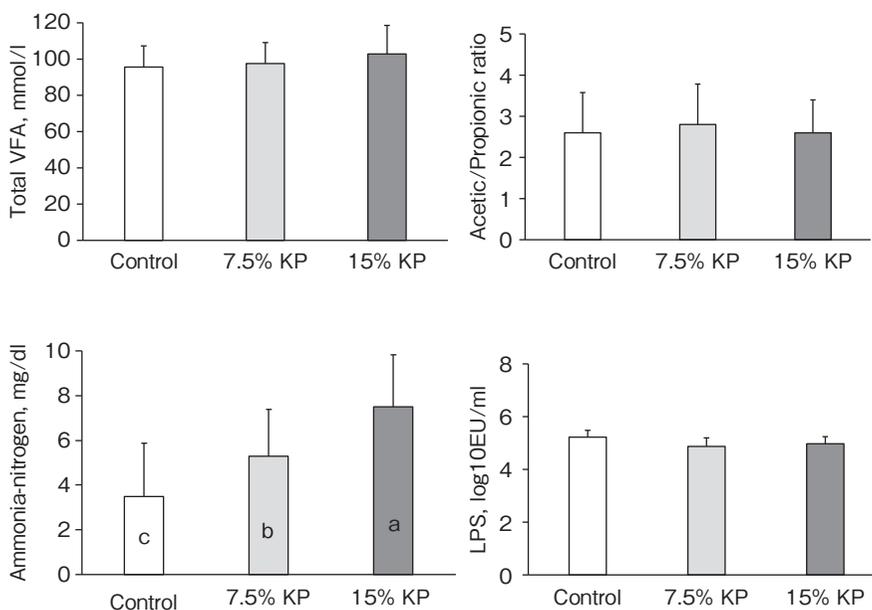


Fig. 1 The rumen fermentation parameters in Japanese Black fattening steer when fed commercial formula feed (control, white square), formula feed containing 7.5% KP on a dry matter (DM) basis (7.5% KP, light gray), and formula feed containing 15% KP on a DM basis (15% KP, dark gray).

^{abc}Means within a row with different superscript letters differ ($p < 0.05$).

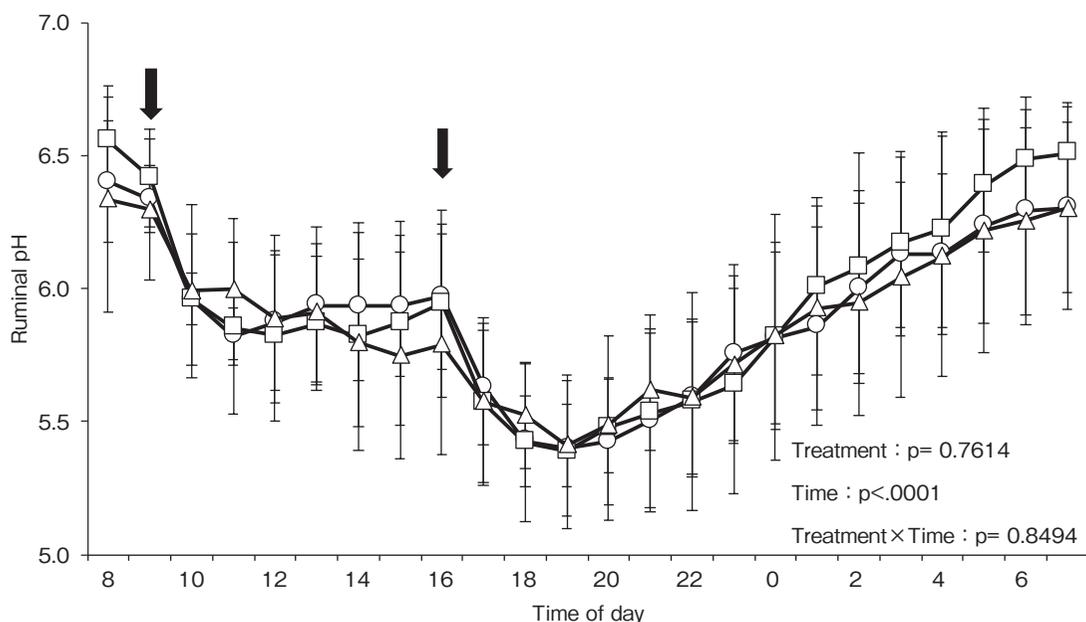


Fig. 2 Diurnal changes in the ruminal pH of Japanese Black fattening steers when fed commercial formula feed (circles), formula feed containing 7.5% KP on a dry matter (DM) basis (7.5% KP) (squares), and formula feed containing 15% KP on a DM basis (15% KP) (triangles). The values are presented as the mean \pm SEM. Arrow : feed time.

る影響はほとんど認められなかった。このことには、肥育が進行した肥育中期および後期では、濃厚飼料の給与量がきわめて多いことが影響している可能性が考えられた。

文 献

- 1) 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 (編) : 日本飼養標準・肉用牛, 2008年度版, 1~234, 中央畜産会, 東京, 2009.
- 2) Owens, F. N., Secrist, D. S., Hill, W. J., Gill, D. R. : *Journal of animal science*, **76**, 275~286, 1998.
- 3) Hada, M., Yashiro, J., Machida, M., Kajikawa, H. : Japanese Patent No.5994964, granted 2 September 2016.
- 4) Izumi, K., Tamura, T., Fujii, R., Nakatsuji, H., Morita, S. : *Animal Science Journal*, **90**, 205~213, 2019.
- 5) Nishimura, K., Kurosu, K., Terada, F., Mizuguchi, H., Sato, S., Kushibiki, S. : *Animal Science Journal*, **90**, 189~195, 2019.
- 6) Maeda, Y., Nishimura, K., Kurosu, K., Mizuguchi, H., Sato, S., Terada, F., Kushibiki, S. : *Animal Science Journal*, **90**, 523~532, 2019.
- 7) 自給飼料利用研究会 (編) : 粗飼料の品質評価ガイドブック 三訂版, 1~196, 日本草地畜産種子協会, 東京, 2009.
- 8) Van Soest, P. J., Robertson, J. B., Lewis, B. A. : *Journal of dairy science*, **74**, 3583~3597, 1991.
- 9) Hirabayashi, H., Kawashima, K., Okimura, T., Tateno, A., Suzuki, A., Asakuma, S., Isobe, N., Obitsu, T., Sugino, T., Kushibiki, S. : *Animal Science Journal*, **88**, 1162~1170, 2017.
- 10) Balch, C. C., Campling, R. C. : *Physiology of digestion in the ruminant*, 108~123. Ames, Iowa : Butterworths, 1965.
- 11) Huntington, G. B. : *British journal of nutrition*, **57**, 109~114, 1987.

耕畜連携を目指した国産トウモロコシ子実の 高品質サイレージ化に向けた調製条件の探索

Exploration of preparation conditions for high-quality silage from domestic corn grain aiming at integration systems between crop and animal production

神 園 巴 美・嶺 野 英 子

(国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター)

Tomomi Kamizono and Eiko Touno

(Tohoku Agricultural Research Center, NARO)

In this study, in order to clarify the effect of different preparation methods on feed composition and fermentation quality of corn grain silage, silage preparations were conducted in which the moisture content, the degree of crushing, and the addition of lactobacillus preparation were combined. Feed composition did not show any significant difference due to the moisture content at the time of harvest, the degree of crushing, and the addition of lactobacillus preparation, and was comparable to those on the market. The moisture content had a large effect on the fermentation quality of corn grain silage. At a moisture content of 37%, it was possible to prepare high-quality silage regardless of the degree of crushing and the addition of lactobacillus preparation if corn grains could be packed at high density. At a moisture content of 29%, it was suggested that high-quality silage could be obtained by combining crushing and the addition of lactobacillus preparation. When the moisture content was 23%, the effect of the addition of the lactobacillus preparation was minor in both uncrushed and crushed cases. Therefore, to obtain high-quality silage at a moisture content of 23%, it was necessary to combine crushing and the addition of lactobacillus preparation with hydration.

1. 目 的

我が国の水田転換畑における飼料用のトウモロコシ子実生産は、国産飼料を用いることによる畜産物の高付加価値化、水田転換畑における省力的輪作作物としての地力維持の観点から注目されている。水田転換畑で収穫されたトウモロコシ子実をはじめとする飼料用穀物は、家畜への給与に当たり、乾燥またはサイレージ（発酵飼料）調製が

行われている。その中でサイレージは、高水分から低水分域の原料でも調製が可能で、乾燥施設や貯蔵施設を必要としないことから、低コストで穀実の飼料化ができる有用な方法である。

近年、国内でも取り組みが始まったトウモロコシ子実サイレージ調製は、乳酸発酵の促進と家畜給与時の消化性向上を目的として、調製時に子実の破碎処理が行われている。しかし、子実の破碎処理には人手や時間がかかるため、米や大豆等の

収穫と競合する繁忙期においては、人員や作業時間の確保が難しい。また、トウモロコシ子実栽培の取り組みが広がっている耕種農家においては、新たに破碎機の導入が必要なため、取り組みへのハードルが高い。そこで、耕種農家でもトウモロコシ子実サイレージ調製が容易に行えるよう、無破碎（丸粒）のままサイレージ化を行い、そのまま家畜に給与したいとの要望がある。しかし、無破碎のままでは子実の水分含量や破碎粒度の違いが影響し、サイレージ調製時の乳酸発酵が十分に進まない場合がある。現在、国内のトウモロコシ子実サイレージの調製においては実用化の研究が先行しており^{1~4)}、調製条件の違いによる飼料成分や発酵品質の変化を精査した研究報告はあまりない。また国外においては、1970年代にトウモロコシ子実サイレージの栄養価の比較がなされているが^{5,6)}、日本とは気候・土壌条件、品種および収穫時期が異なるため、厳密にデータ値を比較することは難しい。このような背景から、生産現

場を意識した科学的根拠に基づくトウモロコシ子実サイレージの最適調製条件の検討が急務となっている。

そこで本研究では、水分含量、破碎程度および乳酸菌製剤の添加の3つに焦点を絞リ、これらを組み合わせた調製方法の違いがトウモロコシ子実サイレージの飼料成分および発酵品質に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。これにより、畜産農家と耕種農家の双方が取り組みやすいトウモロコシ子実サイレージ調製利用技術の開発に資することを目指した。

2. 方法

2.1 サイレージ調製

本研究のサイレージは、食品用の真空パックを利用した小規模サイレージ発酵試験法（パウチ法）⁷⁾で調製した（各区3パウチ）。サイレージ調製の試験概要をFig. 1に示した。水分含量については、目標値として生育ステージの異なる3段階

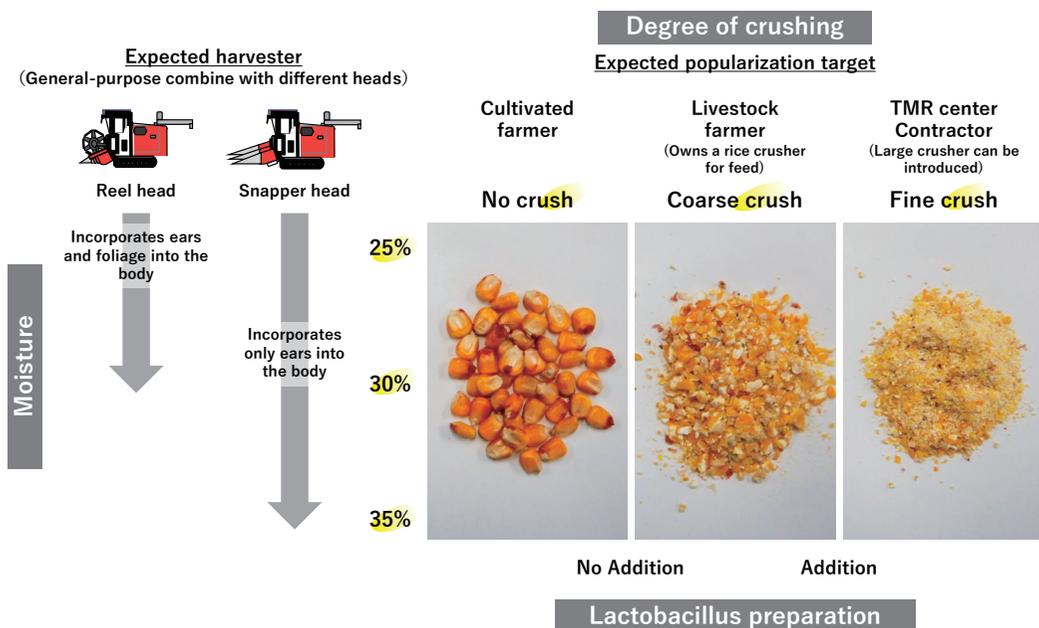


Fig. 1 Experimental design of this study.

の収穫時期（黄熟後期から完熟期にかけて）、すなわち、35%（スナッパヘッド装着汎用コンバインのみ収穫可能：9月中下旬）、30%（リールヘッド、およびスナッパヘッド装着汎用コンバインで収穫可能：10月上旬）、25%（10月下旬に収穫）に設定した。破碎程度については、普及する経営体を想定した3段階、すなわち、無破碎（丸粒；耕種農家）、粗挽き（畜産農家：飼料米用破碎機を保有）、細挽き（TMRセンター、耕畜連携コントラクター：大型破碎機の導入が可能）とした。乳酸菌製剤の添加については、代表的な市販乳酸菌製剤（雪印種苗株式会社）であるサイマスターLP（初期発酵を促進）を使用した。よって、処理数は水分含量が3段階、破碎程度が3段階、乳酸菌添加の有無から、計18（ $3 \times 3 \times 2$ ）となった。また、反復数を3とし、計54サンプルのサイレージを調製した。これらサイレージは20℃の制御環境下で貯蔵し、貯蔵1ヵ月後で開封した。なお、トウモロコシ子実の品種は、SL0746（RM95、雪印種苗株式会社）を使用した。

2.2 飼料成分とサイレージ発酵品質

上記の開封後のサンプルを凍結乾燥し、飼料成分である粗タンパク質（CP）、粗脂肪（EE）、粗灰分（CA）、中性デタージェント繊維（NDFom）、酸性デタージェント繊維（ADFom）の含量を測定した⁷⁾。また、生サンプルを用いて発酵品質、すなわちpH、有機酸含量（乳酸、酢酸、プロピオン酸、n-酪酸）、揮発性塩基態窒素（VBN）を測定し、V-スコア（酢酸、プロピオン酸、酪酸、ならびに総窒素に占めるVBNの割合（VBN/TN）から点数化）⁷⁾により発酵品質を科学的に評価した。

2.3 統計解析

サイレージ発酵品質の統計解析はR version3.6.1を用いて行った。採取したサンプルを反復（ $n = 3$ ）とする三元配置分散分析によっ

て、収穫時期の水分含量、破碎程度および乳酸菌製剤の添加の交互作用の有意差検定を行った。交互作用が $p < 0.001$ の場合は、すべての組み合わせに対してTukey法による多重比較を行った。

3. 結果と考察

3.1 飼料成分含量

本試験でのトウモロコシ子実の水分含量の実測値（目標値）は、収穫時期1回目が37%（35%）、2回目が29%（30%）、3回目が23%（25%）であった。よって、いずれの収穫時期においても、水分含量の目標値をおおむね達成することができた。CP、EE、CA、NDFomおよびADFom含量（乾物当たり）は、収穫時期の水分含量、破碎程度、乳酸菌製剤の添加による著しい違いは現れなかった。なお、それぞれの値の範囲は、CPで10.5-11.4%、EEで3.3-4.4%、CAで1.4-2.2%、NDFomで10.1-13.8%、ADFomで3.4-4.7%を示した。日本飼料成分表（2009年版）⁸⁾に記載されているトウモロコシ子実の成分（乾物当たり）は、CP 8.8%、EE 4.4%、CA 1.4%、NDFom 12.5%、ADFom 3.6%であった。これらと本試験の結果を比較すると、本試験のCP含量がやや高いものの、その他の成分はほぼ同様であった。したがって、本試験のトウモロコシ子実サイレージの飼料成分は、一般に流通しているものと遜色ないことが明らかになった。

3.2 サイレージ発酵品質

収穫時期の水分含量、破碎程度および乳酸菌製剤の添加の交互作用で $p < 0.001$ の測定項目は、pH、乳酸含量、VBN/TNおよびV-スコアであった（Table 1）。まず、pH値の動きを見ると、水分含量が下がることで上昇していき、破碎程度が細かくなり、乳酸菌製剤を添加することで低下した。次に、乳酸含量の値の動きを見ると、水分含量が下がることで低下していき、破碎程度が細か

Table 1 Effects of moisture contents at harvest time, degree of crushing, and addition of lactobacillus preparation on fermentation quality in corn grain silages.

Harvest time	1st		2nd		3rd		ANOVA	p value	M*C*L							
	Targeted value	Measured value	No crush	Fine crush	No crush	Fine crush				No crush	Fine crush					
Moisture (M, %)	35	37	30	29	25	23										
Degree of crushing (C)	No crush	No crush	No crush	No crush	No crush	No crush	No crush	No crush	No crush							
Lactobacillus preparation (L)	No	Addition	No	Addition	No	Addition	No	Addition	No							
pH	5.70 ^d	4.41 ^f	5.30 ^e	3.84 ^{gh}	4.57 ⁱ	3.71 ^h	6.36 ^a	6.32 ^{ab}	6.17 ^b	6.16 ^b	6.23 ^{ab}	5.95 ^c	< 0.001			
Lactic acid (% dry matter)	0.30 ^g	0.82 ^e	0.51 ^f	1.78 ^b	0.94 ^d	2.12 ^a	ND ⁱ	0.01 ^j	0.03 ^{ij}	0.03 ^{ij}	0.14 ^h	ND ⁱ	0.09 ^{hi}	< 0.001		
VBN/TN (%)	1.39 ^{cd}	0.87 ^e	3.58 ^a	1.28 ^d	2.57 ^b	1.45 ^c	0.13 ^{hi}	0.32 ^g	0.39 ^f	0.39 ^f	0.95 ^e	0.18 ^{ghi}	0.28 ^{gh}	0.35 ^f	0.43 ^f	< 0.001
V-Score	100 ^a	100 ^a	98 ^b	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	< 0.001

ND : not detected (< 0.01% dry matter).

Values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.01$).

くなり、乳酸菌製剤を添加することで上昇した。VBN/TNの値の動きについては、水分含量が下がることで低下していき、破碎により上昇した。また、VBN/TNについては、乳酸菌製剤の添加による影響は水分含量で異なり、37%では低下し、29%以下では上昇した。なお、プロピオン酸はすべての調製方法で不検出 (< 0.01% 乾物) であった。n-酪酸は水分含量37%の乳酸菌製剤を添加しない粗挽きと細挽きの2つの調製方法でのみ検出されたが、その値は0.03%以下であった(データ省略)。V-スコアは、すべての調製方法で良(80点以上)⁷⁾と判定された。

本試験のサイレージにおいて、水分含量37%では全体的に発酵が進んでいた。本試験の水分含量37%においては、最も乳酸含量が低い条件の無破碎・乳酸菌製剤の無添加であっても、同じ条件で実規模(実際の農家での利用を想定)の調製⁴⁾を行った結果、pHは4.3まで下がり、乳酸含量は0.8%まで高まった(燈野ら、未発表)。上記の結果の違いは、実規模のほうがトウモロコシ子実をより高密度に充填できたことで、乳酸発酵が促進されたためと推察された。したがって、水分含量37%においては、無破碎であってもトウモロコシ子実を高密度に充填できれば、破碎程度や乳酸菌製剤の添加に左右されずに高品質なサイレージを調製可能と考えられた。また、水分含量29%では、破碎と乳酸菌製剤の添加の処理を組み合わせることで良質なサイレージを得られることが示唆された。さらに、水分含量23%では、無破碎・破碎のいずれにおいても発酵が進んでおらず、乳酸菌製剤の添加の影響も小さかったことから、良質なサイレージを得るためには、破碎と乳酸菌製剤の添加に加えて加水処理も組み合わせることが重要だと考えられた。今後の検討事項としては、水分含量37%と同様に、29%および23%についても実規模でのトウモロコシ子実サイレージの調製を行

い、小規模調製との発酵品質の違いを精査する必要がある。

4. 要 約

本研究は、調製方法の違いがトウモロコシ子実サイレージの飼料成分および発酵品質に及ぼす影響を明らかにするために、収穫時期の水分含量、破碎程度および乳酸菌製剤の添加の3つに焦点を絞り、これらを組み合わせたサイレージの調製試験を行った。飼料成分については、水分含量、破碎程度、乳酸菌製剤の添加による著しい変化はなく、一般に流通しているトウモロコシ子実と遜色はなかった。サイレージ発酵品質については、水分含量による影響が大きかった。水分含量37%においては、トウモロコシ子実を高密度に充填できれば、破碎程度や乳酸菌製剤の添加に左右されずに高品質なサイレージを調製可能と考えられた。また、水分含量29%では、破碎と乳酸菌製剤の添加の処理を組み合わせることで良質なサイレージ

を得られることが示唆された。さらに、水分含量23%では、無破碎・破碎のいずれにおいても発酵が進んでおらず、乳酸菌製剤の添加の影響も小さかったことから、良質なサイレージを得るためには、破碎と乳酸菌製剤の添加に加えて加水処理も組み合わせる必要があると考えられた。

文 献

- 1) 青木康浩, 大下友子, 上田靖子, 根本英子, 青木真理: 日草誌, **62**, 146~151, 2016.
- 2) 大下友子, 根本英子, 青木康浩, 上田靖子, 青木真理: 日草誌, **62**, 140~145, 2016.
- 3) 大下友子, 青木康浩, 根本英子, 上田靖子, 青木真理: 日畜会報, **87**, 125~131, 2016.
- 4) 魚住順, 嶋野英子, 宮路広武, 河本英憲, 出口新, 内野宙: 日草誌, **64**, 180~188, 2018.
- 5) Jones, G. M., Donefer, E., Elliot, J. I.: *Can. J. Anim. Sci.*, **50**, 483~489, 1970.
- 6) Clark, J. H., Frobish, R. A., Harchbarger, K. E., Derrig, R. G.: *J. Dairy Sci.*, **56**, 1531~1539, 1973.
- 7) 自給飼料利用研究会編: 三訂版粗飼料の品質評価ガイドブック, 日本草地畜産種子協会, 東京, 2009.
- 8) 農業・食品産業技術総合研究機構編: 日本標準飼料成分表 (2009年版), 中央畜産会, 東京, 2010.

母子同品種のホルスタイン種および黒毛和種における 分娩直後の母牛，分娩時の臍静脈および出生直後の 子牛のアミノ酸濃度の比較

Comparison of blood amino acid levels in dams immediately after calving,
in the umbilical veins at calving, and in their calves immediately following
birth between Holstein and Japanese Black cattle

川島 千帆¹・草場 信之¹・山岸 則夫²

(¹帯広畜産大学畜産フィールド科学センター，²大阪府立大学大学院生命環境科学研究科獣医学専攻)

Chiho Kawashima¹, Nobuyuki Kusaba¹ and Norio Yamagishi²

(¹Field Center of Animal Science and Agriculture, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine,

²Division of Veterinary Science, Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University)

In general, pregnant Japanese Black cattle receive individual management, whereas dairy cattle receive herd management. However, dairy cattle pregnant with beef breeds receive herd management. Our previous study indicated that the supply of glucose and amino acids from Holstein dams to the beef fetuses (Japanese Black or F1 cross : Holstein×Japanese Black) was lower than that to the Holstein fetuses, although the previous study lacked the information of blood parameters in Japanese Black dams with similar fetal breed. Therefore, the aim of the present study was to investigate the blood glucose, insulin, and amino acid levels in late-pregnant Holstein and Japanese Black dams with similar breed fetuses, umbilical cords, and calves immediately after birth. We investigated blood parameters in 28 late-pregnant Holstein dams and four Japanese Black dams. Samples were obtained from dams 2-3 weeks before calving and immediately after calving, from the umbilical vein at calving, and from calves immediately after birth. From serum glucose and plasma insulin concentrations in dams 2-3 weeks before calving and immediately after calving, Holstein dams had lower insulin sensitivity compared with Japanese Black dams, whereas there were no significant differences of amino acid between both breeds. Japanese Black calves showed lower serum glucose levels than those in Holstein calves ($p < 0.01$). In addition, a similar tendency was observed in umbilical veins. On the other hand, plasma total amino acid, total essential amino acid, and total non-essential amino acid did not differ between Japanese Black and Holstein calves. Overall, it is considered that the amount of glucose transferred from dam to beef fetus was low regardless of the breed of dams. In the case of the Holstein dams pregnant with beef breeds, the amount of amino acid transferred to the fetus was small.

1. 目 的

近年の災害や農家の高齢化により肉用牛農家の

離農が進み、酪農現場では乳牛（特に未経産牛）
に肉用種の受精卵や精液を用いて肉用素牛を生産
することが日常的に行われており，その割合も

年々増加している。日本飼養標準にはその場合の飼育方法の留意点について記されている¹⁾。しかし酪農現場では、乳用未経産牛に肉用種を妊娠させた場合でも乳用種を妊娠させた場合と同じ群飼育による管理が行われている。そのため、個体に合わせて飼育管理されている肉用牛の繁殖農家から得られた場合に比べて、乳用牛から得られる肉用子牛は虚弱や増体不良が問題視されているが、科学的な根拠は明確にされていない。一方、妊娠した肉用種における研究では、妊娠期の母牛の低栄養により胎子の重さは変わらないものの胎盤が重くなること²⁾や、妊娠中期の低タンパク質給餌が出生後の増体を促進させる可能性が報告されている³⁾。

牛における胎子の主要な栄養源はグルコースとアミノ酸である⁴⁾。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感受性が強く関与している^{5~7)}。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、母牛の栄養状態はそれほど重要視されてこなかった。しかし、牛と同様の胎盤構造を持つヒツジでは、母体が低栄養の場合、胎子へのアミノ酸供給が減少することが報告されている⁸⁾。そこで申請者は、以前の本助成事業における研究で、乳用種（ホルスタイン種）または肉用種（黒毛和種または交雑種）を妊娠しているホルスタイン種未経産牛の分娩直後や、分娩時の臍静脈、子牛の血液性状を調査した。その結果、胎子の品種にかかわらず母牛は同程度の血液性状を示したが、分娩時の臍静脈や出生直後の子牛において、肉用種は乳用種に比べて血中グルコース濃度ならびにほとんどのアミノ酸濃度が低かった^{9,10)}。したがって、肉用種の胎子は体重が軽く乳用種に比べてグルコースや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、母子ともに肉用種の場合を比較しておらず、この違いをもたらした要因は不明である。

そこで本試験では、母子の品種が同じ乳用種（ホルスタイン種）と肉用種（黒毛和種）の分娩直後の母牛、分娩時の臍静脈および出生直後の子牛のアミノ酸濃度を中心とした血液性状を比較することとした。

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#20-147）。2020年7月から2021年1月に分娩したホルスタイン種28頭（うち未経産牛14頭）と黒毛和種4頭ならびにその産子を対象とした。ホルスタイン種妊娠牛には、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の1日1回の給与に加えて、乾草を自由摂取とした。黒毛和種妊娠牛は、チモシー主体の放牧地での自由採食に加え、1日2回の配合飼料を個別に給与した。さらに両品種ともに鉱塩と水は自由摂取とした。血液は、母牛では分娩予定2~3週間前と分娩直後の計2回を尾静脈から採取し、分娩時の臍静脈血は娩出直後の臍帯切断前に鉗子でクランプし、子牛側の臍帯を鈍性切断後に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。採取した血液から血中グルコース、インスリンおよび20種類のアミノ酸濃度を測定した。測定したアミノ酸から総アミノ酸、総必須アミノ酸および総非必須アミノ酸をそれぞれ算出して統計解析に用いた。分娩予定2~3週間前のデータにおいて、サンプリング漏れによりホルスタイン種妊娠牛1頭を除外した。臍静脈は、死産や逆子、分娩の見逃し、採取前の臍帯切断により採血できなかった牛を除くとホルスタイン種10頭

および黒毛和種1頭となり、統計解析ができなかったため、参考値としてデータを記載した。データは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

分娩予定2-3週間前の母牛の血中グルコース、インスリンおよびアミノ酸濃度をFig. 1に示した。血中グルコースおよびインスリン濃度はホルスタイン種のほうが黒毛和種より高くなった ($p < 0.05$)。一方、血中アミノ酸濃度は両品種間に差はなかった。

妊娠期間をホルスタイン種280日間、黒毛和種285日間とした場合の分娩予定日とのずれは、ホルスタイン種より (-0.7 ± 0.9 日) 黒毛和種で長くなった (7.5 ± 1.5 日, $p < 0.01$)。また、子牛の

性別の分布は品種間で差はなかったが、出生時体重はホルスタイン種 (43.6 ± 1.0 kg) が黒毛和種より重かった (37.1 ± 1.7 kg, $p < 0.05$)。分娩難易度は両品種間で差がなかった。分娩直後の母牛の血中グルコース、インスリンおよびアミノ酸濃度をFig. 2に示した。血中インスリン濃度はホルスタイン種のほうが黒毛和種より低くなったが ($p < 0.01$)、その他の項目においては両品種間に差はなかった。

血中グルコースやインスリン濃度はエネルギー代謝の指標であり、エネルギー状態が良好な場合は高値を示すが、妊娠末期は胎子の成長や泌乳開始に伴いインスリンの感受性が低くなるため、どちらも濃度が高くなり、特に乳量の多いホルスタイン種では高インスリン血症になりやすい^{5,7)}。加えて、一般的にホルスタイン種のほうが子牛の出生時体重が重いいため、分娩2-3週前の血中グルコースおよびインスリン濃度はホルスタイン種

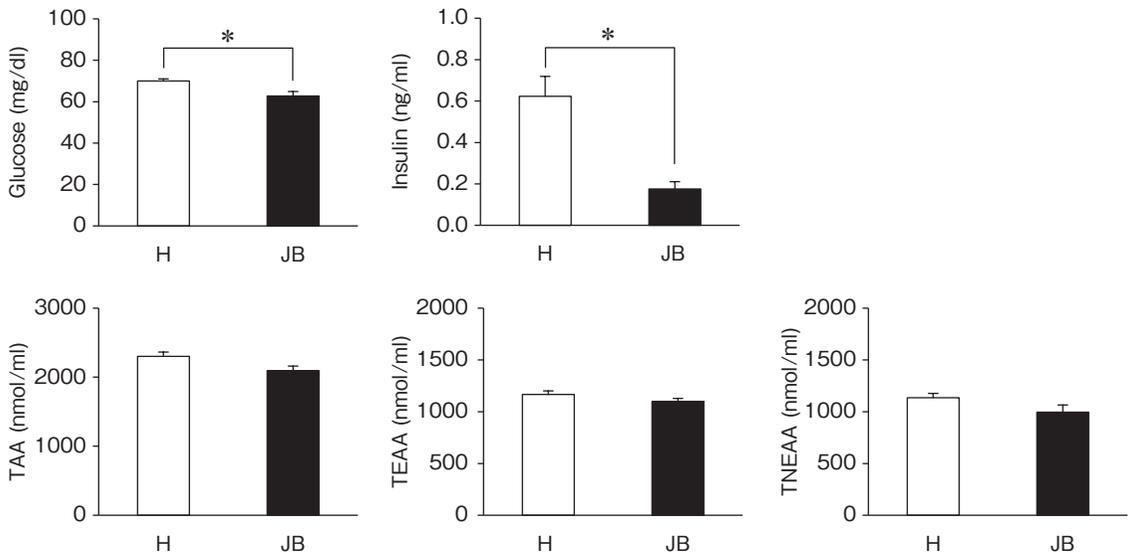


Fig. 1 Blood glucose, insulin and amino acid concentrations 2-3 weeks before expected calving in dams.

Data are presented as the mean \pm SEM.

H: Holstein dams (n=23). JB: Japanese Black dams (n=4)

TAA: Total amino acid, TEAA: Total essential amino acid, TNEAA: Total nonessential amino acid

*: $p < 0.05$

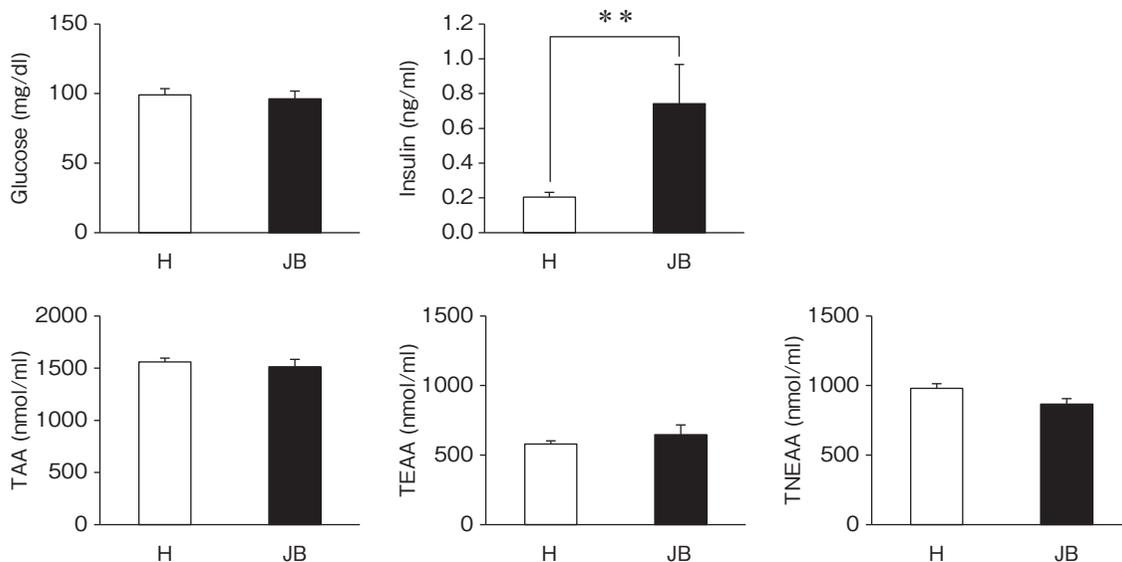


Fig. 2 Blood glucose, insulin and amino acid concentrations after calving in dams.

Data are presented as the mean \pm SEM.

