令和３年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 40

公益財団法人
伊藤記念財団

「伊藤記念財団」設立趣意書

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

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

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

第１は，食肉加工団体の指導体制の若返りであり，

第２は，食肉加工業の基礎的研究の充実であります。

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

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

昭和56年６月

設立発起人　伊　藤　傳　三

© The Ito Foundation

Philosophy Behind the Establishment of the Ito Foundation

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

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

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

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

Denzo Ito, Founder

June 1981

© The Ito Foundation

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。

⑴　食肉の生産，処理，加工等に関する基礎的研究及び調査

⑵　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

⑶　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

⑷　食肉の生産，処理，加工等に関する情報の普及及び広報

© The Ito Foundation

（事業実績）

年度	研究調査助成			伊藤記念財団賞授賞		学会等助成事業
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	第１回	4名（8,000千円）	
28	35	71	69,000	2	3名（6,000千円）	3団体（3,700千円）
29	36	74	75,000	3	2名（4,000千円）	2団体（2,500千円）
30	37	84	101,200	4	3名（6,000千円）	3団体（3,795千円）
31（令和元年度）	38	74	105,000	5	3名（6,000千円）	3団体（4,990千円）
2	39	79	105,000	6	2名（4,000千円）	3団体（4,500千円）
3	40	80	110,000	7	3名（6,000千円）	3団体（6,000千円）

© The Ito Foundation

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40年となります。この間，当財団の研究調査助成事業の存在が畜産関係の方々の間に浸透いたし，事業内容も逐次充実して参りつつあります。

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

本書は，40回（令和３年度）助成事業における80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７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４年11月

理事長　伊　藤　功　一

Dear Sir：

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

You will find out philosophy behind the establishment of the Ito Foundation described by Mr.Denzo Ito, in the research report of the Ito Foundation, Vol.40 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. 2022
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation

© The Ito Foundation

研究助成事業

目　　次

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（Ⅲ）
…… 若松　純一・阿部　　悠・翟　　洋（北海道大学大学院農学研究院）…… 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（Ⅲ）
…… 竹　中　慎　治（神戸大学大学院農学研究科）…… 9
食肉加工品の塩漬熟成に認められる「塩なれ」に関する研究
ー食肉加工品の塩味に対する遊離脂肪酸の影響ー
…… 中村　幸信・内海　寛子・吉田　由香・猪口　由美
（一般社団法人食肉科学技術研究所）…… 16
食肉の品質を制御する遺伝的要因に関する多因子複雑系の解析
：細胞骨格との関連からのアプローチ
…… 灘　野　大　太（名古屋大学大学院生命農学研究科）…… 21
国内標準化を目的とした食肉の可食期間延長技術の検証
…… 中　村　好　徳
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター）…… 26
枝肉の 3D グラフィック化システムの製作（Ⅲ）
…… 本山　三知代・石田　翔太・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）…… 31
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（Ⅱ）
…… 早　川　　徹（北海道大学大学院農学研究院）…… 37
ポークソーセージにおけるタンパク質の香り保持効果とそのメカニズムの解明
…… 西村　敏英・山口　千里（女子栄養大学栄養学部）…… 41
食肉加水分解物の栄養機能について
…… 竹之山　愼一・川北　久美子・六車　三治男（南九州大学健康栄養学部）…… 49
プレバイオティクスによる食肉の効果的な栄養利用の研究
…… 大島　健司・髙原　彩那・北浦　靖之（名古屋大学大学院生命農学研究科）…… 58
鶏肉の低温調理におけるカンピロバクターの消長
…… 下　島　優香子（相模女子大学栄養科学部）…… 66
ハム・ソーセージの食品添加物に関するスマート・リスクコミュニケーションの
改良研究ならびに効果検証
…… 山﨑　　毅・山﨑　深雪（特定非営利活動法人食の安全と安心を科学する会）…… 74

© The Ito Foundation

近赤外光と偏光，AI を組み合わせた食肉中の虫および異物検知技術の開発
…… 山　口　堅　三（徳島大学ポストLEDフォトニクス研究所）…… 82
ニワトリ骨格筋成長に遺伝子変異が及ぼす影響の全ゲノム解析に基づく解明
…… 石　原　慎　矢（日本獣医生命科学大学応用生命科学部）…… 87
早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明
…… 平野　　貴[1]・村木　英二[2]・佐々木　慎二[3]
（[1]東京農業大学農学部，[2]岐阜県畜産研究所飛騨牛研究部，[3]琉球大学農学部）…… 93
ウシ複合脊椎形成不全症の病態解析とウシの骨格成長に重要な糖鎖の同定
…… 古　市　達　哉（岩手大学農学部共同獣医学科実験動物学研究室）…… 99
肥育豚の霜降り割合の指標となるバイオマーカーの特定
…… 谷口　雅章[1]・中島　郁世[1]・荒川　愛作[1]・吉岡　　豪[2]・鈴木　香澄[2]
（[1]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，
[2]岐阜県畜産研究所養豚・養鶏研究部）…… 104
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（Ⅱ）
…… 横　井　伯　英（京都大学大学院農学研究科）…… 110
黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立
…… 中嶋　宏明・庄司　則章（山形県農業総合研究センター畜産研究所）…… 115
黒毛和種における経腟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（Ⅱ）
…… 及川　俊徳[1]・沼邊　　孝[2]（[1]宮城県畜産試験場，[2]みやぎ農業振興公社）…… 123
ウシ二次卵胞の発育制御における TNF α 受容体の役割
…… 平　山　博　樹（東京農業大学生物産業学部）…… 129
体外受精由来ウシ胚盤胞の可逆的発生停止を誘導する体外培養法の開発ならびに
その誘導による胚盤胞の胚質改善の可能性
…… 石　井　利　通（三重県畜産研究所）…… 135
受精卵の未凍結保存における植物由来成分の有効性検証と配合の最適化
…… 星　野　由　美（日本女子大学理学部）…… 140
内腔の有無に着目したウシ形成期黄体の機能解析
…… 窪　　友瑛[1]・古山　敬祐[2]
（[1]北海道立総合研究機構酪農試験場，[2]大阪公立大学大学院獣医学研究科）…… 145
牛黄体血流の多寡は子宮内膜機能の局所調節に関与するのか？
…… 金澤　朋美・木崎　景一郎（岩手大学農学部共同獣医学科）…… 152
ウシ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（Ⅱ）
…… 森　田　康　広
（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）…… 158

© The Ito Foundation

黒毛和種における不明瞭な発情発生メカニズムの黄体退行の観点からの解明
…… 法上　拓生・堀畑　　慶
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター）…… 165
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（Ⅱ）
…… 久保田　海雄・三輪　雅史・阪谷　美樹
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）…… 171
生殖巣始原生殖細胞を用いた新規家禽遺伝資源保存法の開発
…… 中　島　友　紀（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）…… 177
機能性脂肪酸を活用した黄体機能強化による乳牛繁殖成績改善技術の確立
…… 山口　昇一郎・藤井　英之・青木　直人[1]・山田　　豊[1]・柿原　孝彦
（福岡県農林業総合試験場，[1]油化産業株式会社）…… 183
卵胞刺激ホルモンを用いた夏季における繁殖母豚の発情回帰遅延対策技術の開発
… 内倉　健造・田島　茂行・山本　るみ子・豊島　浩一（愛知県農業総合試験場）…… 188
ウシ初期黄体における PG 抵抗性の解明ー低酸素環境による抗アポトーシス機構ー（Ⅱ）
…… 西村　　亮・菱沼　　貢（鳥取大学農学部共同獣医学科獣医繁殖学）…… 194
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（Ⅱ）
…… 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）…… 199
ウシにおける排卵後の血中エストラジオール増加の検知による受胎性評価
…… 松　井　基　純（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 205
黒毛和種雌牛の繁殖成績を改善するための栄養状態の最適化検討
…… 鍋　西　　久（北里大学獣医学部）…… 211
抗酸化物質を利用したウシ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（Ⅱ）
…… 日巻　武裕[1, 2]・中川　裕喜[1]・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）…… 217
分娩前の複合型アミノ酸ペレット給与が乳牛の繁殖成績に及ぼす影響
…… 住　吉　俊　亮（日本大学生物資源科学部獣医学科）…… 224
卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅱ）
…… 小山　　毅[1]・若槻　拓司[2]
（[1]北海道立総合研究機構畜産試験場，[2]北海道立総合研究機構酪農試験場）…… 232
アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究（Ⅳ）
…… 杉浦　勝明・芳賀　　猛（東京大学大学院農学生命科学研究科）…… 239
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（Ⅱ）
…… 佐々木　羊介・上松　瑞穂*（宮崎大学農学部，*NOSAI宮崎）…… 247
イノシシにおける豚コロナウイルスの感染実態調査
…… 中　川　敬　介（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）…… 253

© The Ito Foundation

PRRS ウイルス感染初期における鼻腔内ウイルス動態の解析
…… 平　井　卓　哉（宮崎大学農学部）…… 258
家畜に下痢を引き起こすロタウイルスの遺伝子改変技術
…… 金　井　祐　太（大阪大学微生物病研究所）…… 263
地方病性牛伝染性リンパ腫発症機序の解明と予後診断法の確立
…… 森　　宏・岡崎　克則（北海道医療大学薬学部）…… 270
牛伝染性リンパ腫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（Ⅱ）
…… 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）…… 276
牛のストレス応答における肝臓機能の解明
…… グルゲ　キールティ　シリ・吉岡　　都
（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）…… 282
補体制御性タンパク質 CD46 の豚熱ウイルス受容体としての機能解析
…… 岩丸　祥史[1]・池田　圭吾[1]・原口　清輝[2]
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
[1]動物衛生研究部門，[2]生物機能利用研究部門）…… 288
家畜用ワクチンのための新規ワクチンプラットフォームの構築
…… 新　地　浩　之（鹿児島大学学術研究院理工学域工学系）…… 294
炎症マーカーの代わりに安価で簡単に測定できる血清 Fe 濃度で牛複合性呼吸器疾患の炎症評価が可能か？
…… 鈴木　一由・塚野　健志・村上　義樹・大塚　まりな
（酪農学園大学獣医学群）…… 299
映像解析技術を用いたアブの吸血行動の定量的解析による病原体媒介リスクの可視化
…… 菅沼　啓輔[1]・Acosta J. Tomas[2]・齊藤　朋子[2]
（[1]帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター・原虫病研究センター，
[2]帯広畜産大学畜産学部）…… 305
サルモネラ鶏卵汚染・介卵感染に寄与する鶏卵巣での菌・宿主細胞間相互作用の解明
…… 岡　村　雅　史（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 311
ジビエおよび家畜動物におけるトキソプラズマ感染の頻度と新規検査方法の開発
…… 保科　斉生[1, 2]・櫻井　達也[3]・嘉糠　洋陸[2, 3]
（東京慈恵会医科大学 [1]感染制御科，[2]実験動物研究施設，[3]熱帯医学講座）…… 318
網羅的ジェノタイピングによる新規牛伝染性リンパ腫抵抗性遺伝子の同定（Ⅲ）
…… 目　堅　博　久（宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター）…… 323
牛の腸アミロイド症の根絶を目的とした AA アミロイド症原因遺伝子の同定
…… 上　家　潤　一（麻布大学獣医学部）…… 329

© The Ito Foundation

牛伝染性リンパ腫ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発
…… 岡　川　朋　弘（北海道大学大学院獣医学研究院）…… 334
ルーメンアシドーシスに伴うエンドトキシン体内流入と肝機能障害を防除する技術の開発
…… 米　倉　真　一（信州大学農学部）…… 340
母体の乳生産性向上による効率的な肥育を目指す基礎的研究
…… 津　上　優　作（広島大学大学院統合生命科学研究科）…… 344
日本短角種去勢牛の２シーズン放牧肥育における放牧管理改善による肉質向上
…… 上田　宏一郎・呉　　成真（北海道大学大学院農学研究院）…… 350
夏季に調製した発酵混合飼料の泌乳牛における利用適正－窒素利用効率に基づく検証－
…… 近藤　　誠[1]・関田　梨々花[1]・股村　真也[1]・永墓　訓明[2]・平岡　啓司[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）…… 356
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（Ⅱ）
…… 保田　昌宏[1, 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）…… 362
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究（Ⅲ）
－ Diet Selection 能力の活用によるアミノ酸給与の精密化－
…… 勝　俣　昌　也（麻布大学獣医学部）…… 367
国産子実用トウモロコシ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（Ⅱ）
…… 篠遠　善哉[1]・金井　源太[1]・齧野　英子[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）…… 372
多頭飼養の牛群において反芻を含む行動型判別を可能とする映像モニタリング技術の開発
…… 多　田　慎　吾
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター）…… 378
寒地型多年生牧草採草地が１年生イネ科草種（自生イタリアンライグラスーイヌビエ・メヒシバ）
交代植生に遷移する気候・土壌要因の解明と飼料価値の評価
…… 池　田　堅太郎
（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）…… 385
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（Ⅱ）
…… 西本　　完[1]・小林　寿美[2]・大津　晴彦[2]
（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]畜産研究部門）…… 391
子牛用疑似グルーミング装置利用モニタリングによる健康状態評価手法の開発
…… 矢用　健一[1]・野上　大史[2]
（[1]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，[2]九州大学）…… 398
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（Ⅲ）
…… 松　﨑　正　敏（弘前大学農学生命科学部）…… 404

© The Ito Foundation

木材クラフトパルプとカンショ焼酎粕を原料としたサイレージの給与が黒毛和種肥育牛の第一胃内発酵に及ぼす影響

…… 前　田　友　香（宮崎県畜産試験場）…… 409

採卵日齢に起因するヒナ品質がブロイラー異常硬化胸肉の発現に及ぼす影響の解明

…… 岩　崎　智　仁（酪農学園大学農食環境学群）…… 416

乳用子牛における消化管機能強化および消化管由来の炎症予防に関する研究

…… 福　森　理　加（酪農学園大学獣医学群）…… 423

睡眠様姿勢―肉用牛の生産性およびウェルフェアの新たな行動指標の検討

…… 深澤　　充・盧　　尚健（東北大学大学院農学研究科）…… 431

ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発（Ⅱ）

…… 権　藤　崇　裕（宮崎大学フロンティア科学総合研究センター）…… 437

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（Ⅱ）

…… 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）…… 443

畜産汚水処理施設の低コスト水質監視システムの開発

…… 富谷　信一[1]・影山　智明[2,3]・三浦　政司[3]・宮崎　　隆[4]・堀尾　靖史[4]

（[1]鳥取県中小家畜試験場，[2]合同会社TURIPテクノロジズ，[3]鳥取大学学術研究院，

[4]株式会社アクシス）…… 451

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（Ⅱ）

…… 松永　将伍[1]・深川　　聡[1]・井尻　大地[2]

（[1]長崎県農林技術開発センター，[2]鹿児島大学農学部）…… 457

ウシ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[1]・八木沢　拓也[2]・片桐　成二[3]

（[1]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野，[2]北海道中央農業共済組合，

[3]北海道大学大学院獣医学研究院）…… 464

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）ーより効果的に免疫を誘導するための可能性の追求―

…… 塩　川　　舞（日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科）…… 472

© The Ito Foundation

CONTENTS

Studies on the formation and the existence form of zinc protoporphyrin IX in dry-cured ham (Ⅲ)
Jun-ichi Wakamatsu, Haruka Abe and Yang Zhai
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) ····· 3

Developments in technology for meat processing by fungal aspartic protease (Ⅲ)
Shinji Takenaka
(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) ····· 9

Studies of mild saltiness induced by curing maturation
− Effects of free fatty acid on saltiness of meat products −
Yukinobu Nakamura, Hiroko Utsumi, Yuka Yoshida and Yumi Inoguchi
(Japan Meat Science and Technology Institute) ····· 16

Analysis of the complex system composed of multiple genetic factors regulating meat quality : approaches in relation to the cytoskeleton
Daita Nadano
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) ····· 21

Verification of edible period extension technology for meat for the purpose of domestic standardization
Yoshi-nori Nakamura
(Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO) ····· 26

Development of a system for rendering 3D computer graphics of meat carcasses (Ⅲ)
Michiyo Motoyama, Shota Ishida, Genya Watanabe, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 31

Effect of imidazole compounds on the aging of meat (Ⅱ)
Toru Hayakawa
(Hokkaido University, Research Faculty of Agriculture) ····· 37

Clarification of the mechanism for holding aroma compounds by proteins in pork sausages
Toshihide Nishimura and Chisato Yamaguchi
(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University) ····· 41

Nutritional function of meat hydrolysates
Shinichi Takenoyama, Kumiko Kawakita and Michio Muguruma
(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) ····· 49

© The Ito Foundation

Studies on effective nutritional utilization of meat with prebiotics

Kenzi Oshima, Ayana Takahara and Yasuyuki Kitaura

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University) ····· 58

Survival of *Campylobacter jejuni/coli* in low temperature cooking poultry meat

Yukako Shimojima

(Faculty of Nutritional Science, Sagami Women's University) ····· 66

Improvement research and evaluation of smart risk communication on the food additives in ham and sausage

Takeshi Yamasaki and Miyuki Yamasaki

(NPO, Science of Food Safety and Security (SFSS)) ····· 74

Detecting foreign object in meat using near-infrared light with polarization and artificial intelligence

Kenzo Yamaguchi

(Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University) ····· 82

Whole-genome analysis of the effects of genetic mutations on chick skeletal muscle growth

Shinya Ishihara

(Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University) ····· 87

Genetic factor associated with calf mortality with preterm birth

Takashi Hirano [1], Eiji Muraki [2] and Shinji Sasaki [3]

([1]Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture, [2] Gifu Prefectural Livestock Research Institute, Hida Beef Cattle Research Department, [3]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

····· 93

Pathophysiology analysis of bovine complex vertebral malformation and identification of sugar chains important for bovine skeletal growth

Tatsuya Furuichi

(Laboratory of Laboratory Animal Science and Medicine, Co-Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) ····· 99

Biomarker discovery for breeding highly marbled pork production

Masaaki Taniguchi [1], Ikuyo Nakajima [1], Aisaku Arakawa [1], Go Yoshioka [2] and Kasumi Suzuki [2]

([1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Gifu Prefectural Livestock Research Institute)

····· 104

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

Norihide Yokoi

(Graduate School of Agriculture, Kyoto University) ····· 110

© The Ito Foundation

Establishment of breeding improvement method for "sweet smell" in Japanese Black beef
Hiroaki Nakajima and Noriaki Shoji
(Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center) 115

Effect of single shot intramuscular injection of porcine FSH mixed with hyaluron acid prior to ovum pick-up in Japanese Black cattle (Ⅱ)
Toshinori Oikawa [1] and Takashi Numabe [2]
([1]Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, [2]Miyagi Agricultural Development Corporation)
..... 123

Roles of TNF *α* receptors in development of bovine secondary follicles
Hiroki Hirayama
(Faculty of bioindustry, Tokyo University of Agriculture) 129

Possible improvement of embryonic quality of *in vitro* derived bovine blastocysts by induction of diapause-like state in *in vitro* culture
Toshimichi Ishii
(Mie Prefectural Livestock Research Center) 135

Effects of plant-derived ingredients on non-cryogenic preservation of early embryos, and its blending optimization
Yumi Hoshino
(Faculty of Science, Japan Women's University) 140

Function analysis of the corpus luteum with cavity during luteal formation in cows
Tomoaki Kubo [1] and Keisuke Koyama [2]
([1]Dairy research center, Hokkaido research organization, [2]Graduate school of veterinary science, Osaka metropolitan university) 145

Is bovine blood flow involved in the local regulation of endometrial functions?
Tomomi Kanazawa and Keiichiro Kizaki
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) 152

Improvement of post-partum reproductive performance by rumen protected niacin supplementation in cattle (Ⅱ)
Yasuhiro Morita
(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Asian Satellite Campuses Institute, Nagoya University)
..... 158

Elucidation of mechanisms for silent heat from luteal regression in Japanese Black Cows
Takuo Hojo and Kei Horihata
(Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO) 165

© The Ito Foundation

Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility in Japanese Black cow（Ⅱ）

Kaiyu Kubota, Masafumi Miwa and Miki Sakatani

（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）…… 171

Developing new method of conservation of poultry genetic resources using gonadal primordial germ cells

Yuki Nakajima

（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）…… 177

Functional fatty acid diet improves the reproductive performance of dairy cows by boosting their luteal function

Shoichiro Yamaguchi, Hideyuki Fujii, Naoto Aoki [1], Yutaka Yamada [1] and Takahiko Kakihara

（Fukuoka Agricultural Research Center, [1]Yuka Sangyo Co., Ltd.）…… 183

The development of method of estrus induction for weaning sow in summer using follicular stimulating hormone

Kenzo Uchikura, Shigeyuki Tajima, Rumiko Yamamoto and Koichi Toyoshima

（Aichi Agricultural Research Center）…… 188

The mechanisms of PG-resistance in bovine early corpus luteum － hypoxia-induced anti-apoptotic mechanism －（Ⅱ）

Ryo Nishimura and Mitsugu Hishinuma

（Laboratory of Theriogenology, Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University）…… 194

Study on bovine endometrial function regulator and regulatory mechanism during estrus（Ⅱ）

Tomochika Sugiura and Ken Nakada

（Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, Rakunogakuen University）…… 199

Evaluation of fertility by detecting increase in blood estradiol after ovulation in cattle

Motozumi Matsui

（Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine ）

…… 205

Optimizing nutritional status to improve the reproductive performance of Japanese Black cows

Hisashi Nabenishi

（Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University）…… 211

Improvement of bovine *in vitro* fertilized embryo production technology using antioxidants and development of calf production system by new OPU-IVF-ET method（Ⅱ）

Takehiro Himaki [1, 2], Hiroki Nakagawa [1] 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）…… 217

© The Ito Foundation

Effect of prepartum administration of rumen - protected complex amino acids pellet on reproductive performance of the dairy cow

Toshiaki Sumiyoshi

(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Science, Nihon University) ····· 224

Examination of new selection method of recipient cow based on ovarian reserves (Ⅱ)

Takeshi Koyama [1] and Takushi Wakatsuki [2]

([1]Animal research center, Hokkaido research organization, [2]Dairy research center, Hokkaido research organization) ····· 232

Epidemiological research on the risk assessment of introduction of African swine fever into Japan

Katsuaki Sugiura and Takeshi Haga

(Department of Veterinary Medical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) ····· 239

Detection of fever of Japanese Black calves by ventral tail base surface temperature (Ⅱ)

Yosuke Sasaki and Mizuho Uematsu *

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki, *NOSAI Miyazaki) ····· 247

Epidemiological survey of porcine coronavirus-infection in Japanese wild boars

Keisuke Nakagawa

(Joint Department of Veterinary Medicine Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 253

Analysis of intranasal viral dynamics in the early stage of PRRS virus infection

Takuya Hirai

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 258

Development of reverse genetics technology for rotaviruses of livestock

Yuta Kanai

(Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University) ····· 263

Study for control of enzootic bovine leucosis

Hiroshi Mori and Katsunori Okazaki

(Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido) ····· 270

Identification of host-derived proteins interacting with BLV non-coding RNA (Ⅱ)

Kiyohiko Andoh

(National Institute of Animal Health, NARO) ····· 276

The role of the liver in the oxidative stress response of cattle

Keerthi S. Guruge and Miyako Yoshioka

(National Institute of Animal Health, NARO) ····· 282

© The Ito Foundation

Functional analysis of porcine complement regulatory protein CD46 upon classical swine fever virus infection

Yoshifumi Iwamaru [1], Keigo Ikeda [1] and Seiki Haraguchi [2]

([1]National Institute of Animal Health, [2]Institute of Agrobiological Science, NARO) 288

Development of a novel platform for veterinary vaccines

Hiroyuki Shinchi

(Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University) 294

Simple and inexpensive evaluation of inflammation in bovine respiratory disease complex using serum Fe concentration as an alternative to inflammatory markers

Kazuyuki Suzuki, Kenshi Tsukano, Yoshiki Murakami and Marina Otsuka

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) 299

The clarification of pathogen transmission risk by quantitative video image analysis of blood sucking behavior of Tabanus flies

Keisuke Suganuma [1], Acosta J. Tomas [2] and Tomoko Saito [2]

([1]National Research Center for Protozoan Diseases/Global Agromedicine Research Center, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [2]School of Agriculture Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) 305

Elucidation of the interaction between *Salmonella* and host cells in avian ovary that underlies egg contamination and transovarian infection

Masashi Okamura

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) 311

Toxoplasma infection in wild and livestock animals ; developing novel serological diagnostic methods

Tokio Hoshina [1, 2], Tatsuya Sakurai [3] and Hirotaka Kanuka [2, 3]

(The Jikei University School of Medicine [1] Department of Infectious Disease and Infection Control, [2]Laboratory Animal Facilities, [3]Department of Tropical Medicine) 318

Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by comprehensive genotyping (Ⅲ)

Hirohisa Mekata

(Center for Animal Disease Control, University of Miyazaki) 323

Identification of causative gene of AA amyloidosis for eradicating intestinal amyloidosis in cattle

Junichi Kamiie

(School of Veterinary Medicine, Azabu University) 329

© The Ito Foundation

Development of a new therapeutic drug against bovine leukemia virus infection

Tomohiro Okagawa

(Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University) ····· 334

Development of technology to control endotoxin influx and liver dysfunction associated with rumen acidosis

Shinichi Yonekura

(Faculty of Agriculture, Shinshu University) ····· 340

Efficient fattening by improving maternal milk production

Yusaku Tsugami

(Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University) ····· 344

Effect of grazing management on meat quality in Japanese Shorthorn steers fattened under 2 season grazing system

Koichiro Ueda and Seongjin Oh

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) ····· 350

Seasonal effect on nitrogen utilization in lactating cows fed ensiled total mixed ration

Makoto Kondo[1], Ririka Sekida[1], Masaya Matamura[1], Noriaki Nagahaka[2] and Hiroshi Hiraoka[2]

([1]Graduate School of Bioresources, Mie University, [2]Mie prefectural Livestock Institute) ····· 356

Studies on the enhancement of calf immunity appraised by rumen mat score (Ⅱ)

Masahiro Yasuda [1, 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) ····· 362

A study on requirement of lysine in weanling pigs (Ⅲ) - Precise feeding of amino acids by application of Diet Selection -

Masaya Katsumata

(School of Veterinary Medicine, Azabu University) ····· 367

Effects of drying temperature and storage conditions on nutritive value of domestic grain of corn (Ⅱ)

Yoshiya Shinoto [1], Genta Kanai [1], Eiko Touno [1] and Akane Ashihara [2]

([1]Tohoku Agricultural Research Center, NARO, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 372

Development of video monitoring system for cattle herds that enables the discrimination of type of behaviour including rumination

Shingo Tada

(Hokkaido Agricultural Research Center, NARO) ····· 378

© The Ito Foundation

Climate and soil factors of succession from temperate perennial grassland to annual grassland and evaluation of the feeding value

Kentaro Ikeda

(Tohoku Agricultural Research Center, NARO) 385

Verification of the effect of feed supplemented with mass-producible oligosaccharides on the improvement of intestinal flora in livestock (Ⅱ)

Mamoru Nishimoto [1], Hisami Kobayashi [2] and Haruhiko Ohtsu [2]

([1]Food Research Institute, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) 391

Development of health check system by monitoring usage frequency of mechanical grooming brush for calves

Ken-ichi Yayou [1] and Hirofumi Nogami [2]

([1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Kyushu University) 398

Colostral programming of physiological properties related to meat production (Ⅲ)

Masatoshi Matsuzaki

(Faculty of Agriculture and Life Science, Hirosaki University) 404

Effect of feeding silage containing wood kraft pulp and sweet-potato shochu distillery on rumen fermentation of Japanese Black fattening cattle

Yuka Maeda

(Miyazaki Livestock Research Institute) 409

Effect of chick quality due to the age of egg collection on the development of wooden breast in broilers

Tomohito Iwasaki

(College of Agriculture, Food and Environment Sciences, Rakuno Gakuen University) 416

The studies on the strengthening of gastrointestinal function and prevention of gut-derived inflammation in dairy calves

Rika Fukumori

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) 423

Sleep-like posture : Evaluation as a new behavioural indicator of beef cattle productivity and welfare

Michiru Fukasawa and Sanggun Roh

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) 431

Development of high digestibility warm-season forage grass by genome editing (Ⅱ)

Takahiro Gondo

(Frontier Science Research Center, University of Miyazaki) 437

© The Ito Foundation

Development of fattening method that maintain the flavor of beef and shorten the feeding period in Japanese Black cow（Ⅱ）

Noriaki Shoji [1] and Yutaka Uyeno [2]

（[1] Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [2] Faculty of Agriculture, Shinshu University）…… 443

Development of low-cost water quality monitoring system for livestock wastewater treatment facility

Shinichi Tomitani [1], Tomoaki Kageyama [2, 3], Masashi Miura [3], Takashi Miyazaki [4] and Yasushi Horio [4]

（[1]Tottori Swine&Poultry Experiment Station, [2]GK TURIP technologies, [3]Tottori University Academic Research Institute, [4]Axis CORPORATION）…… 451

Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on development and meat quality of Tushima-Jidori crossbred chicken for meat（Ⅱ）

Shogo Matsunaga [1], Satoru Fukagawa [1] and Daichi Ijiri [2]

（[1]Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center, [2]Department of Agricultural Sciences and Natural Resources, Kagoshima University）…… 457

Microbiome analysis of bovine uterine, aiming to creation of novel technology improving low fertility

Jumpei Uchiyama [1], Takuya Yagisawa [2] and Seiji Katagiri [3]

（[1]Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, [2] Hokkaido Chuo Agricultural Mutual Aid Association, [3] Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University）…… 464

Can END$^-$, a quasispecies of bovine viral diarrhea virus, be a live-attenuated vaccine?（Ⅱ）
－Pursing the possibility of inducing immunity more effectively－

Mai Shiokawa

（School of Veterinary Nursing and Technology, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University）…… 472

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

目　　次

加　藤　健太郎（東北大学大学院農学研究科　教授）
食肉に関わる原虫感染症の病態発現メカニズムの解明と対策技術の確立 …… 485

東　山　由　美（農研機構東北農業研究センター研究推進部　事業化推進室事業化推進チーム　チーム長）
肉用家畜生産における栄養素配分調節機構ならびにストレス評価に関する研究 …… 486

上　田　修　司（神戸大学大学院農学研究科　助教）
畜産物の品質評価，付加価値の向上に向けたメタボロミクス技術の応用に関する研究 …… 487

© The Ito Foundation

学会等事業助成

目　　次

令和３年度学会等事業助成実施報告書

市民公開講座『牛伝染性リンパ腫の新規制御法の可能性を探る』に関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会　　代表理事　猪熊　壽（東京大学）…… 491

日本食肉科学会 令和３年度事業助成実施報告

日本食肉科学会　　理事長　坂田亮一（麻布大学名誉教授）…… 494

令和３年度事業実施報告書

日本畜産学会第 129 回大会オンラインシンポジウム

「畜産学のレジリエンスと進化」

公益社団法人日本畜産学会　　理事長　佐藤正寛（東北大学）…… 498

© The Ito Foundation

研究助成事業

© The Ito Foundation

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（Ⅲ）

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

若松　純一・阿部　　悠・翟　　洋
（北海道大学大学院農学研究院）

Jun-ichi Wakamatsu, Haruka Abe and Yang Zhai
（Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University）

To elucidate the mechanism by which zinc protoporphyrin IX (ZnPP) is formed in nitrite/nitrate free dry-cured meat products, we focused on hemoglobin (Hb), which is dominated as a ZnPP-binding protein in Parma ham. We tried to investigate the cause why ZnPP-binding Hb complex (ZnPP-Hb) is dominated over ZnPP-binding myoglobin complex (ZnPP-Mb) in the water extract of Parma ham and post-translational modifications in Hb bound to ZnPP. In meat homogenate model experiment, the addition of exogenous Hb resulted in significantly higher total ZnPP, water-soluble ZnPP, and non-heme iron contents compared to the Mb-added group and control group. In addition, apoHb, from which heme was removed, were shown to bind to ZnPP non-enzymatically. From these results, Hb is easier to release heme to transform ZnPP via the iron-removal and zinc-insertion reactions, consequently ZnPP-Hb is dominated over ZnPP-Mb in Parma ham by binding ZnPP to the separated apoHb non-enzymatically. On the other hand, the cause of plural bands corresponding with ZnPP-Hb in urea gel electrophoresis was investigated by immunological methods focusing on post-translational modifications, indicating the possibility that carbamylation and succinylation are occured rather than phosphorylation and acetylation.

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形成されるものと考えられる。発色剤無添加の食肉製品の色調改善へのZnPPの応用が期待されるが，パルマハム中でのその形成機構は完全には明らかになっていない。

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[3]に加え，Adamsenら[4]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と考えられており[5]，ヘム生合成に関わる酵素

© The Ito Foundation

であるフェロケラターゼの関与が提唱されているが[6]，定説には至っていない。一方で我々は，ZnPPの形成機構解明の一環として，パルマハムにおけるその存在形態に着目してきた。そして，パルマハムから水抽出できるZnPPのほとんどが，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することを明らかにし，これらのヘムタンパク質のZnPP形成機構への関与を提唱した[7]。一般に，食肉は放血してと畜するため，そのヘム色素の大部分は，血液由来のヘモグロビンではなく，肉由来のミオグロビンである。それにもかかわらず，パルマハムにおけるZnPP結合タンパク質としては，ミオグロビンよりもヘモグロビンのほうが約３倍多かった。このことから，ヘモグロビンがパルマハムにおけるZnPP形成に大きく寄与していると考えられ，その原因を解明できれば，ZnPP形成機構解明に向けた重要な知見となりうる。

一方で，パルマハム水抽出液の尿素ゲル電気泳動による分離では，ZnPPと結合したヘモグロビンのバンドが複数本観察されており[7]，これらはヘモグロビンの分解産物であると考えられていた。しかし，SDS-PAGEでは分子量の違いは観察されず，尿素ゲル電気泳動における複数のバンドは，分解などの大きな分子量の変化を伴うものにはよらないと考えられた。これらの複数のバンドは間隔の空いた明瞭なものであり，新鮮なヘモグロビンと比較して陽極側にみられることから，酸性基の付与といった翻訳後修飾に由来する可能性が考えられた。リン酸化やアセチル化などは，タンパク質の立体構造ならびにその安定性を変化させることが数多く報告されていることから，ヘモグロビンにおける翻訳後修飾がそのZnPP形成能に影響を及ぼしている可能性がある。

そこで本研究では，パルマハムにおけるZnPP形成機構の解明を目的として，ヘモグロビンに着目し，パルマハム水抽出液におけるZnPP結合タンパク質の大部分をヘモグロビンが占める原因，およびZnPPと結合しているヘモグロビンにおける翻訳後修飾の有無について検討した。

２．方　　法

2.1　ZnPP形成モデル実験系

Wakamatsuら[8]が構築したモデル実験系を改変して行った。ブタ胸最長筋に約50％（w/w）となるよう純水を加えてホモジナイズし，抗生物質を添加した後，HClまたはNaOHを用いてpH 5.5に調整した。これにヘモグロビンまたはミオグロビン試薬を添加したものを，35℃の暗所で嫌気的に20日間インキュベートした。

2.2　ZnPP形成量および非ヘム鉄含量の測定

インキュベート後のホモジネートに３倍量のアセトンを加えてZnPPを抽出し，抽出液の蛍光強度（Ex/Em：420/590 nm）をZnPP相当量とした。非ヘム鉄は，ホモジネートにクエン酸－リン酸緩衝液（pH 5.5）およびアスコルビン酸を加え，インキュベートして抽出した。その後，トリクロロ酢酸を加えて混合し，液体部分を回収して酢酸アンモニウムおよび1,10-フェナントロリンを加えた。この抽出液の510 nmにおける吸光度を測定し，検量線を用いて非ヘム鉄含量を算出した。

2.3　アポヘモグロビンの調製およびZnPPとの反応

ブタヘモグロビン標準品をTris-HCl緩衝液（pH 8.2）に溶解し，氷冷アセトンに滴下した。これをろ過して沈殿を回収し，ホウ酸緩衝液（pH 5.5）に溶解してアポヘモグロビン溶液を調製した。このアポヘモグロビン溶液に，ただちにジメチルホルムアミドに溶解したZnPP標準品を加え，冷却しながら１時間以上攪拌して反応を行った。

© The Ito Foundation

2.4　尿素ゲル電気泳動および非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動

Laemmliの緩衝液系を用いて，尿素ゲル電気泳動では0.1％SDSの代わりに４M尿素を加えたゲルを，非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動ではSDSを除いたゲルを調製した。なお，いずれにおいても泳動緩衝液中のSDSも加えなかった。電気泳動後，ただちに暗室内で，ガラス板から外さないで，420 nm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400 nm）を照射して，600 nm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の自家蛍光を撮影した。

2.5　パルマハム中のZnPPの水抽出

市販のパルマハム原木から大腿四頭筋を切り出して細切し，４倍量の純水を加えてホモジナイズした。これを遠心分離して上清を回収し，パルマハム水抽出液とした。

2.6　翻訳後修飾の免疫学的検討

パルマハム水抽出液を，尿素ゲル電気泳動または非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供試してZnPPの自家蛍光を撮影した後，ただちにゲルからPVDF膜に分離タンパク質を転写した。リン酸化タンパク質の検出は，Phos-tagテクノロジーを用い，アセチル化およびカルバミル化タンパク質の検出は，抗アセチル化リジン抗体および抗カルバミル化タンパク質抗体を用いたウェスタンブロッティング法によって行った。また，カルバミル化およびサクシニル化に関しては，ブタ血液から調製した赤血球粗画分について，カルバミル化処理とサクシニル化処理を行ったものと，尿素ゲル電気泳動における移動度を比較して評価した。

3．結果と考察

3.1　ZnPP形成機構におけるPPIX供給源としてのヘモグロビンの特性

パルマハム中のZnPP形成機構において，ヘモグロビンおよびミオグロビン中のヘムは，PPIXの供給源となると考えられる。パルマハムにおけるZnPP結合タンパク質の大部分をヘモグロビンが占めていたことから，ヘモグロビンはミオグロビンよりもPPIX供給源として優れている可能性が考えられた。そこで，初めにPPIX供給源としてのヘモグロビンの特性を明らかにするため，ZnPP形成モデル実験系を用いて，外因性のヘモグロビンおよびミオグロビンの添加がZnPP形成に与える影響を検討した。水抽出できるZnPP量および総ZnPP量について，ヘモグロビン添加区では，インキュベート開始後５日においてミオグロビン添加区および無添加区よりも有意に高くなり（$p < 0.05$），その後もインキュベート日数に従って顕著な増加がみられた一方で，ミオグロビン添加区では無添加区との間に有意な差は検出されなかった（**Fig. 1A, C**）。また，非ヘム鉄含量を測定したところ，ヘモグロビン添加区ではインキュベート開始後10日において，ミオグロビン添加区および無添加区の両者よりも有意に高くなり（$p < 0.05$），その後もインキュベート日数に伴って増加したが，ミオグロビン添加区および無添加区においてはインキュベート前後で非ヘム鉄含量に有意な差はみられなかった（**Fig. 1B**）。これらの結果から，ヘモグロビン中のヘムは，ミオグロビン中のヘムよりも容易にグロビンから解離して脱鉄されることが示唆され，ZnPP形成機構においてミオグロビンよりも優れたPPIX供給源であると考えられた。また，ヘモグロビン添加によって水抽出できるZnPP量が増加したことから，ヘムの解離したアポヘモグロビンと形成された

© The Ito Foundation

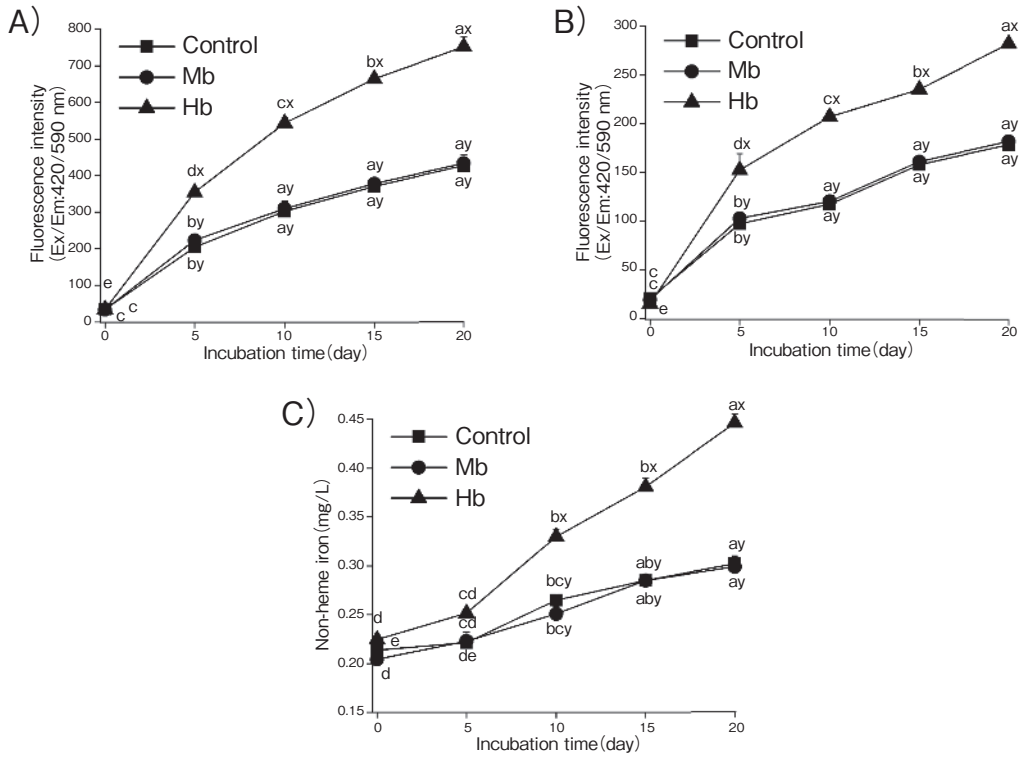


Fig. 1　Effect of the addition of hemoglobin（Hb）and myoglobin（Mb）on total ZnPP formation（A）, non-heme iron formation（B）, and water-soluble ZnPP formation（C）in the experimental model during incubation

Hb: 0.005%（w/w）porcine hemoglobin standard added group ; Mb : 0.005%（w/w）myoglobin standard added group. Bars represent the standard errors（n = 3）. abcde: values with different letters within the same group indicate the significant differences during incubation ; xy : values with different letters within the same incubation day indicate the significant differences among groups（$p < 0.05$）.

ZnPPとが結合し，水抽出できるZnPP-ヘモグロビン複合体が形成されたと考えられた。

3.2　ZnPPとアポヘモグロビンの結合反応の検証

前項の結果を受け，ZnPPがヘムの解離したアポヘモグロビンと容易に結合するのか検討した。緩衝液中でアポヘモグロビンとZnPP標準品を混合して反応させ，これを尿素ゲル電気泳動に供試したところ，ZnPPの自家蛍光のバンドが２本観察された（**Fig. 2**　レーンZHb）。これらの移動度が，ZnPP形成モデル実験系の水抽出液（**Fig. 2**　レーンMOD）およびパルマハム水抽出液（**Fig. 2**　レーンPHE）におけるZnPP-ヘモグロビン複合体のバンドの移動度と一致したことから（**Fig. 2**　バンド１，２），アポヘモグロビンは非酵素的にZnPPと結合することで，ZnPP-ヘモグロビン複合体を形成することが示された。前項の結果とあわせて，ヘモグロビン中のヘムはミオグロビン中のヘムよりも多くのPPIXを供給し，このPPIXから形成されたZnPPとアポヘモグロビンが非酵素的に結合して多量のZnPP-ヘモグロビン複合体が形成されたことで，パルマハム水抽出液中のZnPPの大部分をヘモグロビンとの複合体が占めていることが示唆された。

© The Ito Foundation

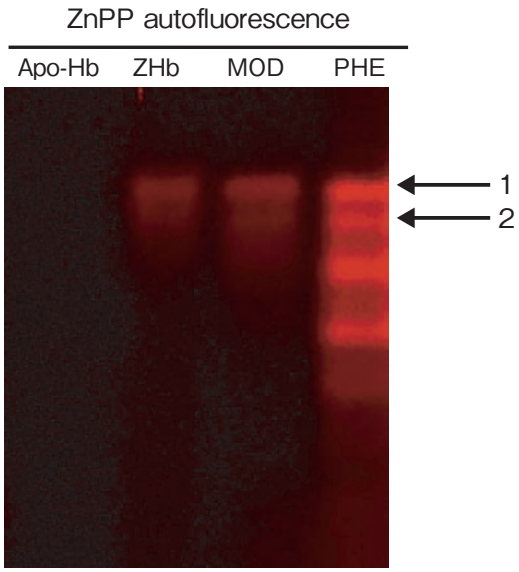


Fig. 2　Fluorescence image of apo-hemoglobin reacted with ZnPP separated using urea-PAGE

Apo-Hb: apo-hemoglobin（apoHb）; ZHb: apoHb reacted with ZnPP; MOD: the supernatant of experimental model after incubation; PHE: the water extract of Parma ham; Arrow 1 and 2: ZnPP fluorescent bands formed in ZHb/MOD.

3.3　尿素電気泳動におけるZnPP結合ヘモグロビンの複数バンドの原因

パルマハム水抽出液を尿素ゲル電気泳動に供試して得られる，ZnPP結合ヘモグロビンの複数のバンドの原因として，翻訳後修飾について検討した。本実験で着目した翻訳後修飾は，データベース（Uni Prot）より，ブタヘモグロビンにおいて発生が予測されているリン酸化，アセチル化，サクシニル化に加え，ヒトヘモグロビンにおいて報告のあるカルバミル化[9]である。このうち，カルバミル化は尿素の分解産物であるイソシアン酸によって引き起こされることから，電気泳動ゲル中の尿素の影響で実験中に発生することが懸念された。しかし，パルマハム水抽出液を，尿素を含まない非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供試しても尿素ゲル電気泳動と同様に複数のバンドが観察されたことから，ゲル中の尿素の影響ではないことが確認された。一方，パルマハム水抽出液におけるZnPP結合ヘモグロビンの複数のバンドについて，ウェスタンブロッティング法に供したところ，抗カルバミル化抗体との反応がみられた。さらに，赤血球粗画分においてはカルバミル化処理によってこれらのバンドと同じ位置に新しくバンドが出現した。以上の結果から，パルマハムの熟成中にヘモグロビンがカルバミル化されたことで，尿素電気泳動における移動度が変化した可能性が示された。また，サクシニル化処理を行った赤血球粗画分についても，カルバミル化処理を行ったものと同様に陽極側に複数のバンドが観察され，パルマハムにおいてZnPPと結合したヘモグロビンの移動度と一致した。他方，Phos-tagおよび抗アセチル化リジン抗体と，複数のバンドとの反応は検出されなかったことから，リン酸化およびアセチル化はこの複数のバンドの原因ではないと考えられた。以上より，パルマハム中でZnPPと結合したヘモグロビンの尿素ゲル電気泳動における複数のバンドは，リン酸化やアセチル化によるものではなく，カルバミル化やサクシニル化に由来する可能性が示された。

4．要　　約

本研究では，パルマハムにおけるZnPP形成機構の解明を目的として，ヘモグロビンに着目し，パルマハム水抽出液中のZnPP結合タンパク質の大部分をヘモグロビンが占める原因，およびZnPPと結合しているヘモグロビンにおける翻訳後修飾の有無について検討した。ZnPP形成モデル実験では，外因性ヘモグロビンの添加により，総ZnPP量，水溶性ZnPP量，および非ヘム鉄含量がミオグロビン添加区および無添加区と比較して有意に高くなった。また，アポヘモグロビンとZnPPは非酵素的に結合することが示された。こ

© The Ito Foundation

れらの結果から，ヘモグロビン中のヘムはグロビンから解離，脱鉄されやすく，ZnPP形成機構においてより優れたPPIX供給源として働く一方，PPIXから形成されたZnPPはアポヘモグロビンと非酵素的に結合することで，ZnPP–ヘモグロビン複合体が多量に形成されることが示唆された。一方，尿素ゲル電気泳動における複数のZnPP–ヘモグロビン複合体の由来について，翻訳後修飾に着目して免疫学的手法で検討したところ，リン酸化やアセチル化ではなく，カルバミル化およびサクシニル化による可能性が示された。

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） Morita, H., Niu, J., Sakata, R., Nagata, Y.：*J. Food Sci.*, **61**, 1021～1023, 1996.
4） Adamsen, C. E., Moller, J. K. S., Hismani, R., Skibsted, L. H.：*Eur. Food Res. Technol.*, **218**, 403～409, 2004.
5） Becker, E. M., Westermann, S., Hansson, M., Skibsted, L. H.：*Food Chem.*, **130**, 832～840, 2012.
6） Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari, Y., Kitajima, S.：*Biochemistry*, **46**, 15054～15061, 2007.
7） Wang, H. C., Hayakawa, T., Kumura, H., Wakamatsu, J. I.：*Food Bioscience*, **40**, 100870, 2021.
8） Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A.：*Meat Sci.*, **68**, 313～317, 2004.
9） 島尻佳典，與那嶺正人，友寄毅昭，益崎裕章，三家登喜夫，原野恵子，和田芳直，古賀正史：糖尿病. **58**, 915～922, 2015.

© The Ito Foundation

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（Ⅲ）

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

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 and taste. 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 plant proteolytic enzymes such as bromelain, ficin, and papain are widely used for proteolytic hydrolysis, to improve meat tenderness. Fungal aspartic protease also shows potential 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 fractionated myofibrillar, myogenic, and extracellular matrix proteins using the recombinant aspartic protease（rPepA）, bromelain, and papain were compared. SDS-PAGE, tricine-SDS-PAGE, and size exclusion chromatography analyses indicated that the hydrolysates by plant proteases contained much more 1.0- to 20 kDa-peptides than that by rPepA. Amino acid composition in papain-treated hydrolysate was similar to that in rPepA-treated hydrolysate. The richness derived from umami and kokumi tastes was also resemble, based on electronic tongue analysis. These findings indicate that beef meat processing with rPepA probably would be expected to improve meat quality and richness.

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，細胞内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

© The Ito Foundation

因として「肉の柔らかさ」,「くちどけ」,「うま味」があげられる。肉はおいしさだけでなく，咀嚼しやすいやわらかさも消化効率や栄養摂取の面で重要である。特に，高齢化が進む先進諸国では肉質の改善のためにプロテアーゼが検討されている。例えば，植物由来のパパイン，ブロメライン，アクチニジンやコラーゲンを加水分解する微生物由来コラゲナーゼ等があげられる[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，微生物由来プロテアーゼも検討されている[4]。近年，肉を「塩麹」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]，加水分解酵素群を用いた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（PepA）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，ブロメラインやパパインとともに筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質（市販試薬）に対する分解特性を比較すると，結合組織タンパク質に対する活性は低かった[7]。さらに，牛もも肉の酵素処理に関する予備的な試験結果からも[8]，既存のプロテアーゼと比較してPepAの優位性が明らかになりつつある。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，市販のプロテアーゼとともに同アスパルティックプロテアーゼについて，牛肉を構成する筋原線維・筋形成・結合組織タンパク質に対する分解特性や牛肉に作用させたサンプルの遊離成分を比較し，その食肉処理におけるPepA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筋肉タンパク質類の分画はBuschらの方法を参考にした[9]。宮崎県産もも肉から調製した10 g の挽肉と100mlの抽出用緩衝液（0.1 M KCl，5 mM EDTA，20 mM KH_2PO_4-K_2HPO_4（pH 7.0））をミニカップに入れ，クッキングミキサー（MX-X501，パナソニック株式会社）を用い，30秒間ホモジナイズした。このホモジナイズ液を遠心分離（10,000×g，10 min，４℃）して，上清部をmyofibril fraction 1（Fraction 1）として回収し，得られた沈殿に抽出緩衝液を50ml加えて再び同条件でホモジナイズと遠心分離を行った。得られた上清部はmyofibril fraction 2（Fraction 2）として回収し，沈殿部に抽出緩衝液を50ml加えてホモジナイズ後ガーゼでろ過した。ガーゼ上の残渣をconnective tissue fraction（Fraction 3）として回収した。これらを2.2で述べる基質タンパク質とした。Lowry法によるBovain serum albumin（BSA）換算で，Fraction 1，2および３のタンパク質濃度は７mg/ml，12 mg/ml，21 mg/mlであった。アスパルティックプロテアーゼ（rPepA）は，既報の方法に従って調製した[10]。ブロメラインおよびパパ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　タンパク質分解酵素を用いた筋肉タンパク質類の加水分解

0.5％（w/v）基質タンパク質－50 mM酢酸ナトリウム緩衝液（pH 5.0）5.0 mlに対して0.22％（w/v）プロテアーゼ溶液（精製rPepA，ブロメ

© The Ito Foundation

ラインもしくはパパイン）を0.5 ml添加し，30℃で３時間反応を行った。遊離したペプチドは，Lowry法（BSA換算）およびニンヒドリン法（glycylglycylglycine換算）にて定量した。また，SDS－PAGEおよびTricin-SDS-PAGEにて分解パターンを調べた。

2.3　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１ml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。SDS-PAGE,Tricin-SDS-PAGE，SEC分子ふるいクロマトグラフィーにて分解パターンを調べた。また，遊離したアミノ酸の組成および味覚を調べた。

2.4　遊離ペプチドのサイズ排除クロマトグラフィー

溶離液（100 mM KH_2PO_4-K_2HPO_4（pH 7.4）-acetonitrile（80：20, v/v））にて平衡化したYMC-Pack Diol-60（4.6×300mm）（株式会社ワイエムシィ，京都）にサンプルを導入した。流速は0.25ml/min，検出はUV_{216}とした。また，同条件で標品サンプル（myoglobin［M.M.（Da），17,000］, cytochrome c［M.M., 12,400］, bacitracin［1,422］, N-hippuryl-His-Leu［429］, glycylglycylglycine［189］）について分子質量（対数）と溶出時間には直線関係があった。

2.5　アミノ酸組成分析

文部科学省食品成分データベース（日本食品標準成分表2015年版・七訂）記載の方法に準拠し，プレラベル法（OPA/FMOC）によるプレラベルHPLC分析法によった。2.3で述べたサンプル100 μlに対して80%メタノール900 μlを加え，除タンパクを行った後，o-フタルアルデヒドおよび9-フルオレニルメチルクロロフォルメートによってラベル化し，Agilent Poroshell 120 EC-C 18カラムにて分別定量した。

2.6　味覚センサー（味認識装置）による測定

味認識装置には株式会社インテリジェントセンサーテクノロジー製のSA402Bを使用した。既報の方法を参考に，味覚センサーは，CA0（酸味），CT0（塩味），C00（苦味雑味），AE１（渋味刺激），AAE（旨味）の５種類を使用し，酸味，苦味雑味，渋味刺激，塩味，苦味，渋味，旨味コク，うま味の８項目とした。

2.7　統計処理

各統計処理は，GraphPad Prism ver. 6を用いて1-way ANOVAおよびTukeyの多重比較検定を行った。アミノ酸組成分析および呈味性試験以外は，３回以上試験（n＝３～５）し，サンプル間においてnot significant（ns）と判断されたものについて上付き文字で表示した。

3．結果と考察

3.1　分画した筋肉タンパク質の加水分解

ブロメラインやパパインはmyofibril fractionに対する活性はきわめて高く，結合組織タンパク質に対しても活性を示し[11]，反応が進みすぎるとドリップの増大や肉の保水性を低下させる[12]。分画の精度は低いが，ブロメライン，パパインおよびrPepAについて筋肉タンパク質分画物に対する加水分解能を生成タンパク質およびそれらの分子量分布を比較した（**Fig. 1**，**Table 1**）。プロテアーゼ無添加の対象と比較してブロメラインやパパイン処理物では分子質量30 kDa以上のタンパク質バンドは消失し（**Fig. 1(A)**），1.0から14 kDaまでのポリペプチドが生成した（**Fig. 1(B)**）。一方，rPepA処理物では30 kDa以上のタンパク質バンドは残っており，1.0から14 kDaまでのポリペプチドの生成も少なかった（**Fig. 1**）。電気泳動の結果からは主要なタンパク質のバンドはさほど減少していなかったが，遊離したアミノ酸やオリゴ

© The Ito Foundation

Table 1　Hydrolysis of protein fractions from beef meat by proteases.

（A）			
	Frac. 1	Frac. 2	Frac. 3
Bromelain	0.17 ± 0.006^{AB}	0.53 ± 0.026	1.07 ± 0.055
Papain	0.14 ± 0.015^{A}	0.33 ± 0.012	0.66 ± 0.01
rPepA	0.26 ± 0.032^{B}	0.46 ± 0.01	0.83 ± 0.036
（B）			
	Frac. 1	Frac. 2	Frac. 3
Bromelain	0.21 ± 0.006	0.33 ± 0.029^{A}	0.84 ± 0.012
Papain	0.29 ± 0.031^{A}	0.25 ± 0.051^{A}	0.32 ± 0.085^{A}
rPepA	0.36 ± 0.072^{A}	0.13 ± 0.059	0.50 ± 0.047^{A}

Fractions 1 and 2 mainly consist of myofibrillar components and fraction 3 is a connective tissue. Produced amino acids/oligo- and poly-peptides were measured by Lowry method（A）and Ninhydrin method（B）.

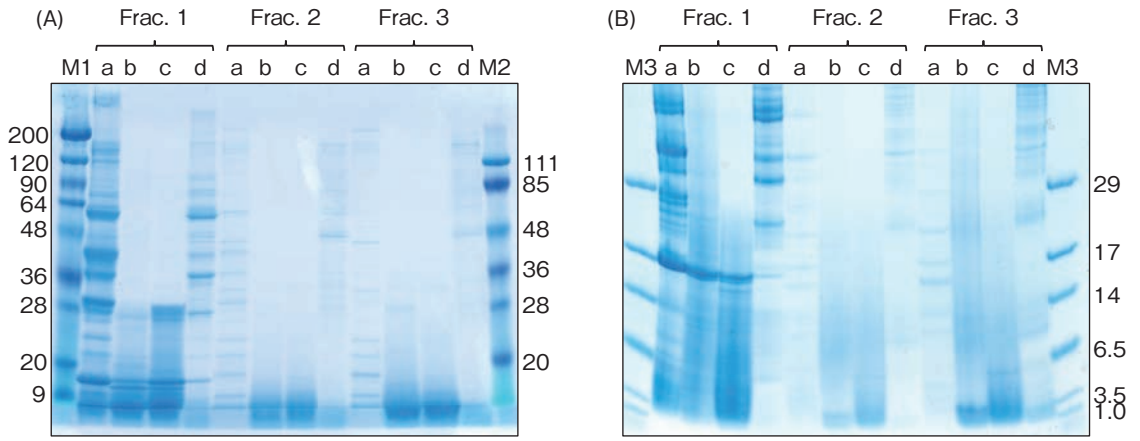


Fig. 1　SDS-PAGE（A）and tricine-SDS-PAGE（B）profiles of proteolytic hydrolysis of fractionated beef proteins. Fractions 1 and 2 mainly consist of myofibrillar components and fraction 3 is a connective tissue. Fractions were treated without protease（a）and with bromelain（b）, papain（c）, and rPepA（d）. Lanes M1, M2, and M3 are broad range, low range, and small protein markers, respectively.

ペプチド量を比較すると，rPepA処理物中（myofibril fraction 1（Frac. 1））遊離量は多かった（**Table 1**）。*Penicllium camenberti*由来アスパルティックプロテアーゼのインシュリンＢ鎖に対する加水分解では，反応時間を24時間とすると非特異的な加水分解も進み，生成ペプチド数が増加する[13]。rPepAは，ヘムタンパク質に対する限定分解位置以外に[6]，ペプチドのP_1部位に疎水性アミノ酸や塩基性アミノ酸残基を含む位置を好んで加水分解する（未発表データ）。rPepAも牛肉タンパク質と長時間反応させると非特異的な作用も徐々に進行し，これが遊離アミノ酸やオリゴペプチド量の増加につながったと思われる。

3.2　タンパク質分解酵素にて処理した牛肉由来サンプルの分析

先行研究において，牛ミンチ肉を市販の0.5％プロテアーゼにて５時間処理したサンプル中のペプチド組成を比較している[14]。エンド型およびエキソ型プロテアーゼ処理サンプルと比較し，ブロメラインやパパイン処理サンプルには高分子タン

© The Ito Foundation

Table 2　Concentration of released proteins and amino acids in beef meat-hydrolysates treated with proteases

	(A)	(B)
(a) Control	22.5 ± 0.57^{A}	9.21 ± 0.46
(b) Bromelain	23.6 ± 0.60^{B}	14.4 ± 0.54
(c) Papain	22.3 ± 0.51^{A}	11.5 ± 0.63^{C}
(d) rPepA	24.2 ± 0.43^{B}	11.7 ± 0.68^{C}

Beef meats were incubated without protease and with bromelain, papain, and rPepA. Produced amino acids/oligo- and poly-peptides were measured by Lowry method (A) and Ninhydrin method (B).

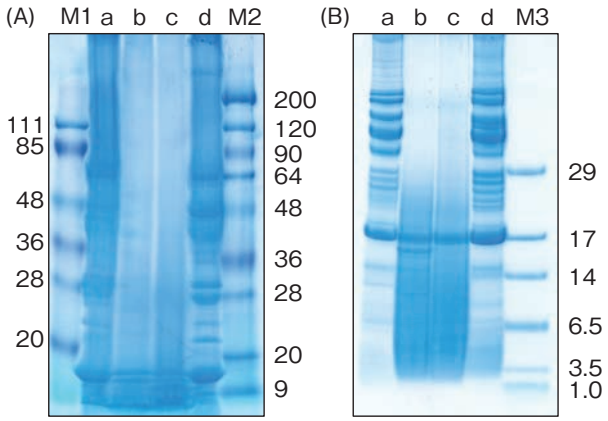


Fig. 2　SDS-PAGE (A) and tricine-SDS-PAGE (B) profiles of released oligo- and poly-peptides during hydrolysis of beef meat. Lanes a – d are referred to protease-treated beef meat hydrolysates without protease (a) and with bromelain (b), papain (c), and rPepA (d). Lanes M1, M2, and M3 are protein markers.

パク質も残存している[14]。本研究において，タンパク質分解酵素を用いた牛肉の処理物由来タンパク質や可溶性ペプチドを比較すると，定量値に相違は見られなかった（**Table 2**）。しかし，電気泳動の結果では，ブロメラインやパパインは作用しやすい牛肉タンパク質を加水分解し，1.0から14 kDaまでのポリペプチドの生成が顕著であった（**Fig. 2**）。これは，サイズ排除クロマトグラフィーよる可溶性ペプチドの分子量分布からも類似した結果が得られ，サンプルをフィルターろ過（30 kDa以下）後，クロマトグラフィーに供すると，オリゴペプチドから分子質量２万以下のポリペプチドの生成に相違が見られた（**Fig. 3**）。rPepAは，ブロメラインやパパインよりも肉の軟化において制御しやすいといえる。

rPepAによる処理からアミノ酸の遊離が期待されたことから（**Table 2**），アミノ酸組成を比較した（**Table 3**）。その結果，ブロメライン処理サンプルは，うま味／酸味に寄与するGlu量や甘味に寄与するSer, Gly, ThrやPro量の増大だけでなく，苦みに寄与するPhe，Ile，LeuやLys量も増大していた。パパイン処理サンプルは，苦みに寄与するLeuやLys量が増大していた。一方，rPepA処理サンプルは，ブロメライン処理サンプルと類似した傾向が見られた。処理サンプルには，アミノ酸だけでなくオリゴペプチドは脂質等も含まれると考えられることから，これらが関わる甘味・苦み・うま味は複雑な味となることから味覚セン

© The Ito Foundation

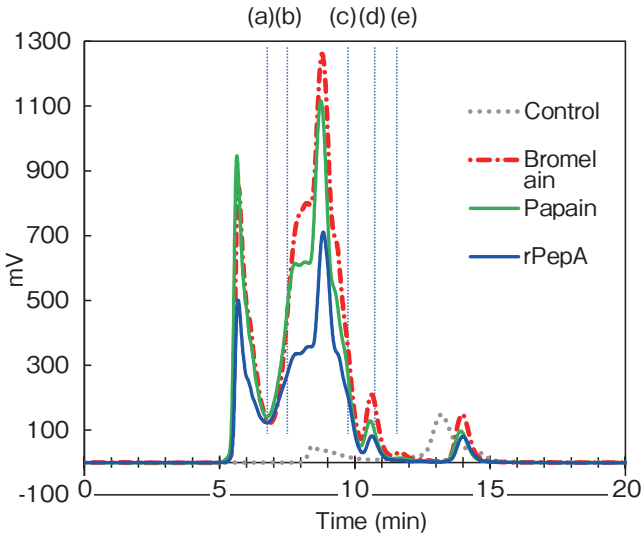


Fig. 3　Elution profiles of protease-treated beef meat hydrolysates by size exclusion chromatography. Authentic proteins and peptides, myoglobin [a, M.M.（Da）, 17,000], cytochrome c [b, 12,400], bacitracin [c, 1,422], N-hippuryl-His-Leu [d, 429], glycylglycylglycine [e, 189] were analyzed.

Table 3　Amino acid compositions in protease-treated beef meat hydrolysates

	Asp	Glu	Asp	Ser	Gln	His	Gly	Thr	Arg	Ala
(a)	104	3,520	1,090	3,450	3,790	755	3,650	2,170	82	10,500
(b)	758	3,710	1,290	4,170	3,230	922	4,280	2,830	27	9,220
(c)	467	3,660	1,200	3,250	2,790	1,010	3,700	2,170	58	8,900
(d)	827	4,780	611	3,840	1,910	1,170	3,650	2,530	46	9,550

	Tyr	Cys	Val	Met	Trp	Phe	Ile	Leu	Lys	Pro
(a)	14	N.D.	3,220	1,170	11	1,670	1,840	3,890	3,260	845
(b)	77	N.D.	3,500	2,280	56	3,000	3,010	6,710	5,560	1,150
(c)	74	N.D.	2,680	1,650	39	2,340	2,290	5,450	3,620	968
(d)	57	N.D.	3,910	1,860	61	3,380	3,080	6,930	4,520	1,080

（nmol/ml）

#Samples: protease-treated beef meat hydrolysates without protease (a) and with bromelain (b), papain (c), and rPepA (d).

サーを用いて比較することにした（**Fig. 4**）。rPepA処理サンプルはブロメライン処理サンプルよりもアミノ酸の遊離量は低いが（**Table 2(B)**），うま味コクの点で両者は同程度であることが分かった。

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。本研究では，申請者オリジナルのアスパルティックプロテアーゼ（rPepA）および植物系プロテアーゼについて，牛肉タンパク質および牛肉に対する分解特性や処理サンプルの遊離アミノ酸や味覚を比較した。処理した牛肉の剪断力やテクスチャーは不

© The Ito Foundation

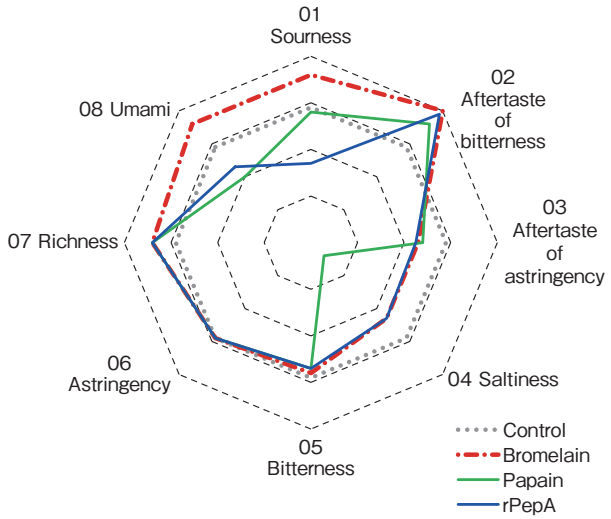


Fig. 4　Flavor evaluation of protease-treated beef meat hydrolysates by electronic tongue.

明であるが，ブロメラインは，牛肉タンパク質分解に伴う呈味性アミノ酸類の遊離は期待できるが，電気泳動の結果から，牛肉タンパク質を細分化することが予想される。一方，rPepAによる分解はこれまでの結果のとおり限定的であるにも関わらず，コク味の向上も期待できることが分かった。

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）　花王株式会社，特開平08－56664
5）　阿部真紀，秋田修：塩麹に含まれる麹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., Tachibana, 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ィ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）　竹中慎治：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），令和２年度　食肉に関する助成研究報告書，**39**，8～14，2021.
9）　Busch, W. A., Stromer, M. H., Goll, D. E., Suzuki, A.：*J. Cell Biol.*, **52**(2), 367～381, 2013.
10）　Takenaka, S., Umeda, M., Senba, H., Koyama, D., Tanaka, K., Yoshida, K., Doi. M.：*J. Sci. Food Agric.*, **97**, 95～101, 2016.
11）　Sorpukdee, S., Sumpavapol, P., Benjakul, S., Tangwatcharin, P.：*LWT*, **126**, 109307, 2020. https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109307
12）　Gagaoua, M., Dib, A. L., Lakhdara, N., Lamri, M., Botineştean, C., Lorenzo, J. M.：*Current Opinion in Food Science*, **38**, 177～188, 2021. https://doi.org/10.1016/j.cofs.2020.12.002
13）　Chrzanowska, J., Kolaczkowska, M., Dryjański, M., Stachowiak, D., Polanowski, A.：*Enz. Microb. Technol.*, **17**, 719～724, 1995. https://doi.org/10.1016/0141-0229(94)00129-F
14）　Fu, Y., Liu, J., Hansen, E. T., Bredie, W. L. P., Lametsch, R.：*Food Chem.*, **257**, 163～171, 2018. https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.159

© The Ito Foundation

食肉加工品の塩漬熟成に認められる「塩なれ」に関する研究
―食肉加工品の塩味に対する遊離脂肪酸の影響―

Studies of mild saltiness induced by curing maturation
– Effects of free fatty acid on saltiness of meat products –

中村　幸信・内海　寛子・吉田　由香・猪口　由美
（一般社団法人食肉科学技術研究所）

Yukinobu Nakamura, Hiroko Utsumi, Yuka Yoshida and Yumi Inoguchi
(Japan Meat Science and Technology Institute)

The role of free fatty acid (FFA) in mild saltiness induced by curing maturation was examined. Ten ml of the test solution adding FFA of 0.2%, hydrophobicity, was stabilized by homogenizing at 3,000 rpm for 30 sec immediately before the sensory test. The effect of free oleic acid and linoleic acid on saltiness was clear in the case of 1.0% NaCl having a strong saltiness. The strong saltiness of the first-taste was gradually weakened while tasting for a few tens of seconds. This was an adaptation-like action. When there were umami and sourness from a pork soup, saltiness of 1.0% NaCl was first sensed, followed by umami and sourness. FFA brought into the balance between saltiness and other taste resulting from an adaptation-like action to saltiness. Edible blended oil, which consist of linoleic acid (46.4%) and oleic acid (29.1%), had no effect on saltiness. It should be important that fatty acid is not as a triglyceride but as a free state. Thus mild saltiness in cured meat products may be induced by an increase of FFA during curing maturation. The results should provide basic information to lead to an in-depth understanding of the mild saltiness of cured meat products.

1．目　　的

塩漬では，発色剤の使用がその特徴と言えるが，塩漬剤の主成分は食塩であり，その役割はとても重要である。塩漬における食塩の作用の１つは，脱水と水分活性の低下に伴う微生物の増殖抑制である。これにより塩漬期間の延長が可能となり，塩漬肉に生じ得る化学的変化はさらに進行する。この化学的変化によってもたらされるのが，風味の向上となる。これが“塩漬熟成”であり，特色JAS規格の基となっている。Ichimuraらは，塩漬熟成による風味の向上に，ヒポキサンチンが関与していることを明らかにした[1)]。この他，塩漬期間中に遊離のアミノ酸や脂肪酸等が増加することも知られている[2)]。

食塩のもう１つの重要な作用は，味付け，塩味の付与である。一般的に，保存性が得られる食塩濃度の塩味は，かなり強く，塩辛いと表現される。しかし，生ハムに代表される非加熱食肉製品においては，この強い塩味が品質特性となっており，塩漬熟成期間の延長によって変化することが経験的に知られている。これは，「塩角がとれる」な

© The Ito Foundation

どと表現され，“塩なれ”と呼ばれる塩辛さがやわらぐ現象と考えられる。この塩なれには，塩漬熟成中に変化する成分が関与していると考えられるが，食肉加工において，この要因は明らかにされていない。

先述のとおり，塩漬熟成期間中には，ヒポキサンチンや遊離のアミノ酸および脂肪酸等が増加することから，これらが要因となる可能性が考えられる。このうち遊離脂肪酸（以下FFA）に関しては，リノール酸が塩化ナトリウム（以下NaCl）溶液の塩味の閾値を高くすること，塩味を弱めることなどが報告されている[3)]。さらに，我々は，外国産生ハムの官能的な塩味の強さとFFA含量との間に負の相関があることを示した[4)]。

本研究では，塩漬熟成における塩なれに対するFFAの影響を調べることを目的とする。FFAについて，官能試験を実施した例は少なく，FFAが疎水性であることなどから，第一に試験液の調製方法を検討した。この試験液を使って，塩味に対するFFAの作用を定性的に理解することを試みた。

2．方　法

2.1　材料

市販のカナダ産三元豚（LDW）のロースの胸最長筋（試料数３）を使用した。と畜日からの経過日数は34日であった。FFAとして，オレイン酸およびリノール酸の標準品，NaClをシグマアルドリッチから入手した。市販の大豆油およびなたね油からなる食用調合油（以下EO）を入手した。

2.2　豚肉スープの調製

ロースから胸最長筋を取り出し，目立った脂肪と結合組織を除去した。穴径５mmのプレートで挽肉とした後，真空パック（約0.8 kPa）し，90℃の湯浴で１時間加熱した。加熱によって発生したドリップを回収後，ろ過（５A，アドバンテック社製）して得られたろ液をスープとし官能試験に用いた。

2.3　官能試験

2.3.1　NaCl溶液の塩味に対するFFAの影響

NaClは0，0.6，1.0%，FFAは0.2%となるよう超純水に加えた（終濃度）。FFAを均一化するためにホモジナイズ（3,000 rpmで30秒間）し，得られた懸濁液を試験液とした。FFAをEOに替えて，同様に試験液を調製した。試験液はすべて，試験直前に調製した。

2.3.2　豚肉スープ中の塩味に対するFFAの影響

2.3.1の超純水を豚肉スープに替えて，同様に処理し，1.0% NaClとFFAあるいはEOを混合した試験液を調製した。

2.3.3　官能試験

パネリストは，調製した試験液の全量である10 mlを口に含み，口に含んでいる30秒間，舌の動きの制限はなく，可能な限り塩味を感じるように味わった。この間の塩味の変化を自由に書き表し，円卓法により評価した。

3．結果と考察

3.1　NaCl溶液の塩味に対するFFAの影響

FFAが疎水性であることから，試験液の調製方法に関しては，乳化剤のカゼインナトリウム等を使用して水層に均一化させることを検討したが，乳化剤由来の風味や物性への影響があった。そこで，液量を少量の10 mlとして，ホモジナイズによる用事調製としたところ，安定性のあるエマルションが得られた。

最初に，超純水にFFAまたはEOを加えた試験液について，官能試験を実施した結果，各種試験液は無味であることを確認した。EOを脂肪酸組成分析に供した結果，脂肪酸組成の上位３種は，

© The Ito Foundation

リノール酸（46.4％），オレイン酸（29.1％），パルミチン酸（9.4％）であった。

予備的に，NaCl溶液にFFAを加えて官能試験を実施したところ，塩味に対するFFAの影響は，複雑な現象であることが分かった。この現象を整理する必要があると考え，定性的に理解することに重きを置くこととした。

塩味が強く感じられるNaCl 1.0％の条件で，オレイン酸またはリノール酸をそれぞれ0.2％添加した液と無添加の液を調製し，両者の塩味を比較した（**Table 1**）。FFAの濃度0.2％は，ヨーロッパ産の長期塩漬熟成された生ハムのFFA含量の平均値に由来する[4]。まず，液を口に含んだ直後（先味）の塩味の強さについて，両者の間に違いは認められなかった。次に，舌の動きに制限がない状態で，液を十数秒間口に含んでいると（後味），各種FFAを添加した液は，塩味の強さがしだいに弱まり，その後強さが先味のレベルへと戻ることを確認した。これに対して，無添加は塩味の強さに大きな変化は認められなかった。FFAが添加された場合，塩味の強さの感覚は，口に含んでいる間，経時的に変化することが分かった。

続いて，塩味が適度に感じられるNaCl 0.6％の条件で，NaCl 1.0％と同様に試験を実施したところ，先味に違いはなく，液を一定時間含んで感じられる後味についても，ともに塩味の強さがしだいに弱くなることを認めた（**Table 1**）。この塩味の強さがしだいに弱くなる現象は，順応と考えられた[5, 6]。先のNaCl 1.0％でのFFA添加による塩味の強さの低下は，この順応に似た現象であった。

また，NaCl 1.0％の条件で，FFA 0.2％をEO 0.2％に替えて同様に処理したところ，先味および後味ともに，塩味の強さに大きな変化はなく，順応様の現象は認められなかった（**Table 1**）。すなわち，FFAの塩味に対する作用は，塩味が強く感じられる条件において顕著であり，この条件下でFFAを添加すると，塩味の強さが順応様に弱くなることが確認された。

FFAの添加によって，塩味の強さが順応様に弱められた理由として，FFAの粘度の影響が考えられる。塩味の強さは，高い粘度によって弱められることが示されているが[7]，FFAの替わりにEOを用いた実験では，塩味の強さの順応様の低下は確認できなかった。EOはトリグリセリド（以下TG）で構成されていることから，FFAより高い粘度を持つ[8]。したがって，FFAの添加が示した塩味の強さの順応様の低下において，粘度の影響は大きくないと考えられた。また，今回使用したEOは，リノール酸およびオレイン酸が主要な構成要素であることから，塩味の強さの順応様の低下は，脂肪酸の状態に影響されると考えられる。すなわち，当該現象は，脂肪酸がTGの状態ではなく，遊離の状態であるときに生じる可能性が示唆された。

3.2　豚肉スープ中の塩味に対するFFAの影響

調製した豚肉スープの味は，酸味とうま味が主

Table 1　Effect of FFA and EO on saltiness from 1.0 and 0.6% NaCl solution

			Strength of saltiness	
			First taste	A few tens of seconds later
NaCl sol.	1.0%	—	Strong	Strong
		+ FFA	Strong	Moderate
		+ EO	Strong	Strong
	0.6%	—	Moderate	Weak
		+ FFA	Moderate	Weak

© The Ito Foundation

体であり，これらが強く感じられた。これに1.0% NaClを加えて，塩味，酸味およびうま味が感じられる順序（反応速度）を確認したところ，最初に塩味が感じられた後，塩味がありながら酸味やうま味が感じられた。すなわち，塩味に対する反応速度が豚肉スープ由来の味に比べて速いことを確認した[9, 10]。

塩味が強く感じられるNaCl 1.0％の条件で，FFA 0.2%を添加したスープと無添加のスープを調製し，NaCl溶液の場合と同様に，両者の塩味を定性的に捉えた（**Table 2**）。スープを口に含んだ直後（先味）の塩味の強さについては，２種のスープの間に違いは認められなかった。しかしながら，後味については違いが認められた。FFAを添加した場合，先味で感じられた塩味の強さがしだいに弱くなることに相まって，スープに由来する酸味やうま味がメインとして感じられるようになり，塩味と他の味のバランスが取れた状態となった。後味において，塩味の強さが弱くなったことは，先の1.0％NaCl溶液で認められた塩味の強さの順応様の低下と同じであった。他方，FFA無添加は口に含んでいる間，塩味の強さに変化は認められず，その強い塩味によって，味のバランスが損なわれた状態であった。

続いて，FFA 0.2%をEO 0.2%に替えて，NaCl 1.0％の条件で同様の試験を実施したところ，スープの塩味の強さに変化は認められず，強い塩味によって味のバランスが損なわれた状態であった（**Table 2**）。すなわち，NaCl溶液の場合と同様に，脂肪酸がTGの状態であると，塩味の順応様の低下は認められなかった。Hiraokaらは[11]，ラットを用いた試験において，口腔内でFFAは受容されるが，TGは受容されないことを示していることから，今回認められた塩味に対するFFAの作用が，FFAが持つ口腔内における生理的な作用によって生じた可能性が推定される。塩漬熟成においては，脂質の主体であるTGがリパーゼによってFFAに分解される。すなわち，塩漬熟成中のFFAの増加が，塩なれの要因となる可能性が示唆された。

一般的に塩なれは，塩辛い食品に認められることから，塩味に対するFFAの作用が，強い塩味の条件下で顕著であったことに矛盾はないと言える。さらに，FFAによって塩味が感じられなくなるような現象ではなく，塩味とうま味等がバランスの良い状態となったことも，「塩味がやわらぐ」と言う塩なれと一致している。本研究は，食肉製品における塩なれ現象をより深く理解することにつながる基礎的な結果を示した。

塩味の抑制については，酸味を呈する有機酸による対比効果がよく知られている[12, 13]。この効果は，酸味によって塩味が抑制されることであるが，本研究との共通点を考察すると，有機酸とFFAがともにカルボキシル基を持つことがあげられる。脂肪酸のpKaは4.85であるから[14]，生ハムのpH5.7～7.0では[4]，多くが解離状態にあると考えられる。このことは，TGからなるEOが塩味に作用しなかった理由に通じるかもしれない。酸

Table 2　Effect of FFA and EO on saltiness from pork soup adding 1.0% NaCl

		First taste	A few tens of seconds later	
		Saltiness	Saltiness	Balance with other taste
NaCl 1.0%	—	Strong	Strong	Off-balanced
	+ FFA	Strong	Moderate	Balanced
	+ EO	Strong	Strong	Off-balanced

© The Ito Foundation

味を呈さないFFAが塩味に作用したことは興味深い。

最後に，リノール酸を豚肉スープに添加した場合に限って，スープを吐き出した後，複雑な濃厚感が感じられた。この結果は，オレイン酸とリノール酸の間に作用の違いがあること，リノール酸と塩味以外の四味の間になんらかの関係性があることを意味する。Koriyamaらは，オレイン酸，リノール酸，EPAおよびDHAの４種の不飽和脂肪酸うち，オレイン酸以外の不飽和脂肪酸が酸味，苦味およびうま味に変化を与えることを示している[15)]。我々は引き続き，呈味に対するリノール酸の作用に注目し，検討を行っている。

４．要　約

塩味に対するFFAの作用は，塩味が強いNaCl 1.0％の条件で顕著であり，先味に強く感じられる塩味がしだいに弱くなる順応様の現象が確認された。豚肉スープ由来のうま味等が共存する場合，塩味に対する反応時間が最も短く，FFAの添加は，NaCl 1.0％の塩味の強さを順応様に弱め，塩味とうま味等のバランスが取れた状態となった。FFAをEOに替えて試験したところ，同様の作用は認められず，脂肪酸がTGではなく，FFAであることが重要と考えられた。したがって，長期塩漬熟成におけるFFAの増加は，塩なれの要因となる可能性が示唆された。今回の結果は，塩漬熟成における塩なれ現象のより深い理解を導く基礎的知見となる。

文　献

1）Ichimura, S., Nakamura, Y., Yoshida, Y., Hattori, A.：*Animal science journal*, **88**, 379～385, 2017.
2）Toldrá, F.：*Meat science*, **49**, S101～S110, 1998.
3）Mattes, R. D.：*American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology*, **292**, G1243～G1248, 2007.
4）一般社団法人 食肉科学技術研究所：海外食肉加工品品質評価等事業報告書（別冊），日本ハム・ソーセージ工業協同組合，2020.
5）栗原堅三：計測と制御，**20**，43～50，1981.
6）山口静子：おいしさの科学，81～97，朝倉書店，1994.
7）Christensen C. M.：*Perception & Psychophysics*, **28**, 347～353, 1980.
8）Valeri, D., Meirelles, A. J. A.：*Journal of the American Oil Chemists' Society*, **74**, 1221～1226, 1997.
9）Halpen, B. P.：Umami：A Basic Taste, 327～341, Marcel Dekker, New York, 1987.
10）Bujas, Z., Szabo, S., Ajdukovic, D., Mayer D.：*Perception & Psychophysics*, **45**, 385～390, 1989.
11）Hiraoka, T., Fukuwatari, M., Imaizumi, M., Fushiki, T.：*Physiology & Behavior*, **79**, 713～717, 2003.
12）浜島教子：調理科学，**8**，132～136，1975.
13）浜島教子：家政学雑誌，**27**，255～261，1976.
14）菊川清見：オレオサイエンス，**1**，75～82，2001.
15）Koriyama, T., Wongso, S., Watanabe, K., Abe, H.：*Journal of Food Science*, **67**, 868～873, 2002.

© The Ito Foundation

食肉の品質を制御する遺伝的要因に関する多因子複雑系の解析：細胞骨格との関連からのアプローチ

Analysis of the complex system composed of multiple genetic factors regulating meat quality : approaches in relation to the cytoskeleton

灘　野　大　太
（名古屋大学大学院生命農学研究科）

Daita Nadano
（Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University）

Meat quality is considered to be a complex system, which is ultimately determined by the multiple interactions of numerous factors. As there are potentially so many factors, it is difficult to obtain a real clue to analyze the quality. Some papers have reported that meat quality is a transmittable genetic trait. From this viewpoint, genetic approaches seem effective but have not been fully successful so far. The present study was conducted on the basis of a larger and more objective survey, genome wide association study (GWAS), rather than a classical genetic approach based somewhat on intuition and experience. The translational product of the target gene lacked known functional domains and motifs, in addition to the fact that there are virtually no reports on its function, and thus lacked clues to elucidate its importance in meat quality. Therefore, we set out to analyze the product of this gene by biochemical and cell-biological methods. For example, the gene product was expressed in mammalian cells as a protein fused with green fluorescent protein (GFP) and observed by confocal laser microscopy. Since the cytoskeleton has been known to be associated with meat quality, our analysis focused on this point. Our data have suggested that this protein has a selective affinity for microtubules, especially their terminal ends, and migrates to the cell periphery near the plasma membrane, providing new clues for further analysis.

1．目　　的

豊かで多幸感のある食生活を支えるという意味において，食肉の重要性は国を問わず言をまたない。食肉の食感として，完全性，新鮮さ，赤身の程度，ジューシーさ，味感等があげられ，たとえば柔らかさは実際の消費者購買行動調査においても購買動機に最も影響を与える因子として報告されてきた。このような経緯から，食肉の柔らかさを含む品質の改善は食肉関連業界において高い優先度で検討されてきた。しかし，残念ながら伝統的な飼育・育種の方法に依存する限りにおいて，測定にかかるコスト高やと畜後に得られるデータの限界から，肉質の改善は難題と言わざるを得ない状態であった[1)]。

この食の満足感に直結する肉質は，では遺伝学の進歩とどのように結び付けられてきたのであろうか。おいしさの重要な要因である肉の柔らかさ

© The Ito Foundation

について，測定によって客観的な評価しうる指標である肉のせん断力に着目して遺伝的調査が行われたところ，中からやや高度程度に伝播可能な形質であることが示された[2)]。こうした研究を踏まえ，ごく最近になって形質を支える遺伝子が明らかになり，その潜在的重要性が指摘されているが[3)]，多因子により制御された複雑系とされる肉質制御の分子レベルでの解明，ましてやその産業応用はいまだ黎明期と判断される状況である。

個体のすべての情報，すなわち全ゲノムレベルでの関連解析（genome-wide association study，GWAS）の一例として，食肉の品質に影響を与える遺伝性因子の探索が行われた。この研究において有力された遺伝子は，偶然にも代表研究者らにより乳腺に関する生物学的研究（最近の例[4)]）において同定されたものであり，これを研究成果の社会貢献に向けた独自の切り口として，この遺伝性複雑系制御因子を分子レベルで解析することとした。

2．方　法

2.1　遺伝子発現系の構築

解析対象の遺伝子のcDNAをPCR法により増幅し，哺乳類細胞発現用ベクターに同ベクターのマルチクローニングサイトを利用して，得られたcDNAを翻訳時の読み枠を考慮して挿入した。これらを市販のキット（Roche Applied Science）を用いて大量に調製した。得られたプラスミドベクターについて，制限酵素処理産物のアガロースゲル電気泳動およびDNA配列解析により当初の予定どおりの発現ベクターが得られたことを確認した。作製した哺乳類細胞用発現ベクターを，10％ウシ胎児血清を含む細胞培養培地に37℃および５％CO_2条件下で培養した細胞株へ，遺伝子導入試薬としてポリエチレンイミンを用いて導入した[4)]。

2.2　遺伝子産物の生物化学的解析

上記の実験で遺伝子を導入した細胞を回収し，下記の電気泳動用の試料緩衝液に溶解し煮沸処理をした。各試料に含まれるタンパク質をラウリル硫酸ナトリウム―ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離した後，セミドライ式ブロッティング装置を用いてポリフッ化ビニリデン膜（Millipore）に転写した。この膜をスキムミルクによってブロッキングした後，目的とするタンパク質検出用の一次抗体，次に検出用に西洋ワサビペルオキシダーゼによって標識された二次抗体と順次反応させた。緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein，GFP）およびその融合タンパク質の検出用にMBL社のポリクローナル抗体を一次抗体として用いた。イモビロンウェスタン化学発光基質（Millipore）を用いて発色させ，ライトキャプチャー（アトー）を使用してブロット上の目的タンパク質をバンドとして検出した。

2.3　遺伝子産物の細胞生物学的解析

細胞培養用プラスチックディッシュ（滅菌済みのカバーガラス入り）に細胞を播種し，上記の発現ベクターを免疫ブロッティングの場合と同様に細胞へと導入した。遺伝子導入後，培養した細胞をパラホルムアルデヒド（室温で15分間）または－20℃の冷メタノールを用いて細胞を固定した。前者の場合に細胞内部の観察のため細胞透過処理を界面活性剤を用いて行い，ウシ血清アルブミンでブロッキングした。微小管の検出にモノクローナル抗α-チューブリン抗体（Sigma-Aldrich）およびその蛍光標識特異二次抗体（Thermo Fisher Scientific）を用いた。GFP融合タンパク質の場合にはGFP由来の緑色蛍光を検出した。蛍光染色像を共焦点レーザー顕微鏡（Zeiss）にて観察した[5)]。また，微小管のノコダゾール（Sigma-Aldrich）および低温処理を組み合わせた選択的かつ完全な脱重合処理ならびにタキソー

© The Ito Foundation

ルを用いた微小管安定化処理については既報[6]にしたがった。細胞の蛍光動画撮影にCO_2非供給型のステージインキュベーターを組み合わせた共焦点レーザー顕微鏡（Fluoview FV1000D，オリンパス）を用いた。

3．結果と考察

ゲノムワイド解析より今回の解析対象とした遺伝子の遺伝子産物には，既知の機能ドメインやモチーフがこれまでのところ見当たらないため，アミノ酸配列から機能を推察することが困難であった。肉質との関連を解明する手掛かりを得るため，このcDNAを哺乳細胞発現ベクターであるプラスミドDNAにクローニングした。そして，こうして得られた遺伝子を哺乳類細胞に導入することで解析を進めることとした。なお，細胞内局在が本遺伝子の翻訳産物の機能解明の手掛かりになると考え，発現ベクターのひとつとしてGFPとの融合タンパク質として細胞内で発現可能なベクターを用いた。GFPはその蛍光により対象タンパク質を蛍光顕微鏡下で観察できるメリットがある半面，分子量が３万弱と比較的大きいことから，その融合位置の違いによる影響が想定された。よって，目的タンパク質のＮ末端またはＣ末端にGFPを融合した計２種類のベクターを調製した。また，コントロールとしてGFPそのもの（未融合）の発現ベクターも同様に調製した。

これらの発現ベクターを用いて各翻訳産物を培養細胞に発現させ，まず遺伝子産物の発現を免疫ブロッティングによって解析し，全長産物が分解されることなく発現することを確認することとした。抗GFP抗体を用いて検出したところ，Ｎ末端にGFPを融合させた目的遺伝子産物は，計算分子量から推定される位置にGFP（未融合）と同程度の発現量で明瞭に観察されたのに対し，Ｃ末端に融合させたものは正確な原因は不明であるが，その発現量がGFPに比べて明らかに低かった。

次に，共焦点レーザー顕微鏡による蛍光顕微鏡観察を行い，目的タンパク質の細胞内局在を調べることとした。上記のとおりＣ末端GFP融合タンパク質について発現量が低かったため，Ｎ末端にGFPが融合された目的タンパク質の発現ベクターをまず遺伝子導入・解析に用いることとした。蛍光顕微鏡で目的タンパク質の発現をGFPの蛍光から確認した後，共焦点レーザー顕微鏡を用いて，細胞内局在を詳細に観察した。その結果，この遺伝子産物が高発現している細胞において細胞質に繊維状の蛍光像が観察されたことから，細胞内の代表的な繊維構造である細胞骨格との関連が推定された（**Fig. 1**）。対照として用いたGFP（未融合）においてはこのような繊維状の観察像は見られず，この観察像がGFPによるものではなく，目的タンパクの特性に由来することが示された。細胞骨格は大きく分けて，径が最も細いアクチンフィラメント（別名Ｆ-アクチン，マイクロフィラメント），径が最も大きくチューブリンダイマーの重合体である微小管，さらに両者の中間の大きさである中間径フィラメント（組織により異なる，たとえば上皮であればケラチンフィラメント）からなる。各細胞骨格を特異的に認識する抗体を用いて共染色実験を行ったところ，この遺伝子産物の観察像は抗チューブリン抗体による染色像と重なり合ったことから微小管に結合していることが示唆された。加えて微小管脱重合処理を行った細胞においては上記の繊維状の観察像が失われ，細胞質にほぼ均一に広がる像が観察され，このことからも微小管との会合が支持された（**Fig. 2**）。なお，上述のとおりＣ末端GFP融合タンパク質は免疫ブロッティングにおいて発現が低かったが，一過性遺伝子導入後に顕微鏡観察において，同タンパク質を発現する細胞が少数ではあるが観察された。これらの発現細胞を共焦点レーザー顕微鏡

© The Ito Foundation

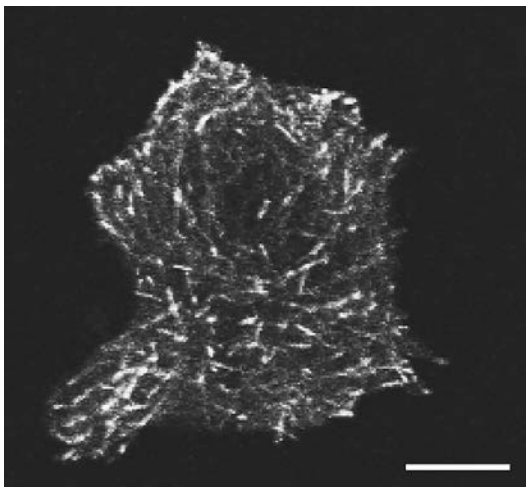


Fig. 1　Observation of the GFP-tagged protein in the cell by using a confocal laser macroscope. Bar, 10 μm

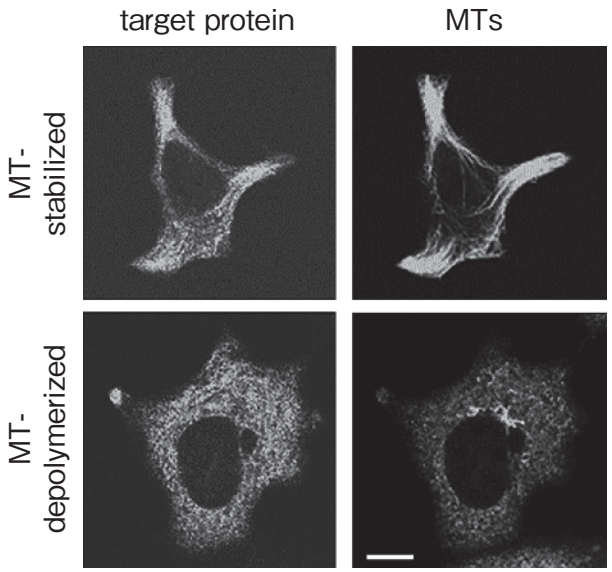


Fig.2　Intracellular co-localization of the target protein and microtubules（MT）under the MT-stabilized and-depolymerized conditions. Bar, 10 μm

で解析したところ，N末端融合タンパク質の場合と同様の微小管との共局在が観察された。よって，上記の観察像に対するGFPの位置による影響は認められないと推定された。そして，さらにこの蛍光顕微鏡観察を進めたところ，発現が中程度以下の場合において，この遺伝子産物が細胞表面近くの微小管の先端部分に強く検出される観察像が再現性よく得られた。微小管には動的不安定性があり，末端の伸長と脱重合，そしてそれに続く再伸長への変化が観察される。この実験結果は，同遺伝子産物が微小管選択的に細胞骨格に結合するだけでなく，その動的な末端により強く結合す

© The Ito Foundation

ることを示唆する。このことはN末端GFP融合タンパク質を発現した細胞の動画観察により，同タンパク質が微小管先端に沿って細胞膜近傍方向へと移動する像が得られたことにより支持された。すなわち，同タンパク質は単に静的に細胞骨格に結合するのではなく微小管の末端に会合した状態でダイナミックな動態を示すことが判明した。

4．要　約

肉質は多数の因子の複雑な相互作用によって最終的に決まってくると考えられる。ただ潜在的にあまりに多くの因子が想定されてしまい，実際の取っ掛かりが得難いことも事実であろう。「1．目的」の項において記述したとおり，肉質は伝播可能な遺伝形質であり，その意味において遺伝学的なアプローチは有効であるにもかかわらず，これまで十分な成果が得られていなかった。本研究はこれまでのややもすれば勘や経験に基づいたアプローチではなく，GWASの大規模でより客観的な調査を背景に進められた。対象とした遺伝子の翻訳産物について機能に関して報告されていないことに加えて，既知のドメインやモチーフが見当たらず，肉質との関連を解明するうえでの手掛かりに欠けていた。そこで，この遺伝子産物であるタンパク質の解明を生化学・細胞生物学的手法を駆使して進めることとした。アクチンを含む細胞骨格は肉質との関連が報告されており，この点に着目して解析した結果，このタンパク質が微小管の末端部に選択的な親和性を持ち，細胞膜近くである細胞辺縁部へと移動することが示され，さらなる解析への手掛かりが得られた。

文　献

1） Raza, S. H. A., Khan, S., Amjadi, M., Abdelnour, S. A., Ohran, H., Alanazi, K. M., Abd El-Hack, M. E., Taha, A. E., Khan, R., Gong, C., Schreurs, N. M., Zhao, C. P., Wei, D. W., Zan, L. S.：Genome-wide association studies reveal novel loci associated with carcass and body measures in beef cattle, *Arch. Biochem. Biophys.*, **694**, 108543, 2020.

2） Miar, Y., Plastow, G. S., Moore, S. S., Manafiazar, G., Charagu, P., Kemp, R. A., Van Haandel, B., Huisman, A. E., Zhang, C. Y., McKay, R. M., Bruce, H. L., Wang, Z.：Genetic and phenotypic parameters for carcass and meat quality traits in commercial crossbred pigs, *J. Anim. Sci.*, **92**, 2869～2884, 2014.

3） Mohammadabadi, M., Bordbar, F., Jensen, J., Du, M., Guo, W.：Key Genes Regulating Skeletal Muscle Development and Growth in Farm Animals, *Animals*, **11**, 835, 2021.

4） Shibayama, H., Yamamoto, T., Oshima, K., Matsuda, T., Nadano, D.：Transcription Factor Sox4 as a Potential Player in Mammary Gland Involution, *DNA Cell Biol.*, **38**, 1125～1133, 2019.

5） Muto, A., Sugihara, Y., Shibakawa, M., Oshima, K., Matsuda, T., Nadano, D.：The mRNA-binding protein Serbp1 as an auxiliary protein associated with mammalian cytoplasmic ribosomes, *Cell Biochem. Funct.*, **36**, 312～322, 2018.

6） Nadano, D., Nakayama, J., Matsuzawa, S., Sato, T., Matsuda, T., Fukuda, M. N.：Human tastin, a proline-rich cytoplasmic protein, associates with the microtubular cytoskeleton, *Biochem. J.*, **364**, 669～677, 2002.

© The Ito Foundation

国内標準化を目的とした食肉の可食期間延長技術の検証

Verification of edible period extension technology for meat for the purpose of domestic standardization

中　村　好　徳
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター）

Yoshi-nori Nakamura
（Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO）

In this work, we aimed to study the effect of super-chilled storage at −1℃ on the shelf life of pork and chicken. Vacuum packaged pork and chicken were stored at −1℃ for 0 ～ 57 days and 0 ～ 47 days, respectively. Sensory evaluation showed no abnormality until day 41 in pork and 30 in chicken. Aerobic, psychrophilic, and anaerobic bacterial abundance increased with super-chilled storage; however, the increase was lower than the regulation levels. The pH and levels of metmyoglobin, thiobarbituric acid reactive substances, and volatile basic nitrogen indicated no adverse effects in terms of food sanitation. Therefore, we recommend setting the shelf life of pork and chicken at 32 and 24 days, respectively.

1．目　　的

わが国で消費される牛肉，豚肉ならびに鶏肉は流通段階で可食期間が設定される。国内の実質的なガイドラインである「食肉に関する期限表示フレーム」[1]には，食肉についての貯蔵温度，包装形態と可食期間の目安が定められている。例えば，原料肉が部分肉の場合，貯蔵温度が0℃（国内における未凍結状態での最低設定温度）で包装形態が真空包装の場合は，安全係数0.8を乗じた可食期間の日数は牛肉で61日間，豚肉で20日間，鶏肉で12日間と記載されている。食品衛生法第19条の規定により，食肉を加工および販売する事業者は可食期間を表示する義務があるが，一般的には検査費用や設備などの負担を考慮してガイドラインを参考にすることが多い。

‘氷点下の未凍結貯蔵’とは，対象とする食品の凝固点から0℃までの過冷却温度域で貯蔵する流通・加工技術である。わが国ではさまざまな食品に適用され，食品の貯蔵，熟成，発酵，乾燥ならびに濃縮過程において利用されている[2]。前報[3]では，牛部分肉を用いて鮮度保持や肉質変化に及ぼす－1℃貯蔵の影響を調査したところ，既存の0℃貯蔵よりも－1℃貯蔵では安全係数が0.8の場合に25日間の可食期間の延長が可能であることを示した。しかし，－1℃貯蔵が豚肉と鶏肉の鮮度保持や肉質変化に及ぼす影響について調べた報告は見られない。

本研究では，－1℃貯蔵が豚肉と鶏肉の可食期間に及ぼす影響を調査し，国内において未凍結状態での最低設定温度である0℃貯蔵と比べて延長が可能かを検討した。

© The Ito Foundation

2．方　法

2.1　材料筋肉

豚肉は，通称：三元交配豚［(ランドレース種×大ヨークシャー種）×デュロック種］８頭（出荷時体重：約118kg）を用いた。と畜後，半丸枝肉から分割した部分肉を真空包装後に冷蔵輸送し，と畜から２日以内に貯蔵試験に供した。鶏肉は，通称：地鶏（原種・天草大王×九州ロード種）12羽（出荷時体重：約3.5kg）の中抜き半丸を真空包装後に冷蔵輸送し，と畜から２日以内に貯蔵試験に供した。

2.2　貯蔵試験

貯蔵試験はインバータ制御型氷温庫（日本軽金属，東京）を用いて行った。本機器は２回／日の頻度で霜取り機能を設定したが，霜取りの有無による貯蔵庫内の温度変化（標準偏差）は約0.37℃（霜取り機能あり）と約0.11℃（なし）であった。貯蔵温度の設定は－１℃とした。貯蔵期間は，豚肉については０日間（貯蔵なし），25日間，41日間ならびに57日間とし，鶏肉については０日間（貯蔵なし），15日間，30日間ならびに47日間として材料部分肉をそれぞれ無作為に振り分けた。部分肉の貯蔵期間に関する設定は「食肉に関する期限表示フレーム」[1]に準拠する必要があるが，－１℃貯蔵については同フレームが適用されないため，前報[3]を参考にして仮想の貯蔵期間を設定した。

2.3　分析項目および方法

貯蔵試験後，開封時の官能検査とドリップロスの測定を行った。その後，豚肉については部分肉から最長筋（*M.longissimus*）を，鶏肉については浅胸筋（*M. pectoralis superficialis*）をそれぞれ摘出して分析に供した。化学成分の分析にはそれぞれ前，中および後部から等量を採取して，よく混合したものを用いた。

2.3.1　官能検査

「食肉に関する期限表示フレーム」[1]に準拠して，食肉に関する官能検査経験が豊富な５名の検査員により色沢，外観，ドリップと臭いについて評価を行った。色沢については‘緑変，褐変があるもの，色沢の劣化が進行しているもの’を，外観については‘肉質が劣るもの，ネトや発泡が生じているもの，カビが発生しているもの，肉の表面が乾燥しているもの’を，ドリップについては‘液汁に濁りが発生しているもの’を，臭いについては‘腐敗臭がするもの’を異常と判定した。

2.3.2　ドリップロス

材料筋肉を取り出し重量W（ｇ）を求め，貯蔵試験前に測定しておいた重量W_0（ｇ）とあわせて次式よりドリップ率（％）を算出した。

ドリップロス（％）＝（W_0－W）／W_0×100

2.3.3　微生物検査

材料筋肉に生理食塩水（滅菌済み）を加えて磨砕し均質化した後，混釈平板培養法で測定した。培養条件については，一般細菌数は標準寒天培地（極東製薬工業，東京）を用いて37±１℃で48時間，低温細菌数は標準寒天培地（極東製薬工業）を用いて７±１℃で10日間，嫌気性細菌数は標準寒天培地（極東製薬工業）を用いてアネロパック（三菱ガス化学，東京）で嫌気的環境にした後，37±１℃で48時間，それぞれ培養を行った。一方，大腸菌群数についてはデスオキシコレート培地（極東製薬工業）を用いて35±１℃で24時間行った。

2.3.4　pH

卓上型pHメータ（F-52，堀場製作所，京都）を用いて，等量の冷蒸留水を加えて磨砕し均質化した材料筋肉に電極を挿入してpH値を測定した。

2.3.5　メトミオグロビン含量

尾藤の方法[4]に準拠して行った。材料筋肉３ｇに冷蒸留水10mlを加えて磨砕し10分間静置した。

© The Ito Foundation

遠心分離（3,000回転，10分間）後の上澄みを濾過し，水酸化ナトリウムでpH6.8に調整した。さらに遠心分離後，上澄みをマイクロフィルター（ポアサイズ0.45μm）で濾過し，0.2mol/lリン酸緩衝液を５ml加えて混和した。503nmおよび540nmで吸光度を測定して吸光度の比（540nm/503nm＝A）を算出して，次式より材料筋肉中の全ミオグロビン含量に対するメトミオグロビン含量の割合（メト化率，%）を算出した。

メト化率（%）＝（30.6－10.6×A）/（0.09×A＋0.191）

2.3.6　2-チオバルビツール酸反応性物質含量

材料筋肉６gに1.15%塩化カリウム溶液を加えて磨砕し均質化した溶液を用いて，今成らの方法[5]を参考にして測定した。均質化した溶液にSDS水溶液0.2ml，酢酸緩衝液1.5ml，BHT酢酸溶液50μl，TBA水溶液1.5mlならびに超純水0.7mlを加えて混和した。密封後，試験管を４℃で60分間静置し，沸騰水中で60分間加熱した。流水中で冷却後，超純水0.7mlおよびブタノール―ピリジン混合液5.0mlを加えて混和した。1.15%塩化カリウム溶液を試料とした対照についても同様の操作を行い，532nmの吸光度（AとA$_0$）を測定して次式により試料１gから生成する赤色色素量から2-チオバルビツール酸反応性物質（2-Thiobarbituric Acid Reactive Substances：TBARS）の含量を算出し脂質酸化の指標とした。

TBARS含量（μmol/g）＝［（A－A$_0$）/156,000］×（5.8/10^3）×（10^2/３）×10^6

2.3.7　揮発性塩基窒素含量

材料筋肉１gに冷蒸留水８mlを加えて磨砕し30分間静置した。20%過塩素酸溶液１mlを加えて遠心分離（3,000回転，10分間）後に上澄みを得て，コンウェイ微量拡散分析法[6]により揮発性塩基窒素（Volatile Basic Nitrogen：VBN）の含量を測定してタンパク質腐敗の指標とした。

３．結果と考察

本研究の結果から，－１℃貯蔵を行った豚部分肉の可食期間は安全係数が0.8の場合に，32日間の設定が可能となることが示唆された。これは豚部分肉が貯蔵41日目においても官能検査と微生物検査において異常が認められなかったためである。しかし，貯蔵57日目に８頭中１頭で腐敗臭が確認され異常と判定された。微生物検査においては，一般細菌数，低温細菌数と嫌気性細菌数ともに貯蔵により漸次増加したが，官能検査が異常と判定された貯蔵57日目でも規制値である10^{8}cfu/g以下で推移した（**Fig. 1**）。したがって，41日間×0.8（安全係数）＝約32日間と算出される。また，32日間の可食期間の設定は，わが国で推奨されている未凍結での最低設定温度である０℃貯蔵の20日間に比べて，12日間の可食期間の延長が可能である。

一方，鶏中抜き半丸の可食期間は安全係数が0.8の場合に，24日間の設定が可能となることが示唆された。これは鶏中抜き半丸が貯蔵30日目においても官能検査と微生物検査において異常が認めら

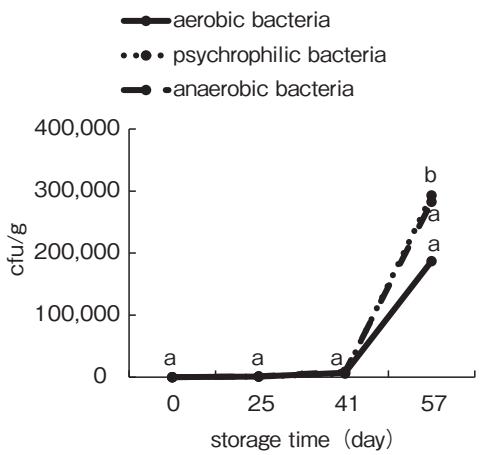


Fig. 1　Changes in the aerobic, psychrophilic and anaerobic bacteria counts of pork during superchilled storage at －1℃. 0～57 days：n＝4. a-b：p＜0.05.

© The Ito Foundation

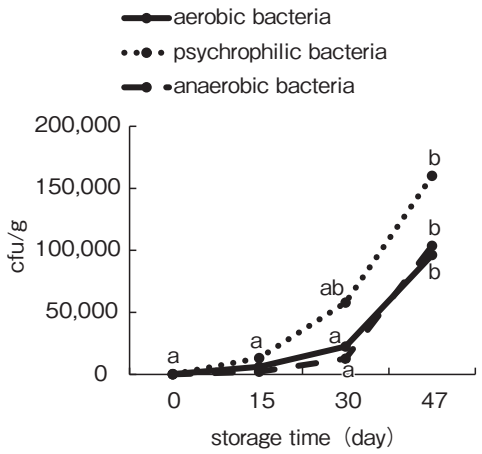


Fig. 2　Changes in the aerobic, psychrophilic and anaerobic bacteria counts of chicken during superchilled storage at −1℃. 0 day：n＝12, 15〜47 days：n＝4. a–b：p＜0.05.

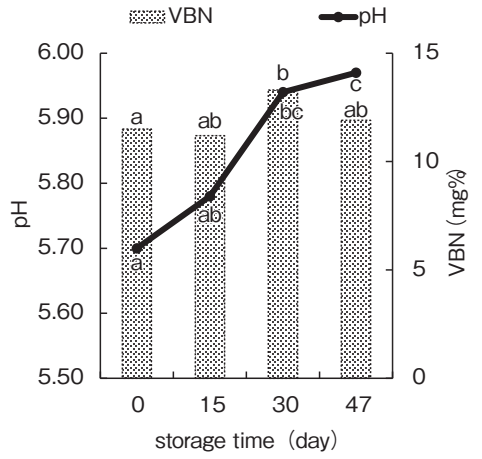


Fig. 3　Changes in the pH and volatile basic nitrogen（VBN）of chicken during superchilled storage at −1℃. 0 day：n＝12, 15〜47 days：n＝4. a–c：p＜0.05.

れなかったためである。しかし，貯蔵47日目に4羽中4羽で緑変や腐敗臭が確認され異常と判定された。したがって，30日間×0.8＝24日間と算出され，24日間の可食期間の設定は，従来の0℃貯蔵の12日間に比べて12日間の可食期間の延長が可能である。また，鶏中抜き半丸についても，官能検査が異常と判定された貯蔵47日目でも各種細菌数は規制値（10^8 cfu/g）以下で推移した（**Fig. 2**）。

肉質に関する理化学検査として，ドリップロスやpH以外にも色調変化の指標としてメト化率，脂質酸化の指標としてTBARS含量，タンパク質腐敗の指標としてVBN含量の測定を行った。その結果，豚部分肉では有意差が認められた項目はなかったが，鶏中抜き半丸ではpHとVBN含量が−1℃貯蔵下でそれぞれ有意に変動した（**Fig. 3**）。「食肉に関する期限表示フレーム」[1]には理化学検査による規制値は記載されていないが，文献を参考にするとpHは6.0，メト化率は40％，TBARS含量は0.500 μmol/g，VBN含量は30mg％を超えない範囲が規制の目安と考えられ[7〜10]，本研究の結果はこれらの数値以下で変動したため食品衛生として問題のない範囲にあったと考えられた。

したがって，豚部分肉と鶏中抜き半丸を−1℃貯蔵すると，安全係数が0.8の場合，それぞれ32日間と24日間の可食期間の設定が可能であり，国内における未凍結状態での最低設定温度である0℃貯蔵よりもそれぞれ12日間の可食期間の延長が可能になることが示唆された。

4．要　約

豚肉と鶏肉の可食期間に及ぼす氷点下の未凍結貯蔵の影響を調査した。真空包装された豚肉と鶏肉を−1℃でそれぞれ0〜57日間と0〜47日間貯蔵した。官能評価は豚肉で41日目，鶏肉で30日目まで異常は認められなかった。一般細菌数，低温細菌数と嫌気性細菌数は貯蔵によりそれぞれ漸次増加したが規制値以下で推移した。pH，メトミオグロビン含量，2-チオバルビツール酸反応性物質含量と揮発性塩基窒素含量は食品衛生として問題のない範囲で推移した。したがって，豚肉と鶏肉について，それぞれ32日間と24日間の可食期間の設定が可能になることが示唆された。

© The Ito Foundation

文　献

1）日本食肉加工協会：期限表示のための試験方法ガイドライン〔食肉（食肉加工品（半製品）を含む。）〕，6，7，11，中央畜産会，東京，2006.
2）山根昭彦：氷温食品入門，日本食糧新聞社，東京，2015.
3）中村好徳，福間康文，細見亮太，細田謙次：日本暖地畜産学会報，62，129～133，2019.
4）尾藤方通：日本水産学会誌，31，534～539，1965.
5）今成麻衣，柴伸弥，米内美晴，渡邊彰：日本畜産学会報，85，549～552，2014.
6）安藤達彦，吉田宗弘（編著）：身のまわりの食品化学実験第２版，131～133，三共出版，東京，2005.
7）細野明義，鈴木敦士：畜産加工，58，朝倉書店，東京，1989.
8）高坂和久：畜産物の鮮度保持，48，52，56，筑波書房，東京，1991.
9）日本食品衛生学会（編集）：食品安全の事典，392，朝倉書店，東京，2010.
10）田村一平（編集）：文献ガイド　水産物・畜産物の鮮度保持，150，流通システム研究センター，東京，1991.

© The Ito Foundation

枝肉の３Ｄグラフィック化システムの製作（Ⅲ）

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

本山　三知代・石田　翔太・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, Shota Ishida, 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 years, we had developed a basic technology for rendering 3D graphics of meat carcasses and its photogrammetric system. In the present study, to improve the processing capacity of the system to hundreds of carcasses per day, a new computer, a NAS (network attached storage) and a router were installed and built a local network in the system. In addition, a Web application was developed to enable us to access 3D graphics by the Internet was developed, and the applicability of a Web color management technique which we have developed to 3D graphics was evaluated.

As a result, the system became to be able to perform fully automatically a series of operations, from photo shooting to uploading 3D graphics to the Internet. Within a few minutes after photo shooting, we can find a carcass 3D graphic in a folder on the Internet. Carcass 3D graphics with an appropriate color calibration at any internet client environments will be also available.

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

© The Ito Foundation

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[1,2]，本基盤技術を実用化に繋げるためのシステムを昨年度までの２年間に受けた貴助成金を活用して製作・改良した。本システムを用いることで，生産ラインを動く枝肉を静止させることなく３Ｄ計測が可能となり，得られた３Ｄグラフィックから，これまで数値化が難しかった枝肉断面形状等の評価が可能となった。また３Ｄグラフィックは，それ自体がリアルな枝肉の品質情報であり，その活用のためには３Ｄグラフィックの作製から配布までを自動化可能とする，ICT技術を利用したネットワークの構築が有効であると考えられた。

また申請者らはこれまでに，デジタル画像の色管理に関する基盤技術も開発した（特許出願2021年４月）。本技術を用いれば，スマートフォンなど表示媒体に依存して異なる画像の発色を補正してクライアント間で揃えることができることから，本技術を３Ｄグラフィックに適用し色も適切に再現可能にすることで，色が重要な品質項目である枝肉のオンライン取引等における３Ｄグラフィックの有用性を高めることができる。

そこで本年度は，過年度までに製作した枝肉３ＤシステムをICTおよび色管理技術と融合させ，適切に色管理された枝肉３Ｄグラフィックにインターネット端末からアクセス可能にすることを目的とした。

２．方　　法

枝肉３Ｄシステムを実際の生産ラインに導入し，１日に数百，数千の３Ｄグラフィックを作製し配布可能とするために，新たに以下の機器を整備し枝肉３Ｄシステムにローカルネットワークを構築した。また，配布する３Ｄグラフィックの色の見えは表示媒体や環境に依存してクライアント間で異なるが，これを補正して適切な色再現を可能にするために申請者らが別途開発したデジタル画像の色管理技術の３Ｄグラフィックへの適用可能性検証を行うとともに，Webアプリケーションの開発を行った。

２.１　ローカルネットワークの構築

２.１.１　ネットワークストレージ（NAS）

枝肉３Ｄシステムが扱う大量の画像データのストレージとして新たにNASを整備した。枝肉３Ｄシステムから得られる画像データを圧縮せずに保存した場合，2,000頭規模の生産ラインでは１日当たり0.7TBのデータを一時的にでも保存する必要があり，撮影から１か月程度の保存期間を想定したストレージ容量を持ち（16TB），かつカメラ40台により同時撮影された画像の転送速度に制約が生じないように，次世代高速データ通信（10GigE）に対応したものとした（I/O DATA社，HDL2-Z19SI3A-16）。

２.１.２　３Ｄグラフィック計算用コンピュータ

これまで画像の撮影および保存と３Ｄ計算をコンピュータ１台で行っていたが，処理能力の改善のためにローカルネットワーク内にGPUを搭載した高速画像処理が可能な３Ｄグラフィック計算専用のコンピュータを追加した（iiyama社，SENSE-F042-LCXW26-INX）。コンピュータには，プログラミング言語Pythonによる自動制御が可能な３Ｄグラフィック制作ソフトウエアであるMetashape Professional（Agisoft社）を新たに導入し，計算の自動化を可能とした。

２.１.３　LAN/LTEハイブリッドルータ

現場の枝肉生産ラインにはLANが整備されていない場所も多いと考えられることから，枝肉３Ｄシステムのインターネットへの接続には，３Ｇや４Ｇなどの携帯電話回線も用いることができる

© The Ito Foundation

ルータを採用した（I/O DATA社，UD-LT1/EX）。

2.2.　アプリケーション開発

2.2.1　３Ｄグラフィックの色管理技術の開発

申請者らが別途開発した色管理に関する基盤技術[3]の３Ｄグラフィックに対する適用可能性を，実際の枝肉とは異なり時間が経っても色が不変である枝肉模型（過年度に製作）と色評価に適した演色性の高い照明（エコリカ社，ECL-LD2EGD-L3A）を用いて検証した。

2.2.2　Webアプリケーション開発

枝肉３Ｄシステムにより作成された３Ｄグラフィックに，クライアントがインターネットを用いてどこからでもアクセス可能とするパスワード認証型Webアプリケーションの開発を試み，試験運用を行った。

3．結果と考察

枝肉３Ｄシステムのローカルネットワーク構築およびアプリケーション開発により，生産ラインを流れる枝肉を止めることなく，撮影からインターネット上に３Ｄグラフィックをアップロードするところまでを全自動で行えるシステムとして完成した（**Fig. 1**）。以下に詳細を述べる。

3.1　ローカルネットワークの構築

新たに導入したNASおよびLAN/LTEハイブリッドルータにより枝肉３Ｄシステム内の機器をローカルネットワークで繋ぎ，作成したPythonプログラムにより撮影から３Ｄグラフィックの計算までの一連の動作が自動で可能となった。

① 枝肉生産ラインを流れる枝肉の位置を，赤外線センサーにより自動検出し，撮影用コンピュータへ撮像トリガを入力する（昨年度製作）

② 撮影用コンピュータの撮影用プログラムがカメラ40台にレリーズ信号を送る（昨年度製作）

③ カメラ40台（一昨年度および昨年度整備）が枝肉を同時撮影する

④ 撮影回ごとにNASにフォルダを新規作成し，40枚の画像データを格納する（撮影から数秒以内に可能）

⑤ 作成したPythonプログラムにより，④で画像データがNASフォルダに格納されたことを計算用コンピュータが自動検知し，３Ｄグラフィック計算ソフトウエアがフォルダ内の画像データから３Ｄグラフィックを自動計算する

⑥ 計算結果は，一般的なインターネット接続環境（1GigEや3G/4G，WiFi）でスマートフォンでも扱えるサイズのPDFファイルとして自動出力する

⑦ 計算用コンピュータは，⑤と⑥を繰り返し，計算すべき対象のフォルダがなくなったら待機する

撮影から枝肉３Ｄグラフィックの出力まで（上

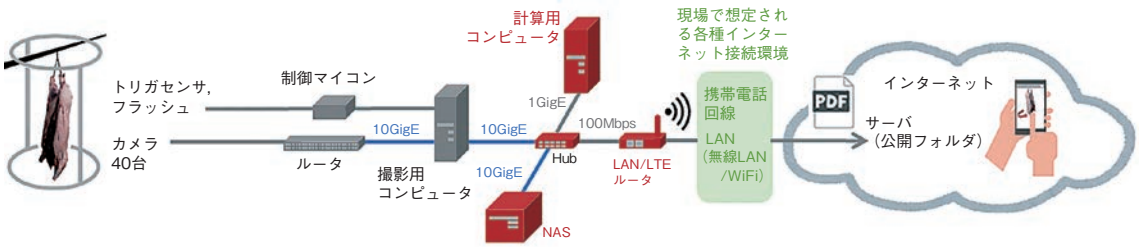


Fig. 1　Schematic diagram of the improved system

© The Ito Foundation

述の①～⑥）を，３Ｄグラフィックの画質を中程度（**Fig.２**）とした場合，約１分で可能であった。画質向上とさらなる高速化を目指して計算方法の最適化のためのプログラム改修を引き続き実施する。

なお，①～④にかかる時間は数秒であった。枝肉生産ラインの速度は，例えば重量計測は枝肉あたり５秒程度以上かかり，これに比べて撮影・保存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ないと考えられた。

また，ネットワークを構成する機材は可動式サーバーラック１台にすべて格納できた。水濡れや結露等，導入する現場環境に応じた調整が必要である。

3.2　アプリケーション開発

3.2.1　３Ｄグラフィックの色管理技術の開発

クライアントに配布された３Ｄグラフィックが各種モニタや印刷物等の表示媒体において適切な色で再現されることは，色が枝肉の重要な品質の一つであることから必要と考えられる。申請者らは色管理に関する基盤技術を別途開発しており[3)]，デジタル画像が持つ本来の色を，ユーザーの任意のモニタや環境で再現することを可能にしている。本技術を用いて，枝肉３Ｄシステムで作製した枝肉模型の３Ｄグラフィックの色校正を行った（**Photo 1**）。

その結果，モニタの特性（**Photo 1** では青味が強くなっている）を校正し，データ本来の色を再現する方向に色味が調整できることを確認した。

一方，実用化に向けた課題としては，**Photo 1** に示したユーザーインターフェースが現状では静止画像にしか対応しておらず，３Ｄグラフィックの利点である自由視点表示ができないことがあった。今後対策し，枝肉３Ｄグラフィック本来の色を自由視点でクライアントが再現できるように展開を図る。

3.2.2　Webアプリケーション開発

新たに導入したLAN/LTEルータにより携帯電

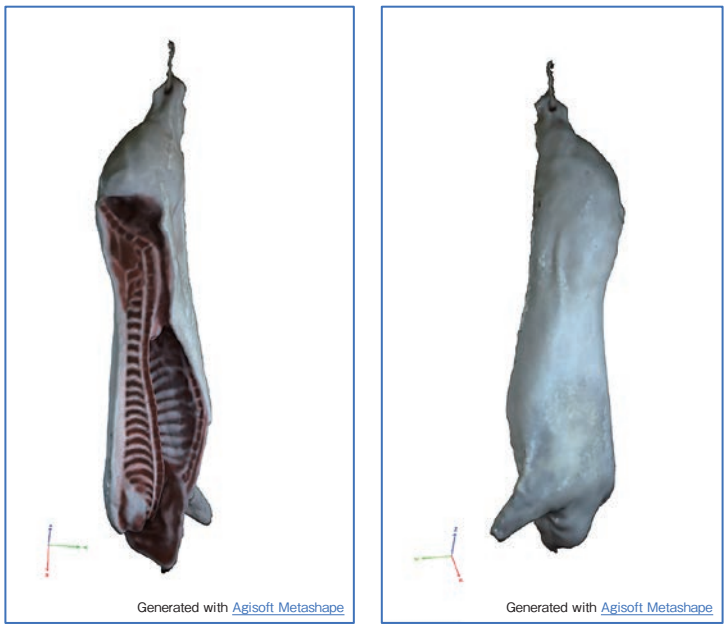


Fig. 2　3D graphic of the carcass dummy rendered by the newly introduced software with medium image quality

© The Ito Foundation

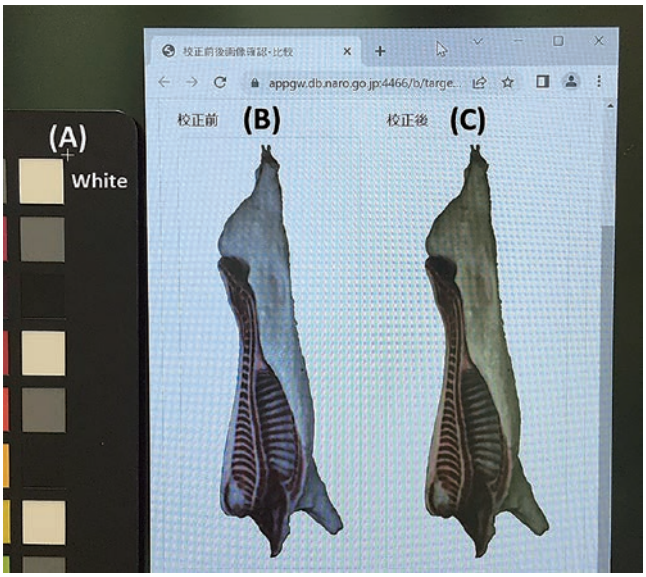


Photo 1　A photograph showing the result of color calibration of the 3D graphic of carcass dummy using an user interface application of the color calibration technology. (A) Standard white color swatch, (B) before calibration, (C) after calibration

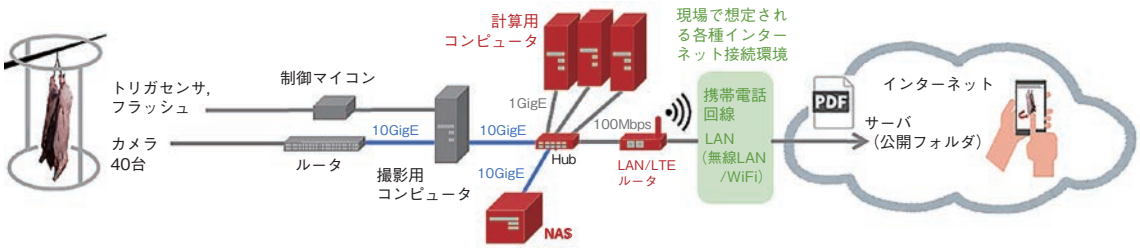


Fig. 3　Schematic diagram of the system with additional calculation computers

話の４Ｇ回線を利用して枝肉３Ｄシステムをインターネットへ接続し，枝肉３Ｄグラフィックがオンラインで閲覧できる仕組みを構築した。当初，インターネット上に保存された３Ｄグラフィックに，クライアントがどこからでもアクセス可能とするパスワード認証型Webアプリケーションを開発し，サーバ等で試験運用することを目指したが，パスワード認証サーバの準備が職場になかったことから，既存のパスワード認証型公開フォルダサービス（Google Drive）を暫定的に利用した。

その結果，撮影から２～３分でインターネット上のフォルダ（Google Driveのフォルダ）内に自動でアップロードされ，閲覧可能な状態になることが確認できた。クライアントがオンラインで閲覧可能にするまでの本システムの処理能力は，単位時間当たりに換算すると20個体／時間，480個体／日である。本システムの実用にあたっては，１日の枝肉処理数に応じて計算用コンピュータの高性能化あるいは増設を行う必要がある。なお，**Fig. 1** に示した構成は，**Fig. 3** のように拡張可能であり，計算用コンピュータの増設は簡単である。

また，用いた携帯電話の４Ｇ回線の速度は75Mbps～100Mbpsであるが，枝肉３ＤグラフィックのPDFファイル（３Mb程度）のアップ

© The Ito Foundation

ロードにはまったく支障はなかった。

４．要　約

生産ラインを流れる枝肉を止めることなくその３Ｄグラフィックを制作する本システムは，撮影からインターネット上への３Ｄグラフィックのアップロードまでの一連の動作を全自動で行えるシステムとして完成した。

今後は，本システムから得られる３Ｄグラフィックの色再現性の確保や，３Ｄデータの畜産現場での活用に向け展開する。これにより，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の数値化や，スマートフォン等で色もよりリアルな枝肉３Ｄグラフィック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。

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）
３）　本山ら，特願（2020年４月30日）

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Effect of imidazole compounds on the aging of meat（Ⅱ）

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. Calpain is a Ca^{2+} ion concentration-dependent proteolytic enzyme. To elucidate the physiological role of carnosine during the transition from skeletal muscle to meat, this study focused on calpain with particular emphasis on its involvement in tenderization from rigor mortis. The addition of carnosine enhanced the degradation of myofibrillar proteins by calpain, and the enhancement of protein degradation was also observed under low Ca^{2+} ion concentration conditions. This showed that carnosine enhanced the Ca^{2+} ion sensitivity of calpain and activated proteolysis. The reaction solution was subjected to SDS-PAGE, and several bands that appeared to be proteolytic products of calpain were identified. In addition, darker bands were observed as the calcium ion concentration increased. The addition of carnosine did not increase the number of bands and did not change the density of the degradation product bands. However, the myofibrillar proteins degraded by calpain were not identified, and the involvement of meat ripening remained unresolved.

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

© The Ito Foundation

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。

これまでの検討で，カルノシンの添加により，低カルシウムイオン濃度条件下におけるカルパインの酵素活性が向上することを確認した[3)]。本研究では，筋原線維タンパク質および筋原線維構造に対するカルパインの分解酵素活性が，カルノシンによって向上するのか確認することを目的とした。

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[4)]。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℃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 $MgCl_2$, 10 mM $Na_4P_2O_7$, 0.1 M K-phosphate，pH 6.4）を加え，同様にホモジナイズした。懸濁液を冷蔵室にて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，0.1，10，および1000 μM $CaCl_2$，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℃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および２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た。反応停止後，４℃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2.2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。

2.4　ウエスタンブロット法によるタンパク質の同定

上記２.3と同様の方法でSDS-PAGEを行い，泳動後のゲルを一部切り出し，PVDFメンブレンに転写した。転写後のメンブレンをT-PBS（0.1％Tween 20，137 mM NaCl，2.68 mM KCl，8.1 mM Na_2HPO_4，1.47 mM KH_2PO_4）で洗浄し，２％スキムミルク溶液を用いてブロッキングした。T-PBSで希釈した一次抗体（抗α-アクチニン・マウスモノクローナル抗体：Sigma-Aldrich社；抗デスミン・マウスモノクローナル抗体：同

© The Ito Foundation

社；抗トロポミオシン・マウスモノクローナル抗体；同社）を添加し，抗体反応を行った。その後，T-PBSで洗浄し，ペルオキシダーゼ標識幸マウスIgG抗体（Bethyl Laboratories社）で二次抗体反応を行った。T-PBSで洗浄後，化学発光分析キット（Chemi-Lumi One L：ナカライテスク社）を用い，検出した。

3．結果と考察

タンパク質の分解の指標とした吸光度は，カルノシン無添加の条件ではCa^{2+}イオン濃度が下がるにつれ，低下した。これはカルパインがCa^{2+}イオン濃度に依存したタンパク質分解活性であり，低Ca^{2+}イオン濃度条件下では十分にタンパク質を分解できなかったためだと考えられる。一方，カルノシンを添加した場合，Ca^{2+}イオン濃度の低下に伴い，吸光度も低下したものの，低下の程度はカルノシン無添加に比べ緩やかであった。各Ca^{2+}イオン濃度条件におけるカルノシンの添加・無添加で比較したところ，10 μMおよび0.1 μMではカルノシン無添加に比べ，カルノシン添加で高い吸光度を示し，カルノシンの存在によってカルパインのタンパク質分解活性が向上したことを示唆した。

カルパインによるタンパク質分解の程度を確認するため，タンパク質分解反応後の筋原線維タンパク質懸濁液をSDS-PAGEに供した。Ca^{2+}イオン濃度およびカルノシンの有無に関わらず，確認できたバンドパターンに大きな差異は見られず，カルパインのタンパク質分解活性の向上により新たなタンパク質の分解はないことが示された。また，一部のバンドでは，Ca^{2+}イオン濃度が高いほど濃く見えているものもあり，高Ca^{2+}イオン濃度条件でカルパインによるタンパク質分解が活発であったことが示された。しかし，カルパインによる分解で得られたバンドのうち，カルノシンの存在下において濃く確認できたものはなかった。カルパインによって分解されたタンパク質を同定するためにウエスタンブロッティングを試みたが，抗体反応がうまく作用せず，バンドの検出ができなかった。使用する抗体の見直しや，質量分析による同定なども検討する必要がある。

骨格筋に含まれるカルパインには，mMオーダーのCa^{2+}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Ca^{2+}イオン存在下で活性化されるカルパイン-２などがある。骨格筋中のCa^{2+}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。本研究で用いたカルパインは，鶏浅胸筋より粗抽出したものであるため，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。本研究では，10および0.1 μM $CaCl_2$添加区で，カルノシン存在下におけるタンパク質分解活性が向上したことが示された。このことは，カルノシンによって２種類のカルパインが活性化されたことを示唆している。しかしながら，SDS-PAGEでは，カルノシンの添加によるタンパク質分解の向上は確認できず，また，ウエスタンブロット法によるタンパク質同定もできなかったことから，より高精度な解析手法による検討が必要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の，骨格筋から食肉への転換期における生理的な役割を解明するために，特に死後硬直からの軟化（熟成）への関与に焦点を当て，Ca^{2+}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を行った。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Ca^{2+}イオン濃度条件においてもタンパク質分解の向上が確認できた。つま

© The Ito Foundation

り，カルノシンがカルパインのCa^{2+}イオン感受性を向上させ，タンパク質分解を活性化させたことが示された。しかしながら，カルパインによって分解される筋原線維タンパク質の同定には至らず，食肉の熟成の関与については未解明であった。

文　献

1） Dutka, Travis L., Graham D. Lamb：*Journal of Muscle Research and Cell Motility*, **25**, 203～213, 2004.
2） Pomponio, Luigi, René Lametsch, Anders H. Karlsson, Leonardo Nanni Costa, Alberto Grossi, Per Ertbjerg：*Meat Science*, **80**, 761～764, 2008.
3） 早川徹：令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**39**，22～24，2021.
4） Colle, M. J., M. E. Doumit：*Meat Science*, **131**, 142～145, 2017.

© The Ito Foundation

ポークソーセージにおけるタンパク質の香り保持効果とそのメカニズムの解明

Clarification of the mechanism for holding aroma compounds by proteins in pork sausages

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 gives us *Koku* attributes such as complexity and lastingness in the flavor sensation. This lastingness is thought to be caused by binding property of aroma compounds with lipids in pork sausages. However, it is not clear that the mechanisms for binding aroma compounds with lipids.

The present research was carried out to clarify which lipid in pork sausage contributed to hold aroma compounds. At first, lipids in pork sausage were extracted and fractionated to triacylglycerol, sugar lipid and phospholipids fractions by florisil column chromatography.

The holding capacity of aroma compounds by each lipid was evaluated by the measurement of amounts of aroma compounds released from the mixture containing each lipid after heating. Guaiacol, *m*-cresol and eugenol possessing log P less than 3 value were not held by triacylglycerol, sugar lipids and phospholipids fractions. On the other hands, caryophyllene (log P; 4.4) was held by triacylglycerols, and D-limonene, nonanal and caryophyllene possessing log P more than 3 were held by phospholipid fraction.

The casing composed by collagen and elastin is used to produce pork sausages. This casing was shown to hold aroma compounds such as methyl propyl disulfide and nonanal. Nonanal was bound with casing, because it possessed the log P of more than 3. As the log P of methyl propyl disulfide was less than 3, the mechanism of holding this aroma compound with casing seemed to be different from that with lipids.

1．目　　的

申請者は，最近，食べ物のコクに関する客観的評価系の確立を目指し，コクを３つの要素（複雑さ，広がり，持続性）で構築し，それぞれの「見える化」を試みている[1~9]。また，美味な食肉製品の１つであるポークソーセージのおいしさに関して，コクに焦点を当て，ポークソーセージのコクの形成と増強に関わるメカニズムの解明を進めている[10, 11]。

先の研究（貴財団からの助成研究）[12~17]において，ポークソーセージのコクは，うま味物質や脂

© The Ito Foundation

質の添加により増強されていることを，官能評価により明らかにした。また，ポークソーセージの香りの特徴に関わる香気成分として，β-Pinene，3-Carene，D-Limoneneを含む16成分を同定し，それぞれの成分の香気的な特徴を明らかにした。ソーセージ中の脂質と結合している香気成分は，咀嚼中に口腔内の唾液により放出されることも示した。さらに，昨年度は，同定された16の香気成分が，ソーセージに含まれる脂質によって保持されるか否かを検討し，これらの香気成分の中で，脂質に保持されるものとそうでないものに分かれることが明らかとなった。香気成分は，中性脂肪であるトリオレインにはほとんど結合しないが，コレステロールやリン脂質に保持されやすいことも判明した。香気成分の脂質への保持のされやすさは，香気成分の有する特性，特にlog P（分配係数）に依存している可能性が示唆された。しかし，そのメカニズムは十分に解明されておらず，さらなる解析が必要である。また，ソーセージの成分で，脂質以外では，タンパク質に香気成分の保持効果が知られている。例えば，乳タンパク質や大豆タンパク質にも香気成分の保持効果があると言われている。しかし，食肉製品に存在するタンパク質の香気成分保持効果に関する研究は，これまでまったくなされていない。

そこで本年度は，まず，ポークソーセージに含まれる香気成分の脂質への保持がどのような特性に起因しているかを検討するため，ソーセージの脂質を抽出，分画し，各脂質画分への香気成分の保持効果を検討した。また，食肉の研究分野ではまったく未知の領域である「タンパク質による香気成分の保持効果」に関する研究を実施した。

２．方法および結果と考察

１）ソーセージに含まれる脂質の種類の違いによる香気成分の保持特性

ソーセージに含まれる脂質による香気成分の保持特性を調べた。ソーセージから脂質を抽出し，それをカラムクロマトグラフィーで，中性脂肪，糖脂質ならびに，リン脂質に分画した後，ソーセージから検出された香気成分の脂質への結合性を調べた。

実験方法

（１）　試薬

トリオレインはSigma社から，メチルプロピルジスルフィド，L-α-ホスファチジルコリン・ジパルミトレインと特級メタノールは富士フイルム・和光純薬（株）から，フロリジル，ヨウ素，チオ尿素，ジクロロメタンは関東化学（株）から，アンスロン，D-リモネン，ノナナール，カリオフィレン，グアヤコール，*m*-クレゾール，オイゲノール，ジメチルフタレート（内部標準物質），特級クロロホルムは東京化成工業（株）から購入した。シリカゲルプレートはメルク社から購入した。

（２）　脂質の抽出[18)]

市販のウィンナーソーセージ（JAS特級）を細切した後，10ｇの細切肉に，200mlのクロロホルム：メタノール（２：１）混合液を添加し，ホモジナイズした。これを濾過し，濾液を集めた。濾液を分液ロートに移し，濾液容量の0.2倍の0.9％食塩水を加えて転倒混和した。その後，30分静置した。水相とクロロホルム相が分離した後，クロロホルム層を回収した結果，100mlの脂質サンプルが得られた。これを窒素充填し，－30℃の冷凍庫で保存した。

（３）　カラムクロマトグラフィーによる脂質の分画[18)]

フロリジル樹脂を洗浄した後，乾燥し活性化したカラムに，0.67mlの脂質サンプルをロードした後，カラムの10倍容のクロロホルムを流し，クロロホルム画分を得た。次に，カラムの20～40倍容

© The Ito Foundation

Table 1　Amount of each lipid in fractionated fractions

画分（回収された脂質の種類）	画分の回収量（g）
クロロホルム画分（主に中性脂肪）	0.102
アセトン画分（主に糖脂質）	0.007
メタノール画分（主にリン脂質）	0.027

のアセトンを流し，アセトン画分を得た。さらに，カラムの10倍容のメタノールを流し，メタノール画分を得た。各画分の溶媒を留去した後，重量を測定した。得られたクロロホルム画分，アセトン画分，メタノール画分には，それぞれ主に中性脂肪，糖脂質，リン脂質が回収されたと推定し，この操作を繰り返した（**Table 1**）。

（4）　薄層クロマトグラフィーによる脂質の同定

各脂質画分ならびに，標準試薬をシリカゲルプレートで展開し，脂質画分の種類の同定を試みた。

中性脂質の同定では，展開溶媒として，ヘキサン：ジエチルエーテル：酢酸＝90：10：1を用い，ヨウ素で中性脂質を検出した。また，糖脂質の同定では，展開溶媒として，クロロホルム：メタノール：水＝60：35：8を用い，アンスロン試薬噴霧後の加熱により糖脂質を検出した。

（5）　脂質に吸着した香気成分のモノトラップ（シリカモノリス捕集剤）による捕集

試験管に0.05 gの脂質を精秤した後，氷水中で，エタノールで4倍希釈した香気成分を20 μl添加した。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。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，蒸留水で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。

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℃で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1 mlと内部標準物質（原液の1000倍希釈）20 μl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。

（6）　GC/MSによる香気成分の比較ならびに同定

Mono Trapから得られた香気成分を，以下の条件で分析した。

GC/MSはGCMS-QP2010（島津製作所（株））で，カラムはTC-wax（長さ60 m×内径0.25mm i.d.，膜厚0.25 μm，使用温度上限260℃）（GL Sciences（株））を使用した。

GC/MSの昇温条件は，40℃（10min）→（5℃/min）→240℃（20min）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。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

1．ソーセージから抽出された脂質の香気成分保持効果

（1）　抽出された脂質による香気成分の保持効果

脂質を抽出したクロロホルム溶液に窒素を吹き付けてクロロホルムを留去し，50mgの脂質を計

© The Ito Foundation

量した。次に，メチルプロピルジスルフィド，ノナナール，グアヤコールがソーセージから抽出された脂質に結合するか否かを調べた。脂質に香気成分を添加し，90℃で4.5時間加熱した後，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。

Fig. 1 に示すように，メチルプロピルジスルフィドとノナナールはソーセージの脂質に保持されることが明らかとなった。一方，グアヤコールは，脂質無添加の場合にも保持されたことから，脂質ではなく，水溶液中に保持されていると推察された。香気成分の脂質への保持には，香気成分のlog Pが関わっており，log Pが3.56のノナナールが，脂質に最も強く結合していることが明らかとなった。また，log Pが1.8のメチルプロピルジスルフィドも，脂質に結合していることが判明した。しかし，log Pが1.32のグアヤコールは疎水性が低く，脂質に結合しなかったと推察された。これまでの研究では，香気成分の脂質への結合は，log Pが３より大きいものが多いことから，メチルプロピルジスルフィドの脂質との結合メカニズムは，log P以外の要因が関わっている可能性が示唆された。

（２）　抽出した脂質の分画と確認

ポークソーセージからFolch法で抽出した脂質をフロリジルカラムクロマトグラフィーにより，クロロホルム画分，アセトン画分，メタノール画分に分画した。これらの画分には，それぞれ主に中性脂肪，糖脂質，リン脂質が回収されたと推定し，シリカゲルによる薄層クロマトグラフィー（TLC）により確認した。

クロロホルム画分をTLCで展開した結果，**Fig. 2** の結果が得られた。クロロホルム画分①と②のスポットのRf値は0.34を示した。標準物質として展開したトリオレインのRf値も0.34を示し，クロロホルム画分の値とほぼ一致したことから，クロロホルム画分の脂質が，中性脂肪であることが示唆された。アセトン画分を展開しても何も検出されなかったことから，中性脂肪は存在しないと推察された。

次に，アセトン画分で溶出した脂質が，糖脂質であるか否かを確認した。図には示さないが，アセトン画分を展開した結果，Rf値が0.82を示した。また，クロロホルム画分を展開した結果，Rf値は0.96を示し，標準物質であるトリオレインのRf値と一致したことから，アセトン画分は中性脂肪で

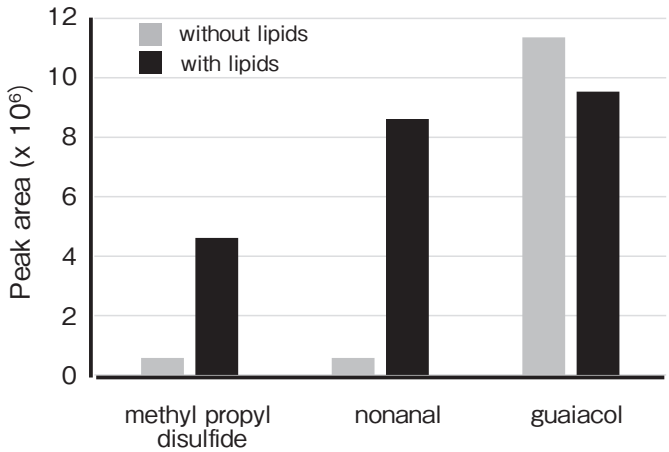


Fig. 1　Amounts of aroma compounds released from lipids in pork sausages after heating

© The Ito Foundation

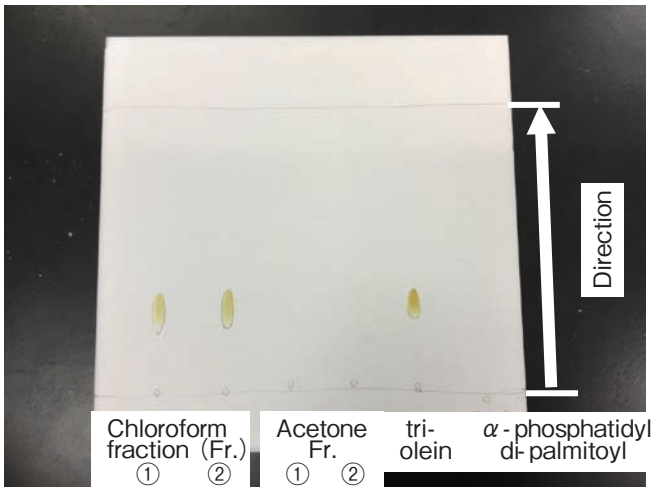


Fig. 2　Thin-layer chromatography of lipids fractionated by florisil column chromatography

はなく，糖脂質を含んでいると推定された。

今回，エタノール画分に関しては検討できなかったが，文献18からリン脂質と推定された。

（3）　分画した脂質画分による香気成分の保持効果

フロリジルカラムクロマトグラフィーにより分画されたクロロホルム画分，アセトン画分，メタノール画分を用いて，これらによる香気成分の保持効果を調べた。この保持効果は，脂質に香気成分を添加し，90℃で4.5時間加熱した後，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。

各画分の脂質50㎎に，ソーセージで検出された6種類の香気成分，D-リモネン（D-limonene），ノナナール（nonanal），カリオフィレン（caryophyllene），グアヤコール（guaiacol），*m*-クレゾール（*m*-cresol），ならびにオイゲノール（eugenol）を添加し，保持効果を調べた。6種類の香気成分は，それぞれ保持時間で約23分，30分，35分，41分，45.5分，47.5分で検出された（**Fig. 3**）。

各香気成分の脂質への結合性は，脂質の種類によって異なっていた。グアヤコール，*m*-クレゾール，オイゲノールは，いずれの脂質とも結合せず，水溶性の香気成分であると推定された。これらのlog Pは，それぞれ1.3，2，2で，3よりも小さかった。以前の研究で，脂質に結合するlog Pを3以上と考察したが，今回の結果も同様の結果となった。

一方，クロロホルム画分の中性脂肪には，カリオフィレンが強く結合することが明らかとなった。カリオフィレンは，クローブ，ラベンダー，レモン，グレープフルーツなどの精油に存在している香気成分であり，ウッディ香が特徴である。この成分はコレステロールに結合するとの結果が，すでに得られているが，中性脂肪に保持されるという結果はまだ得られていない。今回分画されたクロロホルム画分に，コレステロールが含まれていないかを検討する必要がある。また，メタノール画分には，リモネン，ノナナール，カリオフィレンが強く結合していることが明らかとなった。この画分にはリン脂質が含まれていると考えられる。リン脂質はこれまでの研究から，多種の香気成分が保持されることが明らかとなっているので，今回のメタノール画分にはリン脂質が含ま

© The Ito Foundation

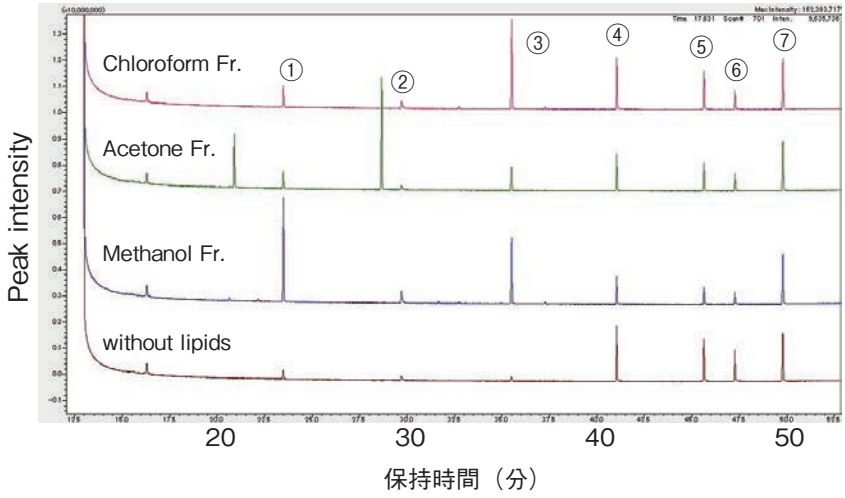


Fig. 3　Chromatogram of aroma compounds released from the mixture containing each lipid after heating
（①D-limonene，②nonanal，③caryophyllene，④guaiacol，⑤*m*-cresol，⑥eugenol，⑦Internal standard）

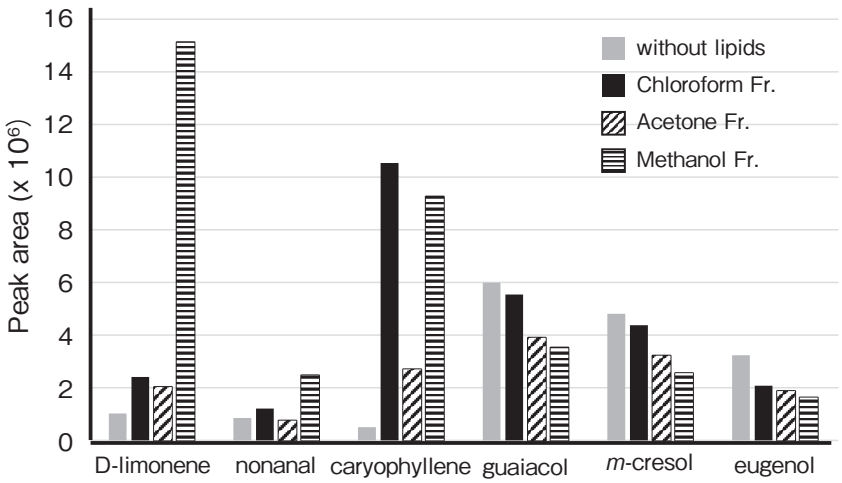


Fig. 4　Amounts of aroma compounds released from the mixture containing each lipid after heating

れていると示唆された。また，リモネン，ノナナール，カリオフィレンのlog Pは，それぞれ4.57，3.27，4.4で，いずれも３より大きかった。このことが，これらの香気成分が脂質に保持される１つの理由であると推察された（**Fig. 4**）。

２）タンパク質による香気成分の保持効果

脂質以外では，タンパク質に香気成分の保持効果が知られている。例えば，乳タンパク質や大豆タンパク質にも香気成分の保持効果があると言われている。しかし，食肉製品に存在するタンパク質の香気成分保持効果に関する研究はまったくない。

そこで，食肉の研究分野ではまったく未知の領域である「タンパク質による香気成分の保持効果」を調べた。

実験方法

（１）　試薬

ソーセージのケーシングとして使用される羊腸

© The Ito Foundation

は，伊藤ハム米久ホールディングス（株）からご提供いただいた。メチルプロピルジスルフィドは富士フイルム・和光純薬（株）から，ノナナールとグアヤコールは東京化成工業（株）から購入した。

（2） タンパク質による香気成分の保持特性

羊腸を細切した後，試験管に0.05 g を精秤した。これに氷水中で，エタノールで4倍希釈した香気成分を20 μl添加した。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℃で4.5時間加熱した。

（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

第1項の実験方法1－（5）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，第1項の実験方法1－（6）と同じ条件で分析した。

結果および考察

グアヤコールは，羊腸無添加のものと，添加したものの両方で香気成分が保持されたことから，羊腸にグアヤコールの保持効果は認められなかった。グアヤコールは，log Pが1.3であり，親水性の香気成分で，羊腸には結合しない可能性が示唆された。一方，メチルプロピルジスルフィドとノナナールは，log Pがそれぞれ1.8と3.27である。グアヤコールよりlog Pが高いことから，羊腸により保持されたと推察され，羊腸の構成タンパク質に香気成分が保持される可能性が示唆された。羊腸の主要な構成タンパク質はコラーゲンやエラスチンである。これらのタンパク質は疎水性タンパク質で，香気成分を保持する可能性が示唆された。今後はタンパク質を用いて，香気成分保持のメカニズムを解明することは，興味深い課題である（**Fig. 5**）。

また，メチルプロピルジスルフィドは，log Pが1.8であり，3より小さいにも関わらず，羊腸に結合したことから，脂質による保持効果とはメカニズムが異なる可能性が示唆された。

3．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明らかとなった。

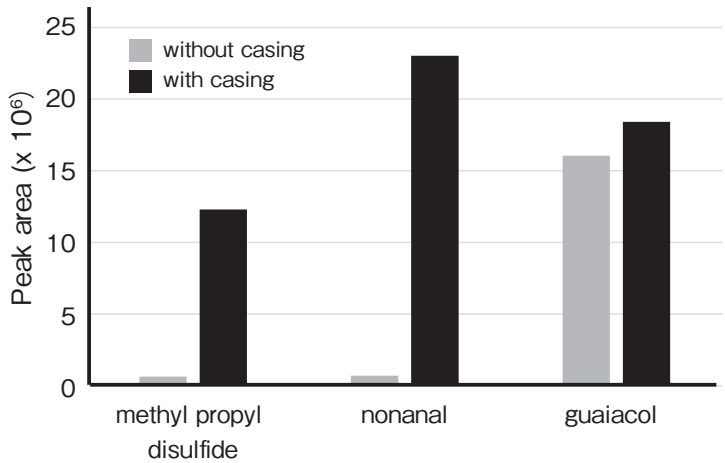


Fig. 5　Amounts of aroma compounds released from the mixture containing casing after heating

© The Ito Foundation

本研究では，ソーセージに含まれている脂質を抽出すると同時に，中性脂肪，糖脂質，リン脂質に分画し，どの脂質画分に香気成分が保持されるかを検討した。その結果，各香気成分の脂質への結合性は，脂質の種類によって異なっていた。グアヤコール，*m*-クレゾール，オイゲノールは，いずれの脂質とも結合しなかった。これらの香気成分のlog Pは，それぞれ1.3，２，２で３より小さかった。以前の研究で，脂質に結合するlog Pを３と考察したが，今回の結果も同様の結果となった。一方，クロロホルム画分の中性脂肪には，カリオフィレン（log P：4.4）が強く結合することが明らかとなった。カリオフィレンは以前の研究において，コレステロールに結合したという結果が得られているが，中性脂肪に保持されるという結果は初めてである。また，リン脂質が含まれるメタノール画分には，リモネン，ノナナール，カリオフィレンが強く結合することが明らかとなった。

羊腸には，メチルプロピルジスルフィドとノナナールが結合することが明らかとなった。これらの香気成分のlog Pはそれぞれ1.8と3.27であり，log Pが３よりも小さいメチルプロピルジスルフィドが羊腸に保持されることが判明した。羊腸の構成成分であるコラーゲン等のタンパク質への香気成分の結合メカニズムを解明することが，次の興味深い課題である。

文　献

1） Nishimura, T.：Definition of “*Koku*” Involved in Food Palatability（Koku in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.）, 1～16, Springer Nature, Singapore, 2019.

2） 西村敏英：食品のコクとその生成メカニズム（「食品のコクとは何か」, 西村敏英・黒田素央編著）, １～21，恒星社厚生閣，2021.

3） 西村敏英：食肉のおいしさとそれを引き出すコクとは！，JATAFFジャーナル，**3**(**12**)，29～35，2015.

4） 西村敏英：食品のおいしさを改善するコク増強物質のチョイ足し技術，月刊フードケミカル，**2017**-**9**，23～27，2017.

5） 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.

6） 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.

7） 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.

8） Nishimura, T., Egusa, S. A., Nagao, A., Odahara, T., Sugise, T., Mizoguchi, N., Nosho, Y.：Phytosterols in onion contribute to a sensation of lingering of aroma, a koku attribute, *Food Chemistry*, **192**, 724～728, 2016.

9） 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.

10） Nishimura, T., Saiga, A.：Umami Compounds and Fats Involved in *Koku* Attribute of Pork Sausages（Koku in Food Science and Physiology, Eds. Nishimura, T. & Kuroda, M.）, 47～58, Springer Nature, Singapore, 2019.

11） 西村敏英：食肉・食肉製品のコクとおいしさ（「食品のコクとは何か」, 西村敏英・黒田素央編著）, 161～172，恒星社厚生閣，2021.

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：ポークソーセージにおける脂質のコク増強効果とそのメカニズムの解明（Ⅱ），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） 西村敏英，山口千里：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），令和２年度　食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.39，25～33，2021.

18） 生物化学実験法９　脂質・酸化脂質分析法入門（宮澤陽夫・藤野泰郎編著），74～83，（株）学会出版センター，2000.

© The Ito Foundation

食肉加水分解物の栄養機能について

Nutritional function of meat hydrolysates

竹之山　愼一・川北　久美子・六車　三治男
（南九州大学健康栄養学部）

Shinichi Takenoyama, Kumiko Kawakita and Michio Muguruma
(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University)

The objective of this research was to produce the drinkable meat proteins and their powders and pellets. The hydrolysates of chicken breast meat were prepared by digestion with food grade enzyme. Degradation of proteins to the peptide level usually results in significant bitterness, astringency and unpleasant odors in the degradation products. The solution was made possible by selecting enzyme and combining the optimum conditions and purification method. A meat drink containing 8g of protein per 120 ml was produced. Based on SDS-PAGE and size exclusion chromatography, the hydrolysates of chicken breast meat digested with protamex contained peptides and amino acids with molecular weights of about 6,800 to 240. Then, dry powders and tablets were made from the hydrolysates. The antioxidant activity of the hydrolysates was determined by the DPPH radical scavenging assay. Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity of the hydrolysates was determined by rabbit lung enzyme. Hydrolysates of chicken breast meat showed the high DPPH inhibition activity and high ACE inhibitory activity. In addition, it was rich in essential amino acids and functional peptides such as BCAA and imidazole dipeptide. Based on their remarkable antioxidant activity and ACE inhibitory activity and rich in essential amino acids and functional peptides such as BCAA and imidazole dipeptide, we suggest that the hydrolysates of chicken breast meat may have potential applications as functional food.

Functional peptide beverages, powders and tablets derived from meat with excellent digestibility and absorbability have been developed. Meat protein with a high protein score is now easily available to the elderly, toddlers, undernourished people, people with masticatory and swallowing disorders and athletes anytime, anywhere.