H: Holstein dams (n=24), JB: Japanese Black dams (n=4)

TAA: Total amino acid, TEAA: Total essential amino acid, TNEAA: Total nonessential amino acid

** : $p < 0.01$

のほうが高くなったと考えられる。また、ホルスタイン種の分娩直後の血中インスリン濃度が低くなったのは、乳量の多さに伴うエネルギー状態の低下が反映されたことが推察される。しかし、両品種ともにこの時期の一般的な数値であったと考えられる^{7, 11-13}。

Fig. 3 に出生直後の子牛、Fig. 4 に参考値として分娩時の臍静脈の血中グルコース、インスリンおよびアミノ酸濃度を示した。子牛の血中グルコース濃度はホルスタイン種よりも黒毛和種で低く ($p < 0.01$)、またデータ数が少ないために統計解析できなかったものの臍静脈血にも同様の傾向がみられた。その他の項目においては両品種間に差はなかった。

一般的に、母牛から子牛へのグルコース輸送は促進拡散により行われるため、母体と胎子の濃度差が重要とされている^{4, 14}。しかし、本研究の分娩直後の母牛の血中グルコース濃度に両品種間で

有意差はなかった。以前の研究においても母牛の血中濃度に差がないにもかかわらず、ホルスタイン種から生まれた肉用種子牛 ($52.2 \pm 7.1 \text{ mg/dl}$) はホルスタイン種子牛 ($139.8 \pm 28.6 \text{ mg/dl}$) に比べて血中グルコース濃度が低かった ($p < 0.01$)^{9, 10}。ヒツジにおいて、取り込まれたグルコースの一部は胎盤でフルクトースや乳酸塩に変換される¹⁴。乳用牛では、乳酸塩の変換についてはまだ不明であるが、母牛の血中グルコース濃度が低い場合は、子牛の血中グルコースおよびフルクトース濃度も低くなることが報告されている¹⁵。そのため、黒毛和種子牛を妊娠している母牛から胎子へのグルコース移行が少ない要因を解明するためには、子牛の血中フルクトース濃度もあわせて評価が必要である。一方、以前の研究において、ホルスタイン種から生まれた肉用種子牛はホルスタイン種子牛に比べて血中アミノ酸濃度が低かったが^{9, 10}、本試験では品種間による差はなかった。

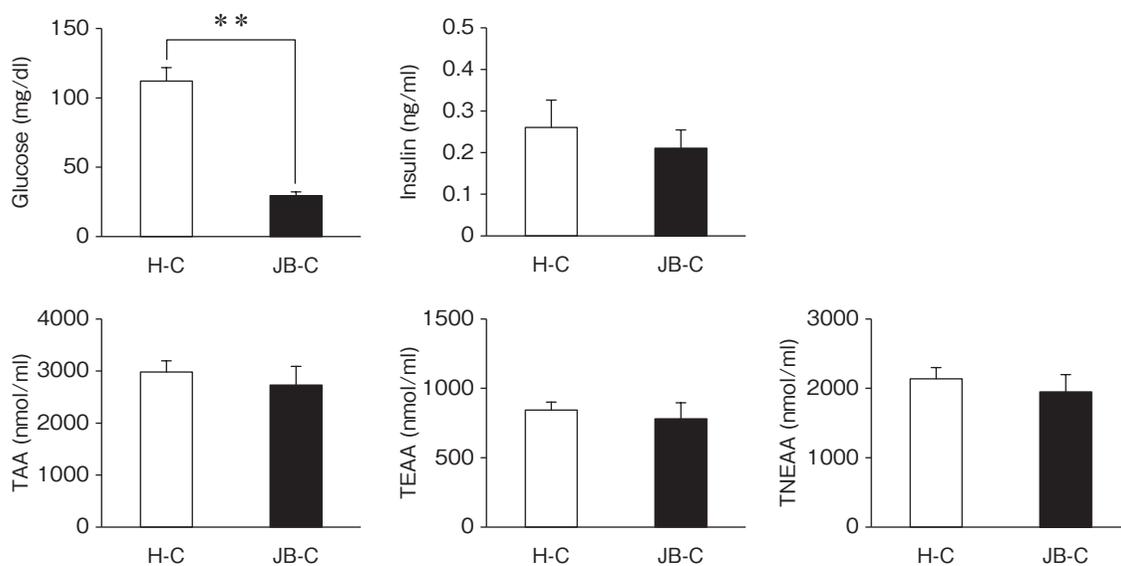


Fig. 3 Blood glucose, insulin and amino acid concentrations after birth in calves.

Data are presented as the mean \pm SEM.

H-C : Holstein calves (n=24), JB-C : Japanese Black calves (n=4)

TAA : Total amino acid, TEAA : Total essential amino acid, TNEAA : Total nonessential amino acid

** : $p < 0.01$

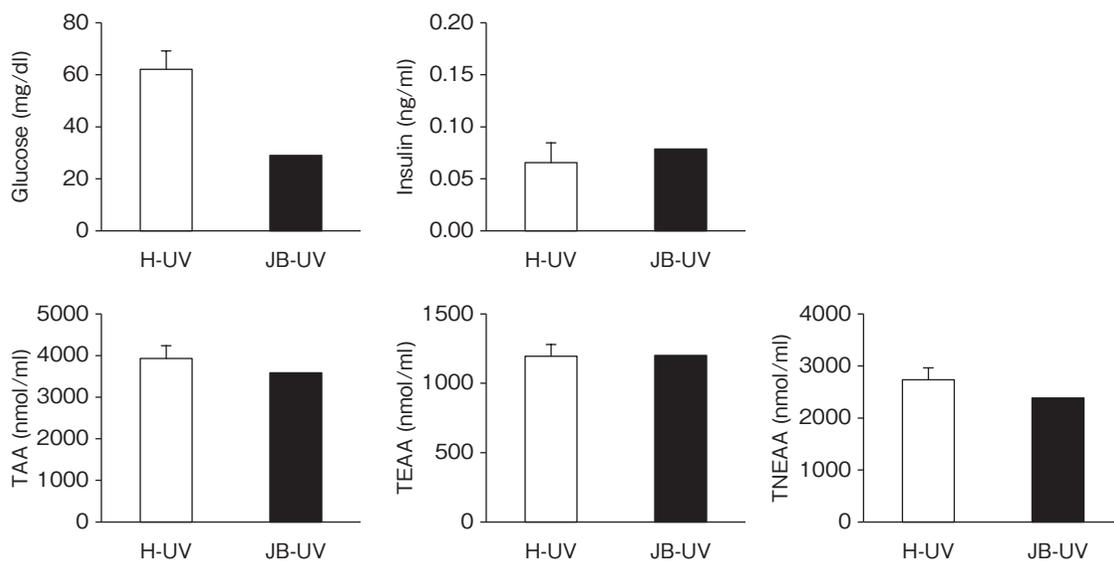


Fig. 4 Blood glucose, insulin and amino acid concentrations at calving in umbilical veins.

Data of H-UV are presented as the mean \pm SEM.

H-UV ; Umbilical veins of Holstein dams (n=10), JB-UV ; Umbilical veins of Japanese Black dams (n=1)

TAA : Total amino acid, TEAA : Total essential amino acid, TNEAA : Total nonessential amino acid

本試験の黒毛和種母子のデータは少なく、さらに妊娠末期の飼料設計が以前の研究と異なるため単純に比較できないが、以前の研究におけるホルスタイン種妊娠のホルスタイン種母牛（未経産）、肉用種妊娠のホルスタイン種母牛、本試験におけるホルスタイン種妊娠のホルスタイン種母牛（未経産）の分娩直後の血中総アミノ酸濃度は、それぞれ $1,898.3 \pm 114.2$ nmol/ml, $1,788.3 \pm 75.8$ nmol/ml, $1,633.3 \pm 69.4$ nmol/mlであり、それらの子牛の血中総アミノ酸濃度はそれぞれ $5,361.7 \pm 576.8$ nmol/ml, $3,133.0 \pm 162.7$ nmol/ml, $3,771.0 \pm 348.8$ nmol/mlであった（以前の研究のホルスタイン種子牛と肉用種子牛間； $p < 0.01$ ）。胎盤におけるアミノ酸移行速度はアミノ酸の種類によって異なり¹⁶⁾、また、アミノ酸は代謝の違いによりケト原性アミノ酸や糖原生アミノ酸等に分類される¹⁷⁾。しかし、これらの特性と品種間で異なったアミノ酸に一貫性はなかったため、本試験では肉用種を妊娠したホルスタイン種においてアミノ酸移行量が減少する理由は明らかにできなかった。そのため、胎盤のアミノ酸移行システムを含めたさらなる研究が必要である。

以上より、先行研究ならびに本研究の結果から、母牛の品種にかかわらず、子牛へのグルコース移行量が少ないことは黒毛和種の特徴であり、またホルスタイン種が黒毛和種を妊娠している場合のみ胎子へのアミノ酸移行量が少ない可能性が考えられた。しかし、本研究では黒毛和種牛の供試頭数が少なかったため、乳用種に肉用種を妊娠させた場合の適切な飼育管理方法を構築するためには、さらにデータ数を増やして検討する必要がある。

4. 要 約

酪農現場では乳牛に肉用種の受精卵や精液を用いて肉用素牛を生産する割合が年々増加している

が、酪農現場では胎子の品種に関係なく一元的な飼育管理が実施されている。申請者は以前、乳用種（ホルスタイン種）または肉用種（黒毛和種または交雑種）を妊娠している乳用未経産牛の分娩直後、分娩時の臍静脈や出生直後の産子の血中代謝物や代謝ホルモン、アミノ酸濃度を調査した。その結果、血中グルコースと多くのアミノ酸濃度が、ホルスタイン種妊娠と比べて肉用種妊娠の臍静脈と肉用種子牛で低かった。しかし、母子ともに肉用種の場合を比較しておらず、この違いの要因は不明である。そこで本試験では、母子の品種が同じ乳用種（ホルスタイン種）と肉用種（黒毛和種）の分娩直後の母牛、分娩時の臍静脈および出生直後の子牛の血液性状を比較することとした。試験は帯広畜産大学畜産フィールド科学センターで2020年7月から2021年1月に分娩したホルスタイン種28頭と黒毛和種4頭ならびにその産子を対象とした。分娩予定日2～3週間前と分娩直後の母牛、分娩時の臍静脈および出生直後（初乳摂取前）の子牛から血液を採取し、血中グルコース、インスリンおよびアミノ酸濃度を測定した。分娩予定日2～3週間前および分娩直後の母牛の血液性状からホルスタイン種のほうが、黒毛和種に比べてインスリン感受性が低いことが考えられたが、血中アミノ酸濃度は同程度であった。分娩時の母牛の血中グルコース濃度は両品種間で差がなかったが、黒毛和種の子牛で低値を示し（ $p < 0.01$ ）、臍静脈血においても同様の傾向が認められた。一方、血中総アミノ酸、総必須アミノ酸および総非必須アミノ酸濃度は、両品種間で差がなかった。先行研究ならびに本研究の結果から、母牛の品種にかかわらず、子牛へのグルコース移行量が少ないことは黒毛和種の特徴であり、またホルスタイン種が黒毛和種を妊娠している場合は、胎子へのアミノ酸移行量が少ない可能性が考えられた。

文 献

- 1) 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.
- 2) Rasby, R. J., Wettemann, R. P., Geisert, R. D., Rice, L. E., Wallace, C. R. : *J. Anim. Sci.*, **68**, 4267～4276, 1990.
- 3) Micke, G. C., Sullivan, T. M., McMillen, I. C., Gentili, S., Perry, V. E. : *Mol. Cell Endocrinol.*, **332**, 234～241, 2011.
- 4) 西田武弘：子牛の科学，31～33，チクサン出版社，東京，2009.
- 5) Hayirli, A. : *Vet. Res. Commun.*, **30**, 749～774, 2006.
- 6) Kawashima, C., Munakata, M., Shimizu, T., Miyamoto, A., Kida, K., Matsui, M. : *J. Vet. Med. Sci.*, **78**, 739～745, 2016.
- 7) Hasegawa, R., Iwase, I., Takagi, T., Kondo, M., Matsui, M., Kawashima, C. : *Anim. Sci. J.*, **90**, 1544～1555, 2019.
- 8) 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.
- 9) 川島千帆，山岸則夫：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，平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，VOL.37, 424～430, 2019.
- 10) Kawashima, C., Kume, S., Yamagishi, N. : *Anim. Sci. J.*, 2021, 92, e13555.
- 11) Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Amaya, Montoya, C., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y-I., Schams, D., Miyamoto, A. : *Reproduction*, **133**, 155～163, 2007.
- 12) Kawashima, C., Kida, K., Matsuhashi, M., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Ishii, M., Miyake, Y-I., Miyamoto, A. : *J. Reprod. Dev.*, **54**, 46～51, 2008.
- 13) 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.
- 14) Bell, A. W., Ehrhardt, R. A. : *Nut. Res. Rev.*, **15**, 211～230, 2002.
- 15) Lucy, M. C., Green, J. C., Meyer, J. P., Williams, A. M., Newsom, E. M., Keisler, D. H. : *J. Dairy Sci.*, **95**, 5095～5101, 2012.
- 16) Paolini, C. L., Meschia, G., Fennessey, P. V., Pike, A. W., Teng, C., Battaglia, F. C., Wilkening, R. B. : *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **280**, E31～39, 2001.
- 17) Meier, S., Mitchell, M. D., Walker, C. G., Roche, J. R., Verkerk, G. A. : *J. Dairy Sci.*, **97**, 1364～1376, 2014.

肉用鶏の成長効率に關与する腸管内Wnt およびその受容体の探索

Search for intestinal Wnt and its receptors involved in the growth
efficiency of broiler chickens

伊 藤 謙

(秋田県立大学生物資源科学部)

Ken Ito

(Faculty of Bioresource Science, Akita Prefectural University)

It is known to be associated with chicken growth and intestinal development. Furthermore, in recent years, studies on chicken embryos have revealed that Wnt signaling pathway-related genes are involved in chicken intestinal development.

However, it has been reported that the gene expression patterns of Wnt and its receptors differ with embryogenesis. Therefore, the gene expression pattern associated with the Wnt signaling pathway in grown chickens is unknown. In the present study, we investigated Wnt signaling pathway-related genes expression in the grown chicken's intestine and searched for genes related to growth efficiency in meat-type chickens (broilers).

First, broilers were used as a model for rapid intestinal development and growth rate, and white Leghorn species were used as control animals to explore the Wnt signaling pathway genes related to chicken growth. As a result, LRP5 and FZD3 in the intestinal tract showed significantly high expression levels in all of the duodenum, jejunum, ileum and rectum of hens. Next, the Pearson correlation coefficient was calculated for the daily weight gain of broilers and the gene expression levels of LRP5 and FZD3, and a significant difference test was performed, but no correlation was found. Not only Wnt, but also EGF, BMP, Notch and Hedgehog signaling pathways are involved in the formation of the intestinal tract. In the future, we will clarify the relationship between other signal pathways and broiler growth.

1. 目 的

農林水産省が令和2年3月に公表した「鶏の改良増殖目標」では、ブロイラー（肉用鶏）の現在の出荷日数である47.1日（令和2年現在）から、10年後に出荷日数が45日となるよう目標数値が掲げられている。また、目標体重である2,970 gに達する日数を2.1日減らすことも目標に掲げられ

ており、遺伝育種の改良、飼養管理の見直しとともに飼料の改良が求められている。

鶏の成長は腸管の発達具合と関連があり、事実、絨毛の発達と成長効率の間に正の相関が認められている¹⁾。また、腸の発達にはWntシグナル伝達が関与しており、特に腸上皮細胞構成にWntシグナル伝達が関わっている²⁾。鶏のWntやWntの受容体であるFrizzled class receptor (FZD)

の遺伝子発現パターンに関する報告は鶏胚を用いたin situ hybridizationによる報告が多い。さらに鶏胚は、発生過程で腸管内の多くのWntおよびFZDの遺伝子発現の消失と出現が起こるため³⁾、成体における明確なWntシグナル伝達経路関連遺伝子の発現パターンは不明である。

そこで本研究では、鶏の腸管におけるWntシグナル伝達経路に関与する遺伝子発現のパターンを調査するとともに、肉用鶏の成長に関与する遺伝子を見出すことを目的とした。

本研究の目的を達成するため、腸管の発達が著しいモデルとして肉用鶏（ブロイラー）を、通常の成長と腸管発達を行うモデル動物として採卵鶏（単冠白色レグホン種）を用いた。

2. 方 法

2.1 採卵鶏と肉用鶏の比較

単冠白色レグホンおよびブロイラー（チャンキー種）の有精卵を孵卵機を用いて37.6℃で21日間孵卵した。孵化後、育雛器内で初雛を2週間平飼いした。飼料および水は自由摂取とし、給与飼料は市販幼雛用飼料（パワーチェックZK前期、JA全農北日本くみあい飼料株式会社）を用いた。飼養期間終了後、幼雛から十二指腸、空腸、回腸および直結腸を採取した後、total RNAを抽出し、RT-qPCRを行った。本研究では、Wntシグナル伝達経路におけるリガンドであるWnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt8a, Wnt8b, Wnt9a, Wnt9b, Wnt10a, Wnt11, Wnt11b, Wnt13, Wnt16とその受容体であるFZD1, FZD2, FZD3, FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5), LRP6, Receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 1 (ROR1) およびROR2の計34遺伝子をターゲットとしたプライマーを設計

した。

2.2 肉用鶏の成長成績とWntシグナル関連遺伝子の相関の有無

ブロイラー（チャンキー種）の有精卵を孵卵機を用いて37.6℃で21日間孵卵し、孵化した初雛40羽の体重を測定後、育雛器内で平飼いした。飼料および水は自由摂取とし、飼料は市販幼雛用飼料（パワーチェックZK前期、JA全農北日本くみあい飼料株式会社）を用いた。飼養期間終了後、ランダムに幼雛を30羽選抜し、体重を測定した。体重測定後、十二指腸、空腸、回腸および直結腸を採取し、total RNAを抽出した。2.1で有意差の認められた遺伝子をターゲットとしてRT-qPCRを行った後、半定量化した遺伝子発現量とブロイラーの成長効率に対して無相関検定を行い、相関が認められるか統計解析を行った。本研究は秋田県立大学動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：21-03）。

2.3 統計解析

統計処理ソフト『R』および統合開発環境（IDE）『RStudio』を用いて一般線形モデル（GLM）による統計解析を行った。パッケージはStatsを使用し、鶏種を説明変数とし、各mRNA発現量を目的変数とした。分布はGaussian分布を指定し、リンク関数はIdentityを選択した。モデルの適合度合いはAIC（Akaike's information criterion）により判断した。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ をそれぞれ有意差とした。

無相関検定はStasパッケージのcor.test関数を使用し、ピアソンの積率相関係数の無相関検定を行い、 $*p < 0.05$ を有意差とした。

3. 結果と考察

鶏の腸管で発現が認められた遺伝子はWnt1, Wnt2, Wnt2b, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt9a, Wnt11b, FZD1, FZD2, FZD3,

FZD4, FZD5, FZD6, FZD7, FZD8, FZD9, FZD10, LRP5, LRP6, ROR1およびROR2の計24遺伝子であった。上記の遺伝子の中でも、十二指腸、空腸、回腸および直結腸にすべてに共通して有意に遺伝子発現量に変化が認められた遺伝子はFZD3およびLRP5であった。Fig. 1に示したように、FZD3およびLRP5はブロイラーよりも単冠白色レグホン種で有意に高い発現量を示した。

以上の結果から、FZD3およびLRP5が鶏の成長効率に関与する遺伝子であると予想し、次にLRP5およびFZD3とブロイラーの成長効率の間に相関が認められるか調査した。ブロイラーの日増体量 (g/日) とLRP5およびFZD3とブロイ

ラーの成長効率における無相関検定を行ったが、Table 1に示したとおり、相関は認められなかった。さらに、浅胸肉、深胸肉および腿肉重量と無相関検定を行ったが、日増体量と同様相関は認められなかった。

LRP5はFZD受容体の共役受容体の役割を果たし、リガンドと結合することでWntシグナル伝達経路の1つである β -カテニン経路(古典的経路)を活性化する。 β -カテニン経路の活性化は腸陰窩における細胞増殖や分化に関与し、マウスの腸の発達に関与していることが報告されている⁴⁾。FZD3はWntの受容体として働き、非古典的経路であるPlanar cell polarity (PCP) 経路に関与す

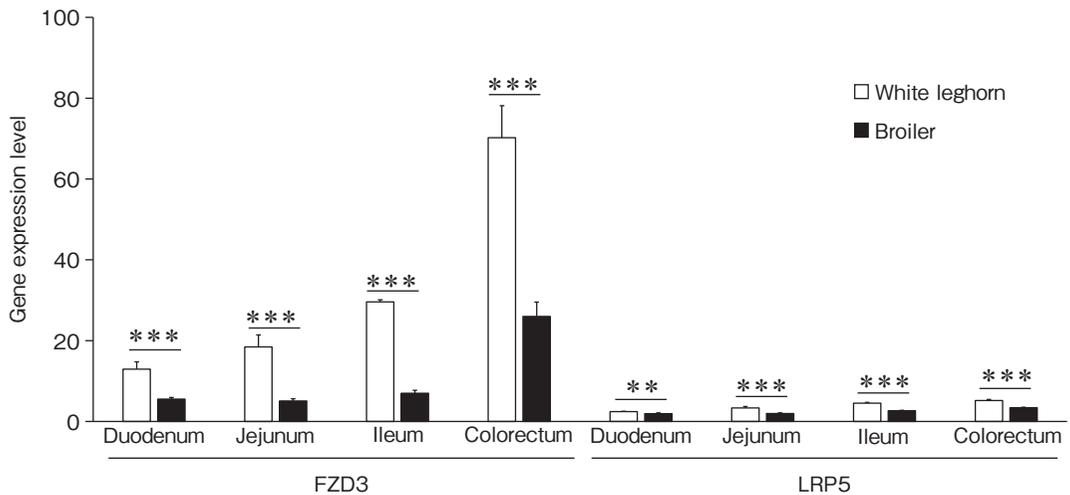


Fig. 1 Comparison of gene expression levels of Wnt related genes in white leghorns and broilers.

Data are expressed as mean \pm SEM (n=8). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Table 1 Correlation between Wnt receptor gene expression level, broiler growth efficiency, and skeletal muscle weight (n=30).

	Gene expression of LRP5				Gene expression of FZD3			
	Duodenum	Jejunum	Ileum	Colorectum	Duodenum	Jejunum	Ileum	Colorectum
Body weight gain, g/day	-0.181	-0.225	-0.115	-0.131	-0.030	0.030	-0.151	-0.009
Breast	-0.051	-0.071	-0.003	-0.071	0.151	0.044	-0.002	0.013
Tender	-0.014	-0.110	-0.161	-0.015	-0.017	-0.094	-0.137	-0.149
Thigh	-0.019	-0.005	0.122	-0.142	0.094	0.023	0.007	-0.027

* $p < 0.05$

る受容体である⁵⁾。しかし、LRP5およびFZD3の双方とも鶏の腸管における生理的機能に関する報告はないため、今後の調査課題である。

腸管の形成に関与するシグナル伝達経路はWntだけではなく、EGF (Epidermal growth factor), BMP (Bone morphogenetic protein), Notch およびHedgehogシグナル伝達経路の関与が明らかとなっている⁶⁾。Wnt, NotchおよびEGFシグナルは腸陰窩で高発現しており、腸幹細胞の増殖・維持に関与している。これに対して、HedgehogおよびBMPシグナルは腸絨毛で高発現することで腸細胞の分化に寄与している。Wntシグナル伝達経路関連遺伝子と成長鶏の腸管発達はWntシグナル伝達経路活性ではなく、分化に関与するHedgehogおよびBMPシグナル伝達の関与の可能性があるため、次の課題として、HedgehogおよびBMPシグナルと肉用鶏の成長との関連について調査する必要がある。

4. 要 約

鶏の成長と腸管の発達に関連があることが知られている。さらに近年、鶏の腸管発達にWntシグナル伝達経路に関連する遺伝子が関与していることが鶏胚の研究から明らかとなっている。しかし、胚の発生に伴いWntおよびその受容体の遺伝子発現様式も異なることが報告されており、成体におけるWntシグナル伝達経路に関連する遺伝子発現の様式は不明である。そこで、本研究では、鶏腸管におけるWntシグナル伝達経路関連遺伝子の遺伝子発現を調査するとともに、肉用鶏（プロ

イラー）における成長効率に関与する遺伝子の探索を行った。まず、成長と腸管発達の著しいプロイラーと対照区として採卵鶏（単冠白色レグホン種）を用意し、Wntシグナル伝達経路関連遺伝子の遺伝子発現量を比較することで、成長に関与するWntシグナル伝達経路関連遺伝子の探索を行った。その結果、腸管内におけるLRP5およびFZD3が採卵鶏の腸管で有意に高い発現量を示した。そこで、プロイラーの日増体量とLRP5およびFZD3の遺伝子発現量に対して無相関検定を行ったところ、LRP5およびFZD3の双方とも相関が認められなかったため、Wntシグナル伝達経路に関与する遺伝子と肉用鶏の成長に直接的な関与がないことが明らかとなった。

文 献

- 1) Smith, W. M., Mitchell, A. M., Peacock, A. M. : Effects of genetic selection on growth rate and intestinal structure in the domestic fowl (*Gallus domesticus*), *Comparative Biochemistry and Physiology*, **97A**, 57~63, 1990.
- 2) Czerwinski, M., Shroyer, F. N., Spence, R. J. : Physiology of the Gastrointestinal Tract, Sixth Edition, Page185-196, *Academic Press*, USA, 2018.
- 3) McBride, J. H., Fatke, B., Fraser, E. S. : Wnt signaling components in the chicken intestinal tract, *Developmental Biology*, **256**, 18~33, 2003.
- 4) MacDonald, B. T., He, X. : Frizzled and LRP5/6 receptors for Wnt/ β -catenin signaling, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **4**, a007880, 2012.
- 5) Corda, G., Sala, A. : Non-canonical WNT/PCP signaling in cancer : Fzd6 takes centre stage, *Oncogenesis*, **6**, e364, 2017.
- 6) Baulies, A., Angelis, N., Li, S. W. V. : Hallmarks of intestinal stem cells, *Development*, **147**, dev182675 doi : 10.1242/dev.182675, 2020.

ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した 採食可能量の予測モデルの開発（Ⅱ）

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

谷川 珠子¹・田中 常喜²

(¹地方独立行政法人北海道立総合研究機構酪農試験場, ²地方独立行政法人北海道立総合研究機構畜産試験場)

Tamako Tanigawa¹ and Tsuneki Tanaka²

(¹Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Dairy Research Center,

²Local Independent Administrative Agency, Hokkaido Research Organization Animal Research Center)

This study demonstrated prediction of dry matter intake (DMI) of total mixed rations (TMR) based on dynamics simulation of neutral detergent fiber (NDF) remain in the rumen. Parameter tuning for passage rate of the model, which was developed in previous study, was carried by the Bayesian optimization. The parameter tuning resulted in stationarity of NDF pool size in case of change of TMR. The simulation based on the optimized parameters showed that NDF remain related to traits of dairy cattle such as metabolic body weight, parity, and days in milk (DIM). In addition, the simulation showed a plausible periodicity in a day and DIM. Predictions of DMI per day, where predictions were performed using test data of rearing by sixteen TMR menu with eight dairy cattle, resulted in low accuracy (RMSE=3.3 and $r = -0.01$). In addition, uniform parameter tuning for intake frequency in the simulation and NDF pool size did not relate to prediction accuracy, despite increase/decrease of prediction value itself. This study suggested model extensions with a seasonal periodicity, or escape from the passage due to ruminal mat formation and rumen fermentation. Further studies would be required to improve accuracy of prediction model of DMI.

1. 目 的

飼料の採食量は、反芻家畜の乳肉の生産性に最も影響し、採食量を高めることは生産性向上に重要である。反芻家畜の採食量は、飼料の種類、成分、物理的特性、消化管内での消化速度および通過速度などの飼料側、体重、体型、乳量、乳期および妊娠などの動物側、設備や給与回数などの環境といった多くの要因に影響される。特に飼料側の要因のうち、粗飼料由来の繊維の特性は、採食

量に強く影響する要因であることが知られている。これまでの試みの多くは、生産性レベルや給与飼料中の粗飼料割合などが一定の条件下において採食量の予測が検討されてきた。それにより、採食量に影響する要因は整理されたが、さまざまな条件下での採食量の予測に向けた、多くの要因を含む体系的なモデルの構築には至っていない。

ルーメン内の許容量の把握は、ルーメン内の物理的な膨満に制限される採食量の予測や、ルーメン性状の解析に、有益な情報となり得る。前課題

で、採食と、消化および下部消化管への通過による時間経過に伴ったルーメン（第一胃）内の繊維（NDF）の動態に着目し、採食量を予測するために、モデルの骨格となるフレームワークを構築した。その計算結果では、TMR設計が切り替わる搾乳日数150日前後を境に、ルーメン内に滞留するNDF量（ルーメン内NDF滞留量）の増加が確認され、弱定常性が担保できなかった。そこで本課題では、本モデルのパラメータの最適化を試みた。具体的には、(i) ルーメン内滞留量の弱定常性に着目したルーメンから下部消化管への通過に関連するパラメータ最適化、(ii) モデルのフレームワーク構築に使用したデータと異なる検証用データの取得、(iii) パラメータ最適化後の日単位の採食量を予測精度の変化と、パラメータの再調整による予測精度への影響を検証した。

2. 方 法

モデルの骨格となるフレームワークの構築は、北海道立総合研究機構酪農試験場（北海道中標津町）において、フリーストールで2群管理（泌乳前期、泌乳中・後期）されたホルスタイン種泌乳牛群の飼養データを用いた（谷川 & 田中, 2020）¹⁾。2018年3月1日～2019年6月30日にかけて、個体別に、リアルタイムで自動記録された採食量を解析対象とし、全126頭中、治療歴が少なく、フリーストールでの滞在が連続した32頭を抽出し、ルーメン内NDF滞留量のモデル構築の基礎データとした。データ解析は、Python 3の各種パッケージを用いた。

2.1 ルーメン内に滞留する繊維（NDF）量の弱定常性に着目したパラメータ最適化

モデル構築の基礎データのうち、搾乳日数100～200日のデータを抽出した。その結果、対象となる牛が32頭中24頭となった。さらに、特にルーメン内NDF滞留量で弱定常性が担保できていな

い（搾乳日数150日前後で増加が確認される）牛を10頭選定し、最適化に用いるトレーニングデータとし、残りを確認用のデータとした。

設定するパラメータは、ルーメンからの通過に関するパラメータのうち、粗飼料の通過速度の関数の係数、通過速度を算出する変数となる摂取量を遡及する時間とした。粗飼料の通過速度（%/hr）は、Krizsan *et al.* (2010)²⁾の推定式を初期値とした： $kp = 1.19 + 0.0879 \times \text{NDFI} + 0.792 \times \text{c-NDFI}/\text{NDFI} + 1.21 \times \text{iNDFI}/\text{NDFI}$ 、ここで、NDFI；体重（BW）当たりのNDF摂取量（ $\text{g day}^{-1}/\text{kg of BW}$ ）、c-NDFI；体重当たりの濃厚飼料由来NDF摂取量（ $\text{g day}^{-1} \text{BWkg}^{-1}$ ）、iNDFI；体重当たりの不消化NDF摂取量（ $\text{g day}^{-1} \text{BWkg}^{-1}$ ）。通過速度を算出するための摂取量の初期値は、直近6hr以内の採食量を合計した。ルーメン内NDF滞留量は、60分間隔で計算し、その値を移動平均法により平滑化（Window size = 2day 1hr）後、個体内分散の平均値の逆数を最大化するスコアとし、最適化を行った。その他の設定は、前課題と同一である。パラメータ最適化は、BayesianOptimizationパッケージを用いた。

2.2 日単位の採食量の予測に向けた精度検証用のデータ取得

北海道立総合研究機構酪農試験場、酪農学園大学（北海道江別市）およびホクレン訓子府実証農場（北海道常呂郡訓子府町）において調査された飼養データを収集し、粗飼料の成分分析と合わせて、精度検証用のデータとした。北海道立総合研究機構酪農試験場では、8種類の牧草サイレージについて、2通り（高NDF設計区、低NDF設計区）のTMR設計を行い、タイストールで飼養された8頭（反転法、2期）の摂取量が調査されている。酪農学園大では、牧草サイレージとトウモロコシサイレージを用いてTMR設計し、フリーストールで飼養された1群17頭について、群全体

の摂取量が調査されている。ホクレン訓子府実証農場では、牧草サイレージとトウモロコシサイレージを用いてTMR設計し、タイストールで飼養された10頭の55日間分の摂取量が調査されている。

2.3 日単位の採食量の予測とパラメータの再調整による変化

パラメータ最適化後、モデル構築の基礎データについて、ルーメン内NDF滞留量を6分間隔で再計算し、搾乳日数350日以前のデータを抽出した。その後、前課題と同様に、代謝体重 (kg^{0.75}), 産次 (初産, 2産, 3産以降), 搾乳日数 (day), 朝の飼料給与からの経過時間 (AM 9:26からの経過時間, min) を説明変数としたルーメン内NDF滞留量の線形加法モデルを、pyGAMパッケージにより作成した。

日当たりのTMRの乾物摂取量の予測は、規定したルーメン内NDF滞留量に達するように30分間隔で採食するシミュレーションを行い、日当たりのTMRの乾物摂取量 (kg day⁻¹) の測定値と比較した。加えて、採食頻度やルーメン内NDF滞留量を変化させた場合の予測値と測定値の関係の変化を検討した。

3. 結果と考察

3.1 ルーメンから下部消化管への通過速度に関するパラメータの最適化後の変化

前課題で設定したパラメータの最適化前後の値をTable 1に示した。パラメータ最適化によって、定数項を除き、各係数は高くなり、通過速度が速くなる方向へ修正された。通過速度を算出する変数となる摂取量を遡及する時間は、約8.5hrと長くなった。Cabezas-Garcia *et al.* (2018)³⁾ と Kammes & Allen (2012)⁴⁾ が調査したiNDFの通過速度の測定値と比較すると、本試験で算出した通過速度は、測定値よりも約2倍高かったが、測定値との相関は $r = 0.84$ とNRC2001の推定式 ($r = -0.40$) やCNCPS ($r = -0.41$) よりも高かった (Table 2)。既報の推定式は日単位の通過速度であるのに対して、本課題ではリアルタイムで変化する通過速度の推定をしていることが一因であると考えられた。加えて、Cabezas-Garcia *et al.* (2018)³⁾ と Kammes & Allen (2012)⁴⁾ は、潜在的な消化可能なNDF (pdNDF) と不消化NDF (iNDF) で通過速度や平均滞留時間が異なるという結果を報告している。しかしながら、本試験で構築したモデルでは、一律の通過ラグタイムの設定にとどまっている。ルーメンマット層の

Table 1 Change of coefficients for passage ratio (%/hr) by parameter tuning based on the Bayesian optimization

Model	Score*	Passage rate (kp) equation for roughage †				Rolling time (min) ‡
		fkp_a	fkp_b	fkp_c	fkp_d	
Initial	0.886	1.190	0.0879	0.792	1.210	360
Before optimization	5.884	0.821	0.2981	2.796	4.731	606

*Score is calculated by reciprocal number of averaged variance within cow for NDF pool size (NDFkg), large value of the score means stationarity for NDF pool size in the rumen between 100-200 days in milk.

† $kp = fkp_a + fkp_b \times NDFI + fkp_c \times CProp(NDF) + fkp_d \times iNDF : NDF$, where NDFI is NDF intake per body weight (g day⁻¹ BWkg⁻¹) for a rolling time, and CProp (NDF) is a proportion of concentrates on a NDF basis, and iNDF : NDF is ratio between diet iNDF and NDF concentrations, respectively.

‡ Rolling time for NDFI, CProp (NDF) and iNDF : NDF in kp equation.

Table 2 Passage ratio (kp, %/hr) by best equation on the Bayesian optimization*, NRC2001 equation †, or CNCPS equation ‡

Trial	Observed kp (%/hr)	Estimated kp (%/hr)			Reference
		Best models	NRC2001	CNCPS	
1L	3.54	6.65	4.92	4.51	Cabezas-Garcia <i>et al.</i> , 2018 ³⁾
1LE	3.37	6.45	4.82	4.40	"
1EL	3.51	6.45	4.82	4.40	"
1E	2.94	6.28	4.74	4.29	"
2AL	3.27	6.84	5.38	4.97	Kammes & Allen, 2012 ⁴⁾
2OG	2.52	5.73	5.29	4.91	"

* $k_p = 0.821 + 0.2981 \text{ NDFI} + 2.796 \text{ CProp (NDF)} + 4.731 \text{ iNDF} : \text{NDF}$, where NDFI is NDF intake per body weight ($\text{g day}^{-1} \text{ BWkg}^{-1}$), CProp (NDF) is proportion of concentrates on a NDF basis, and iNDF : NDF is ratio between iNDF and NDF concentrations, respectively.