1．目　　的

近年，高齢者はさまざまな理由で低栄養から筋肉量・筋力の低下（サルコペニア）や虚弱（フレイル）になる問題が認識されている[1)]。高齢者のサルコペニアやフレイルの予防に，運動とともに適切なタンパク質（アミノ酸）の摂取が重要であることは，筋量，筋力，運動機能などを指標とした数多くの研究から明らかとなっている[2~4)]。日本人の食事摂取基準（2020年版）では，サルコペニアおよびフレイルの発症予防を目的とした場合，高齢者（65歳以上）では少なくとも１g/kg

© The Ito Foundation

体重／日以上のタンパク質を摂取することが望ましいと記述されている[5)]。タンパク質を食品として摂取する場合，必須アミノ酸組成がヒトの必要とするアミノ酸バランスに近く，十分に消化されるものであれば栄養価の高いタンパク質と言える。食肉は良質なタンパク質を多く含んでおり，健康や長寿には不可欠な食品である[6)]。

われわれは2003年以来，食肉由来の血圧降下作用を有するペプチドを単離・精製し，その作用機作を明らかにしてきた。食肉の消化酵素分解ペプチドにACE阻害活性があり，動物実験において血圧降下作用，抗酸化作用やⅡ型糖尿病予防作用を示す結果を得ており[7~11)]，それらの研究を取りまとめ総説として報告している[12)]。さらに，調理加工した食肉・食肉製品を摂取した際にも，生の対照肉に比較してACE阻害活性や抗酸化活性を有する機能性ペプチドの産生の程度が増加することを明らかにした[13)]。また，高い血圧上昇抑制効果や抗酸化活性を有し筋肉で代謝される分岐鎖アミノ酸（BCAA）も豊富に含み，スポーツ栄養の分野にも貢献できる鰹節菌で発酵した新規和風生ハムを完成させた[14)]。

そのような良質なタンパク質を持つ食肉を「食べる食肉から飲む食肉」へと変換することにより，いつどこでも気軽に摂取でき，栄養価が高く生活習慣病予防効果も有する食品素材を開発することが本研究の目的である。具体的には，食肉を各種食品用の酵素により分解してミートドリンク，ミートパウダーやミートペレットを作製し，それらの生理活性や栄養機能性を解析することにより，高齢者の生活機能の維持と生活習慣病の予防，特に血圧上昇抑制効果，抗酸化効果を持つ食材の開発を試みた。さらに，アスリート向けのスポーツニュートリションとしての効果の検討も視野に入れて開発・研究を行った。

2．方　法

2.1　実験材料

和牛肩赤身肉，国産豚ロース肉，国産鶏むね肉を実験材料として使用した。なお，実験の目的に合う新鮮な実験材料は，宮崎市内の食肉専門店から購入した。

2.2　食肉の酵素処理

食肉タンパク質の高度加水分解のため，ノボザイム社の酵素製品のアルカラーゼ（エンド型プロテアーゼ），プロタメックス（エンド型プロテアーゼ），フレーバーザイム（エンド型プロテアーゼ，エキソ型ペプチダーゼ）の食品グレードのタンパク質分解酵素を使用した。各原料ミンチ肉に加水（３倍量の蒸留水添加）し，各種酵素をそれぞれ単品で適量添加して撹拌しながら50℃で90分間反応させた。100℃で２分間加熱して酵素を失活後，冷却した加水分解物をガーゼでろ過して得られたろ液を遠心分離（7,000rpm，15分）し，その上清画分を液状化加水分解物（ミートドリンク）とした。さらに，そのミートドリンクを噴霧乾燥してミートパウダーを調製し，そのミートパウダーからミートペレットを調製した。なお，食肉加水分解物の栄養機能解析のため，それらの試料を溶解し0.45 μmメンブレンフィルター（アドバンティック東洋（株））でろ過したろ液を実験に用いた。

2.3　ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）

得られた試料の分子種や酵素処理による分解程度を調べるため，ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動（SDS-PAGE）をLaemmliの方法[15)]で行った。アクリルアミド濃度7.5～17.5%のグラジエントゲルを用いてスラブ型の泳動槽で行った。ゲルバンドの染色はクーマシーブリリアントブルーR-250（Bio-RAD Laboratories）

© The Ito Foundation

により行い，脱色には10％酢酸を用いた。

2.4　ゲルろ過高速液体クロマトグラフィー（HPLC）

溶離液は0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液（pH7.0）300mM NaClを用いた。分析中は溶離液を脱気装置（DGU-14A，島津製作所（株））に通し，カラムはTSK-GEL G 2000SWXL（7.8×300mm）（東ソー（株）），送液ポンプはLC-20AD（島津製作所（株））を用い，流速2.0ml/min，注入量20 μlで行った。検出器（SPD-10AVP，島津製作所（株））を用い，280nmの検出波長でペプチドの検出を行った。分子量マーカーは，BSA（MW：67,000），シトクロームC（MW：13,000），アプロチニン（MW：6,500），リボフラビン（MW：376）を用いた。

2.5　タンパク質の定量

タンパク質の定量はBiuret法[16]により行った。すなわち，タンパク質溶液に対し，4倍量のBiuret試薬を加えて常温で30分間反応させた。反応液を島津製作所（株）UV-VIS Spectrophotometer 1240型分光光度計（吸光度：540nm）にて測定した。また，分解物であるペプチドについてはUV法[17]を適用し，測定を行った。

2.6　DPPHラジカル消去活性の測定

DPPHラジカル消去活性の測定は，DPPH分光測定法に準じて行った[18]。すなわち，400 μM DPPH，MES（2-morpholino-etanesulphonic acid）buffer，20％エタノールを同量ずつ加え，混液を作製した。混液を0.9ml分注し，80％エタノールを240 μlとサンプルを60 μl加え，20分間反応させた。その後，サンプルを加えた順に前述の分光光度計にて吸光度520nmで測定した。また，サンプルの代わりに，0.2mM Trolox（シグマ社）をサンプルとした測定値を基準として測定し，検量線からサンプルのTrolox相当量を算出した。MES BufferはMESを蒸留水に溶解し，NaOHでpH 6に調整したものを使用した。

2.7　アンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE）阻害活性の測定

CushmanとCheungの方法[19]に準じて測定した。ACEはウサギ肺由来アンギオテンシンⅠ変換酵素（ACE, Peptidyl dipeptidase, EC 3.4.15.1, シグマ社）を用い，0.25Mホウ酸緩衝液で60unit/mlに調整し，測定時には0.25Mホウ酸緩衝液で1 unit/mlに希釈し使用した。ACEとの反応基質としては合成基質であるヒプリル-Lヒスチジル-Lロイシン（HHL，ナカライテスク社）を使用した。このHHLを塩化ナトリウム（和光純薬工業），0.25Mホウ酸緩衝液をそれぞれ0.608M，0.1Mになるようにに Milli-Q水を用いて調整した溶液で溶解した。

試料6 μlに1 unit/mlのACE溶液20 μlおよび7.6mM HHL溶液50 μlを添加し37℃で30分間反応させた。反応は0.1N HCl（和光純薬工業）554 μlを加えて停止させた。反応後には酢酸エチル（ナカライテスク）1.5mlを加えてACEの作用により遊離した馬尿酸を振とう抽出し，2,500rpm，15分間遠心分離を行った。上清の酢酸エチル層を1ml分取し，100℃，10分間の加熱により蒸発乾固させた。乾固した馬尿酸を回収するために1MのNaCl溶液を1ml加えボルテックスを行った。溶解した馬尿酸の吸光度を228nmで測定した。

阻害率は試料の吸光度をS，試料の代わりにMilli-Q水を加えた時の吸光度をC，あらかじめACEを失活させてから反応させた時の吸光度をBとして次式より求めた。

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

2.8　遊離アミノ酸含量の測定

遊離アミノ酸含量の測定については，分析試料の重量に対し3倍量のスルフォサリチル酸を加えホモジナイズ後，冷蔵庫で1時間静置してタンパク質を変性・沈殿させた。その後，3,500xg，4℃

© The Ito Foundation

で15分間遠心分離を行った。上清を0.45μmメンブレンフィルターでろ過し，これをアミノ酸自動分析機（SHIMAZU LC-MS UF-Amino Station：島津製作所（株））にて分析した。

2.9　統計解析

試験結果の解析は，一元配置分散分析による多重比較を行い，５％未満の水準でサンプルの効果が有意であった場合（$p < 0.05$），Tukey法による多重比較検定を行った。それぞれの値は平均値±標準偏差で表した。

３．結果と考察

3.1　ミートドリンク，ミートパウダーおよびミートペレットの開発

日本人の体重分布からすると，その平均は男性70kg，女性55kgである。１g/kg体重/日以上のタンパク質の摂取が筋肉量の低下を予防することを考慮すると[20]，平均で62.5ｇのタンパク質摂取が必要となる。男性を対象とした場合には１日のタンパク質の摂取量が約70ｇとなり，１食分の液状ドリンク（120ml）から，10分の１の量に当たる７ｇのタンパク質が摂取できるドリンクを作製する目標を立てた。

まず，実験材料の牛肉，豚肉，鶏肉を「食べる食肉から飲む食肉」への変換を目的に，アルカラーゼ，プロタメックス，フレーバーザイムにより各酵素の至適条件で加水分解した結果，鶏むね肉のプロタメックス処理により，目的のタンパク質含量に近い液状化ドリンクが得られることが明らかになった。一般に，タンパク質をペプチドレベルまで分解すると，分解生成物には著しい苦味，渋み，不快臭が必ず発生する。その解決のため，活性炭処理と苦み改善剤のベネコート（花王（株））を添加することによりそれらは低減された。その結果，鶏むね肉の酵素処理により120ml中約８ｇの液状化タンパク質を含み，臭いやペプチド由来の苦みも少ないチキンミートドリンクが開発された。さらに，レトルト処理により長期間室温で保存可能な製品の作製が可能となった。なお，牛肉や豚肉を原料とした場合には，味の改善を検討する必要があるが，目標とするタンパク質量に近い製品の製造も可能であった。使用する酵素の併用により加水分解物が増加するとの報告もあり[21]，今後検討が必要である。

本報告では，鶏むね肉のプロタメックス処理により作製された液状のチキンミートドリンク，粉末化したチキンミートパウダーや錠剤化したチキンミートペレットの栄養機能について，得られた結果を記載する。なお，チキンミートドリンクの粉末化と錠剤化は，マルナカフードにより行われた。

3.2　SDS-PAGEおよびゲルろ過HPLCによる分子量分布の分析

鶏むね肉からプロタメックス処理により生じる機能性ペプチドを含む分解物の産生過程を検討した。まず，SDS-PAGEにより酵素処理に伴うタンパク質やペプチド成分の分子量分布を推定し，さらに，ゲルろ過HPLCを用いた分析から，加水分解物の溶解状態における分子量分布も推定した（**Fig. 1**）。

SDS-PAGEによる解析で（**Fig. 1A**），鶏むね肉からプロタメックス処理（30分間）により，大部分のミオシン重鎖（MW：230,000），Z-線の構成成分のα-アクチニン（MW：100,000）やアクチン分子（MW：42,000）などの高分子量のタンパク質が，低分子量のペプチド（MW：7,000以下）に分解されることが認められた。さらに90分間の酵素処理により，筋原線維を構成する未分解の筋肉構造タンパク質や調節タンパク質のほとんどが，低分子量ペプチド（MW：7,000以下）に分解されることが確認された。なお，加水分解物の活性炭処理によっても，MW：7,000以上の分子量を持つゲルバンドの消失が認められ，そのこ

© The Ito Foundation

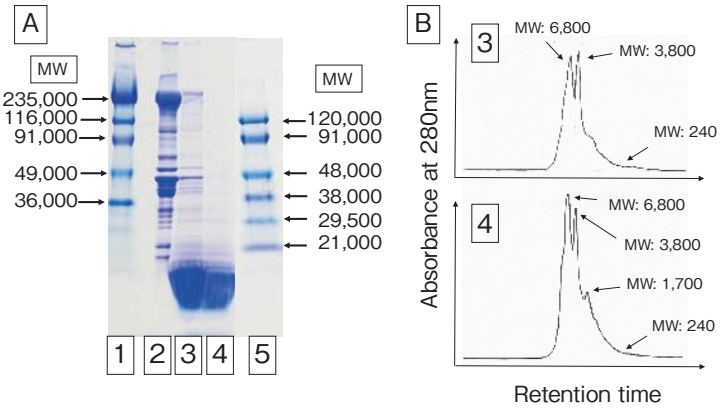


Fig. 1　SDS-PAGE and HPLC profiles of chicken breast meat hydrolysates prepared by digestion with protamex. A：SDS-page profiles. B：HPLC chromatogram of hydrolysate eluted through TSXgel G2000SWxl column.1&5：molecular weight marker; 2：raw chicken meat; 3：hydrolysate digested for 30min.：4; hydrolysate digested for 90min.

とが不快臭低減の要因の一つと考えられた。

次に，鶏肉加水分解物の溶解状態での分子量分布を測定するため，0.45 μmのポアサイズのセルロースアセテートメンブレンフィルターを通過した試料を用いてHPLC分析を行った（**Fig. 1B**）。その結果，30分間のプロタメックス処理により，MW：6,800とMW：3,800のピークや，それより低分子のMW：240に至る範囲にブロードなピークを持つペプチドに分解された。90分間の酵素処理により，さらに低分子量化が進行し，MW：1,700に小さなピークの出現が認められた。これらの結果から，各ピークは約60残基から２残基のアミノ酸残基から構成される多数のペプチドとして存在することが推定された。このように，高度加水分解により液状化した鶏肉タンパク質のほとんどが，ペプチドや遊離のアミノ酸として存在することが認められた。鶏肉タンパク質は，酵素によってマイルドな条件下で加水分解されたので，栄養的な価値を有する各種機能性ペプチドの発現が期待された。

3.3　抗酸化活性の評価

鶏むね肉をプロタメックスで加水分解して得られた加水分解物の抗酸化活性（DPPHラジカル消去活性）を**Fig. 2** に示した。液状の鶏むね肉加水分解物（CM Hydrolysate）は対照区（Chicken Meat）と比較して約3.7倍の高い抗酸化活性を示した。また，その噴霧乾燥物（CM Hydrolyzed Powder）と錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）も，それぞれ対照区と比較して約4.2倍と3.35倍の高い抗酸化活性を保持していた。既知の抗酸化成分のカルノシンと比較しても，液状の加水分解物，噴霧乾燥物および錠剤の抗酸化活性値は，約1.9倍，2.2倍，および1.8倍を示した。

われわれは，各種食肉の消化酵素分解物の抗酸化作用の比較検討を行い，牛肉，豚肉，鶏肉の消化酵素分解物に，既知の抗酸化成分のカルノシンと同等以上の抗酸化活性が産生されることを報告した[22]。対照区の鶏むね肉の値は，畜種別差異を比較検討したその時の数値とほぼ同等の値を示した。近年，食品の機能性成分の中で抗酸化成分は，生活習慣病，ガンおよび老化などの予防に有効であることが明らかになってきた。末綱は，魚肉の酵素分解物に含まれる11種類の抗酸化ペプチドを同定している[23]。鶏むね肉加水分解物にも，内因性抗酸化物質としての機能を有する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のほかに，新規抗酸化ペプチドが存在して高い抗酸化活性を発現していることが示唆された。

© The Ito Foundation

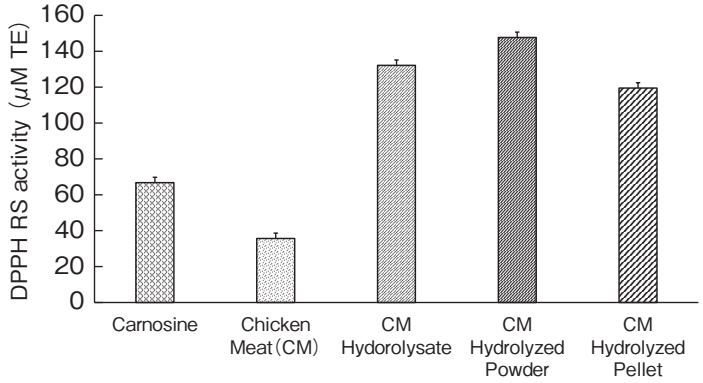


Fig. 2　DPPH radical scavenging (RS) activity of hydrolysates of chicken breast meat digested with protamex. Associated graph shows the values of trolox equivalent (TE). All samples were assayed at a protein concentration of 10mg/ml. Error bars indicate standard deviation (n＝4).

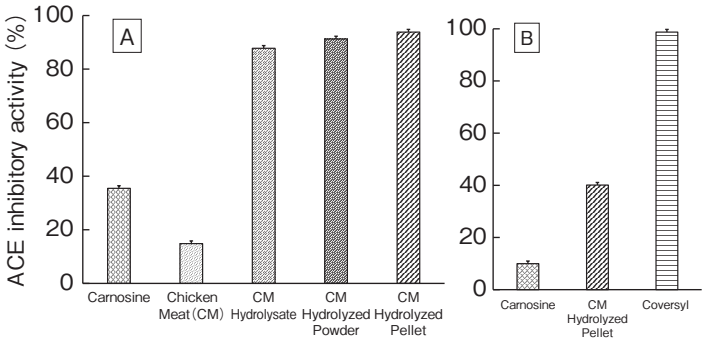


Fig. 3　ACE inhibitory activity of hydrolysates of chicken breast meat digested with protamex. Associated graph shows the values of ACE inhibition percentage. A：All samples were assayed at a protein concentration of 10mg/ml. B：All samples were assayed at a protein concentration of 1mg/ml. Error bars indicate standard deviation (n＝3). Coversyl (Perindopril Erbumine)：hypertension treatment agent (Persistent tissue ACE inhibitor).

3.4　ACE阻害活性の評価

Fig. 3Aに，プロタメックスで鶏むね肉を加水分解することにより得られた加水分解物（CM Hydrolysate），噴霧乾燥物（CM Hydrolyzed Powder）および錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）のACE阻害活性を示した。10mg/ml濃度の試料を用いた結果から，鶏むね肉を加水分解することにより対照区（Chicken Meat）と比較して，いずれの加水分解物標品も６倍以上で，90％以上の阻害率の非常に高いACE阻害活性を示すことが明らかになった。また，既知のACE阻害物質のカルノシン（Carnosine）と比較しても，鶏むね肉加水分解物標品は約2.5倍以上のACE阻害活性を示した。

食品中のACE阻害物質については，今までに多くの研究が行われており，主としてタンパク質派生ペプチドの検索が行われ，多くのACE阻害ペプチドが単離・同定されてきた。われわれは，食肉や畜産副生物中に含まれるACE阻害ペプチドを単離・同定して報告してきた[2～12, 24, 25]。また，牛肉，豚肉，および鶏肉を用いて，それらを加熱後，消化酵素のペプシンおよびトリプシンで処理すると，鶏肉，豚肉，牛肉の順にACE阻害活性が増加することを認め，さらに各種食肉由来ペプ

© The Ito Foundation

チドのIC_{50}（mg/ml）を算出したところ，鶏肉（3.55），豚肉（4.19），牛肉（9.02）であることを報告した[26]。これらのことから，鶏むね肉加水分解物は高いACE阻害活性を発現する多くのペプチドを含んでいる可能性が示唆された。

コバシル（Perindopril Erbumine）は，おもに高血圧症の治療に用いられている高血圧治療剤（持続性組織ACE阻害剤）である。そこで，低濃度（1 mg/ml）の条件下で，鶏むね肉加水分解物錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）とカルノシンやコバシルとのACE阻害活性の比較を行った（**Fig. 3B**）。その結果，加水分解物錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）の力価はカルノシンの約4倍，コバシルの約半分の力価に相当することが明らかになった。臨床的に用いられているACE阻害薬は非常に高いACE阻害活性を有しているが，空咳や喉の違和感などの副作用が報告されている[27]。しかし，ACE阻害ペプチドを含む食肉由来の鶏むね肉加水分解物錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）は，副作用の心配もなく高血圧予防作用を発揮すると考えられる。

3.5　鶏むね肉加水分解物錠剤（CM Hydrolyzed Pellet）の遊離アミノ酸分析

鶏むね肉加水分解物錠剤の栄養成分は，10粒（2.8 g）当たり，タンパク質2.0 g，脂質0.1 g，炭水化物0.2 g，食塩相当量0.1 gを含んでいる。そこで，この錠剤を粉砕して得られた粉末から抽出した遊離アミノ酸組成を**Fig. 4A**に示した。濃い棒グラフは9種類の必須アミノ酸を示している。その結果。Glu，Ala，Leu，Asp，Argなどのアミノ酸が多く含有されていた。さらに，Val，Leu，Ileの分岐鎖アミノ酸（BCAA）を含む9種類の必須アミノ酸が多く含まれていた。

食肉中にはイミダゾールジペプチドが非常に高濃度に存在し，牛・豚は主にカルノシンを，鶏はカルノシンとアンセリン両方を含んでいる。最も高濃度にイミダゾールジペプチドを含有している鶏むね肉加水分解物中の遊離イミダゾールジペプチド組成を**Fig. 4B**に示した。その結果，加水分解物には，カルノシン35mgとアンセリン102mgがいずれも高濃度含まれていた。カルノシンとアンセリンの割合は約1：3であった。加水分解物錠剤10粒当たり，約2,000mgのペプチドやアミノ酸が含有されている。その中身は，遊離アミノ酸や遊離イミダゾールジペプチドとして存在する成分が約7 mgで，残りの1,993mgが固体状のほぼ同様の組成のペプチドやアミノ酸として存在すると想定された。

一般にタンパク質は，摂取すると消化管の中で

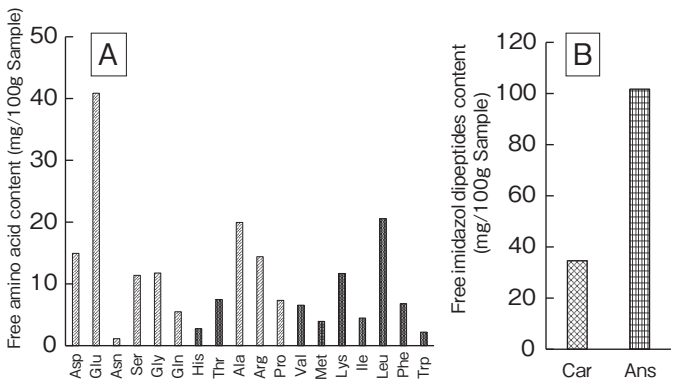


Fig. 4　Contents of free amino acids and imidazole dipeptides in a tablet of chicken breast meat hydrolysates digested with protamex. A：Free amino acids. Dark bars in the figure indicate essential amino acids. B：Free imidazole dipeptides (Carnosine and Anserine).

© The Ito Foundation

３～４時間かけてアミノ酸やペプチドの状態に分解されて初めて吸収される。ペプチドやアミノ酸は，タンパク質に比較して消化過程が不要なことから短時間で体内に吸収される[28]。さらに，委縮した筋肉の回復において，ホエイペプチドはホエイタンパク質と比較し，より優れた効果を示すことが認められている[29]。また，筋肉で代謝されるBCAAは，医薬品や食品として肝硬変を対象とした栄養剤だけでなく，サプリメントやスポーツドリンクなど，特に運動や骨格筋の維持・増強を目的として広く使用されるようになってきている。鶏肉抽出物の摂取は，中高年の筋力の向上に効果があることも報告されている[30]。また，ロイシン高含有アミノ酸混合物が，運動後の筋合成促進作用および筋肉痛軽減作用を有するとの報告がある[31]。最近，卵白ペプチドは，吸収性の速さや吸収後の優れたアミノ酸バランスによって，体タンパク質の合成速度も速く，抗酸化力や抗疲労効果が高いことも報告されている[32]。一方，鶏むね肉加水分解物に豊富に含まれているイミダゾールジペプチドは，抗酸化作用，緩衝作用，抗疲労作用のほか記憶機能改善効果[33]や高齢者において摂取量が減少するイミダゾールジペプチド顆粒状の食品を介して補うことにより，加齢により低下する記憶機能を改善できることも報告されている[34]。このほか，肝臓水解物由来ペプチド[35]や食事として摂取した食品ペプチドによる血糖の制御の可能性も示唆されている[36]。

本研究で作製された鶏むね肉加水分解物は，その吸収性における利点に加えて，抗酸化作用や血圧降下作用などの効果を有する機能性ペプチドが豊富に含まれていることが栄養的利点である。今後は，ヒトに対する抗疲労効果や筋肉増強効果，血糖調節効果などについて研究していく必要がある。さらに，牛肉や豚肉についても，酵素の種類や併用とその分解条件，加水分解物の苦味，渋み，不快臭の低減などが今後の検討課題である。

以上の結果から，本食肉加水分解物はペプチドで，タンパク質含量が調整され，消化と吸収性に優れており，さらに機能性を有している。食肉由来の機能性タンパク質飲料，パウダーやペレットが開発された。これにより，プロテインスコアの高い動物性タンパク質（食肉）を，高齢者，幼児，低栄養者，咀嚼・嚥下障害者そしてアスリートがいつどこでも手軽に利用できるようになる。

４．要　　約

タンパク質を食品として摂取する場合，必須アミノ酸組成がヒトの必要とするアミノ酸バランスに近く，十分に消化されるものであれば栄養価の高いタンパク質と言える。具体的には，食肉があげられる。そこで，食肉を酵素により分解して「食べる食肉から飲む食肉」へと変換し，タンパク質飲料と，その粉末や錠剤を作製することが本研究の目的である。

原料として，鶏むね肉を使用した。諸条件下で食品用の酵素で分解し，精製を行った。それをレトルト殺菌しミートドリンクを調製した。また，その粉末や錠剤も調製した。さらに，それらの抗酸化活性とACE阻害活性，遊離アミノ酸および遊離イミダゾールジペプチド含量を測定した。

鶏むね肉のプロタメックス処理により，高分子量のタンパク質が，分解後は約6,800から240までの分子量のペプチドやアミノ酸にまで低分子化された。通常，タンパク質をペプチドレベルまで分解すると，分解生成物には，著しい苦味，渋み，不快臭が必ず発生する。その解決は，分解酵素の選定，至適条件と精製方法を組み合わせることにより可能になった。タンパク質含量は約７％であった。100ｇの原料肉から，120ml入りの飲料を作製し，約８ｇのタンパク質を含有できる製品設計が可能になった。さらに，タンパク質分解物

© The Ito Foundation

は，抗酸化活性とACE阻害活性が数倍に上昇していた。また。必須アミノ酸やBCAA，イミダゾールジペプチドなどの機能性ペプチドが豊富に含まれていた。

本製品はペプチドでタンパク質含量が調整され，消化と吸収性に優れており，さらに機能性を有している。食肉由来の機能性タンパク質飲料，粉末や錠剤が開発された。これによりプロテインスコアの高い食肉タンパク質を，高齢者，幼児，低栄養者，咀嚼・嚥下障害者そしてアスリートが，いつどこでも手軽に利用できるようになった。

文　献

1） 葛谷雅文：日本内科学会雑誌，**104**，2602～2607，2015.
2） Cruz-jentroft, A. J., Sayer, A.A.：*Lancet*, **293**, 2636～2646, 2019.
3） Hoogendijk, E. O., Afilalo, J., Ensrud, K. E., Kowal, P., Onder, G., Fried, L.P.：*Lancet*, **394**, 1365～1375, 2019.
4） 藤田倶子・菱田知代・丸山加寿子：日本看護科学会誌，**40**，422～429，2020.
5） 厚生労働省：「日本人の食事摂取基準（2020年版）」策定検討会報告書，2019.
6） 六車三治男：食肉の保健的機能性，健康あれこれ栄養ふむふむ，南九州大学健康栄養学部開設10周年記念コラム集（南九州大学健康栄養学部編著），pp.62～65，鉱脈社，宮崎，2015.
7） Katayama, K., Tomatsu, M., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Kawamura, Y., Muguruma, M.：*Animal Science Journal*, **74**, 53～58, 2003.
8） Katayama, K., Tomatsu, M., Kawahara, S., Yamauchi, K., Fuchu, H., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Muguruma, M.：*Journal Agriculture and Food Chemistry*, **52**, 771～775, 2004.
9） Katayama, K., Jamhari, Mori T., Kawahara, S., Miyake, K., Kodama, Y., Sugiyama, M., Kawamura, Y., Nakayama, M., Maruyama, M., Muguruma, M.：*Journal of Food Science*, **72**, 702～706, 2007.
10） Katayama, K., Anggraeni, H. E., Mori, T., Ahhmed, A. M., Kawahara, S., Sugiyama, M., Nakashima, T., Maruyama, M., Muguruma, M.：*Journal of Agriculture and Food Chemistry*, **56**, 355～360, 2008.
11） Muguruma, M., Ahhmed, A. M., Katayama, K., Kawahara, S., Maruyama, M., Nakamura, T.：*Food Chemistry*, **114**, 516～522, 2009.
12） 六車三治男：日本暖地畜産学会報，**55**，85～91，2012.
13） 六車三治男・川北久美子・竹之山愼一：南九州大学研究報告，**51**，9～15，2021.
14） 六車三治男・川越聖人・木本早紀・川北久美子・竹之山愼一・中村豊郎：日本暖地畜産学会報，**65**，2022.「掲載受理」
15） Laemmli, U. K.：*Nature*, **227**, 680～685, 1970.
16） Gornal, A. G., Baradawill, C. J., David, M. M.：*Journal of Biological Chemistry*, **177**, 751～766, 1949.
17） Murphy, J. B., Kies, M. W.：*Biochimica et Biophysica Acta*, **45**, 382～384, 1960.
18） 須田邦夫，抗酸化機能　①分光学的抗酸化機能評価，篠原和毅・鈴木建夫・上野川修一編著：食品機能研究法，pp.218～220，光琳，東京，2000.
19） Cushman, D. W., Cheung, H. S.：*Biochemical Pharmacology*, **20**, 1637～1648, 1971.
20） 葛谷雅文：化学と生物，**52**，328～330，2014.
21） Lindberg, D., Kristoffersen, K. A., Wubshet, S. G., Hunnes, L. M. G., Dalsnes, M., Dankel, K. R., Host, V., Afseth, N. K.：*Molecules*, **26**, 5280, 1～19, 2021.
22） 竹田志郎・久保田大樹・竹之山愼一・河原聡・六車三治男：日本暖地畜産学会報，**58**，103～108，2015.
23） 末綱邦男：日本水産学会誌，**65**，92～96，1999.
24） Nakade, K., Kamishima, R., Inoue, Y., Ahhmed, A., Kawahara, S., Nakayama, T., Maruyama, M., Numata, M., Ohta, K., Aoki, T., Muguruma, M.：*Animal Science Journal*, **79**, 710～715, 2008.
25） Ahhmed, A. M., Muguruma, M.：*Meat Science*, **86**, 110～118, 2010.
26） 久保田大樹・アブドラティフ　アーメド・河原聡・六車三治男：宮崎大学農学部研究報告，**58**，43～50，2012.
27） 清水幸子・小西廣己・佐々木恭子・千葉幹夫・蓑内徳蔵・山路昭：医療薬学，**27**，605～609，2001.
28） 吉原大二・中村強・柳井稔・竹下保義：日本栄養・食糧学会誌，**50**，411～416，1997.
29） 小林敏也：*Milk Science*，**61**，277～280，2012.
30） 佐藤三佳子・松前公彦・高畑能久・森松文毅・佐藤雄二：日本食品科学工学会誌，**59**，182～185，2012.
31） Kato, H., Miura, K., Nakano, S., Suzuki, K., Bannai, M., Inoue, Y.：*Amino Acids*, **48**, 2145～2155, 2012.
32） 杉山喜一・栗城大輔・松岡亮輔・増田泰伸・久能昌朗・大後栄治：日本食品科学工学会誌，**67**，245～256，2020.
33） 片倉善範：化学と生物，**57**，596～600，2019.
34） 久恒辰博：化学と生物，**54**，892～900，2016.
35） 井上尚典・日髙修二・三浦直良・山田耕太郎・深堀勝博・丸山眞杉・河原聡・太田一良・六車三治男：*YAKUGAKU ZASSHI*，**133**，117～123，2013.
36） 比良徹：化学と生物，**55**，296～298，2017.

© The Ito Foundation

プレバイオティクスによる食肉の効果的な栄養利用の研究

Studies on effective nutritional utilization of meat with prebiotics

大島　健司・高原　彩那・北浦　靖之
（名古屋大学大学院生命農学研究科）

Kenzi Oshima, Ayana Takahara and Yasuyuki Kitaura
（Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University）

Meat is a useful source of proteins, essential minerals, and vitamins, and is also recommended in dietary treatments for the improvement of sarcopenia. Thus meat is one of the most important food sources from young children to the elderly. On the other hand, excessive protein intake alters the intestinal microbiota, and their metabolites can have potentially harmful effects on the host. Oligosaccharides have been shown to be highly effective in promoting the growth of certain bacteria and improving the intestinal environment. In this study, fructooligosaccharides (FOS) were fed to mice with diets containing meat to examine their effects on changes in the intestinal environment and host health due to meat consumption. When mice were fed the meat diet with FOS for 2 weeks, FOS intake significantly increased body weight gain, even though the caloric intake was similar to that of the control group. Since there was no significant difference in triceps surae muscle weight among all groups, the increase in body weight gain was attributed to an increase in non-muscle tissue weight. The results of the cecum microbiota analysis formed by the high meat diet and FOS suggested that meat intake increased the diversity of the cecal microbiota and that FOS intake suppressed the changes in the microbiota caused by the meat diet. Meat diet intake increased several bacteria belonging to the order *Oscillospirales* and decreased genus *Akkermansia*. Fructooligosaccharide suppressed these changes in bacterial abundance, suggesting that the simultaneous intake of meat and FOS improves the intestinal microbiota. In the future, it is necessary to verify the nutritional effects of meat and FOS intake on the intestinal microbiota in more detail by analyzing bacterial metabolites such as amino acid metabolites, host blood constituents and tissue lipid levels, and gene expression in the liver and intestine.

1．目　　的

食肉は栄養成分の供給に有用であり，幼児から高齢者まで主要な食材の一つとして利用できる。さらに近年，食肉を中心とした高タンパク質食が，アスリートの筋力増強だけでなく，肥満に対する食事療法やサルコペニアの改善などにも推奨されるようになっている[1,2]。また，食肉は高タンパク質源のみでなく，必須微量ミネラルやビタミンなどの貴重な供給源でもあり，カルノシンなど血中コレステロール低下作用や抗酸化作用を持つ生理活性ペプチドが産生されることも報告され

© The Ito Foundation

ている。そのため食肉の摂取は安定した栄養摂取，高齢化社会における健康維持や疾病予防・治療に役立てられている[3]。その一方，過剰なタンパク質摂取により腸内でタンパク質・アミノ酸発酵が活発に行われるようになり，生成するフェノール化合物，インドール化合物などは宿主に対して潜在的に有害な作用を示す可能性がある[4]。また，タンパク質と脂肪に富んだ食生活では，大腸ガン患者に多く見られる*Bacteroides*型の腸内細菌叢が形成されることが報告されている[5]。しかしながら腸内細菌叢と健康への相関は複雑であるため，より詳細な解析が求められている。

オリゴ糖はプレバイオティクスとして知られ，特定の細菌に対する増殖促進効果が高く，腸内環境を整えることが示されている。我々は，ラットにフラクトオリゴ糖を摂取させると，盲腸内のビフィズス菌や酪酸産生菌，これらが産生する乳酸や酪酸が増加することを見出している[6]。そこで，食肉成分を主要とする飼料とともにオリゴ糖をマウスに与え，食肉食による腸内環境（細菌種，代謝物）および宿主（血中成分）の変化に対するオリゴ糖の影響を検討し，高食肉食による腸内環境変化および宿主への作用に対するオリゴ糖の影響を調べ，より健康的な食肉を加工するための基礎的データを構築する。

2．方　法

2.1　飼料

飼料に添加する食肉成分として，鶏肉パウダー100（日本化工食品）を使用した。今回使用した鶏肉パウダーは，鶏むね肉，鶏もも肉，鶏ささみの混合物を蒸した後にミンチ造粒し，乾燥冷却後に破砕したもので，タンパク質72.5％，脂質27.1％，炭水化物0.0％，灰分2.0％を含む。鶏肉パウダーを含む飼料（食肉飼料）とコントロール飼料は，日本クレアから購入した。それぞれの飼料の組成を**Table 1** に示す。フラクトオリゴ糖として，1-ケストース，ニストース，1^{F}-β-フラクトフラノシルニストースの混合物を95.9％含むメイオリゴP（明治フードマテリア）を使用した。

2.2　実験動物

6週齢のC57BL/6N系統雄マウス（日本SLC株式会社）20匹をコンベンショナルな環境で固形飼料（CE-2，日本クレア）と水道水を自由摂取させることによって1週間順化飼育した後，5匹ずつ4群に分け2週間食肉成分を含む飼料（食肉飼料）またはコントロール飼料を自由摂取させるとともに，水道水または4％メイオリゴPを含む水道水を自由摂取させた。飼育期間中定期的に体重，摂餌量，摂水量の測定を行った。2週間後，マウスをセボフルラン（Wako）で安楽死させ，下腿三頭筋を摘出し重量を測定した。また盲腸の内容物を回収し，−80℃で保存した。

2.3　盲腸内に生息する腸内細菌叢解析

盲腸内容物から抽出したゲノムDNAから16S rRNAのV3/V4領域を増幅し，MiSeqシステム（Illumina）によりシーケンス解析を行った。アンプリコンシーケンス解析は，株式会社生物技研が実施した。得られたリード配列からQIIME 2によりキメラ配列とノイズ配列を除去し，代表配列を得た。代表配列とSilva 138の99％OTU rRNA全長配列を比較し，系統推定を行った。群間のリード数の差を希薄化により補正し，Shannon指数を用いてα多様性を解析した。菌叢の構造類似度の比較であるβ多様性は，Weighted UniFrac距離に基づき解析し，検定にはPERMANOVA解析を用いた。Weighted UniFrac距離の主座標分析結果は，QIIME2 veiwのEMPerorにより可視化した。また，得られた配列からLinear discriminant analysis effect size（LEfSe）を用いて，群間比較解析を行った[7]。

© The Ito Foundation

Table 1　Ingredients of experimental diets

(g/ 100 g diet)	Control diet (AIN-93G)			Meat diet		
Cornstarch	39.75					
a-cornstarch	13.20			14.68		
Casein	20.00					
Chicken powder				64.77		
Sucrose	10.00			8.08		
Soybean oil	7.00					
Lard				3.32		
Cellulose	5.00			3.54		
Mineral mix	3.50			3.50		
Vitamin mix	1.00			1.17		
L-Cystine	0.30			0.70		
Choline bitartrate	0.25			0.23		
Tert-butylhydroquinone	0.0014					
Total	100			100		
	g %	kcal/g	kcal %	g %	kcal/g	kcal %
Protein	17.29	0.69	18.8	46.97	1.88	40.2
Fat	7.67	0.69	18.76	20.98	1.89	40.4
Carbohydrate	57.45	2.30	62.44	22.66	0.91	19.4
Total		3.68	100		4.67	100

３．結果と考察

3.1　食肉成分とフラクトオリゴ糖摂取による体重増加への影響

高食肉食を模倣するため，摂取エネルギーの40%がタンパク質，もう40%が脂質由来となる飼料を使用した。各条件で飼育したマウスの摂餌量を比較すると，コントロール飼料摂取群と食肉飼料摂取群の間で有意な差が見られたが（**Fig. 1A**），摂取カロリーは水道水摂取条件ではコントロール飼料と食肉飼料で差がなかった（**Fig. 1B**）。フラクトオリゴ糖の摂取は飼料の摂餌量に影響しなかった（**Fig. 1A**）。今回フラクトオリゴ糖摂取条件ではコントロール飼料摂取群と食肉飼料摂取群の間で摂取カロリーに有意差が見られた（**Fig. 1B**）。飲水量は食肉飼料群で有意に上昇し，フラクトオリゴ糖は飲水量に影響しなかった（**Fig. 1C**）。摂取カロリーは各群で大きな差がないにも関わらず，フラクトオリゴ糖摂取で有意に飼育２週間の体重増加量が上昇した（**Fig. 1B, D**）。一方，餌の組成は体重増加に影響しなかった。体重に対する下腿三頭筋の重量を解析したところ，全群間で有意差は見られなかったため，体重増加は非筋組織重量の増加によると考えられる（**Fig. 1E**）。腸内細菌の主要な生育箇所である盲腸の内容物重量は，フラクトオリゴ糖摂取群で有意に増加していた（**Fig. 1F**）。一方，飼料の組成は盲腸内容物量に影響しなかった。

3.2　食肉成分とフラクトオリゴ糖摂取により形成される盲腸内細菌叢の解析

高食肉食とオリゴ糖摂取により形成される盲腸内細菌叢解析の結果，４群の各個体から13,100±272リードの結合配列が得られた。平均リード数は，各群で有意な差はなかった。系統解析の結果

© The Ito Foundation

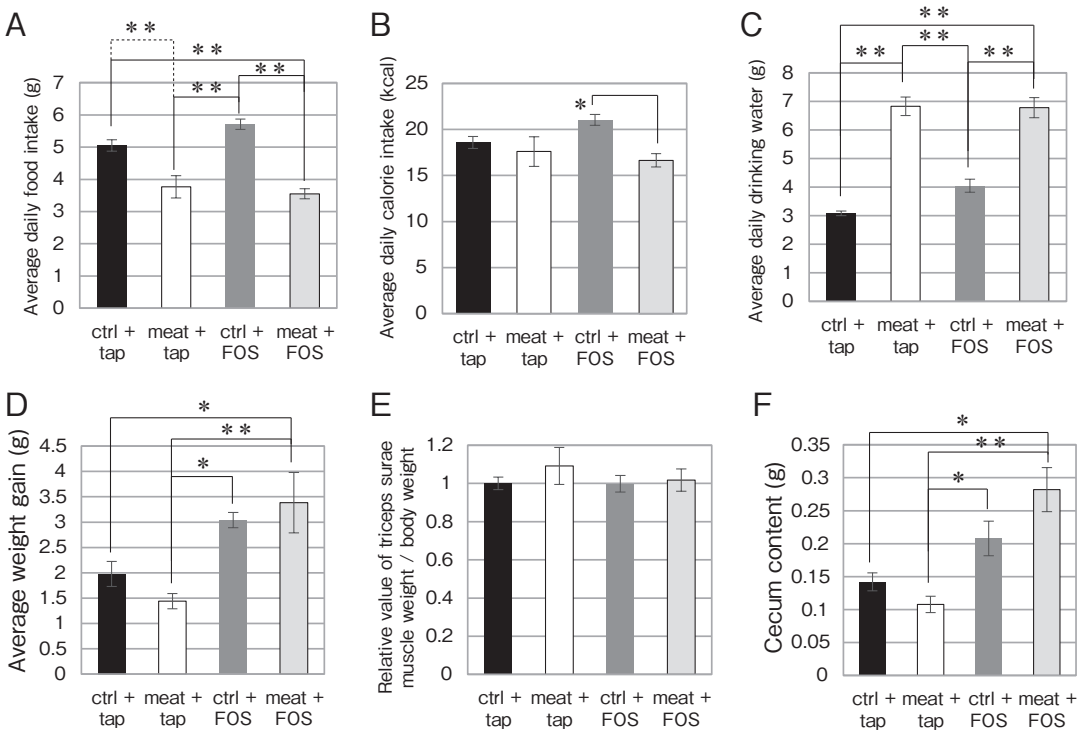


Fig. 1　Average diet intake and weight gain of the mice fed the meat diet and fructooligosaccharides (FOS). Mice were fed in four groups with different diet and drink conditions for two weeks (n=5 each group). Group1 ; control diet and tap water (ctrl + tap), group2 ; meat diet and tap water (meat + tap), group3 ; control diet and tap water containing 4% Meioligo P (ctrl + FOS), group4 ; meat diet and tap water containing 4% Meioligo P (meat + FOS). (A) Average daily food intake of a mouse. (B) Average daily calorie intake of a mouse calculated from food and drink intake. (C) Average daily amount of drinking water of a mouse. (D) Average weight gain after 2 week feeding. (E) Relative values of triceps surae muscle weight divided by body weight. Triceps surae muscles were dissected after 2 week feeding and weighed. (F) Average weight of cecum contents. Cecum contents were obtained from the dissected mice. Data are expressed as means ± s.e.m. Differences were analyzed by the Tukey-Kramer test; $^{*}p < 0.05$, $^{**}p < 0.01$.

全体で116属の菌が同定された。各個体の菌叢について，目レベルの系統解析の結果を**Fig. 2A**に示す。各個体の盲腸内に生息する菌種の多様性であるα多様性について，Shannon指数を指標として解析したところ，食肉飼料と水道水で飼育した条件（以下meat＋tap群）で最もShannon エントロピーが高く，食肉摂取により盲腸内細菌叢の種多様性が高くなることが示された（**Fig. 2B**）。コントロール飼料・水道水群（以下ctrl＋tap群），コントロール飼料・フラクトオリゴ糖群（以下ctrl＋FOS群），食肉飼料・フラクトオリゴ糖群（以下meat＋FOS群）の間にα多様性の差は見られなかった。各個体間の菌叢構造の類似度を示すβ多様性についてWeighted-UniFrac距離を解析した結果，ctrl＋FOS群とmeat＋FOS群の間ではp値が0.242となり，群内の多様性と群間の多様性に有意な差はなく，似かよった菌叢構成になることが示された（**Table 2**）。それ以外の群間では，有意な差があると考えられる。また，Weighted-UniFrac距離の主座標分析からも，フラクトオリゴ糖を摂取した2群が類似することが分かる（**Fig. 2C**）。以上の結果から，食肉摂取により腸

© The Ito Foundation

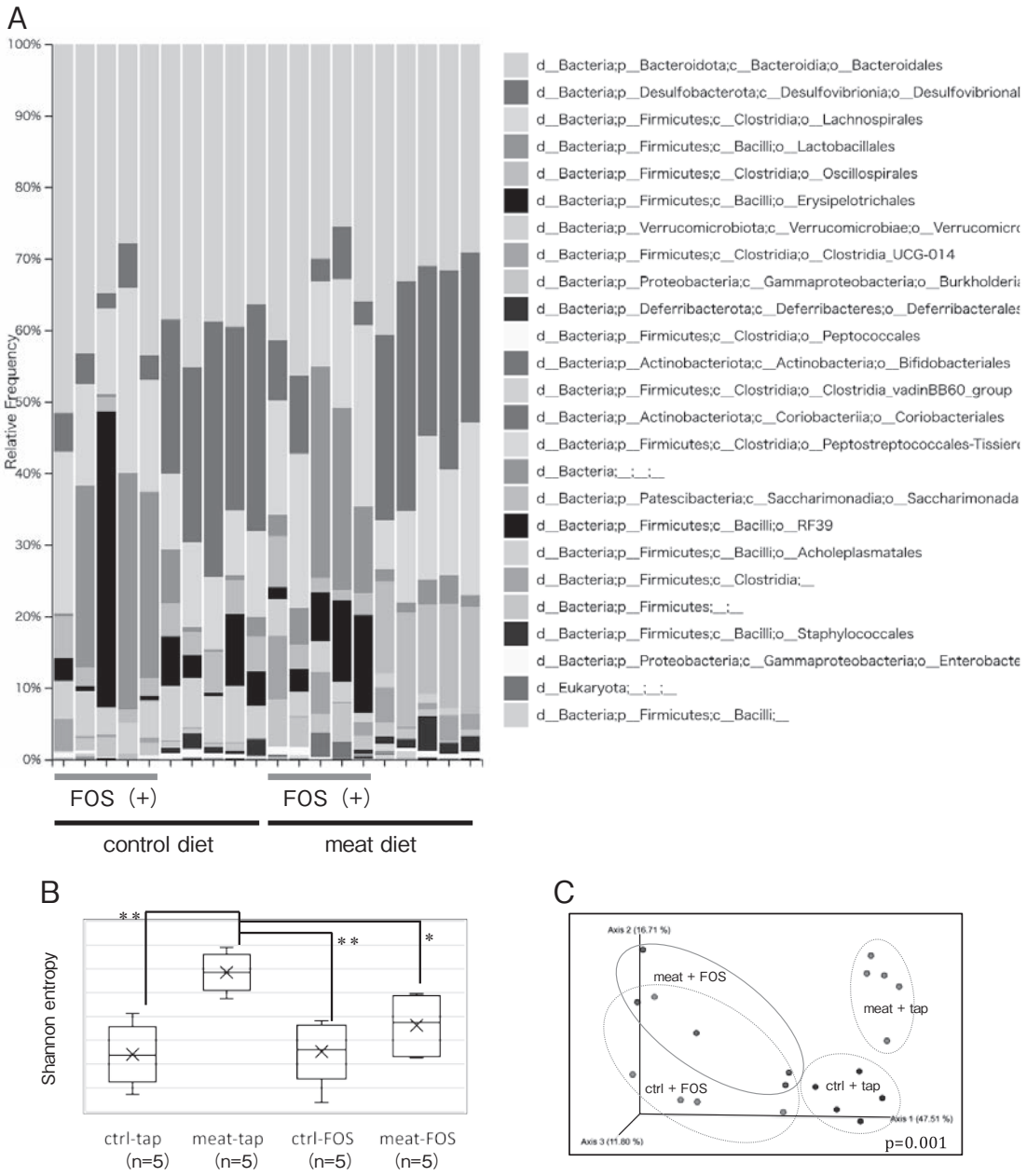


Fig. 2　Microbiota within the cecum of the mice fed the meat diet and FOS. (A) Relative abundance of microbiota in each mouse at the order levels by taxon-based analyses. (B) Alpha diversity of the cecum microbiota from the mice fed the control and meat diets with or without FOS. Boxes represent the 25th, 50th, and 75th percentiles and whiskers represent the 10th and 90th percentiles. Differences were analyzed by the pairwise Kruskal-Wallis test; *p < 0.05, **p < 0.01. (C) Principal coordinates analysis of weighted UniFrac distance of the cecal microbiota. p value was determined by PERMANOVA.

内細菌叢の多様性が上昇すること，フラクトオリゴ糖摂取で食肉食による菌叢変化が抑制されることが示唆された。

© The Ito Foundation

Table 2 Pairwise PERMANOVA results of Weighted-Unifrac distances

Group 1	Group 2	Sample size	pseudo-F	p-value	q-value
ctrl-FOS	ctrl-tap	10	7.969504502	0.008	0.0096
	meat-FOS	10	1.210884965	0.242	0.242
	meat-tap	10	11.29477198	0.008	0.0096
ctrl-tap	meat-FOS	10	8.563449571	0.005	0.0096
	meat-tap	10	9.417641478	0.006	0.0096
meat-FOS	meat-tap	10	8.447715003	0.008	0.0096

3.3 食肉成分とフラクトオリゴ糖摂取により変化する細菌種の同定

各群間で有意に差のある菌種を属レベルでLEfSeにより解析したところ，meat＋tap群の盲腸内で，*Butyricicoccaceae* 科 *UCG_009* 属，*Oscillospiraceae*科未同定属，*Colidextribacter*属，*Negativibacillus*属の菌が特異的に増加しており，これらはすべて*Oscillospirales*目に属していた（**Fig. 3A**）。一方，ctrl＋tap群では*Lactococcus*属，meat＋FOS群では*Lachnospiraceae*科*ASF356*属の菌が他群よりも多くなっていた。meat＋tap群で増加した*Colidextribacter*属は短鎖脂肪酸を産生し，パーキンソン病患者で有意に減少し[8]，高脂血症と相関がある[9]。また，*Negativibacillus*属は潰瘍性大腸炎患者で増加する一方[10]，記憶の改善とも関連性が示されている[11]。以上から，食肉成分を摂取することで，神経疾患と負に関連する細菌を増やす一方，炎症や代謝疾患と関連する菌も増殖することが示された。食肉成分とフラクトオリゴ糖の同時摂取はこれらの菌を抑制することが明らかとなった。

食肉の摂取により変動する菌種をさらに同定するため，ctrl＋tap群とmeat＋tap群で群間比較解析を行ったところ，前出の*Oscillospirales*目菌のほか，食肉飼料摂取群で*Clostridia_UCG_014*属菌が増加しており，*Erysipelotrichales* 科と*Akkermansia*属菌が減少していた。ムチン代謝菌である*Akkermansia*属菌は代謝疾患患者で減少し，脂肪とグルコース代謝に影響して炎症性腸疾患，肥満，糖尿病などと逆相関する[12, 13]。食肉の摂取により減少した*Akkermansia*の量は，フラクトオリゴ糖摂取により回復していた（**Fig. 3B**）。

以上の結果から，食肉飼料とフラクトオリゴ糖摂取により特徴的な菌叢が形成されることが明らかとなった。今後は，アミノ酸代謝物などの腸内細菌代謝物や，宿主の血中成分量や組織脂質量，肝臓や腸管での遺伝子発現を解析することにより，さらに詳細に食肉とフラクトオリゴ糖摂取による腸内細菌叢を介した栄養効果を検証する。

4．要　約

食肉を主要に含む飼料とともにフラクトオリゴ糖を２週間マウスに与え，腸内細菌叢および宿主の変化に対する影響を検討することで，食肉食による腸内環境変化および宿主への作用に対するオリゴ糖の影響を調べた。コントロール群と摂取カロリーは同程度であるにも関わらず，フラクトオリゴ糖摂取で有意に体重増加量が上昇した。下腿三頭筋の重量は全群間で有意差が見られなかったため，体重増加は非筋組織重量の増加によると考えられた。食肉食とオリゴ糖摂取により形成される盲腸内細菌叢解析の結果，食肉摂取により腸内細菌叢の多様性が上昇すること，フラクトオリゴ糖摂取で食肉食による菌叢変化が抑制されることが示唆された。食肉飼料摂取により*Oscillospirales*目に属する複数の細菌が増加し，

© The Ito Foundation

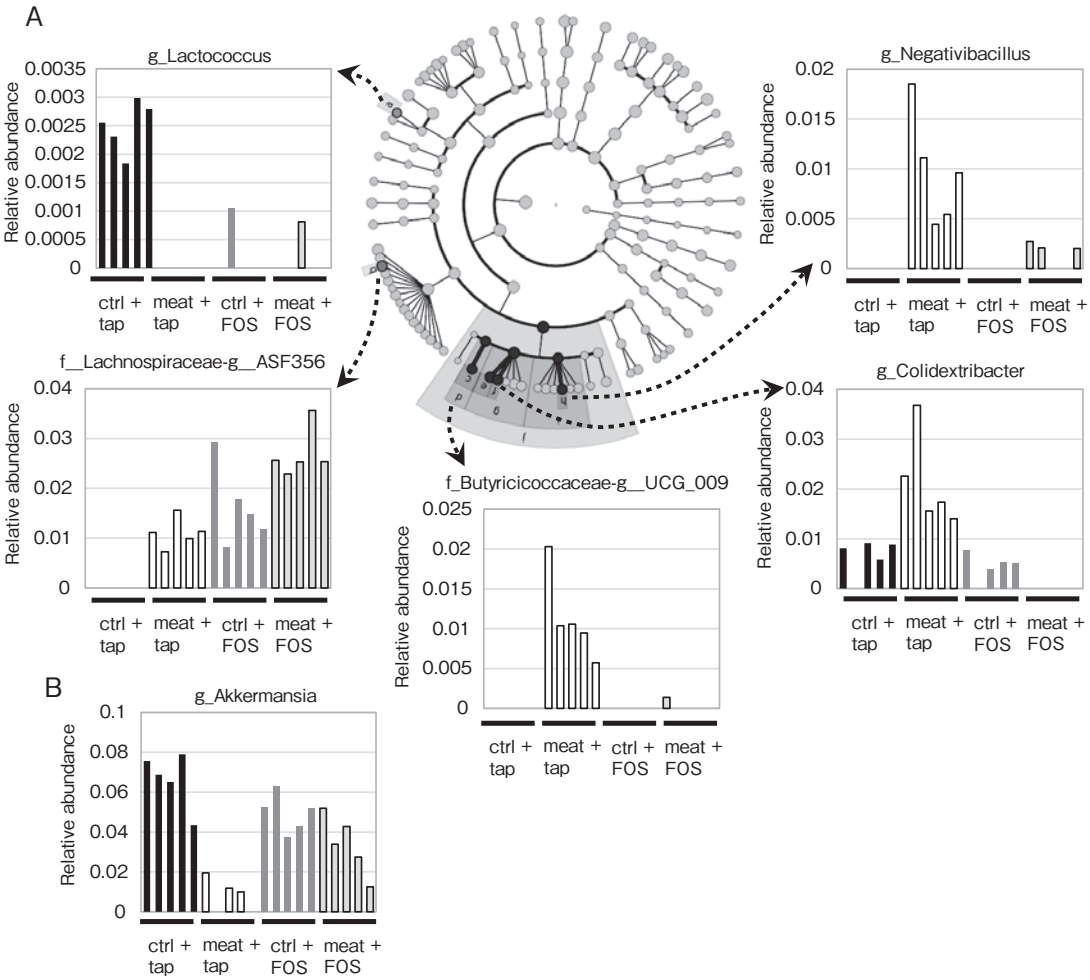


Fig. 3　Different dominant bacteria among the mice group fed the control and meat diets with or without FOS. (A) Circular cladogram represents the LEfSe results showing the significantly increased bacteria in the mouse groups fed control diet and tap water (ctrl + tap), meat diet and tap water (meat + tap), and meat diet and tap water containing 4% Meioligo P (meat + FOS). Relative abundance of each identified bacteria in the cecal microbiota is shown. (B) Significant decrease of relative *Akkermansia* abundance in the meat + tap group.

*Akkermansia*属菌が減少していた。フラクトオリゴ糖摂取によりこれらの菌量変化が抑制されたため，食肉成分とフラクトオリゴ糖の同時摂取は腸内細菌叢の改善につながることが示唆された。今後は，アミノ酸代謝物などの腸内細菌代謝物や，宿主の血中成分量や組織脂質量，肝臓や腸管での遺伝子発現を解析することにより，さらに詳細に食肉とフラクトオリゴ糖摂取による腸内細菌叢を介した栄養効果を検証することが必要である。

文　献

1）　S. M. Phillips：*Meat Sci*, **92**, 174～178, 2012.
2）　I. Janssen, D. S. Shepard, P. T. Katzmarzyk, R. Roubenoff：*J Am Geriatr Soc*, **52**, 80～85, 2004.
3）　L. Wyness：*Proc Nutr Soc*, **75**, 227～232, 2016.
4）　K. Windey, V. De Preter, K. Verbeke：*Mol Nutr Food Res*, **56**, 184～196, 2012.
5）　P. Louis, G. L. Hold, H. J. Flint：*Nat Rev Microbiol*, **12**, 661～672, 2014.
6）　T. Tochio, Y. Kitaura, S. Nakamura, C. Sugawa, M. Takahashi, A. Endo, Y. Shimomura：*PLoS One*, **11**, e0166850, 2016.
7）　N. Segata, J. Izard, L. Waldron, D. Gevers, L.

© The Ito Foundation

Miropolsky, W. S. Garrett, C. Huttenhower：*Genome Biol*, **12**, R60, 2011.
8） J. E. Kenna, E. G. Chua, M. Bakeberg, A. Tay, S. McGregor, A. Gorecki, M. Horne, B. Marshall, F. L. Mastaglia, R. S. Anderton：*Front Neurosci*, **15**, 756951, 2021.
9） R. Duan, X. Guan, K. Huang, Y. Zhang, S. Li, J. Xia, M. Shen：*J Agric Food Chem*, **69**, 7629～7640, 2021.
10） M. V. Gryaznova, S. A. Solodskikh, A. V. Panevina, M. Y. Syromyatnikov, Y. D. Dvoretskaya, T. N. Sviridova, E. S. Popov, V. N. Popov：*Heliyon*, **7**, e06432, 2021.
11） I. S. Sadovnikova, A. P. Gureev, D. A. Ignatyeva, M. V. Gryaznova, E. V. Chernyshova, E. P. Krutskikh, A. G. Novikova, V. N. Popov：*Pharmaceuticals*, **14**, 2021.
12） C. Depommier, A. Everard, C. Druart, H. Plovier, M. Van Hul, S. Vieira-Silva, G. Falony, J. Raes, D. Maiter, N. M. Delzenne, M. de Barsy, A. Loumaye, M. P. Hermans, J. P. Thissen, W. M. de Vos, P. D. Cani：*Nat Med*, **25**, 1096～1103, 2019.
13） I. G. Macchione, L. R. Lopetuso, G. Ianiro, M. Napoli, G. Gibiino, G. Rizzatti, V. Petito, A. Gasbarrini, F. Scaldaferri：*Eur Rev Med Pharmacol Sci*, **23**, 8075～8083, 2019.

© The Ito Foundation

鶏肉の低温調理におけるカンピロバクターの消長

Survival of *Campylobacter jejuni/coli* in low temperature cooking poultry meat

下　島　優香子
（相模女子大学栄養科学部）

Yukako Shimojima
（Faculty of Nutritional Science, Sagami Women's University）

Low-temperature-long-time（LT-LT）cooking, also known as sous vide cooking, in which meat is sealed in a bag and cooked in hot water at a relatively low-temperature of around 60℃, increased in popularity; indeed, home-use low-temperature cookers are now commercially available. However, after LT-LT cooking, if even a small number of foodborne bacteria remain, they could cause infection and foodborne illnesses. Therefore, in the present study, we aimed to determine the appropriate LT-LT cooking methods for chicken by assessing temperature changes and studying the bacteria in LT-LT cooked chicken meat. At set cooking temperatures of 60℃ and 65℃, the temperature of a 300-g chicken breast increased rapidly in the following order: at the surface, in the center of a single-layer sample, and in the center of a double-layer sample. In these areas of chicken breast samples, the respective times required to reach 50℃ were 14, 28, and 35 min at the 60℃ cooking setting and 5, 26, and 33 min at the 65℃ cooking setting. When the meat was LT-LT cooked at 60℃ and 65℃ for 60 min, color changes in the meat and heating of the meat were observed all the way to the interior. *Campylobacter jejuni, Salmonella* O7 and *Listeria monocytogenes* were inoculated into chicken breasts, which were then cooked at set temperatures of 60℃ and 65℃ for 15, 30, 60, 90, and 120 min. *Campylobacter jejuni* survived for up to 30 min of cooking, *Salmonella* O7 survived for up to 60 min of cooking at 60℃ and 30 min at 65℃, and *L. monocytogenes* survived for up to 90 min of cooking at 60℃ and 60 min at 65℃. Thus, to prevent infection and illness caused by the three tested bacteria species, LT-LT cooking for 120 min at 60℃ and 90 min at 65℃ is recommended.

1．目　　的

食肉を袋に密封し，60℃前後の比較的低温で湯煎調理する「低温調理」がジューシーな調理法として注目されている。鍋やタッパーを用いて湯温を一定温度に保つことが可能な家庭用低温調理器が各種調理器具メーカーから市販されており，インターネット上のレシピサイトやブログ等には食肉の低温調理レシピが多く公開されている。しかし国内には調理方法に法的な規定はなく，食中毒の要因となる危険性が指摘されている。

食肉はさまざまな食中毒菌に汚染されており，

© The Ito Foundation

食肉や食肉調理品は細菌性食中毒の原因食品となっている[1)]。わが国で最も多い細菌性食中毒は*Campylobacter jejuni/coli*による食中毒であり，その多くは生，または加熱不十分な鶏肉が原因と考えられている[2)]。鶏肉の*C. jejuni/coli*汚染率は高く，わが国に流通する国産鶏肉では約60%，輸入鶏肉では約30%と報告されている[2)]。加えて２～３log CFU程度の少量で感染が成立することから，鶏肉の*C. jejuni/coli*による食中毒リスクは高いと考えられる。また，鶏肉は*Salmonella* spp. 分離率も高く，鶏肉を生，または加熱不十分な状態で食べることは*Salmonella* spp. による食中毒要因のひとつと考えられる。*Salmonella* spp. による食中毒は，食品中で本菌が増殖し，その食品を喫食することが原因となると考えられているが，１～３log CFU程度の少量摂取と推定される食中毒の報告もある[3)]。さらに，鶏肉では*Listeria monocytogenes*の分離も報告される[4)]。*L. monocytogenes*は，高齢者や妊婦などの易感染者においては敗血症や髄膜炎などを引き起こし，重症化することが知られている。健康なヒトの発症には６log CFUを必要とするが，易感染者ではより少量でも発症すると考えられている。

C. jejuni/coli，*Salmonella* spp. および *L. monocytogenes*は，適切な加熱により死滅させることができる。D値は*C. jejuni/coli*では60℃で8.2 s，65℃で1.3 s，*Salmonella* spp. では60℃で24 s，65℃で2.6 s，*L. monocytogenes*では60℃で87 s，65℃で12 sとまとめられており[5)]，低温調理の設定温度である60℃前後における加熱調理により死滅させることができると考えられる。しかし，中心温度が設定温度に達するのに要する時間や，実際の低温調理による食中毒菌の消長に関する情報は少ない。特に少量でも感染が成立する食中毒菌は，低温調理後に残存することは健康被害のリスクがある。本研究では，鶏肉の適正な低温調理方法設定のための基礎資料とすることを目的とし，鶏肉の低温調理による温度変化や細菌学的調査を実施した。

２．方　法

2.1　供試菌株

菌株は国産鶏肉分離株である*C. jejuni*（CA21-1），*Salmonella* O7群（Sal21-2），*L. monocytogenes*（LM21-1）を供試した。*C. jejuni*は馬血液寒天培地を用いて37℃で24～48時間微好気培養したものをBrain heart infusion broth（BHI broth，BD）に接種し，37℃で24時間微好気で振盪培養したものを接種用菌液とした。*Salmonella* O7群および*L. monocytogenes*はBHI brothに接種し，37℃で24時間静置培養したものを接種用菌液とした。

2.2　低温調理

試料は国産鶏ムネ肉を供試した。300 gをジッパー付きポリ袋にそのまま一層で入れ，厚さを3.5 cmにしたもの（single-layer：SG）および二つ折りにして二層にして入れ，厚さを５cmにしたもの（double-layer：DB）を30分間氷冷し，家庭用低温調理器BONIQ2.0（葉山社中）を用いて，低温調理器の設定温度60℃および65℃で120分間まで調理した後，30分間氷冷した。

2.3　低温調理中の温度測定

低温調理中の試料の温度測定はTMB温度＋メモリボタン（大日電子）を用いて１分間隔で行った。中心温度測定は，試料SG，DBの中心部にメモリボタンを配置して行った。表面温度測定は，試料５ gにメモリボタンを包んで，試料SGの表面に配置して行った（Surface：SF）。設定温度60℃および65℃で90分間調理し，測定は三重で行った。

2.4　低温調理後の観察および細菌検査

試料SG，DBを設定温度60℃および65℃で15分

© The Ito Foundation

間，30分間および60分間調理して，断面の観察と細菌検査を行った。細菌検査は，試料SGは表面および中心部，試料DBは中心部を採取し，一般生菌数，大腸菌群・大腸菌の定量試験，*C. jejuni/coli*，*Salmonella* spp.，*L. monocytogenes* の定性試験を行った。

一般生菌数は標準寒天培地（栄研化学），大腸菌群・大腸菌はXM-G寒天培地による混釈法で計測した。*C. jejuni/coli*は，材料25 gにプレストン増菌培地基礎培地（Nutrient broth No.2., Oxoid）を30 ml入れて混和し，その10 mlに馬脱繊維血液，発育剤および選択剤を添加して培養した後，mCCDA培地に画線塗抹して培養した。*Salmonella* spp. は，材料25 gに緩衝ペプトン水（BPW，Oxoid）を225 ml加えて培養し，その0.1 mlをRV培地（Oxoid）に加えて培養した後，SS寒天培地（栄研化学）に画線塗抹して培養した。*L. monocytogenes*は，材料25 gにhalf-Fraserブロス（Merck）225 mlを加えて一次増菌培養し，培養液をCHROMagar Listeria（関東化学）およびPALCAM寒天培地（Merck）に画線塗抹するとともに0.1 mlをFraserブロス（BD）10 mlに加えて二次増菌培養した。二次増菌培養液も二種の選択分離培地に画線塗抹培養した。

2.5　添加実験

材料５ gに*C. jejuni*接種用菌液は200 μl，*Salmonella* O7群および*L. monocytogenes*接種用菌液はそれぞれ30 μl接種し，硫酸紙７×７cmで包み，ドリップ液に浸したものを材料SG，DBの中心部および材料SGの表面（SF）に配置し，設定温度60℃および65℃で15分間，30分間，60分間，90分間および120分間調理を行った。調理後，菌液を接種した材料５ gを回収し，BPW 20 mlを加えて混和して５倍希釈液を作製し，各菌株の定量試験および定性試験を行った。定量試験は，*C. jejuni*はmCCDA，*Salmonella* O7群はSS寒天培地，*L. monocytogenes*はPALCAM寒天培地に塗抹して測定した。定性試験は，2.4に記載した増菌培地10 mlに５倍希釈液を１ml加えて，2.4と同様に行った。添加実験は三重で行った。

３．結果と考察

3.1　低温調理中の温度測定

低温調理中の温度は，設定温度60℃調理，65℃調理いずれも，一層の試料表面（SF），一層の試料中心部（SG），二層の試料中心部（DB）の順に早く上昇した（**Fig. 1**）。食肉中の主な食中毒菌の増殖限度であり，加熱殺菌効果が認められる50℃に達する時間は，設定温度60℃でSF，SG，

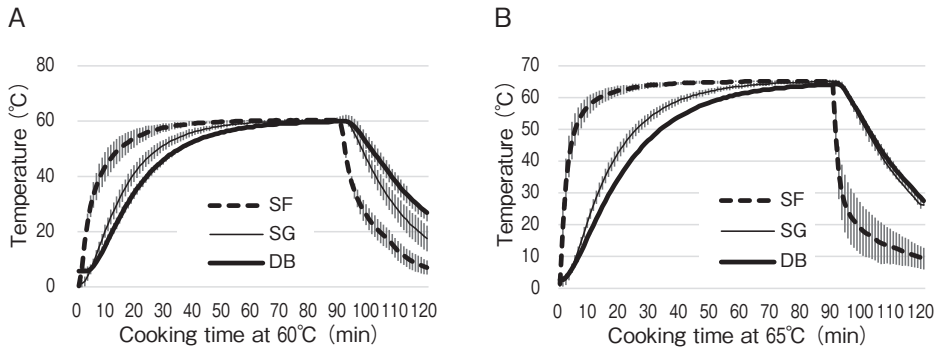


Fig. 1　Temperature change in chicken meat cooked at 60℃（A）and 65℃（B）over 120 min. SF, surface of single-layer chicken meat；SG, center of single-layer chicken meat；DB, center of double-layer chicken meat.

© The Ito Foundation

DBでそれぞれ14分，28分，35分で，設定温度65℃ではそれぞれ５分，26分，33分であった。設定温度が低く，表面から離れているほど温度の上昇に時間を要した。なお，三重測定のばらつきはSFが最も大きかった。SFではメモリボタンを５ｇの鶏肉に包んで表面に配置したが，深さが１mmから５mmとばらつきがあったことと，表面でも部位によって温度上昇に差がある可能性が考えられた。

3.2　低温調理後の観察および細菌検査

低温調理後の試料の切断面は，15分間調理では設定温度60℃および65℃いずれも，試料SGも試料DBも表面の色が白く変わる程度であった。30分間調理ではいずれも内部はピンク色で生っぽい状態であった。60分間調理では内部まで白く色が変わり，内部まで加熱されているように観察された（**Fig. 2**）。

一般生菌数は，4.9 log CFU/g，大腸菌群2.9 log CFU/g，大腸菌1.3 log CFU/gは調理時間に従い減少した（**Fig. 3**）。低温調理器の設定温度が低いほど，試料の厚さが厚いほど，長い時間菌数の生残が認められた。*C. jejuni/coli*は，試料DBは設定温度60℃，30分間調理まで，試料DBの設定温度65℃，試料SGは15分間調理まで分離された。*Salmonella* spp. および*L. monocytogenes*はいずれも陰性であった。試料DBは鶏肉を二つ折りにして二層にして調理しており，厚さが厚く中心部まで熱が伝わりにくいだけではなく，汚染の多い調理前の鶏肉表面部分が加熱調理時には中心部分になることからも，菌が生残しやすくなる可能性が考えられる。

3.3　添加実験

添加実験では，５ｇの鶏肉に自然汚染を上回る多量の菌を接種して硫酸紙に包んで各部位に配置

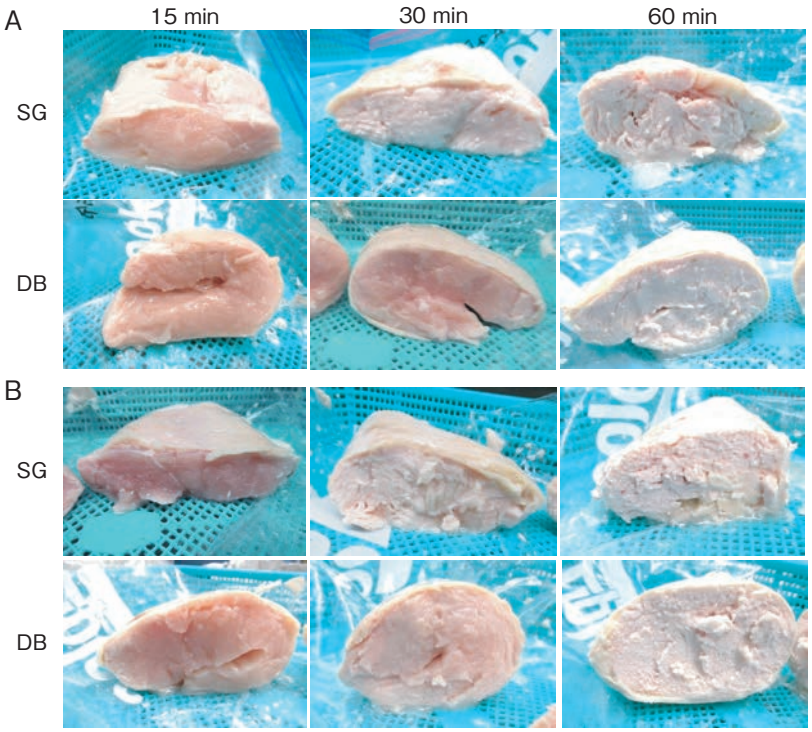


Fig. 2　Cross section of chicken meat cooked at 60℃（A）and 65℃（B）. SG　; Single-layer chicken meat, DB ; Double-layer chicken meat

© The Ito Foundation

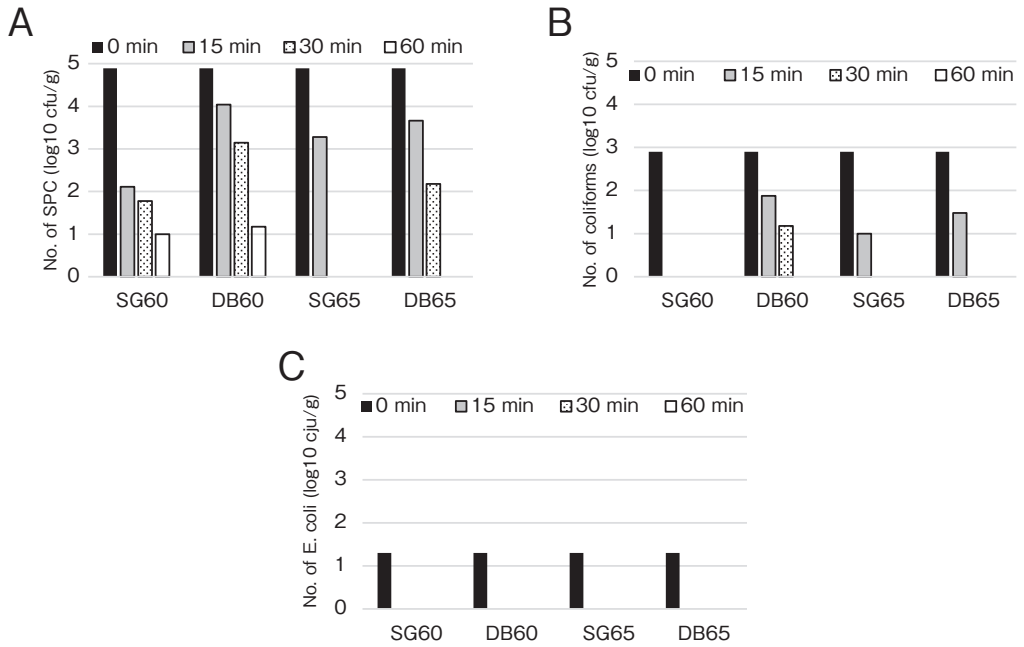


Fig. 3　Number of cells of standard plate counts (A), coliforms (B) and *Escherichia coli* (C)). SG60；Single-layer chicken meat cooked at 60℃, DB60；Double-layer chicken meat cooked at 60℃, SG65；Single-layer chicken meat cooked at 65℃, DB65；Double-layer chicken meat cooked at 65℃

して行った。なお，メモリボタンをそのままおよび硫酸紙に包んで試料SG中心部に配置して温度測定を二重で行い比較したところ，50℃以上の温度域では両者の温度差は１℃以内であり，硫酸紙に包むことで温度への影響はほとんどないと考えられた（data not shown）。

*C. jejuni*は，試料SFでは設定温度60℃調理時は調理時間30分（57.7℃）では検出限界以下で増菌法では三重試験のうち１サンプルのみ陽性，調理時間60分（60.2℃）では陰性となり，設定温度65℃調理時は調理時間15分（60.8℃）で1.8 log CFU/g減少し，調理時間30分（64.0℃）で陰性となった（**Fig. 4**，**Table 1**）。試料SGでは設定温度60℃調理時は調理時間30分（51.7℃）で1.2 log CFU/g減少し，調理時間60分（59.5℃）では陰性となり，設定温度65℃調理時は調理時間30分（54.2℃）では検出限界以下で増菌法では三重試験のうち１サンプルのみ陽性，調理時間60分（63.5℃）では陰性となった。試料DBでは設定温度60℃調理時は調理時間30分（46.7℃）まで減少せず，調理時間60分（57.8℃）では陰性となり，設定温度65℃調理時は調理時間30分（47.2℃）で1.0 log CFU/g減少し，調理時間60分（61.3℃）では陰性となった。*C. jejuni*は温度が50℃に達する頃から減少し，15分～30分間で陰性となることが示された。

Salmonella O7群は，試料SFでは設定温度60℃調理時は調理時間30分（57.7℃）では2.3 log CFU/g減少し，設定温度65℃調理時は調理時間30分（64.0℃）では3.4 log CFU/g減少し，調理時間60分（60.2℃および65.0℃）ではいずれも陰性となった。試料SGでは設定温度60℃および65℃調理時，調理時間30分（51.7℃および54.2℃）まで菌数変化はなく，調理時間60分（59.5℃および63.5℃）では陰性となった。試料DBでは設定温度60℃調理時，60分（57.8℃）では2.3 log

© The Ito Foundation

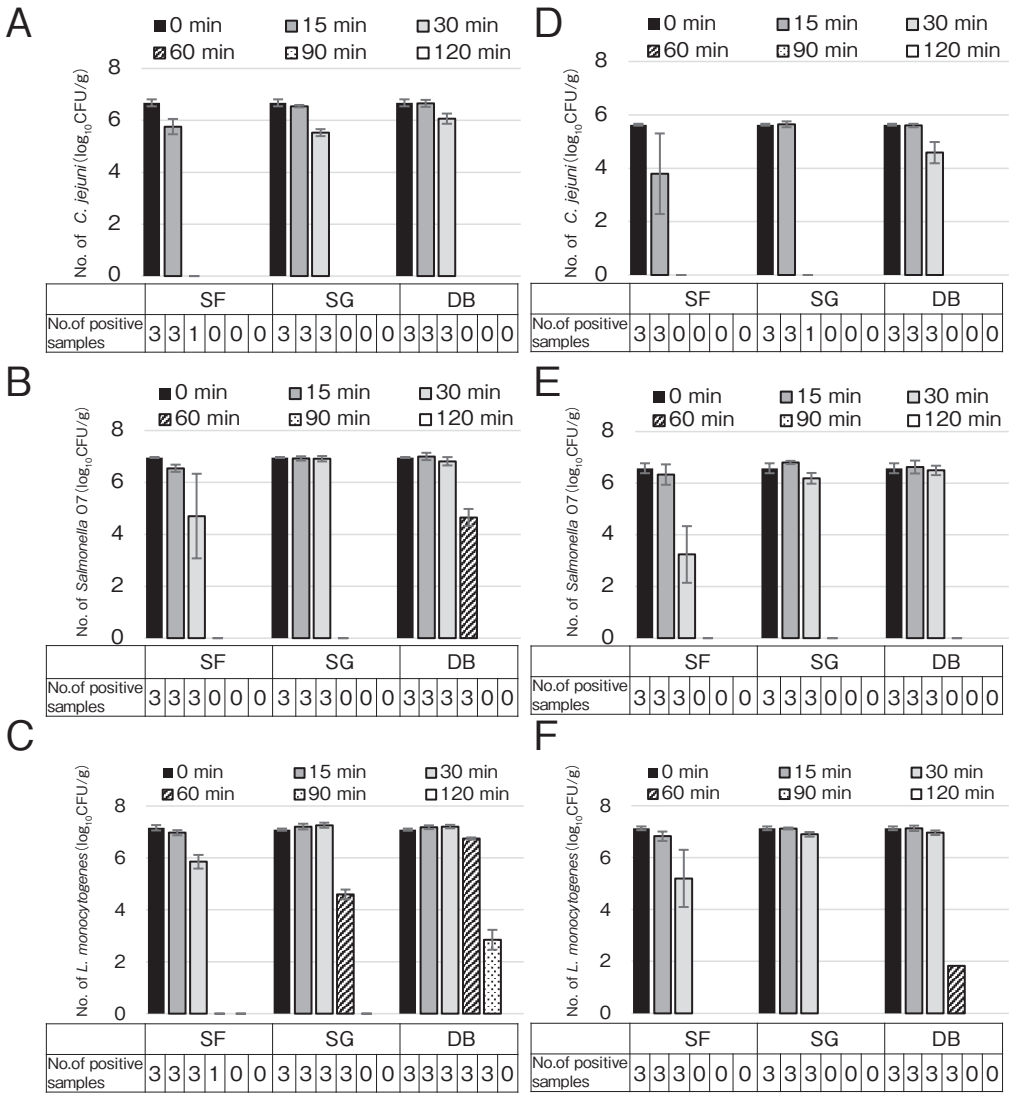


Fig. 4 Number of bacterial cells and samples (n = 3 samples) positive for *Campylobacter jejuni* (A, D), *Salmonella* O7 (B, E), and *Listeria monocytogenes* (C, F) when inoculated chicken meat was cooked at 60℃ (A–C) and 65℃ (D–F).

Table 1 Temperature at specific cooking time

Cooking time	Temperature (℃)					
	Cooked at 60℃			Cooked at 65℃		
	SF*	SG	DB	SF	SG	DB
15 min	50.8	34.0	27.0	60.8	35.3	27.3
30 min	57.7	51.7	46.7	64.0	54.2	47.2
60 min	60.2	59.5	57.8	65.0	63.5	61.3
90 min	60.3	60.3	60.0	65.2	65.2	64.0

* Button-type temprerature recorders were placed on the surface of single-layer chicken meat (SF), at the center of single-layer chicken meat (SG), and at the center of double-layer chicken meat (DB).

© The Ito Foundation

CFU/g減少し，調理時間90分（60.0℃）では陰性であった。設定温度65℃調理時は，30分（47.2℃）まで菌数変化はなく，調理時間60分（61.3℃）では陰性であった。*Salmonella* O7群は温度が55℃に達する頃から減少し，30分間程度で陰性となると推定された。

*L. monocytogenes*は，試料SFでは設定温度60℃調理時は調理時間30分（57.7℃）では1.3 log CFU/g減少し，調理時間60分（60.2℃）では菌数は検出限界以下で増菌法では三重試験のうち１サンプルのみ陽性，調理時間90分で陰性になった。設定温度65℃調理時は調理時間30分（64.0℃）では1.9 log CFU/g減少し，調理時間60分（65.0℃）では陰性となった。試料SGでは設定温度60℃調理時，調理時間60分（59.5℃）で2.5 log CFU/g減少し，調理時間90分（60.3℃）では陰性であった。65℃調理時，調理時間30分（54.2℃）まで菌数変化はなく，調理時間60分（63.5℃）では陰性となった。試料DBでは設定温度60℃調理時，調理時間90分（60.0℃）で4.3 log CFU/g減少し，調理時間120分では陰性であった。設定温度65℃調理時は，調理時間60分（61.3℃）では5.3 log CFU/g減少し，調理時間90分（64.0℃）では陰性であった。*L. monocytogenes*は温度が60℃に達する頃から減少し，30分間程度で陰性になると推定された。

*C. jejuni*は設定温度60℃，65℃でいずれも60分調理で陰性となったが，生きているが培養できない状態の可能性もあるため注意を要する。三菌種の中で最も長く生存した*L. monocytogenes*は，二つ折りにした二重の状態では設定温度60℃調理で90分間調理，65℃調理で60分間調理まで生存していた。今回調査した三菌種の危害を防ぐためには，設定温度60℃では120分間調理，設定温度65℃では90分間調理を要することが示された。加えて，中心部よりも表面のほうが，また中心部では厚さが薄いほうが，温度上昇が速く菌も早く死滅するため，細菌汚染の多い鶏肉表面部分を内側に折り込まないことと厚さを厚くしないことが望ましいと考えられた。

４．要　　約

食肉を袋に密封し，60℃前後の比較的低温で湯煎調理する「低温調理」が注目されており，家庭用低温調理器が市販されている。しかし低温調理後に少量でも感染が成立する食中毒菌が残存すると，食中毒を引き起こすリスクがある。鶏肉の適正な低温調理方法設定のための基礎資料とすることを目的とし，鶏肉の低温調理による温度変化や細菌学的調査を実施した。鶏ムネ肉300ｇの設定温度60℃および65℃による調理時の温度変化は，表面，一層の試料中心部，二層の試料中心部の順に早く上昇した。50℃に達する時間は設定温度60℃調理でそれぞれ14分，28分，35分，設定温度65℃調理でそれぞれ５分，26分，33分であった。低温調理後の試料の切断面は設定温度60℃および65℃で60分間調理すると内部まで色が変わり，加熱されているように観察された。自然汚染の*C. jejuni/coli*は設定温度60℃調理時，一層の試料では15分間調理まで，二層の試料では30分間調理まで生存が認められた。*C. jejuni/coli*，*Salmonella* spp.，*L. monocytogenes*を接種して設定温度60℃および65℃調理で15分，30分，60分，90分および120分調理したところ，*C. jejuni/coli*は30分調理まで，*Salmonella* spp. は設定温度60℃では60分調理，設定温度65℃では30分調理まで，*L. monocytogenes*は設定温度60℃では90分調理，設定温度65℃では60分調理まで生存が認められた。これらの三菌種の危害を防ぐためには設定温度60℃では120分間調理，設定温度65℃では90分間調理を要することが示された。

© The Ito Foundation

文　献

1） Omer, M. K., Álvarez-Ordoñez, A., Prieto, M., Skjerve, E., Asehun, T., Alvseike, O. A.：A systematic review of bacterial foodborne outbreaks related to red meat and meat products, *Foodborne Pathog. Dis.*, **15**, 598〜611, 2018.

2） 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル〜鶏肉等における*Campylobacter jejuni/coli*〜（改訂版），2021.

3） 食品安全委員会：食品健康影響評価のためのリスクプロファイル〜鶏肉におけるサルモネラ属菌〜（改訂版），2012.

4） 食品安全委員会：微生物・ウイルス評価書食品中のリステリア・モノサイトゲネス，2013.

5） Sörqvist, S.：Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp, *Acta Vet Scand.*, **44**, 1〜19, 2003.

© The Ito Foundation

ハム・ソーセージの食品添加物に関するスマート・リスクコミュニケーションの改良研究ならびに効果検証

Improvement research and evaluation of smart risk communication on the food additives in ham and sausage

山　﨑　　毅・山　﨑　深　雪
（特定非営利活動法人食の安全と安心を科学する会）

Takeshi Yamasaki and Miyuki Yamasaki
（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 also research the effect of risk communication method utilized by animation.

We performed the internet questionnaire survey to 200 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）. After we divided the respondents to two group where the one was received the text and the other received the animation movie, of academic explanation（5 kinds）on the risk of food additives in ham and sausage.

The health concerns of food additives were corrected up to 59％ of respondents by the text of “smart risk communication”, compared as 74％ of respondents by the animation movie of same communication contents. Furthermore, the age difference of corrected percentage is as follows: age 20’s（text：72％，animation：81％），30’s（text：52％，animation：62％），40’s（text：63％，animation：74％），50’s（text：49％，animation：78％）. As a result, we found the effect of animation movie in smart risk communication is approximately 15 ％ higher correction of risk perception bias compared by the text communication, and the effect was more significant（30％ higher）in age 50’s.

1．目　　的

食品安全の専門家が安全と評価しているハザードにもかかわらず，消費者がリスクを過大に認知し，リスク誤認を与えている典型例が食品添加物である。2018年，山﨑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，食品添加物を対象として消費者の意識調査研究を実施し

© The Ito Foundation

た[1]。その際に確証バイアスを補正するため，新たに開発したリスコミ手法が「スマート・リスクコミュニケーション」だ。

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わ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との仮説をたて，効果検証を行った。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・リスコミ手法により79％の回答者で確証バイアスの補正を認めた。また2020年度に，我々はハム・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2,500名を抽出し，上述のスマート・リスコミ手法の効果検証を試みたところ，30％～45％のインターネットモニター参加者が食品添加物を使った加工肉食品を安心して食べられるとの回答を選択し，明確なリスク認知バイアスの補正が認められた[2]。

本研究では，ハム・ソーセージ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20代から50代の女性に対して，従来のテキストによる学術説明とともにアニメーション動画を応用したスマート・リスコミ手法の効果検証をインターネット調査により実施したので，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，（株）マクロミルに委託して実施した。まず同社の日本人モニターより最低週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で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218人（20歳代：56人／30歳代：52人／40歳代：56人／50歳代：54人）をランダム抽出し，テキスト説明群（108人）と動画説明群（110人）にグループ分けを行った。

なお，テキストと図表のみ（音声・映像なし）による設問：Ｑ１～Ｑ５は以下のとおり，消費者の食品添加物に対する不安要因に対して，共感したうえで学術的な説明を加えるものとした。

Ｑ１　食品添加物の不安要因：「健康被害が起こった事故の歴史があると聞いたことがある」

ファシリテータ：「ハム・ソーセージ・ベーコンなどの加工肉は食品添加物が入っているので健康によくないって言ってたけど，なぜなのかな？」

不安な消費者：「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と聞いたことがある。そう聞くと不安だよね……」

リスクコミュニケータ：「わかるわかる。うちの母親からもよく同じことを言われたのよね。でも最近，食品添加物で食中毒が起こったって話は聞かないような気がするけど，食品安全の専門家はどう言ってるのかしら」

食品安全の専門家：「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が，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」

あなた：「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」

→選択枝：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

© The Ito Foundation

Ｑ２　食品添加物の不安要因：「家庭科の授業で，できるだけ使わないように教わった」

不安な消費者：「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よ」

リスクコミュニケータ：「たしかに昔，そんなことを家庭科で習った気がするわね。ただ，食品安全の専門家たちは，食品添加物のリスク評価を綿密に行ったうえで，現在の使用基準において安全性に問題がないと保証しているので，それが学校の教科書に反映されていないってことではないかと」

食品安全の専門家：「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言えるでしょう。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」

Ｑ３　食品添加物の不安要因：「知らない化学物質が何の目的で使用されているのか分からない」

不安な消費者：「ハム・ソーセージの食品ラベルを見ると，知らない化学物質名（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かな」

リスクコミュニケータ：「たしかに，ハム・ソーセージのラベルにはいろいろな化学物質名が書かれていて，「なんでこんなに入れないといけないの」って友達から聞かれたことがあるわ。でも，加工食品は食品添加物を使わないと，製造して３日後には腐ってしまったり，見た目も変色して美味しくない食品になるんだって。加工食品は手作りの料理とは違って，保存性を維持するためには，食品添加物が不可欠だよね」

食品安全の専門家：「食品添加物の使用目的は多種多様です。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・着色料などの役割を担っています。味や食感の改善，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さまざまなメニューの材料として便利に使用されています」

Ｑ４　食品添加物の不安要因：「無添加と添加物を比較すると無添加のほうが安全と思う」

不安な消費者：「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ほうが安全と思う」

リスクコミュニケータ：「「無添加」を強調する食品が多いので，やっぱりそちらのほうが健康にいいんだって思うわよね。ただ，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けど，食の安全の専門家にとっては，むしろ逆なんだって……」

食品安全の専門家：「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に比べて，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います。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ほうが，むしろ安全性が高いと言えます。あと，無添加が健康によ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つながります

© The Ito Foundation

(「リスクのトレードオフ」と呼びます)」

Q５　食品添加物の不安要因：「一部ソルビン酸や亜硝酸ナトリウムなど，健康によくないものがある」

不安な消費者：「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ナトリウムなど，健康によくないものがあるって聞いたことがあるからだね」

リスクコミュニケータ：「私の友人もネット情報をよく調べてるんだけど，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言っていたわね。でも食品安全の専門家はどう言ってるのかな？」

食品安全の専門家：「食品添加物は，「食品衛生法」により１日摂取許容量を下回る使用基準が規定されており，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。ヒトが毎日食べ続けても安全と認められた１日摂取許容量をADIと言い，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に設定されています。またハム・ソーセージで食品添加物を使用することで，ボツリヌス菌の繁殖を抑える効果もあります。安全を担保するためにもソルビン酸や亜硝酸ナトリウムを配合しています」

アニメーション動画による設問：Q1a～Q5aは，上述のテキストによる設問とまったく同じ内容ながら，**Fig. 1** のようなイメージのアニメーションに音声を加えた動画を回答者に視聴していただいた後に，上述のテキストと同様，「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」に対して，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，の選択肢を選んでもらった。

なお，本研究のアニメーション動画は，動画編集ソフトのDavinci Resolveを用いて我々自身で

Fig. 1　The characters and charts used in animation movie for the risk communication of food additives in ham and sausage.

© The Ito Foundation

編集・制作した（動画サイズ：横1920×縦1080，動画長さ：①②⑤１分30秒；③④２分，動画の見せ方：キャラクターの口が動くようにした，背景が流れるようにした，専門家の説明シーンは画像とテロップを使用，黒板風枠にテロップを表示した，音声：音読さん（音声読み上げソフト）→役柄に合う音声の種類を選択；高さ，速さを調整して，録音→Davinci Resolve編集時，さらに音声をテンポよく仕上げた）。

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，統計解析ツール「R」を用いて群間（テキストvs動画）や世代間の群間比較についてピアソンのカイ二乗検定を行い，危険率（p value）を求めて，危険率が0.05未満の場合を有意差と評価した。

３．結果と考察

上述のように食品添加物が健康によくないという「確証バイアス」にいたったであろう５つの不安要因候補について，回答者の不安に共感を示す対話（自分や自分の家族・友人も同じ不安をもっていたことなど）を展開したのちに，「でも食品安全の専門家はどうも違うことを言ってますよ……」として，回答者のリスク認知バイアスを補正することを試みた。その際のリスコミ定式として，テキスト説明群（108人）と動画説明群（110人）で不安から安心に転じた回答者，すなわち「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」の質問に対して，肯定的選択肢（①たしかにそう思う，②まあまあそう思う）を選んだ回答者のパーセンテージを世代ごとに集計したので，その結果を**Table 1** に示す。

５つの不安要因に対する安心度を確認したが，テキストと図表のみ（静止画）による説明でも，全世代でおおむね55％～66％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」との回答を肯定したことは前の報告と同様，スマート・リスコミ手法が機能していることを示している。これに対して動画説明群での肯定的回答は71％～77％まで有意に上がっており，この傾向はすべての世代で確認できた。また，とくに設問Ｑ３：「知らない化学物質が何の目的で使用されているのか分からない」に対する説明，ならびに設問Ｑ５：「一部ソルビン酸や亜硝酸ナトリウムなど，健康によくないものがある」に対する説明において，動画説明により顕著な効果を認めた。

さらに，世代間におけるテキスト説明群と動画説明群での本リスコミ手法により効果の違いは，非常に興味深い結果をもたらしている。すなわち，20歳代ではテキスト説明群で72.1％，動画説明群で80.7％が安心を肯定したのに対して，50歳代ではテキスト説明群で49.2％，動画説明群で77.9％が安心して食べると回答したのだ。すなわち，動画によるリスコミがより効果的なのは，我々の意に反して若者世代ではなく熟年世代ということは特筆すべきであろう。もちろん，回答者数が26－28人と少ないため，たまたま確証バイアスの“強度”が高いモニターが，50歳代のテキスト説明群に偶然振り分けられた可能性も残ると考えると再検証の必要はある。そのほかの世代でも若干傾向が異なるように見えた（30歳代ではテキスト説明群で51.5％，動画説明群で62.3％，40歳代ではテキスト説明群で62.9％，動画説明群で73.6％が安心を肯定）が，この数値が世代すべてを反映するとは言えないため，再検証の必要がありそうだ。

山﨑は2017年の日本リスク研究学会にて，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コミ手法を提案[3]し，①二者択一の原理[4]，②Slovicのリスクイメージ過大因子／未知性因子な

© The Ito Foundation

Table 1　Results of Questionnaire：Percentage of respondents where their health concerns on food additives are cleared by the risk communication in text or animation movie. Significant difference between text and animation by Pearson's Chi-squared test indicates*：p<0.05, **：p<0.01.

	Percentage of respondents where their health concerns on food additives are cleared by the risk communication in text or animation movie.	All		20's		30's		40's		50's	
		text	animation movie	text	animation movie	text	animation movie	text	animation movie	text	animation movie
	No. of respondents：	108	110	28	28	26	26	28	28	26	28
Q 1	Respondents who claimed no more health concerns：Because there were some histories of health accidents by food additives in the past.	62.0	71.8	75	78.6	57.7	50.0	64.3	78.6	50.0	78.6*
Q 2	Respondents who claimed no more health concerns：Because I was taught not to use food additives in nutrition class at school in the past.	55.6	71.8	67.9	78.6	50.0	65.4	60.7	71.4	42.3	71.4
Q 3	Respondents who claimed no more health concerns：Because I see many unknown chemical names on the label of ham and sausage, and do not know the purpose of their role.	55.6	75.5*	71.4	82.1	46.2	69.2	57.1	71.4	46.2	78.6*
Q 4	Respondents who claimed no more health concerns：Because the natural food without additives should be safer than process food with additives.	65.7	72.7	78.6	82.1	57.7	61.5	64.3	71.4	61.5	75.0
Q 5	Respondents who claimed no more health concerns：Because some food additives, such as sorbic acid and sodium nitrite, should be unhealthy.	57.4	77.3**	67.9	82.1	46.2	65.4*	67.9	75.0	46.2	85.7**
	Average of percentage in five questions：	59.3	73.8**	72.1	80.7	51.5	62.3*	62.9	73.6*	49.2	77.9**

ど[5]，③リスク情報発信者への不信感[6]，④リスクコミュニケーションのパラドックス[7]など4つのリスク認知バイアスを逆手に取ったリスコミ手法開発の可能性を考察した。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・リスコミの開発と効果検証について発表した[1]。インターネットでの無機的な情報伝達に限界はあ

© The Ito Foundation

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・リスコ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[8]。

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218人を，テキスト説明群と動画説明群にグループ分けして，スマート・リスコ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，テキスト説明群で平均59%，動画説明群で平均77%の回答者が食品添加物を使った加工食品を安心して食べられるとの選択肢を選んだ。また，世代間でも動画によるリスコミの有効性の違いが認められた。以上の結果より「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みつけだして共感し，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」が動画を利用することがより効果的であるとの可能性を示唆する結果であった。

このスマート・リスコミ手法は，食品添加物だけでなく，ゲノム編集食品[9]や残留農薬[10]なども含めた種々のハザードに関しての社会実装が始まっており[11]，徳島県／消費者庁が主催で開講された消費者大学校大学院の食のリスクコミュニケータ養成講座や農林水産省のFCP若手フォーラムにおいても応用されている。今後のスマート・リスコ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）について，テキストと図表（静止画）のみの説明とアニメーション動画を活用した説明の効果の違いを検証した。インターネットでの情報伝達に限界はあるものの，それぞれの不安要因に関する学術的説明に対して，テキスト説明群で平均59%，動画説明群で平均77%の回答者が食品添加物を使った加工食品を安心して食べられるとの選択肢を選び，リスク認知バイアスの補正が明確に認められた。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） 山﨑毅，大瀧直子，冨岡伸一，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.
2） 山﨑毅，山﨑深雪，阿紀雅敏：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，伊藤記念財団助成研究2020年度成果報告書，p161～p171，2021.
3） 山﨑毅：リスク認知バイアスを逆手にとったリスコミ，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.
4） 中谷内一也：リスクのモノサシ，NHK出版，東京，2006.
5） 岡本浩一：リスク心理学入門，サイエンス社，東

© The Ito Foundation

京，1992.
6） 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.
7） 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.
8） 山﨑毅：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.
9） 山﨑毅，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） 大瀧直子，山﨑毅，山口治子：残留農薬のスマート・リスクコミュニケーション，日本リスク研究学会第34回年次大会 講演論文集，Vol. 34, p86, 2021.
11） 山﨑毅，小島正美，佐々義子，田中豊，大瀧直子，山口治子：企画セッション開催報告 食品中の杞憂のリスクを議論する，リスク学研究31巻３号，p151～157, 2022.

© The Ito Foundation

近赤外光と偏光，AIを組み合わせた食肉中の虫および異物検知技術の開発

Detecting foreign object in meat using near-infrared light with polarization and artificial intelligence

山　口　堅　三
（徳島大学ポストLEDフォトニクス研究所）

Kenzo Yamaguchi
（Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University）

A foreign body detection method using near-infrared light and polarized light was successfully used to detect organic foreign object in meat. This proved the superiority of polarization, as it reduced the noise of stray light and identified the location of a foreign material. Furthermore, although the polarization is lost with thick and fat of meat, the detection accuracy can be improved by combining a reflective system and THz wave.

1．目　　的

食品中への異物混入は，SNSでまたたく間に拡散され，メディアで取り上げられる。2014年度までの国民生活センターに寄せられた食品の異物混入に関する相談の概要より[1]，1,852件の報告のうち，食品別では調理食品が首位で，穀物，菓子類へと続く。ここで，85件（全件数の５％相当）の肉への混入事例があった。また，異物別では，ゴキブリやハエなどの虫が最多で，次いでカッターや針金などの金属片，さらに毛髪や爪のヒト由来が続く。注目すべきは，その大半が有機物で，中にはプラスチックや紙，骨，小動物の死骸や羽，糞などがあった。

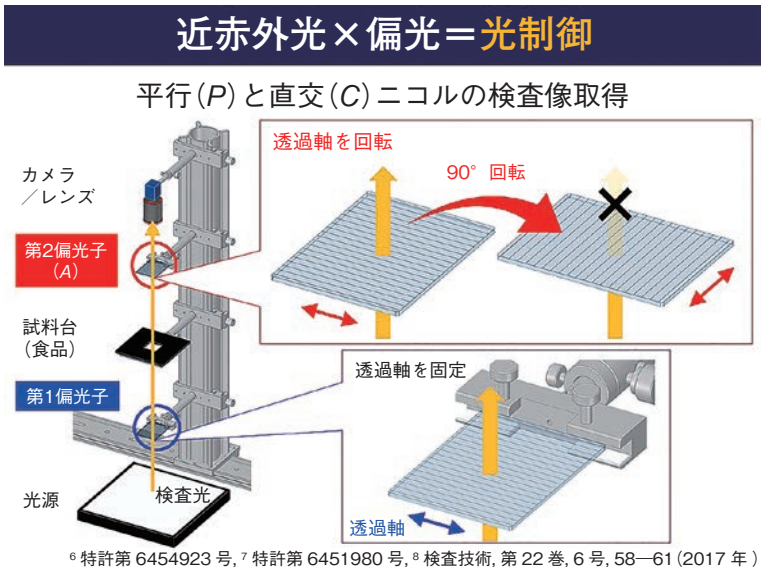
現在，食品製造現場で導入される金属検出機やＸ線検査機は，金属や石などの無機物を検出するも，虫や毛髪などの有機物や小骨は検知できていない。このため，検査員の手作業による目視検査で最終確認を行うも，異物の完全な除去には至っていない。そこで本研究は，食品中の有機異物を検知する技術開発を目的とした。

2．方　　法

異物検査装置は，金検やＸ線が主流である。最近では，高感度な金属検出を実現した超電導磁気センサ[2]，飲料やレトルトパックなどの流体中の異物検出が可能な超音波[3]，検出困難であった虫やプラスチックなど誘電率の低い有機物を検出できる近赤外（near infrared，以下NIR）光[4]やテラヘルツ（terahertz，以下THz）波[5]が次世代異物検知技術として注目されている。

独自開発したNIR光異物検知法[6~8]は，**Fig. 1**より，近赤外光源と試料，カメラに２枚の偏光子を試料前後に配置した光学系である。光源からの検査光を試料に照射し，試料から透過する光をカメラで受光，撮像画像を解析することで異物検知

© The Ito Foundation



[6] 特許第 6454923 号, [7] 特許第 6451980 号, [8] 検査技術, 第 22 巻, 6 号, 58—61（2017 年）

Fig. 1　独自開発した近赤外光異物検知法

画像を得る。ここで，２枚の偏光子の透過軸方向を平行ニコル（以下*P*）と直交ニコル（以下*C*）のそれぞれに配置した。偏光*P*では，試料からの正透過光と異物による光散乱の影響を受け，その一部の散乱光が第２の偏光子（Analyzer，以下*A*）を透過する。これに対し，偏光*C*では，試料からの正透過光は偏光子*A*で除去され，原理上その透過光は０となる。しかし，先と同様で異物による光散乱の影響を大きく受けた光のみが偏光子*A*を透過する。ここでは，偏光保持のための治具を３Ｄプリンタで製作した。

３．結果と考察

本研究開始前の事前検討で，近赤外領域において，ロースハムの光吸収が小さいことを確認した（**Fig. 2** 参照）。これは，近赤外光をよく透過することに相当する。そこで本研究では，中心波長850　nmのLED光源を用いた。なお，LEDの発光特性を同**Fig. 2** に示す。また，これに並行して，ロースハムのハイパースペクトル像を取得し，素材面内での可視および近赤外領域での個体差を確認した。

近赤外光異物検知法によるロースハムに混入した異物（天然ゴムラテックス製の手袋片）の撮像および解析結果を**Fig. 3** に示す。目視画像より，異物であるゴム手袋片は確認できない。偏光*P*より，試料と異物の光吸収差から透過光量が変化し，赤身と脂身，異物を確認した。また，肉厚等による光学的不均一も鮮明に撮像された。偏光*C*では，本来透過しない光が試料を介し，偏光を解消，そして偏光子*A*を透過する偏光成分（散乱光）を撮像した。これより，少ない透過光量で画像*P*と異なる試料情報を得たと考える。そこで，画像*P*を画像*C*で差分，演算処理することで，ノイズ成分を除去し，異物のみを抽出した異物検知画像を得た（**Fig. 3** の枠内参照）。本比較として，異物有無の対照試料による異物検査を行うも，ノイズがなくなり，異物の位置を特定できることから偏光の優位性が容易に理解できる。以上のことから，光制御と画像処理を駆使することで食肉中の有機異物検知に成功した。

ロースハム（厚さ1.4mm／枚）中のゴム手袋片

© The Ito Foundation

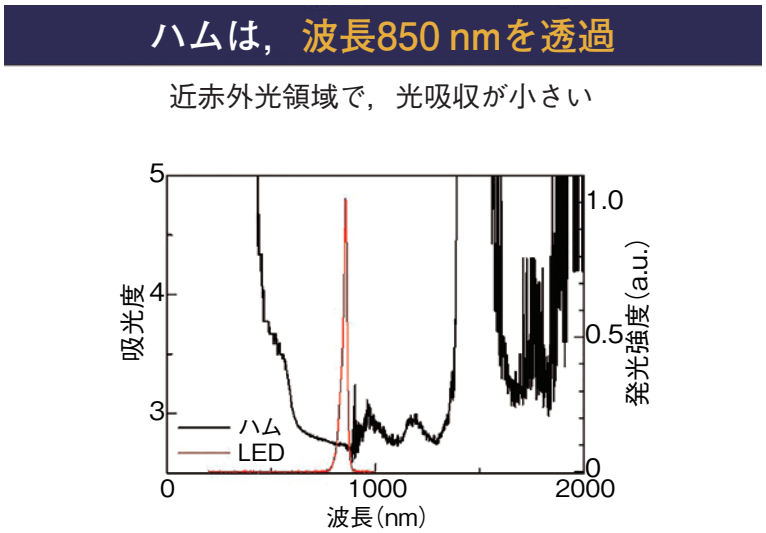


Fig. 2　ロースハムの吸光度スペクトルと、LED光源の関係

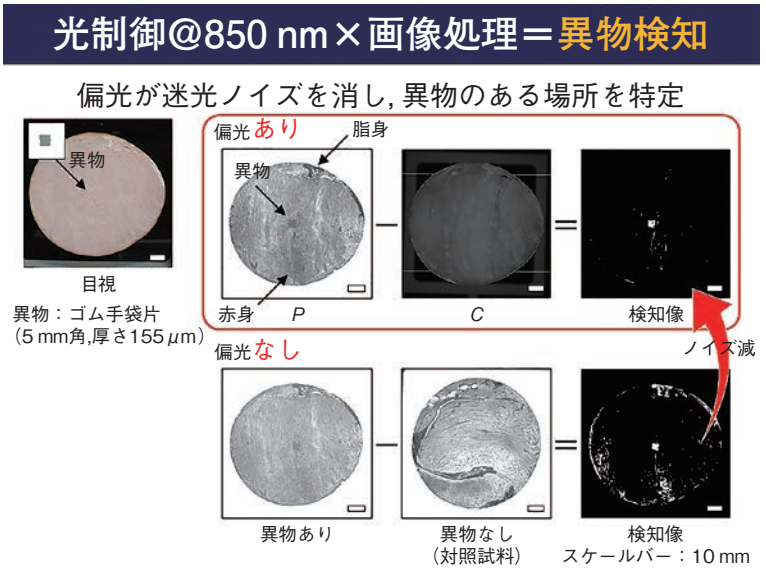


Fig. 3　異物検知例（ロースハム中のラテックス手袋片）

の検知に成功した（**Fig. 3** 参照）。また，透過系での検討を進める中で，ハムの肉厚と脂身で偏光性を失った。前者では，厚さ４～５mm（４枚相当）になると，偏光由来の階調差が見られない。そこで，反射系を組み合わせ，これで肉表層を捉え，厚さの検知精度の向上を提案した。まずは，単純な反射系を構築し，ロースハム中の金属フィルム片の検知を検討したところ，これに成功した（**Fig. 4** 参照）。一方の後者では，ロースハム１枚の厚みの脂身が，異物（手袋片）と同じように現れ，区別が難しい（脂身と異物の光吸収量が類似）。そこで，THz波を組み合わせ，これで脂身

© The Ito Foundation

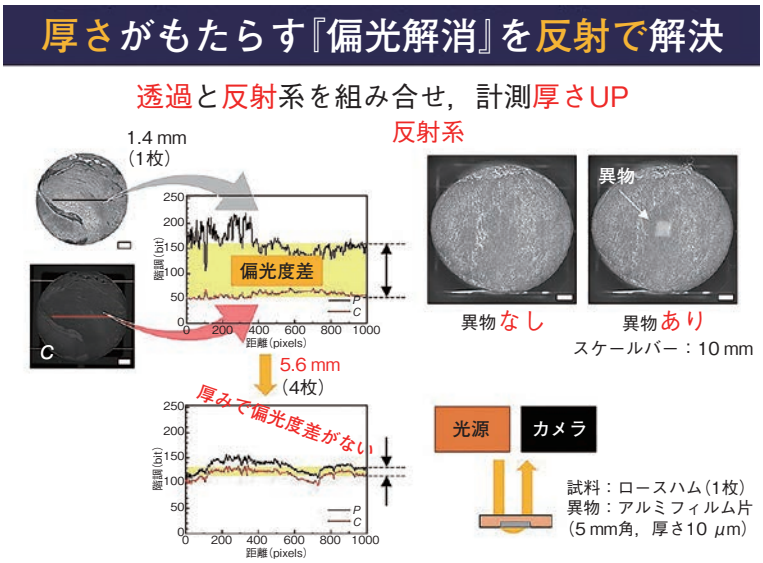


Fig. 4　偏光で見る限界（厚み編）

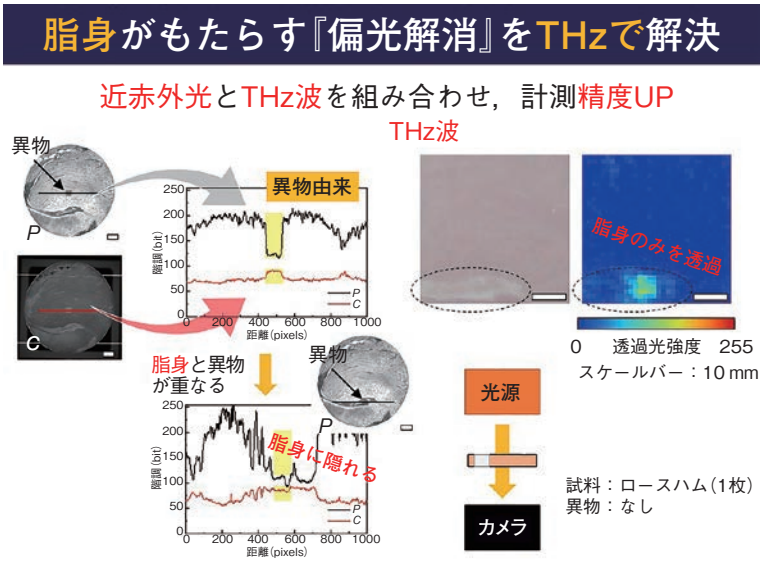


Fig. 5　偏光で見る限界（脂身編）

内を捉え，部位の検知精度の向上を提案した。例えば，THz波を用いると，脂身のみの透過を確認し，この可能性を見出し（**Fig. 5** 参照）。一方で，素材の個体差や異物種による多種多様な検知像，そこからの異物のみの抽出など，今後の課題も明らかになった。これらは引き続き，伊藤記念財団令和４年度研究助成申請書として提案する。

4．要　　約

近赤外光と偏光による異物検知法を用い，ロースハム中の有機異物の検知に成功した。これは，偏光を用いない異物有無の対照試料による異物検

© The Ito Foundation

査法と比較しても，迷光ノイズを減らし，異物の位置を特定できることから，偏光の優位性を証明した。さらに，肉厚と脂身で偏光性を失うも，反射系やTHz波を組み合わせることで，検知精度の向上が期待できる。なお，これらの研究成果は，雑誌２報と展示２件（うち１件は，口頭発表を含む）である[9～12]。

文　献

1） https://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20150126_1.html
2） 田中三郎：高感度磁気センサの非破壊検査への応用　SQUIDを用いた食品および電池内異物検査，非破壊検査，**63**，5，556～561，2014.
3） 穂積直裕，伊藤智啓，市毛将司，小林和人：超音波を利用した食品中異物検出の可能性，包装技術，**51**，11，917～922，2013.
4） 早崎芳夫，武市裕司，坂東弘康，大田昌平：近赤外光による食品中の混入異物の検出，*O plus E*，**31**，7，749～753，2009.
5） 萩行正憲，谷正彦，長島健：テラヘルツ波応用技術，応用物理，**74**，6，709～717，2005.
6） 森智博，德本真一，鳥飼仁，前田良栄，山口堅三，中野聖司，益田一剛，服部修藏：食品検査装置，特許第6454923号，2018年12月28日登録
7） 森智博，德本真一，鳥飼仁，前田良栄，山口堅三：画像生成装置，特許第6451980号，2018年12月21日登録
8） 山口堅三，森智博，德本真一，鳥飼仁：近赤外LED光による食品中の異物検出の最新動向，検査技術，**22**，6，58～61，2017.
9） 山口堅三，大津朋也，釜野勝，獅々堀正幹：食品ロスゼロ社会を目指す光異物検査技術，FOOM技術ジャーナル，**16**，2，25～32，2022.
10） 山口堅三，大津朋也，獅々堀正幹，釜野勝：近赤外光と偏光による食品の異物検知とその可視化，クリーンテクノロジー，**32**，6，54～58，2022.
11） 山口堅三：イノベーションジャパン2021大学見本市Online，2021年８月23日-９月17日
12） 山口堅三：FOOMA JAPAN2022国際食品工業展，東京ビッグサイト，2022年６月７日-10日

© The Ito Foundation

ニワトリ骨格筋成長に遺伝子変異が及ぼす影響の全ゲノム解析に基づく解明

Whole-genome analysis of the effects of genetic mutations on chick skeletal muscle growth

石　原　慎　矢
（日本獣医生命科学大学応用生命科学部）

Shinya Ishihara
（Faculty of Applied Life Science, Nippon Veterinary and Life Science University）

This study focused on broilers showing differences in growth rate even when reared under identical conditions. The expression of various genes controls growth. Gene expression varies depending on environmental and genetic factors. One of these factors is single nucleotide polymorphisms (SNPs), which affect gene expression levels. This study used a next-generation sequencer to extract genetic variation between fast- and slow-growing individuals to search for factors that influence growth differences within the same breed. Furthermore, to detect characteristic gene regions in Japanese native chickens, experiments were conducted on the Yakido and Tosa-Jidori breeds to detect regions with significant genetic differentiation from broilers. The next-generation sequencing analysis subjected four broilers from the Yakido and Tosa-Jidori breeds to four broilers from the rapid- and slow-growing groups. The gene mutations were extracted by *in silico* analysis for statistical analysis and ZFst calculation. SNPs at 708 loci were found to be significantly segregating between the fast- and slow-growing meat chicken groups (permutation test $p = 0.01249$). In addition, 36 loci showed complete segregation of genetic variation between the two groups ($p<0.0001$). These mutations were located within the UCHL3 and DPP4 regions; ZFst was high for genes such as UCHL3 and PARK2. FGFR2 and FBXO30 were detected as genes related to growth among the genes that showed significant differences in the analysis by permutation test. Both Yakido and Tosa-Jidori breeds of Japanese native chickens showed high Fst for the MYH1A gene. INSR in Yakido and MYH15 in Tosa-Jidori showed higher ZFst than broiler, respectively. Although further studies are needed on the effects of these mutations on gene expression and individuals, the findings on gene differences within the same breed and the unique gene regions of native Japanese chickens are expected to be applied to chicken meat production in Japan in the future.

1．目　　的

肉用鶏は高い産肉性が得られるように選抜された系統であり，我が国における主要な動物性タンパク質源である。しかしながら，生産現場では異なる品種間においてはもちろんのこと，同一品種の肉用鶏においても成長（体重や骨格筋の増加量）に大きな個体差が生じることが問題となって

© The Ito Foundation

いる。個体間の成長差により，本来出荷できる日齢であっても飼養期間を延長する必要があり，飼料などの生産コストが増大する[1)]。成長差の要因として外部からのストレスや飼料摂取量の違いなどからなる環境的要因と，遺伝子の違いから生じる形質の差などの遺伝的要因に分けられる。可食部の大半を担う骨格筋の重量は骨格筋の合成速度と分解速度の調節によって維持されている[2)]。同様に骨格筋の合成と分解の差によって骨格筋成長は調節されていることが明らかになっており[3, 4)]，それぞれ多くの遺伝子が関与することが報告されている[5)]。成長の違いは関連遺伝子の遺伝子発現量に起因すると考えられるが，遺伝子発現量に影響を与える要因として一塩基多型（SNP）が知られている。これまで肉用鶏の産肉増産に関する遺伝的研究は国内外で広く行われているが，同一品種内での比較はほとんど行われていない。本研究では，同一品種内での成長速度の差の要因を解明するため，次世代シークエンサー解析法を用いて遺伝子変異のある座位（SNP）を特定することを目的とする。また，農林水産省の鶏の改良増殖目標では，消費者の多様なニーズに対応した鶏卵や鶏肉の安定供給を実現するためには，日本の気候などの飼養条件に適応した多様な国産鶏種の改良・育成が必要であるとしている[1)]。本研究では，日本在来鶏における遺伝子にも着目し，次世代シークエンサー解析法を用いて肉用鶏と差異のある遺伝子領域を特定する。

２．方　　法

飼養環境（飼料，環境温度）を揃えた条件で雄の肉用鶏（ブロイラー，ｎ＝100），八木戸種（ｎ＝20）および土佐地鶏（ｎ＝20）をそれぞれ群飼育する。肉用鶏については初期成長期の増体量を調べ，同品種内個体を急速発育群（上位５％），遅発育群（下位５％）に分けた。八木戸種および土佐地鶏については健康なオスを４個体ずつそれぞれ選抜した。これらの個体はブロイラーについては35日齢まで，八木戸種および土佐地鶏については14日齢まで同一条件で飼育し，安楽死後血液および組織を採取した。血液からDNAを抽出し急速発育群４羽，遅発育群４羽，八木戸種４羽および土佐地鶏４羽の合計16羽について次世代シークエンサー解析（NovaSeq6000）を実施した。得られたショートリードシークエンスデータをBWA-MEMプログラムを用いてニワトリのリファレンスゲノムであるbGalGal1 maternal broiler GRCg7b上にマッピングした。その後，全ゲノム解析プログラムSamtools，PicardおよびGATKのHaplotypeCallerおよびGenotypeGVCFsを用いて遺伝子変異を抽出した。また，GATKのVariantFiltrationを用いて“QD＜2.0 ‖ FS＞60.0 ‖ MQRankSum＜－12.5 ‖ MQ＜40.0 ‖ ReadPosRankSum＜－8.0”の条件で，それぞれの遺伝子変異に対してフィルタリングを行った。さらに，SNPeffプログラムを用いて各座位に遺伝子情報のアノテーションを行った。統計解析にはゲノムワイド解析plinkプログラム[6)]を用いて，各群におけるSNPを並べ替え検定によって比較した。さらに，vcftoolsを用いて各群間における領域ごとの遺伝的分化係数（Fst）を算出した。ここでwindow sizeは10000bpで行った。

３．結果と考察

3.1　肉用鶏品種内における遺伝子変異

肉用鶏の急速発育群と遅発育群において合計10,777,731の変異が確認された。ここで関連解析からSNPの分離が特に顕著であったもの（ｐ＝0.00006.33，0.0004192あるいは0.0001828）に着目すると708座位のSNPが確認できた。また，二群間で遺伝子変異に完全に分離が見られ，それぞれホモ接合であった座位は36箇所であった（ｐ＝

© The Ito Foundation

0.00006.33)。このうちUCHL３遺伝子をコードするchr１：154978458－154981453の領域に計10座位が存在していた。これ以外のSNPは完全に分離していたわけではないが，合計156の遺伝子上に顕著な分離があるSNPが存在していた（並べ替え検定ｐ＝0.01249)。このうち骨格筋の成長に関連する遺伝子として報告されており，かつ複数の遺伝子変異を示したものはTBC1D4，FGFR2およびFBXO30などがあげられる。遺伝子内にそれぞれ163，17および８座位の変異を持っており，急速発育群と遅発育群間で片方の群がホモ接合なのに対し，一方の群はヘテロあるいは異なる塩基によるホモ接合であった。また，ZFstを調べたところ，UCHL3，DPP4などの遺伝子において有意な差が見られた（**Fig. 1**）。

UCHL3は脱ユビキチン化機能が強く示唆されている酵素をコードする遺伝子である。マウスを用いた研究ではUCHL3をノックアウトすることで骨格筋にユビキチン化タンパク質が顕著に蓄積していた[7]。ユビキチン化されたタンパク質はプロテアソームにより分解される標的となるため，UCHL3の発現が変化することで骨格筋分解に影響を与えることが示唆されている。さらに，興味深いことにマウス細胞を用いた実験ではUCHL3をノックアウトすると下流シグナルであるAktのリン酸化は起きるがFoxo1のリン酸化が起きなくなった[8]。ニワトリにおいてFoxo1はリン酸化されることでatrogin-1やMuRFなどの骨格筋分解を促進するユビキチンリガーゼ遺伝子を抑制することが知られている[9]。そのため，UCHL3が発現することでタンパク質分解は強く抑制される可能性が示唆された。

DPP4は，インスリン分泌促進ホルモンであるインクレチンを阻害する。そのため，DPP４阻害剤が糖尿病の薬として使われている。また，DPP4は成長ホルモンであるIGF-1を分解することも報告されている。今回の研究で検出された変異が遺伝子発現にどのように影響を及ぼすかについては今後さらなる調査が必要であるが，同じ系統集団内で顕著な遺伝子変異が見られたこと，明確な成長速度の違いがあることからUCHL3やDPP4の変異による影響が可能性の一つとして示唆された。

このように同一品種内でも遺伝的分化あるいは有意に変異が存在する遺伝子が複数同定された。これらの変異はほとんどが非コード領域であるイントロンにおける変異である。近年の報告で塩基の変異は遺伝子発現量のみならずmicroRNAの構造に影響を及ぼし，骨格筋成長に影響を及ぼす報告もある。今回検出された変異が個体に与える生物学的影響を明らかにしていくことで食肉生産の効率化に寄与することが期待できる。

3.2　肉用鶏－日本在来鶏間における遺伝子変異

完全に分離が見られたSNPは肉用鶏－八木戸間で290034座位，肉用鶏－土佐地鶏では201105座位であった。ZFstの結果を**Fig. 1** に示す。どちらの在来鶏でもMYH1Aの遺伝子が肉用鶏との間に高いZFstを示していた。MYH1Aは，ミオシン重鎖（MYHC）ファミリーのメンバーであり，ミオシンは筋収縮組織の構成要素である。中国在来鶏を用いた研究では４週齢と８週齢で発現が異なることが報告されており，MYH1Aが初期成長および発育に影響を与える可能性が示唆されている。八木戸および土佐地鶏がどちらも肉用鶏との間に高いZFstを示した遺伝子はSEMA3CとFAM19A5があった。これらの遺伝子は骨格筋への影響は報告されていないが，在来鶏特有の遺伝子型なのかもしれない。

八木戸－肉用鶏間のみに高いZFst見られた遺伝子としてINSRがある。INSRはインスリンレセプターをコードする遺伝子である。インスリンは

© The Ito Foundation

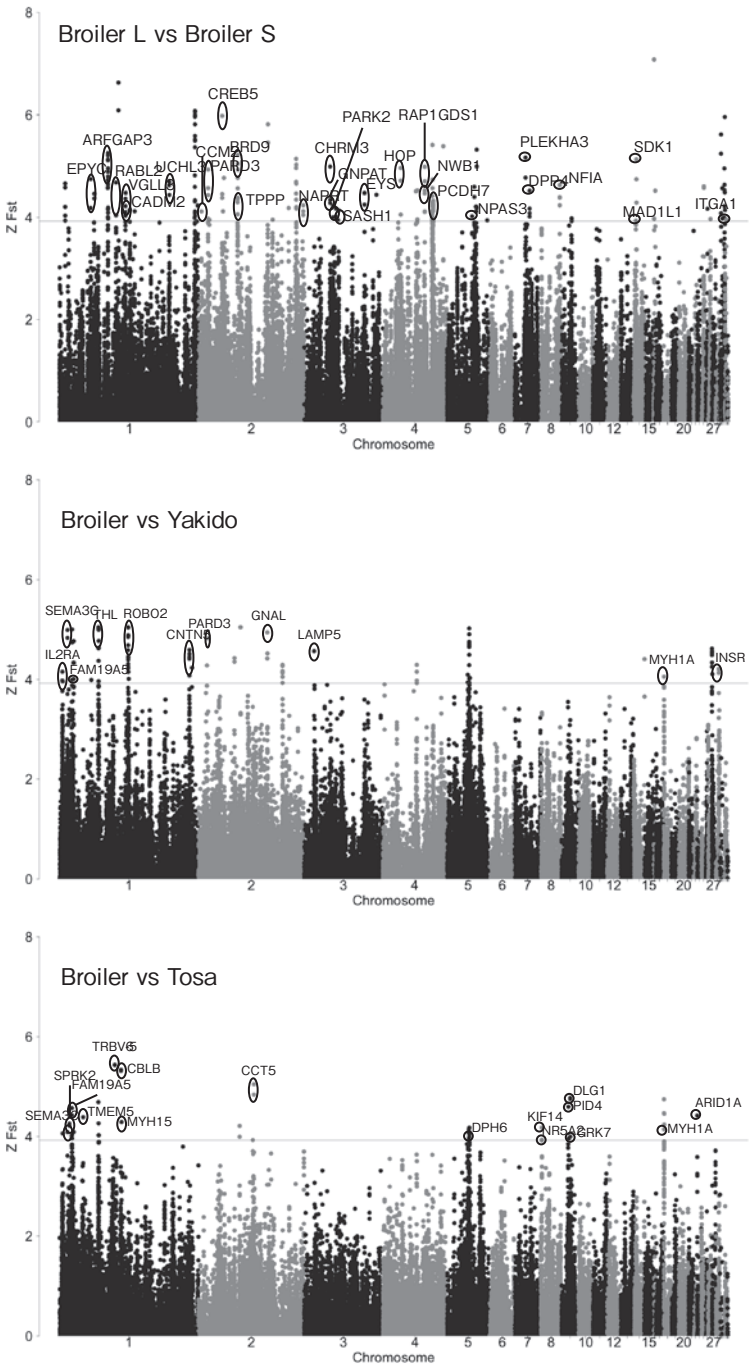


Fig. 1　Genetic differentiation coefficients at each genomic position in broilers, Yakido, and Tosa-Jidori chickens. Gene regions with ZFst values greater than 3.925 are considered significant and are indicated by blue horizontal lines. The horizontal axis shows each chromosome and genomic position, which does not include Z and W chromosomes. Each point represents a 10 kb window and its ZFst. If the ZFst value is high and the corresponding region encodes a gene, the gene name is noted. The top-left panel shows the ZFst between the fast and slow-growth groups of broilers, the Bottom-left panel between broilers and Yakido, and the right panel between broilers and Tosa-Jidori.

© The Ito Foundation

骨格筋のタンパク質合成を促進して，分解を抑制する働きが知られている。高いZFstを示したことが必ずしも遺伝子発現に影響するわけではないが，高い遺伝子的な差異は個体の成長に影響を及ぼしているかもしれない。

土佐地鶏－肉用鶏間ではMYH15が高いZFstを示した。MYH15もMYH1Aと同様に骨格筋構成に関わる遺伝子である。特に土佐地鶏は在来鶏の中でも小さい体躯が特徴的であり，MYH15の変異は土佐地鶏の特徴に関与しているのかもしれない。

本研究では，同一品種内で成長差を示した個体間におけるSNPについて次世代シークエンサーを用いて検出した。さらに，日本在来鶏である八木戸および土佐地鶏と肉用鶏間で遺伝的に分化している領域を検出した。これらの変異が遺伝子発現や個体に与える影響については，さらなる研究が必要である。しかしながら，同一品種内における遺伝子の差異および日本在来鶏固有の遺伝子領域についての知見は，今後の我が国における鶏肉生産への応用が期待できる。

4．要　約

本研究では，肉用鶏であるブロイラーが同一条件で飼育しても成長速度に差異が生じることに着目した。成長はさまざまな遺伝子の発現によりコントロールされている。遺伝子発現は環境要因や遺伝的要因によって変化する。その要因のひとつとして一塩基多型（SNP）が遺伝子発現量に影響を与えることが知られている。そこで本研究では，同一品種内における成長差に影響を及ぼす要因を探索するため，成長の早い個体と遅い個体間における遺伝子変異について次世代シークエンサーを用いて抽出した。さらに，日本在来鶏における特徴ある遺伝子領域を検出するため，八木戸品種および土佐地鶏品種について肉用鶏と遺伝的分化が顕著な領域の検出を目的として実験を行った。ブロイラーから急速発育群および遅発育群，八木戸種および土佐地鶏からそれぞれ４個体を次世代シークエンサー解析に供した。*In silico*解析により遺伝子変異を抽出し，統計解析およびZFstを算出した。肉用鶏の急速発育群と遅発育群から分離が顕著な708座位のSNPが確認できた（並べ替え検定 p ＝0.01249）。また，二群間で遺伝子変異に完全に分離が見られた座位は36箇所であった（ p ＝0.00006.33）。これらの変異はUCHL3やDPP4領域内に存在していた。ZFstはUCHL3やPARK2などの遺伝子が高い値を示した。また，並べ替え検定による解析で有意な差が見られた遺伝子の中で成長に関わる遺伝子としてTBC1D4，FGFR2およびFBXO30が検出された。日本在来鶏からは八木戸，土佐地鶏どちらの品種もMYH1A遺伝子が高いFstを示した。また，八木戸においてはINSRが，土佐地鶏ではMYH15が肉用鶏との間にそれぞれ高いZFstを示した。これらの変異が遺伝子発現や個体に与える影響についてはさらなる研究が必要であるが，同一品種内における遺伝子の差異および日本在来鶏固有の遺伝子領域についての知見は，今後の我が国における鶏肉生産への応用が期待できる。

文　献

1） 農林水産省：鶏の改良増殖目標, 2021.
2） Russell, A. P.：*Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **37**(3), 378～384, 2010.
3） Goldspink, D. F.：*Biochemical Journal*, **156**, 71～80, 1976.
4） Goldspink, D. F., Goldspink, G.：*Biochemical Journal*, **162**, 191～194, 1977.
5） Mohammadabadi, M., Bordbar, F., Jensen, J., Du, M., Guo, W.：*Animals*, **11**(3), 1～25, 2021.
6） Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., De Bakker, P. I. W., Daly, M. J., Sham, P. C.：*American Journal of Human Genetics*, **81**(3), 559～575, 2007.

© The Ito Foundation

7） Setsuie, R., Suzuki, M., Tsuchiya, Y., Wada, K.：*Neurochemistry International*, **56**(8), 911～918, 2010.
8） Suzuki, M., Setsuie, R., Wada, K.：Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L3 promotes insulin signaling and adipogenesis, *Endocrinology*, **150**(12), 5230～5239, 2009.
9） Shimamoto, S., Ijiri, D., Nakashima, K., Kawaguchi, M., Ohtsuka, A.：*General and Comparative Endocrinology*, **267**, 45～50, 2018.

© The Ito Foundation

早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明

Genetic factor associated with calf mortality with preterm birth

平野　貴[1]・村木　英二[2]・佐々木　慎二[3]

([1]東京農業大学農学部，[2]岐阜県畜産研究所飛騨牛研究部，[3]琉球大学農学部)

Takashi Hirano[1], Eiji Muraki[2] and Shinji Sasaki[3]

([1]Tokyo University of Agriculture, Faculty of Agriculture, [2]Gifu Prefectural Livestock Research Institute, Hida Beef Cattle Research Department, [3]Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

Weak calf syndrome (WCS) is a collective term for clinically unexplained calf weakness, and is thought to account for about 60% of neonatal deaths in Japanese Black cattle. IARS disorder is recessive genetic disease, which is caused with *IARS* c.235G>C (p.Val79Leu) mutation. The *IARS* mutation was identified as one of causative mutation for WCS. It had started to perform a DNA test for IARS disorder, and it was shown that there was WCS, which could not be accounted for by the *IARS* mutation. Therefore, to identify other causative mutations for WCS, we had performed homozygosity mapping and linkage analysis in a paternal half-sib family using WCS affected offspring of Bull A, which was not carrier for the *IARS* mutation. The analysis had made detect us candidate region-1 and 2 for WCS.

In candidate region-1 and 2, it was found that causative genes for same human genetic renal disease were located (*Gene-1* and *2*, respectively). Therefore, we hypothesized that affected calves for the WCS carried a *Gene-1* mutation by homozygous and a further *Gene-2* mutation, and searched mutations of *Gene-1* as a candidate gene. Five nonsynonymous substitutions were detected in *Gene-1*. Of these 5 SNPs, 4 SNPs were predicted as "probably damaging", and 2 SNPs of the 4 SNPs were located in a region interacting with a protein coded by *Gene-3*. Furthermore, *Gene-3* was a causative gene for same human genetic renal disease as *Gene-1* and *2*. Therefore, it was thought that more detail analysis for *Gene-1* was needed as candidate gene.

1．目　的

虚弱子牛症候群（WCS：Weak Calf Syndrome）は，吸乳欲の減退や起立困難などの虚弱症状を示し，発症の原因を臨床的に特定できないものの総称である。また，子牛死亡の主要な原因であり，黒毛和種における新生子死亡の約60％を占めると考えられている。WCSの発症には，さまざまな要因が関係していると考えられているが，発症率が父方と母方の家系によって異なることから，遺伝的要因が関係するものも存在すると考えられている[1)]。

IARS異常症は，イソロイシルtRNA合成酵素（*IARS*：*isoleucyl-tRNA synthetase*）遺伝子の塩基置換（c.235G>C）に伴うアミノ酸置換（p.Val79Leu）が原因で発症する黒毛和種でみられ

© The Ito Foundation

る常染色体劣性の遺伝的不良形質である。この*IARS*変異はWCSの原因の一つとして同定された[2)]。しかし，この*IARS*変異を保有せず，IARS異常症とは異なる原因で死亡するWCS発症個体が確認されている。そのため，黒毛和種の子牛死亡発生を低減させるために，新たな子牛死亡の原因遺伝子変異を特定し，交配のコントロールを可能にするDNA診断法を開発する必要がある。

我々は，新たな子牛死亡の原因となる遺伝子変異を探索するために，生後20日以内に死亡した黒毛和種子牛を大規模に収集した。そのうち，*IARS* c.235G>Cを保有しない特定種雄牛（種雄牛Ａ）の産子でWCSと診断され，しかも早産を伴う個体を用いてホモ接合マッピングを行った。また，この集団を父方半きょうだい家系として使用して連鎖解析を試みた。その結果，ホモ接合マッピングと連鎖解析でそれぞれ異なる染色体領域を１ヶ所ずつ検出した（候補領域−１と２）。このことから，このWCSはホモ接合マッピングにより検出された候補領域−１に位置する原因遺伝子変異をホモで保有するとともに，連鎖解析によって検出された候補領域−２に位置する原因遺伝子変異をヘテロまたはホモで保有することにより発症すると考えた。

そこで，これら候補領域から遺伝子変異を同定するために，黒毛和種多様体データベースよりSNPを抽出し[3)]，変異探索を試みた。

２．材料および方法

2.1　共試個体

候補原因遺伝子の変異を探索するために，マッピングに用いた種雄牛Ａとその発症産子および正常産子からなる父方半きょうだい家系から，変異探索用個体として種雄牛Ａ，発症産子２頭および正常産子１頭を選抜し，これらのゲノムDNAを用いた。

2.2　変異探索

候補原因遺伝子（*Gene-1*）のエクソンおよびその周辺に位置する変異を探索するために，*Gene-1*の各エクソンをカバーするようにイントロン領域にプライマーを配置した（**Fig. 2**）。プライマーの設計は，ゲノム配列（ARS-UCD1.2）に基づいて行った。これらプライマーセットを用いて，変異探索用個体のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRし，得られた増幅産物をダイレクトシーケンスすることで変異を探索した。検出された変異でアミノ酸置換を伴うものについて，アミノ酸置換のタンパク質機能への影響をPolyPhen-2（http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/）で予測した。

３．結果と考察

黒毛和種多様体データベースより，候補領域−１内に位置するSNPを抽出した。しかし，種雄牛Ａ産子で発症するWCSの原因と思われる変異は検出されなかった（data not shown）。

多様体データベースのSNPデータには，Hardy-Weinberg平衡（HWE）検定データが付属されている。そこで，このデータを用いて，黒毛和種集団において候補領域−１内でアレル頻度に偏りがある部位を探索した。HWE検定（χ^2検定）により有意差（$p<0.05$）が検出されたSNPの出現頻度を，18.8Mbにわたる候補領域−１を４分割して確認したところ，セントロメア側の区画（１〜4,695,400nt）で最も頻度が高かった（**Table 1**）。この区画における，HWEに従わないSNPの分布を確認したところ，有意SNPが集中する広い部位が存在し，この部位には６種の遺伝子が位置していることが分かった（**Fig. 1**）。これら６遺伝子の１種（*Gene-1*）は，ヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子の一つとして知られる遺伝子であった。そこで，候補領域−２に位置する遺伝子を調

© The Ito Foundation

Table 1　Frequency of SNP which deviated from HWE

Relative position in the candidate region-1			SNPs in the interval		Freq. of p<0.05 SNP
			p<0.05（χ^2 test）	All	
1	–	4,695,400	937	5,178	0.18
4,695,401	–	9,388,500	481	7,425	0.06
9,388,501	–	14,026,000	189	6,343	0.03
14,026,001	–	18,781,788	176	5,798	0.03

HWE : Hardy–Weinberg equilibrium

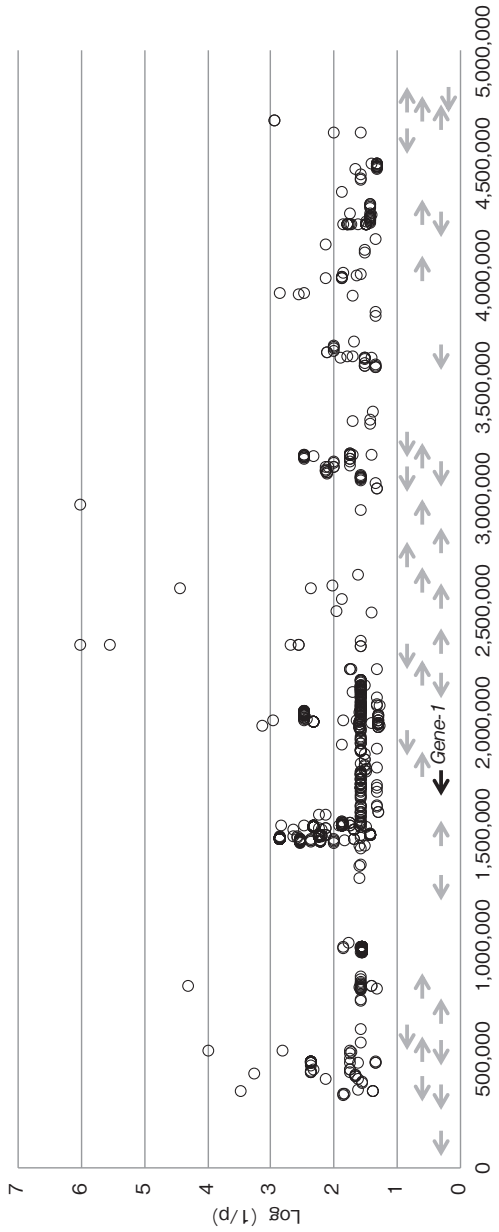


Fig. 1　Distribution of p-values for each SNP deviated from the Hardy–Weinberg equilibrium in candidate region-1
Open circle indicate p-value detected with χ^2 test of each SNPs. Arrow indicates gene and its direction.

© The Ito Foundation

べたところ，同じ遺伝性腎疾患の別の原因遺伝子やこの腎疾患に関連すると思われる遺伝子が存在することが分かった。これらのことから，この種雄牛Ａ産子で見られるWCSは候補領域−１に位置する原因遺伝子変異をホモで保有し，さらに，候補領域−２に位置する原因遺伝子変異を保有することで発症すると考えた。したがって，*Gene*−1を候補領域−１の有力な候補原因遺伝子と考え，変異を探索した。

*Gene−1*は25種のエクソンからなるゲノムの61,048bpにわたるアンチセンス鎖の遺伝子である。これらエクソンをカバーする各プライマーセットを用いて変異を探索したところ，23種のSNPが検出され，これらの11 SNPsがエクソン領域に位置していた。さらに，これら11 SNPsの5 SNPsが非同義置換であり，２SNPsが同義置換であった。残りの4 SNPsは3' UTRに位置していた（**Table ２**，**Fig. ２**）。非同義置換の５SNPsはc.284C>T（p.Pro95Leu），c.292C>A（p.Pro98Thr），c.1039C>T（p.Arg347Cys），c.1084C>T（p.Arg362Trp）およびc.2848A>T（p.Thr950Ser）であり，これらアミノ酸置換のタンパク質機能への影響をPolyPhen−2によって解析したところ，p.Pro95Leu，p.Pro98Thr，p.Arg347Cysおよびp.Arg362Trpが「Possibly damaging」と予測された。特に，c.284C>T

Table 2　Detected SNPs in *Gene−1*

SNP	Amino acid substitution	PolyPhen−2 results
c.284C>T	p.Pro95Leu	Possibly damaging
c.292C>A	p.Pro98Thr	Possibly damaging
c.502+46C>A		
c.503−45C>T		
c.888+63T>G		
c.889−15G>C		
c.1039C>T	p.Arg347Cys	Possibly damaging
c.1084C>T	p.Arg362Trp	Possibly damaging
c.1117+60A>G		
c.1308+33C>T		
c.1308+45G>A		
c.1677T>C	synonymous	
c.1879−201G>A		
c.1879−192A>G		
c.2308+12T>C		
c.2764−34C>T		
c.2848A>T	p.Thr950Ser	
c.2889+141T>C		
c.3019A>C	synonymous	
c.*183G>C	3' UTR	
c.*238G>A	3' UTR	
c.*283T>A	3' UTR	
c.*1846G>T	3' UTR	

© The Ito Foundation

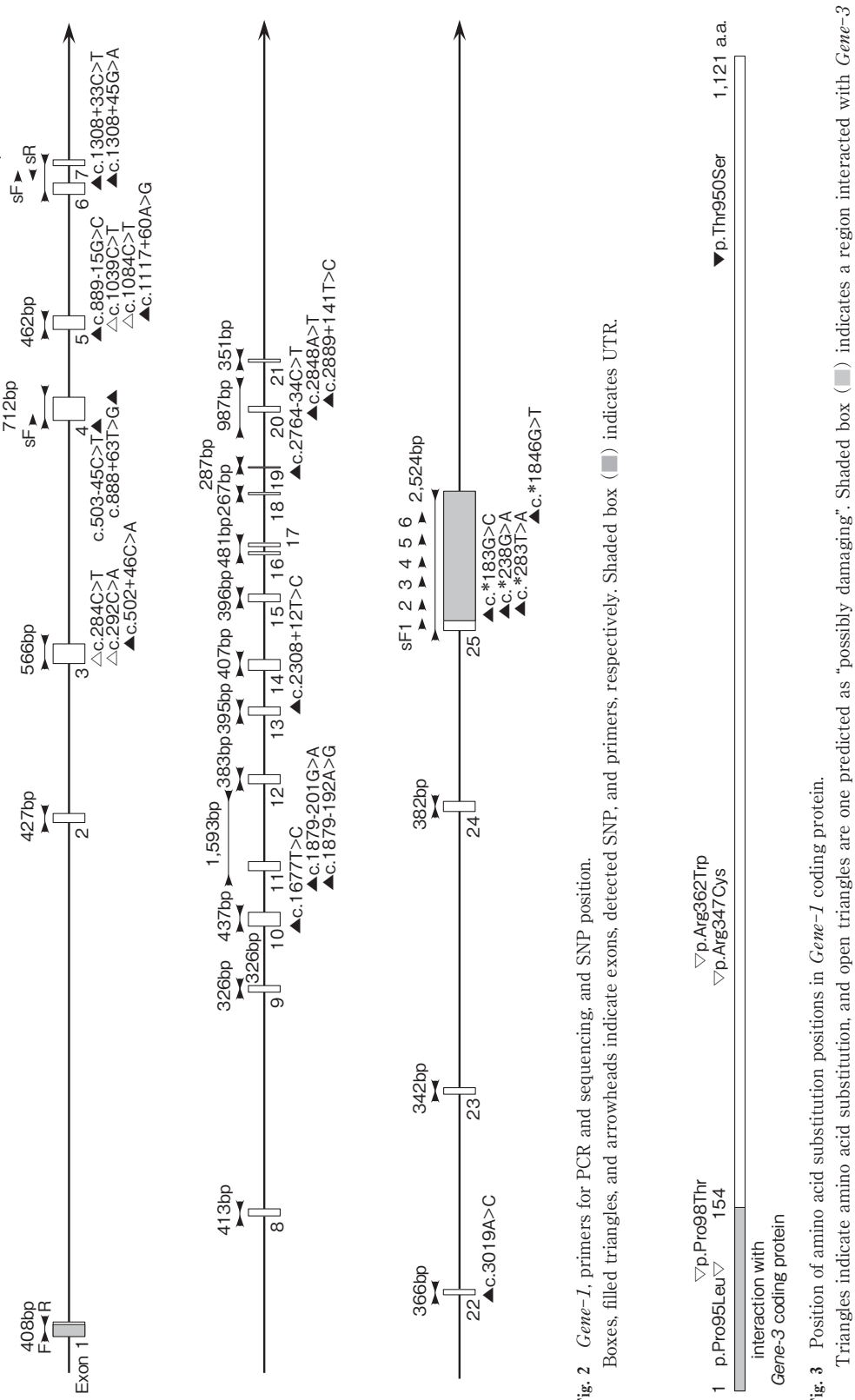


Fig. 2 *Gene-1*, primers for PCR and sequencing, and SNP position.
Boxes, filled triangles, and arrowheads indicate exons, detected SNP, and primers, respectively. Shaded box (■) indicates UTR.

Fig. 3 Position of amino acid substitution positions in *Gene-1* coding protein.
Triangles indicate amino acid substitution, and open triangles are one predicted as "possibly damaging". Shaded box (■) indicates a region interacted with *Gene-3* coding protein.

© The Ito Foundation

（p.Pro95Leu）はdbSNPに登録されていない新規SNPであった。その他のSNPsでスプライシングに関係するなど遺伝子機能に影響すると思われるものはなかった。

次に，*Gene-1*由来タンパク質において，検出されたアミノ酸置換が位置するアミノ酸領域が機能を有するかを確認するために，マウス*Gene-1*由来タンパク質のアミノ酸配列を確認したところ，１～154アミノ酸領域は*Gene-3*にコードされるタンパク質と相互作用する領域であることが分かった（**Fig. 3**）。しかも，*Gene-3*は，*Gene-1*と同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子であることが示されていた。これらのことから，改めて*Gene-1*を候補遺伝子と考え，タンパク質機能に影響すると予測されたc.284C>T（p.Pro95Leu），c.292C>A（p.Pro98Thr），c.1039C>T（p.Arg347Cy）およびc.1084C>T（p.Arg362Trp）について，マッピングに用いた父方半きょうだい家系を型判定し，リスクアレルとハプロタイプの関係を精査する必要がある。また，大規模な正常牛集団におけるアレル頻度を調査し，これら変異とWCSとの関連を詳細に解析していく必要があると思われた。さらに，候補領域−２に位置する同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子（*Gene-2*）または関連遺伝子を候補遺伝子として変異を探索し，同様に解析を進める必要があると思われた。

４．要　約

虚弱子牛症候群（WCS）は，臨床的に原因が特定できない虚弱の総称であり，黒毛和種の新生子死亡の約60％を占めると考えられている。IARS異常症はWCSの原因遺伝子変異の一つとして同定された*IARS* c.235G>C（p.Val79Leu）変異による黒毛和種の劣性遺伝的不良形質である。しかし，*IARS*変異によらないWCSの発症が確認されていることから，新たなWCSの原因遺伝子変異を特定するために解析を進めている。これまでに種雄牛Ａの産子で発症するWCSの候補領域−１と２をそれぞれホモ接合マッピングと連鎖解析によって検出している。これら候補領域−１と２には，同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子（それぞれ*Gene-1*と*2*）が位置することから，*Gene-1*変異をホモで保有し，さらに*Gene-2*変異を保有することで発症すると考えた。そこで，まず候補領域−１に位置する*Gene-1*の変異を探索したところ，５種の非同義置換が検出された。これら5 SNPsの4 SNPsがタンパク質機能に影響があると予測された。また，この4 SNPsの2 SNPsは*Gene-3*がコードするタンパク質と相互作用する領域に位置していた。さらに，この*Gene-3*は，*Gene-1*，*2*と同じ遺伝性腎疾患の原因遺伝子であった。これらのことから，改めて*Gene-1*を候補遺伝子として，さらに詳細な解析が必要であると思われた。

文　献

1） Ogata, Y., Nakao, T., Takahashi, K., Abe, H., Misawa, T., Urushiyama, Y., Sakai, J.:Intrauterine growth retardation as a cause of perinatal mortality in Japanese black beef calves, *J. Vet. Med. A.*, **46**, 327~334, 1999.

2） Hirano, T., Kobayashi, N., Matsuhashi, T., Watanabe, D., Watanabe, T., Takasuga, A., Sugimoto, M., Sugimoto, Y.:Mapping and exome sequencing identifies a mutation in the *IARS* gene as the cause of hereditary perinatal weak calf syndrome, *PLoS ONE*, **21**, e64036, 2013.

3） 佐々木慎二，鈴木穣，森元学，秋山敬孝，福島護之，北村夕貴，田淵一郎，有島太一，長谷川清寿，高山恵，黒木一仁，渡邊学，菅野純夫，杉本喜憲：黒毛和種の生産阻害因子解明のための多様体データベースの構築，日本畜産学会第122回大会講演要旨，2017.

© The Ito Foundation

ウシ複合脊椎形成不全症の病態解析とウシの骨格成長に重要な糖鎖の同定

Pathophysiology analysis of bovine complex vertebral malformation and identification of sugar chains important for bovine skeletal growth

古 市 達 哉

（岩手大学農学部共同獣医学科実験動物学研究室）

Tatsuya Furuichi

(Laboratory of Laboratory Animal Science and Medicine, Co-Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)

Complex vertebral malformation (CVM) is an autosomal recessive severe skeletal dysplasia in Holstein cattle. CVM consists of a range of complex anomalies of the vertebral column and limbs, dysmorphic craniofacial features, cardiac anomalies, and spontaneous abortion or perinatal death. Bovine *SLC35A3* gene has been identified as a CVM-causative gene. SLC35A3 has been reported to be a UDP-N-GlcNAc transporter located in the Golgi membrane, however the pathogenic mechanisms of CVM have been largely unspecified. To address this issue, we generated a *SLC35A3* knockout (KO) mouse strain using CRISPR/Cas9-mediated genome editing. Three hundred and sixty zygotes injected with Cas9 and *SLC35A3* guide RNAs were transferred to pseudo-pregnant mice, and 32 F0 pups were born. Among them, eight pups were dead after birth and exhibited dwarfism, whereas the others were alive with normal body size. The DNA sequencing around the target site showed that the eight lethal pups had the frameshift deletions at both *SLC35A3* alleles and the others had either one or no targeted allele. A stable germline transmission of the edited allele was confirmed in several heterozygous F0 mice, and *SLC35A3* KO mice used in the future experiments were generated by crossing of the heterozygous breeding pairs lacking 17-bp of the coding sequence. *SLC35A3* KO mice at embryonic day 18.5 were found according to the Mendelian ratio, died within a hour of birth, and exhibited severe dwarf phenotypes. *SLC35A3* KO mice exhibited vertebral malformations, including misshaped vertebrae, fusion of vertebral bodies, and fusion and bifurcation of rib. These vertebral malformations were similar to those in CVM patients. In the growth plate cartilage of *SLC35A3* KO embryos, extracellular space was drastically reduced, and many flat proliferative chondrocytes were reshaped. In this study, we succeed in generating *SLC35A3* KO mice and show the usefulness of this mutant mice as an animal model for CVM. To elucidate the pathogenic mechanisms of CVM, we are going to perform the multiple analyses of *SLC35A3* KO mice, including detailed histological, sugar chain, and comprehensive gene expression analyses.

© The Ito Foundation

１．目　　的

複合脊椎形成不全症（CVM）は，ホルスタイン種における周産期致死性の常染色体潜性遺伝病である[1)]。CVM発症個体は，椎骨や肋骨の欠損・癒合，頚椎や胸椎の短縮，側弯など重度の脊椎形成不全を示し，その約８割が妊娠260日までに死流産する。他にも四肢遠位関節の対称性異形成や心奇形などの臨床症状が報告されている。CVM家系の連鎖解析から，CVMの原因遺伝子は糖ヌクレオチド輸送体をコードする*SLC35A3*であることが報告されている[2)]。*SLC35A3*遺伝子はゴルジ体膜上に発現し，UDP-N-アセチルグルコサミン（GlcNAc）を細胞質からゴルジ体内腔へ輸送する糖ヌクレオチド輸送体をコードしている。糖鎖は末端に単糖が付加されることで形成され，この反応は糖転移酵素によって触媒される。糖転移酵素は糖ヌクレオチド（糖供与体）を基質として用い，糖ヌクレオチドの単糖を新しく合成される糖鎖の末端に付加する反応を触媒する。すなわち，糖ヌクレオチド輸送体は，糖転移酵素の基質として用いられる糖ヌクレオチドを細胞質から糖鎖合成の場である小胞体あるいはゴルジ体の内腔へ輸送する役割を担っている[3)]。したがって，CVMは*SLC35A3*の機能不全によって起こる糖鎖の合成不全が原因で発症すると推測されるが，CVM個体ではどのような種類の糖鎖合成が影響を受けているのか，そしてCVMの発症機序はほとんど解明されていない。これらを解明するためにはCVM発症個体のサンプルが必要であるが，CVMの発症頻度は著しく低く，実験に必要なサンプル数の確保は困難である。またCVM個体は周産期致死であるため，糖鎖解析をはじめとする生化学解析が可能となる新鮮なサンプルの入手も困難である。したがって，*SLC35A3*の機能を欠損するモデル動物が必要であり，本研究ではCRISPR/Cas9ゲノム編集システムを用いて*SLC35A3* knockout（KO）マウスを作製した。さらに同マウスの形態学的，組織学的解析を行い，CVMモデル動物として有用性を評価した。

２．方　　法

C57BL/6マウスの受精卵にCas9タンパクと*SLC35A3*をターゲットとしたguide RNAをエレクトロポレーション法で導入した。これらの受精卵は偽妊娠雌ICRマウスの卵管へ移植し，産仔を得た。誕生したF0マウスからゲノムDNAを抽出し，変異の導入をシークエンシングによって確認した。17 bpをヘテロ接合で欠失したF0マウスをライン化した。実験に供する*SLC35A3* KOマウスは17 bp欠失ヘテロマウス同士の交配で妊娠したメスマウスから帝王切開で摘出し，同腹のヘテロKOまたは野生型マウスをコントロールに用いた。胎生18.5日齢マウスの骨格標本を作製し，上腕骨近位端および腰椎の組織切片を作製し，HE染色を行った。

３．結果と考察

ゲノム編集処理した360個の受精卵を仮親に移植した結果，32匹のF0マウスが誕生し，そのうちの８匹は出生後に死亡した。死亡した５匹は*SLC35A3*の両アレルに変異が導入されていた（３匹は解析不可）。生存した24匹のうちの７匹では片側アレルに変異が導入されており，15匹では変異は導入されていなかった（２匹は解析不可）。以上の結果から，*SLC35A3* KOマウスは周産期致死となることが強く示唆されたため，以後の実験に供する*SLC35A3* KOマウスは，17塩基対を欠失するヘテロKOマウスをライン化し，ヘテロKOマウス同士の交配で作製した（**Fig. 1a**）。胎生18.5日齢の胎児を帝王切開で摘出したところ，*SLC35A3* KOマウスは矮小化を認め，摘出１時間

© The Ito Foundation

以内に死亡した（**Fig. 1c**）。帝王切開で摘出した個体数は，野生型：15匹，hetero KO：26匹，homo KO：14匹であり，カイ二乗検定の結果，それぞれの遺伝子型マウスの確率は，メンデルの法則に従った。これらの結果から，*SLC35A3* KOマウスは矮小化し，周産期致死となることが示された。

アルシアンブルー・アリザリンレッド二重染色による胎生18.5日胚の透明骨格標本を作製し，骨格異常の有無を調べた（**Fig. 2**）。野生型と*SLC35A3* KOマウスの二重染色の染色性に大きな違いは見られなかったが，*SLC35A3* KOマウスの骨格は全体的に矮小化していた（**Fig. 2a**）。頭蓋骨の大きさについては，両者で顕著な違いは観察されなかった（**Fig. 2b**）。*SLC35A3* KOマウスの大腿骨および脛骨の長さは，コントロール（野生型＋ヘテロKO）と比べ有意に短縮していた。*SLC35A3* KOマウスの脊椎では，椎骨の癒合・欠損・形態異常といった脊椎形成不全が観察された（**Fig. 2c**）。野生型マウスの肋骨は13対（26本）であるが，KOマウスでは11対（22本）に減少していた（**Fig. 2c**）。KOマウスでは胸骨の癒合が，明らかに遅延していた（**Fig. 2b**，arrow）。以上の結果から，*SLC35A3* KOマウスはCVM罹患ウシと同様に重度の脊椎形成不全を示すことが明らかとなった。

胎生18.5日胚の上腕骨および腰椎の組織切片を用いて，HE染色像を行った（**Fig. 3**）。野生型マウスの長管骨では，端から円形増殖軟骨細胞，扁平増殖軟骨細胞，肥大軟骨細胞から形成される細胞層が観察された。*SLC35A3* KOマウスの上腕骨は明らかに短縮していたが，３層の区別は可能であった（**Fig. 3a**）。しかし，*SLC35A3* KOマウスの円形増殖軟骨細胞，扁平増殖軟骨細胞層では，軟骨細胞外マトリックス領域が著明に減少しており，それに伴い，細胞密度は上昇していた（**Fig. 3b**）。KOマウスの扁平増殖軟骨層では扁平化した細胞が減少しており，扁平増殖軟骨細胞の変形が観察された。KOマウスでは肥大軟骨細胞の小型化も観察された（**Fig. 3b**）。

SLC35A3 KOマウスはCVMと同様に周産期致死となり，重度の脊椎形成不全を呈したことから，CVMモデル動物としての有用性が示された。脊椎は発生過程に一過性に現れる分節構造である

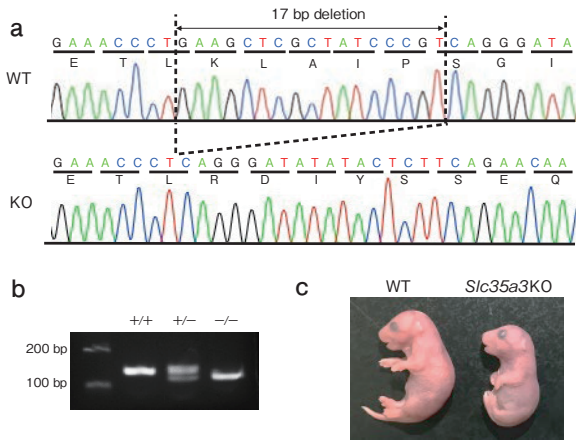


Fig. 1　Generation of *Slc35a3* KO mice by genome editing.
(a) Sequence chromatograms of the edited genomic region in exon 3 of the *Slc35a3* gene. A homozygous 17-bp deletion (c. 256_273del) leading to frameshift occurred in *Slc35a3* KO mice. (b) Agarose gel electrophoresis image of PCR products for genotyping. +/+ : wild-type, +/− : *Slc35a3* heterozygous KO, −/− : *Slc35a3* homozygous KO. (c) Gross appearance of wild-type (WT) and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5.

© The Ito Foundation

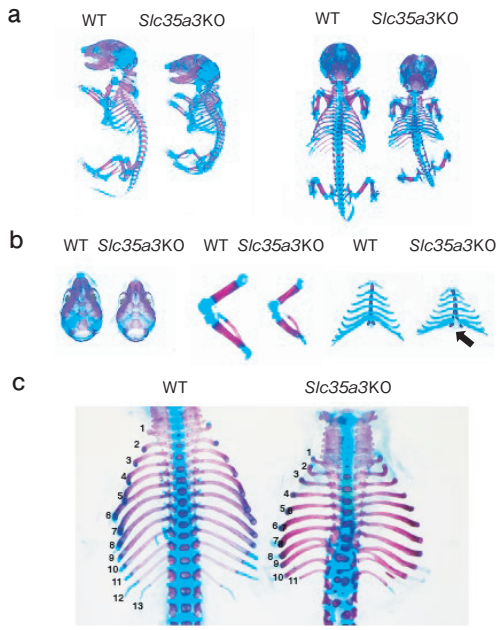


Fig. 2　Skeletal abnormalities in *Slc35a3* KO mice.
Skeletal specimens of wild-type (WT) and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5 were prepared. Calcified tissues were stained red with Alizarin red, and cartilage was stained blue with Alcian blue. (a) whole skeleton. (b) Skull (left), hind limb (middle) and sternum and ribs (light). The black arrow indicates delayed fusion of the sternal bands in *Slc35a3* KO mice. (c) Dorsal view of spine and ribs. *Slc35a3* KO mice exhibited vertebral malformation, including misshaped vertebrae, fusion of vertebral bodies, and fusion and bifurcation of rib.

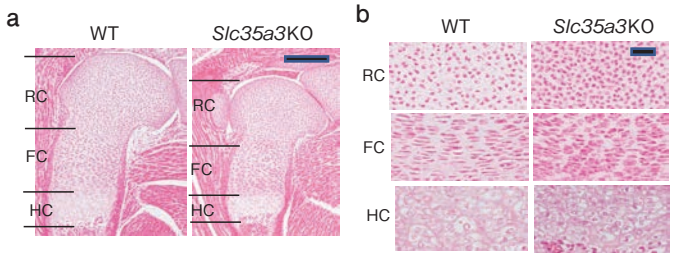


Fig. 3　Cartilaginous extracellular matrix was severely reduced in *Slc35a3* KO mice.
Humerus of wild-type (WT) and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5 were stained with hematoxylin-eosin (HE) solution. (a) low-power magnification image of humerus. (b) High-power magnification image of humerus. PC: round chondrocyte zone, FC： flat chondrocyte zone, HC： hypertrophic chondrocyte zone. The round and flat chondrocytes were well spaced by extracellular matrix (ECM) in WT mice. In contrast, the ECM was decreased and the cell density was increased in the round and flat chondrocyte zones in *Slc35a3* KO mice. The shape of most flat chondrocytes changes to a spindle-like one in the mutant. Scale bars: 100 μm (a), 20 μm (b).

体節に由来しており，体節は胎生中期に未分節中胚葉の前方が一定周期でくびれ切れることで形成される球状の細胞塊である。体節形成は時間的かつ空間的に厳密に制御されており，Notchシグナルが重要な役割を担っている[4]。Notchシグナル伝達では，細胞膜上に発現するNotch受容体と隣接する細胞の膜上に発現するNotchリガンドが直接相互作用することによって，隣接する細胞間でのシグナル伝達が行われる。Notchシグナル系遺伝子のKOマウスでは体節の分節化が不規則に起こり，体節が不整になる。Notch受容体には，細胞外ドメインに36個のEpidermal Growth Factor

© The Ito Foundation

（EGF）様ドメインの繰り返し構造が存在し，これらの細胞外EGFドメインには，O-フコース，O-グルコース，O-GlcNAc糖鎖の３種類のO型糖鎖修飾が起きる[5]。Moloneyらは，Notchシグナルの制御因子であることが知られていたLunatic Fringeが，Notch受容体EGFドメイン上のO-フコース単糖にGlcNAcを転移する糖転移酵素であることを報告した。Lunatic Fringeをコードする*LFNG*の機能消失変異は，ヒトとマウスで脊椎異常を引き起こすことから，Notch受容体上のO-フコースにGlcNAcが付加されることの重要性がうかがえる。これまでの報告からSLC35A3はLunatic Fringeの基質として用いられるUDP-GlcNAcをゴルジ体内腔へ輸送する主要な糖ヌクレオチド輸送体であることが示唆されてきたが，本研究の結果はこの説を強く支持するものである。今後，野生型および*SLC35A3* KOマウスの体節形成期（胎生７日齢から13日齢）の未分節中胚葉における*SLC35A3*発現，Notchシグナル遺伝子の発現をin situハイブリゼーションによって調べることで，Notchシグナル伝達におけるSLC35A3の役割を明らかにする予定である。

胎生18.5日齢の*SLC35A3* KOマウスのHE染色像では，細胞外マトリックスの減少，扁平増殖軟骨細胞の変形，肥大軟骨細胞の小型化が観察された。軟骨細胞外マトリックス中に最も多く存在している糖鎖は，グリコサミノグリカン（GAG）の一種であるコンドロイチン硫酸（CS）である。*SLC35D1* KOマウスと*Csgalnact1/2* double KOマウスはともにCS代謝異常が主な原因で致死的な骨格異常を示すKOマウスであり，両マウスの軟骨組織に認められる異常は，*SLC35A3* KOマウスに認められる異常と類似している[6]。したがって，*SLC35A3* KOマウスではGAGの代謝異常が起きていることが推測されており，今後，*SLC35A3* KOマウスの軟骨組織サンプルを用いたGAG解析を予定している。

４．要　約

私たちが作製した*SLC35A3* KOマウスは，CVMに類似した重度の脊椎形成不全を示し，CVMモデル動物として有用であることが示された。さらに，このKOマウスでは軟骨細胞外マトリックが著明に減少しており，SLC35A3は軟骨細胞外マトリックの産生または恒常性維持においても重要な役割を担っていることが示された。今後はSLC35A3の生体内機能，そしてCVMの病態機序の解明を目指し，同マウスを用いて，詳細な組織学的解析，糖鎖解析，そして体節形成時期における網羅的な遺伝子発現解析などを行う予定である。一方，糖ヌクレオチドは主に細胞内に存在しているが，細胞外では唯一，乳中に検出されており，ウシとヤギの初乳中にはSLC35A3によって輸送されるUDP-GlcNAcが検出されている。したがって，糖ヌクレオチドは家畜の育児用調整乳や家畜飼料素材への機能性添加物として利用できる可能性が指摘されており[7]，本研究は家畜飼料学の方面にも発展させていきたいと考えている。

文　献

1） Ghanem, M. E., Akita, M., Suzuki, T., Kasuga, A., Nishibori, M.：*Anim Reprod Sci*, **103**, 348～354, 2008.
2） Thomsen,B., Horn, P., Panitz, F., Bendixen, E., Petersen, A. H., Holm, L. E., Nielsen, V. H., Agerholm, J. S., Arnbjerg, J., Bendixen, C.：*Genome Res*, **16**, 97～105, 2006.
3） Hadley, B., Litfin, T., Day, C. J., Haselhorst, T., Zhou, Y., Tiralongo, J.：*Comput Struct Biotechnol J*, **17**, 1123～1134, 2019.
4） Maroto, M., Pourquié, O.：*Curr Top Dev Biol*, **51**, 221～248, 2001.
5） Stanley, P., Okajima, T.：*Curr Top Dev Biol*, **92**, 131～164, 2020.
6） Mizumoto, S., Yamada, S.：*Front Cell Dev Biol*, doi：10.3389/fcell. 2021.764781, 2021.
7） 浦本匡：科学研究費助成事業　研究成果報告（16K08003）.