† $k_p = 3.054 + 0.614 \text{ DMI}$, where DMI is dry matter intake (% of BW) (NRC, 2001)⁵⁾.

‡ $k_p = 2.365 + 0.0214 \text{ FpBW} + 0.0734 \text{ CpBW} + 0.069 \text{ FDMI}$, where FpBW is forage dry matter intake per body weight ($\text{g day}^{-1} \text{ BWkg}^{-1}$), CpBW is concentrate dry matter intake per body weight ($\text{g day}^{-1} \text{ BWkg}^{-1}$), and FDMI is forage dry matter intake (kg day^{-1}), respectively (Fox *et al.*, 2004)⁶⁾.

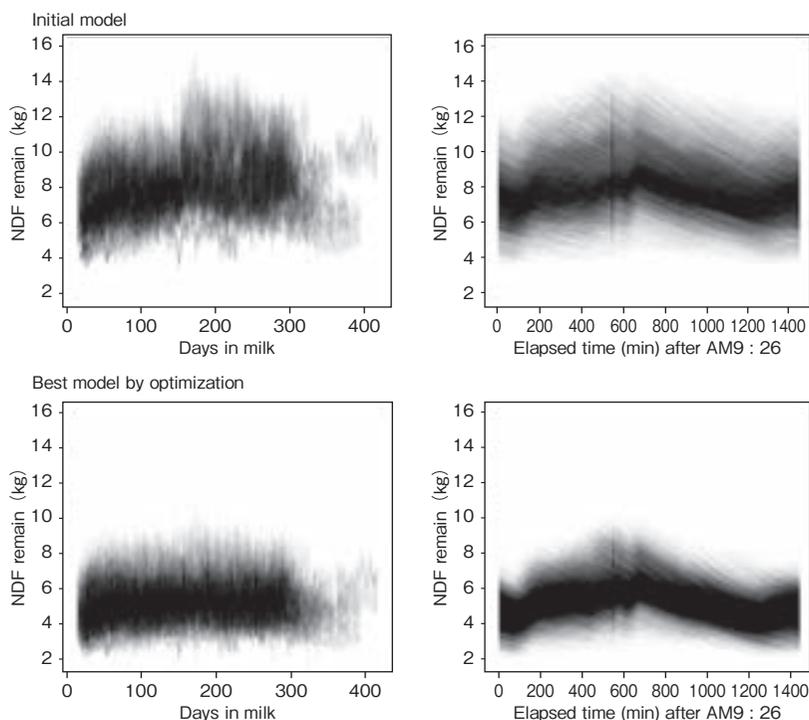


Fig.1 Relationship between neutral detergent fiber (NDF) remain (kg) in the rumen by dynamic simulation based on a real-time total mixed rations (TMR) intake data and days in milk (left), or elapsed time after AM9 : 26 (right). The simulation carried on initial parameter (upper) and optimized parameter shown in Table1 (bottom). The real-time TMR intake data were collected from thirty-two dairy cattle reared in free-stall during March, 2018-June, 2019, at Nakashibetsu, Hokkaido. The dynamic simulation was carried on the assumption of the follow digested and passaged NDF model with a 6-min pitch : $\text{NDF remain} = \text{pdNDF} \times e^{-kd(t-Ld)} + \text{pdNDF} \times e^{-kp(t-Lp)} + \text{iNDF} \times e^{-kp(t-Lp)}$ ($t > Ld$ and $t > Lp$), where NDF remain is NDF (kg) in the rumen after t hours after an intake, pdNDF is potential digestible NDF (kg), iNDF is indigestible NDF (kg), kd is digestion rates (/hr), Ld is lag time (hr) of degradation, kp is passage rates (/hr), Lp is lag time (hr) of passage. NDF were analyzed with thermostable α -amylase and ash correction without sodium sulfite.

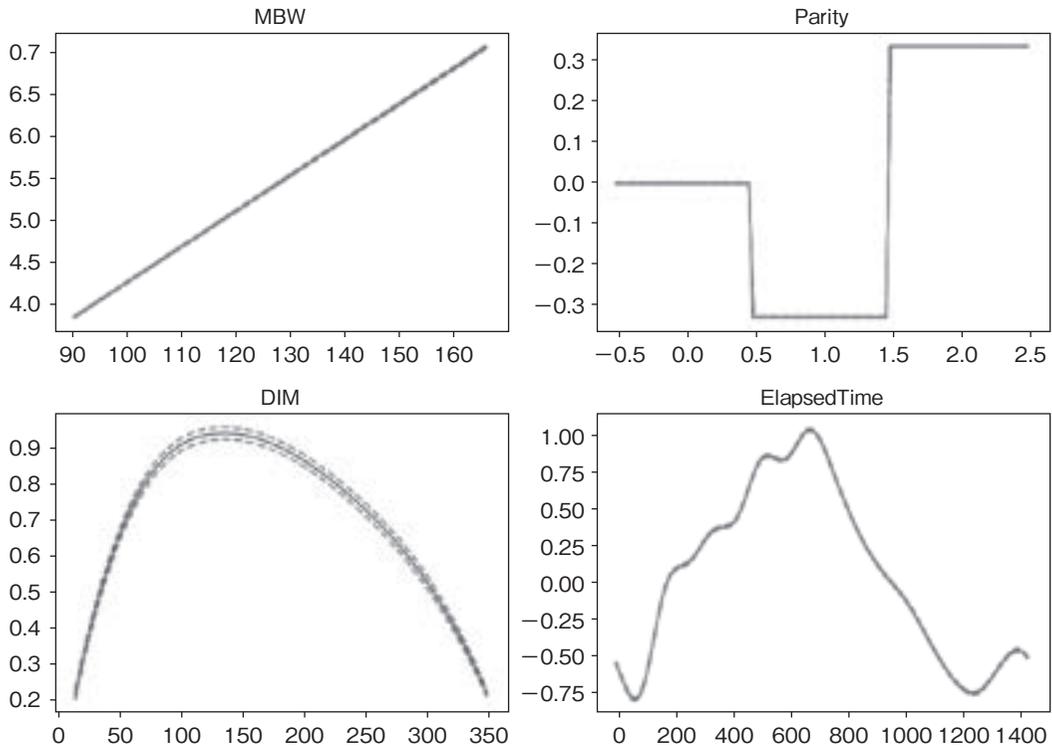


Fig. 2 Coefficient values of parameters in linear additive model for predicting neutral detergent fiber remain (kg) in the rumen before the Bayesian optimization. The model includes metabolic body weight ($\text{kg}^{0.75}$, MBW), parity (first [=1], second [=2] and over third [=0]), days in milk (day, DIM), and elapsed time after AM9:26 (min, ElapsedTime). The solid and dashed lines show coefficient values (kg), and confidence intervals at the 0.95-level, respectively.

形成消化に伴ったVFA発生による浮力による通過からのエスケープについて、モデル拡張の余地があると考えられる。

最適化後のパラメータでルーメン内のNDF滞留量を再計算した結果 (Fig. 1), 最適化前に比べて大きく減少した。また、個体間差や日内変動が確認され、その範囲は3~8 (kg) であった。日内のピークに相当する値は、泉ら (2008)⁷⁾ の報告 (7.2~8.8kg) やKononoff & Heinrichs (2003)⁸⁾ の報告 (7.8~8.2kg) とおおむね一致した。パラメータ最適化後のルーメン内NDF滞留量のモデル (Fig. 2) は、代謝体重と産次の効果や、朝の給餌600~700分後に日内ピークがある曲線となる日内変動が、最適化前のモデルと同様に確認でき

た。前課題で問題点として指摘された搾乳日数との関係は、分娩直後のNDF滞留量は小さく、搾乳日数100日をピークとする緩やかな曲線となり、一般に言われる乾物摂取量の推移と同様の傾向となった。

3.2 精度検証用データと給与粗飼料のNDF消化特性

収集した精度検証用データの乾物摂取量は、20.0~25.3 ($\text{DMkg day}^{-1} \text{cow}^{-1}$) と、体重に対して2.9~3.8%の摂取量であった。酪農学園大学およびホクレン訓子府実証農場でのデータは、各1例の収集にとどまったため、以降の解析は、酪農試験場でのデータを中心に実施した。

各試験で給与したTMR中の粗飼料割合は42~

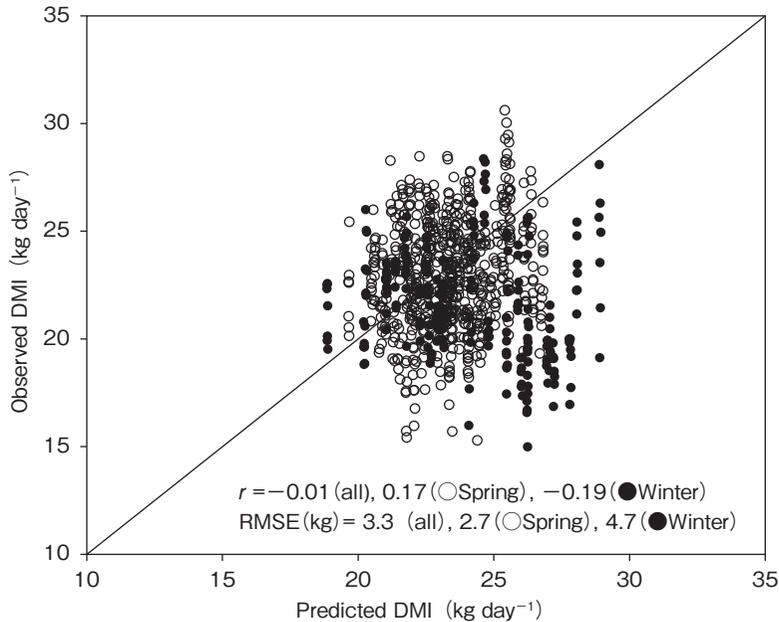


Fig. 3 Prediction of dry matter intake (DMI, kg day⁻¹) of total mixed rations (TMR) based on neutral detergent fiber (NDF)-based dynamic simulation model. Test-data were examined rearing by sixteen TMR-menu with eight dairy cattle (Table 4). The NDF-based dynamic simulations were carried on the NDF remain (kg) prediction model (Fig.1) with a 30-min pitch. The NDF-based dynamic simulations resulted in RMSE=3.3 (kg) and $r = -0.01$ for all data. The open and closed circles show data examined in Spring (March-June) and in Winter (November-February), respectively. The lines are $Y = X$.

64%, デンプン含量は18.3~27.8%と、一般的なTMR設計の範囲内の変異があった。牧草サイレージのNDF消化特性は、pdNDF含量、iNDF含量、消化速度ともに比較的大きな変異が確認できた。一方で、トウモロコシサイレージのNDF消化特性は、NDF含量がほぼ同じ値であったが、iNDF含量や消化速度には変異が見られた。以上より、多様な環境における変異の大きな飼養データを収集できた。

3.3 パラメータ最適化による日当たり乾物摂取量の予測精度

パラメータ最適化後の乾物摂取量 (DMkg day⁻¹ cow⁻¹) の予測値と観測値の関係をFig. 3に示した。ルーメン内繊維消化ダイナミクスにより予測された乾物摂取量の予測精度は、RMSE=3.3 (kg), $r = -0.01$ と低かった (Fig. 3)。特に、冬

季に試験を実施した飼養データに、当てはまりが低く、予測を過大評価しているものが含まれ、それを除くと、RMSE=2.7 (kg), $r = 0.17$ であった。モデルの基礎となるデータが約1年間と少なかったため、本課題では検討できなかったが、季節による周期性も考慮する必要性が示唆された。

採食シミュレーション時の採食頻度や、ルーメン内NDF滞留量を変化させた場合の予測値は、絶対値としての変化は見られたが、予測値と観測値の相関関係には影響がきわめて小さかった (データ省略)。そのため、前述のモデル再構築の必要性に加えて、相関関係に影響する要因の感度分析が必要であると考えられた。

4. 要 約

本課題は、前課題で構築したルーメン内繊維消

化ダイナミクスに基づく採食量予測モデルについて、パラメータ最適化を試みた。ルーメン内繊維滞留量 (NDF滞留量) の弱定常性に着目した通過速度に関連するパラメータ最適化によって、TMR設計が変更された搾乳日数150日前後のNDF滞留量の変化は小さくなった。パラメータ最適化後のNDF滞留量のモデルは、最適化前のモデルと同様に代謝体重、産次の影響と日内周期が確認できた。搾乳日数との関係は、100日頃をピークとする緩やかな曲線となった。パラメータ最適化後の日単位の採食量の予測精度は、RMSE = 3.3kg, $r = -0.01$ と低く、採食シミュレーション時の採食頻度やNDF滞留量を一律に変化させてもその予測精度は高くならなかった。今後の予測精度の向上に向けて、季節性やルーメンマット構造などの通過のエスケープを考慮したモデルの再構築を検討したい。

謝 辞

本研究の実施にあたり、有益なご助言と飼養データを提供いただきました酪農学園大学農食環境学群循環農学類 泉賢一教授、ホクレン訓子府実証農場 渡邊龍之介氏に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) 谷川珠子, 田中常喜:平成31年度食肉に関する助成研究調査成果報告書 Vol.38, 385~390, 2020.
- 2) Krizsan, S. J., Ahvenjärvi, S., Huhtanen, P.: *J. Dairy Sci.*, **93**(12), 5890~5901, 2010.
- 3) Cabezas-Garcia, E. H., Krizsan, S. J., Shingfield, K. J., Huhtanen, P.: *J. Dairy Sci.*, **101**(2), 1177~1189, 2018.
- 4) Kammes, K. L., Allen, M. S.: *J. Dairy Sci.*, **95**(6), 3269~3287, 2012.
- 5) National Research Council: Nutrients Requirements of Dairy Cattle, Seventh Revised Edition, 2001.
- 6) Fox, D. G., Tedeschi, L. O., Tylutki, T. P., Russel, J. B., Van Amburg, M. E., Chase, L. E., Pell, A. N., Overton, T. R.: *Anim. Feed Sci. Technol.*, **112**, 29~78, 2004.
- 7) 泉賢一, 坂本孝仁, 柴山草太, 辻秀雄:日本畜産学会報, **79**(3), 361~368, 2008.
- 8) Kononoff, P. J., Heinrichs, A. J.: *J. Dairy Sci.*, **86**(4), 1445~1457, 2003.

国産トウモロコシ子実の乾燥温度および貯蔵条件が トウモロコシの栄養価に及ぼす影響

Effects of drying temperature and storage conditions on nutritive value of
domestic grain of corn

篠遠 善哉¹・金井 源太¹・芦原 茜²

(¹国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構東北農業研究センター,

²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)

Yoshiya Shinoto¹, Genta Kanai¹ and Akane Ashihara²

(¹Tohoku Agricultural Research Center, NARO, ²Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

The objective of this study was to determine the optimal drying and storage conditions for corn as a domestic grain for swine by comparing nutritional values estimated by an in vitro digestion method. Following harvesting under the standard moisture condition or a high moisture condition, corn grains were dried at two temperature levels (40 or 60°C ~ 80°C) and then stored under a high temperature and humidity condition or a low temperature condition for two months. Grain yield was lower under the standard condition than the high moisture condition and was attributed to decreased kernel number, while ear length and 100-grain weight were not obviously different. Compared to the high moisture condition, the standard moisture condition consumed more energy for water removal due to the outside air temperature during the drying test. There was no effect of harvest drying temperature on the estimated nutritional values; however, the digestibility of dry matter (DM) and crude protein (CP) in grains in the high moisture condition group was higher compared to the standard condition group. In addition, the digestibility of DM and CP in grains stored under the low temperature condition was higher compared to storage under the high temperature and humid condition. In conclusion, it was suggested that domestic corn grains should be harvested under a higher moisture condition than the standard condition, and the grains should be stored at low temperatures during extended storage to prevent quality deterioration during the summer season in Japan.

1. 目 的

水田の有効活用および濃厚飼料の増産という背景から水田転換畑での子実用トウモロコシ栽培が広がりつつある。トウモロコシをホールクロップでサイレージ利用できる牛と比較して、豚は乾燥

したトウモロコシ子実の利用が主である。したがって、子実用トウモロコシの栽培面積の拡大を促進していくには豚での利用拡大に向けた乾燥・貯蔵に関する基礎的な情報の集積がきわめて重要である。

これまで水稻などで使われてきた機械体系をト

ウモロコシ子実の収穫や飼料調製のために有効利用できることは大きなメリットである。トウモロコシ子実の乾燥には、既存の汎用循環式乾燥機が主に使われているが、コメの胴割れを防ぐために乾減率1%/h程度に抑える基本設計となっていることもあり、作業上の律速となっている。そのため、比較的高温かつ短時間で乾燥できる技術開発が必要である。特に、トウモロコシ主要産地であるアメリカと比べてわが国の気候は多湿であり、収穫時における子実水分が5~10%高い傾向にある。子実水分の高い状態で乾燥処理を開始すると成分変化は大きくなると想定され、独自の検討が必要であると考えられる。さらに、国産トウモロコシ子実の利用拡大を図るうえで重要なことは、畜産農家に通年供給できること、すなわち、収穫期である秋から翌年の秋までの好適な保存方法を明示することである。生産現場では夏季の多湿高温条件による品質劣化の可能性が課題としてあがっているが、トウモロコシ子実の貯蔵条件に関する検討はまだ行われていない。多湿高温条件下では、貯蔵中に脂質成分の酸化亢進などが起こり、栄養素の利用低下が懸念されることから、飼料として利用するうえで重要な貯蔵による栄養価の変化を明らかにする必要がある。

そこで本研究では、子実水分が慣行あるいは比較的高い条件で収穫した国産トウモロコシ子実を、異なる温度水準で乾燥し、多湿高温条件あるいは低温条件で貯蔵した後、豚における各種栄養素の利用性が評価できる*in vitro*の人工消化法を用いて栄養価を評価して比較検討することにより、国産トウモロコシの乾燥・貯蔵についての好適条件を明らかにすることとした。

2. 方 法

2.1 子実用トウモロコシの栽培試験および収穫試験

試験は、2020年に農研機構東北農業研究センター内（岩手県盛岡市）でトウモロコシ（*Zea mays* L.cv. 36B08）を供試して実施した。

試験区は、立毛子実水分25~30%で収穫する慣行水分区と立毛子実水分30~35%で収穫する高水分区の2処理区を設けた。慣行水分区は水田転換畑（前作、乾田直播水稲）、高水分区は畑で実施した。両区とも、播種前に牛糞堆肥を1t/10a、基肥として配合肥料をN、P₂O₅、K₂Oの成分でそれぞれ15、20、15g/m²施用した。播種は、真空播種機を用いて、慣行水分区と高水分区それぞれ2020年5月27日と2020年5月24日に条間75cm、株間17cmの設定で行った。収穫作業は、高水分区において2020年9月23日に、慣行水分区において2020年10月19日~20日にトウモロコシ子実の収穫を想定して試験用部品を装着した普通コンバイン（WRH1000c、クボタ社）にタイ製サードパーティー品（3条刈仕様、KIJ VANICH社）を装着して行った。なお、収穫時の立毛子実水分は慣行水分区、高水分区それぞれ23%、32%であった。

2020年9月22日、10月9日にそれぞれ高水分区と慣行水分区の3カ所において、隣接する2条を2mの長さ（3.0m²）で雌穂を収穫して、収量および収量構成要素を調査した。

2.2 トウモロコシ子実の乾燥および貯蔵試験

乾燥試験は、コンバインで収穫した慣行水分区と高水分区のトウモロコシ子実をそれぞれ供試した。試験区は、循環式乾燥機を用いてコメの乾燥の慣行温度（約40℃）で乾燥する低温（LT）区と平型乾燥機を用いて比較的高い温度（60℃~80℃）で乾燥する高温（HT）区を設け、飼料として適した水分15%以下となるまでの乾減率と除

水量あたりの消費熱量を調査した。乾燥機は循環式乾燥機 (RTM250-XLD5, 金子農機社) と平型乾燥機 (HAD-180F, 金子農機社) を用いた。

貯蔵試験は、慣行水分区と高水分区のトウモロコシ子実をそれぞれLT区とHT区の条件で乾燥した4種類を供試した。試験区は、わが国の夏季を想定した多湿高温 (温度32℃, 湿度80%) と常湿低温 (温度15℃, 湿度60%) の条件の2区を設け、収穫・乾燥後の11, 12月の2カ月間丸粒のまままで貯蔵後、分析に供した。一方、本研究で収穫・乾燥したトウモロコシ子実では、実際の夏季に曝露することは時間的に不可能であったため、収穫・乾燥後に10℃の低温下で貯蔵しておいた2019年産のトウモロコシ子実を供試して、北関東 (茨城県つくば市) の実際の夏季3カ月 (7~9月) の間、温度調節機能のない一般的な飼料保管庫 (常温区) と温度15℃に制御された低温貯蔵庫 (低温区) において丸粒のまままで貯蔵する試験も行った。貯蔵前後の各丸粒トウモロコシ子実の一部は、1 mm以下に粉碎した後、乾物 (DM), 粗タンパク質 (CP), 粗灰分 (CA), 粗脂肪 (EE), 粗繊維 (CF) および総エネルギー (GE) を各公定法により測定して品質を評価した。

2.3 トウモロコシ子実の栄養価に関する試験

①乾燥試験で調製された2 (慣行水分区, 高水分区) × 2 (LT区, HT区) の4種類, ②①の4種類 × 2 (多湿高温区, 常湿低温区) の8種類, ③2019年産トウモロコシ子実を北関東の実際の夏季に3カ月間貯蔵した2 (常温区, 低温区) 種類の合計14種類のトウモロコシ子実について、栄養価を評価するために豚の消化管における消化・吸収反応を試験管内で再現した人工消化法^{1, 2)}によりDMとCPの消化率を求めた。トウモロコシ子実の栄養価に関する統計処理は、収穫時の水分条件、収穫後の乾燥温度、貯蔵温度および湿度条件を要因とする分散分析を行い、平均値の有意差検

定にはTukeyの多重検定法を用いた。

3. 結果と考察

3.1 子実収量および収量構成要素

コンバインによる全刈収量は慣行水分区, 高水分区でそれぞれ707kg/10a, 895kg/10aであり、高水分区より慣行水分区で少ない傾向であった。収量構成要素のうち、雌穂長と100粒重に処理区の顕著な差はみられなかったが、粒数は高水分区で多い傾向であった。したがって、高水分区と比較して慣行水分区では、粒数が減少したため全刈収量が少ない傾向であった。これは、前作における畑作と水稲の違いによると考えられた。

3.2 乾燥試験および貯蔵試験

乾燥試験の結果をTable 1に示した。慣行水分区と高水分区における乾燥時の初期水分はそれぞれ24.8%, 35.8%であった。乾燥後の仕上水分は、循環式乾燥機ではおおむね目標水分の15%以下であった。平型乾燥機では上層と下層で水分が異なるため、上層まで十分に乾燥されたことを確認してから運転を停止したため、15%を大きく下回り、慣行水分区では9.2%, 高水分区では7.8%であった。乾燥温度について、慣行水分区ではLT区で33.8℃, HT区では通風温度がセンサーの最大測定値80℃を上回り、測定不可であり、高水分区ではLT区で37.6℃, HT区で66.2℃であった。高水分区と比較して慣行水分区では、乾燥試験時の外気温が低いため、除水量あたりエネルギー消費量が大きかった。

本研究で収穫・乾燥されたトウモロコシ子実の貯蔵試験では、多湿高温条件下の平均温度は31.9℃, 平均湿度は79.7%, 常湿低温下での平均温度は14.2℃, 平均湿度は54.8%であり、おおむね設定どおりであった。開始時および貯蔵後の慣行水分区および高水分区の一般成分値をTable 2に示した。開始時および貯蔵後のDM含量は85~

Table 1 Drying conditions

Harvesting condition	Dryer*	Initial Moisture Content (%)	Final Moisture Content (%)	Ave. Hot Air Temp. (°C)	Drying Speed (%/h)	Energy Consumption to Remove 1 kg of Water (MJ/kg-water)
High moisture	LT	35.8	13.8	37.6	1.5	4.4
	HT		7.8	66.2	2.8	3.5
Standard moisture	LT	24.8	14.8	33.8	1.6	5.4
	HT		9.2	Over 80**	2.4	5.9

*LT : low temperature condition, HT : high temperature condition.

**Range of the sensor was up to 80°C.

Table 2 Chemical analysis of corn (on a DM basis) harvested in 2020

Harvesting condition	Drying condition	Storage condition	DM (%)	CP (%)	CA (%)	EE (%)	CF (%)	GE (MJ/g)
High moisture	LT	Initial	86.2	8.8	1.3	4.01	2.27	18.9
	HT	Initial	87.7	8.5	1.5	4.41	1.81	18.9
	LT	Low temperature	88.5	8.9	1.5	4.25	2.51	18.9
	HT	Low temperature	89.2	9.1	1.5	3.90	2.05	19.0
	LT	High temperature and humid	85.6	9.3	1.3	5.93	2.47	19.1
	HT	High temperature and humid	85.9	9.1	1.3	5.16	2.52	19.0
Standard moisture	LT	Initial	85.9	8.2	1.6	3.92	2.19	18.8
	HT	Initial	87.9	8.6	1.5	3.52	2.68	18.8
	LT	Low temperature	87.1	8.8	1.7	3.26	2.55	18.9
	HT	Low temperature	88.7	8.9	1.7	3.47	2.69	18.8
	LT	High temperature and humid	84.9	9.0	1.4	4.08	2.56	18.9
	HT	High temperature and humid	85.6	9.1	1.5	3.80	2.36	18.9

LT : low temperature condition, HT : high temperature condition.

DM : dry matter, CP : crude protein, CA : crude ash, EE : ethel extract, CF : crude fiber, GE : gross energy.

89%程度であり、多湿高温下で貯蔵することにより、乾燥温度に関わらず両区ともに開始時よりも低値となった。一方で、常湿低温下で貯蔵することにより、開始時よりも高値となったことから、貯蔵中の湿度と温度がDM含量に影響したと考えられた。一方、CP, CA, EE, CF, GEは貯蔵による影響はみられなかった。

2019年産のトウモロコシ子実の貯蔵試験では、常温区の平均温度は25.5°C、平均湿度は72.6%、低温区の平均温度は13.4°C、平均湿度は58.2%であった。開始時および貯蔵後の常温区および低温区的一般成分値をTable 3に示した。DM含量については、常温区では開始時と大きな違いはなかったが、低温で貯蔵すると高値となった。

3.3 乾燥温度および貯蔵条件がトウモロコシ子実の栄養価に及ぼす影響

①2020年度産の慣行水分区と高水分区のトウモロコシ子実を40°Cあるいは60°C~80°Cで乾燥処理した後のDM消化率は、慣行水分区のうちLT区は73.5%、HT区は73.0%であり、高水分区はそれぞれ74.5%と75.1%であった。また、CP消化率は、慣行水分区はそれぞれ85.8%と85.3%、高水分区は87.6%と88.0%であり、DMおよびCP消化率のいずれも乾燥温度の影響はないが、高水分区が慣行水分区よりも有意に ($p < 0.05$) 高い値を示した。②の結果はTable 4に示した。高水分区のトウモロコシは乾燥温度に関わらず、慣行水分区のトウモロコシよりもDM消化率およびCP消化率が有意に ($p < 0.05$) 高かった。また、慣行水分

Table 3 Chemical analysis of corn (on a DM basis) harvested in 2019

Storage condition	DM (%)	CP (%)	CA (%)	EE (%)	CF (%)	GE (MJ/g)
Initial	85.56	10.2	1.5	3.2	2.2	1.87
Low temperature	87.98	10.1	1.5	3.5	2.2	1.88
High temperature and humidity	85.74	10.2	1.6	2.8	1.6	1.88

DM : dry matter, CP : crude protein, CA : crude ash, EE : ethel extract, CF : crude fiber, GE : gross energy.

Table 4 *In vitro* digestion test ② after drying at various temperatures and storage under a high temperature and humidity condition or a low temperature condition

Harvesting condition	Drying condition	Storage condition	DM (%)	CP (%)
High moisture	LT	Low temperature	79.0 ^{Aa}	88.6 ^{Aa}
	HT	Low temperature	78.2 ^{Aa}	88.7 ^{Aa}
	LT	High temperature and humidity	77.5 ^{Ba}	86.0 ^{Ba}
	HT	High temperature and humidity	76.7 ^{Ba}	85.6 ^{Ba}
Standard moisture	LT	Low temperature	76.3 ^{Ab}	86.9 ^{Ab}
	HT	Low temperature	75.0 ^{Ab}	87.0 ^{Ab}
	LT	High temperature and humidity	74.7 ^{Bb}	85.4 ^{Bb}
	HT	High temperature and humidity	75.3 ^{Bb}	85.9 ^{Bb}

LT : low temperature condition, HT : high temperature condition.

DM : dry matter, CP : crude protein.

Values are expressed as least square means. A, B : $p < 0.05$, a, b : $p < 0.05$.

Table 5 *In vitro* digestion test ③ after drying at various temperatures and storage under a high temperature and humidity condition or a low temperature condition

Storage condition	DM (%)	CP (%)
Initial	76.63	83.3
Low temperature	75.99	84.3
High temperature and humidity	73.75	82.3
SD	1.85	1.22
p value	0.05	0.06

DM : dry matter, CP : crude protein.

Values are expressed as least square means and pooled standard deviation.

区、高水分区のいずれも多湿高温下で貯蔵することにより常湿低温下での貯蔵と比較してDM消化率およびCP消化率が有意に ($p < 0.05$) 低かった。以上から、慣行水分区と高水分区のトウモロコシの消化率は高水分区のほうが高く、また、常湿低温下で貯蔵することにより消化率の低下を抑制できる可能性が示された。③の結果はTable 5に示した。多湿高温下で貯蔵したトウモロコシのDM消化率は開始時および常湿低温下で貯蔵した

トウモロコシよりも低くなる傾向 ($p = 0.05$) を示した。また、CP消化率も同様に、多湿高温下で貯蔵すると開始時および常湿低温下で貯蔵したトウモロコシよりも低くなる傾向 ($p = 0.06$) であった。以上から、丸粒のままトウモロコシ子実を長期保管する場合でも、夏季常温下ではなく常湿低温下で貯蔵する必要があると考えられた。

4. 要 約

本研究では、慣行条件と高水分条件で収穫した国産トウモロコシ子実を、異なる温度水準で乾燥し、多湿高温条件あるいは低温条件で貯蔵した後、豚における *in vitro* の人工消化法を用いて栄養価を比較検討することにより、国産トウモロコシの乾燥・貯蔵についての好適条件を明らかにした。高水分区より慣行水分区で粒数が少なく、坪刈収量と全刈収量が少ない傾向であった。高水分区と比較して慣行水分区では、乾燥試験時の外気温が低いため、除水量あたりエネルギー消費量が大きかった。慣行水分区および高水分区のトウモロコシを乾燥・貯蔵して栄養価を比較した場合、

乾燥温度による影響はなかったが、高水分区が慣行水分区よりDMおよびCP消化率が高く、また常湿低温下のほうが多湿高温下で貯蔵した場合よりもDMおよびCPの消化率が高かった。以上から、国産トウモロコシ子実の栄養価を低下させることなく豚に給与するには、高水分条件下で収穫した国産トウモロコシ子実を常湿低温下で貯蔵したものが最適である可能性が示唆された。

文 献

- 1) Boisen, S., Fernandez, J. A. : *Animal Feed Science and Technology*, **68**, 277~286, 1997.
- 2) Regmi, P. R., Ferguson, N. S., Zijlstra, R. T. : *Journal of Animal Science*, **87**, 3620~3629, 2009.

黒毛和種肥育牛の部分尿による尿中窒素排泄量の推定方法の確立

Method development to estimate total urinary nitrogen excretion in fattening Japanese black beef cattle

近藤 誠¹・股村 真也¹・岡本 俊英²・梅木 俊樹²

(¹三重大学大学院生物資源学研究科, ²三重県畜産研究所)

Makoto Kondo¹, Masaya Matamura¹, Toshihide Okamoto² and Toshiki Umeki²

(¹Graduate School of Bioresources, Mie University, ²Mie prefectural Livestock Institute)

We determine daily urinary creatinine excretion in Japanese black cattle and also evaluated the partial urine sampling to estimate daily excretion of nitrogen (N) in urine. In total, 125 samples of daily excreted urine were collected from 7 heifers of Japanese black cattle. The daily excretion of urinary creatinine was 24.8 mg/kg of body weight (BW). The creatinine excretion was influenced neither by diets (12 and 18% of crude protein contents) nor collection day even urine volume ranged widely (3.3~27.6 L/d). Among these cattle, creatinine excretion was variable from 22.6 to 27.2 mg/kgBW as individual average. To evaluate partial sampling technique, daily urinary N excretion was estimated from urine collected in 4-h daytime urine (9-13h or 13-17h) for 5 consecutive days from 4 heifers, and was compared with actual N excretion in total (24-h) urine collection. Percentages of the difference between actual and estimated urine N excretion were 4.8% and 13.9% in the urine collected in 9-13h and 13-17h, respectively. Urinary N excretion estimated from 4-h urine in 9-13h was comparable with them in 24-h urine. Overall, we have developed the following equation ; urinary N excretion (mg/d) = 24.8 (mg/kg) × BW (kg) / creatinine concentration in partial urine sample (mg/dL) × N concentration in partial urine sample (mg/dL). The partial sampling technique may be used to estimate the daily excretion of urinary N in Japanese black cattle under practical conditions.

1. 目 的

霜降り肉を生産する黒毛和種は、全国各地でもさまざまなブランド牛の名で生産されており、優れたおいしさから国民の食を豊かにする一因となっている。近年では各地で育種改良が進み、黒毛和種肥育牛が大型化している。平成14年から令和1年までの18年間で、黒毛和種去勢牛の枝肉重

量では16%、格付けの主要部位であるロース芯面積では23%も増加した¹⁾。

食肉の部位となる筋肉を生産するためには栄養素としてタンパク質が重要である。主なタンパク質供給源は大豆や大豆粕であり、それらの価格は飼料原料の中でも高いことから、肥育農家の経営上、飼料費を抑え、肉牛の生産性を向上させるためにもタンパク質は適量給与することが望まれ

る。特に大型化している黒毛和種肥育牛の歩留まりを高めるためには、摂取したタンパク質（窒素量）を、いかに体内に蓄積させるか（体蓄積率）が重要となる。この体内に蓄積した窒素量を調べるためには、摂取した窒素量から糞と尿に排泄された窒素量を差し引くことで求められるが、通常、連続した5日間以上の期間に排泄された糞および尿をすべて回収することが必要である。牛を対象に糞や尿を全量回収することは非常に労力が大きく、試験データが蓄積しづらい一因となっている。そこで、糞量については消化管でリグニンや酸不溶性灰分などの吸収不可能な指示物質をもとに、部分的に採取した糞から全糞量推定する方法が確立されており、品種を問わず利用が可能となっている。一方、尿量については筋肉量に依存して尿中に排泄されるクレアチニン量をもとにして、部分的に採取した尿（部分尿）から1日に排泄された全尿量を推定することが可能である²⁾。これまでにさまざまな品種で研究が進んでおり、固有のクレアチニン排泄量が明らかにされているが^{2, 3)}、黒毛和種では研究例がなく部分尿から全尿量を推定することができていない。

そこで、本研究では黒毛和種肥育牛を対象に、1) 尿中へのクレアチニン排泄量を明らかにし、部分尿から1日の全尿量を推定する方法を確立すること、2) 部分尿中のクレアチニンおよび窒素濃度から1日の尿中窒素排泄量を推定する方法を確立することを目的とした。

2. 方法

2.1 黒毛和種肥育牛における一日尿および部分尿の回収

本研究は「産業動物の飼養及び保管に関する基準」（昭和62年総理府告示第22号）に基づき実施した。2回の実験により延べ125日分の一日尿を回収した。1回目では黒毛和種の未経産雌牛4頭

を用いて、4×4ラテン方格法により実施した。月齢は17.3～22.4か月、体重は386～618kgであった。処理区は粗タンパク質含量として（濃厚飼料中12%、18%）と圧ベン度合いが異なる2種類のトウモロコシから4処理区を設計した。飼料の給与は9:00と15:00に行った。1期14日間のうち、予備期間を9日間、全尿を採取する期間を5日間とした。合計4頭×4処理区×5日間で合計80サンプルの一日尿を採取した。2回目の実験では同様に黒毛和種雌牛3頭を用いて3×3ラテン方格法により実施した。月齢は14.6～17.6か月齢、体重は446～538kgであった。処理区は2水準の粗タンパク質含量（濃厚飼料中12%、18%）と非繊維性炭水化物含量（飼料中39%、45%）の組み合わせにより3処理区を設計した。合計3頭×3処理区×5日間で合計45サンプルの一日尿を採取した。供試牛の外陰部に尿採取用の受け器とホースを装着し、自然排尿した尿をプラスチック製コンテナで回収した。コンテナ内に20%硫酸を加え、尿はpH3以下を保つようにした。回収した尿は重量を測定後、よく混合し、一部を冷凍庫で保存した。残りの尿のうち一定割合で尿を取り5日目まで冷蔵庫で保管した。その後、5日間の尿を一定割合ずつ混合した後に冷凍庫で保存した。

また、1回目の実験では4期目の最終5日間に、9時～13時および13時～17時の4時間間隔で尿を回収した（部分尿）。

2.2 尿中成分の分析

尿に含まれるクレアチニンはGeorge et al (2006)の方法に準じてHPLCにより分析した⁴⁾。尿はリン酸カリウム緩衝液を用いてpH6.5に調整した後、50倍に希釈したものを分析に供した。HPLCの移動相はpH6.5に調整した200mMリン酸カリウム緩衝液とし、流量は毎分1.0mlとした。分析カラムはInertsil ODS-3（ジールサイエンス）を用い、カラムオーブンは25℃とした。検出

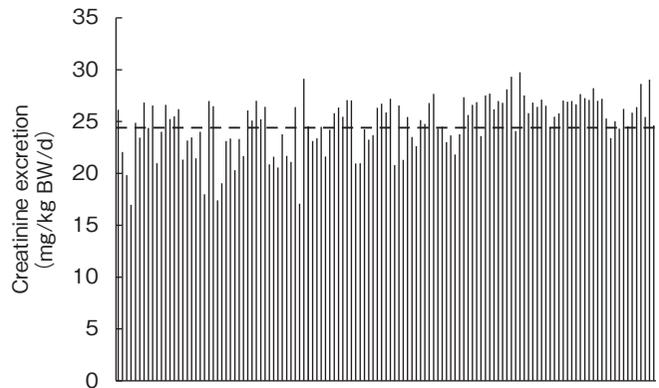


Fig. 1 Daily creatinine excretion in Japanese black cattle.

Each bar indicates daily creatinine excretion ($n = 125$), and horizontal dotted line indicates the mean ($24.8 \pm 2.6 \text{ mg/kg BW/d}$).

は220nmの吸光度を測定した。また、尿に含まれる窒素はケルダール法により測定した。

3. 結果と考察

Fig. 1に7頭の黒毛和種雌牛から採取した延べ125日分の尿を対象に測定したクレアチニン排泄量を示した。本研究で得られたクレアチニン排泄量は1日当たり平均で $24.8 \pm 2.6 \text{ mg/kg}$ 体重（最小17.0～最大29.8mg/kg体重）であった。クレアチニン排泄量に対する要因の解析を行った結果、飼料や日による影響は認められなかった ($p > 0.05$)。ホルスタイン種の泌乳牛を対象にしたいくつかの先行研究では、給与飼料中の粗タンパク質含量や非繊維性炭水化物含量によりクレアチニン排泄量は影響を受けないことが示されており^{5,6)}、これらの先行研究は本研究で得られた黒毛和種での結果を支持している。なお、本研究で対象とした125日分の尿では、1日当たりの尿量が3.3～27.6L（平均10.4L）と広い範囲に及んでおり、特に給与飼料により有意に影響を受けていた ($p < 0.01$)。本研究では2回の実験ともに給与飼料中の粗タンパク質含量が異なる2水準で設計しており、高タンパク質飼料を与えた処理区では尿量が高まっていた。これらのことから尿量が

大きく変動する条件下においても、黒毛和種のクレアチニン排泄量としては飼料中の栄養素含量により影響を受けないことが明らかとなった。また、クレアチニン排泄量は日にちにより影響を受けなかったことから、本研究で行った連続5日間のような短期間であれば、クレアチニンは安定した量で排泄されることが確認された。一方、Chizzotti et al (2008)では、ホルスタイン種の未経産雌牛において体重が100～500kgと幅広い牛群で調査した結果、体重1kg当たりのクレアチニン排泄量は体重と明瞭な負の相関を示すことを報告している³⁾。これは牛の成長に伴い体重当たりの筋肉量が相対的に減少したことで、クレアチニン排泄量も減少していったことを示唆している。黒毛和種では他の品種と比べ脂肪の蓄積能力が高く、肥育過程では筋肉内の脂肪量も増えていくことから⁷⁾、体重当たりの筋肉量が相対的に変化すれば、クレアチニン排泄量も変化することが予想される。本研究では肥育中期にあたる牛から得た結果であるため、異なる肥育段階の黒毛和種においてクレアチニン排泄量を明らかにすることが必要と考えられる。また、本研究で供試した7頭に対して個体ごとの平均排泄量を算出すると最小値22.6mg/kg体重～最大27.2mg/kg体重であ

Table 1 Published data of daily creatinine excretion in cattle.

Studies	Breed	Sex	Number of animals	Daily creatinine excretion (mg/kgBW/d)
Chizotti et al. 2008 ³⁾	Holstein	bull	4	28.1
Chizotti et al. 2008	Holstein	heifer	22	26.5-30.3
Leal et al. 2007 ⁹⁾	Holstein	heifer	11	30.5
Whittet et al. 2019 ¹⁰⁾	crossbred	heifer, cow	21	28.6
Whittet et al. 2019	crossbred	heifer	18	28.1
Whittet et al. 2019	crossbred	cow	6	27.7
Whittet et al. 2019	crossbred	heifer	9	30.5
Whittet et al. 2019	crossbred	heifer	7	26.2
This study	Japanese black	heifer	7	24.8

BW; body weight

り、個体間で変動が認められた。クレアチニン排泄量は尿量を推定するマーカーとして広く使われているが、個体間でクレアチニン排泄量の変動することはホルスタイン種での先行研究においても報告されている^{2,3)}。本研究では17~22か月齢の黒毛和種を対象としたが、この時期は黒毛和種では筋肉内の脂肪含量が直線的、あるいは曲線的に増加する時期である⁷⁾。本研究においても個体間で体組織の発育程度に差が生じていたことが予想され、その結果、体重当たりの筋肉量が異なったことでクレアチニン排泄量の変動に影響した可能性が考えられた。

Table 1 に牛のクレアチニン排泄量について今回明らかになった黒毛和種と他の品種で報告されている値を示した。牛を対象にしたクレアチニン排泄量に関する研究では、泌乳牛の研究例が多いが、本研究では肉牛を対象にしているため、泌乳していない牛を対象に調べた研究例を列挙した。限定的な比較ではあるが、ホルスタイン種や交雑種（アンガス種、ヘレフォード種など）では体重1 kgあたりおおむね26~30mgと報告されていたのに対して、本研究は比較的低い値を示した。クレアチニンは、筋肉中のクレアチンリン酸からATPを産生する際に生じ、尿中へ排泄されるため⁸⁾、その排泄量は主に筋肉量に依存する。黒毛

和種が他の品種と比べて脂肪の蓄積量が多く、相対的に体重当たりの筋肉量が少ないことでクレアチニン排泄量が低値を示したことが推察されるが、品種間でのクレアチニン排泄量の比較を明確に行うためには、今後より詳細な検討が必要である。

続いて、上記で求めたクレアチニン排泄量24.8mg/kg体重を用いて、部分尿からの尿中窒素排泄量の推定を行った。Fig. 2 に5日間の全尿を回収して実測した1日当たりの尿中窒素排泄量と、同期間にて9~13時と13~17時の各時間帯で採取した部分尿により推定した尿中窒素排泄量を示した。実測した尿中窒素排泄量は4頭の間で67~143 gと個体により広く分布したが、部分尿から推定した尿中窒素排泄量も同様の傾向を示した。推定精度の指標として、実測値に対する推定値と実測値の差の割合を算出すると、9~13時で4.8%となり、実用的にも十分な精度と考えられた。一方、13~17時では13.9%であり、実測値との差は比較的大きくなった。Table 2 に全尿と部分尿中のクレアチニン濃度、窒素濃度を示した。また、全尿については実測した尿量および尿中窒素排泄量を、部分尿についてはそれらの推定値を示した。統計解析上の有意差は認められないものの、尿中クレアチニン濃度が13~17時の各時間帯

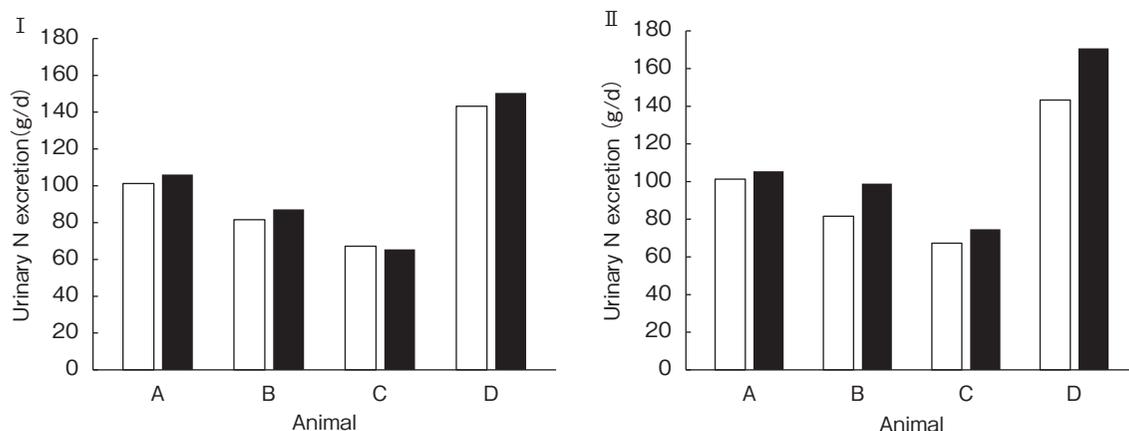


Fig. 2 Daily urinary N excretion in Japanese black cattle.

I, II; estimated from urine collected at 9-13h and 13-17h, respectively.

White and black bars indicate observed values and estimated values in each animal, respectively.

Table 2 Creatinine and N concentration in urine, urine volume and urinary N excretion determined from total collection or spot sampling.

	Total collection	Spot collection		SEM	p-value
		9-13	13-17		
Urinary Creatinine (mg/dL)	174	186	160	11	0.30
Urinary N (mg/dL)	1241	1320	1307	44	0.44
Urine volume (L/d)	8.05	7.87	8.65	0.28	0.19
Urinary N excretion (g/d)	98 ^a	102 ^a	112 ^b	3	0.03

a, b: Means in rows with different superscripts indicate significantly different.

で9～13時と比べて低かったことで、推定尿量は数値上高くなっていた。一方で、尿中窒素濃度については両時間帯で差は比較的小さかったことから、推定された尿中窒素排泄量は13～17時の各時間帯で高い値を示した。このように採尿した時間帯により推定窒素排泄量が異なる原因として、牛の尿中のクレアチニン濃度と窒素濃度の比率が一樣ではないことが考えられる。尿中のクレアチニンと窒素濃度の比率は日内で変動が小さく安定しているという報告がある一方で^{11, 12)}、それらの比率は日内で変動するとの報告もあり¹³⁾、研究事例により一定ではない。本試験の結果からは、全尿回収の代替手段として部分尿を採取する場合、9～13時の尿で精度が高かったが、この回収時間は飼養状況（飼料の給与方法や時間など）により尿

中のクレアチニンや窒素濃度が変化する可能性もあり、今後は例数を増やして検証することが必要である。

4. 要 約

本研究では、黒毛和種肥育牛において1日当たりの尿中窒素排泄量を、4時間で採取した部分尿から推定する方法を示した。部分尿から1日の尿量を推定するための指標として、黒毛和種肥育牛のクレアチニン排泄量が24.8mg/kg体重であることを明らかにした。この結果より、1日当たりの尿中窒素排泄量は、
 尿中窒素排泄量(mg/日) = 24.8(mg/kg体重) × 体重(kg) / 部分尿中のクレアチニン濃度(mg/dL) × 部分尿中の窒素濃度(mg/dL)

により求まることを示した。また、日中の時間帯として9～13時に5日間連続で採取した尿から推定した尿中窒素排泄量は実測値と平均5%以内の差であり、実用的にも十分な精度であった。ただし、尿量を推定するためのクレアチニン排泄量は肥育段階でも異なる可能性があり、また精度の高い採取時間は飼養状況により異なる可能性もあることから、さらに例数を増やして検証することが必要である。

文 献

- 1) 家畜改良センター (2020) 改良部情報分析課 枝肉成績まとめ概要 http://www.nlbc.go.jp/kachikukairyoy/data/pr/edadbgaiyou_r01.pdf
- 2) Lee, C., Morris, D. L., Dieter, P. A. : *J Dairy Sci*, **102**, 236~245, 2019.
- 3) Chizzotti, M. L., Valadares Filho, S. C., Valadares, R. F. D., Chizzotti, F. H. M., Tedeschi, L. O. : *Livest Sci*, **113**, 218~225, 2008.
- 4) George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K., Ramgaokar, J. S. : *J Chromato B*, **832**, 134~137, 2006.
- 5) Valadares, R. F. D., Broderick, G. A., Valadares Filho, S. C., Clayton, M. K. : *J Dairy Sci*, **82**, 2686~2696, 1999.
- 6) Moorby, J. M., Dewhurst, R. J., Evans, R. T., Danelon, J. L. : *J Dairy Sci*, **89**, 3552~3562, 2006.
- 7) 山崎敏雄 : 草地試験場研究報告, **18**, 69~77, 1981.
- 8) 岡田泰信ら : 医科生理学展望, 原書20版 p310-311, 2002.
- 9) Leal, T. L., Valadares, R. F. D., Valadares Filho, S. C., Leão, M. I., Detmann, E., Barbosa, A. M., Chizzotti, M. L., Paixão, M. L. : *R Bras Zootec*, **36**, 905~911, 2007.
- 10) Whittet, K. M., Watson, A. K., Erickson, G. E., Klopfenstein, T. J. : *Transl Anim Sci*, **3**, 532~540, 2019.
- 11) Albin, R. C., Clanton, D. C. : *J Dairy Sci*, **25**, 107~112, 1966.
- 12) 田村哲生, 井上和典, 篠原晃, 古賀照章 : 日本畜産学会報, **78**, 311~316, 2007.
- 13) Silva Júnior, J. M., Rennó, L. N., Valadares Filho, S. C., Paulino, M. F., Detmann, E., Menezes, G. C. C., Martins, T. S., Paula, R. M., Rodrigues, J. P. P., Marcondes, M. I. : *Livest Sci*, **217**, 85~91, 2018.

ビタミンA投与が黒毛和種子牛の骨格筋成長に与える影響

Effects of administration of vitamin A on skeletal muscle growth in
Japanese black calves

二瓶 直浩¹・佐藤 祐介²・湯澤 裕史¹・川田 智弘¹

(¹栃木県畜産酪農研究センター, ²宇都宮大学)

Naohiro Nihei¹, Yusuke Sato², Hiroshi Yuzawa¹ and Tomohiro Kawada¹

(¹Tochigi Pref. dairy & livestock experimental research center, ²Utsunomiya University)

The number of reports on the effects of vitamin A (VA) administration in Japanese Black calves is small, and there are no reports especially focusing on skeletal muscle growth. Therefore, in this study, we administrated VA intramuscularly to Japanese Black calves, and the effects on skeletal muscle growth and blood components were examined. 10 Japanese black cattle were donated and divided into control group (n=5) and administration group (n=5). After separation of the dam at 7 d, feeding was performed by the feeding robot until 90 d. VA (150,000IU) was intramuscularly administered at 7 and 30 d in the administration group. Cattle's physical measurement, blood sampling, and ultrasonic skeletal muscle (*biceps femoris*) diagnosis were performed over time. At 90 d, skeletal muscle (*biceps femoris*) samples were collected by biopsy needles to examine skeletal muscle related mRNA expression. Ultrasound skeletal muscle diagnosis showed administration group was significantly thicker than control group, but no significant difference was observed in body weight and other physical measurements. In addition, there was no significant difference in the expression of skeletal muscle-related mRNA at 90 d. According to the results, it was suggested that the VA intramuscular administration effect on skeletal muscle growth of Japanese Black calves, but it was considered that constant VA administration is necessary to maintain the skeletal muscle development.

1. 目的

ビタミンA (VA) は哺乳類において必須の栄養素であり、成長・発達に重要な役割を担っている。VAの生理活性は核内受容体のレチノイン酸受容体 (RAR) を介して行われており、RARはレチノイドX受容体 (RXR) とヘテロ二量体を形成し対象遺伝子の転写制御を行い、筋細胞等の

分化に重要な役割を担っている。

和牛肥育では、筋肉内の脂肪交雜の発達を重要視することから、VAを抑制し脂肪交雜の発達を促進する飼養管理が一般的である。しかし、VAは肥育牛のIGF-1 (Insulin-like growth factor-1) 代謝に関与し、増体の向上に影響を及ぼすことが報告されており¹⁾、VAの給与制限は欠乏症などの発生とともに生産性への弊害が懸念される。近

年の報告で、アンガス種の子牛へVAを投与すると、筋衛星細胞の活性化を介して骨格筋量が増加する²⁾との報告があり、VAを投与することで哺乳期および育成期における筋肉の増大が期待できると考えられる。しかし、先行研究では、アンガス種などの外国種を対象とした研究であり、脂肪蓄積能力などが異なる黒毛和種において、新生期のVA投与が同様の作用をするかは不明である。

そこで本研究では、和牛経営における収益性を改善する観点から、多様な牛肉生産需要に対応した肥育素牛の生産技術を確立するための一環として、黒毛和種子牛の初期発育に着目し、哺乳期の黒毛和種子牛にVAを投与して筋肉組織の発達への影響を分析することで、子牛の筋肉発達に対するVAの作用について検証を行うことを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試牛および処理

栃木県畜産酪農研究センターで生産された黒毛和種子牛10頭を供した。供試牛は7週齢で母子分離した後、90日齢まで群飼とし、哺乳ロボットによる人工哺乳を行った。このとき最大1,280 g/日給与する設定とし、代用乳は保証成分可消化養分総量105%以上、粗タンパク質28%以上のものを使用した。試験期間中、人工乳は現物3.0kg/日を上限として給与し、チモシー乾草は飽食、自由飲水とした。

供試牛10頭を母牛の産歴、生時体重、雌雄、父の血統を考慮し5頭ずつ、対照群および試験群に分けた。試験群は7日齢および30日齢に150,000IUのビタミンA（チョコラA筋注、エーザイ）を筋肉内注射により投与した。

なお、本研究は栃木県畜産酪農研究センター動物実験規程に基づき、動物福祉に配慮して実施した。

2.2 血液成分分析

経時的に供試牛の頸静脈からヘパリン加真空採血管を用いて採血し、ただちに3,000rpm、4℃下で10分間遠心し、血漿を測定まで-30℃で保存した。血漿中の総タンパク質、総コレステロール（T-Cho）、血中尿素窒素、トリグリセロール、アルブミン、AST、HDL-C、グロブリンは、臨床化学分析装置（富士フィルム（株））により分析した。また、血漿中レチノール濃度は高速液体クロマトグラフィー法により分析した。

2.3 超音波による骨格筋診断

30、60、90日齢の供試牛を診断に用いた。第6-7肋間部位における胸最長筋断面積を推定するため、供試牛を正姿勢で直立させ、肩甲骨後部に正中線と直角になるようプローブを当て、超音波画像を取得した。また、大腿二頭筋を診断するため、左後肢の座骨端から飛節までの長さを測定し、中心部を測定部位とし、正中線に平行となるようにプローブを当て、超音波画像の取得を実施した。この診断には動物用超音波画像診断装置（MyLab™One Vet, Esaote Europe B.V.）およびリニア型プローブ（SV3513Vet, Esaote Europe B.V.）（繁殖性等向上対策事業：農林水産省の繁殖性等の向上対策事業により公益社団法人畜産技術協会から貸付）を用い、得られた画像は画像解析フリーソフトImageJ³⁾により胸最長筋断面積および大腿二頭筋の厚さを測定した。

2.4 骨格筋関連遺伝子発現

90日齢の供試牛を超音波診断時と同様に正姿勢で直立させ、左後肢の座骨端から飛節までの長さを測定し中心部を剃毛した。その後、セラクター（エランコジャパン（株））により鎮静をかけ、筋生検部位を消毒した後、動物用塩プロ注「KS」（共立製薬（株））により局部麻酔をし、メスを用いて大腿二頭筋の筋膜まで切開した。切開した部位に対し垂直となるように14Gの生検針（（株）

タスク)を挿入し、大腿二頭筋サンプルを得た。得られた骨格筋サンプルは液体窒素下で凍結し、解析まで -80°C で保存した。

骨格筋サンプルはTRIzol (Thermo Fisher Scientific)によりトータルRNAを抽出し、iScript™ Reverse Transcription Supermix (Bio-Rad)により逆転写した。PCR反応試薬にはUniversal SYBR Green Supermix (Bio-Rad)を用いて定量PCRを実施した。なお、*GAPDH*を内部標準とし、相対的定量解析を行った。

2.5 統計処理

体測値、血液成分値、超音波診断値については、各項目を応答変数、群および日齢、雌雄を固定効果、子牛をランダム効果とした混合モデル分析による分散分析を行った後、Tukey法による有意差検定を行った。これらの統計解析は統計フリーソフトR (version 4.0.3)のlme4およびlmerTest, emmeans, pbrktestのパッケージを使用した。

また、遺伝子発現については線型モデルによる分散分析後、Student's t検定により有意差検定を行った。有意水準は $p < 0.05$ とし、 $0.05 \leq p < 0.1$ を傾向ありとし、結果は最小二乗平均値 \pm 標準誤差で表記した。

3. 結果と考察

3.1 ビタミンA投与が子牛の発育値に及ぼす影響

供試牛の発育値についてTable 1に示した。試験終了(90日齢)時の体重は、非投与群 $110.5 \pm 3.4\text{kg}$ 、投与群 $116.2 \pm 3.4\text{kg}$ であり、投与群が大きい値を示したものの有意な差は認められなかった。また、他の発育値(体高、胸囲、腹囲、日増体量)についても同様の結果となり、投与群が高値を示す日齢も見られたが、有意な差は認められなかった(Table 1)。この両群の体重は日本飼養標準⁴⁾の発育標準値を超しており、発育が良好で

Table 1 Effects of administration of vitamin A on physical measurements in Japanese black cattle

			Control	VA	p-value
Body weight	Day 0	kg	29.7 \pm 3.4	33.8 \pm 3.4	0.984
	Day 30		50.0 \pm 3.4	57.9 \pm 3.4	0.700
	Day 60		79.2 \pm 3.4	86.3 \pm 3.4	0.803
	Day 90		110.5 \pm 3.4	116.2 \pm 3.4	0.916
Height	Day 0	cm	70.8 \pm 1.3	72.8 \pm 1.3	0.937
	Day 30		77.0 \pm 1.3	80.1 \pm 1.3	0.667
	Day 60		85.6 \pm 1.3	88.5 \pm 1.3	0.749
	Day 90		92.3 \pm 1.3	95.3 \pm 1.3	0.714
Chest circumference	Day 0	cm	70.0 \pm 1.7	73.0 \pm 1.7	0.890
	Day 30		82.4 \pm 1.7	86.4 \pm 1.7	0.681
	Day 60		96.0 \pm 1.7	100.0 \pm 1.7	0.681
	Day 90		105.8 \pm 1.7	109.6 \pm 1.7	0.729
Abdominal circumference	Day 0	cm	69.5 \pm 1.9	71.7 \pm 1.9	0.989
	Day 30		86.3 \pm 1.9	90.7 \pm 1.9	0.708
	Day 60		106.7 \pm 1.9	110.9 \pm 1.9	0.751
	Day 90		125.3 \pm 1.9	127.7 \pm 1.9	0.982
Daily gain	Day 0-30	kg/day	0.67 \pm 0.07	0.80 \pm 0.07	0.751
	Day 31-60		1.00 \pm 0.07	0.97 \pm 0.07	0.999
	Day 61-90		1.08 \pm 0.07	1.03 \pm 0.07	0.996

Lsmean \pm SE

Control group (n=5), VA : Vitamin A injection group (n=5)

あった。TDNやCPの摂取量は子牛の体重といった発育にとって重要な要素であると考えられる。本研究では哺乳ロボットを用いた代用乳多給の人工哺乳であり、代用乳によるTDN、CP給与量は日本飼養標準における養分量の大きい割合を満た

していた。そのため、両群は良好な発育を示し、群間での差が見られなかったと考えられる。

3.2 ビタミンA投与が子牛の血液成分値に及ぼす影響

供試牛の血液成分値について**Table 2**に示した。

Table 2 Effects of administration of vitamin A on blood plasma components in Japanese black cattle

			Control	VA	p-value
Total Protein	Day 0	g/dL	5.34 ± 0.32	5.50 ± 0.32	1.000
	Day 30		5.28 ± 0.32	5.18 ± 0.32	1.000
	Day 60		5.56 ± 0.32	5.60 ± 0.32	1.000
	Day 90		6.20 ± 0.32	6.22 ± 0.32	0.999
Albumin	Day 0	g/dL	2.04 ± 0.08	2.18 ± 0.08	0.896
	Day 30		2.66 ± 0.08	2.62 ± 0.08	1.000
	Day 60		2.94 ± 0.08	3.04 ± 0.08	0.980
	Day 90		2.96 ± 0.08	3.00 ± 0.08	1.000
Globulin	Day 0	g/dL	3.30 ± 0.28	3.32 ± 0.28	1.000
	Day 30		2.62 ± 0.28	2.56 ± 0.28	1.000
	Day 60		2.62 ± 0.28	2.56 ± 0.28	1.000
	Day 90		3.06 ± 0.28	3.22 ± 0.28	1.000
Blood Urea Nitrogen	Day 0	mg/dL	11.5 ± 1.0	8.9 ± 1.0	0.629
	Day 30		13.8 ± 1.0	11.26 ± 1.0	0.655
	Day 60		12.2 ± 1.0	12.1 ± 1.0	1.000
	Day 90		13.8 ± 1.0	12.4 ± 1.0	0.979
Triglyceride	Day 0	mg/dL	15.7 ± 4.8	20.3 ± 4.8	0.997
	Day 30		20.7 ± 4.8	20.1 ± 4.8	1.000
	Day 60		15.2 ± 4.8	24.6 ± 4.8	0.858
	Day 90		13.9 ± 4.8	10.4 ± 4.8	1.000
Total Cholesterol	Day 0	mg/dL	28.1 ± 7.6	29.2 ± 7.6	1.000
	Day 30		110.7 ± 7.6 ^a	162.1 ± 7.6 ^b	< 0.01
	Day 60		157.2 ± 7.6	179.1 ± 7.6	0.474
	Day 90		74.8 ± 7.6	102.8 ± 7.6	0.188
HDL-C	Day 0	mg/dL	18.6 ± 3.6	19.4 ± 3.6	0.997
	Day 90		73.0 ± 3.6 ^a	96.8 ± 3.6 ^b	< 0.01
AST	Day 0	U/L	58.6 ± 8.2	69.0 ± 8.2	0.984
	Day 30		43.4 ± 8.2	46.4 ± 8.2	1.000
	Day 60		55.0 ± 8.2	55.4 ± 8.2	1.000
	Day 90		77.6 ± 8.2	90.4 ± 8.2	0.951
Retinol	Day 0	IU/dL	24.0 ± 5.1	25.1 ± 5.1	1.000
	Day 7		40.4 ± 5.1	40.0 ± 5.1	1.000
	Day 15		26.1 ± 5.1	27.2 ± 5.1	1.000
	Day 30		46.8 ± 5.1	46.1 ± 5.1	1.000
	Day 45		39.4 ± 5.1	41.5 ± 5.1	1.000
	Day 60		36.6 ± 5.1	38.6 ± 5.1	1.000
	Day 75		41.2 ± 5.1	43.9 ± 5.1	1.000
	Day 90		64.9 ± 5.1	61.0 ± 5.1	1.000

Lsmean ± SE

Control group (n=5), VA : Vitamin A injection group (n=5)

a, b values with different superscript letters are significantly different ($p < 0.01$)

30日齢における投与群のT-Cholは 162.1 ± 7.6 mg/dLとなり、非投与群 110.7 ± 7.6 mg/dLよりも有意に高値となった ($p < 0.01$)。また、90日齢のHDLも同様に投与群で有意に高い値となった ($p < 0.01$)。一方、その他の一般血液成分値については、各日齢において群間での有意な差は認められなかった。さらに、血漿レチノール濃度も各日齢において群間での差は認められなかった。先行研究⁵⁾において、VA剤を投与するとコレステロールが高値を示すが、血漿VA濃度とコレステロール値との間に相関は見られなかったことが報告されており、今回の結果と一致していた。なお、発育期におけるVAの過剰な投与は骨格の発育異常をきたすハイエナ病を引き起こすことが報告されており^{6~8)}、本研究においても骨格の発育異常等の発生が危惧されたが、VAを投与した群において異常は見られなかった。これまでの報告で、ハイエナ病は若齢時に高単位のVAを連続的に投与されたことにより発症するとされているが、本研究では、VA投与を7日齢と30日齢の2回とし、かつ間隔を開けて投与しており、投与したVAの作用は一過性であったと思われる、本研究の方法どおり哺育中にVA (150,000IU) を2回筋肉投与してもハイエナ病を誘発しないと考えられる。

3.3 ビタミンA投与が子牛の骨格筋発達に及ぼす影響

供試牛における骨格筋の超音波診断値について Fig. 1 に示した。超音波による左後肢の大腿二頭筋の厚さの診断では、30、60日齢で投与群が非投与群より大きい値を示したが、90日齢では有意な差は見られなくなった。一方、第6-7肋間の胸最長筋断面積は各日齢群間で有意な差は認められなかった。筋肉部位間で異なった結果であったことから、VAの感受性が筋肉部位により異なることが示唆された。筋肥大には筋組織幹細胞である筋衛星細胞が不可欠である。筋衛星細胞は増殖して筋芽細胞へ分化し、互いに融合することで筋管へととなり、最終的に新しい筋線維へと分化成長することで筋肥大が生じることが知られている。IGF-1は主に肝臓より分泌され、骨格筋の筋衛星細胞の増殖に関与することが報告されている⁹⁾。VAを欠乏した黒毛和牛では血中IGF-1濃度が低いことが報告されており¹⁰⁾、VAはIGF-1濃度に関与していることが示唆される。また、筋衛星細胞は遅筋型の筋線維に多いことが知られており、さらに黒毛和種育成牛の大腿二頭筋は胸最長筋よりも遅筋型の割合が多いことが報告されている¹¹⁾。これらのことから、今回の大腿二頭筋の

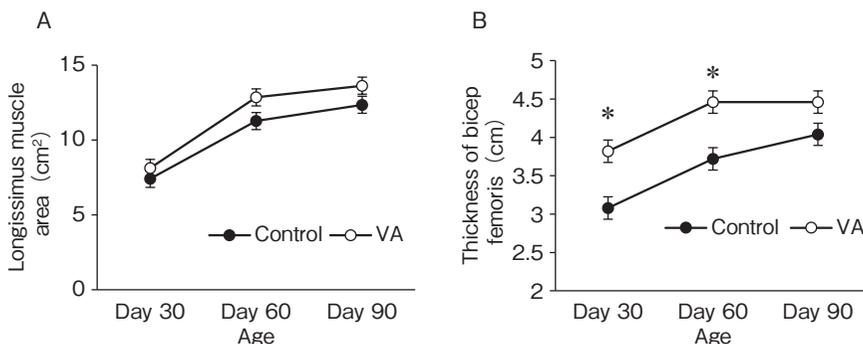


Fig. 1 Diagnosis of longissimus muscle area and thickness of bicep femoris by ultrasound. A : longissimus muscle area (cm²), B : thickness of bicep femoris (cm). Control group (n=5), VA : vitamin A injection group (n=5), The bar graph with an error bar indicates the lsmean value and standard error. * : $p < 0.05$ (Control vs VA)

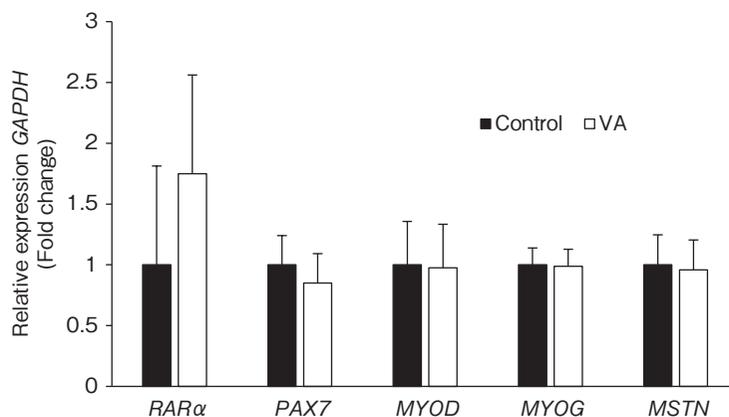


Fig. 2 Effects of administration of vitamin A on mRNA expression in Japanese black cattle.

RARα : retinoic acid receptor alpha, *MSTN* : myostatin, Control group (n=5), VA : vitamin A injection group (n=5), Values are shown as relative values of *GAPDH*. The bar graph with an error bar indicates the mean value and standard error.