© The Ito Foundation

肥育豚の霜降り割合の指標となるバイオマーカーの特定

Biomarker discovery for breeding highly marbled pork production

谷口　雅章[1]・中島　郁世[1]・荒川　愛作[1]・吉岡　　豪[2]・鈴木　香澄[2]
（[1]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，[2]岐阜県畜産研究所養豚・養鶏研究部）

Masaaki Taniguchi[1], Ikuyo Nakajima[1], Aisaku Arakawa[1], Go Yoshioka[2] and Kasumi Suzuki[2]
（[1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Gifu Prefectural Livestock Research Institute）

There are a wide variety of approaches to improving the quality of pork. In order to stably produce the favorable meat with the consistent quality, we aimed to discover potential biomarkers to enable estimating the pork meat quality especially intramuscular fat (IMF) content during the fattening period. In this study, we investigated the metabolites and micro-RNA (miRNA) in serum of fattening Duroc pigs by gas-chromatography-mass-spectrometry (GCMS) metabolomics and small-RNA-sequencing. Duroc pigs were fed with conventional feeding until 77 day-old and separated by 3 groups of different amino acid compositions : (1) control group was fed with 0.95% lysine between 78d and 90d, with 0.58% lysine between 90d and 97d, and with 0.56% lysine from 98d onward till slaughter, (2) Test 1 group was fed with 0.95% lysine between 78d and 120d, and then with 0.56% lysine from 121d onward till slaughter, and (3) Test 2 group was fed with 0.95% lysine between 78d and 120d, with 0.78% lysine and a mixture of amino acids containing tryptophan, methionine and threonine from 121d onward till slaughter. Blood sampling was carried out at 90d, 120d and just before slaughter. Results of the feeding tests showed body weight at 119d of pigs in Test 2 group significantly decreased than that in Test 1 (p<0.05). Other than that, there was no significant difference in body weight and the growth-related traits between the groups at any time points. As per the marbling score, Test 2 group showed significantly greater value than those of control and Test 1 (p<0.05). The result of GCMS metabolomics indicated that there were differential metabolites between control and Test 1 and Test 2 (p<0.05). However, the enrichment analysis did not return any of significant metabolic pathways, due probably to the fewer number of metabolites detected at each time point. The small-RNA-seq analysis identified 12 miRNAs with high expression levels in the pig serum, although no statistical comparison was examined. Once the relationship between the metabolite and miRNA is clarified, they may be the potential biomarkers for the IMF content in the fattening pigs.

1．目　　的

デュロック種は肉量および肉質を含め産肉性に優れるブタ品種である。そのため，デュロック種の生産性向上に向けた育種改良および飼養管理の最適化は養豚業にとって主要な課題である。我が

© The Ito Foundation

国では適度な霜降り（筋肉内脂肪）の入った豚肉が高品質な豚肉として好まれる傾向がある。国産の品質豚肉を安定的に生産するためには，高能力のデュロック種系統豚を開発・普及させることが必須である。

岐阜県は遺伝的な特性から霜降り割合が６％を超える（一般的な豚肉は３％）特徴的な肉質を持つデュロック種系統豚ボーノブラウンを育種した（農林水産省委託プロジェクト研究「生産システム革新のための研究開発」2012－2016）。一方，ブタの第一制限アミノ酸であるリジン含量の調整や給餌のタイミング等により，霜降り割合を制御する研究が進んでいる[1)]。実際，ボーノブラウン種豚を利用したブランド豚肉生産に特化した飼料開発も行われている。しかしながら，試料中のアミノ酸組成と筋肉内脂肪蓄積に関する生物学的メカニズムは未解明な部分があるため，肉豚の霜降り割合にはばらつきが生じる。そこで，高霜降り割合の豚肉を安定的に生産するデュロック種系統豚を供給するためには，給餌飼料中のリジン含量の違いにより飼料に含まれる栄養・エネルギーがどのように筋肉あるいは脂肪細胞へ変換するか，分子生物学的メカニズムを解明する必要がある。

そこで本研究では，デュロック種肥育豚において異なるアミノ酸組成を持つ飼料給餌による増体量，枝肉重量，筋肉内脂肪含量などへの影響について検討した。さらに，肥育期間中の血液における生体内低分子代謝物およびマイクロRNAを探索することにより，バイオマーカーとしての利用可能性を検討した。

2．方　法

本研究には，デュロック種48頭を16頭ずつの３区に分け，以下の飼料を用いた肥育試験を行った（**Fig. 1**）。（１）対照区：生後78–90日齢までリジン含量0.95％，90–97日齢までリジン含量0.58％，98–出荷までリジン含量0.56％，（２）試験区１：生後78－120日齢までリジン含量0.95％，121－出荷まで0.56％，（３）生後78–120日齢までリジン含量0.95％，121–出荷まで0.78％に加え，トリプトファン・トレオニン・メチオニン添加した飼料を給与した。肥育試験期間中の90日齢および120

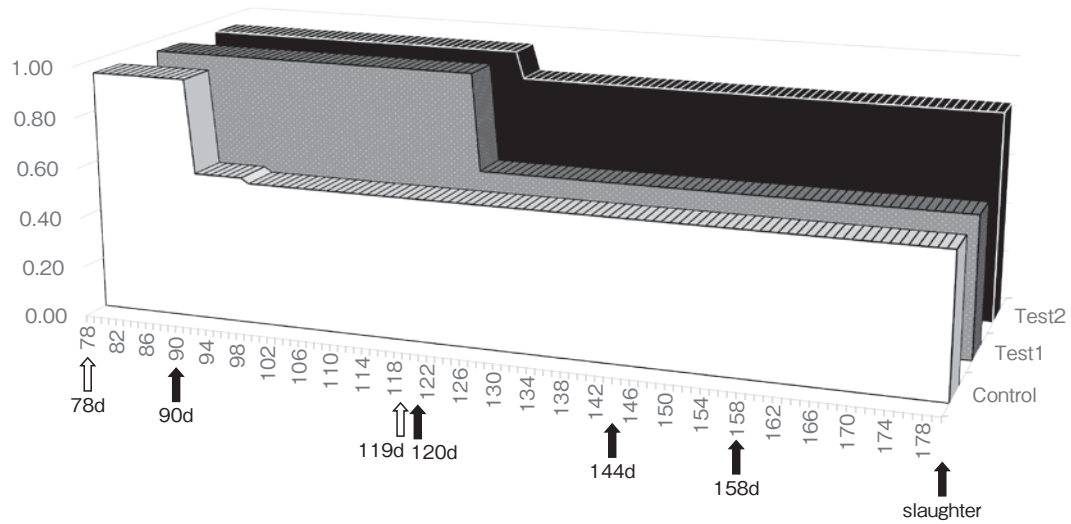


Fig. 1　Difference in lysine content in the feed during fattening/finishing period of Duroc pigs used for this study. Vertical axis denotes percentage (%) of lysine. Horizontal axis denotes days after birth. Open and filled arrows denote the time points at body weight measurements and blood samplings, respectively.

© The Ito Foundation

日齢時，ならびに出荷時において採血を行い，血清を採取したのち－80℃で保存した。低分子代謝物の分析は，ブタ血清，40 μl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抽出物を遠心分離した上清を乾固処理したものを誘導体化してから，島津QP2020ガスクロマトグラフィー質量分析（GCMS）機を用いたメタボローム解析により行った。代謝物データはSmart Metabolite DatabaseおよびMS-DIAL[2]を用いて同定した後，MetaboAnalyst[3]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。

マイクロRNAの特定には，ブタ血清200 μlから抽出したRNAを用いて次世代シーケンサーによるsmall-RNA-seq解析により行った。Fastq形式で取得した。シーケンスリードは，HISAT2[4]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StringTie[5]を用いた。遺伝子発現量のブタ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[6]を用いた。対照区と試験区１，試験区２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。

３．結果と考察

デュロック種肥育豚におけるアミノ酸含量を変化させた飼養試験により，119日齢時において試験区１の生体重が，試験区２に比べ有意に高い値を示したが，これ以降，出荷時にかけてすべての区で生体重に差違は見られなかった（**Fig. 2**）。日増体量および出荷日齢に関しては，対照区が２つの試験区に比べ，増体性がよく，早期に出荷となったが有意差はなかった（**Table 1**）。枝肉重量，枝肉歩留に関しては，対照区と２つの試験区の間に差違は認められなかったが，肉質形質である筋肉内脂肪含量は試験区２が，試験区１より有意に高い値を示した（**Table 2**）。血清を用いたGCMSメタボローム解析により，対照区－試験区１および対照区－試験区２の間で有意差を認めた代謝

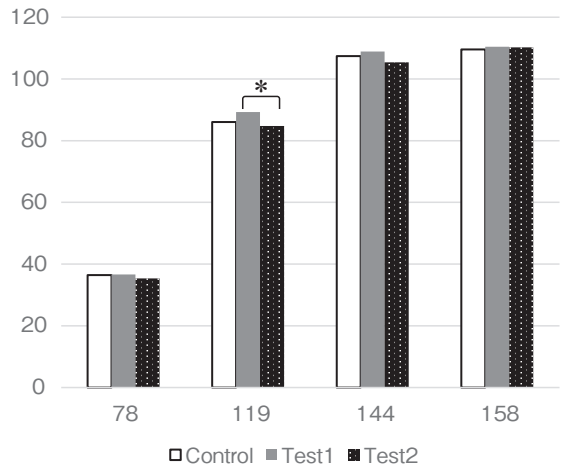


Fig.2　Alternation of body weight of Duroc pigs from the beginning to the finishing of the feeding test
X- and y-axes denote days-old and kg, respectively.
*Significant difference（p<0.05）is observed between Test 1 and Test 2.

© The Ito Foundation

Table 1　Differences in growth traits between control, Test 1 and Test 2.

Traits	Control	Test 1	Test 2
Dairy gain (g/d)	927.9 ± 111.0	876.2 ± 112.1	898.8 ± 114.1
Days-old at slaughter (d)	155.4 ± 11.7	160.8 ± 12.1	159.8 ± 11.3
Body weight at slaughter (kg)	114.6 ± 3.5	115.2 ± 4.1	115.0 ± 3.8

Table 2　Differences in carcass and meat quality related traits between control, Test 1 and Test 2.

Traits	Control	Test 1	Test 2
Carcass weight (kg)	77.59 ± 2.69	77.00 ± 2.85	78.19 ± 2.64
Dressing percentage (%)	0.668 ± 0.012	0.667 ± 0.016	0.672 ± 0.019
Backfat thickness (cm)	2.288 ± 0.342	2.136 ± 0.409	2.250 ± 0.360
Marbling Score	2.64 ± 0.175	2.59 ± 0.205	2.79 ± 0.266*

*Significant difference was identified between Test1 and Test2 (p<0.05).

Table 3　Detection of differential metabolites between control and Tests at three timepoints.

Time point	Items	Control-Test1	Control-Test2
Day90	No. Metabolites	34	17
	KEGG Pathways (FDR<0.05)	0	0
Day120	No. Metabolites	13	7
	KEGG Pathways (FDR<0.05)	0	0
Day-Slaughter	No. Metabolites	6	5
	KEGG Pathways (FDR<0.05)	0	0

物，ならびに各時点で同定した代謝物によるエンリッチメント解析の結果を**Table 3**に示した。いずれの比較においても有意差を示した代謝物数が少なかったためか，エンリッチメント解析により有意水準Q＜0.05を満たすKEGGパスウェイは同定されなかった。しかしながら，119日齢時において，試験区１が対照区に対して有意に７倍高い値を示した代謝物が含まれた。これはアミノ酸代謝に関わることが示唆された。

Small-RNA-seq解析においては，血清から次世代シーケンサーによる解析に耐えるだけの高収量かつ高濃度のRNAを抽出することが困難であったため，各時点において対照区，２試験区ごとにRNAを集約する方法を採用した。このため反復実験ができず，対照区―試験区間の比較解析には至っていない。

しかしながら，ブタリファレンスゲノムに対してSmall-RNA-seqリードをマッピングすることにより，298種類のmiRNAが同定された。発現量の順に並べると上位12個のmiRNAが高い発現量を示した（**Fig. 3**）。これらは多様な生理機能に関わることが分かっており，未分化筋細胞の分化活性があるものなども含まれている。発現量の高さが機能的に重要とは限らないが，バイオマーカー候補として発現量の変動を同定できることが必要条件である。今後，個別のブタ血清を用いたこれらの候補miRNAの発現量と飼料中アミノ酸組成による肉質の変化に関する再検討を行うこと

© The Ito Foundation

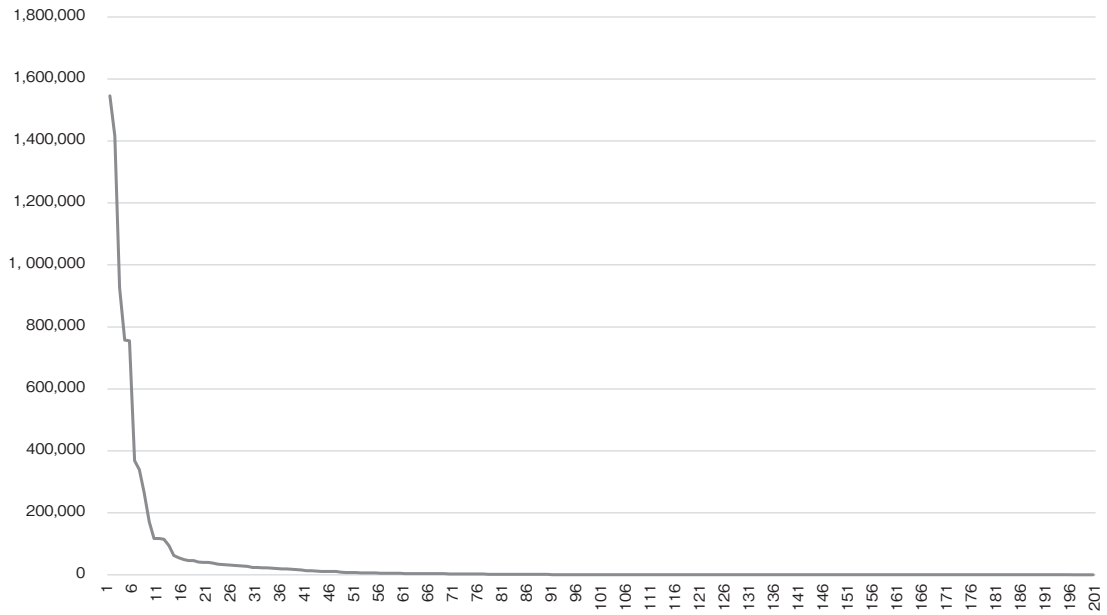


Fig. 3　Expression level of all miRNAs from the top to the bottom detected in Duroc serum.
Y-axis denotes expression level. X-axis denotes the order of miRNA by the expression level.

とする。

本研究の結果より，デュロック種肥育豚の飼料中のアミノ酸組成の変化が増体性，枝肉成績に対して大きな影響は与えなかったが，筋肉内脂肪含量には有意な差違をもたらした。120日齢時に対照区と試験区１の間で，アミノ酸代謝に関連する血清代謝物の大きな変動を観察したことは飼料中のアミノ酸組成が影響したことが考えられる。またmiRNAに関しては，複数の候補を検出したものの，対照区－試験区間の有意差を検出するには至っておらず，今後も研究を進展させる必要がある。本研究で特定した代謝物およびmiRNAが制御する遺伝子－代謝物－肉質形質の関連性解析を継続し，育種による種豚開発および栄養成分の調整による再現性の高い肉豚生産への寄与に向け取り組む。

４．要　　約

肥育豚の肉質の改良に向け，育種および栄養管理の両面からさまざまな研究アプローチが行われている。一方，枝肉には品質のばらつきが現れることが本題である。そこで，遺伝的および栄養学的に肥育期間中の調整を可能とすることにより，枝肉品質の斉一性が改善できれば養豚産業にとって有用である。そこで，肥育期間中の肉質に関わる栄養状態をモニターできるバイオマーカー開発に取り組んでいる。本研究から得られた知見より，候補代謝物およびmiRNAを同定した。今後の研究で利用性の高いバイオマーカーを開発する。

文　　献

１）　Katsumata, M., Kobayashi, H., Ashihara, A., Ishida, A.：Effects of dietary lysine levels and lighting conditions on intramuscular fat accumulation in growing pigs, *Anim. Sci. J.*, **89**(7), 988～993, 2018.
２）　Lai, Z., Tsugawa, H., Wohlgemuth, G., *et al.*：Identifying metabolites by integrating metabolome databases with mass spectrometry cheminformatics, *Nat. Methods*, **15**, 53～56, 2018.
３）　Chong, J., Wishart, D. S., Xia, J.：Using

© The Ito Foundation

MetaboAnalyst 4.0 for Comprehensive and Integrative Metabolomics Data Analysis, *Current Protocols in Bioinformatics*, **68**, e86, 2019.

4） 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.

5） 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.

6） 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.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

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

横　井　伯　英
（京都大学大学院農学研究科）

Norihide Yokoi
（Graduate School of Agriculture, Kyoto University）

Recently, many studies have focused on exosomal and non-exosomal microRNAs (miRNAs) in blood as novel biomarkers. To establish the blood miRNA-based diagnosis method of carcass traits and meat quality in beef cattle, we have been investigating dynamics of exosomal and non-exosomal miRNAs in Japanese Black cattle during fattening period.

In the present study, we performed miRNA-sequencing of plasma exosomal and non-exosomal miRNAs extracted from Japanese Black cattle at 20 and 25 months of age. Among a total of about 520 miRNAs detected, about 300 miRNAs were detected in both exosomal and non-exosomal fractions, about 20 miRNAs were specifically in exosomal fractions, and about 200 miRNAs were specifically in non-exosomal fractions. Principal component analysis revealed that each sample group exhibited a specific profile and that exosomal fractions of both age groups showed a similar profile while non-exosomal fractions of both age groups showed distinct profiles. In exosomal fractions, there were several miRNAs which were specifically detected in 25 months of age. In non-exosomal fractions, however, there was no such phenomenon.

Further longitudinal and comprehensive studies are needed to identify novel biomarker candidates for carcass traits and meat quality and to examine candidate miRNAs in large populations of beef 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。現状においては，血中バイオ

© The Ito Foundation

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。

近年，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，動物においては各種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ことが知られる。したがって，バイオマーカーとして血中マイクロRNAを検討するには，エクソソームに限らずに血中に存在するマイクロRNAを解析することが必要である[3)]。

そこで本研究では，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，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の経時的な動態を検討するとともに，肥育終了時における各種枝肉・肉質形質および骨格筋や脂肪組織中の各種成分との関連を検討する。

本研究は令和２（2020）年度から令和４（2022）年度までの３年間の計画で実施している。昨年度は，黒毛和種去勢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からのマイクロRNAの抽出および検出方法，ならびに量的PCR（qPCR）における最適な内部コントロールを決定した。また，ウシ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のうち血漿中エクソソーム内外において検出可能なものを確認するとともに，肥育初期と後期の間で変動する傾向のある２種類のマイクロRNAを同定した。さらに，血漿中に検出されたマイクロRNAのうち８種類のマイクロRNAが肥育終了時の骨格筋および皮下脂肪において共通して存在することを確認した。

今年度は，次世代シーケンサーによる網羅的なマイクロRNAシーケンスを実施し，黒毛和種去勢肥育牛の20カ月齢と25カ月齢における血漿中に存在するマイクロRNAのプロファイルを検討した。

２．方　法

2.1　血中エクソソーム内外のマイクロRNAの抽出

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10カ月齢から肥育後期の30カ月齢まで，５カ月おきに経静脈から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１mL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。

2.2　次世代シーケンサーを用いたマイクロRNAシーケンス解析

上記のように血漿中のエクソソーム内外から抽出したRNAのうち20カ月齢と25カ月齢のサンプル（各n＝３，合計12サンプル）について，専門業者に依頼して次世代シーケンサーを用いた網羅的マイクロRNAシーケンス解析を行った。次に，各サンプル中に検出されたマイクロRNAの種類およびリード数に基づいてベン図の作成および主成分分析を行った。さらに，edgeRによりフィルタリング，正規化，月齢間で存在量が異なるマイクロRNAの特定を行った。

© The Ito Foundation

2.3　qPCRによる検証

上記2.2の結果をqPCRにより検証するため，上記2.1と同様に同一個体からRNAを抽出し，Mir-X miRNA First-Strand Synthesis Kit （タカラバイオ社）を用いてcDNA合成を行った。qPCR用のForward Primerは，マイクロRNAデータベース（miRBase，www.mirbase.org）からウシのマイクロ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 （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に，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。

3．結果と考察

次世代シーケンサーを用いた網羅的マイクロRNAシーケンス解析の結果，血漿中のエクソソーム内では約320種，エクソソーム外では約500種のマイクロRNAが検出された（**Fig. 1**）。各月齢の血漿中のエクソソーム内外で共通して存在するマイクロRNAは約300種，エクソソーム内のみに見られるものは約20種，エクソソーム外のみに見られるものは約200種であることが分かった。約300種のマイクロRNAは，20カ月齢と25カ月齢の血漿中のエクソソーム内外に共通して認められた。

主成分分析の結果，20カ月齢と25カ月齢の血漿中のエクソソーム内外のサンプルがそれぞれクラスターを形成した（**Fig. 2**）。エクソソーム内のサンプルのクラスターは近接して存在したのに対して，エクソソーム外のクラスターは大きく離れて存在した。これらの結果から，20カ月齢と25カ月齢の間において，血漿中のエクソソーム内に存

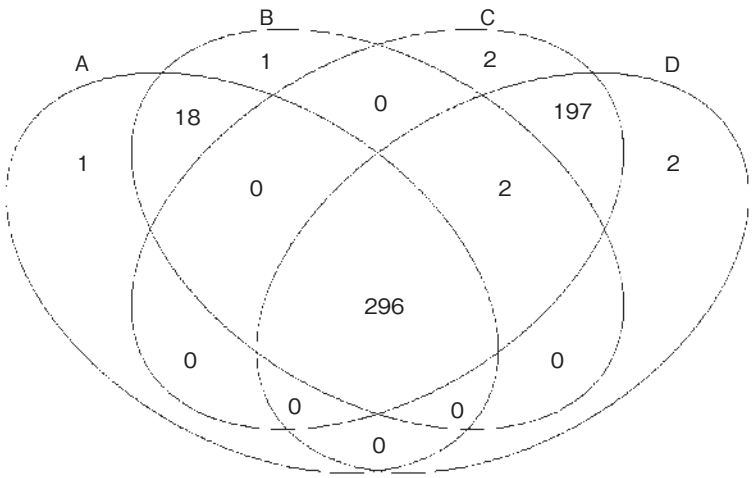


Fig. 1　Venn diagram of miRNAs detected in four sample groups
A：exosomal fractions at 20 months of age, B：exosomal fractions at 25 months of age, C：non-exosomal fractions at 20 months of age, D：non-exosomal fractions at 25 months of age.

© The Ito Foundation

在するマイクロRNAのプロファイルは類似性が高いのに対して，エクソソーム外のそれは大きく異なることが示唆された。

血漿中のエクソソーム内外それぞれにおいて月齢による変動を検討したところ，複数のマイクロRNAに統計学的に有意な差が認められた。これらについてqPCRによる検証を行ったところ，月齢により大きく存在量が異なるマイクロRNAが確認された（**Fig. 3**）。エクソソーム内では，20カ月齢と比較して25カ月齢において特異的に存在するものや存在量の高いものが多く認められた。一方，エクソソーム外では，20カ月齢および25カ月齢にそれぞれ特異的に存在するものが認められた。

本研究では，次世代シーケンサーを用いたマイクロRNAシーケンスにより，黒毛和種去勢肥育牛の20カ月齢と25カ月齢における血漿中エクソソーム内外に存在するマイクロRNAのプロファイルを明らかにするとともに，20カ月齢と25カ月齢の間で変動する複数の血中マイクロRNAを同定した。

今後，同様な手法により肥育終了時の30カ月齢の血中マイクロRNAのプロファイルを明らかにし，本研究の結果と比較解析することにより経時的かつ網羅的な血中マイクロRNAのプロファイルの変動を解明する。さらに，肥育終了時における各種枝肉・肉質形質および骨格筋や脂肪組織中の各種成分との関連を検討することにより，枝肉・肉質形質の指標となるバイオマーカー候補を同定する。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い，最終的にバイオマーカーとなり得るマイクロRNAを絞り込む。

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，本研究では次世代シーケンサーを用いたマイクロRNAシーケンスにより，黒毛和種去勢肥育牛の20カ月齢と25カ月齢における血漿中エクソソーム内外に存在するマイクロRNAのプロファ

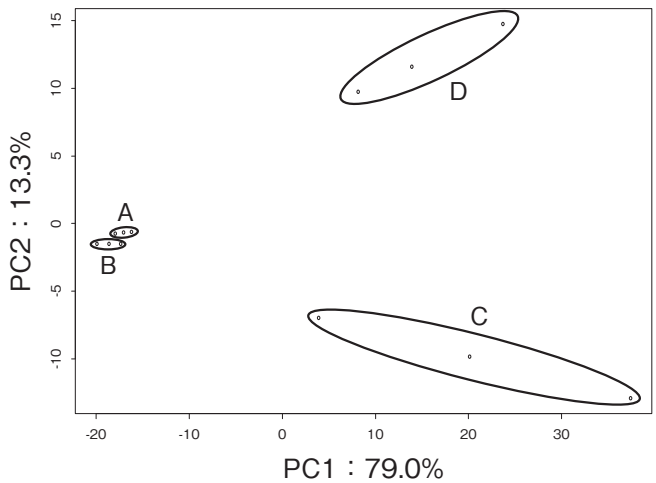


Fig. 2　Principal component analysis of miRNAs detected in four sample groups
A：exosomal fractions at 20 months of age, B：exosomal fractions at 25 months of age, C：non-exosomal fractions at 20 months of age, D：non-exosomal fractions at 25 months of age.

© The Ito Foundation

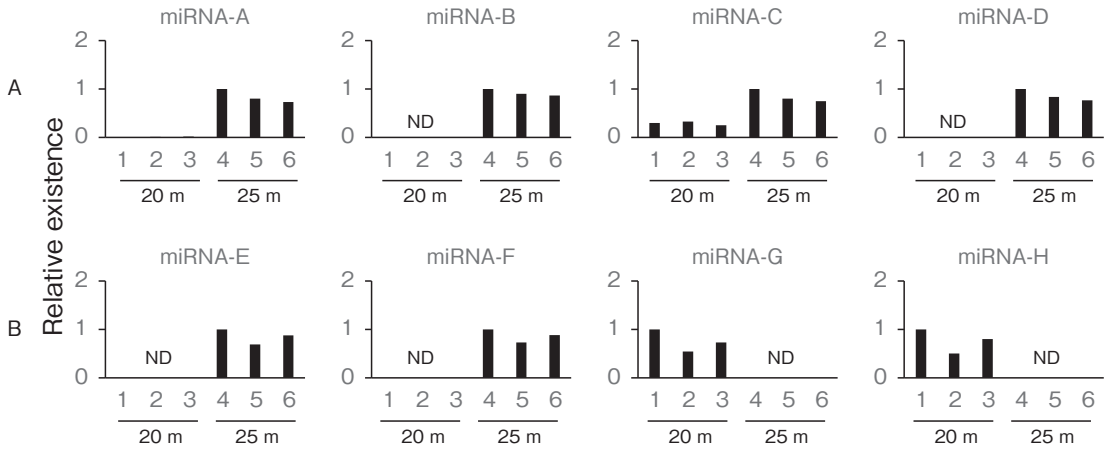


Fig. 3　Differentially existing miRNAs between 20 and 25 months of age
Relative existence of miRNAs in plasma exosomal（A）and non-exosomal（B）fractions are presented as fold-change relative to those of animal No. 1 or No. 4. 20 m, 20 months of age; 25 m, 25 months of age; ND, not detected.

イルを検討するとともに，20カ月齢と25カ月齢の間で変動する血中マイクロRNAを探索した。

次世代シーケンサーを用いた網羅的マイクロRNAシーケンス解析の結果，血漿中のエクソソーム内外で共通して存在するマイクロRNAは約300種，エクソソーム内のみに見られるものは約20種，エクソソーム外のみに見られるものは約200種であることが分かった。主成分分析の結果，20カ月齢と25カ月齢の血漿中のエクソソーム内外のサンプルがそれぞれ特徴的なプロファイルを有すること，エクソソーム内に存在するマイクロRNAのプロファイルは月齢間で類似性が高いのに対して，エクソソーム外のそれは大きく異なることが示唆された。個々のマイクロRNAについて検討したところ，エクソソーム内では20カ月齢と比較して25カ月齢において特異的に存在するものや存在量の高いものが多く認められたが，エクソソーム外では20カ月齢および25カ月齢にそれぞれ特異的に存在するものが認められた。

今後，経時的かつ網羅的な血中マイクロRNAのプロファイルの変動を解明し，枝肉・肉質形質の指標となるバイオマーカー候補を同定する。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い，最終的にバイオマーカーとなり得るマイクロRNAを絞り込む。

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）足立裕哉，平野亘，谷口幸雄，横井伯英：肉用牛の肉量および肉質のバイオマーカーとしての血中マイクロRNAの可能性，肉用牛研究会報，**111**，7～12，2021.

© The Ito Foundation

黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立

Establishment of breeding improvement method for “sweet smell” in Japanese Black beef

中　嶋　宏　明・庄　司　則　章
（山形県農業総合研究センター畜産研究所）

Hiroaki Nakajima and Noriaki Shoji
（Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center）

In order to clarify the precursor of the aroma component that contributes to the “sweet aroma” that is the characteristic of Wagyu beef, investigated aging changes in grilled beef aroma and metabolites in raw beef, and changes in the amount of grilled beef aroma produced by adding standard reagent. As a result, since both the grilled beef aroma and the metabolite have a high correlation before and after aging, it was considered that the taste quality could be evaluated using the sample before aging. It was also clarified that beef with a large amount of sugar tends to generate an aroma component having a sweet scent or a roast-like scent, and beef with a large amount of free fatty acid tends to generate an aroma component having an unpleasant scent. Furthermore, it was suggested that the genotype of SCD could be a DNA marker for the “sweet aroma” of beef.

1．目　　的

黒毛和種牛肉（以下「和牛肉」とする）は脂肪交雑量の多さが特長であり，これまで重点的に育種改良が進められてきた。そのため，脂肪交雑は飛躍的に向上し，全国の令和３年枝肉格付における５等級率は10年前の３倍となる54％まで高まっている。BMS No. の現場後代検定成績が9.5を超える種雄牛が続出していることから，全国の５等級率はさらに高まることが予想される。脂肪交雑量の多い和牛肉生産が拡大する一方で，食肉流通関係者には「脂肪交雑は多くなったが和牛独特の香りが弱くなった」，「甘みのある和牛肉が少なくなった」といったような食味低下を危惧する意見が多い。牛肉の食味には食感，味，香りの３つの要素があり，最近の研究から香りが最も重要であることが明らかになりつつある。いくつかの品種の牛肉の比較試験においても，和牛肉は輸入牛肉と比べて官能評価で明らかに甘い香りが強く，また，交雑種や褐毛和種等の牛肉と比べても有意に甘い香りが強い。和牛肉の特長は甘く脂っぽい香りである「和牛香」にあるということが食肉関係者の間では広く知られており，これらの品種比較をした試験成績からも和牛肉の特長は和牛香であることが分かる。脂肪交雑量が強く影響する「脂っぽさ」は現状の和牛肉では十分であると考えられることから，我々は「甘い香り」を高めていくことが和牛肉の食味向上のうえで非常に重要

© The Ito Foundation

であると考える。

そこで本研究では，和牛肉の「甘い香り」に寄与する香気成分の前駆物質を明らかにするとともに，市場に上場される枝肉から少量の分析用検体を採取することを前提としたデータ蓄積手法を決定する。あわせて，想定される前駆物質の含有量に影響する既知遺伝子の多型が香気生成に与える効果を検証し，「甘い香り」のDNAマーカーとなり得るか検討する。

２．方　法

2.1　試験１　焼成香気と代謝物に及ぼす熟成の効果

和牛肉の「甘い香り」に寄与する香気成分は，と畜後の熟成や加熱調理により前駆物質から生成されると考えられる。そこで，熟成程度の異なる和牛肉について焼成前の代謝物含量と焼成後の香気含量を調査した。山形県内で肥育された黒毛和種38頭（去勢20頭，雌18頭）の枝肉より，と畜後３～５日経過したリブロースを採取（熟成期間０日）し，真空チルド状態にて14日間熟成後，スライスして４℃下で１日冷蔵（熟成期間15日）した。この熟成期間０日ならびに15日の胸最長筋をミンチにして分析まで－80℃で保存した。

焼成香気の前駆物質として想定される生牛肉中の水溶性代謝物（糖類，遊離アミノ酸，ジペプチドなど）はメタボロミクス前処理ハンドブック[1)]の方法によりサンプル調製を行い，ガスクロマトグラフ質量分析計（島津製作所製QP2010plus　カラム：DB-5 30m×1.00μm×0.25mmID）およびSmart Metabolites Databaseにより測定した。サンプル定量では，標準試薬より調製したQCサンプルを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[2)]。また，脂溶性代謝物として生牛肉の遊離脂肪酸を定量した。内部標準物質（C13：０）を添加した牛肉よりメタノールで遊離脂肪酸を抽出し，標準試薬により調製したQCサンプルとともにガスクロマトグラフ質量分析計（カラム：INNOWAX 30m×0.25μm×0.25mmID）により測定し，水溶性代謝物と同様に定量値の標準化を行った。焼成香気は，20mlバイアルに上記の牛肉を３ｇ入れ，200℃で５分加熱して生成させた。これにエタノールを加えて65℃で３時間加温後，内部標準物質（シクロヘキサノール）と硫酸ナトリウムを添加して焼成香気を抽出した。－10℃で遠心分離して得た上清を，固相抽出（InertSep C18FF）により中性脂質を除去し，抽出液にヘキサン・ジエチルエーテル混液を６倍量添加して糖とアミノ酸を除去後に濃縮した。この濃縮サンプルを，標準試薬により調製したQCサンプルとともにガスクロマトグラフ質量分析計（カラム：InertCap PureWAX 60m×0.25μm×0.25mmID）で測定し，同様に定量値の標準化を行った。なお，香気分析に用いた標準試薬には，予備試験にて和牛肉の焼成香気サンプルに含まれることが確認できた86化合物を用いた。

2.2　試験２　焼成香気の前駆物質の特定

試験１の熟成期間０日ならびに熟成期間15日の代謝物含量と焼成香気生成量をThe Unscrambler X（CAMO社）によりPLS解析し，「甘い香り」に寄与すると考えられる香気成分に対する変数重要度や牛肉中含有量などを考慮して代謝物を選定し添加試験を行った。選定した代謝物は，添加試験１ではGlucose，Glutamine，Carnosine，Palmitic acid，Glycerol，Hypoxanthine，Creatine，添加試験２ではFructose，Glucose 6-phosphate，Alanine，Stearic acid，Oleic acid，Linoleic acid，Taurine，Lactic acid，Malic acid，Ureaの計17物質とした。この標準試薬0.1mmolを熟成期間０日の和牛肉３ｇに均質と

© The Ito Foundation

なるよう添加し，試験１と同様に焼成香気を定量した（５反復）。

2.3　試験３　焼成香気と代謝物に及ぼす既知遺伝子の効果

試験１の牛肉38検体より，DNeasyR Blood&Tissue Kits（QAGEN社）を用いてDNAを抽出し，CAPN1（カルパイン）[3]，CAST2（カルパスタチン）[3]，SCD（脂肪酸不飽和酵素）[4]，FASN（脂肪酸合成酵素）[5]，SREBP-1（脂質合成転写因子）[6] 遺伝子の遺伝子型をPCR-RFLP法により判定した。これらの遺伝子型について，熟成期間15日の焼成香気生成量と生牛肉の水溶性ならびに脂溶性代謝物含量に対する効果を検討した。

３．結果と考察

3.1　試験１

焼成香気サンプルで定量した86化合物のうち，和牛肉において官能評価による「甘い香り」と関連性が認められた香気成分（未発表データ），甘い香りを感じる香気成分，不快な香りを感じる香気成分について，熟成による焼成香気生成量の変化を**Table 1** に示した。熟成により増加する香気成分が多かったが，3,5-dimethyl-Benzaldehyde，γ-Nonalactone，2-Acetylpyrroleは熟成により生成量が減少した。またアルデヒド類を除き，熟成前後で高い相関が認められる香気成分が多かった。ラクトン類は甘い香りを感じ[7]，輸入牛肉に比べて和牛肉に多い[8] ことから，和牛肉の特長である「甘い香り」にはラクトン類が寄与すると推察されている。一般的に熟成により牛肉の風味が増すことから，ラクトン類は熟成で増加すると想定していたが，δ-Tetradecalactone やγ-Butyrolactoneは増加，γ-Nonalactoneは減少，γ-Crotolactoneは変化しなかったことから，化合物によって熟成の効果は大きく異なることが明らかとなった。

熟成による代謝物含量の変化を**Table 2** に示した。Glucose 6-phosphateやDipeptide，Inosine，

Table 1　Effect of aging on the production of grilled beef aroma（N=38）

（ng/gWW）

Aging days	Pyrazine			Aldehyde					Lactone			
	2,5-dimethyl-	2,3,5-trimethyl-	3-ethyl-2,5-dimethyl-	Nonanal	Furfural	Phenyl acet aldehyde	3,5-dimethyl-Benz aldehyde	Hydroxy methyl furfural	γ-Butyro	γ-Croto	γ-Nona	δ-Tetra deca
0	105	122	84	257	20	2582	16	80	1442	13486	45	1870
15	170	168	116	264	25	3826	12	94	1673	13410	33	4218
	***	***	***		**	***	***	**	***		*	***
R	0.78	0.64	0.67	0.03	0.07	−0.15	−0.00	0.52	0.95	0.90	0.55	0.94

Aging days	Acid						Other					
	Butyric	Pentanoic	Hexanoic	Heptanoic	Octanoic	Decanoic	Furaneol	Maltol	2-Acetyl pyrrole	ethyl-Lactate	2,5-Hexane dione	2,3-Butane diol
0	3392	165	490	59	195	455	343	28	143	2388	362	16396
15	4023	183	912	64	223	451	348	30	118	3057	472	18881
	***	***	***	*	***				***	***	**	***
R	0.87	0.94	0.70	0.26	0.87	0.59	0.83	0.17	0.86	0.78	−0.82	0.98

***：p<0.001，**：p<0.01，*：p<0.05

R：coefficient of correlation between Aging days 0 and 15.

© The Ito Foundation

Table 2　Effect of aging on beef metabolite content（N=38）

（mg/gWW）

Aging days	Suger					Free Amino acid					
	Glucose	Glucose 6-phosphate	Fructose	Mannose	Ribose	Glutamine	Alanine	Leucine	Lysine	Serine	Valine
0	2.43	2.55	0.58	0.51	0.24	1.12	0.83	0.15	0.16	0.11	0.11
15	3.60	1.40	0.94	0.93	0.70	1.21	1.07	0.46	0.31	0.27	0.26
	***	***	***	***	***	*	***	***	***	***	***
R	0.88	0.96	0.93	0.92	0.67	0.82	0.82	0.43	0.57	0.63	0.61

Aging days	Free Amino acid										
	Phenylalanine	Glycine	Tyrosine	Isoleucine	Methionine	Threonine	Asparagine	Proline	Ornithine	Histidine	β alanine
0	0.09	0.15	0.08	0.08	0.05	0.08	0.11	0.07	0.08	0.03	0.02
15	0.25	0.23	0.22	0.20	0.17	0.17	0.12	0.11	0.10	0.07	0.02
	***	***	***	***	***	***		***	***	***	***
R	0.62	0.76	0.60	0.71	0.59	0.55	−0.10	0.61	0.94	0.43	0.97

Aging days	Dipeptide		Nucleic acid-related substance			Free Fatty acid				
	Carnosine	Anserine	Hypoxanthine	Inosine	IMP	C18:1	C16:0	C18:0	C18:2	C16:1
0	4.29	1.15	0.45	0.70	0.37	0.54	0.19	0.18	0.12	0.03
15	3.81	1.03	1.02	0.47	0.06	0.65	0.25	0.19	0.15	0.03
	***	***	***	***	***	***	***	*	***	
R	0.90	0.89	0.70	0.45	0.46	0.93	0.94	0.83	0.75	0.46

Aging days	Other								
	Lactic acid	Creatine	Glycerol	Urea	Inositol	Taurine	Malic acid	Carnitine	Citric acid
0	17.26	11.74	1.57	0.61	0.35	0.32	0.15	0.15	0.02
15	16.06	11.09	1.86	0.59	0.43	0.31	0.24	0.23	0.08
	***		***	**	***		***	***	***
R	0.73	0.18	0.69	0.97	0.93	0.78	0.81	0.10	0.50

***：p<0.001，**：p<0.01，*：p<0.05

R：coefficient of correlation between Aging days 0 and 15.

Inosine-monophosphate（IMP）などは熟成により減少したが，多くの糖，遊離アミノ酸，遊離脂肪酸は熟成により増加した。これらの代謝物の変化はこれまでの報告[9～11]と一致していた。また，熟成前後で高い相関が認められる代謝物が多かった。以上より，熟成後の焼成香気生成量や想定前駆物質である代謝物含量は熟成前の牛肉より評価できることから，市場に上場される枝肉から少量の分析用検体を採取してデータ蓄積することが可能であると考えられた。

3.2　試験２

焼成前の生牛肉中の粗脂肪割合（Fat），**Table 2**の糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質，遊離脂肪酸のグループごとの合計値（Suger，FAA，DP，Nuc，FFA）の６成分を説明変数，これまでの研究（未発表データ）から和牛肉と輸

© The Ito Foundation

Table 3 Contribution rate and variable importance in PLS analysis

	Number of factors	Cumulative contribution rate		Variable importance					
		Calibration	Validation	Fat	Suger	FAA	DP	Nuc	FFA
2,5-dimethyl-Pyrazine	3	84.3	82.9	0.10	0.73	0.46	−0.13	0.03	−0.03
2,3,5-trimethyl-Pyrazine	3	74.1	71.6	0.10	0.81	0.29	−0.22	−0.00	−0.08
Furaneol	3	74.9	70.7	0.10	0.87	−0.02	−0.08	−0.07	−0.27
Phenylacetaldehyde	2	47.5	42.2	−0.00	0.30	0.40	0.03	0.10	0.22
ethyl-Lactate	3	63.7	59.7	0.31	0.82	0.19	−0.16	0.04	0.20
2-Acetylpyrrole	3	70.6	66.8	−0.04	0.67	−0.24	0.10	−0.01	−0.27
γ-Butyrolactone	3	38.6	28.8	−0.16	−0.35	0.60	−0.25	−0.12	−0.16
γ-Crotolactone	1	48.9	41.5	0.22	−0.20	−0.02	−0.19	−0.21	0.03
δ-Tetradecalactone	4	71.1	65.6	0.56	0.60	0.18	0.00	−0.08	0.50
Butyric acid	1	19.6	14.5	0.16	−0.07	0.08	−0.17	−0.10	0.06
Pentanoic acid	1	16.5	12.0	0.13	−0.06	0.05	−0.17	−0.13	−0.01
Hexanoic acid	2	41.5	35.7	0.19	0.00	0.38	−0.18	−0.01	0.26
Heptanoic acid	1	26.5	23.4	0.17	−0.13	0.03	−0.16	−0.13	0.08
Octanoic acid	2	53.2	49.7	0.19	−0.15	0.21	0.00	0.02	0.52
Decanoic acid	2	31.2	20.5	0.15	−0.16	0.12	0.18	−0.15	0.37
2,3-Butanediol	2	30.2	19.7	0.01	0.35	0.16	−0.06	0.04	−0.32
Furfural	1	28.1	25.0	−0.15	0.18	0.10	0.10	0.15	−0.03

Suger：Total of Glucose, Glucose 6-phosphate, Fructose, Mannose, Ribose
FAA：Total of Glutamine, Alanine, Leucine, Lysine, Serine, Valine, Phenylalanine, Glycine, Tyrosine, Isoleucine, Methionine, Threonine, Asparagine, Proline, Ornithine, Histidine, βalanine
DP：Total of Carnosine, Anserine
Nuc：Total of Hypoxanthine, Inosine, IMP
FFA：Total of Oleic acid, Palmitic acid, Stearic acid, Linoleic acid, Palmitoleic acid

入牛肉との間で有意な差が認められる焼成香気成分を目的変数としたPLS解析の結果を**Table 3**に示した。ローストやナッツ様の香りを感じる2,5-dimethyl-Pyrazine，2,3,5-trimethyl-Pyrazine，甘い香りを感じるFuraneol，ethyl-Lactate，2-Acetylpyrrole，バター様の香りを感じるδ-Tetradecalactoneは累積寄与率が高く，6成分の説明変数により焼成香気中含量をある程度説明できると考えられた。また，これらの香気成分では糖の変数重要度が大きかった。遊離アミノ酸は2,5-dimethyl-Pyrazine，2,3,5-trimethyl-Pyrazine，Phenylacetaldehyde，γ-Butyrolactone，Hexanoic acidで，遊離脂肪酸はδ-Tetradecalactone，Hexanoic acid，Octanoic acid，Decanoic acidでは正，Furaneol，2-Acetylpyrroleでは負の方向に変数重要度が大きかった。

Table 2ならびに**Table 3**の結果を考慮して選択した標準試薬を，未熟成の和牛肉に添加して得られた焼成香気の生成量を**Table 4**に示した。未熟成和牛肉のみ（Control1，2）に比べ，糖（Glucose，Fructose，Glucose 6-phosphate）の添加によりPhenylacetaldehyde，Furaneol，Maltol，2-Acetylpyrroleなどの甘い香気成分が増加した。アミノ酸（Glutamine，Alanine）の添加では甘い香りを感じるγ-Nonalactone，2-Acetylpyrrole，Ethyl-Lactate，2,5-

© The Ito Foundation

Table 4 Effect of standard substances on the production of grilled beef aroma (N=5)

(ng/gWW)

test	standard substance	Pyrazine			Aldehyde					Lactone			
		2,5-dimethyl-	2,3,5-trimethyl-	3-ethyl-2,5-dimethyl-	Nonanal	Furfural	Phenylacet aldehyde	3,5-dimethyl-Benzaldehyde	Hydroxy methyl furfural	γ-Butyro	γ-Croto	γ-Nona	δ-Deca
1	Control 1	91 c	68 b	48 c	157 ab	18 e	1043 c	ND	96 b	1630 bc	10846 a	37 b	17 bc
	Glucose	93 c	44 c	34 cd	164 ab	71 a	1648 a	ND	58 b	1725 b	9902 ab	37 b	25 b
	Glutamine	64 d	39 cd	33 cd	267 a	43 bc	1062 c	ND	95 b	2392 a	7723 c	62 a	63 a
	Carnosine	187 a	65 b	105 b	ND	24 de	955 c	ND	102 b	1433 c	9690 ab	35 b	23 bc
	Palmitic acid	64 d	22 d	ND	ND	48 b	1168 bc	ND	1131 a	2322 a	10249 ab	64 a	34 c
	Glycerol	150 b	129 a	151 a	161 bc	34 cd	1379 b	ND	117 b	1870 b	9840 ab	33 b	19 bc
	Hypoxanthine	60 d	42 c	29 cd	191 ab	29 d	1198 bc	ND	47 b	2219 a	8653 bc	40 b	45 a
	Creatine	61 d	38 cd	34 d	188 bc	24 de	984 c	ND	142 b	2394 a	9886 ab	29 b	16 bc
2	Control 2	63 C	47 AB	38 BC	80 D	22 B	1477 CD	2 B	33 C	1489 G	12490 CDEF	20 F	13 B
	Fructose	133 A	26 CD	28 BC	433 A	1568 A	2498 A	ND	667 AB	2567 B	10555 F	93 AB	84 B
	Glucose 6-phosphate	71 BC	25 CD	48 B	273 ABC	60 B	1886 B	ND	399 BC	2921 A	12225 DEF	83 A	25 A
	Alanine	82 B	51 A	157 A	340 AB	22 B	712 E	ND	169 C	1784 EF	12026 DEF	54 DE	13 B
	Stearic acid	60 CD	60 A	46 B	98 CD	28 B	1588 BCD	ND	807 A	1835 EF	15050 AB	56 DE	20 B
	Oleic acid	44 E	31 CD	23 BC	107 CD	29 B	1410 CD	22 A	136 C	1634 FG	13970 BCD	50 DE	25 B
	Linoleic acid	43 E	27 CD	21 BC	328 AB	25 B	1547 BCD	3 B	235 C	1868 DE	14511 ABC	45 E	26 B
	Taurine	46 E	28 CD	45 B	210 BCD	31 B	1285 D	ND	368 BC	2197 C	11152 F	76 BC	13 B
	Lactic acid	47 DE	37 BC	46 B	363 AB	27 B	1687 BC	ND	115 C	2194 C	12471 CDEF	57 DE	31 B
	Malic acid	36 EF	20 DE	25 BC	143 CD	49 B	2259 A	ND	304 BC	2986 A	16141 A	81 AB	52 AB
	Urea	27 F	9 E	10 C	274 ABC	32 B	899 E	ND	91 C	2064 CD	13305 BCDE	65 CD	9 B

test	standard substance	Acid						Other					
		Butyric	Pentanoic	Hexanoic	Heptanoic	Octanoic	Decanoic	Furaneol	Maltol	2-Acetyl pyrrole	Ethyl-Lactate	2,5-Hexane dione	2,3-Butane diol
1	Control 1	3431 a	134 ab	576 abc	41 cd	150 bcd	153 b	357 b	23 b	96 c	1913 d	303 c	14020 a
	Glucose	2893 b	135 ab	564 bcd	40 cd	155 bc	118 b	1295 a	87 a	168 a	2495 c	348 c	11954 cd
	Glutamine	2680 b	147 a	597 ab	45 b	160 b	150 b	194 cde	25 b	150 b	2766 abc	834 a	13226 ab
	Carnosine	2509 b	121 b	507 e	38 d	145 bcd	107 b	96 e	ND	12 d	1854 d	304 c	12394 bc
	Palmitic acid	2554 b	137 ab	528 de	71 a	335 a	1518 a	158 de	ND	88 c	2823 ab	671 b	10714 e
	Glycerol	2866 b	137 ab	612 a	43 bc	159 b	114 b	299 bc	24 b	84 c	1916 d	340 c	12715 bc
	Hypoxanthine	2653 b	129 b	543 cde	40 cd	140 cd	146 b	230 bcd	24 b	86 c	2564 bc	692 b	11839 cd
	Creatine	2674 b	132 ab	545 cde	40 cd	135 d	153 b	281 bcd	21 b	81 c	2895 a	694 b	11326 de
2	Control 2	3715 DEF	178 C	676 EF	54 D	202 D	104 E	252 C	31 B	101 CDE	1814 J	114 F	9897 BC
	Fructose	3230 F	176 C	685 DEF	58 D	200 D	341 BC	1055 B	1038 A	170 C	3080 D	154 C	10459 AB
	Glucose 6-phosphate	3751 CDE	188 C	671 EF	57 D	207 D	261 CD	1268 A	109 B	1704 A	4222 C	146 CD	9967 BC
	Alanine	3553 DEF	181 C	729 BCD	58 D	225 CD	140 E	187 CDE	22 B	268 B	2071 GHI	249 A	9904 BC
	Stearic acid	4327 AB	221 AB	744 BC	81 C	267 C	465 A	219 CD	33 B	109 CDE	2291 EFG	126 EF	10127 BC
	Oleic acid	3959 BCD	207 B	768 B	233 A	532 B	407 AB	147 CD	29 B	110 CDE	1962 HIJ	124 EF	10242 ABC
	Linoleic acid	4246 BC	237 A	1058 A	168 B	1217 A	452 AB	225 CD	37 B	110 CDE	2202 FGH	236 AB	11011 A
	Taurine	3521 DEF	180 C	701 CDE	56 D	204 D	276 CD	149 DE	29 B	60 E	2500 E	142 CD	9582 CD
	Lactic acid	3394 EF	178 C	691 DE	56 D	219 CD	137 E	102 EF	24 B	104 CDE	5587 A	222 B	10221 BC
	Malic acid	4822 A	213 B	676 EF	58 D	227 CD	202 DE	99 EF	41 B	140 CD	5176 B	149 CD	10335 ABC
	Urea	3514 DEF	179 C	700 CDE	58 D	218 CD	162 DE	26 F	ND	89 DE	2446 EF	136 DE	9074 D

There is a significant difference between different codes.

© The Ito Foundation

Hexanedioneなどが増加した。また，脂肪酸（Palmitoleic acid，Stearic acid，Oleic acid，Linoleic acid）の添加ではヤギ臭を感じるHeptanoic acidや腐敗臭を感じるOctanoic acid，γ-Nonalactoneが増加し，ローストやナッツ様の香りを感じる2,5-dimethyl-Pyrazine，2,3,5-trimethyl-Pyrazineが減少した。また，ジペプチドのCarnosine添加によりFuraneol，Maltol，2-Acetylpyrroleが減少した。試験1ならびに2より，焼成調理において糖含量の多い和牛肉では甘い香りやロースト様の香りを感じやすく，遊離脂肪酸の多い和牛肉では不快な香りを感じやすい可能性が示唆された。

3.3　試験3

遺伝子型間で有意な差が認められた焼成香気と代謝物を**Table 5**に示した。CAPN1のCC，TT間では3,5-dimethyl-Benzaldehyde，SCDのAA，GG間ではGlycerol，Alanine，Malic acidに有意な差が認められた。試験2においてGlycerolやAlanineの添加によりロースト様や甘い香りを感じる焼成香気の生成が促進されることや，モノ不飽和脂肪酸割合は「甘い香り」と正の相関が認められるとする報告[12]などから，牛肉のモノ不飽和脂肪酸割合に影響するSCD遺伝子型が和牛肉の甘い香りのDNAマーカーとなり得る可能性がある。今後，さらに検体数を増やして明らかにする予定である。

4．要　約

和牛肉の特長である「甘い香り」に寄与する香気成分の前駆物質を明らかにするため，焼成香気および生牛肉中の代謝物の熟成変化と，標準品添加による焼成香気の生成量の変化を調査した。その結果，焼成香気と代謝物はともに熟成前後の相関が高いことから，熟成前の検体を用いて食味性を評価できると考えられた。また，糖の多い和牛

Table 5　Effect of genotype on the production of grilled beef aroma and metabolite content

（ng/gWW）

Gene	Genotype	Number	Nonanal	Furfural	Phenylacetaldehyde	3,5-dimethyl-Benzaldehyde	Furaneol	Glycerol	Glucose 6-phosphate	Alanine	Malic acid
CAPN1	CC	14	275	22 B	3654	13 A	310	1.86	1.19	1.08	0.25
	CT	17	253	27 A	4049	12 AB	372	1.88	1.57	1.08	0.22
	TT	7	271	25 AB	3627	9 B	362	1.81	1.42	1.03	0.23
CAST2	AA	23	258	25	3712	11	352	1.85	1.42	1.06	0.21
	AG	14	273	24	3998	12	346	1.87	1.42	1.10	0.26
	GG	1	300	27	4026	13	280	1.93	0.88	1.03	0.33
SCD	AA	14	267	23 AB	3448 AB	12	303 B	1.89 A	1.13 B	1.13 A	0.30 A
	AG	19	259	27 A	4262 A	12	392 A	1.89 A	1.64 A	1.07 AB	0.22 AB
	GG	5	277	20 B	3223 B	12	305 AB	1.67 B	1.26 AB	0.91 B	0.13 B
FASN	AA	25	263	24	3769	11	343	1.86	1.30	1.10	0.26
	GA	12	270	27	4061	13	369	1.87	1.66	1.02	0.21
	GG	1	232	16	2423	ND	214	1.64	0.78	0.93	0.07
SREBP1	LL	17	283 A	24	3438 B	12	325	1.86	1.35	1.06	0.24
	SL	18	247 B	26	4249 A	12	383	1.86	1.51	1.10	0.24
	SS	3	267 AB	21	3482 AB	11	263	1.85	1.07	0.95	0.23

There is a significant difference between different codes.

© The Ito Foundation

肉では甘い香りやロースト様の香りを感じる香気成分が生成されやすく，遊離脂肪酸の多い和牛肉では不快な香りを感じる香気成分が生成されやすいことが明らかとなった。さらに，SCDの遺伝子型が和牛肉の「甘い香り」のDNAマーカーとなり得る可能性も示唆された。

文　献

1）島津製作所：https：//www.an.shimadzu.co.jp/sites/an.shimadzu.co.jp/files/ckeditor/apl/lifescience/metabolomics/c146-2181a.pdf

2）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

3）Calvo, J. H., *et al.*：A new single nucleotide polymorphism in the calpastatin（CAST）gene associated with beef tenderness, *Meat Science*, **96**, 775～782, 2014.

4）Taniguchi, M., *et al.*：Genotype of stearoyl-coA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle, *Mamm Genome*,**14**, 142～148, 2004.

5）Abe, T., *et al.*：Novel mutations of FASN gene effect fatty acid composition in Japanese Black beef, *Biochem Genet*, **47**, 397～411, 2009.

6）Hoashi, S., *et al.*：Genotype of bovine sterol regulatory element binding protein-1（SREBP-1）is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle, *Mamm Genome*, **18**, 880～886, 2007.

7）沖谷明紘：牛肉熟成香とその生成機構，*Japanese Journal of Dairy Food Science*, **44**(2), 53～62, 1995.

8）松石昌典ら：和牛肉と輸入牛肉の香気成分，日本畜産学会報，**75**(3)，409～415，2004.

9）中村好徳ら：周年放牧肥育牛肉の特徴ならびに熟成による肉質の変化，日本暖地畜産学会報，**58**(2)，209～215，2015.

10）小松智彦ら：黒毛和種牛肉の熟成過程におけるグリコーゲンおよび単糖類含量の変化，日本畜産学会報，**91**(2)，119～125，2020.

11）山之上稔ら：牛肉のおいしさに影響する筋内遊離脂肪酸についての研究，食肉に関する助成研究調査成果報告書，**30**，68～75，2011.

12）佐久間弘典ら：黒毛和種肥育牛の胸最長筋における官能特性に及ぼす粗脂肪含量と脂肪酸組成の影響について，日本畜産学会報，**83**(3)，219～299，2012.

© The Ito Foundation

黒毛和種における経腟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（Ⅱ）

Effect of single shot intramuscular injection of porcine FSH mixed with hyaluron acid prior to ovum pick-up in Japanese Black cattle（Ⅱ）

及　川　俊　徳[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 Oikawa[1] and Takashi Numabe[2]
（[1]Miyagi Prefectural Livestock Experiment Station, [2]Miyagi 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 72 hours in 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 1, 6 animals were prepared for each test group and the study was performed. The pFSH-treated groups had a higher percentage of medium-sized follicles（6-10 mm）at the time of the OPU than control group. The FSH＋HA group had significantly lower cleavage rate than the FSH group. But blastocyst rate was no significant difference. In the field demonstration experiment of Experiment Ⅱ, we demonstrated the efficacy of superstimulation treatment with pFSH plus HA before 48 and 72 hours in the ovum pick-up（OPU）. In A and B rank oocyte rates, 72 hours was significantly higher than that of 48 hours. But embryonic developmental result was no significant difference. In conclusion, administration of pFSH combined with hyaluronic acid before OPU is collected high quality oocytes in OPU, but not improved 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腟採卵（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。

© The Ito Foundation

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低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]。

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・頻度が少なくてすむこと，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[4]。昨年度は徐放性があることで知られているヒアルロン酸製剤[5]をpFSHと混合し，OPU前48時間で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試験を実施した。その結果，ヒアルロン酸添加・未添加に関わらずpFSH製剤の効果により中卵胞率が高くなること，対照区と比較してヒアルロン酸添加により胚発生成績が高くなる成績が得られたが，pFSH単独とは同等の成績であった。

今年度は，ヒアルロン酸添加pFSHの投与からOPUまでの時間を昨年度の48時間から72時間に延長することがOPU成績および胚発生成績に及ぼす影響について検討した。

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

ホルモン製剤の投与はOPU実施72時間前とし，試験区として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，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，膨化卵子（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％CO_2，95％airで約22時間成熟培養を実施した。体外受精は当場繋養の黒毛和種種雄牛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％CO_2，95％airで約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％CO_2，5％O_2，90％N_2で体外受精後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時間前および72時間前にpFSH製剤８AUを生理食塩

© The Ito Foundation

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場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CO_2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，採取卵子数および胚発生成績を調査した。

2.3　統計処理

パーセンテージのデータはχ二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

3.1　実験Ⅰ

OPU実施前の卵胞のサイズ別割合を**Fig. 1**（**A**）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 8AUを投与した場合に未投与の場合と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)]，昨年度の成績同様に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。採取卵子のランク別割合を**Fig. 1**（**B**）に示した。Ａランク卵子率においてFSH＋HA区は対照区よりも有意に高い成績であった。Ｄランク卵子率においてFSH＋HA区およびFSH区は対照区よりも有意に低い成績であった。以上の結果よりpFSHを投与することで良質な卵子の採取が可能であり，有意な差は認められなかったが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。

体外受精による胚発生成績を**Fig. 2** に示した。卵割率においてFSH＋AH区はFSH区よりも有意に低い成績であった。胚盤胞率は有意な差は認められなかったものの，FSH区（26.9％）が高くFSH＋HA区（15.0％）で最も低い成績であった。昨年度は胚盤胞率において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の徐放性効果によりpFSHの影響が残ったことが胚発生成績に影響を及ぼしたと考えられたが，投与後の生体内のpFSH測定を実施していないことから今後の課題である。加えて良質な卵子が採取できることと胚発生成績がリンクしない成績となったことから，今後さらなる検討が必要である。

3.2　実験Ⅱ

白石牧場においてOPU実施48時間前および72時間前でのFSH＋HAについて比較検討した。OPU実施前の卵胞のサイズ別割合を**Fig. 3**（**A**）に示したが有意な差は認められなかった。採取卵子のランク別割合を**Fig. 3**（**B**）に示した。Ｄランク卵子率において48ｈ区は72ｈ区よりも有意に高い成績であった。Ａ＋Ｂ卵子ランク率において72ｈ区は48ｈ区よりも有意に高い成績であった。これは72ｈ区では良質な卵子が採取可能であることを示唆している。**Fig. 4** に胚発生成績を示したが有意な差は認められなかった。このことは実験Ⅰと同様で良質卵子採取が胚発生成績の向上につながらなかった。

以上のことから，本研究課題の２年間の検討の結果，OPU前のホルモン製剤投与について，OPU前48時間でヒアルロン酸を添加することで良質卵子採取の可能性および体外受精後の高い胚盤胞率が期待される。OPU前72時間ではヒアル

© The Ito Foundation

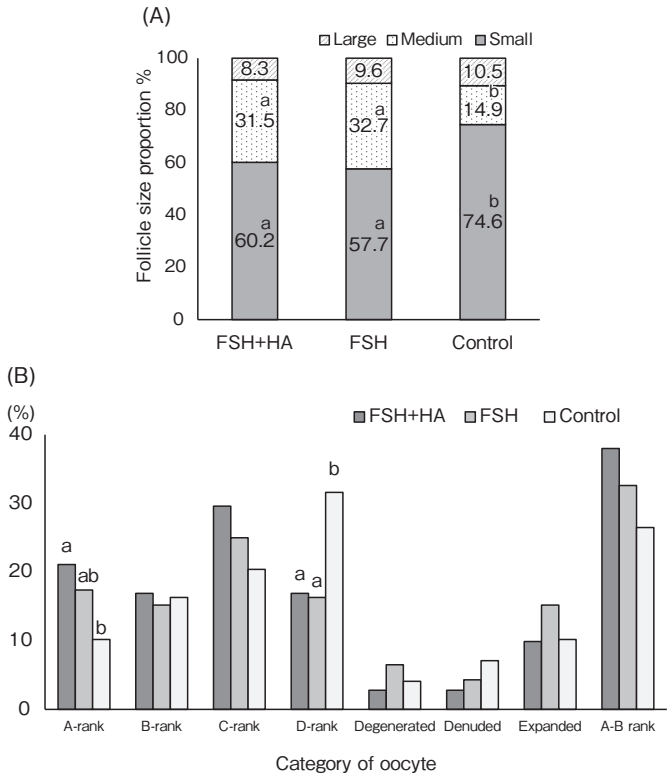


Fig. 1　Proportion of follicle size and oocyte category results by administration of pFSH combined with hyaluronic acid. (A) Proportion of small (<6 mm), medium (6–10 mm), and large (>10 mm) follicles suitable for puncture immediately before ovum pick-up (OPU) in Japanese black cattle submitted to OPU without previous superstimulation treatment (control), after treatment with pFSH (FSH), or pFSH in hyaluronic acid (FSH+HA). (B) 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 ($p<0.05$).

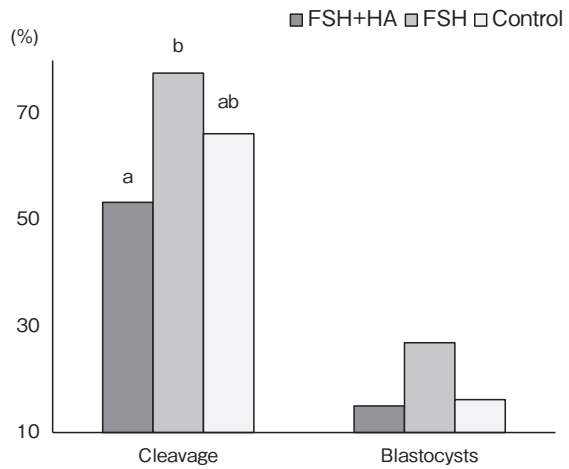


Fig. 2　Proportion of embryo development on *in vitro* fertilization after ovum pick-up in Japanese black cattle. a–b：Columns with different superscripts are statistically significant ($p<0.05$).

© The Ito Foundation

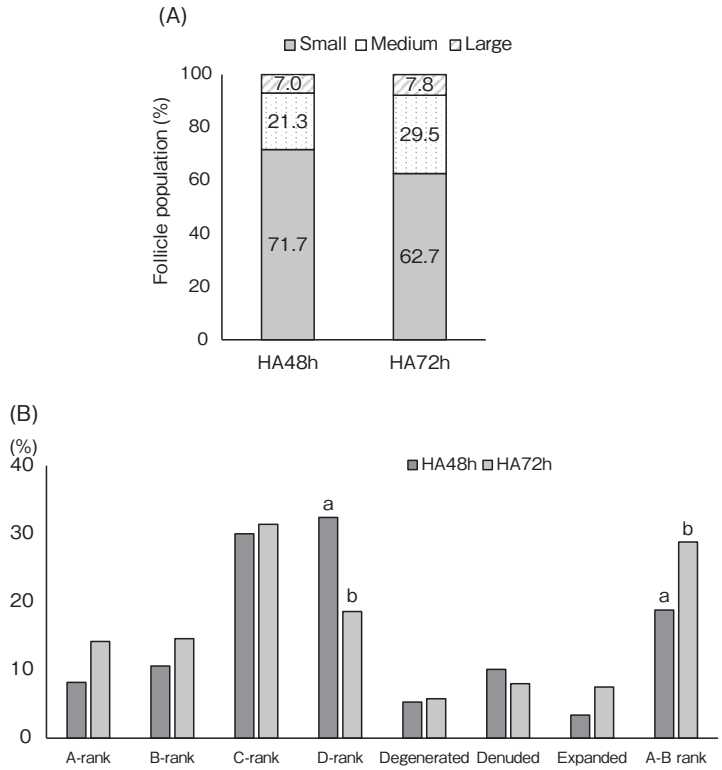


Fig. 3　Proportion of follicle size and oocyte category results by administration of pFSH combined with hyaluronic acid. (A) Proportion of small (<6 mm), medium (6–10 mm), and large (>10 mm) follicles suitable for puncture immediately before ovum pick-up (OPU) in Japanese black cattle submitted to OPU without previous superstimulation treatment (control), after treatment with pFSH (FSH), or pFSH in hyaluronic acid (FSH+HA). (B) 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 ($p<0.05$).

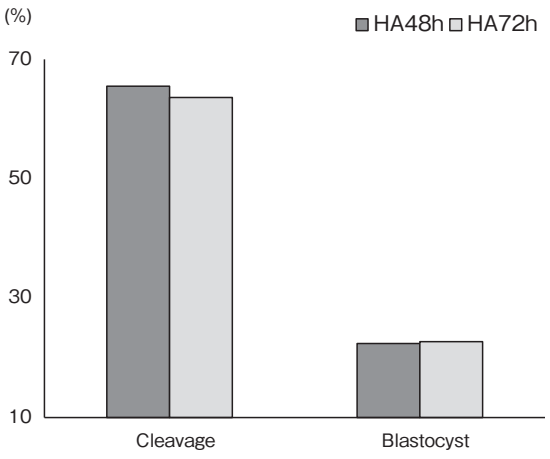


Fig. 4　Proportion of embryo development on *in vitro* fertilization after ovum pick-up in Japanese black cattle.

ロン酸添加で卵割率が低い成績であったが，これはヒアルロン酸の徐放効果によりpFSHの作用時間が長くなったことが影響したと推察された。今後は牛生体内でのホルモン動態を調査し，ヒアルロン酸添加pFSHが生体に及ぼす影響について解明したい。

4．要　　約

本研究は，経腟採卵（OPU）技術の効率化を目的とし，OPU実施前72時間でヒアルロン酸製剤とブタ卵胞刺激ホルモン（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成績に及ぼす影響を検討した。実験Ⅰ

© The Ito Foundation

ではOPU前のpFSH製剤投与量は８AU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４ml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い成績であった。また，体外受精後の胚盤胞率に有意な差は認められなかったが，FSH＋HA区で最も低い成績であった。実験Ⅱの実証実験において，FSH＋HA区においてOPU前48時間と72時間投与について検討した。72時間区で良質卵子が採取可能であったが胚発生成績には差がなかった。以上の結果から，OPU前72時間投与ではヒアルロン酸添加で良質卵子の採取が可能であるが体外受精成績は低い成績であった。

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） Biancucci, A., *et al.*：*Theriogenology*, **85**, 914～921, 2016.
5） Jin, Yu-Jin, *et al.*：*Jounal of Pharmaceutical Investigation*, Vol.40, Special issue, 33～43, 2010.

© The Ito Foundation

ウシ二次卵胞の発育制御におけるTNF α 受容体の役割

Roles of TNF α receptors in development of bovine secondary follicles

平　山　博　樹
（東京農業大学生物産業学部）

Hiroki Hirayama
（Faculty of bioindustry, Tokyo University of Agriculture）

To improve reproductive performance and embryo production efficiency in cattle, it is important to elucidate the mechanism of follicle development. The growth of secondary follicles into antral follicles may be inhibited by the influence of physiological condition such as aging, disease, and nutrition state. In this study, we examined the effect of TNF α on the in vitro growth of secondary follicles using a culture system in which only low concentrations of insulin were added. The development of secondary follicles was maintained for 12 days in this study, and the number of antral follicles did not affect the in vitro growth and survivability of secondary follicles. TNF α, a cytokine that induces both cell death and cell proliferation, significantly promoted secondary follicle growth up to day 4 of culture. However, TNF α significantly inhibited secondary follicle growth after day 10 and significantly increased follicle regression after day 6. The factors responsible for the time-dependent effect of TNF α on secondary follicle growth were examined using TNFR1 antagonist and anti-TNFR2 antibody, but the relationship between receptor type and the action of TNF α was not clear. In addition, TNF α showed a tendency to decrease the expression ratio of proapoptotic gene (*BAX*) to anti-apoptotic gene (*BCL2A1*) in secondary follicles on day 4, but the difference was not statistically significant. The present study demonstrates that TNF α has opposing effects of promoting growth and inducing regression of secondary follicles under in vitro culture conditions with low concentrations of growth factors. The results of this study suggest that further research is needed to fully understand the mechanism of TNF α signaling in the growth of secondary follicles.

1．目　　的

我が国では，ウシにおける人工授精受胎率の低下等を背景に，繁殖雌牛の供用年数延長を目的とした受精卵移植の活用が進んでいる。特に，体外受精卵の移植数は大きく増加し，体外受精用卵子の確保が課題となっている。超音波ガイド経膣採卵（OPU）は生体卵子の供給方法として注目されているが，吸引できる直径約３mm以上の胞状卵胞数は個体，年齢，健康状態などによって数個から50個以上と差が大きく，体外受精卵の生産効率を低下させている。胞状卵胞数の少ない個体

© The Ito Foundation

は，従来の過剰排卵処理でも受精卵の生産数が少ない。これらのことから，個体ごとの胞状卵胞数の増加は，受精卵移植による繁殖成績の改善を進めるうえで重要な課題と言える。近年，卵巣内の原始卵胞数（卵胞リザーブ）と雌牛の繁殖機能の関係が注目されている。卵胞リザーブの多い個体はそれに比例して胞状卵胞数が多く，胚死滅や繁殖障害が少ない。リピートブリーダー牛は，正常牛に比較して卵胞リザーブが少ないことも知られている。

卵胞リザーブは加齢とともに減少し，再び増加することはないとされている。しかし，我々は過剰排卵処理対象牛のなかには一旦減少した胞状卵胞数が再び増加し，採卵成績が回復する個体が存在することを報告している。また，黒毛和種牛の生体内では，加齢とともに二次卵胞から胞状卵胞への発育停滞が発生することが報告されている[1)]。これらの知見は，胞状卵胞数が卵胞リザーブ以外の生理的要因で変動することを示唆している。胞状卵胞への発育を促進する飼養管理やホルモン処理方法が開発できれば，体外受精卵の生産効率や繁殖成績を向上させることができる。しかし，胞状卵胞へと発育する直前のステージである二次卵胞の発育制御機構は十分に解明されていない。

本研究は，ウシ二次卵胞の発育制御因子の役割を解明することを目的として，代謝異常時などに生産され，アポトーシス誘導，細胞増殖促進，細胞のグルコース利用阻害など多面的な機能を持つ腫瘍壊死因子（TNF）αがウシ二次卵胞の発育に及ぼす影響を解析した。

２．方　法

ホルスタイン種のウシ卵巣は食肉処理場で採取し，切り出し法により二次卵胞（直径120-220 μm）を採取した。後期二次卵胞の培養は，Itoh, *et al*[2)] に従って実施した。後期二次卵胞は，0.2% BSA（037-23372，和光純薬）を含む２倍濃度のMedium 199（M2520，Sigma-Aldrich）と３mg/mlコラーゲン酸性溶液（IAC-30，株式会社高研，東京）を等量混和した培地250 μl/wellに包埋し，三次元培養した。包埋した卵胞は，0.1% BSAおよび２mMヒポキサンチン（H9636，Sigma-Aldrich）を添加したMedium 199（12340-030，Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を基礎培地として500 μl添加し，38.5℃，５％CO_2 in airで12日間培養した。培地は２日に一回交換した。卵胞は，培地交換時にZOE蛍光セルイメージャー（BIO-RAD Richmond, CA, USA）を用いて写真撮影し，画像解析ソフト（ImageJ）を用いて直径を測定した。

実験１では，卵巣表面から視認できる胞状卵胞数が20個未満および50個以上の卵巣に分けて二次卵胞の採取と培養を行った。基礎培地には，20 ng/mlのインスリン（I1882，Sigma-Aldrich）を添加し，胞状卵胞数およびインスリン添加が卵胞直径および卵胞退行率に及ぼす影響を解析した。

実験２では，20 ng/mlのインスリンを含む基礎培地に対する10 ng/mlのヒト組み換えTNF α（HZ-1014，Proteintech Group, Inc, IL, USA）添加が卵胞直径および卵胞退行率に及ぼす影響を解析した。さらに，10 μMのTNFR1アンタゴニスト（WP9QY, Cayman Chemical）および５ μg/ml の抗 TNFR2 抗体（10417-R00N6,Sino Biological Inc., Beijing, China）の添加がTNF αの作用に及ぼす影響を解析した。

実験３では，TNF αが二次卵胞のアポトーシスに及ぼす影響を解析した。TNF αを添加して90時間培養した二次卵胞は，３個をプールしてNucleoSpin RNA XS（タカラバイオ株式会社，滋賀）を使用してRNAを抽出した。逆転写反応は，iScript gDNA Clear cDNA Synthesis Kit

© The Ito Foundation

（Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA）を用いて行った。*BAX*および*BCL2A1*のmRNA発現量は，QuantiTect SYBR Green PCR Kit （Qiagen） およびCFX Connectリアルタイム PCR解析システム（Bio－Rad Laboratories, Inc.）を用いて解析した。

3．結果と考察

二次卵胞の体外培養の研究は，卵巣内に大量に存在する前胞状卵胞から成熟卵母細胞を生産し，家畜繁殖や希少動物の保存に利用することを目的に進められてきた。そのため，多くの培養系がインスリン・トランスフェリン・セレン混合物（ITS）などの高濃度成長因子に加えて，ステロイドホルモンや性腺刺激ホルモンなどを添加している。本研究では，無血清条件下で低濃度のインスリンのみを添加した三次元培養により，TNF α の持つ作用を検討した。胞状卵胞の少ない個体の一部には，二次卵胞の発育が停滞している個体が存在することが示唆されている[1)]。また，Nagai, *et al*[3)] は，胞状卵胞数の多い牛の卵巣における初期胞状卵胞は顆粒層細胞の増殖能力が高いことを示唆している。本研究では，発育能力の異なる二次卵胞を実験に使用することを避けるため，実験１として胞状卵胞数と二次卵胞の発育能力の関係を解析した。その結果，インスリン添加の有無に関わらず，胞状卵胞数の多寡は二次卵胞の発育能力に影響を及ぼさなかったことから，本研究では胞状卵胞数を考慮せずに以降の実験を実施した（**Fig. 1**）。

実験２では，低濃度のインスリン添加条件下で培養した二次卵胞の発育に対するTNF α の作用を解析した。その結果，二次卵胞の培養液に対するTNF α の添加は，培養２-４日目の卵胞直径を有意に増加させた（**Fig. 2**）。しかし，TNF α 添加区の卵胞直径は６日目以降減少し，培養10-12日目では対照区に比較して有意に減少した。TNF α 添加区の卵胞退行率は培養４日目から増加し，培養６日目以降は対照区に比較して有意に高い値を示した。この結果から，TNF α は培養初期の二次卵胞の発育を促進するのに対し，培養期間の延長に伴い卵胞発育を抑制することが示唆された。Paulino, *et al*[4)] は，TNF α が体外培養したウシ二次卵胞の発育を促進することを報告して

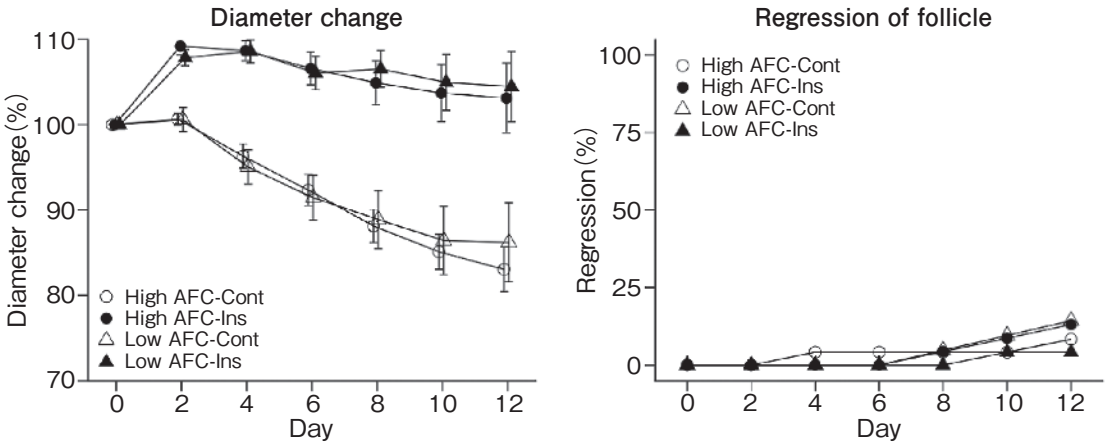


Fig. 1　Effects of antral follicle counts（AFC）on *in vitro* growth of preantral follicles in the presence of insulin. Preantral follicles derived from high（≥50）and low（<20）AFC ovaries were cultured with（Ins）or without（Cont）insulin.

© The Ito Foundation

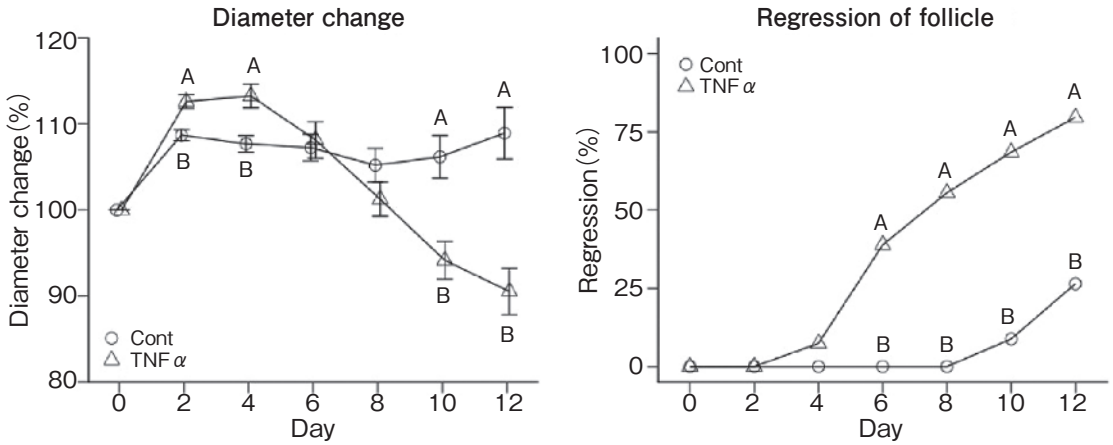


Fig. 2　Effects of TNF α on *in vitro* growth of preantral follicles.

おり，本研究における培養初期の結果と一致した。しかし，Paulino, *et al*[4] の報告とは異なり，本研究では培養時間の延長に伴いTNF α がウシ二次卵胞の退行を誘導した。これまでに，ウシの胞状卵胞ではTNF α が顆粒層細胞と卵胞膜細胞の機能を抑制し，初期の卵胞発育の抑制や卵胞退行を誘導することが明らかとなっている[5]。本研究における培養６日目以降のウシ二次卵胞の退行は，TNF α による顆粒層細胞および卵胞膜細胞の機能抑制によるものであると考えられた。本研究の結果から，TNF α は二次卵胞に対して時間依存的に発育促進と退行誘導という相反する作用を示すことが明らかとなった。同様の研究を行ったPaulino, *et al*[4] の報告では，卵胞刺激ホルモンに加えて成長因子として高濃度のITSを添加しており，強い発育促進条件で実験が行われた。一方で，本研究では二次卵胞の発育を維持できる程度の生理的濃度のインスリンのみを添加したことから，TNF α による卵胞退行作用が検出されたと考えられた。

TNF α が二次卵胞の発育に及ぼす作用における培養時間依存的変化の機序を明らかにすることを目的として受容体阻害実験を行ったところ，TNFR1アンタゴニスト（WP9QY）は二次卵胞の発育と退行に対するTNF α の作用に有意な影響を及ぼさなかった（**Fig. 3**）。WP9QYによるTNF α とTNFR1の結合阻害のIC50は，５ μMとされている。本研究ではIC50を上回る10 μMのWP9QYを添加したものの明確な効果が得られなかったことから，TNF α のTNFR1への結合阻害効果を明らかにするためにはより高濃度の添加実験を行う必要があると考えられた。抗TNFR2抗体もTNF α による卵胞発育に対する作用に影響を及ぼさなかった（**Fig. 4**）。しかし，抗TNFR2抗体は，培養８–10日目におけるTNF α による卵胞退行を抑制する傾向を示した。TNF α は，細胞死と細胞増殖の両方を誘導するサイトカインであり，ブタ卵胞ではTNFR2を介したTNFシグナルが顆粒層細胞の生存に関与することが報告されている[6]。TNFR1およびTNFR2を介したTNFシグナルの違いが二次卵胞の発育に及ぼす影響を明らかにするためには，受容体の阻害条件をさらに検討する必要があると考えられた。

実験３では，TNF α による卵胞直径の増加が

© The Ito Foundation

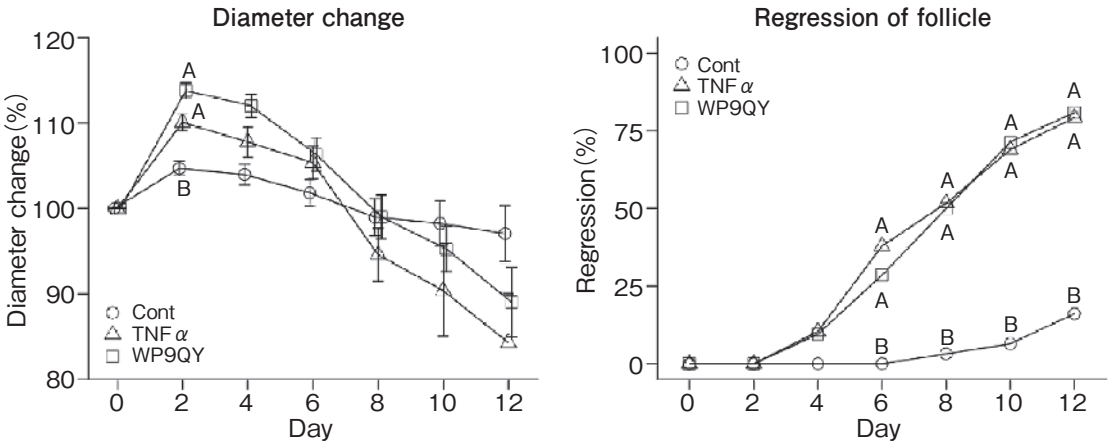


Fig. 3　Effects of TNFR1 antagonist (WP9QY) on the regulation of preantral follicle development by TNF α.

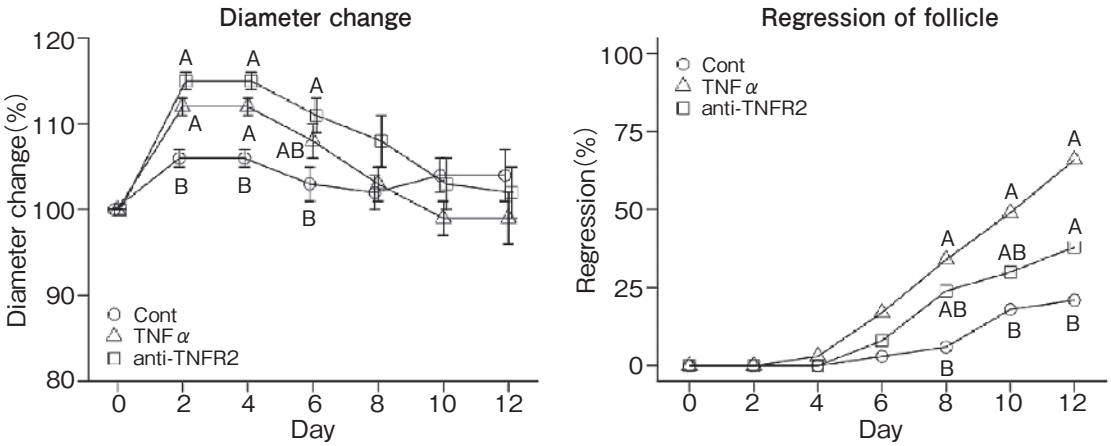


Fig. 4　Effects of anti-TNFR2 antibody on the regulation of preantral follicle development by TNF α.

認められる培養4日目の二次卵胞におけるアポトーシス関連遺伝子の発現を解析した。その結果，TNF α 区におけるアポトーシス抑制遺伝子（*BCL2A1*）に対するアポトーシス促進遺伝子（*BAX*）の発現量比は，対照区に比較して低かったが，有意差は認められなかった（**Fig. 5**）。TNF α が二次卵胞の発育に及ぼす作用における培養時間依存的変化の機序を明らかにするためには，培養の初期と後期におけるアポトーシス関連遺伝子の発現量を比較する必要がある。TNFR2は前述のように顆粒層細胞の生存に関与することが示唆されているものの，その役割は十分に解明されていない。今後は，ステロイド合性機能なども含めて，TNF α が二次卵胞の機能に及ぼす影響と受容体のタイプの関係を解析する必要があると考えられた。

© The Ito Foundation

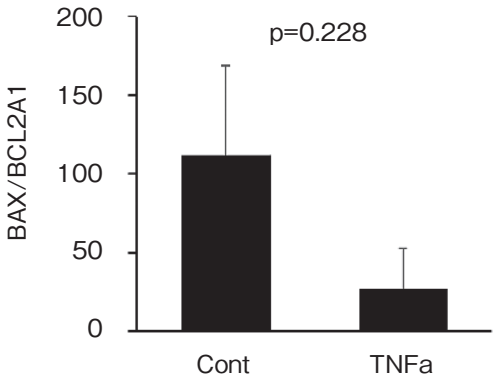


Fig. 5　Effects of TNF α on the expression ratio of proapoptotic gene（*BAX*）to anti-apoptotic gene（*BCL2A1*）in preantral follicles cultured *in vitro* for 4 days.

4．要　約

ウシの繁殖成績や受精卵生産効率を向上させるためには，卵胞発育メカニズムを解明し胞状卵胞数を増加させるための技術開発が重要となる。二次卵胞から胞状卵胞への発育は，加齢や飼養管理などの影響を受けて停滞すると考えられている。本研究では，低濃度のインスリンのみを添加した培養系を利用し，二次卵胞の体外発育に及ぼすTNF α の作用を検討した。本研究の培養条件では，二次卵胞の発育が12日間維持され，胞状卵胞数の多寡は二次卵胞の体外発育成績に影響を及ぼさなかった。細胞死と細胞増殖の両方を誘導するサイトカインであるTNF α は，二次卵胞の発育を培養４日目までは有意に促進し，10日目以降は有意に抑制した。TNF α は，培養６日目以降の卵胞退行を有意に増加させた。二次卵胞の発育に対するTNF α の作用が培養時間依存的に変化する要因を明らかにするためにTNFR1およびTNFR2の阻害実験を行ったが，受容体のタイプとTNF α の作用の関係は明らかとならなかった。また，TNF α の添加は培養４日目の二次卵胞におけるアポトーシス抑制遺伝子（*BCL2A1*）に対するアポトーシス促進遺伝子（*BAX*）の発現量比を低下させる傾向を示したが，統計学的有意差は認められなかった。本研究では，低濃度の成長因子を添加した体外培養条件下において，TNF α が二次卵胞の発育に対して促進と退行誘導の相反する作用を有することを明らかにした。本研究の結果から，今後は二次卵胞の発育におけるTNF α シグナル伝達機構を詳細に検討する必要があると考えられた。

文　献

1）Iwata, H.：Age-associated events in bovine oocytes and possible countermeasures, *Reprod Med Biol*, **15**, 155～164, 2016.
2）Itoh, T., Kacchi, M., Abe, H., Sendai, Y., Hoshi, H.：Growth, Antrum Formation, and Estradiol Production of Bovine Preantral Follicles Cultured in a Serum-Free Medium1, *Biol Reprod*, **67**, 1099～1105, 2002.
3）Nagai, K., Yanagawa, Y., Katagiri, S., Nagano, M.：The relationship between antral follicle count in a bovine ovary and developmental competence of in vitro-grown oocytes derived from early antral follicles, *Biomed Res*, **37**, 63～71, 2016.
4）Paulino, L. R. F. M., Cunha, E. V., Barbalho Silva, A. W., Souza, G. B., Lopes, E. P. F., Donato, M. A. M., Peixoto, C. A., Matos-Brito, B. G., van den Hurk, R., Silva, J. R. V.：Effects of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta on in vitro development of bovine secondary follicles, *Reprod Domest Anim*, **53**, 997～1005, 2018.
5）Sakumoto, R., Shibaya, M., Okuda, K.：Tumor necrosis factor-alpha（TNF alpha）inhibits progesterone and estradiol-17beta production from cultured granulosa cells：presence of TNFalpha receptors in bovine granulosa and theca cells, *J Reprod Dev*, **49**, 441～9, 2003.
6）Nakayama, M., Manabe, N., Inoue, N., Matsui, T., Miyamoto, H.：Changes in the expression of tumor necrosis factor（TNF）α, TNF α receptor（TNFR）2, and TNFR-associated factor 2 in granulosa cells during atresia in pig ovaries, *Biol Reprod*, **68**, 530～535, 2003.

© The Ito Foundation

体外受精由来ウシ胚盤胞の可逆的発生停止を誘導する体外培養法の開発ならびにその誘導による胚盤胞の胚質改善の可能性

Possible improvement of embryonic quality of *in vitro* derived bovine blastocysts by induction of diapause-like state in *in vitro* culture

石　井　利　通
（三重県畜産研究所）

Toshimichi Ishii
（Mie Prefectural Livestock Research Center）

Mouse blastocysts can be induced to enter a diapause-like paused state in *in vitro* culture via inhibition of the cytoplasmic kinase mTOR, a major nutrient sensor and growth promotor, by treating with a mTORC1/C2 inhibitor, INK128. The present study evaluated the possibility of inducing a diapause-like state in bovine blastocysts developed *in vitro* by INK128 treatments. First, the effects of increasing concentrations (0–400 nM) of the inhibitor on the viability and hatching rates of day 7 blastocysts (day 0 : *in vitro* fertilization) cultured until day 10 were examined. Most embryos treated with 100 nM INK128 arrested at the non-hatching stage. However, embryo viability remained very high regardless of the inhibitor treatments. Immunofluorescence staining experiments revealed that the expression levels of phosphorylated 4EBP1, an mTORC1 target, in embryos treated with 100 nM INK128 were significantly decreased, compared to those with 0 nM INK128 ($p < 0.05$), whereas those of phosphorylated AKT, an mTORC2 target, were not different between embryos treated with and without 100 nM INK128. These findings suggest that INK128 may modulate the processes involved in developmental pause via the downregulation of mTORC1 activity in bovine blastocysts.

1．目　　的

ウシ胚生産技術の飛躍的な進展に伴い，世界中で生産されるウシ胚の約半数が体外受精に由来することが報告されている。一方で，ウシ体外受精胚の胚質に起因する低い耐凍性や低受胎が，利活用に大きな障害となっている。すなわち，ウシ体外受精胚の胚質改善は，胚移植によるウシ生産技術のさらなる進展において喫緊の課題と考えられる。

多くのほ乳類動物では，胚盤胞が着床前の段階で一時的に発生を停止する休眠現象が起こることが知られている。また，子宮内で誘導されるマウス休眠胚盤胞の特徴として，１）着床後の発生能が高くなる[1)]，２）DNA損傷を修復する能力がある[2)]等の休眠中に胚自身が胚質を改善するとの報告がなされている。非休眠動物と考えられてきた反すう動物であるヒツジの胚盤胞においても胚の休眠状態が誘導され，休眠胚をヒツジ雌へ移植

© The Ito Foundation

すると，非休眠胚盤胞の移植の場合よりも高い割合で産子が得られることが報告された[3]。もし，同様に非休眠動物と考えられてきた反すう動物であるウシの胚盤胞でも休眠が誘導できるならば，胚質改善による産子への発生能の向上が期待でき，さらには，体外培養で休眠誘導が可能となれば，凍結保存に代わる新たな胚の保存と移送技術の開発にもつながるであろう。

最近，体外培養マウス胚盤胞をmTORC1/C2（主要な栄養センサーで成長のプロモーター酵素）の阻害剤であるINK128で処理することによって休眠様の可逆的発生停止（以下，可逆的発生停止）を誘導できることが示され，可逆的発生停止した胚盤胞は，胚移植により産子へ発生する能力を保持していることも明らかにされた[4]。本研究では，ウシ胚盤胞の体外培養での可逆的発生停止を誘導できる方法を開発するために，INK128処理が体外授精由来ウシ胚盤胞（IVPウシ胚盤胞）の発生に及ぼす効果を検証した。

２．方　法

2.1　ウシ卵巣の採取ならびにウシ胚の培養方法

食肉処理場由来の卵巣から卵子卵丘細胞複合体（COCs）を回収した。回収したCOCsは，10％ウシ胎児血清および0.20AU/ml卵胞刺激ホルモン添加HEPES-TCM199で21時間培養した。その後，IVF100で６時間体外受精を行った。体外受精を実施した受精卵は，５％ウシ胎児血清添加CR1aa液（500 μl）で７日間培養した。試験には，７日目に発生したウシ胚盤胞を用い，10％ウシ胎児血清添加KSOM液を用い96穴Ｕ底低吸着プレートにて培養した。

2.2　mTORC1/C2阻害剤（INK128）処理による体外培養IVPウシ胚盤胞の形態的変化および生存性に及ぼす効果（実験１）

マウス胚盤胞をmTORC1/C2阻害剤INK128（200 nM）で処理することで胚の可逆的発生停止が誘導される[4]。そこで，IVPウシ胚盤胞の生存性および形態的変化に及ぼすINK128（0，50，100，200，400 nM）処理の各濃度における効果を検証した。具体的には，７日目のIVPウシ胚盤胞を用い実体顕微鏡下で胚を経日的に観察した。なお，ほとんどの細胞が黒色変化や壊死した胚を変性胚とし，それ以外の胚を生存胚として胚の生存率を求めた[5]。

2.3　INK128処理あるいは無処理IVPウシ胚盤胞のmTORC1/C2活性の測定（実験２）

先の実験で明らかとなった発生停止様の変化が生じたウシ胚盤胞のmTORC1/C2活性を以下の方法で測定した。mTORC1活性については，その標的である4EBP1のリン酸化の程度を，そしてmTORC2活性については，その標的であるAKTのリン酸化の程度を，胚の免疫蛍光染色を行い，その蛍光強度をImageJによって半定量的に求めた。なお，本実験では，4EBP1抗体（Cell Signaling Technology，#9452），リン酸化4EBP1抗体（Cell Signaling Technology，#9459），AKT抗体（Proteintech Group Inc，10176-2-AP）ならびにリン酸化AKT抗体（Bioss Inc, bs-0876R-TR）を一次抗体として用いた。

2.4　統計解析

INK128処理がウシ胚盤胞の生存性および形態的変化に及ぼす影響については，カイ二乗検定（必要に応じ，フィッシャーの正確確率検定またはイエーツの補正を実施），それ以外の有意差検定においては，ｔ-検定を用いた。$p < 0.05$を統計学的に有意とした。

３．結果と考察

実験１では，100 nM以上のINK128処理ウシ胚盤胞において50 nMのINK128処理ならびに無処

© The Ito Foundation

置のウシ胚盤胞と比べ，培養開始から培養４日目までの透明帯からの孵化率が低下した（$p < 0.05$）（**Fig. 1**）。また，100 nMのINK128処理ウシIVP胚盤胞では，培養開始より培養３日目までは，50 nMのINK128のならびに無処置のウシ胚盤胞と生存性に差が認められなかった（**Fig. 1**）。以上の結果より，100 nMのINK128処理によってウシIVP胚盤胞の発生停止が誘導されることが示唆された。実験２では，mTORC1の標的である4EBP1のリン酸化の程度がINK128（100 nM）処理区において減少した（$p < 0.05$）（**Fig. 2**）。mTORC１は，翻訳に関与する因子や転写因子を介して細胞周期の進行を調整していることが報告されており[6]，本実験におけるINK128（100 nM以上）処理ウシ胚での孵化率低下は，胚の細胞周期の調整による発生停止に起因していることが推察された。一方，実験２では，mTORC2活性の標的であるAKTのリン酸化の程度は，INK128処理区と無処理区において差が認められなかった（**Fig. 2**）。mTORC2は，細胞骨格の維持，細胞の生存性，糖代謝および脂質代謝の調整に深く関与していることが報告されており[6]，体外培養マウス胚盤胞の可逆的発生停止が誘導された胚においては，mTORC2活性の低下に起因する細胞内の脂肪分解の増加が胚の生存性の向上に重要であることが報告されている[7]。また，体外培養マウス胚盤胞のINK128処理による可逆的発生停止胚では，4EBP1ならびにAKTのリン酸化の程度が低下していることが報告されており[4]，mTORC1/C2の活性を同時に低下させることが可逆的発生停止の誘導に必要なのかもしれない。本実験では，INK128処理したIVPウシ胚盤胞では，

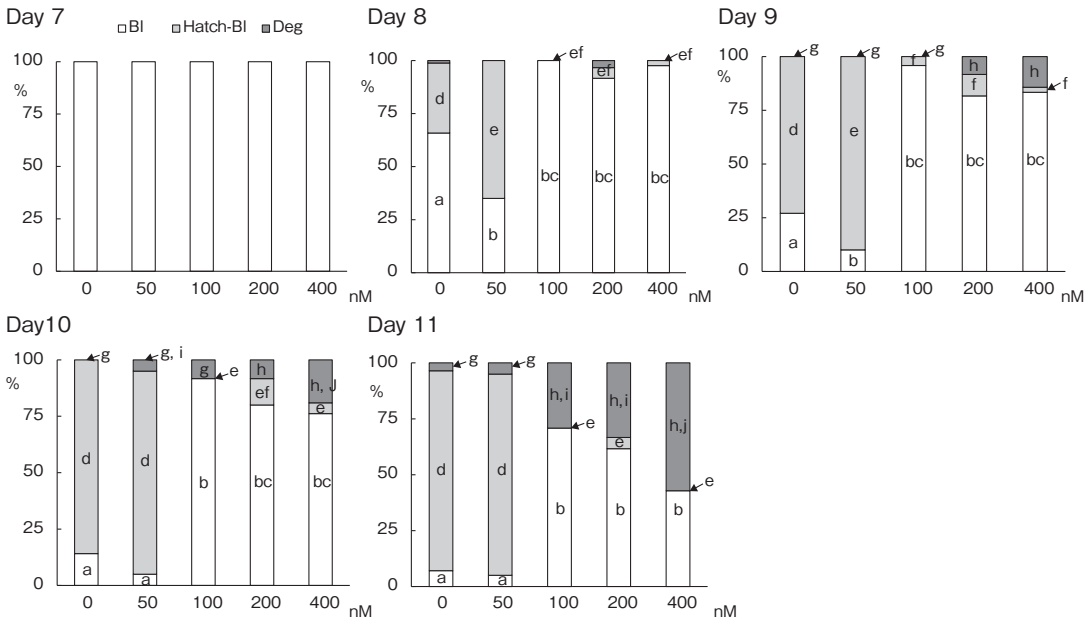


Fig. 1　Morphological changes in day 7 bovine blastocysts cultured *in vitro* for 4 days in different concentrations of INK128 (0, 50, 100, 200 and 400 nM). Blastocysts obtained 7 days post IVF were assigned randomly to the following five groups： 0 nM (n = 85), 50 nM (n = 20), 100 nM (n = 24), 200 nM (n = 60), and 400 nM (n = 42). The experiments were repeated six times. Values designated by separate superscript letters within each morphological category differ significantly ($p < 0.05$). Morphological categories： blastocyst (Bl), hatching blastocyst (Hatch-Bl), and degenerated embryo (Deg).

© The Ito Foundation

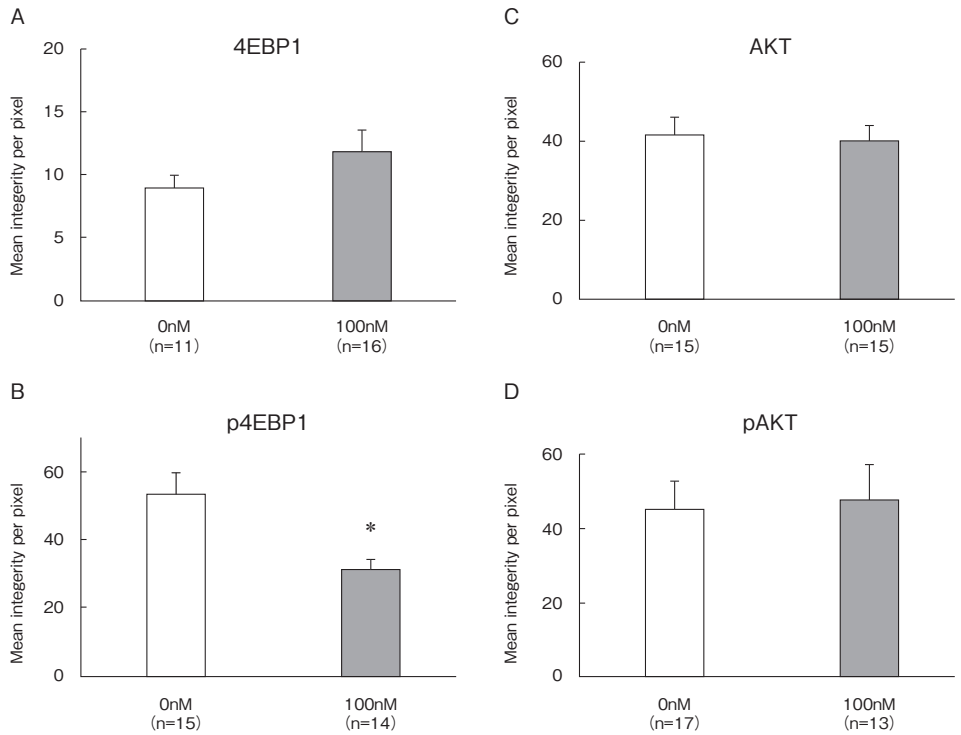


Fig. 2　Expression levels of 4EBP1, p4EBP1, AKT, and pAKT in bovine embryos treated with or without 100 nM INK128 for 3 days. Individual mean pixel intensity was measured per embryo using ImageJ software, and mean pixel intensities of 4EBP1（A）, p4EBP1（B）, AKT（C）and pAKT（D）are depicted. Bars represent SEM. *（$p < 0.05$）

mTORC2の活性が抑制されておらず，このことが，培養３日目以降のINK128処理のウシ胚で生存性が高率に維持されなかった理由の１つとも推察された。

本実験は，ウシIVP胚盤胞をmTORC1/C2阻害剤であるINK128で処理することで，胚の透明帯からの孵化率が低下し，これがmTORC1活性の低下に起因する可能性があることを見出した。今後は，本実験では得ることができなかったmTORC2活性の抑制手法について検討を行い，ウシIVP胚盤胞の体外培養での可逆的発生停止の誘導を目指す。

４．要　　約

ウシの胚盤胞において休眠現象（可逆的胚発生停止）が誘導できるかは不明である。本実験では，細胞代謝や成長の調整因子であるmTORC1/C2の阻害剤であるINK128でウシIVP胚盤胞を処理することにより，可逆的胚発生停止が誘導できるかを検証した。その結果，100 nM以上のINK128処理胚では，50 nM INK128処理ならびに無処理胚と比べ，透明帯からの孵化率は有意に低下した。また，100 nM INK128処理胚の培養開始から３日目までの生存率は，50 nM INK128処理ならびに無処理胚と比べて差が認められなかった。さらに，INK128（100 nM）処理によってウシIVP胚盤胞におけるmTORC1活性の標的である4EBP1のリン酸化の程度が無処理胚に比べて有意に低下した。本実験において，ウシIVP胚盤胞のmTORC1の活性がINK128処理によって抑制

© The Ito Foundation

され，その結果，３日間と短期間ではあるが，胚の発生休止が誘導されたことが示唆された。今後は，本実験では得ることのできなかったmTORC2活性の抑制手法についてさらなる検討を行い，ウシIVP胚盤胞の体外培養でのより長期間の可逆的発生停止の誘導を目指す。

文　献

1） Kaufman, M. H., Barton, S. C., Surani, M. A.：*Nature*, **256**, 53～55, 1977.

2） Surani, M. A. H., Fishel, S. B.：*J Reprod Fertil*, **29**, 159～172, 1981.

3） Grazyna, E. P., Emanuela, T., Marta, C., Paola, T, Jacek, A. M., Pasqualino, L.：*PLoS One*, **7**, e33027, 2012.

4） Aydan, B.-K., Steffen, B., Hu, J., Trisha, A. M., Miroslav, H., Marina, G., Jun, S. S., Miguel, R.-S.：*Nature*, **540**, 119～123, 2016.

5） Ishii, T., Kawano, K., Tanaka, N., Tomita, K., Saito, N., Yamada, M.：*J Reprod Dev*, **65**, 275～280, 2019.

6） Roberto, Z., Alejo, E., David, M. S.：*Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 21～35, 2011.

7） Abdiasis, M. H., Yuliang, W., Julie, M., Lilyana, M., Chaozhong, S., Daniel, C. J., Christopher, C., Jason, W. M., Elisabeth, M., Megan, R. S., Walter, L. R., Oliver, F., Carol, B. W., C, Anthony, B., Hannele, R.-B.：*Dev Cell*, **52**, 236～250, 2020.

© The Ito Foundation

受精卵の未凍結保存における植物由来成分の有効性検証と配合の最適化

Effects of plant-derived ingredients on non-cryogenic preservation of early embryos, and its blending optimization

星　野　由　美
（日本女子大学理学部）

Yumi Hoshino
（Faculty of Science, Japan Women's University）

This study investigated the effectiveness and optimal conditions for the use of plant-derived components in the preservation of 2-cell embryos without freezing under a supercooling condition. Our previous studies showed that the University of Wisconsin cold storage solution (UW solution) effectively preserves oocytes without freezing. In this study, a UW solution was used as the basic preservation solution. Coffee lees extract with a supercooling effect suppressing the formation of ice crystals was added as a plant-derived component to test its effectiveness in preserving early embryos. Results indicated that early embryos could be stored at −6℃ for 72 h using UW solution; however, some of these early embryos showed cell membrane deformation. This could be mitigated by adding 10% coffee lees extract (containing caffeine, caffeic acid, chlorogenic acid, and quinic acid) with no evident morphological damage to early embryos. To identify the active components for cell preservation, we verified the individual effects of caffeine and chlorogenic acid, both of which are known to exhibit antioxidant activities and suppress ice nucleation. Caffeine was found to be effective for early embryo storage when 10 times the quantity (173 μg/ml) was added. However, as caffeine concentration increased, damage (such as tearing of the zona pellucida) was observed. A high concentration (623 μg/ml) of chlorogenic acid, although slightly effective in preserving early embryos, damaged cell membranes. Therefore, chlorogenic acid alone was not suitable. Since cells are probably injured by low temperatures, early embryos could be stored in a healthy state by adding coffee lees extract before storage. In the caffeine-only group, the morphological damage of cells that occurred at −6℃ could be eliminated by storage at 4℃. We will verify the combination of active components and storage temperature in future research to make long-term preservation of embryos easier.

1．目　　的

受精卵を含む生殖細胞の保存は，優良形質をもつ家畜遺伝資源の活用や希少動物の遺伝子保存に有効であり，重要な技術として位置づけられている。細胞の長期保存には，ガラス化法や緩慢凍結法などの凍結保存法が広く用いられており，液体窒素中で半永久的な保存が可能である。しかし，

© The Ito Foundation

凍結により生じる細胞膜へのダメージや，保存液に含まれる凍害保護物質による細胞毒性は，現行の凍結保存法では避けることができない[1,2]。また最近の研究によると，保存液に含まれる凍害保護物質が受精卵移植後に子宮内で炎症を引き起こす原因になることも指摘されている。受精卵が受けるダメージは，その後の発生に大きく影響することから，細胞へのダメージの少ない未凍結での保存法の確立に取り組むこととした。

これまでのところ，細胞の未凍結保存の成功事例は少ない。2014年に米国ハーバード大学の研究グループがラットの肝臓を臓器保存液であるベルザーUW液（以下，UW液）に，細胞保護剤として3-O-メチル-D-グルコースを添加して，－６℃で72時間の未凍結保存に成功したと報告した[3]。一方，関西大学の河原秀久教授らは，植物（ヒノキ，大根など）や食品廃棄物（コーヒー粕，あん粕など）から氷晶形成抑制物質を発見し，その抽出に成功した[4]。氷晶形成抑制物質には，不凍タンパク質や過冷却促進物質として分類されるものがある。これを適切な濃度で使用すると，低温下でも氷核形成が抑制されるため，過冷却状態を維持させることができる。一般に液体が凝固点以下でも固体にならない状態を過冷却と言うが，液体中に異物が存在すると過冷却温度は上昇し凍結しやすくなる。しかし，氷晶形成抑制物質を添加することで過冷却温度を下げることが可能になるため，細胞や組織の保存に有効であると考えられる。そこで本研究では，これらの報告を参考にUW液を基礎保存液として用い，細胞保護剤の代わりに細胞毒性のない植物由来物質を添加することで，受精卵の未凍結保存への有効性を検証した。

２．方　　法

植物由来の抽出液に含まれる過冷却促進物質（氷晶形成抑制物質）の単離・精製および含有成分の分析については，関西大学の河原秀久教授の協力を得た。過冷却促進物質として低温環境下での効果が期待される候補物質の中から，抗氷核活性値が高く，抗酸化効果も期待されるコーヒー粕抽出液を細胞保護剤の代替として選択した。

本研究では，マウスの受精卵を研究対象として，常法に従い体外受精を行うことで受精卵を獲得した[5]。体外受精後，卵子をKSOM培地に移して体外培養し，翌日，受精卵（２細胞期胚）を得た。受精卵の保存は，UW液（アステラス製薬）を基礎保存液として，コーヒー粕抽出液を終濃度５％または10％添加することで，その効果を検証した。さらに，コーヒー粕抽出液の含有成分のうち，主要成分であり抗氷核形成阻害作用が高いカフェインと，抗酸化効果が期待されるクロロゲン酸に着目し，受精卵保存への有効性を検証した。各条件，保存液100 μlに受精卵（５～10個）を浸し，超低温アルミブロック恒温槽（クライオポーター，サイニクス）を使用し，20℃から２℃/minの速度で段階的に冷却し－６℃で72時間保持した。温度制御は，Berendsenらの方法に準じて行った[3]。保存期間終了後，受精卵は－６℃から２℃/minの速度で段階的に20℃まで加温し，２％パラホルムアルデヒドで固定した後，核と細胞膜をそれぞれPropidium Iodide（PI）とPhalloidinで染色し，共焦点レーザー顕微鏡（FV 1200，オリンパス）で観察することで，受精卵の健常性を評価した。

３．結果と考察

コーヒー粕抽出液１㎎/mlに含まれる成分を分析したところ，カフェイン，カフェ酸，クロロゲン酸，クマル酸が主として含まれていることが明らかになった。それぞれの濃度と抗氷核活性値を比較したところ，弱酸性フェノール層にカフェインが多く含まれ，抗氷核活性が最も高かった。カ

© The Ito Foundation

フェインは哺乳動物の卵子や受精卵の活性を維持する効果があり，培養液にも添加されることが多い[6]。また，クロロゲン酸はカフェ酸とキナ酸がエステル結合したポリフェノールであり，一般的に抗酸化作用が知られている。このことから，本研究ではコーヒー粕抽出液とカフェイン，クロロゲン酸を過冷却促進物質として使用し，受精卵の未凍結保存への有効性を検証した。

まず，UW液単独で受精卵を保存したところ，細胞膜に歪みなどの変形が認められたが，細胞死を意味する核凝縮は認められなかったことから，UW液は受精卵の保存に有効であると考えられた（**Fig. 1**）。そのうえで，コーヒー粕抽出液が受精卵の未凍結保存にどのような効果をもたらすのかを検証したところ，コーヒー粕抽出液添加区ではUW液単独区と比較すると濃度依存的に細胞膜の歪みが改善され，新鮮な受精卵に近い形態で保存できることを確認した（**Fig. 1**）。このことから，コーヒー粕抽出液の含有成分がマウス受精卵の未凍結保存において細胞膜の保護に作用したものと考えられた。

次に，コーヒー粕抽出液の含有成分であるカフェインについて未凍結保存への効果を検証した。カフェインには氷核形成阻害作用がある[4]。コーヒー粕抽出液におけるカフェインの濃度は173 μg/mlであったことから，この値を基準に高濃度区（1.73×10^{3} μg/ml），中濃度区（1.73×10^{2} μg/ml），低濃度区（1.73×10^{1} μg/ml，コーヒー粕抽出液10％添加と同濃度）で効果を比較した。その結果，カフェイン添加のいずれの濃度でも細胞へのダメージ軽減の効果があり，未凍結保存への有効性が認められた。特に，中濃度区で効果が高く，コーヒー粕抽出液10％添加区と同等の効果が得られた（**Fig. 2**）。しかし，高濃度区では割球の変形を示す受精卵も複数認められたことから，カフェイン単独での効果には限界があると考えられた。次に，クロロゲン酸についてその有効性を検証した。コーヒー粕抽出液におけるクロロゲン酸の濃度は62.3 μg/mlであったことから，この値を基準として，高濃度区（62.3×10^{-5} g/ml）

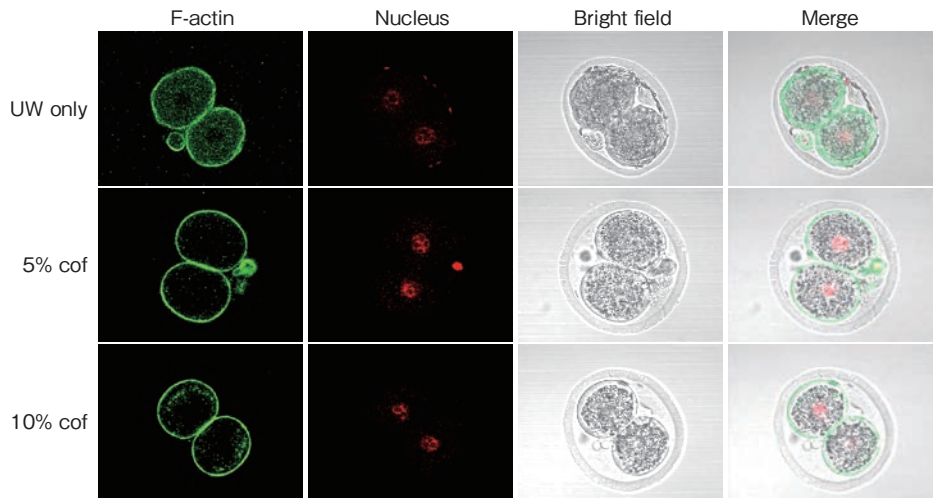


Fig.1　Effects of coffee lees extract on non-cryogenic preservation of 2-cell embryo.
It shows the morphology of 2-cell after adding 5% (middle panel) or 10% (lower panel) coffee lees extract (cof) to UW solution, and storing at −6 ℃ for 72 hours. Upper panel shows using UW solution alone. F-actin (green) and nucleus (red) were stained with Phalloidin and PI.

© The Ito Foundation

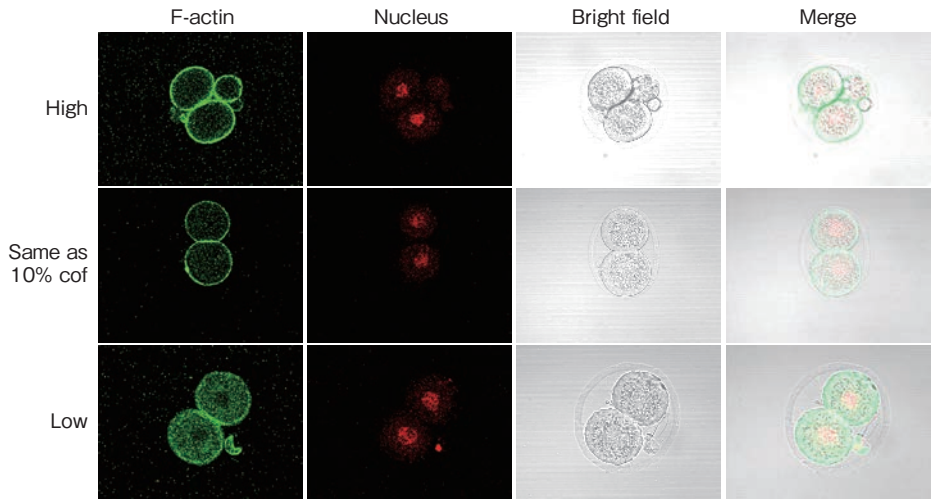


Fig.2　Effects of caffeine with different concentrations on non-cryogenic preservation of 2-cell embryo.
Caffeine was most effective for early embryo storage when same as concentration of 10% coffee lees extract (same as 10% cof) was added.

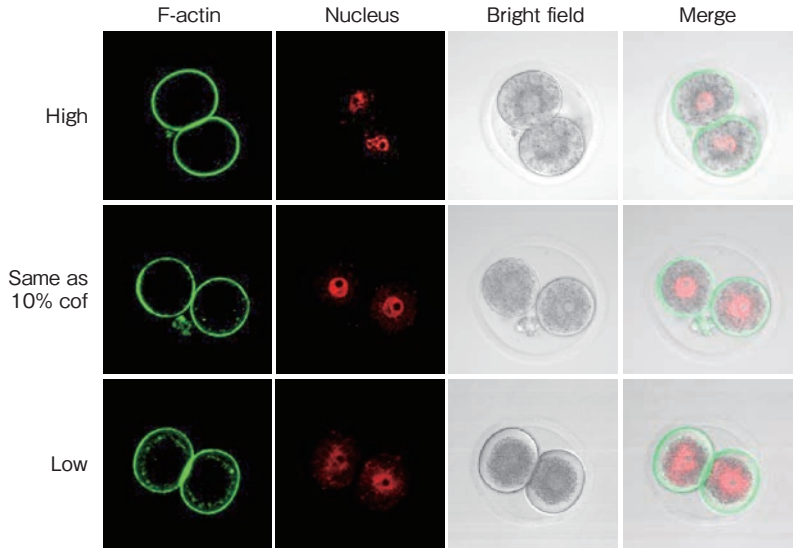


Fig.3　Effects of chlorogenic acid with different concentrations on non-cryogenic preservation of 2-cell embryo.
A high concentration of chlorogenic acid, although effective in preserving early embryos, damaged cell membranes (upper panel).

中濃度区（62.3×10^{-6}g/ml，コーヒー粕抽出液添加10％と同濃度），低濃度区（62.3×10^{-7}g/ml）で効果を比較した。その結果，今回比較した濃度条件では，高濃度で細胞膜へのダメージが少なく，未凍結保存への有効性が認められた（**Fig. 3**）。しかし，中・低濃度区においては，細胞膜の歪みや割球の変形が認められ，クロロゲン酸単独での効果は低かった。前述のとおり，クロロゲン酸には抗酸化作用があるが，受精卵の未凍結保存では，低温によるダメージが生じていた可能性があり，抗酸化効果を発揮するに至らなかったと考えられる。

© The Ito Foundation

本研究では，コーヒー粕抽出液とその成分であるカフェインおよびクロロゲン酸をUW液に添加することで，受精卵の未凍結保存が可能であることを示した。動物種や対象細胞に最適な条件検討を行う必要はあるが，適切な条件を構築できれば，新規保存法としての発展が期待されるため，引き続き生殖細胞の未凍結保存に有効な成分を探索し，保存条件の最適化を図っていく予定である。

４．要　約

本研究では，未凍結での受精卵の保存法の確立を目指して，植物由来成分の有効性と至適条件の検討を行った。研究代表者によるこれまでの研究から，臓器保存液として利用されているUW液が，生殖細胞の未凍結保存に有効であることが明らかになっていることから，本研究ではUW液を基礎保存液として用いた。添加する植物由来成分には，過冷却促進作用と抗氷核活性の高いコーヒー粕抽出液を選択し，その含有成分と合わせて未凍結保存への有効性を検証した。その結果，受精卵（２細胞期胚）はUW液を用いた場合，－６℃の温度条件で72時間保存することができたが，一部の受精卵では細胞膜の変形が認められた。このダメージは，コーヒー粕抽出液（終濃度10%）を添加することで軽減させることができた。コーヒー粕抽出液を添加した条件では，形態的なダメージは確認されず，－６℃の条件下で良好な状態で受精卵を保存できた。コーヒー粕抽出液にはカフェイン，カフェ酸，クロロゲン酸，キナ酸が含まれている。保存への有効成分を特定するため，この含有成分のうち氷核形成阻害作用と抗酸化作用が知られているカフェインとクロロゲン酸に注目し，その単独での効果を検証した。その結果，カフェイン単独でもコーヒー粕抽出液に含まれる同成分の10倍量を添加することで，保存に有効であることを確認した。しかし，カフェイン濃度を上げていくと，ピペッティング操作によって透明帯が破れるなどの細胞損傷も認められた。一方，クロロゲン酸単独では，高濃度区において受精卵の保存に有効であったが，細胞膜へのダメージも認められたことから，単独での効果は低いと考えられた。低温に暴露することにより，細胞は低温障害を起こしている可能性が考えられるが，コーヒー粕抽出液の添加によって，受精卵を良好な状態で保存できたことから，コーヒー粕抽出液には低温障害から細胞を保護する効果があったと考えられる。今後の研究で成分の組み合わせや保存温度についても検証し，長期間の保存を目指すとともに，より簡便な保存法の確立に繋げていく。

文　献

1） Mandawala, A. A., *et al.*：Cryopreservation of animal oocytes and embryos：Current progress and future prospects, *Theriogenology*, **86**(7), 1637～1644, 2016.

2） Saragusty, J., Arav, A.：Current progress in oocyte and embryo cryopreservation by slow freezing and vitrification, *Reproduction*, **141**(1), 1～19, 2011.

3） Berendsen, T. A., *et al.*：Supercooling enables long-term transplantation survival following 4 days of liver preservation, *Nat Med*, **20**(7), 790～793, 2014.

4） Kawahara, H., *et al.*：Characterization of Anti-Ice Nucleation Activity of the Extract from Coffee Refuse, *Biocontrol Sci*, **22**(4), 205～211, 2017.

5） Hoshino, Y., Sato, E.：Protein kinase B（PKB/Akt）is required for the completion of meiosis in mouse oocytes, *Dev Biol*, **314**(1), 215～223, 2008.

6） Ariu, F., *et al.*：Effect of caffeine treatment before vitrification on MPF and MAPK activity and spontaneous parthenogenetic activation of in vitro matured ovine oocytes, *Cryo Letters*, **35**(6), 530～536, 2014.

© The Ito Foundation

内腔の有無に着目したウシ形成期黄体の機能解析

Function analysis of the corpus luteum with cavity during luteal formation in cows

窪　　友　瑛[1]・古　山　敬　祐[2]

（[1]北海道立総合研究機構酪農試験場，[2]大阪公立大学大学院獣医学研究科）

Tomoaki Kubo[1] and Keisuke Koyama[2]

（[1]Dairy research center, Hokkaido research organization, [2]Graduate school of veterinary science, Osaka metropolitan university）

The purpose of this study was to determine the relationship between the presence of a cavity in corpus luteum（CL）during luteal formation and that luteal function. Forty-five Holstein lactating cows were inseminated at day 0 and classified into Compact CL, Small-cavity CL（the cavity size to the total CL size ratio below median）, and Large-cavity CL（that ratio above median）groups based on the presence of cavity and the size of cavity on day 5. The conception rate at day 30 was significantly higher in the Small-cavity CL group（80.0%）than in the Compact CL group（26.7%）. Comparison of luteal blood flow area by color Doppler ultrasonography showed that the area was significantly larger in the Small-cavity CL group than in the Compact CL group on day 5, while no difference was observed in the luteal tissue area and the plasma progesterone（P_4）concentration. Therefore, the higher conception rate observed in the Small-cavity CL group was presumably related to increased luteal blood flow. Fifty-two formative luteal corpora lutea were obtained from ovaries derived from slaughterhouses of meat breeds, and the experiment groups were classified in the same manner as described above. Concentrations of P_4, total cholesterol, and glucose in the luteal tissue were analyzed. Although there were no significant differences in P_4 and total cholesterol concentrations in the CL tissue between the groups, the glucose concentration in the tissue of the Large-cavity CL group was lower than that of the Compact CL group and the Small-cavity CL groups. This result was suggesting that the CL with large cavity may have lower P_4 production capacity. These results provide the evidence for the high fertility in cows with small- to medium-sized cavity in the CL during luteal formation.

1．目　　的

黄体は，妊娠の成立と維持に必須のステロイドホルモンであるプロジェステロン（P_4）を分泌する内分泌器官である。ウシにおいては，黄体の中心部に内容液が貯留した腔（内腔）を有する場合があることが知られており，超音波検査で黄体を観察すると，内腔の存在が容易に確認できる。これまで複数の研究[1～3]において，黄体における内腔の有無により，人工授精（AI）あるいは受精卵移植（ET）後のウシの受胎率に差はないと報告されてきた。我々は，AI後の泌乳牛におけ

© The Ito Foundation

る内腔の有無と受胎率との関係について，内腔の確認時期や内腔サイズを考慮して解析した結果，黄体開花期での内腔の有無で受胎率に差はないが，黄体形成期において内腔がある場合に受胎率が有意に高いこと，さらに同時期において内腔サイズが大きくなると受胎率が低下することを明らかにした。これらの結果は，形成期黄体において小さい内腔が存在することが，ウシの受胎性にポジティブな影響を与えている可能性を示している。

黄体形成期において，妊娠の成立に対する黄体由来P_4の役割は特に重要である。妊娠牛は，非妊娠牛に比べAI後５日目頃から血中P_4濃度が高く推移している[4]。また，AI後５日目のウシに膣内留置型P_4製剤を投与すると，胚伸長が早まり，妊娠シグナル物質であるIFNτの分泌量が高まることも知られている[5]。これらのことから，形成期黄体から分泌されるP_4は，近傍の卵管・子宮に作用し，胚発生および発育を支える局所環境の構築を促すことで，ウシの高い受胎性に寄与すると考えられている。一方，酪農試験場の泌乳牛において，黄体形成期の血中P_4濃度を調べた結果，内腔の有無で血中P_4濃度に差は認められなかった。しかし，先行研究において，開花期黄体の組織中P_4濃度は，内腔のない黄体と比較して内腔を有する黄体で有意に高いことが報告されているため[6]，内腔を有する形成期黄体は，局所におけるP_4産生能が高く，ウシの高い受胎性に寄与している可能性がある。

以上より本研究では，形成期黄体における内腔の存在と卵巣局所における黄体機能との関連性を明らかにすることを目的として，近年，黄体機能の評価指標として活用されているカラードプラ超音波検査による黄体血流量の評価，および食肉処理場由来卵巣から採取した黄体組織におけるP_4濃度の解析を実施した。

２．方　法

2.1　形成期黄体の内腔の有無による黄体血流量の比較

北海道立総合研究機構酪農試験場のフリーストール牛舎で飼養されているホルスタイン種泌乳牛のべ45頭（産次：2.2±0.9産，分娩後日数：93.2±35.6日，乳量：36.8±6.3kg／日，平均±SD）を供試した。歩数計による活動量増加またはスタンディング行動が確認された個体においてAIを実施し，AI後24時間以内の排卵確認および１個排卵した個体のみを調査対象とした。AI日を０日目として，AI後５および12日目にカラードプラ機能付き超音波検査装置（HS-1600V，本多電子）を使用した経直腸超音波検査およびヘパリン加真空採血管（VP-H100K，テルモ）を用いた採血を実施した。供試牛は，AI後30日目に超音波検査により妊娠診断を実施した。

超音波検査は，Ｂモードおよびパワードプラモード（**Fig. 1**）で黄体画像を撮影し，画像解析ソフト（Image J，NIH）を使用して黄体全体面積，黄体内腔面積および黄体血流面積を測定した。測定したデータから黄体組織面積（黄体全体面積－黄体内腔面積）および黄体内腔比（黄体内腔面積／黄体全体面積）を算出した。AI後５日目の黄体における内腔の有無および黄体内腔比の違いに基づき，内腔のない個体を無腔群（Compact CL），内腔比が10.2％（中央値）未満の個体を小腔群（Small－cavity CL）および10.2％以上の個体を大腔群（Large－cavity CL）に分類し，AI後30日目の受胎率，黄体組織面積，黄体血流面積および血中P_4濃度を比較した。

採取した血液は，４℃，1,500ｇ，30分間の遠心分離後に血漿サンプルとし，血中P_4濃度測定まで－30℃で保管した。血中P_4濃度測定は，Takenouchiら[7]の方法に則り実施した。受胎率

© The Ito Foundation

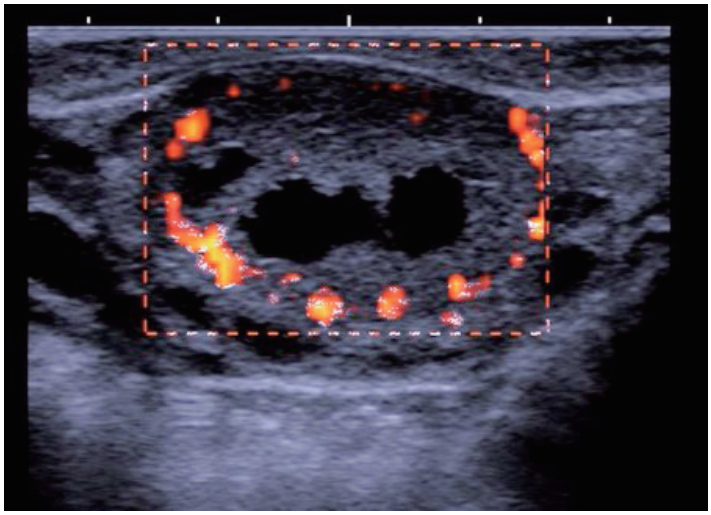


Fig. 1　Example of a luteal blood flow image taken in the power Doppler mode of ultrasonography.
The colored area surrounding the corpus luteum was calculated using Image J software and defined as the luteal blood flow area.

の統計解析については，受胎の有無を目的変数とし，試験群および産次を説明変数とした一般化線形モデル（リンク関数：ロジット関数）を実施した。その他の項目の統計解析は，Tukey HSD法により多重比較を実施した。解析には，Rソフトウェア（ver. 4.0.2）を使用した。

2.2　形成期黄体の内腔の有無による黄体組織中P_4濃度の比較

食肉処理場（京都食肉市場（株））において，黒毛和種またはF１種のと殺後の卵巣を採取し，卵巣の肉眼的所見から卵巣周期のステージを推定し[8]，黄体形成期に相当する黄体を52個取得した。取得した黄体に割入れを実施し，黄体全体および内腔の長径および短径を記録し，黄体全体面積および黄体内腔面積を測定した[9]。前述と同様に，黄体組織面積および黄体内腔比を算出した。内腔のない黄体を無腔群，内腔比が7.0％（中央値）未満の黄体を小腔群および7.0％以上の黄体を大腔群に分類し，黄体組織面積，黄体組織中のP_4濃度，総コレステロール濃度およびグルコース濃度を比較した。

黄体から５mm角程度の組織を切り出し，重量測定後に15秒以上液体窒素に浸漬し，その後解析まで－80℃で保管した。黄体組織0.1ｇ当たり１％BSA－PBSを１mLを加え，ホモジナイザー（TH115-PCR，OMNI）で15,000rpm，２分間ホモジナイズを実施した。得られた懸濁液を1,500ｇ，15分間遠心分離し，上清を採取した。黄体組織中P_4濃度測定は，上清サンプルを用いて前述した手法で実施した。なお，希釈倍率は500倍とした。また，上清サンプル中の総コレステロール濃度およびグルコース濃度は，生化学自動分析装置（3100，日立）を用いて測定した。統計解析は，試験群間の各測定値について，Tukey HSD法により多重比較を実施した。

３．結果と考察

3.1　形成期黄体の内腔の有無による黄体血流量の比較

各試験群におけるAI後30日目の受胎率を**Table 1**に示した。受胎率は，無腔群（26.7％）と比較して小腔群（80.0％）において有意に高かった。

© The Ito Foundation

Table 1　Comparison of conception rate, luteal tissue area and plasma progesterone concentration after artificial insemination in dairy cows with corpus luteum（CL）having cavity or not.

Experiment groups	Conception rate（%）	day5		day12	
		Luteal tissue area（mm^2）	Plasma P_4 *2（ng/ml）	Luteal tissue area（mm^2）	Plasma P_4 *2（ng/ml）
Compact CL（n=15）	26.7[a]	302.4 ± 14.9	1.31 ± 0.09	535.4 ± 22.4	5.62 ± 0.30[a]
Small-cavity CL*1（n=15）	80.0[b]	339.3 ± 12.5	1.54 ± 0.11	551.5 ± 20.6[a]	5.64 ± 0.37[a]
Large-cavity CL *1（n=15）	53.3	310.0 ± 27.9	1.36 ± 0.09	483.6 ± 22.7[c]	4.66 ± 0.28[c]

*1：At day 5 after insemination, the experimental groups were classified as having the median luteal cavity ratio（the ratio of luteal cavity area to the total luteal area）of less than 10.2%（Small-cavity CL）and greater than 10.2%（Large-cavity CL）.
*2：progesterone
Data are shown as mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant differences（ab：$p<0.01$, ac：$p<0.05$）between groups.

これまで我々は，黄体形成期にあたるAI後４－６日目の泌乳牛において，内腔がない黄体を有する個体と比較して，内腔がある黄体を有する個体の受胎率が高く，内腔がある黄体を有する個体の中でも，黄体内腔比が中央値未満の内腔がある黄体を有する個体と比較して中央値以上の内腔がある黄体を有する個体で受胎率が低下することを明らかにしている（投稿準備中）。さらに，ET時の黄体に内腔を有するホルスタイン種未経産牛の受胎率は，内腔のない黄体を有する個体と比較して有意に高いことが本年報告されている[10]。

AI後５日目の黄体組織面積および血中P_4濃度については，試験群間で有意差は認められず，AI後12日目の黄体組織面積および血中P_4濃度は，小腔群と比較して大腔群で低値を認めた（$p<0.05$）（**Table 1**）。先行研究において，黄体内腔の有無は血中P_4濃度に影響しないことや[6, 12]，$80mm^2$を超える大きな内腔を有する黄体の場合は，血中P_4濃度が低下すること[1]が示されており，本研究結果はこれらの結果を支持するものである。**Fig. 2**に，各試験群におけるAI後５および12日目の黄体血流面積を示した。AI後５日目の黄体血流面積は，無腔群と比較して小腔群で大きく（$p<0.05$），AI後12日目についても，無腔群と比較して小腔群で大きい傾向を認めた（$p<0.10$）。ET後に妊娠した泌乳牛は，非妊娠牛と比較してET時の黄体血流面積が約1.42倍大きいことが報告されており[11]，黄体形成期における黄体血流量の増加が，ウシの高い受胎性に繋がることが明らかとなっている。一方，この報告においては，妊娠牛と非妊娠牛間のET時の血中P_4濃度に差は認めていなかった。これらのことから，本研究において小腔群で認められた高い受胎率は，黄体組織面積や血中P_4濃度の影響ではなく，黄体血流量の増加が関与していると推察された。黄体血流量が増加することが，ウシの受胎性を向上させる要因についてはよく分かっていない。黄体のある卵巣と同側の卵管[13]および子宮角[14]のP_4濃度は，反対側のそれらよりも高くなることが示されている。黄体内の活発な血流は，P_4合成に必要な栄養および基質を供給し，局所的な分泌により黄体と同側の卵管や子宮角のP_4濃度を高め，胚の生存と妊娠の成立に寄与する可能性が考えられる。今後，黄体における内腔の有無と卵管および子宮角におけるP_4濃度の関係性を明らかにする必要がある。

3.2　形成期黄体の内腔の有無による黄体組織中P_4濃度の比較

黄体組織面積，黄体組織中P_4濃度および総コレステロール濃度は，各試験群間でいずれも有意

© The Ito Foundation

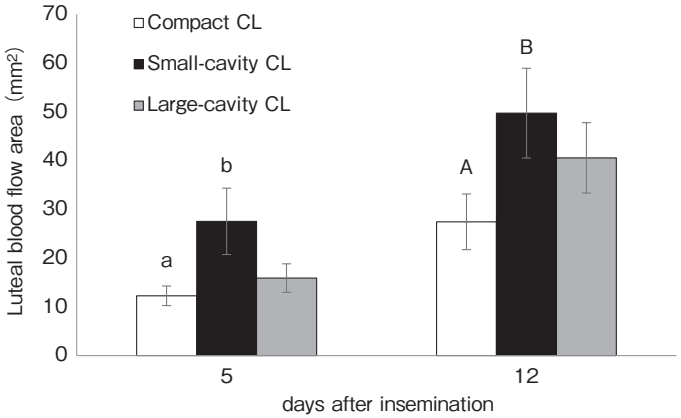


Fig. 2　Comparison of luteal blood flow area between the experiment groups.
At day 5 after insemination, the experimental groups were classified as having the median cavity ratio (the ratio of luteal cavity area to the total luteal area) in the corpus luteum (CL) of less than 10.2% (Small-cavity CL) and greater than 10.2% (Large-cavity CL).
Data are shown as mean ± SEM. Different superscript letters on the same day indicate significant difference or significant tendency (ab : $p<0.05$, AB : $p<0.10$) between groups.

Table 2　Comparison of luteal tissue area, concentrations of progesterone, total-choresterol and glucose in the formative corpus luteum (CL) tissues in beef cows.

Experiment groups	Luteal tissue area (mm^2)	Progesterone (μg/g)	Total choresterol (mg/g)	Glucose (mg/g)
Compact CL (n=25)	276.4 ± 15.3	27.2 ± 2.0	185.6 ± 10.0	32.0 ± 2.2a
Small-cavity CL* (n=13)	280.4 ± 25.1	26.3 ± 2.8	188.5 ± 16.4	32.3 ± 3.0^{A}
Large-cavity CL* (n=14)	230.2 ± 23.7	21.4 ± 1.9	209.3 ± 16.6	23.6 ± 1.7^{bB}

*：The experimental groups were classified as having the median luteal cavity ratio (the ratio of luteal cavity area to the total luteal area) of less than 7.0% (Small-cavity CL) and greater than 7.0% (Large-cavity CL).
Data are shown as mean ± SEM. Different superscript letters indicate significant difference or significant tendency (ab : $p<0.05$, AB : $p<0.10$) between groups.

差を認めなかった（**Table 2**）。内腔の有無に着目して黄体組織中P_4濃度測定を実施した研究は，私の知る限り１報[6]のみである。この研究では，ホルスタイン種の開花期黄体を対象としており，黄体組織中P_4濃度は，内腔がある場合に有意に高いことを示している。本研究では，肉用種の形成期黄体を対象としたため，品種や卵巣周期のステージの違いが影響した可能性はあるが，詳細は不明である。

コレステロールはP_4の前駆体であり，黄体内腔液中のコレステロール濃度は，卵巣周期のステージの中では黄体形成期に最も高いことが示されている[15]。そのため，黄体形成期において黄体内腔に貯留した内腔液がP_4前駆体の供給源として機能し，黄体組織中のコレステロール濃度が上昇する可能性が考えられたが，本研究ではそのような結果は得られなかった。一方，大腔群における黄体組織中グルコース濃度は，無腔群および小腔群と比較して低かった（それぞれ$p<0.05$および$p<0.10$）。グルコースは，形成期黄体細胞の培養実験において，P_4産生を増加させることが示されている[16]。また，有意差はないものの，黄

© The Ito Foundation

体組織中P_4濃度は大腔群で最も低い数値であり，これらのことから，内腔の大きい黄体のP_4産生能は低い可能性がある。さらに，**Table 1** に示したAI後12日目の泌乳牛のデータでは，大腔群における黄体組織面積が有意に小さかった。そのため，内腔の大きい黄体は，P_4を産生する組織量および産生能の２つの側面で，内腔の小さい黄体よりも劣ると考えられる。

以上より本研究結果は，小～中程度サイズの内腔のある黄体を持つウシの高い受胎性を裏付ける基礎的知見となると考えられる。また，黄体内腔の評価は今後，受卵牛選定の際や，AI後早期のホルモン剤投与による不妊治療を実施する際の新たな指標として活用され，ウシの受胎率向上に寄与することが期待できる。

４．要　約

本研究では，形成期黄体における内腔の存在と卵巣局所における黄体機能との関連性を明らかにすることを目的とした。人工授精（AI）後のホルスタイン種泌乳牛45頭を供試し，AI後５日目の黄体内腔の有無および内腔サイズに基づき，無腔群，小腔群（黄体全体に対する内腔の比率が中央値未満）および大腔群（同比率が中央値以上）に分類した。AI後の受胎率は，無腔群（26.7％）と比較して小腔群（80.0％）において有意に高かった。カラードプラ超音波検査による黄体血流面積の比較では，AI後５日目の黄体血流面積は，無腔群と比較して小腔群で有意に大きかった一方，黄体組織面積や血中プロジェステロン（P_4）濃度に差は認められなかった。そのため，小腔群で認められた高い受胎率は，黄体血流量の増加が関与していると推察された。また，肉用種における食肉処理場由来卵巣から形成期黄体を52個取得し，上述と同様に試験群の分類を実施し，黄体組織におけるP_4，総コレステロールおよびグルコース濃度の解析を実施した。黄体組織中P_4および総コレステロール濃度は，各試験群間でいずれも有意差を認めなかった。一方，大腔群における黄体組織中グルコース濃度は，無腔群および小腔群と比較して低く，内腔の大きい形成期黄体はP_4産生能が低い可能性が示された。以上より本研究結果は，小～中程度サイズの内腔のある黄体を持つウシの高い受胎性を裏付ける基礎的知見となると考えられる。

文　献

1）Kastelic, J. P., Bergfelt, D. R., Finther, O. J.：*Theriogenology*, **33**(6), 1269～1278, 1990.
2）Grygar, I., Kudláč, E., Doležel R., Nedbálková, J.：*Anim Reprod Sci*., **49**, 77～82, 1997.
3）Garcia, A., Salaheddine, M.：*Reprod Domest Anim*., **35**, 113～118, 2000.
4）Mann, G. E., Lamming, G. E., Robinson, R. S., Wathes, D. C.：*J Reprod Fertil Suppl*., **54**, 317～328, 1999.
5）Mann, G. E., Fray, M. D., Lamming, G. E.：*Vet J*., **171**(3), 500～503, 2006.
6）Okuda, K.：*J Reprod Dev*., **43**(6), 55～64, 1997.
7）Takenouchi, N., Oshima, K., Shimada, K., Takahashi, M.：*J Vet Med Sci*., **11**, 1315～1321, 2004.
8）Ireland, J. J., Murphee, R. L., Coulson, P. B.：*J Dairy Sci*., **63**, 155～160, 1980.
9）Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T., Kaneda, Y.：*J Reprod Dev*., **47**, 283～294, 2001.
10）Jaśkowski, B. M., Herudzińska, M., Gehrke, M., Niżański, W.：*Theriogenology*, **178**, 73～76, 2022.
11）Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T.：*Theriogenology*, **86**, 1436～1444, 2016.
12）Perez-Marin, C.：*Reprod Dom Anim*., **44**, 384～389, 2009.
13）Wijayagunawardane, M. P. B., Cerbito, W. A., Miyamoto, A., Acosta, T. J., Takagi, M., Miyazawa, K., Sato, K.：*Theriogenology*, **46**(7), 1149～1158, 1996.
14）Takahashi, H., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M.：*J Vet Med Sci*., **78**(4), 613～618, 2016.
15）Rizzo, A., Stefani, A. L., Piccinno, M., Roncetti, M., D'Onghia, G., Sciorsci, R. L.：*Res Vet Sci*., **109**, 56～58, 2016.
16）Nishimura, R., Hasegawa, H., Yamashita, M., Ito, N., Okamoto, Y., Takeuchi, T., Kubo, T., Iga, K., Kimura, K., Hishinuma, M., Okuda, K.：*J Vet Med*

© The Ito Foundation

Sci., **79**, 1878～1883, 2017.

© The Ito Foundation

牛黄体血流の多寡は子宮内膜機能の局所調節に関与するのか？

Is bovine blood flow involved in the local regulation of endometrial functions?

金　澤　朋　美・木　崎　景一郎
（岩手大学農学部共同獣医学科）

Tomomi Kanazawa and Keiichiro Kizaki
(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University)

Luteal vascularity is essential for progesterone (P_4) biosynthesis from corpus luteum, and influences fertility in cattle. However, no studies have investigated the mechanism that luteal vascularity controls fertility. The present study was conducted to investigate influences of luteal vascularity on endometrial functions. Ultrasound examinations were performed on 6 Japanese Black cattle to evaluated maximum diameter of corpus luteum (CL), CL area, CL tissue area, and blood flow area (BFA) on Day 7 (Day 0 = the day of estrus). After ultrasound examination, endometrial biopsy samples and blood samples were collected from these cattle. Plasma and endometrial P_4 concentrations were measured by enzyme immunoassay analysis. RNA-sequencing (RNA-seq) was performed to determine endometrial gene expression. No differences in CL area, CL tissue area, and plasma and endometrial P_4 concentrations were observed between high (HV；n = 3) and low vascularity (LV；n = 3) groups. BFA was greater in HV group than in LV group ($p < 0.01$). RNA-seq dataset revealed that high vascularity of the CL altered the expression of 386 differentially expressed genes (DEGs；248 up- and 138 down-regulated). In addition, DEGs were retrieved for gene ontology enrichment analysis. Up-regulated genes were mainly associated with cell adhesion, extracellular matrix organization, and regulation of leukocyte apoptotic process. In conclusion, it was suggested that endometrial gene expression on Day 7 may change according to the amount of luteal vascularity, and thereby influence fertility.

1．目　　的

近年，牛の繁殖成績の低下は深刻な問題であり，受胎性に関わる要因の探索，ならびに受胎性向上に資する技術の開発は急務である。牛の妊娠成立には，卵巣に機能的な黄体が存在し，妊娠維持に必要なプロジェステロン（P_4）が高い濃度で維持され，胚の正常な発育と着床に適した子宮内環境の構築が必要不可欠である。近年，超音波ドプラ法が牛の繁殖領域に応用されたことで黄体血流の観察が容易となり，新たな黄体機能評価法として注目されている。これまで，胚移植（ET）時とET後７日（発情後７および14日）において受胎牛の黄体血流は不受胎牛と比較して多く，黄

© The Ito Foundation

体血流が受胎性に関与していることが明らかになっている[1)]。しかし，受胎牛と不受胎牛では末梢血中P_4濃度の推移に差がなく[1)]，黄体血流の多寡が受胎性に影響を及ぼすメカニズムは解明されていない。一方，黄体と同側子宮角先端の内膜組織のP_4濃度は反対側と比較して高く，黄体から分泌されたP_4が卵巣静脈，動脈および子宮動脈を介し同側子宮角へ局所的に作用することが示唆されている[2)]。また，子宮内膜組織のP_4濃度は，受胎性関連遺伝子の発現に影響を及ぼすことが明らかにされている[2, 3)]。これらのことから，黄体血流と受胎性には卵巣・子宮間の局所的なメカニズムが存在し，黄体血流の多寡が黄体と同側子宮角内膜組織のP_4濃度や妊娠成立に関与する遺伝子発現に影響を及ぼし，胚の着床・受胎を制御している可能性が推察される。

そこで本研究では，子宮内膜組織の網羅的遺伝子発現解析を行い，黄体血流量と子宮内膜組織のP_4濃度および発現変動遺伝子との関係を調べ，黄体血流の多寡が子宮内膜の局所的な機能調節に関与しているか否かを明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2.1　供試材料

健康で発情周期が正常な黒毛和種経産牛６頭を供試した。発情日をDay ０とし，Day ７に卵巣の超音波検査を行い，同時に子宮内膜組織および血液を採取した。

2.2　超音波検査による黄体血流量の測定

Day ７に超音波画像診断装置（MyLab One Vet，Esaote SpA）を用いて卵巣の観察を行った。はじめにＢ－モードを用いて黄体の静止画を３回記録し，次にカラーフローマッピングモードを用いて黄体のドプラ画像を３回記録した。画像解析ソフト（Image J，Wayne Rasband（NIH））により，最大直径，黄体面積（最大直径での断面積），黄体内腔面積（内腔が存在した場合：最大直径での黄体内腔の断面積），黄体組織面積（黄体面積と黄体内腔面積の差）および黄体血流面積（BFA）を算出し，３回の平均値をデータとして使用した。

2.3　子宮内膜組織および血液の採取

子宮内膜組織採取前に頸部静脈よりヘパリン加真空採血を用いて採血を行った。血液を遠心分離後，血漿を採取しP_4の測定まで－35℃で保存した。キシラジン製剤（セデラック２％注射液，日本全薬工業（株））0.05mg/kgを用いて鎮静後，２％リドカイン（キシロカイン注射液２％，アスペンジャパン（株））により尾椎硬膜外麻酔を行った。滅菌済み子宮内膜採取器（富士平工業（株））を用いて，黄体側子宮角先端の子宮内膜組織を採取した。採取した子宮内膜組織は液体窒素にて凍結し，P_4の測定およびRNA抽出まで－80℃で保存した。内膜組織採取後，トラネキサム酸製剤（トラムリン，日本全薬工業（株））を10mg/kg，サリチル酸ナトリウム製剤（ザルソブロガ糖注NZ，日本全薬工業（株））を6.5mg/kg静脈内投与した。

2.4　P_4濃度の測定

血漿および子宮内膜組織中P_4濃度を酵素免疫測定法により測定した。

2.5　RNA抽出

子宮内膜バイオプシー試料からTRIzol試薬（Thermo Fisher Scientific）を使用して総RNAを抽出した。抽出したRNAの濃度および品質は，RNA 6000 Pico kit（Agilent）を用いて，Agilent Bioanalyzer 2100を使用して測定した。得られたRNAの品質は，RNA Integrity Number値はいずれも7.5以上であったことから，RNAシークエンシング（RNA-seq）による網羅的遺伝子発現解析に供した。

© The Ito Foundation

2.6　RNA-seq解析

抽出RNAからNEBNext® Poly（A）mRNA Magnetic Isolation Module（New England Biolabs）を用いてPoly（A）を分離，NEBNext® UltraTMII Directional RNA Library Prep Kit を使用してRNA-seqのライブラを調製した。データ取得には，Illumina NovaSeq 6000 Sequencing system（Illumina）を使用した。生シークエンシングデータは，ソフトウエアFastQC v0.11.7による品質チェック，Trimmomatic v0.38によるシーケンスリードのトリミング，HISAT2 v2.1.0によるマッピングした。マッピングにはBos taurus ARS-UCD1.2（http://asia.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index）をリファレンスゲノムとして使用した。標準化した発現量は，ソフトウエアfeatureCounts v1.6.3を用いてマッピングされたフラグメントのカウントを行い，transcripts per million（TPM）値として算出した。また，ソフトウエアstats v3.6.1による階層型クラスター解析，主成分分析，相関評価，ヒートマップ作成を実施するとともに，DESeq2 v1.24.0による発現変動遺伝子の抽出，plotly v4.9.2.1によるVolcanoプロット作成を行った。Gene ontologyエンリッチメント（GO）解析は，DAVID webservice v1.22.0を使用して実施した。

2.7　統計解析

BFAに基づき，供試牛を血流の多い群（HV，n＝３）と少ない群（LV，n＝３）に分類した。黄体の最大直径，黄体面積，黄体組織面積，BFAおよびP_4濃度の２群間の差の検定にはBrunner-Munzel検定を行い，危険率５％未満を有意差ありとした。すべてのデータは平均±標準誤差で示した。

３．結果と考察

3.1　各群の黄体の形態および血流量の比較

BFAに基づき分類したHV群およびLV群について，黄体の最大直径，黄体面積，黄体組織面積およびBFAの比較を行った（**Table 1**）。黄体の最大直径，面積および組織面積は２群間で差が認められなかった。黒毛和種牛において，Day ７の黄体の最大直径は平均22～23mmと報告されており[4]，本研究においても同様の結果となった。また，BFAは，HV群（92.97±15.92mm^2）とLV群（43.56±1.62mm^2）で有意な差が認められた（P＜0.01）。ET時（Day ７）のBFAによる受胎性診断基準は43.0mm^2であり[1]，それ以下の牛では受胎性が低い。したがって，本研究のLV群は受胎性が低い牛群であると考えられた。

3.2　黄体血流量が血漿および子宮内膜組織中P_4濃度に及ぼす影響

各群の血漿および黄体側子宮角先端の子宮内膜組織中P_4濃度を**Table２**に示した。血漿・子宮内膜組織中P_4濃度ともにHV群とLV群で差は認められなかった。乳用種において，Day ５または６の子宮内膜組織中P_4濃度は，黄体側子宮角先

Table 1　Features of the corpus luteum（CL）in the high（HV）and low（LV）vascularity groups on Day 7.

Item	HV（n = 3）	LV（n = 3）	p value
CL maximum diameter（mm）	22.3 ± 0.8	23.5 ± 1.7	0.62
CL area（mm^2）	341.48 ± 25.13	370.33 ± 44.71	0.62
CL tissue area（mm^2）	322.20 ± 43.34	353.71 ± 39.82	0.26
BFA（mm^2）	92.97 ± 15.92	43.56 ± 1.62	<0.01

Abbreviation：BFA, blood flow area.

© The Ito Foundation

Table 2 Plasma and endometrial progesterone（P_4）concentrations on Day 7.

	P_4 concentrations	
Group	Plasma（ng/ml）	Endometrium（ng/g）
HV（n = 3）	2.25 ± 0.10	6.94 ± 0.51
LV（n = 3）	1.97 ± 0.14	6.32 ± 0.39

Table 3 Summary showing various endopoints form RNA-sequencing of endometrial samples.

Group	Number of total reads	Number of trimmed reads	Number of mapped reads	Mapping rate（%）
HV（n = 3）	31,706,692—35,930,820	31,244,730—35,469,172	30,670,678—33,531,666	98.16—98.19
LV（n = 3）	29,315,820—36,257,882	28,903,212-35,781,076	28,405,523—35,079,523	98.04—98.28

端・外側分岐部付近でそれぞれ32.6 ± 3.7ng/gおよび16.4 ± 4.2ng/gと報告されている[2]。本研究では，HV群・LV群ともにこれらの報告に比較して低値を示した。

3.3　RNA-seq実験の評価

黄体血流量の多寡が子宮内膜組織の遺伝子発現に及ぼす影響を明らかにするため，HV群（n = 3）およびLV側（n = 3）の子宮内膜組織から抽出したRNAからRNA-seq用ライブラリーを調製した。各試料からは約3000万程度の生シーケンスリードを得ることができた（**Table 3**）。品質の低いリードやアダプター配列，短いリードをトリミングで除去し，リファレンスゲノムへマッピングしたところ，いずれも98%程度であった。検出された遺伝子数としては，HV群およびLV群の両方で約13,000だった。

Mesquitaらによるウシ子宮内膜組織のRNA-seqによる解析では，トリミング後のリード数は1000万から3000万であり，試料間によって大きな差異が認められ，さらにマッピング率は60%程度だった[5]。本研究では，トリミング後のリード数に試料間での大きな差異は認められず，マッピング率も約98%と高値を示したことから，本研究で実施したRNA-seq実験はより信頼性が高い結果であると考えている。また，検出された子宮内膜に発現している遺伝子数は13,000程度であり，Mesquitaらの解析で得られた14,000遺伝子と同程度であった。

3.4　子宮内膜組織における網羅的遺伝子発現解析

前述の3.3において得られたRNA-seqデータをもとに解析を進めた。HV群およびLV群の子宮内膜組織で検出された約13,000遺伝子の発現強度を**Fig. 1** に示した。HV群およびLV群の子宮内膜組織の群間において一定の傾向は認められず，HV群・LV群を問わず各試料で特徴的な発現強度を示していた。さらに，主成分分析による各試料における遺伝子発現全体のパターンの類似性を調べたところ，HV群およびLV群の子宮内膜組織間で特徴的なパターンは認められなかった（**Fig. 2**）。したがって，これらの結果から，黄体血流の多寡によって子宮内膜組織における遺伝子発現のパターンは大きく影響を受けないことが考えられた。

一方，HV群およびLV群の子宮内膜組織間で発現の差異が認められる遺伝子（Differentially expressed genes，DEGs）を抽出したところ，

© The Ito Foundation

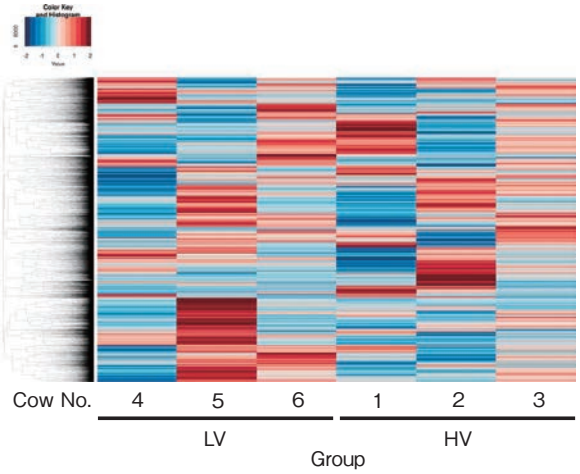


Fig. 1　Heatmap of gene expression in endometrium on the high（HV；n = 3）and low（LV；n = 3）vascularity groups.
Profile of gene expression in endometrium were measured by RNA-seq. Each columns represent gene expression intensities. The gradation from blue to red in the columns indicates the intensity of each gene. Blue column, low expression; Red, high expression.

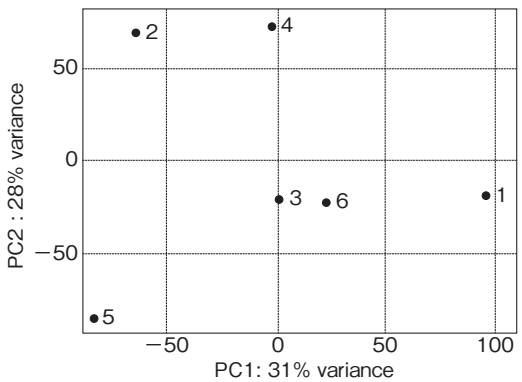


Fig. 2　Principal component analysis of endometrium on the high（HV；n = 3）and low（LV；n = 3）vascularity groups.
Profile of gene expression were measured by RNA-seq. Principal component analysis（PCA）was performed by stats v3.6.1. The numbers were indicated the endometrium samples on the HV（No. 1—3）and LV（No. 4—5）groups.

HV群の子宮内膜組織において高発現であった248遺伝子および低発現であった138遺伝子を同定した（log2 Fold change >1，p<0.05）。これらの遺伝子について，GO解析を実施したところ，細胞接着や細胞外マトリックス構築，白血球のアポトーシス制御に関する遺伝子群の変動が認められた。DEGの各遺伝子については，今後，定量的リアルタイムRT-PCR法にて検証するとともに，詳細を精査する予定である。

今回得られた研究結果から，黄体血流の多寡により子宮内膜の遺伝子発現の全体像は大きく変動しないが，少なからず影響を受ける遺伝子も存在すること，さらに，これらの遺伝子の変動が受胎性に影響を及ぼす可能性が考えられた。

4．要　　約

本研究では，黄体血流の多寡が子宮内膜の局所的な機能調節に関与しているか否かを明らかにするため，発情後７日の子宮内膜組織の網羅的遺伝子発現解析を行い，黄体血流量と血漿・子宮内膜組織中P_4濃度および発現変動遺伝子との関係を調べた。その結果，黄体血流の多い群（HV群）と少ない群（LV群）では血漿および子宮内膜組織中P_4濃度に差が認められなかった。一方，子宮内膜組織のRNA-seqデータに基づく主成分分析により遺伝子発現全体のパターンの類似性を調

© The Ito Foundation

べたところ，HV群およびLV群の子宮内膜組織間で特徴的なパターンは認められなかった。したがって，黄体血流の多寡によって子宮内膜組織における遺伝子発現のパターンは大きく影響を受けないと考えられた。しかし，発現変動遺伝子（DEG）の抽出を行い，HV群の子宮内膜組織において高発現であった248遺伝子および低発現であった138遺伝子を同定した。さらに，抽出したDEGについてGO解析を行ったところ，細胞接着や細胞外マトリックス構築，白血球のアポトーシス制御に関する遺伝子群の変動が認められた。以上のことから，Day 7の黄体血流の多寡により黄体側子宮角の内膜組織において遺伝子発現が変動し，受胎性に影響を及ぼす可能性が示唆された。

文　献

1）Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T.：*Theriogenology*, **86**, 1436～1444, 2016.

2） Takahashi, H., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M.：*J Vet Med Sci*, **78**(4), 613～618, 2016.

3） Forde, N., Beltman, M. E., Duffy, G. B., Duffy, P., Mehta, J. P., Ó'Gaora, P., Roche, J. F., Lonergan, P., Crowe, M. A.：*Biol Reprod*, **84**, 266～278, 2011.

4） 上村俊一，小野雅幸，鮫島秀暢，榎元勝治，浜名克己，後藤和文，柳田宏一：鹿大農学術報告, **44**, 29～34, 1994.

5） Mesquita, F. S., Ramos , R. S., Pugliesi, G., Andrade, S. C. S., V Van Hoeck , Langbeen, A., Oliveira, M. L., Gonella-Diaza, A. M., Gasparin, G., Fukumasu, H., Pulz, L. H., Membrive, C. M., Coutinho, L. L., Binell. M.：*Biol Reprod*, **93**(2), 52, 2015.

© The Ito Foundation

ウシ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（Ⅱ）

Improvement of post-partum reproductive performance by rumen protected niacin supplementation in cattle (II)

森　田　康　広

（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）

Yasuhiro Morita

(Graduate School of Bioagricultural Sciences, Asian Satellite Campuses Institute, Nagoya University)

Niacin is a water-soluble vitamin B and it has a variety of physiological functions. Niacin promotes lipolysis and is used as a drug for lipid metabolism disorders in human medicine. Fat mobilization is one of the essential energic pathways in the postpartum period in cows. In the present study, we investigated the effects of oral administration of rumen-protected niacin (RPN) in metabolites in postpartum cattle by using metabolome analysis. Six healthy postpartum Japanese Black cows were randomly assigned to a niacin-administrated group (supplement group, n = 3) or control group (n = 3). The supplement group was fed 15 g RPN (7.75 g niacin) mixed with 100 g concentrates once a day from one week postpartum to 8 weeks. Control group was fed only 100 g concentrates. Blood sampling was conducted at 1 and 8 weeks postpartum for metabolome analysis. In the metabolome analysis, there were six metabolites were more abundant in supplement group compared with control group at week 8. Three metabolites were more abundant in samples at week 8 rather than week 1, and other three metabolites decreased in samples at week 8 in supplement group. In this study, we found the differences in amino acid metabolism rather than fatty acid metabolism, particularly branched-chain amino acids metabolism in plasma samples in supplement group. It suggests that RPN administration may promote amino acid metabolism and improve energy cycle in Japanese Black beef cows during the postpartum period.

1．目　　的

ナイアシンは水溶性のビタミンBの一種で，ニコチン酸，ニコチンアミドの総称である。また，ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（Nicotinamide adenine dinucleotide，NAD）の前駆体であり，ミトコンドリアにおけるクエン酸回路で補酵素として働くことで，エネルギー代謝において重要な役割を担っている[1)]。ナイアシンにはさまざまな生理機能があり，その中で着目されている作用は血管拡張作用と脂肪分解抑制作用である。ナイアシンは，ルーメンバイパス処理をしたもの（Rumen protected niacin，RPN）が暑熱対策として，一部飼料へ添加されており，乳牛

© The Ito Foundation

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[2]。また，ナイアシンは血清中の低密度リポタンパク質コレステロールとトリグリセリドの濃度を低下させ，高密度にリポタンパク質コレステロールの濃度を上昇させる働きがあり，ヒトの医療分野では脂質代謝異常の治療薬の１つとして利用されている[3]。これはナイアシンがその受容体（GPR109A）を介して，肥満細胞においてトリグリセリドが脂肪酸とグリセリンに分解される反応を抑制するためである。

申請者は，伊藤記念財団研究助成課題において，RPNの経口投与によって子宮動脈の血管が拡張すること，それにより繁殖性が向上する可能性があることを報告している[4]。また，上記の血管拡張作用のほかに，ナイアシンにおける脂肪分解促進作用が知られており，また，ウシでは産後の低エネルギー状態において脂肪動員が見られることから，本研究では，分娩後のウシにおいてRPNの経口投与による産後の各種代謝関連への作用について，メタボローム解析を用いることで総合的に検討した。

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教育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６頭供試した。正常分娩した６頭を３頭ずつ対照群と試験群にランダムに分け，それぞれ分娩後１週間まではコンクリート床にオガクズを敷いた牛房に仔牛と同居させ，分娩から１週間後に母子分離し，個別に管理した。また両群とも仔牛の哺乳制限は行わなかった。給餌は朝夕の２回行い，スーダングラスとチモシーグラスのみを日本家畜管理飼養標準（和牛編）に従い規定量給与した。水と固形塩（SALT LICK，共立製薬株式会社，東京）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て実施した。

2.2　実験プロトコール

正常に分娩した黒毛和種経産牛６頭を供試し，ナイアシンを給与した群（投与群，Control，n＝３）と給与しなかった群（対照群，Supplement，n＝３）にランダムに割り振った。投与群には離乳させる分娩後１週間後から８週目まで，１日１回15ｇのRPN（ナイアシンとして7.75ｇ）を配合飼料100ｇに混合したものを夕方の給餌に合わせ給与し，対照群には同じ条件で配合飼料100ｇのみを与えた。分娩後１週目と８週目に採血を行い，血液中の代謝産物のメタボローム解析を行った。採血は頸静脈から行い，血液はヘパリンと混和した後に氷上に静置し，速やかに実験室に移動後，遠心分離（1500×ｇ，30min，４℃）を行った。得られた血漿は－30℃で測定まで保存した。

2.3　メタボローム解析

本研究におけるメタボローム解析はヒューマン・メタボローム・テクノロジーズ株式会社（HTM社，山形）に委託し，検出された物質はHMT社の代謝物質ライブラリおよびKnown-Unknownライブラリに登録された全物質との照合，検索を行った。

2.4　統計解析

メタボローム解析の主成分分析（PCA），階層的クラスタリング解析（HCA）およびHeatmap表記は統計解析ソフトウェア（HMT社開発）を用いて行った。

３．結果と考察

3.1　結果

ウシ血漿についてCE-TOFMSによるメタボローム解析を行った結果，188個のピークが検出

© The Ito Foundation

され，177のピーク（カチオンモード112ピーク，アニオンモード65ピーク）においてライブラリより候補化合物が割り当てられた。検出されたピークを用いて主成分分析を行った結果と階層的クラスタリングを行って得られたHeatMapをそれぞれ**Fig. 1** および**Fig. 2** に示す。

また，候補化合物が絞り込まれた177ピークについて，各群の相対面積値比の算出およびWelchのｔ-検定を実施した。177個の化合物のうち，対照群の第８週と投与群の第８週において有意差が認められた化合物は９種類，投与群の第１週と投与群の第８週において有意差が認められた化合物は６種類，対照群の第１週と対照群の第８週において有意差が認められた化合物は６種類存在した

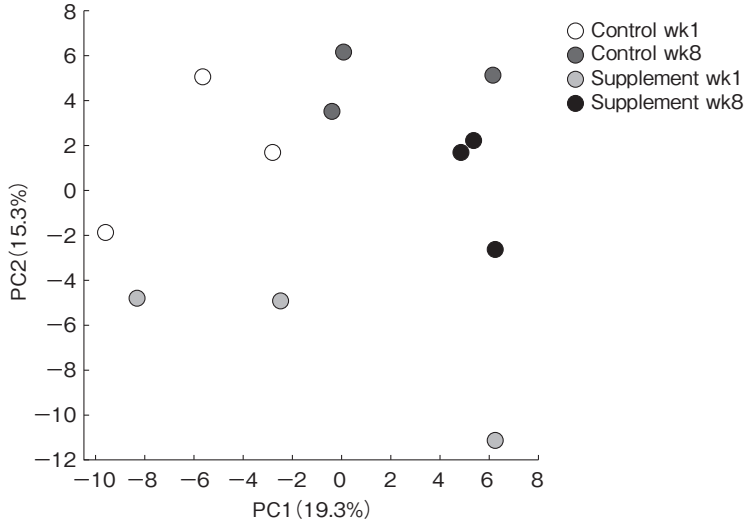


Fig. 1　Principal component analysis（PCA）of metabolite in plasma samples from control group（n=3）and supplement group（n=3）in week 1 and week 8.

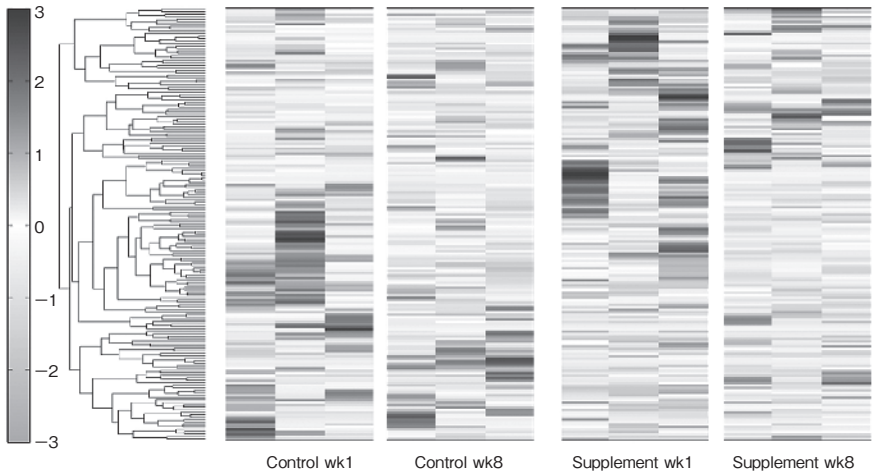


Fig. 2　Heatmap of metabolite in plasma samples from control group（n=3）and supplement group（n=3）in week 1 and week 8.

© The Ito Foundation

（**Fig. 3～5**）。

対照群の第８週と投与群の第８週において有意差が認められた９種類の化合物のうち，対照群と比較して投与群で血漿中の存在量が有意に高かったのはニコチンアミド（p＝0.024），分枝鎖α-ケト酸（p＝0.015），尿酸（p＝0.025），2-ヒドロキシ酪酸（p＝0.034），N5-エチルグルタミン（p＝0.018），馬尿酸（p＝0.049）の６種類であり，一方で存在量が低かったのは尿素（p＝0.004），システイン（p＝0.041），ウレイドグリコール酸（p＝0.009）の３種類であった（**Fig. 3**）。また，投与群内において第１週に比較し，第８週において血漿中の存在量が有意に増加していた化合物はアスパラギン（p＝0.019），クエン酸（p＝0.009），馬尿酸（p＝0.034）の３種類，減少していた化合物はイソロイシン（p＝0.049），L-アセチルカルニチン（p＝0.037），コリン（p＝0.038）の３種類であり（**Fig. 4**），対照群内において第１週に比較し，第８週において血漿中の存在量が増加していた化合物は，5-ヒド

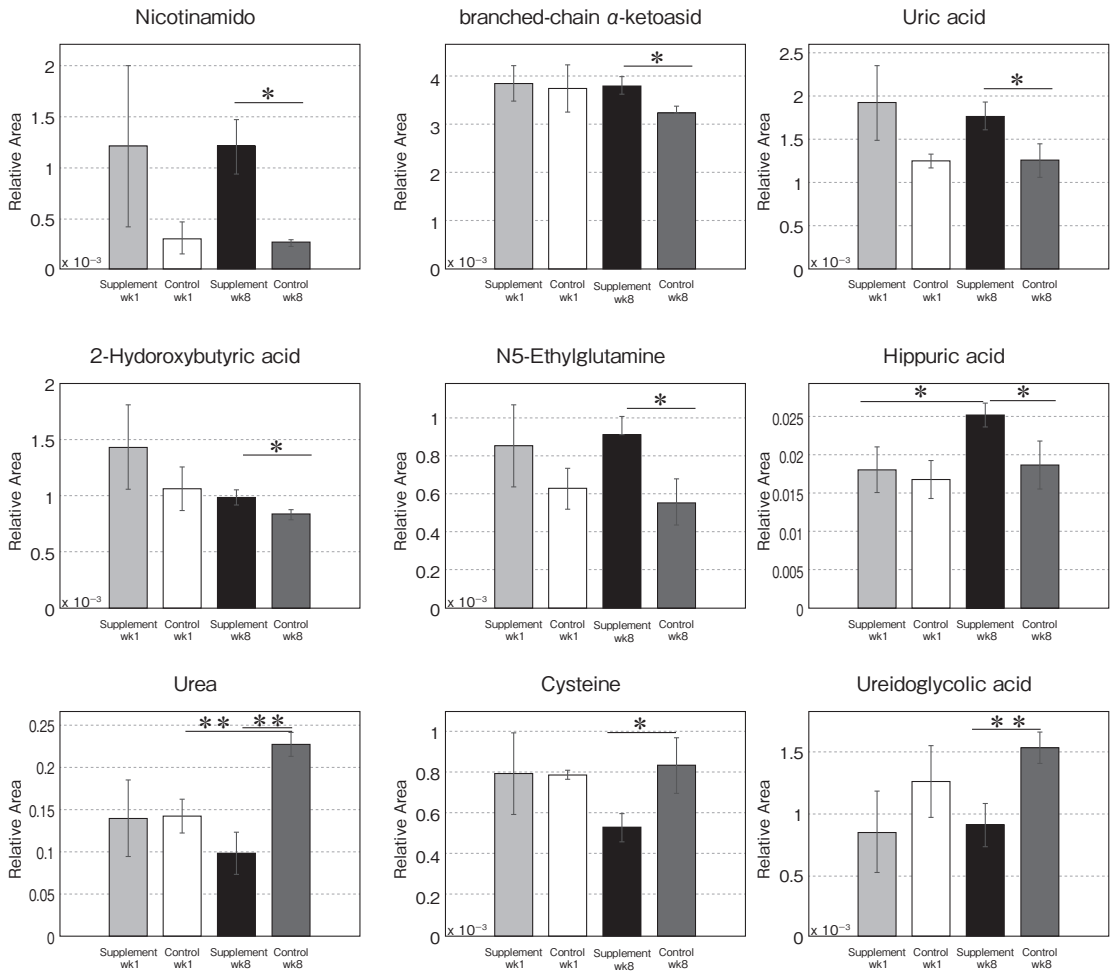


Fig. 3　Relative quantity of metabolites in plasma samples from control group（n=3）and supplement group（n=3）in week 1 and week 8. There were significant differences in nine metabolites between control samples and supplement samples at week 8. Six metabolites were more abundant in samples of supplement group compared with control group.（**p<0.01, *p<0.05, Welch t-test）.

© The Ito Foundation

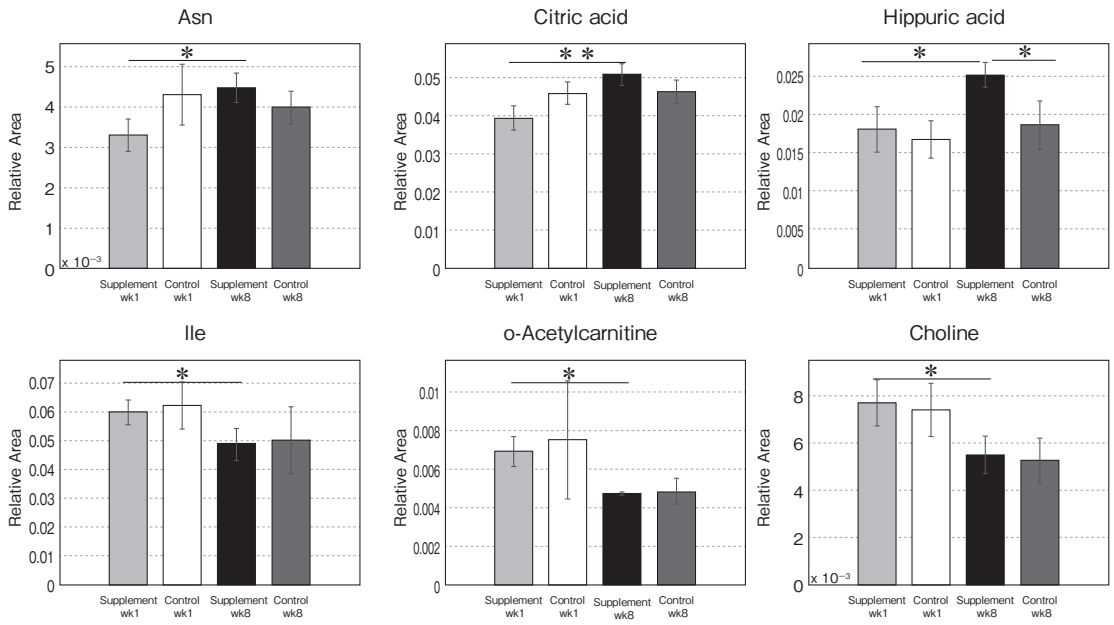


Fig. 4　Relative quantity of metabolites in plasma samples from control group (n=3) and supplement group (n=3) in week 1 and week 8. There were significant differences in six metabolites between week 1 and 8 in supplement group. Three metabolites were more abundant in samples at week 8 rather than week 1, and other three metabolites decreased in samples at week 8. **p<0.01, *p<0.05, Welch t-test.

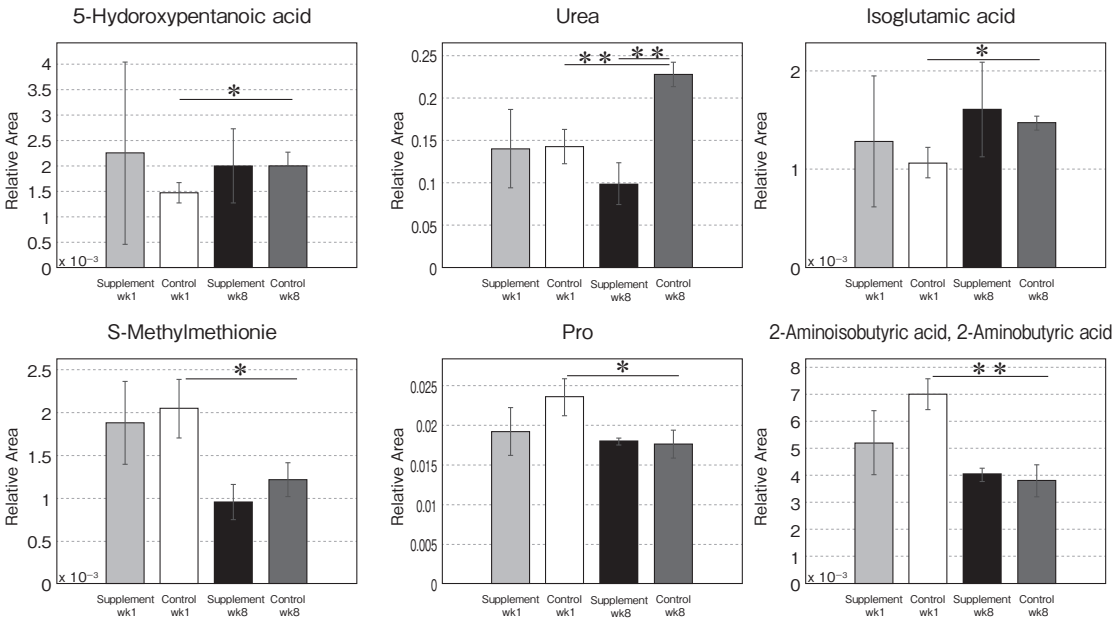


Fig. 5　Relative quantity of metabolites in plasma samples from control group (n=3) and supplement group (n=3) in week 1 and week 8. There were significant differences in six metabolites between week 1 and 8 in control group. Three metabolites were more abundant in samples at week 8 rather than week 1, and other three metabolites decreased in samples at week 8. **p<0.01, *p<0.05, Welch t-test .

© The Ito Foundation

ロキシペンタン酸（p = 0.049），尿素（p = 0.005），イソグルタミン酸（p = 0.030）の３種類，減少していた化合物は，S-メチルメチオニン（p = 0.031），プロリン（p = 0.027），2-アミノ酪酸 2-アミノイソ酪酸（p = 0.002）の３種類であった（**Fig. 5**）。

3.2　考察

メタボローム解析の結果，本研究においては，RPN投与群における血漿中において，脂質代謝に関わる代謝産物よりも，分枝鎖アミノ酸代謝に関わる代謝産物に変化が見られた。このことから，黒毛和種経産牛の分娩後において，中期的にはRPNの投与は骨格筋におけるアミノ酸代謝経路を活性化し，エネルギー消費を促進する可能性が示唆された。

本実験では，分娩後のナイアシンの継続投与は分枝鎖アミノ酸を含むアミノ酸代謝へ影響を与える可能性が示された。分枝鎖α-ケト酸は，分娩後第８週において対照群と比較して投与群で血漿中の存在量が有意に高かった化合物の１つである。分枝鎖α-ケト酸（branched-chain α-ketoacid, BCKA）は，ケトロイシン，3-メチル-2-オキソ吉草酸，２-ケトヘキサン酸の総称であり，体内での分枝鎖アミノ酸（branched-chain amino acids，BCAA）の分解反応における一次中間代謝物である[5]。分枝鎖アミノ酸にはバリン，ロイシン，イソロイシンの３種類があり，これらは他のアミノ酸が肝臓で代謝されるのに対して，肝臓ではあまり代謝されず代わりに骨格筋で代謝される[5, 6]。分枝鎖アミノ酸の分解系は，最初の２つのステップは３つに共通しており，第一ステップは，分枝鎖アミノ酸アミノ基転移酵素（branched-chain aminotransferase，BCAT）による分枝鎖アミノ酸の可逆的なアミノ基転移反応である。第二ステップは，分岐鎖α-ケト酸脱水素酵素複合体（branched-chain α-ketoacid dehydrogenase complex，BCKDC）による分岐鎖α-ケト酸の不可逆的な酸化的脱炭酸反応である[6, 7]。投与群では第８週において血漿中の分岐鎖α-ケト酸量が対照群より高く維持されていたことから，骨格筋における分枝鎖アミノ酸の分解系が亢進していた可能性が示唆された。また，投与群の分娩後第８週では第１週に比べ，血漿中のイソロイシン量が有意に低下していた。これは分枝鎖アミノ酸の分解が亢進していたことによるものだと考えられた。また，Yepes, F. L. らの研究では，ルーメンバイパス処置をした分枝鎖アミノ酸を飼料に混合してホルスタイン牛に給与すると血漿尿素窒素量が増加したことが示されている[7]。本実験の対照群において，血漿中の尿素量が対照群より高くなっていたのは，分枝鎖アミノ酸の分解が投与群に比べ抑えられていたためと考えられた。

これまでの研究からナイアシンは脂肪の分解を抑制することで脂質代謝を変化させることが知られている[8]が，分枝鎖アミノ酸を含むアミノ酸代謝に対する影響については報告がない。今回の実験によって黒毛和種牛では，ナイアシンがより広い範囲の代謝経路に対して影響を与える可能性が示唆された。しかしながら，ナイアシンが体内でどのような経路で分枝鎖アミノ酸の代謝を変化させたかは，今回の実験では不明であった。また，今回観察された分枝鎖アミノ酸の代謝変化は，ナイアシンが直接的に経路を調節したのか，それともナイアシン投与によって調節された他の代謝経路の変化による間接的なものなのかは判定できなかった。そのため，ナイアシン投与後に主なアミノ酸代謝場所である骨格筋や肝臓のメタボローム解析を行い，アミノ酸代謝に関わる種々の物質の変化を調べることや，アミノ酸代謝に関わる酵素がナイアシンによってその発現量や活性を変化させるのかなどを検討するなど，さらなる研究が必要である。

© The Ito Foundation

４．要　約

ナイアシンは水溶性のビタミンＢの一種であり，さまざまな生理機能がある。本研究では，ナイアシンの脂質代謝促進作用に着目し，分娩後のウシにおいてRPNの経口投与による産後の各種代謝関連への作用について，メタボローム解析を用いることで総合的に検討した。正常に分娩した黒毛和種経産牛６頭を供試し，ナイアシンを給与した群（ｎ＝３）と給与しなかった群（ｎ＝３）にランダムに割り振った。分娩後１週目と８週目に採血を行い，血液中の代謝産物のメタボローム解析を行った。メタボローム解析の結果，対照群の第８週と投与群の第８週において有意差が認められた化合物は９種類，投与群の第１週と投与群の第８週において有意差が認められた化合物は６種類，対照群の第１週と対照群の第８週において有意差が認められた化合物は６種類存在した。本研究においては，RPN投与群における血漿中において，脂質代謝に関わる代謝産物よりも，分枝鎖アミノ酸代謝に関わる代謝産物に変化が見られた。このことから，黒毛和種経産牛の分娩後において，中期的にはRPNの投与は骨格筋におけるアミノ酸代謝経路を活性化し，エネルギー消費を促進する可能性が示唆された

文　献

1）Carlson, L. A.：Nicotinic acid： the broad-spectrum lipid drug. A 50th anniversary review, *J. Inter. Med*, **258**(2), 94～114, 2005.
2）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.
3）Lauring, B., Taggart, A. K. P., Tata, J. R., Dunbar, R., Caro, L., Cheng, K., Chin, J., Colletti, S. L., Cote, J., Khalilieh, S., *et al*.：Niacin lipid efficacy is independent of both the niacin receptor GPR109A and free fatty acid suppression, *Sci. Transl. Med*, **4**(148), 146ra115, 2012.
4）森田康広，松山秀一：令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **39**, 195～201, 2021.
5）下村吉治：分枝鎖アミノ酸の代謝機構，日本栄養・食糧学会誌, **65**(3), 97～103, 2012.
6）Hatazawa, Y., Tadaishi, M., Nagaike, Y., Morita, A., Ogawa, Y., Ezaki, O., Takai-Igarashi, T., Kitaura, Y., Shimomura, Y., Kamei, Y., Miura, S.：PGC-1α-mediated branched-chain amino acid metabolism in the skeletal muscle, *PloS One*, **9**(3), e91006, 2014.
7）Yepes, F. L., Mann, S., Overton, T. R., Ryan, C. M., Bristol, L. S., Granados, G. E., Nydam, D.V., Wakshlag, J. J.：Effect of rumen-protected branched-chain amino acid supplementation on production-and energy-related metabolites during the first 35 days in milk in Holstein dairy cows, *J. Dairy Sci*., **102**(6), 5657～5672, 2019.
8）Kamanna, V. S., Kashyap, M. L.：Mechanism of action of niacin, *Am. J. Cardiol*, **101**(8), 20～26, 2008.

© The Ito Foundation

黒毛和種における不明瞭な発情発生メカニズムの黄体退行の観点からの解明

Elucidation of mechanisms for silent heat from luteal regression in Japanese Black Cows

法上拓生・堀畑　慶
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構九州沖縄農業研究センター）

Takuo Hojo and Kei Horihata
（Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO）

Summer heat stress (HS) is a known cause of reduced reproductive ability in dairy cows. Heat stress affects the functions of various reproductive organs, including the corpus luteum (CL). Currently, the effects of HS on luteal function in beef cattle are unclear. Therefore, in the present study, we investigated the effects of HS on CL functions, including intracellular signaling underlying apoptosis and progesterone (P4) secretion, to clarify the influence of HS on reproductivity in beef cattle. Isolated luteal steroidogenic cells (LSCs) from the mid CL were cultured at 38.5 or 40.0°C (representing HS conditions) in 5% CO2 for 6 h. Thereafter, LSCs were treated at 38.5°C for 12 or 48 h with tumor necrosis factor-alpha (TNF: 50 ng/ml), interferon gamma (IFNG: 50 ng/ml), and Fas ligand (FASL: 100 ng/ml), which were known stimulators of apoptosis and luteal regression in bovine CL, or luteinizing hormone (10 ng/ml), which stimulates P4 secretion. We then investigated the viability, mRNA-level expression of apoptosis-related factors (*CASP3*, *CASP8*, *BCL2* and *BAX*), P4 secretion, and mRNA-level expression of P4 synthesis-related factors (*3βHSD*, *StAR*, *SCARB1* and *LDLR*) in LSCs. HS downregulated TNF+IFNG+FASL-induced cell death and tended to decrease *CASP3* and *CASP8* mRNA expression in LSCs. By contrast, HS did not affect P4 secretion or expression of *3βHSD*, *StAR*, *SCARB1* and *LDLR* mRNA. Overall, these results suggest that HS reduces apoptotic signals but does not affect P4 secretion in bovine luteal cells. HS may thus be considered to influence reproductivity in beef cattle by affecting CL function.

1．目　的

本研究は，肉用牛において夏季の高温環境下で増加することが報告されている不明瞭な発情の発生メカニズムの一端を，卵巣上に形成される内分泌器官である黄体機能の観点から明らかにすることを目的とする。

近年，気候温暖化に伴い，牛における夏季の繁殖成績低下が大きな問題となっている。その一因として，夏季における発情行動（乗駕許容行動）が発現しない不明瞭な発情の増加が指摘されている。黒毛和種において，不明瞭な発情が冷涼期と比較して夏季に約30％増加すること[1)]，また，夏季の授精頭数当たりの受胎率は低下していないに

© The Ito Foundation

も関わらず，受胎頭数は他の季節と比較し夏季に約30％低下すること（家畜改良事業団調べ）が報告されている。これらの報告から不明瞭な発情発現が直接肉用牛における繁殖効率を低下させることが示唆されており，このような夏季における不明瞭な発情の増加は肉用牛生産において喫緊の課題となっている。

不明瞭な発情の対策を開発するためには，発生のメカニズムを解明する必要がある。これまでに，不明瞭な発情発生のメカニズムの一つとして，卵巣に発現する黄体の関与が示唆されている。黄体は妊娠の成立・維持に必須のプロジェステロン（P4）を分泌する内分泌器官であるが，妊娠が成立しなかった場合，次の排卵が起こるために黄体はP4分泌能が衰退するとともに（機能的黄体退行），卵巣上から消失する（構造的黄体退行）。発情前のウシ体内では黄体退行に伴うP4濃度の急激な低下と，黄体退行の開始とほぼ同時に発育を開始する主席卵胞からのエストラジオール（E2）の上昇が観察され，E2/P4が最高値に達した時点で乗駕許容が開始する。不明瞭な発情を示すウシでは明瞭な発情のウシと比較し黄体の退行が緩慢になること[1]，また，夏季において不明瞭な発情が増加することから，夏季の高温環境は，黄体退行への影響を介して不明瞭な発情を誘導すると考えられるが詳細は不明である。本研究では，開花期黄体より単離した黄体ステロイド合成細胞（以下黄体細胞）を用いて，高温環境が構造的黄体退行の主な要因であるアポトーシスと細胞内アポトーシス誘導経路ならびにP4分泌能とP4合成経路に及ぼす影響を検証する。

2．方　法

2.1　黄体細胞の単離と培養

食肉処理場由来の肉用牛開花期黄体から過去に報告のある環流法により[2]，黄体細胞を単離し，一晩前培養した。単離直後にトリパンブルー染色により細胞生存率が85％以上であることを確認している。

本試験では高温環境条件として，予備試験により確認した40℃，６時間の培養条件を用いた。黄体細胞を38.5℃または40℃で６時間培養後，P4分泌を刺激するためにLH（10ng/ml）またはアポトーシスを刺激するためにTNF（50ng/ml），IFNG（50ng/ml）ならびにFASL（100ng/ml）を組み合わせて添加しさらに38.5℃で培養を継続した。

2.2　細胞生存率とP4分泌能

細胞生存率に及ぼす高温環境の影響を調べるため，高温条件で培養した細胞にTNF＋IFNG＋FASLを添加（以後サイトカイン添加区）し，38.5℃でさらに18時間培養した後，再度高温環境下で培養した。２度目の高温環境下での培養終了後38.5℃で18時間培養を継続し，培養終了後AlamarBlueによって細胞生存率を調べた[3]。

P4分泌能に及ぼす高温環境の影響を調べるため，高温条件で培養した細胞にLHを添加し，38.5℃で12時間培養した。培養終了後，培養上清を回収し，enzyme immune assay（EIA）によって上清中のP4濃度を調べた。

2.3　遺伝子解析

LHまたはTNF＋IFNG＋FASLを添加し12時間培養後，total RNAを回収し，コレステロールの細胞内への取り込みに重要なタンパク質をコードする*SCARB1*および*LDLR*，P4合成関連因子*StAR*および*3βHSD*，アポトーシス誘導経路に関連するタンパク質をコードする*caspase*（*CASP*）*8*，*3*，*BAX*および*BCL2* mRNA発現をreal-time qPCRにより測定した。内部標準には*β*-actin（ACTB）を用いた。

3．結果と考察

通常の培養温度である38.5℃培養では，サイト

© The Ito Foundation

カイン添加区において無添加区と比較し細胞生存率が低下したが，40℃培養では無添加区とサイトカイン添加区との間に有意な差はなかった（**Fig. 1**）。予備試験の結果から，ウシ黄体細胞を40℃，6時間で培養することで暑熱ストレスマーカーのヒートショックタンパク（HSP）70をコードする遺伝子である*HSPA1* mRNA発現が増加することを確認している。HSPはさまざまな細胞に発現し，細胞の恒常性を保つシャペロン機能を有するタンパク質であり，数種類あるHSPのうち分子量が70kDaのHSP70は細胞の恒常性維持に特に重要な役割を果たすことが知られている[4]。また，HSP70はラットの細胞においてアポトーシスを阻害することが報告されている[5]。これらの報告は本研究において高温環境での培養によってウシ黄体細胞にアポトーシス誘導処理をしても細胞生存率が維持された結果と一致しており，ウシ黄体細胞においても高温環境の培養で増加したHSP70がアポトーシスを阻害することが示唆された。

アポトーシス誘導経路に関連する遺伝子発現に及ぼす高温環境の影響を調べた結果，*CASP3*および*CASP8* mRNA発現は38.5℃培養において，無添加区と比較しサイトカイン添加区で有意に高かったが（$p < 0.05$），40℃培養では無添加区とサイトカイン添加区の間に有意な差はなかった（**Fig. 2A，B**）。CASP3は細胞内のアポトーシス誘導経路における最も下流に位置するアポトーシス実行因子である[6]。40℃培養においてサイトカインによる*CASP3* mRNA発現の上昇が抑制されたのは，高温環境下の熱ストレスによって増加したHSP70がCASP3よりも上流の因子に作用し，アポトーシス誘導経路を阻害していることを示唆している。過去の研究においてもHSP70はCASP3よりも上流のCASP9に作用することでアポトーシスに影響することが報告されており[5]，本研究の結果と一致している。一方で，CASP9よりも上流に位置する*CASP8* mRNA発現にも高温環境の影響が見られたことは[6]，HSP70がCASP8よりも上流にも作用することを示唆している。今後，CASP8よりも上流である細胞膜上のTNFレセプターやFASなどのデスレセプター発現に及ぼすHSP70の影響についても検証する必要がある。アポトーシス誘導経路に関連するBCL2スーパーファミリー[7]である*BAX*ならびに*BCL2*遺伝子発現はいずれの区においても有意な差はなかった（**Fig. 2C，D**）。この結果より高温環境ならびにHSP70はこれらのタンパク質が関連する経路には影響しないことが示唆された。

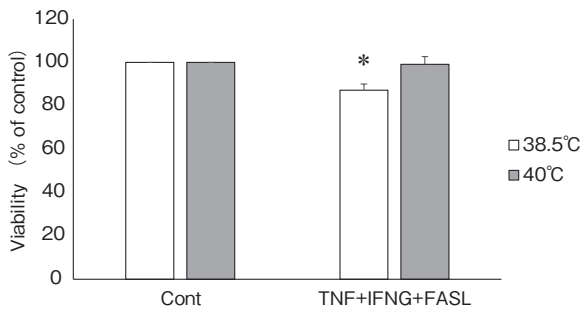


Fig. 1　Effects of heat stress and TNF, IFNG and FASL on viability in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without TNF（50ng/ml）+IFNG（50ng/ml）+FASL（100ng/ml）under 38.5 or 40℃ for 48h. Asterisk indicate significant difference（$p<0.05$）, as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

© The Ito Foundation

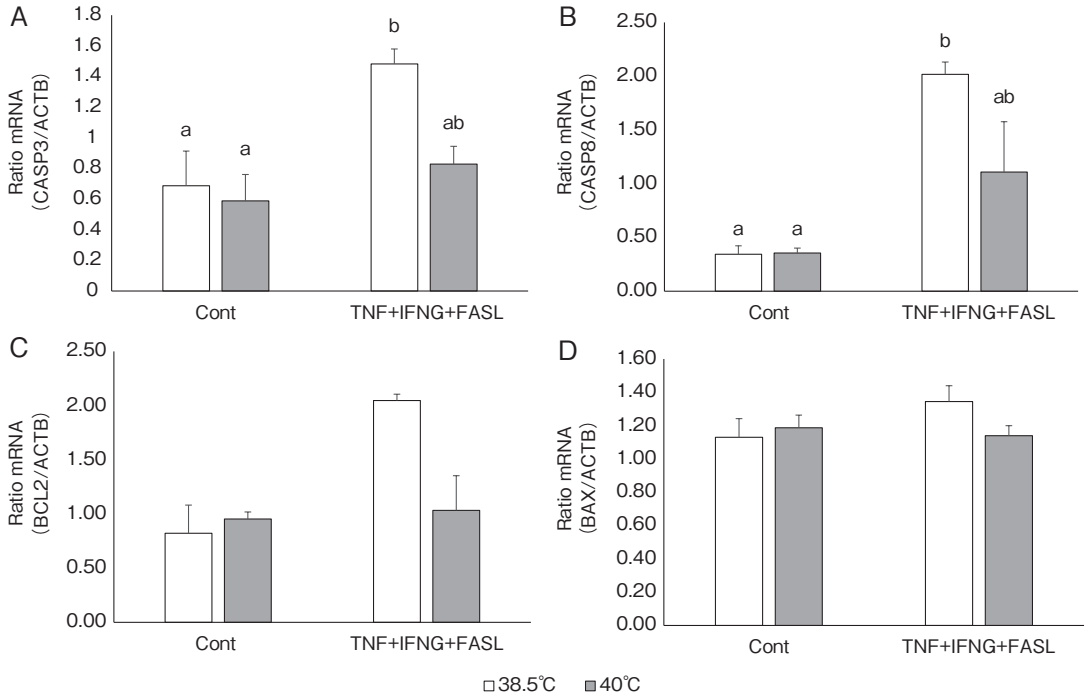


Fig. 2　Effects of heat stress and TNF, IFNG and FASL on expression of *CASP3* (A), *CASP8* (B), *BCL2* (C) and *BAX* (D) mRNA in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without TNF+IFNG+FASL under 38.5 or 40℃ for 12h. The amount of each mRNA is expressed relative to the amount of *ACTB*. In (A) and (B), different letters indicate significant differences ($p<0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

培養上清中のP4濃度はLH添加によって上昇したが，38.5℃培養区と40℃培養区の間に有意な差は見られなかった（$p<0.05$；**Fig. 3**）。このことは高温環境やHSP70がP4分泌に影響しないことを示唆している。黄体細胞内において，P4合成に関連する遺伝子である*3βHSD*および*StAR* mRNA発現はLHの有無にかかわらず培養温度によるに差は見られなかった（**Fig. 4A，B**）。黄体細胞の細胞内部へのコレステロールの取り込みに関与し，P4合成に重要な役割を果たす[8] *SCARB1*ならびに*LDLR* mRNA発現も同様にLHによって増加したが，培養温度による差は見られなかった（**Fig. 4C，D**）。このことからも，本研究の高温環境条件はP4合成経路に影響しないことが示されたが，高温環境下での培養ならびにそれに伴って増加するHSP70がP4分泌に及ぼす影響については，より詳細な検証が必要である。

本研究の結果より，高温環境下で増加したHSP70はウシ黄体細胞においてTNF＋IFNG＋FASLによって刺激される*CASP3*および*CASP8* mRNA発現を抑制し，アポトーシスを阻害している可能性が示された。生体内においても，暑熱期の熱ストレスによって黄体組織内で増加したHSP70が黄体を構成する細胞のアポトーシスを阻害することで緩慢な黄体退行を引き起こし，鈍性発情の一因となっているのかもしれない。今後はHSP70の活性阻害剤を用いて，HSP70が黄体細胞の機能に及ぼす影響についてより詳細に検証する。

© The Ito Foundation

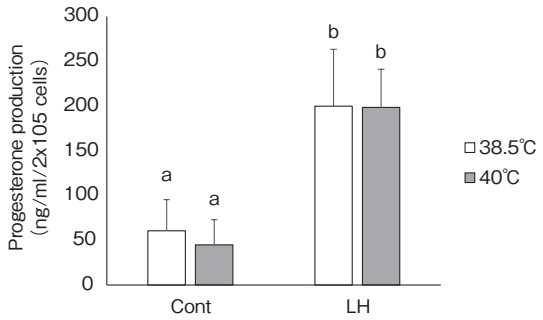


Fig. 3 Effects of heat stress and LH on P4 secretion in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without LH (10ng/ml) under 38.5 or 40℃ for 12h. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

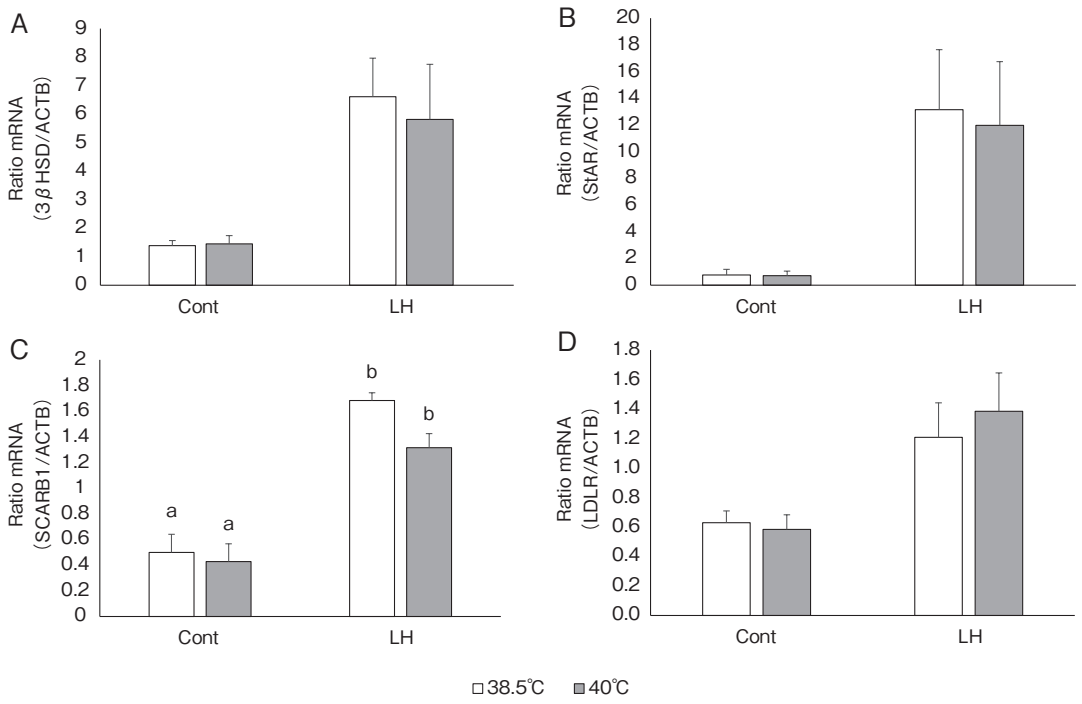


Fig. 4 Effects of heat stress and LH on expression of *3βHSD* (A), *StAR* (B), *SCARB1* (C) and *LDLR* (D) mRNA in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without LH under 38.5 or 40℃ for 12h. The amount of each mRNA is expressed relative to the amount of *ACTB*. In (C), different letters indicate significant differences ($p<0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

4．要　約

高温環境における暑熱ストレスがウシの黄体ステロイド合成細胞（黄体細胞）の主要な機能であるアポトーシス誘導機構ならびにプロジェステロン（P4）分泌能に及ぼす影響について調べた。開花期黄体より黄体細胞を単離し，通常の温度環境（38.5℃）または高温環境下（40℃）で6時間前培養後，アポトーシスを誘導するためのサイトカインとして腫瘍壊死因子（Tumor necrosis

© The Ito Foundation

factor α；TNF：50ng/ml），interferon γ（IFNG：50ng/ml）ならびにFAS Ligand（FASL）またはP4分泌を刺激する黄体形成ホルモン（LH：10ng/ml）を添加した。サイトカイン添加後12時間培養し，黄体細胞におけるアポトーシス誘導経路に関連する因子（*CASP3*，*CASP8*，*BCL2*ならびに*BAX*）の遺伝子発現を調べた。また，添加後48時間培養し，細胞生存率を調べた。さらに，LH添加後12時間培養し，培養上清中のP4濃度を測定するとともに，細胞中のステロイド合成関連因子（*3βHSD*，*StAR*，*SCARB1*および*LDLR*）の遺伝子発現を調べた。【結果】38.5℃での培養において，サイトカイン添加によって細胞生存率が低下したが（$p < 0.05$），40℃での培養で培養することで細胞生存率の低下が阻害された。38.5℃の培養ではサイトカイン添加区において無添加区と比較し*CASP3*および*CASP8* mRNA発現が有意に高かったが（$p < 0.05$），40℃での培養では無添加区とサイトカイン添加区との間に*CASPs* mRNA発現に有意な差はなかった。*BAX*ならびに*BCL2* mRNA発現はいずれの区において有意な差はなかった。培養上清中のP4濃度はLHによって刺激されたが（$p < 0.05$），培養温度による差は見られなかった。P4合成関連因子の遺伝子発現はいずれもP4濃度と類似の推移を示した。これらの結果より，高温環境はウシ黄体細胞においてP4の分泌には影響しないが，サイトカインによって刺激された*CASP3*および*CASP8* mRNA発現を抑制し，アポトーシスを阻害する可能性が示された。肉用牛において暑熱環境下で増加したHSP70は黄体を構成する細胞のアポトーシスを抑制することで，黄体退行を緩慢にすることが示唆された。

文　献

1） 竹之内直樹，福重直輝：日本胚移植学雑誌，**35**，97～108，2013.
2） Okuda, K., Miyamoto, A., Sauerwein, H., Schweigert, F. J., Schams, D.：*Biol Reprod*, **46**, 1001～1006, 1992.
3） Hojo, T., Siemieniuch, M. J., Lukasik, K., Piotrowska-Tomala, K. K., Jonczyk, A. W., Okuda, K., Skarzynski, D. J.：*Sci Rep*, **6**, 38211, 2016.
4） Fernández-Fernández, M. R., Valpuesta, J. M.：F1000Res, 7, F1000, 2018.
5） Beere, H. M., Wolf, B. B., Cain, K., Mosser, D. D., Mahboubi, A., Kuwana, T., Tailor, P., Morimoto, R. I., Cohen, G. M., Green, D. R.：*Nat Cell Biol*, **2**, 469～475, 2000.
6） Cohen, G. M.：*Biochem J*, **326**, 1, 1997.
7） Antonsson, B.：*Cell Tissue Res*, **306**, 347～361, 2001.
8） Davis, J. S., LaVoie H. A.：The ovary（Third edition），237～253, 2019.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility in Japanese Black cow（Ⅱ）

久保田　海雄・三輪　雅史・阪谷　美樹
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）

Kaiyu Kubota, Masafumi Miwa and Miki Sakatani
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

Longer post-partum interval causes huge economic loss in the cattle management. Full recovery of the uterus from the damage by parturition, so-called “uterine involution” is necessary to achieve the subsequent 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. fertility. Therefore, the ultimate goal of the present study was to establish a quantitative and reliable molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility. We collected endometrial samples from Japanese Black cows by cytobrush during the uterine involution for RT-qPCR gene expression analyses of insulin-like growth factor 1（IGF1）pathway factors. IGF1 function was evaluated by wound healing assay using cultured endometrial epithelial cells with IGF1 signaling inhibitor. Cervicovaginal mucus（CVM）contains uterine proteins and we hypothesized that uterine IGF1 is released into CVM. Therefore, concentration of IGF1 in CVM was determined by ELISA assay, for future use of CVM to evaluate involution. The results showed that the expression of *IGF1* was high at involution and decreased after recovery beyond the timing of lochia loss. IGF1 receptor（*IGF1R*）and IGF binding protein（IGFBP）1-6 were also expressed in the bovine endometrial epithelial cells during involution. IGF1 is known to function in cell proliferation and the role in uterine involution was confirmed since IGF1R inhibitor attenuated the wound healing. IGF1 concentrations in CVM were not altered before and after involution. In conclusion, although uterine local IGF1 expression was high only during involution and seems as a potential candidate of a marker for uterine involution, the IGF1 assay using CVM is not an optimal strategy to evaluate uterine involution.

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，分娩後なるべく早期に受胎させる必要がある。令和元年度の乳用牛空胎日数は最頻値80日であるが，平均値では160日となっており，一部の

© The Ito Foundation

牛が平均値を間延びさせている。分娩後初回人工授精日数は初産牛で最頻値70日（平均値89日），経産牛で最頻値76日（平均値94日）であり，初回日数に問題はないことから，一度の交配では受胎しない，複数回交配が必要な牛を検出・改善していく必要がある。受胎が成立するためには前回の分娩により損傷した子宮が元に戻る必要がある（子宮修復）。直腸検査・超音波診断によると，子宮内滞留物は分娩約30日後までに排出され，子宮角・頚は40日後までに妊娠前の大きさに戻るが，この方法では受胎性までは判断できない。子宮修復が未完である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ことから，交配時に受胎性を持った状態まで子宮修復が完了しているかを判断するシステムが必要である。

我々は子宮修復を客観的に評価できる分子マーカーの確立を目指して，分娩後子宮修復期に経時的にサンプリングを行い，その分子生物学的機構・特徴の解明に取り組んできた。昨年度には，インスリン様成長因子（IGF1）の発現が子宮修復時にのみ高いこと，またムチンタンパク（MUC1）の発現が子宮修復後に上昇し長期空胎牛で高いこと等を明らかにした。このMUC1に関しては，その発現挙動と性ホルモンによる発現制御機構を学術誌に報告した[1)]。これら我々が明らかにした知見を含めた子宮修復機構の情報を活用し，分子マーカーによって子宮修復を判断し，繁殖処置（人工授精，受精卵移植）の実施判断や淘汰牛の選定を行うことが最終目標であるが，そのために遺伝子・タンパク質解析を生産現場で行うことは困難である。

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や妊娠により胎盤が分泌するホルモン（hCG）を検知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が牛の子宮修復にも開発されれば，生産現場へ普及することも考えられる。IGF等の液性因子は体液や粘液中に分泌されること，さらに子宮粘液は腟内に漏出することから，腟粘液を利用して子宮内膜の状態を把握・評価する方法を着想した。本研究では，子宮修復期のIGF1シグナルについてさらなる詳細を明らかにするとともに，腟粘液中に分泌されていると仮定したIGF1のタンパク質量を測定し，子宮修復時の子宮内膜における発現変動を反映しているかを調査し，その結果としてIGF1をマーカーとした腟粘液による子宮修復評価法を確立することを目的とした。加えて，人工授精時に腟粘液を採取し，受胎の成否との相関を比較することで，受胎性マーカーとしての適性評価を試みた。

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妊娠牛31頭を初産・経産の区別なくランダムに供試した。本研究に用いた母牛は分娩前後とも臨床上異常所見がなく正常分娩と考えられた。分娩予定日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。

昨年度，本牛群の一部の牛において10日ごとの超音波診断および２－３日ごとのプロゲステロン濃度を測定した。その結果，本牛群における悪露消失は41.0±1.8日目，初回排卵は44.0±6.2日目，初回発情は53.9±5.9日目であった。

2.2　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上皮細胞検体を採取した。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

© The Ito Foundation

ルタイムPCR（RT-qPCR）によりIGF1シグナル因子群（IGF1，受容体IGF1R，結合因子IGFBP1-6）の発現解析を行った。解析には18S rRNAを内部標準として，ΔΔCT法を用いて相対的発現量を評価した。

2.3　培養細胞におけるIGF1機能評価（創傷アッセイ）

細胞診用サイトブラシを用いて，分娩後20日目の子宮体部内膜から上皮細胞を単離し，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。サブコンフルエント後に1 mlチップの先端で疑似傷（ギャップ）を作成し，IGF1R阻害剤（Picropodophyllin，1 μM）で48時間処理後，顕微鏡下で創傷部位を観察した。

2.4　腟粘液中のIGF1タンパク定量（ELISAアッセイ）

分娩後20日目，30日目，および子宮修復後（分娩50日目以降）の発情期において，腟鏡下で鉗子に挟んだ脱脂綿により外子宮口付近を拭い，腟粘液を採取した。検体は遠心により固形物を除去し，上清を分注後に解析に用いるまで即座に凍結保存した。IGF1タンパク質の定量は，R&D systems製ヒト用IGF1 Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）キットを用いてプロトコルに従い測定した。

3．結果と考察

IGF1は肝臓をはじめとした多様な組織で生産され，さまざまな細胞の増殖・分化に必須であり，多くの臓器の機能維持に貢献している。繁殖雌牛の産褥に対しては以前よりIGF1の寄与が知られている。分娩後早期に排卵する個体では血中IGF1濃度が高く，この高いIGF1に曝された卵胞が排卵に至る[2]。一方で過度な負のエネルギーバランスに陥った個体では血中IGF1濃度が低いため排卵しない。ここで，これら血中IGF1は主に肝臓由来であり，子宮局所的なIGF1産生やその機能，そして子宮修復への関与についてはまだ研究の余地が残っている。実際，ヒトの子宮内膜においては月経周期中の内膜の亢進に関与すると考えられており[3]，さらに牛子宮においては子宮より産生されたIGF1が胚の発生を促すと考えられている[4]。

本研究では，最初に牛子宮内膜における発現動態を解析した。マウス子宮においては，卵胞ホルモンにより子宮内膜間質細胞で誘導・産生されたIGF1が子宮内膜上皮細胞のIGF1受容体（IGF1R）を介してその細胞増殖に作用することが報告されている[5]。我々は昨年度からの研究において，分娩後子宮修復期には子宮内膜間質細胞ではなく上皮細胞自身がIGF1を発現していることを明らかにしてきた（**Fig. 1**）。その発現は子宮修復時にのみ高く分娩後50日目には減少し，その後も低値を示していた（データ未発表）。子宮修復期に上皮細胞におけるIGF1の発現を誘導・制御するメカニズムは今後，明らかにしていく必要がある。

IGF1は結合タンパク（IGFBPs）に結合することでその安定性や機能を制御されており，またそのシグナルは受容体IGF1Rを介して伝達される。分娩後牛子宮内膜におけるIGF1Rに関しては，子宮修復期に若干高い傾向を示すものの一貫して子宮内膜上皮細胞で発現していた（**Fig. 1**）。またIGFBPsに関して，IGFBP3は分娩20日目に高値を示しその後減少した（**Fig. 1**）。その他のIGFBPsに関しては，子宮修復に関連した挙動や一貫した発現変動は認められない（**Fig. 1**）。これらの結合タンパクはその発現や機能について他臓器においてもまだ不明な部分が多く，子宮特異的な発現制御機構や機能も含めて今後，さらなる研究が必要とされる。

続いて，分娩後子宮修復時の子宮内膜上皮細胞に対するIGF1の機能を検討するために，本研究

© The Ito Foundation

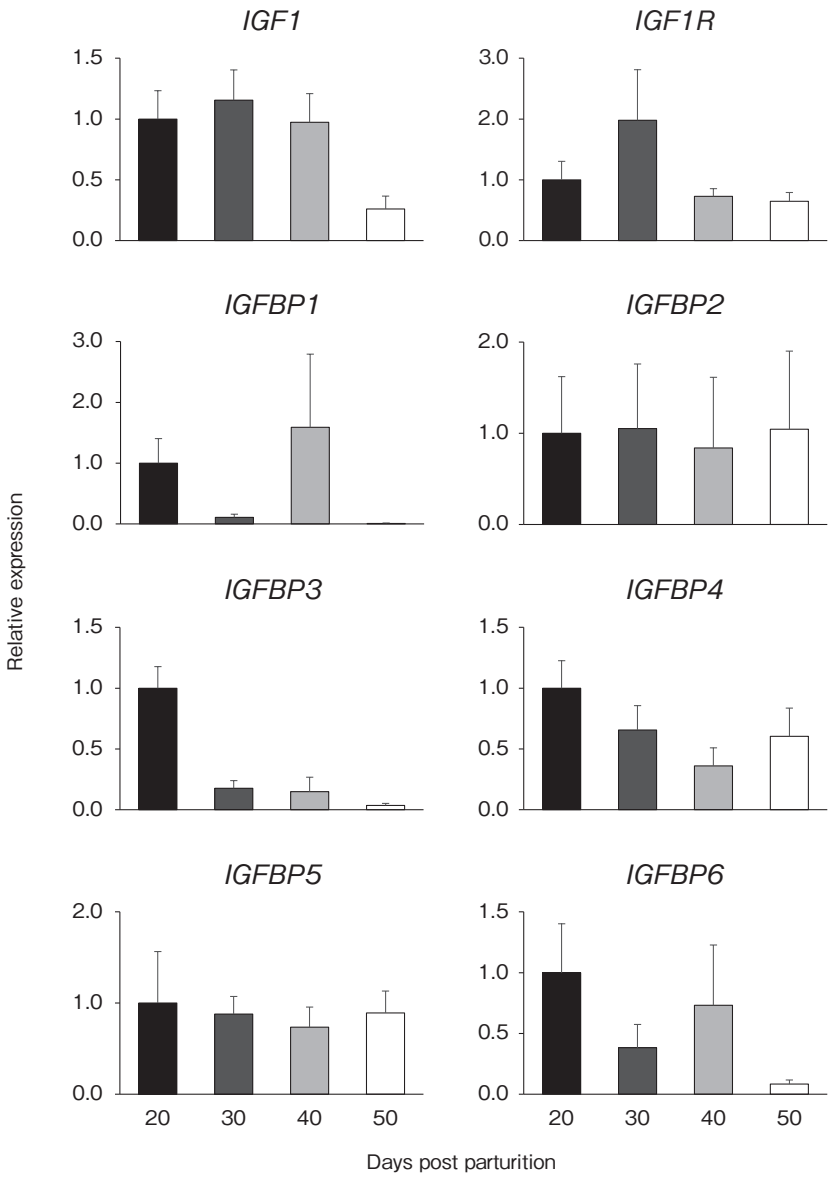


Fig.1　Time-course change of the expression of *IGF1*, *IGF1R* and *IGFBP1-6* in the endometrium of Japanese Black cattle during the uterine involution. Expressions were analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean ± standard error.

では培養細胞モデルを用いて創傷アッセイを行った。この方法では遺伝子の強制発現・抑制や薬剤処理と並行して，人工的に作り出した傷（ギャップ）の修復される面積や速度を解析することで標的因子の機能解析を行うことが可能である。その結果，IGF1Rの機能阻害剤処理により対照区と比較して創傷部位の修復遅延が起きたため，IGF1は細胞の増殖を調節することで分娩後の子宮修復に寄与していることが示唆された（**Fig.２**）。

最後に，腟粘液中のIGF1を指標として子宮修復を評価可能であるかを確かめるために，子宮修復前後の腟粘液中のIGF1濃度を測定した。腟粘

© The Ito Foundation

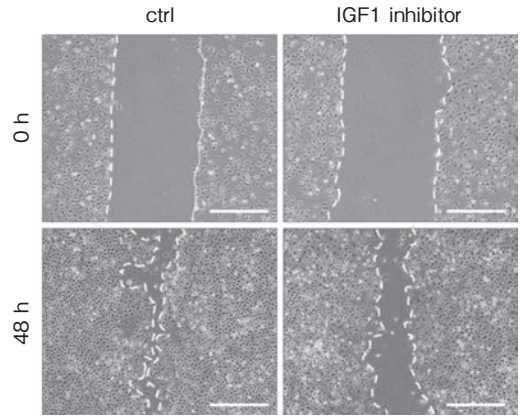


Fig.2 Role of the IGF1 in the uterine endometrial epithelial wound healing. A representative picture of the wound healing assay using uterine endometrial epithelial cells cultured with IGF1 inhibitor (Picropodophyllin, 1 μM). ctrl; control (without treatment). Scale bar = 200 μm.

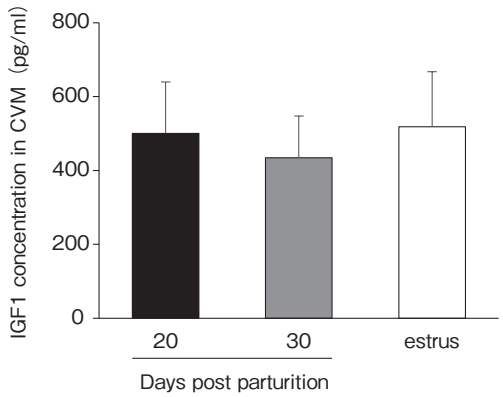


Fig.3 IGF1 concentration in cervicovaginal mucus (CVM) of Japanese Black cattle during uterine involution and estrus after involution. IGF1 concentration was analyzed by ELISA. Data are presented as the mean ± standard error.

液は子宮からの悪露や液性因子の漏出を受け，有機化合物とともにムチンやインターロイキン等の液性因子が含まれる。実際，子宮内膜炎牛の腟粘液にはインターロイキン等の炎症因子が高いことが報告されている[6]。本研究では，ⅰ）子宮で分娩後の汚染により炎症が起こっている分娩後20日目，ⅱ）炎症が治まっているが依然子宮修復中である分娩後30日目，そしてⅲ）子宮修復後の発情期，の３時点で腟粘液を回収し，ELISA法によりIGF1濃度を測定した。その結果，遺伝子発現と相反して，腟粘液中では調べた３時点において差は認められず一定のIGF1濃度を示した（**Fig. 3**）。その理由として，子宮内膜で発現したIGF1が子宮内腔液や腟粘液に分泌されないこと，結合タンパクがないため安定せず即座に分解されてしまうこと，肝臓やその他臓器で産生されたIGF1が混入することで子宮内膜由来のIGF1がマスクされていること等のさまざまな可能性が考えられ，現段階では本研究の目的である腟粘液中のIGF1を指標として用いることが困難であった。また，人工授精の成否とIGF1の相関についても，サンプル数の不足等の影響もあり，残念ながら現時点において結論には至っていない。

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分子マーカー確立を目指して，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解析し，IGF1に注目し研究を行った。IGF1は子宮修復時に発現が高く修復に伴い減少した。IGF1の受容体や結合タンパクも子宮内膜上皮において発現していた。腟粘液中IGF1

© The Ito Foundation

濃度を測定したが，子宮内膜における発現とは一致しておらず，残念ながら腟粘液を用いてIGF1濃度を指標に子宮修復を判断することは困難であった。今後は，腟粘液に代わり直接的に子宮内膜を評価する方法や，IGF1以外のマーカーを検討することによって，子宮修復・受胎性を客観的に評価するマーカーを検出していくことで分娩間隔短縮を達成する必要がある。

文　献

1） Kubota, K., Miwa, M., Hayashi, K. G., Hosoe, M., Sakatani, M.：*J Reprod Dev*, **67**, 386～391, 2021.

2） Butler, W. R.：*Anim Reprod Sci*, **60-61**, 449～57, 2000.

3） Zhou, J., Dsupin, B. A., Giudice, L. C., Bondy, C. A.：*J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 1723～1734, 1994.

4） Hansen, P. J., Tríbulo, P.：*Biol Reprod*, **101**, 526～537, 2019.

5） Zhu, L., Pollard, J. W.：*Proc Natl Acad Sci USA*, **104**, 15847～15851, 2007.

6） Adnane, M., Chapwanya, A., Kaidi, R., Meade, K. G., O'Farrelly, C.：*Theriogenology*, **103**, 117～122, 2017.

© The Ito Foundation

生殖巣始原生殖細胞を用いた新規家禽遺伝資源保存法の開発

Developing new method of conservation of poultry genetic resources using gonadal primordial germ cells

中　島　友　紀
（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）

Yuki Nakajima
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

The technology for long-term conservation of poultry genetic resources is necessary for stable production of native chicken. Cryopreservation of primordial germ cells (PGCs), progenitor cells of sperm and ova, has been developed as technology for long-term conservation of poultry genetic resources. However, recovery of PGCs require special technique and/or expensive machine. In the present study, therefore, efficient method for cryopreservation of poultry genetic resources was developed using gonadal PGCs (gPGC), which present in embryonic gonad. Embryonic gonads were removed from 5-, 7- and 9-day-old tdTomato induced chick embryo, then placed in cryotube containing cryoprotectant including 1) 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and serum, 2) 10% DMSO and 3) 10% propylene glycol (PG). Cryotubes were cryopreserved by slow freezing and stored for more than a month in liquid N_2. Then, gPGCs were recovered by incubation of frozen-thawed gonads in phosphate buffered saline (PBS) at 37℃ for 3 h. After incubation, the number, survival rate and purity of gPGCs recovered from gonads were measured. Additionally, migratory and proliferative abilities of gPGCs recovered from frozen-thaw gonads in each cryoprotectant was analyzed to evaluate physiological function in recipient embryos. Efficiency of recovery of gPGCs from frozen-thaw gonads were higher when 1) was used in both 5- and 7-day-old embryo. In 9-day-old embryo, efficiency of recovery of gPGC cryopreserved in 2) was higher than other cryoprotectants. However, in 5- and 9-day-old embryo, migratory and proliferative ability of recovered gPGCs from frozen-thaw gonads were lower than conventional method. In the present study, therefore, a new method of conservation of poultry genetic resources using gPGCs were developed by directly cryopreservation of embryonic gonads.

1．目　　的

安定的な地鶏生産のためには，種鶏となる家禽を安定的に維持・供給する必要がある。しかし，現在の飼育による個体での維持は，鳥インフルエンザ等の感染症や地震・台風・大雨等の災害により，一度に多数の種鶏を失う可能性がある。そのため，地鶏の種鶏を保有する都道府県では遺伝資源保存技術の関心が年々高まっており，地鶏生産の種鶏となる品種や系統における遺伝資源の早急

© The Ito Foundation

な保存がきわめて重要である。

形態的・生理的に哺乳類とは異なる家禽の遺伝資源の保存については，卵や精子の源である始原生殖細胞（PGC）を用いた独自の方法が開発されている。この方法では，ニワトリ2.5日胚の血液中に存在するPGC（cPGC）を分離して凍結保存する。凍結保存後に融解したcPGCを宿主胚に移植して作製した雌雄のキメラニワトリを交配することにより個体の復元が可能である[1)]。

現在はcPGCの利用が主流であるが，cPGCの分離には特殊な器具，高価な試薬や機械の導入が必須である。また，それらの技術習得には時間を要するため，早急な対応が困難な場合が考えられる。さらに，cPGCを使用する場合，回収できる胚発生時期が孵卵２日後の数時間程度であり，一つの胚から採取可能なcPGCの数は10～200個程度と少ない。そこで，これらの問題を解決するため，生殖巣で増殖したPGC（gPGC）の利用に着目した。gPGCは一つの胚から多数の細胞を確実に得ることが可能であり，採取可能な胚発生期間もcPGCに比べて数日以上長い。また，gPGCはcPGCと同様に凍結保存が可能なため，前記した事項とあわせ遺伝資源保存試料としての利点が多い[2)]。そこで，本研究ではgPGCを用いた特別な機器や技術を必要としない効率的かつ簡便な家禽遺伝資源の保存法の開発を目的とする。具体的には，従来の「細胞を分離した後に凍結保存する」という手順を省くため，胚から採取した生殖巣を直接凍結保存する。保存した生殖巣からgPGCを分離し，分離したgPGCを宿主胚に移植し，宿主胚の生殖巣への移住および増殖能を解析することで新たな保存法の有効性を検証し，特殊な技術や機械を必要としないまったく新しい効率的な家禽遺伝資源保存法を開発する。

２．方　　法

赤色蛍光を示すtdTomato導入ニワトリの受精卵を孵卵し，孵卵後５日，７日および９日の胚を供試した。tdTomato陽性を示す雌雄の胚から生殖巣を採取し，50μlのCa^{2+}およびMg^{2+}を含まないリン酸緩衝生理食塩水（PBS）で２回洗うことで中腎組織片や血球を取り除き，４℃に冷却した200μlの凍結保護溶液に浸漬し，－１℃/分の速度で－80℃まで冷却した後，－196℃の液体窒素内で１か月以上保存した。凍結保護溶液には，①血清および10％ジメチルスルホキシド（DMSO）添加，②血清添加なし，10％DMSO添加，③血清添加なし，10％プロピレングリコール（PG）添加の３種で比較した。融解時には，凍結チューブを37℃のウォーターバス内に入れて急速融解し，取り出した生殖巣をただちに50μlのPBSで２回洗浄し，200μlのPBSに浸漬して，37℃，３時間インキュベーションした。その後，チューブ内のPBSをゆっくりピペッティングし，得られた細胞懸濁液10μlのトリパンブルー染色を行い，生殖巣から分離された生存gPGC数，死滅gPGC数，体細胞数をそれぞれ測定した。対照区として，従来法と同様に生殖巣から取り出したgPGCを凍結保存した[3)]。具体的には，生殖巣を200μlのPBSに浸漬し，37℃，３時間インキュベーションして分離したgPGC数を測定した。また，分離したgPGCを①，②，③の凍結保護溶液で同様に保存，融解し，それぞれの細胞数を測定した。

次に，分離したgPGCの生体内における移住能および増殖能を解析するため，上法によりそれぞれの胚から分離したgPGC50個を野生型の白色レグホーン（WL）2.5日胚の血管内に移植した。移植５日後，WLの生殖巣を取り出し，生殖巣に存在するtdTomato陽性gPGC数を測定し，移住能の有無および移植したgPGC数に対する増殖率を算

© The Ito Foundation

出した。

3．結果と考察

3.1　凍結生殖巣からのgPGC分離

Fig. 1 に①の凍結保護溶液を用いて凍結保存した生殖巣から分離したgPGC（試験区，**Fig. 1A**）と，生殖巣から分離し①を用いて凍結保存を行ったgPGC（対照区，**Fig. 1B**）の鏡検像を示した。試験区と対照区では分離したgPGCにおいて形態的な差異は認められなかった。一つの胚から分離可能なgPGC数について，凍結・融解後の生殖巣から分離した場合（試験区）と凍結保存を行う前に生殖巣から分離した場合（対照区）で比較した。その結果，５日胚および９日胚では対照区および凍結保護溶液間で有意な差は認められなかった。一方，７日胚では①の凍結保護溶液を用いた場合，対照区と同等の細胞数が分離可能であり，②および③を用いた場合に比べて有意に多くの細胞の分離が可能であった（$p<0.05$）（**Fig. 2**）。次に，gPGCの生存率は，５，７および９日胚いずれもgPGCで保存した対照区より試験区の場合に有意に低くなった（$p<0.05$）。また，試験区ではすべての発生段階で①または②の凍結保護溶液を使用した場合，③に対し有意に高い生存率を示した（$p<0.05$）（**Fig. 3**）。gPGC純度（分離された総細胞に対するgPGCの割合）は，５日胚ではいずれの凍結法および凍結保護溶液においても有意な差は認められず，凍結法と凍結保護溶液間の交互作用は認められなかった。一方，７日胚および９日胚においては，対照区に対し試験区ではgPGC純度が有意に低くなった（$p<0.05$）。また，凍結保護溶液は①の場合，②および③に比べて有意にgPGC純度が高く，保存法と凍結保護溶液の間に有意な交互作用が認められた（$p<0.05$）（**Fig. 4**）。以上より，生殖巣のまま凍結保存する場合，生存しているgPGCを効率的に分離できる条件は，５日胚では②の凍結保護溶液，７および９日胚では①の凍結保護溶液を使用した場合であることが示された。

3.2　凍結生殖巣から分離したgPGCにおける宿主胚生殖巣への移住・増殖能の解析

3.1の各凍結保存条件におけるgPGCの生理的機能を明らかにするために，3.1で分離したgPGCを宿主胚に移植し，移植５日後の生殖巣への移住・増殖能を解析した。その結果を移住能の有無については**Fig. 5A**に，増殖能（率）については**Fig. 5B**にそれぞれ示した。gPGCで保存した対照区では，５日胚の場合いずれの凍結保護溶液でも移植したうちの63～70％が移住能を示した。また，増殖率は①および③では1.5～1.8倍であったのに対し，②では0.7倍であった。７日胚の場合，①では移植したうち88.8％が移住能を示したのに

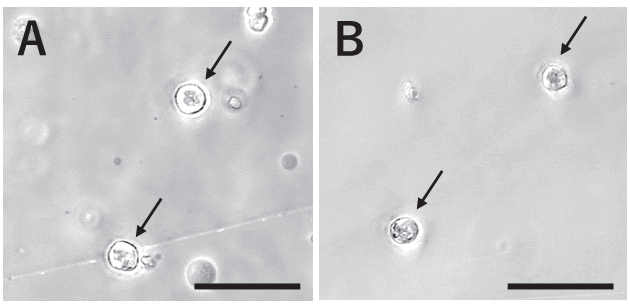


Fig. 1　Gonadal PGCs recovered from frozen-thaw gonads of 7-day-old chick male embryo. A) GGCs recovered from frozen-thaw gonad. B) Frozen-thaw GGCs (Ctrl). Arrow: gPGC, Bar = 50μm.

© The Ito Foundation

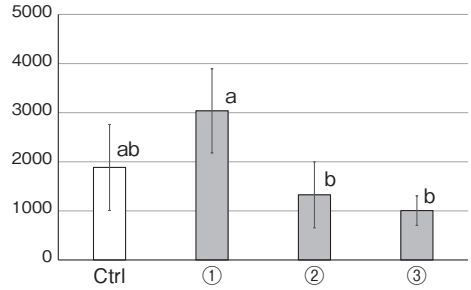


Fig. 2　Total number of gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 7-day-old chick embryo (means ± 95% confidence intervals (CI)).
Notations : Ctrl ; gPGCs recovered from unfrozen gonads, ① ; cryoprotectant containing 10% DMSO and serum, ② ; cryoprotectant containing 10% DMSO, ③ ; cryoprotectant containing 10% PG
a, b : Numbers with different letters are significantly different at $p<0.05$.

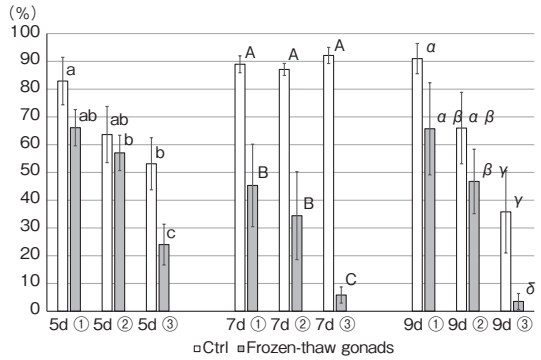


Fig. 3　Survival rate of gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 5-, 7- and 9-day-old chick embryo (means ± 95% CI).
Notations : 5d ; 5-day-old embryo, 7d ; 7-day-old embryo, 9d ; 9-day-old embryo, Ctrl ; frozen-thaw gPGCs after recovering from unfrozen gonads, ① ; cryoprotectant containing 10% DMSO and serum, ② ; cryoprotectant containing 10% DMSO, ③ ; cryoprotectant containing 10% PG
abc, ABC, $\alpha\ \beta\ \gamma\ \delta$: Survival rate with different letters are significantly different at $p<0.05$ among same developmental stage.

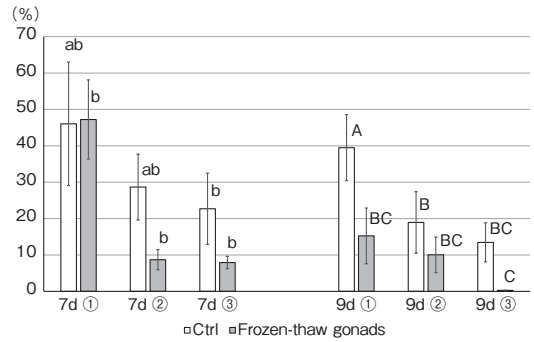


Fig. 4　Purity of gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 7- and 9-day-old chick embryo (means ± 95% CI).
Notations: 7d ; 7-day-old embryo, 9d ; 9-day-old embryo, Ctrl ; frozen-thaw gPGCs after recovering from unfrozen gonads, ① ; cryoprotectant containing 10% DMSO and serum, ② ; cryoprotectant containing 10% DMSO, ③ ; cryoprotectant containing 10% PG
abc, ABC : Purity with different letters are significantly different at $p<0.05$ among same developmental stage.

© The Ito Foundation

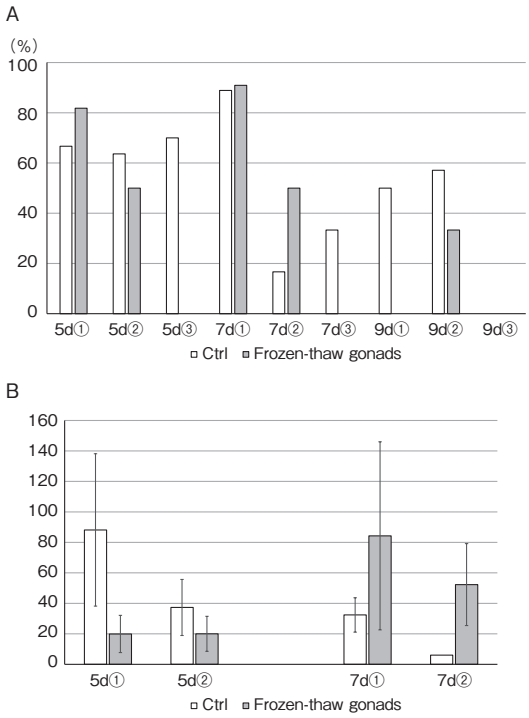


Fig.5 Migratory and proliferative ability of gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 5-, 7- and 9-day-old chick embryo. A) Proportion of migratory ability of gPGCs to the gonads of recipient embryos. B) The number of tdTomato-positive gPGCs in the gonad of recipient embryos (means ± 95% CI).
Notations: 5d ; 5-day-old embryo, 7d ; 7-day-old embryo, 9d ; 9-day-old embryo, Ctrl ; frozen-thaw gPGCs after recovering from unfrozen gonads, ① ; cryoprotectant containing 10% DMSO and serum, ② ; cryoprotectant containing 10% DMSO, ③ ; cryoprotectant containing 10% PG

対し，②および③では16.7％および33.3％となった。また，増殖率は①，②および③でそれぞれ0.7，0.1および0.3倍であった。９日胚の場合，①および②で移住能を示したが，③については移住能を示さなかった。増殖率については，有意差は認められなかったが，①が②よりも高い傾向にあった。これらのことから，分離後に凍結保存したgPGCでは凍結保護溶液により移住・増殖能が異なることが示唆された。一方，試験区である凍結保存した生殖巣から分離したgPGCでは，５日胚および７日胚の場合，①の凍結保護溶液ではそれぞれ81.8％および90.9％が移住能を示したのに対し，②ではいずれも50％，③では移住能を示さない，もしくは移植できるgPGCが得られなかった。９日胚では，移住能を示したのは②の凍結保護溶液のみで，①および③では移住能は認められなかった（**Fig. 5A**）。増殖率については，５日胚の場合，①および②いずれも0.4倍程度で，対照区より有意に低くなった（$p < 0.05$）（**Fig. 5B**）。一方，７日胚では①および②の増殖率はそれぞれ1.7および１倍で対照区より有意に高くなった（$p < 0.05$）（**Fig. 5B**）。９日胚の②の凍結保護溶液の場合，増殖率は対照区と同程度であった。

以上の結果より，移住・増殖能を維持したgPGCを凍結保存した生殖巣から分離することが可能であることが明らかになった。また，凍結保護溶液を比較した結果，５および７日胚では①の凍結保護溶液，９日胚では②の凍結保護溶液が最

© The Ito Foundation

も効果的であることが示唆された。しかし，対照区と比較すると５日胚および９日胚では移住・増殖能を維持したままgPGCを分離する方法として，効率が低かった。そのため，本研究で目的としている「生殖巣をそのまま凍結保存する技術」を遺伝資源保存へ応用するためには，今後，保存対象の胚発生段階に合わせた凍結法の改良が必要であると考えられる。しかし一方で，意外なことに，７日胚では対照区よりも高い増殖能を維持している可能性が示された。このことから，本研究により，７日胚に関しては，生殖巣のまま凍結保存することにより従来法に比べて短時間かつ簡便に遺伝資源を保存できることが示された。

最後に，今後の課題として，本研究で開発した方法を実用化するにあたっては，保存した７日胚のgPGCにおける配偶子形成能および個体形成能の解析が必要であると考えられる。

４．要　約

安定的な地鶏生産のためには，家禽遺伝資源を長期保存する技術が必要である。家禽遺伝資源の長期保存法として，精子や卵の源である始原生殖細胞（PGC）の凍結保存技術が開発されている。しかし，PGCの採取には特殊な技術や高価な機械が必要である。そこで，本研究では，生殖巣に存在するPGC（gPGC）に着目し，特殊な技術や高価な機械を必要としない，簡便かつ短時間で効率的な家禽の遺伝資源保存法の開発を試みた。まず，tdTomato導入ニワトリ５，７および９日胚の生殖巣を取り出し，①10％ジメチルスルホキシド（DMSO）および血清添加，②10％DMSO添加，③10％プロピレングリコールを添加した３種の凍結保護溶液中にそれぞれ浸漬し，緩慢凍結法を用いて凍結保存を行った。－196℃下で１か月以上保存した生殖巣を融解し，リン酸緩衝生理食塩水内に浸漬し，37℃，３時間インキュベーションすることにより分離したgPGCの数，生存率および体細胞に対するgPGCの純度を測定した。次に，凍結生殖巣から分離したgPGCの生理的機能を評価するため，それぞれの凍結保護溶液で保存した生殖巣から分離したgPGCの生体内における移住・増殖能を解析した。その結果，５および７日胚では①の凍結保護溶液で保存した場合，９日胚では②の凍結保護溶液の場合にgPGCの保存効率が最も高くなった。しかし，５および９日胚においては，gPGCを分離した後に凍結する従来の凍結保存法よりもgPGCの移住・増殖能を保持したまま保存する効率は低かった。以上より，本研究で７日胚において，従来法に比べて短時間かつ効率的な遺伝資源の新規保存法が開発された。

文　献

1） Naito, M., Tajima, A., Tagami, T., Yasuda, Y., Kuwana, T.：*Journal of Reproduction and Fertility*, **102**, 321～325, 1994.
2） Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y., Kuwana, T.：*Journal of Experimental Zoology*, **280**, 265～267, 1998.
3） Nakajima, Y., Asano, A., Tajima, T.：*British Poultry Science*, **63**, 46～53, 2022.

© The Ito Foundation

機能性脂肪酸を活用した黄体機能強化による乳牛繁殖成績改善技術の確立

Functional fatty acid diet improves the reproductive performance of dairy cows by boosting their luteal function

山口　昇一郎・藤井　英之・青木　直人[1]・山田　豊[1]・柿原　孝彦
（福岡県農林業総合試験場，[1]油化産業株式会社）

Shoichiro Yamaguchi, Hideyuki Fujii, Naoto Aoki[1], Yutaka Yamada[1] and Takahiko Kakihara
(Fukuoka Agricultural Research Center, [1]Yuka Sangyo Co., Ltd.)

In this study, we investigated the effect of feeding a diet containing calcium salts of α-linolenic acid fatty acids to lactating dairy cows on milk yield and reproduction. The experimental diet consisted of total mixed rations, which was mainly Italian ryegrass silage. The α-linolenic acid group was supplied with 100 g of calcium salts of α-linolenic acid by oral administration daily from 3 weeks postpartum.

Results showed that the milk yield was higher by 1.1 kg/day in the α-linolenic acid group than in the control group. The α-linolenic acid levels in the blood of the treatment group increased 2.4 times compared to that in the control group. There was no difference in the luteal blood flow on the 7th day after artificial insemination, but it tended to be higher in the α-linolenic acid group on the 14th day ($p < 0.1$). The conception rate tended to be higher in the α-linolenic acid group than in the control group; however, there was no significant difference.

In conclusion, it is suggested that feeding a diet containing calcium salts of α-linolenic acid to lactating dairy cows from 3 weeks postpartum may improve the milk yield and luteal function, thereby improving the conception rate.

1．目　　的

近年，乳牛の受胎率が低下し，酪農現場で大きな問題となっている。福岡県内における乳牛の平均分娩間隔は約460日であるが，目標となる400日程度に短縮することができれば50頭規模の農家換算において子牛生産頭数は，年間で７頭増加する計算となり，乳量増加も考慮すると繁殖成績の向上が経営に与える影響は非常に大きい。

分娩後の乳牛は，泌乳量の急増に伴い負のエネルギーバランスとなっており，これが繁殖成績低下の大きな要因となっている。酪農現場では，繁殖性向上や乳量および乳脂肪向上を目的として従来からリノール酸やパーム油脂などのバイパス脂肪酸が用いられている。近年，泌乳牛にn-3系脂肪酸であるα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを給与すると分娩後初回授精日数や受胎までの日数が短くなることが報告された[1)]。同様に同じn-3系の脂肪酸であるDHAを分娩４週目からの泌乳牛に給与したところ，インターフェロン刺激遺

© The Ito Foundation

伝子の発現を向上させ妊娠率を向上させる[2]などn-3系脂肪酸に関する繁殖性向上に関する知見が報告されている。

そこで本研究では，泌乳初期牛にアマニ油由来のα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを給与することで，乳量や乳成分および血液成分に及ぼす影響を検討するとともに，性選別精液の人工授精を行って，受胎率や妊娠維持に関与する黄体血流量等を明らかにする。

２．方　法

供試牛は福岡県農林業総合試験場で飼養する２産以上のホルスタイン種経産牛12頭（対照区：６頭および試験区：６頭）を用いた。試験牛はフリーストール牛舎で飼養し，ドアフィーダによって個体ごとに飼料摂取量を計測した。搾乳はミルキングパーラーで８：45と17：15の１日２回行った。体重は毎日測定し，乳成分は分娩後２週間に１回乳サンプルを用いて，MILKO-SCAN FT＋（Foss Electric，Hillererod，Denmark）で分析した。試験期間は，分娩後３週から21週とした。採血は３週間に１回行い，ヘパリン入り真空採血管を用いて採血して，冷却遠心（3,000rpm，30分間）によって得られた血漿を検体とした。血漿中の血糖，総コレステロール，総タンパク，BUN，GOTおよびGGTは，乾式血液自動分析装置（富士ドライケム，富士メディカルシステム，東京）で分析した。血中のα-リノレン酸含量は，石田ら[3]の変法によって行った。なお，血中のα-リノレン酸含量は，対照区２頭およびα-リノレン酸区が３頭のデータである（有意差検定なし）。すべての試験用飼料は，カッターで細断した粗飼料と濃厚飼料を合わせて混合飼料（TMR）に調製した。TMRの養分含量は，TDN71％，CP15.5％となるように濃厚飼料と場内産イタリアンライグラスサイレージを組み合わせ給与した。

α-リノレン酸区は，分娩後３週目からトップドレスでα-リノレン酸脂肪酸カルシウム（ファインメイト，油化産業株式会社，東京）を100ｇ夕方に給与した。卵巣および子宮修復診断は，毎週１回超音波画像診断装置（HS-101Ｖ，本田電子株式会社，愛知）で行い，子宮修復は子宮腔貯留物スコア[4]によってスコア０で修復とした。人工授精（AI）は，分娩後80日以降で黄体を確認後，プロスタグランジンF2α製剤（動物用プロナルゴンＦ注射液，Zoetis，東京）を投与し，その48時間後に酢酸フェルチレリン（コンセラール注射液，MSDアニマルヘルス，東京）を200μg投与し，その24時間後に定時AIを行った。人工授精に際しては，主席卵胞側の子宮角内で深部注入器（YTガン，ヤマネテック，長野）の先端から内芯を押し出して先端チューブを子宮角深部に挿入した状態でホルスタイン種性選別精液を注入した。黄体血流量は，AI後７日目および14日目にカラードップラー（MyLabOne VET，メディカルタスクフォース，大阪）によって測定した。統計処理は，Studentのｔ検定またはχ二乗検定で行った。

３．結果と考察

乾物摂取量は，対照区が27.8kg／日およびα-リノレン酸区が27.6kg／日となり，差は認められなかった。トップドレスでα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを給与したが，乾物摂取量には影響を与えないことが明らかとなった。試験期間中の平均乳量は，対照区が46.1kg／日およびα-リノレン酸区が47.2kg／日となり，有意差は認められないもののα-リノレン酸区が1.1kg／日多くなった（**Table 1**）。乳成分については，脂肪において対照区の3.7％に対してα-リノレン酸区が3.5％と有意差はないものの低い傾向にあった。他の乳成分には差が認められなかった。α-リノレン酸区の脂肪が低かった要因は，乳量が多かっ

© The Ito Foundation

Table 1　Effect of feeding α-linolenic acid on lactation performance in Holstein cows.

	Milk yield	Fat	Solids not fat	Protein	MUN
	kg/day	%	%	%	mg/dl
α-linolenic acid	47.2	3.5	8.6	3.1	12.7
Control	46.1	3.7	8.6	3.1	12.3

Table 2　Effect of feeding α-linolenic acid on metabolic parameters in Holstein cows.

	Glucose	Protein	BUN	GOT	GGT	α-linolenic acid (before the test)	α-linolenic acid (before AI)
	mg/dl	g/dl	mg/dl	U/l	U/l	μg/ml	μg/ml
α-linolenic acid	66.3†	8.3*	14.3	88.4	40.0	35.4	101.9
Control	62.0	7.7	14.0	84.5	38.4	40.1	42.5

*p＜0.05, †p＜0.1

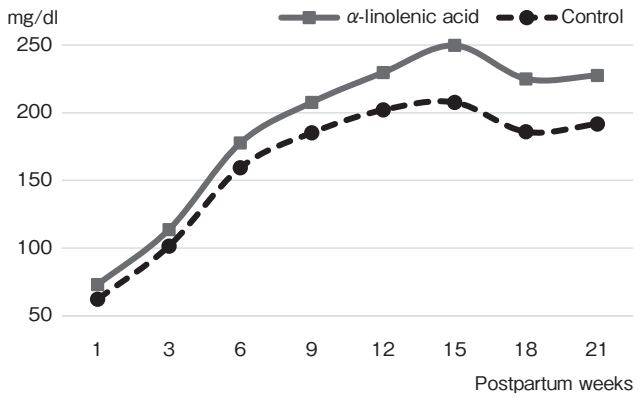


Fig. 1　Effect of feeding α-linolenic acid on total cholesterol in plasma in Holstein cows.

たことが考えられる。

血液成分については，血糖において対照区が62.0mg/dlおよびα-リノレン酸区が66.3mg/dlとなりα-リノレン酸区が高い傾向にあった（p<0.1）（**Table 2**）。また，タンパクについては，対照区が7.7g/dlおよびα-リノレン酸区が8.3g/dlとなりα-リノレン酸区が有意に高くなった（p＜0.05）。この理由については，α-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムに血糖やタンパクに影響を与える成分が含まれていないため原因は明らかにはできなかった。総コレステロールについては，有意差は認められないものの給与期間中は，α-リノレン酸区が高く推移した（**Fig. 1**）。血中α-リノレン酸含量は，試験開始前（分娩３週目）は，両区ともほぼ同程度であったが，AI前の分娩80日目には，対照区では増加していないのに対してα-リノレン酸区では2.9倍に増加した。その他の血液成分には差が認められなかった。

黄体血流量については，AI７日目には有意差が認められなかったが，14日目にはα-リノレン酸区が高い傾向にあった（p<0.1）（**Fig. 2**）。Sakumotoら[5]は，*in vitro*において牛子宮内膜組織をα-リノレン酸存在下で培養したところ，プロスタグランジン（PG）E2の産生が有意に増加

© The Ito Foundation

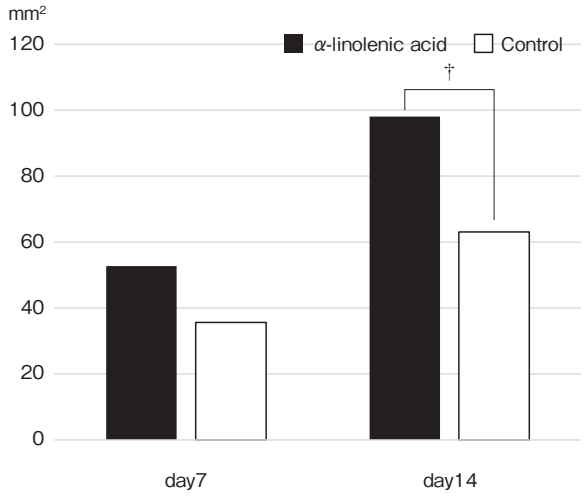


Fig. 2　Effect of feeding α-linolenic acid on changes in the blood flow area of the CL in Holstein cows.
† p<0.1

Table 3　Effect of feeding α-linolenic acid on reproductive performance in Holstein cows.

	Rate of weight gain (12week/3week)	Postpartum uterine recovery	First postpartum insemination	Conception rate at first insemination
	%	day	day	%
α-linolenic acid	104	24	95	43（3/7）
Control	111	30	87	33（2/6）

したことを明らかにした。PGE2は黄体のプロジェステロン（P4）合成を促進する機能亢進作用が知られ，また血管新生を促す作用を有することから，黄体での血管新生が促進され，その結果，黄体の血流が増加したものと推察された。一方，コレステロールは，ステロイドホルモン合成の基質になり，α-リノレン酸区は試験期間を通じて総コレステロールが高く推移したことから黄体細胞が活性化した可能性も考えられる。

体重増加率，分娩後子宮修復日数および初回授精日数は，試験区間で差が認められなかった（**Table 3**）。受胎率は，有意差は認められないもののα-リノレン酸区が高い傾向が認められた。受胎率が高く推移している理由として，黄体機能が高かったことが考えられる。黄体血流面積が大きい牛の受胎率が高くなる理由として，黄体の血管形成が高まることにより，黄体への栄養やP4の基質供給量を増加させ，局所循環を介して黄体側の子宮角のP4濃度を増加させるためと推測されている[6)]。また，泌乳牛にDHAを給与することによりIFN-τに関係する遺伝子発現が高くなり受胎率が高くなる[2)]ことも報告されている。これらのことから，α-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを泌乳牛に給与することにより黄体機能が高まるとともに妊娠維持に関する機構が向上することによって受胎率が高くなる可能性が示された。

以上のことから，分娩後３週目の泌乳牛にα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを給与することによって乳量が向上するとともに黄体機能が向上することによって受胎率が向上する可能性が示唆された。

© The Ito Foundation

4．要　約

本研究では，泌乳牛へのα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムの給与が乳量や繁殖に及ぼす影響を検討した。試験飼料は，イタリアンライグラスサイレージを主体としたTMRとした。α-リノレン酸区には，α-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを分娩後３週目から100ｇ／日トップドレスで投与した。検討の結果，乳量は対照区に比べα-リノレン酸区は1.1kg／日多くなった。血液中のα-リノレン酸含量は，対照区に比べ2.4倍増加した。黄体血流量は，人工授精７日目には差が認められなかったが，14日目にはα-リノレン酸区が高い傾向にあった（p＜0.1）。受胎率は，α-リノレン酸区が有意差はないものの高い傾向にあった。

以上のことから，分娩後３週目の泌乳牛にα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを給与することによって乳量が向上するとともに黄体機能が向上することによって受胎率が向上する可能性が示唆された。

文　献

1） Meignan, T., Madouasse, A., Beaudeau, F., Ariza, J. M., Lechartier, C., Bareille, N.：*Theriogenology*, **125**, 293～301, 2019.
2） Sinedino, L. D., Honda, P. M., Souza, L. R., Lock, A. L., Boland, M. P., Staples, C. R., Thatcher, W. W., Santos, J. E.：*Reproduction*, **153**(5), 707～723, 2017.
3） 石田修三，早澤宏紀，清水隆司，玉城政信，相井孝允：日畜会報，**66**(10)，889～897，1995.
4） 小山毅：北海道獣医師会雑誌，**56**(1)，10～15，2012.
5） Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Iga, K.：*J Reprod Dev*, **68**(1), 62～67, 2022.
6） 金澤朋美：臨床獣医臨時創刊号，**35**，45～48，2017.

© The Ito Foundation

卵胞刺激ホルモンを用いた夏季における繁殖母豚の発情回帰遅延対策技術の開発

The development of method of estrus induction for weaning sow in summer using follicular stimulating hormone

内倉　健造・田島　茂行・山本　るみ子・豊島　浩一
（愛知県農業総合試験場）

Kenzo Uchikura, Shigeyuki Tajima, Rumiko Yamamoto and Koichi Toyoshima
（Aichi Agricultural Research Center）

The purpose of this study was to investigate whether subcutaneous administration of follicle-stimulating hormone (FSH) can be used to delay the return to estrus in breeding sows during the summer season, and whether subcutaneous administration of FSH can be used for estrus induction of weaning sows, and piglet production. Subcutaneous administration of FSH to weaning sows during the non-thermal period showed the same efficacy as intramuscular administration of equine chorionic gonadotropin (eCG). Subsequently, artificial insemination and farrowing were performed, and these results suggested that normal piglet production was possible. FSH or FSH with human chorionic gonadotropin (hCG) was administered subcutaneously at weaning to multiparous sows during the heat period, and estrus was observed in only one of the four sows treated with administration of FSH, whereas estrus was observed in all four sows treated with administration of FSH/hCG. However, in subsequent examination, estrus was observed in all three primiparous sows in the FSH group, whereas in the FSH/hCG group, estrus was observed in only one of the three primiparous sows. These results suggest that subcutaneous administration of FSH at weaning can be used to induce estrus as an alternative to intramuscular administration of eCG in the conventional method, and can be used in piglet production. On the other hand, the optimal method of using FSH as a countermeasure for delayed return to estrus in sows during the summer season needs to be further investigated.

1．目　　的

近年，豚の繁殖性に関する育種改良が進み，産子数や泌乳能力の向上に伴って，授乳中における母豚への負荷が増大している。そのため，母豚の適切な飼養管理がより重要となっている。特に成長途上にある初産後の母豚は，夏季の離乳後に発情回帰が遅延する傾向が強いことが知られており，生産性低下の原因になっている。

こうした発情回帰遅延を防ぐため，または発情の同期化や定時人工授精を行う目的で国内の８割程度の農場が交配前のホルモン投与を利用しており，さらに３割程度の農場は恒常的に利用していると報告されている。また，それら農場内で使用

© The Ito Foundation

されるホルモンの80％以上は馬絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）であったと報告されている[1)]。交配前にホルモンを用いた際の分娩率の向上や産子数の増加といった有益な効果については農場によって成績が異なる[2, 3)]。一方で，雌豚にホルモンを用いた場合，卵胞嚢腫や卵胞の早期黄体化が発生すると言われており[4)]，ホルモンの利用が繁殖障害のリスクになることも指摘されている。

牛の胚採取のための過剰排卵処理では，卵胞発育促進の目的でeCGを使用すると異常な大型卵胞の形成が起こることが報告されている[5～7)]。このため牛では一般的に半減期の短い卵胞刺激ホルモン（FSH）が用いられているが，FSHは半減期が短いことから１日２回，３～４日間投与する必要がある。この点について近年，多量の生理食塩水（NS）や徐放化溶液にFSHを溶解し，皮下投与することで体内半減期を調節し，省力化を行う試みがされている[8)]。

豚においてもFSHの単回投与で発情誘起や定時人工授精が可能になれば，繁殖障害のリスクを抑えながら母豚の発情回帰日数が短縮することが期待される。過去に我々は，雌豚にFSHを多量のNSに希釈し皮下に単回投与することで発情を誘起可能であること，さらにその後人工授精を行い，採卵で正常胚を採取可能であることを明らかにした[9)]。本研究では，夏季における母豚の発情回帰遅延対策の確立を目的に母豚へのFSHの投与法の検討を行い，発情が正常に回帰するかどうかを検証するとともに，分娩させ産子数や発育への影響について調査した。

２．方　法

2.1　非暑熱期におけるFSHの単回投与量および投与方法の検討

暑熱ストレスが少ないと考えられる春期（４月８日～５月23日）において，初産および２産後のランドレース（L）種および大ヨークシャー（W）種母豚を用いて，離乳日にFSH 2.5 AU（アントリン10，共立製薬株式会社）をNS25 mlに溶解（試験区分：FSH 2.5/25区（AU/ml)），もしくはFSH 5 AUをNS50 ml（試験区分：FSH 5/50区）に溶解し皮下に投与した。皮下投与の方法は過去の報告[9)]に従って行った。慣行区として離乳日にeCG 1000 IU（セラルモン1000，共立製薬株式会社，試験区分：eCG区）をNS3 mlに溶解し筋肉内投与した。すべての区において離乳後72時間後に排卵誘起を目的としてヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）1000 IU（ゲストロン1500，共立製薬株式会社）を投与し，その24時間後に発情発現を確認し，発情の有無にかかわらず当場慣行法で人工授精を１回行った。人工授精後25日目に超音波診断装置で受胎の確認を行い，受胎が確認された母豚は分娩させ，総産子数，生存産子数および子豚の生時体重を測定した。離乳後の子豚については出荷時体重および出荷日齢を測定した。

2.2　種豚場における投与方法の検証

秋期（10月27日～11月29日）の種豚場においてＬ種とW種の経産豚を用いて，上記2.1の方法と同様に種豚場職員が離乳時にFSH 5 AUをNS50 mlに溶解し皮下投与を実施した。離乳後毎日発情発現の確認を行い，発情が確認された個体については当該種豚場の慣行法を用いて人工授精を行った（試験区)。対照区では10頭のＬ種，W種およびデュロック種の経産豚を用いて，ホルモン投与を行わず，同様に発情確認および人工授精を行った。人工授精後25日に妊娠鑑定を行い，受胎を確認した。

2.3　暑熱におけるFSHおよびhCGの投与の検討

暑熱期（８月７日～９月17日）において，２もしくは３産後のＬ種およびW種母豚を用いて，FSH 5 AUもしくは，FSH 5 AUおよびhCG200

© The Ito Foundation

IUをNS50 mlに溶解し，離乳日に皮下投与した（それぞれFSH区およびFSH/hCG区）。また，慣行法として離乳時にeCG 1000 IUを筋肉内投与するeCG区を設定した。離乳後３～７日目に朝夕２回，2.1と同様に発情発現を確認し，発情終了まで確認を継続した。発情終了後６日目に経直腸卵巣診断を行い，触知で黄体数を計測した。また，その際に1.5 cm以上の卵胞が存在した場合，卵巣嚢腫と判定した。

2.4　暑熱期における初産後の母豚へのFSHおよびhCGの投与の検討

暑熱期（７月26日～９月17日）において，初産後のＬ種とW種の交雑種豚を用いて，FSH 5 AUもしくは，FSH 5 AUおよびhCG200 IUをNS50 mlに溶解し，離乳日に皮下投与した（それぞれFSH区およびFSH/hCG区）。また，慣行法として離乳時にeCG 1000 IUを筋肉内投与するeCG区を設定した。対照区では離乳時のホルモン投与を行わなかった。離乳後３～７日目に朝夕２回，2.1と同様に発情発現を確認し，発情開始から発情終了まで１日１回当場慣行法で人工授精を行った。受胎確認は初回人工授精25日後に超音波診断装置で行い，受胎が確認された母豚については分娩させた。

３．結果と考察

春期における離乳時の経産豚にFSHを皮下投与した場合の発情発現率，受胎率，分娩率，平均総産子数および平均生存産子数を**Table 1** に示した。FSH 2.5/25区では５頭中３頭で発現し，人工授精後４頭が受胎に至った一方で，FSH 5/50区では４頭すべてで発情，受胎した。FSH 2.5/25区，FSH 5/50区およびeCG区の平均総産子数についてはそれぞれ9.0 ± 4.1，11.0 ± 1.4および11.5 ± 3.9頭で有意差は見られなかった。これらのことからFSHの皮下投与による発情誘起が子豚生産に用いることが可能であり，FSHの投与量は５AUが適していることが示唆された。**Table 2** に各試験区の出生子豚の平均生時体重，平均離乳体重，平均出荷体重および平均出荷日齢を示した。Rayerらはホルモン投与後の交配により，分娩された子豚の生時体重，離乳時体重，８週齢体重が有意に大きくなると報告している[10]が，本研究の各試験区間で出生子豚についての生時体重やその後の発育に有意な差は見られなかった。

種豚場において，離乳後７日以内に発情が回帰

Table 1　Effect of amount of FSH on estrus expression of sows.

Group	N	No. of sows（%）			Litter size	No. of live piglet
		Estrus expression	Pregnant	Farrowed		
FSH2.5 / 25	5	3（60）	4（80）	4（80）	9.0 ± 4.1	8.8 ± 4.5
FSH5 / 50	4	4（100）	4（100）	4（100）	11.0 ± 1.4	11.0 ± 1.4
eCG1000	4	4（100）	3（75）	3（75）	11.5 ± 3.9	11.3 ± 3.3

Table 2　Effect of amount of FSH on growth of piglet.

Group	N	Birth B.W.（kg）	Weanimg B.W.（kg）	Fnishing B.W.（kg）	Finishing age（date）
FSH2.5 / 25	89	1.43 ± 0.3	5.6 ± 1.6	115.7 ± 5.6	162.5 ± 15.4
FSH5 / 50	79	1.5 ± 0.3	6.5 ± 1.0	110.4 ± 9.7	159.5 ± 10.7
eCG1000	92	1.7 ± 0.5	6.4 ± 1.7	113.5 ± 2.9	165.6 ± 6.4

© The Ito Foundation

Fig. 1　FSH administration to subcutaneous in the abdomen region of the sow.

Table 3　Effect of FSH/hCG on estrus expression of multiparous sows in hot season.

Group	N	No. of sows (%)		No. of corpus luteum*
		Estrus expression	Ovarian cyst	
FSH	4	1 (25)	1 (25)	8
FSH / hCG	4	4 (100)	1 (25)	13.3
eCG1000	3	2 (66)	1 (33)	10

*only data from sows expressed estrus

した母豚は試験区では３頭中２頭，対照区では10頭中８頭であった。平均発情回帰日数はそれぞれ試験区で11.0±12.0日，対照区で5.0±2.0日であり，有意差は見られなかったものの，種豚場においても本方法が実施可能であることが分かった。また，種豚場職員がFSHを溶解したNSを50 mlを下傭部に皮下投与する際（**Fig. 1**）に半量程度投与した段階で豚が動くことが多いことから，NSを半量にできれば作業性がより向上することが考えられた。

夏期における離乳時の２および３産後の経産豚にホルモン投与した場合の発情発現率，卵巣嚢腫の発現率および黄体数を**Table 3** に示した。FSH区では４頭中１頭のみで発情発現が認められた一方で，FSH/hCG区では４頭すべてで発情発現が認められた。過去の報告では母豚の離乳後の黄体形成ホルモン（LH）の分泌頻度と発情回帰日数は負の相関があった[11] とされている。また，夏期に多い授乳中の栄養摂取低下は母豚におけるLH分泌の強度を低下させる[12] と報告されている。これらのことから本実験ではLH作用をもつhCGを添加した試験区において卵胞発育がより促進されたことが考えられる。各試験区とも黄体数や嚢腫の発生数に大きな差は見られないことから，夏期の複数産次の経産豚においてhCGを添加したFSHの皮下投与は慣行法であるeCGの筋肉内投与と同等の発情誘起効果があることが示唆された。

夏期の離乳時において初産後の母豚にホルモン皮下投与した場合の発情発現率，受胎率および分娩率を**Table 4** に示した。複数産次の母豚とは異なり，FSH区では３頭すべてで発情発現が認められた一方で，FSH/hCG区では３頭中１頭のみで

© The Ito Foundation

Table 4　Effect of FSH/hCG on estrus expression of primiparous sows in hot season.

Group	N	No. of sows (%)		
		Estrus expression	Pregnant	Farrowed
Control	3	1 (33)	1 (33)	1 (33)
FSH	3	3 (100)	2 (66)	2 (66)
FSH / hCG	3	1 (33)	1 (33)	1 (33)
eCG1000	3	2 (66)	2 (66)	1 (33)

発情発現が認められた。初産後の母豚は２産後以上の母豚より発情回帰日数が長い[13, 14]と報告されているとともに，発情期間の長さや排卵時期が異なる[15]と報告されている。これらのことから初産後の母豚では離乳時における卵胞の発育段階が複数産次の経産豚と異なることが考えられ，hCGの添加効果が異なったのかもしれない。

本研究により，離乳豚に対してFSHの皮下投与を行い，発現した発情において人工授精を行うことで子豚の生産が可能であることが分かった。このことから肉豚生産において発情誘起の目的でeCGの筋肉内投与の代替としてFSHの皮下投与の利用が可能であることが示唆された。一方で，暑熱期では離乳時における母豚内の卵巣内卵胞の発育ステージが個体ごとに大きく異なることが考えられ，離乳前の卵胞発育を促進する方法の検討が今後必要と考えられる。

４．要　　約

本研究では，卵胞刺激ホルモン（FSH）を用いた夏季における繁殖母豚の発情回帰遅延対策技術の確立を目的とし，FSHの皮下投与が離乳豚の発情回帰，子豚生産に用いることができるかを検討した。まず，非暑熱期において離乳豚にFSHの皮下投与を行ったところ，慣行法である馬絨毛性性腺刺激ホルモン（eCG）の筋肉内投与と同等の発情誘起効果が示唆された。また，その後に人工授精を行い分娩させたところ，正常な子豚生産が可能であった。次に暑熱期において複数産次後の母豚にFSH単体もしくはヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）を添加して（FSH/hCG）皮下投与したところ，FSH皮下投与では４頭中１頭のみ発情が観察されたのに対して，FSH/hCGの皮下投与では４頭すべてで発情が確認された。一方，初産後の母豚で同様の処理を行ったところ，FSH区では３頭すべてで発情発現が認められたのに対して，FSH/hCG区では３頭中１頭のみで発情発現が認められた。以上のことから，離乳時におけるFSHの皮下投与は慣行法のeCGの筋肉内投与の代替として発情誘起に用いることができ，肉豚生産に利用できることが示唆された。一方で，夏期の母豚の発情回帰遅延の対策としてのFSHを用いた最適な方法については，今後より検討が必要であると考えられた。

文　　献

１）　河原崎達雄，片岡岳志：日豚会誌，**56**，106～118，2019.
２）　Bates, R. O., Day, B. N., Britt, J. H., Clark, L. K., Brauer, M. A.：*J. Anim. Sci.*, **69**, 894～898, 1991.
３）　Vargas, A. J., Bernardi, M. L., Wentz, I., Neto, G. B., Bortolozzo, F. P.：*Theriogenology*, **66**, 2017～2023, 2006.
４）　Brüssow, K. P., Schneider, F., Kanitz, W., Rátky, J., Kauffold, J., Wähner, M.：*Soc Reprod Fertil Suppl.*, **66**, 187～95, 2009.
５）　Jensen, M. A., Greve, T., Madej, A., Edqvist, L. E.：*Theriogenology*, **18**, 33～44, 1982.
６）　Moor, R. M., Kruip, T. A. M., Green, D.：*Theriogenology*, **21**, 103～116, 1984.
７）　da Costa, L. L., e Silva, C. J., Silva, R. J.：

© The Ito Foundation

Theriogenology, **56**, 65～77, 2017.
8） Hiraizumi, S., Nishinomiya, H., Oikawa, T., Sakagami, N., Sano, F., Nishino, O., Kurahara, T., Nishimoto, N., Ishiyama, O., Hasegawa, Y., Hashiyada, Y.：*Theriogenology*, **83**, 466～473, 2015.
9） Uchikura, K., Yamamoto, R., Tajima, S., Suzuki, M., Sagara, A., Kurita, T.：*J. Reprod. Dev.*, **66**, 189～192, 2020.
10） Rayer, D. J. J., Maheshwari, H., Muladno, Manalu, W.：*Anim. Prod.* **17**, 8～15, 2015.
11） Shaw, H. J., Foxcroft, G. R.：*J. Reprod. Fertil*, **75**, 17～28, 1985.
12） Baidoo, S. K., Aherne, F. X., Kirkwoods, R. N., Foxcroft, G. R.：*Can. J. Anim. Sci*, **72**, 911～917, 1992.
13） Clark, J. R., Komkov, A., Tribble, L. F.：*Theriogenology*, **26**, 1986.
14） Koketsu, Y., Dial, G. D.：*Theriogenology*, **47**, 1445～1461, 1997.
15） Soede, N. M., Kemp, B.：*J. Reprod. Fertil. Suppl*, **52**, 91～103, 1997.

© The Ito Foundation

ウシ初期黄体におけるPG抵抗性の解明 ―低酸素環境による抗アポトーシス機構―（Ⅱ）

The mechanisms of PG-resistance in bovine early corpus luteum －hypoxia-induced anti-apoptotic mechanism－（Ⅱ）

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. Several TGF-β binding proteins (TGFBPs), such as follistatin, gremlin, noggin and chordin, have been known to modulate the action of TGF-β superfamily proteins. To clarify possible physiological roles of TGFBPs in bovine corpus luteum (CL), we examined mRNA expressions of TGFBPs in bovine CL corrected at each stage of estrous cycle. We also investigated the effects of human chorionic gonadotropin (hCG) and hypoxia on these mRNA expressions in cultured bovine early luteal cells. Luteal cells obtained from early CL were incubated under different O_2 concentrations (20%, 3 % O_2) with or without hCG (1 U/ml) for 24 hr. TGFBP mRNAs were expressed during the estrous cycle. Follistatin mRNA expression were higher at early luteal stage. Gremlin mRNA expression was higher at early and regressed luteal stages, compared with the other luteal stages. Noggin mRNA expression was higher at regressed luteal stage. In early luteal cells, TGFBP mRNA expressions were not significantly affected by hCG nor hypoxia. The overall results suggest that TGFBPs have some physiological roles for luteal formation and regression, and that these expressions were regulated not significantly by luteinizing hormone nor by hypoxic conditions.

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ジェステロンを合成・分泌する一過性の内分泌器官である。ウシ卵巣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，ウシの初期黄体においてもHIF 1の機能することが明らかにされている[1)]。

Transforming growth factor(TGF)-βスーパーファミリーは，さまざまな細胞の増殖，分化に関

© The Ito Foundation

わっているサイトカインであり，TGF-β1，アクチビン，インヒビン，bone morphogenic proteins（BMPs）などを含む[2]。TGF-βスーパーファミリーの受容体には，Ⅰ型受容体（TGFBR1）とⅡ型受容体（TGFBR2）が存在し，これらがヘテロ四量体を形成することで，TGFBR2に結合したTGF-βスーパーファミリーのリガンドがTGFBR１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]。これらのシグナルはTGF-βスーパーファミリーのリガンドに結合するタンパク質（TGF-β binding protein；TGFBP）による調節を受けることが知られており，ウシの卵巣においてTGFBPであるfollistatin, gremlin, nogginおよびchordinの発現が報告されているが[4]，ウシの黄体におけるこれらの生理的な役割は明らかにされていない。

本研究では，TGFBPsのウシ黄体における生理的な役割を明らかにする目的で，１）ウシの黄体におけるTGFBPs（follistatin，gremlin，noggin，chordin）のmRNA発現量について発情周期を通じて調べるとともに，２）培養したウシの黄体期初期の黄体細胞（初期細胞）におけるTGFBPsのmRNA発現に及ぼす低酸素環境およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）の影響について検討した。

２．方　法

2.1　ウシ卵巣の採取

と畜場においてと畜直後のウシより発情周期各期（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）のウシ黄体を採取し，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　ウシ黄体における発情周期を通じたTGFBPsのmRNA発現

発情周期各期のウシ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TGFBPs（follistatin，gremlin，noggin，chordin）のmRNA発現量を調べた。

2.3　初期細胞のTGFBPs mRNA発現に及ぼす低酸素環境およびhCGの影響

黄体期初期の黄体を有するウシ卵巣（１回の実験につき２－４卵巣）から初期細胞を単離し，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％ O_2，５％ CO_2，75％ N_2）および低酸素環境（３％ O_2，５％ CO_2，92％ N_2）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における発情周期各期のウシ黄体組織と，2.3において24時間培養したウシ黄体細胞からRNeasy mini kit（Qiagen，74106）を用いてtotal RNAを抽出した。total RNA（１μg）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，$^{\Delta\Delta}$Ct法で算出した。実験に用いたウシ特異的プライマーを**Table 1** に示す。

３．結果と考察

ウシの黄体において，検討したすべてのTGFBPs mRNA発現が発情周期を通じて認められた。follistatinのmRNA発現は初期および後期

© The Ito Foundation

黄体において高い傾向が認められ，初期において形成期と比較して有意に高かった（**Fig. 1(A)**）。gremlinのmRNA発現は初期および退行期黄体において顕著に高く，他期と比較して有意に高かった（**Fig. 1(B)**）。nogginのmRNA発現は初期，形成期および退行期黄体において高い傾向が認められ，退行期において中期および後期と比較して有意に高かった（**Fig. 1(C)**）。chordinのmRNA発現において周期中の有意な発現の差は認められなかった（**Fig. 1(D)**）。培養した初期細胞において，低酸素環境あるいはhCGの影響はいずれのTGFBPs mRNA発現においても認められなかった（**Fig. 2**）。follistatinは多数のリガンド（activin，inhibin，BMP2，4，6，7，15）と結合して作用を抑制することが知られている[5]。このうち，activin Aがウシの黄体退行に関わることをこれまでに見出しており[6]，初期に高まるfollistatinの発現は黄体の形成される初期においてactivin Aなどの黄体退行因子の作用を抑制する機構の一つかもしれない。gremlinおよび

Table 1　Primers used in real-time PCR.

18SrRNA	forward:	5'- TCGCGGAAGGATTTAAAGTG -3'
	reverse:	5'- AAACGGCTACCACATCCAAG -3'
follistatin	forward:	5'- TGAGCAAGGAGGAGTGTTGCAGCA -4'
	reverse:	5'- CATCTGGCCTTGAGGAGTGCACATTC -4'
gremlin	forward:	5'- GAAGCGAGACTGGTGCAAAACCCA -3'
	reverse:	5'- TATGCAACGGCACTGCTTGACACG -3'
noggin	forward:	5'- CAAGAAGCAGCGCCTGAGCAAGA -4'
	reverse:	5'- GAAACAGCTGCCCACCTTCACGTAG -4'
chordin	forward:	5'-CCTACCCGAATCCGCTTCTCTGACTCC -3'
	reverse:	5'- GACAACCGAGGCACTGCCCGC -3'

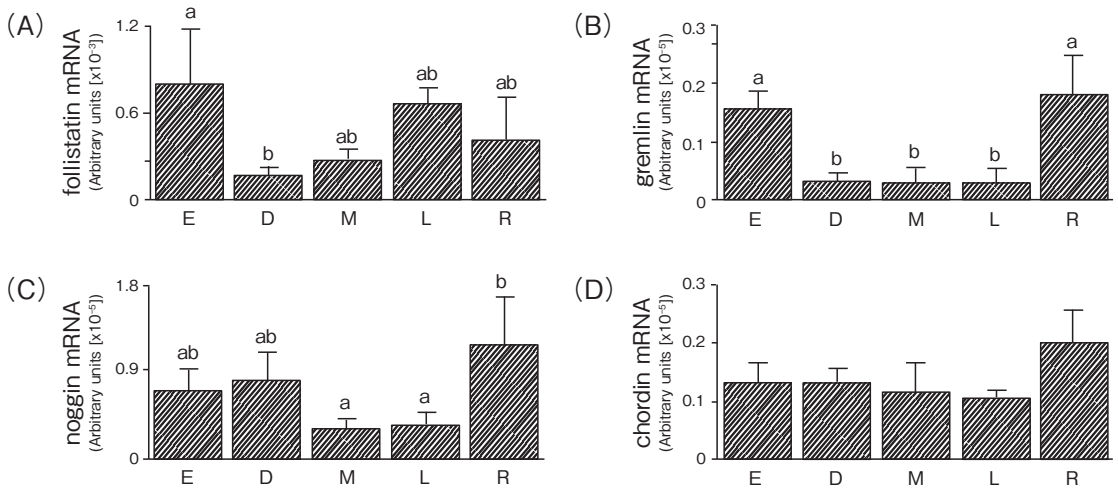


Fig. 1　Change in the relative amounts of TGFBPs ((A) follistatin, (B) gremlin, (C) noggin, (D) chordin) mRNA in the bovine CL throughout the estrous cycle (E：early, Days 2-3；D：developing, Days 5-6；M：mid, Days 8-12；L：late, Days 15-17；R：regressed luteal stages, Days 19-21). Data are the means ± SEM for 4 samples/stage and are expressed as relative ratios of follistatin, gremlin, noggin or chordin mRNA to *18SrRNA*. Different letters indicate significant differences ($p<0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Bonferroni correction.

© The Ito Foundation

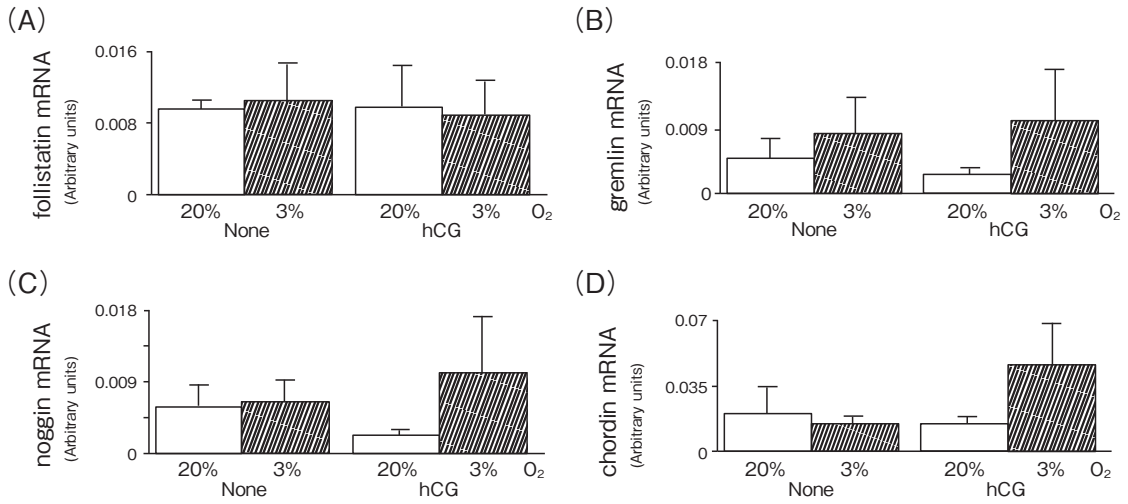


Fig. 2　Effects of hCG and hypoxia on TGFBPs ((A) follistatin, (B) gremlin, (C) noggin, (D) chordin) mRNA expression in bovine early luteal cells (means ± SEM; n = 3). The cells were cultured in the medium without or with hCG (1.0 U/ml) under 20% O_2 or 3% O_2 for 24 hr. The amount of follistatin, gremlin, noggin or chordin mRNA is expressed relative to the amounts of *18SrRNA*.

nogginはともにBMP2およびBMP4との親和性が高く，これらとⅠ型受容体との結合を抑制することで作用を抑える[7,8]。BMP4はBMP6とともにウシの黄体退行に関与する可能性が示唆されていることから[9]，初期あるいは形成期において高いgremlinおよびnogginの発現はBMP4の黄体退行作用を抑制することで黄体形成に寄与している可能性が考えられる。今回の検討で周期的発現が変動していなかったchordinもBMP4との親和性が高いことが知られていることから[10]，定常的に発現することでBMP4の黄体退行シグナルを抑制して黄体の維持に寄与している可能性が考えられる。初期細胞を用いた検討において，低酸素環境およびhCGのTGFBPs発現に及ぼす統計学的に有意な影響を認めなかった。この背景として，初期細胞の単離の難度から，検討例数が少なかったことが一つの要因と考えられ，今後も検討を追加する必要性がある。

本研究において，ウシの黄体の形成あるいは維持におけるTGFBPsの生理的役割が示唆された。現在，TGFBPsの生理的役割について引き続き低酸素環境およびCGシグナルとの関わりを精査しつつ，その生理機能，とくに初期黄体のアポトーシス抑制への関与について，高親和性リガンドであるactivinおよびBMP4の作用・発現とあわせて検討を進めることで，ウシ黄体の形成あるいは機能維持におけるTGFBPsの生理的意義について解明する。

4．要　　約

Transforming growth factor (TGF)-β スーパーファミリーの機能を調節するリガンド結合タンパク質（TGFBP）のウシ黄体における発現や機能は不明である。本研究では，ウシ黄体の機能調節におけるTGFBP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TGFBP (follistatin, gremlin, noggin, chordin) のmRNA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ウシ黄体初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TGFBP mRNA発現に及ぼす低酸素環境の影響についても検討した。その結

© The Ito Foundation

果，follistatinの発現は初期および後期黄体において高い傾向が認められ，gremlinの発現は初期および退行期黄体において顕著に高く，nogginのmRNA発現は初期，形成期および退行期黄体において高い傾向が認められた。培養ウシ初期黄体細胞において，低酸素環境あるいはhCGの影響はいずれのTGFBP mRNA発現においても認められなかった。TGFBPが高い親和性で結合するリガンドは黄体退行に関与することから，本研究において初期あるいは形成期の黄体において高い発現を認めたTGFBPsが黄体退行性のTGF-βスーパーファミリーリガンドの作用を抑制することで黄体の形成あるいは維持に関与する可能性が示唆された。

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） Glister, C., Satchell, L , Knight, P. G.：*Reproduction*, **142**, 581～591, 2011.

5） Shimonaka, M., Inouye, S., Shimasaki, S., Ling, N.：*Endocrinology*, **128**, 3313～3315, 1991.

6） Watanabe, Y., Nishimura, R., Hashiba, K., Yamamoto, Y., Kimura, K., Okuda, K.：*Biol Reprod*, **95**（Suppl.）, P67（Poster#233）, 2016.

7） Zimmerman, L. B., De Jesus-Escobar, J. M., Harland, R. M.：The Spemann organizer signal noggin binds and inactivates bone morphogenetic protein 4, *Cell*, **86**, 599～606, 1996.

8） Avsian-Kretchmer, O., Hsueh, A. J.：*Mol Endocrinol*, **18**, 1～12, 2004.

9） Haas, C. S., Rovani, M. T., Ilha, G. F., Bertolin, K., Ferst, J. G., Bridi, A., Bordignon, V., Duggavathi, R., Antoniazzi, A. Q., Goncalves, P. B. D., Gasperin, B. G.：*Anim Reprod*, **18**, 829～837, 2019.

10） Piccolo, S., Sasai, Y., Lu, B., De Robertis, E. M.：*Cell*, **86**, 589～598, 1996.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Study on bovine endometrial function regulator and regulatory mechanism during estrus（Ⅱ）

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. Expression of endometrial epidermal growth factor（EGF）on days 3 and 14 after estrus is one of the indicators of normal functioning on the bovine endometrium. The objective of study was to clarify the physiological function of bovine uterus, which is the place of conception. The relationship between the increase in endometrial thickness induced by the expression of vascular endothelial growth factor（VEGF）in the endometrial tissue and the expression of endometrial EGF on the third day after estrus, and the effect of sex steroid hormones during the estrus phase were investigated. The results suggest that the increase in endometrial thickness during estrus is affected by E_2 concentration during estrus and correlates with endometrial EGF expression on the third day after estrus, which affects the fertility. Further data accumulation and analysis are needed to clarify the relationship between E_2 concentration and subsequent endometrial EGF expression. The physiological changes that occur in bovine endometrium from the estrous period to the third day after estrus are a series of reactions that have a positive relationship with each other. It may be an important physiological response leading to the expression of endometrial EGF, which is essential for conception.

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。現在，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（母牛）の発情時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として，子宮内膜機能の異常が指摘されている。牛子宮内膜は黄体期から発情期にかけてその厚さが増加して一時的に厚くなり，発情終了後に元の厚さに戻るという周期を繰り返しているが，発情期の子宮内膜がより厚くなるほうが高い受胎性を示すことが示唆されている[1)]。そのため，本研究（Ⅰ）において，発情期の牛子宮内膜厚の増加調

© The Ito Foundation

節（血管透過性亢進）に関与する因子として血管透過性亢進因子である血管内皮細胞増殖因子（VEGF）に着目し，発情期における牛子宮内膜厚と子宮内膜組織中のVEGF発現との関係，ならびにその調節機序を明らかにした。

一方で，正常な子宮機能の牛では発情後３日目および14日目に子宮内膜上皮成長因子（EGF）の二峰性ピークが認められたが，長期不受胎牛のうち70％では認められなかったという子宮内膜機能異常が報告されていることから[2]，子宮内膜が正常に機能する指標として子宮内膜EGF発現の重要性が示唆されている。そこで，本研究（Ⅱ）では次なるステップとして，子宮内膜組織中VEGF発現により誘引された子宮内膜厚の増加と発情後３日目における子宮内膜EGF発現との関係性，さらに発情期間中の性ステロイドホルモン濃度の影響について検討した。

2．方　法

本研究には，生殖器に異常のない分娩後30～86日のホルスタイン種経産牛（年間乳量9,500 kg以上の高産乳牛）18頭を供試し，腟内留置型プロジェステロン徐放剤（CIDR）とプロスタグランジン（PG）$F_{2\alpha}$製剤を組み合わせたプロトコールにて１回目の発情を誘起した（**Fig. 1**）。その後，自然発情を追って２回目の排卵を確認した10頭10例を自然発情群とし，１回目の誘起発情18例と，その後同じプロトコールにて発情を誘起し排卵を認めた７頭７例の計25例を誘起発情群とした。誘起発情群での超音波検査は，PG製剤投与の少なくとも６時間前より，排卵後24時間目までは６時間ごとに実施し，排卵後２および３～７日目まで48時間ごとに実施した。自然発情群では，１回目の排卵後３～15日目までは48時間ごとに，その後遅くとも排卵後18日目から２回目の排卵後24時間目まで６時間ごとに実施した。超音波検査スケジュールに合わせて採血も実施した。

2.1　超音波検査による子宮内膜厚の測定方法

我々のこれまでの研究報告と同様に[3]，経直腸超音波診断装置を用いて牛の左右子宮角の角間間膜付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

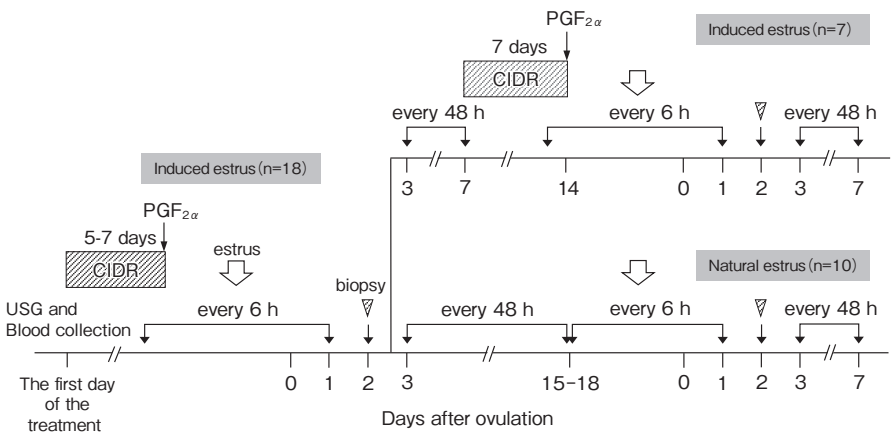


Fig. 1　Schedules of treatments and examinations of animals.
Eighteen cows were treated with a combination of a controlled internal drug release (CIDR) device and prostaglandin (PG) $F_{2\alpha}$ (25 mg, dinoprost tromethamine) to induce estrus. Ten cows were allowed to show natural estrus (lower line), while estrus was induced for the second time in 7 cows (upper line). One cow was excluded because of no ovulation (upper line). The presence of the corpus luteum and dominant follicle was confirmed on the day of the first CIDR treatment by ultrasonography (USG). Day 0 = Day of ovulation.

© The Ito Foundation

ら楕円形を呈すことが多いため，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 13，排卵日＝Day 0）の子宮内膜厚に対する変化の割合に換算し，発情期の子宮内膜厚変化率を比較した。なお，発情期の子宮内膜厚は，発情徴候が観察された検査回を含む前後12時間ずつ（４回分）の子宮内膜厚測定値の平均値とした。

2.2　子宮内膜組織の採取およびEGF濃度測定

子宮内膜組織の採取は，自然発情群および誘起発情群ともに，Day 2（発情日後３日目に相当）に実施した。まず，２％リドカインにより尾椎硬膜外麻酔処置を行い，滅菌したバイオプシーガンを用いて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，合計６箇所採取した。採取した子宮内膜組織中のうち，少なくとも50 mg以上の組織を採取後すぐに－80℃で保管した。子宮内膜EGF濃度はKatagiriらの方法に従い[2]，96ウェルマイクロプレートを用いた酵素免疫測定法により測定した。

2.3　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（P_4）およびエストラジオール（E_2）濃度を酵素免疫測定法により測定した。発情期のP_4およびE_2濃度は，発情期の子宮内膜厚と同様に発情徴候が観察された検査回を含む前後12時間ずつ（４回分）のホルモン値の平均値を利用した。

3．結果と考察

3.1　子宮内膜厚変化と子宮内膜EGF濃度との相関性

Day 13を基準とし，自然発情群の発情期には子宮内膜厚が約1.3倍に，誘起発情群では子宮内膜厚が約1.5倍に増加し，誘起発情群の発情期における子宮内膜は自然発情群の子宮内膜よりも有意に厚かった（$^*p < 0.05$，**Fig. 2**）。この結果を受け，自然発情と$PGF_{2\alpha}$製剤を用いた誘起発情では，発情後３日目において子宮内膜に発現するEGF濃度が異なる可能性を考慮し，自然発情および誘起発情に分けて，発情期の子宮内膜厚と発情後３日目の子宮内膜EGF濃度を比較した（**Fig. 3**）。分娩後の高産乳牛の子宮内膜EGF濃度の回復時期は，分娩後４～７週目に始まる発情周期に集中するとされ，受胎成績低下に影響する組織中のEGF濃度の基準は5.0 ng/g組織重量ということが示唆されている[4]。そのため，本研究において測定した子宮内膜EGF濃度結果が5.0 ng/g組織重量未満だった検体については，分娩後の子宮内膜EGF濃度の周期的変化が未回復段階と判断し，自然発情群では３例，誘起発情群では９例を解析

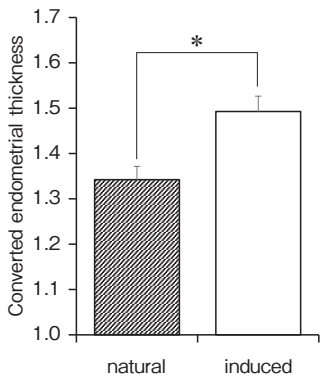


Fig. 2　Comparison of endometrial thickness during natural and induced estrus.
Endometrial thickness was converted to a ratio based on the reference day（Day 13）. Data were shown as the mean ± SEM. $^*p < 0.05$.

© The Ito Foundation

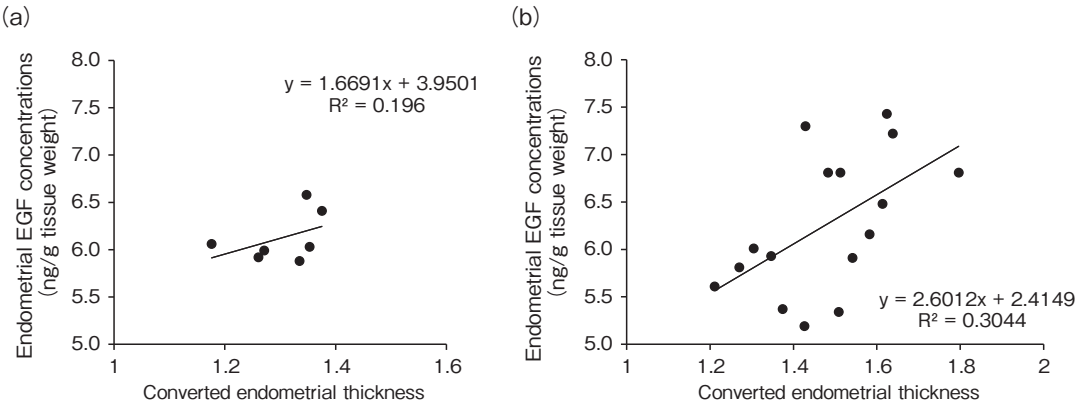


Fig. 3　Correlation between endometrial thickness and endometrial tissue EGF concentrations in natural estrus (a) and induced estrus (b).
Endometrial thickness were converted to a ratio based on the Day 13 in panel (a) and (b). Positive correlation between converted endometrial thickness and EGF concentrations was suggested in the induced estrus.

データから除外した。その結果，誘起発情群において，発情期の子宮内膜厚変化率と発情後３日目の子宮内膜EGF濃度には，正の相関のある傾向が認められた（**Fig. 3b**）。なお，誘起発情群で除外例が９例と多かったが，分娩後50日未満での１回目の誘起発情の占める割合が高く，子宮内膜EGF周期が未回復であったと考えられる。

3.2　発情期の性ステロイドホルモン濃度との関係

発情期における子宮内膜厚の変化と性ステロイドホルモンとの関係について解析した。子宮内膜厚とP_4との相関性は自然発情群および誘起発情群ともに認められなかった。一方で，誘起発情群における子宮内膜厚の変化と発情期E_2濃度には正の相関が認められた（**Fig. 4a, b**）。次に，発情期の性ステロイドホルモン平均濃度と発情後３日目の子宮内膜EGF濃度の関係について解析した。子宮内膜厚の変化と同様，発情期のP_4濃度と発情後３日目の子宮内膜EGF濃度との相関性は，自然発情群および誘起発情群ともに認められなかった。しかしながら，自然発情群における発情期E_2濃度と発情後３日目の子宮内膜EGF濃度には正の相関が認められた（**Fig. 4c, d**）。誘起発情群では，発情期E_2濃度によらず，発情後３日目の子宮内膜EGF濃度は一定の値を示した。なお，自然発情群と誘起発情群において，発情期E_2濃度に差は認められなかった（7.1 ± 0.8 vs 8.2 ± 0.4 pg/ml，標準誤差，$p = 0.2$）。

以上の結果より，発情期の子宮内膜厚の増加強度は，その後の子宮内膜EGF発現に影響する可能性が示唆された。本研究（Ⅰ）において，発情期の子宮内膜組織中のVEGF発現により子宮内膜の血管透過性が亢進し，子宮内膜厚の増加につながることを明らかにしたが，本研究（Ⅱ）により，子宮内膜厚の増加は，受胎性に影響する発情後３日目の子宮内膜EGF発現と相関することが示唆され，発情期から発情後３日目までの子宮内膜で起こる生理的変化は，相互に正の関係を持っている一連の反応であることが推測された。また，発情期E_2濃度は子宮内膜厚の増加に影響することが明らかとなり，発情後３日目の子宮内膜EGF発現に間接的に関与することが示唆された。ただし，本研究で得られた自然発情群のｎ数の規模が小さかったことから，発情期E_2濃度とその後の子宮内膜EGF発現との関係を明確にするには，さらなるデータの蓄積と解析が必要である。

© The Ito Foundation

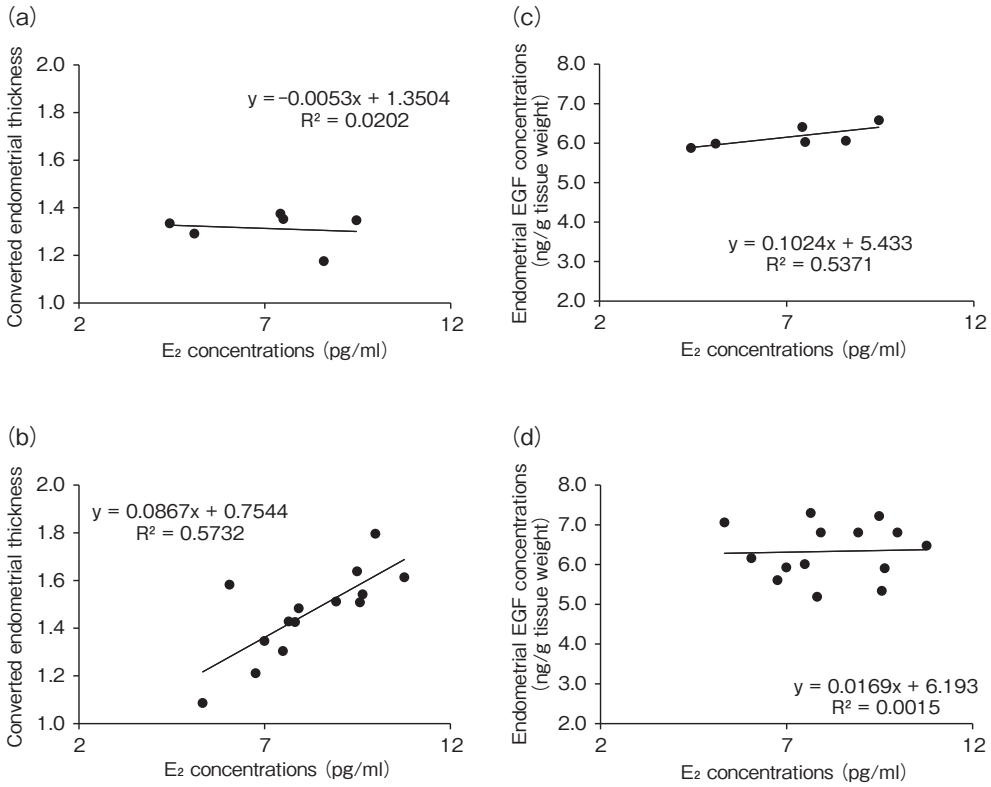


Fig. 4　Correlation between endometrial thickness or endometrial tissue epidermal growth factor (EGF) concentrations and estradiol (E_2) concentrations in natural estrus (a, c) and induced estrus (b, d).
Endometrial thickness were converted to a ratio based on the Day 13 in panel (a) and (b). Positive correlation between converted endometrial thickness and E_2 concentrations, and EGF and E_2 concentrations were suggested.

また，発情期E_2濃度とVEGFとの相互作用の解明も課題である。子宮内膜厚増加という生理的反応は，人医療において「妊娠への準備」とされるが，具体的な意義は明らかにされていない[5]。本研究を通して，牛の発情期における子宮内膜厚増加は，その後の子宮内膜EGFという受胎には不可欠な因子の発現を誘引する重要な生理反応である可能性が示された。

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。牛子宮内膜が正常に機能する指標として，発情後３日目および14日目の子宮内膜上皮成長因子（EGF）の二峰性発現があげられる。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，子宮内膜組織中の血管内皮細胞増殖因子（VEGF）発現により誘引された子宮内膜厚の増加と発情後３日目における子宮内膜EGF発現との関係性，さらに発情期間中の性ステロイドホルモン濃度の影響について検討した。その結果，発情期の子宮内膜厚の増加は，発情期E_2濃度の影響を受け，受胎性に影響する発情後３日目の子宮内膜EGF発現と相関することが示唆された。発情期から発情後３日目までに牛子宮内膜で起こる生理的変化は，相互に正の関係を持っている一連の反応であり，発情期E_2とVEGF発現による子宮内膜厚の増加は受胎に不可欠な子宮内膜EGF発現につながる重要な生理反応の可能性がある。

© The Ito Foundation

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，p264，つくば，2019.
2） Katagiri, S., Takahashi, Y.：*Theriogenology*, **62**, 103～112, 2004.
3） Sugiura, T., Akiyoshi, S., Inoue, F., Yanagawa, Y., Moriyoshi, M., Tajima, M., Katagiri, S.：*J. Reprod. Dev*, **64**, 135～143, 2018.
4） Katagiri, S.：*J. Reprod. Dev*, **52**(suppl), 133～137, 2006.
5） Rockwell, L. C., Pillai, S., Olson, C. E., Koos, R. D.：*Biol Reprod*, **67**, 1804～1810, 2002.

© The Ito Foundation

ウシにおける排卵後の血中エストラジオール増加の検知による受胎性評価

Evaluation of fertility by detecting increase in blood estradiol after ovulation in cattle

松　井　基　純
（帯広畜産大学獣医学研究部門）

Motozumi Matsui
（Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine）

Estrogen secreted from follicles that develop after ovulation in cattle is associated with the function of the corpus luteum formed, and higher plasma estrogen（E2）levels early after ovulation is known to be low fertility. Since the amount of activity and cervical mucus electrical resistance（CER）change during estrus period when the E2 concentration rises, the relationship between endocrine, activity, CER up to one week after ovulation and conception after artificial insemination（AI）or embryo transfer（ET）were examined. Using Holstein multiparous lactating cows, plasma progesterone（P4）and E2 concentrations, activity and CER were measured each day from 4 to 7 days after ovulation. P4 levels increased with the passage of days, but E2 levels did not change up to 7 days after ovulation. The amount of activity did not change throughout the period and was not associated with P4 and E2 levels. The CER showed a significant positive correlation with the E2 levels and the E2/P4 ratio on the 6 day after ovulation. In Holstein multiparous cows, between pregnant and non-pregnant cows after AI, no differences in activity amount, CER, plasma P4 and E2 levels from 4 to 7 days after ovulation were observed. On the other hand, it was clarified that decrease in the E2/P4 ratio was faster in pregnant cows than in non-pregnant cows. In cross－bred beef cattle, between pregnant and non-pregnant cows after ET, no differences in vaginal mucus electrical resistance, plasma P4 and E2 levels at the day of transfer（7 days after ovulation）were observed. Present study showed that it is difficult to predict the fertility of cattle using an activity meter and a measuring device for mucus electrical resistance in the cervix or vagina up to one week after ovulation.

1．目　　的

ウシの妊娠の成立にとって，排卵後に形成される黄体から分泌されるプロジェステロン（Ｐ４）は不可欠である。黄体の機能が弱く，血中Ｐ４濃度が低い場合には，受胎成績は低下する[1)]。ウシでは，排卵後の黄体形成とともに，新たな卵胞が発育する。その卵胞の機能は，Ｐ４により抑制されるが，黄体の機能が不十分な場合，卵胞からのエストロジェン（エストラジオール：Ｅ２）の分泌が高まり，排卵後５－７日頃に少量ながら血中Ｅ２濃度が増加する[2)]。つまり，Ｅ２増加は不十

© The Ito Foundation

分な黄体機能を示し，その個体の受胎性が低いことを示唆している。よって，発情後１週間頃の血中Ｅ２濃度から，受胎性の推察が可能であると考えられるが，臨床現場で速やかにホルモン濃度を測定することは難しい。

発情時の血中Ｅ２濃度上昇に応じて，活動量の増加[3]や子宮頸管粘液の電気抵抗の低下[4]が知られており，その変化を利用した発情発見デバイスが開発されている。これらのデバイスを用いて，発情後１週間頃の血中Ｅ２濃度の増加を検知できれば，その個体の受胎性を推察できると考えられる。

本研究では，排卵後１週間頃までの内分泌（血中Ｐ４およびＥ２濃度），活動量，子宮頸管粘液の電気抵抗および人工授精あるいは受精卵移植後の受胎成績との関係を明らかにし，簡易なデバイスによるウシ受胎性の推察を試みた。

２．方　法

2.1　試験①　排卵後１週間までの内分泌状況と活動量，子宮頸管粘液電気抵抗との関係

ホルスタイン種経産泌乳牛24頭を用いた。自然発情あるいは定時人工授精プログラムに基づいて，直腸検査により発情および排卵を診断した。

排卵確認日をday 1として，day 4からday 7まで，内分泌状況と活動量，子宮頸管粘液電気抵抗を調べた。

尾静脈より採血を行い，遠心処理により血漿を分離した。ジエチルエーテルを用い，血漿からＰ４あるいはＥ２を抽出し，それぞれEIA法あるいはELISA法により，血中Ｐ４あるいはＥ２濃度を測定した。

活動量は，発情・疾病兆候検知センサー（Farmnote Color，株式会社ファームノート）を用いて記録されたデータを基に作成されたグラフを画像解析ソフトに取り込み，活動量の領域を選択し，総ピクセル数を求め，day 4からday 7まで，１日ごとの活動量とした（**Fig. 1**）。

子宮頸管粘液電気抵抗の評価には，ラット用腟インピーダンス・チェッカーMK 12（室町機械株式会社）を用いた。受精卵移植機を支軸として，先端にプローブを固定した（**Fig. 2**）。プローブにシース管カバーをかぶせた状態で腟内に挿入し，外子宮口に挿入する直前にシース管カバーを破り，子宮頸管内へ挿入し電気抵抗値を測定した。

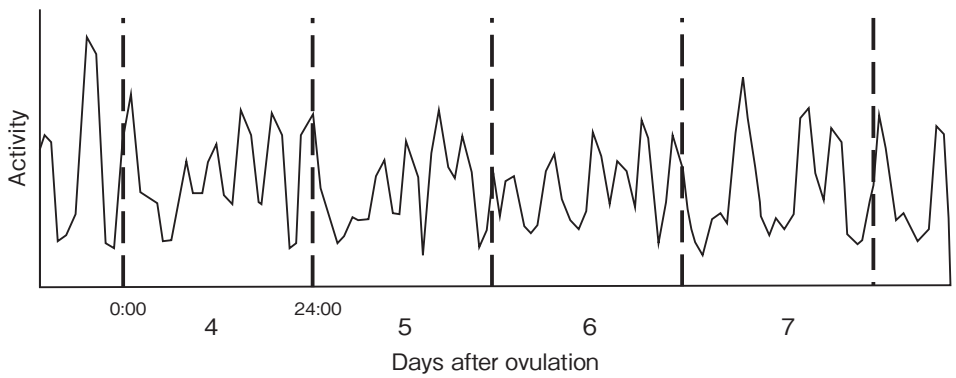


Fig. 1　Representative data of changes in activity from day 4 to day 7
The graph created based on the activity data was imported into the image analysis software. The number of pixels of selected area of activity for each date was calculated as activity value.

© The Ito Foundation

Fig. 2　A device that measures the electrical resistance of the cervix and vagina

2.2　試験②　排卵後１週間頃の活動量，子宮頸管粘液電気抵抗と人工授精あるいは受精卵移植後の受胎成績との関係

人工授精後の受胎成績との関係については，試験①の供試牛のうち22頭に対し，自然発情あるいは定時人工授精プログラムに基づいて人工授精を実施した。内分泌状況と活動量，子宮頸管粘液電気抵抗値は，試験①のデータを用い，受胎牛と不受胎牛を比較した。

受精卵移植後の受胎成績との関係については，北海道士幌町の和牛繁殖農場に繋養されるホルスタイン種と黒毛和種の交雑種43頭を用いた。ホルモン処置による発情同期化を行った供試牛に対し，発情日を０日として７日目に受精卵を移植した。インピーダンス・チェッカーを用いた電気抵抗値測定は，移植時の子宮頸管の汚染を避けるために，移植日にプローブを外陰部から25cmの位置に挿入し，試験①と同様の方法で，腟部の電気抵抗値を測定した。内分泌状況を調べるために，移植日に採血を行い，試験①と同様に血中Ｐ４およびＥ２濃度を測定した。

人工授精後35日目あるいは受精卵移植後28日目に，超音波画像診断装置を用い，妊娠診断を行った。

2.3　統計解析

内分泌状況と活動量，子宮頸管粘液電気抵抗値との関係について，ノンパラメトリック分析のSpearmanの順位相関を行った。受胎牛と不受胎牛の群間の活動量，子宮頸管粘液電気抵抗値の比較についてScheffeの多重比較検定を行った。これらの検定において危険率５％未満（$p < 0.05$）の場合に有意差があると判定した。

３．結果と考察

3.1　試験①

【結果】

血中Ｐ４濃度は，day 4は1.4±0.6 ng/ml（平均±標準偏差），day 5は1.9±0.6 ng/ml，day 6は3.0±0.4 ng/mlおよびday 7は3.8±0.4 ng/mlであり，排卵後日数の増加に伴い上昇した。一方，血中Ｅ２濃度は，day 4は2.5±0.2 pg/ml，day 5は2.9±0.3 pg/ml，day 6は2.6±0.2 pg/mlおよびday 7は2.3±0.4 pg/mlであり，変動はみられなかった。

各個体のday 4の活動量に対するday 5，6および７の活動量の割合を算出し比較した。day 4の活動量に対し，day 5は97.3％，day 6は95.0％，day 7は93.6％であり，活動量に有意な変化はみられなかった。活動量と血中Ｐ４あるいはＥ２濃

© The Ito Foundation

Table 1　Spearman's rank correlation coefficient（rs）and p values between impedance at cervix and plasma hormone concentrations.

Variable	Impedance at cervix（kΩ）							
	Days after ovulation							
	4		5		6		7	
	r	*p*	*r*	*p*	*r*	*p*	*r*	*p*
P4（ng/ml）	0.12	0.76	0.10	0.87	0.13	0.69	0.18	0.56
E2（pg/ml）	0.09	0.32	0.38	0.19	0.54	0.05	0.20	0.51
E2/P4 ratio	0.13	0.68	0.12	0.76	0.58	0.03	0.33	0.28

度との間に有意な相関関係は認められなかった。

子宮頸管内の電気抵抗値と血中Ｐ４濃度，血中Ｅ２濃度およびＥ２濃度とＰ４濃度の比（以下，Ｅ２/Ｐ４比）との相関について，**Table 1** に示した。排卵後６日目において，電気抵抗値は，血中Ｅ２濃度およびＥ２/Ｐ４比と有意な正の相関を示した。

【考察】

血中Ｐ４濃度は排卵後日数の経過に伴い上昇したが，血中Ｅ２濃度は，４日目（day 4）から７日目（day 7）までの期間では変動はみられず，供試牛では，卵胞からのＥ２分泌が高まっていなかったと考えられた。これまで，黄体の機能が不十分な場合，排卵後５−７日頃に血中Ｅ２濃度が増加することが知られている[2]が，本試験では，黄体機能が十分であったと考えられる。血中Ｅ２濃度が上昇しなかったため，活動量が変動しなかったと考えられる。また，血中Ｐ４濃度が上昇し，発情時のような基底値ではなかったため，活動量が増加しなかった可能性も考えられる。一方，排卵後６日目に，子宮頸管粘液電気抵抗値と血中Ｅ２濃度およびＥ２/Ｐ４比との間に相関がみられたことから，血中Ｅ２濃度が子宮頸管粘液電気抵抗に影響している可能性が示された。これまで，血中Ｅ２濃度が上昇する発情時には，子宮頸管粘液電気抵抗は低下することが知られている[4]が，本試験では，血中Ｅ２濃度の変動はみられず，さらに，Ｅ２/Ｐ４比と正の相関がみられたことから，子宮頸管粘液のなんらかの成分が血中Ｅ２およびＰ４濃度のバランスにより変動している可能性がある。今後，詳細な検証が必要と考えられる。

3.2　試験②

【結果】

人工授精後の受胎性成績は，受胎牛11頭，不受胎牛11頭であった。血中Ｐ４およびＥ２濃度において，受胎牛と不受胎牛との間で差異はなく，Ｐ４濃度は排卵後日数の増加に伴い上昇し，Ｅ２濃度の変動はみられなかった。一方，Ｅ２/Ｐ４比について，受胎牛ではday 4からday 5にかけて有意な低下がみられるのに対し，不受胎牛ではday 5からday 6に低下がみられ，Ｅ２/Ｐ４比の低下する時期が異なることが示された（**Fig. 3a**および**Fig. 3b**）。活動量および子宮頸管内の電気抵抗値の変動は，受胎牛と不受胎牛との間で差異はなかった。

受精卵移植後の受胎性成績は，受胎牛34頭，不受胎牛９頭であった。血中Ｐ４およびＥ２濃度において，受胎牛と不受胎牛との間で差異はなかった（**Fig. 4a**および**Fig. 4b**）。移植日（day 7）の膣部の電気抵抗値において，受胎牛と不受胎牛との間で差異はなかった（**Fig. 4c**）。

【考察】

人工授精において，受胎牛と不受胎牛との間

© The Ito Foundation

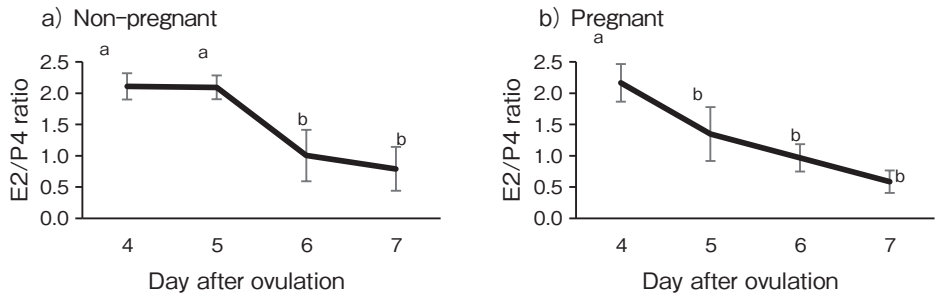


Fig. 3　Changes in ratio of plasma E2 to P4 from day 4 to day 7

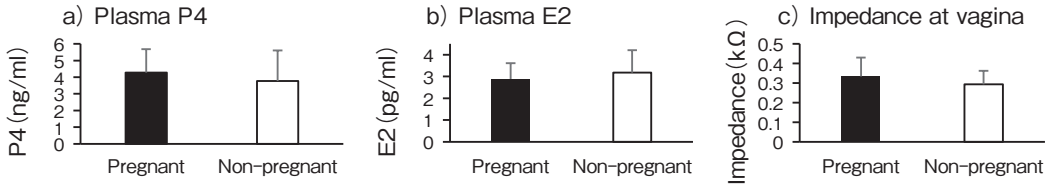


Fig. 4　Comparison of plasma P4, E2 and impedance at vagina on day 7 between pregnant and non-pregnant cattle

で，活動量および子宮頸管粘液電気抵抗の変動に差異は認められなかった。これは，受胎の有無による，血中Ｐ４およびＥ２濃度の変動に差異がなかったためと考えられる。試験②では，Ｅ２/Ｐ４比は，排卵後日数の経過に伴い低下し，受胎牛では，Ｅ２/Ｐ４比の低下するタイミングが，不受胎に比べ早いことが示された。排卵後６あるいは７日目にＥ２/Ｐ４比が高い受胚牛は受胎率が低いことが報告され，Ｐ４濃度が低く，Ｅ２濃度が高い子宮内環境が胚死滅を引き起こす可能性が示唆されている[5]。本試験の結果とあわせて，血中Ｅ２およびＰ４濃度のバランスおよびその経時的変化が受胎性に関与することが明らかとなった。一方，試験①では，子宮頸管粘液電気抵抗がＥ２/Ｐ４比と相関を示していたが，試験②で，受胎の有無による差異がみられなかった理由は明らかでない。今後，電気抵抗値測定の感度を上げるなど，詳細な検査が必要と考えられる。

受精卵移植において，受胎牛と不受胎牛との間で，血中Ｐ４およびＥ２濃度に差異はなく，Ｅ２/Ｐ４比も差異はみられなかった。また，腟部粘液電気抵抗においても差異はなかった。試験①では，Ｅ２/Ｐ４比における排卵後の経時的な変動が受胎性に関与する可能性が示されており，試験②では，移植日（排卵後７日目）のみでの検査であったため，差異がみられなかった可能性がある。本試験では，事前の検査において，黄体の小さい個体や子宮に収縮感が認められた個体は，移植対象から除外されていた。このような個体では，血中Ｐ４およびＥ２濃度あるいは腟部粘液電気抵抗において，なんらかの違いがみられた可能性がある。今後，移植に不適と判定された個体を用いた試験が必要と考えられた。

本試験の結果から，排卵後１週間頃までの活動量計および子宮頸管部あるいは腟部の粘液電気抵抗測定器を用いた，ウシの受胎性の推察は難しいことが示された。一方，排卵後７日までのＥ２/Ｐ４比の変動が受胎性に関与する可能性が示されたことから，その変動を感知できる指標やその測定法を開発することで，早期の受胎性推定が可能

© The Ito Foundation

となると考えられた。

４．要　約

ウシの排卵後に発育する卵胞からのエストロジェン分泌は，形成される黄体の機能と関連しており，排卵後早期に血中エストロジェン（Ｅ２）濃度の高い場合に受胎性が低いことが知られている。本研究では，血中Ｅ２濃度が上昇する発情時に変動する活動量および子宮頸管粘液電気抵抗に着目し，排卵後１週間頃までの内分泌，活動量，子宮頸管粘液電気抵抗および人工授精あるいは受精卵移植後の受胎成績との関係を明らかにし，ウシ受胎性の推察法の開発を試みた。

ホルスタイン種経産泌乳牛を用い，排卵後４から７日目までの各日の血中プロジェステロン（Ｐ４）およびＥ２濃度，活動量および子宮頸管粘液電気抵抗を測定した。血中Ｐ４濃度は日数の経過に伴い上昇したが，血中Ｅ２濃度は，４から７日目までの期間では変動はみられなかった。活動量は期間を通じて変動がなく，血中Ｐ４およびＥ２濃度との関連もみられなかった。電気抵抗値は，排卵後６日目において，血中Ｅ２濃度およびＥ２/Ｐ４比と有意な正の相関を示した。

人工授精後のホルスタイン種経産泌乳牛において，血中Ｐ４およびＥ２濃度，活動量および子宮頸管粘液電気抵抗を調べた結果，活動量および電気抵抗値の変動は，受胎牛と不受胎牛との間で差異はなかった。排卵後４から７日目までの血中Ｐ４およびＥ２濃度の変動においても，受胎に有無による差はなかった。一方，Ｅ２/Ｐ４比が，受胎牛では，不受胎に比べ早く低下することが明らかなった。

排卵後７日目の交雑種牛への受精卵移植時に，血中Ｐ４およびＥ２濃度，腟部粘液電気抵抗を調べた結果，受胎牛と不受胎牛との間で差異はみられなかった。

以上のことから，発情・排卵後１週間頃までの活動量計および子宮頸管部あるいは腟部の粘液電気抵抗測定器を用いた，ウシの受胎性の推察は難しいことが示された。

文　献

１）　Mcneill, R. E., Diskin, M. G., Sreenan, J. M., Morris, D. G.：*Theriogenology*, **65**, 1435～1441, 2006.
２）　Kaneko, H., Kishi, H., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, Y.：*J. Reprod. Dev.*, **41**, 311～320, 1995.
３）　Gaillard, C., Barbu, H., Sorensen, M. T., Sehested, J., Callesen, H., Vestergaard, M.：*J. Dairy Sci.*, **99**, 3134～3143, 2016.
４）　Kitwood, S. E., Phillips, C. J. C., Weise, M.：*Theriogenology*, **40**, 559～569, 1993.
５）　Nishigai, M., Kamomae, H., Tanaka, T., Kaneda, Y.：*J. Reprod. Dev.*, **46**, 235～243, 2000.

© The Ito Foundation

黒毛和種雌牛の繁殖成績を改善するための栄養状態の最適化検討

Optimizing nutritional status to improve the reproductive performance of Japanese Black cows

鍋　西　　久
（北里大学獣医学部）

Hisashi Nabenishi
（Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University）

Using 115 Japanese Black cows kept on a commercial farm in Aomori Prefecture, we conducted monthly nutritional assessment and blood sampling for biochemical and steroid hormone analysis for 5 months before and after calving (from 1 month before to 3 months after calving) to examine the relationship between nutritional status and reproductive performance. Regarding the calving to first AI interval, cows with a BCS of 4 postpartum were significantly prolonged. These cows had lower blood progesterone levels in the month of calving and a higher percentage of anovulatory, suggesting delayed recovery of ovarian function. In addition, days open (cows with empty uterus or without pregnancy) was also significantly prolonged in the cows with lower post-partum nutritional status. Comparison of pre- and post-parturition nutritional status between the first AI (+) and first AI (−) groups showed that nutritional status significantly decreased from 1 months before calving to the month of calving in the first AI (−) group, whereas there was no significant decrease in the first AI (+) group, indicating a significant difference in nutritional status in the month of calving. No significant differences in general biochemical parameters depending on first AI performance, but NEFA concentrations in the first AI (−) group remained high in the 1 month before calving and in the 1-2 months after calving, suggesting that body fat mobilization was caused by energy deficiency. Therefore, the importance of feeding management to control the significant decline in nutritional status after calving is clear for improving reproductive performance of Japanese Black cows.