発達における機序の1つとしてIGF-1の関与が考えられた。

90日齢の供試牛の大腿二頭筋における骨格筋関連遺伝子 (*RARα*, *PAX7*, *MYOD*, *MYOG*, *MSTN*) の発現について有意な差は今回認められなかった (Fig. 2)。ビタミンAの代謝産物であるレチノイン酸は筋細胞のPax3やMyoDを含んだシグナル伝達を行っている¹²⁾。先行研究²⁾では、アンガス種子牛へのVA投与により、*MYF5*, *MYOD*, *MYOG*の遺伝子発現が高くなることが報告されていることから、品種間でのVAに対する感受性が異なると考えられる。

3.4 今後の展望

本研究において黒毛和種子牛の大腿二頭筋はVA投与により厚みが増す可能性が示唆されたが、試験終了時 (90日齢) では群間の差が見られなくなった。本研究ではVA投与が7日齢および30日齢であり、試験終了時まで60日間の間が空いていたことが要因として考えられる。適切なVAの投与量および投与方法、投与時期について模索することで、より初期発育に富む素牛生産が可能となることが期待される。

4. 要 約

黒毛和種哺乳子牛におけるビタミンA (VA) 投与効果の報告は少なく、特に骨格筋発達に着目した報告は見られない。そこで、黒毛和種哺乳子牛にVAを筋肉内投与し、骨格筋発達および血液成分に及ぼす影響を検証した。黒毛和種子牛10頭を供し、VA非投与群5頭と投与群5頭に分けた。両群ともに7日齢で母子分離した後、90日齢まで哺乳ロボットによる哺乳を行い、投与群は7日齢および30日齢にVAを筋肉内投与した。経時的に体測および採血、超音波による骨格筋の診断を実施し、90日齢には大腿二頭筋から筋サンプルを採取し、骨格筋関連遺伝子発現について調べた。その結果、体重等の体測値について有意な差は認められなかった。また、90日齢における骨格筋関連遺伝子の発現に有意な差は見られなかったが、超音波診断によって投与群の大腿二頭筋が有意に厚いことが観察された。これらのことから、黒毛和種子牛へのVA投与は骨格筋の発達に寄与する可能性が示唆され、この効果を維持するためには継続的なVA投与や投与量の検討が必要であると考

えられた。

文 献

- 1) Akio Oka, Taiji Dohgo, Masakatsu Juen, Takemitsu Saito : *Animal Science Technology*, **69**, 90~99, 1998.
- 2) Bo Wang, Wei Nie, Xing Fu, Jeanene M de Avila, Yannan Ma, Mei-Jun Zhu, Martin Maquivar, Steven M Parish, Jan R Busboom, Mark L Nelson, Min Du : *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **9**, 82, 2018.
- 3) Caroline A. Schneider, Wayne S. Rasband, Kevin W. Eliceiri : *Nat Methods*, **9**, 671~675, 2012.
- 4) 日本飼養標準・肉用牛, 2008年版, 51~63, 社団法人中央畜産会, 東京, 2009.
- 5) T. W. Knight, A. F. Death : *Animal Science*, **69**, 607~612, 1999.
- 6) 高木久 : 東北家畜臨床研究会誌, **19**, 74~86, 1996.
- 7) 高木久, 藤田茂, 佐藤えれ子, 岡田幸助, 内藤善久 : 東北家畜臨床研究会誌, **16**, 22~28, 1993.
- 8) 加藤伸悦, 佐々木和夫, 佐々木良悦, 阿部博行, 山田稲生, 伊藤敦 : 日本獣医師会雑誌, **45**, 555~558, 1992.
- 9) Shuichi Machida, Frank W. Booth : *Proceedings of the Nutrition Society*, **63**, 337~340, 2004.
- 10) 石橋瑞穂, 牛之浜寛治, 上村俊一, 浜名克 : 日本獣医師会雑誌, **52**, 427~430, 1999
- 11) Takafumi Ggtoh : *Animal Science Journal*, **74**, 339~354, 2003.
- 12) Reijntjes, S., Francis-West, P., Mankoo, B. S. : *The International journal of developmental biology*, **54**, 125~134, 2010.

ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与が対馬地鶏肉用交雑鶏の発育および肉質に及ぼす影響

Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on development and meat quality of Tsushima-Jidori crossbred chicken for meat

深川 聡・松永 将伍

(長崎県農林技術開発センター)

Satoru Fukagawa and Shogo Matsunaga

(Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center)

This study demonstrated the use of residues of fermented loquat tea leaves, a heretofore unused resource, as feed. We investigated the residue effects on meat development and quality in meat-type cross chickens of a native variety : Tsushima-Jidori. Results show that the residues of fermented loquat tea leaves contained significantly less ($p < 0.01$) β -carotene, α -tocopherol, and total catechin than residues of green tea leaf infusion, although total polyphenol was significantly higher ($p < 0.01$) and DPPH radical-scavenging activity tended to be significantly higher ($p < 0.10$), indicating high antioxidant properties. When meat-type Tsushima-Jidori crossbred chickens were fed on a diet supplemented with 1.0% of residues of fermented loquat tea leaves for 4 weeks of the finisher period, the α -tocopherol content in the breast muscle was higher. An increase in the K value, which is an indicator of meat freshness, was suppressed. Drip loss was less than that of the control group without supplementation with residues of fermented loquat tea leaves, demonstrating that effects meat quality improvement can be expected.

1. 目 的

長崎県で入手可能な低・未利用資源の中で、緑茶製造残渣(緑茶粕)は、比較的抗酸化活性が高い¹⁾ことが明らかになっており、暑熱期において、飼料中に3%添加して給与することで、緑茶粕を添加していない飼料を給与した場合と比べて、保水性の高い豚肉¹⁾やハウユニット値の高い卵²⁾を生産できる可能性がある。しかし、緑茶粕は高水分であるため、配合飼料に混合するためには乾燥させて水分を低下させる必要がある。一

方、ビワ葉混合発酵茶は、長崎県農林技術開発センターが中心となって、「産・学・官」連携で開発した商品で、ヒトにおいて食後の血糖上昇の抑制や血中の中性脂肪濃度減少などの効果³⁾や内臓脂肪低減効果⁴⁾が報告されている。工場から製造される過程で篩を通らないものが加工残渣(ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣)として排出される。このビワ葉混合発酵茶製造加工残渣は乾燥されているため、取り扱いが容易であるものの、産業廃棄物として処理されており、飼料としてほとんど利用された実績がない。

そこで、未利用資源であるビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の一般成分や機能性成分を緑茶粕と比較調査するとともに、仕上げ期の対馬地鶏肉用交雑鶏にビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を添加した飼料を給与し、発育成績および肉質に及ぼす影響を明らかにすることを本研究の目的とした。

2. 方法

2.1 飼料分析

ビワ葉発酵茶製造加工残渣は、乾燥・粉碎されているものをそのまま使用し、緑茶粕は80℃で48時間通風乾燥して、1mmの篩を通るように粉碎し、各分析項目とも3点ずつ分析した。分析項目は、一般成分と機能性成分とし、機能性成分ではβカロテン含量、α-トコフェロール含量、総ポリフェノール含量、総カテキン含量（エピカテキン、エピガロカテキン、エピカテキングレードおよびエピガロカテキングレードの合計値）およびDPPHラジカル消去活性を調査した。βカロテン含量およびα-トコフェロール含量は食品分析法⁵⁾、総ポリフェノール含量は鈴木ら⁶⁾、カテキン類は後藤⁷⁾およびDPPHラジカル消去活性は柚木崎ら⁸⁾に各々準じて分析した。

2.2 供試動物および実験計画

動物実験は「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」(環境省2006)に則り行った。

本試験にビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の添加割合を検討するために、対馬地鶏原種の雌に2020年8月13日～9月10日(18週齢～21週齢)までの4週間、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を配合飼料(CP13.0%, ME2,850kcal)に0%, 0.25%, 0.5%および1.0%を添加して給与し、1.0%までの水準でも増体や飼料摂取量に影響がないことを確認した。

2020年7月29日餌付けの対馬地鶏肉用交雑鶏の

雄120羽を用い、餌付けから試験終了まで長崎県農林技術開発センター内のウインドレス鶏舎で平飼いとされた。試験期間は2020年9月30日～10月27日(9週齢から12週齢)までの4週間とし、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を配合飼料(CP16.5%, ME2,990kcal)に重量比1%を出荷前4週間の仕上げ飼料として給与するビワ葉混合発酵茶区と配合飼料のみを給与する対照区との2区を設け、1区20羽の各区3反復の乱塊法に配置した。

2.3 発育成績、解体成績および肉質分析

試験期間中(9週齢～12週齢)における発育成績(試験開始時体重、試験終了時体重、飼料摂取量、飼料要求率、増体量、生存率および生産指数)を調査した。解体調査は13週齢の体重が区の平均値に比較的近い4羽を選び、18時間絶食させた後、と体を解体して、正肉重量(ムネ、モモ、ササミ)、組織重量(心臓、肝臓、筋胃、および腹腔内脂肪量)および色差計を用いて浅胸筋の肉色を測定した。肉質分析には解体後、5℃の冷蔵庫で24時間静置した左浅胸筋を4cm×2cm×1.5cmに切り出して加熱損失率およびさらに24時間冷蔵庫で静置した時のドリップロス(%)を調査した。残った部位はプロセッサを用いてミンチ状にし、α-トコフェロール含量、遊離アミノ酸組成、核酸含量を調査した。TBARSは右浅胸筋を用い、解体してから24時間後をDay 0として冷蔵保存期間をDay 1, Day 3およびDay 5とし、肉片を切り出して分析に供した。加熱損失率は「食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル」(I. 理化学分析)⁹⁾、ドリップロスは井尻ら¹⁰⁾、α-トコフェロール含量はFaustman¹¹⁾、遊離アミノ酸組成はAzuma¹²⁾、核酸含量は「食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル」(I. 理化学分析)⁹⁾およびTBARSはOhkawa¹³⁾に各々準じて分析を行った。なお、ATP関連化合物含量(ATP、

ADP, AMP, IMP, InoおよびHyp) に占める InoおよびHypの割合を求め、その合計値をK値として表した。

2.4 食味官能評価

ビワ葉混合発酵茶区および対照区の浅胸筋から3 cm × 1.5 cm × 1.0 cm (筋繊維は3 cmの方向に走る) に切り出し、230℃に設定したホットプレートで表裏それぞれ4分30秒調理して官能評価に供した。訓練されていない一般パネル31名に「味や香り」、「食感」および「全体評価」の嗜好性を「非常に好ましい、とても好ましい、まあまあ好ましい、どちらかと言えば好ましい、どちらかと言えば好ましくない、好ましくない、とても好ましくない、非常に好ましくない」の8段階で評価させる評点法を実施した。

2.5 統計処理

飼料分析、発育成績、解体成績および肉質分析の調査項目は、t検定により平均値の差の検定を行った。なお、百分率で表記した値はアークサイン変換後、t検定を行った。飼料成分は標本データから母集団の成分のバラツキを推定するために、平均値 ± 不偏標準偏差 (SD) で表示した。発育成績、解体成績および肉質については、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与による各パラ

メーターの平均値の違いを示すために、平均値 ± 標準誤差 (SE) で表示した。また、食味官能評価の嗜好点は8段階の評価を1～8点に評点付けし、評点を応答変数、提示順序および肉の種類を固定効果、パネリストをランダム効果とした線形混合モデル分散分析によって解析し、最小二乗平均値 ± SEで表示した。

3. 結果と考察

3.1 一般成分および機能性成分

一般成分および機能性成分の各含量をTable 1に示した。ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣は、緑茶粕と比べて、粗繊維含量に有意差はなかったが、粗タンパク質含量および粗脂肪含量が1%水準で有意に低く、粗灰分含量が1%水準で有意に高い値であった。蔡ら¹⁴⁾は、緑茶製造残渣の粗タンパク質含量は乾物で27～28%と高く、良質な飼料であることを報告している。今回、供試した緑茶粕 (緑茶製造残渣) の粗タンパク質含量はTable 1に示したように34.5%と7ポイント程度高い値であったが、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の24.9%と比べるとほぼ同程度の値であり、ビワ葉発酵茶製造加工残渣についても良質な飼料となる可能性が認められた。

Table 1 Chemical composition and functional ingredients in residues of fermented loquat and green tea infusions.

Fraction	Compound	Residues of fermented loquat tea leaves	Residues of green tea leaves infusion
Chemical composition	Crude protein (%DM)	24.9 ± 0.02 ^{B1)}	34.5 ± 1.35 ^A
	Crude fiber (%DM)	15.1 ± 2.31 ^{ns}	17.7 ± 1.01 ³⁾
	Crude fat (%DM)	2.59 ± 0.08 ^B	5.20 ± 0.13 ^A
	Crude ash (%DM)	5.63 ± 0.12 ^A	3.48 ± 0.08 ^B
Functional ingredients	α-tocopherol (μg/g)	4.33 ± 0.09 ^B	13.1 ± 0.66 ^A
	β-carotene (μg/g)	0.96 ± 0.04 ^B	39.1 ± 1.71 ^A
	Total catechins (mg/g)	10.0 ± 1.58 ^B	40.4 ± 1.85 ^A
	Total polyphenol (mg/g)	209.1 ± 31.9 ^A	113.1 ± 26.8 ^B
	DPPH radical-scavenging activity (μM TE ^{2)/g}	396.8 ± 22.2 ^a	324.1 ± 41.4 ^β

1) Values with different capital letters (A, B) and Greek alphabets (α, β) within the same row differ significantly at the 1% and 10% levels, respectively, by the Student t-test (ns: not significant).

2) TE: Trolox Equivalent.

3) Means ± SD.

β カロテン含量, α -トコフェロール含量および総カテキン含量では, ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣が緑茶粕に比べて1%水準で有意に低い値であったが, 抗酸化活性の指標となるDPPHラジカル消去活性が10%水準で有意に高い傾向にあった。これは, 総ポリフェノール含量において, ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣が, 緑茶粕よりも1%水準で有意に高い値であったことと関係していると考えられた。

総カテキン含量では, ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣が緑茶粕よりも有意に低い値であったのにも関わらず, 総ポリフェノール含量では逆の傾向となった。この理由として, 緑茶粕のポリフェ

ノールのほとんどはカテキン類であるのに対して, ビワ葉混合発酵茶ではカテキン類とカテキン類の酸化重合により生成される紅茶ポリフェノールの両方を含み, 他の茶では検出されない比較的分子量の小さい高分子ポリフェノールを含んでいるという特徴³⁾があるためと考えられた。

3.2 発育成績, 解体成績および肉質成績 (加熱損失率およびTBARS)

ビワ葉混合発酵茶区および対照区の発育成績, 解体成績および肉質成績をTable 2に示した。試験開始時体重, 試験終了時体重, 増体量, 飼料摂取量, 飼料要求率, 生存率および生産指数のいずれの調査項目において, 両区に有意差は認められ

Table 2 Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on growth performance parameters, weight and meat quality.

Measurements	Control	Examines	p-value
Growth performance parameters			
Initial body weight (g)	2186.50 \pm 6.22 ¹⁾	2189.67 \pm 5.53	ns
Final body weight (g)	3327.83 \pm 90.2	3284.17 \pm 15.7	ns
Body weight gain (g)	1141.33 \pm 93.0	1094.50 \pm 11.8	ns
Feed intake (g)	154.66 \pm 6.32	150.71 \pm 4.73	ns
Feed conversion ratio	3.67 \pm 0.16	3.72 \pm 0.10	ns
Survival rate	100 \pm 0	100 \pm 0	ns
Production score	115.67 \pm 14.06	109.08 \pm 2.69	ns
Weight of tissues			
Breast muscle (g)	384.42 \pm 6.84	389.02 \pm 7.25	ns
Breast tender muscle (g)	101.72 \pm 1.58	100.95 \pm 2.51	ns
Leg muscle (g)	709.60 \pm 6.31	717.14 \pm 4.38	ns
Liver (g)	16.17 \pm 0.25	15.57 \pm 0.25	ns
Heart (g)	42.83 \pm 1.21	43.96 \pm 0.81	ns
muscular stomach (g)	39.32 \pm 1.54	36.33 \pm 1.09	ns
Abdominal fat tissue (g)	102.25 \pm 8.10	93.25 \pm 14.55	ns
Meat quality			
Color of breast muscles			
L*	49.45 \pm 0.87	48.32 \pm 0.99	ns
a*	1.99 \pm 0.38	1.79 \pm 0.09	ns
b*	10.60 \pm 0.72	10.57 \pm 0.21	ns
Cooking loss (%)	18.51 \pm 0.36	18.27 \pm 0.22	ns
TBARS (nmol/mg protein)			
Day1	1.21 \pm 0.38	1.06 \pm 0.35	ns
Day3	1.43 \pm 0.31	1.40 \pm 0.30	ns
Day5	2.13 \pm 0.82	2.56 \pm 0.97	ns

1) Means \pm SE (ns : not significant).

なかった。佐々木および出口¹⁵⁾は茶を粉碎して1.0%添加した飼料を銘柄鶏「伊勢赤どり」(シェーパーロッド種)に11~16週齢まで給与すると、茶を添加していない対照区と比べて、1%あるいは5%水準で有意に増体量が低下したことを報告しており、茶に含まれるカテキン類が渋味を有するので、鶏の嗜好性を低下させたのではないかと考察している。本研究で使用したビワ葉混合発酵茶製造加工残渣は、Table 1で示したように緑茶粕よりも総カテキン量が有意に少ないため、1.0%添加では飼料摂取量に影響せず、増体量において対照区と同等であったと考えられた。

正肉重量、組織重量、腹腔内脂肪量、加熱損失率およびTBARSのいずれの調査項目においても両区に有意差は認められなかった。茶葉1.0%添加飼料¹⁵⁾を銘柄鶏に、茶殻2.5%添加飼料¹⁶⁾をブロイラーに各々給与した結果、無添加の対照区と比べて、腹腔内脂肪量が有意に低下したことが報告されている。本研究では、ビワ葉混合発酵茶を1.0%添加した飼料の給与が飼料摂取量や増体量に影響しなかったため、腹腔内脂肪量において対照区との間に有意差が認められなかったと考えられた。

3.3 肉質成績 (α -トコフェロール, K値およびドリップロス)

ビワ葉混合発酵茶区および対照区の肉質成績(α -トコフェロール含量, K値およびドリップロス)をFig. 1に示した。ビワ葉混合発酵茶区は対照区と比べて、浅胸筋において、肉の新鮮度を示すK値(14.95 \pm 0.96% vs. 18.02 \pm 0.96%)およびドリップロス(9.94 \pm 0.10% vs. 10.62 \pm 0.20%)が5%水準で有意に低い値であった。これは、浅胸筋中の α -トコフェロール含量(2.70 \pm 0.14 vs. 2.15 \pm 0.16)が5%水準で有意に高かったことと関係していると考えられた。

ビワ葉混合発酵茶区および対照区の浅胸筋中の遊離アミノ酸含量をTable 3に示した。ビワ葉混合発酵茶区は対照区と比べて、ヒスチジンが5%水準で有意に低い値となり、アルギニン、アラニンおよびチロシンにおいて10%水準で低い傾向であった。そのうち、ヒスチジン、アルギニンおよびアラニンは鶏の必須アミノ酸であることから、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の摂取により体内におけるアミノ酸の合成に影響があったと考えられた。

3.4 食味官能評価

食味官能評価の結果をTable 4に示した。それぞれの項目についてビワ葉混合発酵茶区と対照区

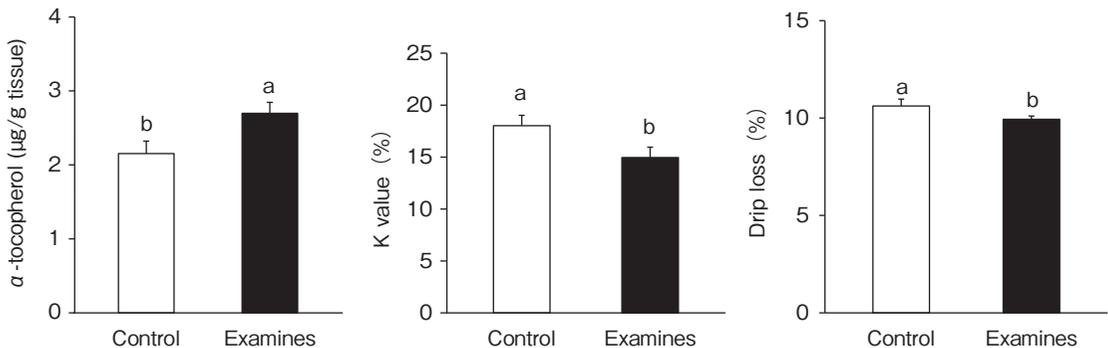


Fig. 1 Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on α -tocopherol, K-value and Drip loss in the breast muscle of Tsushima-Jidori crossbred chickens. Result are expressed as Means \pm SE. Symbols with different small letters (a, b) denote significantly at the 5% levels, by the student t-test.

Table 3 Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on free amino acids in the breast muscle of Tsushima-Jidori crossbred chickens.

Amino acids (mg/100g)	Control	Examines	p-value
Aspartic acid	5.40 ± 0.35 ¹⁾	4.90 ± 0.29	ns
Glutamic acid	11.38 ± 0.69	10.54 ± 0.45 ²⁾	ns
Asparagine	3.27 ± 0.20	3.34 ± 0.20	ns
Serine	10.32 ± 0.39	10.43 ± 0.36	ns
Glutamine	42.19 ± 2.94	39.76 ± 1.84	ns
Histidine	2.85 ± 0.17 ^a	2.27 ± 0.18 ^b	<0.05
Glycine	5.51 ± 0.15	5.26 ± 0.26	ns
Threonine	5.91 ± 0.21	5.73 ± 0.44	ns
Arginine	7.18 ± 0.32 ^α	6.31 ± 0.41 ^β	<0.1
Alanine	93.84 ± 1.86 ^α	88.47 ± 2.67 ^β	<0.1
Carnosine	363.87 ± 15.53	367.58 ± 17.14	ns
Tyrosine	6.96 ± 0.60 ^α	5.91 ± 0.62 ^β	<0.1
Valine	5.34 ± 0.18	4.92 ± 0.14	ns
Methionine	4.12 ± 0.35	3.85 ± 0.10	ns
Norvaline	20.11 ± 0.91	20.58 ± 0.70	ns
Cystine	75.25 ± 4.83	81.92 ± 4.86	ns
Tryptophan	49.76 ± 1.82	44.15 ± 1.69	ns
Phenylalanine	4.85 ± 0.17	4.33 ± 0.17	ns
Isoleucine	3.96 ± 0.19	3.72 ± 0.12	ns
Leucine	8.86 ± 0.38	8.10 ± 0.34	ns
Lysine	5.97 ± 0.62	5.74 ± 0.35	ns
Proline	3.32 ± 0.39	3.08 ± 0.65	ns

1) Values with small letters (a, b) and Greek alphabets (α , β) within the same row differ significantly at the 5% and 10% levels, respectively, by the Student t-test (ns : not significant).

2) Means ± SE.

Table 4 Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on sensory characteristics of Tsushima-Jidori crossbred chicken breast.

	Control	Examines	p-value
Taste and Odor	5.16 ± 0.58 ¹⁾	5.18 ± 0.58	ns
Texture	4.77 ± 0.61	4.99 ± 0.61	ns
Overall judgment	4.96 ± 0.56	5.33 ± 0.56	ns

1) Least square means ± SE (ns : not significant).

では浅胸筋の嗜好性に差は見られなかった。肉質において遊離アミノ酸含量および肉質のK値およびドリップロスで有意差が認められたものの、消費者の嗜好性には影響を及ぼさなかったと考えられた。

以上のことから、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を1.0%添加した飼料を対馬地鶏肉用交雑鶏の仕上げ期4週間に給与すると、ビワ葉混合発酵茶

製造加工残渣を添加していない飼料を給与した場合と比べて、飼料摂取量および増体量などの発育成績や正肉重量および組織重量などの解体成績に影響を及ぼさず、浅胸筋中のK値の上昇を抑制し、ドリップロスを低減でき、肉質の改善効果が期待できることが示された。これまで利用されていなかったビワ葉混合発酵茶製造加工残渣が、対馬地鶏肉用交雑鶏の飼料として利用できる可能性

が認められた。

4. 要 約

本研究では、未利用資源であるビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の飼料としての可能性を明らかにし、対馬地鶏肉用交雑鶏の発育および肉質に及ぼす影響について調査した。ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣は、緑茶粕と比べて、βカロテン含量、α-トコフェロール含量および総カテキン含量は有意に低い値 ($p < 0.01$) であったが、総ポリフェノール含量が有意に高く ($p < 0.01$)、DPPHラジカル消去活性が有意に高い傾向 ($p < 0.10$) にあったことから、高い抗酸化機能を有することが明らかとなった。ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を1.0%添加した飼料を対馬地鶏肉用交雑鶏の仕上げ期4週間に給与すると、ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を添加していない対照区と比べて、発育成績や解体成績に影響を及ぼさず、浅胸筋中のα-トコフェロール含量を高め、肉の鮮度の指標となるK値の上昇を抑制し、ドリップロスを低減できることから、肉質の改善効果が期待できることが示された。

謝 辞

本研究の実施にあたり、ビワ葉発酵茶製造加工残渣は株式会社サンダイ、緑茶粕はJA全農長崎大村果汁工場より各々提供して頂いた。また、機能性成分および肉質の分析手法については、鹿児島大学農学部の井尻大地准教授にご指導およびご助言頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。

文 献

1) 深川聡：農林水産省 研究成果発表会資料，地球

温暖化時代の日本の農業・水産業，農林水産議会事務局他，146，2018。

https://www.naro.affrc.go.jp/org/niaes/ccaff/conference2018/index_1.html

- 2) 高木英恵，深川聡，嶋澤光一：九州沖縄農業試験研究，2018。
http://www.naro.affrc.go.jp/laboratory/karc/prefectural_results/files/30_3_13.pdf
- 3) 田中一成，湯浅正洋，山本咲暁子，大曲勝久，宮田裕次，玉屋圭，田中隆：薬理と治療，44，1613～1619，2016。
- 4) 田中一成，湯浅正洋，山本咲暁子，大曲勝久，宮田裕次，玉屋圭，吉野豊，小野博之，丸勇史，山村春男：薬理と治療，46，539～547，2018。
- 5) 文部科学省：日本食品標準成分表2015年版（七訂）分析マニュアル，第3章ビタミン類，88～93，2016。
https://www.mext.go.jp/component/a_menu/science/detail/_icsFiles/afiedfile/2016/03/25/1368932_03_1.pdf
- 6) 鈴木誠，渡辺敏郎，三浦麻子，原島恵美子，中川靖枝，辻啓介：日本食品科学工学会誌，49，71～75，2002。
- 7) 後藤哲久：食品機能研究法，東京，pp328-331，2000。
- 8) 柚木崎千鶴子，酒井美穂，小阪妙子，堂園眞澄，窄野昌信，福田亘博：日本食品科学工学会誌，55，293～298，2008。
- 9) 家畜改良センター：技術マニュアル「食肉の理化学分析及び官能評価マニュアル」（I. 理化学分析），18～76，2010。
- 10) 井尻大地，宝蔵直樹，島元紗希，川口真奈，古川愛理，多田司，友永省三，中島一樹，大塚彰：日畜会報，89(2)，191～198，2018。
- 11) Faustman, C., Cassens, R. G., Schaefer, D. M., Buege, D. R., Williamms, S. N., Scheller, K. K. : *Journal of Food Science*, 54, 858～862, 1989.
- 12) Azuma, K., Hirao, Y., Hayakawa, Y., Murahata, Y., Osaki, T., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y., Ito, N. : Application of pre-column labeling chromatography for canine plasma-free amino acid analysis, *Metabolites*, 6(1), 3, 2016.
- 13) Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction., *Anal Biochem*, 95, 351～358, 1979.
- 14) 蔡義民，増田信義，藤田泰仁，河本英恵，安藤貞：日本畜産学会報，72，536～541，2001。
- 15) 佐々木健二，出口裕二：三重県農業技術センター研究報告，23，69～72，1995。
- 16) 金子国雄，迫宏一，飛佐学，木戸康博，古瀬允宏，六車三治男：日本家禽学会誌，42，153～158，2005。

暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレイクスルー： 筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化（不活化） の関与の検証（Ⅱ）

Breaking-through the heat stress-induced suppression of postnatal muscle growth : possible implication of nitration of myogenic stem cell activation factor HGF (part II)

辰巳 隆一・増原 夏海・Mohamed Zakaria Elhussiny・
Vishwajit Sur Chowdhury・Alaa Elgaabari¹・城戸 潤力・今富 奈々・
関 美弓・松吉 祐児・鈴木 貴宏・中村 真子・古瀬 充宏

(九州大学大学院農学研究院, ¹Kafrelsheikh University, Egypt)

Ryuichi Tatsumi, Natsumi Masuhara, Mohamed Zakaria Elhussiny, Vishwajit Sur Chowdhury,
Alaa Elgaabari¹, Hirochika Kido, Nana Imatomi, Miyumi Seki, Yuji Matsuyoshi, Takahiro Suzuki,
Mako Nakamura and Mitsuhiro Furuse

(Graduate School of Agriculture, Kyushu University, ¹Kafrelsheikh University, Egypt)

Hepatocyte growth factor (HGF) is known to be an essential factor that activates quiescent myogenic stem satellite cells to enter the cell cycle and contributes to *postnatal* muscle growth and regeneration after injury. Very recently, we found that recombinant HGF is nitrated by incubation with peroxynitrite (ONOO⁻: a highly reactive biomolecule generated by reaction of NO and superoxide radicals) to lose the biological activity *in vitro* in a mole-ratio (HGF : peroxynitrite) dependent manner. The subsequent experiments showed that nitration of HGF has clear pH dependence with a maximum range at pH 7.2-7.4 and the reaction occurs quickly within a few seconds after adding of peroxynitrite to recombinant HGF. These emerging results were obtained by ECL-Western blotting and may provide physiological significance of HGF nitration that abolishes satellite cell activation and the subsequent cell proliferation. Here we show that nitration of extracellular and intracellular HGF was detected in calf muscle of 6-day-old male ROSS chicks (broiler : *Gallus gallus domesticus*) that received acute heat-stress for 3 days (housing at 36°C for 5 hr and 28°C at the subsequent 19 hr in a day), as revealed by comparable direct-immunofluorescence microscopy of control (housing at 28°C) and heat-stressed samples stained with monoclonal antibody against nitrated HGF. Importantly, nitration of HGF was abundant for fast (type II) myofibers as revealed by immunostaining of serial cryo-sections with anti-slow myosin heavy chain antibody. More results on this novel finding await further study including species (broilers and hens), sex (male and female), housing temperature, duration of heat-stress, and muscles (breast, thigh and calf muscles), and may help in developing a novel strategy for application in meat production technologies and human sports science.

1. 目 的

地球温暖化の進行に伴い、特に家禽産業において、夏季の暑熱環境における肉用鶏の産肉量・肉質低下は経済的損失を招く深刻な問題であり、これを抑制する研究の進展は急務である。暑熱環境下の家禽で生じる代謝反応として、呼吸性アルカローシス、酸化ストレス（活性酸素種の生成）の増加、筋タンパク質分解の亢進があげられる。このうち、酸化ストレスと筋タンパク質分解亢進は産肉量や肉質を低下させる要因と考えられているが、それらの作用機構を含めた詳細は依然として不明である。

一方、骨格筋の成長（および肥大、萎縮、再生）は筋幹細胞（衛星細胞）の活性化とこれに続く増殖の活性に大きく依存していることが知られている^{1~5)}。申請者は、衛星細胞の増殖活性を決定する活性化（休止期からG 1期への復帰）と休止化（セルフリニューアル）の制御機構に関する一連の研究の過程で、「筋幹細胞の活性化の抑制機構」の存在を洞察し、これが活性化因子HGF（肝細胞増殖因子；現在認知されている唯一の活性化因子）のチロシン残基のニトロ化による不活化であることを明らかにした（論文投稿準備中）。

タンパク質のニトロ化とは、芳香族アミノ酸（主にチロシン残基のε位の炭素）にNO₂基が導入される翻訳後化学修飾であり、生体内においては、NOラジカルと活性酸素の反応により速やかに生成するペルオキシナイトライト（ペルオキシ亜硝酸イオン：高反応性の短寿命の生体内分子）によって非酵素的にニトロ化が起こることが知られている（NO基が導入されるニトロソ化とは異なる）。HGFは衛星細胞の増殖も促進するので、家畜・家禽の成長期、特に、衛星細胞のほとんどが増殖期にある肉用鶏の初期成長期においては、HGFのニトロ化（不活化）は筋の成長を著

しく阻害すると考えられる。また、HGFは線維芽細胞の増殖を抑制する働きもあるので、HGFのニトロ化（不活化）は筋肉内結合組織の過剰な発達を招き、結果として産肉量や肉質（軟らかさ）が低下すると予想される。

一昨年度の貴財団研究助成を受け、ペルオキシナイトライトによるHGFのニトロ化は顕著な対HGFモル比依存性（反応時のHGF：ペルオキシナイトライトのモル比）のほか、pH 7.2-7.4を至適とするpH依存性や数秒でニトロ化反応が完了する高反応特性を有することを明らかにした（令和元年度研究成果報告書参照）。これらの実験結果は、HGFのニトロ化が生理学的現象に密接に関わっていることを示唆するものである。本研究では初年度に続き、「暑熱ストレスによって上述の衛星細胞活性化・増殖因子HGFがニトロ化・不活化する」という作業仮説を、新規ツールであるニトロ化HGFに対する特異的モノクローナル抗体（一昨年度末に作出済み）を用いてさらに検証した。

2. 方 法

2.1 肉用鶏の暑熱感作（実験動物）

室温28℃で育雛した6日齢の雄性肉用鶏（ROSS：*Gallus gallus domesticus*）を湿度60±5%、室温36℃で5時間飼育し暑熱ストレスを負荷した後、室温28℃で19時間飼育した。この暑熱負荷操作を3日間繰り返した後、頸動脈放血によりと鳥し、ふくらはぎの筋肉を採取した。試料はマイナス80℃で凍結保存した。対照区の飼育温度は28℃とした。本研究に関するすべての動物実験は九州大学動物実験委員会の審査・承認の下、実施した（承認番号：A23-047）。

2.2 筋肉内のニトロ化HGFの可視化

常法に従い、厚さ20μmの凍結筋切片を作成し蛍光免疫顕微鏡法に供試した。使用した抗ニトロ

化HGF特異的モノクローナル抗体は、ヒト・マウス・ラットHGFのクリングルドメイン2のチロシンのニトロ化（ニトロチロシン）を特異的に認識するもので、その特異性はWestern blottingとELISAで確認済みである。また、鶏のHGF部分ペプチド（クリングルドメイン2のチロシンを含む13残基の合成ペプチド）のニトロ化を検出することもELISAで確認した（data not shown）。ラット凍結筋切片の蛍光免疫染色での反応性は充分であったので（論文投稿準備中）、この抗体を蛍光物質（ALEXA）で標識し蛍光免疫顕微鏡法に使用した（2次抗体は必要としない）。

3. 結果と考察

3.1 暑熱ストレス負荷によってHGFはニトロ化されるか（*in vivo*実験）

6日齢の雄性肉用雛鶏を室温36℃で5時間飼育し暑熱ストレスを負荷した（3日間連続処理；対照区の飼育温度は28℃）。5時間の暑熱ストレス負荷直後の直腸温度が有意に約2℃上昇し（ $p < 0.01$, $n = 6$ /グループ）、またストレス応答ホル

モンであるコルチコステロン濃度の増加も認められたことから、雛鶏が暑熱感作されたことが確認された。

採取したふくらはぎの筋肉の凍結切片を蛍光標識抗ニトロ化HGF特異的モノクローナル抗体で染色すると、筋線維の周囲（細胞外マトリックス）および細胞質が陽性反応を示し、その蛍光強度は対照区に比べて明らかに高いことが認められた（Fig. 1； $n = 3$ /グループ）。したがって、暑熱ストレス負荷によって筋肉内に存在する衛星細胞活性化・増殖因子HGFがニトロ化され不活化することが明らかになった。暑熱感作温度・時間、ニワトリの日齢などの条件を変えてさらに詳細な基礎データを集積することにより、暑熱ストレス負荷による筋肉内HGFのニトロ化・不活化による筋の初期成長障害が、より明確になると期待された。

3.2 HGFのニトロ化・不活化と筋線維型との関係性

暑熱ストレス負荷によるHGFのニトロ化は同一筋でも部位によって強弱があることが先のFig.

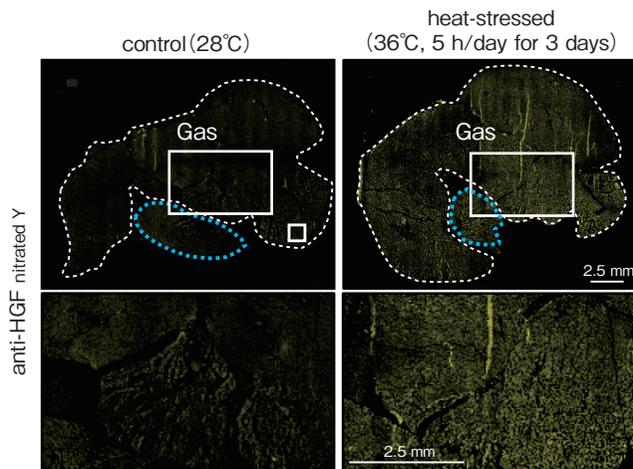


Fig. 1 Nitration of HGF in calf muscle by heat-stress treatment of broiler chicks. Cryosections of calf muscle were stained with Alexa-labeled anti-nitrated HGF (nitrated Y) monoclonal antibody. Gas, gastrocnemius muscle (white dotted line). Blue dotted line, other muscle group in calf muscle. Lower panel, boxed areas of upper panels.

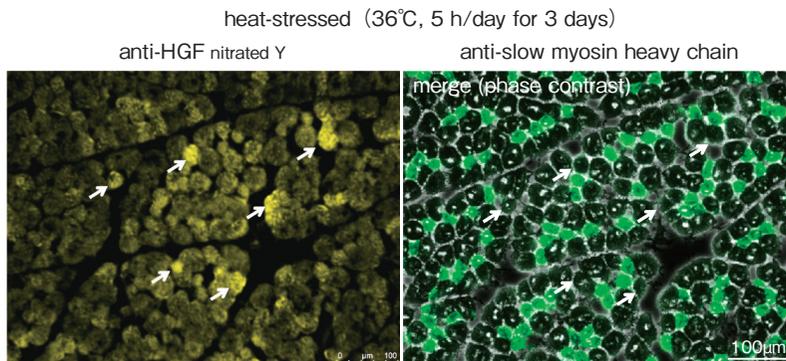


Fig. 2 Close relationship between slow/fast fiber types and nitration of HGF in broiler chick calf muscle. Serial cryo-sections of calf muscle were single-stained with Alexa-labeled anti-nitrated HGF (left) and anti-slow myosin heavy chain monoclonal antibodies (right), respectively. Typical nitrated HGF-positive fibers were indicated by arrows.

1で観察された。筋肉中のHGFの存在量とは関係はないことは、抗HGF抗体(SantaCruz Biotech.社製：HGFのN末端のNK1領域を認識するモノクローナル抗体で鶏HGFを認識することを確認済み)による蛍光免疫染色像との比較から明らかであった。そこで、筋線維型(速筋型・遅筋型)と関係性があると予想し、連続切片を遅筋型myosin重鎖(遅筋型筋線維のマーカー)に対する抗体で蛍光免疫染色した。Fig. 2に示すように、緑色の蛍光で可視化された遅筋型筋線維ではない筋線維、すなわち、速筋型筋線維のニトロ化が顕著であった。したがって、速筋型筋線維は遅筋型筋線維に比べてHGFのニトロ化を受けやすいことが分かった。この知見は、暑熱ストレスが負荷されると速筋型筋線維の初期成長は阻害されやすいことを示唆しており、速筋型筋線維を主体とする鶏胸肉の初期成長・肥大に及ぼす影響は大きいと予想された。

現時点では、暑熱ストレスによるHGFのニトロ化・不活化が鶏の初期筋成長阻害の主要因であるとの直接的な証明はできていないが、前述どおり、衛星細胞の活性化・増殖因子であるHGFがニトロ化・不活化すると筋線維の成長や肥大が直

接的に阻害されることは明らかであるので、HGFのニトロ化・不活化の抑制が暑熱対策の重要なターゲットになると確信している。

4. 要 約

本研究により、肉用雛鶏に暑熱ストレスを負荷すると筋肉内に存在する筋幹細胞(衛星細胞)活性化・増殖因子HGFがニトロ化され不活化することが明らかになった。この現象は速筋型筋線維で顕著であることから、速筋型筋線維がきわめて優勢な鶏胸肉の生産に及ぼす影響は大きいと予想された。衛星細胞の活性化・増殖因子であるHGFがニトロ化・不活化すると筋線維の初期成長・肥大が直接的に阻害されることは明らかであるので、HGFのニトロ化・不活化を抑制することが、夏季の暑熱環境における産肉量・肉質低下を改善する新しい飼育・管理技術の鍵になると期待される。

文 献

- 1) Allen, R. E., Temm-Grove, C. J., Sheehan, S. M., Rice, G. M.: *Methods in Cell Biol.*, 52, 155~176, 1997.
- 2) Tatsumi, R., Anderson, J. E., Nevoret, C. J.,

- Halevy, O., Allen, R. E. : *Dev. Biol.*, **194**, 114~128, 1998.
- 3) Tatsumi, R., Hattori, A., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Allen R. E. : *Mol. Biol. Cell*, **13**, 2909~2918, 2002.
- 4) Tatsumi, R., Allen, R. E. : *Anim. Sci. J.*, **79**, 279~290, 2008.
- 5) Tatsumi, R. : *Anim. Sci. J.*, **81**, 11~20, 2010.

家畜糞の分解効率に関わる土壌・糞中微生物の関連性 ～多様性と量の謎を解く～

Relationship between microbiomes related to the decomposition efficiency
of livestock dung –the importance of diversity and the abundance–

内田 義崇・龍見（岩岡） 史恵

（北海道大学大学院農学研究院）

Yoshitaka Uchida and Chikae Tatsumi (Iwaoka)

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

This study aimed to evaluate the bacterial abundance and diversity in soils and livestock excreta, sampled from dairy farms in Hokkaido, Japan. The decomposition of dung on grazed pasture soils is very important to sustain pastoral growth rates because the pasture covered by dung reduces its growth rate, temporarily. As a control factor of the decomposition rates of dung on soils, microbiomes both in dung and in soils are important, but their contribution to the decomposition is not well understood. Also, the identification of key microbes related to the rates of dung decomposition can be useful to establish feed or soil management techniques to utilize the pasture more efficiently. We sampled dairy cow dung and grazed pasture soils from fifteen farms across Hokkaido, Japan (with four replicates per sample type). We extracted their DNA and investigated for their bacterial abundance using a qPCR approach. Also, the bacterial community structures were determined by an amplicon sequencing approach, targeting the 16S rRNA region. The decomposition rates of dung were measured by incubating the soil in a plastic cup with dung applied on top, placing each cup in a bottle with cap and sampling gases over time to measure an increase in carbon dioxide concentrations. In results, the soil and unexpectedly, dung microbiomes showed regional similarity, when the samples from east, north and central Hokkaido were compared. The dung microbial diversities might be weakly correlated to the decomposition rates of the dung on soils, but further experiments are needed to confirm this.

1. 目 的

本研究は、家畜糞が土壌表面で分解する際の、「土壌微生物」と「家畜糞中微生物」それぞれの増減や多様性の変化を調べ、家畜糞が効率よく分解する土における二つの異なる微生物群集の役割を明らかにすることを目的とした。畜産業におい

て、放牧は糞尿や飼料管理に関わる労力を減らす観点から注目されている。しかし、排出される糞が固まりとなり牧草表面を覆い、その生育を阻害する可能性がある放牧では、糞が土壌表面で迅速に分解されるかどうか、放牧の生産性と関連している可能性が高い。

放牧地土壌表面での糞分解速度をコントロール

している要因として、分解に関わる微生物叢を調べるのが重要である。糞分解に関わっているのは、糞中の微生物叢と土壌中微生物叢、両方であると考えられるが、この異なる二つの微生物叢がそれぞれどのように糞分解と関連しているのかはこれまで調べられていなかった。

そこで、糞分解の速度を糞分解由来の二酸化炭素 (CO₂) 排出量として測定し、その量と、糞中、土壌中のバクテリアの量、多様性との関連性を調べる実験を行った。

2. 方 法

2.1 家畜糞分解速度を調べるためのCO₂排出量測定

この部分の実験では、家畜糞の分解速度を調べるために、北海道内の放牧農家から家畜糞とそれが散布される土壌を採取し、糞分解時に排出される二酸化炭素量を調べた。そのために、北海道内の15件（道央5件、道北5件、道東5件）の放牧酪農家を訪問し、牛糞と土壌のサンプルを、各4反復ずつ採取した。

これら土壌をそれぞれ90mlのプラスチック容器に充填し（土壌密度は0.78g cm⁻³）、水分量を60%の水分飽和度（Water-filled pore space）に合わせ、25℃で15日間予備培養した後、約10gの糞（土壌採取場所と同じ農場で採取したもの）を表面に置き、さらに24日間培養した。

糞分解速度をCO₂排出量として測定するため、土壌と糞が入ったプラスチック容器を1.5 l 瓶に入れ蓋をし、0、30、60分後にそれぞれ30mlのガスを真空バイアルに採取し、ガスクロマトグラフィー（メタナイザー、FID付き）でCO₂量を測定し計算した。ガス採取は週に1～3回行い、得られたCO₂排出量を積算し、糞分解量とした。

2.2 土壌、糞中DNA抽出、バクテリアコミュニティ構造解析

培養前の土壌、糞に関しては野外調査後、速やかにDNA抽出用チューブへのサンプルの取り分け作業を行った。すべてのサンプルに対して、QIAGEN社のPower Soilキットを用いて、提供されているプロトコルに従って抽出作業を行った。DNA抽出後の分析については、まず、リアルタイムPCR法を用いバクテリアの定量を行った。ライマとして、515F・806Rというプライマーを用いて、16S rRNA遺伝子を増幅することによって定量した。反応液には、日本ジェネティック社のKAPA SYBR Fast qPCRKit (ROXLowqPCRキット) を用い、機械には、ロシュ・ダイアグノスティックス社のLightCycler[®]480リアルタイムPCRシステムを使用した。

さらに、定量に加えて、バクテリアコミュニティ構造を明らかにするために515F・806Rのアダプター（シーケンサー用チップに受容されるために必要な配列）およびバーコード（サンプルを区別するために必要なユニークな配列）付きプライマーを使って、バクテリアの16S rRNA遺伝子を増幅した。増幅されたサンプルに対して、Global Life Science Technology社の磁器ビーズ試薬Sera-Mag Selectおよびワケンピーテック社の磁器ビーズ吸着プレート96R Ring Magnet Plateを用いて、プロトコルどおりにターゲットDNAの精製を行った。精製したDNAは、Promega社の試薬Quantifluor ONE dsDNA Systemおよび機械Quantus[™] Fluorometerを用いて、プロトコルどおりに定量を行った。作成したライブラリは、Thermo Fisher Scientific社の機械Ion Chefシステムおよび試薬Ion PGM Hi-Q View Chef Kitを用いて、チップIon 318 Chip Kit v2 BCにローディングさせた。その後、機械Ion Torrentにチップを設置してシーケンスを行った。

シーケンス完了後、各サンプルのシーケンスデータをfastqファイル形式で取り出し、Rソフトウェアを用いて、dada2 Pipeline (<https://benjjneb.github.io/dada2/tutorial.html>) に従って解析を行った。データベースとしては、Silva version132を用いた。また、多様性指数としてShannon指数を計算した。使用したRコードの詳細は、龍見のGitHubにて公開している (https://github.com/Chikae-Tatsumi/NGS-Data-Processing/blob/master/dada2_16S_IonTorrent.r)。

2.3 統計解析

土壌、糞それぞれのバクテリア量、バクテリアコミュニティ多様性と、糞分解量（積算したCO₂排出量）の相関を計算した。さらに、バクテリアコミュニティ構造データに関してはNMDS法を用いてコミュニティ間の類似性を示した。

3. 結果と考察

3.1 土壌・糞中のバクテリア量・多様性と家畜糞分解能の関連性

土壌や糞中のバクテリア量と多様性に関しては、家畜糞分解能とのはっきりした相関はなかった。しかし、糞中バクテリアコミュニティ構造の多様性と糞分解速度 (Fig. 1 右上) には弱い相関が見られたため、今後、反復数などを増やし検証する必要がある。また、今回の研究では培養日数が短い (30日以下) ため、主に糞中の易分解性炭素がCO₂として放出されたと考えられる。難分解性の炭素が分解する分解後期により土壌や糞中のバクテリアコミュニティ多様性が重要となる可能性もあるため、より長期の培養試験やフィールドレベルの試験が求められる。先行研究によると、

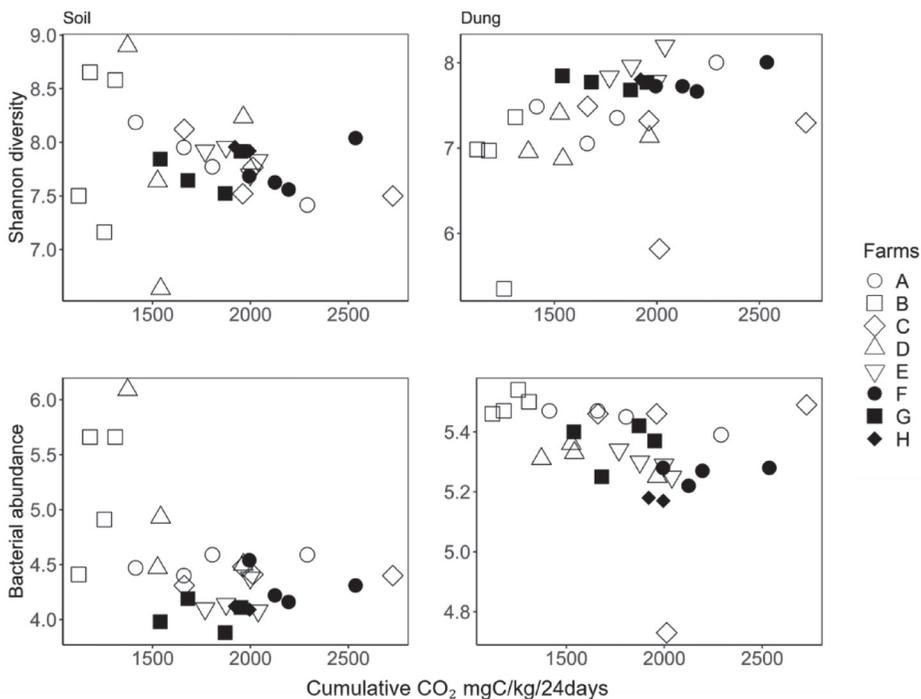


Fig. 1 The relationship between the diversity (Shannon index) of soil microbiome and the decomposition rate of dung applied on a soil (top left), the diversity of dung microbiome and the decomposition rate of dung (top right), the soil bacterial abundance (log copy number g^{-1} soil) and the decomposition rate of dung (bottom left), and the dung bacterial abundance (log copy number g^{-1} dung) and the decomposition rate of dung (bottom right), respectively.

フィールドレベルでは気温などにより糞分解速度が大きく変化することが分かっており¹⁾、現場での課題解決には、より多様な環境要因について考察するべきである。

3.2 土壌・糞中のバクテリアコミュニティ構造をコントロールしている要因

土壌や糞中のバクテリアコミュニティ構造とはっきりと関連している要因として、地域差が本研究で明らかとなった。本研究では、道央、道東、道北の放牧酪農家を対象に調査したが、NMDS法でバクテリアコミュニティ構造を調べると特に土壌ではっきりとした地域差があり、糞においても特に道北由来の糞バクテリアコミュニティはクラスター化し類似していることがわかった (Fig. 2)。土壌バクテリアコミュニティには地域特性がある程度あることは先行研究でも報告されており²⁾、北海道でも火山灰土壌や泥炭など土壌に特性のある北海道内の地域ごとに独特の土着バクテリアコミュニティが形成されていると考えられる。今後はよりサンプル数を増やし、地域ごとに糞分解をコントロールする微生物的要因を評価するなどのアプローチが必要である。

3.3 糞分解効率と関連性が高いバクテリア門
また、バクテリアコミュニティ構造をより精緻に解析し、糞分解効率と関連性が高いと考えられる門について考察した。その結果、土壌や糞中の Alphaproteobacteriaが糞分解効率の高い農場の土や糞に他農場サンプルと比較して相対的に多く生息していることが分かり (Fig. 3)、これらが有機物分解に関わっているという先行文献データ³⁾とも合致した結果が得られた。

しかし、この結果は初期の土壌中、糞中バクテリアと糞分解能を比較しており、分解ステージによって変化するバクテリアコミュニティ構造を精緻に調べる実験がさらに必要である。また、先述したバクテリアコミュニティ構造の地域差を踏まえて、より反復を増やした大がかりな調査研究も必要であろう。

4. 要 約

本研究は、北海道における酪農場由来の家畜糞と土壌微生物 (バクテリア) コミュニティ多様性と量を評価し、家畜糞の放牧地土壌表面での分解を説明することを目的とした。放牧地において、

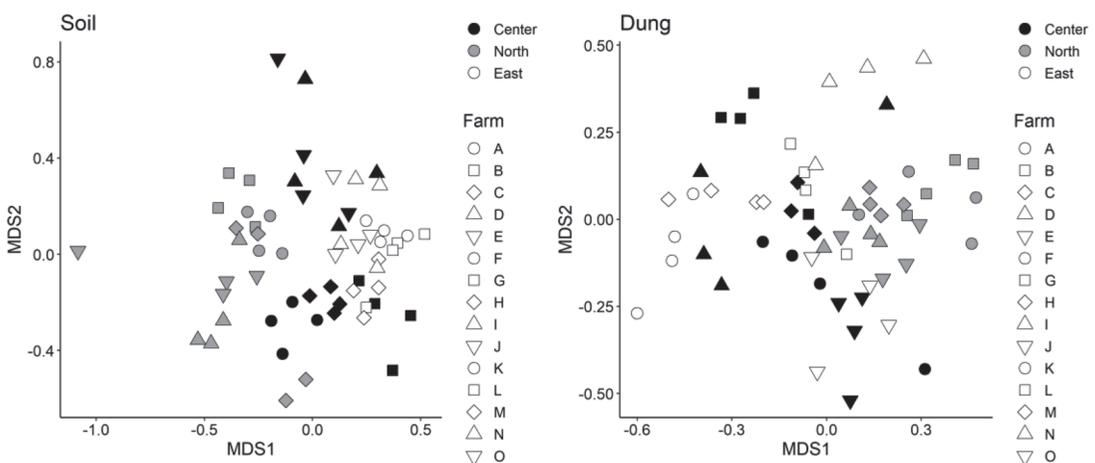


Fig. 2 The similarity among the soil microbiomes (left) and dung microbiomes (right), sampled from grazed dairy farms within Hokkaido, Japan. The colour indicates the sampling regions (black, grey and white for centre, north and east Hokkaido, respectively).

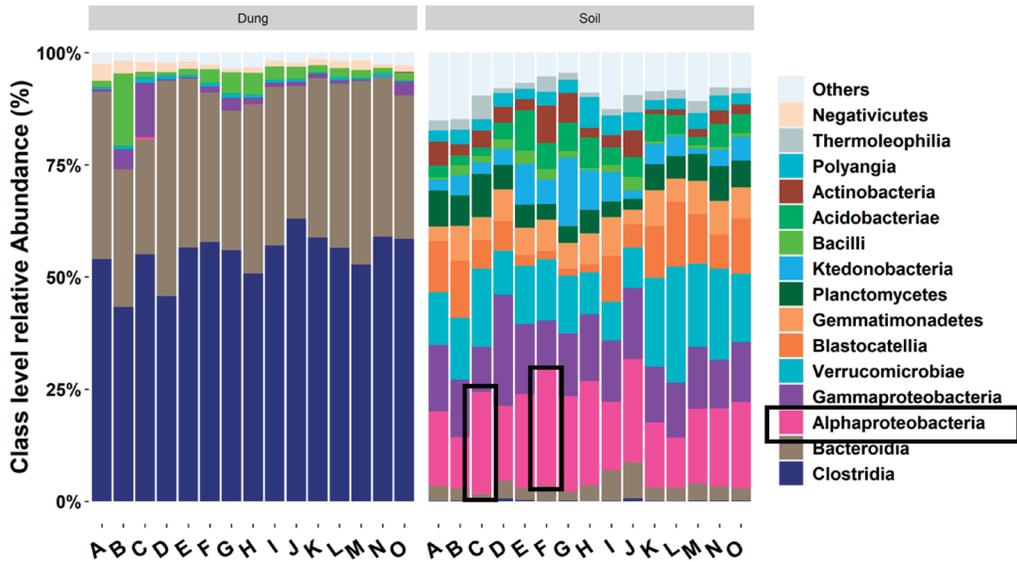


Fig. 3 Dung (left) and soil (right) bacterial community structures at the class level. The alphabets indicate different dairy farms in Hokkaido. The farms C and F showed relatively higher dung decomposition rates and had relatively higher abundances of Alphaproteobacteria, shown in black squares. Please see colour images (online) for more details.

家畜糞が適正に分解されることは、家畜糞に覆われた牧草の生育阻害を最低限にとどめるために重要である。しかし、その糞分解速度のコントロール要因として、糞中バクテリア、土壌バクテリアのどちらがどれほど重要なのかという問いに対する答えははっきりしていない。この問いに答えることで、家畜糞の適正な分解を目指すための飼料設計や土壌改良などの技術を確立するための基礎情報が蓄積できる。15の酪農場から糞と土壌を各4反復で採取し、DNAを抽出し、定量PCR法によりバクテリアの量、次世代シーケンス法を用いてバクテリアコミュニティの多様性を定量した。その結果、土壌、糞どちらのバクテリアコミュニティにおいても地域差があることが分かった（道東、道北、道央を比較）。そのため、糞と土壌微生物量や多様性と家畜糞分解量との関係は15の農

場全体をまとめて評価するとはっきりしなかったが、家畜糞中バクテリアコミュニティの多様性と家畜糞分解量の間には弱い相関が見られた。さらに、綱レベルではAlphaproteobacteriaが分解量と関連している可能性が示唆されているが、分解ステージにおけるバクテリアコミュニティの変動や先述した地域差を踏まえた、さらなる研究が必要である。

文 献

- 1) Yoshitaka, S., Soutome, H., Koizumi, H. : *Ecological Research*, 29(4), 673~684, 2014.
- 2) Kuramae, E. E., Yergeau, E., Wong, L. C., Pijl, A. S., van Veen, J. A., Kowalchuk, G. A. : *FEMS Microbiology Ecology*, 79, 12~14, 2012.
- 3) Buresova, A., Kopecky, J., Hrdinkova, V., Kamenik, Z., Omelka, M., Sagoa-Mareckova, M. : *Applied and Environmental Microbiology*, 85(24), e01760-19, 2019.

初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性（Ⅱ）

Colostrum programming of physiological properties related to meat production (Ⅱ)

松 崎 正 敏

(弘前大学農学生命科学部)

Masatoshi Matsuzaki

(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University)

Based on its higher colostrum concentration and possible maternal nutritional influence, effect of neonatal oral administration of insulin to one of twin sheep littermate was examined. Single physiological dose (2.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW) of bovine insulin was administered to one of twins within 2 hours after birth. Change of body weight from birth to 20 weeks of age (around puberty) was not affected by the insulin administration in the 3 litters that completed trial. Plasma concentrations of metabolite and hormones including glucose and insulin were not influenced by neonatal insulin administration. The results indicate that neonatal insulin fortification does not have noticeable impacts on growth and blood chemistry of young sheep.

1. 目 的

初乳は豊富な栄養素に加えて、母から子への移行抗体の供給源として家畜動物の新生子の受動免疫確立に不可欠である。さらに最近では、初乳中のホルモンその他のメッセージ物質が新生子の成長や生理特性の形成に不可逆的な影響を及ぼすことが明らかにされつつある¹⁾。初乳中のメッセージ物質としてIGF-Iやインスリンなどのホルモンが新生子期の急速な成長や腸管の発達、体タンパク質蓄積や糖代謝の活性化に重大な影響を及ぼしていることが明らかにされている^{2~4)}。乳中に含まれるその他のホルモン類として、レプチン、アディポネクチン、グレリン、レジスチンやグルココルチコイドなどが母乳哺育児の成長や発達、さらには食欲やエネルギーバランスの調節に

影響して、成人期の肥満の予防に関与することが示唆されている^{5~7)}。さらに、母乳中のエクソソームに含まれるメッセージ物質の産子の生理機能の発達や成長に及ぼす影響が研究され始めている⁸⁾。しかしながら、これらの乳中メッセージ物質の反芻家畜の初乳中含量に関する知見はきわめて少なく、産子の成長後の生理特性との関連を解析した研究は見当たらない。そこで、昨年度は妊娠末期と哺育中の母めん羊の栄養制御を行った実験モデルを用いて、母畜の初乳中ホルモン濃度と産子の成長および生理特性の関連を調べた。その結果、初乳中のインスリンは分娩直後の母畜血中に比べてきわめて高濃度で存在しており、妊娠末期の母畜への給与とタンパク質レベルに反応して初乳中濃度が変化する可能性が示唆された。そこで、反芻家畜の産肉特性に長期的な代謝的プログ

ラミングを引き起こす初乳成分の候補物質としてインスリンに着目して、出生直後のめん羊双子産子の一方にインスリンを経口投与することにより、その後の成長、飼養成績ならびに血液成分に及ぼす影響の解明を試みた。

2. 方 法

本研究における動物実験は弘前大学動物実験委員会で審査、承認された動物実験計画（承認番号A08019）に従って実施した。

同一の種雄畜との自然交配により妊娠したサフォーク種母めん羊を供試して、妊娠末期（交配開始後16週以降）から自然分娩を経て産子が8週齢で離乳するまで個別飼育ペンに收容して飼養試験を実施した。妊娠末期の母めん羊には、双胎妊娠末期に必要なTDN要求量を市販の配合飼料（CP12%，TDN75%）から50%，アルファルファペレットから45%，チモシー乾草から5%，それぞれ充足するように給与した。分娩後1週間から8週間までは哺育頭数に応じたTDN要求量を妊娠末期と同様に給与したが、TDN供給量は配合飼料から50%，アルファルファペレットからは40%，チモシー乾草から10%とした。自然分娩で出生した双子産子5腹の一方に対して、生時体重1 kgあたり2.5 μ gのウシインスリン（Sigma-Aldrich I5500-100MG, Lot# SLBW1822, 25USP units/mg）を2.5 μ g/ml生理食塩水として初乳吸乳介助時に経口投与した。出生から初乳吸入介助、すなわちインスリン投与までの時間は、おおむね2時間以内であった。産子は8週齢で離乳させた後、体重比原物2%の配合飼料（CP12%，TDN75%）と体重比1%のアルファルファペレットならびに体重比1%のチモシー乾草を給与して20週齢まで成長試験を実施した。5腹の供試双子のうち、1腹は産子の一方が母畜による圧死、もう1腹の産子の一方は母畜に授乳を拒否さ

れ人工哺育で飼育したため、離乳後の成長試験に供試できたのは3腹でインスリン投与群および対照群それぞれ3頭ずつとなった。産子は生時体重の測定の後、3, 7, 14, 28, 56, 84, 112および140日齢に体重測定と頸静脈血採取を行い、代謝成分とホルモンの血漿中濃度を測定して出生直後の経口インスリン投与の影響を調査した。

3. 結果と考察

出生直後のインスリン経口投与は同腹産子の増体には影響しなかった（Fig. 1）。

Fig. 2には出生後3日齢以降、自然哺育中および離乳後におけるめん羊産子の血漿中グルコース、インスリンおよび遊離トリヨードサイロニン濃度を示した。いずれも、試験処理による有意な影響は認められなかった。結果を示していないが、総タンパク質、尿素態窒素、トリグリセライド、リン脂質、遊離脂肪酸、総コレステロール、HDL-コレステロール、LDL-コレステロール、ならびにコルチゾールの血漿中濃度も、出生直後のインスリン経口投与による影響は認められなかった。

初乳中に高濃度で存在し、妊娠末期の母畜の栄養状態を反映して初乳中濃度が変化する可能性が

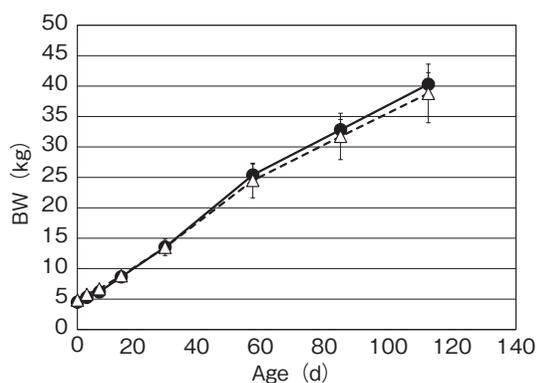


Fig. 1 Body weights (BW) of lambs in either control (●) or insulin administered (△) groups during suckling and postweaning period.

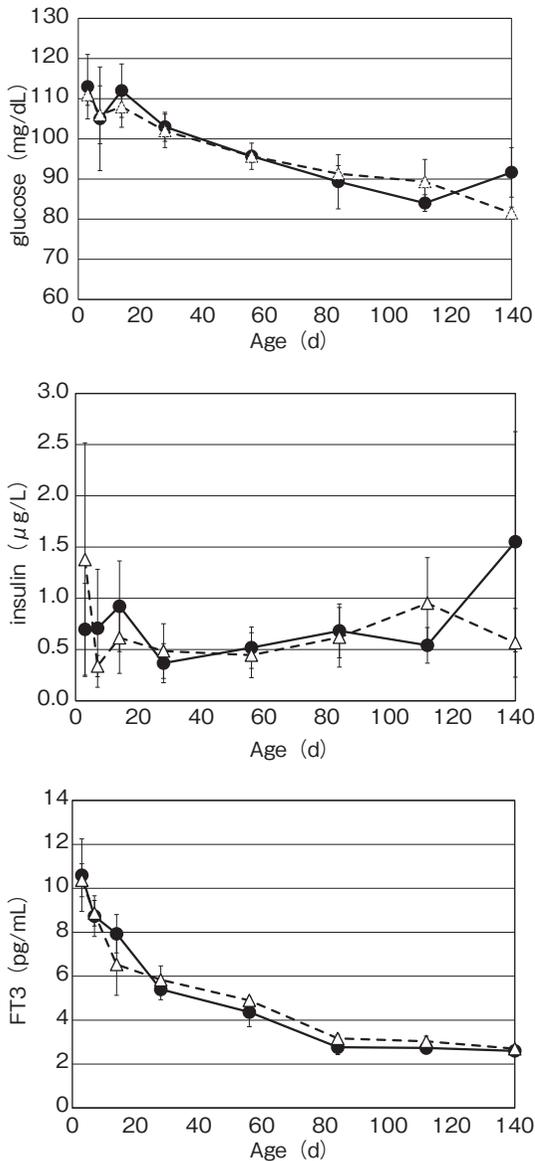


Fig. 2 Plasma concentrations of glucose, insulin and free triiodothyronine (FT3) of lambs in either control (●) or insulin administered (△) groups during suckling and postweaning period.

示されたインスリンの新生子めん羊への経口投与は成長や血液成分に検出しうる変化を引き起こさなかった。IGF-Iのようなホルモンの新生子豚の腸管からの吸収は否定されてはいるものの⁹⁾、初乳摂取あるいは腸管上皮への初乳中生理活性物質の接触が出生直後の産子のホルモン分泌などのな

んらかの特異的なシグナル伝達に与する可能性は否定できない。実際、腸管上皮の細胞に存在する受容体群を介してIGF-Iやインスリンが、新生子牛の腸管の発達やグルコース代謝の活性化を促すことなどが報告されている²⁻⁴⁾。本研究では初乳中に含まれる生理的レベルのインスリンの追加投与を実施した。薬理レベルでの投与効果の検討の余地はあるものの、実際の家畜生産レベルでの効果を評価するうえでは初乳特有の含有成分である免疫グロブリンの摂取レベルや吸収状況との関連を含めた生産形質への影響の解析が必要と考えられる。

4. 要 約

初乳中に高濃度で存在し、妊娠末期の母畜の栄養状態を反映して初乳中濃度に変化する可能性が示されたインスリンの新生子めん羊への経口投与の影響を、双子のめん羊産子を用いて調べた。初乳中に含まれる生理的レベルのインスリン (2.5 µg/kg生時体重) を最初の初乳摂取のタイミングで同腹の双子産子の一方に経口投与して、その後の増体ならびに血中の代謝成分やホルモン濃度を調べたが、明らかな影響はみられなかった。

文 献

- 1) Hammon, H. M., Liermann, W., Fritten, D., Koch, C. : Importance of colostrum supply and milk feeding intensity on gastrointestinal and systemic development in calves, *Animal*, 14 : S1, s133-s143, 2020.
- 2) Blum, J. W. : Nutritional physiology of neonatal calves, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 90, 1~11, 2006
- 3) Hammon, H. M., Steinhoff-Wagner, J., Flor, J., Schönhusen, U., Metges, C. C. : Lactation Biology Symposium : role of colostrum and colostrum components on glucose metabolism in neonatal calves, *Journal of Animal Science*, 91, 685~695, 2013.
- 4) Ontsouka, E. C., Albrecht, C., Bruckmaier, R. M. : Invited review : growth promoting effects of colostrum in calves based on interaction with intestinal cell surface receptors and receptor-like

- transporters, *Journal of Dairy Science*, **99**, 4111~4123, 2016.
- 5) Savino, F., Liguori, S. A., Lupica, M. M. : Adipokines in breast milk and preterm infants, *Early Human Development*, **86**, S77-S80, 2010.
- 6) Eilers, E., Ziska, T., Harder, T., Plagemann, A., Obladen, M., Loui, A. : Leptin determination in colostrum and early human milk from mothers of preterm and term infants, *Early Human Development*, **87**, 415~419, 2011.
- 7) Hollanders, J. J., Heijboer, A. C., van der Voorn, B., Rotteveel, J., Finken, M. J. J. : Nutritional programming by glucocorticoids in breast milk : Targets, mechanisms and possible implications, *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, **31**, 397~408, 2017.
- 8) Samuel, M., Chisanga, D., Liem, M., Keerthikumar, S., Anad, S., Ang, C. S., Versteegen, E., Jois, M., Mathivanan, S. : Bovine milk-derived exosomes from colostrum are enriched with proteins implicated in immune response and growth, *Scientific Reports*, **7**(1), 5933~10, 2017.
- 9) Donovan, S. M., Chao, J. C. L., Zijlstra, R. T., Odle, J. : Orally administered iodinated recombinant human insulin-like growth factor-I (I-125-rh IGF-I) is poorly absorbed by newborn piglet, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, **24**, 174~182, 1997.