1．目　　的

肉用牛の飼養農家戸数と飼養頭数は近年減少傾向で推移しており，慢性的な素牛不足と子牛価格高騰の要因として大きな問題となっている。したがって，繁殖基盤の強化が喫緊の課題であり，増頭事業などの対策が講じられているところである。農林水産省が公表している「畜産統計」[1)]によると，肉用牛の飼養戸数は前年比4.1％減であったが子取り用雌牛の飼養頭数は減少傾向に歯止めがかかり，前年比2.5％の増加となった。そのため，今後は子牛の生産効率を高めることが求められる。一方で，一戸当たりの飼養頭数は増加傾向で推移しており，大規模化が進展していることから

© The Ito Foundation

１頭当たりに要する労働時間は短くなるため，個体管理の重要性が高まっている。

肉用牛繁殖経営において，子牛を確実に生ませることは収益に直結する重要なポイントである。すなわち，繁殖雌牛の繁殖管理技術を向上させ，発情発見率や受胎率を高めることにより分娩間隔を短縮することが求められる。しかしながら，わが国における肉用牛の分娩間隔は13.2ヵ月となっており，経営目標である“１年１産”にはほど遠い状況のため，繁殖成績の改善が最重要課題となっている。

肉用牛における繁殖成績低下の要因のひとつとして，飼養管理技術の過誤による栄養充足率の過不足が考えられる。肉用牛の飼料給与量の目安としては，成長過程や生産性などに応じた適正な養分要求量が日本飼養標準で示されており，妊娠期の養分要求量については，胎子の急速な成長がみられる妊娠末期２ヵ月間において，維持養分量に胎子やその付属物の成長に必要とされる量を加算するように提唱されている。一方で，肉用牛の繁殖成績に影響する繁殖疾患のうち卵巣静止，卵胞嚢腫，黄体遺残および排卵遅延の発生が全体の約84％を占めているとの報告がある。これらの疾病には飼料給与量や栄養バランスが大きく関わっている。また，飼料給与量の制限による低栄養飼養によって起こる発情持続時間の短縮と発情行動の鈍性化が，発情発見率の低下ひいては受胎率低下の要因となることが示唆されている。逆に，妊娠期の高栄養飼養は母体の過肥を招き，死産（難産）の多発，分娩後の泌乳量および受胎率の低下をもたらすことが報告されている。したがって，栄養状態を個体ごとに把握しながら適切な飼養管理を行うことが求められる。

泌乳によって負のエネルギーバランスに陥りやすい乳用牛においては，分娩後の低栄養状態が繁殖成績を悪化させるとの知見が多く報告されている[2～4]。肉用牛においても，分娩前後の栄養状態が繁殖成績に影響を及ぼすことが推察されるが，黒毛和種繁殖雌牛における分娩前後の栄養状態とその後の繁殖成績との関連についての知見は少ない。さらに，分娩前後における栄養状態の推移（トレンド）が繁殖成績にどのように影響しているかは不明である。そのため，生産現場における栄養管理技術として活用できる情報はほとんどない。そこで本研究では，黒毛和種繁殖雌牛を対象として分娩前後の栄養状態と繁殖成績との関連について検討するとともに，繁殖成績を改善するための栄養状態の最適化指標を設定し，生産現場で活用可能な技術情報として提供することを目的とした。

２．方　　法

供試動物として，青森県内の大規模繁殖農場で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛115頭を供試し，分娩予定日の１ヵ月前から分娩３ヵ月後まで採材（採血，栄養状態の評価）を実施した。採血は，供試牛の頸部静脈から真空採血管にて採取した。栄養状態の判定は，公益社団法人全国和牛登録協会の栄養度判定要領[5]に基づき，全期間を通してすべての供試牛で同一の判定者が実施した。

採取した血液から得られた血漿を用いて，一般生化学性状としてグルコース（GLU），総コレステロール（TCHO），トリグリセロール（TG），総タンパク（TP），尿素窒素（BUN），アルブミン（ALB），グルタミン酸ピルビン酸トランスアミラーゼ（GPT）およびグルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ（GOT）の８項目，血中遊離脂肪酸（NEFA）濃度および血中プロジェステロン（P4）濃度を測定した。なお，血中P4濃度の測定は，分娩後の個体のみに限定して実施し，分娩後の発情回帰の指標とした。これらの血液性状と分娩前後における栄養状態推移（トレン

© The Ito Foundation

ド），繁殖成績との関連性について評価した。

分娩後の繁殖成績として初回人工授精（AI）日数，実空胎日数，空胎日数，発情発見率，受胎に要したAI回数および受胎率を評価項目として解析を行った。

3．結果と考察

対象農場における期間中の平均初回AI日数は76.9±1.8日で，分布では61－90日が最も多く全体の約50％を占めた。空胎日数の最頻値は，１年１産が可能な80日以内であったが，平均空胎日数は133.1±6.3日であった。

分娩後３ヵ月間の栄養度と初回AI日数との関係を**Fig. 1** に示した。栄養度４の牛は85.9±4.1日，栄養度５の牛は71.7±2.1日，栄養度６の牛は68.8±2.2日であり，栄養度４の牛は栄養度５，６の牛と比較して初回AI日数が有意に延長した（$p < 0.05$）。

分娩月における栄養度が発情回帰に及ぼす影響について，**Fig. 2** に示した。発情回帰の判断は，血中P4濃度に応じて，機能的な黄体が存在しているとされる血液１ml当たり１ng以上を発情回帰，１ng未満を発情未回帰とした。分娩月における栄養度が低いほど，発情未回帰の牛の割合が高くなる傾向が認められ，栄養度４の牛では67％が発情未回帰であった。分娩前の栄養状態が分娩後の繁殖成績に及ぼす影響は栄養水準の程度やその期間によって異なり，さらに分娩後の栄養水準とも密接な関係を持つ[6]。黒毛和種繁殖雌牛を供試した本研究においては，分娩後に栄養度４の牛は，栄養度５，６の牛と比較して初回AI日数が有意に延長し，また分娩月における栄養度が低いほど発情回帰の割合が低かったことから，分娩直後において栄養度が低い牛では，卵巣機能回復が遅延したことが，初回AI日数延長の要因であると考えられた。

分娩前後における栄養度の推移（トレンド）と初回AI成績（受胎：＋，不受胎：－）との関係を**Fig. 3** に示した。初回AI（－）牛群では，分娩前１ヵ月から分娩月にかけて栄養度が有意に低下

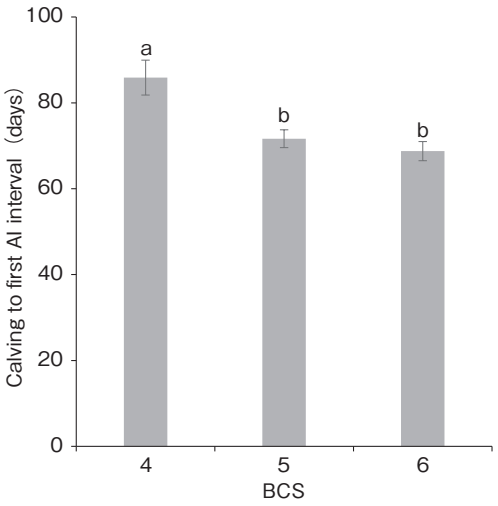


Fig. 1　Relationship between nutritional status in the pre- and postpartum and calving to first AI interval. Statistically significant differences are indicated by different letters ($p < 0.05$).

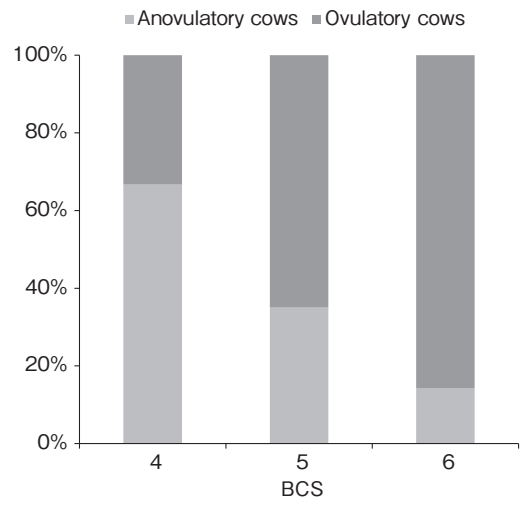


Fig. 2　Effect of nutritional status in the calving month on estrus regression.

© The Ito Foundation

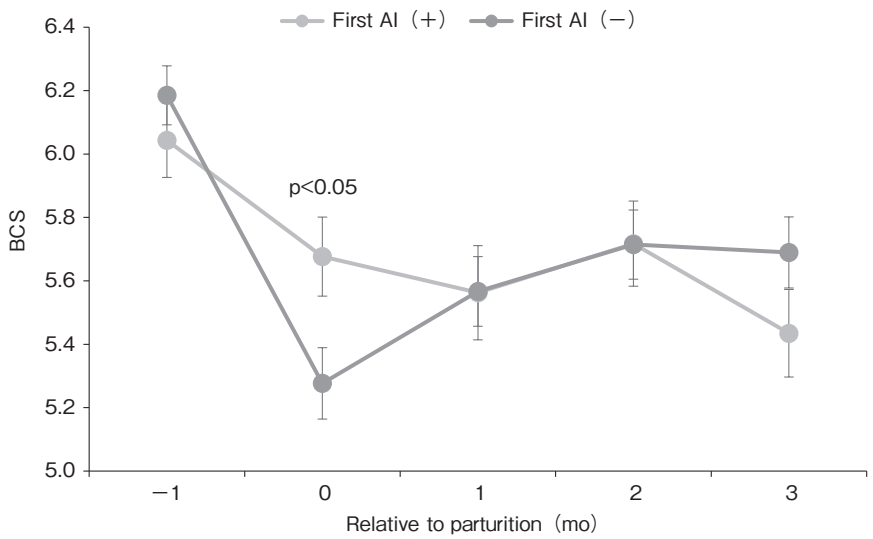


Fig. 3　Relationship between nutritional status and first AI performance.
First AI (+) : Did conceive at first AI
First AI (-) : Did not conceive at first AI

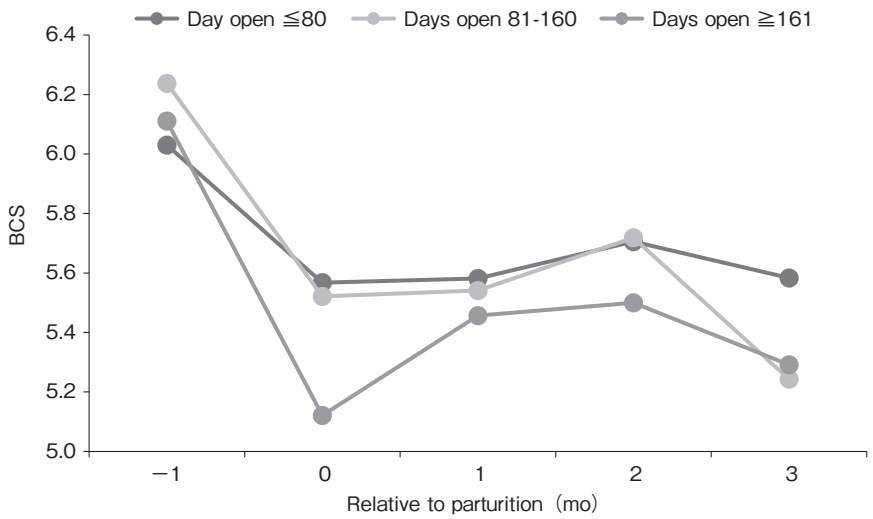


Fig. 4　Relationship between nutritional status and days open (cows with empty uterus or without pregnancy).

したのに対し（p＜0.05），初回AI（+）牛群では有意な低下は認められず，かつ分娩月の栄養度差は有意であった（p＜0.05）。

分娩前後における栄養度の推移（トレンド）と空胎日数（＜80日，81－160日，＞161日）との関係を**Fig. 4** に示した。空胎日数＞161日の牛では，分娩月の栄養度が空胎日数＜80日，81－160日の牛と比較して低く推移し，分娩前１ヵ月から分娩直後にかけての栄養度低下率が大きかった。実空胎日数は，発情発見効率と受胎率によって決定される。本研究においては，分娩後における栄養度にかかわらず，発情発見効率はほぼ一定であった

© The Ito Foundation

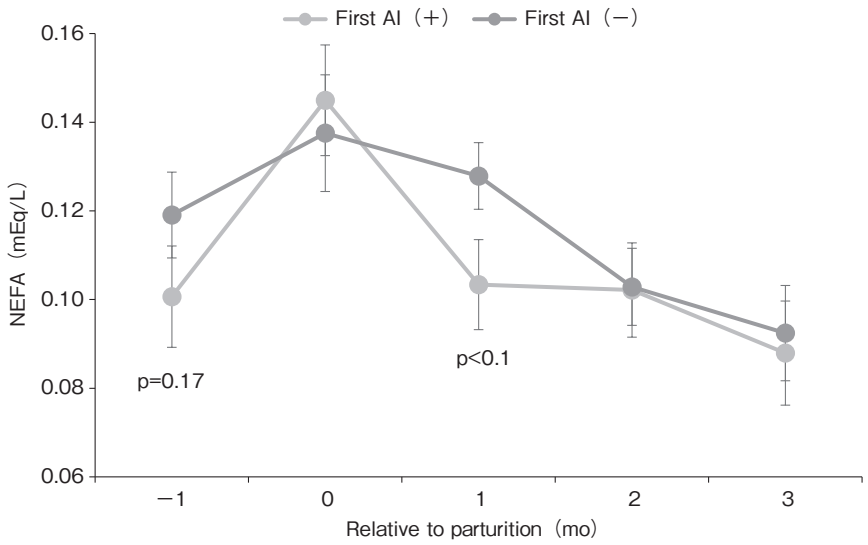


Fig. 5　Relationship between NEFA concentration and first AI performance.
First AI（+）: Did conceive at first AI
First AI（−）: Did not conceive at first AI

こと，また分娩月における栄養度が低い牛では受胎に要したAI回数が多い，すなわち受胎率が低かったことから，実空胎日数の延長の要因としては，栄養度が低いことによる受胎率の低下によるものと示唆された。初回AIにおける不受胎牛では，分娩直後の栄養度低下率が大きく，また栄養度の低下に伴い，初回AI受胎率も低下した。阿部ら[7]は，乳用牛において，分娩後にBCSが1.25以上低下した場合に，1.0以下の牛と比較して初回AI日数が約15日延長し，授精後にBCSが回復すると受胎率が約20％上昇したと報告している。鍋西ら[8]は，分娩後の皮下脂肪蓄積状態が減少で推移した牛群では増加で推移した牛群と比較して空胎日数が延長することを観察している。前述したように，実空胎日数の延長要因も受胎率の低下によるものと推察されたことから，分娩前後における低い栄養度と分娩後の急激な栄養度低下は，その後の受胎率低下の要因にもなり得ることが示唆された。

分娩前１ヵ月から分娩後３ヵ月までの期間における初回AI（+）牛群と初回AI（−）牛群のNEFA濃度の推移を**Fig. 5**に示した。初回AI（−）群のNEFA濃度は，分娩前１ヵ月，分娩後１，２ヵ月で（+）牛群よりも有意に高く推移した（$p < 0.05$）。また，栄養度４の牛では，栄養度５～７の牛と比較して，分娩後３ヵ月間のNEFA濃度が有意に高かった（$p < 0.05$）。初回AIの妊否による血液一般生化学性状に有意な差は認められなかったが，初回AI（−）牛群は受胎牛群と比較して分娩前後のNEFA濃度が高かった。また，栄養度４の牛では，NEFA濃度が高かった。このことから，初回AI（−）牛群では，エネルギー不足による体脂肪動員が亢進していたものと考えられ，その結果として栄養度が低下したものと考えられた。分娩後のNEBはLHパルス頻度を低下させ，分娩後の無排卵期間を延長させる[9]。したがって，分娩後にNEBになり，栄養度が低下した牛では，卵子の品質低下，または発情が回帰し授精を実施したとしても，無排卵のために受胎しなかった可能性が示唆された。

© The Ito Foundation

以上のことより，黒毛和種繁殖雌牛における分娩前後の栄養度および栄養度推移が，初回AI日数，受胎率，実空胎日数，空胎日数に影響を及ぼすこと，分娩直後の栄養度低下率が大きい場合に繁殖成績が低下すること，さらに初回AI（－）牛群では，エネルギー不足による体脂肪の動員が亢進している可能性が示唆された。

したがって，黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績改善のためには，分娩後における著しい栄養状態の低下を抑制する飼養管理の重要性が明らかとなった。

４．要　　約

青森県内の民間農場で飼養されている黒毛和種繁殖雌牛115頭を用い，分娩前後５ヵ月間（分娩１ヵ月前～分娩３ヵ月後）にわたって月１回の栄養度評価と採血による生化学分析と性ホルモン分析を実施し，繁殖成績との関連を検討した。

初回AI日数については，分娩後４ヵ月間の栄養度が４の牛群では有意に延長した。この牛群では分娩月の血中プロジェステロン濃度が低く，発情未回帰の割合が高いことから，卵巣機能の回復が遅延したものと考えられた。さらに，分娩後４ヵ月間の栄養度が低い牛群では実空胎日数が延長し，空胎日数も有意に延長した。分娩前後の栄養度推移を初回AI受胎（＋）・不受胎（－）牛群で比較したところ，初回AI（－）牛群では分娩前２，１ヵ月から分娩月にかけて栄養度が有意に低下したのに対し，初回AI（＋）牛群では有意な低下は認められず，分娩月の栄養度差は有意であった。一般生化学性状については，初回AI妊否による有意な差は認められなかったが，初回AI（－）牛群のNEFA濃度が分娩前１ヵ月，分娩後１，２ヵ月で高く推移したことから，エネルギー不足による体脂肪動員が推察された。したがって，黒毛和種繁殖雌牛の繁殖成績改善のためには，分娩後における著しい栄養状態の低下を抑制する飼養管理の重要性が明らかとなった。

文　　献

１）　農林水産省：畜産統計, 2020.
２）　平子誠，高橋ひとみ，櫛引史郎：*Journal of Japanese for clinical infectious disease in farm animals*, Vol.6, No.3, 2011.
３）　坂口実，笹本良彦，鈴木貴博，高橋芳幸，山田豊：北畜会報, **45**, 33～40, 2003.
４）　Humblot, P.：*Theriogenology*, **56**, 1417～1433, 2001.
５）　公益社団法人 全国和牛登録協会：和牛登録事務必携, 2009.
６）　鈴木修，佐藤匡美：草地試験場研究報告, **23**, 79～86, 1982.
７）　阿部榮，植松正巳，斎藤博水，渡辺大作：家畜臨床誌, **27**(2), 46～50, 2004.
８）　鍋西久，坂口浩平，亀樋成美，黒木幹也：肉用牛研究会報, **101**, 6～11, 2016.
９）　Bulter, W. R.：*Livestock Production Science*, **83**, 211～218, 2003.

© The Ito Foundation

抗酸化物質を利用したウシ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（Ⅱ）

Improvement of bovine *in vitro* fertilized embryo production technology using antioxidants and development of calf production system by new OPU-IVF-ET method（Ⅱ）

日巻　武裕[1,2]・中川　裕喜[1]・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]，Hiroki Nakagawa[1]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）

One of the factors that influencing the *in vitro* embryo production efficiency is oxidative stress. The purpose of this study is to investigate the effect of α-lipoic acid（ALA）treatment during *in vitro* maturation culture of bovine oocytes, which is a strong antioxidant, on the quality of matured oocyte. Furthermore, evaluated the *in vivo* developmental ability and normality of calves produced in *in vitro* fertilized（IVF）embryos derived from ALA treatment. Oocytes collected from slaughterhouse were cultured for 22 h in maturation medium supplemented with 0, 50, 100 or 200 μM ALA. At first, examined on mitochondrial activity of matured oocytes, the 50 μM treatment group showed a significantly higher value（$p < 0.05$）than all other treatment groups. In addition, the 100 μM treatment group also showed a significantly higher value（$p < 0.05$）than the 200 μM treatment group. Next, examined on the mitochondrial content of matured oocytes, the 50 μM treatment group showed a significantly higher value（$p < 0.05$）compared to all other treatment groups. In addition, examined on early apoptosis of matured oocytes, the 50 μM treatment group showed significantly lower values（$p < 0.05$）than the 0 μM and 200 μM treatment group. Finally, after treating the immature oocytes collected by Ovum Pick Up（OPU）with 50 μM 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 and recipient cows successfully completed their gestation period and succeeded in producing two offspring. Both calves born were morphologically normal and continued to grow normally. In conclusion, it was revealed that treatment with 50 μM ALA during *in vitro* maturation was effective in improving the developmental capacity of bovine *in vitro* matured oocyte and had no negative effects on the developmental ability on *in vivo* and normal calf production.

© The Ito Foundation

１．目　　的

国内における畜産業は，畜産農家の減少に伴い，多頭飼養形態や複合経営が主流になりつつある。特にウシにおいては，このような多頭飼養形態の弊害として，授精適期の見逃しによる人工授精受胎率の低下が問題となっている。その結果，子牛生産頭数の減少にもつながっており，これまでの和牛生産を一新する効率的な増産体制の確立が急務である。今世紀に入り，世界では，経膣採卵法（OPU）による生体由来卵子の採取と体外受精（IVF）卵の生産，そして受精卵移植（ET）による産子生産が急激に増加している[1)]。国内においても近年，IVF卵のETによる産子生産は増加傾向にある。特に，和牛受精卵を移植する個体に乳用牛を選択することで，乳用牛は乳生産に利用でき，産出子牛は高値で販売できるため酪農家の経営を助ける手段として応用されている。しかし，IVF卵は体内受精卵と比較して品質に劣り，受胎率が低いことが問題視されており，IVF-ETの普及がなかなか進まない理由の一因となっている。この受胎性に影響を及ぼす要因には，受胚牛の諸要因も存在するが，なによりも受精卵が順調に体内発生する能力を有することが最も重要になる。すなわち，受精卵が正常かつ品質に優れていることが大前提である。

そこで申請者は，IVF卵の発生能や品質に悪影響を及ぼす酸化ストレスを抑制するために，抗酸化剤であるα-リポ酸をIVF卵生産過程に添加し，その改善効果を検討した。その結果，酸化ストレスを軽減させ，IVF卵の生産効率ならびに品質を改善することを初めて明らかにした[2)]。さらに，α-リポ酸処理によって生産した和牛のIVF卵を乳用牛に移植して受胎させることにも成功し，順調な妊娠経過を観察している[2)]。しかし，α-リポ酸処理による発生能および品質改善効果の詳細なメカニズムは十分に解明されていない。また，誕生した子牛の正常性を評価することも今後の畜産現場への技術普及にとって重要である。

そこで本研究は，この新技術によって培養した体外成熟卵子について，胚発生能に関わる品質を詳細に解析するとともに，産出子牛の正常性について評価し，新技術を取り入れたOPU-IVF-ETによる子牛生産システムの現場応用の実現性を明確にすることを目的とした。

２．方　　法

2.1　種々濃度のALA処理によって培養した体外成熟卵子の品質の評価

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 μM添加したそれぞれの成熟培地微小滴で22時間培養した。その後，卵丘細胞を剥離し，第一極体の放出が確認された成熟卵子を選抜した。成熟卵子は，１）ミトコンドリア活性の評価，２）ミトコンドリア含有量の評価，３）成熟卵子細胞質の初期アポトーシス出現割合の評価，を行った。１）ミトコンドリアの活性評価については，Lee, *et al.*の方法[3)]を参考にし，MitoProbe™ JC-1 Assay Kit（Invitrogen）を使用した。２）ミトコンドリア含有量については，Zeng, *et al.*の方法[4)]を参考にし，Mito Tracker™ Red CMXRos（Invitrogen）を使用した。３）成熟卵子細胞質の初期アポトーシス出現割合については，Xu, *et al.*の方法[5)]を参考にし，Annexin-V-FLUOS Staining Kit（Roche）を使用した。それぞれの染色法で染色し，作製したホールマウント標本は，共焦点レーザースキャン顕微鏡（Carl Zeiss；LSM710）を用いて蛍光画像を記録し，ImageJソフトウェアを用いて，蛍光輝度を数値化することで各検討項目を定量的に解析した。

© The Ito Foundation

2.2　ALA処理によって生産した胚に由来する産子の発育正常性の評価

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OPUで未成熟卵子を採取した。その後，50 μMのALAを添加した成熟培地で22時間培養後，IVF卵を生産した。媒精から7日後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。後日，2頭の受胚牛は超音波画像診断によって受胎を確認した。2頭とも順調な妊娠経過をたどったが，出産予定日に分娩の兆候がみられなかったため，発情から286日後に，一般的なホルモン処理（プロスタグランジン$F_{2\alpha}$とエストラジオール安息香酸エステルの筋肉内注射ならびに合成副腎皮質ホルモンの皮下注射）による分娩誘起処理を施した。2頭とも翌日に自然分娩に至り，形態的に正常な子牛を出産した。産まれた子牛は初乳を与える前に，速やかに生時体重および体尺を測定した。なお，体尺測定の調査項目は，全国和牛登録協会が発行する黒毛和種正常発育曲線[6]に従った。その後，1ヵ月おきに生後6ヵ月まで体重と体尺を測定し，発育正常性を評価した。

2.3　統計解析

ミトコンドリア活性，ミトコンドリア含有量ならびに初期アポトーシスの評価は，One-Factor ANOVAにて検定を行い，多重比較としてTurkey Kramerの検定を行った。

3．結果と考察

3.1　種々濃度のALA処理によって培養した体外成熟卵子の品質の評価

ミトコンドリアは生命活動に必要なエネルギー源であるATPを産生するだけでなく，代謝や恒常性の維持，アポトーシスにおいて重要な役割を担っている[7]。受精卵において，ミトコンドリアの複製は卵子の成熟後，桑実期胚まで抑制されており[8]，成熟卵子が貯蔵しているミトコンドリアの量やその品質は初期胚発生に非常に重要である[9]。したがって，ミトコンドリア量や品質の評価は，細胞質成熟を評価する指標として有効である。また，ミトコンドリア活性は，細胞生存の重要な指標とされ[10]，その減少はミトコンドリア機能障害につながる可能性がある。そこで，ALA処理がミトコンドリア活性に及ぼす影響について検討した結果，ミトコンドリア活性は，50 μM処理区がその他のすべての処理区と比較して有意（$p<0.05$）に高い値を示した。また，100 μM処理区も200 μM処理区と比較して有意（$p<0.05$）に高い値を示した（**Fig. 1**）。本研究で使用したJC-1は，活性化および非活性化ミトコンドリアを判別することができ，この相対的な膜電位差を解析することで，ミトコンドリア活性の評価が可能である。膜電位差は，ATPが産生される電子伝達系において，ミトコンドリア内膜全体に水素イオンが送られる過程で生じる。したがって，ミトコンドリア膜電位差は，ATP産生に密接に関わっている。本研究において，50または100 μM添加区においてミトコンドリア活性が改善されたことは，卵子細胞質の成熟が向上することを示唆した。

細胞質内のミトコンドリア含有量が多い卵子は，含有量が少ない卵子と比較してATP産生量が多いだけでなく，IVF後の胚盤胞形成率が高く，胚盤胞総細胞数や胚盤胞のATP含有量も多いこ

© The Ito Foundation

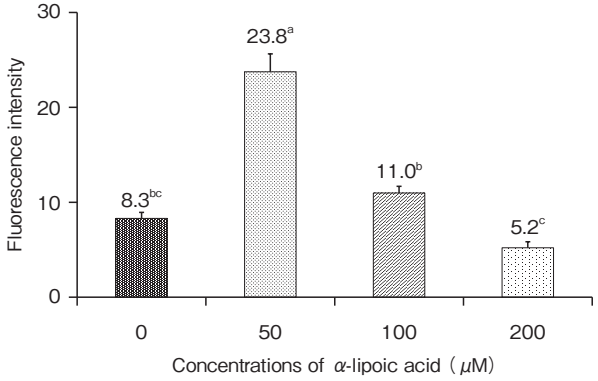


Fig. 1　Effect of α-lipoic acid treatments of the IVM period on mitochondrial activity in matured bovine oocytes. Different superscripts indicate a significant difference (p<0.05). Experiments repeated three times (Sample numbers of each groups = 30).

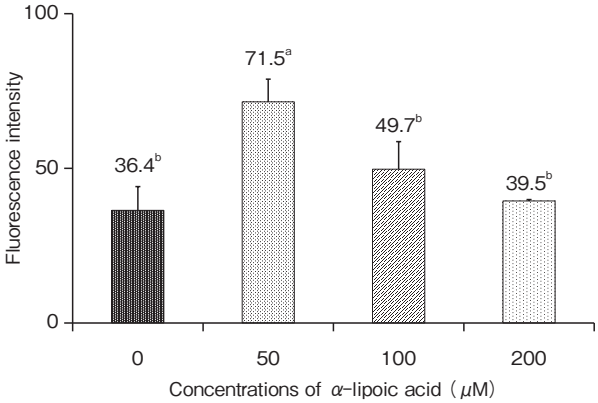


Fig. 2　Effect of α-lipoic acid treatments of the IVM period on mitochondrial content in matured bovine oocytes. Different superscripts indicate a significant difference (p<0.05). Experiments repeated four times (Sample numbers of each groups = 40).

とが報告されている[11]。そこで，ALA処理がミトコンドリア含有量に及ぼす影響について検討した結果，50 μM処理区がその他のすべての処理区と比較して有意（p<0.05）に高い値を示した（**Fig. 2**）。ミトコンドリア含有量の増加は，卵子細胞質の成熟状況およびその後の胚発生の増加と関連している[12]。さらに我々は，先行研究[2]において，IVM過程におけるALA処理が卵細胞質内の活性酸素種（ROS）量を有意に減少させることを明らかにした。損傷したミトコンドリアは，ROSの生成により卵子に酸化ストレスを与える[13]。したがって，ALA処理による酸化ストレスの軽減が，ミトコンドリアの損傷を抑え，アポトーシスが減少したことでミトコンドリア含有量の有意な増加につながったと考えられる。

上述のとおり，卵子におけるアポトーシスは，その後の胚発生に直接的な影響を及ぼす。そこで，ALA処理が初期アポトーシス状況に及ぼす

© The Ito Foundation

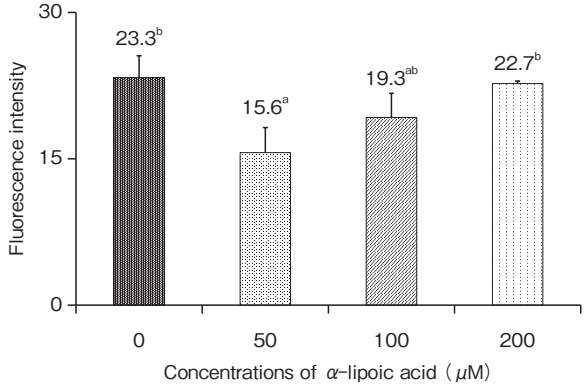


Fig. 3　Effect of α-lipoic acid treatments of the IVM period on early apoptosis in matured bovine oocytes. Different superscripts indicate a significant difference ($p<0.05$). Experiments repeated four times (Sample numbers of each groups = 40).

影響について検討した結果，初期アポトーシスは，50 μM処理区が0 μM処理区および200 μM処理区と比較して有意（$p<0.05$）に低い値を示した（**Fig. 3**）。卵子細胞質内のミトコンドリアは，アポトーシス促進因子を貯蔵する機能を有する[14]。アポトーシス促進因子は，ミトコンドリア膜の透過性を調節し，ミトコンドリアからサイトゾルへのシトクロムCなどのアポトーシス誘導物質の放出を調節する。ミトコンドリアのアポトーシス誘導物質のサイトゾルへの放出は，カスパーゼカスケードの活性化をもたらし，一度活性化されると，カスパーゼカスケードはアポトーシスをもたらす[15]。したがって，本研究において，ALA処理は，ミトコンドリア活性の向上ならびにROSの減少に有益であり，初期アポトーシスの原因となる諸要因を抑制したと考えられる。

以上の結果から，本実験において，50 μM添加区においてミトコンドリア活性や含有量，初期アポトーシスが改善されたことは，卵子細胞質成熟状況の改善を示すものであり，先行研究[2]の結果であるIVF胚の発生能の有意な改善を支持するものである。

3.2　ALA処理によって生産した胚に由来する産子の発育正常性の評価

新鮮胚，凍結融解胚を移植した受胚牛の両個体において，出産予定日から2日後に正常な雄子牛を産出することに成功した。超音波画像妊娠診断では，新鮮胚移植した個体は，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は，ETから38日後に胎膜および胎仔の心拍を確認した。先行研究において我々は，ALA処理によってIVFに由来する胚盤胞期胚の総細胞数ならびに内部細胞塊が有意に増加することを明らかにした[2]。総細胞数や内部細胞塊が多い胚ほど受胎率が高い[16]。したがって，本実験において，2頭とも受胎したことは，胚盤胞の品質改善が貢献した可能性がある。その後は順調な妊娠経過をたどったが，ETでは頻発しがちな分娩日の遅れが観察された。そこで，本実験では過大仔による難産を避けるため2頭ともホルモン処理による人為的な分娩誘起を行った。両個体とも予定日より2日遅れての分娩となったが，生時体重は，1頭目（No. 1）が28.3kg，2頭目（No. 2）が26.2kgであり，2頭ともやや低体重であったも

© The Ito Foundation

Table 1　Growth dynamics of calves derived from *in vitro* fertilized embryos after 50 μM ALA treatment during *in vitro* maturation culture.

	Month old	Body weight (kg)	Withers height (cm)	Hip height (cm)	Body length (cm)	Chest girth (cm)	Chest depth (cm)	Chest width (cm)	Rump length (cm)	Hip width (cm)	Thurl width (cm)	Pin bone width (cm)
	0	28.3	66.8	67.4	54.9	71.0	25.7	13.5	17.2	12.4	13.6	10.0
	1	53.0	76.6	81.6	69.0	87.0	32.0	19.0	25.4	19.0	21.0	12.2
	2	71.5	79.8	85.0	80.0	96.8	33.0	21.5	28.0	20.0	24.0	14.0
No.1	3	102.5	92.5	94.4	95.5	109.0	39.8	24.0	28.9	22.5	24.5	17.0
	4	131.0	94.0	96.2	102.0	120.0	41.8	27.8	34.4	25.5	26.5	19.0
	5	144.0	98.2	99.8	110.0	124.0	43.6	31.0	35.1	28.5	30.2	20.5
	6	171.0	102.4	104.6	115.0	134.0	45.5	32.2	38.8	31.2	31.5	21.0
	0	26.2	67.6	68.0	56.6	74.0	25.2	14.4	19.1	13.1	16.7	9.7
	1	47.5	72.7	80.6	74.5	85.5	30.4	17.4	23.0	16.2	20.0	11.8
	2	73.5	86.8	89.1	82.1	101.0	36.8	19.2	26.5	20.1	21.5	15.5
No.2	3	91.0	90.0	91.0	90.0	110.0	37.4	20.0	28.2	22.5	25.5	16.0
	4	108.0	92.5	95.8	101.0	112.5	43.0	22.0	30.2	25.2	26.5	17.5
	5	135.5	97.2	101.6	107.0	123.0	45.5	26.0	34.5	28.5	29.2	19.0
	6	179.5	104.0	107.2	113.0	130.0	48.5	29.5	39.2	30.0	31.5	20.5

Fig. 4　Photographs of calves derived from *in vitro* fertilized embryos after 50 μM ALA treatment during *in vitro* maturation culture（right：8 months old, left：6 months old）.

のの黒毛和種正常発育曲線の下限から外れることはなかった。その後も順調な発育を示し，月齢が経過するにしたがって黒毛和種正常発育曲線の平均値に近づいた（**Table 1**）。なお，１頭目（No.１）は出産後166日目に，２頭目（No.２）は出産後152日目に去勢施術を実施したが，その後も体重の減少等はみられず順調に発育した（**Fig. 4**）。

４．要　　約

本研究では，強力な抗酸化物質であるα-リポ酸（ALA）処理によるウシ体外受精（IVF）卵生産技術の高度化と開発した培養技術の現場応用

© The Ito Foundation

を目的として，まず，ALA処理が体外成熟卵子の品質に及ぼす影響を評価した。さらに，ALA処理に由来するIVF卵を受精卵移植（ET）し，体内発生能と得られた産子の正常性に及ぼす影響を検討した。

その結果，体外成熟培養過程における50 μM ALA処理は，ミトコンドリアの活性と含有量を有意に改善し，ATP産生による胚発生能の改善が示された。加えて，成熟卵子の初期アポトーシス発現状況を改善し，IVF卵の発生能と品質が向上することが明らかとなった。ET後の体内発生能では，無事に妊娠期間を全うし，ALA処理によるIVF卵に由来する正常子牛の産出に世界で初めて成功した。その後の産子の発育状況も良好で，ALA処理が子牛生産に悪影響を及ぼさないことが明らかとなった。

結論として，本研究は，ウシIVF卵生産技術の発展に新たな知見を提供し，産子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，ウシIVF卵研究の基盤となり，畜産現場における効率的かつ発展的な産子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） IETS Data Retrieval Committee Reports.：*Embryo Technology Newsletter*, **39**, n.4, 2021.
2） 日巻武裕，草薙志穂，多治見弘史：公益財団法人伊藤記念財団　令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**39**，167～173，2021.
3） Lee, S. K., Zhao, M. H., Kwon, J. W., Li, Y. H., Lin, Z. L., Jin, Y. X., Kim, N. H., Cui X. S.：*J Reprod Dev*, **60**, 128～35, 2014.
4） Zeng, Y., Shinada, K., Hano, K., Sui, L., Yang, T., Li, X., Himaki T.：*Theriogenology*, **162**, 32～41, 2021.
5） Xu, D., Jiang, X., He, H., Liu, D., Yang, L., Chen, H., Wu, L., Geng, G., Li, Q.：*Life Sci*, **232**, 116639, 2019.
6） 全国和牛登録協会：黒毛和種正常発育曲線，2004.
7） Babayev, E., Seli, E.：*Curr Opin Obstet Gynecol*, **27**, 175～181, 2015.
8） Dalton, C. M., Carroll, J.：*J Cell Sci*, **126**, 2955～2964, 2013.
9） Grindler, N. M., Moley, K. H.：*Medicine*, **19**, 486～494, 2013.
10） Abdulhasan, M. K., Li, Q., Dai, J., Abu-Soud, H. M., Puscheck, E. E., Rappolee, D. A.：*J Assist Reprod Genet*, **34**, 1595～1607, 2017.
11） Stojkovic, M., Machado, S. A., Stojkovic, P., Zakhartchenko, V., Hutzler, P., Gonçalves, P. B., Wolf, E.：*Biol Reprod*, **64**, 904～909, 2001.
12） Nie, J., Yan, K., Sui, L., Zhang, H., Zhang, H., Yang, X., Lu, S., Lu, K., Liang, X.：*Theriogenology*, **141**, 35～40, 2020.
13） Saita, S., Shirane, M., Nakayama, K. I.：*Nat Commun*, **4**, 1410, 2013.
14） Wang, L. Y., Wang, D. H., Zou, X. Y., Xu, C. M.：*J Zhejiang Univ Sci B*, **10**, 483～492, 2009.
15） Kosaka, N., Sudo, N., Miyamoto, A., Shimizu, T.：*Biochem Biophys Res Commun*, **363**, 733～737, 2007.
16） Zullo, G., Albero, G., Neglia, G., De Canditiis, C., Bifulco, G., Campanile, G., Gasparrini, B.：*Theriogenology*, **85**, 688～697, 2016.

© The Ito Foundation

分娩前の複合型アミノ酸ペレット給与が乳牛の繁殖成績に及ぼす影響

Effect of prepartum administration of rumen - protected complex amino acids pellet on reproductive performance of the dairy cow

住　吉　俊　亮
（日本大学生物資源科学部獣医学科）

Toshiaki Sumiyoshi
(Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Science, Nihon University)

The purpose of this study is to reveal the effect of administration of rumen – protected complex amino acids pellet on the health condition of dams and offsprings, as well as on the reproductive performance. Data were collected from 10 Holstein-Friesian cows with clinically healthy. These 10 cows were divided into the 2 groups of 5 cows each, amino acids groups and control groups. The amino acids group was fed 50 g of rumen – protected complex amino acids pellet added feed from 60 days before estimated day of parturition to the day of parturition. A total of 16 items of Glucose (Glu), non-esterified fatty acid (NEFA), 3-hydroxybutyric acid, total ketone body, acetoacetic acid, urea nitrogen (BUN), albumin (Alb), total protein (TP), total cholesterol (T-Cho), γ-glutamyl transpeptidase (γ-GT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine (CRE), creatine kinase (CK), phosphorus (iP), magnesium (Mg), calcium (Ca) were measured. In addition, a total of 20 amino acids such as Arginine (Arg), Isoleucine (Ile), Leucine (Leu), Lysine (Lys), Methionine (Met), Phenylalanine (Phe), Tyrosine (Tyr), Valine (Val), Alanine (Ala), Asparagine (Asn), Aspartic Acid (Asp), cystine, Glutamine (Gln), Glutamic Acid (Glu), Glycine (Gly), Histidine (His), Proline (Pro), Serine (Ser), Threonine (Thr), and Tryptophan (Trp), or 40 items by adding 20 items of α-aminoadipic acid, α-amino-n-butyric acid, Anserine (An), Aminopimelic acid (Apm), β-Alanine (β-Ala), β-Amino-iso-butyric acid (β-AIBA), Carnosine (Carno), Citrulline (Cit), Cystathionine (Cysthio), gamma-Aminobutyric acid (GABA), Glycylproline, σ-Hydroxylysine (σ-Hyl), 4-Hydroxyproline (4-Hyp), quinurenin, 1-Methylhistidine (1-Me His), 3-Methylhistidine (3Me-His), Ornithine (Orni), prolyl-Hydroxyproline (prolyl-Hyp), Sarcosine (Sar), and thioproline to these above 20 items were measured. Regarding the reproductive performance, first ovulation day, vaginal mucus properties, cytological count, first insemination day, days after parturition and number of inseminations were investigated. The blood acetoacetic acid concentration tended to be significantly lower in 3 days after parturition and tended to be lower in 5 and 7 days after parturition in the amino acids group. The blood Cre and CK concentration significantly lower in 3 days after parturition and tended to be lower in 5 and 7 days after parturition in the amino acids group. The number of days of initial ovulation was 50.4 ± 17.4 days in the amino acids group and 74.2 ± 20.2 days in the control group, indicating

© The Ito Foundation

that the number of days tended to be shortened by feeding the rumen - protected complex amino acids pellet added feed. In the future, we plan to continue sampling and data analysis to elucidate the factors that affected reproductive performance by feeding amino acid added feeds.

1．目　　的

最近50年における乳牛の改良や飼養管理技術の発展により，全世界における乳牛の個体乳量は飛躍的に増加した。しかし，それとともに乳牛の繁殖成績は全世界的に低下している[1~8]。この繁殖成績の低下の原因は多岐にわたるが，その一要因として周産期にエネルギー収支バランスがマイナスに陥る，いわゆる負のエネルギーバランス状態が関わっていることが指摘されている。負のエネルギーバランス状態が長引けば，それだけ繁殖機能回復が遅れるとされている。特に高泌乳牛ではエネルギー要求量も大きくなるため，負のエネルギー状態に陥りやすいと考えられる。近年，乳牛の周産期における負のエネルギーバランスの改善や泌乳成績の向上のために，アミノ酸添加飼料が利用され，一定の効果が得られている[9~11]。しかし，アミノ酸の給与が繁殖成績に及ぼす影響についての報告は少ない。そこで本研究では，周産期のアミノ酸添加飼料の給与が母牛の健康状態維持，産子の健康，分娩時の酸化ストレスに与える影響に加え，繁殖成績に及ぼす影響について明らかにすることを目的とした。

2．材料と方法

2.1　供試動物

供試牛は2021年10月から2022年６月の間に，神奈川県下の民間のタイストール形式の牧場に飼養されている一般健康状態の良好なホルスタイン種経産搾乳牛10頭である。10頭の供試牛を無給与群５頭，給与群５頭に振り分けた。供試牛の供試時の年齢は4.0±0.9（平均±SD）歳，産次数は1.7±0.7産であり，５段階で評価したボディコンディションスコア（BCS）[12]は2.5±0.3であった。搾乳回数は朝夕２回であり，１頭あたりの305日換算平均乳量はおよそ9,000kgであった。飼料給与状況は日本飼養標準（2017年）に準拠して混合飼料（TMR）および乾草を給与していた。給与群にはアミノ酸添加飼料（ベストバランス・W，あすかアニマルヘルス株式会社，東京）を１日50ｇ，分娩前60日から分娩日までTMRにトップドレスし，朝の給餌時に給与した。なお，本研究は日本大学動物病院における臨床研究の承認を受けている（承認番号1-005）。

2.2　採血

母牛は分娩前60，42，14，７，０，分娩後１，３，５，７，14，28，35，42，63，84，105日に正中尾静脈より採血を行った。また，子牛については出生後０，７，14，28日に経静脈より採血を行った。採取した血液は，ただちに1,500gで15分間遠心分離を行い，血清および血漿を分離後，測定まで－30℃で保存した。

2.3　BCS，体重，胸腺スコアの測定

母牛は，各採血日にBCSの測定を行った。また，子牛については各採血日に体重および胸腺スコアの測定を行った。

2.4　血液化学検査

各採血日の血液を用い，母牛，子牛についてエネルギー代謝の指標として血糖（Glu），遊離脂肪酸（NEFA），３ヒドロキシ酪酸，総ケトン体，アセト酢酸，タンパク質代謝の指標として尿素窒素（BUN），アルブミン（Alb），総タンパク（TP），肝機能の指標として総コレステロール（T-Cho），γ－グルタミルトランスペプチターゼ

© The Ito Foundation

（γ-GT），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），腎機能の指標としてクレアチニン（CRE），クレアチンキナーゼ（CK），ミネラルの指標としてリン（iP），マグネシウム（Mg），カルシウム（Ca）の計16項目について測定した。測定は民間の検査施設（株式会社保健科学，神奈川）に依頼した。

2.5　血清アミノ酸濃度の測定

アミノ酸の測定項目はアルギンニン（Arg），イソロイシン（Ile），ロイシン（Leu），リシン（Lys），メチオニン（Met），フェニルアラニン（Phe），チロシン（Tyr），バリン（Val），アラニン（Ala），アスパラギン（Asn），アスパラギン酸（Asp），シスチン，グルタミン（Gln），グルタミン酸（Glu），グリシン（Gly），ヒスチジン（His），プロリン（Pro），セリン（Ser），トレオニン（Thr），トリプトファン（Trp）の計20項目あるいは，この20項目にα-アミノアジピン酸，α-アミノ-n-酪酸，アンセリン（Ans），アミノピメリン酸（Apm），βアラニン（β-Ala），βアミノイソ酪酸（β-AIBA），カルノシン（Carno），シトルリン（Cit），シスタチオニン（Cysthio），γ-アミノ酪酸（GABA），グリシルプロリン，σ-ヒドロキシリシン（σ-Hyl），4-ヒドロキシプロリン（4-Hyp），キヌレニン，1-メチルヒスチジン（1Me-His），3-メチルヒスチジン（3Me-His），オルニチン（Orni），プロリル-ヒドロキシプロリン（prolyl-Hyp），サルコシン（Sar），チオプロリンを加えた40項目について測定した。すなわち，母牛については，分娩前60，14，分娩後７，42，63，105日に20項目を，分娩前７，０，分娩後１，14，28，84日について40項目を測定した。子牛は，産後０，７，14，28日に20項目について測定を行った。測定は民間の検査施設（日本動物特殊診断（株），北海道）に依頼した。

2.6　繁殖成績

母牛は，分娩後に週１回，各採血実施日に直腸検査および超音波画像診断装置（トリンガリニア，Esaote Europe B.V.，Netherlands）を用いて卵巣および子宮を観察した。黄体が初めて確認された日を初回排卵日とした。また分娩後１～７週にメトリチェックによる膣粘液性状検査およびサイトブラシによる子宮内膜細胞診を実施した。また，供試牛は初回授精日数，空胎日数，授精回数および産褥期疾患等の疾病罹患の有無について受胎するまで追跡調査を行った。

2.7　統計解析

測定を行った各項目について，給与群と無給与群で比較を行った。初回排卵日数，初回授精日数，空胎日数の比較は，スチューデントのｔ検定（エクセル統計，オーエムエス出版，東京）を用いた。血液生化学検査，血清アミノ酸濃度，その他の血液検査項目についての群間の比較は，正規性により，スチューデントのｔ検定またはマン・ホイットニ検定を用いた。$p<0.05$を有意差あり，$p<0.1$を有意傾向ありとした。データは平均±標準偏差で示した。

3．結果と考察

試験開始時のBCSは給与群2.4±0.3，無給与群2.6±0.3であり，両群間に差は認められなかった。また，子牛の出生時体重，出生後28日までの増加体重，胸腺スコアについても差は認められなかった。

繁殖成績は，初回授精日数，空胎日数，授精回数および受胎率については現在追跡調査およびデータ解析中であるが，初回排卵日数については給与群が50.4±17.4日，無給与群が74.2±20.2日となり，アミノ酸添加飼料の給与により日数が短縮する傾向が認められた（**Fig. 1**）。メトリチェックおよびサイトブラシによる子宮の回復状況につ

© The Ito Foundation

いては両群に差は認められなかった。

血液生化学検査，血清アミノ酸濃度の結果については，まだサンプリングおよび測定がすべて終了していないので，現在までにサンプリングが終了しているデータについて，有意差および有意な傾向が認められたものについてのみ記載する。エネルギー代謝の指標については，血糖（Glu）濃度は，母牛において実験開始時の分娩前60日で，給与群が有意に高かった。また，血中アセト酢酸濃度は母牛において分娩後３日で給与群が有意に低く，分娩後５，７日で給与群が低値を示す傾向が認められた（**Fig. 2**）。NEFA，３ヒドロキシ酪酸，総ケトン体については，両群間に有意な差は認められなかったが，アミノ酸製剤の給与により，負のエネルギーバランスが改善され，脂肪組織の分解が抑制され，給与群のアセト酢酸濃度が低値となった可能性が示唆される。タンパク質代謝の指標については，BUN濃度は，子牛において分娩後14日で，給与群が有意に高かった。また，血中Alb濃度は子牛において分娩後７日で無給与

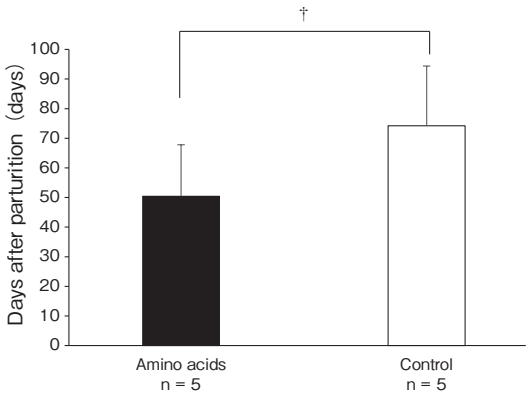


Fig. 1　Days to first postpartum ovulation.
Date are presented as the mean ± SEM.
†；p < 0.1

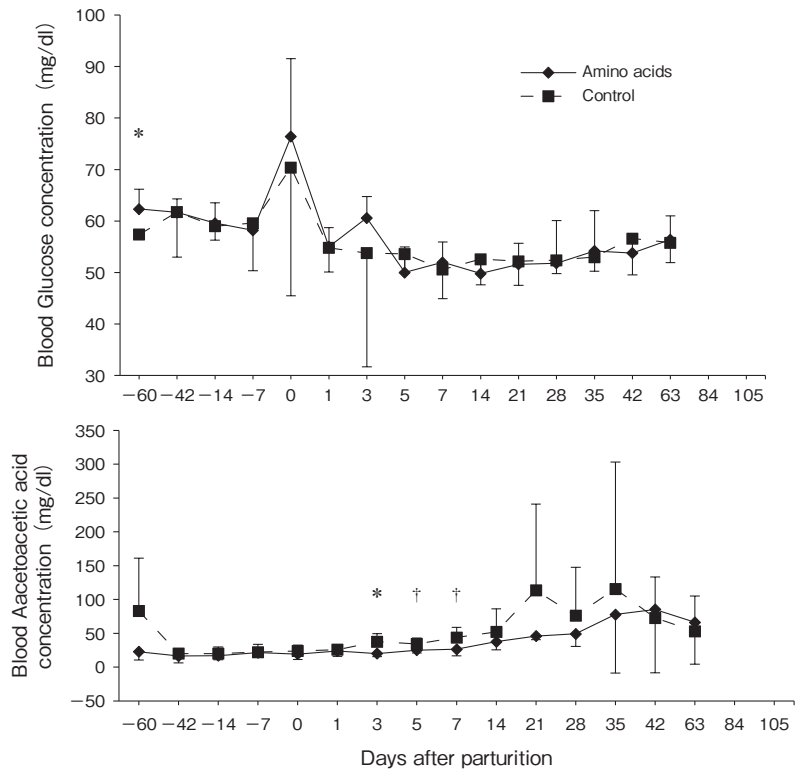


Fig. 2　Blood concentration of biochemical parameters for Indicator of energy metabolism in calving cows.
Date are presented as the mean ± SEM.
*；p <0.05 †；p < 0.1

© The Ito Foundation

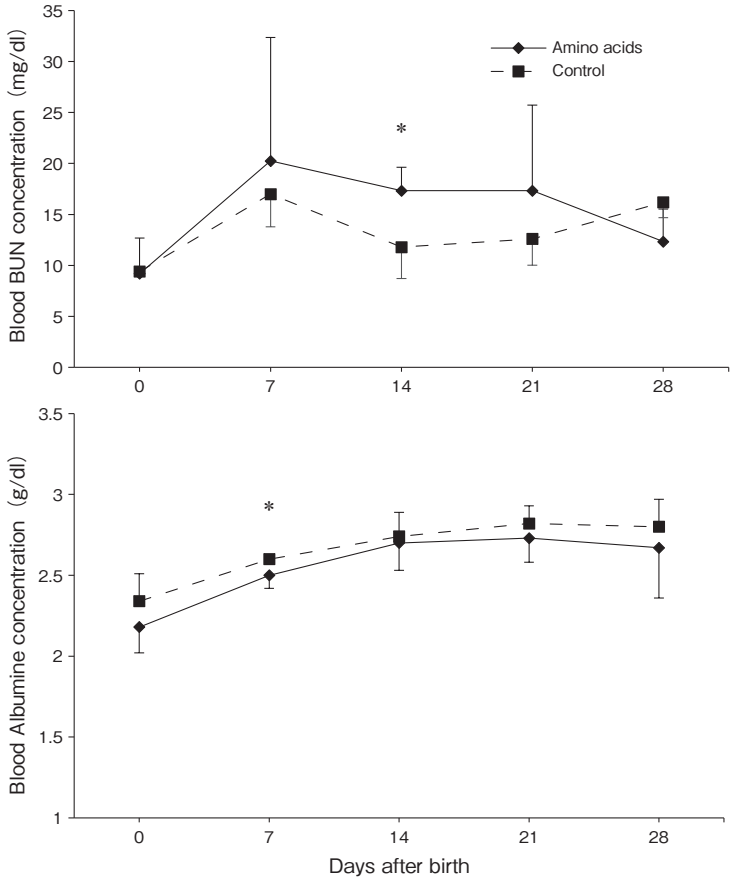


Fig. 3　Blood concentration of biochemical parameters for Indicator of protein metabolism in calves.
Date are presented as the mean ± SEM.
*；p <0.05

群が有意に高かった（**Fig. 3**）。腎機能の指標に関しては，血中Cre濃度および血中CK濃度はともに，母牛において分娩後３日において給与群が有意に低く，分娩後５，７日で低値を示す傾向が認められた（**Fig. 4**）。これには分娩後の筋肉分解が関与している可能性があり，アミノ酸給与により分娩後の筋肉分解が抑えられ，給与群においてCreおよびCKが低値となった可能性が考えられる。ミネラルの指標については，血中Mg濃度は，母牛において分娩日で，給与群が高値を示す傾向が認められた（**Fig. 5**）。

今回の研究において，アミノ酸添加飼料の給与は繁殖成績の向上に有効である可能性が示唆された。アミノ酸添加飼料の給与が繁殖成績に影響を与えた要因の解明に関しては，さらなるデータの測定および解析が必要であり，引き続き解析を続ける予定である。

４．要　　約

本研究の目的は，周産期のアミノ酸添加飼料の給与が母牛および産子の健康状態に与える影響に加え，繁殖成績に及ぼす影響について明らかにすることである。本研究には，一般健康状態の良好なホルスタイン種経産搾乳牛10頭を供試した。この10頭の供試牛を無給与群５頭，給与群５頭に振り分け，給与群にはアミノ酸添加飼料を１日50

© The Ito Foundation

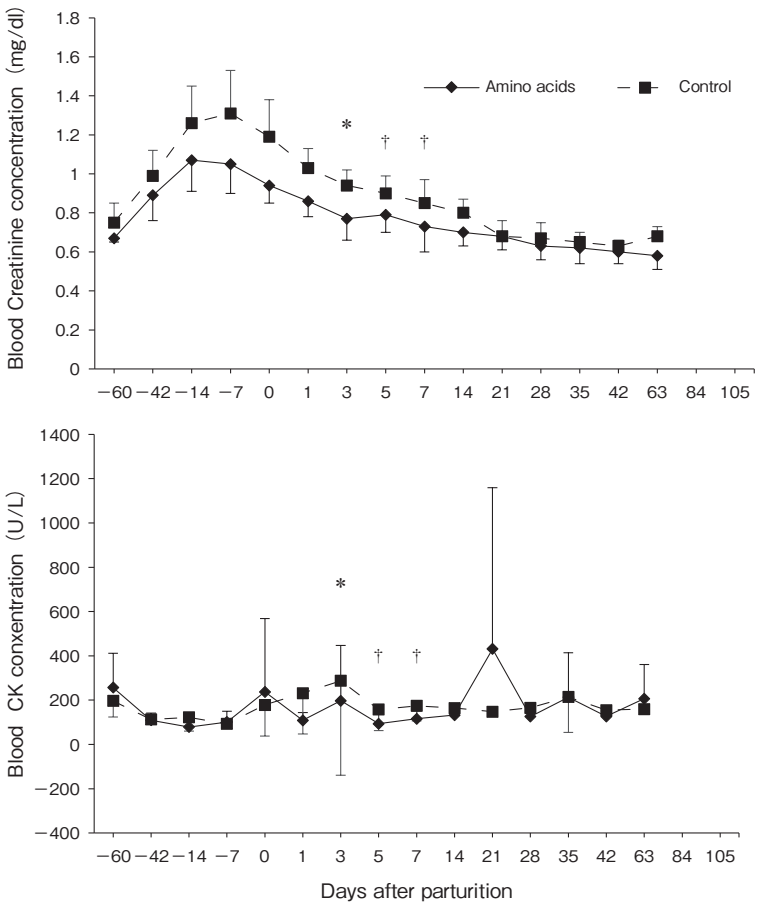


Fig. 4　Blood concentration of biochemical parameters for Indicator of renal function in calving cows.
Date are presented as the mean ± SEM.
*；p <0.05 †；p < 0.1

g，分娩前60日から分娩日まで給与した。母牛については分娩前60，42，14，7，0，分娩後1，3，5，7，14，28，35，42，63，84，105日に，子牛については出生後0，7，14，28日に採血を行い，血糖（Glu），遊離脂肪酸（NEFA），3ヒドロキシ酪酸，総ケトン体，アセト酢酸，尿素窒素（BUN），アルブミン（Alb），総タンパク（TP），総コレステロール（T-Cho），γ-グルタミルトランスペプチターゼ（γ-GT），アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST），クレアチニン（CRE），クレアチンキナーゼ（CK），リン（iP），マグネシウム（Mg），カルシウム（Ca）の計16項目について測定した。加えて，アミノ酸としてアルギニン（Arg），イソロイシン（Ile），ロイシン（Leu），リシン（Lys），メチオニン（Met），フェニルアラニン（Phe），チロシン（Tyr），バリン（Val），アラニン（Ala），アスパラギン（Asn），アスパラギン酸（Asp），シスチン，グルタミン（Gln），グルタミン酸（Glu），グリシン（Gly），ヒスチジン（His），プロリン（Pro），セリン（Ser），トレオニン（Thr），トリプトファン（Trp）の計20項目，あるいは，この20項目にα-アミノアジピン酸，α-アミノ-n-酪酸，アンセリン（Ans），アミノピメリン酸（Apm），β

© The Ito Foundation

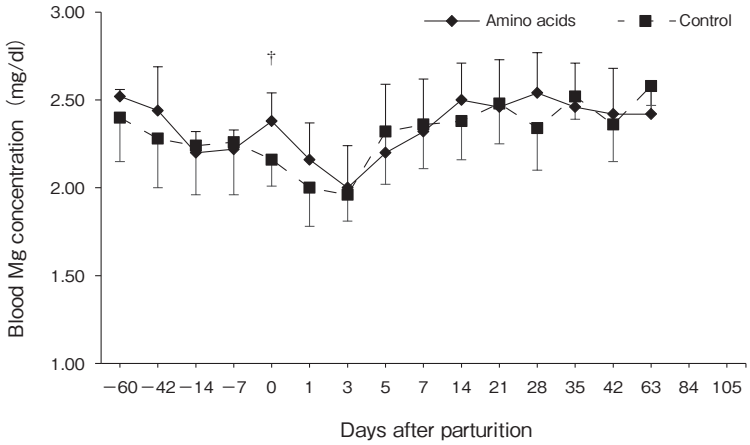


Fig. 5　Blood concentration of biochemical parameters for mineral index in calving cows.
Date are presented as the mean ± SEM.
† ; $p < 0.1$

アラニン（β−Ala），βアミノイソ酪酸（β−AIBA），カルノシン（Carno），シトルリン（Cit），シスタチオニン（Cysthio），γ−アミノ酪酸（GABA），グリシルプロリン，σ−ヒドロキシリシン（σ−Hyl），4−ヒドロキシプロリン（4−Hyp），キヌレニン，1−メチルヒスチジン（1Me−His），3−メチルヒスチジン（3Me−His），オルニチン（Orni），プロリル−ヒドロキシプロリン（prolyl−Hyp），サルコシン（Sar），チオプロリンを加えた40項目について測定した。

繁殖成績については，初回排卵日，メトリチェックによる膣粘液性状検査およびサイトブラシによる子宮内膜細胞診に加えて，初回授精日数，空胎日数，授精回数および産褥期疾患等の疾病罹患の有無について追跡調査を行った。血液生化学において，血中Glu濃度は，母牛において実験開始時の分娩前60日で，給与群が有意に高かった。また，血中アセト酢酸濃度は母牛において分娩後３日で給与群が有意に低く，分娩後５，７日で給与群が低値を示す傾向が認められた。NEFA，３ヒドロキシ酪酸，総ケトン体については，両群間に有意な差は認められなかったが，アミノ酸製剤の給与により，負のエネルギーバランスが改善され，脂肪組織の分解が抑制され，給与群のアセト酢酸濃度が低値となった可能性が示唆される。BUN濃度は，子牛において分娩後14日で，給与群が有意に高かった。また，血中Alb濃度は子牛において分娩後７日で無給与群が有意に高かった。血中Cre濃度および血中CK濃度はともに，母牛において分娩後３日において給与群が有意に低く，分娩後５，７日で低値を示す傾向が認められた。これには分娩後日での筋肉分解が関与している可能性があり，アミノ酸給与により分娩後の筋肉分解が抑えられ，給与群においてCreおよびCKが低値となった可能性が考えられる。血中Mg濃度は，母牛において分娩日で，給与群が高値を示す傾向が認められた。繁殖成績に関しては，初回排卵日数については給与群が50.4±17.4日，無給与群が74.2±20.2日となり，アミノ酸添加飼料の給与により日数が短縮する傾向が認められた。今後は，サンプリングおよびデータ解析を継続し，アミノ酸添加飼料の給与が繁殖成績に影響を与えた要因の解明を続ける予定である。

© The Ito Foundation

文　献

1） Lucy, M. C.：*J Dairy Sci*, **84**, 1277～1293, 2001.
2） Lopez-Gatius, F.：*Theriogenology*, **60**, 89～99, 2003.
3） Reimers, T. J., Smith, R. D., Newman, S. K.：*J Dairy Sci*, **68**, 963～972, 1985.
4） Van Eerdenburg, F. J. C. M., Loeffler, H. S. H., Van Vliet, J. H.：*Vet Q*, **50**, 57～69, 1996.
5） Van Vliet, J. H., Van Eerdenburg, F. J. C.M.：*Appl Anim Behav Sci*, **50**, 57～69, 1996.
6） Butler, W. R., Smith, R. D.：*J Dairy Sci*, **72**, 767～783, 1989.
7） Royal, M. D., Darwash, A. O., Flint, A. P. F., Webb, R., Woolliams, J. A., Lamming, G. E.：*Anim Sci*, **70**, 487～501, 2000.
8） Butler, W. R.：*J Dairy Sci*, **81**, 2533～2539, 1998.
9） Colin-Schoellen, O., Laurent, F., Vignon, B., Robert, J. C., Sloan, B.：*J Dairy Sci*, **78**, 2807～2818, 1995.
10） Donkins, S. S., Varga, G. A., Sweeney, T. F., Muller, L. D.：*J Dairy Sci*, **72**, 1484～1491, 1989.
11） Misciatteilli, L., Kristensen, V. F., Vestergaard, M., Welsbjerg, M. R., Sejrsen, K., Hvelplund, T.：*J Dairy Sci*, **86**, 275～286, 2003.
12） Ferguson, J. D., Galligan, D. T., Thomsen, N.：*J Dairy Sci*, **77**, 2695～2703, 1994.

© The Ito Foundation

卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅱ）

Examination of new selection method of recipient cow based on ovarian reserves（Ⅱ）

小　山　　毅[1]・若　槻　拓　司[2]

（[1]北海道立総合研究機構畜産試験場，[2]北海道立総合研究機構酪農試験場）

Takeshi Koyama[1] and Takushi Wakatsuki[2]

（[1]Animal research center, Hokkaido research organization, [2]Dairy research center, Hokkaido research organization）

The aims of this study were to (1) determine the optimal evaluation time of anti-Müllerian (AMH) hormone concentration before and after calving and to (2) evaluate the risk factors affect the change in AMH concentration before and after calving in Holstein dairy cows. In experiment 1, plasma samples for AMH were collected from 142 Holstein dairy cows at 21 days before calving (prepartum), 21 days after calving (puerperal), and 42 days after calving (peak lactation). The relationship between AMH concentration at each evaluation time and conception at 100 days after calving was investigated by logistic regression models. There was significant relationship between AMH concentration at the peak lactation and conception at 100 days after calving. In experiment 2, the same cows as in experiment 1 were tested. The AMH ratio was calculated by dividing the AMH concentration at the peak lactation by the AMH concentration at prepartum and tested cows were classified into 3 categories (high, medium, and low) according to AMH ratio. The relationship between AMH ratio and milk yield after calving, dry matter intake, total digestible nutrients (TDN) sufficiency rate, blood metabolite concentrations were investigated by multiple regression models. Compared with H group, M and L group showed decreased serum albumin, magnesium, inorganic phosphorus, and calcium concentrations after calving. These findings suggested that inflammatory diseases occurred, and feed intake was low in M and L groups. Furthermore, TDN sufficiency rate in the M and L groups were lower than that in the H group. In conclusion, 1) AMH concentration at the peak lactation was appropriate for the evaluation of AMH concentration before and after calving, and 2) it was possible that changes in AMH concentration before and after calving were affected by prepartum and puerperal nutritional status.

1．目　　的

受精卵移植（ET）技術を活用して効率よく改良を行っていくためには，ET受胎成績の向上および高位安定化が必要である。そのためには従来から行われてきた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，主に供卵牛側からの取り組みに加え，受卵牛側からのアプローチが必要不可欠である。

近年，ウシの繁殖領域において卵巣予備能が注

© The Ito Foundation

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）濃度等によって評価することが可能である。卵巣予備能が高いウシでは発情周期中のプロジェステロンやエストラジオールなどの性ホルモン濃度が高く，子宮内膜が厚い[1]ことが報告されており，卵巣予備能が高いウシは受胎しやすい可能性がある。このため，受卵牛の卵巣予備能を評価することで，ETの受胎確率が高い牛を選定することが可能であると考えられる。

畜産現場で本技術を検証するにあたり，実際に黒毛和種受精卵の受卵牛として用いられるウシの多くが乳牛であることを考慮する必要がある。北海道では黒毛和種体内胚のETに用いられた受卵牛の約80％が乳牛であった[1]。乳牛と肉牛の最大の違いは，分娩後の乳量の急増と飼料摂取量の不均衡に伴う深刻な負のエネルギーバランス（NEB）が発生しやすいことである。分娩後のNEBは卵巣機能の低下を引き起こすため，卵胞の顆粒層細胞から分泌されるAMH濃度が低下する可能性が指摘されている[2, 3]。これは乳牛でAMH濃度を評価する場合，泌乳ステージ（乾乳，産褥期，泌乳前期等）を考慮する必要があることを意味する。

本研究では，卵巣予備能を活用した受卵牛選定技術を開発するために，主たる受卵牛の品種であるホルスタイン種経産牛を用いて，１）分娩前後における適当なAMH濃度の評価時期，および２）分娩前後におけるAMH濃度の変動に影響を及ぼす要因，を明らかにすることを目的とした。

２．方　法

2.1　ホルスタイン種経産牛におけるAMH濃度の評価時期の検討

北海道立総合研究機構酪農試験場で飼養されていた，ホルスタイン種142頭（平均産次：2.2±1.7，分娩時の平均年齢：3.2±1.3）を供試した。分娩２週前（分娩前），分娩後３（産褥期）および６週目（泌乳最盛期）に抗凝固剤としてEDTA-2Naが封入された真空採血管を用いて採血し，遠心分離後血漿サンプルを得た。血漿サンプル中のAMH濃度はウシAMH専用キット（Ansh Lab社，AL-114）を用いて測定した。供試牛について，分娩状況（難産，死産，双子分娩，胎盤停滞の有無），初回授精日数，授精に対する受胎の有無，除籍日および除籍理由，分娩後100日以内の周産期疾病（第四胃変位，ケトーシス，産褥熱，胎盤停滞，低カルシウム血症，蹄病，乳房炎）治療の有無，分娩後100日以内の繁殖疾病治療の有無，分娩前21日から分娩後100日までの可消化養分総量（TDN：日本飼養標準・乳牛2017年版を用いて算出）充足率，を調べた。統計解析は，分娩後100日時点の受胎の有無を目的変数とした，ロジスティック回帰分析を行った。目的変数と各説明変数の関係を単変量解析で調べ，$p < 0.15$の説明変数を多変量解析における説明変数の候補とした。最終モデルに投入する説明変数を，変数増加法により選んだ。$p < 0.05$の説明変数または交互作用を説明モデルとした。AMH濃度と分娩時の年齢は強制的にモデルに投入した。分娩後100日時点の受胎と関係が認められたAMH濃度の評価時期を，分娩前後における適切なAMH濃度の評価時期とした。

2.2　ホルスタイン種経産牛の分娩前後におけるAMH濃度の変動に影響を及ぼす要因の検討

試験2.1と同じ供試牛を用いた。分娩前，産褥期および泌乳最盛期に採血を行い，血清および血糖値測定用の血漿サンプルを得た。各サンプル中の血中栄養代謝産物濃度を生化学自動分析機（日立，3100）によって測定した。泌乳最盛期の

© The Ito Foundation

AMH濃度を分娩前のそれで除してAMH ratioを算出し，３区分（H，MおよびL群）した。分娩前，産褥期，および泌乳最盛期の血中栄養代謝産物濃度，乾物摂取量，乳量およびTDN充足率のそれぞれを目的変数とし，産次およびAMH ratio区分を説明変数とした重回帰分析を行い，AMH ratioと各目的変数の関係を調べた。

３．結果と考察

3.1　ホルスタイン種経産牛におけるAMH濃度の評価時期の検討

分娩前，産褥期および泌乳最盛期のAMH濃度の中央値（幅）は141（８―788），147（９―827）および142（８―793）pg/mlであり，採血時期の間で差は認められなかった。**Table 1** に，AMH評価時期間のAMH濃度の相関係数を示した。採血時期間の相関係数は0.7～0.9であり，強い正の相関を示した。AMH濃度は同一個体であれば採血時期が異なっても，その再現性が高いことが報告されている[5]。一方で，乾乳，分娩，泌乳などのライフサイクルにおいて，AMH濃度は少なからず変動することが報告されている[2～4]。採血時期ごとに，供試牛をAMH濃度によって３区分（高，中および低群）し，個体ごとに分娩前後におけるAMH濃度区分の変動を調べた。その結果40％の個体で，分娩前から泌乳最盛期までの間にAMH濃度区分が変動した。この結果から，分娩前後にAMH濃度を評価する場合は，時期を統一する必要があると考えられた。

Table2-1に，AMH評価時期と分娩後100日時点の受胎の有無との関係を示した。事前の解析で，AMH濃度と受胎の間に二次回帰的な関係が認められたため，モデルにはAMH濃度の二乗項を投入した。分娩後100日時点の受胎と関係が認められたのは泌乳最盛期のAMH濃度であった。二乗項の係数が正であることから，AMH濃度が低いまたは高い場合に受胎確率が高いことが推察された。AMH濃度が低かった個体には，分娩時の年齢が低い個体が多かったため，年齢の影響を受けている可能性が考えられた。そこで分娩時年齢の中央値である３歳を基準に２群に分け（３歳以上群，または３歳未満群），それぞれの群において再度AMH濃度と分娩後100日時点の受胎との関係を調べ，**Table2-2**に示した。分娩時年齢が３歳以上の個体では，泌乳最盛期のAMH濃度が上昇すると受胎確率が上昇したのに対し，３歳未満の場合はAMH濃度と受胎に関係が認められなかった。年齢が若い牛における卵巣予備能と繁殖性との関係については不明な点も多いため[6]，今後さらなる検討が必要である。以上の結果から，分娩前後にAMH濃度が変動する個体が多く，分娩後の受胎性と関係が認められたのは泌乳最盛期のAMH濃度であったことから，分娩前後においてAMH濃度を評価する時期は，泌乳最盛期が適していると考えた。

Table 1　Correlation coefficients for AMH concentrations at all sampling points.

	prepartum AMH	puerperal AMH	peak lactation AMH
prepartum[1] AMH	1.000	0.826	0.775
puerperal[2] AMH	0.826	1.000	0.910
peak lactation[3] AMH	0.775	0.910	1.000

1）21 days before calving
2）21 days after calving
3）42 days after calving

© The Ito Foundation

Table 2-1 Final logistic regression models of factors related to pregnancy at postpartum 100 days

Models	Variables	Estimate	Standard error	p value
Prepartum[1] AMH	Quadratic term of prepartum AMH	1.240E-06	3.413E-06	0.722
	Age at calving	-0.152	0.169	0.371
	First AI[4] days after calving	-0.064	0.013	< 0.01
Puerperal[2] AMH	Quadratic term of puerperal AMH	3.029E-06	2.109E-06	0.151
	Age at calving	-0.227	0.180	0.206
	First AI days after calving	-0.066	0.014	< 0.01
Peak lactation[3] AMH	Quadratic term of peak lactation AMH	0.061	0.026	0.020
	Age at calving	-0.275	0.178	0.122
	First AI days after calving	-0.068	0.014	< 0.01

1）21 days before calving
2）21 days after calving
3）42 days after calving
4）artificial insemination

Table 2-2 Final logistic regression models of factors related to pregnancy at postpartum 100 days by age at calving

Models	Variables	Estimate	Standard error	p value
Cows of 3 years old and over at calving	Peak lactation[1] AMH	0.004	0.002	0.037
	Age at calving	-0.203	0.277	0.465
	First AI[2] days after calving	-0.069	0.019	< 0.01
Cows of under 3 years old at calving	Peak lactation AMH	-0.002	0.002	0.401
	Age at calving	0.646	0.641	0.733
	First AI days after calving	-0.065	-3.180	< 0.01

1）42 days after calving
2）artificial insemination

3.2 ホルスタイン種経産牛の分娩前後におけるAMH濃度の変動に影響を及ぼす要因の検討

泌乳最盛期のAMH濃度を分娩前のそれで割り，AMH ratioを算出し，分布を基に３区分した（H，MおよびL群）。各群のAMH ratioは，H群で平均2.40（1.43―10.63），M群で平均1.15（0.93―1.42），およびL群で平均0.69（0.23―0.93）であった。採血時期ごとのAMH ratioと各栄養代謝産物濃度の関係を**Table 3**に示した。本研究では，AMH ratioとアルブミン，カルシウム（Ca），無機リン（iP）およびマグネシウム（Mg）との関係に注目した。アルブミンは総合的な栄養摂取状況および肝機能障害や慢性炎症の存在を反映して変化する。本試験では泌乳最盛期において，H群と比較してMおよびL群のアルブミン濃度が低かった。両群のTP，ASTおよびγGTPはおおむね正常範囲内であるため，タンパク不足や肝機能障害は考えにくい。Okawaら[7]は分娩後にAMH濃度が低下した個体ではアルブミン濃度とアルブミン―グロブリン比が低下し，子宮内膜炎の発生が認められたことを報告している。本試験ではグ

© The Ito Foundation

Table 3 Blood metabolite concentrations before and after calving for each AMH ratio group

	Prepartum[1)]			Puerperal[2)]			Peak lactation[3)]		
	H[1)]	M[1)]	L[1)]	H	M	L	H	M	L
TP（g/dl）	7.16 ± 0.18	7.42 ± 0.17	7.20 ± 0.17	7.45 ± 0.09	7.63 ± 0.09	7.63 ± 0.08	7.47 ± 0.10	*7.71*† ± *0.10*	*7.76** ± *0.09*
Alb（g/dl）	4.07 ± 0.03	4.02 ± 0.03	*3.98*† ± *0.03*	4.09 ± 0.06	3.99 ± 0.05	*3.83** ± *0.05*	4.24 ± 0.05	*4.10** ± *0.05*	*4.00** ± *0.04*
AST（IU/l）	63.2 ± 2.7	60.6 ± 2.6	60.8 ± 2.5	86.2 ± 3.5	86.2 ± 3.4	80.5 ± 3.3	77.2 ± 2.5	73.9 ± 2.5	*68.6** ± *2.4*
γGTP（IU/l）	23.0 ± 0.7	22.2 ± 0.7	*21.0** ± *0.6*	23.4 ± 9.8	44.1 ± 9.5	24.6 ± 9.2	26.3 ± 12.7	51.0 ± 12.4	25.8 ± 12.0
FFA（mEq/l）	0.20 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.51 ± 0.04	0.43 ± 0.03	0.41† ± 0.03	0.26 ± 0.02	0.26 ± 0.02	0.22 ± 0.02
Tchol（mg/dl）	93.7 ± 3.4	98.1 ± 3.3	99.8 ± 3.2	124 ± 5	133 ± 5	133 ± 5	180 ± 7	191 ± 6	186 ± 7
BUN（mg/dl）	10.1 ± 1.0	9.8 ± 0.9	11.4 ± 0.9	11.0 ± 0.5	10.2 ± 0.5	10.6 ± 0.5	11.4 ± 0.5	11.6 ± 0.5	11.0 ± 0.5
Glu（mg/dl）	67.2 ± 0.9	68.5 ± 0.8	68.4 ± 0.9	54.9 ± 1.4	55.1 ± 1.3	56.3 ± 1.4	56.0 ± 0.9	57.3 ± 0.9	*58.3*† ± *0.9*
Ca（mg/dl）	9.72 ± 0.07	9.70 ± 0.07	9.56 ± 0.07	9.92 ± 0.10	9.74 ± 0.10	*9.55** ± *0.10*	9.85 ± 0.10	9.69 ± 0.10	*9.59*† ± *0.10*
iP（mg/dl）	6.35 ± 0.11	*6.05** ± *0.10*	*5.87** ± *0.10*	5.08 ± 0.12	5.05 ± 0.12	5.17 ± 0.12	5.33 ± 0.12	5.21 ± 0.12	5.42 ± 0.12
Mg（mg/dl）	2.39 ± 0.06	2.47 ± 0.06	2.42 ± 0.06	2.52 ± 0.05	2.53 ± 0.05	2.52 ± 0.05	2.71 ± 0.05	*2.58** ± *0.05*	*2.58** ± *0.04*
BHBA（mol/l）	529 ± 19	522 ± 18	542 ± 18	1,107 ± 147	1,427 ± 143	1,188 ± 148	953 ± 96	968 ± 94	996 ± 91

1）21 days before calving, 2）21 days after calving, 3）42 days after calving

4）The AMH ratio was calculated by dividing the AMH concentration at the peak lactation by the AMH concentration at prepartum and classified into 3 categories（H：AMH ratio high, M：AMH ratio medium, L：AMH ratio low）. TP：total protein；Alb：albumin；AST：asparete aminotransferase；γGTP：γ-glutamyltransferase；FFA：free fatty acid；Tchol：total cholesterol；BUN：blood urea nitrogen；Glu：glucose；iP：inorganic phosphorus；Mg：magnesium；BHBA：β-hydroxybutyric acid.

Compared to AMH ratio H group, *：$p<0.05$, †：$p<0.1$

© The Ito Foundation

ロブリン濃度の測定，および子宮内膜炎の調査は行っていないが，MおよびL群では子宮内膜炎等の炎症性疾患が発生していたため，アルブミン濃度が低下した可能性が考えられた。乳牛において，Ca，iPおよびMgといったミネラル類の濃度低下は，飼料摂取量の低下が直接的原因であるとされている。MおよびL群はH群と比較して飼料摂取量が少なかった可能性がある。

Table 4 に，AMH ratioごとの乳量，乾物摂取量および可消化養分総量（TDN）充足率を示した。H群と比較すると，MおよびL群では分娩前および産褥期のTDN充足率が低かった。この時期の栄養状態は分娩後に排卵する卵胞の発育に影響を及ぼす可能性がある。Fairら[8]は，Hulshof[9]ら，Lussierら[10]の研究結果に基づき，原始卵胞から排卵卵胞までの発育に要する時間を約50～80日であることを示した。それに基づくと，泌乳最盛期にAMHを分泌していると考えられる前胞状卵胞から小型胞状卵胞は，分娩前後から産褥期にかけては原始卵胞から二次卵胞などの初期卵胞であったことが推察される。初期卵胞の発育にはインスリン様成長因子やインスリン等のホルモンの影響を受けることが報告されている[11]。分娩後にAMH濃度が低下した牛では相対的に栄養充足率が低かったため，これら成長因子の濃度が低かった可能性がある。そのため，泌乳最盛期にAMHを分泌していた主要な小型卵胞のホルモン産生能が低下し，AMH濃度が低下した可能性が考えられた。

本研究の結果から，ホルスタイン種乳牛において分娩前後にAMH濃度を評価するのに適しているのは，当該産次の繁殖成績と関連が認められた泌乳最盛期であること，分娩前後のAMH濃度の変動は，分娩前から産褥期の栄養状態に影響を受ける可能性があることが明らかになった。本研究結果は，AMH濃度を用いて受卵牛を選定する場

Table 4　Dry matter intake, milk yield and total digestible nutrients sufficiency rate before and after calving for each AMH ratio group.

AMH ratio[1)] Category	21 days before calving		21 days after calving			22–42 days after calving		
	DMI[2)] (kg)	TDN sufficiency rate[3)] (%)	Milk yield (kg)	DMI (kg)	TDN sufficiency rate (%)	Milk yield (kg)	DMI (kg)	TDN sufficiency rate (%)
H	12.8 ± 0.2	132 ± 2	33.5 ± 0.5	16.7 ± 0.3	72.6 ± 1.1	39.2 ± 0.5	21.2 ± 0.3	83.6 ± 1.1
M	11.8 ± 0.2*	123 ± 2*	31.9 ± 0.5*	15.8 ± 0.3*	70.2 ± 1.2*	37.6 ± 0.5*	20.2 ± 0.3†	82.3 ± 1.1
L	10.7 ± 0.2*	110 ± 2*	28.6 ± 0.5*	14.2 ± 0.3*	67.8 ± 1.2*	35.0 ± 0.5*	19.2 ± 0.3*	82.2 ± 1.1

1) The AMH ratio was calcuralted by dividing the AMH concentraiton at the peak lactation by the AMH concentration at prepartum, and classfied into 3 categories（H：AMH ratio high, M：AMH ratio medium, L：AMH ratio low）.
2) Dry matter intake, 3) Total digestible nutrients sufficiency rate calculated by Japanese feeding standard for dairy cattle（2017）
Compared to AMH ratio H group, *：p<0.05, †：p<0.1

© The Ito Foundation

合の基礎的知見となるとともに，ホルスタイン種乳牛の繁殖成績の改善に貢献できると考えられた。

４．要　約

本研究では，黒毛和種受精卵の受卵牛として主要な品種であるホルスタイン種142頭を供試し，抗ミューラー管ホルモン（AMH）濃度を用いた受卵牛選定技術の基礎的知見を得るために，分娩前後における適切なAMH濃度評価時期の検討，および分娩前後のAMH濃度変化に影響を及ぼす要因の検討を行った。分娩前21日（分娩前），分娩後21日（産褥期）および分娩後42日（泌乳最盛期）に血漿中AMH濃度を測定し，分娩後100日時点の受胎の有無との関係を調べた。泌乳最盛期におけるAMH濃度が受胎の有無と関係していたことから，分娩前後のAMH評価時期は泌乳最盛期が適していると考えた。泌乳最盛期と分娩前のAMH濃度の比率（AMH ratio）を算出して３区分（H，MおよびL群）し，分娩前後の血中の代謝産物濃度および飼養成績との関係を調べた。H群と比較して，MおよびL群は分娩後に血清中アルブミン，マグネシウム，無機リン，およびカルシウム濃度の低下が認められ，炎症性疾患の発生および飼料摂取量が少ないことが推察された。また，MおよびL群の分娩前および産褥期の可消化養分総量充足率は，H群のそれと比較して低く，分娩後のAMH濃度の低下は分娩前後の栄養状態の影響を受けていることが推察された。

文　献

1）　一般社団法人北海道家畜人工授精師協会：北海道乳・肉用牛人工授精・受精卵移植実施成績，p.43, 2019.
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）　Monniaux, D., Drouilhet, L., Rico, C., Estienne, A., Jarrier, P., Touzé, J. L., Sapa, J., Phocas, F., Dupont, J., Dalbiès-Tran, R., Fabre, S.：*Reprod. Fertil. Dev*., **25**(1), 1～16, 2012.
4）　Alward, K. J., Graves, W. M., Palomares, R. A., Ely, L.O., Bohlen, J. F.：*Theriogenology*, **168**, 83～89, 2021.
5）　Gobikrushanth, M., Dutra, P. A., Bruinjé, T. C., Colazo, M. G., Butler, S. T., Ambrose, D. J.：T*heriogenology*, **92**, 90～94, 2017.
6）　Umer, S., Zhao, S., Sammad, A., Sahlu, B., Yunwei, P., Zhu, H.：*Genes*, **10**, 1009, 2019.
7）　Okawa, H., Monniaux, D., Mizokami, C., Fujikura, A., Takano, T., Sato, S., Shinya, U., Kawashima, C., Yamato, O., Fushimi, Y., Vos PLAM, Taniguchi, M., Takagi, M.：*Animal* (*Basel*), **26**, 11(5), 1241, 2021.
8）　Fair, T.：*Anim Reprod. Sci*. **78**, 203～216, 2003.
9）　Hulshof, S. C., Figueiredo, J. R., Beckers, J. F., Bevers, M. M., van den Hurk, R.：*Vet. Q*., **16**, 78～80, 1994.
10）　Lussier, J. G., Matton, P., Dufour, J. J.：*J, Reprod, Fertil*., **81**, 301～307, 1987.
11）　Beam, S. W., Butler, W. R.：*J. Reprod. Fertil. Suppl*., **54**, 411～424, 1999.

© The Ito Foundation

アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究（Ⅳ）

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
(Department of Veterinary Medical Science, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

There are several routes of African swine fever (ASF) introduction into a country. Among the possible routes of entry, quarantine policies determine the possibility of introduction by legal import of live pigs. This study aimed at assessing the probability of ASF introduction through legal import of live pigs during the high-risk period using a quantitative stochastic approach during 2011-2020. Scenario tree modelling was used with the following entry and exposure pathway considered to be the most likely route of ASF entry : an ASF infected pig is selected for export in the country of origin during the high-risk period ; the pig survives ASF infection ; the pig survives transportation to Japan; the imported pig is not quarantined, or the imported pig is quarantined but undetected during quarantine. The result indicates that the mean annual probability of ASF introduction by legal import of live pig was 1.88×10^{-9} (90 % prediction interval : $0.74 - 3.92 \times 10^{-9}$), of which Denmark and Canada assumed 44.2% and 39.3% of the mean annual risk, respectively. Monthly probability of ASF introduction was highest in June, followed by July, March and September. The current import quarantine policy of Japanese government may be enough to block the introduction of the virus via legal import of live pigs, and it should be continually enforced. This result can help to elucidate source of infection and to minimize the catastrophic consequences of the potential ASF introduction into Japan by designing risk mitigation strategies such as preventing ASF free countries from exporting live pigs during the high-risk period once they are affected with ASF.

1．目　　的

アフリカ豚熱（ASF）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。致死率はほぼ100％に達する。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年コーカサス地方のジョージアで突如として確認され，その後，東欧諸国およびロシアに拡がった。2018年中国で初めて確認さ

© The Ito Foundation

れ，中国国内で急速に拡がるとともに隣国の韓国，モンゴル，さらに東南アジア諸国でも発生が確認され甚大な被害をもたらしている。現在（2022年３月）までにアジア15か国に拡がり，日本への侵入リスクはかつてなく高まっている。

ASFウイルスの侵入経路はさまざまである。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）。また，最近のヨーロッパでの拡大では，感染イノシシや豚の移動が原因となった事例が報告されている。

生きた豚および豚肉製品の輸入はASFの重要な侵入経路であることから，国際獣疫事務局（OIE）は，国際基準に則った輸入検疫を実施するか，リスク評価の結果に基づき必要なリスク管理を実施することを奨励している。OIE陸生動物衛生コードによると，ASF汚染国または地域から生きた豚を輸入する場合には，過去３カ月間ASFの発生のない経営体で飼養されたか，検疫を少なくとも30日間受け検疫開始21日以降にウイルス学的および血清学的検査を受け陰性であることを輸入条件として要求すべきとしている。

日本は，家畜伝染病予防法に基づきASF発生国からの生きた豚，豚肉の輸入を禁止するというOIE基準より厳しい水際措置を講じている。また，ASF清浄国からの生きた豚，豚肉の輸入にあたっても，ASFが発生した場合にはただちに日本向けの輸出を停止することなどの条件を輸出国当局と取り決めており，この条件に基づきASF清浄国でASFの発生が確認されると，生きた豚とその製品の輸出はただちに禁止される。しかし，最初に感染した豚が発見され当局に通報され禁止措置がとられるまでの間（高リスク期間），ASFウイルスに感染した生きた豚とASFウイルスを含む豚製品は，合法的に搬出され，清浄国に輸出される可能性がある[1)]。一方，ASFと同様に伝播力の強い口蹄疫および豚熱については，最近の一部のヨーロッパ諸国では高リスク期間中の家畜の移動を通じてわずか１～２週間で広範な拡散が生じることが示されている[2, 3)]。

このような状況にかんがみ，本研究では，日本が生きた豚の輸入を認めている清浄国にASFが侵入し最初の感染豚が確認され輸出禁止措置がとられるまでの高リスク期間に生きた豚が輸出され，日本にASFが侵入するリスクを定量的に評価した。

２．材料と方法

2.1　リスク評価モデル

生きた豚の輸入を通じた日本へのASF侵入リスクの定量的評価は，先行研究で使用されたモデルと同様のモデルを用いて行った[4, 5)]（**Fig. 1**）。分析対象国については，過去10年間に日本への豚の輸出実績があったカナダ，米国，フランス，ドイツ，デンマーク，オランダ，英国およびアイルランドの８か国とした。なお，これらの国ではいずれも過去10年間，豚でのASF発生の報告はなかった（**Table 1**）。

まず，ある月mのある輸出国oからの生きた豚輸入に伴うASF発生リスクP_odmを，①侵入リスクP_re（輸出国から輸入された１頭の豚がASFウイルスに感染している確率），②仮にASFウイルス感染豚が日本に輸入された場合に国内の豚と接触し，ASFウイルス感染を生じる確率（P_ex）および③月mに輸出国oから日本に輸入される生きた豚の頭数（n_odm）から，二項プロセスを用いて，次式により予測した。

$$P\_odm = 1 - (1 - P\_re \times P\_ex)^{n\_odm}$$

次に，月別の全世界からの侵入リスクP_mは，

© The Ito Foundation

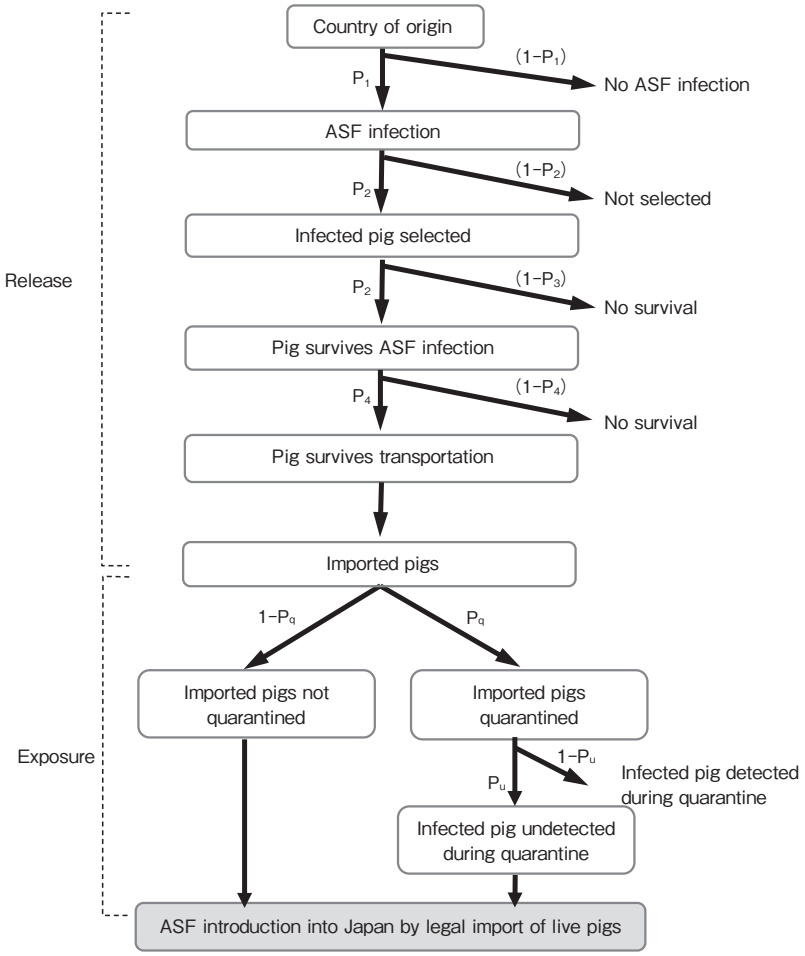


Fig. 1 A scenario tree used to assess the risk of ASF introduction into Japan via legal importation of live pigs

Table 1 Number of pigs imported to Japan and ASF status of the country of origin

Country of origin	Pigs imported into Japan from 2011 to 2020		ASF status
	Heads	%	
Canada	3,526	33.7%	Free
United States of America	1429	13.6%	Free
France	303	2.9%	Free
Germany	6	0.1%	Free
Denmark	4189	40.0%	Free
Netherlands	503	4.8%	Free
United Kingdom	488	4.7%	Free
Ireland	26	0.2%	Free
Total	10,470	100.0%	

© The Ito Foundation

$$P\_m = 1 - \prod_{o} (1 - P\_odm)$$

次に，国別の年間侵入リスクP_oは，

$$P\_o = 1 - \prod_{m} (1 - P\_odm)$$

最後に，全世界からの年間侵入リスクP_fは，

$$P\_f = 1 - \prod_{o} (1 - P\_o)$$

これらの確率を推定するために，４つの仮定を行った。①分析対象とした10年間に輸出国でASFの発生報告がなかった場合，その国でのASF発生は最大で1,000年に１回とする，②高リスク期間中のASF発生数を推定にあたり，いずれの輸出国においてもサーベイランスおよび輸出検査能力は同等レベルとする，③輸入された豚はすべて日本国内の養豚場へ仕向けられる，④感染ウイルスは，アジアにおける豚での発生の原因となっている急性型ASFウイルスとする。

2.2　侵入リスク評価

侵入リスク（輸出国から輸入された１頭の豚がASFウイルスに感染している確率）は，特定の月mに輸出国から高リスク期間中にASFウイルスに感染した豚が摘発されずに日本に輸入される確率である。P_reは，次の４つの条件付き確率をもとに次式により推定した。①輸出国でのASFウイルス感染の確率（$P1$），②輸出国でASF感染豚が確認される前に（すなわち，高リスク期間中に）ASF感染豚が輸出用に選択される確率（$P2$），③ASF感染豚がASFにより死亡しない確率（$P3$），④ASFウイルス感染豚が輸出国から日本への輸送中にASF以外の原因で死亡しない確率（$P4$）。

$$P\_re = P1 \times P2 \times P3 \times P4$$

2.3　曝露評価

仮にASFウイルス感染豚が日本に輸入された場合，国内の豚と接触しASFウイルス感染を生じる確率（P_ex）は，次式により推定した。

$$P\_ex = P\_q + (1 - P\_q) \times P\_u$$

ただし，P_qは輸入されたASFウイルス感染豚が検疫を受けない確率であり，P_uは検疫を受けた感染豚が検疫中に確認されない確率である。

2.4　入力変数およびデータ源

輸出国でのASFウイルス感染の確率（$P1$）は，ベータ分布$Beta$（α_1，α_2）を用いてモデル化した。α_1は国内で未確認のASFの発生が少なくとも１回あった月数＋１であり、α_2は分析対象期間の月数－α_1＋１である[6]（**Table２**）。ASF発生頭数は，OIEへの緊急およびフォローアップ通報のデータをもとに推定した[6]。

ASFウイルスに感染した豚がある月mに輸出用に選択される確率（$P2$）についても，Beta分布を用いてモデル化した。ベータ分布の形は，原産国でASFの発生が確認される前に推定されるASFウイルス感染豚の頭数（NI）と輸出国における豚飼養頭数（No）をもとに推定した。NIは，３つの独立したパラメータの積として推定した。すなわち，①各輸出国における高リスク期間中に検出されなかった発生農家戸数（Ou）[6]（Pert分布を用いてモデル化），②輸出国内の養豚場の平均飼養頭数（To）（輸出国における養豚農家戸数（So）および総飼養頭数（No）[7]から推定）（平均値（μ）および標準偏差（σ）で表される正規分布を用いてモデル化），③ASF群内有病率（Hp）[6]への報告データから得られた感受性動物に対する症例の割合の最小値，最大値および平均値を用いてPert分布によりモデル化）。

ASF感染豚の生存率（$P3$）と輸送生存率（$P4$）については，先行研究[8, 9]に基づきPert分布を用いてモデル化した。

輸入されたASFウイルス感染豚が検疫を受けない確率（Pq）は，日本では輸入される豚はすべて動物検疫と着地検疫の対象となることから，

© The Ito Foundation

Table 2 Description and parameterization of model inputs for assessing the risk of ASF introduction into Japan via legal import of live pigs

Notation	Definition	Parameterization	Values	Source
P 1	Prob of ASF infection in the country of origin	Beta（X＋1，M－X＋1）	X：number of months with undetected ASF outbreaks; M: number of months subjected to analysis ASF free countries: Beta（2, 12000）	OIE（2021）
Ou	Number of undetected outbreaks during high-risk period（HRP）	Pert（min, most likely, max）	Free countries: Pert（1, 1, 1）	Mur et al.（2012）
No	Pig population in the country of origin	Fixed value	Ireland：1644121	OIE（2019）
So	Number of pig establishments in the country of origin	Fixed value	Ireland：1631	OIE（2019）
To	Average herd size in the country of origin	No/So	Ireland：1008	OIE（2019）
Hp	Intraherd prevalence	Pert（min, most likely, max）	Free countries（0, 0.21, 1）	OIE（2021）
NI	Number of ASF infected pigs in the country of origin	Ou×To×Hp	Derived from other parameters.	
P 2	Prob of selecting ASF infected pig	Beta（NI＋1，No－NI＋1）	Derived from other parameters.	
P 3	Prob that an ASF infected pig survives the infection	Pert（min, most likely, max）	Pert（0.05, 0.2, 0.8）	Spickler and Roth（2006）
P 4	Prob that an ASF infected pig survives the transportation	Pert（min, most likely, max）	Pert（0.0005, 0.0027, 0.092）	Murray and Johnson（1998）
Pre	Prob than an ASF-infected pig from origin country enters a farm in Korea	Pre＝P1×P2×P3×P4	Derived from other parameters.	
Pq	Prob that imported pigs were not quarantined	Fixed value	0	Assumption
Pu	Prob that an ASF-infected pig passes undetected during quarantine	Parameters reflect the belief that, most likely, infected pigs will be detected during the quarantine in 99% of the cases with 95% confidence that the probability of detection is not less than 90%.	Beta（1.33, 34.16）	Martinez-Lopez et al.（2009）
Pex	Prob of an imported ASF-infected pig coming into contact with pigs in Korea	Pex＝Pq＋[1－Pq]×Pu	Derived from other parameters.	
nodm	Imports of live pigs from origin country	Normal（μ, σ）	Denmark/January：Normal（11.4, 28.4）	Ministry of Finance（2021）
Pf	Probability that an ASF-infected pig from origin country enters a farm and results in transmission in Japan in month m	$Pf = \Sigma 1-(1-Pre\times Pex)^{nodm}$	Derived from other parameters.	

０％とした。検疫を受けた感染豚が検疫中に確認されない確率（*Pu*）は検疫中に臨床症状に基づいて豚熱感染豚が検出されない確率を用いて推定した[10]。ASFと豚熱は，類似の臨床症状を示す[11]ことから合理的な仮定である（**Table 2**）。

ある特定の月*m*に輸出国*o*から日本に輸入される生きた豚の頭数（*n_odm*）については，2011～2020年までの10年間の国別および月別の豚の輸入頭数[12]をもとに平均値および標準偏差を求め，正規分布を用いてモデル化した。

2.5　シミュレーション計算

リスク評価モデルは，@Riskバージョン7.6（Palisade, Ithaca, New York）をアッドオンしたMicrosoft®Excel 2013を用いて作成した。シミュ

© The Ito Foundation

レーションは，ラテンハイパーキューブ法抽出による10000回反復計算により行った。モデル出力結果は，平均値（５パーセンタイル，95パーセンタイル）で表示した。

2.6　シナリオアナリシス

ベースラインモデルでは，清浄国における生きた豚の感染の確率（P1）については，先行研究[4, 5]にならい侵入リスクを1000年に１回と仮定した。しかしながら，ヨーロッパ諸国ではイノシシの移動を通じて感染が拡大していることを考えると，侵入リスクはさらに高いことも予想される。そこでこれらの国における侵入リスクを100年に１回，10年に１回または１年に１回に変化させることにより日本への侵入リスクがどう変化するかを検証した。

3．結果と考察

生きた豚の合法的な輸入による日本へのASF侵入の年間確率は，1.88×10^{-9}（0.74×10^{-9}，3.92×10^{-9}）と推定された。この年間確率は，6.91×10^{8}（0.26×10^{8}，1.34×10^{8}）年に１回の侵入に相当する。デンマークが年間確率の44.2％を占め，カナダ（39.3％），オランダ（6.1％），英国（5.1％）と続いた（**Fig. 2**）。月別の侵入確率については，

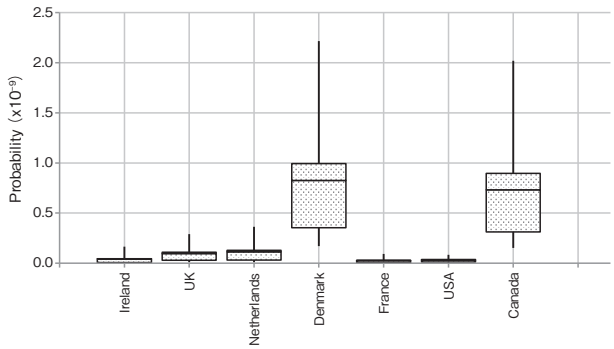


Fig. 2　Probability of ASF introduction into Japan via legally imported pigs by country（*P_o*）. For each box-whisker plot, the line in the box indicates the mean; the length of the box indicates the inter-quartile range; the whiskers indicate the 5th percentile and the 95th percentile respectively.

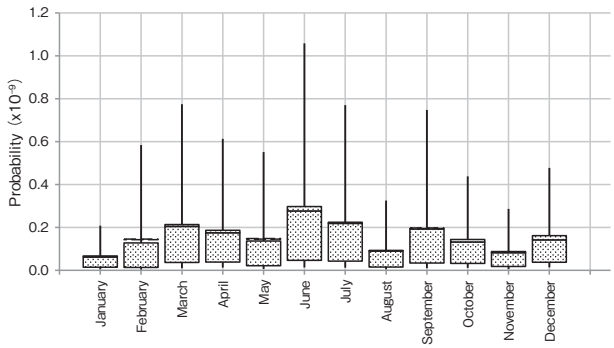


Fig. 3　Probability of ASF introduction into Japan via legally imported pigs by month（*P_m*）. For each box-whisker plot, the line in the box indicates the mean; the length of the box indicates the inter-quartile range; the whiskers indicate the 5th percentile and the 95th percentile respectively.

© The Ito Foundation

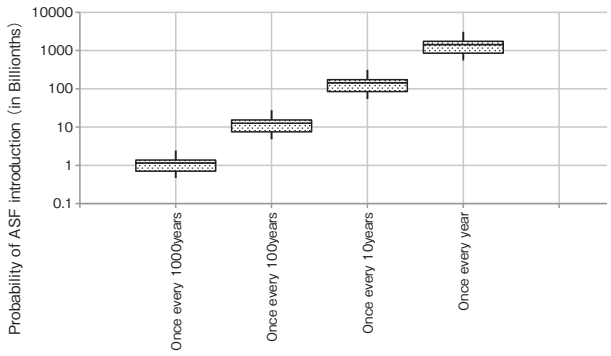


Fig. 4　Scenario analysis depicting the effects of tested scenarios on the probability of ASF intoruction into Japan via legally imported pigs（*P_f*）. For each box-whisker plot, the line in the box indicates the mean; the length of the box indicates the inter-quartile range; the whiskers indicate the 5th percentile and the 95th percentile respectively.

６月が最も侵入確率が高く，続いて７月，３月，９月が高かった（**Fig. 3**）。

シナリオアナリシスの結果，清浄国における侵入確率が100年に１回，10年に１回，１年に１回と高くなると，日本への侵入確率も1.89×10^{-8}（7.49×10^{-9}，3.92×10^{-8}），1.86×10^{-7}（7.40×10^{-8}，3.87×10^{-7}），1.62×10^{-8}（6.58×10^{-7}，3.33×10^{-6}）と増加した（**Fig. 4**）。

生きた豚の合法的な輸入に伴い，日本にASFが侵入する確率はきわめて低いことが分かった。きわめて低いながらも，日本への輸出実績のある８か国中ではデンマークおよびカナダの２か国が日本への輸出頭数が多いことから侵入リスクの大部分を占めることが分かった。

日本への生きた豚の輸入が認められている国・地域は，現在33ある[13]。これらの国・地域の家畜衛生当局と日本の家畜衛生当局との間で事前に取り決められた家畜衛生条件に基づき，ASFの発生が確認された場合には日本への生きた豚の輸出をただちに停止することとされている。これらの国・地域のうちドイツ，ハンガリー，ベルギーおよびポーランドでは最近ASFの発生がそれぞれ2020年９月，2018年４月，2018年９月および2014年２月に報告されたことから，家畜衛生条件に基づき最初の発生が報告された後，ただちに日本への生きた豚の輸入停止措置がとられた。これらの国からはたまたま日本への生きた豚の輸入は行われていなかったことから，これらの国からの生きた豚の輸入に伴うリスクはなかった。しかしながら，輸入実績のあるデンマーク，オランダ，英国や今後潜在的に日本への輸出の可能性があるその他の清浄国・地域のうち，ヨーロッパ大陸に存在する国・地域ではイノシシの移動による侵入リスクは高まっている。これらの国からの生きた豚の輸入にあたっては，最初の発生が確認された直後から日本への輸出を停止することが条件付けられているが，シナリオアナリシスの結果を踏まえると，万一侵入した場合に高リスク期間中に輸出されないようにする対策をとることがリスク管理に効果的と考えられる。

４．要　　約

アフリカ豚熱（ASF）について考えられるさまざまな侵入経路のうち生きた豚の合法的輸入による侵入の可能性は，どのような検疫措置がとられるかにより左右される。本研究の目的は，2011

© The Ito Foundation

年から2020年までのデータと定量的確率論的アプローチを用いて輸出国から高リスク期間に合法的に輸出され日本に輸入される生きた豚によるASF侵入の可能性を評価することである。シナリオツリーを用いてASFの侵入経路として最も可能性が高いと考えられる以下の侵入および暴露経路を前提としたリスク評価モデルを作成した。すなわち，日本向けに輸出される豚はASFウイルスに感染していても農場で死亡せず，日本への輸送中にも死亡せず，輸入後も検疫を免れるか，検疫を受けてもASFが検出されない場合に侵入すると仮定した。リスク評価の結果，生きた豚の合法的輸入によるASF年間侵入確率は，1.88×10^{-9}（90％予測区間：$0.74-3.92\times10^{-9}$）であり，デンマークおよびカナダが侵入確率の44.2％および39.3％をそれぞれ占めた。月別のASF侵入確率については，６月が最も高く，続いて７月，３月，９月が高かった。日本の現行の輸入検疫措置は，生きた豚の輸入に伴うASFウイルスの侵入阻止には十分である可能性が高く，今後も引き続き適用されることが望まれる。本研究の結果から，ASF清浄国が侵入時に早期に感染源を発見し，ASF感染の高リスク期間中に生きた豚を輸出することを防止するなどのリスク低減措置をとることにより、潜在的な日本への侵入に伴う壊滅的な結果を最小限に抑えるのに有用であることが分かった。

文　献

1） Horst, H. S., *et al.*：Introduction of contagious animal diseases into The Netherlands: elicitation of expert opinions, *Livestock Production Science*, **53**(3), 253～264, 1998.

2） Bouma, A., *et al.*:The foot-and-mouth disease epidemic in The Netherlands in 2001, *Preventive Veterinary Medicine*, **57**(3), 155～166, 2003.

3） Greiser-Wilke, I., *et al.*：Molecular epidemiology of a large classical swine fever epidemic in the European Union in 1997-1998, *Veterinary Microbiology*, **77**(1-2), 17～27, 2000.

4） Herrera-Ibatá, D. M., *et al.*：Quantitative approach for the risk assessment of African swine fever and Classical swine fever introduction into the United States through legal imports of pigs and swine products, *PLoS One*, **12**(8), e0182850, 2017.

5） Cho, K. H., *et al.*：Quantitative risk assessment of the African swine fever introduction into the Republic of Korea via legal import of live pigs and pig products, *Transbound Emerg Dis.*, **68**(2), 385～396, 2021.

6） World Organization for Animal Health（OIE）. 2019. WAHID database. Immediate notifications and follow-ups. Retrieved from http://web.oie.int/wahis_2/public_wahid.php/Diseaseinformation/Immsummary.

7） World Organization for Animal Health（OIE）. 2021. WAHID database. Animal Population, Country information. Retrieved from http://web.oie.int/wahis_2/public_wahid.php/Diseaseinformation/Animalpopulation.

8） Spickler, A. R., *et al.*：Peste Porcina Africana, College of Veterinary Medicine: Iowa State University, 2006. Retrieved from http://www.cfsph.iastate.edu/?lang=en.

9） Murray, A. C., *et al.*：Impact of the halothane gene on muscle quality and pre-slaughter deaths in Western Canadian pigs, *Canadian Journal of Animal Science*, **78**, 543～548, 1998.

10） Martínez-López, B., *et al.*：A stochastic model to quantify the risk of introduction of classical swine fever virus through import of domestic and wild boars, *Epidemiology and Infection*, **137**(1), 1505～1515, 2009.

11） Sánchez-Vizcaíno, J. M., *et al.*：Chapter 25 African swine fever virus. In B. E. Straw, J. J. Zimmerman, S. D'Allaire, & D. J. Taylor（Eds.）, Diseases of Swine, 9th ed.（pp. 291-298）, Ames, IA: Blackwell Publishing Professional, 2006.

12） 財務省：貿易統計　https://www.customs.go.jp/toukei/info/

13） 農林水産省：家畜伝染病予防法施行規則　https://elaws.e-gov.go.jp/document?lawid=326M50010000035

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Detection of fever of Japanese Black calves by ventral tail base surface temperature（Ⅱ）

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 19 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. Two types of tail-attached methods were performed to compare the effectiveness of the methods: Method 1 used attachment unit with a rubber loop with hook-and-loop fasteners (N＝9), and Method 2 used attachment unit that drilled hole by punching pliers without the rubber loop (N＝10). Of 19 calves, proportions of calves that not drop their sensor in both methods were 100%. Both methods were able to attach the sensor more than one month. Some calves in Method 1 had hair loss in the position of sensor attached, whereas no calves had hair loss in Method 2. ST was ranged from 36℃ to 37℃ during the studied period, but slight drop of ST was found in 30 days or later after attachment. Additionally, circadian change of ST was found: the lowest and highest ST were observed around 6 am and 5 pm, respectively. In this study, no calves showed clinical sing of respiratory disease during experimental period, and we were not able to develop fever prediction model. In conclusion, the present study found appropriate method to obtain ventral tail base ST.

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廃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廃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

© The Ito Foundation

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，簡易的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ことだけではなく，その治療に要する日数およびコストの低減にも繋がる。

これらの課題を解決するために，我々は昨年度に無線小型センサを活用した黒毛和種育成子牛の発熱検知手法の開発を試みた。この研究により，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可能であることを明らかにした。しかし，課題として，無線小型センサの安定的な装着方法の確立およびセンサ装着箇所の脱毛等の外貌所見への影響があげられた。そのため，本手法を生産現場で普及していくためには，これらの点を改善する必要があることが明らかになった。また，昨年度の研究では異常検知の敏感度は高く，真に発熱がみられた個体は100％異常を検知できたものの，偽陽性の検知も多かったことにより，全体の陽性反応的中度は低かった。このことより，陽性反応的中度を向上させるために，機械学習アルゴリズムを用いた異常検知の自動検出法の開発が必要である。

そこで本研究では，無線小型センサの安定的かつ非侵襲的な装着方法を検討すること，そして得られた体表温度のデータから異常検知を効果的に検出するために，機械学習アルゴリズムを用いた異常検知の自動検出法を開発することを目的とした。

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ストール当たり５―７頭で飼育されていた。

試験は2021年８月から2022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５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，⑤子牛の所有者が試験に供することを拒否している。その結果，本試験では生後４―７ヶ月齢の育成子牛19頭（去勢牛５頭，雌牛14頭）を供試した。

2.2　試験方法

試験には無線小型センサ（縦26mm×横21mm

© The Ito Foundation

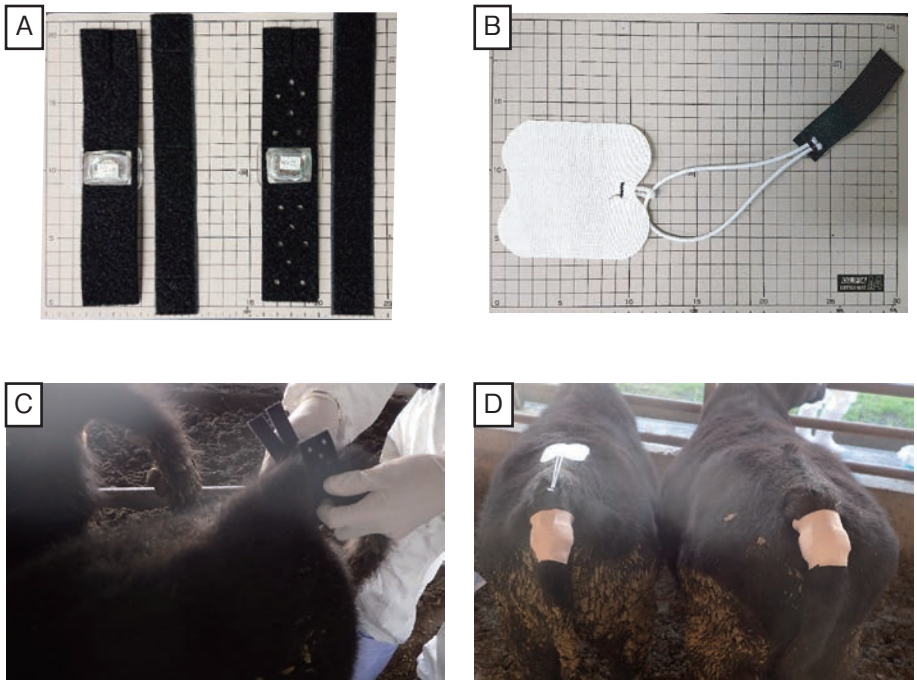


Fig. 1　Structure and usage of the wearable wireless surface temperature (ST) sensor. A) ST sensor in an attachment unit. Left unit is method 1, and right unit is method 2. B) A rubber loop with hook-and-loop fasteners that used for method 1 to stabilize the sensor. C) Sensor attachment unit fixed on the surface of the ventral tail base. D) Sensor attachment unit suspended from the back of the animal and wrapped with elastic medical bandages.

×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，昨年度に実施した試験結果を参考に，以下２つの装着手法を用いた。

試験区１：成牛用に用いられている資材（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）[4] を子牛用に改良した資材（昨年度に実施した装着方法のうち，最も装着が安定していたが，センサ装着箇所に脱毛あり）で，昨年度よりも脱落防止用腰部補助布の形状を大幅に縮小した資材

試験区２：試験区１の資材に用いるセンサ梱包用マジックベルトにペンチで細かい穴を複数箇所に開け，その穴の部分に被毛が絡まる形状とし，脱落防止用腰部補助布は使用しない

試験に用いたセンサの形状およびセンサの装着に用いたベルトを**Fig. 1** に示した。試験区１は９頭，試験区２には10頭の子牛を用いた。

センサ装着時点における子牛の平均日齢は158±22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，１ヶ月を経過しても異常がみられなかった場合は，２ヶ月を上限としてセンサの取付を継続した。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

© The Ito Foundation

Table 1　Comparisons of proportions of calves that not drop their sensor and the number of days from attachment to removal of sensor between two types of tail-attached methods

Types[1]	Proportions of calves that not drop their sensor	Number of days from attachment to removal of sensor（±SD）
Method 1	100%（9/9）	40.9±13.3days
Method 2	100%（10/10）	43.2±14.9days

[1] Method 1 used attachment unit with a rubber loop with hook-and-loop fasteners. Method 2 used attachment unit that drilled hole by punching pliers without the rubber loop.

欲不振や呼吸器疾患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，２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（≦30℃，≧45℃，連続記録が±１℃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。また発熱の定義として，昨年度の解析において用いた「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」の２つを主軸として用いた。

３．結果と考察

本試験に用いた育成子牛19頭のうち，すべての子牛で，装着予定期間である１ヶ月間の装着ができた。このうち６頭（試験区１で３頭，試験区２で３頭）は，試験農場の飼養管理上の理由で，１ヶ月が経過した後にセンサの取り外しを行った。残りの13頭は，センサのズレや明らかな脱落兆候，センサ装着部位やその周囲の外貌異常がみられず，体表温度の数値も安定していたため，センサの装着を継続した。その結果，13頭のうち，すべての子牛でセンサの取付の上限である２ヶ月まで，センサのズレや明らかな脱落兆候，センサ装着部位やその周囲の外貌異常がみられず，体表温度の数値も安定していた。２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。両試験区において，非脱落割合は100％であり，装着日数は試験区１で40.9日，試験区２で43.2日であり，両試験区の間で有意な差はなかった。また，センサを取り外した際に，試験区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。試験区２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，両試験区において，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，両試験区ともに安定した装着方法であることが明らかになった。しかし，試験区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，試験区２では，装着に要する時間が試験区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。そのため，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観点より，試験区２で活用した資材を用いることが有用であると考えられる。ただし，今回の試験では子牛の毛が生え変わる時期に試験を行えなかったことより，今後は１年を通じて試験区２で用いた資材の効果を検証する必要がある。

体表温度の実測値に関して，本試験に用いた育

© The Ito Foundation

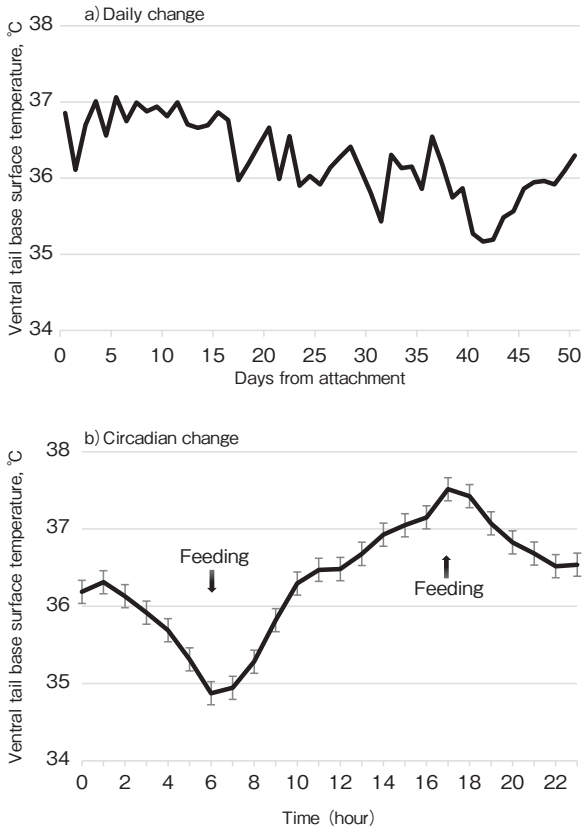


Fig. 2　Daily change (a) and circadian change (b) of ventral tail base surface temperature

成子牛19頭の経時的変化および日内変動の推移を**Fig. 2**に示した。体表温度の実測値は36―37℃の間で推移していたが，装着経過日数が30日を超えたあたりにおいて，体表温度がやや低下していた。これは装着日数の経過に伴い，センサ装着部位がややずれていたことが可能性として考えられる。そのため，装着日数が長くなった際は，センサの装着部位を定期的に確認することが推奨される。また，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。尾根部の体表温度を測定したデータは成牛では多く報告されているが[5~8]，子牛のデータはあまり報告されていないため，今後も継続した調査が必要である。

本試験に用いた育成子牛19頭のうち，装着期間中に呼吸器疾患異常がみられた個体はいなかった。同様に，「体表温度の実測値が４時間以上39℃を超えた子牛」または「過去３日間の同時刻平均値が４時間以上１℃を超えた子牛」もいなかった。本研究では，呼吸器疾患異常や発熱がみられた個体を対象として，これらの兆候を早期に検知するための機械学習アルゴリズムの開発を目指していたが，対象となる子牛のデータを収集することができなかったため，この開発を行うことができなかった。今後の展望として，呼吸器疾患

© The Ito Foundation

異常や発熱がみられた個体における体表温度を複数等から収集することにより，発熱が検知される前における体表温度の各種数値および個体の血統情報や飼養環境などの情報を用いて，異常の自動検出に関する最適な予測検知モデルを開発することが望まれる。

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，無線小型センサの安定的かつ非侵襲的な装着方法を検討すること，そして得られた体表温度のデータから異常検知を効果的に検出するために，機械学習アルゴリズムを用いた異常検知の自動検出法を開発することを目的とした。データは４―７ヶ月齢の黒毛和種育成子牛19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２つの方法を用いて有効性を検討した：試験区１．成牛用に用いられている資材（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）を子牛用に改良した資材（Ｎ＝９），試験区２．試験区１の資材に用いるセンサ梱包用マジックベルトにペンチで穴を開け，その部分に被毛が絡まる形状とし，脱落防止用腰部補助布は使用しない（Ｎ＝10）。両試験区において，センサの非脱落割合は100％であり，センサは１ヶ月以上安定して装着できた。センサを取り外した際に，試験区１では一部の個体で被毛短縮が確認されたが，試験区２ではほとんど確認されなかった。体表温度の実測値は36―37℃の間で推移していたが，装着経過日数が30日を超えたあたりにおいて，体表温度がやや低下していた。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。また，装着期間中に呼吸器疾患異常がみられた個体はいなかったことより，呼吸器疾患異常や発熱となる子牛のデータを収集することができなかったため，機械学習アルゴリズムの開発を行うことができなかった。結論として，子牛の体表温度を安定して測定するためには，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観点より，試験区２で活用した資材を用いることが有用であると考えられる。

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）　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.

５）　Miwa, M., Matsuyama, S., Nakamura, S., Noda, K., Sakatani, M.：Prepartum 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.

６）　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.

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.

© The Ito Foundation

イノシシにおける豚コロナウイルスの感染実態調査

Epidemiological survey of porcine coronavirus-infection in Japanese wild boars

中　川　敬　介

（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）

Keisuke Nakagawa

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

In Japan, infectious diseases remain to pose a threat to swine industry. Once swine infectious diseases unfortunately spread to wild boars, it takes a long time to make them disease-free, as shown by a recent epidemic of classical swine fever in Japan. This fact indicates that wild boars may play a role as potential transmitters or reservoirs of swine pathogens. Therefore, it is important for control of swine diseases to understand the status of prevalence of them in wild boars. Porcine epidemic diarrhea virus（PEDV）and transmissible gastroenteritis virus（TGEV）cause a big problem in swine industry because of the high level of pathogenicity for swine. Especially, PEDV caused an epidemic in Japan during 2013-2015, leading to vast economic loss. Cases of TGEV are also reported every year in Japan. Thus, the both viruses sporadically emerge and prevail to swine from unknown routes. To identify the transmission routes of them should be useful information to control the swine coronavirus diseases. Here, we conducted serological and molecular surveys for PEDV and TGEV among wild boars in Gifu Prefecture, Japan. We found that the wild boars have a high level of antibody positive rates against TGEV and PEDV by ELISA（84% and 71%, respectively）. Also, we detected PEDV gene from some of tonsil and spleen specimens of the wild boars by real-time PCR. Our findings strongly suggested that wild boars in Japan may play a role of transmitters/reservoirs for TGEV and PEDV.

1．目　　的

昨今の豚熱の流行が示すように，感染症は養豚産業の脅威となり続けている。また，豚と遺伝的に近縁であるイノシシに感染症が定着してしまうと，その感染症の清浄化には長い時間と労力が必要となる。すなわち，イノシシは豚の病原体を保持する可能性をもつ野生動物であり，イノシシにおける豚の感染症の流行実態を把握することは，豚への感染防止対策を取るうえできわめて重要な情報となる。

豚流行性下痢ウイルスや豚伝染性胃腸炎ウイルスに代表される豚コロナウイルスは，特に幼豚に高い致死性を示すことから，養豚業界では大きな問題となっている。例えば，豚流行性下痢ウイルスを原因とする哺乳豚の死亡は，2013―15年のみ

© The Ito Foundation

で約10億円の経済被害をもたらした[1)]。また，豚伝染性胃腸炎ウイルスの感染も，日本の豚において毎年の発生が報告されている。幸いなことに両感染症に対するワクチンが存在する一方，突発的に感染拡大することが知られ，その侵入経路についてはいまだに不明な点が多い[2)]。

以上より，これら豚コロナウイルスの侵入経路ならびに野生動物におけるウイルスの保有・流行状況を明らかにすることは，養豚へのウイルス感染対策をたてるうえできわめて重要な意味をもつ。しかしながら，日本の野生動物における，豚コロナウイルスの感染実態（ウイルス保有状況や感染歴）を調べた研究は実施されていない。

そこで本研究では，豚の近縁野生種であるイノシシを対象として，豚コロナウイルスである豚流行性下痢ウイルスおよび豚伝染性胃腸炎ウイルスの感染実態を調査する。本研究を通じて，これら豚コロナウイルス媒介動物としての野生イノシシを評価し，豚コロナウイルス感染症対策に貢献できる情報提供を目指した。本研究の概要を**Fig. 1**に示した。

2．材料と方法

2.1　材料とそれらの取り扱い

本研究では，2018年から採材された野生イノシシの血清，扁桃乳剤および脾臓乳剤を使用した。イノシシ血清は血清疫学調査に供した。なお，下痢症を引き起こす豚コロナウイルスは腸管のみならず，脾臓など他の臓器にも分布することが分かっているため[2)]，扁桃乳剤および脾臓乳剤を分子疫学調査に用いた。2018年から現在までに採取されたこれらサンプル数はすでに合計500を超えており，申請課題後にもサンプル数は増える予定である。なお，これらサンプルは豚熱の調査を目的に採材されたものであり，豚熱ウイルスを含む可能性が考えられた。そのため，これらのサンプルは岐阜県中央家畜保健衛生所のBSL３実験施設にて以下の適切なウイルス不活化処置を施した後

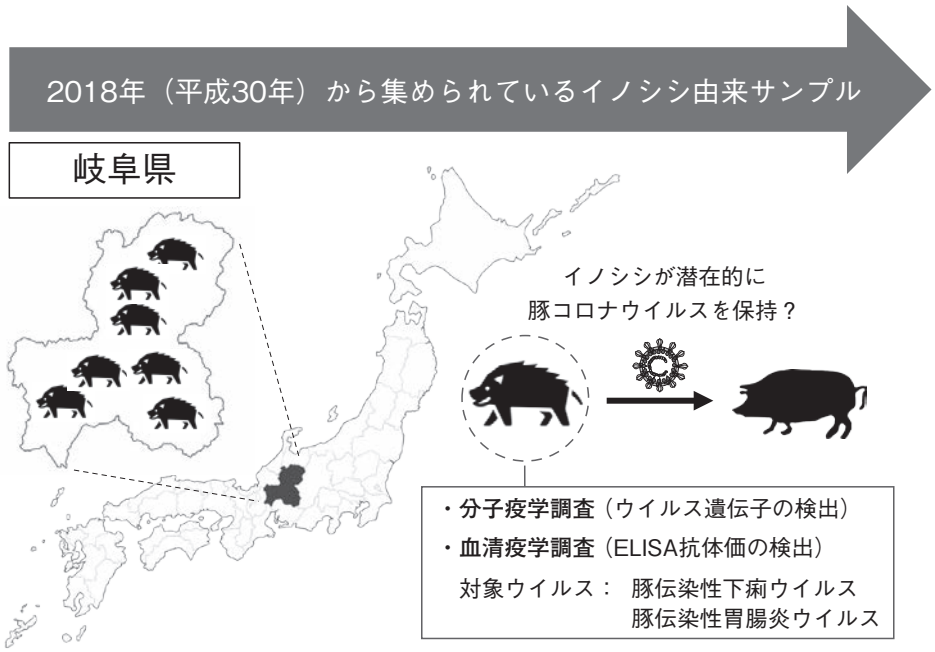


Fig.1　Overview of the current study

© The Ito Foundation

に実験に供することとした。すなわち，血清サンプルは，豚熱ウイルスを不活化する目的で，0.1% v/vのβ-プロピオラクトン（FUJIFILM社）添加後，37℃で2時間処理し，岐阜大学へ移動させた。さらに，扁桃乳剤および脾臓乳剤については，RNA抽出試薬（Invitrogen社：TRIzol Reagent）添加後に破砕したものを使用した。これらの臓器乳剤はフェノール乳剤であることから，これらサンプル中に感染性を保持した豚熱ウイルスが残存することはない。

2.2　イノシシ血清を用いた豚コロナウイルスに対する血清疫学調査

上述した不活化処理を施したイノシシ血清を用いて，豚伝染性下痢ウイルスと豚伝染性胃腸炎ウイルスに対する抗体価を調べた。抗体価は市販の両ウイルスに対するELISAキット（Abbexa社：Pig Epidemic Diarrhea Virus Antibody ELISA Kit および Pig Transmissible Gastroenteritis Virus Antibody ELISA kit）により測定した。なお，両ウイルスに対する抗体は交差性がなく，この2つのキットを使用することにより豚流行性下痢ウイルスと豚伝染性胃腸炎ウイルスのいずれの感染歴があるか区別することが可能である。なお，本実験は添付の使用説明書に従って実施された。

2.3　イノシシ扁桃乳剤および腸管乳剤を用いた豚コロナウイルスに対する分子疫学調査

上記のイノシシ扁桃乳剤と脾臓乳剤からRNAを抽出した（Zymo社：Direct-zol RNA miniprep kit）。抽出されたRNAを逆転写酵素（Invitrogen社：Superscript Ⅲ Reverse Transcriptase）を用いてcDNAに変換し，これらを鋳型にリアルタイムPCRを実施した。本リアルタイムPCRには豚流行性下痢ウイルス，豚伝染性胃腸炎ウイルスおよび豚デルタコロナウイルスRNAを同時に検出できるキット（Applied Biosystems 社：VetMAX PEDV/TGEV Kit）を用いた。なお，本実験は添付の使用説明書に従って実施された。

3．結果と考察

3.1　岐阜大学へのイノシシ由来検体の移送と保管

本研究助成より支援を賜われることが決定したのち，岐阜県中央家畜保健衛生所のBSL3実験施設に保管されているイノシシ由来検体の不活化処理から着手した。上述した方法にて処理した血清409サンプル，扁桃乳剤339サンプル，脾臓394サンプルを岐阜大学に移送させた。これらのサンプルは岐阜県との合意の下，岐阜大学にて保管され，今後の貴重な調査試料として活用される予定である。

3.2　イノシシ血清中のPEDVとTGEVに対するELISA抗体の検出

上述したサンプルのうち，174サンプルを用いてELISA抗体価を測定した。その結果，PEDVに対するELISA抗体価陽性率は約71%（125/174サンプル），TGEVに対するELISA抗体価は，約84%（147/174サンプル）ときわめて高い陽性率を示すことが分かった。これらの結果は，日本のイノシシがPEDVとTGEVに対して高い感染歴を有していることを示している。すなわち，日本のイノシシが生涯のうちに両ウイルスに暴露される機会はきわめて高く，イノシシが両ウイルスを豚へと伝播しうることを示している。なお，使用したELISAキットに添付されている陽性コントロールと陰性コントロールを，イノシシ血清と同様に0.1%（v/v）のβ-プロピオラクトンで処理してもELISAのOD値に影響を及ぼさないことを確認した。

これまで，イノシシを対象とした抗PEDV抗体の血清疫学調査は報告がなく，本調査が世界初となる。一方，海外で実施されたイノシシに対する

© The Ito Foundation

抗TGEV抗体調査では，2013年にトルコで実施されたものの，陽性検体は報告されなかった[4]。これまで，2009年にドイツのイノシシにおいて抗TGEV抗体（ELISA抗体）陽性率が1.59％を示したことのみが報告されている[5]。すなわち，過去の報告と比べ，今回の抗体調査はきわめて高い抗体陽性率を示したことが分かる。なお，イノシシの個体情報から体重20kg未満のものを幼獣とし，20kg以上の体重のものを成獣とし，両群において抗体陽性率を比較したところ，PEDV抗体陽性率は幼獣60.2％および成獣88.7％，TGEV抗体陽性率は幼獣76.7％および成獣95.8％を示した。PEDV抗体陽性率およびTGEV抗体陽性率のいずれにおいても，幼獣群と成獣群間でウイルス抗体陽性率に有意な差が認められた（フィッシャーの正確確率検定 $p<0.01$）。すなわち，イノシシが成長するに従い，ウイルスに暴露される機会が増えていることを示しており，本調査における高いウイルス抗体陽性率について，一定の信頼性を担保していると言える。

3.3　イノシシ脾臓乳剤および扁桃乳剤中のPEDVおよびTGEV遺伝子の検出

VetMAX PEDV/TGEV Kitを用いて，上述したサンプルのうち脾臓乳剤394サンプルおよび扁桃乳剤388サンプル中のPEDVおよびTGEV遺伝子の検出を試みた。その結果，PEDV遺伝子は脾臓乳剤６サンプルにおいて陽性，扁桃乳剤53サンプルにおいて陽性を示した。一方，TGEV遺伝子は脾臓乳剤および扁桃乳剤いずれのサンプルにおいてウイルス遺伝子は検出されなかった。これらの結果は，PEDVが野生のイノシシの脾臓および扁桃中に存在していることを示唆している。

豚への感染実験により，PEDVは腸管の他に腎臓および脾臓にも分布することが明らかとされている一方[3]，TGEVについては豚での体内動態の詳細が報告されていない。本調査によりPEDVのみイノシシの扁桃と脾臓よりウイルス遺伝子の存在が示されたことから，TGEVは感染個体内におけるウイルス動態がPEDVと異なる，あるいは体内でウイルスが存在する期間が短い可能性が考えられた。

3.4　今後の展望

今回，調査したイノシシ血清のTGEVとPEDVに対するELISA抗体陽性率は海外報告と比べても，非常に高い陽性率となった。調査したイノシシ血清によっては，キットが支持するCutoff値よりも低いOD値を示したものも複数検出されたので，イノシシ血清が使用したELISAキットの陽性率を上昇させる物質を含んでいる可能性は低いと考えられる。現在，実験的にも「血清へのβプロピオラクトン処理が本ELISAキットのOD値を上昇させない」ことを実験的に示すために，ワクチン未接種豚由来血清の手配を進めており，本調査で得られたELISA抗体陽性率の信頼性をさらに高める実験を計画している。

現在，PEDVの遺伝子の存在が示されたRNAより，PEDVのＳ遺伝子配列の検出を試みており，さらなる系統学的解析も計画している。日本では2013年にPEDVの大流行が発生していることから，本系統学的解析は，2013年に豚にて流行したPEDVがイノシシに定着した可能性と，イノシシが独自のPEDVを保持している可能性のいずれかを示すことができると考えられる。いずれの結果になるとしても，イノシシにおけるPEDVの新たな感染実態を示すことが期待できる。PEDVとイノシシの関連を示した報告は少なく，本調査結果は世界的にもきわめて貴重かつ重要な知見を含んでいると考えられる。

本調査を通じて，大量のイノシシ由来血清および臓器乳剤を岐阜大学に保管することができた。本試料は今後，イノシシが豚コロナウイルス以外の病原体を保有・伝播させる役割をもつか否かを

© The Ito Foundation

調査するうえできわめて貴重な試料と言える。今後，本検体を用いて，さまざまな感染症に対する血清疫学および分子疫学の展開が期待できる。

4．要　約

本調査により，日本のイノシシがPEDVとTGEVに対する高い感染歴を有していることが示唆された。また，いくつかのイノシシでは脾臓と扁桃にPEDV遺伝子の存在を示すデータを得ることができた。これらの結果は，イノシシが豚コロナウイルスを保有している高い可能性を示しており，ウイルス学的にきわめて貴重かつ重要な知見を含んでいる。また，学術的のみならず，養豚家に対し「イノシシは豚熱ウイルス以外にも，豚コロナウイルスを伝播させ得る存在である」ということを警鐘するうえできわめて高い説得力をもつデータを得ることができた。本調査結果は，今後の日本の養豚業界の豚コロナウイルス対策の一助となると考えられた。

文　献

1） Sasaki, Y., Kawabata, T., Nakatake, S., Kohigashi, T., Toya, R., Uemura, R., Sueyoshi, M.：Assessment of reproductive and growth performance of pigs on commercial swine farms in southern Kyushu, Japan, *Anim Sci J*, 91, 2020.

2） 中川敬介：豚のコロナウイルス感染症，All about SWINE 59, 2021.

3） Park, J. E., Shin, H. J.：Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages, *Virus Res*, 191, 2014.

4） Albayrak, H., Ozan, E., Cavunt, A.：A serological survey of selected pathogens in wild boar (Sus scrofa) in northern Turkey, *Eur J Wildl Res*, 59, 2013.

5） Kaden, V., Lange, E., Hänel, A., Hlinak, A., Mewes, L., Hergarten, G., Irsch, B., Dedek, J., Bruer, W.：Retrospective serological survey on selected viral pathogens in wild boar populations in Germany, *Eur J Wildl Res*, 55, 2009.

© The Ito Foundation

PRRSウイルス感染初期における鼻腔内ウイルス動態の解析

Analysis of intranasal viral dynamics in the early stage of PRRS virus infection

平　井　卓　哉
（宮崎大学農学部）

Takuya Hirai
(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki)

Porcine respiratory disease complex (PRDC) has an important impact on swine producers worldwide. Common primary viral contributors to PRDC are porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and porcine circovirus 2 (PCV2). PRDC-affected pigs often show poor growth with respiratory symptoms. Nasopharynx-associated lymphoid tissue (NALT) plays an important role in the up taking of pathogens and defense of the nasal mucosa. However, there were few academic reports about pathological analysis of NALT in pigs. In this study, the histopathological examination of NALT, *in situ* hybridization and quantitative (q) PCR and was performed in the PRDC-affected pigs. Histopathological examination revealed catarrh nasopharyngitis with goblet cell hyperplasia and neutrophils infiltration in follicle-associated epithelium covering NALT. There are neutrophils and mononuclear cells infiltration in degenerated crypt epithelium near NALT. By *in situ* hybridization, PRRSV nucleic acid were detected in cytoplasm of cells resembling macrophages beneath the crypt near the NALT. These cells were positive for Iba-1 which was macrophage marker. *Streptococcus suis* was also isolated from nasal swab in same pigs which were infected by PRRSV. By quantitative PCR, PRRSV was detected ranging from 2.6×10^3 to 4.1×10^6 copies/μl in NALT and from 1.0×10^4 to 6.9×10^6 in lung, respectively. The results of this study show that PRRSV replicates in monocyte/macrophage lineage cells. It is speculated that the PRRSV-infected antigen-presenting cells may affect IgA production and induce local immunosuppression in upper respiratory tract. It causes microbiota dysbiosis, induces nasopharyngitis and develops into pneumonia. We believe that PRRSV enters the NALT via degenerative epithelium, M cells, or hematogenous routes. Further investigation is needed for clarifying the pathogenesis of viral and bacterial infection in NALT and lung of pigs.

1．目　　的

子豚の呼吸器複合感染症は，豚繁殖・呼吸障害症候群（PRRS）ウイルスを基本に，豚サーコウイルスⅡ型（PCV2），豚呼吸器コロナウイルス，豚インフルエンザウイルスなどのウイルスの他，各種細菌の重感染により起こる疾患である。その推定損失額は全国で年間280億円にものぼり，養

© The Ito Foundation

豚業界では呼吸器病対策が最も重要な課題になっている。本研究は，PRRSウイルス感染時における鼻咽頭病変の病理学的解明とともに，子豚の呼吸器複合感染症の防除対策を目指すのが目的である。

近年，ヒトとマウスでは鼻咽頭関連リンパ組織（nasopharynx-associated lymphoid tissue：NALT）が感染初期における生体防御に重要な役割を担っていることが解明された。NALTには，樹状細胞，T細胞，B細胞などが集結することから，粘膜組織に侵入するウイルスと病原細菌に対する防御免疫システムを構築している。NALTを覆う上皮層は特殊に分化しており，そこには外来抗原の取り込みを専門に行うMicrofold細胞（M細胞）が存在し，外来抗原はM細胞に取り込まれた後に上皮直下に存在するマクロファージと樹状細胞に受け渡され，リンパ球へと抗原提示が行われる。多くのウイルスや細菌が呼吸器を介して感染することより，感染初発部位の粘膜面に抗原特異的な分泌型IgA産生と細胞性免疫を誘導できるNALTの役割はきわめて重要である。

PRRSウイルスは鼻粘膜から感染し，一次増殖後に肺病変を形成する。本ウイルスの標的細胞はマクロファージであるが，ウイルス動態，すなわち本ウイルスがどのように上皮バリアーを通過して，粘膜下のマクロファージに感染・増殖するかについては解明されていない。その原因として，鼻咽腔壁を覆う鼻骨や頭蓋骨が標本作製の妨げとなり，鼻粘膜でのウイルス抗原の検出が難しく，NALTの存在すら知られていなかったからである。申請者は，PRRSウイルスがNALTのM細胞を介して侵入し，上皮下のマクロファージで増殖する可能性を推測している。

本研究の目的は，NALTにおけるM細胞の分布およびPRRSウイルスの増殖を組織上で可視化させることにより，豚の鼻咽頭における本ウイルスの動態を明らかにし，推察を実証することである。

2．方　法

6農場から41～120日齢の死亡豚73頭を入手し，生材料として鼻咽頭ぬぐい液，NALTおよび肺を採取した。NALTを含む鼻咽頭粘膜組織および肺はホルマリン固定後にパラフィン包埋を行い，HE染色標本を作製した。また，と畜場にて健常豚3頭（168日齢）の頭部からNALTを含む鼻咽頭粘膜組織を採取した。これらはPRRS陰性農場由来の豚で，コントロールとして用いた。M細胞特異的モノクローナル抗体glycoprotein2（GP2）およびcytokeratin18（CK18）を用いて，鼻咽頭粘膜を免疫組織化学（IHC）法で検索した。さらに，NALTおよび肺を用いて*in situ* hybridization（ISH）法によるPRRSウイルス感染細胞の検出とその細胞種の特定を試みた。2農場から採取した各4例についてはNALTおよび肺のリアルタイムPCRを実施し，PRRSおよびPCV2のウイルス量を測定した。一部の症例については鼻咽頭ぬぐい液および肺を用いて細菌の分離・同定を行った。

3．結果と考察

3.1　M細胞についての検索

NALTを含む鼻咽頭は，硬口蓋と軟口蓋の境界部の背側から咽頭にかけて存在し，頭蓋基底部と軟口蓋に囲まれており，文献報告と同様であった[1,2]。同部は頭蓋底の骨から比較的容易に剥離可能であった。NALTを含む鼻咽頭は骨を含まないで採材可能であり，各種抗原や遺伝子の検出に支障がなく，今後，呼吸器病を引き起こす病原体の上部気道における病態解析や肺病変との関連性を調べるうえで，有用な採材手法と考えられた。

HE染色では，健常豚のNALTを覆う濾胞関連上皮は多列繊毛上皮細胞であり（**Fig. 1A**），咽頭側では重層扁平上皮へと上皮形態の移行が認めら

© The Ito Foundation

れた。IHC法では，健常豚の多列繊毛上皮から構成される濾胞関連上皮の一部領域で抗GP2抗体陽性細胞が観察された（**Fig. 1B**）。抗CK18抗体に対しては，多列繊毛上皮の濾胞関連上皮では多くの細胞が陽性を示し，強陽性細胞と弱陽性細胞の両方が認められた。IHC法において，健常豚のNALTの濾胞関連上皮で，抗GP2抗体および抗CK18抗体に強陽性を示す細胞が観察されたことより，M細胞の存在が示唆された。

3.2　病理学的検査および細菌検査

剖検の肉眼所見にて44頭（62%）で鼻咽腔内に滲出液の貯留が認められた。病理組織学的検査では，鼻咽腔には粘液の貯留および好中球の浸潤が認められ，粘膜上皮において杯細胞の過形成がみられた（**Fig. 1C**）。粘膜上皮細胞の一部は変性・壊死・剥離し，粘膜上皮内にも好中球を主とした炎症細胞が浸潤していた。陰窩腔においてさまざまな程度に陰窩上皮細胞の変性・壊死・剥離，好

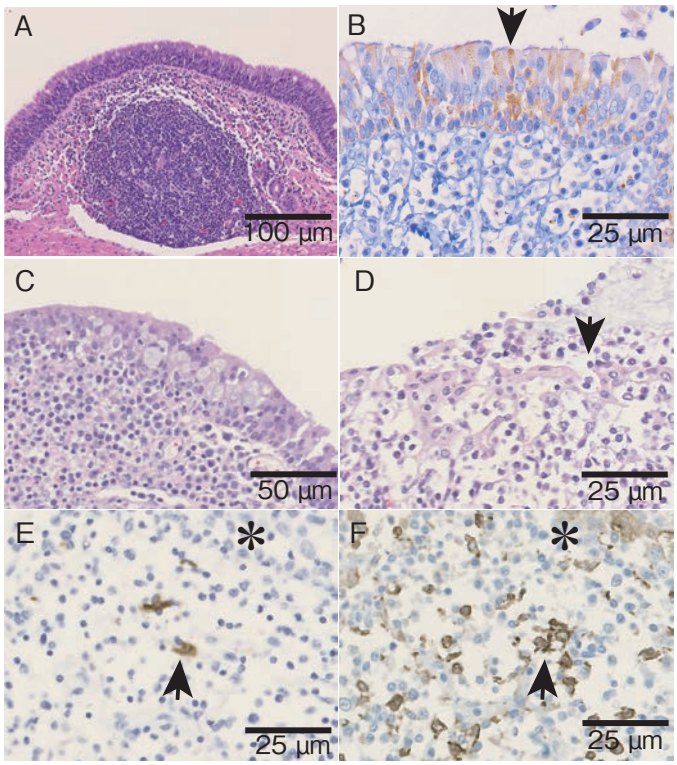


Fig.1

A. NALT in the nasopharynx. NALT is covered by follicular associated epithelium. HE.

B. NALT in the nasopharynx. GP2-positive M cells (arrow) are observed in follicular associated epithelium. Immunohistochemistry.

C. NALT in the nasopharynx. Goblet cells hyperplasia and infiltration of neutrophils are present in follicular associated epithelium. HE.

D. Crypt in the nasopharynx. Degeneration of epithelium and mononuclear cell infiltration (arrow) are seen in the crypt. HE.

E. NALT near the crypt in the nasopharynx. Positive signals of PRRSV nucleic acid are present in cytoplasm of macrophage-like cells (arrow) beneath the crypt (asterisk). *In situ* hybridization.

F. NALT near the crypt in the nasopharynx. Iba-1 positive macrophages are scattered beneath the crypt (asterisk). Immunohistochemistry.

© The Ito Foundation

中球および単核細胞の浸潤が認められた（**Fig. 1D**）。PRRSプローブを用いたISH法ではウイルス陽性シグナルが主に陰窩近傍のマクロファージ様細胞の細胞質に検出された（**Fig. 1E**）。連続標本を用いたIHC法で，これらの細胞はマクロファージマーカーであるIba1に陽性を示した。以上より，NALTにおいてPRRSウイルスが単球・マクロファージ系細胞で増殖することが示された。PRRSウイルスが上皮下に存在する樹状細胞などの抗原提示細胞に感染すれば，抗原提示能の障害によりIgAの産生が影響され，上部気道における局所免疫が抑制される可能性が考えられた。

検索した症例の全例に肺炎があり，化膿性気管支肺炎および間質性肺炎が混在して認められた。病理組織学的には気管支腔および肺胞腔内に好中球を主とした炎症細胞浸潤があり，肺胞壁もしくは肺胞腔内にはマクロファージが増生していた。PRRSプローブを用いたISH法でこれらのマクロファージの細胞質に陽性シグナルが検出された。細菌検査では，H農場の全症例において鼻咽頭ぬぐい液から*Streptococcus suis*が検出された。また，２例（Nos. 1 & 2）において*Haemophilus parasuis*が分離された。肺からは細菌は分離されなかった。

鼻咽腔内には常在細菌叢が分布し，正常機能の発揮に共生関係が成立している。常在細菌叢は，非病原性細菌のみならず，一定量の病原性細菌も分布しているが，感染症を生じることはない[3)]。PRRSウイルス感染により，局所免疫抑制が起これば，常在細菌叢の乱れが生じ，病原性細菌の増殖により鼻咽頭炎が引き起こされ，肺炎等に進展する機序が考えられる。今回の研究では，H農場の全症例において鼻咽頭ぬぐい液から*Streptococcus suis*が検出されており，PRRSウイルスの感染から細菌感染症を続発した可能性が示唆された。

3.3　リアルタイムPCR法によるPRRSウイルス量の測定

検索した一部の症例について，PRRSウイルスおよびPCV2のリアルタイムPCRを実施した（**Table 1**）。カタール性鼻咽頭炎を示したH農場の２症例（No. 1：41日齢，No. 4：63日齢）では鼻咽頭ぬぐい液で3.5×10^5copy/μℓ以上のPRRSウイルスが検出され，肺におけるウイルス量と同等レベルであった。T農場の120日齢の症例では，４例中３例のNALTにおいて2.3×10^5copy/μℓ以上のPRRSウイルスが検出された。加えて，PCV2のリアルタイムPCRを実施したところ，1.3×10^6copy/μℓ以上のPCV2が検出された。

T農場の120日齢の症例ではNALTにおいて

Table 1　Results of PRRSV and PCV2 quantitative PCR in different tissues.

Sample No.	Farm	Age (days)	PRRSV qPCR (copy/μl)		PCV2 qPCR (copy/μl)	
			NALT	Lung	NALT	Mesenteric lymph node
No. 1	H farm	41	1.6×10^6	1.3×10^6	—	—
No. 2		44	1.3×10^4	1.5×10^6	—	—
No. 3		47	2.6×10^3	5.4×10^5	—	5.0×10^5
No. 4		63	3.5×10^5	6.9×10^6	—	—
No. 5	T farm	120	1.3×10^6	1.0×10^4	1.1×10^8	3.6×10^8
No. 6		120	4.1×10^6	8.7×10^4	1.3×10^6	2.2×10^6
No. 7		120	9.4×10^3	1.0×10^4	4.3×10^7	2.4×10^7
No. 8		120	2.3×10^5	−	1.1×10^8	1.1×10^8

ND：Not done，—：Negative

© The Ito Foundation

PRRSウイルスとPCV2の両ウイルスの増殖が示唆された。臨床現場において両ウイルスの混合感染は多く確認されており，両ウイルスとも単球・マクロファージ系細胞を標的として宿主の感染防御能を低下させ，免疫抑制につながることが報告されている。NALTにおいて両ウイルスが増殖することは豚呼吸器複合感染症の病理発生を解明するうえできわめて重要な所見と考えられた。

４．要　約

NALTの単球・マクロファージ系細胞においてPRRSウイルスが増殖することが示された。ウイルス増殖により，IgAの産生に影響が出て，上部気道における局所免疫が抑制された可能性が考えられた。また，常在細菌叢が乱れることで，外来病原菌によって鼻咽頭炎が引き起こされ，肺炎に進展する機序が推測された。感染経路として，M細胞を介しての侵入，粘膜上皮の損傷部位より侵入，血行性に侵入が考えられた。豚のNALTおよび肺におけるウイルスと細菌感染による病態を明らかにするためには，さらなる研究が必要である。

文　献

１）Liebler-Tenorio, E. M., Pabst, R.：MALT structure and function in farm animals, *Vet Res*, 37(3), 257～80, 2006, May-Jun.
２）Yang, J., Dai, L., Yu, Q., Yang, Q.：Histological and anatomical structure of the nasal cavity of Bama minipigs, *PLoS One*, 12(3), e0173902, 2017, Mar, 24.
３）Zeineldin, M., Lowe, J., Aldridge, B.：Contribution of the mucosal microbiota to bovine respiratory Health, *Trends Microbiol*, 27(9), 753～770, 2019, Sep.

© The Ito Foundation

家畜に下痢を引き起こすロタウイルスの遺伝子改変技術

Development of reverse genetics technology for rotaviruses of livestock

金 井 祐 太
（大阪大学微生物病研究所）

Yuta Kanai
（Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University）

Rotavirus is one of the leading causes of diarrhea in livestock. Rotavirus infection induces severe diarrhea in young animals such as cattle, pigs, and horses, and can cause death due to excessive dehydration. There is no specific treatment for this disease, and it is treated by supplemental fluids and other symptomatic therapies. Viral reverse genetic system is a technique for engineering of viral genome or generation of artificial recombinant viruses. So far, reverse genetics system of rotavirus have been developed using simian rotavirus and human rotavirus strains but reverse genetics of rotavirus strains of livestock have not been available. Rotaviruses are highly host-specific, and bovine rotaviruses and porcine rotaviruses have different properties from human rotaviruses. Thus, the establishment of reverse genetics systems of animal rotaviruses is required for molecular biological studies of rotaviruses from domestic animals.

In this study, the first reverse genetics system for bovine rotavirus was established using bovine rotavirus strain KM3 isolated from a dairy cow with diarrhea in Japan in 2017. The reverse genetics system of bovine rotavirus was applied to study the viral genome packaging signal sequence of NSP1 gene which antagonizes interferon responses. The recombinant virus, rKM3_NSP1_Δ1178 carrying deletion mutant NSP1 gene which kept only 200bp of 5' and 3' region of NSP1 gene segment was generated. rKM3_NSP1_Δ1178 was replication competent and replication kinetics was similar to wild-type KM3 indicating 200bp of 5' and 3' terminal regions of NSP1 gene contained sufficient genome packaging signals. Further, recombinant bovine rotaviruses expressing red fluorescent protein (rKM3-mScarlet) was generated. The rKM3-mScarlet infected cells exhibited red fluorescent signals. Since the reverse genetics technology enable for generation of mutant virus with any gene mutation, the technique established in this study will contribute for molecular biology of viral pathogenesis and vaccine development of bovine rotavirus.

1．目　　的

ウイルスの遺伝子操作系は，精製したウイルスゲノムDNA・RNAを細胞にトランスフェクションすることで感染性ウイルスを得る人工合成技術であり，任意の遺伝子変異を持つ組換えウイルス

© The Ito Foundation

を作製できることからウイルスの分子生物学的研究に必須の技術である。これまで多くのウイルスでウイルス種固有の遺伝子組換え技術が開発され，病原性解析やワクチン開発などに応用されていた。本研究対象であるロタウイルスは，家畜の幼獣に重篤な下痢を引き起こし産業上きわめて重要なウイルスである。ロタウイルスは11分節の二本鎖RNAゲノムを持ち，他のウイルス科には見られない複雑なゲノム構造が原因で遺伝子組換え技術は永らく確立されていなかった。申請者は，ロタウイルスの遺伝子組換え技術の開発のため，サルロタウイルスの11分節遺伝子をコードする11種のプラスミドに加え，新規ロタウイルス増殖促進因子として，ネルソンベイレオウイルスのFASTタンパク質およびワクシニアウイルス由来のRNAキャッピング酵素を同時に細胞に発現することで，感染性ロタウイルスの人工合成に世界で初めて成功した[1)]。また，同様の技術によりヒトロタウイルスの遺伝子操作系も確立した[2)]。この遺伝子操作系を利用し，抗原性を変化させた次世代ロタウイルスワクチン候補株の開発[3)]や，外来遺伝子を発現するロタウイルスベクター[4)]の開発を行ってきた。一方，ロタウイルスは宿主特異性が高く，家畜に病原性を示すウシロタウイルスやブタロタウイルスは感染に必要な細胞表面の受容体分子がヒトロタウイルスと異なることが知られており，分子生物学的な研究を遂行するうえで家畜由来ロタウイルスを用いた遺伝子操作系の確立は不可欠である。

本研究では，2017年に日本国内で下痢を呈した乳牛から分離されたウシロタウイルスKM3株を用いた遺伝子操作系の確立を試みた。さらに遺伝子操作系を利用することで，外来遺伝子であるレポーター遺伝子（蛍光タンパク質等）を発現する組換えウシロタウイルスを作成し，感染の可視化と簡便な検出系の構築を試みた。

２．方　　法

2.1　ウイルスおよび細胞

ウイルス材料として，2017年に岐阜県の農場で下痢を呈したウシから分離されたウシロタウイルスKM1～KM11株（松尾加代子博士提供）を実験に供した。ウイルスの増殖および感染実験にはMA104細胞株（サル腎臓由来）を使用した。MA104細胞の培養には５％牛胎児血清を加えたDMEM培地を用い，37℃，５％CO_2で培養を行った。ロタウイルスの感染は，５％血清加DMEM培地中でウイルスを吸着後，培地を豚膵臓由来トリプシン（Sigma T0303，0.5 μg/ml）を添加した無血清のDMEMに置換し，37℃，５％CO_2で培養を行った。ウイルス感染価測定のため，希釈したウイルスをMA104に感染し，感染後16時間におけるウイルス感染細胞をウサギ抗ロタウイルスNSP4抗体およびヤギ抗ウサギIgG-CF488を用いて検出し，focus forming unit（ffu）/ mlにて算出した。

2.2　ウイルス由来RNAゲノムのクローニングおよび配列決定

ウイルス培養液からTRIzol LS（Thermo Fisher）を用いてウイルス由来RNAを精製した。ウイルスゲノムRNAの末端は配列はFull-Length Amplification of cDNAs法[5)]により以下のとおり行った。精製したウイルスRNAの末端にRNA ligase（takara）を用いてリンカー配列である5'-GACCTCTGAGGATTCTAAAC/iSp9/TCCAGTTTAGAATCC-3'を付加し，逆転写酵素（Revert Aid, Thermo Fisher）を用いてcDNAの合成を行った。cDNAを鋳型とし，リンカー配列に相補的なプライマー5'-GTTTAGAATCCTCAGAGGTC-3'を用いてPCRを行い，増幅したロタウイルス各遺伝子分節に相当するバンドからDNAを精製し，プラスミド

© The Ito Foundation

pBluescriptへのクローニングを行った。クローニングした各遺伝子分節の全配列を決定した。

2.3　ウイルス人工合成のためのプラスミド構築

KM1およびKM3のそれぞれ11分節に由来するcDNAをロタウイルス人工合成に使用するプラスミドにクローニングした（**Fig. 1**）。プラスミドからの正確なウイルスRNAの転写のため，各ウイルス遺伝子の上流にはT7プロモーターを配置し，下流にはD型肝炎ウイルス由来のリボザイム配列を配置した。NSP1変異組換えウイルス作成のため，KM3株のNSP1遺伝子をコードするプラスミド（pT7_KM3_NSP1）を用いて，PCR mutagenesisにより5'および3'末端からそれぞれ200 bのみを持つ変異NSP1発現プラスミド，pT7_KM3_NSP1_Δ1178を作製した。mScarletタンパク質を発現する組換えウイルス作成のため，pT7_KM3_NSP1プラスミドを用いて，mScarlet遺伝子をKM3 NSP1遺伝子の106番目の塩基の後に挿入し，さらに外来遺伝子の安定性を上昇させるため，NSP1遺伝子の107–1378番目の塩基を除去したプラスミド，pT7_KM3_NSP1_mScarletを作製した。

2.4　組換えウシロタウイルスの人工合成

ロタウイルスの11遺伝子分節をそれぞれコードする11種のプラスミドを同時にT7ポリメラーゼ発現細胞であるBHK T7細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから48時間後に培地をトリプシンを加えたDMEM培地に交換し5日間培養した。ウイルス感染確認のため，培養上清をMA104細胞株に加えトリプシンを加えたDMEM培地で最長で1週間培養し，細胞変性効果の有無を観察した。また，NSP1変異ウイルスおよびmScarlet発現ウイルス作成のため，野生型NSP1遺伝子発現プラスミドに代え，pT7_

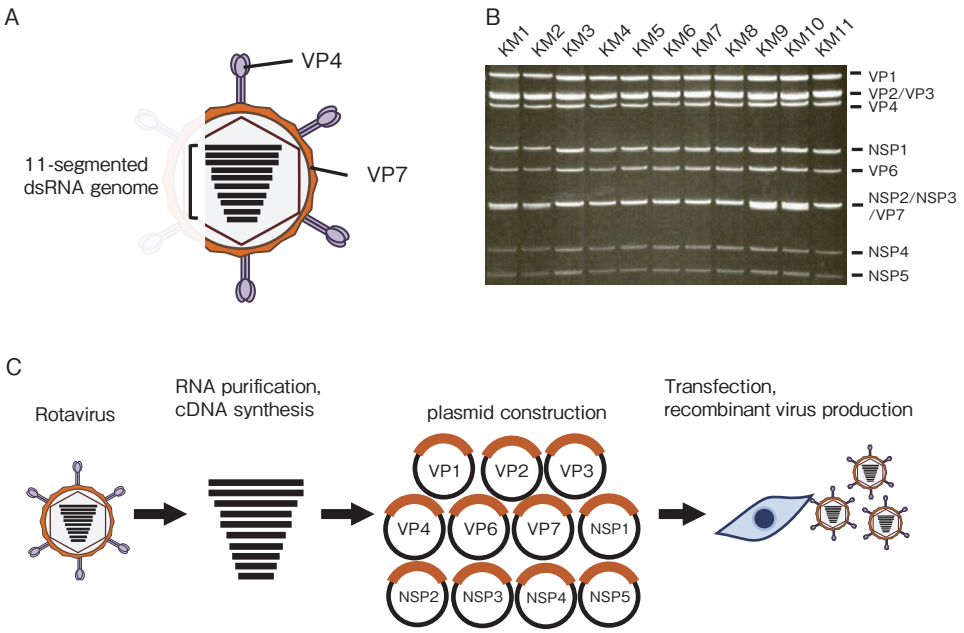


Fig. 1　Schematic strategy for developing reverse genetics system of bovine rotavirus. A. Schematic structure of the rotavirus virion. The outer capsid layer is composed of VP7 and VP4, which determine the G (glycoprotein) and P (protease sensitive) type antigens. B. Electrophoretic migration profile of the 11 segments of bovine rotavirus KM1 to KM11 strains isolated in Japan. C. Schematic strategy for rotavirus reverse genetics.