異なる月齢時の輸送が子牛の福祉性および生産性に与える影響

Influence on welfare and production by transporting calves at different ages

戸澤 あきつ

(帝京科学大学生命環境学部)

Akitsu Tozawa

(Faculty of Life & Environmental Sciences, Teikyo University of Science)

The objective of this study is to investigate the influence on welfare and production by transporting calves at different ages. Japanese Black calves were transported about 1,200km distances by ferry and truck. After arriving at the fattening farm, 12 calves were divided in 3 pens with 4 calves each. The mean age of each pen was 9.25 months old (Pen 1), 8.25 months old (Pen 2) and 8 months old (Pen 3). Behaviour, physiological reactions by blood sampling and live weight estimated by measuring chest girth were observed for assessing welfare and production. Behaviour was observed 3 consecutive days from arriving, after a week and a month. The percentage of time spent ingestive behaviour at day time of Pen 3 was significantly lower than Pen 1 and that of resting behaviour of Pen 3 was higher than Pen 1 ($p < 0.05$). In addition, social play behaviour in Pen 1 was expressed significantly more times than in Pen 3 ($p < 0.05$). These results suggest that the older calves might recover faster from stress by transport. Blood sampling was carried at arriving day, after a week and a month. Serum creatinine concentration was significantly higher in Pen 1 than Pen 2 and 3 ($p < 0.01$). Serum creatinine can be high due to months old, further studies are needed to identify the effect of transport. There were no clear differences between pens in other physiological reactions and live weight. However, the concentrations of cortisol, NEFA, BUN, TP, blood glucose and T3 become higher after arriving the farm than a week or a month later in all pens. These results suggest that calves had stress under transport regardless of age between 8 to 10 months old and recover in a week.

1. 目的

肉用牛はもとより、乳用牛も最終的にと場へ出荷されることから、ほとんどの牛は生涯に少なからず一度は輸送を経験する。OIE（国際獣疫事務局）が定めている陸生動物衛生規約のなかのアニマルウェルフェアの基準でも輸送に関する項目が

定められており、アニマルウェルフェアを考えると、家畜の輸送は重要な課題であることがいえる。

輸送による牛へのストレス負荷については、輸送直後の血液性状や心拍数といった生理状態を把握した研究¹⁾や、免疫力の低下に関する研究については報告がある²⁾。しかし、ストレスを受けた

動物の福祉状態を把握する場合、生理状態だけで判断するのではなく、快・不快や心理的健康状態をとらえる必要がある³⁾。また、輸送中の牛の行動に関する報告はあるものの¹⁾、輸送によるストレスからの回復に伴う行動変化についての研究はほとんど行われていない。

肥育牛において、体重の変化は生産性の重要な指標のひとつである。輸送時には通常、絶食絶水であることや排糞・排尿により体重は通常12～15%程度減少する。しかし、体重の急激な減少は体内恒常性に負荷がかかるため、その後の成長を妨げる可能性や体力の低下、疾病罹患率の上昇につながるといわれている⁴⁾。つまり、血液性状といった生理的評価だけでなく、体重も輸送時の牛の肉体的健康状態の指標となりうる。

繁殖農家で飼育された子牛は市場でセリにかけられ、肥育農家に移動する場合がある。セリにかけられる子牛は9～10ヶ月齢であるが、この時期は成長段階であるため1ヶ月の違いでも体格や体内恒常性機能の適応力は異なる可能性がある。多少の違いではあるが、子牛の血液性状の標準値は月齢ごとに異なっている⁵⁾。

そこで本研究では、異なる月齢時での輸送が、輸送後の子牛の福祉性および生産性にどのように影響を与えているか、明らかにすることを目的とした。

2. 方 法

2.1 供試動物および飼養管理

本研究は、帝京科学大学動物実験委員会により承認され、実施された(承認番号20C027)。

調査は、茨城県銚田市に所在する肥育農家で実施した。調査地の農家まで、輸送は全行程約1,200km、北海道の子牛市場から陸路で苫小牧港に行き、苫小牧港から八戸港まではフェリーによる海上輸送、八戸港からは陸路で4時間ごとに30

分休憩を取りながら9時間かかった。輸送日時は2020年8月19日に市場を出発し、翌20日の14:00頃搬入された。

供試動物は黒毛和種の去勢オス、1ペン当たり4頭飼育を3ペン、計12頭であった。各ペンの導入時月齢は、ペン1で9.25ヶ月齢(9ヶ月齢3頭、10ヶ月齢1頭)、ペン2で8.25ヶ月齢(8ヶ月齢3頭、9ヶ月齢1頭)、ペン3で8ヶ月齢であった。搬入日にチアンフェニコール系合成抗菌剤(15ml/300kg)および牛5種混合生ワクチン(2ml/頭)を接種し、次の日にイベルメクチン(0.02ml/kg)を投与した。

飼育環境は、開放型牛舎で、20.2m²(6.5m×3.1m)の広さのペン内に4頭ずつ飼育されていた。稲わらとチモシーを不断給餌していた。配合飼料は1kgからスタートし、2週間ごとに0.5kg増量していった。給与時間は9:00と15:00の1日2回であった。加えて、機能性飼料であるBIOバガス(バイオ科学株式会社)を1日当たり0.5～1.0kg/頭給与していた。

2.2 調査項目および調査日程

調査項目は、福祉状態をとらえるために、維持行動とイベント的に発生する行動の発現状況を観察し、生産性として生理状態の把握および体重と相関が高い胸囲測定を行い⁶⁾、体重に換算し、指標とした。それぞれの調査日程をTable 1に示した。

2.3 行動観察

行動は、維持行動およびイベント的に発現する行動を観察した。維持行動については搬入当日18:00から5分間隔の瞬間サンプリングで24時間観察を行った。18:00から翌6:00までを夜間とし、ビデオカメラで撮影した動画を後日解析した。6:00から18:00までを日中とし、2名交代で目視により直接観察を行った。観察した行動は、飼料の摂食、飲水、舐塩を合わせた摂取行動と、休息、反芻、睡眠を合わせた休息行動、およ

Table 1 Sampling schedule

	Day 1		Day 2		Day 3		Week1		Month 1		Month 2	Month 3	Month 4	Month 5
	Arriving at the farm		2nd day		3rd day		a week after arriving		a month after arriving					
	day time	night time	day time	night time	day time	night time	day time	night time	day time	night time	day time	day time	day time	day time
Maintenance behaviour	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	—	—	—	—
Behaviour as events	○	—	○	—	○	—	○	—	○	—	—	—	—	—
Blood sampling	○	—	—	—	—	—	○	—	○	—	—	—	—	—
Measuring chest girth (Body Weight)	○	—	—	—	○	—	○	—	○	—	○	○	○	○

びそれ以外の行動をその他とした。採血や胸囲測定の作業時間があったため、全観察回数に対する発現回数の割合を算出した。イベント的に発現する行動については、日中の時間帯に維持行動観察と並行して30秒ごとに3分間連続で1-0サンプリングを行った。1頭につき、1時間のうちに3分間を4回観察した。観察した行動は、模擬闘争、模擬乗駕、追いかかけ合いを合わせた社会的遊戯行動、他個体に触れる、嗅ぐ、舐める行動を合わせた社会的探査行動、他個体舐めを親和行動、頭振り、頭突き押し、闘争を合わせた敵対行動とした。

2.4 生理状態と体重の評価

生理状態については、血液生化学検査によって評価した。頸静脈から採血を行い、総タンパク (TP), AST (GOT), ALT (GPT), コルチゾール, 血糖, 総コレステロール (T-CHO), 中性脂肪 (TG), 遊離脂肪酸 (NEFA), 尿素窒素 (BUN), クレアチニン (CRE), トリヨードサイロニン (T3), ビタミンAを測定した。採血は搬入日および1週間後, 1ヶ月後に行った。

胸囲については、肩後第8肋骨の基部を通過する帯径部における周囲の長さをメジャーで測定した。胸囲による体重の推定式は以下のとおりである。

$$\text{推定体重 (kg)} = 55.256 - 2.114190 \times \text{胸囲 (cm)} + 0.024323 \times [\text{胸囲 (cm)}]^2$$

胸囲は搬入日, 搬入3日後, 1週間後, そして1ヶ月後以降は1ヶ月おきに5ヶ月後まで測定した。

2.5 統計解析

各データについて、Shapiro-Wilk検定により正規分布に従わないことを確認した。維持行動割合については逆正弦変換, イベント的に発現する行動および血液検査の各項目, 体重については対数変換を行った。各データについて、反復測定二元配置分散分析を行い、多重比較検定にはBonferroni法を用いて $p < 0.05$ を統計学的有意差ありとして判定した。統計解析ソフトはIBM SPSS Statistics version 23 (IBM, Armonk, NY, USA) を用いた。

3. 結果と考察

3.1 行動

維持行動の結果をTable 2に示した。ペン間で有意な違いが見られた行動は、日中の摂取行動と休息行動であった。ペン3はペン1と比較して日中の摂取行動の発現割合が低く、休息行動の発現割合が高かった ($p < 0.05$)。また、経日変化を見てみると、日中の摂取行動発現割合は搬入1日目で各ペン18.8~28.8%であったが、1ヶ月後には52.1~63.4%に増加していた ($p < 0.01$)。対して、日中の休息行動発現割合は搬入1日目では62.8~77.1%であったが、1ヶ月後には33.5~44.4%と低下している ($p < 0.01$)。これは、搬入直後の12~24時間は輸送や新規の群編成によるストレスにより、摂取行動を発現するよりも休息を優先させたと考えられる。搬入3日後および1週間後には日中の摂取行動発現割合がどのペンでも

Table 2 The percentage of time spent in maintenance behaviours during day time or night time in each pen

	(%) pen no.	Day 1		Day 2		Day 3		Week 1		Month 1		pen p value	day p value	pen*day p value
		mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.			
Day time														
Ingestive behaviour	1	25.5	± 18.8	40.8	± 15.5	39.8	± 24.4	41.6	± 22.3	52.1	± 30.3	x		
	2	28.8	± 21.4	37.3	± 17.2	38.3	± 21.5	37.9	± 25.1	53.3	± 27.4	xy	0.04	< 0.01
	3	18.8	± 13.7	1.9	± 3.7	37.4	± 21.1	37.3	± 23.0	63.4	± 24.8	y		< 0.01
		a		a		b		b		c				
Resting behaviour	1	67.0	± 17.2	54.3	± 17.5	53.6	± 26.4	55.7	± 23.0	44.4	± 28.3	x		
	2	62.8	± 22.5	52.3	± 15.9	54.6	± 25.6	54.0	± 25.1	42.0	± 27.9	xy	< 0.01	< 0.01
	3	77.1	± 13.5	97.9	± 4.2	57.4	± 22.1	58.8	± 33.5	33.5	± 24.8	y		< 0.01
		a		a		b		b		c				
Night time														
Ingestive behaviour	1	12.8	± 14.7	8.5	± 8.6	10.6	± 10.6	9.0	± 11.8	8.9	± 9.0			
	2	7.2	± 9.0	6.1	± 9.6	10.4	± 15.2	7.6	± 12.0	6.4	± 11.0		0.57	0.06
	3	10.2	± 8.4	6.1	± 10.6	9.9	± 15.1	8.2	± 15.1	8.5	± 11.4			0.56
Resting behaviour	1	85.9	± 14.8	89.8	± 8.8	85.6	± 13.1	86.5	± 16.8	88.9	± 9.8			
	2	89.7	± 10.1	90.5	± 11.9	83.2	± 20.4	87.7	± 17.7	91.0	± 12.5		0.80	< 0.01
	3	87.2	± 10.0	92.0	± 12.1	87.0	± 15.5	89.1	± 16.1	87.8	± 13.2			0.45
		ab		b		a		ab		b				

Two-way repeated measures ANOVA

a, b, c : Different superscripts indicate a significant difference between days ($p < 0.05$)x, y : Different superscripts indicate a significant difference between pen ($p < 0.05$)**Table 3** Expression times of behaviours as event during day time in each pen

	(times / h) pen no.	Day 1		Day 2		Day 3		Week 1		Month 1		pen p value	day p value	pen*day p value
		mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.			
Social play behaviour	1	0.08	± 0.08	0.04	± 0.04	0.35	± 0.11	0.06	± 0.07	0	± 0	x		
	2	0.04	± 0.07	0.10	± 0.09	0.13	± 0.22	0	± 0	0.06	± 0.036	xy	< 0.05	< 0.01
	3	0	± 0	0	± 0	0.04	± 0.04	0	± 0	0	± 0	y		< 0.05
		ab		ab		a		ab		b				
Social investigative behaviour	1	0.10	± 0.18	0.02	± 0.04	0.33	± 0.06	0.23	± 0.31	0.06	± 0.07			
	2	0.08	± 0.14	0.17	± 0.16	0.38	± 0.22	0.25	± 0.31	0.08	± 0.06		0.49	< 0.01
	3	0	± 0	0.17	± 0.18	0.15	± 0.11	0.23	± 0.12	0.02	± 0.04			0.73
		ab		ab		a		ab		b				
Affiliative behaviour	1	0.27	± 0.28	0.25	± 0.19	0.15	± 0.16	0.13	± 0.09	0.35	± 0.41			
	2	0.35	± 0.27	0.35	± 0.38	0.48	± 0.37	0.44	± 0.37	0.19	± 0.16		0.12	0.93
	3	0	± 0	0.04	± 0.04	0.08	± 0.14	0.25	± 0.25	0.04	± 0.07			0.63
Agonistic behaviour	1	0	± 0	0.29	± 0.22	0.31	± 0.22	0.25	± 0.06	0.31	± 0.19			
	2	0.29	± 0.41	0.33	± 0.44	0.19	± 0.11	0.17	± 0.24	0.60	± 0.36		0.67	< 0.01
	3	0.10	± 0.11	0.10	± 0.09	0.21	± 0.15	0.15	± 0.12	0.21	± 0.07			0.10
		a		ab		ab		ab		b				

Two-way repeated measures ANOVA

a, b, c : Different superscripts indicate a significant difference between days ($p < 0.05$)x, y : Different superscripts indicate a significant difference between pen ($p < 0.05$)

40%程度であり、ストレスが緩和され、環境にも慣れてきたと考えられる。また、夜間の休息行動発現割合を見てみると、搬入3日目が83.2~87.0%であり、搬入2日目および1ヶ月後よりも有意に低かった ($p < 0.01$)。搬入から2日は体力的疲労や身体的ストレスにより、心身の回復のため休息行動が多く発現されるが、3日目の夜間

には活動性が高くなってきたと考えられる。

イベント的に発現される行動の結果をTable 3に示した。ペン間で有意な違いが見られた行動は社会的遊戯行動であり、ペン1がペン3よりも多く発現していた ($p < 0.05$)。ペン1はペン3よりも月齢が高い個体であるが、3日目には他個体と遊戯行動を発現していたということは月齢が高

い個体のほうが搬入2日で環境に慣れ、疲労回復等も早かった可能性が考えられる。しかし、ペン3は観察期間中、社会的遊戯行動を発現した回数はわずかであった。このことから、ペン内の個体の気質や個体の組み合わせが影響している可能性も考えられた。経日変化を見てみると、社会的遊戯行動および社会的探査行動が3日目に発現が多く見られ、敵対行動は搬入1日目で発現が少なかったものの、1ヶ月後には多く見られた ($p < 0.01$)。導入後数日は社会的遊戯行動や社会的探査行動により、親和的關係性の構築を図っていた可能性が考えられた。また、1ヶ月後には環境に慣れて活動的になり、給餌飼料や給水器、快適な休息場所といった資源の争奪が起こることにより敵対行動が多く発現したと考えられた。

3.2 生理状態

血液生化学検査の結果をTable 4に示した。ペン間で有意な違いが見られた項目は血清CRE濃度で、ペン1がペン2および3よりも高値を示していた ($p < 0.01$)。血清CRE濃度は、8ヶ月齢の子牛よりも10ヶ月齢でわずかに高い値を示す可能性があることから⁵⁾、月齢が高いペン1で高値を示した可能性が考えられる。個体の影響も考えられるため、今後さらなる検討が必要である。そのほかの項目において、ペン間に大きな違いは認められなかった。

経日変化では、血清CRE濃度以外の項目で違いが見られた ($p < 0.01$)。輸送直後におけるTP、血糖、T3の上昇はこれまでも報告されているとおりであり¹⁾、1週間後には低下していたことから輸送ストレスが解消したと考えられた。また、NEFAやBUNが搬入日に上昇していたが1週間後には低下していた。NEFAやBUNの上昇は負のエネルギーバランスによって生じるが、輸送時の絶食が影響していたと考えられる。同様に、搬入日のコルチゾールや血糖は輸送ストレス

の影響を受けて上昇したと考えられるが^{7,8)}、1週間後には低下していた。

3.3 体重変化

胸囲から体重を推定した結果をFig. 1に示した。ペン間で有意な違いは見られなかったが、経日変化では搬入後1日から3ヶ月と比較して4ヶ月および5ヶ月で体重が増加していた ($p < 0.01$)。搬入直後から3ヶ月程度までは体重が大幅に増減することなく維持され、搬入後4ヶ月から順調に増加した。給与飼料のうち、濃厚飼料を20~30日につき1日当たり1kgずつ増加しており、搬入4ヶ月で1日当たり8kgの給与量となる設計で給与されていた。体重の増加は、給与飼料の影響を多大に受けるため飼料設計が重要となるが、本研究ではペンごとの違いは認められなかったため、搬入時の月齢による影響は少ないと考えられた。

4. 要 約

本研究では、異なる月齢時での輸送が、輸送後の子牛の福祉性および生産性にどのように影響を与えているか、明らかにすることを目的とした。約1,200kmの行程をフェリーによる海上輸送とトラックによる陸上輸送された黒毛和種の去勢オス12頭を各ペン4頭ずつ、3ペンで飼育した。各ペンの月齢は9.25ヶ月齢(ペン1)、8.25ヶ月齢(ペン2)、8ヶ月齢(ペン3)であった。福祉状態評価のために、維持行動として摂食行動と休息行動を日中および夜間観察し、イベント的に発現する行動のうち社会的遊戯行動、社会的探査行動、親和行動、敵対行動を日中のみ観察した。生産性評価のために、血液生化学検査と体重変化をとらえた。体重は胸囲測定により推定した。

搬入時の月齢による違いは、日中の摂食行動発現割合がペン3でペン1よりも低く、日中の休息行動発現割合が高かった ($p < 0.05$)。また、社

Table 4 Physiological reactions of calves after transported

	pen no.	Day 1		Week 1		Month 1		pen	day	pen*day
		mean	± S.D.	mean	± S.D.	mean	± S.D.	p value	p value	p value
Serum Total Protein (g/dl)	1	7.3	± 0.2	6.4	± 0.2	6.2	± 0.3	0.63	< 0.01	0.47
	2	7.2	± 0.3	6.6	± 0.1	6.2	± 0.2			
	3	7.4	± 0.4	6.8	± 0.4	6.4	± 0.5			
		a		b		c				
Serum AST (GOT) (U/l)	1	190	± 112	164	± 57	92	± 24	0.13	< 0.01	0.11
	2	120	± 26	80	± 22	72	± 11			
	3	154	± 22	87	± 6	72	± 21			
		a		b		c				
Serum ALT (GPT) (U/l)	1	35.5	± 3.6	30.5	± 7.4	21.5	± 3.2	0.37	< 0.01	0.54
	2	35.8	± 2.9	25.3	± 7.4	19.5	± 3.8			
	3	36.5	± 2.1	23.0	± 1.7	17.5	± 5.4			
Plasma Cortisol (U/l)	1	1.5	± 0.9	0.7	± 0.3	0.7	± 0.3	0.16	< 0.01	0.83
	2	3.2	± 1.9	1.1	± 0.1	0.9	± 0.2			
	3	2.3	± 0.3	1.9	± 2.1	0.9	± 0.3			
		a		b		b				
Blood glucose (mg/dl)	1	83.8	± 7.2	65.0	± 2.1	60.8	± 5.1	0.31	< 0.01	0.26
	2	72.5	± 9.1	63.3	± 5.1	57.0	± 6.0			
	3	76.5	± 7.1	70.0	± 4.3	58.5	± 2.7			
		a		b		c				
Serum total cholesterol (mg/dl)	1	148.8	± 15.4	133.0	± 10.0	79.0	± 11.2	0.12	< 0.01	0.41
	2	159.3	± 40.8	131.8	± 18.9	73.8	± 9.3			
	3	204.0	± 27.6	182.0	± 30.3	78.8	± 22.5			
		a		b		c				
Serum TG (mg/dl)	1	3.3	± 0.4	9.5	± 0.5	12.8	± 4.7	0.75	< 0.01	0.03
	2	8.5	± 7.8	8.0	± 2.5	9.5	± 3.5			
	3	5.0	± 1.6	8.0	± 3.5	7.3	± 4.5			
		a		b		b				
Serum NEFA (mEq/l)	1	0.77	± 0.13	0.28	± 0.04	0.35	± 0.10	0.73	< 0.01	0.79
	2	0.69	± 0.32	0.31	± 0.05	0.31	± 0.15			
	3	0.72	± 0.13	0.35	± 0.09	0.47	± 0.29			
		a		b		b				
Serum BUN (mg/dl)	1	14.0	± 3.2	5.3	± 1.4	6.0	± 1.1	0.83	< 0.01	0.19
	2	12.3	± 3.6	6.2	± 0.8	7.1	± 1.7			
	3	16.1	± 2.5	4.7	± 1.5	7.2	± 1.7			
		a		b		b				
Serum creatinine (U/l)	1	1.19	± 0.04	1.24	± 0.08	1.24	± 0.12	< 0.01	0.52	0.32
	2	1.00	± 0.11	1.05	± 0.09	0.98	± 0.09			
	3	1.03	± 0.05	0.97	± 0.11	0.94	± 0.07			
						x y y				
Serum T3 (ng/dl)	1	157.3	± 27.6	130.0	± 17.6	100.5	± 17.4	0.85	< 0.01	0.05
	2	168.3	± 48.7	103.3	± 19.2	103.8	± 21.6			
	3	135.3	± 19.0	134.8	± 15.4	115.3	± 17.2			
		a		b		c				
Vitamin A (mEq/l)	1	97.5	± 12.6	66.7	± 6.2	60.0	± 17.2	0.62	< 0.01	0.76
	2	85.8	± 22.3	54.2	± 9.5	57.5	± 13.2			
	3	93.3	± 15.3	57.5	± 12.3	52.5	± 14.6			
		a		b		b				

Two-way repeated measures ANOVA

a, b, c : Different superscripts indicate a significant difference between days ($p < 0.05$)x, y : Different superscripts indicate a significant difference between pen ($p < 0.05$)

会的遊戯行動の発現回数がペン3よりもペン1で多かった ($p < 0.05$)。ペン1はペン3よりも月齢が高い個体であったため、月齢が高い個体のほうが疲労回復や環境への慣れが早い可能性が考えられた。

生理状態のうち、ペン間で違いが見られた項目は血清クレアチニン濃度であり、ペン1がペン2および3よりも高値を示していた ($p < 0.01$)。クレアチニン濃度は月齢が高いことで高値になることがあるため、輸送が影響していたかどうかは

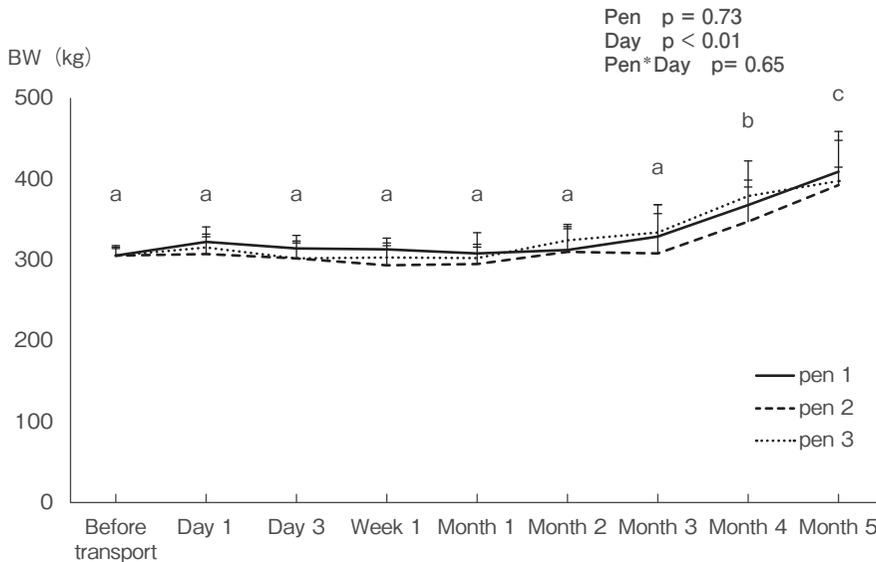


Fig. 1 Live weight of calves in each pen estimated by measuring chest girth

Two-way repeated measures ANOVA

a, b, c : Different superscripts indicate a significant difference between days ($p < 0.05$)

今後さらなる検討が必要である。体重変化はペン間で違いが認められなかった。

生理状態および体重変化について、ペン間で違いは認められなかった。しかし、輸送直後にコルチゾール、NEFA、BUN、TP、血糖、T3濃度の上昇といったストレス状態下の生理状態が見られた ($p < 0.01$)。搬入月齢に関係なく、1週間後には生理状態の回復状態が認められ、体重も順調に増加していった。これらのことから、8~10ヶ月齢の月齢間では輸送ストレス負荷は同程度であると考えられた。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、行動調査およびサンプリングのご協力を賜った茨城県銚田市に所在する肥育農場に厚く御礼申し上げます。また、2019年度に本研究実施のために尽力して下さった千葉県旭市に所在する肥育農場は令和元年房総半島台風により甚大な被害を受けました。被害に

遭われるまでに調査のご協力を賜ったことを深謝するとともに、一日も早い再建をお祈り申し上げます。

文 献

- 1) Ishiwata, T., Uetake, K., Eguchi, Y., Tanaka, T. : *Anim. Sci. J.*, **79**, 510~517, 2008.
- 2) Kegley, E. B., Spears, J. W., Brown Jr., T. T. : *J. Anim. Sci.*, **75**, 1956~1964, 1997.
- 3) Appleby, M. C., Olsson, I. A. S., Galindo, F. : *Animal Welfare 3rd Edition*, 16~35, CAB International, Oxfordshire, 2018.
- 4) Grandin, T. : *Livestock Handling and Transport 4th Edition*, 143~173, 2014.
- 5) 家畜感染症学会編：子牛の医学 胎子期から出生・育成期まで, 441~453, 緑書房, 東京, 2014.
- 6) 高橋俊彦, 中辻浩喜, 森田茂監修：ライフステージでみる牛の管理—栄養・行動・衛生・疾病—, 48~56, 緑書房, 東京, 2017.
- 7) Villarroel, M., María, G., Sañudo, C., García-Belenguer, S., Chacón, G., Gebre-Senbet G. : *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, **110**, 105~107, 2003.
- 8) 植竹勝次：家畜診療, **55**, 177~181, 2008.

令和2年度助成研究調査一覧

本年度の対象とする研究または調査：

食肉に関する研究または調査（品質・製造加工技術、食品の価値、食品安全、遺伝育種、繁殖、動物衛生、家畜飼養・飼料など）

単位：千円

研究課題	継続年数	代表研究者		助成金額
		代表者名	所属機関	
I a 食肉の品質・製造加工技術（10件）				
和牛肉のおいしさを「見える化」する（Ⅲ） 和牛ブランド間の比較	H30～	山田 知哉	農研機構中央農業研究センター	1,000
微生物由来アスパルティックプロテアーゼを利用した食肉加工技術の開発（Ⅱ）	R1～	竹中 慎治	神戸大学大学院農学研究科	1,000
牛枝肉のモモ抜けの非破壊検査用磁気共鳴スキャナーの開発		中島 善人	国立研究開発法人産業技術総合研究所	1,750
イミダゾール化合物が食肉の熟成に及ぼす影響について		早川 徹	北海道大学大学院農学研究科	1,400
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（Ⅲ）	H30～	西村 敏英	女子栄養大学栄養学部	1,300
枝肉の3Dグラフィック化システムの製作（Ⅱ）	R1～	本山三知代	農研機構畜産研究部	1,950
乾塩漬ハム中の亜鉛プロトポルフィリンIXの形成様相と存在形態に関する研究（Ⅱ）	R1～	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	1,750
食肉の風味を構成する呈味性化合物の分画およびメタボローム解析		水野谷 航	麻布大学獣医学部	1,250
食肉製品の香気分析に基づく品質管理手法の開発		河原 聡	宮崎大学農学部	900
次世代の培養肉作製のための骨格筋タイプ変換技術の基礎的研究		久保 純	東北大学加齢医学研究所	1,950
I b 食肉の食品価値（4件）				
畜産副生物から再生医療部材への高付加価値加工		神田 英輝	名古屋大学大学院工学研究科	1,000
産肉量増加を目指した間葉系前駆細胞による新規血管新生機構の解明		山内啓太郎	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,400
コリン供給源としての食肉機能の評価		三浦 豊	東京農工大学大学院農学研究科	1,250
食肉中に含まれる2-オキソ-イミダゾールジペプチドに関する研究		居原 秀	大阪府立大学大学院理学系研究科	1,000
I c 食品安全（3件）				
国際基準および国内と畜場の現場実態に適合した牛枝肉の生物的危害要因制御のための内部検証方法の開発		猪島 康雄	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	1,000

ハム・ソーセージに配合する食品添加物に関するリスクコミュニケーション手法の開発ならびに効果検証		山崎 毅	(特非)食の安全と安心を科学する会	1,500
食品添加物の安全性に関する消費者の意識に関する研究(Ⅱ)	R1~	堀江 正一	大妻女子大学 家政学部	1,400
Ⅱ a 遺伝育種(5件)				
牛の新規遺伝的不良形質の分子基盤および生産性への影響(Ⅱ)	R1~	大和 修	鹿児島大学 共同獣医学部	1,400
肉用牛の枝肉形質および肉質の診断マーカーとしての血中マイクロRNAの動態解析		横井 伯英	京都大学大学院 農学研究科	1,600
豚胎児の成長性に影響する生体内因子の探索		谷口 雅章	農研機構 畜産研究部門	1,600
黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の客観的評価手法の開発		鈴木 洋美	北海道立総合研究 機構畜産試験場	1,000
遺伝子情報を用いた黒毛和種の枝肉形質と脂肪酸組成に及ぼす系統と遺伝様式の影響の解明		広岡 博之	京都大学大学院 農学研究科	1,400
Ⅱ b 繁殖(19件)				
牛子宮内膜での単核球の出現が分娩後の子宮修復に及ぼす影響		三浦 亮太郎	日本獣医生命科学 大学獣医学部	1,000
黒毛和種における経膈採卵前のヒアルロン酸添加ブタF S H製剤1回筋肉内注射の効果に関する研究		及川 俊徳	宮城県畜産試験場	1,400
沖縄在来豚アグーを絶滅から守るべきL-カルニチン処理による凍結精子作製技術の改良		建本 秀樹	琉球大学農学部	1,300
牛の低受胎を改善する技術創出を目指した子宮マイクロバイオーム解析		内山 淳平	麻布大学獣医学部	1,600
抗酸化物質を利用した牛体外受精卵生産技術の高度化とそれを応用した新規OPU-IVF-ETによる子牛生産システムの開発		日巻 武裕	岐阜大学 応用生物科学部	1,300
牛体外受精胚の染色体異常予測技術の開発(Ⅱ)	R1~	杉村 智史	東京農工大学大学院 農学研究科	1,300
牛の早期妊娠診断を目指した血中マイクロRNA定量に関する基礎的研究(Ⅲ)	H30~	木崎景一郎	岩手大学農学部 共同獣医学科	1,400
妊娠末期の黒毛和種における子宮動脈血流動態および胎盤の血流面積による胎盤機能および新生子牛の健全性の推定		伊賀 浩輔	農研機構東北農業 研究センター	900
糞および尿を検査検体として用いる簡便かつ正確な馬の妊娠診断法の開発		高橋 透	岩手大学農学部	1,000
牛におけるルーメン非分解性ナイアシン給与による子宮、卵巣への血流促進による分娩後の繁殖性向上		森田 康広	名古屋大学大学院 生命農学研究科	1,500
発情期における牛子宮内膜機能調節因子および調節機序の解明		杉浦 智親	酪農学園大学 獣医学群	1,000
温度センサと加速度センサを内蔵する多機能尾部センサの乳牛周産期管理への利用		檜垣 彰吾	農研機構 動物衛生研究部門	1,100
受胎性を裏付ける黒毛和種牛の分娩後子宮修復指標の確立		久保田 海雄	農研機構 畜産研究部門	1,300
卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討		小山 毅	北海道立総合研究 機構畜産試験場	1,200
ドライ精子による牛生産に関する研究		松川 和嗣	高知大学 農林海洋科学部	1,400

MTT (3[4,5-dimethylthiazolyl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) を用いた豚精液の評価法の開発		内倉 健造	愛知県農業総合試験場	1,100
牛初期黄体におけるPG抵抗性の解明—低酸素環境による抗アポトーシス機構—		西村 亮	鳥取大学農学部共同獣医学科	1,300
黒毛和種牛における妊娠期の栄養状態が産子の繁殖能力に及ぼす影響		北原 豪	宮崎大学農学部	1,200
リピートブリーダー牛の原因の多角的解析によるその対策のための基礎情報収集		羽田 真悟	帯広畜産大学獣医学研究部門	1,300
Ⅲ 動物衛生 (19件)				
オリゴコロナルな持続性リンパ球増多症を示す牛白血病ウイルス感染牛の生産性解析		猪熊 壽	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,600
牛難治性伝染性蹄病であるヘアリーアタックの病態解析		谷口 喬子	宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター	700
カンピロバクター・ジェジュニの「生きているが培養できない状態」を復帰させるための生物学的因子の解明		三澤 尚明	宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター	1,500
豚熱 (CSF) ワクチン接種繁殖母豚から初乳摂取条件の異なる子豚へのCSF抗体移行と存続に関する研究		長井 誠	麻布大学獣医学部	1,200
尾根部の体表温度から黒毛和種育成子牛の発熱を検知する手法の開発		佐々木羊介	宮崎大学農学部	1,000
牛呼吸器病症候群 (BRDC) 発症機序の解明 (Ⅱ)	R1~	帆保 誠二	鹿児島大学共同獣医学部	1,500
病原性因子を欠損した生後感染アカバネウイルスの作出と生ワクチンへの応用		正谷 達磨	岐阜大学応用生物科学部	1,600
熊本系褐毛和種における地方病性牛白血病抑制メカニズムの解明		稲永 敏明	東海大学農学部応用動物科学科	1,200
豚の筋ジストロフィーの病態解明と生前検査法の開発		相原 尚之	麻布大学獣医学部	1,600
リコンビナーゼポリメラーゼ増幅法とナノポアシークエンス技術を用いた超迅速なウイルス塩基配列読法の開発		堀江 真行	京都市大学白眉センター	1,600
牛白血病ウイルス由来の非翻訳性RNAと結合する宿主タンパク質の同定		安藤 清彦	農研機構動物衛生研究部門	1,700
豚消化器病ウイルスの感染メカニズムを解明するための豚腸管オルガノイドを用いた画期的なインビトロ実験感染系の開発		鈴木 亨	農研機構動物衛生研究部門	1,600
アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究 (Ⅲ)	H30~	杉浦 勝明	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,700
牛ウイルス性下痢ウイルスの準種END ⁻ は弱毒生ワクチンになるか? (Ⅱ) -より効果的に免疫を誘導するための可能性の追求-	R1~	塩川 舞	日本獣医生命科学大学獣医学部	1,100
肉用牛から分離された新規病原体 <i>Rhodococcus equi</i> の国内感染状況の疫学調査		鈴木 康規	北里大学獣医学部	1,400
畜産動物用粘膜ワクチンアジュバントの開発		若尾 雅広	鹿児島大学学術研究院理工学域工学系	1,500
UV-LED光殺菌を用いた、鶏病原性大腸菌殺菌システムの開発		下畑 隆明	徳島大学大学院医歯薬学研究部	1,600

網羅的ジェノタイプングによる新規牛白血病抵抗性遺伝子の同定（Ⅱ）	R1～	目堅 博久	宮崎大学 産業動物防疫 リサーチセンター	1,600
牛の消化管内寄生虫の浸潤度と駆虫プログラムの実施状況調査（Ⅲ）	H30～	森本 素子	宮城大学 食産業学群	1,000
Ⅳ 家畜飼養、飼料など（19件）				
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究（Ⅱ） －飼養成績と腸内細菌叢に及ぼす影響－	R1～	勝俣 昌也	麻布大学獣医学部	900
牧草サイレージの高品質化に向けたバイオガスプラント消化液施用量の評価		三谷 朋弘	北海道大学 北方生物圏フイ ールド科学セン ター	1,300
ルーメンマットスコアを指標にした子牛の免疫強化法の研究		保田 昌宏	宮崎大学農学部	1,500
量産可能なオリゴ糖素材を添加した飼料給餌による家畜腸内細菌叢改善効果の検証		西本 完	農研機構 食品研究部門	1,600
子牛の健全な発達を目指した消化管の上皮細胞接着微生物叢の相互関係の解明		西原 昂来	東北大学大学院 農学研究科	1,800
ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発		権藤 崇裕	宮崎大学 フロンティア科学 総合研究センター	800
牛肉の風味を維持した黒毛和種雌牛の肥育期間短縮技術の開発		庄司 則章	山形県農業 総合研究センター 畜産研究所	1,600
木材クラフトパルプの混合割合の異なる濃厚飼料の給与が黒毛和種去勢牛の飼料消化性および第一胃内発酵に及ぼす影響		前田 友香	宮崎県畜産試験場	1,400
耕畜連携を目指した国産トウモロコシ子実の高品質サイレージ化に向けた調製条件の探索		神園 巴美	農研機構東北農業 研究センター	800
母子同品種のホルスタイン種および黒毛和種における分娩直後の母牛、分娩時の臍静脈および出生直後の子牛のアミノ酸濃度の比較		川島 千帆	帯広畜産大学 畜産フイールド 科学センター	1,400
肉用鶏の成長効率に關与する腸管内Wntおよびその受容体の探索		伊藤 謙	秋田県立大学 生物資源科学部	1,600
ルーメン内繊維消化ダイナミクスに着目した採食可能量の予測モデルの開発（Ⅱ）	R1～	谷川 珠子	北海道立総合研究 機構酪農試験場	1,400
国産トウモロコシ子実の乾燥温度および貯蔵条件がトウモロコシの栄養価に及ぼす影響		篠遠 善哉	農研機構東北農業 研究センター	1,100
黒毛和種肥育牛の部分尿による尿中窒素排泄量の推定方法の確立		近藤 誠	三重大学大学院 生物資源学研究科	1,000
ビタミンA投与が黒毛和種子牛の骨格筋成長に与える影響		二瓶 直浩	栃木県畜産酪農 研究センター	1,200
ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与が対馬地鶏肉用交雑鶏の発育および肉質に及ぼす影響		深川 聡	長崎県農林技術 開発センター	900
暑熱ストレスによる筋成長阻害のブレークスルー：筋幹細胞の活性化・増殖因子HGFのニトロ化（不活化）の關与の検証（Ⅱ）	R1～	辰巳 隆一	九州大学大学院 農学研究科	1,600
家畜糞の分解効率に關わる土壤・糞中微生物の關連性～多様性と量の謎を解く		内田 義崇	北海道大学大学院 農学研究科	1,500
初乳成分による産肉特性の代謝的プログラミングの可能性（Ⅱ）	R1～	松崎 正敏	弘前大学 農学生命科学部	1,500
合 計		79件		105,000

伊藤記念財団賞

安部 亜津子

鳥根県畜産技術センター 肉用牛科長

〔業績の課題名〕

黒毛和種牛肥育経営の収益性向上を目指した短期肥育技術 ならびに和牛肉の特性評価に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

黒毛和種肥育牛の生産費は肥育素牛価格の高騰や飼料価格の高止まりによって年々上昇し、収益性の確保が喫緊の課題となっている。そのために、生産コストの低減と生産された牛肉の市場価値を高めることが必要である。そこで短期肥育によるコスト低減と、和牛肉の特徴の客観評価について研究を行い、以下の成果を得た。

1. 黒毛和種牛の短期肥育技術の開発

（1）黒毛和種去勢牛の短期肥育における飼料給与技術

短期肥育は飼料費等の生産コストの低減に有効な手段の一つであるが、慣行肥育（29か月齢）と同等の枝肉重量と肉質を安定的に確保する技術が求められている。24か月齢出荷の短期肥育体系において、肥育前期（8～13か月齢）にバイバスタンパク質飼料を補給することで、増体量が向上し、慣行肥育と同等の枝肉成績が得られることを明らかにした。さらに飼料給与方法として、短期肥育牛に対する発酵混合飼料（TMR）の給与効果を検討し、粗飼料と濃厚飼料を分離給与する従来法で問題となっている、濃厚飼料多給に起因する消化器等の疾病が低減され、濃厚飼料摂取量を高く維持できることを証明した。これらの肥育試験成績をもとに行った経営試算により、短期肥育は飼料費低減と牛舎回転率向上によって1頭あたり約5万円の収益向上効果があることを示した。

（2）短期肥育における国産飼料の活用

飼料用米、飼料イネ科の国産飼料の利用拡大は、飼料の安定確保、安全安心な牛肉生産から重要な課題である。飼料用米（破碎粳米）の配合割合が異なる肥育牛用発酵TMRの消化試験を行い、飼料の摂取量と消化・利用性の観点から、適正配合割合は乾物中14%であることを明らかにした。また、輸入乾草を飼料イネで全量代替した発酵TMRを全期間給与する肥育試験の結果、慣行と比べて肉質を大きく低下させることなく枝肉重量を確保できることを示した。

2. 和牛肉の市場評価向上における官能評価技術の活用

和牛肉の市場評価向上を目指し、給与飼料の検討と牛肉の特性評価を実施してきた。特に脂肪酸組成について、嗜好型パネルによる官能評価により、脂肪含量を考慮した消費者嗜好への影響調査を行い、脂肪酸組成の違いにより脂肪含量の高低のほうが大きく影響することを明らかにし、脂肪含量を考慮した評価の重要性を示した。また、味覚センサー測定値の官能評価による検証を行い、項目によっては味覚センサー強度とヒトの官能特性とは必ずしも一致せず、官能特性評価における官能評価の必要性を示した。

岩崎 智仁

酪農学園大学農食環境学群 食と健康学類 教授

〔業績の課題名〕

食肉加工への超高压利用，新規顕微鏡による食肉の顕微解析 ならびに鶏の異常硬化胸肉に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉を対象とした研究領域は、食資源としての家畜の骨格筋特性からその加工特性等の理解までと広範囲に及ぶ。これまでにはいくつかの新規手技手法の食肉加工への展開と食肉科学分野での応用に関する研究を行ってきた。その内容は主に、（１）食肉加工への超高压処理の利用、（２）原子間力顕微鏡の食肉科学への応用、（３）肉用鶏の異常硬化胸肉の性状と発現機序に関する研究に分類される。

（１）食肉加工への超高压処理の利用

「超高压処理を利用した新規加工食肉製品の開発」を目的とし、筋原繊維タンパク質、特にミオシンならびにそのフィラメントの圧力変性について分光学的、電子顕微鏡学的手法等にて詳細に検討した。さらに肉パティを適切な圧力強度で処理した後に加熱することで、低温濃度においても良好なテクスチャーを持つエマルジョン型の肉製品製造の可能性を見出した。

（２）原子間力顕微鏡の食肉科学への応用

走査プローブ顕微鏡の一種である原子間力顕微鏡を用いた食肉科学分野でのナノレオロジー解析において実績をあげた。主たる業績として、溶液中の加熱あるいは加圧変性したミオシンフィラメント線維の微細構造観察と局所物性（ナノレオロジー）解析を実施し、それら弾性率の温度ならびに圧力依存性がゲル（バルク）の弾性率変化と一致していることを見出した。さらに、食肉の熟成過程における筋原線維構造のナノ弾性計測に成功し、食肉の軟化機構における脆弱部位を明確に示してその理解の一助とした。

（３）肉用鶏の異常硬化胸肉の性状と発現機序に関する研究

2013年ごろから世界的に肉用鶏の胸肉異常である異常硬化胸肉（wooden breast）が頻発している。この異常硬化胸肉の組織化学的特徴と発現鶏の臨床的所見から、飼育の比較的初期にその兆候が現れることを明らかにした。また、異常硬化胸肉を発現する鶏では筋ミトコンドリアに異常があり、その異常の程度が発現の有無に関係していることを明らかにした。さらに、異常硬化胸肉の死後熟成による生化学的組織学的変化についても明確にし、その利用の可能性についても調査を進めた。

学会等事業助成

令和2年度学会等事業助成実施報告書

シンポジウム『豚の感染症と私たちの暮らし —豚熱とアフリカ豚熱の現状と対策』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）

〔開催主旨〕

畜産動物の健康管理は獣医学の主要な研究テーマの1つである。なかでも家畜の感染症は多くの動物に拡散する可能性があり、発生した場合には莫大な経済的損失をもたらすため、一般市民の方からも大きな関心が寄せられている。近年、豚の重大感染症の発生が国内外で頻発しており、マスコミで報道されることも多いため、一般市民の関心も大きくなっている。豚熱（旧：豚コレラ）は、2018年9月に岐阜県で発生したのち、終息することなく2020年12月現在、北は東北地方、南は沖縄県にも拡大している。一方、アフリカ豚コレラは中国、韓国をはじめとするアジア各国で猛威を振るっており、旅行者によってウイルスに汚染された食品が日本国内に持ち込まれるリスクが現実のものとなっている。つまり、これらの感染症により、豚肉の安定供給に大きなリスクが生じており、病原体の海外からの侵入と国内での拡散を防ぐには、いまや国民が一体となって協力し行動しなければならない状況である。このため、市民公開講座「豚の感染症と私たちの暮らし」を開催し、豚熱とアフリカ豚熱とはどのようなものであるか、またそれがどのように拡がり、それを防ぐにはどのような対策をとる必要があるのか、現状と対策について、一般市民の方が理解できることを目的として市民公開講座を開催した。なお、本年はCOVID-19のまん延の影響から、ZOOMを利用したオンラインセミナー方式で実施した。

〔開催概要〕

令和3年2月7日（日）14：00－15：40にZOOMを利用したオンラインセミナー方式にて、一般市民を対象とした市民公開講座を開催した。事前に約700名の申込があったが、当日の参加者は約280名であった。また、シンポジウムの講演を動画に編集し、本学会HPにて、同年3月31日まで一般に無料公開した。さらに、講演内容については小冊子にまとめ、3000部を印刷し、関係機関（獣医系大学、日本養豚協会、日本養豚開業獣医師協会等）へ無償配布した。

〔シンポジウムプログラム〕

開会挨拶 14：00－14：05 久和 茂（日本獣医学会理事長）

講演① 14：05－14：45

演題：豚熱（CSF）の現状と今後の展望－食生活への影響はあるのか

演者：迫田義博 北海道大学大学院獣医学研究院 教授

座長：内田和幸 東京大学大学院農学生命科学研究科 准教授

講演② 14:45-15:25

演題：アフリカ豚熱（ASF）の脅威および国内／農場侵入ルートと対応策

演者：末吉益雄 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科 教授

座長：大澤健司 宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科 教授

総合討論・質疑応答 15:25-15:35 司会 猪熊 壽（日本獣医学会理事）

閉会 15:40

〔講演概要〕

講演①「豚熱（CSF）の現状と今後の展望－食生活への影響はあるのか」

迫田 義博（北海道大学大学院獣医学研究院 教授）

2018年9月に26年ぶりに国内で豚熱（CSF，以前の病名は豚コレラ）が発生し，2年が過ぎたが，ウイルスが野生動物であるイノシシで感染拡大しており，結果として豚での発生も60事例を超えた。豚にワクチンを接種して対応しているものの，ワクチンはその性能上，ウイルス感染を完全に防ぐことができないため，今後もワクチン接種農場での発生が懸念される。問題の根本解決には，イノシシからウイルスを完全に追い出す必要があるが，そのゴールには10年以上の努力の継続が必要であり，生産者にはそのための支援が必要である。豚熱ウイルスは豚とイノシシのみに感染し，ヒトへは感染しない。豚熱清浄化への道のりは長い，関係者は最善の衛生管理を続けており，スーパーに並ぶ豚肉はこれまで通り美味しく安全なので，各位には安心して豚肉の消費をお願いしたい。

講演②「アフリカ豚熱（ASF）の脅威および国内／農場侵入ルートと対応策」

末吉 益雄（宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科 教授）

アフリカ豚熱（ASF）は国内で発生している豚熱とは原因ウイルスが違う，まったく異なる豚の高致死性の熱性出血性伝染病である。ASFウイルスは4℃で525日間以上，pH 3.9～13.4で7日間生残する。死亡イノシシ体中，感染豚由来加工肉製品内では3～6ヶ月間生残する。ASFの伝播は感染豚・イノシシ等との直接的・間接的接触だけではなく，ダニの媒介もある。ASF流行はアフリカと一部の地域に限局していたが，2007年4月にジョージアに侵入して約10年間で欧州・ロシアにまん延し，2018年8月に中国に侵入して，約1年間で東・東南アジア諸国にまん延した。国内の国際空港等で摘発された手荷物等の肉製品等からASFウイルス遺伝子が89件（うち3件は感染性有）検出された（2020.10.25）。これらは氷山の一角であり，すでに国内にはASFウイルスが侵入している可能性もあり，いつ，どこで発生してもおかしくない状態である。有効なワクチンはなく，消石灰散布による消毒も期待できない病気である。一般の皆様にもご注意を願いたい。

日本食肉研究会 令和2年度事業助成の実施報告

日本食肉科学会 理事長 坂田亮一（麻布大学名誉教授）

1. はじめに

標記の事業の項目として、(公財)伊藤記念財団から今回助成を受けたのは、(1)海外派遣事業の補助(国際食肉科学技術会議派遣)、(2)国内における研究会でのセミナー、および(3)第68回国際食肉科学技術会議(2022年 神戸開催、日本食肉科学会主催)の組織委員会の運営の補助などである。

昨年8月に実施された(1)、昨年9月および今年3月に行った(2)、および昨年度の組織委員会の活動(3)まで、各項目の実施内容を順次報告するが、これらの助成を受けた「日本食肉研究会」の概要について以下に記す。

2. 日本食肉研究会等の概要

本会は昭和34年(1959年)4月に発足し、食肉に関する分野について広く学界、業界、団体関係者がお互いの研鑽の場として、学術と産業の発展を目指し、「日本食肉研究会」の名称で長年活動を行ってきた。

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。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。これらの研究会の発表要旨ならびに、総説、解説、海外事情、最近の文献紹介などが「食肉の科学」に掲載されている。

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、ICoMST2022の成功に向けて国内受入組織である本会は重要な役割を担っている。

一昨年は、研究会創設60周年という記念すべき年となり、3月30日の大会で記念式典が開催された。ヨーロッパから2名の招待講演者を迎え、会場となった麻布大学に多くの参加者が詰めかけ盛大なセレモニーとなった。これらの行事に関しても、日本食肉科学会ホームページで紹介している(<http://jmeatsci.org/>)。その詳細は、一昨年発行した本財団助成研究報告書¹⁾に、また同内容で「食肉の科学」60巻1号²⁾にも掲載した。

昨年3月の第61回日本食肉研究会大会は、京都大学農学部での畜産学会大会に関連して行うことになっており、また多数の演題申し込みと協賛もあったため、鋭意準備を進めていたが、新型コロナウイルスの感染拡大により、やむなく中止となった。前回を超す演題申し込みと協賛もあっただけに、真に残念な決断であった。2022年に開催する国際食肉科学技術会議を見据え、学術情報交換や人脈拡大など

期待されていた大会であっただけに断腸の思いであった。このことは昨年の本報告書にも記述している³⁾。そこで、本会の活動が停滞することを懸念し、春の大会に代わる特別セミナーを昨年秋（9月19日）に開催した（図1）。初のリモートでの大会であったが、コロナ禍中の医療と食肉産業の現場の話題は大きな反響があり、約80名の参加があった。そこで、活発な意見交換が交わされ、会員にも現状を知るよい機会になった⁴⁾。

本研究会は、今年度から「日本食肉科学会」に改称した。その理由は、来年に迫った第68回国際科学技術会議の神戸開催を成功させるには産官学からの会員が一体となって内部強化を図ることが急務であること、また関係諸方面に主催団体の活動を訴えるためにも、学会化は重要であるとの会員の声を受けてのことである。この学会化にあわせて、本会が発行している「食肉の科学」のバックナンバーすべてを電子化しており、会員はオンラインで閲覧可能となった（発行後2年経過した全号）。

本学会の会員数は、本年6月30日現在で、正会員178名（前年160名）、学生会員17名（前年6名）、賛助会員6社（前年6社）、特別会員32社（前年31社）、名誉会員8名（前年9名）である。

3. 今回の助成結果

(1) 海外派遣事業の補助

国際食肉科学技術会議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名を派遣してきた。その際、代表者会議に出席し、会議報告を本会機関誌の「食肉の科学」に掲載し、内容を会員に周知することが義務づけられている。この海外派遣事業の補助を受け、2019年の第65回会議には本会から会員4名が参加した。

2022年に神戸で開催される68th ICoMSTに向けて、組織委員会メンバーの大半が、昨年8月USAフロリダのオーランドでの国際会議に参加すべく準備を行っていたが、その年になってCOVID-19の勃発という思いもよらない事態が生じ、前年春の日本食肉研究会も余儀なく中止となった。

ICoMST本部（アイルランド）からは、この世界的なパンデミックにより米国の会議は1年延ばし、それに続く予定国の会議は1年スライドし、日本も中止にしないでもらいたいとの通告を昨春に受けた。ICoMST2022組織委員会としても、それに従い、神戸での会議を延期することで意思統一していた。しかし、まもなくして、exclusively virtual meeting すなわち、オンラインでの開催がアナウンスされた。毎年開かれてきたこの会議としては、このような形式での開催は初めてのことであった。これまでと違って、会議登録は早割をやめて開催間際まで受け付けられ、一般参加は1名200ドル（学割あり）に抑えられた。我々組織委員会としても、この海外派遣事業の補助を活用し、大いに参加を呼びかけた結果、参加人数は30名にのぼり、これは主催の米国に次ぐ人数であった⁵⁾。写真1に初日（8月3日）の



図1 昨秋のセミナー要旨集の表紙

開会式の様子を示す。

ICoMST2020のバーチャル開催に対して、参加した日本の組織委員会メンバーからの意見をうかがった。ある委員から、良かった点は講演画面の字幕が講演内容の理解の助けになったことと、講演（録画）を後から見直すことができたことで（写真2）、良くなかった点は、学会自体のHPがなく、スケジュールがわかりにくかったことや、使用する機器の性能（マイク感度や画面の解像度など）に影響を受け、小さい文字が見えにくく、またZoomによる質疑応答では音声聞き取り難いことなどであった。また、講演の字幕付き配信はネイティブでない視聴者からでも理解しやすいものであったが、事前録画や大会運営は非常に苦労があったものと思われる。

本来顔と顔を合わせ、1週間近く一緒に同じ空気を吸うことで、学術上の意見交換が保たれ、国際的な人的交流も図られるのが、この会議の伝統であり特徴である。コロナショックの中、リモート様式が当たり前になり、画面越しにしかコンタクトできないのは、この会議の主旨にそぐわないことも事実である。実際コロナ感染拡大が起こった当初、会議開催に関して、延期してでも従来方式を踏襲するようICoMST本部でも声明を出していたが、米国側に押し切られた感がある。2022年、日本主催の時にいまだコロナ禍が収束に至ってないならば、その判断が問われるであろう。

（2）国内における研究会でのセミナーの補助

「日本食肉研究会」は、周知のようにミートサイエンスに関する研究者、業界人などの集まりで、毎春に大会（学術講演会）を開催してきたが、先に記したようにコロナ禍で2020年は中止となった。今回、春の大会に代わる集会を「秋期特別セミナー2020」という形でオンライン開催し、コロナ禍の中での医療・家畜生産および食肉産業の現場での話題をあげ、専門家による講演を行った⁴⁾。

このセミナーは東京飯田橋にあるTKP市ヶ谷カンファレンスをキーステーションとして、2020年9月19日13:30~17:00の設定で開催した。Zoom配信により、令和元年度伊藤記念財団賞受賞講演（受賞者は林利哉・名城大学農学部教授：司会は宮口右二・茨城大学農学部教授）に続き、本題のセミナー



写真1 会議開始のカウベルを鳴らすLonergan委員長、毎回恒例のセレモニー（WEB画面より。最終日の終了時も鳴らす）

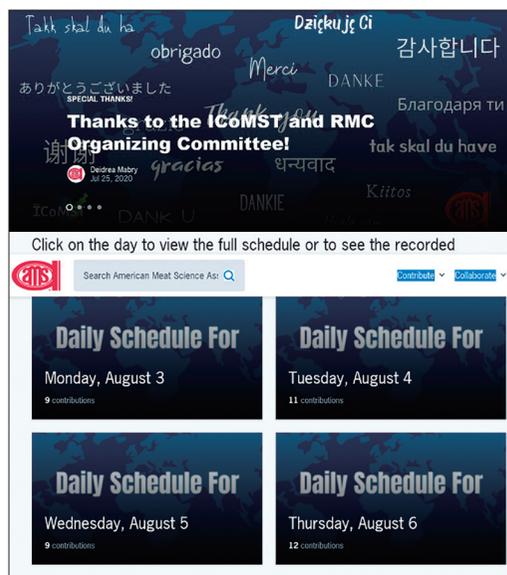


写真2 日ごとの講演画像と論文が見られる会議WEB

が始まった（写真3）。セミナーでは、順に桑平一郎氏（東海大学：東京病院呼吸器内科特任教授）、伊藤貢氏（愛知県：あかばね（有）動物クリニック代表・獣医師）および竹内裕嗣氏（東京：大和食品工業（株）代表取締役社長）の諸氏が講演を行った。総合司会は松石昌典氏（日本獣医生命科学大学教授、日本食肉研究会副会長）で、それぞれの講演の座長は坂田、押田敏雄会員（麻布大学名誉教授、日本食肉研究会監事）および西海理之会員（新潟大学教授、日本食肉研究会常任幹事）の順に担当した。また、閉会挨拶は有原圭三会員（北里大学獣医学部教授、日本食肉研究会副会長）が執り行った。



写真3 特別セミナー配信会場で講演者と進行役

林氏の「伊藤記念財団賞受賞講演」の受賞題名は「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」で、その詳細内容は「食肉の科学」2020年第1号⁶⁾に掲載されている。研究の概略は食肉・食肉製品の機能改善に関する内容で、特に有用微生物を用いた発酵や加熱処理といった食肉加工技術によって、より安全で美味しく、かつ機能性が強化された高付加価値な製品の創製を目指し、①レトルト食肉の機能維持・改善、②低温性乳酸菌を用いた食肉の機能改善についてであった。

今回の秋期特別セミナーの受講者はあらかじめオンライン登録をした日本食肉研究会会員が主で、北海道から九州まで80名が受講した。講演で、桑平氏は発症の機序、症例のCT画像、感染対策などについて詳述された。伊藤氏は、コロナ以外の畜産や食肉産業に影響を及ぼす可能性がある感染症についても触れ、それらの対応についても述べられた。竹内氏は信用をベースに事業を展開し、消費者ニーズに合致した商品開発を進めたいと力説され、それぞれの講師からコロナ社会で我々が生活していくために貴重な情報を拝聴できたと、会員からも賞讃の声が得られた。

本年3月の定例会（第62回日本食肉研究会大会）もオンライン形式で開催し、令和2年度伊藤記念財団賞の佐々木啓介会員（農研機構）の受賞講演「食肉の官能特性評価と消費者受容に関する研究」、ならびに特別講演で、Dr. Wangang Zhang（南京農業大学教授）による「Protein post-translational modification in fresh meat: emphasis on the effects of S-nitrosylation on beef tenderness」および Dr. Peter McGilchrist（University of New England 上級講師）による「Japanese consumer perception of Australian grass fed and Japanese Holstein beef」（写真4）を配信し、質疑応答をライブで行った。前大会では、米国、ロシアから招聘予定だった研究者の講演が大会中止によって実現できなかったが、今回の成功により本助成による国際交流事業を継続できたことは、来年に迫った国際会議の主催にあたり大きな収穫であった。

（3）第68回国際食肉科学技術会議運営の助成

2022年、神戸開催を目指し、組織委員会を3年前に立ち上げ、鋭意準備を進めている。一昨年8月は、上記ポツダムでの65th ICoMSTに組織委員会メンバーを派遣し、情宣活動を実施した。昨年は上記の

通り米国での66th ICoMSTがコロナ感染拡大でリモートになり、派遣の機会がなかったが、大勢の組織委員会メンバーが参加した。昨年からの組織委員会はほぼ2カ月ごとに精力的に会議を開き、そこで活発な意見交換を行っている。農林水産省、厚生労働省ならびに各種食肉関連団体、学会等から後援承諾を得ており、作成した趣意書を関連企業や団体に配布し、協賛金の依頼活動を展開している。そのためにNews Letterを本年から発行し(図2)、組織委員会活動の広報に努めている。

一方で、コロナウイルス感染拡大の中で、会議の様式について、ICoMST本部ならびに本年第67回会議をバーチャル形式で開催するポーランドの組織委員会と連携し、国際情勢も見ながら開催に向けて鋭意検討中である。

4. おわりに

(公財)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5回目となった。平成30年度まで順調に大会を開催し、外国人研究者招聘等を実施することができた。しかし、その後の予期せぬ新型コロナの発生により、大会の中止に至るなど混乱をきわめた。このパンデミックの中で、昨年度はリモート方式を駆使し、すべての助成事業を行うことができたことは、本会を運営するうえでも大きな進歩と言える。国際会議参加、来年神戸での国際会議開催を見据えての諸外国のキーパーソンとの交流など、この海外派遣とセミナーの事業助成効果は確実に上がってきたと判断する。実際、昨年度の活動の中で画面越しに英語でのコミュニケーションも図られたことは、この助成による成果であると感謝する。

来夏の神戸開催が予定通りできるよう、コロナ社会の中でもできる限りの準備は、組織委員会をフルに稼働させて進める方針である。

ここに、助成をいただいた(公財)伊藤記念財団の皆様へ深謝し、引き続き本助成の増強を日本食肉研究会あらため日本食肉科学会として衷心よりお願い申し上げます。



写真4 特別講演セミナーの講演者と座長(河原聡会員, 宮崎大学教授)

ICoMST2022 News Letter No.1

第68回国際食肉科学技術会議 組織委員会
発行責任者 坂田亮一
発行日: 2020.12.1

68th International Congress of Meat Science and Technology
August 21-25, 2022

■ News Letter の発行に寄せて

2022年8月に日本で2度目の開催が決定している国際食肉科学技術会議(68th ICoMST,またはICoMST2022と表記)について、主催団体の日本食肉研究会会員の皆さんには定期刊行誌「海外事情」の参加観音などで、準備の進捗をお伝えしてきました。また日本食肉研究会ホームページでも会議の情報を発信し、ご覧いただいたと思います。

このNews Letterでは、会議について、68th ICoMSTの後援団体、協賛団体、顧問の皆様にも準備の進捗をタイムリーにお伝えすべく、発行致します。皆様におかれましては準備の進捗状況についてご理解いただき、引き続きご協力を賜りますようお願い申し上げます。

■これまでの経緯

組織委員会は2年前に立ち上げており、最新の会議(本年10月開催)で7回目になります。組織委員会は、財務、広報、登録、プログラム、会場、宿泊・ツアー、行事・振替、展示、総務の9つの部会に分かれており、それに、事務局と協賛の窓口となる募金委員会があります。

組織委員会の構成やみなさまの方へ、組織委員会立ち上げのための準備委員会が、日本政府観光局(JNTO)発行の国際会議開催マニュアルに従って作成しました(左図)。これまで開催した組織委員会は、各正副部会長と事務局が主体で行ってまいりましたが、これからは状況に応じて参加委員の幅を広げる必要があります。

立ち上げ時期の要点
1. 組織作り
2. 準備作成
3. 全体の計画づくり

ICoMST2022 組織委員会を立ち上げる時の流れ、組織づくり部会の仕事内容などこのマニュアルに沿って作成

上かつは準備委員会の会議模様。ここで開催日や会場などを決定。一番下は、神戸国際会議場の視察風景。2017年春

ICoMST 2022 INDA JAPAN
第2ロゴマーク、需給りをイメージ

図2 第68回国際食肉科学技術会議組織委員会のNews Letter No.1

参考資料

- 1) 坂田亮一：日本食肉研究会への平成30年度事業助成実施報告，平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.37, 521～524, 2019.
- 2) 坂田亮一，山之上稔，若松純一，本山三知代，参加者13名：第65回国際食肉科学技術会議に出席して，食肉の科学，Vol.60, No.2, 203～217, 2019.
- 3) 坂田亮一：日本食肉研究会への平成31年度・令和元年度事業助成実施報告，令和元年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.38, 443～447, 2020.
- 4) 押田敏雄，坂田亮一：日本食肉研究会秋期特別セミナー2020 -新型コロナウイルス感染症における医療・家畜生産および食肉加工の現状-，食肉の科学，Vol.61, No.2, 194～201, 2020.
- 5) 坂田亮一，日本食肉研究会 ICoMST2022 組織委員会一同：第66回国際食肉科学技術会議（ICoMST2020）米国開催の概要，畜産技術，2020年1号，51～58, 2020.
- 6) 林 利哉：筋肉・食肉タンパク質の機能・加工特性に関する研究 -食肉製品の高付加価値化を目指して-，食肉の科学，Vol.61, No.1, 25～35, 2020.

令和2年度事業実施報告書
日本畜産学会第128回大会（オンライン開催）
公開シンポジウム
市民公開シンポジウム1
「地球温暖化：暑熱ストレスによる家畜・家禽の
生産性低下の科学的理解と対応策の展望」

公益社団法人日本畜産学会 理事長 柏崎直巳（麻布大学）

〔日時〕 2021年3月28日（日）13：00～15：30

〔会場〕 Zoom第1会場（講演録画配信とライブ質疑応答）および講演動画とライブ質疑応答の録画を一般公開（シンポジウム終了後から4月3日24時までオンデマンド配信）

〔主催〕 公益社団法人日本畜産学会

〔共催〕 九州大学大学院農学研究院

〔企画〕 日本畜産学会第128回大会実行委員会（大会長：古瀬充宏）

〔プログラム〕

（それぞれ約20分の講演）

講演1. 「飼料給与面からの肥育豚における暑熱対策」

脇屋裕一郎氏（佐賀県畜産試験場）

講演2. 「夏季暑熱による乳牛の生産性低下の科学的理解と対応策の展望」

黒川勇三氏（広島大学・瀬戸内圏フィールド科学教育研究センター農場）

講演3. 「現代ブロイラーの暑熱対策と生菌剤を用いた夏場生産性の改善」

山下祐樹氏（株式会社ジャパンファーム）

講演4. 「株式会社ニチレイフレッシュファームにおける暑熱ストレスによる生産成績への影響とその対策」

佐々木隆行氏（株式会社ニチレイフレッシュ）

講演5. Livestock Production Concerning Global Warming : A Case Study in Thailand」

Sanchai Jaturasitha氏（Chiang Mai University, Thailand）

総合司会者（座長）：

豊後貴嗣氏（広島大学大学院統合生命科学研究所）

Wishwajit Sur Chowdhury氏（九州大学基幹教育院）

ライブ質疑応答（総合討論：約30分）：

Zoomのチャット機能により各講演に対する質問を受け付けた。すべての講演が終了した後、寄せられた質問に対して演者が回答した。時間内に対応できなかった質問とその回答を質疑応答集として4月5日にHPに掲載した。

〔講演動画とライブ質疑応答録画の一般公開〕

本シンポジウムの市民公開にあたり、福岡県内の農業高校4校および農業関係者にパンフレットなどを配布したほか、九州全域の農業関係者に電子媒体にて案内を行った。すべての講演動画とライブ質疑応答の録画を、シンポジウム終了後から4月3日24時までオンデマンド配信するとともに質問を受け付けた。

〔開催概要〕

地球温暖化を原因とする諸問題の1つに食料生産効率の低下がある。家畜・家禽産業において、特に夏季の暑熱環境による生産性の低下は大きな経済的損失を招く深刻な問題である。世界人口の急速な増加と関連して、食肉（特に鶏肉）の消費量がアジア諸国や南米などで急増していることを考えると、良質なタンパク質供給源である畜産物の夏季における生産性を格段に向上させる方策が喫緊の課題であると言える。

暑熱環境による家畜・家禽の生産性低下をブレイクスルーするためには、繁殖・育種・栄養・生産物などのさまざまな要素を統合的に理解することが重要である。それぞれの専門分野で精力的に研究をされている2名の日本人研究者から最新の知見をご講演頂いたほか、国内企業2社と国外の大学（タイのチェンマイ大学）の講演者から暑熱環境下での畜産業の現状と改善策が紹介された。総合司会者2名を配置し、本課題の現状と解決策を展望するため約30分の質疑応答を行った。

本シンポジウムにより、研究者および農業関係者に対しては、今後求められる「暑熱環境下での畜産業の発展モデル像」がより鮮明になったとともに、オンデマンド配信により「地球温暖化」の影響を考える市民公開型事業に相応しい良質な情報発信になったと評価された。

講演録画配信とライブ質疑応答を行ったZoom第1会場には150名前後の参加者があり（最大数は159名；本大会の参加登録者総数634名の約25%相当数）、質疑応答は計14件であった。また、オンデマンド配信による市民公開の視聴者数は91名であった。そのうち46%にあたる42名が農業関連の会社員等（会社員／公務員／自営業者）であった。一方、農業以外の会社員等が29%（26名）、研究教育者が11%（10名）、その他10%（9名）と、多様な属性を持つ方々に視聴いただくことができた。さらに報道関係者も4%（4名）確認され、講演内容の積極的な取材が行われたと考えられた。次にシンポジウムの情報を得た方法については、視聴者の48%が日本畜産学会128回大会HPからと答えている。これに知人から教えてもらったという回答を含めると82%にのぼり、多くの視聴者がシンポジウムのみならず日本畜産学会128回大会に関心を持っていたと考えられた。それ以外に、配布された広告で知ったという回答も6%（6名）あり、積極的な広報活動が今後も望まれる。これらの分析結果が上記の総評を裏付けている。高校生や大学生の視聴がなかったことは残念であった。

なお、本シンポジウムを含む第128回大会を従前通り対面式で実施することを予定していたが、コロ

ナ禍によりオンライン式に変更を余儀なくされた。このため、当初予定していたとおりに予算を執行することが困難となった。貴財団の了解を得て、助成金は本シンポジウムを含めて第128回大会の運営に適切に支出したことを申し添える。ここに記して、貴財団のご理解と柔軟なご対応に感謝の意を表すものである。

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

令和2年度 (Vol. 39)

2021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>