© The Ito Foundation

KM3_NSP1_Δ1178もしくはpT7_KM3_NSP1_mScarletをウイルス人工合成に使用した。

３．結果と考察

3.1　ウシロタウイルス遺伝子型の解析

我々は，これまでに2017年に岐阜県の農場で下痢を発症した牛から分離されたロタウイルス臨床株を11株（KM1～KM11株）入手した。これら11株の二本鎖RNAゲノムの電気泳動パターンを比較したところ，インターフェロン抑制機能を持つNSP1遺伝子と，外殻タンパク質であるVP7遺伝子に異なるパターンが認められた（**Fig. 1B**）。そこで，異なる電気泳動パターンを示したKM1株とKM3株からそれぞれ11分節の二本鎖RNAゲノムを精製し，末端配列を含む全ウイルスゲノムの単離と配列決定を行った。ロタウイルスの粒子表面は外殻タンパク質であるVP7およびVP4タンパク質に覆われ，ロタウイルスの抗原決定基となっている（**Fig. 1A**）。VP7はG（Glycoprotein）タイプ抗原を規定し，VP4はP（Protease sensitive）タイプ抗原を規定する。GおよびPタイプ抗原性は，ワクチンの有効性に大きな影響を

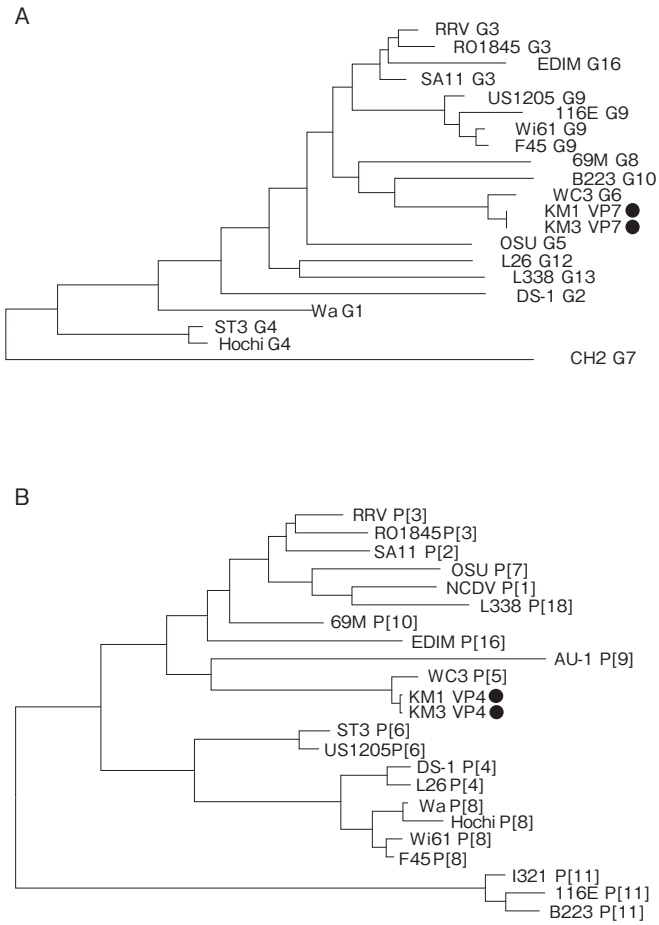


Fig. 2　Phylogenetic analysis of VP7 and VP4 of bovine rotavirus KM1 and KM3 strains. The deduced amino acid sequences of（A）VP7 and（B）VP4 of KM1 and KM3 strains were aligned with VP7 and VP4 of reference strains deposited in GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the maximum likelihood method. KM1 and KM3 were indicated by black circles.

© The Ito Foundation

及ぼすためロタウイルスの野外調査にきわめて重要な意義を持つ。本研究で使用したKM1株およびKM3株のVP7およびVP4の系統樹解析を行ったところ，両株ともVP7はG6型，VP4はP[5]型であり，ウシロタウイルスとして日本では優勢に検出されているG6P[5]型であった[6]（**Fig. 2A, B**）。

3.2　ウシロタウイルス遺伝子操作系の確立

次に，KM1およびKM3株の遺伝子操作系（もしくは人工合成法）確立のため，それぞれのウイルス株から単離した各11分節由来のcDNAをロタウイルス人工合成用のプラスミドにクローニングした。KM1もしくはKM3由来の遺伝子を含むそれぞれ11種のプラスミドを同時にBHK-T７細胞にトランスフェクションし，トリプシンを加えた培地中で５日間培養した。さらに，培養上清をサル腎臓由来のMA104細胞株に加え37℃で培養したところ，感染２日後に細胞変性効果が認められ，感染４日後にはすべての細胞が死滅していた。この細胞溶解液からRNAを精製し，10％アクリルアミドゲル電気泳動を行ったところ，11分節二本鎖RNAゲノムに相当するバンドが認められた（**Fig. 3**）。電気泳動パターンは親株であるKM3と同一であったことから人工合成されたKM3株であることが確認され，rKM3（recombinant KM3）と名付けた。一方，KM1株の遺伝子を導入した細胞からはウイルスが回収されなかった。

3.3　ロタウイルスのゲノムパッケージングシグナルの解析

次にKM3株の人工合成技術を用いて，ロタウ

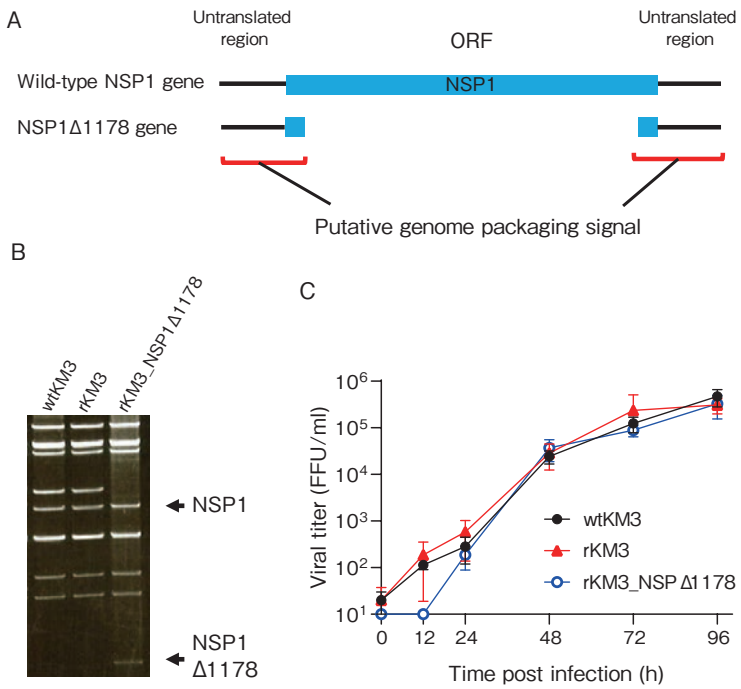


Fig. 3　Generation of recombinant KM3 viruses by reverse genetics. A. Schematic design of NSP1 mutant gene lacking 1178bp. B. Electropherotypes of dsRNA genome purified from wild-type KM3 (wtKM3), recombinant KM3 (rKM3) and rKM3 carrying NSP1 deletion mutant gene (rKM3_NSP1_Δ1178). C. Replication kinetics of wtKM3, rKM3 and rKM3_NSP1_Δ1178 in MA104 cells.

© The Ito Foundation

イルス遺伝子のパッケージングシグナルの解析を行った。ロタウイルスのように多分節に分かれたRNAをウイルスゲノムとして持つウイルスの細胞内におけるウイルス複製の際には，合成されたウイルスゲノム（遺伝子分節）を正確に新規ウイルス粒子に取り込む必要があるため，「ゲノムパッケージング」と呼ばれる，正確にそれぞれの遺伝子分節を取り込む機構があると考えられている。ロタウイルス遺伝子分節は，タンパク質翻訳領域であるORF（open reading frame）の5'および3'側に非翻訳領域（UTR：untranslated region）を持ち，各遺伝子分節両端の数十～数百塩基がパッケージングシグナルであると想定されている（**Fig. 3A**）。そこでNSP1遺伝子の両端200bpを残し，ORFの1178bpを削除したNSP1_Δ1178遺伝子を作製し，ウイルス人工合成の際に野生型NSP1遺伝子に代わりNSP1_Δ1178遺伝子を使用することで，欠損型NSP1遺伝子を持つ組換えウイルスrKM3_NSP1_Δ1178を作製した。rKM3_NSP1_Δ1178からゲノムRNAを精製し電気泳動に供したところ，短縮したNSP1_Δ1178が確認された（**Fig. 3B**）。また，rKM3_NSP1_Δ1178の増殖能を測定したところ，野生型ウイルスであるrKM3と同等であった（**Fig. 3C**）。このことから，NSP1遺伝子のパッケージングには両端200bpで十分であることが示された。

3.4　赤色蛍光タンパク質発現レポーターウイルスの作製

次に，外来遺伝子であるmScarletタンパク質を発現する組換えKM3ウイルスの作製を行った。申請者は以前の研究で，サルロタウイルスSA11株のNSP1遺伝子に蛍光タンパク質（GFP等）や発光タンパク質（ルシフェラーゼ等）を挿入し，ウイルス感染の可視化や定量に成功している[4]。そこで同様の手法により，mScarlet遺伝子を挿入したNSP1遺伝子（NSP1_mScarlet）を作製し，ウイルス人工合成の際に野生型NSP1遺伝子に代わりNSP1_mScarlet遺伝子を使用することで，組

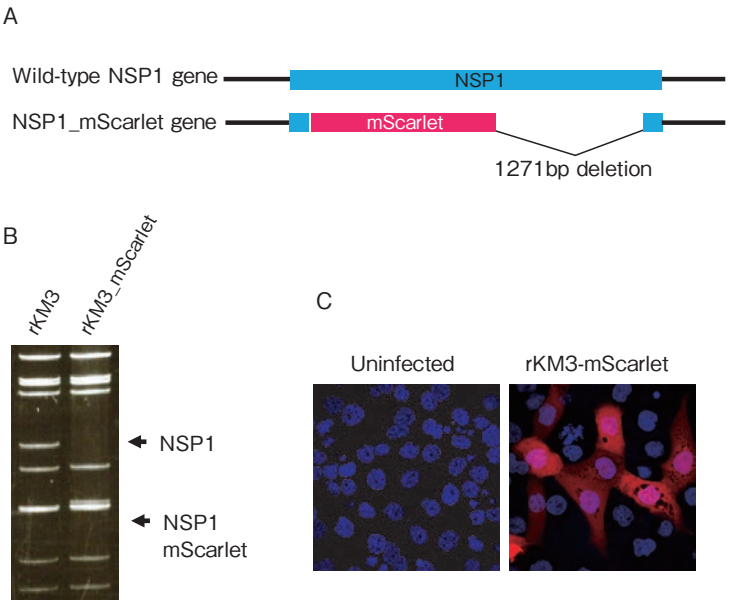


Fig. 4　Generation of recombinant KM3 viruses expressing red fluorescent protein. A. Schematic design of NSP1_mScarlet gene. B. Electropherotypes of dsRNA genome purified from rKM3 and rKM3_mScarlet. C. Visualization of rKM3_mScarlet infected cells.

© The Ito Foundation

換えウイルスrKM3_mScarletを作製した（**Fig. 4A**）。rKM3_mScarletのゲノムRNAを電気泳動したところ，目的のサイズのバンドが確認された（**Fig. 4B**）。rKM3_mScarletをMA104細胞に感染し，蛍光顕微鏡で観察したところ赤色蛍光が観察され，ウイルス感染の可視化に成功した（**Fig. 4C**）。

4．要　約

ロタウイルスはウシ，ブタ，ウマなどさまざまな家畜の幼獣に重篤な下痢症を引き起こし，公衆衛生上きわめて重要なウイルスである。本研究では，本邦で下痢症を呈したウシより分離されたロタウイルス株を用いて，世界初となるウシロタウイルスの遺伝子組換え法を確立した。遺伝子組換え技術により，ロタウイルスのインターフェロン抑制遺伝子であるNSP1の変異ウイルスを作製し，NSP1遺伝子分節の5’および3’末端からそれぞれ200bpの領域があることでゲノムパッケージングシグナルとして機能し，ウイルス粒子に取り込まれることを示した。さらに，蛍光タンパク質であるmScarletを発現するレポーターロタウイルスを作製し，ウイルス感染細胞が赤色蛍光を呈し，ロタウイルス感染の可視化に成功した。遺伝子組換え技術により任意の遺伝子変異を持つロタウイルスが作製可能になるため，病原性解析やワクチン開発などに応用可能である。

文　献

1） Kanai, Y., Komoto, S., Kawagishi, T., Nouda, R., Nagasawa, N., Onishi, M., Matsuura, Y., Taniguchi, K., Kobayashi, T.：*Proc Natl Acad Sci USA*, **114**, 2349～54, 2017.
2） Kawagishi, T., Nurdin, J. A., Onishi, M., Nouda, R., Kanai, Y., Tajima, T., Ushijima, H., Kobayashi, T.：*J Virol*, **94**, e00963～19, 2019.
3） Kanai, Y., Onishi, M., Kawagishi, T., Pannacha, P., Nurdin, J. A., Nouda, R., Yamasaki, M., Lusiany, T., Khamrin, P., Okitsu, S., Hayakawa, S., Ebina, H., Ushijima, H., Kobayashi, T.：*J Virol*, **95**, e01374～20, 2020.
4） Kanai, Y., Kawagishi, T., Nouda, R., Onishi, M., Pannacha, P., Nurdin, J. A., Nomura, K., Matsuura, Y., Kobayashi, T.：*J Virol*, **93**, e01774～18, 2019.
5） Maan, S., Rao, S., Maan, N. S., Anthony, S. J., Attoui, H., Samuel, A. R., Mertens, P. P.：*J Virol Methods*, **143**, 132～9 , 2007.
6） Odagiri, K., Yoshizawa, N., Sakihara, H., Umeda, K., Rahman, S., Nguyen, S. V., Suzuki, T.：*Viruses*, **12**(12), 1386, 2020.

© The Ito Foundation

地方病性牛伝染性リンパ腫発症機序の解明と予後診断法の確立

Study for control of enzootic bovine leucosis

森　　宏・岡 崎 克 則
（北海道医療大学薬学部）

Hiroshi Mori and Katsunori Okazaki
(Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido)

Enzootic bovine leucosis (EBL) is caused by infection with bovine leukemia virus (BLV). Most BLV-infected cattle are asymptomatic carriers but 2-3% of those develop tumors after a long incubation period. The details of the mechanism developing tumor are unknown. The number of EBL case in Japan has rapidly increased in the past 20 years and, therefore, the establishment of new countermeasures against EBL is urgently needed.

We previously reported that BLV is divided into two types: L233-Tax- and P233-Tax-carrying viruses, according to the amino acid at position 233 of Tax, and that L233-Tax-carrying virus had a significantly shorter incubation period than P233-Tax-carrying one for EBL developing. In addition, we showed that L233-Tax-expressing rat fibroblast cells secreted a number of molecules playing critical roles in vesicular development, including annexin A3 (ANXA3) and extracellular matrix protein 1 (ECMP1), and formed larger tumor than P233-Tax-expressing cells through a murine subcutaneous xenograft study.

In this study, we carried out murine xenograft study using Tax-expressing bovine cells in order to elucidate mechanism developing EBL by BLV. Unlike rat fibroblast cells, however, no tumor developed, probably due to insufficient number of cells or usage of differentiated cells. We also generated CRISPR/Cas9 RNP cleaving BLV provirus genome to determine the integration sites of the genome. Then, we established a sandwich ELISA system measuring ANXA3 concentration in blood of cattle to prognose BLV-infected animals for EBL onset. Since demonstration experiment using field EBL samples could not verify its usefulness, we made a purified ECMP1 preparation as another target molecule for EBL prognosis.

1．目　　的

地方病性牛伝染性リンパ腫（EBL）は牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）を病因とする。BLV感染牛の多くは無症状であり，リンパ腫を発症するのは感染牛全体の２－３％のみである。リンパ腫発症には宿主のMHCやウイルスの転写調節因子Taxあるいはプロウイルス挿入部位などが関与すると考えられているが，その詳細は不明である[1]。EBLに対する有効なワクチンおよび治療法は存在しないが，ヨーロッパ諸国の一部では抗体陽性牛の摘発・淘汰によってBLVの清浄化に成功した。一方，我が国におけるEBLの報告数はこの20年間で急増しており[2]，感染牛の摘発・淘汰に

© The Ito Foundation

よるBLVの清浄化は困難になっている。そのため，BLVによるリンパ腫の発症機構を解明してEBLの発症予防あるいは治療法の開発に繋げること，ならびに，予期せぬEBL発症による経済損失を防ぐためにBLV感染牛の予後診断法を開発することを目的として本研究を計画した。

我々は，BLVがTaxの233番アミノ酸により二分され，Pro（L233-Tax）であるBLVに感染したウシのEBL平均発症月齢はLeu（L233-Tax）のそれに比べ有意に高いことを報告した[3]。また，Tax発現ラット繊維芽細胞をヌードマウス皮下に移植し，L233-Tax発現細胞はP233-Tax発現細胞に比べ，脈管新生を伴う有意に大きな腫瘍を形成することを示した[4]。さらに，L233-Tax発現細胞は脈管新生に関与するとされるアネキシンA3（ANXA3）および細胞外基質タンパク質1（ECMP1）をP233-Tax発現細胞および対照細胞に比べ大量に分泌することを示した[5]。

本研究では，BLVによるEBL発症機構を解明するため，Tax発現ウシ細胞を用いてヌードマウス皮下移植実験を行った。また，BLVプロウイルス挿入部位を決定するため，CRISPER/Cas9を用いたプロウイルスゲノムDNAの*in vitro*切断法を開発した。さらに，BLV感染牛の予後診断法として，ウシANXA3の定量系を確立し，野外のEBL検体を用いた実証実験を行った。また，新たな診断標的分子としてウシECMP1を発現し，精製標品を得た。

2．方　法

2.1　Tax発現ウシ細胞のヌードマウス皮下移植実験

ウシ腎由来MDBK細胞にL233-Tax発現プラスミド[3]を導入し，G418で選択した。Taxの発現はSPHERICALPLATE 5D（水戸工業株式会社）上でのスフェロイド形成試験により確認した。2.8×10^5cells/100 μlに調製したTax発現細胞および対照細胞を6週齢雌Balb/c（nu/nu）マウス（日本クレア）背側部皮下に接種し，6週間観察した。

2.2　BLVプロウイルスDNA切断用CRISPR/Cas9複合体の作製

CRISPR direct（https://crispr.dbcls.jp）を使用してBLVプロウイルスゲノムの1160番，2815番および8179番塩基3'側を切断するcrRNA1，2および3を設計した。ウシゲノム上にはcrRNA 1および2に対する12塩基長のオフターゲット配列は存在しないが，crRNA 3では59カ所予想された（**Table 1**）。これらをIntegrated DNA Technologies（IDT）に委託して合成した。各crRNA（100 μM）1 μl，tracrRNA（100 μM，IDT）1 μlおよびNuclease Free Duplex Buffer（IDT）8 μlを混合し，95℃で加熱後，室温まで

Table1　crRNA for CRISPR/Cas9 RNP and target sequence of BLV provirus genome.

crRNA	Target			Number of off target position		
	Sequence	Strand	Nucleotide number	Hit_20mer	Hit_12mer	Hit_8mer
1	TTCCCCGGTCGACCAAACGG	+	1138-1160	0	0	393
2	CCTTATCGCTTCGCCTACAG	−	2816-2838	0	0	506
3	CTCTCCCGCCTTTTTTGAGG	+	8160-8182	0	59	10879

target：target sequence, target strand and nucleotide number of the BLV genome.
hit_(N)mer: off-target search results against bovine genome. The number of target sites with perfect match is shown. (N)mer+PAM：The target sequence (Nmer) adjacent to the PAM is searched against the genome. Zero ('0') in this column means that the sequence has no match in the genomic sequence.

© The Ito Foundation

冷却した。これに滅菌蒸留水79.2 μl，Reaction Buffer（Oxford Nanopore Technologies）10 μl，Guide-it™ Recombinant Cas9 （3 μg/ μl）（Takara）2.4 μlを加え，室温30分放置してCRISPR/Cas9 RNPを形成させた。

EBL腫瘍ゲノムDNAを鋳型にPCRでBLVプロウイルスゲノム塩基番号１-4855（4855bp）および7051-8720（1670bp）断片を増幅した。これらとCRISPR/Cas9 RNPを37℃で15分，72℃で５分間反応させ，アガロースゲル電気泳動により特異的切断活性を確認した。

2.3　ウシアネキシンＡ３定量系の開発と実証実験

ウシANXA3の異なる抗原決定基を認識するモノクローナル抗体23-１および67-１を用いたサンドイッチELISAを確立した。すなわち，23-１を捕捉抗体としてELISAプレートに固相化し，検出抗体としてHRP標識した67-１を用いた。反応基質として1-Step UltraTMB-ELISA（Thermo Scientific）を用いた。

pCold Pro S2ベクター（Takara）に化学合成したウシANXA3遺伝子（ファスマック）を挿入し，説明書に従い大腸菌BL21で発現させた。得られたHisタグ融合タンパク質をHCV 3C protease（Takara）で消化してHisTrap™ FFカラム（GE Healthcare）に添加し，素通り画分を精製ウシANXA3とした。精製標品のタンパク質濃度はBCA法で決定した。実証実験では浅頚リンパ節の腫脹によりEBLが疑われた黒毛和牛のペア血清（北里大学 夏堀博士より分与）および食肉衛生検査所においてEBLと診断されたホルスタイン牛の血清３検体を用いた。精製ウシANXA3を用いた検量線から各血清中のANXA3濃度を求めた。

2.4　ウシ細胞外マトリクスタンパク１の調製

化学合成したウシECMP1遺伝子（ファスマック）をpCold Pro S2に挿入した（pWT）。これを制限酵素*Sph*Iおよび*Stu*Iで消化し，T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化後，環状化してpΔSSを得た。同様に，*Stu*I/*Ppu*MI処理後平滑末端化して環状化したpΔSPを得た。pWT，pΔSSおよびpΔSPを大腸菌に導入し，発現を確認した。可溶性画分に目的タンパク質が認められた発現プラスミドで大腸菌BL21を形質転換し，ウシANXA3と同様の方法で精製した。

３．結果と考察

3.1　Tax発現ウシ細胞のヌードマウス皮下における腫瘍形成能

MDBK細胞にL233-Tax発現ベクター[3]を導入し，G418耐性細胞を選択した。SPHERICALPLATE 5Dに1000cells/wellとなるよう分注して10日間培養したところ，対照細胞はすべて単層を形成したのに対し，G418耐性細胞はいずれもスフェロイドを形成した（**Fig. 1**）。薬剤耐性細胞は足場非依存性増殖能を獲得していたことから，Taxを発現しているものと考えられた[6]。

この細胞を2.8×10^5cells/100 μlに調製し，ヌードマウス皮下に接種した。その結果，６週を経ても対照細胞と同様，腫瘍は形成されなかった。細胞数が少なかった可能性がある。また，MDBK細胞は腎上皮細胞に分化した細胞であり，腫瘍形成にはより未分化なウシ細胞を用いる必要があるのかもしれない。当初の実験計画ではTax発現MDBK細胞で腫瘍が形成されなかった場合，ラット繊維芽細胞の系で抗ANXA3抗体の抗腫瘍作用を確認する予定であった。しかしながら，後述のようにウシANXA3の血中濃度とEBL発症に関連が認められなかったことから，この実験は取りやめた。

© The Ito Foundation

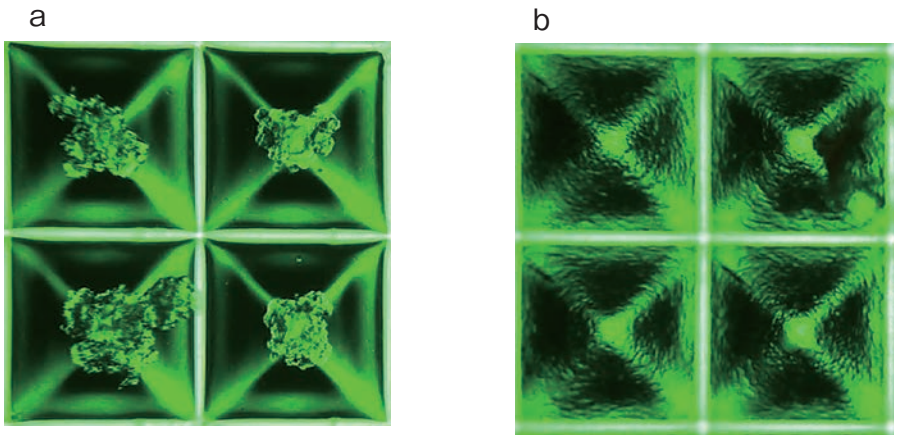


Fig. 1　Anchorage independent growth of Tax-expressing MDBK cells.
Tax-expressing MDBK cells (a) or normal MDBK cells (b) were propagated in SPHERICALPLATE 5D for 10 days.

3.2　BLVプロウイルスDNA切断用CRISPER/Cas9複合体の作製

crRNA1および２を含むCRISPER/Cas9 RNPをBLVプロウイルスゲノム由来５kbのPCR産物と反応させたところ，切断活性は認められなかった。一方，crRNA3を含むRNPを同1.5kb産物と反応させた場合には，約1.5kbと0.5kbへの切断が認められた（**Fig. 2**）。crRNA3を含むRNPによる予想切断長は1129bpおよび541bpであることから，本RNPは特異的にBLVプロウイルスゲノムを切断するものと考えられた。crRNA1および２で切断活性が認められなかった原因は不明である。

近年，次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析によりさまざまなレトロウイルスの組み込み部位の解析が行われているが，特定ゲノム領域の濃縮法はいまだ確立されていない。一方，宿主ゲノムを脱リン酸化後，CRISPR/Cas9によりプロウイルスゲノム内で切断すると，切断点のみにナノポアシーケンシングアダプターを導入することができる。ナノポアシーケンシングではロングリードを得ることができるため，効率よく組み込み部位の同定が可能となる。BLV感染未発症牛とEBL発症牛におけるプロウイルス組み込み部位を詳細に比較することにより，EBL発症機構を解明することができるかもしれない。加えて，CRISPR/Cas9は*in vivo*において疾患の原因となる遺伝子を直接編集することが可能であることから，本研究で得られたCRISPR/Cas9 RNPの応用によりEBLの治療が可能となるかもしれない。

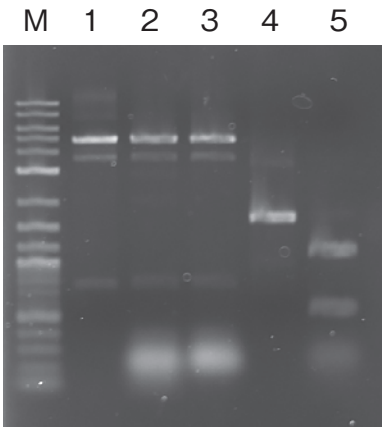


Fig. 2　*In vitro* digestion of BLV-derived DNA fragment by CRISPR/Cas9 RNPs.
BLV 5kb fragment (lane 1) was digested by crRNA1 containing RNP (lane 2) or crRNA2 containing RNP (lane 3). BLV 1.5kb fragment (lane 4) was digested by crRNA3 containing RNP (lane3). The reaction mixtures were analysed by agarose gel electrophoresis. Lane M, 2-log ladder.

© The Ito Foundation

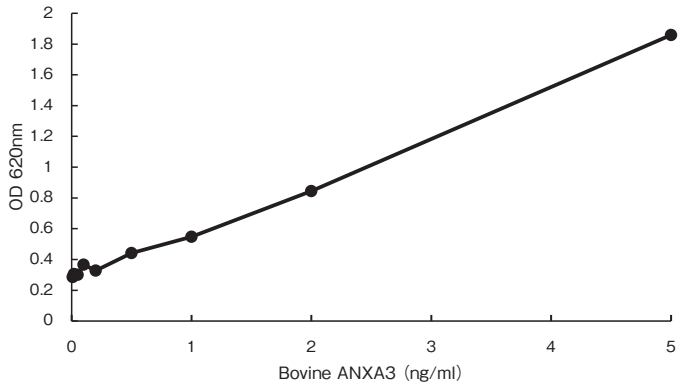


Fig.3　Calibration curve of the sandwich ELISA measuring bovine ANXA3 concentration.
Variable concentrations of recombinant bovine ANXA3 were subjected to the ELISA in duplicate.

3.3　ウシアネキシンＡ３定量系の開発と野外材料を用いた実証

階段希釈した捕捉抗体23-１をELISAプレートに固相化し，一定濃度の精製ウシANXA3および標識抗体67-１を反応させ，捕捉抗体の至適濃度を決定した。至適濃度の捕捉抗体を固相化したELISAプレートに一定濃度の抗原を加え，階段希釈した標識抗体を用いて反応を行った。得られた結果から検出抗体の至適濃度を決定し，ウシANXA3検出サンドイッチELISAを確立した。0.01-５ng/mlに調製した精製ウシANXA3を上記のサンドイッチELISAに供し，検量線を作成した。**Fig. 3** に示すように，ウシANXA3濃度0.02-５ng/mlで直線性が認められた。したがって，本サンドイッチELISAがウシANXA3定量系として使用可能であることが分かった。

そこで，EBL野外材料を用いて本サンドイッチELISAがBLV感染牛の予後診断に有用であるかの確認を試みた。浅頚リンパ節の腫脹によりEBLが疑われたウシの血清および同一個体の６カ月前の血清中のANXA3濃度を測定したところ，前血清は0.8ng/ml，後血清は50ng/mlであった。そこで，食肉衛生検査所でEBLと診断されたウシの血清を本サンドイッチELISAに供したところ，いずれも検出濃度未満であった。血中ANXA3濃度はヒト大腸がんおよび膵臓がんにおいて病態との相関が認められる[7]。一方，EBLの発症と血中ANXA3濃度には相関はないのかもしれない。

3.4　ウシ細胞基質タンパク質１の調製

血中ANXA3濃度とEBL発症の関連が認められなかったことから，新たな標的分子としてウシECMP1の発現を試みた。野生型ウシECMP1発現pCold Pro S2ベクターpWTで形質転換した大腸菌JM109を37℃で培養した。OD_{600}が0.3-0.5になった時点で15℃に移し，１mM IPTG存在下で発現を誘導したところ，その後の菌の増殖はほとんど認められなかった。溶菌後，SDS-PAGEに供した結果，不溶性画分にのみ74Kバンドが認められた。そこでpΔSSおよびpΔSPで大腸菌を形質転換し，同様の実験を行った。その結果，pΔSP形質転換体はpWTと同様誘導後の増殖は認められず，不溶性画分に63Kバンドが認められた。一方，pΔSS形質転換体は誘導中も増殖を続けたが，SDS-PAGEでは両画分ともに誘導産物は認められなかった。そこで，可溶性画分にProfinity IMACNi-ChargedResin（BIO-RAD）を加えて

© The Ito Foundation

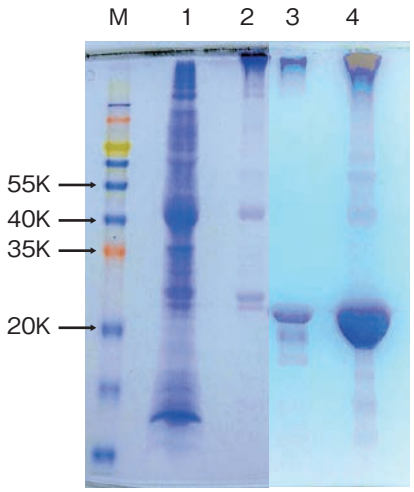


Fig. 4　Purification of truncated bovine ECMP1.
Lysate of the cells expressing truncated bovine ECMP1 (lane 1) was subjected to HisTrap FF column and His-taged protein was purified (lane 2), followed by digestion with HRV C3 protease (lane 3). The digestive products were subjected to HisTrap FF column and passing fractions (lane 4) were analysed by SDS-PAGE. M, molecular weight marker.

Hisタグ融合タンパク質を分離し，SDS-PAGEに供したところ，43Kにバンドを認めた。そこで，pΔSSで大腸菌BL21を形質転換し，ANXA3と同様にして20KのN末端欠損ウシECMP1を得た（**Fig. 4**）。pΔSP産物は野生型517アミノ酸中の339-497番アミノ酸，pΔSS産物は13-338番アミノ酸を欠く。したがって，ウシECMP1の13-338アミノ酸が封入体形成に関与し，細胞毒性を示したために菌の増殖が抑えられたものと考えられる。今後，ウシECMP1を標的とした予後診断法開発のため高度免疫血清およびモノクローナル抗体を作製する予定である。

4．要　約

EBLはBLV感染牛の2-3％が長い潜伏期間の後に発症する全身性腫瘍で，その発症機構の詳細は不明である。近年急激に報告数が増え大きな経済的損失をもたらしており，EBL対策の確立が急務となっている。

本研究では，BLVによるEBL発症のメカニズムを解明するため，Tax発現ウシ細胞のヌードマウス皮下移植試験を行ったが，腫瘍は形成されなかった。より多くの細胞あるいはより未分化な細胞を使う必要があったと考えられる。また，BLVプロウイルスゲノム挿入部位を決定するため，プロウイルスゲノムを特異的に切断するCRISPER/Cas9 RNPを作製した。次いで，予後診断法として，ウシの血中ANXA3濃度を測定するサンドイッチELISAを確立した。しかしながら，野外のEBL材料を用いた実験では実証に至らなかった。新たなEBL予後診断の標的分子としてウシECMP1の精製標品を得た。

謝　辞

本研究の遂行に当たりご協力頂きました北里大学獣医学部の夏堀教授および帯広食肉衛生検査所の職員の皆様に感謝申し上げます。

文　献

1）Aida, Y., *et al.*：Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus, *Front. Microbiol.*, 4, 2013.
2）農林水産省：監視伝染病発生年報
3）Inoue, E., *et al.*：L233P mutation of the Tax protein strongly correlated with leukemogenicity of bovine leukemia virus, *Vet. Microbiol.*, **167**, 364～371, 2013.
4）Mori, H., *et al.*：L233P mutation in the bovine leukemia virus Tax protein depresses endothelial cell recruitment and tumorigenesis in athymic nude mice, *Arch. Virol.*, **164**, 1343～1351, 2019.
5）Tomiyasu, T., *et al.*：L233P mutation in the bovine leukemia virus Tax protein has impact on annexin A3 and type I collagen secretion by host cells, *Vet. Microbiol.*, **256**, 109042, 2021.
6）森宏：牛白血病ウイルスによる白血病発症機構の解明―Taxの変異と腫瘍原性に関する研究―，北海道医療大学大学院薬学研究科学位論文，2019.
7）Wu, N., *et al.*：The role of annexin A3 playing in cancers, *Clin. Transl. Oncol.*, **15**, 106～110, 2013.

© The Ito Foundation

牛伝染性リンパ腫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（Ⅱ）

Identification of host-derived proteins interacting with BLV non-coding RNA（Ⅱ）

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. To date, although a number of studies have been intended to clarify molecular mechanisms of BLV pathogenesis, the detail of the mechanism is still enigmatic. Recent studies revealed that BLV genome encodes some novel long non-coding RNAs, and one of the non-coding RNA, AS1-S, is expressed in both latently infected cells and lymphoma cells, suggesting that the AS1-S RNA might play an important role in BLV pathogenesis. Previously, we identified an hnRNPM as the biding partner of the AS1-S RNA, and in the present study, we intended to clarify the molecular function brought by the interaction between the AS1-S and the hnRNPM using transcriptome and knock-down analysis. Transcriptome analysis suggested that cells expressing the AS1-S RNA altered the expression levels of several genes which are correlating with response to stimulus or signal transduction. Furthermore, knock-down analysis using a virus-producing cell line showed that the expression of BLV-derived proteins was not affected by knock-down of the hnRNPM, suggesting that the interaction between the AS1-S RNA and the hnRNPM might be unnecessary in active infected cells. Although further studies are required, these findings can contribute to understand the molecular mechanism of BLV pathogenesis in detail.

1．目　　的

本研究の目的は，牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）がコードする非翻訳性RNA AS1-Sと宿主タンパク質hnRNPMの相互作用がもたらす細胞機能の変化を解明することである。

BLVはレトロウイルス科に属する腫瘍ウイルスであり，ウシの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届出伝染病「牛伝染性リンパ腫」を引き起こす。リンパ腫を発症した牛は全廃棄の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，その原因となるBLVへの対策は現場における大きな課題となっている。しかしながら，BLVに対する有効な制御法（ワクチンや治療薬）は存在せず，現場における対策は一般的な衛生管理など限定的なものにとどまっているため，国内の牛伝染性リンパ腫発生件数は年々増加している現状である[1)]。BLVに対す

© The Ito Foundation

る有効な制御法の開発を困難にしている一因として，その病態進行やリンパ腫発症機構の詳細が解明されていないことがあげられ，実際，BLVに感染した個体の大半は無症状でありリンパ腫を発症するのはわずか数％のみであるが，その要因は明らかになっていない。

BLVは，感染細胞においてタンパク質に翻訳されない非翻訳性RNAを複数発現していることが報告されているが，それらの転写産物の機能の多くはいまだ解明されていない[2,3]。この非翻訳性RNAの一つであるAS1-Sは，他のウイルス因子が発現しない潜伏状態にある腫瘍細胞でも恒常的に発現しているため，BLV感染症の病態進行において重要な役割を果たすことが示唆される[2,4]。2020年度の伊藤記念財団助成において，我々はAS1-S RNAの細胞内における結合パートナーとして宿主由来RNA結合タンパク質hnRNPMを同定した。hnRNPMは核内に存在するRNA結合タンパク質であり，mRNAのプロセッシングや自然免疫活性化など多様な機能を持つことが報告されている。そのため，AS1-S RNAとhnRNPMとの相互作用により発揮される生物学的機能の解明は，BLVの病態理解に大きく貢献すると考えられる。

本課題では，AS1-S RNA発現細胞のトランスクリプトーム解析やBLV感染細胞のhnRNPMノックダウン解析により，発現変動する遺伝子やタンパク質の詳細を明らかにする。

2．方　法

2.1　AS1-S cDNAを導入した細胞のトランスクリプトーム解析

2020年度の伊藤記念財団助成において樹立したAS1-S RNA発現細胞MDBK/AS1-S細胞および対照細胞からNucleoSpin RNA Plus（マッハライ・ナーゲル社）を用いてRNAを抽出し，TruSeq stranded mRNA（Illumina）を用いてライブラリーを調製してRNA-seqを実施した（NovaSeq 6000，4 Gb，100 bp paired-end，n＝2）。得られたデータから両細胞で発現量に差がある遺伝子を探索し，g:Profiler（https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost）を用いたGene Ontology（GO）解析により発現変動している遺伝子群の機能的特徴を解析した。

2.2　siRNA処理によるBLV感染ウシB細胞のhnRNPMノックダウン

Stealth RNAi （Thermo Fisher Scientific） により hnRNPM に対する２種類の siRNA（siRNA#1，siRNA#2）をデザインし，合成したsiRNAをNucleofector 2b（Lonza）を用いてBLV感染ウシB細胞であるBL3.1細胞（ATCC，CRL-2306）に導入した。遺伝子導入３日後にRIPA buffer（Thermo Fisher Scientific）を用いて細胞溶解液を回収し，hnRNPMおよびBLV由来タンパク質であるgp51とｐ24の発現をウェスタンブロットで検出した。

ウェスタンブロット解析は，４×Laemmli Sample Buffer（Bio-Rad）を加えて95℃で５分間熱変性させたサンプルをSDS-PAGEで分離後PVDF膜に転写し，５％スキムミルクでブロッキング，各タンパク質に対する１次抗体（gp51（VMRD），p24（VMRD），hnRNPM（abcam），beta-tubulin（Merck））ならびに対応する２次抗体（HRP標識抗ウサギ抗体（Zymed）または抗マウス抗体（abcam））でそれぞれ室温１時間感作し，SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate （Thermo Fisher Scientific）による検出を行った。

2.3　AS1-S RNA発現細胞の自然免疫関連シグナル因子の発現解析

MDBK/AS1-S細胞および対照細胞を10 μg/mlのpoly（I:C)(Invivogen）存在下で培養し，poly

© The Ito Foundation

（I:C）刺激後０，５，15，30分の時点でRIPA bufferを用いて細胞溶解液を回収した。回収した細胞溶解液を用いて，NFκB，IκB，リン酸化Akt，IRF3およびリン酸化IRF3の経時的な発現変化をウェスタンブロットで検出した。

ウェスタンブロット解析は，各タンパク質に対する１次抗体（NFκB（Cell Signaling Technology），IκB（Cell Signaling Technology），リン酸化Akt（Cell Signaling Technology），IRF3（abcam），リン酸化IRF3（abcam））ならびに対応する２次抗体（HRP標識抗ウサギ抗体（Zymed）または抗マウス抗体（abcam））を用い，2.2と同様の方法で実施した。

３．結果と考察

3.1　AS1-S RNAの導入により発現変動する遺伝子群の同定

トランスクリプトーム解析の結果，MDBK/AS1-S細胞と対照細胞において168個の遺伝子が２倍以上の発現変動を示し，MDBK/AS1-S細胞で発現上昇または減少している遺伝子数はそれぞれ51個と117個であった（**Fig. 1a**）。168個の発現変動遺伝子についてGO解析を実施した結果，「regulation of response to stimulus」や「signal receptor binding」，「positive regulation of signal transduction」など，主に細胞への刺激に対する応答やシグナル伝達などの機能にかかわる遺伝子

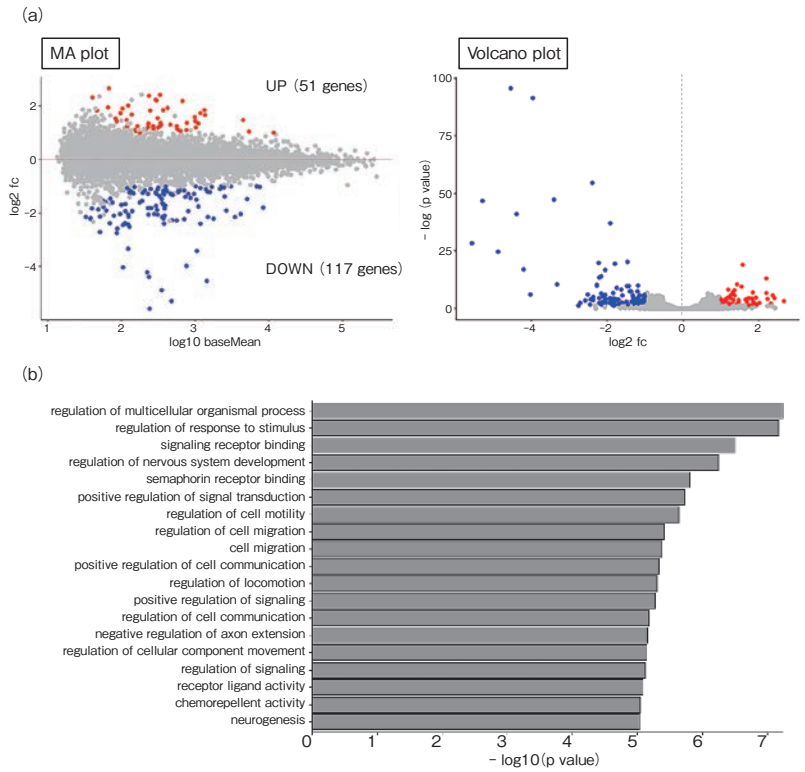


Fig. 1　(a) MA plot and volcano plot of the transcriptome analysis. The differentially expression genes (DEGs) identified between MDBK/AS1-S and mock cells are shown in black. (b) Result of gene ontology (GO) analysis. Total of 168 DEGs are used for the analysis, and enriched terms are shown; GO analysis was performed using g：Profiler web server (https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost) with default parameters and “Bos taurus” option.

© The Ito Foundation

群が有意に抽出された（**Fig. 1b**）。

この結果は，2020年度の伊藤記念財団助成研究において示唆されたAS1-S RNA導入細胞におけるpoly（I:C）刺激応答性の変化を裏付けるものであり，さらに，AS1-S RNAが自然免疫以外にもさまざまな細胞内シグナルに干渉している可能性が示唆された。

3.2　siRNA処理によりhnRNPMをノックダウンしたBLV感染ウシB細胞のタンパク質発現解析

BLVが持続感染しているBL3.1細胞において，hnRNPM標的siRNA（siRNA# 1，siRNA# 2）およびコントロールsiRNAによるノックダウンを実施し，ウェスタンブロットにより各種タンパク質の発現を解析した。その結果，siRNAを導入した細胞においてhnRNPMの発現が減少していることを確認できたが，BL3.1細胞が発現するBLV由来タンパク質gp51およびp24の発現量には変化が認められなかった（**Fig. 2**）。

この結果から，BL3.1細胞においてhnRNPMの存在はBLVの転写翻訳活性には関与しないことが示唆された。しかしながら，BLVが潜伏感染状態にあっても恒常的に発現していることがAS1-S RNAの大きな特徴であり，ウイルスが潜伏している状況下において潜伏感染の維持や感染細胞の病態進行に重要な役割を果たしている可能性が考えられるため，常にBLVが強い活性化状態にあるBL3.1細胞はAS1-SとhnRNPMの相互作用を解析するには不適であった可能性がある。そのため，BLV感染とhnRNPMの関係性については，潜伏感染を評価可能な材料を用いてさらなる検証を行う必要がある。

3.3　Poly（I:C）刺激したMDBK/AS1-S細胞の自然免疫シグナル因子の解析

2020年度の伊藤記念財団助成において得られた成果と今回得られたトランスクリプトーム解析の結果から，自然免疫シグナルを指標としてAS1-S RNAによる細胞シグナルの干渉メカニズムを評価できると考えられたため，AS1-S発現細胞における各種免疫シグナル因子の発現を解析した。しかしながら，MDBK/AS1-S細胞と対照細胞のどちらにおいてもpoly（I:C）刺激条件下においてNFκBとIκBの明瞭な発現量の変化を認めず（**Fig. 3**），リン酸化Aktについても非常に薄いバ

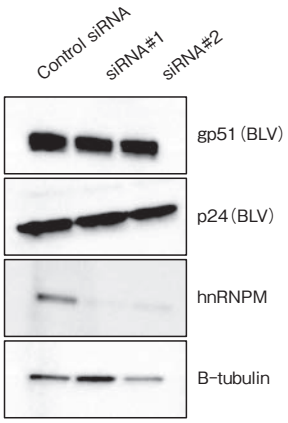


Fig. 2　Immunoblot analysis of the knock down cells. BL3.1 cells were introduced with siRNAs, and then expression of BLV-derived (gp51 and p24) and host-derived (hnRNPM and beta-tubulin) proteins was confirmed.

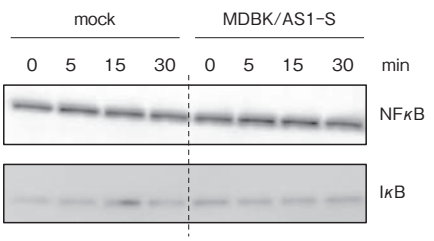


Fig. 3　Immunoblot analysis of MDBK/AS1-S and mock cells. Both cells were incubated in the presence of poly (I : C) and sequentially collected to evaluate the expression of NFκB and IκB.

© The Ito Foundation

ンドを確認できたのみで発現量の変化を認めなかった（Fig.省略）。さらにIRF3については，ウシIRF3を検出可能な抗体を入手できず，検証を行うことができなかった。そのため本課題では，AS1-S RNAとhnRNPMの相互作用の標的となりえるシグナル因子を特定することはできなかった。

なお，当初はsiRNAによるノックダウンを行ったBL3.1細胞でも同様に自然免疫シグナルタンパク質の発現解析を実施する予定であったが，実験の過程でATCCから購入したBL3.1細胞が自然免疫シグナルの阻害を引き起こす牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）に汚染されていることが判明したため，BL3.1細胞の免疫関連因子の解析は不可能と判断し，以降の解析は断念した。

3.4　総括

トランスクリプトーム解析によって，AS1-S RNAを導入した細胞では刺激に対する応答やシグナル伝達など多様な機能が影響を受ける可能性が示唆された。またノックダウン解析の結果より，BLVが強い活性化状態にあるBL3.1細胞ではhnRNPMのノックダウンによるウイルス転写翻訳活性への影響は認められず，BLVが潜伏感染状態にある細胞を用いたAS1-S RNAの機能評価の必要性が示唆された。

本研究では，入手可能な材料の制限などの問題により，hnRNPMのノックダウンがBLVの動態に与える影響やAS1-S RNAとhnRNPMの相互作用によるシグナル経路の変化などの詳細な解明には至らなかった。現在入手可能なウシＢ細胞株はすべてBLVに感染しているため非感染Ｂ細胞株を対照として設定することができず，加えて，培養細胞ではBLVが強い活性化状態にあるために潜伏感染状態の評価が不可能であることが大きな課題である。さらに，一部の細胞はBVDVに汚染されているため，各種刺激に対する細胞の免疫応答を評価する試験系の実施も困難であることが明らかとなった。今後は，BLVの潜伏感染状態を評価可能な培養細胞の作出を試みるとともに，昨年度の助成研究で実績があるRNA-タンパク質結合解析とハイスループットシークエンスを組み合わせた解析を実施することで，今回見出したAS1-S RNAによる宿主遺伝子発現変化を引き起こす分子機構をより詳細に解析する予定である。

4．要　　約

牛白血病ウイルス（BLV）は，ウシの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。最近の研究により，BLVは複数のウイルス由来非翻訳性RNAをコードしていることが報告されており，その一つであるAS1-S RNAは，潜伏状態にある感染細胞やリンパ腫細胞において恒常的に発現していることが明らかとなっている。この事実は，AS1-S RNAがBLV感染症の病態において広く重要な役割を担っている可能性を示唆している。2020年度の伊藤記念財団助成において，我々はAS1-S RNAの結合パートナーとして宿主由来RNA結合タンパク質hnRNPMを同定した。そこで本研究では，トランスクリプトーム解析やノックダウン解析により，BLVが発現する非翻訳性RNA AS1-Sとその結合パートナーであるhnRNPMの相互作用がもたらす細胞機能の変化をより詳細に解析した。トランスクリプトーム解析の結果，AS1-S RNAを導入した細胞は刺激に対する応答やシグナル伝達など多様な機能が影響を受ける可能性が示唆された。さらにノックダウン解析の結果から，BLVが強い活性化状態にある培養細胞ではhnRNPMのノックダウンによる影響が認められず，AS1-S RNAとhnRNPMの相

© The Ito Foundation

互作用が活性化状態にある細胞に与える影響は小さいことが明らかとなった。BLVが発現する非翻訳性RNAが持つ多彩な機能の解明にはさらなる検証が必要であるが，本研究の推進はBLVの病態理解への貢献が期待される。

文　献

1） 農林水産省：監視伝染病発生年報
2） Durkin, *et al.*：*Retrovirology*, **13**, 33, 2016.
3） Safari, *et al.*：*PLoS Pathog.*, **16**(5), e1008502, 2020.
4） Andoh, *et al.*：*Arch. Virol.*, **165**(12), 2869～2876, 2020.

© The Ito Foundation

牛のストレス応答における肝臓機能の解明

The role of the liver in the oxidative stress response of cattle

グルゲ　キールティ　シリ・吉　岡　　都
（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）

Keerthi S. Guruge and Miyako Yoshioka
（National Institute of Animal Health, NARO）

Oxidative stress has an unwarranted influence on the metabolic activity of various organs and tissues and is considered to be associated with the ruminant productivity. However, the role of liver during the stress response of cattle is not well known, and its detailed mechanism has not been elucidated. To carry out extensive exposure experiments using cattle is difficult because of laboriousness, high cost and animal welfare concern. Therefore, an *in vitro* assay system that maintains the liver function of cattle to detect oxidative stress on the liver is desirable. It has previously been clarified that co-culturing of bovine hepatic parenchymal cell lines and sinusoidal endothelial cell lines improves hepatic functions such as drug metabolism. Therefore, in this experiment, those cell-lines were used to evaluate oxidative stress response of cattle using lipopolysaccharides as an inducer.

The microarray analysis followed by the stress-related gene set enrichment analysis (GSEA) showed significant gene elevation of cytokines such as prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (COX-2), CCL5 (C-C motif chemokine ligand 5) and IL-19, which are known as inflammatory markers. In addition, a significant increase in gene expression of oxidases such as NADPH oxidase 1 was observed. However, the elevated gene expressions of superoxide dismutase 2 (SOD2), which is an antioxidant enzyme, and metallothionein (MT)-3, which is a hydroxyl radical scavenger, suggest a protective role against oxidative stress. The metabolome analysis of intracellular metabolites revealed an increased production of antioxidants such as polyamines suggesting a biological defense response to the oxidative stress in the liver. Collectively, these results shown that the bovine-derived liver cell culture assay could be a useful tool for evaluating the mechanism of pathological conditions such as inflammatory reaction in bovine oxidative stress and the biological defense response to it. This assay could be used to exploring new antioxidants that protect against oxidative stress in cattle.

1．目　　的

本研究は，牛の肝臓機能の状態を*in vitro*で再現・解析可能な牛肝臓由来細胞株の複合培養系を用い，牛に対する種々の酸化ストレスが肝機能に及ぼす影響について，抗酸化ストレス関連の遺伝子および代謝変動などを指標として解析し，牛の酸化ストレス応答における肝臓の役割を明らかに

© The Ito Foundation

することを目的としている。

肥育牛や乳用牛の飼養管理における輸送や群構成，濃厚飼料の多給，高泌乳牛の分娩や泌乳開始に伴う体脂肪動員等は，内因的および外因的ストレスとなる。とくに乳牛では，高いエネルギー産生のために好気的代謝が高まり，肝臓では酸化代謝産物による酸化ストレスの増大が考えられる。これらのストレッサーによって体内で活性酸素の産生が高まり，抗酸化防御機構が十分に機能しなくなると，牛は酸化ストレス状態に陥る。酸化ストレスあるいは酸化によるダメージは，さまざまな臓器・組織の代謝活性に大きな影響を与え，生産性阻害要因になると考えられている。近年，ヒトでは肝臓病の発症には酸化ストレスが関与すると言われているが[1]，牛のストレス応答において，肝臓がどのような役割を果たしているか，詳細なメカニズムは解明されていない。しかし，大動物である牛を用いた飼養試験は，経済的にも環境負荷の点でも負担が大きい。また，牛は反芻動物であるため，実験動物のマウスやラット等とは代謝機能が大きく異なっており，牛特有の肝臓機能に及ぼす酸化ストレスの影響を評価するためには，牛の肝機能を維持した代替細胞を用いた迅速・簡便な*in vitro*アッセイ系の活用が非常に有用であると考えられる。

代謝の中枢である肝臓は，代謝の場である肝実質細胞のほかクッパー細胞，類洞内皮細胞，星細胞等の非実質細胞から構成されており，これらの非実質細胞と肝実質細胞との協働によって，薬物代謝などの肝臓機能が調節されている。本課題では，我々が確立した牛肝臓由来不死化細胞株の共培養アッセイ系を用いて[2,3]，牛の酸化ストレスにおける種々の代謝および遺伝子発現の応答性を解析する。このような牛の酸化ストレス時の肝臓の応答性を明らかにすることで，酸化ストレスを防御する新規の抗酸化物質の探索など，牛の飼養管理技術や畜産物の安全性確保技術への応用が期待される。

2．方　法

2.1　牛由来肝細胞株共培養の酸化ストレスモデル

牛の肝臓機能の状態を*in vitro*で再現・解析可能な牛肝臓由来細胞共培養系として，肝実質細胞株であるBH４細胞と非実質細胞である類洞内皮細胞株であるB46細胞を用いた。それぞれの細胞は既報に準じて，10%FCS加のWillam's E培地で，BH４細胞とB46細胞の細胞数の比率が１：２になるように６ウェルプレートに播種し，培養48時間後にコンフルエントな状態になった後，無血清培地に交換して実験に供した。この共培養系に，炎症を介した酸化ストレス誘発剤としてLPS（１μg/ml）で48時間刺激後の細胞からtotal RNAを抽出した。細胞は３回の実験で１ウェルから抽出したtotal RNAを３本プールして１つのマイクロアレイ用のサンプルとした。

2.2　マイクロアレイによる遺伝子発現解析

2.1で採取したtotal RNAはNanoDrop Oneで RNA濃度および純度を算出し，A260/280≥1.8，A260/A230≥1.5のサンプルを以後の解析に用いた。また，バイオアナライザ解析のRIN（RNA Integrity Number）値およびRNA比（28S/18S）からRIN≥7.0であることを確認した。マイクロアレイには，Agilent社のB.taurus（Bovine）Oligoマイクロアレイver. 2.0を用いて，100ngのtotal RNAを鋳型として，一色法のプロトコールの方法に準じて実施した。無処理の対照群と比較して，２倍以上もしくは0.5倍以下に発現変動した遺伝子群を抽出した。ヒトおよびマウス酸化ストレス関連遺伝子セットからウシ酸化ストレス関連遺伝子セットを作製し，アレイで得られたデータについて，Gene Set Enrichment Analysis

© The Ito Foundation

（GSEA）解析を用いて，発現遺伝子群中で特定の機能を持つ遺伝子群がどのように変動しているかについて検討した。

2.3　メタボローム解析

牛実質細胞株BH４と類洞内皮細胞株Ｂ46の共培養系を用いて，2.1と同様に無血清培地でLPSを１μg/ml存在下で48時間培養後，５％（w/w）マンニトール水溶液で２回洗浄後，メタノールを添加によって得た抽出液をメタボローム解析に供した。細胞中の代謝物質は，CE-TOFMSまたはCE system および TripleQuad LC/MS（CE-QqQMS）を用いて測定した。標準部物質ピーク情報から得られたピーク面積値は相対面積値に変換後，標準部物質を用いて絶対定量値に換算し，各代謝物質について三点検量線より濃度を算出した。

３．結果と考察

3.1　牛肝臓酸化ストレスモデルにおけるマイクロアレイのGSEA解析

GSEA解析の結果，**Fig. 1** に示すようなエンリッチメントプロットが得られ，牛酸化ストレス関連遺伝子セットの中で，エンリッチメントへの寄与度が高いと判定された遺伝子は**Table 1** のとおりとなった。すなわち，牛肝臓由来細胞を用いた酸化ストレス応答において，**Table 1** に示す遺伝子の発現上昇が有意に認められた。

最もエンリッチメントへの寄与度が高いと判定された Prostaglandin-endoperoxide synthase 2は，Cyclooxygenase-2（COX-2）として知られる炎症マーカーであり，正常な状態では多くの細胞でほとんど発現しておらず，炎症が起きると血管内皮細胞や血管平滑筋細胞等での発現が上昇する[4]。今回の牛由来肝細胞株共培養の酸化ストレスモデルでは，類洞内皮細胞由来であるＢ46細胞においてCOX-２の発現が亢進し，アラキドン酸からプロスタグランジンＨ$_2$の生成を高めていると考えられる。炎症性マーカーとしては，CCL5（C-C motif chemokine ligand 5）やIL-19のサイトカインも発現上昇遺伝子の上位に観察された。CCL５は，Ｔ細胞や血小板，マクロファージや内皮細胞など多様な細胞から分泌され，炎症部位に白血球を動員する炎症性ケモカインの一種である。一方，IL-19は，IL-10ファミリーに属する免疫抑制性サイトカインであるが，マウスのLPS投与モデルでは，心臓，肺，腎臓のほか，肝臓でIL-19遺伝子発現が上昇することが報告されている[5]。また，肝臓細胞株であるHuh-７細胞において，IL-19刺激により活性酸素種（ROS）の産生が誘導されることから，牛肝臓ではLPSによる酸化ストレスで誘導されたIL-19がさらに酸化ストレスを増強している可能性がある。

LPSによって誘導される酸化ストレスに対して，NADPH oxidase 1 などの酸化酵素の遺伝子発現の上昇が有意に認められるが，それを打ち消す抗酸化剤である Superoxide dismutase 2（SOD2）やヒドロキシラジカルのスカベンジャーになると考えられている金属結合性低タンパク質のMetallothione（MT）-３の有意な遺伝子発現上昇が観察された。SOD２はマンガン依存性のSODであり，ROSの一種であるスーパーオキシド（O_2^-）を過酸化水素と酸素に変換し，過酸化水素はさらにカタラーゼによって酸素と水に分解される。牛肝臓酸化ストレスモデルにおいては，他の代表的な抗酸化酵素であるグルタチオンペルオキシダーゼやカタラーゼの遺伝子上昇が上位に観察されなかったことから，SOD２が肝臓保護に重要な役割を有することが示唆された。

また，MTは低分子の金属結合タンパク質で，Ⅰ～Ⅳまでの４種のアイソフォームが存在し，活性酸素のスカベンジャーとして抗酸化作用を有する。Ⅰ，Ⅱ型は肝臓などのほとんどの組織に分布

© The Ito Foundation

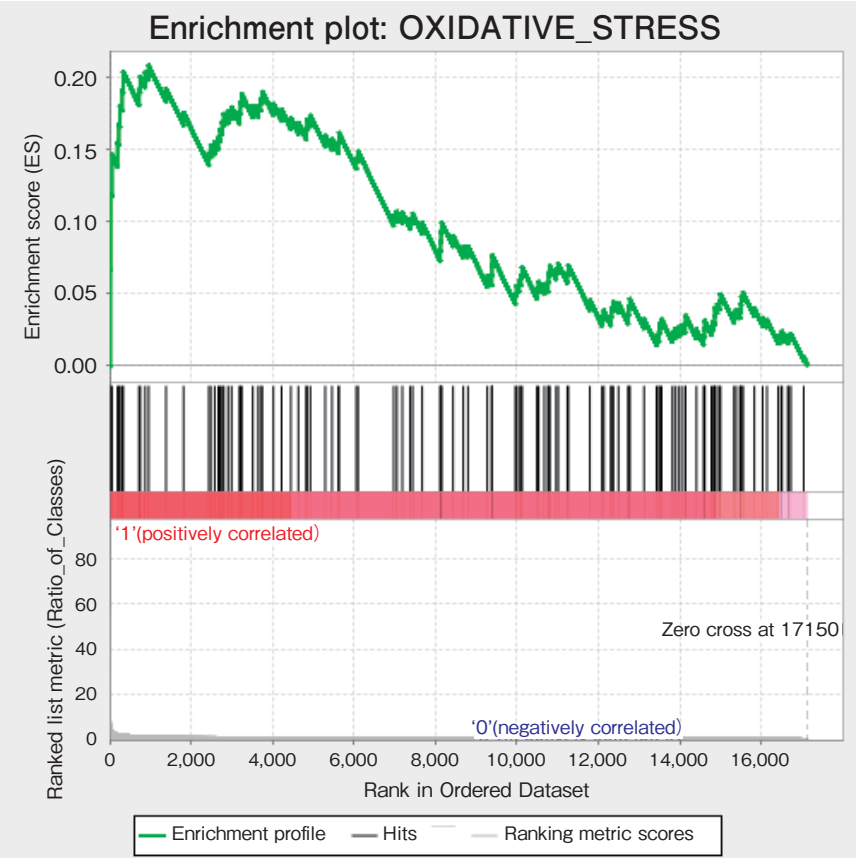


Fig. 1 Enrichment plot of bovine oxidative stress response gene set

Table 1 Enrichment score for genes contributed significantly to enrichment in the bovine oxidative stress gene set

SYMBOL	TITLE	Metric Score	Enrichment Score
PTGS2	prostaglandine endoperoxide synthase 2	9.53	0.0066
CCL5	C-C motif chemokine ligand 5	7.58	0.119
MT3	metallothionein 3	4.07	0.146
IL19	interleukin 19	2.33	0.155
SOD2	superoxide dismutase 2	2.07	0.168
LOC788751	eosinophil peroxidase	2.00	0.180
IPCEF1	interaction protein for cytohesin exchange factors 1	2.00	0.191
TXNDC2	thioredoxin domain containing 2	2.00	0.204
NOX1	NADPH oxidase 1	1.50	0.192
SGK2	serum/glucocorticoid regulated kinase 2	1.50	0.200
CTGB	cytoglobin	1.43	0.203
AOX1	Aldehyde oxidase 1	1.38	0.208

© The Ito Foundation

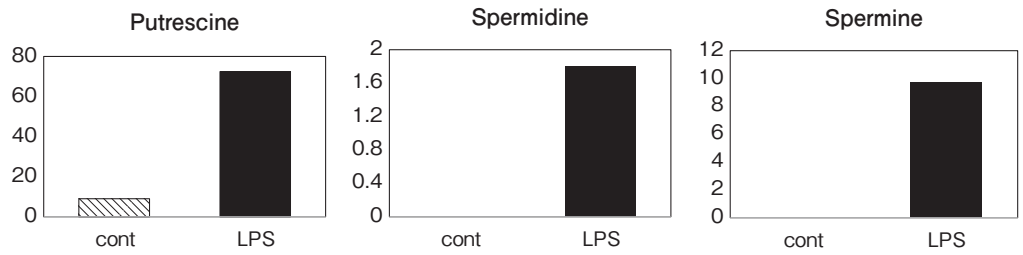


Fig. 2　Polyamine concentration（pmol/10^6cells）induced by *in vitro* assay of bovine oxidative stress

しているが，MT-３はとくに脳での局在が報告されている等，その遺伝子発現制御は他のMTsと異なっている[6]。牛の肝臓酸化ストレスモデルでのMT-３遺伝子の発現上昇は，牛の肝臓においてもなんらかの役割を果たしている可能性があるが，今後の詳細な解析が必要である。

3.2　牛肝臓酸化ストレスモデルにおけるメタボローム解析

細胞内代謝産物のメタボローム解析では，酸化ストレスによって抗酸化作用のあるグルタチオン濃度の上昇や，グルタチオン産生を促進して肝機能改善作用のあるベタイン，生体内でラジカルスカベンジャーとして働くイミダゾールペプチドの一種であるカルノシンの増加傾向が認められたが，有意な上昇は認められなかった。また，プトレシン，スペルミジン，スペルミンなどのポリアミン類の濃度が上昇した（**Fig. 2**）。ポリアミンは細胞の成長や増殖作用を有し，細胞への影響や動物試験などからアンチエイジングや肝機能改善作用が注目されている[7]。しかし，酸化ストレス時に，肝臓細胞によるポリアミンの産生増加が牛の酸化ストレスにどのように関与するのか，さらなる検討が必要である。

4．要　　約

牛の飼養管理における酸化ストレスは，さまざまな臓器・組織の代謝活性に大きな影響を与え，生産性阻害要因になると考えられているが，牛のストレス応答において，肝臓がどのような役割を果たしているか，詳細なメカニズムは解明されていない。しかし，牛を用いた飼養試験は，経済的および動物福祉の観点から実施が困難であるため，牛の肝機能を維持した*in vitro*アッセイ系を用いて，牛特有の肝臓機能に及ぼす酸化ストレスの影響を評価する必要がある。我々の開発した*in vitro*アッセイ系は，種々の代謝の中心である肝実質細胞株と類洞内皮細胞株の共培養系であり，これらの非実質細胞と肝実質細胞との協働によって，薬物代謝などの肝臓機能が向上することを明らかにしている。そのため本実験では，これらの牛由来肝細胞共培養アッセイ系を用いて，LPSを誘導剤として牛の酸化ストレス応答性を解析した。

マイクロアレイによるGSEA解析では，炎症性マーカーとして知られるProstaglandin-endoperoxide synthase 2（COX-2）やCCL5（C-C motif chemokine ligand 5）やIL-19のサイトカインの遺伝子上昇が有意に認められた。また，NADPH oxidase 1などの酸化酵素の遺伝子発現の上昇が有意に認められたが，それに対抗する抗酸化酵素であるSuperoxide dismutase 2（SOD2）やヒドロキシラジカルのスカベンジャーであるMetallothionein（MT）-３の遺伝子発現も上昇していた。細胞内代謝物のメタボローム解析では，ポリアミン等の抗酸化物質の産生が増加しており，肝臓での酸化ストレスに対する生体防御反応が明らかとなった。これらのことか

© The Ito Foundation

ら，牛由来肝臓細胞培養アッセイ系では，牛の酸化ストレスにおける炎症反応等の病態のメカニズムやそれに対する生体防御応答性を解析する有用なツールであることが示された。今後，本アッセイ系を用いた酸化ストレスを防御する新規の抗酸化物質の探索など，畜産物の安全性評価への応用が期待される。

文　献

1）坪内博仁ら：肝とストレス，肝臓，56(7), 313～323, 2015.

2）Yoshioka, M., Takenouchi, T., Kitani, H., Guruge, K. S., Yamanaka N.：Synergistic induction of drug-metabolizing enzymes in co-culture of bovine hepatocytic and sinisoidai cell line, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim*, **56**(**1**), 2～9, 2020.

3）Yoshioka, M., Takenouchi, T., Kitani, H., Okada, H., Yamanaka N.：Establishment of SV40 large T antigen-immortalized bovine liver sinusoidal cell lines and their immunological responses to deoxynivalenol and lipopolysaccharide, *Cell Biol Int*, **40**(**12**), 1372～1379, 2016.

4）Sanz, P. M., Hortelano, S., Bosca, L., Casado, M.：Cyclooxygenase 2: understanding the pathophysiological role through genetically alterd mouse models, *Front Biosci*, **11**, 2876～2888, 2006.

5）Chung-His, H., Chiau-Juon, C., Lih-Yun, C., Chuan-Chih, H., Ming-Shi, C.：IL-19 is involved in the pathogenesis of endotoxic shock, *Shock*, **29**(**1**), 7～15, 2008.

6）Coyle, P., Philcox, J. C., Carey, L. C., Rofe, M.：Metallothionein: The multipurpose protein, *Cell Mol Life Sci*, **59**, 627～647, 2002.

7）Madeo, F., Eisenberg, T., Pietrocola, F., Kroemer, G.：Spermidine in health and disease, *Science*, 359, eaan2778, 2018.

© The Ito Foundation

補体制御性タンパク質CD46の豚熱ウイルス受容体としての機能解析

Functional analysis of porcine complement regulatory protein CD46 upon classical swine fever virus infection

岩丸　祥史[1]・池田　圭吾[1]・原口　清輝[2]
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構　[1]動物衛生研究部門，[2]生物機能利用研究部門）

Yoshifumi Iwamaru[1], Keigo Ikeda[1] and Seiki Haraguchi[2]
([1]National Institute of Animal Health, [2]Institute of Agrobiological Science, NARO)

Classical swine fever (CSF) is a highly contagious viral disease of swine, which causes significant economic losses in the swine industry. CSF is a disease listed by the World Organisation for Animal Health (OIE) Terrestrial Animal Health Code and reportable to OIE. The responsible pathogen, CSF virus (CSFV) is a member of the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae*. In the closely related bovine viral diarrhea virus, complement regulatory protein CD46 is identified as a cellular receptor. CD46 is reported as a candidate receptor for CSFV, whereas there are conflicting reports for its function and it remains to be re-examined the role of CD46 in CSFV infection.

In this study, we generated CD46 knockout cells to examine whether the complement regulatory protein CD46 has a receptor function for CSFV. CD46 was ablated in PPK3F cells by CRISPR-Cas9-mediated gene targeting. Using the GPE$^-$ strain as the test CSFV, we compared the efficiency for (1) viral replication, (2) viral attachment and entry into cells, and (3) intercellular viral diffusion between CD46 knockout cells and its parental PPK3F cells. As a result, CD46 knockout cells showed no significant reduction in each indicator in comparison to the PPK3F cells. Although we performed the study with only one live attenuated vaccine strain, our results suggest the possibility that CD46 does not act as a receptor for CSFV at least in this model.

1．目　　的

豚熱ウイルス（CSFV）は，エンベロープを有する１本鎖RNAウイルスであり，フラビウイルス科ペスチウイルス属ペスチウイルスＣに分類される。ペスチウイルス属には，牛ウイルス性下痢（BVD）ウイルスやボーダー病ウイルスがあり，各々ペスチウイルスＡ（BVDウイルス１）とＢ（BVDウイルス２），ペスチウイルスＤに分類されている。豚熱ウイルスに感染した豚には発熱や白血球減少が認められ，出血性病変を形成し数日から２週間で死亡することが多い。我が国では，1992年の熊本県での最終発生以降，豚熱の発生報告はなかった。しかし，2018年９月９日の岐阜県での発生を皮切りに，2022年３月現在，16県で計77事例発生している。これまでに約28万頭の豚が

© The Ito Foundation

殺処分されており，養豚業界に甚大な被害を引き起こしている。さらに，野生イノシシにおいて豚熱ウイルスが拡散していることから，豚熱の発生が長期化する恐れがある。

CSFVは，３つのエンベロープタンパク質，E^{rns}，E1，E2を持っている。E^{rns}とE2はウイルスエンベロープの外側に露出しており，中和抗体の主要な標的となる。E2に対する抗体は，CSFV感染を完全に防御するのに対し，E^{rns}に対する抗体は，部分的な防御にとどまる。ヘパラン硫酸とラミニン受容体は，E^{rns}を介したCSFVの接着因子として報告されている[1, 2]。また，細胞表層に存在するTNF-a切断酵素であるADAM17が，E2を介したCSFVの接着因子であることが，ごく最近報告された[3]。補体制御タンパク質であるCD46に関しては，CSFVの主要な受容体であるという報告[2]がある一方，これと相反する報告[4]もあり，結論が出ていない。CSFVの病原性発現機構の解明には，CD46がウイルスの増殖に果たす役割を明らかにすることが重要である。本研究では，ゲノム編集技術によりCD46欠損細胞を作出し，CSFV感染後のウイルス増殖動態を親細胞と比較を行うことで，CD46がCSFV増殖に果たす役割の解析を目的とする

２．方　　法

2.1　CD46欠損細胞の樹立

CSFV研究に汎用されている豚腎臓上皮由来株化細胞PK15細胞のクローン株である，PPK3F細胞のCD46遺伝子配列のシーケンスを行い，データベースに登録されている豚のCD46遺伝子塩基配列情報と比較した。切断標的DNA配列を決定後，Guide-it CRISPR/Cas9 System（TaKaRa）を利用したゲノム編集技術により，CD46欠損細胞を作出，樹立した。

2.2　CD46タンパク質の検出

PPK3F細胞とCD46欠損細胞から，界面活性剤添加緩衝液でタンパク質を抽出し，SDS-PAGE後，抗CD46抗体（BioRad）を用いたウエスタンブロット法でCD46タンパク質を検出した。各細胞をパラホルムアルデヒドで固定後，細胞膜透過処理し，CD46タンパク質を上記の抗体を用いて間接蛍光抗体法で検出した。

2.3　GPE^-株感染試験

CSFVウイルスとして，生ワクチンとして使用されている弱毒CSFV GPE^-株を使用した。各細胞を洗浄後，各感染多重度（MOI）のウイルス液と細胞を，37℃で１時間インキュベートした。ウイルス液を洗浄除去後，培地を添加し60時間培養した。半量の培養上清を回収し，残りの培養上清と細胞を同時に回収した。回収した各検体の感染価を，PPK3F細胞を用いて測定した。

2.4　CSFV Ｅ２タンパク質の免疫染色

感染細胞を洗浄し室温で乾燥させた後，80℃で１時間熱処理した。HRP標識した抗E2タンパク質マウスモノクローナル抗体（WH303，APHA）を固定した細胞と反応させ，洗浄後にHRP発色試薬（PIERCE）で検出した。

2.5　フォーカスアッセイ

ウイルス感染前日に，各細胞を48wellプレートに培養した。ウイルスをヘパリン存在／非存在下で，37℃で１時間インキュベートした。各ウイルス液と各細胞を，37℃あるいは４℃で１時間インキュベートした。細胞をPBSで洗浄後，１％アガロース加培地を重層し，固化後，37℃で24時間培養した。その後，E2タンパク質の免疫染色を行い，光学顕微鏡で取得した画像のフォーカス数と面積をImageJ（NIH）で解析した。

2.6　GPE^-株遺伝子量の解析

４℃で１時間GPE^-株を吸着させた各細胞を洗浄後，NucleoSpin RNA Plus（TaKaRa）を用い

© The Ito Foundation

てRNAを抽出した。One Step PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real time）（TaKaRa）を用いて，GPE⁻株の遺伝子量を測定し，βアクチンの発現量で補正し比較した。

３．結果と考察

各細胞におけるCD46タンパク質の発現レベルを，ウエスタンブロット法と免疫染色法により評価した結果（**Fig. 1**），樹立したCD46欠損細胞においてCD46タンパク質は発現していないことを確認した。

GPE⁻株感染60時間後の各細胞における，E2タンパク質染色部の面積は，いずれのMOIにおいても，PPK3F細胞と比較しCD46欠損細胞のほうが多い傾向がみられた（**Fig. 2A**）。GPE⁻株感染60時間後の各細胞における，培養上清の感染価を測定したところ，CD46欠損細胞のほうが低値であったが，細胞と培養上清を合わせた感染価を測定すると，CD46欠損細胞のほうが高値であった（**Fig. 2B**）。以上の結果から，CD46タンパク質の欠損はGPE⁻株の細胞における増殖に影響していない可能性が示唆された。

次に，各細胞におけるGPE⁻株の吸着・侵入・増殖に違いがあるかを，フォーカス形成法で詳細に解析した。GPE⁻株は細胞表面に存在するヘパラン硫酸依存性に接着することが知られているた

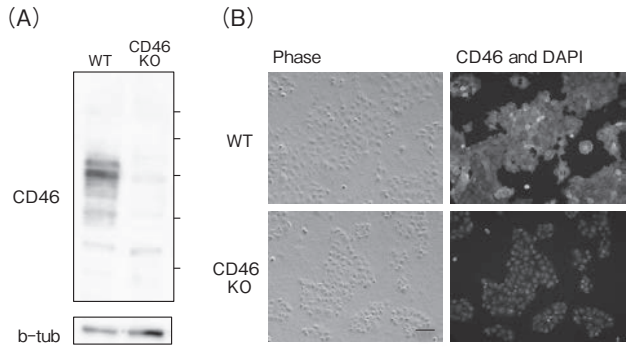


Fig. 1　Expression levels of CD46 in CD46 knockout (CD46 KO) cell and its parental PPK3F (WT) cell. (A) Western blot analysis of CD46 expression. b-tubulin (b-tub) was used as a control to confirm the protein content of the cell extracts. (B) Immunocytochemical analysis of CD46 expression. Phase indicated phase-contrast microscopic image. Nuclei were stained with DAPI. Scale bar indicated 100 μm.

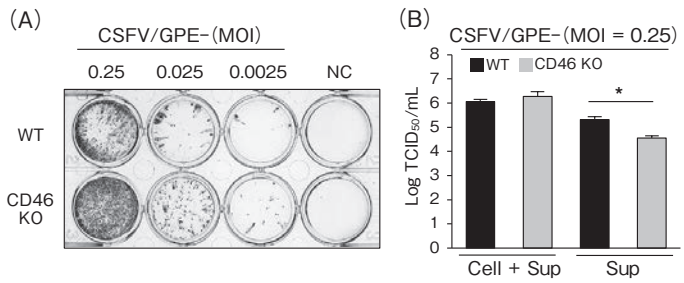


Fig. 2　Replication characteristics of GPE⁻ strain in CD46 KO and WT cells. (A) Cells were infected at different MOI with GPE⁻ strain and visualized with direct immunoperoxidase staining of the viral glycoprotein E2 after 60 h. (B) The cells were infected at MOI=0.25 with GPE⁻ strain. At 60 h after infection, the half of culture supernatant (Sup) or cells together with the rest of Sup (Cell+Sup) were collected. Virus titers in Sup or Cell+Sup were determined by end-point dilution. Welch's t-test was performed to determine the statistical differences (*$p<0.05$).

© The Ito Foundation

め，あらかじめウイルスをヘパリン非処理・処理を行い，解析を行った。37℃でウイルス吸着・侵入させ24時間培養した場合，ヘパリン非処理条件下でのフォーカス形成数は，CD46欠損細胞のほうが多かったが，ヘパリン処理条件では両細胞ともフォーカス形成数が減少し，かつPPK3F細胞のほうがわずかに多くなった（**Fig. 3A**）。4℃でウイルス吸着させ，37℃で24時間培養した場合，ヘパリン処理の有無にかかわらず，フォーカス形成数はCD46欠損細胞のほうが多かった（**Fig. 3B**）。4℃でウイルスを吸着させた直後のウイルス遺伝子量を細胞間で比較した場合，ヘパリン処理の有無にかかわらず，遺伝子量はCD46欠損細胞のほうが多い傾向があった（**Fig. 4**）。これらの結果から，CD46タンパク質の欠損はGPE⁻株の細胞吸着・侵入に影響していない可能性が示唆された。

最後に，各細胞間でGPE⁻株の細胞間拡散に違いがあるかを解析した。4℃でウイルス吸着させ，37℃で24時間培養した場合，両細胞間で

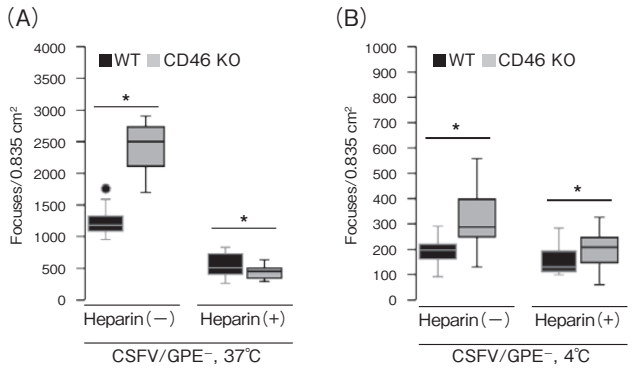


Fig. 3　CSFV focus assay. GPE⁻ strain was treated with heparin （+） or mock treated （−） for 1 h at 37℃. The cells were then infected with the virus for 1 h at 37 （A） or 4 （B）℃. After incubation for 24 h at 37℃ under a solid agarose/medium overlay, the infected cells were visualized with indirect immunoperoxidase staining of the viral glycoprotein E2. Number of focuses per indicated area on WT （black） and CD46 KO （grey） cells are presented as box-and-whisker plots. Welch's t-test was performed to determine the statistical differences （*p＜0.05）.

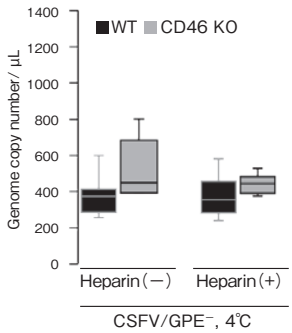


Fig. 4　CSFV binding assay. GPE⁻ strain was treated with heparin （+） or mock treated （−） for 1 h at 37℃. The cells were then infected with the virus for 1 h at 4℃. Cells were washed before quantitative RT-PCR. Viral RNA from WT （black） and CD46 KO （grey） was quantified using the standard curve and viral copies normalized to the expression of b-actin were presented as box-and-whisker plots. Welch's t-test was performed to determine the statistical differences （*p＜0.05）.

© The Ito Foundation

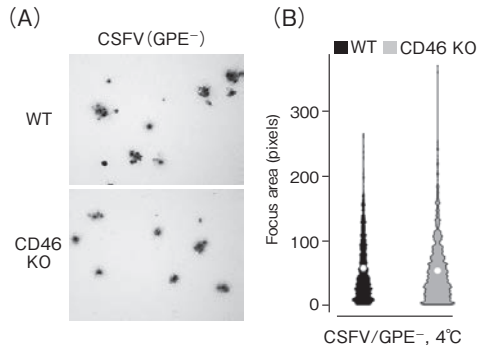


Fig. 5　CSFV cell-to-cell spread assay. GPE⁻ strain was mock-treated for 1 h at 37℃. The cells were then infected with the virus for 1 h at 4℃. After incubation for 24 h at 37℃ under a solid agarose/medium overlay, the infected cells were visualized with indirect immunoperoxidase staining of the viral glycoprotein E2 (A). Focus area from WT (black) and CD46 KO (grey) was measured by ImageJ software and presented as violin plots with mean value (white circle) (B). Welch's t-test was performed to determine the statistical differences (*$p<0.05$).

フォーカス面積に差は認められなかった（**Fig. 5**）。

以上の結果は，弱毒化生ワクチン株であるGPE⁻株を使用して得られたことを留意する必要があるが，これらの結果はCD46がCSFVの受容体としての機能を果たしていないことを示唆する。CD46欠損により，CSFVに非特異的に結合する分子群が除去されている可能性があることから，今回作出された細胞は，CSFV新規受容体探索の有用なツールになると考えられる。

4．要　約

豚熱（CSF）は，伝染力の強い豚のウイルス性疾病であり，養豚業界に多大な経済的被害をもたらす。そのため，CSFは国際獣疫事務局において届け出義務のある疾病のひとつである。原因となるCSFウイルス（CSFV）は，フラビウイルス科ペスチウイルス属に分類される。CSFVに近縁である牛ウイルス性下痢症ウイルスでは，受容体として補体制御タンパク質であるCD46が同定された。CD46はCSFVにおいても受容体として機能するという報告がある一方，これと相反する報告も最近なされ，CD46が培養細胞でCSFV感染に果たす役割を再検討する必要があった。

本研究では補体制御性タンパク質CD46が，CSFVの受容体機能を持つかどうかを，ゲノム編集技術によりCD46を欠損させた細胞を用いて検証した。供試CSFVとしてGPE⁻株を用いて，各細胞における①増殖能，②細胞への吸着・侵入能，③細胞間拡散能，を評価した結果，CD46欠損細胞は親細胞であるPPK3F細胞と比較して，各指標の低下は認められなかった。弱毒化生ワクチン株であるGPE⁻株を使用した実験結果である点に留意する必要があるが，これらの結果は，CD46がCSFVの受容体としての機能を果たしていないことを示唆する。

文　献

1）Chen, J., He, W. R., Shen, L., Dong, H., Yu, J., Wang, X., Yu, S., Li, Y., Li, S., Luo, Y., Sun, Y., Qiu, H. J.：The laminin receptor is a cellular attachment receptor for classical Swine Fever virus, *J Virol*, **89**, 4894～906, 2015.

2）Dräger, C., Beer, M., Blome, S.：Porcine complement regulatory protein CD46 and heparan sulfates are the major factors for classical swine fever virus attachment in vitro, *Arch Virol*, **160**, 739～46, 2015.

3）Yuan, F., Li, D., Li, C., Zhang, Y., Song, H., Li, S., Deng, H., Gao, G. F., Zheng, A.：ADAM17 is an

© The Ito Foundation

essential attachment factor for classical swine fever virus, *PLoS Pathog*, **17**, e1009393, 2021.
4） Cagatay, G. N., Antos, A., Suckstorff, O., Isken, O., Tautz, N., Becher, P., Postel, A.：Porcine Complement Regulatory Protein CD46 Is a Major Receptor for Atypical Porcine Pestivirus but Not for Classical Swine Fever Virus, *J Virol*, **95**, 2021.

© The Ito Foundation

家畜用ワクチンのための新規ワクチンプラットフォームの構築

Development of a novel platform for veterinary vaccines

新　地　浩　之
（鹿児島大学学術研究院理工学域工学系）

Hiroyuki Shinchi
（Graduate School of Science and Engineering, Kagoshima University）

In recent years, the risks for livestock infectious diseases is increasing due to globalization. An outbreak of a new infectious disease may require massive culling of livestock, which could result in enormous economic losses. Therefore, the vaccination strategy against infectious diseases is crucially important for the livestock industry. Vaccines are mainly classified into live attenuated and inactivated vaccines. Live attenuated vaccines provide strong immune responses. However, i) there is a possibility that induces infectious diseases, ii) vaccination may affect meat exports, and iii) it takes a long time to develop the vaccine. In contrast, inactivated vaccines do not cause infectious disease, and vaccines can be produced once the pathogen is isolated and cultured. However, their immunogenicity is lower and less sustained efficacy than live attenuated vaccines. Thus, it is necessary to add adjuvants (immunostimulants) to enhance the effectiveness of inactivated vaccines. Recently, we developed Glyco-nanoadjuvants that can induce strong immune responses, predominantly cellular immunity. In this study, we addressed developing novel vaccine materials consisting of Glyco-nanoadjuvants conjugated with recombinant protein antigens. Glyco-nanoadjuvants could be a versatile platform for the development of various vaccines against livestock infectious diseases. Thus, it is expected that vaccines can be supplied promptly when emerging and re-emerging infectious diseases occur, leading to reduced prevention measures against infectious diseases and a stable supply of meat.

1．目　　的

近年，人や物流等の国際化に伴い，近隣諸国から家畜感染症が持ち込まれる可能性が増加している。新たな感染症が流行すると，大規模な家畜の殺処分等が必要になる場合があり，甚大な経済的損失が発生する恐れがある。実際に，2018年に日本で26年ぶりに発生した豚熱（豚コレラ）においては，これまでに28万頭を超える豚が殺処分され，きわめて大きな損失が生じている。したがって，これらの感染症を予防・軽減するワクチンを迅速に開発する技術の確立は，畜産業においてきわめて重要な課題である。

ワクチンは，弱毒化した生きた病原体を接種する『生ワクチン』と，不活化した病原体やその抗原の一部を接種する『不活化ワクチン』に大別さ

© The Ito Foundation

れる。生ワクチンは，生きた病原体を接種するため，高い感染防御効果が得られる。しかし，１）病原性が復帰し感染症を誘発する恐れがあること，２）当該感染症（例：豚熱）の清浄国では生ワクチンの接種によって食肉の輸出に影響を及ぼす場合があること，３）開発に長期間を要すること，などが課題である。一方，不活化ワクチンは，感染症の恐れがなく，病原体を分離・培養できれば，ただちにワクチンを製造することができる。したがって，安全性の高い不活化ワクチンへの置換が進められている。一方，不活化ワクチンは，生ワクチンに比べて，免疫誘導能が低く，効果の持続性に乏しいことが課題である。ワクチンの効果を増強するためには，アジュバント（免疫増強剤）の添加が必要であるが，既存のアジュバントは，抗体産生に寄与する液性免疫を増強する一方で，ウイルス感染細胞の除去などに重要な細胞性免疫の誘導能が低い。したがって，不活化ワクチンで，病原体に対する強力な免疫を誘導するには，液性免疫と細胞性免疫の両方を誘導するアジュバントが鍵になる。さらに，病原体に対する免疫を効率的に誘導するには，同一の免疫細胞に抗原分子とアジュバントの両方を輸送して活性化することも重要である。従来のワクチンは，抗原分子とアジュバントの混合物として投与する場合が多いが，これらを一体化して，免疫細胞選択的に輸送できれば，より効率的に免疫を誘導するワクチンになると考えられる[1,2]。本研究は，ワクチン開発における上記問題点を解決するために，独自開発した細胞性免疫誘導能を有するアジュバント（＝グライコナノアジュバント）[3]を抗原分子のキャリアに用いたワクチンプラットフォームを構築することを目的とした。

２．方　法

本研究では，グライコナノアジュバント（＝合成低分子Toll様受容体７（TLR7）リガンドおよび糖分子を共固定化した金ナノ粒子）[3]のワクチンプラットフォームとしての有用性を示すために，１）組換えタンパク質抗原とグライコナノアジュバントを一体化したワクチン材料の調製，２）細胞レベルでのグライコナノアジュバントの免疫刺激活性評価，３）動物体内でのワクチン材料の免疫誘導能を評価した。

2.1　組換えタンパク質抗原とグライコナノアジュバントを一体化したワクチン材料の調製

グライコナノアジュバントは，既報を参考に調製した[3]。本研究で用いたグライコナノアジュバントには，合成低分子TLR7リガンド誘導体（＝アジュバント）および糖誘導体（＝免疫細胞をターゲティング）に加えて，組換えタンパク質を固定化するためのリンカー分子を共固定化した。まず，塩化金ナトリウムを水素化ホウ素ナトリウムで還元して金ナノ粒子（GNP）を合成した。続いて，TLR7リガンド誘導体，糖誘導体，タンパク質固定化用リンカー分子の３種類を特定のモル比で混合した溶液を加えて，GNP表面に固定化した。得られたグライコナノアジュバントは，透析で精製した。次に，グライコナノアジュバント表面のタンパク質固定化用リンカー分子に組換えタンパク質抗原を固定化して，ワクチン材料を調製した。

2.2　マウス骨髄由来樹状細胞を用いたグライコナノアジュバントのIL-6誘導活性評価

96ウェルプレートに１ウェル当たりの細胞数が１×10^5個になるように，マウス骨髄由来樹状細胞（BMDCs）を播種した。グライコナノアジュバントを加え，37℃，５％CO_2の条件下で18時間培養後，培養上清に産生されたインターロイキン-6（IL-6）をELISA法で定量した。

© The Ito Foundation

2.3　ワクチン材料のマウス体内での免疫誘導活性評価

グライコナノアジュバントと組換えタンパク質抗原を一体化したワクチン材料を，C57BL/６マウスに，０日目と21日目に皮内注射した。免疫28日目に眼窩静脈叢から血液を採取し，血清中のタンパク質抗原に対するIgG１，またはIgG2c抗体の抗体価（産生量）を，ELISA法で決定した。なお，本実験は鹿児島大学動物実験委員会承認（承認番号：VM20010）のもと，動物愛護に十分に配慮して行った。

３．結果と考察

3.1　グライコナノアジュバントの特性解析

より多くの組換えタンパク質抗原を固定化可能なグライコナノアジュバントを調製するために，TLR7リガンド誘導体，糖誘導体，タンパク質固定化用リンカー分子の固定化比率が異なる３種類のグライコナノアジュバントを調製した。それぞれの粒子径を，透過型電子顕微鏡（TEM）を用いて測定したところ，コアとなるGNPの平均粒径は，いずれも約４nmであった（**Fig. 1A**）。PBS中での粒径を動的光散乱（DLS）法で測定したところ，平均粒径は約10nmであった（**Fig. 1B**）。これらはGNP表面に固定化した分子を含む理論的な分子サイズに一致することから，いずれのグライコナノアジュバントも，PBS中で単一の粒子として分散していると考えられた。GNP表面に固定化したTLR7リガンド誘導体および糖誘導体を，既報[3]に従ってHPLCで定量したところ，その固定化比率は，調製時の混合モル比と同程度であった。なお，タンパク質固定化用リンカー分子は，吸光係数が小さく，HPLCでの定量が困難であり，今後定量方法を検討する必要がある。以上の結果から，タンパク質固定化用リンカー分子の固定化は，GNPの粒径や水分散性，各分子の固定化比率に大きく影響しないことが示唆された。

3.2　グライコナノアジュバントの細胞レベルでの免疫刺激活性

３種類のグライコナノアジュバントの免疫刺激活性を，マウスBMDCsを用いて評価した。その結果，タンパク質固定化用リンカーの固定化量が多くなると，IL-6の誘導活性が低下する傾向にあった。グライコナノアジュバントには，糖誘導

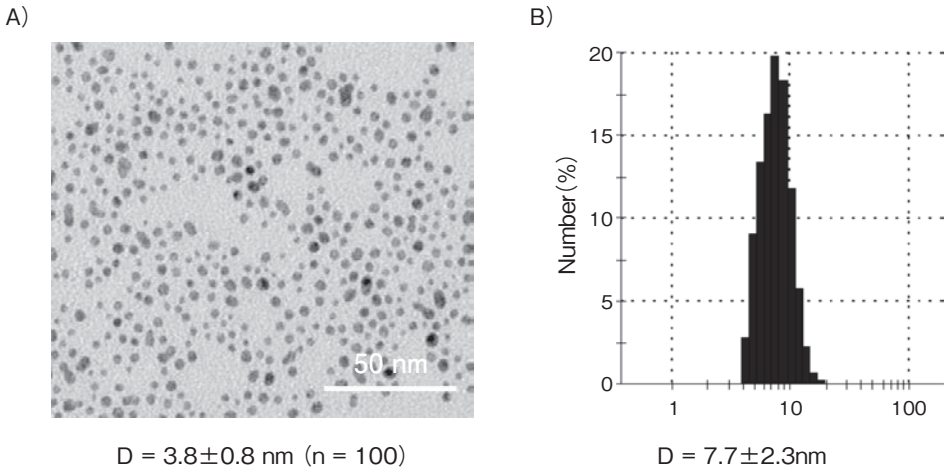


Fig. 1　Representative particle size of Glyco-nanoadjuvants. A) TEM images and B) hydrodynamic diameters measured by dynamic light scattering.

© The Ito Foundation

体が固定化されており，免疫細胞表層の糖結合受容体を介したエンドサイトーシスによって，免疫刺激活性が増強されることが示されている[4]。したがって，タンパク質固定化用リンカーの固定化量が多くなると，共固定化した糖誘導体の固定化量が相対的に下がり，糖受容体を介した免疫細胞への取り込み量が減少してIL-6の誘導活性が低下したことが考えられる。

3.3　グライコナノアジュバントへのタンパク質抗原の固定化

３種類のグライコナノアジュバントに対して，組換えタンパク質抗原の固定化を検討した。グライコナノアジュバントに対して，４当量の組換えタンパク質抗原を固定化後，超遠心分離によってグライコナノアジュバントを含む沈殿と上清に分離し，各画分をSDS-PAGEで解析した。その結果，タンパク質固定化用リンカーの固定化量が少ないと，超遠心分離後の上清に多くのタンパク質が残存しており，沈殿画分には仕込み量の40％程度しか検出されなかった。一方，タンパク質固定化用リンカーの固定化量が多いグライコナノアジュバントでは，上清に検出されたタンパク質は10％以下であり，約80％が沈殿画分に存在した。したがって，グライコナノアジュバント１個に３～４個のタンパク質を固定化するためには，タンパク質固定化用リンカーの最適な固定化量があることが示された。

3.4　グライコナノアジュバントと組換えタンパク質抗原を一体化したワクチンのマウス体内での免疫誘導活性

グライコナノアジュバント１個当たりに，組換えタンパク質抗原を１～４個固定化したワクチン材料を用いて，抗原特異的な免疫誘導活性を評価した。この際，グライコナノアジュバントには，IL-6の誘導活性を低下させず，なおかつ，より多くの組換えタンパク質抗原を固定化できるものを用いた。組換えタンパク質抗原の固定化量の異なる３種類のグライコナノアジュバント溶液，または組換えタンパク質抗原とグライコナノアジュバントを単純に混合した溶液をマウスに投与し，血清中の組換えタンパク質抗原に特異的な抗体の抗体価をELISA法によって評価したところ，IgG2c抗体の産生において，グライコナノアジュバントの添加によって抗体価が有意に上昇した（**Fig. 2**）。しかし，組換えタンパク質抗原のグライコナノアジュバントへの固定化の有無や固定化量の違いで，IgG2c抗体の抗体価には有意な差がなかった。また，IgG1抗体の産生においては，アジュバントの添加の有無に関わらず，抗体価には有意な差がなかった。以上のことから，組換えタンパク質抗原に対する抗体の誘導においては，グライコナノアジュバントの添加によって抗体価が上昇するが，組換えタンパク質抗原と一体化しても抗体誘導活性に大きく影響しないことが示唆された。現在，抗原特異的な細胞性免疫の誘導活性等について評価している。

4．要　　約

本研究では，グライコナノアジュバントを家畜のウイルス感染症ワクチンに応用することを目指し，グライコナノアジュバントと組換えタンパク質抗原を一体化したワクチン材料の調製について検討した。その結果，サイトカイン誘導活性を維持したまま，より多くの組換えタンパク質抗原を固定化するためには，各化合物の最適な固定化量があることを見出した。グライコナノアジュバントと組換えタンパク質抗原を一体化したワクチン材料をマウスに免疫したところ，液性免疫の誘導能には，顕著な差が見られなかった。現在，細胞性免疫の誘導活性等について評価を行っており，今後ワクチン材料のデザインを最適化する予定である。グライコナノアジュバントは，家畜感染症

© The Ito Foundation

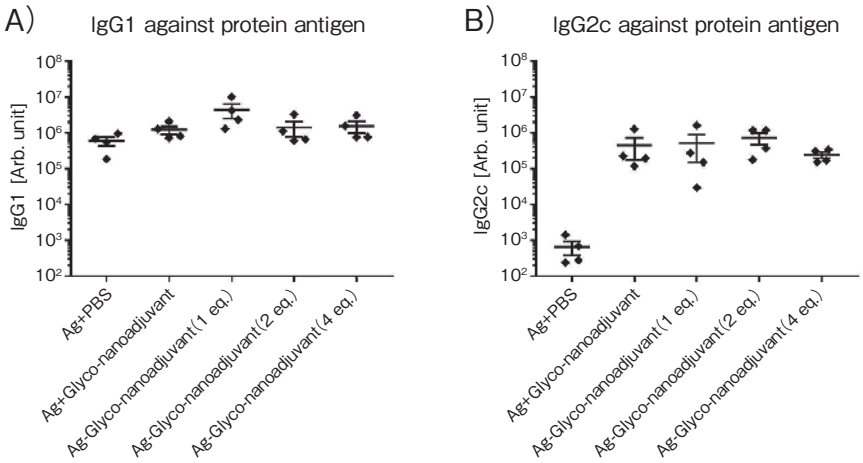


Fig. 2　IgG antibodies against protein antigen produced in C57BL/6 mice. The mice（n＝4 mice）were intradermally vaccinated with protein antigen conjugated Glyco-nanoadjuvant（protein antigen：3 μg, TLR7 ligand：0.2 nmol）in the tail on days 0 and 21. Blood was then collected on day 28 and the levels of protein antigen specific（A）IgG1 or（C）IgG2c antibodies were determined by ELISA. Data shown are means ± SEM（n＝4 mice）.

に対するさまざまなワクチンを開発するための有用なプラットフォームになると考えられる。したがって，新興・再興感染症が発生した際に，迅速にワクチンを供給できるようになり，畜産農家の防疫対策の軽減や食肉の安定供給などに繋がると期待できる。

文　献

1）　Yao, L., Yannan, Y., Zhengying, G., Jun, Z., Hao, S., Guangya, X., Chengzhong, Y.：*Biomaterials*, **175**, 82～92, 2018.

2）　Weiss, A. M., Ajit, J., Albin, T. J., Kapoor, N., Maroju, S., Berges, A., Pill, L., Fairman, J., Esser-Kahn, A. P.：*Sci. Rep.*, **11**, 6267, 2021.

3）　Shinchi, H., Yamaguchi, T., Moroishi, T., Yuki, M., Wakao, M., Cottam, H., Hayashi, T., Carson, D., Suda, Y.：*Bioconjugate Chem.*, **30**(**11**), 2811～2821, 2019.

4）　Shinchi, H.*, Yuki, M.*, Yamauchi, T., Niimura, M., Wakao, M., Cottam, H. B., Hayashi, T., Carson, D. A., Moroishi, T., Suda, Y.（*Equal contribution）：*ACS Appl. Bio Mater.*, **4**(**3**), 2732～2741, 2021.

© The Ito Foundation

炎症マーカーの代わりに安価で簡単に測定できる血清Fe濃度で牛複合性呼吸器疾患の炎症評価が可能か？

Simple and inexpensive evaluation of inflammation in bovine respiratory disease complex using serum Fe concentration as an alternative to inflammatory markers

鈴木　一由・塚野　健志・村上　義樹・大塚　まりな
（酪農学園大学獣医学群）

Kazuyuki Suzuki, Kenshi Tsukano, Yoshiki Murakami and Marina Otsuka
(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University)

The objective of this study was to examine whether serum iron (Fe) concentration is useful as a prognostic biomarker for cows with acute coliform mastitis (ACM). Aims of our study was clarifying the sequential changes in serum Fe concentration in cattle that received endotoxin. Ten young cattle aged　176.8 ± 23.7　days were enrolled in this study. Five young cattle received endotoxin (LPS group) and the remaining five received physiological saline (control group). Blood collections were carried out before endotoxin challenge (pre), and 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 h after the challenge. As a result, a significant decrease in serum Fe concentration was not observed until 24 h after endotoxin challenge. As a result, it was clarified that hepcidin expression is induced by inflammation in cattle as well as in humans, and the serum Fe concentration decreases. On the other hand, it became clear that it was difficult to confirm the decrease in serum Fe concentration within at least 8 hours after the administration of endotoxin. In this study, a significant decrease in serum Fe concentration could not be confirmed until 24 h after endotoxin administration. In order to use the serum Fe concentration as an inflammation marker in cattle, it is considered necessary to have passed 24 hours or more after the disease.

1．目　　的

エンドトキシンは，マクロファージを刺激して腫瘍壊死因子 α （TNF-α: Tumor Necrosis Factor-α），インターロイキン（IL：Interleukin）-1および6などのサイトカインを放出させることが知られている[1)]。これらの内因性炎症メディエーターの循環系への放出は，重篤化した甚急性乳房炎（ACM）が呈する諸症状の主な原因であると考えられている[1)]。すなわち，ACMはエンドトキシン由来の炎症反応の重篤度により予後が大きく異なり，しばしば致命的である[1)]。ACMに対する治療が奏功するかどうかは，早期診断および予後評価などの適切な判断に左右される。したがって，ACMの重症度を反映する鋭敏なバイオマーカーが利用できれば，予後評価に有用なマーカーとなり得る。

炎症に対する宿主の反応，つまり急性相反応

© The Ito Foundation

は，血漿タンパク濃度の著しい変化を伴う一連の生理学的反応である[2]。炎症性サイトカインに対する全身反応には，肝臓からの急性相タンパク質（APPs）の産生と分泌が含まれる[3]。APPsは炎症反応の初期に放出されるため，APPsを測定することにより炎症の早期発見が可能である。例えば，人で汎用されているC反応性タンパク（CRP：C reactive Protein）は，牛での応用がなされていない[4]。牛において測定可能な主なAPPsはハプトグロビン（Hp：Haptoglobin），血清アミロイドA（SAA：Serum Amyloid A），α1酸性糖タンパクおよびトランスフェリンであり[5]，これらはACMに有用なマーカーとなり得る。しかし，これらの炎症マーカーおよび炎症性サイトカインの測定は牛に特異的な抗体を有していない一般的な検査会社では難しいために経費，労力，時間的な制限がある。

人や動物における多くの慢性疾患は，数種の元素の蓄積を誘導する細胞外基質の代謝の変化に関連している。したがって，炎症と微量元素との関係を知ることは有用である。例えば，急性炎症を生じている患者[6]や動物[7]の血液中Fe濃度は著しく減少することが報告されている。例えば，Neumann[8]は，炎症性疾患を患っている猫の90％および犬の60％で血清中Fe濃度が低下したことを報告した。この炎症による血清中Fe濃度の減少は，腸管でのFe吸収の減少および細網内皮細胞によるFeの放出減少に起因している。血清中Fe濃度の測定は，一般的な検査会社で１検体当たり200～300円程度での測定が可能であることから，血清中Fe濃度が炎症に関連しているのであれば牛の炎症性マーカーとして条件を満たす可能性がある。すなわち本研究では，エンドトキシン由来全身性炎症モデルを用いてFe調節タンパクであるヘプシジンのmRNAレベルを指標に炎症により血清Fe濃度が減少する機序を解明した。

２．方　　法

本研究は酪農学園大学動物実験委員会の承認（Approval#：VC15H2）に基づいて実施した。本研究では，日齢176.8±23.7日，体重178.7±33.0 kgの雌雄各５頭，合計10頭のホルスタイン種育成牛を供試した。供試牛のうち５頭にエンドトキシン（LPS投与群），残り５頭に生理食塩液（対照群）を投与した。エンドトキシンまたは生理食塩液の投与直前に頸静脈カテーテルを留置した。LPS投与群には2.5 μg/kgのO111：B4 LPS(L4391；Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, U.S.A）を自家血清10 mlに混和調整した。また，対照群には生理食塩液（生理食塩水；日本全薬工業，福島，日本）10 mlをそれぞれ頸静脈より投与した。LPSまたは生理食塩液の投与前（pre），投与後0.5，１，２，４，８，12，24および48時間において10 mlを反対側の頸静脈より採血した。採血した血液はただちに10 mlの血清分離用真空採血管およびヘパリン添加採血管に分注した。血清および血漿はそれぞれ分注後４℃で保存し，3,000 × g，15分で遠心分離して得た。これらのサンプルは測定まで－80℃で保存した。第10-11肋間において2.5 mlの２％リドカイン（キシロカイン注２％；アストラゼネカ，大阪，日本）により局所麻酔を行い，pre，投与後0.5，１，２，４，８，12，24および48時間において超音波ガイド下で肝生検を行った。生検には14Gの生検針（クイックカットC2；株式会社八光，東京，日本）を用いた。肝生検により得た組織をただちにRNAlater RNA stabilization reagent（Qiagen, Hilden, Germany）に浸漬し，採取後24時間以内に使い捨てホモジナイザー（bio-masher Ⅱ；和光純薬工業，東京，日本）を用いてホモジナイズしたのち測定まで－80℃で保存した。

測定の直前に血漿をエンドトキシンフリー蒸留

© The Ito Foundation

水（大塚蒸留水；大塚製薬，東京，日本）を用いて20倍希釈し，ボルテックスミキサーで10秒間混和した。その後，阻害物質を不活化するため80℃で10分間加熱した。血漿中エンドトキシン活性値はリムルス比濁時間分析法（LAL-KTA：Limulus Amebocyte Lysate-Kinetic Turbidimetric; Charles River）により測定した。すべての測定には，エンドトキシンフリー蒸留水を陰性対照，リファレンススタンダード（CSE, Control Std Endotoxin；Charles River, Charleston, SC, U.S.A.）を10,000（EU）／バイアルに調整したエンドトキシンを陽性対照として使用した。β-グルカンによる反応阻害をさけるため，カイネティック比濁時間用LAL試薬（Endosafe® KTA2；Charles River）をEndotoxin-Specific Buffer Solution（Charles River）により再融解した。LAL-KTA法は96穴マイクロプレート（Endosafe® 96-well, flat bottom microplate M9001 ； Charles River）を用い，マイクロプレートリーダー（SunriseTM；Tecan Group Ltd., Mannedorf, Switzerland）およびエンドトキシン測定ソフトウェアEndoScan-VTM（Charles River）により測定した。各測定ではLAL試薬の添付文書に従い，0.003 EU/mlから3.0 EU/mlの範囲の検量線を作成した。検出限界値は0.028 EU/mlであった。

血清中Fe濃度は，市販のキット（N-アッセイL Fe-Hニットーボー；ニットーボーメディカル，東京，日本）を用いて，波長753 nmにおいて全自動血液生化学アナライザー（LABOSPECT 003；日立ハイテクノロジーズ，東京，日本）によりNitroso-PSAP法により測定した。測定は2回行い，平均濃度を統計解析に用いた。

エンドトキシンチャレンジモデルより得た肝臓のヘプシジンおよびIL-6のmRNA発現量をリアルタイムPCR（Light-Cycler 480 system II; Roche Diagnostics, Basel, Switzerland）により測定した。逆転写およびリアルタイムPCRは市販のキット（Light-Cycler® Multiplex RNA Virus Master version 3；Roche Diagnostics）を用いたワンステップ法により行った。リアルタイムPCRは96穴プレートで行い，最終量は20 μlとした。PCRミックスには5 μlのテンプレートRNA，各プライマー（リバースおよびフォワード）1 μl（0.5 μM），ユニバーサルプローブ0.4 μl，RT-PCR reaction mix 4 μl, RT-Enzyme solution 0.1 μlおよび水8.5 μlを含む。牛ヘプシジンおよびIL-6に対するプライマーおよびユニバーサルプローブはPubMedで遺伝子情報を得た後にロシュのホームページ（https://lifescience.roche.com/global_en/brands/universal-probe-library.html）で設計をした。添付文書に従い，増幅条件は50℃で10分（逆転写），95℃で30秒（プレインキュベート），95℃で5秒および60℃で30秒を計45サイクル（増幅）とした。結果は，リファレンス遺伝子であるGlyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase（GAPDH）-mRNAに対する相対発現量を市販のソフトウェア（E-method; Roche Diagnostics）を用いて算出した。

統計解析は市販のソフトウェア（IBM SPSS Statistics v.21；IBM Co, Armonk, NY, U.S.A.）を用いて行った。データが正規分布する場合は平均値±標準偏差，非正規分布の場合は中央値で示した。血漿中エンドトキシン活性値および血清中Fe濃度の群内および群間変数は二元配置分散分析を用いて分散を評価したのち，群間比較をStudent's *t*検定（血清中Fe濃度，IL-6 mRNAおよびヘプシジンmRNA）およびMann-Whitney *U*検定（血漿中エンドトキシン活性値）を用いて解析した。また，pre値に対する経時的変化は，Dunnett検定を用いた。

© The Ito Foundation

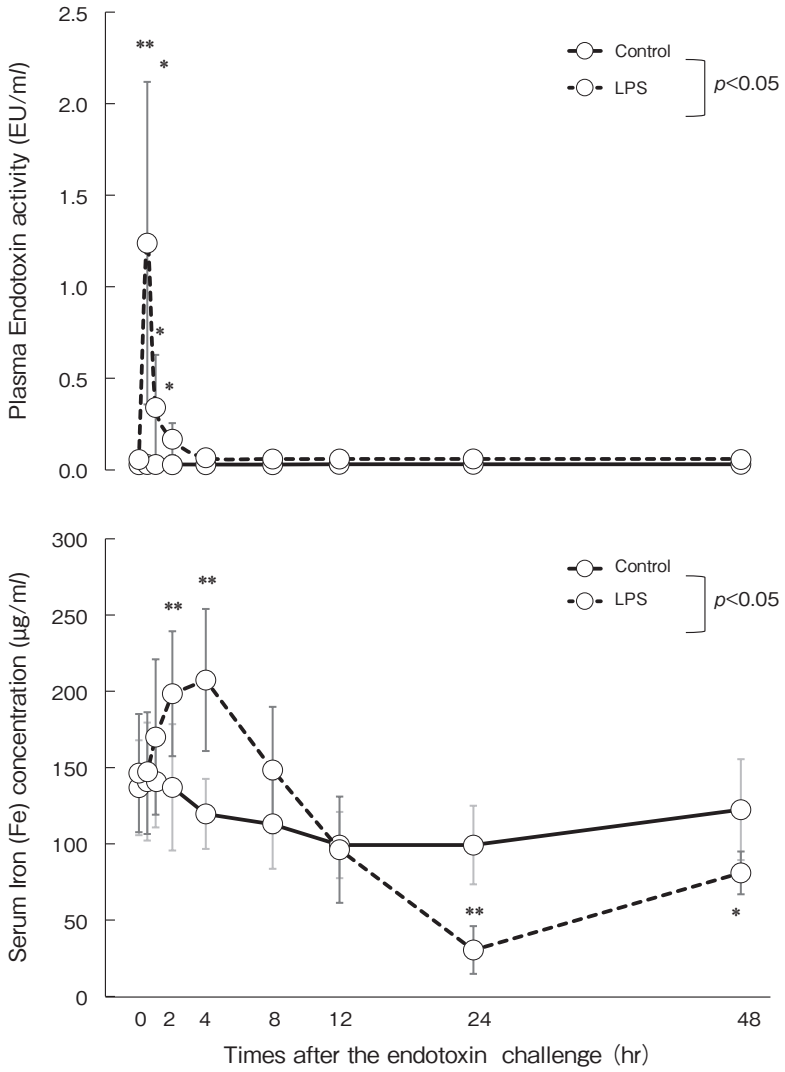


Fig. 1　Sequential changes in plasma endotoxin activity and iron (Fe) concentrations in endotoxin challenge model. *；vs pre $p<0.05$，**；vs pre $p<0.01$ by Dunnett-test after 2-way ANOVA as the F test.

３．結果と考察

Fig. 1 にエンドトキシンを投与した牛の血漿中エンドトキシン活性値および血清中Fe濃度の経時的変化をそれぞれ示した。Pre値の血漿中エンドトキシン活性値はすべての牛で検出限界値以下であった（検出限界：0.028 EU/ml）。血漿中エンドトキシン活性値は，エンドトキシンチャレンジ後0.5時間目において1.239±0.881 EU/mlを最高値とする有意な上昇を示した（$p<0.001$）。その後，投与後４時間目にpre値に復した。一方で，対照群の血漿中エンドトキシン活性値に有意な差は認められなかった。血清中Fe濃度の有意な経時的変化はエンドトキシンをチャレンジした牛でのみ認められた。エンドトキシンをチャレンジされた牛において，チャレンジ後４時間目に血清中

© The Ito Foundation

Fe濃度は207.4±46.6 μg/dlに達し，pre値と比較して有意に上昇したが，チャレンジ後８時間目までにpre値に復した。その後，血清中Fe濃度は投与後24時間目をピークに30.4±15.7 μg/dlまで低下し，pre値と比較して有意な変動を示した（$p<0.001$）。その結果，血清中Fe濃度は投与後24から48時間目において，pre値と比較して有意に低値を維持した（$p<0.001$）。エンドトキシンをチャレンジされた牛において，チャレンジ後２時間目に肝臓におけるIL-6のmRNA発現量（IL-6mRNA/GAPDH）は0.006±0.008 μg/dlに達し，pre値（0.0006±0.0005）と比較して有意に上昇し（$p<0.01$），チャレンジ後８時間目まで有意に高値を維持した。同様にエンドトキシンをチャレンジされた牛において，チャレンジ後２時間目より肝臓におけるヘプシジンのmRNA発現量（ヘプシジンmRNA/GAPDH）はpre値（0.5±0.5）と比較して有意に上昇し，チャレンジ後８時間目（6.7±1.0）をピークに，12時間後まで有意に高値を維持した（$p<0.01$）。

本研究において，エンドトキシンチャレンジモデルを用いてエンドトキシン由来の炎症がヘプシジン発現を誘導し，血清中Fe濃度へ影響を及ぼすかどうかを調査した。エンドトキシンはtoll-like receptor 4シグナル伝達を活性化し，それによりマクロファージのIL-6の産生を促進する[3]。Nemethら[9]は，ヘプシジンはIL-6により誘導されるが，IL-1またはTNF-αによっては誘導されないことを示し，炎症によるヘプシジン誘導はヒトにおけるⅡ型急性期反応であることを報告した。この炎症により惹起されるIL-6-ヘプシジン経路によって血清中Fe濃度が調節を受ける。本研究の結果では，エンドトキシンを投与した牛の肝臓組織におけるIL-6およびヘプシジンmRNAの発現は，エンドトキシン投与後２～８時間目で高レベルに維持され，その後エンドトキシン投与後24時間目でベースラインに復した。ヘプシジンおよび血清中Fe濃度の継時的変化は，IL-6を投与した人において観察されたものと類似していた[10]。炎症に反応して血清中Fe濃度が急速に低下することは，宿主防御機構として説明できる[11]。生体内でのFeが隔離された結果生じる低Fe環境は細菌の増殖を制御するため，生体の血液，リンパ液および滲出液における静菌または殺菌機構にとって不可欠である[12]。本試験の結果は，牛においても人と同様に炎症によりヘプシジン発現が誘導され，血清中Fe濃度が低下することを明らかにした。一方で，血清中Fe濃度の低下は，エンドトキシン投与後少なくとも８時間以内に確認することは困難であることが明らかとなった。Erskineら[13]は大腸菌の乳房内感染後20～24時間で血清中Fe濃度の低下が認められたと報告している。本試験においても，エンドトキシン投与24時間後まで血清中Fe濃度の有意な減少を確認できず，24時間後に低下したことは，Erskineらの報告を支持する結果となった。血清中Fe濃度を牛の炎症マーカーとして利用するためには疾病罹患後24時間以上経過している必要があると考えられた。

4．要　約

本研究の目的は，血清鉄（Fe）濃度が急性大腸菌型乳房炎（ACM）の牛の予後バイオマーカーとして有用であるかを明らかにすることであった。すなわち，エンドトキシンをチャレンジした育成牛の血清Fe濃度の経時的変化を明らかにすることであった。５頭の若い牛はエンドトキシンを投与され（LPS投与群），残りの５頭は生理食塩水を投与した（対照群）。採血は，エンドトキシンチャレンジ直前（pre），およびチャレンジの0.5，１，２，４，８，12，24，および48時間後に実行した。その結果，牛においても人と同様に

© The Ito Foundation

炎症によりヘプシジン発現が誘導され，血清中Fe濃度が低下することを明らかにした。一方で，血清中Fe濃度の低下は，エンドトキシン投与後少なくとも８時間以内に確認することは困難であることが明らかとなった。本試験では，エンドトキシン投与24時間後まで血清中Fe濃度の有意な減少を確認できず，血清中Fe濃度を牛の炎症マーカーとして利用するためには疾病罹患後24時間以上経過している必要があると考えられた。

文　献

1） Ziv, G.：*Vet. Clin. North Am. Food Anim. Pract.*, **8**, 1～15, 1992.
2） Bertsch, T., Triebel, J., Bollheimer, C., Christ, M., Sieber, C., Fassbender, K., Heppner, H. J. *Z.*：*Gerontol. Geriatr.*, **48**, 595～600, 2015.
3） Constante, M., Jiang, W., Wang, D., Raymond, V. A., Bilodeau, M., Santos, M. M.：*Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, **291**, G229～G237, 2006.
4） Black, S., Kushner, I., Samols, D.：*J. Biol. Chem.*, **279**, 48487～48490, 2004.
5） Eckersall, P. D., Bell, R.：*Vet. J.*, **185**, 23～27, 2010.
6） Ullah, Z., Ullah, M. I., Hussain, S., Kaul, H., Lone, K. P.：*Biol Trace Elem Res.*, **175**, 10～16, 2017.
7） Ilbäck, N. G., Benyamin, G., Lindh, U., Fohlman, J., Friman, G.：*Pancreasz.*, **26**, 190～196, 2003.
8） Neumann, S.：*Comp. Clin. Path.*, **12**, 90～94, 2003.
9） Nemeth, E., Valore, E. V., Territo, M., Schiller, G., Lichtenstein, A., Ganz, T.：*Blood*, **101**, 2461～2463, 2003.
10） Burvenich, C., Bannerman, D. D., Lippolis, J. D., Peelman, L., Nonnecke, B. J., Kehrli, M. E. Jr., Paape, M. J.：*J. Dairy Sci.*, **90 Suppl**, 1, E39–54, 2007.
11） Borges, A. S., Divers, T. J., Stokol, T., Mohammed, O. H.：*J. Vet. Intern. Med.*, **21**, 489～494, 2007.
12） Ward, C. G., Bullen, J. J., Rogers, H. J.：*J. Trauma*, **41**, 356～364, 1996.
13） Erskine, R. J., Bartlett, P. C.：*J. Dairy. Sci.*, **76**, 408～413, 1993.

© The Ito Foundation

映像解析技術を用いたアブの吸血行動の定量的解析による病原体媒介リスクの可視化

The clarification of pathogen transmission risk by quantitative video image analysis of blood sucking behavior of Tabanus flies

菅沼　啓輔[1]・Acosta J. Tomas[2]・齊藤　朋子[2]

（[1]帯広畜産大学グローバルアグロメディシン研究センター・原虫病研究センター，[2]帯広畜産大学畜産学部）

Keisuke Suganuma[1], Acosta J. Tomas[2] and Tomoko Saito[2]

（[1]National Research Center for Protozoan Diseases/Global Agromedicine Research Center, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [2] School of Agriculture Science, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine）

Horse flies have negative impacts against domestic animals by frequently blood sucking behavior and transmission of several pathogens. However, the negative impact by horse flies is relatively ignored due to the limited information of their seasonal prevalence and their carrying pathogens. The aim of this study is to reveal the risk of horse flies against domestic animals in Tokachi district, Hokkaido prefecture where is one of the leading farming areas in Japan. In the study revealed that the occurrence of horse flies in Tokachi district was from end of July to early of October. The dominant species were *Haematopota tristis* and *Tabanus nipponicus*. The occurrence period and dominant species were different from that of previous studies published on 1990. This could be explained by the changing of farming environment and climate change during the last three decades. The prevalence of *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp. was 38 % in five species of horse flies. A previous study revealed that *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) *theileri* was widely infected in dairy cattle in the study area and caused negative impact on their productivity. In addition, *Trypanosoma* (*Megatrypanum*) spp. was also widely infected in wild Ezo sika deer (*Cevus nippon yesoensis*) in the same area. Therefore, the control of horse flies could reduce a risk of trypanosome infection via blood sucking of horse flies and might improve productivity. Finally, blood sucking behavior of horse flies and evasive behavior of domestic animals were analyzed by video and motion sensor. The results suggested that the improvement of automatic analysis may contribute to establishing control strategy for horse flies.

1．目　　的

アブ類（双翅目アブ科）は，家畜伝染病予防法に定められる法定もしくは届出伝染病の病原体であるウシ伝染性リンパ腫ウイルスなどのウイルス類，アナプラズマなどの細菌・リケッチア類，さらにはピロプラズマやトリパノソーマなどの寄生虫類を吸血に伴い機械的に伝播する[1)]。また，アブ類は執拗な吸血習性をもち，何度も繰り返し吸血を行う。さらに，アブ類はサシバエなどの小型吸血性昆虫に比べ大きいため吸血量が多く飛翔能力も高い。そのため，広範囲の多数の動物に病原

© The Ito Foundation

体を伝播する。すなわち，アブ類は病原体を効率的に媒介する能力を有し，家畜感染症の伝播を防ぐために積極的な防除が求められる重要な衛生昆虫である。アブ類によって媒介される感染症の中でもウシ伝染性リンパ腫は年々増加傾向にあり，2011年には30％を超える抗体陽性ウシ[2]や2019年には4,000頭を超える症例が報告[3]され，日本全国で蔓延している。ウシ伝染性リンパ腫発症ウシの摘発淘汰や，と殺時検査陽性症例の全廃棄，清浄化のための未発症ウシの淘汰が畜産経営に与える打撃は大きい。そのため，アブ類によって媒介される感染症の予防は畜産経営の改善に直結する。

蚊によって媒介されるウエストナイルウイルスの場合，１）吸血昆虫の発生数の季節変動，２）吸血昆虫の病原体保有率，そして，３）吸血昆虫による吸血行動（吸血時間，吸血頻度）の定量によって，媒介蚊ごとの病原体感染リスクを定量的に評価できるとされている[4]。しかしアブ類においては，家畜動物にたかる多数のアブ類の吸血行動を人による直接観察で定量的に記録・解析することは困難である。一方で，録画映像を用いた解析の利点として，「繰り返し解析が可能である」，「同一記録から多様な解析を実施できる」，「自動解析により大量のデータを処理できる」といった点があげられる。このような映像解析技術の利点を活かすことで，アブ類の吸血行動を録画後に解析し正確に把握できる，すなわち，ビデオ映像解析によりアブ類の吸血行動を定量的に解析できると考えられる。そこで本研究は，北海道十勝地方の牧場を調査地として，そこで飼養されている家畜動物に飛来する吸血性アブが媒介する家畜感染症病原体の媒介リスクを定量化することを目的として，アブ類の発生動態とその吸血行動および家畜動物の忌避行動の解析を実施した。

２．方　　法

2.1　アブ類の発生動態の調査

北海道十勝地方の三ヶ所の農場（Ａ地点：ウシの放牧，Ｂ地点：乗馬クラブ，Ｃ地点：ウシのフリーストール）を選定した。それぞれの地点にH-trap（アブキャップ，ファームエイジ株式会社）を二基ずつ，５月下旬から10月上旬まで設置し，定期的に採集されたアブを回収した。

2.2　採集されたアブの種同定

回収されたアブは形態学的に種同定を行った。各月を上旬，中旬，下旬と約10日ごとに区切って，サンプリング地点ごとにトラップで採集された１日当たりのアブ数（fly/trap/day）を算出した。

2.3　保有病原体（トリパノソーマ）の解析

採集されたアブ類の個体数の多かったＡ地点およびＢ地点で採集され，種同定を行ったアブの一部を解剖し消化管を顕微鏡下で観察した。さらに，同じサンプルからDNAを抽出した。抽出したDNAを鋳型として，アブの媒介するトリパノソーマ（*Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp.）を検出するために*Cathepsin L*遺伝子を標的としたPCR[5]を実施した。

2.4　ビデオ撮影条件および忌避行動の検討

採取されたアブ類の個体数の多かったＢ地点において，ビデオ撮影条件の検討を行った。馬２頭を係留して用い，１）馬体の横・２）馬体の上からの撮影を行った。撮影は各10分程度行い，同時にアブの飛来について目視にて確認を行った。

また，動物のアブに対する忌避行動の確認として，帯広畜産大学において飼養されているウシを利用して２つの実験を行った。１つ目はウシの尾にマーカーをつけてソフトウェアにより追尾を目指したもの，２つ目は１つ目の結果を受けてウシの尾に３軸加速度センサーをつけてウシの尾の動きの定量化を目指したものである。

© The Ito Foundation

3．結果と考察

3.1　アブ類の発生動態

調査期間中に捕獲されたアブは，A牧場では8月上・中旬が捕獲数のピークであり，優占種は8月上旬から中旬にかけてはゴマフアブ（*Haematopota tristis*）であり，7月下旬までと8月下旬からはニッポンシロフアブ（*Tabanus nipponicus*）であった（**Fig. 1A**）。B牧場で7月中旬が捕獲数のピークであり，優占種は7月下旬から8月上旬にかけてはゴマフアブであり，7月中旬までと8月中旬からはニッポンシロフアブであった（**Fig. 1B**）。一方，C牧場では，アブの総捕獲数が44匹と少なく（**Fig. 1C**），サシバエ（*Stomoxys calcitrans*）がアブの約6倍（247匹）捕獲された。全体では9種3,140匹であり，アブの発生は6月下旬から始まり，10月上旬までに終了した（**Fig. 1D**）。農場ごとに捕獲されたアブ種の構成・アブの個体数が異なったことから，アブの発生動態の解明とその防除対策には，調査地点を増やして幼虫の生息環境である農場周囲の環境および飼養されている家畜の種類などを含めた解析が必要であると考えられる。

過去に北海道十勝地方で行われた研究[6]では，発生は7月下旬から8月上旬をピークとして6月下旬から9月上旬までであった。一方で，3ヶ所

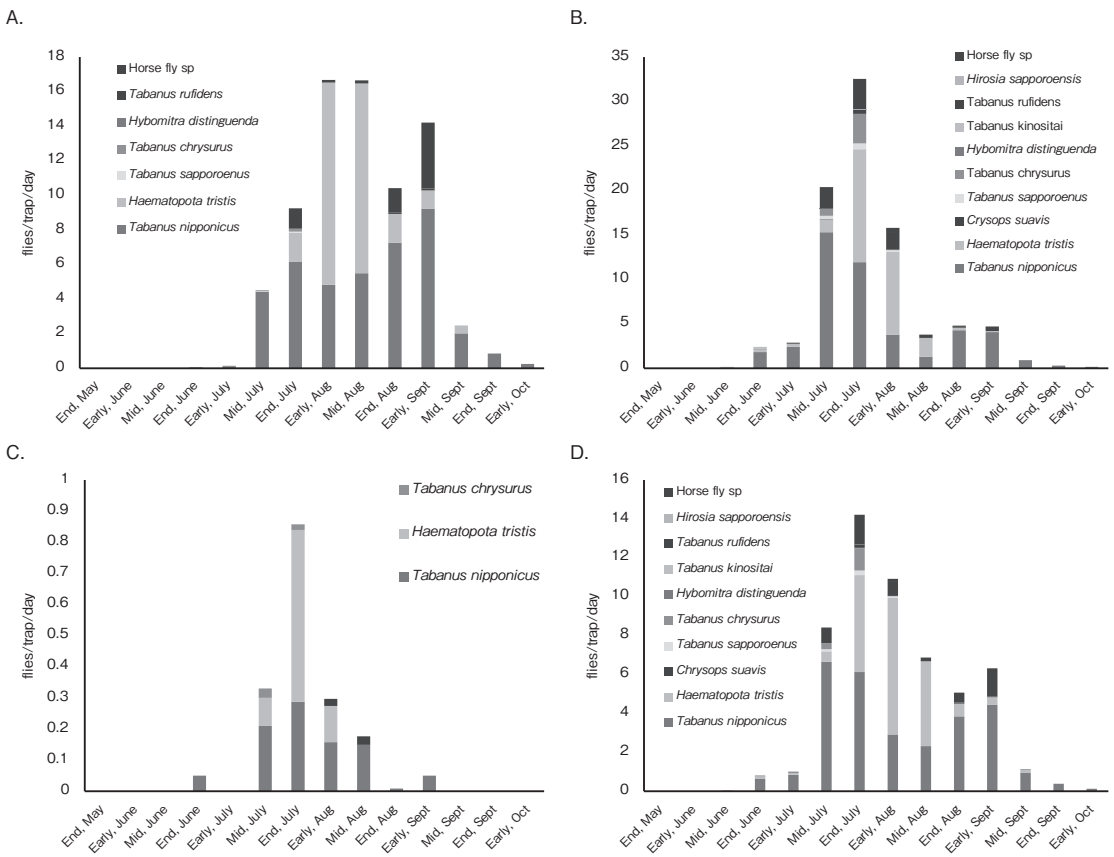


Fig. 1　Seasonal prevalence of horse flies in three farms in Tokachi district, Hokkaido.
X-axis：Average numbers of captured flies in each trap in each day (flies/trap/day), Y-axis：Sampling term. A：Seasonal prevalence of horse flies at A farm, B：Seasonal prevalence of horse flies at B farm, C：Seasonal prevalence of horse flies at C farm, D：Seasonal prevalence of horse flies at three farms

© The Ito Foundation

の調査地点で行われた本研究で確認されたアブ類の発生は，７月下旬をピークとして６月下旬から10月上旬までであった。近年の地球温暖化を反映したためか，過去の報告に比べてアブ類の発生期間が延長している可能性が示唆された。そのため，農家ではより長期間のアブ類の防除が必要となるとともにアブによって媒介される感染症の蔓延や吸血による増体抑制など経営コストの増加が危惧される。

同じ報告[6]では34ヶ所の調査で15種類のアブ類が採集された。また，その他の研究とあわせて22種類のアブ類が十勝地方では確認されている。一方で，３ヶ所の調査地点で行われた本研究で確認されたアブ類の発生は，９種類のアブ類が採集された。また，文献７では優占種がゴマフアブ（66.4％）でニッポンシロフアブが占める割合は小さかった（7.0％）[7]が，本研究では文献７と同じ８月に採集されたアブ類では，ゴマフアブが優占種（52.6％）であったが，ニッポンシロフアブも39.8％と大きな割合を占めた。本研究と文献６では調査地点の数や調査地点が異なるものの，畜産経営形態および農家周囲の自然環境の変化，さらには気候変動を反映し，発生しているアブ類の種や種構成が変改している可能性が示唆された。

3.2　アブ類のトリパノソーマ保有率

採集したアブを解剖し消化管を顕微鏡で観察した結果，すべてのアブでトリパノソーマの感染は認められなかった（0/150，（0.0％））。一方でPCRによる分子生物学的解析の結果，38.0％のアブ（57/150）にトリパノソーマの感染が認められた（**Table 1**，**Fig. 2**）。複数種のアブ属（*Tabanus* spp.），キンメアブ属（*Chrysops* spp.），ゴマフアブ属（*Haematopota* spp.）などからウシに生産性低下を引き起こす*Trypanosoma theileri*もしくはその近縁種である*Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp.が見出され，ベクターであると考えられている[7]。本邦ではヤマトアブ（*Tabanus rufidens*）から*Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp.の遺伝子断片が検出されている[8]とともに，アカウシアブ（*Tabanus chrysurus*）消化管に感染ステージの*Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp．が認められている[9]。本研究で解析したアブ類のなかに，顕微鏡観察で感染ステージのトリパノソーマを有する個体は認められなかったが，38.0％と多くのアブ類から遺伝子断片を検出したことから，これらのアブ類が本邦における*Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp.のベクターである可能性が高い。これらのアブの防除を行うことで，トリパ

Table 1　Summary of PCR against *Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp.

Horse fly species	Number	No. of positive（%）	
		Microscopic observation	PCR
Haematopota tristis	41	0（0.0）	17（41.5）
Tabanus nipponicus	86	0（0.0）	33（38.4）
Tabanus rufidens	4	0（0.0）	2（50.0）
Tabanus chrysurus	11	0（0.0）	4（36.4）
Tabanus sapporoenus	2	0（0.0）	0（0.0）
Tabanus kinoshitai	2	0（0.0）	0（0.0）
Chrysops japonicus	1	0（0.0）	1（100.0）
Chrysops suavis	3	0（0.0）	0（0.0）
Total	150	0（0.0）	57（38.0）

© The Ito Foundation

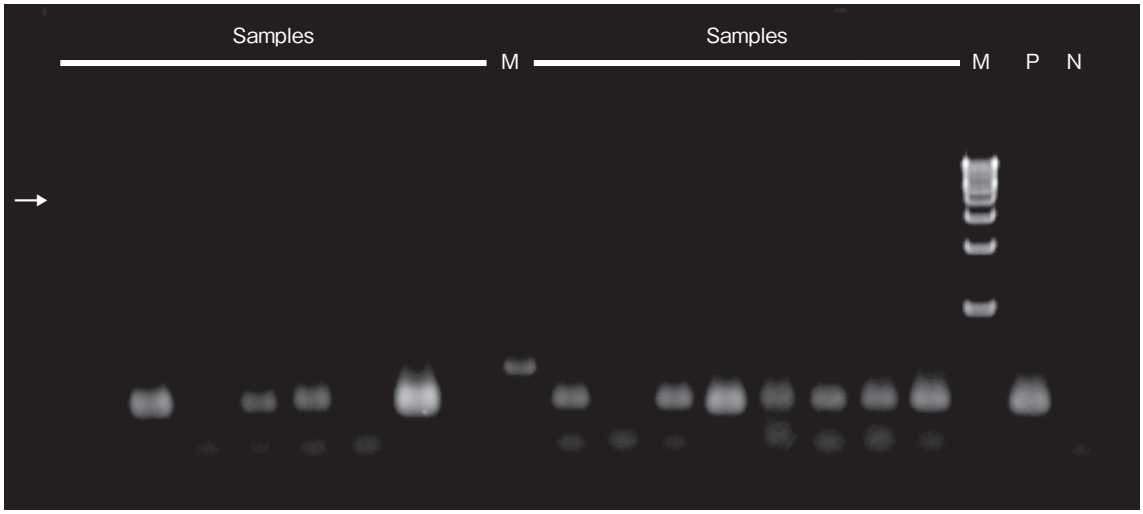


Fig. 2　PCR results of *Trypanosoma*（*Megatrypanum*）spp. in horse flies.
Arow shows amplicons of partial-*CATL* gene（~300 bp）. M：Marker, P：Positive control, N：Negative control

ノソーマ感染による乳牛生産性にあたえる悪影響を低減できると考えられる。今後，ウシ伝染性リンパ腫ウイルスやウシパピローマウイルスなどより悪影響の大きい感染症について同様の研究を進めるとともに，保有病原体叢について網羅的な解析を実施することで，アブ類の家畜感染症媒介における役割を可視化し防除を進めることにつながると考えられる。

3.3　吸血行動および忌避行動解析の予備的検討

アブ類の吸血行動を定量化するためのビデオ撮影条件については，アブが大きい種類（アカウシアブ，ヤマトアブ，アカアブなど）の場合は映像から確認できた。しかし，中型～小型のアブの場合（ニッポンシロフアブ，ゴマフアブなど），馬の毛色によっては，特に黒や灰色の毛色の馬の場合，馬の体と色が同一色となってしまい，目視でもソフトウェアを利用しても撮影された映像からは吸血の判別が難しいことが明らかとなった。この点は今後，さらなる研究が必要であると考えられた。

一方，動物のアブへの忌避行動としてのウシの尾ふりの定量化については，尾にマーカーをつけて自動追尾する方法は難しいことが明らかとなった。ウシが尾を振るとマーカーに当たる光の向きが変化し，それによって色が異なって認識されてしまい識別および定量化が難しかった。一方で３軸加速度センサーを利用した場合は，通常時に対し尾を振ったときに数値が大きく変化したことから，動物のアブへの忌避行動としての尾ふりを定量化し計測するためには，３軸加速度センサーが最適であることが明らかとなった。

4．要　　約

日本有数の畜産業集積地である北海道十勝地方において，家畜生産に悪影響を与えるアブの発生動態，保有病原体，および吸血行動と家畜の忌避行動を解析した。アブの採集を行った３ヶ所の農場では９種3,140匹のアブが採集され，その発生は６月下旬から10月上旬でありピークは８月であった。また，アブが保有・媒介する病原体のうち，トリパノソーマは５種57個体（38.0％）のアブで検出された。このことからアブは高い比率でトリパノソーマを保有，家畜動物に媒介している

© The Ito Foundation

ことが示唆された。検出されたトリパノソーマは乳牛に感染し生産性を低下させること，またエゾシカに広く感染が認められていることから，アブの防除によりトリパノソーマ感染リスクを低減し家畜生産性を向上させることが可能である。さらに，映像解析で吸血するアブ種の同定，および家畜の忌避行動を解析するための基礎的な情報収集が行われた。本研究をもとに，家畜および畜産経営に対して悪影響を与えるアブ種の同定とそのアブに対する重点的な対策の立案が期待される。

謝　辞

アブ類の採集にご協力いただきました農家の皆様，採集したアブの種同定にご協力いただきました帯広畜産大学畜産学部　山内健生准教授，共同獣医学部　安馬英斗さんに深謝いたします。

文　献

1） Baldacchino, F., Desquesnes, M., Mihok, S., Foil, L. D., Duvallet, G., Jittapalapong, S.：Tabanids：Neglected subjects of research, but important vectors of disease agents!, *Infection, Genetics and Evolution*, **28**, 596～615, 2014.

2） Murakami, K., Kobayashi, S., Konishi, M., Kameyama, K., Tsutsui, T.：Nationwide Survey of Bovine Leukemia Virus Infection among Dairy and Beef Breeding Cattle in Japan from 2010–2011, *Journal of Veterinary Medical Science*, **75**(8), 1123～1126, 2013.

3） 農林水産省：監視伝染病の発生状況　https://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/kansi_densen/kansi_densen.html

4） Kilpatrick, M., Kramer,L. D., Campbell, S. C., Alleyne, O., Dobson, A. P., Daszak, P.：West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm, *Emerging Infectious Diseases*, **11**(3), 425～429, 2005

5） Suganuma, K., Kondoh, D., Sivakumar, T., Mizushima, D., Elata, A., Thekisoe, O., Yokoyama, N., Inoue N.：Molecular characterization of a new *Trypanosoma*（*Megatrypanum*）*theileri* isolate supports the two main phylogenetic lineages of this species in Japanese cattle, *Parasitology Research*, **118**, 1927～1935, 2019.

6） 早川博文：北海道十勝地方におけるアブ類の発生調査，衛生動物，40(3), 181～186, 1989.

7） Werszko, J., Szewczyk, T., Steiner-Bogdaszewska, Ż., Wróblewski, P., Karbowiak, G., Laskowski Z.；Molecular detection of *Megatrypanum* trypanosomes in tabanid flies, *Medical and Veterinary Entomology*, **34**, 69～73, 2020.

8） Kobayashi, D., Faizah, A. N., Amoa-Bosompem, B., Watanabe, M., Maekawa, Y., Hayashi, T., Higa, Y., Sawabe, K., Isawa, H.：Analysis of *Trypanosoma* sequences from *Haemaphysalis flava*（Acari：Ixodidae）and *Tabanus rufidens*（Diptera：Tabanidae）collected in Ishikawa, Japan, *Medical Entomology and Zoology*, **71**(4), 79～288, 2020.

9） 菅沼啓輔，安馬英斗，洪祐天，河津信一郎：北海道十勝地方で発生するアブの季節消長とその保有病原体に関する予備的調査，日本寄生虫学会・日本衛生動物学会第67回北日本支部合同大会，2021.

© The Ito Foundation

サルモネラ鶏卵汚染・介卵感染に寄与する鶏卵巣での菌・宿主細胞間相互作用の解明

Elucidation of the interaction between *Salmonella* and host cells in avian ovary that underlies egg contamination and transovarian infection

岡　村　雅　史
（帯広畜産大学獣医学研究部門）

Masashi Okamura
(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine)

Salmonella enterica serovar Gallinarum biovar Pullorum (SP), the causative agent of pullorum disease in chicks, a legally contagious disease in Japan, is transmitted vertically from asymptomatic, infected hens through ovarian infection, followed by the death of the progeny, and then horizontal dissemination in the flock. Resultant high mortality rate finally leads to significant economic damage worldwide. We have focused on the granulosa membrane cells (cGCs) surrounding the oocyte as a route of SP transfer to the reproductive organs and identified OmpA as a protein on the SP outer membrane that binds to the cGC membrane protein. In this study, we generated an *ompA*-deficient strain (Δ*ompA*) and tested the involvement of OmpA in virulence in SP infection. In vitro, Δ*ompA* significantly reduced the number of intracellular invading bacteria ($p<0.01$) in experimental infection of cGCs compared to the wild type (WT). To further evaluate the in vivo virulence of Δ*ompA*, experimental infection was performed using adult chickens; the number of bacteria recovered in the cecal tonsils, cecum contents, follicles, ovaries and oviducts of Δ*ompA*-inoculated chickens at 15 days post-infection was lower compared to WT-infected chickens. On the other hand, a number of candidate proteins were detected to serve as receptors for OmpA, suggesting that one or more of these factors may be involved in the interaction with OmpA in concert.

1．目　　的

サルモネラ食中毒の発生は，1999年の年間825件をピークとしてその後，2019年の同21件まで減少傾向にある。しかし，サルモネラ食中毒では死亡事例が発生しており，逆に現在発生件数が増加傾向にあるカンピロバクター食中毒では死亡事例がゼロである点を考慮すると，サルモネラ食中毒は重症化しやすいということがわかる。サルモネラ食中毒の原因食品としては依然として*Salmonella enterica*血清型Enteritidis汚染鶏卵が多く，喫食時の加熱調理の徹底のみならず，採卵養鶏場においても鶏卵汚染を防止するためのワクチン接種や衛生管理の徹底をはじめとした対策が継続的に行われている。我々はこれまで，2,500種類以上あるサルモネラ血清型のなかでもEnteritidisが鶏の卵巣・卵管に強い親和性を有することを証明し[1,2]，それが鶏卵汚染につながる

© The Ito Foundation

メカニズムに寄与していると考えている。また，血清型Gallinarumを構成する生物型GallinarumとPullorumは鳥類だけを自然宿主とし，感染するとひな白痢や家禽チフスと呼ばれる致死性の高い急性敗血症制疾患を引き起こす。これらはいずれもわが国では家畜伝染病予防法で法定伝染病に指定される重大な感染症である。特に生物型Pullorum（以下SP）は母鶏に全身感染後，卵巣や卵管組織に侵入し，その後産出される有精卵に移行することでその中で成熟するひなにも感染（介卵感染）するため，世界中で経済被害をもたらしている。SPによる鶏卵汚染の頻度はEnteritidisよりも非常に高いため，我々はSPを用いて，前述のEnteritidisに対する市販ワクチンの鶏卵汚染防止効果を評価することに成功したと同時に，SPの介卵感染がEnteritidisの鶏卵汚染と共通のメカニズムによって起こる可能性を示すことができた[3]。

一方で，SPの介卵感染のメカニズムについては，性成熟に伴う一過性の免疫能の低下が介卵感染に関与するという報告[4]がなされているのみであり，SPが卵巣に到達した後，卵母細胞に大量に含まれる卵黄へ移行するメカニズムについてもいまだ明らかにされていない。鶏の卵胞は，外側から順に，卵胞膜，基底膜，顆粒膜，透明帯の４層で包まれており，透明帯の内側に卵母細胞が存在する[5,6]。卵巣顆粒膜細胞（chicken Granulosa Cells：以下cGC）は卵母細胞に最も近い細胞であり，SPの卵黄への移行においてなんらかの形で通過する必要がある。我々はこれまで，Enteritidis[7,8]と同様にSPもcGCに接着・侵入することを見出した（未発表）。さらに，その接着・侵入経路解明の足掛かりとして，cGC膜タンパク質を表面にカップリングした磁気ビーズにSPの外膜タンパク質を反応させるプルダウンアッセイを行い，cGC膜タンパク質ビーズと相互作用した菌側の因子としてOuter membrane protein A（OmpA）を検出・同定した（未発表）。OmpAと相互作用するcGC膜タンパク質構成成分は，まだ同定に至っていない。

そこで本研究では，OmpAがサルモネラの鶏生殖器感染時における細胞との相互作用において果たす役割を明らかにし，さらにその宿主細胞表面のレセプターを同定することにより，最終的にサルモネラが鶏卵汚染あるいは鶏胚に介卵感染するメカニズムを解明することを目的とした。

２．方　　法

2.1　Δ*ompA*の作製

SP野生型（WT，2001年に千葉県で発生したひな白痢事例由来分離株）を親株とし，λ-red homologous recombination法[9]によりΔ*ompA*を作製した。

2.2　*in vitro*培養細胞を用いたΔ*ompA*感染実験

採卵鶏廃鶏より成熟卵胞を採取し，コラゲナーゼ処理により消化して鶏卵巣顆粒膜細胞（cGC）を単離した。細胞数を調整してM199培地で37℃，５％CO_2で24時間培養した。並行して培養しておいたSPのWTおよびΔ*ompA*を，培養細胞に１細胞あたり50-100個の菌が感染するように接種した。３時間後に培養液を除去し，ゲンタマイシンを添加して細胞外の菌を殺菌した。さらにハンクスバッファーで洗浄後，一部のウェルについてはTritonX-100処理により得られた細胞溶解液をDHL平板培地に塗抹して細胞内菌数を測定し，これを０時間後とした。残りのウェルにはM199培地を加えて培養を続け，数時間おきに一部のウェルについてTritonX-100処理により得られた細胞溶解液をDHL平板培地に塗抹して細胞内菌数を測定し，菌株間で比較した。なお，感染性のない大腸菌実験室株であるJM109を陰性対照とし

© The Ito Foundation

て用いた。

2.3　鶏を用いた*in vivo*でのΔ*ompA*感染実験

120日齢の採卵鶏（ボリスブラウン）4羽にWTを，5羽にΔ*ompA*を経口接種（$1.4-8.0\times10^{7}$ CFU／羽）し，その後15日間にわたり回収された卵を採材し，産卵率とSP汚染率を算出した。また，最終的に全羽安楽殺後，盲腸扁桃，盲腸内容，肝臓，脾臓，卵胞，卵巣，卵管を採取した。PBSでこれら組織の懸濁液とその10倍階段希釈液を作製してDHL寒天平板培地に100 μL塗抹し，単位量あたりの生菌数を測定し，群間で比較した。

2.4　組換えOmpA（rOmpA）の磁気ビーズへのカップリング

すでに作製済みのrOmpA 7.5 μgをDynabeads Co-immunoprecipitation kit（Thermo Fisher Scientific，14321D）に含まれるDynabeads M-270 Epoxy 7.5 mgにカップリングした。

2.5　鶏卵巣顆粒膜細胞の膜タンパク質の抽出

前述実験1と同様の手順で鶏卵巣顆粒膜細胞を単離し，Plasma Membrane Protein Extraction Kit（コスモ・バイオ，東京，P503）を用いて細胞膜タンパク質を抽出した。

2.6　プルダウンアッセイ

rOmpAをカップリングしたビーズ（rOmpAビーズ）にcGC膜タンパク質0.21 mgを反応させ，洗浄した後，rOmpAビーズと相互作用したcGC膜タンパク質を溶出した。なお，陰性コントロールとして，rOmpAをカップリングせずに同様の操作を行ったビーズにも同量のcGC膜タンパク質を反応させた。溶出したタンパク質を遠心真空濃縮器（TOMY，MV-100）により30 μlまで乾燥させた。

2.7　SDS-PAGEによる溶出タンパク質の展開

溶出タンパク質を10％SDS-PAGEで展開後，Oriole Fluorescent Get Stain（BIO-RAD，161-0496）を用いて染色し，可視化されたバンドの位置を陰性コントロールと比較した。rOmpAビーズとcGC膜タンパク質を反応させた溶出液のレーンを，ビーズのみとcGC膜タンパク質を反応させた溶出液のレーンおよびrOmpAビーズのみを溶出させた溶出液のレーンを比較し，最初のレーンのみに見られたバンドをrOmpAと相互作用するcGC膜タンパク質側の因子と考えた。

2.8　タンパク質解析

陰性コントロールと比較してバンドが認められたゲルを切り出し，LC-MS/MS解析およびMascotデータベース検索により，バンドに含まれる当該タンパク質の同定を試みた。

3．結果と考察

3.1　*in vitro*培養細胞を用いたΔ*ompA*感染実験

Δ*ompA*感染cGCにおけるcGC細胞内生菌数の平均値は4.57 ± 0.28 $\log_{10}$ CFU/well，JM109感染cGCにおける細胞内生菌数の平均値は3.79 ± 0.07 $\log_{10}$ CFU/wellであり，いずれもWT感染cGCにおける5.38 ± 0.32 $\log_{10}$ CFU/wellよりも有意に（$p<0.01$）低かった（**Fig. 1**）。

3.2　鶏を用いた*in vivo*でのΔ*ompA*感染実験

感染15日後の臓器内生菌数は，盲腸扁桃においてWT群で$10^{3.05}$ CFU/gに対してΔ*ompA*群で$10^{1.50}$ CFU/gと後者での回収菌数は低くなった（$p<0.05$）。盲腸内容物や肝臓，脾臓，卵胞，卵巣および卵管においては，肝臓と脾臓を除いていずれもΔ*ompA*群においてWT群よりも少ない菌数が回収されたが，統計学的な違いはなかった（**Fig. 2**）。

3.3　cGC表面のOmpAレセプターの同定

rOmpAビーズとcGC膜タンパク質を反応させた溶出液のレーンに，ビーズのみとcGC膜タンパク質を反応させた溶出液のレーンおよびrOmpAビーズのみを溶出させた溶出液のレーンには見ら

© The Ito Foundation

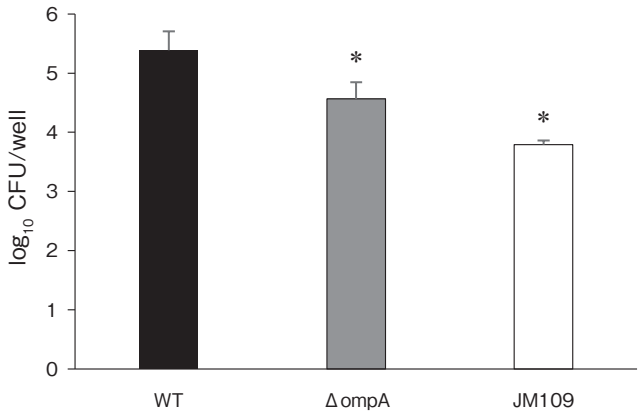


Fig. 1　Mean intracellular bacterial counts in cGC cell monolayer　　＊p＜0.01

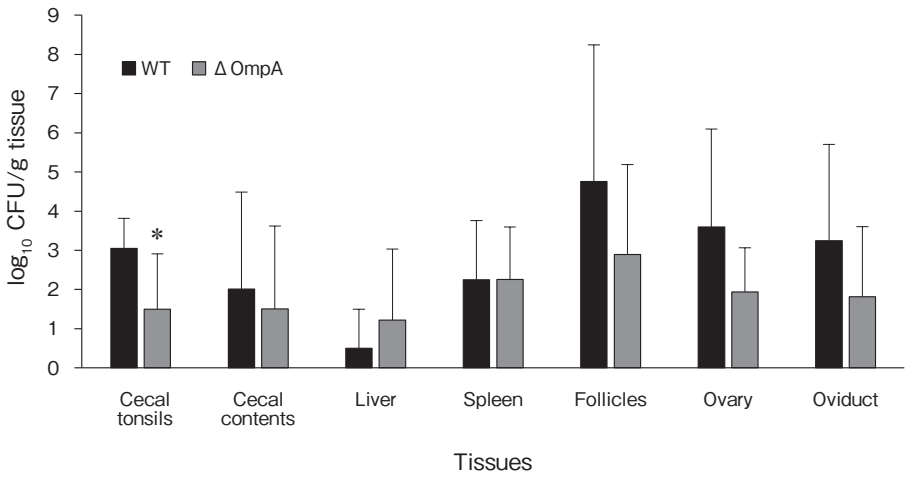


Fig. 2　Bacterial burdens in layer chickens at 15 days post infection with S. Pullorum wild type (WT) and ΔompA　　＊p＜0.05

れなかったバンドが２か所に観察された（約26 kDaおよび約45 kDa）（**Fig. 3**）。いずれのバンドにも複数の候補タンパク質が含まれており，これらの一つあるいは複数がOmpAのレセプターとしての役割を果たしているものと示唆された（**Table 1**）。

3.4　本研究の意義と今後の展望

以上のことから，Δ*ompA*はWTと比較して細胞接着・侵入が低下するとともに，感染鶏においても産出卵の汚染率が低下した。すなわち，OmpAはcGCへの接着・侵入に不可欠であり，生体での卵汚染にも大きく関与すると考えられた。一方で，OmpAを欠損させてもSPの接着と侵入が完全には阻害されなかった。OmpAはグラム陰性細菌に見られ，菌体構造の維持に関わる重要な外膜タンパク質であり[10]，ペリプラズムに存在するC末端部分がペプチドグリカンと相互作用することで膜の安定性に関与している[11, 12]。その機能は細菌の病原性におけるいくつかの重要なプロセスに寄与する[13]と考えられている。菌の宿主上皮細胞への侵入は多くの細菌感染の病因における重要なステップであり，さまざまな菌において

© The Ito Foundation

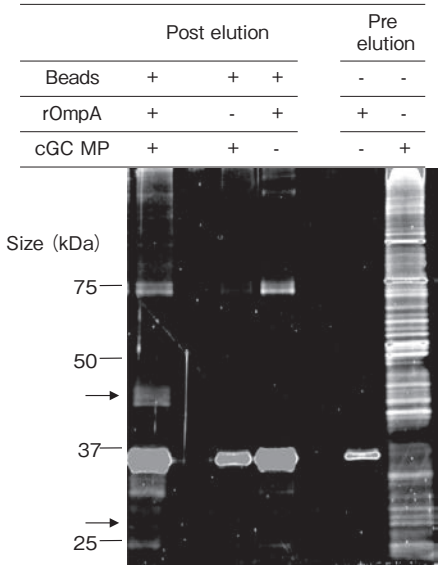


Fig. 3　cGC membrane proteins (cGC MP, arrows) interacting with recombinant OmpA (rOmpA) from S. Pullorum

Table 1　Candidate cGC membrane proteins interacting as surface receptor(s) with OmpA from S. Pullorum

Band	Accession	Score	emPAI	Description
1	E1C1V3	1087	1.63	Junction plakoglobin
1	Q766V2	635	1.58	Zona pellucida protein D
1	E1BWI0	920	0.45	SH3 domain-containing protein
1	F1NSV6	34	0.24	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit beta
1	A0A1D5PWL2	29	0.14	Uncharacterized protein
1	A0A3Q2TVC5	48	0.09	Uncharacterized protein
1	E1BUH5	23	0.08	Zona pellucida sperm-binding protein 3
1	F1NPI1	213	0.05	Transporter
1	A0A1L1RQA3	21	0.05	Sodium/potassium/calcium exchanger 2
1	F1NAN4	27	0.02	Uncharacterized protein
2	A0A1D5PNK3	105	0.41	Uncharacterized protein
2	F1NL85	59	0.23	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit MAGT1
2	A0A1D5PJK2	16	0.18	Uncharacterized protein
2	A0A3Q2UHG3	39	0.17	Endostatin domain-containing protein
2	A0A1D5PM72	25	0.09	Uncharacterized protein
2	E1BWI0	68	0.04	SH3 domain-containing protein
2	F1NS61	19	0.03	Uncharacterized protein
2	F1NFL6	49	0.02	Phosvitin

OmpAが細胞への接着・侵入に関与することは数多く報告されている。例えば，*Cronobacter sakazakii*（*C. sakazakii*）の腸管由来株化細胞（INT407）への接着[14]，*Acinetobacter baumannii*（*A. baumannii*）の宿主上皮細胞への接着[15]および腸管出血性大腸菌（EHEC）のヒト子宮頸癌由

© The Ito Foundation

来株化細胞（HeLa細胞）への接着[16]には，いずれもOmpAが介在し，各菌の病原性に関与していることから，SPの病原性におけるOmpAの潜在的関与も推測できる。なかでも*C. sakazakii*はINT407腸細胞株の細菌侵入にOmpAを必要とするが，微小管とマイクロフィラメントの凝縮も侵入プロセスに重要であることが報告されており[14]，我々がOmpAを細胞接着因子として検出した研究では，*E. coli*において哺乳動物の細胞への接着および侵入に関与するOmpX[17]などの病原性に関与するタンパク質がcGCと相互作用する因子として検出されている（未発表）。これらを考慮すると，菌の細胞侵入において他の菌側因子が協働している可能性は否定できない。一方，本研究ではcGC膜タンパク質において複数のOmpAレセプター候補が特定された。プロテインスコアやemPAIなどの指標と，細胞内における当該タンパク質の存在箇所，さらにcGCにおける特異性を考慮すると，バンド１に含まれるZona pelucida protein DがOmpAとの相互作用に関与している可能性が強く示唆される。今後は同定されたタンパク質の機能解析を行うことでOmpAとの相互作用の意義を探り，SP感染を防御するための糸口となることを期待したい。

また，ひな白痢はその呼称のとおりひなに強い病原性を示す。本研究結果に示すように，成鶏は明らかな臨床症状を見せずに汚染卵を産出するため，SPの病原性を直接評価するのは容易ではない。そこで，ひなを用いた感染実験を実施するなどして，より評価しやすい表現型に基づいて，OmpAの病原性への関与を調べる必要があろう。

４．要　約

法定伝染病であるひな白痢の原因菌*Salmonella enterica*血清型Gallinarum生物型Pullorum（SP）は，感染後耐過した無症状保菌鶏から介卵感染により垂直伝播することで後代鶏を死に至らしめ，さらには水平感染により同居ひなへ伝播し高確率で死亡させるため，世界的に経済被害が大きい。我々はこれまでSPの生殖器への移行経路として卵母細胞を取り囲む顆粒膜細胞（cGC）に着目し，cGC膜タンパク質と結合するSP側のタンパク質として，OmpAを同定した。そこで本研究では，*ompA*欠損株（Δ*ompA*）を作製し，SP感染におけるOmpAの病原性への関与を検証した。Δ*ompA*は*in vitro*において，野生型（WT）と比較して増殖能が低下し，cGCへの感染実験では細胞内侵入菌数が顕著に減少した。さらにΔ*ompA*の*in vivo*における病原性を評価するため，成鶏を用いて感染実験を行った。Δ*ompA*経口接種鶏では，WT感染鶏と比較して，感染15日後の盲腸扁桃，盲腸内容物，卵胞，卵巣および卵管において回収菌数が低下した。一方，OmpAのレセプターとしての役割を果たす候補タンパク質は多数検出され，このうち一つあるいは複数の因子が協働してOmpAとの相互作用に関与している可能性が示唆された。

文　献

1） Okamura, M., Kamijima, Y., Miyamoto, T., Tani, H., Sasai, K., Baba, E.：Differences among six *Salmonella* serovars in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in laying hens, *Avian Dis.*, **45**, 61～9, 2001.

2） Okamura, M., Miyamoto, T., Kamijima, Y., Tani, H., Sasai, K., Baba, E.：Differences in abilities to colonize reproductive organs and to contaminate eggs in intravaginally inoculated hens and in vitro adherences to vaginal explants between Salmonella enteritidis and other *Salmonella* serovars, *Avian Dis.*, **45**, 962～71, 2001.

3） Okamura, M., Tachizaki, H., Kubo, T., Kikuchi, S., Suzuki, A., Takehara, K., Nakamura, M.：Comparative evaluation of a bivalent killed *Salmonella* vaccine to prevent egg contamination with *Salmonella enterica* serovars Enteritidis, Typhimurium, and Gallinarum biovar Pullorum, using 4 different challenge models, *Vaccine*, **25**, 4837～44, 2007.

© The Ito Foundation

4） Wigley, P., Hulme, S. D., Powers, C., Beal, R. K., Berchieri, A. Jr., Smith, A., Barrow, P.：Infection of the reproductive tract and eggs with *Salmonella enterica* serovar pullorum in the chicken is associated with suppression of cellular immunity at sexual maturity, *Infect. Immun.*, **73**, 2986～90, 2005.
5） Reaven, E., Lua, Y., Nomoto, A., Temel, R., Williams, D. L., Van der Westhuyzen, D. R., Azhar, S.：The selective pathway and a high-density lipoprotein receptor (SR-BI) in ovarian granulosa cells of the mouse, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1436**, 565～76, 1999.
6） Schneider, W. J.：Receptor-mediated mechanisms in ovarian follicle and oocyte development, *Gen. Comp. Endocrinol.*, **163**, 18～23, 2009.
7） Thiagarajan, D., Saeed, M., Asem, E. K.：Mechanism of transovarian transmission of *Salmonella enteritidis* in laying hens, *Poult. Sci.*, **73**, 89～98, 1994.
8） Thiagarajan, D., Saeed, M., Turek, J., Asem, E. K.：In vitro Attachment and invasion of chicken ovarian granulosa cells by *Salmonella enteritidis* phage type 8, *Infect. Immun.*, **64**, 5015～21, 1996.
9） Murphy, K. C.：Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **180**, 2063～2071, 1998.
10） Krishnan, S., Prasadarao, N. V.：Outer membrane protein A and OprF：versatile roles in Gram-negative bacterial infections, *FEBS J.*, **279**, 919～31, 2012.
11） De Mot, R., Vanderleyden, J.：The C-terminal sequence conservation between OmpA-related outer membrane proteins and MotB suggests a common function in both gram- positive and gram-negative bacteria, possibly in the interaction of these domains with peptidoglycan, *Mol. Microbiol.*, **12**, 333～334, 1994.
12） Koebnik, R., Krämer, L.：Membrane assembly of circularly permuted variants of the *E. coli* outer membrane protein OmpA, *J. Mol. Biol.*, **250**, 617～626, 1995.
13） Naylor, K. L., Widziolek, M., Hunt, S., Conolly, M. Hicks, M. Stafford, P., Potempa, J., Craig, Murdoch., lan Douglas, C. W., Stafford, G. P.：Role of OmpA2 surface regions of *Porphyromonas gingivalis* in host-pathogen interactions with oral epithelial cells, *Microbiology Open.*, **6**, 1～11, 2017.
14） Nair, M. K., Venkitanarayanan, K.：Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*, *Pediatr. Res.*, **62**, 664～9, 2007.
15） Mortensen, B. L., Skaar, E. P.：The contribution of nutrient metal acquisition and metabolism to *Acinetobacter baumannii* survival within the host, *Front. Cell Infect. Microbiol.*, **3**, 1～10, 2013.
16） Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Weiser, J. N., Stins, M. F., Huang, S. H., Kim, K. S.：Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells, *Infect. Immun.*, **64**, 146～153, 1996.
17） Joachim, V., Schulz, G. E.：The structure of outer membrane protein OmpX from *Escherichia coli* reveals possible mechanisms of virulence, *Structure*, **7**, 1301～9, 1999.

© The Ito Foundation

ジビエおよび家畜動物におけるトキソプラズマ感染の頻度と新規検査方法の開発

Toxoplasma infection in wild and livestock animals；developing novel serological diagnostic methods

保科　斉生[1,2]・櫻井　達也[3]・嘉糠　洋陸[2,3]

（東京慈恵会医科大学　[1]感染制御科，[2]実験動物研究施設，[3]熱帯医学講座）

Tokio Hoshina[1,2], Tatsuya Sakurai[3] and Hirotaka Kanuka[2,3]

（The Jikei University School of Medicine [1] Department of Infectious Disease and Infection Control, [2] Laboratory Animal Facilities, [3] Department of Tropical Medicine）

Toxoplasmosis is caused by *Toxoplasma gondii*, a zoonotic protozoan infection of food origin. It is believed that about 1/3 of the world's population is infected with *T. gondii*, and infections have been reported worldwide. Toxoplasma can infect almost all warm-blooded animals, with no exceptions for humans and food-producing domestic animals. It has been noted that human Toxoplasma infections in Japan may be of meat origin, and pork, which is eaten widely, is a particular risk for infection. This study conducted experimental infections using four micro-mini pigs and measured antibody trends using the Sabin-Feldman dye test（SFDT）and the TOKIO test, a modified SFDT. Type 3 T. gondii（Gifu clinical isolate）tachyzoites were used in the infection experiments. The results of the SFDT and TOKIO tests were correlated and showed a strong correlation with a Spearman rank correlation coefficient of 0.90 and a 95% confidence interval of 0.84-0.92. As a result, the majority of titers of positive specimens were SFDT 1:16 and TOKIO test 1:16-1:64. In one pig, antibody titers after PID 126 were negative in both tests, suggesting that SFDT, the golden standard for serological testing, maybe a false negative. The small number of micro-mini pigs in this study was a limitation of this research. In addition, there were no studies that used SFDT to track changes in antibody titers due to infection against domestic isolates, and further exploration is warranted.

1．目　　的

トキソプラズマ感染症は，*Toxoplasma gondii* の感染が原因であり，食品由来の人獣共通の原虫感染症である。感染者は世界人口の約1/3に達すると考えられており，世界中で感染が報告されている。またトキソプラズマは，ほぼすべての温血動物に感染可能であり，ヒトも家畜も例外なく感染する。日本国内のヒトのトキソプラズマ感染の多くは，食肉由来であるとの可能性が示唆されており，特に調理不十分な豚肉や山羊肉の摂取はリスクであると考えられている[1)]。本邦の妊婦を対象とした疫学調査では，約10％の妊婦が抗体を保有しており[2)]，我々が行ったHIV感染者を対象と

© The Ito Foundation

した調査では，抗体保有率が8.3％であることが判明した[3]。妊婦や免疫抑制者では重篤な病態を引き起こすため，注意が必要な感染症である。

家畜におけるトキソプラズマ症は，無症状またはサブクリニカルな場合が多く，急性期感染でない限り，解体時にトキソプラズマ感染を検出することは難しい。よって，トキソプラズマに感染した大部分の家畜は，と畜場における検査で検出できない可能性が高い[4]。特に感染リスクが比較的高いブタでは，正確な診断方法が必要である[4]。一般的に感染の検出には，血清学的検査（ELISA法など）が使用される頻度が高い。一方で，血清学的検査のゴールドスタンダードであるSabin-Feldman Dye Test（以下SFDT）は高い感度と特異度を有すが，手技が煩雑であり，評価には習熟したスキルを要するため，検査が可能な機関は限られている[5]。我々はSFDTの改良が，正確なトキソプラズマ診断に寄与する可能性を考え，本研究を計画した。本研究では，感染マイクロミニピッグにおけるトキソプラズマ感染後の抗体価を，SFDTと改良SFDTで測定し，検査性能の比較，抗体価の推移を明らかにした。

2．方　法

本研究ではType 3 *T. gondii*（岐阜臨床分離株）を用いた感染実験を行った[6]。一般的に，Type 3のトキソプラズマは，マウスに対して低病原性であり，感染後も無症候であることが多いが，本株はシストの経口摂取によりマウスでも高い病原性を示すことが知られている。本株のタキゾイトをマウスの腹腔内に接種し，感染マウスを作成し，その脳乳化液（多数のブラディゾイトを内包するシストを約900個含有）を用意した。この脳乳化液を4頭のマイクロミニピッグに経口投与し，感染後182日までの抗体価の推移をSFDTと改良SFDTであるToxoplasma Killing Observation Test（TOKIOテスト）で測定した。

SFDTは，生鮮虫体（タキゾイト）を被験血清と反応させた後にメチレンブルーで染色し，虫体の傷害程度を評価する。本研究で行ったSFDTのプロトコルは，過去の報告と同様に実施し，Type 1 *T. gondii*を使用し，希釈血清（1：4，1：16，1：64，1：256，1：1024）において青染虫体が50％未満となる，最高希釈濃度を抗体価とした[7]。SFDTは検査を2回行い，得られた抗体価の平均値を結果として用いた。TOKIOテストでは，GFP発現*T. gondii*のタキゾイトを用い，虫体の傷害をGFPの消退として観察した。TOKIOテストの工程はSFDTと同様に行い，蛍光顕微鏡（×400倍）を用いてGFPの発光像を撮影した。撮影は一希釈検体あたり5視野とし，画像解析ソフトImage Jを用いて発光範囲の平均面積を算出した。各希釈検体の発光面積を，陰性コントロールの発光面積で除した数値が0.5未満となる最高希釈濃度を抗体価とした。いずれのテストも1：16以上の結果を陽性と判定し，それ未満を陰性と判定した[8]。感染前の血液検体をPost Infection Days（PID）0とし，以降1週間ごとの血液検体をPID182まで評価した。

3．結果と考察

トキソプラズマのシストを経口投与した4頭のマイクロミニピッグは観察期間中，無症状であり，182日間生存した。4頭のSFDTの抗体価の推移を**Fig. 1**に，TOKIOテストの抗体価の推移を**Fig. 2**にまとめた。1頭（A）ではシストの経口摂取から182日間にわたり，SFDTとTOKIOテストが，カットオフ値である1：16以上にならず，感染の不成立，または抗体の非産生が示唆された。他の3頭（B，C，D）ではPID 21以内に抗体価の上昇が認められた。PID 14の時点で，1頭（D）でSFDT，2頭（B，D）でTOKIOテ

© The Ito Foundation

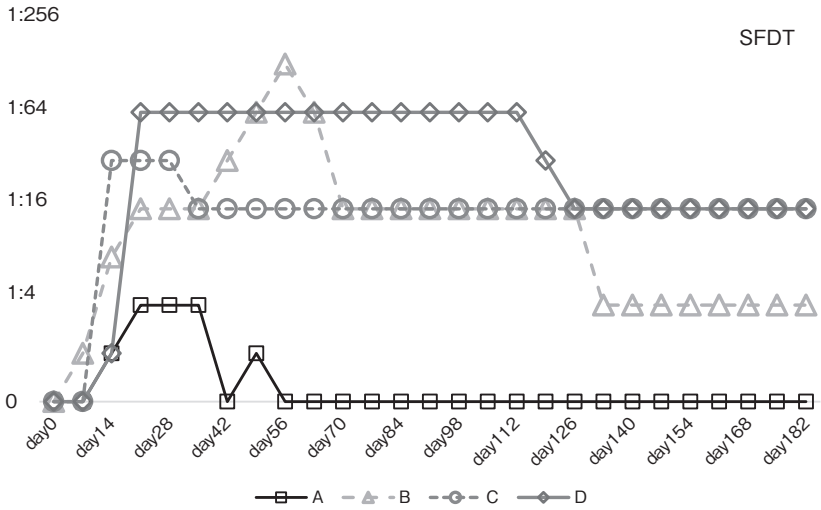


Fig. 1　The following figure shows the trends in antibody titers (SFDT) after Toxoplasma infection in four micro-mini pigs. The values on the vertical axis represent the dilution fold of the tested sera. A result of 1:16 or greater was defined as positive.

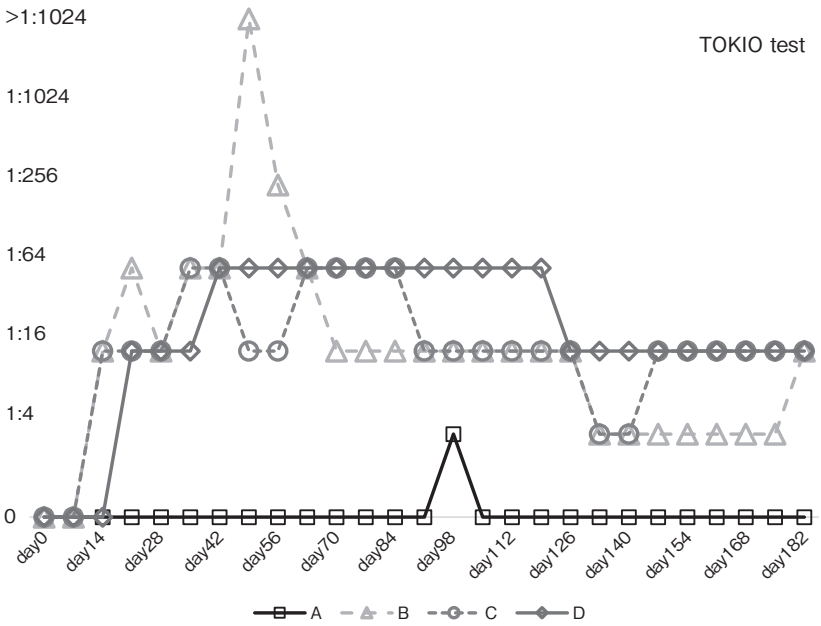


Fig. 2　The following figure shows the trends in antibody titers (TOKIO test) after Toxoplasma infection in four micro-mini pigs. The values on the vertical axis represent the dilution fold of the tested sera. A result of 1:16 or greater was defined as positive.

ストの陽転化が認められた。抗体価の最高値は，いずれもＢ個体で認められ，SFDTではPID 56に１：64-１：256, TOKIOテストではPID 49に１：1024以上の抗体価を認めた。同個体の両検査の抗体価は経過とともに漸減し，PID 70以降は１：16の抗体価で安定し，PID 126には１：４（カッ

© The Ito Foundation

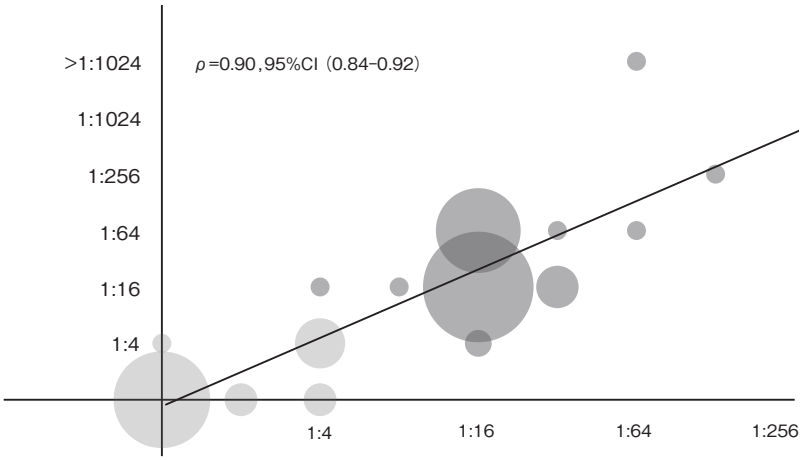


Fig. 3　The correlation between the SFDT and TOKIO test is summarized in a bubble chart. The size of the circles in the figure represents the number of specimens matching equal titers. Light gray circles indicate negative samples for both tests, and dark gray circles indicate positive samples for at least one of the tests.

トオフ値以下）まで低下した。他の２頭（C，D）は，SFDTでPID 21をピークに，TOKIOテストではPID 35（C）とPID 42（D）をピークに抗体価の安定を認めた。以降の期間は，SFDTで１：16以上の保持を認めたが，TOKIOテストではC個体においてPID133-140の間，抗体価が１：４まで低下した。PID 147以降は１：16まで再上昇し，以降は安定を認めた。

４頭のマイクロミニピッグにおける，SFDTとTOKIOテストの検査結果を経時的に比較し，その関係を**Fig. 3**のバブルチャートにまとめた。図中の円のサイズは，その条件に一致する検体数を表す。また，淡いグレーの円は両検査が陰性の検体を，濃いグレーの円は，少なくとも一方の検査が陽性の検体を示している。SFDTとTOKIOテストの結果は，スピアマン順位相関係数（ρ）0.90，95％信頼区間0.84-0.92と強い相関関係を認めた。結果として，検査で得られた陽性検体の多くは，SFDT 1：16，TOKIOテスト１：16-１：64であった。

本研究の結果から，SFDTとTOKIOテストは強い相関関係にあることが明らかになった。Aの個体の抗体価は，SFDTとTOKIOテストで一致しており，観察期間中はいずれも陰性であった。原因として感染の不成立，もしくはトキソプラズマ抗体の非産生があると考えられた。C，Dの個体は，一度抗体価が上昇した後に，長期にわたり抗体価が維持され，双方の検査は矛盾をしない結果であった。一方で，一部の検査では結果が乖離した。特にB個体の検査で見られた，PID 133-140のTOKIOテストの陰転化については，臨床検査上，偽陰性になるため注意が必要である。またB個体では，感染の約２ヶ月後にSFDTとTOKIOテストで高い抗体価が見られたが，その後抗体価は漸減し，PID 133以降は両テストともに陰転化を認めた。これまでは，トキソプラズマに感染した個体は，長期間にわたり抗体価が持続すると考えられていたが，感染後早期に抗体が陰転化する個体の存在が示された。稀ではあるが，ヒトでもトキソプラズマIgG陰性の感染再燃例が報告されており，発症の数ヶ月後に抗体が陽性転化した症例が報告されている[9]。本研究のB個体

© The Ito Foundation

でも，同様の反応が起きていた可能性がある。なお，今回の研究で対象としたマイクロミニピッグの頭数が少なかった点は，本研究の制約である。ただし，国内の分離株を用いて，感染実験により抗体価の推移を追跡した研究は少なく，重要な知見が得られたと考えている。本研究の結果は，飼育されたマイクロミニピッグにおける検証に限られているが，今後は野生のイノシシやシカを対象にした研究を展開したい。

4．要　約

本研究では，国内で分離されたType 3 *T. gondii*をマイクロミニピッグ４頭に経口感染させ，その後の抗体価の推移をSFDTとTOKIOテストを用いて明らかにした。SFDTとTOKIOテストの結果は強く相関した（スピアマン順位相関係数0.90，95％信頼区間0.84-0.92）。一部の検査結果には乖離が見られ，解釈には注意を要すが，TOKIOテストの結果はSFDTに近似することが示された。また，観察期間中に抗体価が漸減し，両テストともに陰転化する個体が確認された。ヒトのトキソプラズマ感染症では，稀に血清学的検査が陰性になることが報告されており，マイクロミニピッグでも同様の現象が起きていた可能性がある。

文　献

1） Konishi, E., Takahashi, J.：*Int. J. Epidemiol.*, **16**, 277～281, 1987.
2） Sakikawa, M., Noda, S., Hanaoka, M., Nakayama, H., Hojo, S., Kakinoki, S., Nakata, M., Yasuda, T., Ikenoue, T., Kojima, T.：*Clin. Vaccine. Immunol.*, **19**, 365～367, 2012.
3） Hoshina, T., Horino, T., Saiki, E., Aonuma, H., Sawaki, K., Miyajima, M., Lee, K., Nakaharai, K., Shimizu, A., Hosaka, Y., Kato, T., Sato, F., Nakazawa, Y., Yoshikawa, K., Yoshida, M., Hori, S., Kanuka, H.：*J Infect Chemother.*, **26**, 33～37, 2020.
4） 松尾加代子：IASR, 43, 53～54, 2022.（https://www.niid.go.jp/niid/ja/typhi-m/iasr-reference/2563-related-articles/related-articles-505/11037-505r03.html, 2022/4/17アクセス）
5） Reiter-Owona, I., Petersen, E., Joynson, D., Aspöck, H., Dardé, M. L., Disko, R., Dreazen. O., Dumon, H., Grillo, R., Gross, U., Hayde, M., Holliman, R., Ho-Yen, D. O., Janitschke, K., Jenum, P. A., Naser, K., Olszewski, M., Thulliez, P., Seitz, H. M.：*Bull. World Health Organ.*, **77**, 929～935, 1999.
6） Taniguchi, Y., Appiah-Kwarteng, C., Murakami, M., Fukumoto, J., Nagamune, K., Matsuo, T., Masatani, T., Kanuka, H., Hoshina, T., Kitoh, K., Takashima, Y.：*Parasitol. Int.*, **67**, 587～592, 2018.
7） Sabin, A. B., Feldman, H. A.：*Science*, **10**, 660～663, 1948.
8） 保科斉生，青沼宏佳，堀誠治，嘉糠洋陸：*Clin. Parasitol.*, **27**, 105～108, 2016.
9） Shiojiri, D., Kinai, E., Teruya, K., Kikuchi, Y., Oka, S.：*Emerg. Infect. Dis.*, **25**, 841～843, 2019.

© The Ito Foundation

網羅的ジェノタイピングによる新規牛伝染性リンパ腫抵抗性遺伝子の同定（Ⅲ）

Identification of novel bovine leukosis resistance-associated alleles by comprehensive genotyping（Ⅲ）

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 EBL development. 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, the 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 correlated with the proviral load. To follow up on the result of GWAS, we investigated the correlation between the proviral load and allele of the SNP（AX-168291905） in additional 1,425 samples. Mean（median）values of proviral loads were 1,796 copies/50 ng of genomic DNA（1,289 copies/50 ng）in the A_A allele, 1398 copies/50 ng（876 copies/50 ng）in the A_G allele and 1053 copies/μl（557 copies/50 ng）in the G_G allele. Significant differences were confirmed between A_A and A_G, and A_A and G_G. These results showed that the SNP would be associated with the 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

家畜監視伝染病のうち，牛の伝染病で最も多く報告されているのが牛伝染性リンパ腫（旧名：牛白血病）である。牛伝染性リンパ腫のほとんどを占める地方病型（Enzootic bovine leukosis：EBL）は，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。BLV感染牛の約５％が，感染から数年後にEBLを発症して予後不良や全廃棄処分となるため，畜産業にとって大きな経済的損失となる。日本では，約35％の牛がBLVに感染しているが，豪州やニュージーランド，西欧諸国では清浄化されている[1)]。デルタレトロウ

© The Ito Foundation

イルス属に分類されるBLVは，宿主の染色体にウイルス遺伝子を組み込むため，生涯にわたって感染を持続させることができる。感染や発症を防ぐワクチンおよび治療薬がないことから，BLVに感染させないことがEBL被害を防ぐ，唯一の方法である。

BLV感染から半年ほど経過するとセットポイント期となり，血液中のプロウイルス量が安定する。我々はこれまでに，BLVを他の牛に伝播する感染源リスクとセットポイント期におけるプロウイルス量との相関を明らかにしてきた。500 copies/50 ng of genomic DNA以上の牛が水平および垂直感染の主要な感染源となる高リスク牛であり，それ以下が感染源とはなりにくい低リスク牛である[2～4]。つまり，すべての感染牛を対象とした対策よりも，高リスク牛に対象を絞ったBLV対策が効率的である。

感染率が高い地域では，経営を維持するためにも高リスク母牛による繁殖が欠かせない。しかし，高リスク母牛は約40％の確率でBLVを母子間伝播する[3, 4]。つまり，新生子牛への母子間伝播を防ぐ，もしくは新生子牛のプロウイルス量を抑えて，子牛を新たな感染源としない方法が必要である。牛のMHCクラスⅡ遺伝子であるBoLA class Ⅱは牛の23番染色体上にコードされている。このうちDRB３遺伝子には多型が存在し，そのタイプによってBLVのウイルス量が明確に決定されることが明らかとなっている[5]。それらのうち，DRB3*0902遺伝子（0902遺伝子）はBLV抵抗性遺伝子と呼ばれ，この遺伝子をヘテロもしくはホモで持つウシは，例外なくウイルス量が低い[6]。そのため，高リスク母牛に0902遺伝子を持つ種牛を交配することで，新生子牛を50％以上の確率で抵抗性牛にすることができる。

一方，MHC class Ⅱの偏りは，集団におけるリンパ球の多様性消失に繋がる。そのため，BLV以外の特定の感染症に対して，牛群全体が強い感受性を示す可能性が否めない。そのため，BoLA以外の宿主遺伝子からBLV抵抗性に関与する遺伝子を明らかにする必要がある。0902遺伝子は6.8％の牛が保有しているが[6]，黒毛和種の1/2から1/3は低リスク牛である。すなわち，BoLA class Ⅱ遺伝子以外にもBLV抵抗性に関与する遺伝子が存在するのではないか。そこで本研究では，ウイルス量と宿主の一塩基多型（SNP）との網羅的比較解析から，新規BLV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2021年２月にBLV検査を目的として採取した血液（12ヶ月齢以上，雌）のうち，BLV感染を確認した血液のゲノムDNAを使用した。なお，BLV検査の際に，獣医師を通してウシの所有者に本研究への検体利用に関する同意を得ている。本研究では，ELISAとリアルタイムPCRでともに陽性の検体をBLV感染とした。ELISAは，市販のELISAキット（牛伝染性リンパ腫エライザキット；ニッポン・ジーン，東京，日本）を用いた。リアルタイムPCRは，magLEAD 12gc（プレシジョン・システム・サイエンス，松戸，日本）でゲノムDNAを抽出して濃度を調整後，既報のプライマー／プローブを一部修正してプロウイルス量を定量した[7]。

2.2　SNPアレイ解析

SNPアレイ解析には計288検体の黒毛和種のゲノムDNAを使用した。リアルタイムPCRの結果，2,000 copies/50 ngを超えた146検体を高リスク群，100 copies/50 ng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

© The Ito Foundation

場あたり最大３検体を供した。SNPアレイ（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（東京，日本）に受託解析した。データ解析には，SNP & Variation Suite Ver8.9.0（ゴールデンヘリックス社，ボーズマン，米国）を用いた。ゲノム参照配列にBos taurus UMD3.1（GCA_000003055.3）を，SNPマーカーマップにAxiom BovMDv３（サーモサイエンティフィック社）を用いた。サンプルデータのクオリティーチェックはCall rate ＞0.95を，ジェノタイピングデータのクオリティチェックはCall rate >0.95, Minor allele frequency >0.01, Hardy Weinberg平衡＞0.001を条件とした。さらに，連鎖不平行解析を行い，関連性の高いSNP（r^2＞0.9）を解析から除外した。相加，優性および劣性モデルを用いて，各SNPと各リスク群との相関をcorrelation-trend testで解析した。各モデルにおいてgenomic inflation factor（λ）を算出し，genomic control法でサンプルのバイアス補正をした。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（0.05/34,491＝1.449×10^{-6}）をゲノムワイド関連解析における有意差の基準とした。また，genomic control法が保守的な補正方法であり，偽陰性が多くなることから，$p<1.0\times10^{-5}$を緩やかな有意差ありとした。

2.3　リアルタイムPCR法によるSNPジェノタイピング

SNPジェノタイピングには，rhAmp SNP Genotyping System（IDT社，コーラルビル，米国）を用いた。初めに，標的としたSNP（Chr1：95,193,165）の前後500塩基配列を公共データベースより抽出した。続いて，抽出した配列からrhAmp Genotyping Design Tool（IDT社）を用いて，以下のプライマーを設計した。Allele-specific primer：5'-CTCTGTTTCACCACCAC［A/G］ACTGT-3'，Locus-specific reverse primer：5'-GCCATGCAGCCTATATAAGTGATGTTCTTGT-3'。検体には，黒毛和種を1,342検体とホルスタイン種を83検体を用いた。Combined Master Mix and Reporter Mix を 5.0 μl，rhAmp SNP Assayを0.3 μl，ゲノムDNAを20 ng加え，さらに超純水で全量を10 μlとした。PCR条件は，95℃10分の後，95℃10秒，60℃30秒，68℃20秒を40サイクル行い，FAMでメジャーアレルのAを，VICでマイナーアレルのGを検出した。各アレルとプロウイルス量の統計解析は，クラスカル・ウォリス検定およびダンの多重比較検定を用いた。また，$p<0.05$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，SNPのクオリティコントロールおよび連鎖不平衡解析の結果，34,491個のSNPを以下の解析に用いた。これら34,491個のSNPsについて相加，優性および劣性モデルにおいてプロウイルス量との相関解析を行い，マンハッタンプロットに描出した（**Fig. 1**）。すべてのモデルにおいて，ゲノムワイド関連解析における有意水準（$p=1.449\times10^{-6}$）を満たしたSNPは存在しなかった。一方，１番染色体上の95,193,165（SNP ID：AX-168291905）に位置するSNP，および23番染色体上の25,642,674（SNP ID：AX-124375550），28,568,745（SNP ID：AX-185116447），30,773,701（SNP ID：AX-115113358）に位置する３つのSNPが，相加モデルにおいて，緩やかな有意水準（$p=1.0\times10^{5}$）を満たした（**Fig. 1a**）。また，AX-168291905は，優性モデルにおいても緩やかな有意水準を満たした（**Fig. 1b**）。なお，劣性モデルでは緩やかな有意水準を

© The Ito Foundation

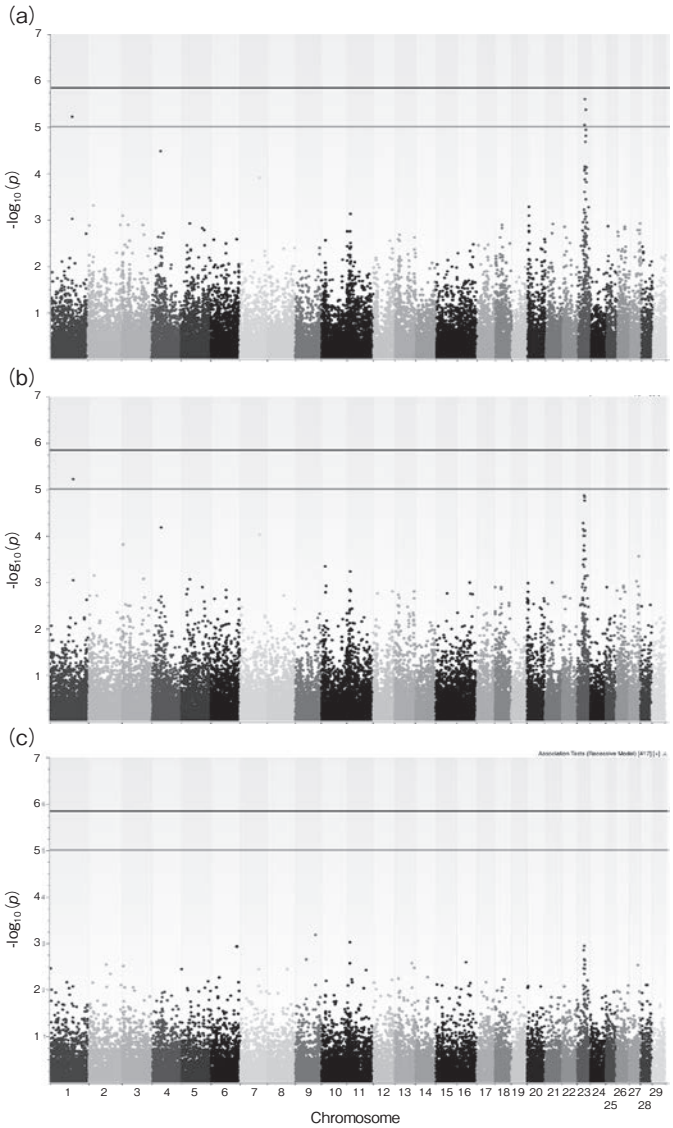


Fig. 1　Manhattan plot of a genome-wide association study on bovine leukemia virus proviral load in 288 cattle.
Manhattan plots of additive, dominant and recessive models are depicted. The number of chromosomes and the negative logarithm of the association *p* values are displayed along the *x*-axis and *y*-axis, respectively. *p* value was calculated by Fisher's exact test, and the bold and thin lines indicated the *p* value of 1.449×10^{-6} and 1.0×10^{-5}, respectively.

満たすSNPは存在しなかった（**Fig. 1c**）。AX-168291905はウシのspermatogenesis associated protein 16（SPATA16, Chr1；94,965,198-95,364,350）をコードする遺伝子のイントロンに位置する。また，近傍にglutathione peroxidase 6（GPX6, Chr1；95,159,026-95,166,199）およびzinc finger and SCAN domain containing 23（ZSCAN23, Chr1；95,203,732-95,206,770）をコードするため，このSNPがこれらの遺伝子発現などに影響している可能性がある。

© The Ito Foundation

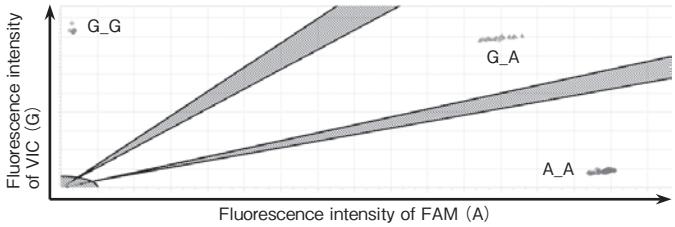


Fig. 2　Allelic discrimination plots by rhAmp SNP genotyping assays.
Allelic discrimination plots for the target SNP（Chr1：95,193,165）were obtained using rhAmp SNP genotyping assays on 95 samples. The dots located near the *y*-axis and *x*-axis represent the homozygous genotypes（*y*-axis：G_G, *x*-axis: A_A）and the dots located far from the *y*- and *x*-axis represent the heterozygous genotypes（A_G）.

SNPアレイの結果，AX-168291905において，マイナーアレルであるGを持つウシは，メジャーアレルであるAを持つウシに比べて，低リスク群が多いことが示された。しかし，SNPアレイでは数万を超えるSNPを解析するため，そのうちの1つが偶然に有意水準を満たすこともある。そこで，さらに検体数を増やして，プロウイルス量との関連性について検討する必要があった。本研究では，AX-168291905におけるアレルを簡便に検出する方法としてrhAmp SNPジェノタイピングの確立を試みた。この方法により，1ランのリアルタイムPCRで，95検体のAX－168291905におけるアレル（A_A, A_G, G_G）を簡便に区別することが可能となった（**Fig. 2**）。そこで，プロウイルス量を測定済みのウシのゲノム1,425検体（黒毛和種1,342検体，ホルスタイン種83検体）のAX-168291905におけるアレルを決定し，プロウイルス量とアレルとの相関解析を行った。その結果，A_Aを持つ感染牛768頭のプロウイルス量の平均値（中央値）は1,796 copies/50 ng（1,289 copies/50 ng），A_Gを持つ感染牛555頭のプロウイルス量の平均値（中央値）は1,398 copies/50 ng（876 copies/50 ng），G_Gを持つ感染牛102頭のプロウイルス量の平均値（中央値）は1,053 copies/50 ng（557 copies/50 ng）であった（**Fig. 3**）。統計解析の結果，A_AとA_GおよびA_AとG_Gの間で有意な差が認められた。以上から，1番染色体上の95,193,165番に位置するSNP（ID：AX-168291905）において，マイナーアレルGを持つウシは，メジャーアレルAを持つウシに比べて有意にBLVのプロウイルス量が低くなることが明らかとなった。

4．要　　約

牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）の感染を主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。日本では約35％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な手法で抑えるアプローチが有効かもしれない。牛の23番染色体に位置するBoLA class Ⅱの多型領域は，個体により大きく異なり，それがセットポイント期のプロウイルス量に寄与する。多くの研究者がこの部位の解析に取り組んでいる一方で，23番染色体以外にもプロウイルス量に寄与する遺伝子があるのかはまったく不明であった。そこで，ゲノムワイド関連解析からBLVのプロウイルス量に関与する遺伝子があるのかを

© The Ito Foundation

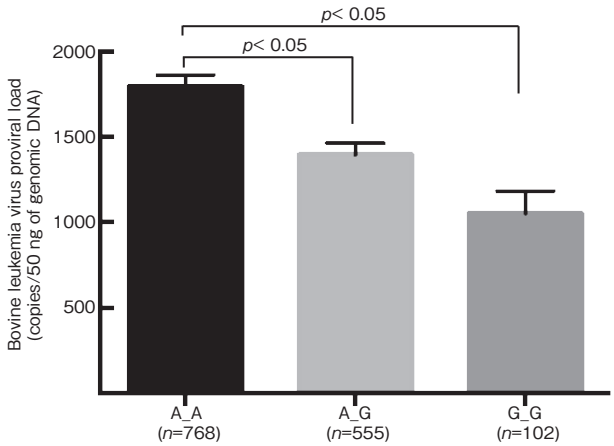


Fig. 3　Comparison of bovine leukemia virus proviral load among cattle with homozygous and heterozygous genotypes in the target SNP.
Bovine leukemia virus proviral loads were compared among cattle with A_A, A_G, and G_G alleles in the target SNP（Chr1；95,193,165）. Mean（median）values of proviral loads were 1,796 copies/50 ng（1,289 copies/50 ng）in the A_A allele, 1398 copies/50 ng（876 copies/50 ng）in the A_G allele, and 1053 copies/50 ng（557 copies/50 ng）in the G_G allele.

明らかにすることを本研究の目的とした。本研究の結果，１番染色体上の１つのSNP（ID：AX-168291905）がプロウイルス量に影響を与えることが明らかとなった。AX-168291905は１番染色体上95,193,165bpに位置し，SPATA16遺伝子をコードする領域に位置する。今後は，このSNPと連動する遺伝子を見つけ出し，その遺伝子の多型や発現量がプロウイルス量と相関するのかを解明したい。

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）　Mekata, H., *et al.*：*Vet. Sci.*, **27**, 255, 2021.
5）　Lo, CW. *et al.*：*Viruses*, **12**, 352, 2020.
6）　Hayashi, T., *et al.*：*J. Vet. Med. Sci.*, **79**, 1552～1555, 2017.
7）　Takeshima, S.-N., *et al.*：*Arch. Virol.*, **160**, 1325～1332, 2015.

© The Ito Foundation

牛の腸アミロイド症の根絶を目的とした AAアミロイド症原因遺伝子の同定

Identification of causative gene of AA amyloidosis for eradicating intestinal amyloidosis in cattle

上 家 潤 一
（麻布大学獣医学部）

Junichi Kamiie
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

This study revealed that the deposited amyloid in the organs contained both of wild-type and mutant SAA in bovine AA amyloidosis by mass spectrometry. Since mutant SAA has been detected in the deposited amyloid in all of 33 cases, the involvement of mutant SAA in the formation of amyloid genesis was considered important in the pathogenesis of AA amyloidosis.

Although the gene encoding mutant SAA was not detected by real time PCR, digital PCR could detect the mutant SAA gene in the liver of all cases affected with amyloidosis at a frequency of 0.25%. This low mutation rates suggest that the mutation of SAA gene were caused by somatic mutation in the liver. Those findings indicate a pathogenesis of AA amyloidosis triggered by mutant SAA generated in hepatocytes. To prove this novel pathogenesis of AA amyloidosis, it is necessary to exhibit the high amyloidogenicity of mutant SAA. Unfortunately, we could not show the amyloidogenicity of mutant SAA in this study. We would like to try amyloid fibrils formation assay in the further study using recombinant SAA created in this study.

1．目　　的

本研究の目的は，牛の難治性下痢の要因である腸アミロイド症の根絶のために，AAアミロイド症の原因遺伝子を明らかにすることである。Amyloid A（AA）アミロイド症はSerum amyloid A protein（SAA）を前駆タンパク質とする線維状のAAアミロイドが全身諸臓器に沈着する疾患である。特に腸粘膜にAAアミロイド症が沈着する腸アミロイド症は，牛の難治性下痢の主要な原因の一つであり，生産性への影響が大きい。根本的な治療法はなく，治療は対症療法に限られている。AAアミロイド症は哺乳類，鳥類に共通して発生する疾患であるが，発生頻度には著しい動物種差が存在する。牛では頻発する疾患であるが，豚では非常にまれである。現在のAAアミロイド症の発生機序は，炎症刺激により血中SAA上昇することが原因とされている。しかし，豚でも炎症時には血中SAAは上昇することが報告されており，SAA濃度上昇だけでは発生頻度の種差は説明できない。牛で高率にAAアミロイド症が発生する原因は，SAA濃度の上昇以外に

© The Ito Foundation

あると考えられる。牛の腸アミロイド症の予防・治療法の開発，疾患根絶のためには病理発生機序を解明し，真のリスクファクターを明らかにすることが重要であるが，詳細はいまだに不明である。

豚では変異型SAAがAAアミロイド症の病理発生に関与することが報告されている[1)]。本研究では，牛のAAアミロイド症における変異型SAAの証明とアミロイド線維形成への関与を明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2.1　病理組織学的解析

過去にAAアミロイド症と診断された牛33例の全身臓器について，HE染色，コンゴーレッド染色，SAAの免疫染色を実施し，AAアミロイドの沈着を確認した。

2.2　沈着SAA型の同定

申請者の開発したアミロイド抽出[2)]に従い，沈着臓器のパラフィン切片からDMSOを用いてアミロイドを抽出した。抽出物をトリプシン消化し，LC-MS/MS（Orbi-Trap, ThermoScientific）で測定した。検出はSelected reaction modeで行い，野生型SAAと，豚で検出された中央部のアラニンがバリンに変化した変異型SAAの変異部位を含む配列（**Fig. 1**）をペプチドの質量特異的に検出した。

2.3　SAA遺伝子ジェノタイピング

各症例の肝臓組織からDNAを抽出し，real time PCR（StepOne, Applide Biosystems）およびdigital PCR（Clarity, JN Medsys）を用いて野生型，変異型SAA遺伝子のジェノタイピングを行った。コントロールとして合成した野生型，変異型遺伝子を組込んだプラスミドを用いた。

2.4　変異型，野生型SAAのアミロイド線維形成性の比較

野生型と変異型SAAのHisタグラベルされた全長タンパク質を大腸菌発現にて作成した。リコンビナントSAAは，His精製し，SDSPAGEで発現を確認した。

2.5　リコンビナントタンパク質のアミロイド線維形成

作成した各リコンビナントSAAを10％酢酸溶液に１mg/mlの濃度で溶解し，37℃で１週間静置した。溶解液を蒸留水で100倍に希釈したものをコロイド膜グリッド上に滴下し，negative 染色（EMステイナー，日新EM）して透過型電子顕微鏡（JEM-1400，日本電子）により観察した。

3．結果と考察

3.1　病理組織学的解析

33例すべてにアミロイドの沈着を確認した。すべての症例で肝臓のディッセ腔，腎臓髄質の間質に均質無構造の好酸性物質の沈着を認めた。特に肝臓への沈着が高度であった。これらの沈着物はコンゴーレッド染色にて偏光顕微鏡下で緑色を呈し（**Fig. 2**），抗SAA抗体を用いた免疫染色に陽

Protein	Wild	GPGGAWAAK
	Mutant	GPGGVWAAK
Genome	Wild	GGACCTGGGGGCGCTTGGGCGGCCAAA
	Mutant	GGACCTGGGGGCGTTTGGGCGGCCAAA

Fig. 1　Protein and gene sequence of SAA. Boxes indicate mutation site.

© The Ito Foundation

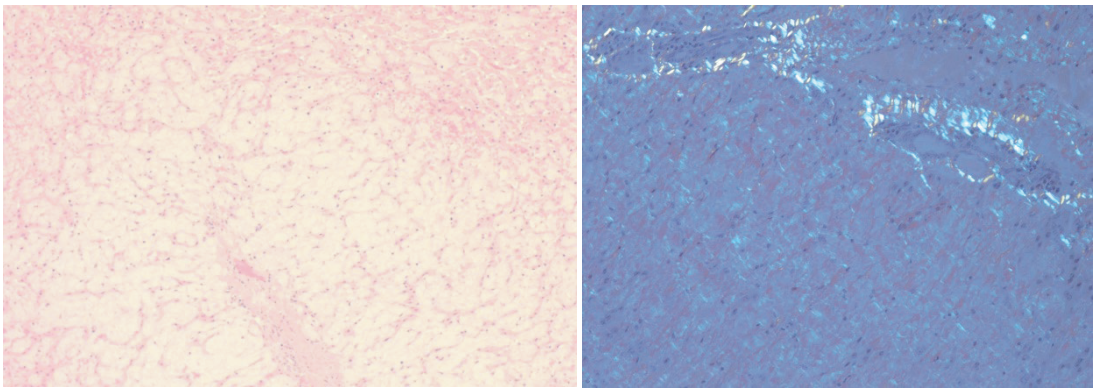


Fig. 2　Histological findings of bovine liver affected with AA amyloidosis. (Left) HE stain of the liver of a cow with Amyloidosis. Severe amyloid deposition in the disse space. (Right) Congo-red stain. Amyloid deposited has characteristic green birefringence under polarized light.

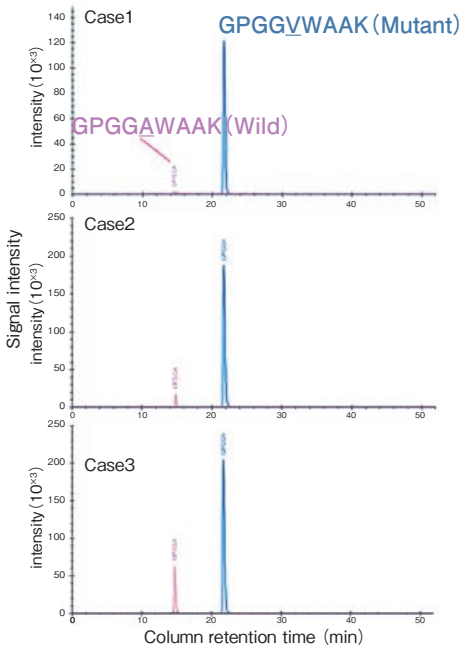


Fig. 3　SRM chromatogram of extracted amyloid from 3cases. Specific peptide derived from wild and mutant SAA were detected.

性を示した。

3.2　AAアミロイドを構成するSAA型

33症例について沈着AAアミロイドの質量分析を行ったところ，すべての症例で溶出時間15分に野生型，溶出時間22分に変異型SAAを検出し（**Fig. 3**），沈着AAアミロイドは野生型と変異型SAAの両タンパク質を含むことが明らかとなった。すべての症例で検出したことから，アミロイドの形成には野生型と変異型の両SAAが関与していることが示唆された。

3.3　SAA遺伝子のジェノタイピング

Real time PCRによるSAA遺伝子のジェノタイ

© The Ito Foundation

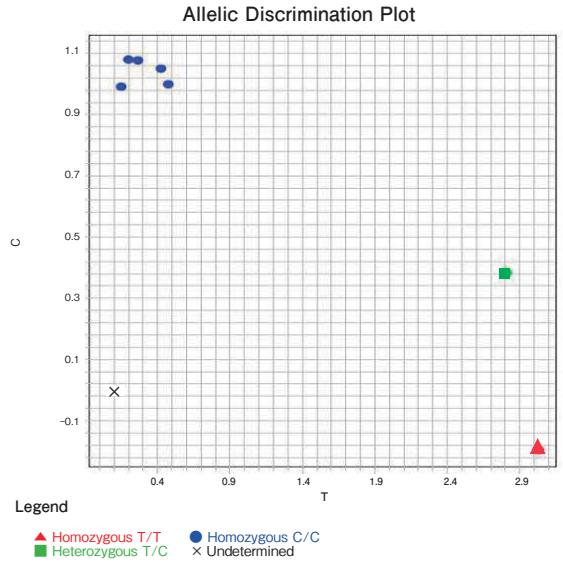


Fig. 4　Genotyping of SAA gene using real time PCR.

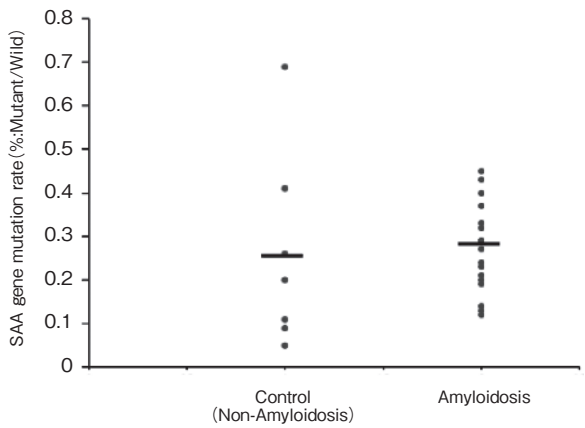


Fig. 5　SAA gene mutation rate. digital PCR could detect the mutant SAA gene in the liver of all cases affected with amyloidosis at a frequency of 0.25%.

ピングの結果，すべての症例は野生型SAA遺伝子のホモ個体であった（**Fig. 4**）。この結果は野生型と変異型の両SAAを検出した質量分析の結果と異なる。変異型SAAをコードする遺伝子はなぜ検出されないのか？　SAA遺伝子の変異がreal time PCRの検出限界以下の頻度で生じている可能性を考え，高感度なdigital PCRを用いてSAA遺伝子のジェノタイピングを実施したところ，肝臓において0.25％の低頻度で変異型SAA遺伝子を検出した（**Fig. 5**）。変異率の低さから，変異体は遺伝ではなく，生後に体細胞変異によって生じることが示唆される。SAAは主に肝臓で発現することから，肝細胞の体細胞変異によって生じた変異型SAA遺伝子が原因となり，炎症時に変異型SAAを発現させていると考えられる。

3.4　SAAのアミロイド線維形成

大腸菌を用いて野生型，変異型SAAを作成し，His精製により高純度タンパク質を得た。しかし，

© The Ito Foundation

今回のアミロイド線維形成試験では，両タンパク質からアミロイド線維の形成には成功していない。今後はタンパク質濃度，溶液のpH，塩濃度を検討し，線維形成の条件を確定する。

野生型と変異型SAAの線維形成性が確認できておらず，両SAAのアミロイド線維への直接的な関与は証明されていない。しかし，全症例で沈着アミロイドに両SAAが含まれていること，また，肝臓においてSAA遺伝子の変異を検出していることから，変異型SAAを起点とするAAアミロイド症の発生機序が示唆される。

4．要　約

本研究では，牛のAAアミロイド症において，臓器に沈着するアミロイド中には野生型SAAと変異型SAAが含まれていることが明らかになった。変異型SAAは33症例すべての症例の沈着アミロイド中に検出されていることから，従来のAAアミロイド症の発生機序として考えられていた血清SAAの上昇に加え，変異型SAAの関与がAAアミロイド形成に重要であると考えられる。

変異型SAAをコードする遺伝子はreal time PCRでは検出されず，digital PCRを用いることではじめて全症例の肝臓から0.25％の低頻度で検出された。この変異率の低さは，SAA遺伝子変異は体細胞変異によって生じることを示唆する。

上記の結果から，肝細胞で生じたSAA遺伝子の体細胞変異が引き金となるAAアミロイド症の新しい病理発生機序が示唆された。本機序の証明には変異型SAAのアミロイド原性の高さを証明する必要がある。今後の研究として，本研究で作成した野生型および変異型のリコンビナントSAAを用いたアミロイド線維形成実験を行い，各SAAのアミロイド原性を証明していきたい。

文　献

1）　Kamiie, J., Sugahara, G., Yoshimoto, S., Aihara, N., Mineshige, T., Uetsuka, K., Shirota, K.：*Vet Pathol*., **54**, 111～118, 2017.

2）　Kamiie, J., Aihara, N., Uchida, Y., Kobayashi, D., Yoshida, Y., Kuroda, T., Sakaue, M., Sugihara, Y., Rezeli, M., Marko-Varga, G.：*MethodsX*, **27**, 100770, 2020.

© The Ito Foundation

牛伝染性リンパ腫ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発

Development of a new therapeutic drug against bovine leukemia virus infection

岡　川　朋　弘
（北海道大学大学院獣医学研究院）

Tomohiro Okagawa
（Faculty of Veterinary Medicine, Hokkaido University）

Bovine leukemia is a malignant B-cell lymphoma in cattle and caused by infection of bovine leukemia virus（BLV）. Recently, BLV infection is widely spread in most farms throughout Japan. Accordingly, the number of cases of bovine leukemia in Japan has been increased 42-fold in 21 years, from 99 in 1998 to 4,197 in 2020. Bovine leukemia is the most common among the monitored infectious diseases of cattle and cause huge economic losses in livestock industry in Japan. Therefore, a new strategy is required to establish a novel control method for BLV infection. This study aims to develop a targeting antibody against a B-cell antigen as a molecular targeted drug to eliminate BLV-infected B cells and reduce viral load in cattle.

First, the nucleotide sequence of a B cell antigen “X” was determined, and an expression plasmid encoding antigen X was generated. The expression plasmid was immunized to rats, and hybridomas producing specific antibodies were established. The antibodies produced by the hybridomas were evaluated for their binding activities to antigen X-overexpressing cells and bovine B cell lines using flow cytometry. Finally, four clones of monoclonal antibodies（mAbs）that bind strongly to the overexpressing cells and bovine B cells were selected as candidates for antibody drugs. The mAbs established in this study are expected to be potential seeds of antibody drugs for EBL. Further studies are warranted to examine the cytotoxic activity of the mAbs against bovine B cells and establish therapeutic antibodies for the control of EBL.

1．目　　的

牛伝染性リンパ腫ウイルス（bovine leukemia virus；BLV）は，ウシのＢ細胞に持続感染し，Ｂ細胞性リンパ腫である地方病型牛伝染性リンパ腫（Enzootic bovine leukemia；EBL）を引き起こす。近年，日本国内の農場ではBLVの感染が拡大しており，2009～2011年の全国調査によると日本国内の肉牛の28.7％，乳牛の40.9％がBLVに感染している[1)]。BLVの蔓延に伴い，その感染に起因するEBLの発生も国内で急増している。農林水産省の統計によると，牛伝染性リンパ腫の発生数は1998年の99頭から2020年の4,197頭へと，22年間で42倍に増加している。牛伝染性リンパ腫は

© The Ito Foundation

家畜伝染病予防法により届出伝染病（監視伝染病）に指定され，腫瘍を発症した牛は淘汰（全廃棄）が義務付けられている。牛伝染性リンパ腫は，牛の監視伝染病の中で最も発生が多く，その経済的被害は大きい。

我々は，BLV感染症ならびにEBLに対する新規制御法の確立を目指して，ウシ用の分子標的薬の開発を進め，ウシの免疫抑制因子PD-1およびPD-L1を標的とした抗体薬を樹立した[2,3]。BLV感染牛における臨床試験において，抗PD-L1抗体はウイルス量の低い感染牛に対してはT細胞応答の活性化により抗ウイルス効果を発揮したが，ウイルス量の高い感染牛（ハイリスク牛）に対しては十分な免疫活性化効果がなく，抗ウイルス効果は限定的であった[3,4]。ハイリスク牛は，EBLの発症リスクが高いだけでなく，農場内で子牛やまわりの牛にウイルスを拡散するリスクも高い。さらに，ハイリスク牛は免疫抑制による日和見感染症を併発しやすく，枝肉重量や乳量も低下することから，農場経営に対する直接的な被害も大きい。そのため，農場におけるBLV対策を進めるうえでは，ハイリスク牛をいかに減らすかが重要になる。また，BLVは細胞に持続感染するとウイルスタンパク質やウイルス粒子をほとんど形成しない。そのため，BLVに対して有効なワクチンや抗ウイルス薬の開発は非常に難しいと考えられている。このような背景から，ハイリスク牛に対する新規制御法の確立には新たな戦略が求められる。

そこで，本研究課題ではハイリスク牛に対しても有効な新規制御法の確立を目指して，ウシのB細胞に対する分子標的薬（抗体薬）を開発する。B細胞はBLVが持続感染する細胞であり，BLV感染B細胞が腫瘍化するとEBLを発症する。そのため，B細胞を標的とする抗体薬は，ハイリスク牛においてBLV感染細胞を排除し，ウイルス量を低減させることで，EBLの発症リスクとBLVの感染拡大リスクを軽減できると期待される。

2．方　法

2.1　抗原X遺伝子の塩基配列同定および発現プラスミドの作製

ウシの末梢血単核球からTrizol Reagent（Thermo Fisher Scientific）を用いてRNAを抽出し，mRNAを鋳型にPrimeScript Reverse Transcriptase（Takara Bio）を用いて，cDNAを合成した。GenBankに登録された抗原X遺伝子に特異的なプライマーを設計し，合成したcDNAを鋳型にEx Taq Polymerase（Takara Bio）を用いて，X遺伝子のコーディング領域全長を増幅した。増幅産物をpMD20 vector（Takara Bio）に挿入し，E. coli HST08 Premium Competent Cell（Takara Bio）を用いてクローニングを行った。クローニングしたプラスミドをDTCS Quick Start Master Mix（Beckman Coulter）を用いて増幅し，GenomeLab GeXP Genetic Analysis System（SCIEX）を用いて塩基配列を決定した。さらに，X遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列について相同性解析を実施してXの細胞外領域を特定し，X遺伝子の細胞外領域を含む塩基配列をタンパク質発現用のプラスミドに導入した。

2.2　抗体産生細胞株（ハイブリドーマ）の樹立

ラットに抗原Xの発現プラスミドを接種した。抗体価の上昇を確認した後に追加免疫を行い，脾臓およびリンパ節からリンパ球を分離した。これらのリンパ球とマウスミエローマ細胞株について細胞融合を行い，抗体を産生するハイブリドーマ（ポリクローナルプール）を樹立した。これらのハイブリドーマが産生するポリクローナル抗体について，2.4に示す方法で抗体の結合活性を解析

© The Ito Foundation

し，強い結合活性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてクローニングを行い，シングルコロニーを分離した。

2.3　抗原Ｘ発現細胞の樹立

Expi293F 細胞株（Thermo Fisher Scientific）に対して，抗原Ｘの発現プラスミドをExpiFectamine 293 Transfection Kit （Thermo Fisher Scientific）を用いて導入し，抗原Ｘ発現細胞を樹立した。

2.4　フローサイトメトリーによる抗体の結合活性解析

上述のとおり取得したハイブリドーマ（ポリクローナルプールあるいはシングルコロニー）を液体培地で培養し，培養上清に含まれる抗体を回収した。まず，各抗体について，抗原Ｘ発現細胞に対する結合活性をフローサイトメトリーにより検証した。抗原Ｘ発現細胞を各抗体と25℃で20分間反応させた後に，APC標識抗ラットimmunoglobulin抗体（Southern Biotech）と25℃で20分間反応させ，蛍光標識を行った。そして，細胞の蛍光強度をフローサイトメーターFACSLyric（BD Bioscience）を用いて測定した。

次に各抗体について，ウシＢ細胞に対する結合活性をフローサイトメトリーにより検証した。ウシＢ細胞株としてKU-1細胞株を用いた。また，陰性対照の細胞として，ウシＴ細胞株であるBTL26細胞株を用いた。KU-1細胞株とBTL26細胞株を１：１で混合したものに対して，各抗体と25℃で20分間反応させた。さらに，これらの細胞をAPC標識抗ラットimmunoglobulin抗体（Southern Biotech）と25℃で20分間反応させ，蛍光標識を行った。そして，細胞の蛍光強度をフローサイトメーターFACSLyric（BD Bioscience）を用いて測定した。測定結果をFACSuite Software（BD Bioscience）で解析し，陰性対照と比較して細胞の蛍光強度が高い検体を陽性（抗体が結合した）と判断した。

３．結果と考察

本研究ではBLV感染牛に対する有効な新規制御法の確立を目指して，ウシのＢ細胞に対する分子標的薬となりうるモノクローナル抗体を開発した（**Fig. 1**）。

はじめに，標的となるＢ細胞抗原Ｘについて，遺伝子の塩基配列を決定した。Ｘ遺伝子のアミノ酸配列を解析したところ，Ｘは膜貫通領域を有しており，細胞膜表面に発現するタンパク質であることが確認された。

次に，抗原Ｘの発現プラスミドをラットに免疫し，Ｘに対するポリクローナル抗体を産生するハイブリドーマを384種類樹立した。そして，フローサイトメトリーを用いて，これらのポリクローナル抗体のうち，抗原Ｘに対して特異的な結合活性を有する抗体を選抜した。その結果，22種類のポリクローナル抗体が抗原Ｘ発現細胞に結合した（**Table 1**）。さらに，22種類のポリクローナル抗体のうち，５種類の抗体がウシＢ細胞株に対しても結合した（**Table 1**）。

そこで，５種類のハイブリドーマについてクローニングを行い，モノクローナルなハイブリドーマ480株を樹立した。これらのハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体480クローンについて，再度フローサイトメトリーによる選抜を実施した。その結果，24クローンのモノクローナル抗体が抗原Ｘ発現細胞に結合した（**Fig. 2**，**Table 1**）。さらに，24クローンのモノクローナル抗体のうち，21クローンの抗体がウシＢ細胞株に対しても結合した（**Fig. 3**，**Table 1**）。２つの解析結果を比較したところ，抗原Ｘ発現細胞に強く結合したモノクローナル抗体は，ウシＢ細胞株に対しても強く結合する傾向が認められた（**Fig. 2**，**3**）。また，ウシＢ細胞株に対して結合した抗

© The Ito Foundation

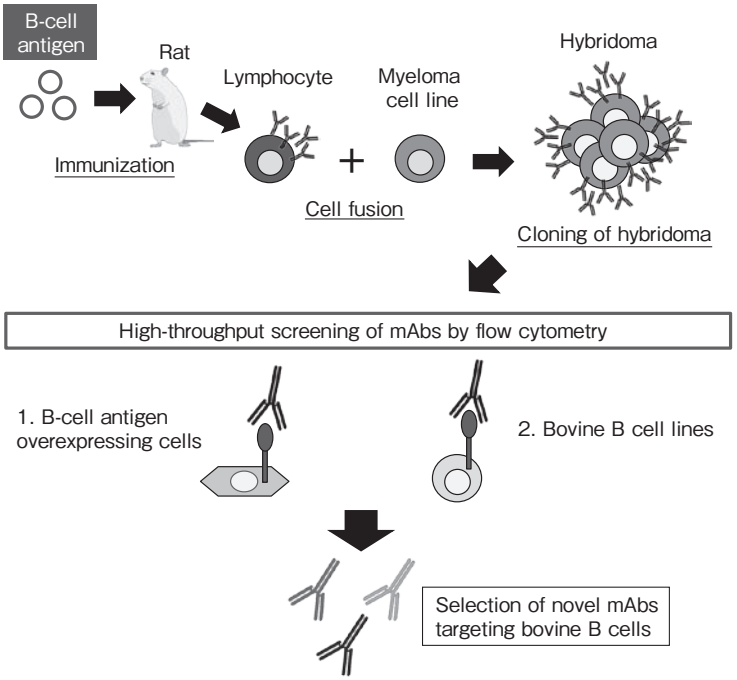


Fig. 1　Outline of the development of novel monoclonal antibodies (mAbs) against bovine B cells.
Plasmid encoding the B-cell antigen was immunized with rats. Hybridomas producing antibodies were established by cell fusion of immunized lymphocytes and myeloma cells. The mAbs produced from the cloned hybridomas were tested for their binding ability against B-cell antigen overexpressing cells and bovine B cell lines. Finally, mAbs with the high binding ability were selected as candidates of targeting mAbs against bovine B cells.

Table 1　Screening of antibodies against the B-cell antigen.
The numbers of the polyclonal and monoclonal antibodies were listed based on the results of the flow cytometric screening of their binding activities.

	No. of the tested antibody	No. of the antibody binding to		No. of the selected antibody
		Overexpressing cell	Bovine B cell	
Polyclonal antibody	384	22	5	5
Monoclonal antibody	480	24	21	4

体はいずれも，ウシT細胞株に対しては結合が認められなかった（**Fig. 3**）。これらの結果より，抗原Xへの結合活性を示したモノクローナル抗体のうち，特に強い結合活性を示した4クローンの抗体（mAb clone　#1～4）をウシのB細胞に対する標的抗体候補として決定した（**Fig. 2**，**3**）。

標的抗原XはウシのB細胞に恒常的に発現し，EBLの腫瘍細胞でも発現が認められる。以上のことから，本研究で樹立したモノクローナル抗体は，EBLのB細胞を標的とした分子標的薬のシーズとして有望であると期待される。今後はまず，本研究で樹立したモノクローナル抗体のB細胞に対する傷害活性を検討し，分子標的薬としての有用性をさらに検証したい。さらに，抗体の免疫原性を低減し，生体に投与した際の副作用を抑えるために，抗体の定常領域をウシ型に改変した治療用抗体の樹立を進めていきたい。

© The Ito Foundation

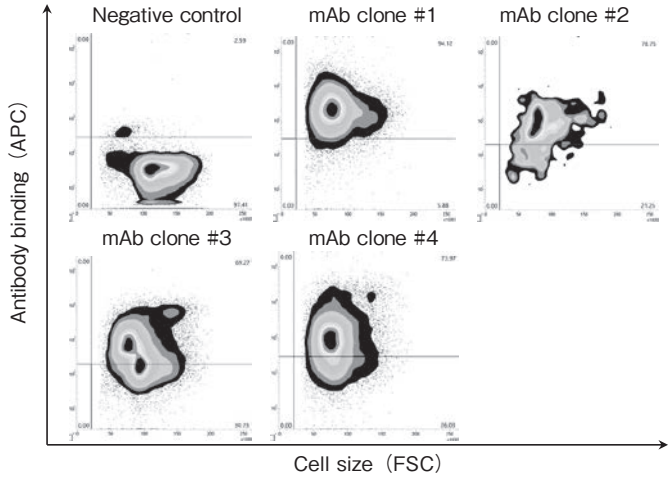


Fig. 2　Binding of the selected mAb clones to antigen X overexpressing cells.
Flow cytometric analysis of the binding of the mAb clones to antigen X overexpressing cells. The overexpressing Expi293F cells were stained with mAb clones and APC-conjugated secondary antibody. The cells stained with the secondary antibody only were used as a negative control. The horizontal axis shows forward scatter（FSC）which represents the cell size. The vertical axis shows fluorochrome intensity of APC which represents the binding intensity of the mAbs.

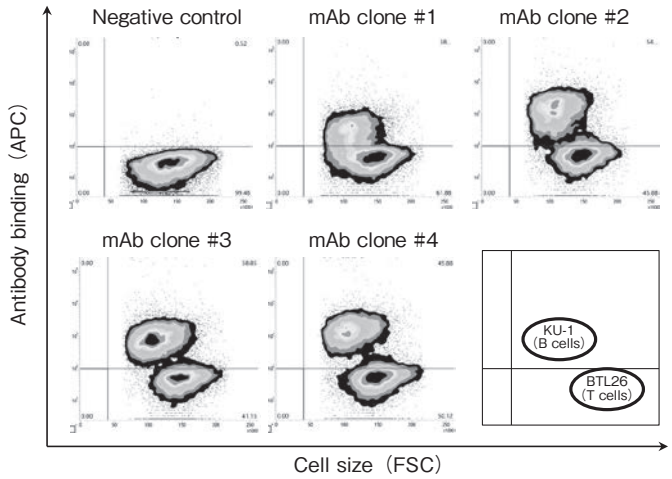


Fig. 3　Binding of the selected mAb clones to bovine B cells.
Flow cytometric analysis of the binding of the mAb clones to bovine B cells. The mixture of bovine B cells（KU-1）and T cells（BTL26）were stained with mAb clones and APC-conjugated secondary antibody. The cells stained with the secondary antibody only were used as a negative control. The horizontal axis shows forward scatter（FSC）which represents the cell size. The vertical axis shows fluorochrome intensity of APC which represents the binding intensity of the mAbs. KU-1 and BTL26 were can be distinguished on the plot according to the size of each cell.

4．要　　約

地方病型牛伝染性リンパ腫（EBL）は，牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）に感染に起因するＢ細胞性の腫瘍疾患である。近年，日本国内の農場ではBLV感染が蔓延しており，それに伴い国

© The Ito Foundation

内でのEBLの発生は急増している。牛伝染性リンパ腫は家畜伝染病予防法により届出伝染病（監視伝染病）に指定され，腫瘍を発症した牛は淘汰（全廃棄）が義務付けられている。牛伝染性リンパ腫は，牛の監視伝染病の中で最も発生が多く，その経済的被害は大きい。しかし，BLV感染牛に対して十分な抗ウイルス効果を発揮する治療薬やワクチンは存在しないため，新規制御法の確立が求められている。

そこで本研究では，本研究課題ではBLV感染牛に対する有効な新規制御法の確立を目指して，ウシのＢ細胞に対する分子標的薬（抗体薬）の開発を目的とした。まず，標的として有望なＢ細胞抗原Ｘについて，遺伝子の塩基配列を決定し，抗原Ｘの発現プラスミドを作成した。抗原Ｘの発現プラスミドをラットに免疫し，特異的抗体を産生するハイブリドーマを樹立した。次に，ハイブリドーマから産生された抗体について，フローサイトメトリーを用いて抗体の結合活性を評価したところ，抗原Ｘ発現細胞ならびにウシＢ細胞株に結合する抗体を確認した。その中から，抗原Ｘ発現細胞ならびにウシＢ細胞に強く結合するモノクローナル抗体を４クローン，抗体薬の候補として選抜した。本研究で樹立したモノクローナル抗体は，EBLのＢ細胞を標的とした分子標的薬のシーズとして有望であると期待される。今後はまず，本研究で樹立したモノクローナル抗体のＢ細胞に対する傷害活性を検討した上で，抗体の定常領域をウシ型に改変した治療用抗体の樹立を進めていきたい。

文　献

1） Murakami, K., *et al.*：*J. Vet. Med. Sci.*, **75**, 1123～1126, 2013.
2） Okagawa, T., *et al.*：*Front. Immunol.*, **8**, 650, 2017.
3） Nishimori, A., *et al.*：*PLOS One.*, **12**, e0174916, 2017.
4） Sajiki, Y., *et al.*：*J. Immunol.*, **203**, 1313～1324, 2019.

© The Ito Foundation

ルーメンアシドーシスに伴うエンドトキシン体内流入と肝機能障害を防除する技術の開発

Development of technology to control endotoxin influx and liver dysfunction associated with rumen acidosis

米　倉　真　一
（信州大学農学部）

Shinichi Yonekura
（Faculty of Agriculture, Shinshu University）

The endoplasmic reticulum stress is expected to be a factor in the loss of rumen epithelial barrier function and liver damage in subacute ruminal acidosis（SARA）. The author has previously found that dietary supplementation of 5-amino levulinic acid（5-ALA）to dairy cattle diets alleviates endoplasmic reticulum stress in the liver caused by fasting. The purpose of this study was to determine whether dietary supplementation of 5-ALA is effective in reducing endotoxin influx and liver damage caused by high-concentrate diet.

The results showed that 5-ALA had no effect on the decrease in rumen pH caused by high-concentrate diet, and contrary to expectations, LPS activity in the rumen juice was higher in the 5-ALA-diet group than in the high-concentrate-diet group. In addition, the expression of inflammation-related genes in liver tissue was examined. The mRNA expression of TRAF6, IL1 β and TNF α were significantly upregulated in the high-concentrate-diet compared to the control a, while no increase was observed in the liver of the 5-ALA-diet group. The results suggest that feeding 5-ALA reduces the inflammation in liver tissue caused by feeding high-concentrated diet.

These results indicate that dietary supplementation of 5-ALA is effective in the treatment of liver damage caused at least in part by high-concentrate diet.

1．目　　的

濃厚飼料多給に起因する亜急性ルーメンアシドーシス（Subacute ruminal acidosis：SARA）の発生が，乳牛および肉牛生産において大きな問題となっている。ルーメン液pHの低下によりルーメン上皮のバリア機能が損なわれ，ルーメン細菌が死滅することで発生したエンドトキシンが体内に流入すると考えられている。血液に流入したエンドトキシンは肝臓で解毒されるが，ルーメンアシドーシスが持続されると肝障害が発生し，そのことが代謝病の発症と関連していることが示唆されている[1)]。ルーメンアシドーシスの病態が臨床症状として顕在化する急性アシドーシスに比べ，SARAは臨床症状が潜在化しやすく，周産期におけるSARAは代謝病や繁殖障害の原因となることが示唆されている。SARAは経済性にも甚大な悪影響をもたらすため，SARAの診断・予防の重要

© The Ito Foundation

性が国内外で認識されているところである。

SARAの予防において，良好なルーメン環境を維持することは言うまでもないことであるが，エネルギー要求の高い泌乳初期や脂肪沈着を図る肥育後期には，穀物主体の飼養体系にならざるをえないのが現状である。よって，ルーメン上皮のバリア機能を強化することでエンドトキシンの体内侵入を防ぐことや，エンドトキシンによる肝機能障害を緩和することもSARAによる生産性低下を抑止する鍵となる。

これまでマウスを用いた研究より，pH低下は上皮細胞に対して小胞体ストレスを惹起し，バリア機能を損失させることが報告されている[2)]。また，エンドトキシンは肝細胞に対して小胞体ストレスを惹起し，その結果，肝障害が生じることも報告されている[3)]。すなわち，SARAにおけるルーメン上皮のバリア機能の損失や肝障害の要因も小胞体ストレスの発生が考えられるため，SARAによって惹起されるルーメン上皮および肝臓での小胞体ストレスを抑制する技術が有効であると考えた。

著者はこれまで，ウシの培養細胞を用いた研究から5-Amino Levulinic Acid（5-ALA）に小胞体ストレスを緩和する効果を有していることを明らかにしている[4,5)]。さらに，乳牛の飼料に5-ALAを添加することで，絶食によって発生する肝臓の小胞体ストレスが緩和することも見出した。すなわち5-ALAを飼料に添加することによって，SARAによって惹起されるルーメン上皮および肝臓での小胞体ストレスを抑制できることが期待される。

よって本研究では，5-ALAの給与が，濃厚飼料多給に起因するエンドトキシンの体内流入や肝障害に及ぼす影響を明らかにすることを目的に検討した。

2．方　法

2.1　供試牛および給与方法

健康な乾乳期のホルスタイン種経産牛３頭（平均体重735kg）を用い，対照区，濃厚飼料多給区，5-ALA添加区（濃厚飼料多給）を配置し，3 x 3のラテン方格法による飼養試験を実施した。試験期間は３週間として，最初の14日間は粗飼料を多給し（１日当たり乾草９kg，市販の配合飼料３kgを給餌），その後，濃厚飼料多給（１日当たり乾草３kg，市販の配合飼料３kg，圧ペン大麦６kgを給餌）に切り替えて７日間の給餌試験を行った（対照区は粗飼料多給を継続）。5-ALA添加区は試験期間を通して5-ALA（100㎎／頭／日）を飼料へ添加給与した。供試牛はスタンチョンで飼育し，飲水は自由で，１日２回の給餌制限とした。試験期間終了より２週間，乾草を飽食させてから区を入れ替えた。動物実験は信州大学動物実験委員会の承認を受けて行った。

2.2　採材

第一胃液は飼料変換の当日と試験最終日に，ルミナー胃汁採取器（富士平工業，東京）を用いて経口的に採取した。採取後，ただちにコンパクトpHメータLAQUAtwin（堀場アドバンスドテクノ，京都）を用いて胃液のpHを測定した。またLPS測定用に，採取した胃液を速やかに２重ガーゼでろ過した後，遠心分離（遠心加速度12,000ｇ，30分，４℃）し，上清を－30℃で凍結保存した。

肝臓組織は生検（バードマグナム，メディコン，大阪）により飼料変換の当日と試験最終日の計２回採取した。

2.3　第一胃液のLPS活性値

Lipopolysaccharides（LPS）活性値はKinetic-QCL 192テスト（ロンザ，東京）を用いたカイネティック比色法により測定した。

© The Ito Foundation

2.4　肝臓組織の遺伝子発現解析

トータルRNA抽出にはTRIzolを使用した。TaKaRa PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser（Perfect Real Time）の手順に従い，cDNAを作成した。PCR反応試薬にはTaKaRa SYBR Premix ExTaq（Perfect Real Time）を用い，リアルタイムPCRを行った。GAPDHを内部標準として相対定量解析を行った。

3．結果と考察

3.1　5-ALA給与が第一胃液のLPS活性値に及ぼす影響

試験期間を通してすべての区において給与試料を完食し，飼料摂取量に区間の差がないことを確認している。まずは本試験の濃厚飼料多給による第一胃pHの影響を検討した。その結果，対照区に比べて濃厚飼料多給区の第一胃pHが有意に減少していることが明らかとなった（**Table 1**）。また，濃厚飼料多給区と5-ALA添加区の第一胃pHにおいて有意な変化が認められなかったことから，少なくとも5-ALAには濃厚飼料多給による第一胃pHの減少に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

続いて第一胃液のLPS活性値について検討を行った。その結果，対称区に比べて濃厚飼料多給区で有意に高い値を示し，また5-ALA添加区では濃厚飼料多給区よりも高い値であることが明らかとなった（**Table 1**）。この5-ALA添加区における第一胃液のLPS活性値が濃厚飼料多給区であるという結果は予想外のものであった。第一胃pHが両区で変わりがないことを考えると，エンドトキシン産生量に違いがないことが予想される。マウスの研究より，低pHによる胃腸管バリアの破綻に小胞体ストレスが起因していることが報告されている[6)]。よって小胞体ストレスを低減する効果のある5-ALAがルーメンバリアを保護し，体内に流入したエンドトキシン量が濃厚飼料多給区より減少した結果，5-ALA添加区における第一胃液のLPS活性値が高かったことも考えられる。一方，5-ALAがルーメン細菌叢に影響を及ぼした結果であることも排除できない。よって，ルーメンバリア，ルーメン細菌叢に着目した詳細な検討が必要であると考える。

3.2　5-ALA給与が肝臓の炎症関連遺伝子発現に及ぼす影響

肝臓の炎症性関連遺伝子発現の解析を行った（**Table 2**）。その結果，濃厚飼料多給区の肝臓におけるTRAF6，p38，ERK，IL1β，TNFα遺伝子発現量が対照区に比べて有意に上昇していることが明らかとなった。また，これら遺伝子の中でTRAF6，IL1β，TNFα遺伝子については5-ALA添加区の肝臓において発現上昇が認められなかった。TLR4，TRIF遺伝子については，区間で有意な変化は認められなかった。これら結果より，濃厚飼料多給により肝臓組織の炎症が上昇しているが，5-ALAを給与することで炎症が軽減していることが考えられた。著者は，これまで5-ALA給与により絶食によって発生する肝臓の小胞体ストレスが緩和することを明らかにしている。よって，5-ALAが直接的に肝臓に作用し

Table 1.　Rumen pH and LPS activity

		Acidosis challenge	
	Control	—	5-ALA
Ruminal pH	^{a}7.14	^{b}6.15	^{b}6.24
LPS concentration in the rumen liquid（EU/mL）	^{a}3,644	^{b}22,150	^{c}45,339

a,b,c　Means in the same line with different superscripts differ（$p<0.05$）

© The Ito Foundation

Table 2　Relative mRNA abundance of inflammation-related genes in the liver of cows.

Gene		Acidosis challenge	
	Control	—	5-ALA
TLR4	1.00	1.10	1.05
TRIF	1.00	1.05	1.08
TRAF6	[a]1.00	[b]1.40	[a]1.15
p38	[a]1.00	[b]2.13	[b]1.95
ERK	[a]1.00	[b]1.52	[b]1.42
IL1β	[a]1.00	[b]1.70	[ab]1.40
TNFα	[a]1.00	[b]2.50	[ab]1.80

a,b　Means in the same line with different superscripts differ（$p<0.05$）

[1] Presented mRNA abundance is expressed relative to mRNA abundances of Control group

て炎症を低減していることが考えられる。一方，先ほども言及したが，5-ALAがルーメンバリアを保護し，体内に流入したエンドトキシン量が濃厚飼料多給区より減少したことにより，炎症の発生が抑えられた可能性もある。今後，5-ALAの作用機序に関するさらなる検討が必要である。

4．要　約

SARAにおけるルーメン上皮のバリア機能の損失や肝障害の要因に小胞体ストレスの発生が予想される。著者はこれまで，乳牛の飼料に5-ALAを添加することで，絶食によって発生する肝臓の小胞体ストレスが緩和することを見出している。よって，本研究では5-ALAの給与が，濃厚飼料多給に起因するエンドトキシンの体内流入や肝障害の低減に効果を有するのか明らかにすることを目的に検討した。その結果，5-ALAには濃厚飼料多給による第一胃pHの減少に影響を及ぼさないこと，予想に反して第一胃液のLPS活性値は，濃厚飼料多給区よりも5-ALA添加区において高い値であることが明らかとなった

また，肝臓組織における炎症関連遺伝子発現を検討した結果，濃厚飼料多給区のTRAF6，IL1β，TNFα遺伝子発現量が対照区に比べて有意に上昇している一方，5-ALA添加区の肝臓において発現上昇が認められなかった。よって5-ALA給与により，濃厚飼料多給に起因する肝臓組織の炎症が軽減することが示唆された。

本研究結果より，少なくとも濃厚飼料多給に起因する肝障害に対して5-ALA給与が有効であることが明らかとなった。一方，その低減の機序は不明である。今後，ルーメンバリア，ルーメン細菌叢に着目した詳細な検討をすることで，5-ALAが第一胃機能に及ぼす影響を明らかにしていく予定である。

文　献

1）　Guo, J., Chang, G., Zhang, K., Xu, L., Jin, D., Bilal, M. S., Shen, X.：*Oncotarget*, **8**, 46769～46780, 2017.

2）　Maeyashiki, C., Melhem, H., Hering, L., Baebler, K., Cosin-Roger, J., Schefer, F., Weder, B., Hausmann, M., Scharl, M., Rogler, G., de Vallière, C., Ruiz, P. A.：*Scientific Reports*, **10**, 1438, 2020.

3）　Wang, J., Dong, R., Zheng, S.：*Molecular Medicine Reports*, **19**, 3～14, 2019.

4）　Sharmin, M. M., Islam, M. A., Yamamoto, I., Taniguchi, S., Yonekura, S.：*Molecules*, **26**, 1183, 2021.

5）　Islam, M. A., Noguchi, Y., Taniguchi, S., Yonekura, S.：*Animal Bioscience*, **34**, 1006～1013, 2021.

6）　Eugene, S. P., Reddy, V. S., Trinath, J.：*Frontiers in Immunology*, **11**, 543022, 2020.

© The Ito Foundation

母体の乳生産性向上による効率的な肥育を目指す基礎的研究

Efficient fattening by improving maternal milk production

津　上　優　作
（広島大学大学院統合生命科学研究科）

Yusaku Tsugami
（Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University）

Improving maternal milk production contributes to the growth of suckling offspring. In contrast, mastitis causes decrease in the milk yield and quality. In mammary glands, formation of less-permeable tight junctions (TJs) and production of antimicrobial components are important for preventing mastitis. This study investigated the effect of resveratrol on TJs and antimicrobial components using mammary epithelial cells (MECs) and udders of lactating goats. For in vitro experiments, MECs were cultured and treated with resveratrol depending on concentrations or days. For in vivo experiments, 1 mL of 100 μM resveratrol in 70% ethanol was topical applicated to goat udders for 7 days. The results showed that MECs treated with resveratrol at 10 μM for 3 days increased the amount of claudin-3, which is a main component of less-permeable TJs during lactation. Moreover, by measuring transepithelial resistance, it revealed that resveratrol enhances TJ barrier function. In addition, resveratrol promoted production of antimicrobial components, such as β-defensin-1 and S100A7. The topical application of resveratrol to udders decreased somatic cell counts and Na^+ concentration in milk after days 5-7, which means resveratrol enhanced in vivo TJ barrier function. Moreover, resveratrol increased concentrations of β-defensin-1 and S100A7 in milk after day 3 and day 7, respectively. Resveratrol has been reported to exhibit an anti-oxidant activity. Reactive oxygen species (ROS) induced with milk component synthesis impairs viability and TJ barrier function in MECs. Thus, resveratrol may ameliorate the damage caused by ROS resulted in improvement of antimicrobial component production and TJ barrier function. Further study needs to investigate the effect to growth of suckling offspring. In conclusion, it revealed that topical application of resveratrol to udders enhances defense system in lactating mammary glands, which contributes to stable maternal milk production.

1．目　　的

肉牛や豚は，分娩直後から離乳前までは母体で産生される乳によるところが大きい。分娩前後の母豚へのアミノ酸給与による主要乳成分（乳タンパク質・乳脂肪・乳糖）の増加を介した乳生産性の改善は，子豚の日増体量を向上させることが報告されている[1)]。乳生産性を低下させる疾病として乳房炎があげられる。乳房炎は病原体が乳頭から侵入し，乳腺内で炎症を引き起こすことで発症

© The Ito Foundation

する。乳腺には，侵入した病原体に対抗するため，①抗菌因子産生による化学的バリア，②タイトジャンクション（TJ）形成による物理的バリアの乳腺防御機構が存在する。本研究では，乳腺防御機構を調節しうる因子としてレスベラトロールに着目した。レスベラトロールはブドウに多く含まれるポリフェノールであり，抗酸化作用を示すことが知られている。ポリフェノールは経口摂取した場合，生体内での代謝変換や抱合体形成により標的組織での生理活性が低減することが予想される。そこで，レスベラトロールの乳房塗布により経皮吸収を介して乳腺防御機構を調節できないかと考えた。以上より，本研究は，母体の乳生産性の向上による効率的な哺育，ひいては肥育成績の向上を目指すため，乳腺上皮細胞へのポリフェノール処理および乳房へのポリフェノール塗布が乳腺防御機構に及ぼす影響を調べた。

2．方　法

2.1　乳腺上皮細胞の培養

泌乳期トカラヤギから乳腺を採材し，PBSで洗浄後，メスを用いて細切した。続いて，1 mg/mlコラゲナーゼを含むDMEM/F12培地中で３時間振盪した。その後，トリプシン処理と密度勾配遠心を２回行い，乳腺上皮細胞塊を単離して使用時まで凍結保存した。

乳腺上皮細胞塊を解凍後，24ウェルプレートもしくはコラーゲンゲル（cellmatrix type 1A，新田ゼラチン）を被覆したセルカルチャーインサート上に播種し，増殖培地（５％ウシ胎子血清，5 μg/ml ITS-X，10 ng/ml上皮成長因子，5 mM酢酸ナトリウムを含むDMEM/F12）でコンフルエントになるまで培養した。続いて，分化培地（１％ウシ胎子血清，5 μg/ml ITS-X，1 ng/ml上皮成長因子，5 mM酢酸ナトリウム，1 μg/mlプロラクチン，1 μMデキサメタゾンを含むDMEM/F12）に変更し，２日間培養した。その後，レスベラトロール（東京化成工業）を添加し，その影響を調べた。なお分化培地以降，インサートを用いた場合には上層にHBSSを添加した。溶媒コントロールとして0.1% DMSOを使用した。経上皮電気抵抗値はMillicell-ERS-2を用いて測定した。

2.2　乳房への塗布試験

泌乳期トカラヤギ乳房へ100 μMレスベラトロールを含む70%エタノールを1 ml搾乳後に７日間塗布した。反対側の乳房には溶媒コントロールとして0.2% DMSOを含む70%エタノールを塗布した。採取した乳汁は，Countess II FL Automated Cell Counter（Thermo Fisher Scientific）を用いた乳中体細胞数（SCC）の測定やLAQUAtwin Na-11（HORIBA）を用いたNa^+濃度の測定，ELISAによる各抗菌因子濃度の測定に供試した。

2.3　ウェスタンブロッティング

レスベラトロール処理した乳腺上皮細胞層を供試した。SDS-PAGE後，PVDF膜に転写した。ブロッキング溶液として４％スキムミルク／PBS-T溶液を使用した。一次抗体には，抗claudin-3抗体，（Thermo Fisher Scientific）および抗α-tubulin抗体（GeneTex）を使用した。二次抗体は，Bio-Radから購入したHorseradish peroxidase標識した抗ウサギあるいは抗マウスIgG抗体（×2500-5000）を使用した。バンドの検出には，発光基質溶液であるImmobilon Forte Western HRP Substrate（Millipore）とEz-Capture II（ATTO）を用いた。

2.4　ELISA

競合ELISAによってβ-defensin-1，S100A7，lactoferrinを測定した。抗β-defensin-1抗体と抗S100A7抗体は合成ペプチドをウサギへ免疫して作製し，抗lactoferrin抗体はLife Laboratoryから購入した。ペプチドへのHorseradish

© The Ito Foundation

peroxidase標識はPeroxidase Labeling Kit-NH2もしくはKit-SH（Dojindo Laboratories）を用い，発色にはTMBを用いた。

2.5　定量PCR

セパゾールRNA I Super G（ナカライ）を用いてRNAを抽出し，ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover（東洋紡）を用いてcDNAを作製した。リアルタイムPCRはBrilliant III Ultra-Fast SYBR QRTPCR とAriaMx Real-Time PCR System （Agilent technologies）を用いて行った。

2.6　統計解析

数値データはn = 8以上の平均値とし，統計分析はスチューデントのt検定もしくはダネット検定を用い，$p<0.05$を有意とした。また，再現性を確かめるため，異なるヤギ由来による独立した培養実験を３回以上行い，塗布実験を９回行った。

なお，本研究における動物実験は，広島大学動物実験委員会の承認を得て行った（no. C21-20）。

３．結果と考察

泌乳期の乳腺TJはクローディン-３を主体に構成され，透過性の低い強固なバリア機能を示す。各濃度のレスベラトロールを３日間処理したところ，10 μM処理群においてクローディン-３量の有意な増加が確認された（**Fig. 1A**）。また，10 μM処理による経上皮電気抵抗値の経時的変化を調べたところ，処理３日後と４日後においてコントロール群より高い値を示していた（**Fig. 1B**）。以上より，レスベラトロールは乳腺上皮細胞のTJバリア機能を強化することが判明した。

乳腺上皮細胞ではβ-defensin-1，S100A7，lactoferrinなどの抗菌因子が産生・分泌されている。各濃度のレスベラトロールを３日間処理したところ，10 μM処理群において細胞内β-defensin-１濃度およびS100A７濃度が有意に増加し，１ μM処理群において細胞内lactoferrin濃度が有意に増加していた（**Fig. 2A**）。また，10 μMで３日間処理したところ，β-defensin-1と

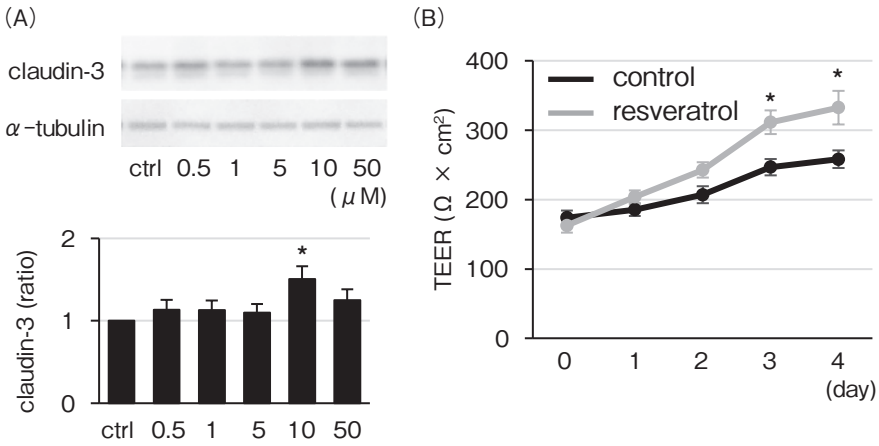


Fig. 1　The influence of resveratrol on tight junction barrier in goat mammary epithelial cells (GMECs). (A) GMECs were treated with resveratrol at each concentration for 3 days. The bands show claudin-3 and α-tubulin by western blot. The graph shows the result for the densitometry analysis of the bands for claudin-3. Alpha-tubulin was used as an internal control. (B) The graph shows the transepithelial electrical resistance (TEER) in GMECs treated with resveratrol at 10 μM for 4 days. The data are presented as the mean ± SEM (n=8-12). Asterisks show a significant difference ($p<0.05$ versus control).

© The Ito Foundation

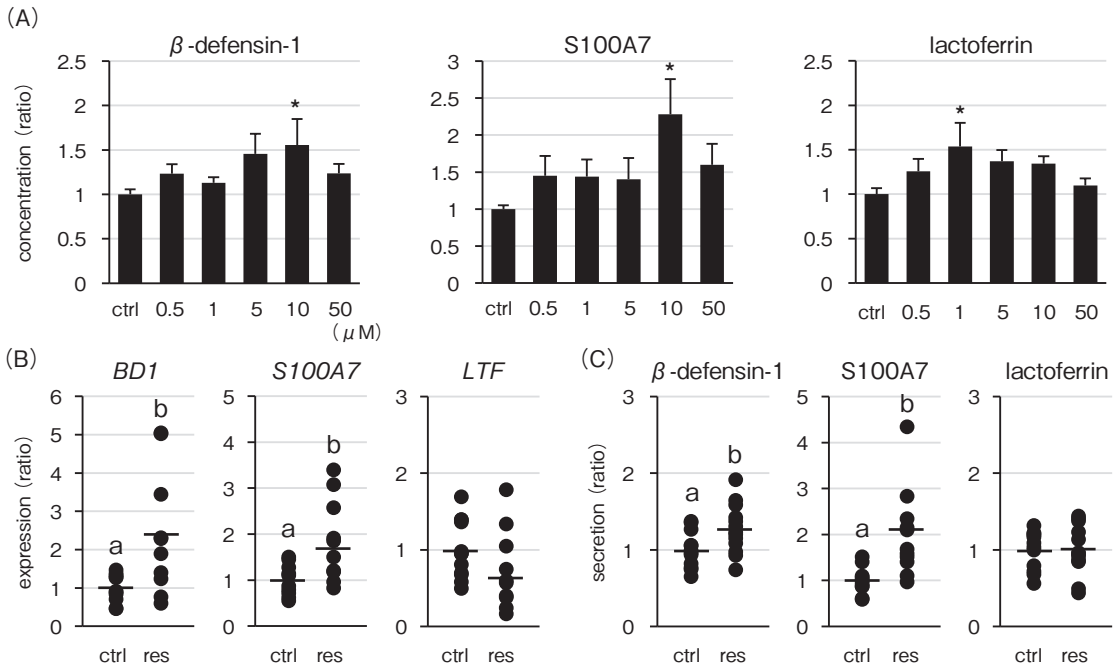


Fig. 2　The influence of resveratrol on antimicrobial component production in goat mammary epithelial cells (GMECs). (A) GMECs were treated with resveratrol at each concentration for 3 days. The graphs show intracellular concentration of β-defensin-1, S100A7, and lactoferrin detected using ELISA. (B, C) GMECs were treated with resveratrol (res) at 10 μM for 3 days. The graphs show mRNA expression of BD1 (β-defensin-1), S100A7, and LTF (lactoferrin) detected using qPCR (B) and each protein concentration in medium detected using ELISA (C). The data are presented as the mean ± SEM (n=8-12). Asterisks or different alphabetical letters show a significant difference (p<0.05 versus control).

S100A7のmRNA発現量が有意に増加し（**Fig. 2B**），インサート上層の培地中への分泌量も増加していた（**Fig. 2C**）。以上より，レスベラトロールは乳腺上皮細胞の抗菌因子産生を高めることが判明した。

乳房へのレスベラトロール塗布が及ぼす影響を調べた（**Fig. 3**）。乳量は塗布後，顕著な変化は観察されなかったが，SCCとNa^+濃度は塗布５，７日後において処理前より有意に低下していた。SCCとNa^+濃度はTJバリア機能の指標であり，バリア機能の強化に伴い，その値は低下する[2, 3]。また，乳中抗菌因子濃度は，β-defensin-1が塗布３日後，S100A７が塗布７日後に有意に増加していた。以上より，乳房へのレスベラトロール塗布によって乳腺のTJバリア機能と抗菌因子産生が高まることが判明した。

レスベラトロールは抗酸化作用を示すことが知られている[4]。泌乳期乳腺上皮細胞では活発な乳生産に伴い，多くの活性酸素種（ROS）が産生され，乳生産性を低下させると予想されている[5]。乳房へのレスベラトロール塗布は乳産生に伴い発生するROSの影響を緩和し，TJバリア機能や抗菌因子産生を調節したのかもしれない。乳腺のTJバリア機能と抗菌因子産生の向上は，母体の高品質で安定的な乳生産ならびに分娩直後の効率的な成長・増体に寄与すると考えられる。今後の実験では，分娩前後から乳房への塗布を行い，日増体量への効果を検証する必要がある。また，本研究では乳房へのポリフェノール塗布により乳腺機能を調節できることが実証された。さらなる検

© The Ito Foundation

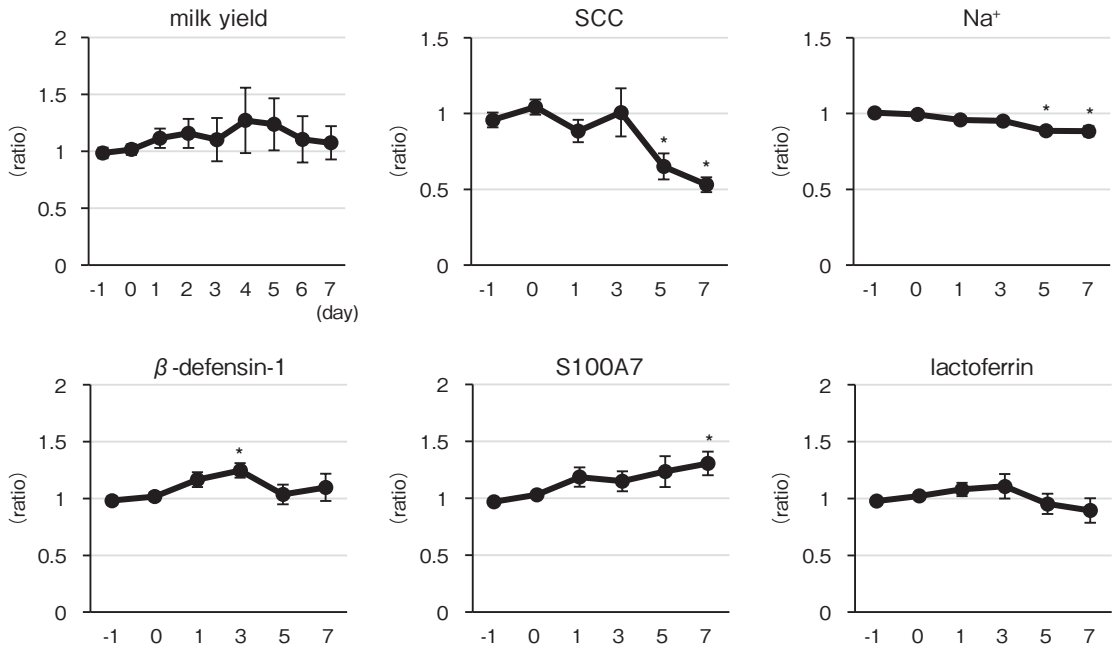


Fig. 3　The influence of topical application of resveratrol to lactating goat udders. One mL of 100 μM resveratrol in 70% ethanol containing 0.2% dimethyl sulfoxide was applicated to the udder of lactating goats on days 0–6 after milking. The data are presented as the mean ± SEM (n=9). Asterisks show a significant difference (p<0.05 versus pre-treatment).

証により，酪農を含めた畜産業界全体の発展に寄与することが期待される。

4．要　　約

本研究では，母体の乳生産向上による増体効率の改善を目指し，高品質で安定的な乳生産を維持するために必要な乳腺の感染防御機構の向上を乳房へのレスベラトロール塗布により試みた。まず，ヤギ乳腺上皮細胞の培養モデルを用いてレスベラトロールがタイトジャンクション（TJ）バリア機能と抗菌因子産生に及ぼす影響を調べた。その結果，レスベラトロール処理によって，泌乳期乳腺TJの主要タンパク質であるクローディン-3 量の増加とともに，TJバリア機能も向上することが証明された。また，抗菌因子であるβ-defensin-1とS100A７の産生と分泌も促進されることが判明した。さらに，生体レベルの実験として，100 μMレスベラトロールを含む70%エタノール1 mlを泌乳期ヤギ乳房へ７日間塗布した。その結果，塗布５日後には乳中体細胞数とNa^+濃度の低下が確認され，β-defensin-1とS100A7濃度の有意な増加も認められ，レスベラトロール塗布が生体レベルでも有効であることが証明された。以上より，乳房へのレスベラトロール塗布によりTJバリア機能と抗菌因子産生が向上し，乳腺の感染防御機構が強化されることが判明した。今後の実験では，分娩前後から乳房への塗布を行い，実際に仔の日増体量に効果があるかを検証する必要がある。

文　　献

1）　Kaiguo, G., Xiaolu, W., Chunyan, G., Li W., Wenjie, B., Xuefen, Y., Zhijun, W., Zongyong, J.：*Journal of Animal Science*, **98**, skaa261, 2020.
2）　Rupert, M. B., Daniel, W., Martin, W., Susanne, S.,

© The Ito Foundation

Georg, W.：*Journal of Dairy Research*, **71**, 316～321, 2004.
3） Michael, R. A., Stephen, C. N.：*Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **16**, 275～289, 2011.
4） Juliana, F. S., Viviane de, O. L., Peter, S., Josè C. C.-E., Denise, M.：*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 963217, 2013.
5） Xiaolu, J., Kai, W., Hongyun, L., Fuliang, H., Fengqi, Z., Jianxin, L.：*Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2572175, 2016.

© The Ito Foundation

日本短角種去勢牛の２シーズン放牧肥育における放牧管理改善による肉質向上

Effect of grazing management on meat quality in Japanese Shorthorn steers fattened under 2 season grazing system

上　田　宏一郎・呉　　成　真
（北海道大学大学院農学研究院）

Koichiro Ueda and Seongjin Oh
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

This study aimed to clarify the effect of difference in daily body weight gain during second grazing period of Japanese Shorthorn beef steers fattened under 2-season grazing system on their carcass performance and physico-chemical trait of meat. An increase in pasture area and herbage mass for a steer during the second grazing season improved average bodyweight gain of steers. The improved body weight was maintained during the fattening period for the steers allowed greater pasture area during grazing season. After fattening period, these steers produced carcasses with thicker rib and longissimus muscle with higher crude fat concentration and lower shear fore value compared to the steers with less body weight gain during the second grazing period. The results indicate that increased pasture allowance during the second grazing season could improve the quality of carcass meat from Japanese Shorthorn steers fattened under 2-season grazing system.

１．目　　的

日本短角種の肉は，黒毛和種と比べると脂肪交雑は低く市場価値は高くはない。しかし，最近では消費者の健康志向等などにより国産赤身牛肉への関心が高まっている。一方で，肉牛生産者は年々減少しており，耕作放棄地が増えている。このような中，地域の自給飼料資源を有効に利用しつつ，消費者に安全で安心な国産牛肉を供給することはわが国の畜産業にとって重要な課題となっている。日本短角種は他の和牛に比べて高い粗飼料利用能力を有しており，伝統的に２シーズン放牧肥育システムによる肥育が行われてきた。この牛肉生産システムは上記の課題を解決するうえできわめて有効である。しかし，生産者が肥育牛の十分な増体を維持して市場価値の高い枝肉を生産しつつ，現在の消費者が嗜好する品質の牛肉とするには，この２シーズン放牧肥育システムには改善が必要である。

日本短角種の２シーズン放牧肥育において，１夏目の放牧時では子牛は自然哺乳で飼育され，日本短角種の母牛の泌乳量が多い特性のため子牛の増体は非常に良好な成績を示す。しかし，２夏目の放牧肥育期では通常は放牧草のみで飼育するため増体が停滞することが多い。とくに，放牧地の草量や栄養価が低下する夏季以降においては肥育

© The Ito Foundation

牛の増体は停滞してしまう。放牧後の冬季では，肉量と肉質の向上のため舎内において濃厚飼料を補給する仕上げ肥育を行う。しかしながら，既往の研究では放牧肥育期の日増体量が0.6kgより低くなると，仕上げ肥育を行っても期待される増体が得られないことが報告されている[1)]。

日本短角種去勢牛の２シーズン放牧を取り入れた肥育において，肉の「締まり」が悪いために低く格付けされる場合がある。竹中ら[2)]は，２シーズン放牧肥育による日本短角種去勢牛の枝肉格付けと放牧肥育時の増体との関係を検討し，放牧期間中の日増体量が低かった肥育牛は，仕上げ肥育後の枝肉の格付けが低くなる場合が多いことを明らかにした。

これらから，日本短角種２シーズン放牧肥育システムによる牛肉生産において，生産者と消費者が求める枝肉量と肉質を担保するためには，放牧肥育期の放牧管理等による増体速度の改善が必要不可欠であろう。しかし，放牧肥育期の増体速度が理化学的特性等の詳細な肉質に及ぼす影響は明らかではない。

本研究では，２シーズン放牧肥育システムの２夏目の放牧期において，放牧管理により操作した日本短角種去勢の増体速度の違いが，仕上げ肥育後の枝肉成績と肉の理化学的に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。あわせて，体重変化および血液中代謝物質への影響も検討した。

２．方　　法

本研究は北海道大学動物実験委員会の承認を受けて実施した（承認No. 20-0016）。

春生まれ日本短角種去勢牛14頭を用いた。これらの供試牛は以下のような２シーズン放牧肥育システムで飼養した。１夏目は５月初旬より母子放牧で飼育し，11月初旬の放牧期の終了とともに離乳し，その後の冬期間は舎内でイネ科乾草とコーンサイレージを給与して飼育した。再度，２夏目の放牧を５月初旬より放牧し，供試牛を６月下旬に７頭ずつの２群に分け，片方の群は放牧強度1.59頭／ha（Control区），もう一方の群は0.96頭／ha（Test区）となるように放牧地面積とその他の牛群を用いて調節し，それぞれ異なる放牧地において別群として11月初旬まで輪換放牧により飼育した。すなわち，Control区は春からの放牧強度と同一で一般的な方法であるのに対し，Test区では夏以降の草量と草質が低下する時期に１頭あたり草量を増やす処理であった。放牧終了後は，舎内でイネ科乾草，コーンサイレージ，ふすま，大麦を増体にあわせて調節しつつ給与して仕上げ肥育を行い，体重700kg以上を目標として26～30カ月齢で出荷した。出荷は全頭同時には不可能であったため，Control区とTest区の１頭ずつをペアにして，同時期に２頭ずつ体重の大きいペアから順に出荷した。

供試牛全頭について，２夏目放牧期以降から出荷まで２～３週間おきに体重および体格（体高，胸囲，腹囲）を測定した。毎回の体重測定と同時に頚静脈より血液サンプルを採取した。出荷後，と畜場で行われる枝肉評価のデータを得た。と畜７日後に枝肉を解体し，第６-７肋骨断面胸最長筋と大腿２頭筋を５cm厚でサンプル肉を採取した。

血液サンプルは遠心分離により血漿を分離後，血漿中の尿素態窒素，クレアチニン，遊離脂肪酸，グルコース，コレステロール，リン脂質の濃度を，分析キットを用いて測定した。肉サンプル採取後，ただちにpH，肉色，加熱損失およびせん断力価の測定を行った。加熱損失については，ビニール袋に入れた肉塊を70℃のウォータバースに１時間浸漬し，水分を取り除いた後の重量減少から測定した。せん断力価はこの加温後の肉塊を用いてレオメーターにより測定した。肉サンプルの

© The Ito Foundation

一部は採取後にミンチ肉とし化学成分分析のために保存し，水分，粗脂肪，粗タンパク質の分析を行った。

各測定値はJMP Pro 15ソフトウェアを用いて，去勢牛を変量効果，処理を固定効果とする混合モデルにより放牧処理による効果を検定した。血液成分については，放牧処理期および舎飼肥育期のそれぞれについて去勢牛ごとの反復測定はAR（1）モデルを指定して解析した。解析された処理間の差は，$p<0.05$を有意とし，$p<0.1$を傾向とした。

３．結果と考察

放牧処理直前，舎飼肥育直前，および出荷直前における去勢牛の体重と各体格値を**Table 1** に示した。放牧処理開始前の去勢牛の体重と各体格値には，処理間で差はなかった。舎飼肥育直前の去勢牛の体重は，Control区に比べTest区で有意に高い値を示した（$p<0.05$）。また，胸囲についても同様にControl区に比べTest区で有意に高い値を示した（$p<0.01$）。放牧処理期間中の去勢牛の平均日増体量は，Control区は0.44，Test区は0.71であり，Control区に比べTest区で有意に高い値を示した（$p<0.01$）。Control区よりもTest区では放牧処理期において１頭あたりの面積を大きくし１頭あたりに草量を多く割り当てられたことにより，放牧処理期における去勢牛の牧草の摂取量が多くなり日増体量が高まったと考えられる。出荷直前では，去勢牛の各体格値にはControl区とTest区の間に差はなかったが，体重はControl区に比べTest区で有意に高い値を示した（$p<0.05$）。したがって，放牧処理によって生じたControl区とTest区の去勢牛の体重差は，舎飼肥育期間中も継続して維持され，舎飼開始時に低かったControl区の体重が肥育期間中にTest区と同等になるような代償的発育は認められなかった。

日本短角種の２シーズン放牧肥育において，小山ら[3]は１冬目舎飼期から２夏目放牧期終了まで

Table 1　Body weight and conformation trait of steers.

	Control	Test	p=
Immediately before grazing treatment			
Body weight（kg）	455	454	NS
Withers height（cm）	127	127	NS
Heart girth（cm）	177	176	NS
Abdominal girth（cm）	217	218	NS
Immediately before fattening period			
Body weight（kg）	507	540	*
Withers height（cm）	130	131	NS
Heart girth（cm）	184	190	**
Abdominal girth（cm）	230	233	NS
Immediately before shipment			
Body weight（kg）	735	759	*
Withers height（cm）	139	140	NS
Heart girth（cm）	220	224	NS
Abdominal girth（cm）	254	256	NS

NS：Not siginificant
**$p < 0.01$, *$p<0.05$

© The Ito Foundation

の増体は出荷までの全期間の増体と強い正の相関があることを見出した。また，梨木ら[4]は日本短角種去勢牛の２夏目放牧期の夏以降に採草兼用地を用いることで，夏から秋における増体を高め，良好な年間の日増体量が得られることを明らかにした。さらに，柴ら[1]は放牧時の増体を0.6以上にすることで最も出荷に至るまでの増体成績が良くなることを報告した。これらの先行研究の結果から，日本短角種の２シーズン放牧肥育における２夏目放牧時の放牧管理を改善することは，放牧時の増体のみならず仕上期の増体にも大きく影響することが示唆される。本研究においても，２夏目放牧時の１頭あたりの面積増加によって１頭あたりに割り当てる草量を増やす放牧管理の改善の結果，放牧終了時の体重が高まるだけでなく，出荷時の体重も高まることが示された。

放牧処理期間中および舎飼肥育期間中の去勢牛の血漿中代謝産物濃度の平均値を**Table２**に示した。放牧期間中においては，去勢牛のグルコース濃度はControl区に比べTest区で有意に高い値を示した（$p<0.05$）。また，リン脂質濃度もControl区に比べTest区で高い傾向を示した（$p<0.1$）。この結果は，放牧処理期において去勢牛の体重増加がControl区に比べTest区で有意に高い値を示したことを裏付けるものと考えられる。すなわち，放牧期間中においてControl区に比べTest区の割り当て面積と草量を多くしたことが牧草摂取量を高め，それによりControl区の去勢牛はTest区の去勢牛よりも多くのエネルギーを摂取していたこと，それにより日増体量も高まったことを示唆している。一方，肥育期間中においては，いずれの代謝産物濃度においても処理間で差は認められなかった。したがって，肥育期間中においては両区の去勢牛は同量の養分およびエネルギーを摂取していたものと考えられる。

と畜月齢，枝肉成績，および胸最長筋の理化学

Table 2　Metabolite concentration in blood of steers

	Control	Test	p=
During grazing treatment			
Glucose（mg/dL）	67.7	71.5	*
Urea nitrogen（mg/dL）	17.1	17.8	NS
Non-esterified fatty acid（μEq/dL）	246	222	NS
Total cholesterol（mg/dL）	129	138	NS
Creatinine（mg/dL）	1.13	1.18	NS
Triglyceride（mg/dL）	17.8	17.6	NS
Phospholipid（mg/dL）	127	142	†
During fattening period			
Glucose（mg/dL）	76.4	74.1	NS
Urea nitrogen（mg/dL）	10.8	11.7	NS
Non-esterified fatty acid（μEq/dL）	101	107	NS
Total cholesterol（mg/dL）	94.8	108	NS
Creatinine（mg/dL）	1.23	1.21	NS
Triglyceride（mg/dL）	13.2	13.4	NS
Phospholipid（mg/dL）	104	117	NS

NS：Not siginificant
*$p<0.05$, †$p<0.1$

© The Ito Foundation

Table 3　Carcass trait and physico-chemical trait of logissmus muscle of steers

	Control	Test	p=
Months of age at shipping	28.3	28.2	NS
Carcass trait			
Carcass weight（kg）	412	426	NS
Longissimus muscle area（cm^2）	43.7	46.3	NS
Rib thickness（cm）	6.3	6.8	*
Subcutaneous fat thickness（cm）	2.3	2.6	NS
Physico-chemical trait of longissimus muscle			
Water（%）	65.2	63.5	NS
Crude protein（%）	21.1	20.4	†
Crude fat（%）	10.0	12.9	†
Cooking loss（%）	27.2	25.9	*
Water retention capacity（%）	54.0	52.5	NS
pH	5.56	5.55	NS
Shear force value（g/cm^2）	3.51	3.28	†

NS：Not siginificant
*p<0.05, †p<0.1

的特性を**Table 3**に示した。出荷・と畜した去勢牛の平均月齢はControl区とTest区に差はなく，両区とも28カ月齢程度であった。枝肉重量，胸最長筋面積および皮下脂肪厚には，両区間に差はなかった。出荷時においてControl区に比べTest区の体重が有意に大きかったのに対し，枝肉重量には区間に差がなかったことは，Control区よりもTest区では出荷時の内蔵重量が多かったことを示唆するものである。バラ厚については，Control区に比べTest区で有意に大きい値を示した（$p<0.05$）。

胸最長筋の粗脂肪含量はControl区よりもTest区において高い傾向を示し（$p<0.1$），粗タンパク質含量についてはこれとは逆の結果であった（$p<0.1$）。この結果は，Control区に比べてTest区では胸最長筋に筋間脂肪が多く蓄積していることを示唆するものである。加熱損失およびせん断力価はともに，Control区よりもTest区において有意に低い（$p<0.05$）および低い傾向を示した（$p<0.1$）。Control区よりもTest区の胸最長筋には多くの脂肪が蓄積した結果，これに伴って加熱損失およびせん断力価も低くなったものと考えられる。したがって，２夏目放牧時の放牧管理の改善によって出荷時に体重が高まると，胸最長筋の肉は脂肪含量が高くせん断力価の低いものとなることが示唆された。

先行研究では，日本短角種去勢牛の２シーズン放牧を取り入れた肥育において，枝肉は「締まり」が悪いために低く格付けされる場合があり，このような低評価には２夏目の放牧期の増体停滞が影響している可能性が示唆されている。竹中ら[2)]は，２シーズン放牧肥育の日本短角種去勢牛の２夏目放牧時の増体成績と仕上げ肥育後の枝肉成績との関連を検討した。その結果，放牧開始２カ月までにおける増体の個体間変動は枝肉成績の違いと関連性は見られなかった。しかし，放牧開始２カ月以降における日増体が0.6kg以上の個体は枝肉の評価は多くが２等級であったが，0.6kg

© The Ito Foundation

を下回る個体ではロース芯面積と歩留基準値が低いため１等級となるものが多かった。したがって，本研究の結果を含めて考慮すると，２シーズン放牧肥育における２夏目放牧期の増体は，その仕上げ期の増体への影響を介して肉質に影響する可能性が高いと考えられた。

以上の結果から，日本短角種去勢牛の２シーズン放牧を取り入れた肥育において，２夏目放牧時の増体成績を改善すると，舎飼肥育後の枝肉のバラ厚を増加させ，胸最長筋の脂肪含量を高めると同時にせん断力価を下げることが示された。日本短角種去勢牛の２シーズン放牧を取り入れた肥育では，２夏目の放牧管理を改善することにより枝肉の肉質が向上する可能性がある。

４．要　約

２シーズン放牧肥育システムの２夏目の放牧期において，放牧管理により操作した日本短角種去勢の増体速度の違いが，仕上げ肥育後の枝肉成績と肉の理化学的に及ぼす影響を検討した。１頭あたりの割り当て面積の増加は，１頭あたりの割り当て草量の増加をもたらし，放牧中の去勢牛の増体量を高めた。放牧終了時における体重の差は舎飼肥育時においても維持され，出荷時において縮小することはなかった。さらに，放牧終了時において高体重であった去勢牛の肥育後の枝肉は，バラ厚が大きく，胸最長筋の脂肪含量が多く，せん断力価を低いことが示された。日本短角種去勢牛の２シーズン放牧を取り入れた肥育では，２夏目の放牧管理を改善することにより枝肉の肉質が向上する可能性がある。

文　献

１）　柴伸弥，樋口幹人，今成麻衣，米内美晴，東山雅一，渡邊彰：日本短角種去勢牛の２シーズン放牧肥育における放牧中の適正な増体量，東北農業研究センター研究報告，**117**，51～58，2015.

２）　竹中昭雄，澁谷幸憲，須山哲男，篠田満，近藤恒夫：日本短角種の放牧育成中の増体量が肉質に大きく影響する，東北農業研究成果情報，2001.

３）　小山錦也，嶽肇：放牧をとりいれた日本短角種（春産子）の肥育法の確立　第Ｉ報　冬期育成期と放牧期の飼養条件の差が放牧期，仕上げ期の増体，摂取量，産肉などに及ぼす影響，青森県畜産試験場報告，**13**，1～36，1981.

４）　梨木守，目黒良平，福田栄紀，須山哲男，太田顯：日本短角種の秋子と春子の冬期育成期及び放牧育成期の日増体量の比較，日本草地学会誌，**43**，489～491，1998.

© The Ito Foundation

夏季に調製した発酵混合飼料の泌乳牛における利用適正―窒素利用効率に基づく検証―

Seasonal effect on nitrogen utilization in lactating cows fed ensiled total mixed ration

近藤　誠[1]・関田　梨々花[1]・股村　真也[1]・永墓　訓明[2]・平岡　啓司[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 Kondo[1], Ririka Sekida[1], Masaya Matamura[1], Noriaki Nagahaka[2] and Hiroshi Hiraoka[2]
（[1]Graduate School of Bioresources, Mie University, [2]Mie prefectural Livestock Institute）

We determine the effect of season on nitrogen utilization in lactating dairy cow fed ensiled total mixed ration (TMR). The TMR ensiled in summer contained comparable organic matter, crude protein (CP), starch, soluble sugars, neutral detergent fiber contents with the TMR ensiled in spring. Soluble CP content in a CP basis in the TMR ensiled in summer was almost 50% that was higher than that in the TMR ensiled in spring. Lactic acid, acetic acid, ammonia-N were higher and pH was lower in the ensiled TMR in summer as compared to than in that in spring. Dry matter intake (DMI) by lactating cows in summer was significantly lower than those in spring. Milk yield was not significantly different between seasons; however, it was numerically lower in summer than in spring. Milk protein and solid non-fat contents were significantly lower in summer than in spring, but fat, lactose and urea-N contents were not significantly different between seasons. Nitrogen intake in lactating cows was lower in summer than in spring in according to DMI. Microbial N synthesis in rumen, urinary N output, fecal N output, milk N yield per day were significantly lower in summer than in spring, but retained N was not significantly different. Based on the amount of N intake, the ratio of rumen microbial N synthesis was significantly lower in summer, but those of N output in urine, feces and milk and retained N were not affected by the seasons. It was concluded that feeding ensiled TMR in summer may be paid attention to lower synthetic efficiency of microbial-N in rumen.

1．目　的

乳牛の飼養頭数が多い酪農家では，乳牛の栄養要求量を満たすように牧草類に穀物などを組み合わせた混合飼料を調製して給与する方法が行われている。この混合飼料は日持ちがしないため毎日調製する必要があり，今日の酪農家では労働の負担の一部となっている。近年，この混合飼料の調製を個々の酪農家に代わり企業や組合が行う事例が増えつつあり，特に貯蔵や流通させるためにサイレージ化した発酵混合飼料が一部の地域で使われている。

しかし発酵混合飼料では，トウモロコシや大豆などの穀物もサイレージとして発酵が進むため，

© The Ito Foundation

栄養成分の変化が起きる。先行研究では発酵により可溶性糖類が７～９割程度消費されることに加えて，粗タンパク質の一部が発酵により分解され，アンモニアや遊離アミノ酸などの溶解性画分が増加することが報告されている[1)]。特に夏季のような高温期では発酵が進むため，他の季節に調製された発酵混合飼料と比べて，粗タンパク質のうち溶解性画分の増加が著しい[1)]。つまり，常に同じ飼料原料や配合割合で混合飼料を設計していても，乳牛が採食する段階（発酵後）では，栄養素の組成が季節によって異なっていることが予想される。

乳牛が体内で利用するタンパク質の７割程度は，ルーメン内の微生物体タンパク質により供給されている[2)]。この微生物体タンパク質は飼料中の糖類などから得られるエネルギーとタンパク質から得られるアンモニアや遊離アミノ酸（窒素源）を使い合成される。しかし発酵混合飼料では，糖類が減少している一方で，粗タンパク質のうち溶解性窒素画分が増えているためルーメン内で炭素と窒素のバランスが合わず，ルーメン内の微生物体タンパク質合成量が低下することが懸念される。一般にルーメン内で余剰となった窒素は尿中へ排泄されるため，摂取した窒素源が乳生産にまわらず，乳牛としては窒素の利用効率が低下する。これまでに，非発酵の混合飼料と発酵混合飼料を乳牛に給与した結果，後者では尿中への窒素排泄量が増加することが報告されている[3)]。これらのことから，サイレージ発酵により混合飼料中の溶解性窒素画分が増える夏季では，ルーメン内の微生物体タンパク質合成量が低下し，乳牛による窒素利用効率が低下している可能性がある。そこで本研究では，発酵混合飼料を給与する体系において泌乳牛のルーメン内の微生物体タンパク質合成量と乳生産に使われる窒素利用効率を定量的に把握し，夏季における発酵混合飼料の利用適正を検証することを目的とした。

２．方　　法

発酵混合飼料を春季（２月～４月）および夏季（７月～９月）に調製を行った。乳牛用の混合飼料（粗飼料：コーンサイレージ，イタリアンライグラスサイレージ，濃厚飼料：圧ペントウモロコシ，圧ペン大麦，加熱大豆，大豆粕，ビートパルプ，フスマ，コーングルテンフィード）を細断型ロールベーラーで成形後，ラッピングマシーンにより密封し屋外にて貯蔵した。発酵期間はいずれの季節も45～70日間で，平均気温は春季では10.3℃，夏季では26.5℃であった。

発酵混合飼料の乳牛への給与は，各季節に泌乳中～後期の泌乳牛を６頭ずつ供試した。馴致期間を14日間とし，その後連続した５日間に次の試料を採取した。給与飼料と残食は毎日全量を記録し，一部を分析まで冷凍保存した（－28℃）。糞と尿は午前および午後に１回ずつ５日間採取し，分析まで冷凍保存した（－28℃）。乳量は毎日朝・夕２回ずつ記録し，一部の生乳を採取し乳成分の測定に用いた。本試験は「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。

飼料および糞中の成分は粗飼料の品質評価ガイドブックに基づいて分析した[4)]。可溶性糖類はフェノール硫酸法[5)]，デンプンは酵素法[6)]により測定した。部分的に採取した糞から１日に排泄された糞量の推定には，酸不溶性灰分を用いた。尿中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[7)]。また，尿中に含まれる窒素はケルダール法により測定した。部分的に採取した尿から１日に排泄された尿量の推定にはクレアチニンを指標に田村ら（2007）の方法により推計した[8)]。また，ルーメン内における微生物体窒素合成量はIAEA（1997）

© The Ito Foundation

により算出した[9]。

３．結果と考察

Table 1 に春季および夏季に調製した発酵混合飼料の化学成分を示した。有機物含量や粗タンパク質，デンプン，可溶性糖類，中性デタージェント繊維（NDF）含量では季節による顕著な差は認められなかった。一方，粗タンパク質のうちの溶解性画分は春季と比べて夏季では高く，約50％程度と高い値を示した。発酵の様相として，夏季では春季と比べて乳酸や酢酸，アンモニア態窒素の含量が高く，pHは低い値を示した。これらのことから，夏季ではサイロ内の微生物の代謝が春季と比べて亢進することで，タンパク質の分解や糖から有機酸への発酵がより進んでいたと考えられた。一方，可溶性糖類はいずれの季節でも１％DM程度と低く，発酵期間の温度によらず残存は少ないことが示された。Kondo *et al.*（2016）では，実験室内の小規模のサイロを用いて混合飼料を発酵させた際，15℃と比べて30℃の環境で発酵させた場合に，有機酸含量とタンパク質の溶解性画分の割合が増加することを示している[1]。また，同報告では残存する可溶性糖類の含量は温度によらずほぼ消費されることを報告しており，実用規模で行った本研究の結果を支持している。

Table 2 に春季および夏季に調製した発酵混合飼料を採食した泌乳牛による乾物摂取量，乳量，乳成分を示した。乾物摂取量は夏季で有意に低下した。乳量は統計解析による有意な差は認められなかったが，数値上夏季のほうが春季と比べて低値を示した。乳成分では乳脂肪，乳糖，尿素窒素では季節による違いは認められず，乳タンパク質，無脂固形分は夏季のほうが有意に低い値を示した。本研究を行った期間における牛舎内の平均温度と湿度，温湿度指数（THI）は，春季ではそれぞれ13.5℃，66.8％，57.1であったのに対して，夏季ではそれぞれ26.7℃，85.2％，78.2であった。また，対象とした泌乳牛の１分間あたりの呼吸数は春季で39.2回であったのに対して，夏季では57.6回と増加した。阪谷（2014）では一般に乳牛はTHI68～70で暑熱ストレスを受け始めると報告しており[10]，本研究でも乳牛は暑熱ストレスを受けていたと判断できる。

Table 3 に春季および夏季に調製した発酵混合飼料を採食した泌乳牛の窒素分配およびルーメン内微生物による窒素合成量を示した。夏季では乾物摂取量の低下に伴い，窒素摂取量も有意に低下した。また，ルーメン内微生物による窒素合成量，

Table 1　Chemical composition of fermented total mixed ration used in this experiment.

	Spring	Summer
Organic matter（%DM）	91.4	92.8
Crude protein, CP（%DM）	17.2	16.5
Soluble CP（%CP）	39.7	46.9
Starch（%DM）	19.1	17.9
NDF（%DM）	35.6	36.5
Soluble sugar（%DM）	1.5	1.0
pH	4.32	4.04
Lactic acid（%DM）	5.15	8.06
Acetic acid（%DM）	2.27	3.47
Ammonia-N（%total N）	2.28	3.14

© The Ito Foundation

Table 2 Feed intake, milk yield and composition in dairy cows fed fermented total mixed ration in spring or summer.

	Spring	Summer	p-value
Dry matte intake (kg/day)	24.5	21.6	0.018
Milk yield (kg/day)	33.8	31.0	0.226
Milk composition			
Fat (%)	4.23	3.85	0.170
Protein (%)	3.36	3.08	0.035
Lactose (%)	4.68	4.99	0.140
Solid non-fat (%)	9.02	8.66	0.012
Urea nitrogen (mg/dl)	11.4	10.1	0.250

Table 3 Nitrogen utilization in dairy cows fed fermented total mixed ration in spring or summer.

	Spring	Summer	p-value
N intake (g/day)	681	573	0.003
Milk N yield			
g/day	178	149	0.009
% N intake	26.2	25.9	0.817
Fecal N excretion			
g/day	198	165	0.024
% N intake	29.1	28.8	0.843
Urinary N excretion			
g/day	257	206	0.011
% N intake	37.9	36.0	0.402
N retention			
g/day	42.9	50.3	0.585
% N intake	6.8	9.3	0.281
Rumen microbial N synthesis			
g/day	473	344	<0.001
% N intake	69.6	60.0	0.011

尿中窒素排泄量，糞中窒素排泄量，乳中窒素移行量が春季と比べて有意に低下した。体窒素蓄積量については季節による影響は認められなかった。一方，摂取窒素量あたりで窒素分配量を比較すると，ルーメン内微生物体窒素合成量は夏季で有意に低下したが，他の窒素分配率については季節による影響は認められなかった。

春季と比較して夏季にルーメン内における微生物体窒素の合成量や尿中および糞中への窒素排泄量，乳中への窒素移行量が有意に低下した原因としては，暑熱ストレスにより乾物摂取量が低下したことに伴い，窒素摂取量が低下した影響が大きいと考えられる。Kamiya *et al.*（2005）では室温を制御した環境下において18℃に対して28℃で乳牛を飼養した際に，乾物摂取量が低下し，摂取窒素量，糞中窒素排泄量，乳中窒素移行量が低下したことを示しており[11]，本研究の結果を支持している。一方，本研究では摂取窒素量で換算した糞

© The Ito Foundation

および尿中への窒素排泄量，体窒素蓄積量，乳中への窒素移行率については季節による影響は認められなかった。Kamiya *et al.*（2005）では短期的に暑熱環境に晒した場合，摂取窒素量の低下に加えて，摂取窒素量あたりの尿中への窒素排泄量が40％程度まで高まり，体窒素蓄積量も－12％と低下している。本研究では摂取窒素量あたりの窒素排泄量や体窒素蓄積量はそれぞれ26％，19％であり，Kamiya *et al.*（2005）とは分配率が異なる。山岸ら（1995）は温湿度に日内変動のある暑熱環境では日内変動のない人工気象室のような恒温暑熱環境よりも泌乳牛への暑熱の影響が小さかったと報告しており[12]，本研究は自然環境下で行ったことから乳牛への暑熱ストレスの影響は比較的穏やかであった可能性がある。

夏季において摂取窒素あたりの微生物体窒素合成量，すなわち微生物体窒素合成効率が低下していた。ルーメン内での微生物体窒素の合成には摂取したルーメン内で分解可能なタンパク質が利用される。この合成にはエネルギー源としてルーメン内で消化可能な飼料中の炭水化物が必要であり，このエネルギーとタンパク質の供給バランスが効率的な微生物の増殖に関わっている[13]。本研究では給与飼料中のデンプン含量について季節による影響は認められなかった。デンプンと同様にエネルギー源として利用される可溶性糖類はいずれの季節も含量が低く，夏季で見られた微生物体窒素合成効率の低下に影響していないと考えられる。一方，飼料中タンパク質の溶解性窒素画分の増加に伴い，ルーメン内の微生物へ遊離アミノ酸やアンモニア等の窒素源の供給が増加したため，炭水化物との供給バランスが崩れ，微生物体窒素合成効率が低下したと考えられる。

本研究では季節によるルーメン内の微生物体窒素合成効率の違いは乳牛の窒素利用効率にまで影響を与えるほどの量ではなかった。Miyaji *et al.*（2018）では混合飼料を発酵貯蔵させた場合，粗タンパク質中の溶解性画分が約37％から約49％に高まるとともに，ルーメン内のアンモニア態窒素濃度や乳中尿素窒素濃度が高まっていた[3]。また，同報告では乳牛の摂取窒素量あたりの尿中への窒素排泄量が約21％から約25％に増加しており，体蓄積窒素量が約８％から３％へ低下していた。本研究では，乳中の尿素態窒素が夏季では増加していなかったことからも，ルーメン内で余剰にアンモニアが生じていたと判断できず，摂取窒素量あたりの尿中への窒素排泄量も影響がなかったと考えられる。また，乳牛が体内で代謝するタンパク質の供給源としては，ルーメン内で合成される微生物体タンパク質に加えて，飼料由来のタンパク質がルーメン内での分解を逃れ，小腸に到達するRUP（ruminally undegradable protein：ルーメン非分解性タンパク質）がある。飼料中のRUPは小腸での消化率が50～100％と範囲が広く，代謝タンパク質に占める割合は飼料によって異なる[13]。本研究でRUPの消化率が春季より夏季に高まったことで，体内で代謝可能なタンパク質量を補った可能性も考えられるが，詳細は不明である。今後，発酵混合飼料中のタンパク質画分についてより詳細に明らかにすることが必要である。

４．要　　約

本研究では，春季および夏季に調製した発酵混合飼料が泌乳牛の窒素利用に与える影響を調べた。その結果，夏季に調製した発酵混合飼料ではタンパク質中の溶解性タンパク質が高まり，採食した乳牛のルーメン内では微生物体窒素合成効率は低下するものの，乳牛体内での窒素利用効率には顕著な影響を及ぼさなかった。

© The Ito Foundation

文　献

1） Kondo, M., Shimizu, K., Jayanegara, A., Mishima, T., Matsui, H., Karita, S., Goto, M., Fujihara, T.：*J Sci Food Agri*, **96**, 1175～1180, 2016.

2） AFRC：Energy and protein requirements of ruminants, 57～72, CAB International, 1993.

3） Miyaji, M., Nonaka, K.：*J Dairy Sci*, **101**, 5092～5101, 2018.

4） 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，4～32，日本草地畜産種子協会，2009.

5） Kondo, M., Mulianda, R., Matamura, M., Shibata, T., Mishima, T., Jayanegara, A., Isono, N.：Validation of a phenol-sulfuric acid method in a microplate format for the quantification of soluble sugars in ruminant feeds, *Anim Sci J*, **92**, e13530, 2021.

6） Hall, M. B.：Determination of dietary starch in animal feeds and pet food by an enzymatic-colorimetric method：collaborative study, *J AOAC Int*, **98**, 397～409, 2015.

7） George, S. K., Dipu, M. T., Mehra, U. R., Singh, P., Verma, A. K., Ramgaokar, J. S.：*J Chromato B*, **832**, 134～137, 2006.

8） 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.

9） IAEA：A laboratory manual for FAO/IAEA Co-ordinated Research Programme, IAEA-TECDOC-945, IAEA, Vienna. 1997. https：//www.iaea.org/publications/5597/estimation-of-rumen-microbial-protein-production-from-purine-derivatives-in-urine

10） 阪谷美樹：産業動物臨床医誌，5（増刊号），238～246，2015.

11） Kamiya, M., Iwama, Y., Tanaka, M., Shioya, S.：*Anim Sci J*, **76**, 217～223, 2005.

12） 山岸規昭，三橋俊彦，宍戸弘明：畜産試験場研究報告，55号，21～30，1995.

13） National Research Council（NRC）2001：NRC 乳牛飼養標準　第７版，284～293，（株）デーリィ・ジャパン社，東京.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Studies on the enhancement of calf immunity appraised by rumen mat score（Ⅱ）

保　田　昌　宏[1,2]・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] 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）

The immunity of Japanese Black calves with significantly higher score of ruminal matt formation（RMF）was evaluated by veterinarians' guidance on improving feeding management for farmers with a high mortality. As a result, the number of monocytes after the improvement of feeding management was significantly reduced. Furthermore, in lymphocyte subset analysis, the number of B cells and the number of MHC class Ⅱ$^+$ cells increased significantly after the improvement of feeding management. The mortality also decreased after the feeding management was improved. 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

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ると考えられる。

これまでに申請者は，家畜の免疫に関する研究と，宮崎県および鹿児島県内の死廃家畜の病理解剖に関する研究，さらに農業共済獣医師および宮崎県畜産試験場などと連携して，牛，豚および鶏の飼養管理と抗病性の評価について研究を実施してきた[4,5]。その中で家畜の免疫能について，胸腺スコア，末梢血サブセット解析，顆粒球や単球の貪食能，末梢血単核球のサイトカイン発現など

© The Ito Foundation

を指標にして，自然免疫，細胞性免疫および液性免疫を評価してきた実績があり，家畜の免疫系の評価方法は確立できている[6,7]。

さらに昨年までの結果から，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し抗病性が向上することを明らかにした（投稿準備中）。具体的には，月齢，胸囲および腹囲が同じ値である子牛（81.0±5.0日齢）を選別してルーメンマット形成良好群とルーメンマット形成不良群について免疫系のパラメーターを比較した。その結果，B細胞数はルーメンマット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（$p=0.06$），$CD8^+$細胞数（$p=0.07$），MHC class II^+細胞数（$p=0.06$）はルーメンマット形成良好群で多い傾向が認められた。ルーメンマット形成良好群の顆粒球の貪食率は有意に高かった（$p=0.01$）。さらに，ルーメンマット形成良好群の単球の貪食率も高い傾向が認められた（$p=0.05$）。つまり，ルーメンマット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，免疫を増強させることが明らかになった。

そこで本研究では，事故率の高い農家を選抜し，飼養管理の改善前後の末梢血サブセット解析，顆粒球や単球の貪食能，末梢血単核球のサイトカイン発現，疾病の発症率とルーメンマットの固さをスコア化した基準を比較評価した。

2．材料および方法

2.1　呼吸器病での事故率の高い農場の現状を評価（飼養改善前）

宮崎県内の農場で，過去の治療歴や死亡・廃用履歴から呼吸器病での事故率が高い農家を16件選抜した。農場の飼養環境，母牛や子牛への飼料給与などの聞き取り調査を実施し，下記の研究方法2.3で示したようにルーメンマットスコアの測定，臨床上呼吸器症状などの異常の認められない子牛から採血を実施した。血液を大学へ持ち帰り下記の研究方法2.4に記載した方法で免疫系の評価を実施した。事故率の高い農家の子牛の飼養環境，ルーメンマットスコア，末梢血サブセット解析，顆粒球や単球の貪食能，末梢血単核球のサイトカイン発現などの評価によって現状を分析し，子牛の健康状態や飼養管理の問題点を把握した。

2.2　飼養環境を改善した後の農場の子牛の状態を評価（飼養改善後）

実験１で得られた結果を元にして，各調査農家で可能な飼養改善を実施し，事故率を調査した。飼養管理の改善後に臨床上呼吸器症状などの異常の認められない子牛から採血と下記の研究方法2.3で示したようにルーメンマットスコアの測定を行った。採取した血液は下記の研究方法2.4に記載した方法で免疫系の評価を実施した。実験１と実験２で得られた免疫学的な結果を比較解析し，飼養環境を改善することによって，子牛の事故率や，自然免疫，細胞性免疫，液性免疫の変化を評価した。

2.3　ルーメンマットスコアの測定と基準

対象となる子牛を頭絡で保定し，左腹部に拳を体表に当てた状態で10回連続して強く反復圧迫する。圧迫する強さは供試子牛を軽く動かす程度とし，反復圧迫の頻度は10回／10～15秒とする。内容物の固体と液体が混和されて液状化することによって，粗飼料充満度が低い場合は，少ない圧迫回数で波動感を認めるようになり（ルーメンマットスコア１），粗飼料充満度が高い場合は，10回の反復圧迫終了後も固いままで波動感を認めない（ルーメンマットスコア５）。まとめると，ルーメンマットスコア１は１回目の圧迫で波動感を認めるもの，スコア２は２～５回の反復圧迫で波動感を認めるもの，スコア３は６～10回の反復圧迫で波動感を認めるもの，スコア４は10回の反復圧迫で波動感を認めないが，内容物が軟らかいもの，

© The Ito Foundation

スコア５は10回の反復圧迫で波動感を認めず，内容物が粘土状で固いものとする（Abe *et al.*, 投稿中）。

2.4　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γδT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 classⅡ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，φ１μm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。

2.5　統計処理

サブセット結果および貪食結果はMann-Whitney U testを用いて解析し，$p < 0.05$を有意と評価した。データは平均±標準偏差で示した。

3．結果と考察

3.1　実験群の内訳およびルーメンマットスコア

子牛末梢血サブセットは月齢によって増減することが知られており[8]，飼養改善前後の比較のために同じ農家内で月齢がほぼ同じサンプルを抽出して解析した。その結果，のべ10農場で飼養改善前（幼齢改善前群30頭：62±14日齢，若齢改善前群20頭：107±12日齢）と飼養改善後（幼齢改善後群30頭：59±９日齢，若齢改善後群20頭：107±11日齢）を本研究では解析対象とした。幼齢群および若齢群とも飼養改善後のルーメンマットスコアは改善前に比べて有意に高値であった（**Table 1**）。

3.2　血液一般検査

幼齢群も若齢群も改善後に末梢血１μlあたりの単球数が有意に減少した（**Table２**）。それ以外の末梢血白血球数，リンパ球数，顆粒球数などには差が認められなかった。事故率の高い農家の子牛は単球数の増加が認められ，飼養改善によって単球数が減少したことは，事故率の高い農家の子牛には自然免疫系が活性化し続け炎症傾向が認められた。我々は，慢性肺炎などの慢性炎症で廃用となった子牛を剖検しその免疫性状を報告している[4]。慢性炎症の場合，自然免疫系の亢進を獲得免疫系が制御できなくなっていることが明らかになっている。

3.3　末梢血サブセット解析

末梢血サブセットは血液１μlあたりの実数値

© The Ito Foundation

Table 1 The score of ruminal matt formation pre and post improvement of feeding management

stage	pre	post
juvenile period	1.2 ± 0.5	2.5 ± 1.1**
young period	2.7 ± 0.9	3.5 ± 1.1*

*p<0.05 vs pre, **p<0.01 vs pre

Table 2 Monocyte number pre and post improvement of feeding management

Stage	pre	post
juvenile period	219.7 ± 131.5（cells/ ml）	112.2 ± 49.0**
young period	213.0 ± 86.4	130.0 ± 63.2**

**p<0.01 vs pre

Table 3 Peripheral lymphocyte subset analysis pre and post improvement of feeding management

Stage	subset	pre	post
juvenile period	CD4	1211.8 ± 352.6（cells/ ml）	1153.2 ± 295.9
	CD8	459.4 ± 126.5	435.8 ± 123.7
	CD4CD8	10.2 ± 4.2	7.4 ± 3.9**
	γδ	946.4 ± 336.0	1142.4 ± 248.3
	MHC class Ⅱ	1829.7 ± 451.4	2165.8 ± 604.1*
	B-cell	801.7 ± 328.5	1275.4 ± 432.1**
	NK	273.1 ± 105.4	291.9 ± 189.5
young period	CD4	1348.2 ± 295.0	1174.9 ± 302.6
	CD8	464.6 ± 155.7	497.1 ± 191.0
	CD4CD8	10.4 ± 6.5	6.3 ± 2.9*
	γδ	1021.4 ± 441.7	957.2 ± 322.1
	MHC class Ⅱ	1895.4 ± 680.4	2355.3 ± 804.2
	B-cell	894.0 ± 423.9	1417.9 ± 555.3**
	NK	299.6 ± 182.0	274.9 ± 131.5

*p<0.05 vs pre, **p<0.01 vs pre

で示した。サブセット解析時のフォワードスキャッターとサイドスキャッターはリンパ球をターゲットとした。$CD4^+$細胞，$CD8^+$細胞，γδ T細胞は各群間で有意な差は認められなかった（**Table 3**）。飼養管理改善後の幼齢および若齢群では，改善前と比べて$CD4^+CD8^+$細胞は有意に減少した。同様に飼養管理改善後の幼齢および若齢群では，改善前と比べてB細胞数とMHC class $Ⅱ^+$細胞数は有意に高値となった。ルーメンマットスコアが上がることでB細胞数が有意に増加することは昨年と同じ結果が得られ再現性が認められた。$CD4^+CD8^+$細胞は末梢血中の細胞数も少なく，その機能も明かになっていないので，今後さらなる解析が必要と思われる。また，飼養改善後には単球数が有意に減少する一方で，リンパ球と同じ大きさのMHC class $Ⅱ^+$細胞数が有意に増加したことから，機能的に異なる抗原提示細胞の存在が示唆された。今後この細胞分画が樹状細胞な

© The Ito Foundation

Table 4　Monocyte and granulocyte phagocytosis pre and post improvement of feeding management

Stage	phagocytosis	pre	post
juvenile period	monocyte	48.9 ± 11.7(%)	44.6 ± 11.7
	granulocyte	70.0 ± 17.8	58.2 ± 14.7
young period	monocyte	52.9 ± 12.7	42.2 ± 10.2**
	granulocyte	74.8 ± 12.7	63.5 ± 14.4*

*p<0.05 vs pre, **p<0.01 vs pre

どの抗原提示細胞であるかどうか機能解析も含めて詳細な研究を進めていきたい。

3.4　末梢血単球および顆粒球貪食能

幼齢群では顆粒球および単球の貪食能に飼養改善前後で差は認められなかった（**Table 4**）。しかしながら，飼養改善後には若齢群では顆粒球および単球の貪食能が飼養改善前に比べて有意に低い結果が得られた。この結果から，飼養改善によって単球の数と貪食する機能が抑制されていると考えられた。

3.5　飼養管理改善前後の事故率

飼養管理改善前後の事故率は，改善前の3.5±5.2%から改善後には1.6±1.6%となった。

4．要　約

獣医師による事故率の高い農家に対する飼養改善指導によって，ルーメンマットスコアが有意に高くなった子牛の免疫能を評価した。その結果，飼養改善後の単球数が有意に減少した。さらにリンパ球サブセット解析では，飼養改善後にB細胞数とMHC class Ⅱ$^+$細胞数が有意に増加した。飼養改善後には事故率も低下した。つまり，ルーメンマットスコアを上げる飼養管理を行うことで子牛の免疫能を向上させ事故率の軽減にもつながることが明らかになった。加えてルーメンマットスコアを用いた飼養改善により抗生剤の使用などを減じることも可能であると思われる。

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**, 180～186, 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，壱岐佳浩：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）Isashiki, Y., Ohashi, Y., Imatake, S., Baakhtari, M., Ramah, A., Kida, T., Yanagita, T., Yasuda, M.：Studies on the immune status of calves with chronic inflammation and thymus atrophy, *J. Vet. Med. Sci., in press.*
5）Wakitani, S., Kawabata, R., Yasuda, M.：Insufficiency of CD205-positive cortical thymic epithelial cells in immature Japanese Black cattle with severe thymic abnormalities and poor prognosis, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **245**, 110379, 2022.
6）Baakhtari, M., Imaizumi, N., Kida, T., Yanagita, T., Ramah, A., Ahmadi, P., Takebe, N., Iwamoto, Y., Korosue, K., Tsuzuki, N., Yasuda, M.：Effects of Branched-chain Amino Acids on Immune Status of Young Racing Horses, *J. Vet. Med. Sci., in press.*
7）Ramah, A., Yasuda, M., Ohashi, Y., Urakawa, M., Kida, T., Yanagita, T., Uemura, R., Bakery, H. H., Abdelaleem, N. M., El-Shewy, E. A.：Different doses of tannin reflect a double-edged impact on broiler chicken immunity, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **220**, 109991, 2020.
8）Hisazumi, R., Kayumi, M., Zhang, W., Kikukawa, R. Nasu, T., Yasuda, M.：Evaluation of bovine thymic function by measurement of signal joint T-cell receptor excision circles, *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **169**, 74～78, 2016.

© The Ito Foundation

離乳育成豚のリジン要求量に関する研究（Ⅲ）
―Diet Selection能力の活用によるアミノ酸給与の精密化―

A study on requirement of lysine in weanling pigs（Ⅲ）－Precise feeding of amino acids by application of Diet Selection－

勝　俣　昌　也
（麻布大学獣医学部）

Masaya Katsumata
（School of Veterinary Medicine, Azabu University）

This study was conducted to confirm that pigs could display the ability of diet selection as they could select dietary protein intake meeting their protein and/or amino acids requirements. We prepared two test diets: high protein diet（HCP diet, crude protein concentration was 26.7% and that of total lysine was 1.85%, respectively）and low protein diet（LCP diet, 14.2% and 0.81%, respectively）. We conducted two diet selection trials. Four three-week-old barrows were used in each trial. After acclimatization periods, the pigs were subjected to training periods（8 days）and then subjected to diet selection periods（2 or 3 weeks, 2 weeks for the first trail and 3 weeks for the second trial）. During the training periods, the pigs were allowed access either HCP or LCP diet every other day-the LCP diet on the days 1, 3, 5, and 7 and the HCP diet on the days 2, 4, 6, 8. As for during the diet selection periods, the pigs were allowed to access both diets every day. The initial body weighs of the pigs on the first day of the diet selection period were 15.6 to 17.2kg for the first trial while 8.8 to 11.8 kg for the second trial. The selected CP concentration on the last days of the diet selection periods were lower than those of the first days of the diet selection periods（$p<0.05$）-the first trial: 14.7 vs 16.2%；the second trial: 15.9 vs 21.0%. Thus, we conclude that we succeeded to observe ability of diet selection of the pigs. However, we could not confirm that the pigs could select dietary protein intake meeting their protein and/or amino acids requirements because the selected CP and/or total lysine were lower than their requirements.

1．目　　的

わたしたちは，離乳育成豚のリジン要求量を推定するための試験研究に2019年度から取り組んでいる。そして，離乳育成豚（体重10～20kg）のリジン要求量は，95%信頼区間を想定しなければ飼料中の総リジン濃度として1.27%，標準化可消化（SID）リジン濃度として1.19%，95%信頼区間を想定すれば，それぞれ1.53%と1.46%という推定値を得た。これらの推定値は日本飼養標準・豚2013年版の1.13%と0.96%よりは高い[1)]。95%信頼区間を想定した推定値は米国のNRC飼養標

© The Ito Foundation

準2012年版の1.40％と1.23％よりも高い[2]。このことは，育種改良によってブタの能力が高くなるのに伴い，アミノ酸要求量も高くなっていることを示している。

ところで，ブタのアミノ酸要求量は日々変化し，漸次低下していく。日々変化するアミノ酸要求量にあわせて飼料を給与するためには，ブタのDiet Selection能力（Kyriazakisら）を活用すればよい[3]。10～20kgのブタのリジン要求量は飼料中の総リジン濃度として1.53％であるが，体重10kgのブタには1.53％は低すぎ，20kgのブタには高すぎる。期間の平均としてのアミノ酸要求量を推定できたとしても，アミノ酸給与をさらに精密化するためには，漸次低下する要求量にあわせて飼料を給与するのが望ましい。

ブタへのアミノ酸給与をさらに精密化することを目指して，これまでに推定したリジン要求量1.53％に近い濃度となるよう体重10～20kgのブタが選択摂取できることを明らかにするために，本研究を実施した。

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210811-4）。

トウモロコシ，脱脂粉乳，魚粉，大豆粕をおもな原料として粗タンパク質（CP）含量26.7％の高タンパク質飼料（総リジン濃度1.85％，可消化エネルギー濃度3.54Mcal/kg，HCP飼料）と14.2％の低タンパク質飼料（総リジン濃度0.81％，可消化エネルギー濃度3.55Mcal/kg，LCP飼料）を調製した。飼料の粗タンパク質含量が飼料の嗜好性に影響を及ぼすことが考えられたので，サッカリンナトリウムを甘味料として両方の飼料に0.5％配合した。４週齢の去勢雄豚（系統名スイートマミー）を株式会社シムコの館山農場から導入して供試豚とした。

１回目の飼養試験は2021年９月７日に供試豚を４頭導入，市販人工乳を給与して豚房へ馴致させる期間を８日間，供試飼料に馴致させる期間を３日間おいた。幅1.8m×奥行1.6mの豚房の両端に向かい合うように２つの飼槽を設置した。導入後12日目からLCP飼料とHCP飼料を１日おきに交互に給与するトレーニング期間を８日間おいた。したがって，供試豚はLCP飼料を１日おきに４日，HCP飼料を１日おきに４日摂取したことになる。トレーニング期間中は豚房の２つの飼槽の両方にLCP飼料あるいはHCP飼料を投入した。その後，２週間の選択摂取期間を供試豚に経験させた。選択摂取期間中は豚房の２つの飼槽の一方にLCP飼料を，もう一方にHCP飼料を投入した。そして，翌日には同じ飼槽に投入する飼料は入れ替えた。つまり，各飼槽には１日おきにLCP飼料とHCP飼料が投入されたことになる。飼料の投入量，残飼量から摂取量を毎日計算した。１回目の飼養試験の選択摂取期間を始めるときの供試豚の体重は15.5kg，16.5kg，17.0kg，17.2kg，選択摂取期間を終えたときの体重は26.7kg，27.8kg，28.4kg，28.9kgだった。

１回目の飼養試験では供試豚が選択したCP濃度が予想より低かった。開始時体重が大きかったことがその理由と考え，開始時体重が10kg前後となるように調整して２回目の飼養試験を実施した。２回目の飼養試験は2022年２月22日に供試豚を４頭導入，市販人工乳を給与して豚房へ馴致させる期間を５日間，トレーニング期間を８日間おいた。その後，３週間の選択摂取期間を供試豚に経験させた。２回目の飼養試験の選択摂取期間を始めるときの供試豚の体重は9.9kg，8.8kg，10.6kg，11.8kg，選択摂取期間を終えたときの体重は25.6kg，25.2kg，26.9kg，29.2kgだった。

© The Ito Foundation

3．結果と考察

1回目の飼養試験の供試豚の日増体量（g/d）は798，809，814，838，全飼料摂取量（g／14日）は20,990，19,975，19,131，22,895，飼料効率は0.53，0.57，0.60，0.51，全CP摂取量（g/14days）は3527，3204，2979，3457，CPの利用効率（14日間の増体量（kg）／14日間のCP摂取量（kg））は3.43，3.53，3.83，3.39，それぞれの測定値の変動係数（%）は1.8，6.8，6.3，6.6，4.9だった。2週間の選択摂取期間中に4頭の供試豚が選択したCP濃度の平均値を日ごとにプロットしたのが**Fig. 1**である。開始日に選択したCP濃度は16.2%，7日目には15.4%，終了日には14.7%だった。供試豚が選択した総リジン濃度は順に0.98%，0.92%，0.86%だった。CP濃度も総リジン濃度も開始時と終了時には差があった（$p<0.05$）。

2回目の飼養試験の供試豚の日増体量（g/d）は700，784，774，829，全飼料摂取量（g/21days）は25,540，26,550，28,780，37,950，飼料効率は0.58，0.62，0.56，0.46，全CP摂取量（g/14days）は4745，6561，4731，7185，CPの利用効率（21日間の増体量（kg）／21日間のCP摂取量（kg））は3.09，2.51，3.44，2.42，それぞれの測定値の変動係数（%）は6.0，16.5，10.6，18.8，14.7だった。3週間の選択摂取期間中に1頭の供試豚（日増体量が784g/dのブタ）は選択摂取能力を発揮しなかった。このブタが選択したCP濃度は漸減せず3週間の平均値は24.6±2.6%だった。そのため，その豚を除外した3頭の供試豚が選択したCP濃度の平均値を日ごとにプロットしたのが**Fig. 2**である。開始日に選択したCP濃度は21.0%，11日目には18.2%，終了日には15.9%だった。供試豚が選択した総リジン濃度は順に1.37%，1.14%，0.95%だった。CP濃度もリジン濃度も開始時と終了時には差があった（$p<0.05$）。

供試した8頭中，7頭のブタは日齢が進むと（体重が大きくなると）選択するCP濃度が低下した。また，1回目と2回目の飼養試験で選択したCPと総リジンの濃度を比較すると2回目のほうが高かった。これは2回目の開始時の日齢が7日早く，開始時体重の平均値が6.3kg小さかったことが理由だろう。以上のことから，本研究でもブタによるCPの選択摂取を観察できたと結論する。

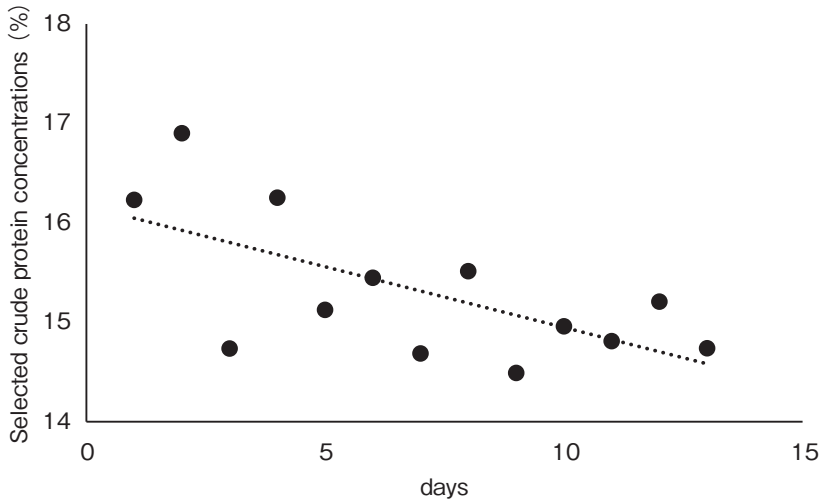


Fig. 1　Selected crude protein concentrations of the first feeding trial (n=4).
Each dot is average of selected crude protein concentrations by four pigs.

© The Ito Foundation

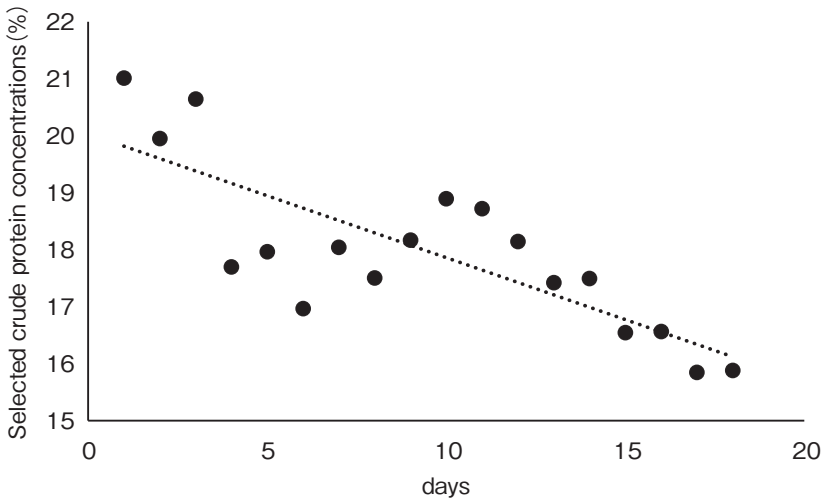


Fig. 2　Selected crude protein concentrations of the second feeding trial (n=3).
Each dot is average of selected crude protein concentrations by three pigs.

しかし，これまでに推定したリジン要求量に近い濃度となるよう体重10～20kgのブタが選択摂取できることは確認できなかった。

本研究でブタが選択したCPと総リジン濃度をNRC飼養標準（NRC2012）に記載されている数値と比較した。NRC飼養標準では総窒素と表示されているので6.25をかけてCPに変換した。NRCに記載されているCP要求量は７-11kgでは20.6％，11-25kgでは18.9％，25-50kgになると15.7％である。１回目の飼養試験は11-25kg，２回目は７-11kg，11-25kgに対応している。１回目の飼養試験はNRCより低いCP濃度を，２回目は同等のCP濃度を選択したことになる。一方，NRCに記載されている総リジン要求量は７-11kgが1.53％，11-25kgは1.40％，25-50kgになると1.12％である。高めの濃度を選択した２回目の飼養試験であっても，選択した総リジン濃度はNRCに記載されている要求量よりも低かった。

NRCは７-11kgのブタのCP要求量を20.6％と記載している。きわめてアミノ酸バランスが良い飼料でなければ，このCP濃度で総リジン濃度1.53％の飼料を調製するのは難しい。NRCに記載されているCPの要求量はアミノ酸バランスの良い飼料を想定しているようだ。生産現場で実際に使われている飼料よりもCPの要求量が低く設定されていると言ってよい。以上のことから，本研究でブタが自ら選択したCPと総リジンの濃度は，そのブタの要求量（遺伝的能力を発揮するのに必要な摂取量）よりも低い値で推移したと考えている。実際，2019年度と2020年度に推定した離乳育成豚（体重10～20kg）の総リジン要求量は，本研究でブタが選択した総リジン濃度よりも高かった。このとき，総リジン濃度0.95％，1.20％，1.70％，1.95％の飼料を給与したときの飼料効率は0.54，0.61，0.64，0.62だった。本研究では，選択摂取能力を発揮しなかったブタの飼料効率が0.62で，1.20％，1.70％，1.95％の飼料を給与したときの飼料効率と同等であった。しかし，それ以外のブタの飼料効率は0.46～0.60であり，リジンが充足していない飼料を摂取させたブタの飼料効率と同等であった。ブタは自らの要求量を満たす，つまり遺伝的能力を発揮できるように選択摂

© The Ito Foundation

取すると考えていたが，間違った予想だったかもしれない。ブタの立場に立つと，遺伝的能力を発揮するということは，代謝能力を100％あるいはそれ以上に発揮することになる。タンパク質の代謝回転速度を想定すると分かりやすい。これはブタにとって負担が大きいのではないだろうか。すでに述べたように，本研究でもブタによるCPの選択摂取を観察できたと結論する。しかし，それはブタにとって負担の少ない範囲でCP濃度を選択したのであって，遺伝的能力を発揮してほしいという人間側の都合とは違った反応だったと現在は考えている。

動物福祉への対応が進むと，代謝上の負担についても目配りすることを求められるかもしれない。長い目で見ると，ブタの負担が少ない飼料給与が必要になることもあるだろう。本研究で実施した選択摂取モデルも使い，要求量を満たした飼料をブタが摂取したときの代謝上の負担を評価することも重要な研究課題となろう。

4．要　約

ブタへのアミノ酸給与をさらに精密化することを目指して，これまでに推定したリジン要求量1.53％に近い濃度となるよう体重10～20kgのブタが選択摂取できることを明らかにするために，本研究を実施した。CP含量26.7％の高タンパク質飼料（総リジン濃度1.85％，HCP飼料）と14.2％の低タンパク質飼料（総リジン濃度0.81％，LCP飼料）を調製した。飼養試験は２回実施し，１回の飼養試験には４頭供試した。３週齢の去勢雄豚を導入，馴致期間をおいてから，トレーニング期間（８日間）と選択摂取期間を２週間（１回目の飼養試験）あるいは３週間（２回目の飼養試験）設定した。トレーニング期間にはHCP飼料とLCP飼料を隔日で交互に摂取させ，選択摂取期間にはHCP飼料とLCP飼料の両方を摂取させた。選択摂取期間開始時の体重は１回目が15.6～17.2kg，２回目は8.8kg～11.8kgだった。いずれの飼養試験でも選択摂取期間の開始日に選択したCP濃度よりも終了時に選択したCP濃度のほうが低かった（１回目；16.2％ vs 14.7％，２回目21.0％ vs 15.9％，$p<0.05$）だった。以上より，ブタによるCPの選択摂取を観察できたと結論する。しかし，供試豚が選択したCP濃度（あるいはリジン濃度）は要求量よりも低く，要求量を満たすように選択摂取できることは確認できなかった。

文　献

1） 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本飼養標準・豚，2013年版，18，中央畜産会，東京，2013.
2） National Research Council of the National Academies：Nutrient Requirements of Swine，11th Revised Edition，211，The National Academies Press，Washington，D.C.，2012.
3） Kyriazakis，I.，*et al.*：*Physiology & Behavior*，**50**，1197～1203，1991.

© The Ito Foundation

国産子実用トウモロコシ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（Ⅱ）

Effects of drying temperature and storage conditions on nutritive value of domestic grain of corn（Ⅱ）

篠遠　善哉[1]・金井　源太[1]・嶝野　英子[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 Shinoto[1], Genta Kanai[1], Eiko Touno[1] and Akane Ashihara[2]

（[1]Tohoku Agricultural Research Center, NARO, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

Expansion of the cultivation area of domestic corn grain at the site of production is bottlenecked by post-harvest drying and year-round storage. To determine the optimal drying and storage conditions of corn grain, the effects of two different drying temperatures（40 or 70℃）after harvesting, two moisture levels（9 or 13%）at the start of storage and three storage conditions（cold storage at 13℃ in flexible container bags; storage in flexible container bags under normal temperature; and storage in flexible container bags by a wrapping machine under normal temperature）on the nutritional value of corn as swine feed were examined by *in vitro* digestion methods. The effect of drying temperature was assessed at 40℃ with a Japanese domestic recirculating dryer and at 70℃ with an Italian recirculating dryer. There was no effect of drying temperature（40 or 70℃）on the estimated nutritional values（dry matter, DM；crude protein, CP; gross energy, GE; lysine）. The digestibility of DM and CP of the grain with standard moisture content（13%）was decreased during storage in flexible container bags at normal temperature to a greater extent than that at cold temperature or in the flexible container bags by a wrapping machine at normal temperature. In contrast, in the grain with lower moisture content（9 %）, no clear difference in the digestibility of DM, CP and lysine was observed among all storage conditions examined. Moreover, in the case of cold storage, the digestibility of DM, CP, GE and lysine was not decreased for stored grain with standard moisture（13%）. In conclusion, it is suggested that domestic corn grain should be dried under a lower moisture condition than the standard condition, and the grain should be stored at a low temperature or in the flexible container bags by wrapping machine during extended storage to prevent quality deterioration.

1．目　　的

生産現場における国産トウモロコシ子実（子実用トウモロコシ）の栽培面積拡大のボトルネックは乾燥調製と通年貯蔵のポストハーベストの部分である。他の土地利用型作物である水稲・麦・大豆と比較して，子実用トウモロコシは単位面積当たりの収量が多い。栽培から収穫までは高速作業

© The Ito Foundation

体系が開発されているが，既存の乾燥機では処理能力が追いつかず，特に府県では栽培面積の拡大が停滞している。また，子実用トウモロコシの実需者である畜産農家では，輸入，国産に関わらず通年供給が求められることから，国産の子実用トウモロコシの通年貯蔵は必須である。しかし，輸入元の主要産地であるアメリカ等と比較して，梅雨や夏季に高温多湿条件となる我が国の貯蔵条件では，カビや腐敗など貯蔵中の品質低下が懸念される。府県において東北地域は，子実用トウモロコシの栽培面積が最大である。しかし，現状で国産の子実用トウモロコシの通年貯蔵方法に関する知見が少なく，東北地域では，これまで貯蔵中の品質低下が原因で子実用トウモロコシを廃棄する事例も報告され，多くの場合が冬季に全量を使い切る体系で利用されている。そのため今後，府県において子実用トウモロコシの栽培面積の拡大と安定供給のためには高速乾燥技術と通年蔵技術に関する知見の集積がきわめて重要である。

そこで本研究では，国産の子実用トウモロコシの高速高温乾燥と通年貯蔵の条件がそれぞれ豚の飼料としての栄養価に及ぼす影響を*in vitro*の人工消化法を用いて明らかにし，効率と品質を両立させる子実用トウモロコシの乾燥・貯蔵体系の社会実装へ向けた基礎的知見を得ることを目的とする。

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，2021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. LG3490）を供試して実施した。

施肥は，牛糞堆肥を１t/10a，基肥として配合肥料をN，P_2O_5，K_2Oの成分でそれぞれ20，10，10 g/m^{2}施用した。播種は，不耕起播種機を用いて2021年５月12日に条間76 cm，株間17 cmの設定で行った。収穫作業は，2021年10月21日に子実用トウモロコシ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23%であった。

2021年10月18日に３カ所において，隣接する２条を２mの長さ（3.0 m^2）で雌穂を収穫して，坪刈収量を調査した。

2.2　子実用トウモロコシ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子実用トウモロコシを供試した。試験区は，循環式乾燥機（RTM250-XLD5，金子農機社）を用いてコムギの乾燥の慣行温度（約40℃）で乾燥する低温（LT）区と高速高温乾燥機（AGD10，Agrex社）を用いて高い温度（70℃）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当たりの消費熱量を調査した。

貯蔵試験は，2020年11月上旬に収穫した子実用トウモロコシを11%-13%以下に乾燥させた13%（対照：慣行水分区）と９%（低水分区）まで乾燥した試料をそれぞれ供試した。なお，乾燥には循環式乾燥機（RTM250-XLD5，金子農機社）を用いて，乾燥温度はコムギの乾燥の慣行温度（約40℃）とした。試験は，耕種農家が特別な施設や装置を必要とせず手持ちの営農機械で通年貯蔵を行えるように，乾燥終了時の子実用トウモロコシの水分を慣行水分（13%，HM）と低水分（９%，LM）で変えた条件とフレコンバッグを用いた３種類の貯蔵方法を組み合わせた合計６条件で検討した。貯蔵試験は，東北地域における通年貯蔵を想定して2020年秋の収穫後から約１年後の2021年９月下旬まで東北農業研究センター（岩手県盛岡

© The Ito Foundation

市）で実施した（対照区の低温貯蔵試験のみ茨城県つくば市で実施した）。貯蔵方法は，2021年３月下旬までフレコンバッグで常温貯蔵した後に常湿低温貯蔵（13℃）したものを対照とし，他の処理区は温度調節の機能を持たない一般的な飼料保管庫で実施し，フレコンバッグで貯蔵する区（貯蔵の面では劣るが最も簡易かつ安価な方法），フレコンラップで貯蔵する区（2020年秋の収穫，乾燥後にフレコンラップ調製：最も通年貯蔵に適しているがラッピングマシーンやラッピング代等により貯蔵に係る費用が最も高い）とした。調査は，低温貯蔵前（３月下旬）と貯蔵後（９月下旬）のカビ毒濃度（フモニシン）および生菌数（カビ数，酵母数，大腸菌数）について調査した。

2.3　子実用トウモロコシの栄養価に関する試験

①高速高温乾燥試験：循環式乾燥機を用いて40℃，70℃で乾燥処理した子実用トウモロコシ２種類，および②通年貯蔵試験：13％と９％まで乾燥した子実用トウモロコシをフレコンバッグまたはフレコンラップで常温下において2020年10月から2021年３月末まで保管した後，フレコンバッグ貯蔵の一部は2021年４月上旬から９月上旬まで冷蔵貯蔵した子実用トウモロコシ６種類，についてそれぞれの栄養価を明らかにするために，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により，各種栄養素の利用性を評価した。人工消化は，Boisenら（1997）[1]およびRegmiら（2009）[2]の方法に従い，ペプシンとパンクレアチンを消化酵素として用いた２段階の消化反応を行った後，ろ過による残さを不消化物とみなし，栄養成分（乾物：DM，粗タンパク質：CP，総エネルギー：GE，リジン）の消化率を算出し，飼料タンパク質としての栄養価を低温貯蔵前（３月下旬）と貯蔵後（９月下旬）について評価した。

３．結果と考察

3.1　乾燥試験および貯蔵試験

コンバインによる全刈収量は977 kg/10a，坪刈収量は1,142 kg/10aであった。乾燥後の仕上水分は，LT区およびHT区ともにそれぞれ13.4％，12.5％であり，おおむね目標水分の15％以下であった。乾燥温度について，慣行水分区ではLT区で31.3℃，HT区では68.8℃であり，LT区よりHT区で37.5℃高く，１時間当たりの水分の減少程度を示す乾減率はLT区，HT区それぞれ1.5％，3.1％であり，HT区はLT区の２倍程度であった．除水量当たりエネルギー消費量はLT区とHT区でそれぞれ5.8 MJ/kg-water，8.4 MJ/kg-waterであり，HT区で大きかった。

岩手県盛岡市における貯蔵試験では，2020年11月から３月までの冬季の平均温度は1.2℃，平均湿度は76.4％であった。一方，４月－９月の温度は６月に入ると20℃を超え，８月には日平均温度が34℃となり，８月中旬より徐々に低下したが，20℃を下回ることはなかった。４月－９月の湿度は最低34.6％，最高87.1％，平均湿度は62％であった。生菌数については，いずれの乾燥水分においても貯蔵前にはカビ数で4.6-4.8 log CFU/gFM，酵母数で1.0-4.1 log CFU/gFM，大腸菌数で3.2-4.3 log CFU/gFM検出されたが，貯蔵１年後には酵母数は検出限界以下となり，カビ数，大腸菌数も低く抑えられ，いずれの処理区においても良好な貯蔵状態を保っていた（**Table 1**）。

3.2　乾燥温度および貯蔵条件が子実用トウモロコシの栄養価に及ぼす影響

①高速高温乾燥試験に用いた子実用トウモロコシの一般成分値を**Table 2**に，人工消化試験結果を**Table 3**に示した。40℃あるいは70℃で乾燥後の一般成分値は両トウモロコシ間で違いはなく，また，DM，CP，GEおよびリジン消化率はいず

© The Ito Foundation

Table 1　Microbial flora of dry corn grain（log CFU/gFM）

Storage condition	Moisture levels at the start of storage	Fungi	Yeast	Coliform bacteria
before storage	13%	4.8^{A}	1.0^{B}	4.3^{A}
before storage	9%	4.6^{A}	4.1^{A}	3.2^{A}
in bag	13%	1.5^{B}	ND	0.7^{B}
in bag	9%	1.5^{B}	ND	0.7^{B}
in wrap	13%	ND	ND	0.7^{B}
in wrap	9%	2.3^{B}	ND	0.8^{B}

in bag, storage in flexible container bag；in wrap, storage in flexible container bag by wrapping machine.
ND：not detected.
Values are expressed as least square means. A, B：$p<0.05$.

Table 2　Chemical analysis of corn（on a DM basis）harvested in 2021

Drying condition	DM（%）	CP（%）	CA（%）	EE（%）	CF（%）	GE（MJ/g）
40°C	87.1	8.4	1.4	4.1	2.3	18.7
70°C	88.1	8.3	1.5	4.0	2.1	18.6

DM, dry matter；CP, crude protein；CA, crude ash；EE, ethyl extract；CF, crude fiber；GE, gross energy.

Table 3　*In vitro* digestion test ① after drying at two different temperatures

Drying condition	DM（%）	CP（%）	GE（%）	Lysine（%）
40℃	76.1	83.5	99.9	92.1
70℃	76.4	83.7	99.9	92.0

DM, dry matter；CP, crude protein；GE, gross energy.
In vitro digestion test ①：The effect of two different drying temperature on the nutritive balue of domestic corn grain.

Table 4　Chemical analysis of corn（on a DM basis）harvested in 2020

Storage condition	Moisture level at start of storage	DM（%）	CP（%）	CA（%）	EE（%）	CF（%）	GE（MJ/g）
before storage	13%	87.4	8.5	1.6	4.07	2.76	18.8
before storage	9%	90.4	9.0	1.5	3.82	2.12	18.8
cold	13%	88.1	8.4	1.5	4.11	2.39	18.6
cold	9%	88.7	9.1	1.5	4.18	2.20	18.6
in bag	13%	87.8	8.3	1.4	4.15	2.45	18.5
in bag	9%	90.9	9.0	1.3	4.09	2.34	18.4
in wrap	13%	86.5	8.5	1.4	4.29	2.46	18.6
in wrap	9%	91.5	8.8	1.4	4.31	2.29	18.5

DM, dry matter；CP, crude protein；CA, crude ash；EE, ethyl extract；CF, crude fiber；GE, gross energy；in bag, storage in flexible container bag；in wrap, storage in flexible container bag by wrapping machine.

© The Ito Foundation

Table 5　*In vitro* digestion test ② following storage under conditions of cold, in flexible container bags or in flexible container bags by wrapping machine

Storage condition	Moisture level at start of storage	DM（%）	CP（%）	GE（%）	Lysine（%）
before storage	13%	74.8^{AB}	85.3^{AB}	99.8^{AB}	90.3^{ABC}
before storage	9%	76.8^{A}	86.5^{A}	99.8^{A}	90.7^{ABC}
cold	13%	76.6^{A}	85.2^{AB}	99.8^{AB}	90.6^{ABC}
cold	9%	76.5^{A}	86.5^{A}	99.8^{AB}	91.0^{AB}
in bag	13%	73.0^{B}	82.1^{C}	99.7^{B}	89.5^{BC}
in bag	9%	75.0^{AB}	84.9^{AB}	99.8^{A}	91.9^{A}
in wrap	13%	76.2^{AB}	83.1^{BC}	99.8^{AB}	89.0^{C}
in wrap	9%	78.0^{A}	85.2^{AB}	99.8^{A}	90.5^{ABC}

DM, dry matter；CP, crude protein；CA, crude ash；EE, ethyl extract；CF, crude fiber；GE, gross energy；in bag, storage in flexible container bag；in wrap, storage in flexible container bag by wrapping machine.
Values are expressed as least square means. A, B, C：$p<0.05$.
In vitro digestion test ②：The effect of storage conditions on the nutritive value of domestic corn grain

れも差はなかった。

②通年貯蔵条件試験に用いた子実用トウモロコシの一般成分値を**Table 4** に，人工消化試験結果を**Table 5** に示した。貯蔵前と冷蔵，フレコンバッグ，フレコンラップで貯蔵後の人工消化の結果は，冷蔵で貯蔵すれば，子実用トウモロコシの水分含量に関わらず貯蔵前と比較して有意差はなかったが，フレコンバッグで貯蔵した場合は，13％の水分含量のトウモロコシは，CP消化率（85.3％ vs 82.1％）において貯蔵前より有意に低くなり，また，フレコンバッグで貯蔵した13％と９％の子実用トウモロコシ間で比較すると，CP消化率（82.1％ vs 84.9％），GE消化率（99.7％ vs 99.8％）およびリジン消化率（89.5％ vs 91.9％）において，13％の子実用トウモロコシのほうが９％よりも有意に低い値であった。このことは，フレコンバッグで貯蔵した場合は，13％の水分含量の子実用トウモロコシは消化率が低下する可能性があり，９％まで水分含量を低下させることにより消化率の低下は抑制できる可能性が考えられた。一方，フレコンラップで貯蔵した場合は，貯蔵前と比較して，子実用トウモロコシの消化率に影響を及ぼさず，また水分含量の違いによっても消化率の違いは見られなかった。以上から，貯蔵前と比較して，冷蔵やフレコンラップで貯蔵した場合は，子実用トウモロコシの水分含量に関わらず消化率は低下しないが，フレコンバッグで貯蔵した場合は，13％の水分含量の子実用トウモロコシは貯蔵前や９％の水分含量の子実用トウモロコシと比較して，消化率が低下することが明らかとなった。これらのことは，秋に収穫した子実用トウモロコシを，消化率を低下させずに長期間貯蔵するには，冷蔵あるいはフレコンラップが適している可能性が示唆された。なお，本研究は2020年度に収穫した子実用トウモロコシのみの結果であるため，今後，再現性を確認する必要がある。

貯蔵前のフモニシン濃度は13％の水分含量より９％の水分含量で低い傾向であり，貯蔵後のフモニシン濃度は13％および９％の水分含量ともに冷蔵貯蔵もしくはフレコンバッグであれば増加することはなかった。また，フレコンラップでは貯蔵前後でフモニシン濃度に大きな変化は見られなかった。

© The Ito Foundation

4．要　約

本研究では，収穫した国産子実用トウモロコシを異なる温度水準（40℃ vs 70℃）で乾燥し，さらに異なる水分含量（13% vs 9％）のトウモロコシを異なる条件下（冷蔵，フレコンバッグ，フレコンラップ）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，国産子実用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を目的とした。約40℃で通風を行う国産循環式乾燥機と約70℃で通風を行う外国製高温高速乾燥機を用いることで，２つの温度水準での乾燥を行った。

①異なる温度（40℃と70℃）で乾燥した子実用トウモロコシの人工消化率は，乾物（DM），粗タンパク質（CP），総エネルギー（GE），リジンのいずれも差がなかった。②13%の水分含量の子実用トウモロコシのDMおよびCPの消化率はフレコンバッグで貯蔵したものが冷蔵やフレコンラップで貯蔵したものより低く，冷蔵およびフレコンラップで貯蔵したものは貯蔵前と消化率の違いはなかった。一方で，９％の水分含量の子実用トウモロコシのDM，CPおよびリジンの消化率は貯蔵方法の違いによる影響は受けず，貯蔵前と消化率の違いはなかった。以上から，国産子実用トウモロコシの栄養価を低下させることなく豚に給与するには，低水分まで乾燥した国産子実用トウモロコシを使用すること，また品質の低下を防ぐためには冷蔵あるいはフレコンラップで貯蔵する必要が示唆された。

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.

© The Ito Foundation

多頭飼養の牛群において反芻を含む行動型判別を可能とする映像モニタリング技術の開発

Development of video monitoring system for cattle herds that enables the discrimination of type of behaviour including rumination

多　田　慎　吾

（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構北海道農業研究センター）

Shingo Tada

（Hokkaido Agricultural Research Center, NARO）

In this study, we developed the video monitoring system for cattle herds that enables the discrimination of type of behaviour including rumination. Using the video data acquired by the network camera, more than three thousand images of a cattle were clipped and seventeen keypoint positions of the cattle body in the image were annotated. Using the annotated data for deep learning, we developed an artificial intelligence model that can detect the keypoint position of the cattle body with high accuracy. Then, applying the developed model, the time-series information of the keypoint positions of each type of behaviour（“foraging”, “standing-ruminating”, “standing-idling”, “lying-ruminating” and “lying-idling”）were obtained. Using these data, we developed the support vector machine model that enables the discrimination of type of behaviour. When applying the model for the videos that mouth of cattle was visible, the accuracy rate of the discrimination among “foraging”, “standing” and “lying” was close to 90%, and the accuracy rate for discrimination between “ruminating” and “idling” when the cattle were “standing” or “lying” was about 70%. Furthermore, we presented a video analysis system that can executes discrimination of type of behaviour for multiple individuals of cattle simultaneously.

1．目　　的

肉用牛生産においては，アニマルウェルフェアのレベルを維持しつつ，採食や休息といった個体維持行動が正常に保たれるよう飼養管理することが求められる。これには日常的に各個体の行動を把握することが重要である。飼養頭数が中規模程度であれば，各個体に目が行き届きやすく，異常が生じた場合でも早期対応を図ることができる場合も多い。しかしながら，肉用牛飼養戸数の減少傾向に伴い，近年１戸当たり飼養頭数は大きく増えている。飼養頭数の大規模化に伴って群飼肉用牛の行動把握および個体ごとの精密な飼養管理がより困難な状況となっており，異常発見の遅れや症状の重篤化，その対処に伴う労力の増加を招くケースも多い。

このような課題を解決する目的で，近年，ウシを対象とした映像解析に基づく行動モニタリング技術が開発されつつある[1～5]。同様の目的のものにウシに万歩計や加速度計のようなウェアラブル

© The Ito Foundation

センサを装着し行動データを収集する手法もあるが，映像解析に基づく手法はカメラさえ設置すれば各個体へセンサを取り付ける費用や労力が生じないため，低コストかつ省力的なシステムとして実用化が期待されている。一方，これまで提案されている映像解析による手法は，主に滞在場所や行動量の把握を目的とするものであり，反芻行動を含めた行動型を把握できるものは存在していない。行動型の中でも特に反芻行動は，飼料摂取量をはじめ各種疾病の徴候や回復状態，あるいはストレス状態を反映するバロメーターとなる有用な情報となるため，これを把握できるウェアラブルセンサシステムにおいての明確な優位点となっている。

そこで本研究では，映像解析により反芻行動を含む行動型把握を可能とすることを目的として，近年ヒトを対象として研究が進んでいる，1）深層学習手法による画像からの関節位置キーポイント検知技術のウシへの応用と，2）そこから得られる情報の時系列解析による行動型判別技術の開発に取り組む。そして，3）これらと調査者が開発を進めている牛群映像解析技術[3, 4]を組み合わせ，多頭飼養の肉用牛各個体の行動型を自動かつ同時に把握できる映像モニタリングシステムを構築することを目的とする。本成果により，コストが高くなりがちなウェアラブルセンサを利用することなく，省力的かつ容易に多頭飼養肉用牛の精密個体管理を可能とする飼養管理者補助システムを提供することを目指す。

2．方　法

本研究では，農研機構北海道農業研究センターおよび協力農家の放し飼い方式の搾乳牛牛舎に設置の複数の撮影条件の有線LAN接続ネットワークカメラからのべ約25ヵ月分の映像データを取得，蓄積し，これを用いた。さまざまな撮影位置および角度からの映像を利用することで，ウシの映り方によらない汎用性の高い行動型判別技術を開発することを目的とした。取得された映像はネットワーク経由でネットワークディスクレコーダー（Panasonic社，WJ-NX200）に記録し，同データをハードディスクドライブに保存して，パーソナルコンピュータでの解析に供した。

2.1　牛体画像を対象としたキーポイント検知モデルの開発

取得した牛舎映像データを基にウシ1頭が映る範囲を画像として切り出し，合計3,438枚の画像データを得た。画像の切り出しは，画像・映像処理用の計算ライブラリであるOpenCV（https://opencv.org/）を用いて行った。この大量のウシ画像について，牛体のキーポイント位置を指定するアノテーション作業を実施した（**Fig. 1**）。アノテーション作業にはCOCO Annotator（https://github.com/jsbroks/coco-annotator）を用いた。指定するキーポイントの数としては，ヒトの骨格検知の分野にて代表的なデータセットであるCOCO dataset（https://cocodataset.org/）でも用いられる計17点の設定が本研究の目的において

Fig. 1　An example of the keypoint annotation of cattle in this study.

© The Ito Foundation

も充分と考えたため，この設定を踏襲してウシの口元，左目，右目，左耳，右耳，左肩，右肩，左前肢踵，右前肢踵，左前肢蹄，右前肢蹄，左臀部，右臀部，左後肢踵，右後肢踵，左後肢蹄，右後肢蹄，の計17点についてアノテーションした。アノテーション画像のうち，3,127枚を画像キーポイント検知モデルの学習用データとし，残りの311枚は精度検証のためのテストデータとした。

画像からのキーポイント検知手法として，本研究ではHRNet[6]と呼ばれる手法を応用して牛体画像を対象に適用した。同手法は画像中の対象を検出した後に同範囲内でキーポイントを検知するトップダウン方式の手法であり，牛体範囲を検出する機能を有する映像によるウシ個体識別・追跡プログラム[3, 4]と親和性が高く，また，同方式の手法の中でも精度および計算速度が高い方法として知られている。本研究では，同手法のPython言語の公開プログラムコード（https://github.com/HRNet/HRNet-Human-Pose-Estimation）を自身の開発環境（Windows 10, Anaconda（https://www.anaconda.com/）を利用）にて実行し，上述のアノテーション済みデータセットを同モデルに学習させることで，牛体のキーポイント位置を検出できるオリジナルのモデルを作成した。機械学習のエポック数（一つの訓練データを繰り返して学習させる回数）は最大210回とし，最終的に得られたモデルを本研究のキーポイント検出モデルとして採用した。

上記で学習に用いなかったテストデータ311枚に対して，作成したモデルによるキーポイント検出を試行し，精度評価を行った。評価指標としてOKS（Object Keypoint Similarity）の閾値を0.5以上とした際のPrecisionとRecallを用いた。OKSとは，モデルにより検出されたキーポイント位置と正解の位置との類似度の平均の指標で，以下の式で計算される（1.0で完全一致，0.0で重なりなしを示す）。

$$OKS = \Sigma_i[\exp(-d_i^2/2s^2\kappa_i^2)\,\delta(v_i > 0)]/\Sigma_i[\,\delta(v_i > 0)]$$

d_i：検出されたキーポイント位置と正解の位置との距離，s：対象の全体の矩形領域面積，κ_i：定数（本研究ではヒトの骨格検出に採用される値を用いた），δ（$v_i > 0$）：正解データにてアノテーションされていれば１。

そして，Precisionはすべての検出のうち，OKSが0.5以上での予測に成功した割合を表す。また，Recallは検出されるべき総数のうち，OKSが0.5以上で検出できた割合を表す。

2.2　牛体キーポイント位置座標の時系列情報に基づいた行動型判別モデルの開発

取得した牛舎映像データを基に，判別を目指すそれぞれの行動型（“採食”，“立位反芻”，“立位休息”，“横臥反芻”，“横臥休息”）について，ウシ１頭が口元を含めて映っている15秒程度の動画ファイル（10フレーム／秒）を各15個以上，合計で120個切り出した（**Fig. 2**）。各行動型の動画について150秒分を精度検証用として，残りを学習用として用いた。これらの動画ファイルを対象に2.1で作成したキーポイント検出モデルを適用し，１フレームごとに各キーポイント位置データを取得した。

本研究では，牛体キーポイント位置座標情報に基づき，まず“採食”，“立位”，“横臥”のいずれの姿勢であるか判別し（段階１），“立位”もしくは“横臥”と判別されたものについて，“反芻”か“休息”かの判別を行う（段階２）方法をとった。予備検討から，段階１の姿勢の判別には，ウシの前半身の各キーポイント位置間の距離（口元と左肩，口元と右肩，口元と左前肢踵，口元と右前肢踵，口元と左前肢蹄，口元と右前肢蹄，左肩と左前肢踵，左肩と左前肢蹄，左前肢踵と左前肢蹄，右肩と右前肢踵，右肩と右前肢蹄，右前肢踵

© The Ito Foundation

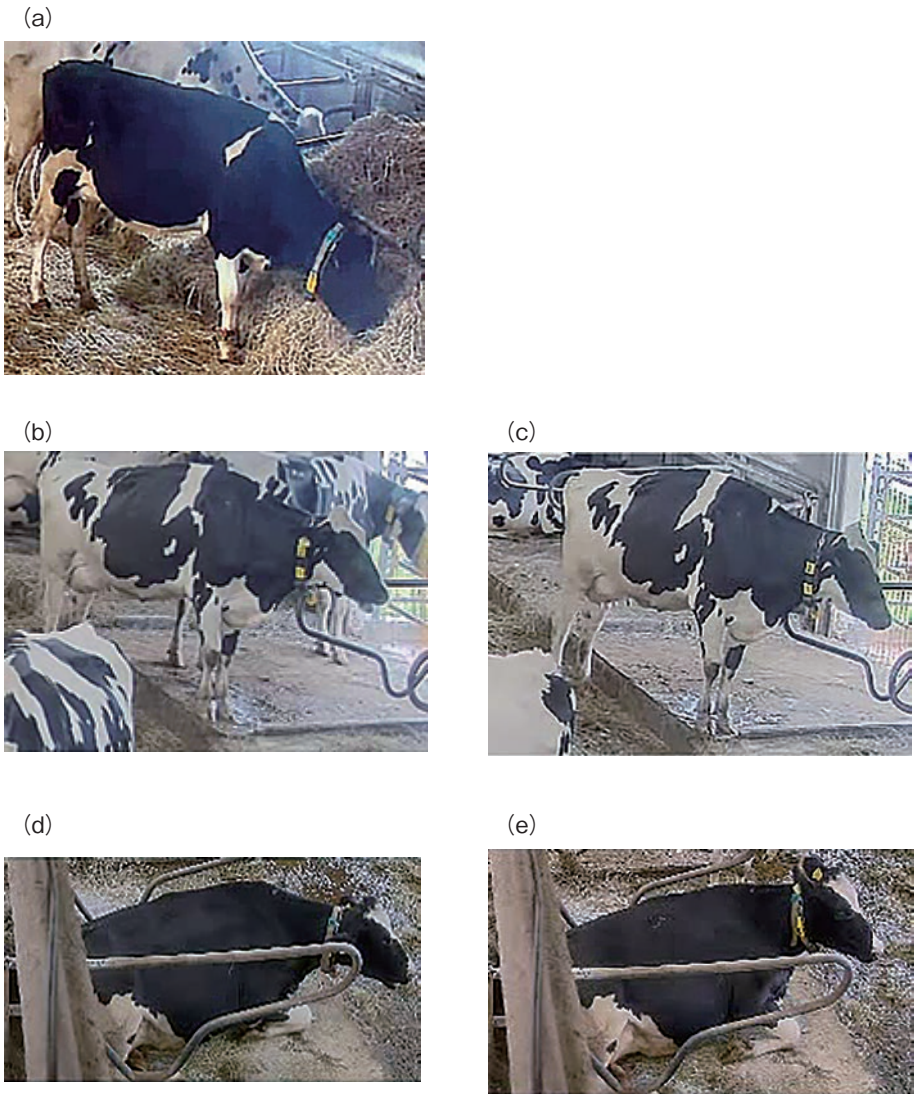


Fig. 2　Example of cattle images for each type of behaviour. (a) Foraging. (b) Standing-Ruminating. (c) Standing-Idling. (d) Lying-Ruminating. (e) Lying-Idling.

と右前肢蹄）計12個のパラメータを用いることとした。また，段階２の“反芻”か“休息”かの判別には，ウシの口元の動きを表すパラメータとして，過去１秒間（10フレーム）のフレーム間（0.1秒ごと）の口元の位置の距離変位の絶対値（n = 9）および合計，x軸方向の変位（n = 9）および合計，y軸方向の変位（n = 9）および合計，加えて段階１で用いた位置間の距離の，計42個のパラメータを用いることとした。これらのパラメータを入力として，段階１および２の判別を行うサポートベクターマシン（SVM）モデルをそれぞれ作成した。SVMモデルの作成にはPythonの機械学習ライブラリであるscikit-learn（https://scikit-learn.org/）を用いた。

2.3　映像による行動モニタリングシステムへの牛体キーポイント検知および行動型判別機能の実装

調査者が開発を進めているウシ個体識別・追跡

© The Ito Foundation

プログラム[3, 4]は，映像上に映る複数頭のウシ個体について同時に牛体範囲を検出する機能を有する。この牛体範囲検知ステップに，前項2.1，2.2で開発した牛体キーポイント検知および行動型判別機能を組み込み，多頭のウシの行動型を自動かつ同時に把握できるプログラムのコードを作成した。具体的には，対象のウシが１秒以上持続して同じ位置で矩形検出された場合に，キーポイント検知および行動型判別を実行し，判別結果を画面上に表示する構成とした。プログラミング言語にはPythonを用いた。

３．結果と考察

3.1　牛体画像を対象としたキーポイント検知モデルの開発

本研究にて作成した牛体キーポイント検知モデルの精度指標は，OKSの閾値を0.5以上とした場合，Precisionが90.8%，Recallが91.6%であった。Precisionの値はどれだけ正確にキーポイント検出できたかを示す。すなわち，すべての検出のうち，90.8%と非常に高い割合がOKS 0.5以上の検出であったこととなる。また，Recallの値は検出漏れの少なさを示し，検出すべき総数のうち91.6%をOKSが0.5以上にて検出できたことを意味する。このように本研究で作成したキーポイント検出モデルは，アノテーションした画面上に映るキーポイントに関して正確に検出可能かつ検出漏れも非常に少ないと考えられた。

3.2　牛体キーポイント位置座標の時系列情報に基づいた行動型判別モデルの開発

牛体キーポイント位置座標の時系列情報に基づく，“採食”，“立位”，“横臥”のいずれの姿勢であるかのSVMによる判別（段階１）の全体のAccuracy（正解率）は88.0%となり，高い確率でウシの姿勢の判別が可能であった（**Table 1**）。ただし，“横臥”を正しく判別できる確率は非常に高かったものの，“採食”と“立位”を誤識別するケースがやや多く認められた。これは判別のためのパラメータとして用いたウシの各キーポイント位置間の距離の，各姿勢間の差異程度を反映した結果と考えられた。

一方で，段階１で“立位”もしくは“横臥”と判別されたものについて行う“反芻”か“休息”かのSVMによる判別（段階２）については，“立位”の際の正解率が72.0%，“横臥”の際の正解率が71.3%にとどまった（**Table 2**）。本研究では“反芻”か“休息”かの判別には主にウシの口元の位置変化に関する情報を用いたが，ウシの首振りのような他の動作での口元の動きが誤判別の大きな要因と推察された。このような反芻でない動きのデータも蓄積し，判別モデルに反映させることで，さらなる精度向上が期待される。他方で，さらに精密に口元位置を検出できるモデルを作成し，反芻時の口元の細かな位置変化をより正確に捉えることで，判別精度を向上させられる可能性も考えられた。

Table 1　Confusion matrix of SVM for classifying “Foraging”, “Standing” or “Lying”.

		Predicted (sec)			
		Foraging	Standing	Lying	Recall (%)
True (sec)	Foraging	112	34	1	76.4
	Standing	29	254	5	88.1
	Lying	9	12	294	93.4
	Precision (%)	74.5	84.7	98.1	Accuracy (%) 88.0

© The Ito Foundation

Table 2　Confusion matrix of SVM for classifying “Ruminating” or “Idling” when the cattle was standing (a) and lying (b).

(a)

		Predicted (sec)		
		Ruminating	Idling	Recall (%)
True (sec)	Ruminating	121	55	68.8
	Idling	29	95	76.6
	Precision (%)	80.7	63.3	Accuracy (%) 72.0

(b)

		Predicted (sec)		
		Ruminating	Idling	Recall (%)
True (sec)	Ruminating	108	44	71.1
	Idling	42	106	71.6
	Precision (%)	72.0	70.7	Accuracy (%) 71.3

Fig. 3　Application example of video analyzing program for cattle herds that enables the discrimination of type of behaviour. “_R” measns “Ruminating”.

3.3　映像による行動モニタリングシステムへの牛体キーポイント検知および行動型判別機能の実装

本研究にて開発した技術を実装し，映像から各個体を検出する[3,4]とともに，各個体のキーポイント位置データに基づき行動型を判別するプログラムを作成した（**Fig. 3**）。これにより映像中の複数の個体について行動型を同時かつ自動で判別できる。しかしながら，実用のためには，行動型判別モデルの精度向上に加え，密集により映像上でウシが重なった際にキーポイント検出自体の精度が落ちてしまうほか，そもそも口元が映らない場合への対処，同じ位置にとどまっているウシしか対象とできない点の解決，取得する行動型データと各個体IDとの紐づけを可能とする高精度な個体識別技術の開発，幅広い撮影条件における開発技術の汎用性の検証，といった課題も多く，今後これらの技術開発に努める。

© The Ito Foundation

４．要　約

さまざまな撮影条件で取得した大量の牛舎内映像からウシ１頭が映る範囲を切り出した合計３千枚超の画像について，牛体のキーポイント位置をアノテーションした。これを機械学習に用いて，画像中の牛体のキーポイント位置を高精度に検出できるモデルを作成した。そして，同モデルを用いて取得される“採食”，“立位反芻”，“立位休息”，“横臥反芻”，“横臥休息”の各行動型のキーポイント位置の時系列変化を入力データとして，これらの行動型を判別するモデルを作成した。口元が映るウシの映像を対象に検証を行った結果，“採食”，“立位”，“横臥”の判別については９割に近い正解率で，“立位”もしくは“横臥”の際の“反芻”か“休息”かの判別については７割程度の正解率で判別が可能であった。さらに，以上の技術を開発中の牛舎内映像解析プログラムと組み合わせ，実用化に向けて課題はあるものの，映像中の複数の個体について同時に行動型判別を実行するシステムを提示した。

謝　辞

本研究は，農研機構北海道農業研究センターの山形麻利子氏，農研機構北海道技術支援センター第１業務科の職員諸氏，漆原牧場の漆原俊之氏のご協力のもと行われた。ここに記して感謝の意を表する。

文　献

１）　コンピューター総合研究所：牛の行動監視システム　MOH-CAL, https://moh-cal.com/［ホームページ］，2017.
２）　東京理科大学：北海道初！５ＧとAI技術による乳用牛の映像を用いた個体管理システムの実証実験を開始［プレリリース］，2019.
３）　農研機構：学習用データ生成装置，学習装置，行動分析装置，プログラム，及び記録媒体，特願2020-114316，発明者：多田慎吾［特許出願］，2020.
４）　農研機構：学習用データ生成装置，学習装置，行動分析装置，行動型分析装置，プログラム，及び記録媒体，特願2021-110070，発明者：多田慎吾［特許出願］，2021.
５）　Tassinari, P., Bovo, M., Benni, S., Franzoni, S., Poggi, M., Mammi, L. M. E., Mattoccia, S., Stefano, L. D., Bonora, F., Barbaresi, A., Santolini, E., Torreggiani, D.：A computer vision approach based on deep learning for the detection of dairy cows in free stall barn, *Computers and Electronics in Agriculture*, 2021.
６）　Sun, Ke., Xiao, B., Liu, D., Wang. J.：Deep High-Resolution Representation Learning for Human Pose Estimation, *CVPR*, 2019.

© The Ito Foundation

寒地型多年生牧草採草地が１年生イネ科草種（自生イタリアンライグラス―イヌビエ・メヒシバ）交代植生に遷移する気候・土壌要因の解明と飼料価値の評価

Climate and soil factors of succession from temperate perennial grassland to annual grassland and evaluation of the feeding value

池　田　堅太郎
（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）

Kentaro Ikeda
（Tohoku Agricultural Research Center, NARO）

Orchardgrass（*Dactylis glomerata* L.）, one of the primary temperate perennial grasses, is sown in the grasslands of Japan. However, due to recent global warming, orchardgrass is dying out. Orchardgrass vegetation is transitioning to alternate annual grass vegetation, in which native Italian ryegrass（*Lolium multiflorum* Lam）. and tropical annual grasses（barnyardgrass（*Echinochloa crus-galli*（L.））and southern crabgrass（*Digitaria adscendens*（H.B.K.）Henr）renovate and alternate with each other by natural reseeding. Therefore, the following tests were carried out in this study：1）Climatic conditions under which annual grass species alternate vegetation is distributed were analyzed using GPS data and mesh climate maps, 2）the yield and nutrition were evaluated for each cutting time and grass species. 3）the effects of summer cutting timing（second flush）and post-cutting nitrogen fertilization on fall（third flush）grass species composition in a meadow were investigated. The results showed that 1）annual grass species alternate vegetation was widely distributed from Tohoku to Kyushu, and was found in regions with little snow cover in March, 2）annual grass alternate vegetation had more dry matter yield than orchardgrass vegetation, and the TDN of annual grass was higher than that of orchardgrass. 3）Early harvesting of the second flush and nitrogen fertilization after the second flush were significant factors that weakened the orchardgrass community.

１．目　　的

わが国の採草地には，これまで，栄養価の高い寒地型多年生牧草が導入されてきた[1)]。しかし近年の温暖化により，オーチャードグラス（*Dactylis glomerata* L.）の著しい枯死が生じている[2)]。替わって，播種していないイタリアンライグラス（*Lolium multiflorum* Lam）（以下，自生イタリアンライグラス）が春～初夏に，暖地型１年生イネ科草種（イヌビエ（*Echinochloa crus-galli*（L.）とメヒシバ（*Digitaria adscendens*（H.B.K.）Henr））が夏～秋に優占する植生（以

© The Ito Foundation

下，１年生イネ科草種交代植生）へと急速に遷移している。１年生イネ科草種交代植生を構成するイタリアンライグラス，イヌビエ，メヒシバは牛の嗜好性が良好なため，収量と栄養価がオーチャードグラスに匹敵すれば，わが国の気候に適応した省力的かつ持続的に生産可能な粗飼料として期待できる。

そこで本研究では，１）１年生イネ科草種交代植生の乾物収量と栄養価を評価し，２）分布地域に共通する気候条件を解明し，３）自生イタリアンライグラスの雪腐病抵抗性の差異を明らかにするとともに，４）夏季（２番草）の刈取時期と窒素施肥がイヌビエ・メヒシバとオーチャードグラスの種間競争に与える影響を調査した。

２．方　法

2.1　１年生イネ科草種交代植生の生産性の評価

１年生イネ科草種交代植生（構成草種は自生イタリアンライグラス，イヌビエ，メヒシバ）と，オーチャードグラス優占植生を，オーチャードグラスの草地管理指標[1]に準じて施肥と年３回の刈り取りを行い，１～３番草の草種ごとの乾物収量と栄養価（TDN，CP）を比較した。１番草は５月25日，２番草は７月19日，３番草は10月14日に１m^2，草高７cmで刈り取り，草種ごとの乾物収量と栄養価（TDN，CP）を各４反復で測定した。

2.2　分布地域に共通する気候条件の解明

北海道南部～北関東と九州の採草地において，初夏と初秋の年２回以上，草種別の冠部被度を１m^2コドラート法[3]で６箇所調査した。植生調査の結果から，初夏（１番草か２番草）で自生イタリアンライグラス（芒を有するライグラスをイタリアンライグラスと定義）が優占し，初秋（３番草）でイヌビエとメヒシバが優占する採草地を１年生イネ科草種交代植生とした。また，自生イタリアンライグラスが１年を通して優占する採草地を自生イタリアンライグラス単一植生とした。植生調査を行った採草地はGPS情報（緯度，経度，標高）を取得した。根雪期間の長さの指標として日本全土の３月の最深積雪深（cm）データを，３月の積雪のない温暖地においては年平均気温（℃）（国土数値情報ダウンロードサービス）をGIS（QGIS）により１km×１kmメッシュ地図を作成し，取得した自生イタリアンライグラス優占採草地のGPS情報をレイヤーとして重ねることで，１年生イネ科草種交代植生と気候条件の関係性を地図化した。

2.3　自生イタリアンライグラスの雪腐病抵抗性の差異

自生イタリアンライグラスが越冬するためには，積雪の間，雪腐病[4]に耐えられるかにかかっている。そこで採草地から採種した自生イタリアンライグラスと，雪腐病抵抗性が既知の市販品種を積雪地域（岩手県盛岡市：根雪期間80日）において圃場検定による３反復の比較を行った。

2.4　夏季の窒素施肥がイヌビエ・メヒシバとオーチャードグラスの種間競争に与える影響

夏季（２番草）の刈取時期（早刈，遅刈）と窒素施肥の有無（＋N，－N）の試験区を設けて，３番草の草種構成に与える影響を４反復で比較した。50cm×65cmのコンテナに市販の黒ボク土を詰め，10cm株のオーチャードグラスを４月に12株移植した。表層には盛岡市の１年生イネ科草交代植生の表土100ｇ（発生可能な埋土種子イヌビエ約900個・メヒシバ約1700個を含む）を散布した。施肥は化成肥料8-8-8を早春（８kgN/10a）と１番草収穫後（５kgN/10a）に行った。刈り取りは，１番草を５月21日に，２番草を早刈が７月15日，遅刈は８月４日に行った。２番草刈取後の窒素施肥は＋Nが尿素で５kgN/10aを施用し，

© The Ito Foundation

－Nは施肥無とした。3番草は9月24日に収穫し，草種ごとの乾物収量を測定した。

3．結果と考察

3.1　1年生イネ科草種交代植生の生産性の評価

Fig. 1 にオーチャードグラス区と1年生イネ科草交代植生区の番草ごとの乾物収量を示した。1年生イネ科草交代植生区の1番草は自生イタリアンライグラスが優占し，オーチャードグラスよりも高い乾物収量を示した（$p<0.01$）。2番草の優占種も自生イタリアンライグラスであったが，オーチャードグラス区と乾物収量に差は見られなかった。3番草はイヌビエとメヒシバが優占し，オーチャードグラス区の乾物収量と差はなかった。

Table 1 にはオーチャードグラス，自生イタリアンライグラス，イヌビエ，メヒシバの1～3番草ごとのTDNとCPを示した。1番草の自生イタリアンライグラスのTDNはオーチャードグラスより高く，CPはオーチャードグラスのほうが高い値を示した。2番草の自生イタリアンライグラスはTDNとCPともにオーチャードグラスが高かった。3番草のイヌビエとメヒシバのTDNはオーチャードグラスより低かったが，CPはイヌビエとメヒシバのほうが高かった。

1年生イネ科草交代植生の利点は，最も栄養価の高い1番草の乾物収量が多い点にある。1番草で重点的に高栄養牧草を確保するのに適した植生

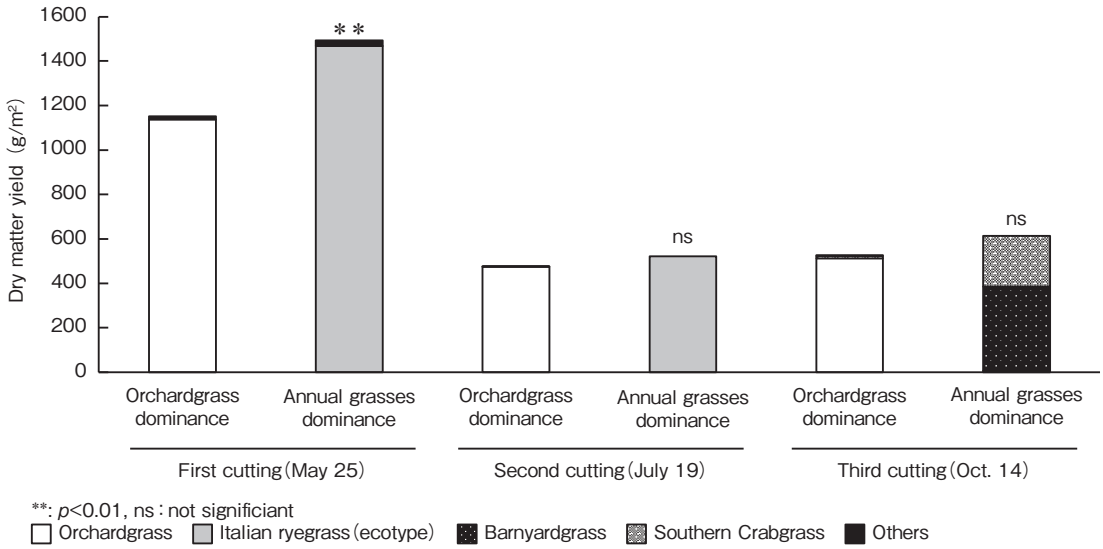


Fig. 1　Dry matter yield of Orchardgrass dominance vegetation and annual grass dominance vegetation.

Table 1　Nutritive value of Orchardgrass, Italian ryegrass (ecotype), Barnyardgrass and Southern crabgrass

		TDN (%)	CP (%)
First cutting (May 25)	Orchardgrass	59.5	17.4
	Italian ryegrass (ecotype)	61.0	12.6
Second cutting (July 19)	Orchardgrass	60.7	15.4
	Italian ryegrass (ecotype)	56.5	11.1
Third cutting (Oct. 14)	Orchardgrass	60.2	12.5
	Barnyardgrass	57.0	13.0
	Southern crabgrass	57.4	15.0

© The Ito Foundation

である。一方，オーチャードグラスの利点は１年を通じてTDN60前後で安定した栄養価の粗飼料を調達できる点にある。よって，１年生イネ科草交代植生を利用する場合は，高栄養の１番草を搾乳牛や肉用育成牛に，２番草と３番草は肉用繁殖雌牛に給与するのが望ましい利用方法であると考える。

3.2　分布地域に共通する気候条件の解明

Fig. 2 には自生イタリアンライグラス優占採草地と１年生イネ科草種交代植生採草地の分布ならびに，自生イタリアンライグラスの２倍体集団と４倍体集団の分布を示した。寒冷地の分布は３月最深積雪深（cm）を，温暖地の分布は年平均気温（℃）の平年値データをメッシュ地図に重ね合わせて表示した。寒冷地の自生イタリアンライグラス優占採草地は３月最深積雪深100cm以下の地域に分布していた。その中で，４倍体自生集団は30～100cmの地域に，２倍体自生集団は30cm未満の地域に分布していた。

雪腐病に弱いイタリアンライグラスにとって，根雪期間の長さに耐えられるか否かが，寒冷地で栽培するうえで重要な課題である[4]。本研究の結果から，寒冷地における自生イタリアンライグラスの生育分布は根雪期間により制限されていると考えられる。また，１年生イネ科草種交代植生採草地より，さらに高緯度地域にはイヌビエとメヒシバが生育できずに，自生イタリアンライグラスが１年を通して優占する単一植生が分布していることも明らかとなった。自生イタリアンライグラスの中で，４倍体集団は３月最深積雪深30～100cmの地域に分布していることから，自生イタリアンライグラスの２倍体集団と４倍体集団では，雪腐病抵抗性が異なるため，より長い根雪期間の地域に４倍体集団が分布したと考える。温暖地における分布は，阿蘇・くじゅうといった，比較的高標高の高原地域で確認された。ただし，調査できた地域が少なかったことから，西日本～九州における分布状況を把握するためには，さらな

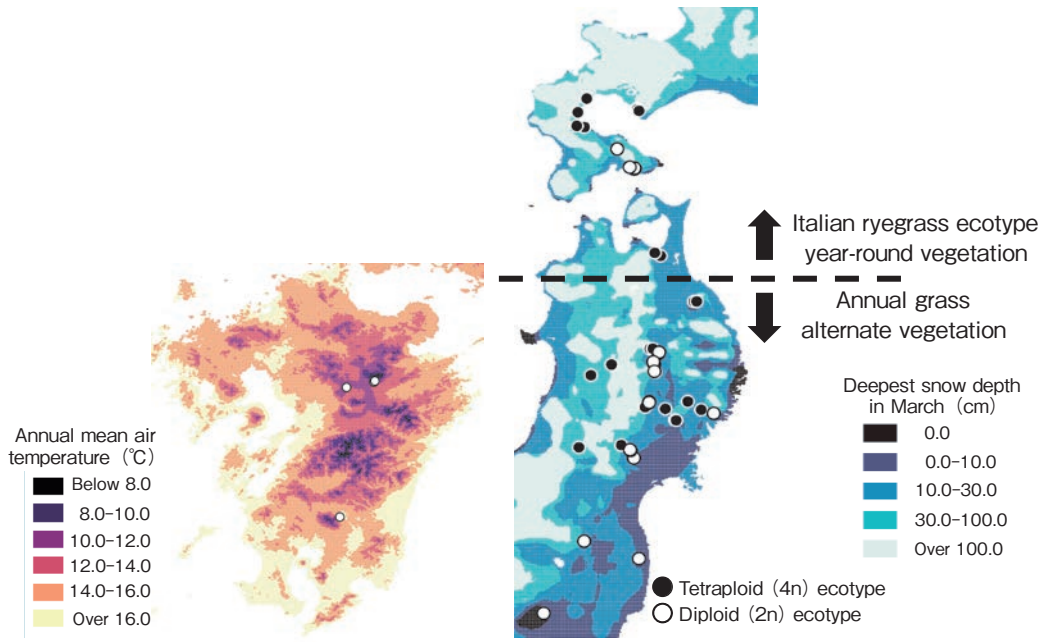


Fig. 2　Distribution of diploid and tetraploid ecotypes Italian ryegrass populations.

© The Ito Foundation

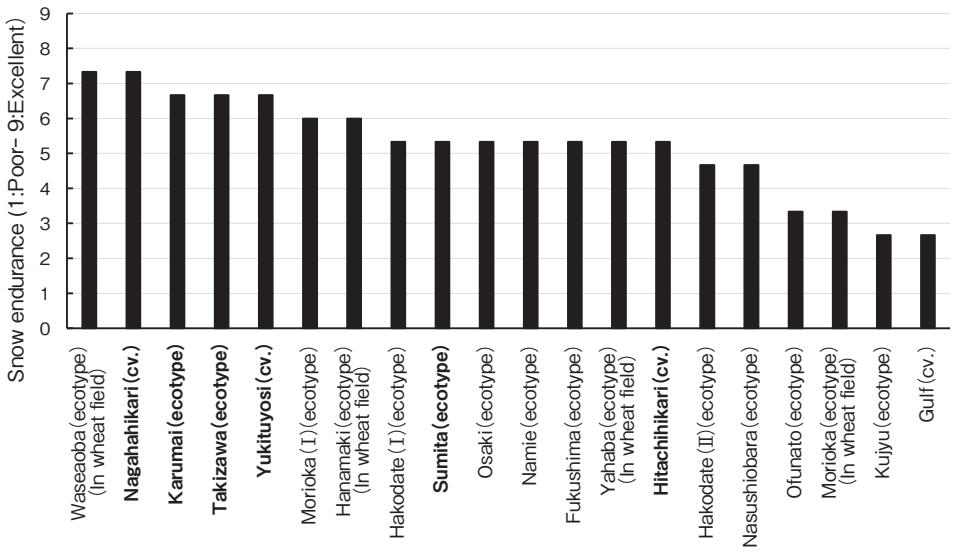


Fig. 3　Snow endurance of cultivars and ecotypes of Italian ryegrass.
Bold print is tetraploid and narrow is diploid Italian ryegrass.

る分布地域を明らかにする必要がある。

3.3　自生イタリアンライグラスの雪腐病耐性の差異

Fig. 3 には市販品種と自生イタリアンライグラスの雪腐病抵抗性を示した。4倍体（**Fig. 3** 太字）の自生集団は雪腐病抵抗性の高い市販品種と同等の抵抗性を示した。一方，2倍体自生集団は4倍体自生集団に比べて雪腐病抵抗性が低い傾向であった。倍数性による雪腐病抵抗性の差異が，寒冷地における2倍体と4倍体の自生イタリアンライグラスの分布地域に違いをもたらしている要因であると考える。

3.4　夏季の窒素施肥がイヌビエ・メヒシバとオーチャードグラスの種間競争に与える影響

Fig. 4 には2番草の刈取時期と2番草後の窒素施肥が3番草の草種構成に与える影響を示した。2番草の刈取時期を遅らせると，総乾物収量は大きく増加する。しかし，オーチャードグラスの乾物収量は変わらず，イヌビエとメヒシバが有意に増加した（$p<0.05$）。3番草の乾物収量は，2番草を早刈りし，2番草後に窒素施肥を行うと，総乾物収量は大きく増加した（$p<0.05$）。しかし，オーチャードグラスの乾物収量は最も低かった（$p<0.05$）。一方，2番草の刈取時期を遅らせ，窒素施肥を行わないと，総乾物収量は少ないが，オーチャードグラスの乾物収量は高い値を示した（$p<0.05$）。これまで採草地の牧草は，高栄養の粗飼料を得るために早刈りし，高収量を得るために施肥を行うことが推奨されてきた[1)]。夏季の草地管理方法がオーチャードグラス植生から1年生イネ科草種交代植生へ遷移させている要因の1つと考えられる。

以上のことから，1年生イネ科草種交代植生は，東北～九州の根雪期間が短い地域に分布していること，オーチャードグラスよりも1番草の乾物収量とTDNが高いこと，2番草の早刈と2番草後の窒素施肥がオーチャードグラス植生から1年生イネ科草種交代植生への遷移を助長していることが明らかとなった。今後は本研究から得られた知見をもとに，気象データを用いたメッシュ地図を作成し，1年生イネ科草種交代植生の分布地

© The Ito Foundation

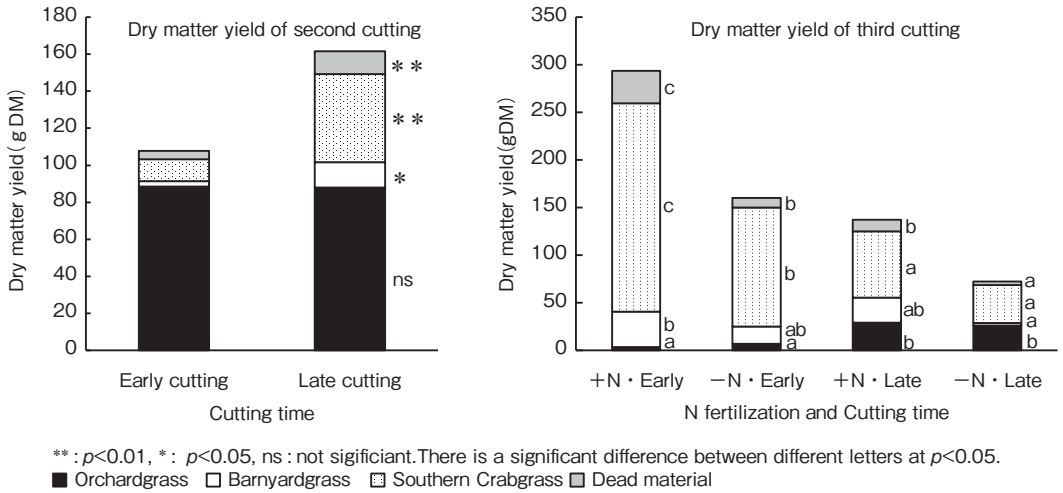


Fig. 4　Effect of cutting time and N fertilization on dry matter yield of different grass species in summer (second cutting)

域を予測することで，全国の広範囲におよぶ分布を明らかにする必要がある。

4．要　約

都府県の採草地では寒地型多年生牧草のオーチャードグラスが播種される。しかし，近年の温暖化により，オーチャードグラスが枯死し，替わって自生のイタリアンライグラスと暖地型１年生イネ科草種（イヌビエとメヒシバ）が自然下種により，交互に入れ替わる植生（１年生イネ科草種交代植生）へ遷移が発生している。そこで本研究では，本植生が分布する気候条件をGPS位置情報とメッシュ気候地図により明らかにし，番草と草種ごとの収量と栄養価を評価した。さらに，採草地の夏季（２番草）の利用方法の違いが秋季（３番草）の草種構成に与える影響を調査した。その結果，１年生イネ科草種交代植生は岩手県北部から九州の広範囲に分布していること，オーチャードグラス採草地よりも乾物収量が多いこと，１番草のTDNはオーチャードグラスより高いこと，２番草の早刈と２番草後の窒素施肥がオーチャードグラスの衰退を助長することが明らかになった。

文　献

1）　農林水産省生産局：草地管理指標　草地の管理作業及び草地の採草利用編，40～90，日本草地種子協会，東京，2018.
2）　樽見恵梨奈・築城幹典・森昭憲：システム農学，34(1)，7～15，2018.
3）　日本草地学会：草地科学実験・調査法，185～221，全国農村教育協会，東京，2004.
4）　田瀬和浩・小林真：日本草地学会誌，40(3)，246～256，1994.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Verification of the effect of feed supplemented with mass－producible oligosaccharides on the improvement of intestinal flora in livestock（Ⅱ）

西本　　完[1]・小林　寿美[2]・大津　晴彦[2]

（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]畜産研究部門）

Mamoru Nishimoto[1], Hisami Kobayashi[2] and Haruhiko Ohtsu[2]

([1]Food Research Institute, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO)

In the previous year's study, we found that ryegrass seed composition increased the body weight of chicks. In this study, to confirm the reproducibility of the effect and to verify the amount of ryegrass seed composition necessary to achieve the same effect, we conducted a feeding test using Chunky, a representative meat breed, using a larger breeding scale and reducing the amount of ryegrass seed composition by half. In addition, the effect of ryegrass seed composition on the intestinal microflora was also verified by conducting a microflora analysis of the digestive tract contents collected in the previous year's second feeding test. Moreover, the oligosaccharide loliose, which is considered to be the active ingredient of the ryegrass seed composition, was tested for microbial metabolization using the genus of *Bifidobacterium*. The results of these study showed that the ryegrass seed composition significantly increased the body weight of chicks even when the amount of ryegrass seed composition was reduced by half, and that a type of lactic acid bacteria known as a useful bacterium characteristically increased its occupancy rate in the ryegrass seed composition feed. Therefore, it was found that the ingestion of the ryegrass seed composition had an effect of increasing body weight and improving the intestinal microflora. It was also found that many bifidobacteria grew well in the medium with loliose as the only carbon source. This suggests that loliose could be used as a selective growth reagent for useful intestinal bacteria. Further studies are needed to determine what linkage exits between these effects.

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，いわゆる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[1)]。実際，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

© The Ito Foundation

わず販売されている。このため，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のだが，どれほど優れた機能性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の種類が限られている現状がある。

昨年度実施した新たな機能性素材候補の探索において，いくつかのオリゴ糖含有素材の中から，牧草栽培に用いられているライグラス種子より調製した組成物にニワトリヒナ増体効果があることを見出した[2)]。本効果はニワトリの出荷までの期間を短縮することで生産性向上に資するものであり，生産者の収益向上にもつながる。本組成物はライグラス種子を原材料としていることから，栽培面積を拡大することで容易に生産量を増大でき，生産コストも高価ではないという利点がある。

そこで本研究では，このライグラス種子組成物を早期に実用化するために必要なデータ，異なる鶏種での有効性，最少有効量の検証，および給与によって選択的に増殖した腸内細菌の同定等を実施した。また，ライグラス種子組成物中の有効成分と目されるオリゴ糖「ロリオース」は，1958年にライグラス種子に存在することが報告されたものの[3)]，その後の研究例は糖の構造解析[4)]や耐乾燥性とは無関係[5)]，という数報しかなく，生合成機構や植物体にとっての生理的役割などに関する研究例は少ない。そこで今回，ロリオースのオリゴ糖自体の健康機能性を探るべく，前年度の給与試験において採取した消化管内容物中の腸内細菌叢を解析するとともに，グラム単位で調製したロリオース標品を用い，それを添加した培地でビフィズス菌を培養することで，その資化性についても検証を行った。これにより，ロリオースと増体効果との関連性を評価するための足掛かりになればと期待している。

2．方　法

2.1　種子組成物の調製

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，給与試験に用いる種子組成物を以下のとおり調製した。種子は，低速撹拌によるもみすりを行った後，超遠心粉砕機（ZM-100，レッチェ社）にて，１mmメッシュのスクリーンで粉砕した。また，ロリオース含有量を高めるため，粉砕後に180 μmのふるいを通過した微細な画分を除去したものをライグラス種子組成物として用いた。また，エンバクは農研機構で育成された「たちあかね」をライグラス種子組成物と同様に調製した。

2.2　ロリオース標品の調製

微生物培養試験に用いるロリオース標品を上記ライグラス種子組成物から既報[6)]に従って以下のとおり精製した。400 gの種子組成物に1.6 lの80％（v/v）エタノールを加えオリゴ糖画分を抽出した。懸濁液をろ過によりろ液と沈殿に分画後，沈殿に対して再度1.6 lの80％（v/v）エタノールを加え再抽出した。得られたろ液（３l）をエバポレータで１lまで濃縮後，1.4 lの水を加えてろ過することにより水に不溶性の画分を除去した。得られたろ液を精密ろ過（PMP003膜，旭化成），および限外ろ過（SLP0053膜，旭化成）により分子量10,000以上の夾雑物を除去した。また，得られたろ液（1.6 l）にDEAE-セルロース担体を加えて撹拌しろ過することで，負電荷の夾雑物を担体に吸着させ除去した。得られたろ液（2.2 l）をエバポレータで50 mlまで濃縮し，ゲルろ過（担体TOYOPEARL HW40S，東ソー，カラム径φ５㎝，高さ90 ㎝）に供し，ロリオース画分を回収した。回収画分を濃縮・凍結乾燥することにより，純度95％以上のロリオース標品3.0 gを得た。

© The Ito Foundation

2.3　第三次給与試験

本研究は前年度からの継続研究課題であることから，各給与試験の名称を通し番号で識別できるよう，前年度の第一次・第二次給与試験に続き，今年度は第三次・第四次給与試験と称することとした。また，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ている。

15日齢の横斑プリマスロック種の雄ヒナを試験に供し，各区５羽（単飼），計20羽を用いて試験を行った。試験区は，日本飼養標準の卵用鶏育成期幼雛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**）を給与した①対照区，2.1に記述したように粉砕・製粉したライグラス種子組成物を50％配合した②ライグラス50％区（**Table 1**），対照区とライグラス50％区を等量混合した③ライグラス25％区，エンバク種子組成物を50％配合した④エンバク（Oats）50％区の合計４区を設け，14日間の飼養試験を行った。

2.4　第四次給与試験

ブロイラー（チャンキー）初生雛160羽を供試

Table 1　Composition of experimental diet

	Control diet	Seed (50) diet
Ingredients, %		
Corn	65.73	21.00
Dehulled ryegrass seed	−	50.00
Soybean meal	31.14	16.10
Corn gluten meal	−	4.00
Vegetable oil	−	5.00
Dicalcium phosphate	1.27	1.50
Calcium carbonate	1.22	1.05
Sodium chloride	0.34	0.35
L-Lysine-Cl	−	0.35
DL-Methionine	−	0.15
L-Threonine	−	0.10
Vitamin mixture	0.20	0.20
Mineral mixture	0.10	0.10
Chromic oxide	0.10	0.10
Calculated value（%）		
Metabolizable energy（kcal/g）	2.90	2.90
Crude protein	19.01	19.03
Calcium	0.87	0.88
Total phosphorus	0.62	0.64
Non-phytate phosphorus	0.40	0.40
Methionine + Cystine	0.61	0.52*
		*Content in seeds unknown
Lysine	1.06	1.05
Threonine	0.73	0.73

© The Ito Foundation

して給与試験を行った。これまでの試験と比較するため，①対照区，②ライグラス50％区，③ライグラス25％区においては第三次給与試験と同様の飼料を調製し，さらに，対照飼料にフラクトオリゴ糖（富士フイルム和光純薬株式会社）を３％添加した④フラクトオリゴ糖添加区（FOS）を試験として設けた（ただし，すべての飼料において酸化クロム不含）。それぞれの試験区に，１群10羽４反復の計40羽ヒナを配置し，23日間の飼養試験を行った。飼料摂取量は各群について試験期間中の摂取量を測定し，１羽あたりの量を算出した。試験終了時に，すべての鳥の体重を測定し，群の体重の平均値および１羽あたりの試験期間中の飼料摂取量を用いて増大量，飼料効率を算出した。

2.5　腸内細菌叢解析

前年度に実施した第二次給与試験における供試ヒナの腸内細菌叢解析を行った。給与試験後に採取した盲腸内容物をただちにDNA保存試薬（DNA/RNA Shield，ザイモリサーチ社）中で懸濁し，－20℃で保存していた懸濁液からDNA抽出キット（QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit，QIAGEN社）を用いてメタゲノムDNAを調製した。得られたDNAの16S rRNA領域を増幅させ，その塩基配列を次世代シーケンサーで解析を行い，データベースに対する相同性検索および系統分類解析により，各微生物目の占有割合を評価した。

2.6　ロリオース資化性試験

昨年度のオリゴ糖資化性試験で用いた*Bifidobacterium*属細菌の基準株について，これらのロリオースに対する資化性を検討した。なお，2.1で調製したロリオース量の制約により，単離源が家畜である９菌種を用いて培養試験を行った。使用した培地は昨年度と同様に，前培養用の培地[2)]を用いて24時間嫌気条件で前培養した後，糖源フリー基礎培地[2)]にロリオースを最終濃度１％（w/v）添加した条件にて72時間嫌気条件下で培養した。ネガティブコントロールとして糖質無添加区（none），ポジティブコントロールとしてグルコース添加区（Glc），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（FOS）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　第三次給与試験

本試験においては，増体効果を示すライグラス種子組成物の有効量を検証するため，飼料に配合する量を従来の50％から25％に半減させた飼料を給与した区を設け，試験を行った。さらに，これまでライグラス種子給与により得られた増体効果がロリオースを含有する種子に特異的な効果であるかを検証するため，同じイネ科の牧草でロリオースを含まないエンバク種子組成物を配合した飼料を給与したエンバク50％区における検証もあわせて行った。本第三次給与試験の飼養成績を**Table２**に示す。その結果，①対照区での14日間の平均増大量は227 gであるのに対し，②ライグラス50％区では248 g，③ライグラス25％区では258 gとなり，高い値を示すものの，統計的な有意差は見られなかった。その要因の一つとしては，供試個体数の少なさによるばらつきがあげられる。また，④エンバク50％区では平均増大量は222 gとなり，①対照区とほぼ同等の成績であった。次の第四次給与試験ではロリオースの作用をさらに詳細に検討するために，オリゴ糖の対照区として，フラクトオリゴ糖添加区を設定することとした。

3.2　第四次給与試験

第三次給与試験において，体重の増加傾向は認

© The Ito Foundation

Table 2　Effect of feeding ryegrass seeds on growth performance in chicks

Third trial				
	Control	Ryegrass（50）	Ryegrass（25）	Oats（50）
Body weight gain（g/14 days）	227 ± 8	248 ± 13	258 ± 9	222 ± 14
Feed intake（g/14 days）	569 ± 13^{ab}	563 ± 24^{ab}	620 ± 21^{a}	507 ± 20^{b}
Feed efficiency	0.399 ± 0.008	0.441 ± 0.012	0.417 ± 0.009	0.442 ± 0.033
Fourth trial				
	Control	Ryegrass（50）	Ryegrass（25）	FOS
Body weight gain（g/23 days）	630 ± 14^{b}	777 ± 6^{a}	722 ± 24^{a}	624 ± 21^{b}
Feed intake（g/ 23 days）	1275 ± 32^{ab}	1386 ± 19^{a}	1340 ± 29^{ab}	1225 ± 33^{b}
Feed efficiency	0.495 ± 0.003^{b}	0.561 ± 0.004^{a}	0.539 ± 0.010^{a}	0.509 ± 0.007^{b}

Mean ± S.E., n=5（Third trial）, n=4（Fourth trial）
Means within rows with no common superscript differ significantly（p<0.05）

められるものの，有意差までは得られなかったことから，供試個体数を大幅に増加させた第四次給与試験を実施した。また，飼育方法も単飼から，10羽１群の群飼に切り替え，さらに，供試種も卵肉兼用の横斑プリマスロックからより成長速度の速い肉用種のブロイラー（チャンキー）に変更した。設定した試験区は第三次給与試験と同様の①対照区，②ライグラス50％区，③ライグラス25％区に加え，プレバイオティクス効果を狙って添加される④フラクトオリゴ糖添加区，の４試験区であり，その飼養成績を**Table 2**に示す。その結果，対照区においては，平均増大量は630 gであるのに対し，ライグラス50％区では，777 g，ライグラス25％区では722 gと有意に高い値を示した。また，飼料効率も同様に，ライグラス50％，ライグラス25％区で対照区に比べ，有意に高くなった。以上のように，ライグラスの25％配合においても，50％配合と同様の有意な増体効果，および飼料効率の向上が確認できた。一方，一般的なプレバイオティック素材であるフラクトオリゴ糖添加区では対照区と比較して目立った変化は認められなかった。以上のことから，ライグラス種子組成物によるニワトリ雛増体効果の再現性を確認するとともに，従来の半量でも十分効果が得られること，ブロイラーにおいても同様の効果があることが示された。今後，段階的に配合量を少なく設定した試験を行うことで，新たな飼料素材としての実用化が期待される。

3.3　消化管内容物中の菌叢解析

前年度の第２次給与試験における飼養成績の結果を受け，対照区と増体効果が観察されたライグラス種子組成物50％配合区について，給与試験後に－20℃で保存していた消化管内容物よりゲノムDNAを抽出し，菌叢解析を行った。その結果を**Table 3**に示す。どちらの試験区も８割以上は「*Clostridiales*」であったが，ライグラス種子組成物50％配合区では，「*Lactobacillales*」の占有率が10倍以上高く，また，「*Enterobacteriales*」も２倍ほど高いという特徴があった。「*Lactobacillales*」にはいわゆる善玉菌とされる

© The Ito Foundation

Table 3　Microbial occupancy in gastrointestinal tract contents

Order	Occupancy (%)	
	Control	Ryegrass (50)
Clostridiales	89.83	82.03
Erysipelotricharles	8.16	6.94
Lactobacillales	0.60	9.06
Enterobacteriales	0.53	1.09
Coriobacteriales	0.45	0.64
Xanthomonadales	0.25	0.21
Bifidobacteriales	0.01	0.01
Other	0.18	0.01

Mean, n=5

Table 4　Growth of bifidobacteria in the presence of various sugars

Bifidobacterium species	Strain	Isolation source	Growth and Acid production from：			
			none	Glc	FOS	Lol
B. animalis subsp. *animalis*	JCM 1190T	Rat feces	−	+	+	+
B. thermophilum	JCM 1207T	Swine feces	−	+	+	+
B. boum	JCM 1211T	Rumen of cattle	−	+	−	−
B. pullorum subsp. *gallinarum*	JCM 6291T	Chicken cecum	−	+	+	+
B. merycicum	JCM 8219T	Bovine rumen	−	+	+	+
B. ruminantium	JCM 8222T	Bovine rumen	−	+	+	+
B. psychraerophilum	JCM 15958T	Porcine caecum	−	+	+	+
B. porcinum	JCM 16945T	Piglet feces	−	+	+	+
B. longum subsp. *suillum*	JCM 19995T	Piglet feces	−	+	−	+

乳酸菌類が多く属しており，それらの占有率の向上による腸内細菌叢の改善，ならびに健康増進が示唆された。今後，さらに詳細な解析により，占有率を向上させた菌種の同定が期待される。

3.4　ロリオース資化性試験

家畜を単離源とするビフィズス菌株９株に対して，精製したロリオース標品を添加した培地を用いて資化性試験を実施した。使用した菌種，菌株番号，単離源，および培養終了後における各菌株の培養上清の濁度およびpHから判断したオリゴ糖資化能を**Table 4** に示す。その結果，９菌株中８菌株がロリオースを唯一の炭素源として増殖可能であることが分かった。機能性オリゴ糖として知られるフラクトオリゴ糖（FOS）を添加した場合も同様の資化性（９菌株中７菌株）が観察されており，ロリオースもビフィズス菌に対して汎用的なプレバイオティクスとして有用であることが示唆された。一方，*B. longum* subsp. *suillum* JCM 19995TのようにFOSを資化することができないにもかかわらず，ロリオースに対する資化性を示す菌株が認められたことから，菌種による選択的な増殖促進剤としての利用価値についても示唆された。今回，調製したロリオース標品の量的な制約により，ビフィズス菌に対する資化性につ

© The Ito Foundation

いて，十分な検証ができたとは言えないが，家畜の消化管に由来する多くのビフィズス菌が利用可能である，という傾向を把握することができた。今後，ロリオース標品を大量に調製することで，前項で示唆された本組成物の給与により占有率を拡大させた「*Lactobacillales*」等，さまざまな微生物における詳細な資化性試験を実施していく必要がある。

以上，本研究の成果を基礎的知見とし，今後，ライグラス種子組成物給与による増体効果とロリオースによる腸内細菌叢改善効果との関連性を明らかにすることで，ニワトリにおける作用機序の解明，新たな飼料用素材としての実用化に取り組んでいきたい。

4．要　約

前年度の研究で，ライグラス種子組成物がヒナの体重を増加させることを明らかにした。今回，その効果の再現性を確認するとともに，同様の効果を得るために必要なライグラス種子組成物の量を検証するため，飼育規模を拡大するとともに，ライグラス種子組成物の量を半減させ，代表的な肉用種「チャンキー」を用いた給与試験を実施した。また，前年度の飼育試験で採取した消化管内容物の菌叢解析を行い，ライグラス種子組成物の腸内細菌叢への影響も評価した。さらに，ライグラス種子組成物の有効成分と目されるオリゴ糖「ロリオース」について，ビフィドバクテリウム属細菌を用いて微生物培養試験を行った。それらの結果，ライグラス種子組成物の配合量を半減してもヒナの体重が有意に増加すること，有用菌として知られる乳酸菌目腸内細菌がライグラス種子組成物配合飼料中で特徴的に占有率を拡大していることが明らかになった。このことは，ライグラス種子組成物の摂取による体重増加効果の再現性が示されるとともに，腸内細菌叢の改善効果があることを示唆するものである。また，ロリオースのみを炭素源とする培地では，多くのビフィズス菌が増殖可能であることが分かった。このことから，ロリオースを有用腸内細菌の選択的増殖剤として利用できる可能性が示唆された。今後のさらなる研究により，これらの効果にどのような関連性が存在しているかを検証することが重要である。

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） 西本完，山崎信，遠野雅徳：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，令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，公益財団法人伊藤記念財団，**39**，380～385，2021.

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） 西本完：イネ科牧草に含まれるα-ガラクトシド含有オリゴ糖の特性評価およびその利活用に向けた調製技術の開発，平成30年度年報　公益財団法人飯島藤十郎記念食品科学振興財団，**34**，243～247，2019.

© The Ito Foundation

子牛用疑似グルーミング装置利用モニタリングによる健康状態評価手法の開発

Development of health check system by monitoring usage frequency of mechanical grooming brush for calves

矢　用　健　一[1]・野　上　大　史[2]
（[1]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門，[2]九州大学）

Ken-ichi Yayou[1] and Hirofumi Nogami[2]
（[1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Kyushu University）

Usage of automatic grooming brush for calves had a lower priority than the desire for behavior such as eating and resting, and decreased quickly as the health condition deteriorated. For this reason, the purpose of this study was to enable monitoring of the use of this equipment in group raring and to use it as a health condition evaluation method.

A wireless 3-axis accelerometer was attached to 4 calves around the neck, and vibration during use of the device was measured. As a result of frequency analysis of this measurement signal, we found signal characteristics that appear only when the device is used, From these results, it was found that the brush usage time is an important index for judging the individual who used the brush. We proposed a new judgment system using the brush usage time and the acceleration sensor data of each individual, and applied for a patent.

Regarding the relationship between the frequency of use of the device and deterioration of health, daily records of 4 Holstein calves from birth to weaning, body temperature before feeding at 9 am, remaining feed amount, and the presence or absence of diarrhea and coughing. However, there was no deterioration in health that required medical treatment.

In the future, surveys should be targeting 1 to 2 weeks after the transfer to a group where frequent occurrence of diarrhea and pneumonia are problems, or early mother-child separation in Japanese black cattle for which mother-child separation immediately after birth is not customary. We would like to add more numbers while utilizing the brush usage time sensor applied for a patent.

1．目　　的

牛肉の国内需要の増加への対応と輸出の一層の拡大を目指すため，令和元年12月に，和牛の生産量を平成30年度の14.9万トンから令和17年度に30万トンに増やす政策目標が「農業生産基盤強化プログラム」の中で設定された[1)]。繁殖雌牛の増頭に主眼が置かれているが，出生した子牛の死廃率（現在優良農家で５％程度）を下げる対策も重要である。特に黒毛和種はホルスタイン種に比べて生時体重が小さいため免疫機能が劣っており，下痢，肺炎等による成長遅延，死廃の問題は，特に

© The Ito Foundation

増頭のための早期母子分離や乳牛への和牛ETにおいて大きく，早急に解決すべき課題である。

解決には子牛の健康状態把握が肝要であるが，増頭対策のために増えつつある“母牛から早期分離し哺乳ロボットで群管理するシステム”では健康状態悪化個体は目に見える症状が出て初めて発見されるため，治療にも時間を要し，死廃率も高くなる。“もの”のインターネット，IoTが畜産分野にも適用されつつあるが，採食量（哺乳量）の低下や，発熱の検知など，目に見える症状を検出することが目的であることがほとんどであり，それよりもさらに早期検出が可能な技術を新たに開発したいと考えた。

申請者は母牛が子牛に対して行う舐め行動（グルーミング）の代替となる子牛用疑似グルーミング装置を開発した（特許第6449028号）[2]。子牛はグルーミングを受けたいという体幹刺激への欲求が強く，多くの個体は１日20分程度，毎日一定の時間を装置利用に費やすことが分かっており，装置を利用することで日増体重の向上や，群からの離脱率の低減といった効果があることを明らかにしてきている。

本課題では，このシステムをさらに発展させて子牛の死廃率を２％台まで下げることを可能にする技術の開発を目指す。具体的には，採食や休息といった行動の欲求と比べてプライオリティが低いと考えられるグルーミングへの欲求は，健康状態の悪化に伴っていち早く減少するのではないかと予想しており，採食量（哺乳量）の低下や，発熱の検知など，目に見える症状の検出よりも早期に疾病発症の危険がある子牛を発見可能と考えている。早期に発見し，早期に治療が可能となることで，子牛の死廃率を低減するとともに，増体のよい強い素牛作りに貢献できる。また，早期治療が可能となることで，治療コストが低減できるとともに，薬剤，特に抗菌剤使用の低減によって環境に優しく安全安心な牛肉の生産にも貢献可能である。

２．方　　法

本研究は，（国研）農研機構の動物実験規定に基づき計画を立案し，同機構動物実験委員会の承認を得たうえで行った。

2.1　ブラシ利用時間センサの開発

無線式３軸加速度センサ端末を子牛の首周りに取り付け，装置使用時の振動を測定した。この測定信号の特徴を抽出し，装置利用時のみ現れる信号特性について明らかにした。その信号特性を利用したブラシ利用時間自動判定アルゴリズムを提案，その実現可能性を示した。

実験では，無線式３軸加速度センサ端末を複数頭（４頭）の子牛の首周りに取り付け，加速度を測定した（**Fig. 1**）。各センサのサンプリング周波数は50Hzであり，子牛の行動を計測するには十分であった。ブラシ使用時の状態と加速度を比較するため，カメラは子牛用疑似グルーミング装置の周囲に３台設置し動画撮影を行った。本条件にて，24時間の実験を２回行い，解析を行った。

2.2　センサの利用頻度と健康状態低下との関連解明

子牛用疑似グルーミング装置の１日あたりの利用頻度を調べるため，ブラシの回転数のカウンターを農研機構が所有する疑似グルーミング装置に取り付けた（**Fig. 2**）。近接センサでブラシの軸に取り付けた突起物を軸１回転につき１回カウントするシステムとした。

試験には農研機構で飼育しているホルスタイン種雌子牛４頭を用いた。出生直後からロール乾草を敷料とした個別のペン（1.2x1.5m）で飼育した（**Fig. 3**）。毎朝子牛の健康状態を確認するため，朝９時の哺乳前に体温，残飼量，下痢や咳の有無をチェックした。また，治療した場合にはその記

© The Ito Foundation

Fig. 1　The scene of the experiment using the neck type wireless 3-axis acc. Sensor nodes.

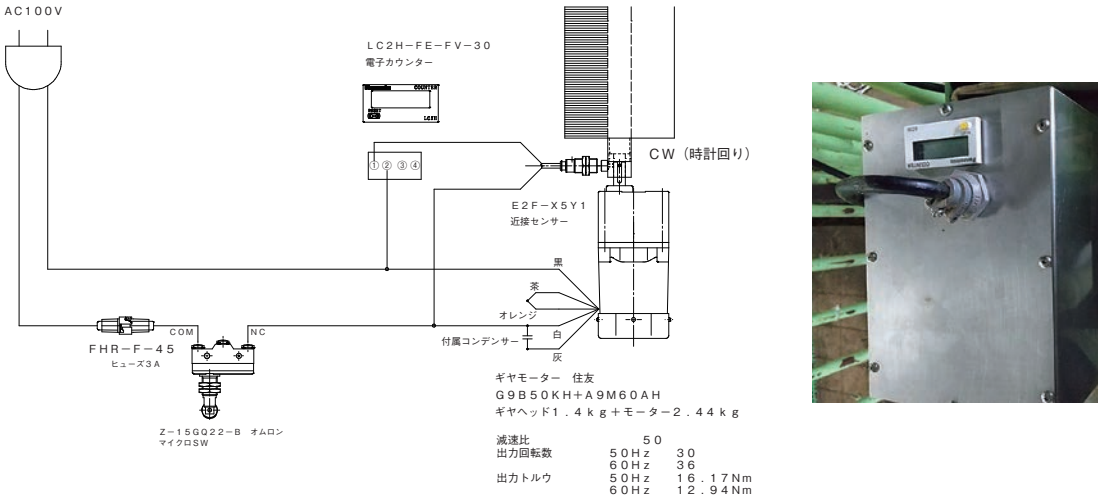


Fig. 2　The design drawing of the counter (left) and photo (right) that measure the brush rotation frequency of the automatic grooming device for calves.

Fig. 3　The scene of the experiment.

録も行った。その際，装置の利用頻度を前日24時間の値として記録した。

3．結果と考察

3.1　ブラシ利用時間センサの開発

動画解析からブラシを使用した個体および時間を判定し，その時の加速度について解析した結果，ブラシの使用前・中・後において，特に，ブラシを使用する前後において特徴的な加速度を示す場合が多いことが判明した（**Fig. 4**）。例えば，ブラシを使用する前はブラシへ歩行して接近するため，歩行による動加速度の変化が計測された。

© The Ito Foundation

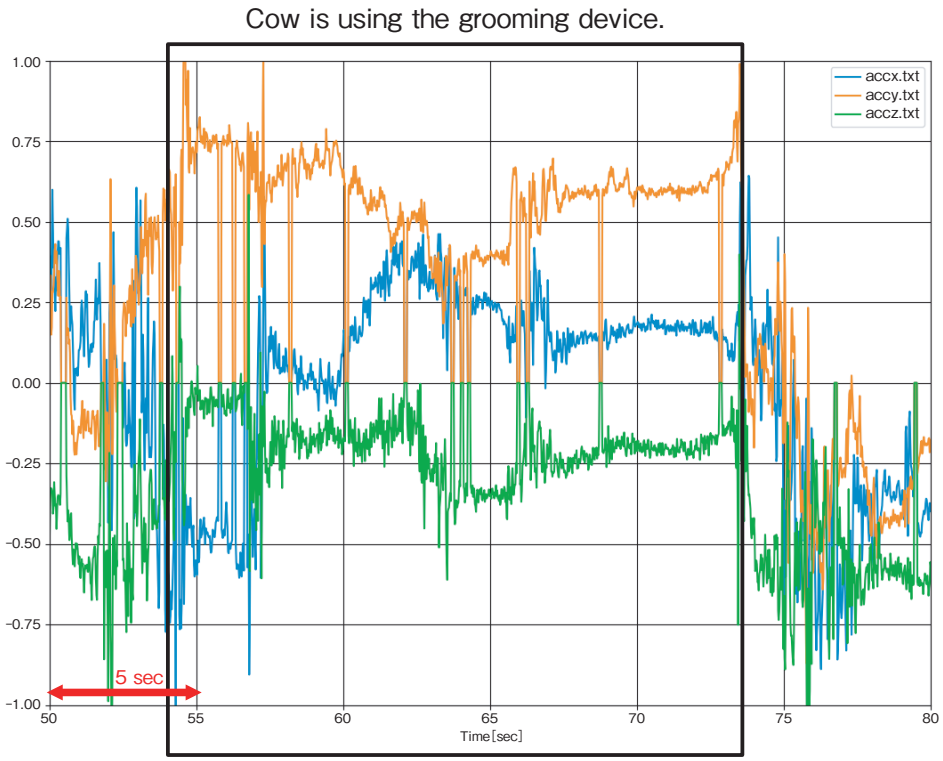


Fig. 4　Measurement result of the 3 axis acc. data when cow using the grooming device.

ブラシ使用開始時は立位・姿勢が保持された状態であり，動加速度の変化は小さく，また姿勢保持の特徴である静止加速度が一定時間変化しないことを確認できた。ブラシ使用終了時の前後でもこれらと同様の特徴を確認することができた。

Fig. 4 以外にも加速度とビデオ観察との比較を行い，グルーミング装置使用時刻そのものが判明している場合，ブラシ使用前・中・後のこれら特徴的な加速度を判別できることが確認され，ブラシ使用時刻，各個体の加速度センサデータを用いた，ブラシ使用個体・使用時間判定システムを新たに提案し，特許出願した（グルーミング情報収集システム，個体判別システム，データセットの生成方法，及び，個体判別方法　特願2022–79382）。現在，グルーミング装置使用時刻と各個体の加速度センサデータを用いた，機械学習（AI）を用いた個体識別アルゴリズムの試作を行っており，高精度でブラシを使用した個体を推定することが可能となる。

今後は，個体識別の高精度化（識別率90％以上）に向けて多様な教師データの収集を行う。例えば，グルーミング装置を使用した部位（頭，腹，耳，首など）やグルーミング装置と複数のウシの位置関係について，加速度データおよび撮影動画の解析を行い，明瞭な教師データを充実，これら教師データをAIに組み込み，個体識別の高精度化を実現する。

3.2　センサの利用頻度と健康状態低下との関連解明

調査した4個体それぞれの1日あたりの装置利用頻度と朝の体温を図に示した（**Fig. 5**）。すべての個体が生後1日目から装置を利用した（H

© The Ito Foundation

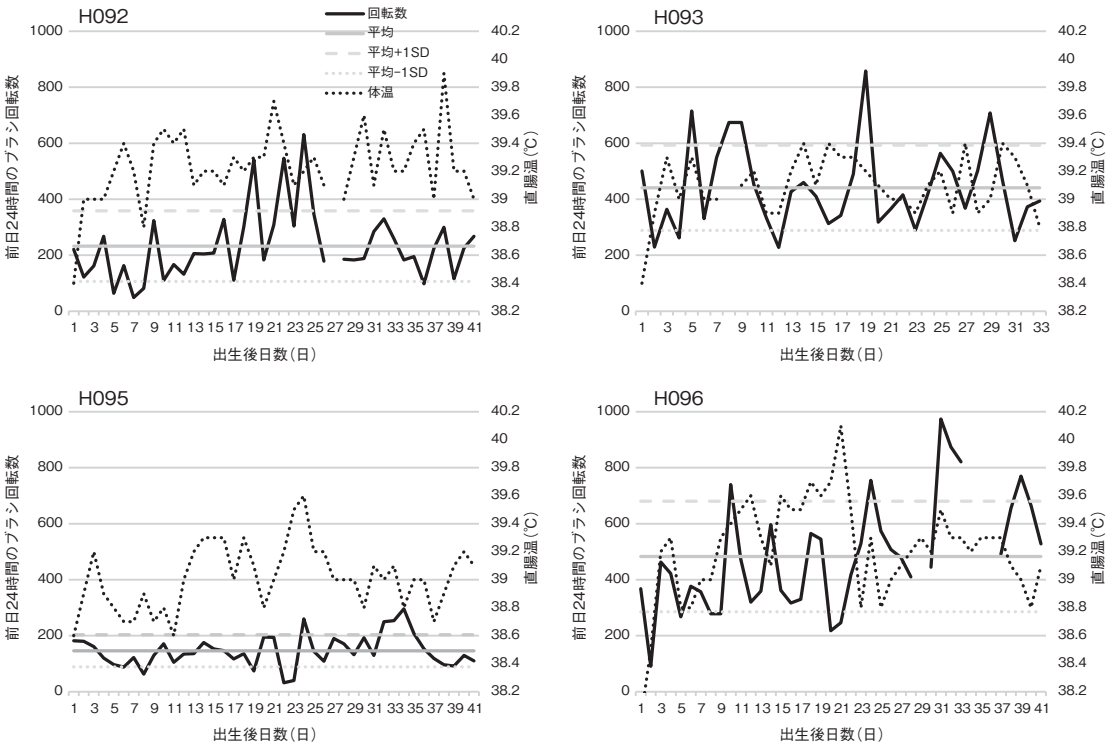


Fig. 5　Daily device usage frequency (solid line) and morning body temperature (dotted line) for each of the four surveyed individuals.

092：221回，H093：501回，H095：182回，H096：368回)。装置の利用頻度は，個体ごとに差が認められた（調査期間の平均値は，H092：232.6回／日，H093：441.0回／日，H095：146.1回／日，H096：474.1回／日)。標準偏差もそれぞれ，H092：26.0，H093：152.3，H095：57.3，H096：202.3と大きいものであったが，変動係数はH092：0.54，H093：0.35，H095：0.39，H096：0.43であり，利用頻度のばらつきに大きな差がないことが明らかとなった。したがって，個体によって利用頻度のレベルには差があるものの，出生後すぐに装置を利用し始めること，装置利用頻度は一定のばらつきの範囲で離乳まで推移することが明らかとなった。

すべての個体において調査期間中，食欲不振，下痢および咳といった疾病の兆候は認められなかった。体温はH096の生後21日のみ40℃を超える発熱が認められた。その前日および当日，つまり48時間前から平均値から標準偏差を除した値を下回る利用頻度の低下は認められたものの，その他の個体でも，体温の上昇を伴わない同様の利用頻度低下は認められた。したがって，今回の４頭の結果のみからでは，体調悪化の前段階として装置利用頻度低下が起こることを明らかにすることはできなかった。

例数が少なかったこともあるが，生後すぐに母子分離し，人工哺乳で飼育することが慣行化しているホルスタイン種であったことや，個別飼育によって社会的ストレスがなかったことなどが，健康悪化例が少なかった原因と考えられた。生後すぐの母子分離が慣行化していない黒毛和種子牛での早期母子分離や，下痢・肺炎が多発することが

© The Ito Foundation

問題となっている群飼移行後１から２週間を対象とした調査例数の追加を今後行っていきたい。特許出願した群飼におけるブラシ利用時間センサを活用し，取り組む予定である。

４．要　約

子牛用疑似グルーミング装置の利用は，採食や休息といった行動の欲求と比べてプライオリティが低く，健康状態の悪化に伴っていち早く減少すると考えた。このため，群飼における装置利用モニタリングを可能にし，健康状態評価手法とすることを目的とした。

複数の育成牛に無線式３軸加速度センサ端末を首周りに取り付け，装置使用時の振動を測定した。この測定信号の特徴を抽出し，装置利用時のみ現れる信号特性を明らかにした。これら解析結果からブラシ使用時刻そのものが，ブラシを使用した個体を判定するための重要な指標となることが分かり，ブラシ使用時刻，各個体の加速度センサデータを用いた，ブラシ使用個体・使用時間判定システムを新たに提案し，特許出願した（グルーミング情報収集システム，個体判別システム，データセットの生成方法，及び，個体判別方法　特願2022-79382）。

装置利用頻度と健康悪化との関係については，ホルスタイン種雌子牛４頭を出生直後から離乳までの間，朝９時の哺乳前の体温，残飼量，下痢や咳の有無を毎日記録したが，治療を要するような健康状態の悪化は見られなかった。

今後，生後すぐの母子分離が慣行化していない黒毛和種子牛での早期母子分離や，下痢・肺炎が多発することが問題となっている群飼移行後１から２週間を対象とした調査例数の追加を，特許出願した群飼におけるブラシ利用時間センサを活用しつつ行っていきたい。

文　献

１）　農林水産省：農業生産基盤強化プログラム，2020.
２）　矢用健一：子牛の疑似グルーミング装置及び飼育管理法，特許第6449028号，2018.

© The Ito Foundation

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（Ⅲ）

Colostral programming of physiological properties related to meat production（Ⅲ）

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）

Effects of oral selenium administration on growth and plasma immunoglobulin levels were examined in newborn sheep, however, no beneficial effect was observed. Relationships between colostral constituents, lamb's birth weight and average daily gain during suckling period were investigated in 30 pregnancies with 44 lambs born alive and 37 weaned lambs. Positive correlation was observed between colostral leptin and adiponectin, also between glucose and NEFA. Colostral cortisol and NEFA were negatively associated. Average daily gain during suckling period was positively correlated with colostral insulin and birth weight. A tendency toward positive association between colostral insulin and birth weight was observed. These results suggested that maternal nutritional status during gestation would reflect concentrations in colostral constituents and thus fetal and postnatal growth of their offspring.

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しうる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大き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による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有量に関する知見はきわめて少なく，産子の成長後の生理特性との関連を解析した研究はみあたらない。

本研究では，一昨年度に妊娠末期と哺育中の母めん羊の栄養制御を行う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

© The Ito Foundation

リンが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タンパク質レベルに反応して初乳中の濃度が変化する可能性が示唆された。そこで昨年度は，初乳中のインスリンが反芻家畜の産肉特性に長期的かつ不可逆的な代謝的プログラミングを引き起こす可能性を検討した。すなわち，出生直後のめん羊双子産子の一方に生理的レベルのインスリン（2.5 μg/kg生時体重）の経口投与を行い，その後の成長，飼養成績ならびに血中の代謝成分やホルモン濃度を調べたが，明らかな影響は認められなかった。

今年度は，新生子畜の強健性や発育に最も大きな影響を及ぼしている免疫グロブリンの吸収促進に有効とされるセレンの経口投与[9]の効果を検証するとともに，初乳中メッセージ物質の生理的意義の解明を目指して，本研究でこれまでに集積した初乳サンプル中のメッセージ物質の定量を行い，産子の発育データとの関連を解析した。

2．方　法

2.1　新生子めん羊へのセレンの経口投与試験

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収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%，イネ科乾草から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40%，イネ科乾草からは10%とした。

自然分娩で出生した産子11頭（単胎５腹，双胎３腹）のうち，５頭をセレン給与区，６頭を対照区に配置して，出生直後の経口セレン投与が産子の発育や血中免疫グロブリン濃度に及ぼす影響を調査した。３組の双胎同腹産子については一方をセレン給与区，もう一方を対照区とした。セレン給与区の子めん羊には，出生後できるだけ速やかに亜セレン酸ナトリウム水溶液（セレン0.06mg/ml）5ml，すなわちセレン0.3mgを，口腔内に到達する長さのシリコンチューブを装着したシリンジで経口投与した。対照区の子めん羊には処置しなかった。出生からセレン給与，ならびに初乳吸入介助までの時間は，単胎および双胎の各１腹は３～５時間と推定されたが，その他はおおむね２時間以内であった。産子は生時体重の測定の後，３，７，14，28および56日齢に体重測定を行い，１，３，７，14，28および56日齢に頸静脈血を採取して，血漿中の免疫グロブリン濃度をサンドイッチELISA測定試薬セット（Bethyl Laboratories）により定量した。

2.2　初乳成分と産子の発育との関係

上述の方式で交配し，周産期から哺育期の給与TDNレベルを統一した飼養管理を行った母めん羊が2018年から2021年の４年間に分娩したのべ30腹から分娩後できるだけ速やかに初乳サンプルを採取するとともに，哺乳中の産子の発育成績を調査した。初乳中のコルチゾール，インスリン，IGF-Ⅰ，レプチンおよびアディポネクチンを，ELISA測定試薬キット（Enzo Lifesciences，Mercodiaならびに Cloud Clone社製）で定量した。また，乳中のグルコースおよびNEFA濃度はFUJIFILM Wako社製の酵素法の測定キットで定量した。これらの初乳中濃度と産子の発育データとの相関係数を算出した。

3．結果と考察

出生直後のセレンの経口投与は，哺乳期めん羊

© The Ito Foundation

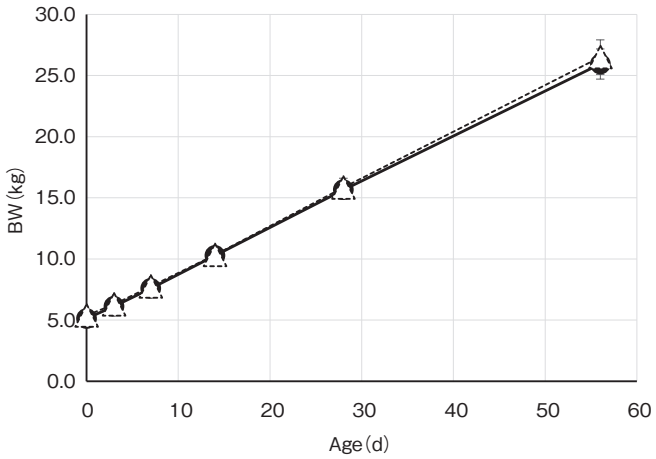


Fig. 1　Body weighs（BW）of lambs in either control（●；n=6）or Se administered（△；n=5）groups during suckling period.

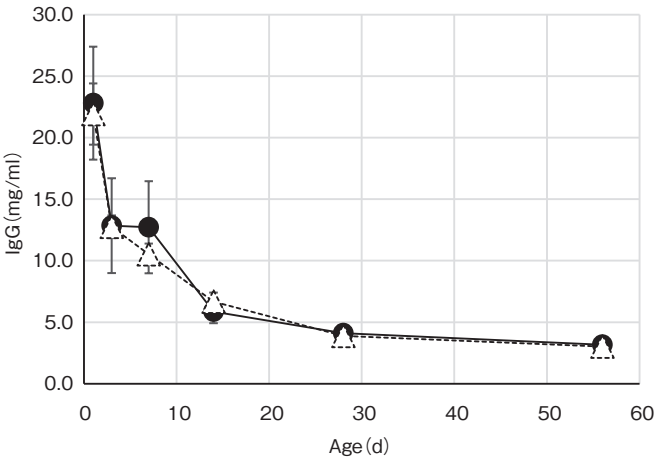


Fig. 2　Plasma IgG concentrations of lambs in either control（●；n=6）or Se administered（△；n=5）groups during suckling period.

産子の増体ならびに血漿中免疫グロブリン濃度には影響しなかった（**Fig. 1** および**Fig. 2**）。血漿中IgGだけでなく，IgMあるいはIgAのいずれにおいても，セレンの経口投与の効果は認められなかった。本研究で採用した出生直後の子羊へのセレン投与量0.3mgは，体重が約10倍程度大きい子牛で効果を認めた１頭あたりの投与量３mg[9]の10分の１として設定した。本研究においてセレン投与効果が認められなかった理由として，動物種の違い，両試験区の母めん羊のセレン摂取レベルや投与量の影響などが考えられるが，特定には至らなかった。妊娠末期の母畜へのセレン添加給与も含めて，今後の検討が待たれる。

Table 1 には，30腹の分娩で得られた出生時の生存産子44頭，自然哺育で56日齢の離乳を迎えた産子37頭を対象として，初乳中のメッセージ物質と代謝成分の濃度，産子の生時体重ならびに出生から離乳までの平均日増体量の間で算出した相関

© The Ito Foundation

Table 1 Correlation coefficients between colostral constituents, birth weight and average daily gain（ADG）during suckling period of sheep offspring.

	Insulin	IGF-1	Leptin	Adiponectin	Glucose	NEFA	Birth weight	ADG
Cortisol	−0.136	−0.152	−0.034	0.186	−0.097	−0.342 *	0.136	0.070
Insulin		−0.001	0.175	0.199	0.060	−0.107	0.284	0.211
IGF−1			−0.032	0.150	0.024	0.076	0.103	−0.027
Leptin				0.460 **	−0.192	−0.211	0.223	0.341 *
Adiponectin					−0.139	−0.117	0.034	0.160
Glucose						0.301*	−0.073	−0.105
NEFA							−0.129	−0.130
Birth weight								0.552 ***

*：$p<0.05$，**：$p<0.01$，***：$p<0.001$

係数を示した。初乳中成分間では，レプチンとアディポネクチン，ならびにグルコースとNEFAとの間に正の関係が認められた。また，コルチゾールとNEFAとの間には有意な負の相関係数が得られた。初乳中レプチンと哺乳中の平均日増体量との間で，また，生時体重と哺乳中の平均日増体量との間で，有意な正の相関係数が認められた。初乳中インスリンと生時体重との間にも，正の関連を示唆する相関係数が得られた（$p=0.06$）。

初乳中のIGF-1，IgGならびにビタミンAの濃度が出生後1ヶ月の哺乳子ヤギの増体と関連があるとする報告[10]やSGA（small-for-gestational-age）児の新生児期の急速な発育速度と初乳中のレプチンとインスリン濃度の常乳における急激な減少との関連を見出した報告[11]など，初乳中成分が産子の成長速度に影響しうることが明らかにされている。本研究においても，初乳中のレプチン濃度が哺乳中の増体速度と正の相関が認められた。また，有意ではないものの，初乳中インスリンと産子の生時体重との正の関連がみられたことから，初乳中のこれらのホルモンが産子の発育促進に関与する可能性が示された。めん羊においては，出生時点での発育が哺乳中の増体や損耗率低減に影響することはよく観察されるところであるが，本研究においても，生時体重と哺乳中の増体速度の間に高い正の相関が認められた。初乳中インスリンと生時体重との関連は，妊娠中の栄養状態が初乳中インスリンレベルならびに妊娠末期の急速な胎子発育に反映され，さらには哺乳中の増体速度にも影響しうるものと考えられた。すなわち，妊娠中の栄養状態が初乳中成分や胎子発育，ひいては出生後の初期成長にも大きな影響を及ぼしているものと考えられた。

4．要　約

初乳中免疫グロブリンの吸収促進効果が示唆されている出生直後のセレンの経口投与（0.3mg／頭）の可能性を検討したが，哺乳中産子の増体あるいは血中免疫グロブリン濃度のいずれにも影響が認められなかった。出生後の産子の成長や生理特性を左右する初乳中成分の探索を目指して，30腹のめん羊母子の初乳中成分と産子の発育との関連を調べたところ，レプチンとインスリンの関与を示唆する結果が得られた。これらの初乳中濃度は母畜の栄養状態の影響が大きいものと考えられることから，妊娠中の母畜の良好な栄養状態確保の重要性が再認識された。

© The Ito Foundation

文　献

1） Hammon, H. M., Liermann, W., Frieten, 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 Daily 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*, **19**, 5933, 2017.

9） Kamada, H., Nonaka, I., Ueda, Y., Murai, M.：Selenium addition to colostrum increases immunoglobulin G absorption by newborn calves, *Journal of Dairy Science*, **90**, 5665～5670, 2007.

10） Buranakarl, C., Thammacharoen, S., Semsirmboon, S., Sutayatram, S., Nuntapaitoon, M., Kato, K.：Impact of insulin-like growth factor 1, immunoglobulin G and vitamin A in colostrum on growth of newborn Black Bengal goats and its crossbred, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, DOI：10.1111/jpn.13671, 2021.

11） Nunes, M., Homrich da Silva, C., Lucia, Vera., Bernardi, J. R., Werlang I. C. R., Goldani, M. Z.：Could a remarkable decrease in leptin and insulin levels from colostrum to mature milk contribute to early growth catch-up of SGA infants?, *BMC Pregnancy Childbirth*, **17**, 410, 2017.

© The Ito Foundation

木材クラフトパルプとカンショ焼酎粕を原料としたサイレージの給与が黒毛和種肥育牛の第一胃内発酵に及ぼす影響

Effect of feeding silage containing wood kraft pulp and sweet-potato shochu distillery on rumen fermentation of Japanese Black fattening cattle

前　田　友　香
（宮崎県畜産試験場）

Yuka Maeda
（Miyazaki Livestock Research Institute）

The effect of wood kraft pulp (KP) and sweet-potato shochu distillery by-product (SDP) mixtures on the fermentation quality of the silage was examined by mixing KP : SDP in five ratios of 2:1 (Ⅰ), 3:2 (Ⅱ), 1:1 (Ⅲ), 2:3 (Ⅳ), and 1:2 (Ⅴ) on a fresh matter basis (Experiment 1). The V-SCORE of all the silage except I exceeded 90 points at 30, 60, and 120 days of fermentation ; this indicated good fermentation quality. Silage I is not suitable for long-term storage. In experiment 2, we carried out the digestion trial with 10 Japanese Black steer 11 months of age. Five steer were fed timothy hay and commercial concentrate feed (control group), and another steer were fed timothy hay, commercial concentrate feed, and the KP silage. Steers in the KP group were provided KP silage Ⅱ to replace 10% (dry matter bases) of the timothy hay. The experimental period is 17-day. The feed intake and blood profiles of the control group were not significantly different from the KP group. The total concentration and molar composition of the ruminal volatile fatty acids did not differ between the two groups. However, the activity of ruminal lipopolysaccharide (LPS) in the KP group was significantly lower than in the control group. Our results indicate that the fermentation quality of KP silage stabilizes as SDP content increases. Furthermore, KP silage does not affect the feed intake and blood profile of the Japanese Black steer, although it is possible that feeding them KP silage may decrease ruminal LPS activity.

1．目　　的

黒毛和種肥育牛は生産効率向上のため濃厚飼料多給で飼養される[1)]。しかし，濃厚飼料多給は，易発酵性炭水化物の過剰摂取や粗飼料摂取量不足につながりやすく，第一胃内での揮発性脂肪酸（VFA）の生成が亢進し，胃液pHが低下する。これにより第一胃の消化機能が低下し，食欲不振，下痢，および鼓張症などの臨床症状の発症につながる[1)]。したがって，黒毛和種肥育牛の生産現場では，濃厚飼料多給を維持しながらも，第一胃内発酵を安定的に維持できる飼養管理技術の開発が求められている。

近年，木材チップ由来の飼料である木材クラフ

© The Ito Foundation

トパルプ（KP）（日本製紙株式会社，東京）が開発された。KPは消化性に優れるため，繊維質飼料でありながら，トウモロコシと同等の可消化養分総量（TDN）を有する[2)]。よって，KPを黒毛和種肥育牛へ給与することで，エネルギー摂取量を減少させることなく，第一胃内発酵を安定的に維持できると考えられる。これまでの研究で，KPは黒毛和種肥育牛へ濃厚飼料の代替として給与可能であるが，濃厚飼料の給与量がきわめて多い肥育中期[3)]や肥育後期[4)]では，第一胃内発酵に対する影響はほぼ認められていない。しかし，肥育前期の黒毛和種牛に対するKP給与の影響は，いまだ検討されていない。

一方，宮崎県を含む南九州地域は焼酎の生産が盛んな地域であり，その製造副産物である焼酎粕も多量に排出される。これまでに，カンショ焼酎粕（SDP）を有効活用する方法として，飼料化[5)]と牛への給与[6,7)]について検討されており，黒毛和種肥育牛へ給与しても健常性に悪影響を及ぼさないことが明らかにされている。

そこで本研究では，KPとSDPを混合して調製したサイレージの発酵品質を検討するとともに，そのサイレージを肥育前期の黒毛和種去勢牛へ給与した場合の第一胃内発酵に及ぼす影響を検討した。

２．材料および方法

2.1　試験１　KPとSDPを原料としたサイレージの発酵品質の検討

KP（日本製紙株式会社，東京）（DM，48.0％；CP，0.4％DM；NDF，98.1％DM）とSDP（霧島酒造株式会社，宮崎）（DM，5.5％；CP，23.6％DM；NDF，0％DM）を用いて，原物当たりの比率が，KP：SDPで，２：１（Ⅰ），３：２（Ⅱ），１：１（Ⅲ），２：３（Ⅳ），および１：２（Ⅴ）の５種類の混合飼料を４kgずつ調製した。各飼料の化学成分の設計値を**Table 1** に示した。調製した飼料は，ポリエチレン／ナイロンの積層フィルム（飛竜，旭化成ポリプレックス株式会社，東京）に，原物で約300 gずつ充填し，真空梱包機（SQ-303，サランラップ販売株式会社，東京）で脱気・密閉後，室温環境下で保管した。そして，調製後０日，30日，60日，および120日目に，各飼料とも３袋ずつ開封した。開封した飼料は，それぞれ50 gを300 mlの蒸留水に浸漬し一晩４℃で冷蔵保管した後，４重ガーゼで濾過した。濾液は，pHを測定し（FEP 20，メトラー・トレド株式会社，東京），遠心分離（1840 *g*× ４℃，10分）後，その上澄みを，乳酸，有機酸，および塩基態窒素を測定するまで－30℃で保管し

Table 1　Ingredients and nutritional compositions of the experimental diets in experiment 1

	Ⅰ	Ⅱ	Ⅲ	Ⅳ	Ⅴ
Ingredient, DM %					
KP	94.6	92.9	89.7	85.3	81.4
SDP	5.4	7.1	10.3	14.7	18.6
Chemical composition†					
DM, %	33.8	31.0	26.8	22.5	19.7
CP, DM%	1.7	2.0	2.8	3.8	4.7
TDN, DM%	94.1	93.6	92.6	91.3	90.1

DM, dry matter；KP, wood kraft pulp；SDP, sweet-potato shochu distillery by-product；CP, crude protein；TDN, total digestible nutrient.

© The Ito Foundation

た。残りの飼料は60℃で24時間乾燥させた後，1 mmメッシュのウィリーミルで粉砕し，各化学成分分析に供した。飼料の乾物（DM），有機物（OM），粗タンパク質（CP），粗脂肪（EE），粗灰分（CA），および可溶性炭水化物（WSC）含量は常法[8]により測定し，耐熱性α-アミラーゼ処理中性デタージェント繊維（aNDFom）含量はVan Soestらの方法[9]で定量した。抽出液中の乳酸および有機酸は，高速液体クロマトグラフ（HPLC）（CLASS-LC10；島津製作所株式会社，京都）によるブロモチモールブルー（BTB）ポストラベル法[8]（カラム：Shodex Rspak（KC-811，昭和電工株式会社，東京），カラム温度：60℃，移動相：3 mmol過塩素酸溶液，流量：0.7 ml／分および検出波長：455 nm）により測定した。塩基態窒素は，アンモニアメーター（TiN-9001，株式会社東興化学研究所，東京）を用いて定量した。

2.2　試験2　黒毛和種去勢牛へのKPサイレージ給与試験

供試牛は11カ月齢の黒毛和種去勢牛10頭とし，17日間の飼養試験を実施した。処理区は，チモシー乾草（DM，90.9％；CP，14.5％DM；aNDFom，63.4%DM）と市販の配合飼料（DM，89.3％；CP，21.3％DM；aNDFom，14.9％DM）を給与する対照区と，チモシー乾草，市販の配合飼料，および試験1の比率Ⅱのサイレージ（KPサイレージ，DM，28.6％；CP，4.1％DM；aNDFom，86.5%DM）を給与するKP区の2区とし，それぞれに供試牛を5頭配置した。なおKP区では，チモシー給与量のDM当たり10%の代替としてKPサイレージを給与した。給与量は，日本飼養標準肉用牛[1]に基づき，日増体量1.0 kgに要するCPおよびTDN要求量を充足する量とした。粗濃比は4：6とした。飼料は，1日量を9：00と16：00の2回に分けて給与した。

胃液および血液は，試験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。血液は，頸静脈よりヘパリン入り真空採血管（Venoject Ⅱ VP-H100K，テルモ株式会社，東京）およびエチレンジアミン四酢酸（EDTA）入り真空採血管（Venoject Ⅱ VP-DK050K，テルモ株式会社，東京）を用いて採取し，速やかに冷却した。遠心分離（1870 g×15分，4℃）後，得られた血漿を分析に供するまで−30℃で保管した。ヘパリン入り真空採血管で採取した血漿は，オートアナライザー（HITACHI7070，株式会社日立製作所，東京）を用いて，総タンパク質（TP），アルブミン（Alb），総コレステロール（T-cho），アスパラギン酸トランスフェラーゼ（AST），および尿素窒素（UN）を，HPLC（HPLC L-2130，株式会社日立製作所，東京）を用いてビタミンA（VA）を，それぞれ測定した。また，EDTA入り真空採血管で採取した血漿は，市販のキットを用いて，リポポリサッカライド（LPS）結合タンパク質（LBP）（HK503 kit，Hycult Biotech，オランダ），血清アミロイドA（SAA）（TP-802，Tri-Delta Diagnostics Inc.，アメリカ合衆国），およびハプトグロビン（Hp）（HAPT-11，Life Diagnostics, Inc.，アメリカ合衆国）を定量した。胃液は，経口カテーテル（NFM90，富士平工業株式会社，東京）を用いて採取し，滅菌4重ガーゼで濾過した後，分析に供するまで−30℃で保管した。乳酸および揮発性脂肪酸（VFA）は，試験1で示したBTBポストラベル法で測定した。LPS活性は，Hirabayashiら[10]の方法で，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，富士フイルム和光純薬株式会社，大阪）を用いて，それぞれ定量した。

本試験は，宮崎県畜産試験場動物実験委員会による承認を得て実施したものである。

© The Ito Foundation

2.3　統計解析

統計解析には，SAS（JMP®R15.2.1；SAS Institute Inc.，アメリカ合衆国）を用いた。

サイレージの発酵品質は，以下の混合モデルにより解析した。

$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + a \times \beta_j + b \times \beta_j \wedge 2 + e_{ij}$

ここで，Y_{ij}＝観測値，μ＝総平均，α_i＝処理区ｉの効果，β_j＝調整後日数j，e_{ij}＝誤差，そしてａとｂはβ_iと$\beta_i \wedge 2$の回帰係数である。

血液性状および胃液性状は，以下の混合モデルにより解析した。

$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_{ijk} + \delta_l + \beta\delta_{jl} + e_{ijkl}$

ここで，Y_{ijk}＝観測値，μ＝総平均，α_i＝測定グループｉの効果（変量効果），β_j＝処理効果ｊ，γ_{ijk}＝供試牛ijkの効果（変量効果），δ_l＝採材時間ｌ，$\beta\delta_{jl}$＝処理効果ｊと採材時間ｌの交互作用，e_{ijkl}＝誤差である。

得られた解析結果は，$p<0.05$を有意差ありと判断した。

3．結果と考察

3.1　試験１

混合飼料の調製後０日の化学成分は，比率Ⅰ，Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，およびⅤの順に，DMは，30.9%，28.4%，24.8%，21.3%，および19.3%，DM中のCP濃度は，2.8%，3.1%，4.2%，5.6%，および6.7%，aNDFom濃度は，82.8％，81.2％，77.3％，73.0%，および69.4%，WSC濃度は，1.1%，1.2%，1.4%，2.1%，および2.4%であった。KPへのSDP混合割合が高まると，飼料中のDM，CP，およびWSC含量が有意に増加し，逆に，aNDFomは有意に減少した。この変化は，配合飼料にSDPの濃縮液を添加した神谷ら[6]の報告と一致した。

抽出液のpH，乳酸，酢酸，およびV-SCOREの推移を**Fig. 1**に示した。比率Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，およびⅤの混合飼料において，０日のものを除いたすべてのサンプルはpHが4.2以下と良好[8]であったが，比率Ⅰの混合飼料ではpHが4.2以下を示したのは120日のみであった。乳酸および酢酸は，SDP割合が増えると増加した（$p<0.05$）。V-SCOREは，比率Ⅱ，Ⅲ，Ⅳ，およびⅤの混合飼料は，いずれの日数でも90点以上の良好な発酵品質を示した[8]。しかし，比率Ⅰの混合飼料は30日で62点，120日では28点に低下した。したがって，KPに混合するSDPの量が増えると発酵品質が安定することと，本試験における比率Ⅰのサイレージは長期保存性に難があり，供用には適さないことが明らかになった。

3.2　試験２

飼養試験中のDM摂取量は，両処理区間に有意差は認められなかった（データ未提示）。

血液性状と胃液性状を**Table 2**に示した。本試験で調査した血液成分には，いずれの項目もKPサイレージ給与の影響は認められなかった。胃液性状では，両区の総VFA含量，VFA組成，およびアンモニア態窒素濃度に有意な差は認められなかった。しかし，胃液LPS活性値は対照区に比べてKP区で有意に低かった。これまでに，乳用牛へKPを給与すると胃液LPS活性が低下することが報告されている[11]。Nishimuraら[11]はこの原因として，KP給与によりaNDFom摂取量が増加し，かつ，デンプン摂取量が減少したことで，胃液pH低下が抑制されたことをあげている。本試験では，aNDFomおよびデンプンの摂取量にKPサイレージ給与の影響は認められていない（データ未提示）。したがって，本試験の結果からはKPサイレージ給与により胃液LPS活性値が低下した原因は不明であった。今後は，第一胃内pHの測定などを実施し，その原因を検討する必要がある。

以上より，KPにSDPを混合したサイレージはSDPの混合割合が高まると発酵品質が安定することが明らかになった。そして，KPサイレージを

© The Ito Foundation

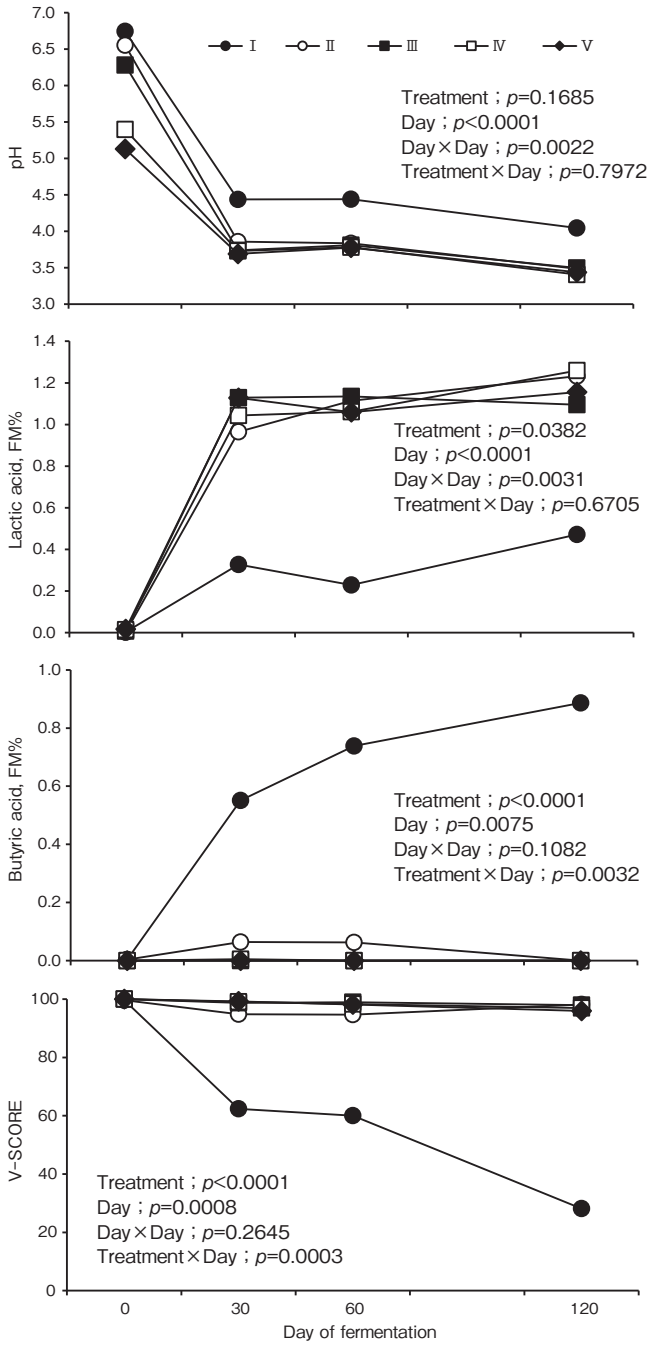


Fig. 1　Diurnal variation in fermentation quality of the wood kraft pulp silage（Ⅰ, black circles；Ⅱ, white circles；Ⅲ, black squares；Ⅳ, white squares；Ⅴ；black rhombuses）over time.

肥育前期の黒毛和種去勢牛へチモシー乾草の10%代替として給与することで，胃液LPS活性が低下することが示された。また，その他の胃液性状や血液性状には影響は認められなかった。

© The Ito Foundation

Table 2　Effect of feeding kraft pulp silage on blood profiles and ruminal profiles in the Japanese Black fattening steers

	Control group	KP group	SEM†	am	pm	SEM†	*p*-value		
							Treatment	Time	Treatment × Time
Blood profiles									
TP, g/dl	6.8	6.9	0.2	6.9	6.8	0.2	0.7225	0.7156	0.2037
Alb, g/dl	3.5	3.5	0.1	3.5	3.5	0	0.9479	0.2855	0.5548
A/G ratio	1.08	1.07	0.05	1.06	1.08	0.04	0.8854	0.5736	0.1366
T-Cho, mg/dl	111	95	10	102	104	7	0.2994	0.1210	0.9617
AST, U/l	57	51	6	52	55	6	0.1159	0.0050	0.7996
UN, mg/dl	15.4	13.9	1.2	14.2	15.1	0.9	0.4262	0.0080	0.3504
VA, IU/dl	99	84	8	92	91	6	0.1680	0.7457	0.7455
LBP, ng/ml	233.5	259.8	42.3	249	244.3	36.3	0.5835	0.7516	0.9763
SAA, μg/ml	8.03	14.03	4.87	12.45	9.62	3.7	0.4084	0.3223	0.4294
Hp, μg/ml	0.43	0.72	0.13	0.62	0.53	0.11	0.1403	0.4861	0.2014
Ruminal profiels									
Total VFA, mmol/l	84.6	86.0	5.5	77.2	93.5	4.8	0.8286	0.0023	0.4202
Composition, mol%									
Acetic acid	64.7	62.2	4.7	63.3	63.7	4.7	0.1080	0.6525	0.9260
Propionic acid	14.8	15.0	0.9	13.4	16.4	0.5	0.8751	<0.0001	0.9799
Butyric acid	16.8	18.6	3.3	19.0	16.4	3.3	0.1348	0.0120	0.8553
Acetic : Propionic	4.7	4.1	0.3	4.8	3.9	0.2	0.3253	0.0020	0.6038
Ammonia-Nitrogen, mg/dl	9.6	9.8	1.9	12.7	6.7	1.5	0.9504	0.0001	0.8865
LPS, log10 EU/ml	4.22	3.89	0.12	4.11	4.00	0.11	0.0334	0.0169	0.2533

KP, kraft pulp ; TP, total protein ; Alb, albumin ; A/G, albumin/globulin ; T-Cho, total cholesterol ; AST, aspartate transaminase ; UN, urea nitrogen ; VA, vitamin A ; LBP, lipopolysaccharide-binding protein ; SAA, serum amyloid A ; Hp, haptoglobin ; VFA, volatile fatty acid ; LPS, lipopolysacharide.
† Standard error of the mean.

4．要　　約

木材クラフトパルプ（KP）にカンショ焼酎粕（SDP）を添加して調製したサイレージ（KPサイレージ）の発酵品質の検討と，そのKPサイレージの給与が肥育前期の黒毛和種去勢牛の第一胃内発酵に及ぼす影響を検討した。まず，KPとSDPの混合比率の異なる５種類の飼料を調製（KP：SDPは，２：１（Ⅰ），３：２（Ⅱ），１：１（Ⅲ），２：３（Ⅳ），１：２（Ⅴ））し，パウチ法により

© The Ito Foundation

発酵品質を検討した。その結果，発酵品質はSDPの混合割合が高まると安定し，比率Ⅰの混合飼料は，V-SCOREが著しく低く長期間の保存には不向きであることが分かった。次に，11カ月齢の黒毛和種去勢牛10頭を用いて飼養試験を実施した。処理区は，KP無給与の対照区（n＝5）と，比率ⅡのKPサイレージをチモシー給与量のDM当たり10％代替として給与するKP区（n＝5）の2区とした。DM摂取量および血液性状にはKPサイレージ給与の影響は認められなかった。胃液性状では，総VFA含量，VFA組成，およびアンモニア態窒素濃度には両処理区に有意差は認められなかった。しかし，胃液LPS活性値はKPサイレージ給与により低下した（$p<0.05$）。これらのことから，KPにSDPを混合したサイレージは，SDPの混合割合が高まると発酵品質が安定することと，肥育前期の黒毛和種去勢牛へ給与すると，胃液LPS活性値が有意に低下することが明らかになった。

文　献

1） 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構（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） Hada, M.,Yashiro, J.,Machida, M.,Kajikawa, H.：Japanese Patent No.5994964, granted 2 September 2016.

3） Mizuguchi, H.,Maeda, Y.,Nishimura, K.,Shinkura, H.,Kurosu, K.,Terada, F.,Kushibiki, S.：*Animal Science Journal*, **92**, e13589, 2021.

4） Maeda, Y.,Nishimura, K.,Kurosu, K.,Mizuguchi, H.,Sato, S.,Terada, F.,Kushibiki, S.：*Animal Science Journal*, **90**, 523～532, 2019.

5） 林國興：日本暖地畜産学会報，**55**，101～107，2012.

6） 神谷充，服部育男，上村昌志，佐藤健次：日本暖地畜産学会報，**54**(2)，149～159, 2011.

7） 神谷充，服部育男，神谷裕子，佐藤健次，林義朗：日本畜産学会報，**84**，395～401，2013.

8） 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.

9） Van Soest, P. J.,Robertson, J. B.,Lewis, B. A.：*Journal of Dairy Science*, **74**, 3583～3597, 1991.

10） 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.

11） Nishimura, K.,Kurosu, K.,Terada, F.,Mizuguchi, H.,Sato, S.,Kushibiki, S.：*Animal Science Journal*, **90**, 189～195, 2019.

© The Ito Foundation

採卵日齢に起因するヒナ品質がブロイラー異常硬化胸肉の発現に及ぼす影響の解明

Effect of chick quality due to the age of egg collection on the development of wooden breast in broilers

岩 崎 智 仁
（酪農学園大学農食環境学群）

Tomohito Iwasaki
（College of Agriculture, Food and Environment Sciences, Rakuno Gakuen University）

In recent years, abnormalities in broiler breast meat have been occurring worldwide in the poultry industry, and researchers in many countries have reported cases of the wooden breast（WB）, in which the breast meat becomes abnormally hard. Although the effects of growth rate and sex differences have been reported on abnormal wooden breasts, there are no reports on the impact of the age at which eggs were taken on WB expression, which was investigated in this study. Fertilized eggs from 201（young；Yg）, 306（middle；Md）, and 446（old；Od）day-old hens were hatched and reared for 46 days and analyzed for WB expression indices such as wing contact test, the circularity of muscle fibers, lipofuscin accumulation, as well as for antioxidant enzyme-related gene groups associated with WB expression and gene expression analyses were carried out for genes related to mitochondrial dynamics. The wing contact test and circularity analysis of muscle fibers showed significantly higher values in the Md group（306 day-old）, but no difference was observed in lipofuscin accumulation. In addition, there were no significant differences in the expression of various genes, including those related to antioxidant enzymes and those related to mitochondrial dynamics, between the three groups Yg, Md, and Od. These results suggest that chick quality due to the age of the egg-laying date may not contribute significantly to WB expression.

1．目　　的

世界的な人口増加に伴う食料供給の観点から，食肉の増産は大切な課題であり，家畜１頭当たりの筋重量を増やすことを目的とした育種改良等が行われている。鶏肉は，胸肉が消費者に好まれて消費されていることから，胸肉重量の増加を目指した産肉性向上のための育種改良が行われている。このように生産効率を追求する中で，Wooden Breast（以下，WB）と呼ばれる，胸肉が異常硬化する等の胸肉異常が発生して問題となっている。WBは肉眼所見では表面が淡い色を呈しており，粘性滲出液や胸肉表面に斑点状の出血があり，加えて尾部の膨らんだ外観を持つ。その胸肉は品質および外観を損なうため廃棄対象となり問題になっている[1)]。WBの筋組織を観察すると多数の筋線維を含む広範囲な損傷が認められ，残存する筋線維は丸みを帯びた形態が観察さ

© The Ito Foundation

れる[2]。WB発現のメカニズムは明確に理解されていないが，成長スピードが速い個体ほど胸筋の筋変性が生じ，日齢とともに筋変性の頻度が高くなることが明らかとなっている[3]。一方，ヒナの品質は種鶏の採卵日齢に関係しており，採卵日齢の若い種鶏の場合にはヒナ重量が低い[4]。この採卵日齢とWBの発現に関する報告がなく，その発現への影響についてはまったく明らかにされていない。このことから本研究では種鶏の採卵日齢に着目し，ヒナの生体重が軽い（品質が低い）場合には，WBを発現しやすいのではないかと仮説を立て実験を実施した。

2．材料と方法

2.1　ブロイラー（Ros308系）の選抜および飼育方法

日齢201日，306日および446日の種鶏それぞれから受精卵を各30個得て，それらをYoung（Yg），Middle（Md），およびOld（Od）とした。孵卵０－18日目は正確に37℃湿度60％以上で維持し，孵卵19日目から36℃で維持した。孵化後の各群のヒナは雌雄でそれぞれ最も体重が軽い２羽，最も体重が重い２羽，体重が中央値の２羽の計12羽（雄６羽，雌６羽）を選抜し飼育実験に用いた。ブロイラーは本学の実験鶏舎で46日齢まで飼育した。なお，飼育０日齢から12日齢までを飼育前期とし育雛前期飼料（くみあい飼料，育雛前期Ａ）にて育雛器で飼育し，13日齢から46日齢を飼育後期として後期飼料（中部飼料，あおぞら仕上げ）にて平飼いで飼育した。飼育期間中には，２日ごとに体重測定を行い，46日齢のと殺時には，川崎らの方法[5]を用いた挙上試験にてWBを鑑別し，ブロイラーの左右の翼が接触するものをWB非発現（挙上プラス），左右の翼が接触しないものをWB発現（挙上マイナス）とした。なお，本実験は「酪農学園大学における動物実験等に関する規程（承認番号DH21A3）」に従って実施した。

2.2　試料の採材

46日齢のニワトリに対して，80 mg/kgとなるようにペンタバルビタールNaを翼下静脈に注射し，深麻酔下で放血し，浅胸筋を採取した。採取した浅胸筋を組織観察用の凍結切片用試料として，１cm四方に加工したコルクボードの上にトランガカントガムを載せ，その上に筋線維方向が上になるように固定した。これを液体窒素下で冷却したイソペンタン中で急速冷凍した。各種理化学分析用試料については液体窒素下で急速冷凍した。なお，遺伝子解析用試料については，RNAlater（Thermo Fisher Scientific）に浸漬して４℃下で一晩保管して翌日にRNAlaterを除いた。すべての試料は使用まで－80℃で保存した。

2.3　異常硬化胸肉の組織観察

凍結切片用試料を－24℃に設定したクリオスタット内にセットし，厚さ10 μmの連続凍結切片を作製して，常法にてHE染色ならびにAzan染色を行い組織観察と顕微解析による真円度計測に供した。真円度は各採卵日齢群でそれぞれ約3,000本の筋線維から求めた。また，リポフスチン蓄積量については，それ自身が自家蛍光物質であることを利用した蛍光顕微鏡による定量解析を先行研究を参考に実施した[6]。なお，すべての顕微解析にはImage J（https://imagej.nih.gov/ij/）を用いた。

2.4　qPCR法による抗酸化酵素関連遺伝子ならびにミトコンドリアダイナミクス関連遺伝子等の発現解析

と殺後のニワトリ浅胸筋を裁断しRNAlaterに浸漬して所定の処理を行い，使用まで－80℃で保存した。RNAの抽出にはTRIzol Reagent（Thermo Fisher Scientific）を使用して行った。cDNAはRever Tra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover THUNDERBIRD SYBR qPCR

© The Ito Foundation

Mix（Toyobo Co., ltd）を用い，抽出したRNA濃度を0.5 ng/ μlになるよう調整して仕様書に記載された方法で実施した。得られたcDNAは使用するまで－80℃で保存した。qPCRはSYBR qPCR Mixを用いたSYBR Green検出系によって，次に示した各遺伝子（抗酸化酵素関連遺伝子群：SOD1，SOD2，CAT，GPX，PRDX；ミトコンドリアダイナミクス関連遺伝子群：MFN1，MFN2，OPA1，DRP１；オートファジー関連遺伝子群：MAP1LC3，MAP1LC3，PARK２）の発現解析を行った。なお，ハウスキーピング遺伝子にはβ-Actinを用い，比較定量法（ΔΔCt法）にて得られた相対値で比較した。

2.5　統計検定

３群間の比較はKaleida Graph ver. 3.6を用いてTukey HSD検定を行った。数値は，遺伝子発現解析は平均値±標準誤差で記し，それ以外は平均値±標準偏差で示した。有意水準はp＜0.05とした。

３．結果と考察

3.1　卵日齢とヒナ品質について

導入時の卵重量はYgが55.4±3.2 gと最も軽く，ヒナの初期体重（０日齢）についてもYg群で39.92±3.30 gとなり有意に軽かった。これらの結果は予想していたとおりであり，採卵日齢がヒナの体重（品質）に影響していることが確認された（**Table 1**）。

3.2　体重の推移と挙上試験

WBは成長速度の速い個体で発現しやすいことから，孵化直後からの体重の推移を調べて**Table ２**に示した。１週間の平均増体重は，21日齢まではいずれの群においても同様に推移していたが，21-28日齢においてYg，MdおよびOdはそれぞれ187.3 g，124.5 g，および151.8 gとなり，Mdが他群と比べ増体重が緩やかになった。35-46日齢での平均増体重はYg，MdおよびOdでそれぞれ241.8 g，314 gおよび212 gとなり，Mdが他群と比べ増加傾向にあった。と殺時の46日齢での生体重に有意差はなかった。46日齢に，川崎らの報告[5]に基づき挙上試験を実施したところ，挙上（マイ

Table 1　Effects of egg-laying date on egg weight, hatchling weight, live weight at 46 days, and wing contact test of broiler.

	Yg	Md	Od
egg weight / g	55.4±3.2（30）	62.7±5.0（30）	64.4±6.7（30）
hatching weight / g	39.7±2.7（24）	43.6±4.2（27）	46.9±4.8（22）
live weight at 46 day / g	2785.8±203.7（11）	2763.3±429.0（12）	2759.1±417.5（12）
wing contact（–）%	45.5	66.7	41.7

Data represent mean±SD
Numbers in brackets indicate the number of used.

Table 2　Effect of age of egg-laying on the average weekly weight gain of broiler.

Day	0-8	8-14	14-21	21-28	28-35	35-46
Yg	74.5	82.4	211.3	187.3	105.5	241.8
Md	86.1	87.1	208.6	124.5	137.8	314.0
Od	87.6	91.9	225.9	151.8	97.7	212.3

（g）

© The Ito Foundation

ナス）割合はMdで最も高い66.7％を示した（**Table 1**）。このことはMd群でWBの発現割合が高い可能性を示唆している。

3.3　筋線維の真円度と筋組織中のリポフスチン蓄積量

WBを発現した胸筋組織の筋線維は円形化することが形態学的に報告されている[3]。円形化の指標である真円度は1に近いほど真円を示すが，その真円度の平均はYg，MdおよびOdでそれぞれ，0.800 ± 0.097，0.854 ± 0.087，および0.813 ± 0.009となりMd群の筋線維が最も円形化していた（**Fig. 1**）。一方，リポフスチンは，筋組織中のネクローシス領域に局在する傾向があり（**Fig. 2A** 矢じり），その蓄積量はOdが有意に低い結果を示した（**Fig. 2B**）。これらの結果は挙上試験の結果と一致しなかった。

3.4　胸肉中の各種遺伝子の発現量解析

各遺伝子の発現量の比較を行い**Fig. 3**と**Fig. 4**に示した。SOD1を含むと抗酸化酵素関連遺伝子群では，採卵日齢の影響は確認できず，ヒナ品質がこれら遺伝子の発現に及ぼす影響は小さいと考えられた（**Fig. 3**）。一方，これまでに我々は，WBを発現したニワトリは胸筋中でミトコンドリアのマイトファジーが生じていること，その結果としてミトコンドリアの活動が亢進している可能性を示唆した[7]。したがって，それらの活動に関わる遺伝子群の発現解析を実施して**Fig. 4**に示した。ミトコンドリアダイナミクスに関連する遺伝子群（MFN1，MFN2，OPA1，DRP1）については，いずれも採卵日齢が若いほど発現量が低くなる傾向を示しているものの有意な差は得られなかった。マイトファジーに関連するMAP1LC3,

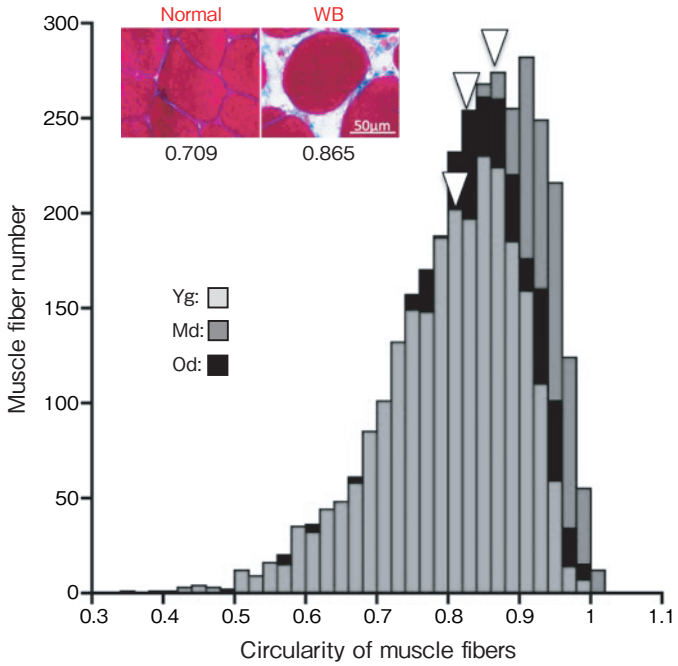


Fig. 1　Circularity distribution of the pectoralis major muscle fibers in each group. The inset images show a typical myofiber image (Azan stain), and the numbers represent the circularity of myofiber. Yg (n=11), Md (n=12), and Od (n=12) indicate each group of fertilized eggs from 201, 306, and 446 day-old hens, respectively.

© The Ito Foundation

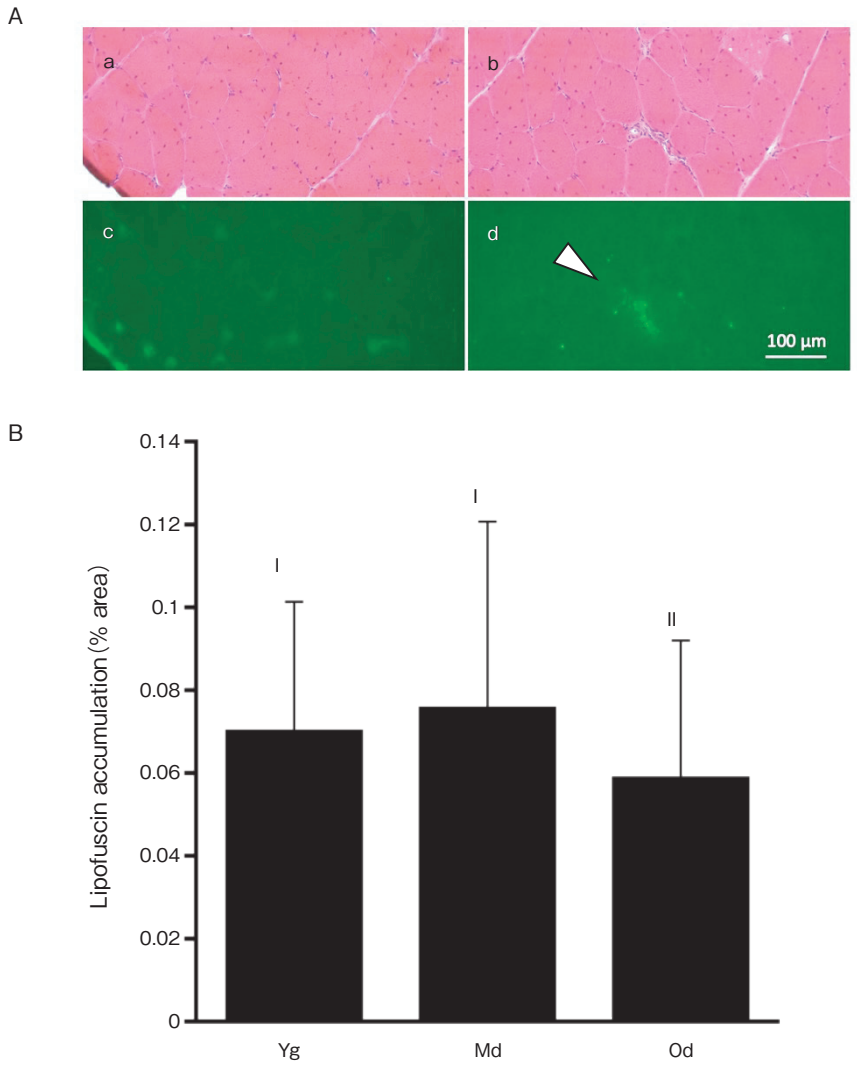


Fig. 2　Lipofuscin in the wooden breast muscle. (A) : Typical images of lipofuscin autofluorescence and H&E-stained tissue in frozen serial sections of the wooden and normal breast. (a) and (b) : H&E stain, (c) and (d) : lipofuscin autofluorescence. Normal breast (a) and (c), and wooden breast (b) and (d). White dots in (d) indicated arrowhead represent lipofuscin autofluorescence granules. (B) : Lipofuscin accumulation (% area) of breast tissue of each group. Error bars indicate standard deviation. Roman numerals indicate a significant difference between groups (Ⅰ and Ⅱ ; $p<0.05$).

MAP1LC３，ならびにPARK2の発現量は，真円率が最も１に近いと判断されたMd群で高い傾向を示したが有意差はなかった。また，結果には示していないが，低酸素適応型遺伝子のHIF1A（hypoxia inducible factor 1 subunit alpha）とVEGFA（vascular endothelial growth factor A）の遺伝子発現についても各群間での有意差は認められなかった。

以上の結果からWBの発現に及ぼすヒナ品質の影響は小さいと考えられた。ただし，本研究では

© The Ito Foundation

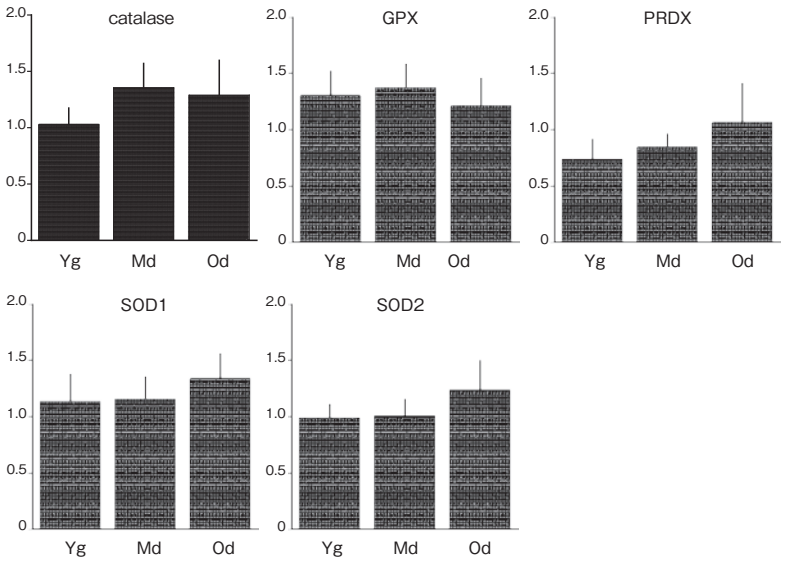


Fig. 3　Antioxidant enzyme-related gene expression includes catalase, glutathione peroxidase (GPX), peroxiredoxin (PRDX), superoxide dismutase (SOD1 and SOD2) in the breast muscle of each group of fertilized eggs. Data representing the means ± SEM were shown as relative values of β-actin.

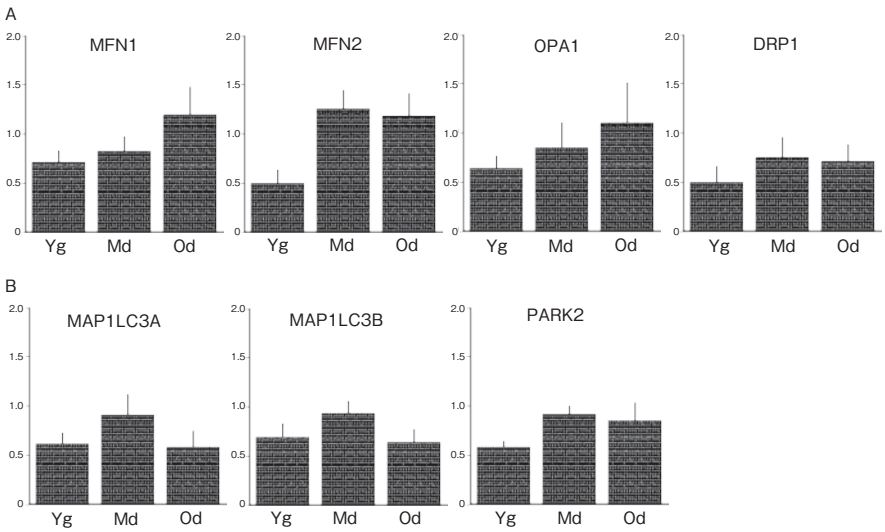


Fig. 4　Relationship of gene expression levels in the breast muscle of each group of fertilized eggs. (A) Mitochondrial dynamics-related gene expression, including mitofusion 1, 2 (MFN1, 2), mitochondrial dynamin-like GTPase (OPA1), and dynamin-related protein 1 (DRP1). (B) Autophagy-/mitophagy-related gene expression, including microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha, beta (MAP1LC3A, B) and parkin RBR E3 ubiquitin-protein ligase (PARK2). Data representing the means ± SEM were shown as relative values of β-actin.

各群の筋ミトコンドリアの構造を観察していないことから，Md群で筋ミトコンドリアの構造に異常が見られる可能性は否定できない。今後も引き続き解析を進め，ヒナ品質がブロイラーの胸肉異常に及ぼす影響について調査を進める必要がある。

© The Ito Foundation

４．要　約

近年，養鶏業界において全世界的にブロイラーの胸肉異常が生じており，特に胸肉が異常に硬くなる異常硬化胸肉（wooden breast，WB）については，各国の研究者が症例報告等を行っている。鶏の成長速度ならびに性差が胸肉の異常硬化に及ぼす影響についての報告はあるが，採卵日齢がWBの発現に及ぼす影響についての報告はないことから，本研究にて調査を行った。日齢201日（Yg），306日（Md）および446日（Od）の種鶏から得られた受精卵を孵化させ，46日齢まで飼育してWBの発現指標である挙上試験，筋線維の真円度，ならびにリポフスチンの蓄積量の解析のほかに，WBの発現に関連する抗酸化酵素関連遺伝子群とミトコンドリアダイナミクスの関連遺伝子群等について発現解析を行った。挙上試験ならびに筋線維の真円度解析では，採卵日齢306日のMd群が有意に高い数値を示したが，リポフスチンの蓄積量では差異は認められなかった。加えて，抗酸化酵素関連遺伝子群とミトコンドリアダイナミクスの関連遺伝子群等の各種遺伝子の発現においても，３群間に有意差は認められなかった。以上のことから，採卵日齢に起因するヒナ品質はWBの発現に大きくは影響しない可能性が示唆された。

文　献

1） Sihvo, H. K., Immonen, K., Puolanne, E.：*Vet. Pathol.*, **51**, 619～623, 2014.
2） Bailey, R. A., Watson, K. A., Bilgili, S. F., Avendano, S.：*Poult Sci.*, **94**, 2870～2879, 2015.
3） Petracci, M., Soglia, F., Madruga, M., Carvalho, L., Ida, E., Estevez, M.：*Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, **18**, 565～583, 2019.
4） Tufft, L. S., Jensen, L. S.：*Poult Sci.*, **70**, 2411～2418, 1991.
5） Kawasaki, T., Yoshida, T., Watanabe, T.：*J. Poultry Sci.*, **53**, 291～297, 2016.
6） Hasegawa, Y., Kawasaki, T., Maeda, N., Yamada, M., Takahashi, N., Watanabe, T., Iwasaki, T.：*Anim Sci J*, **92**, e13517, 2021.
7） Hosotani, M., Kametani, K., Ohno, N., Hiramatsu, K., Kawasaki, T., Hasegawa, Y., Iwasaki, T., Watanabe, T.：*J. Vet. Med. Sci.*, **83**, 1764～1771, 2021.

© The Ito Foundation

乳用子牛における消化管機能強化および消化管由来の炎症予防に関する研究

The studies on the strengthening of gastrointestinal function and prevention of gut-derived inflammation in dairy calves

福　森　理　加
（酪農学園大学獣医学群）

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

Our objective was to evaluate the relationship between solid feed consumed by calves and diarrhea, gut function, feed intake, growth in calves during the weaning transition period. Twenty-seven Holstein calves weaned at 8 wk of age were used until 13 wk of age in this study. The calves were fed calf starter *ad libitum* until 3.5 kg/d (as fed) and chopped hay *ad libitum*. Calves were randomly assigned to 3 dietary groups that consumed calf starters with different starch contents [High (H) : 40%, Medium (M) : 30%, Low (L) : 20%, n = 9]. During the post-weaning period, starter DMI was higher in H calves than in L calves (p<0.05). No differences in hay intake were observed in any period. Averaged daily gain was higher in H than in L in post-weaning period (p<0.05). There were no differences between treatments in fecal pH and starch contents, and the number of days of diarrhea (p=0.147). There were no differences in total VFA concentration and pH in the rumen between treatments, but there were differences in the percentage of various VFA. The molar proportion of acetic acid was higher in M and L than in H and the proportion of propionic acid was higher in H than in M and L (p<0.05). No differences in serum glucose and born alkaline phospholipase concentrations were observed between treatments. Serum urea nitrogen was higher in L than in H at 9 wk of age, and in the order of L, M, and H at 10 and 13 wk of age. Serum beta-hydroxybutyrate concentrations were higher at 11 wk of age in M and L than in H, and at 13 wk of age in M than in H. No differences in plasma insulin, GLP-1 and GLP-2 concentrations were observed between treatments. GH was higher in L than in H at 4 wk of age. IGF-1 was higher in H than in L at 13 wk of age. From the results of this study, it was found that a high-starch diet during the weaning period has merits for achieving high growth without damaging the digestive tract of calves.

1．目　　的

早期離乳法は哺乳量を制限することでカーフスターターの摂取量を増やし，ルーメンの発達を早期に促すことを目的とする。生乳や代用乳の給与は固形飼料に比べコストがかかるため，哺乳量の制限や哺乳期間の短縮の子牛育成における飼料コストを抑えることにつながると考えられてきた。

© The Ito Foundation

しかし，哺乳を制限することで子牛は空腹やストレス徴候を示し，成長率が低下するため，最近では哺乳期の発育や健康，動物福祉および将来性を重視する目的で高栄養哺乳が普及してきている[1)]。

高栄養哺乳は哺乳量を増やすことで哺乳期間中の成長率を高めるが，一方でスターター摂取量の減少を引き起こす。スターター摂取量の低下は，離乳時にルーメンの発達を制限し，発育を低下させるおそれがある。さらに，離乳後にスターター摂取量が急激に増加することで，未発達のルーメンに大きな負担がかかる。スターターに含まれる主な炭水化物源はデンプンであるが，未発達なルーメンではその発酵産物である揮発性脂肪酸（VFA）をルーメン上皮細胞から効率的に吸収できず，唾液による緩衝作用も弱いため，酸の蓄積によるルーメンアシドーシスのリスクが増加する。また，ルーメン内における不十分な発酵によって未消化デンプンが下部消化管に流入し，小腸で膵アミラーゼやマルトースによって消化が行われるが，哺乳期のアミラーゼ活性は成牛に比べて低いことが報告されている[2)]。このため，未消化のデンプンが大腸に多量に流入し，微生物発酵を受けることで生じる大腸性アシドーシスなども懸念される。これらによって発生する消化性の下痢は，発育に必要な栄養やエネルギーの損失につながる。一方で，消化管トラブルを回避するためにデンプン含量を抑えることは，発育の低下につながる可能性がある。

スターターのデンプン含量が子牛の発育や離乳に及ぼす影響に関する情報はいまだ少なく，その影響は哺乳プログラム（哺乳量や漸減方法，離乳時期）によって異なることが予想される。本研究の目的は，高栄養哺乳プログラムで８週齢離乳した乳用子牛において，スターターのデンプン含量の違いが発育，糞性状および血液性状に及ぼす影響を評価することであった。

２．材料および方法

本試験は酪農学園大学動物実験委員会の承認（VH20 C12）を受け，酪農学園フィールド教育研究センター酪農生産ステーションにおいて実施した。供試動物としてホルスタイン種子牛27頭（雌14頭，雄13頭）を使用し，出生後３時間以内に初乳を２Ｌ以上，24時間以内に合計４Ｌ以上を給与した。体重は出生後毎週測定した。子牛はスチール製のファームゲートで仕切られたペン（2.42m × 1 m，2.42m^2／頭）で１頭ずつ飼養し，各ペンにはラバーマットおよび麦稈を敷料として使用した。４日齢まで移行乳を，５日齢からは代用乳（カーフトップEX，全酪連，東京；粗タンパク質28％，粗脂肪15％）を43℃のお湯に溶かし（16.7％（w/v)），哺乳バケツで給与した。代用乳は粉体で14日齢まで600ｇ／日，15～21日齢まで800ｇ／日，22～42日齢まで1200ｇ与え，その後漸減し，43～48日齢まで800ｇ／日，49～55日齢まで600ｇ／日与え56日齢で完全離乳した。カーフスターター，乾草および水は５日齢から給与した。乾草（粗タンパク質12.6％，可消化養分総量58％）および水はバケツから自由摂取させた。なお，哺乳およびスターター給与は１日２回行われた（0700h，1600h)。また，乾草は２cmに細断したのち給与した。試験処理として，デンプン含量の異なる３種のスターター区［H区（デンプン濃度：乾物あたり40％)，M区（30％)，Ｌ区（20％)］に９頭ずつランダムに配置した。スターターは摂取上限を原物量で3.5kg／日とした。試験はスターター給与を開始する５日齢から13週齢まで行われた。

採血（15mL）は，４，６，７，８，９，10，11，12および13週齢に朝の給飼前（0700ｈ）に頚静脈から行い，プレイン管とヘパリン管に保存した。糞のサンプルは６，８，10および13週齢に，午前

© The Ito Foundation

7時の給飼前に直腸糞を用手によって採取した。採取した糞の一部は速やかにpH（LAQUAtwin-pH-22，HORIBA，京都府，日本）を測定し，Megazyme kit（日本バイオコン，東京，日本）を用いて糞中デンプン濃度を測定した。また，文献3の方法に基づいて糞性状スコアを毎日2回（0700h，1600h）記録した。ルーメン液は，6，10および13週齢の朝の給飼前に経口で採取した。ルーメン液は採取後，速やかにpHを測定した。ルーメン液のVFA濃度はガスクロマトグラフィー（GASCHROMATOGRAPH GC-2014，SHIMADZU，東京，日本）にて測定した。

血清生化学成分［グルコース，非エステル型脂肪酸（NEFA），血液尿素窒素（BUN）および3-ヒドロキシ酪酸（BHBA）］濃度は自動分析装置（OLYMPUS「AU680」，オリンパス株式会社，東京，日本）で測定された。時間分解蛍光免疫測定法（競合固相免疫測定法）によりホルモン（インスリン，GH，IGF-1，GLP-1およびGLP-2）の血漿濃度を測定した。骨形成状態の指標となる血清骨型アルカリホスファターゼ（BAP）濃度を市販のアルカリホスファターゼ（ALP）アッセイキット（LabAssay ALP，富士フィルムワコーシバヤギ株式会社，群馬，日本）を用いて測定した。

すべての測定値は最小二乗平均±標準誤差で示された。データはJMP（version 13.0 for Windows, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA）を用いて分析し，$p<0.05$を有意差あり，$p<0.10$を傾向ありとした。

3．結果と考察

離乳後（64-91d）で，L区に比べH区でスターターの乾物摂取量が多かった（$p<0.05$, **Table 1**）。体重の推移には処理区間の差が認められなかったが（**Fig. 1A**），日増体量は離乳後（64-91d）で，L区に比べH区で高かった（$p<0.05$，**Fig. 1B**）。これは，離乳前の摂取量には差がなかったが，H区における離乳後のスターター摂取量がL区に比べて多かったためと考えられる。

Table 1　Dry matter intake of calf starter and grass hay for each period

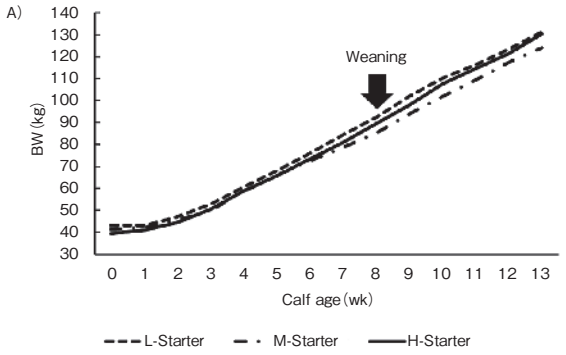
	Treatment calf starter[1]				
Item	H	M	L	SEM	p-value
Starter intake（g/d）					
preweaning（5-42d）	195	172	202	29.4	0.745
transition（43-63d）	1570	1350	1470	106	0.319
postweaning（64-91d）	2979[a]	2923[ab]	2828[b]	43.6	0.067
Average starter intake for 3 days before weaning	1641	1368	1517	152	0.447
Day of age when calves consumed 1.5kg/d of starter[2]	52.8[a]	56.2[b]	54.2[ab]		0.116
Hay intake（g/d）					
preweaning（5-42d）	31.2	44.5	41.4	9.61	0.593
transition（43-63d）	232	276	271	26.9	0.458
postweaning（64-91d）	567	651	758	93.1	0.377

a, b Means within row with a common superscript differ（$p<0.05$）

[1]H：High starch starter, M：Medium starch starter, L：Low starch starter

[2]Means age when 1.5 kg / d（DM）is achieved for 3 consecutive days

© The Ito Foundation



	preweaning (0–5wk)	transition (6–8wk)	postweaning (9–13wk)
■ H区	0.80	1.17	1.16
▨ M区	0.74	1.02	1.09
▣ L区	0.78	1.22	1.01

a,b (p<0.05)

Fig. 1　Effects of dietary starch content on body weight (A) and averaged daily gain (ADG : B) in calves before and after weaning.

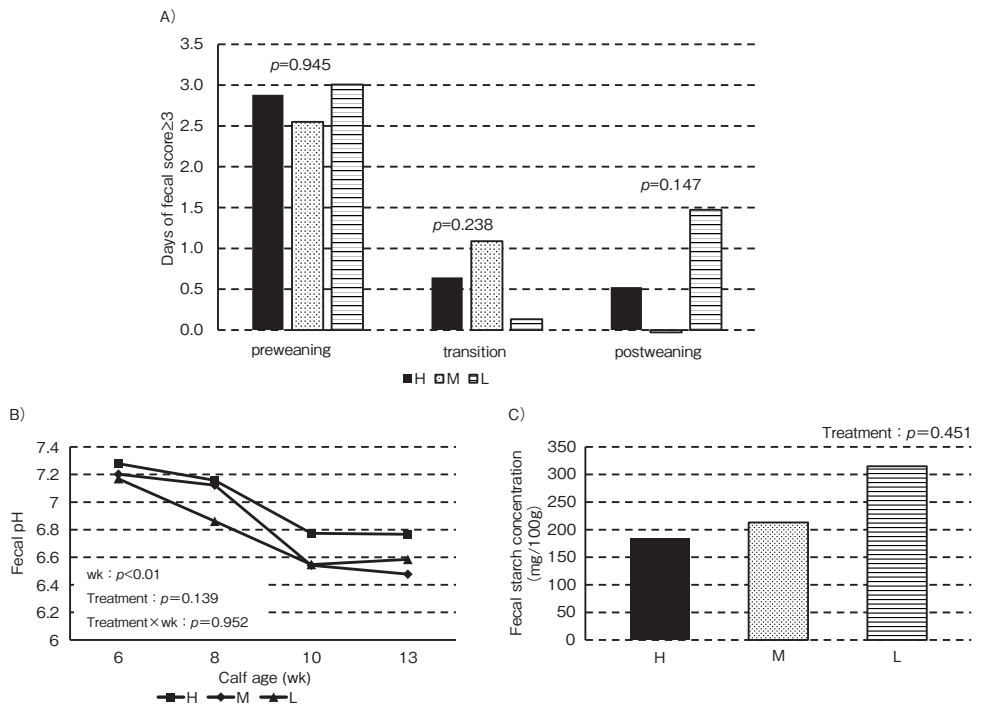


Fig. 2　Effects of dietary starch content on fecal score (A), fecal pH (B), and fecal starch concentration (C) before and after weaning.

© The Ito Foundation

Table 2　Ruminal fluid properties at various weeks

	Treatment calf starter[1]										SEM	*p*-value		
	L				M			H						
	6wk	8wk	10wk	13wk	6wk	8wk	10wk	13wk	6wk	8wk	10wk	13wk		Starter treatment	wk	Starter × wk
total VFA, mM	78.8	77.9	60.8	61.1	67.4	96.5	91.1	61.9	59.2	75.3	75.4	52.3	9.3	0.12	0.01	0.37
C2, %	67.0	59.8	63.2	67.8	64.0	59.7	58.0	63.2	61.4	54.7	52.1	63.8	2.1	<0.01[2]	<0.01	0.48
C3, %	22.0	24.9	21.4	17.7	22.3	24.0	24.8	21.4	25.5	28.3	31.0	22.0	1.5	<0.01[3]	<0.01	0.20
iC4, %	0.8	0.7	1.1	1.4	0.7	0.6	0.7	1.0	0.7	0.9	0.5	1.2	0.1	0.09	<0.01	0.17
nC4, %	7.4	11.1	10.8	9.4	10.2	12.1	12.5	10.4	8.5	10.6	11.0	9.5	1.3	0.14	0.052	0.99
iC5, %	1.0	1.0	1.7	2.2	0.9	0.9	1.2	1.9	0.7	1.4	1.0	1.9	0.2	0.31	<0.01	0.42
nC5, %	1.7	2.2	1.4	1.2	1.7	2.3	2.3	1.6	2.8	3.6	3.8	1.4	0.4	0.01[4]	<0.01	0.05
nC6, %	0.2	0.4	0.3	0.3	0.2	0.5	0.5	0.5	0.4	0.6	0.6	0.2	0.1	0.37	0.04	0.40
A/P	3.2	2.4	3.0	3.9	3.0	2.6	2.4	3.1	2.7	2.0	1.7	3.0	0.2	<0.01[5]	<0.01	0.34
pH	6.99	7.08	6.84	7.27	6.83	7.08	6.54	6.8	7.12	7.16	6.95	7.07	0.2	0.37	0.17	0.83

[1]H : High starch starter, M : Medium starch starter, L : Low starch starter
[2]L, M>H (p<0.05)
[3]L, M<H (p<0.05)
[4]L, M<H (p<0.05)
[5]L>M>H (p<0.05)

ルーメン液性状について，総VFA濃度に処理区間の差はなかったが，M区およびL区では酢酸割合が，H区ではプロピオン酸割合が高くなっていた（p<0.05，**Table 2**）。これは，M区およびL区で繊維発酵が，H区でデンプン発酵が多く行われていたことが示唆される。酪酸およびプロピオン酸はルーメン上皮を発達させることが知られており[4]，本研究では処理区間に酪酸割合の差がなかったことから，H区ではプロピオン酸の刺激を受けて，ルーメン上皮の発達が促された可能性がある。本研究では，サンプリング期間を通じてルーメンpHに処理区間の差はなかった（**Table 2**）。一般的に，デンプン濃度の高い飼料を与えられたほうが，高繊維質飼料を与えられたときよりもルーメンpHが低下することが知られている。哺育期では，与えられた固形飼料の質によりルーメン絨毛の発達が異なることが知られており，哺乳期の子牛にミルクとともに穀類と草を与えた子牛では，ルーメン絨毛が発達していたのに対し，ミルクと草のみを与えられた子牛では，同じ月齢でもルーメン絨毛が発達していなかったことが観察されている[5]。このことから本研究では，H区のスターターには多くの穀類が含まれており，絨毛が早期に発達していたことで，発生したVFAの吸収が効率よく行われていたと考えられる。以上のことからH区ではルーメンの発達が他の処理区よりも進んでおり，離乳後のスターター摂取量も伸び，日増体量が高くなったと考えられる。

糞便pHに差はなかったが，週齢が進むにつれて低下していた（**Fig. 2B**）。これは，週齢が進むにつれてスターター摂取量が増加したことで，未消化デンプンの下部消化管への流入が増加し，大腸内で発酵を受けたことを反映していると考えられる。糞便pHは6.5から7.4の範囲であり，おおよそ正常便であったと思われる。糞中のデンプン濃度の増加はルーメン，小腸および大腸で未消化な

© The Ito Foundation

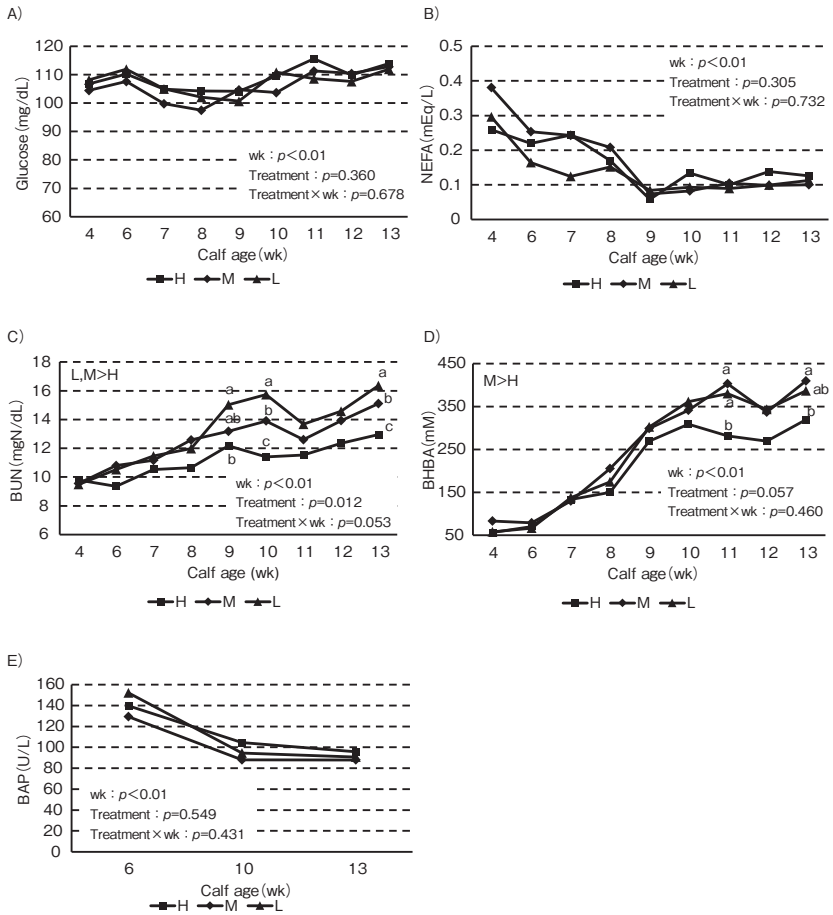


Fig. 3　Effects of dietary starch content on serum glucose (A), non-esterified fatty acids (NEFA : B), blood urea nitrogen (BUN : C), beta-hydroxybutyrate (BHBA : D), and borne alkaline phospholipase (BAP : E)

デンプンが排出されたことを意味する。このことは糞中pHの低下と同様に大腸性アシドーシスのリスクとなることを示唆するが[6]，離乳後pHが大きく低下した10週齢における糞中デンプン濃度に差はなかった。また，スコア３以上の日数に処理区間の差は認められず（**Fig. 2A**），デンプン含量の違いは糞性状に影響を及ぼさなかった。

ルーメンが未熟な子牛はグルコースが主なエネルギー源となるが，離乳後はルーメンの発達に伴い減少する。今回は，グルコースは離乳後も高い値を推移していた（**Fig. 3A**）。インスリンはグルコースが離乳後に減少しなかったために離乳後も低下することなく推移したと考えられる（**Fig. 4A**）。NEFAは離乳に伴い減少したが，離乳前は代用乳中の脂肪の吸収が反映されていると考えられる（**Fig. 3B**）。

BUNは離乳後にH区で低く，H区で菌体タンパク質の合成が進んでいたことが推察される（**Fig. 3C**）。H区では摂取デンプン濃度が多く，これが微生物のエネルギー源となったと考えられる。IGF-1は13週齢にH区で高くなっていた。菌体タンパク質の合成が進み，離乳後に利用できるタンパク質が増えたことでH区の高発育につながったと思われる。IGF-1に差が出た一方で，

© The Ito Foundation

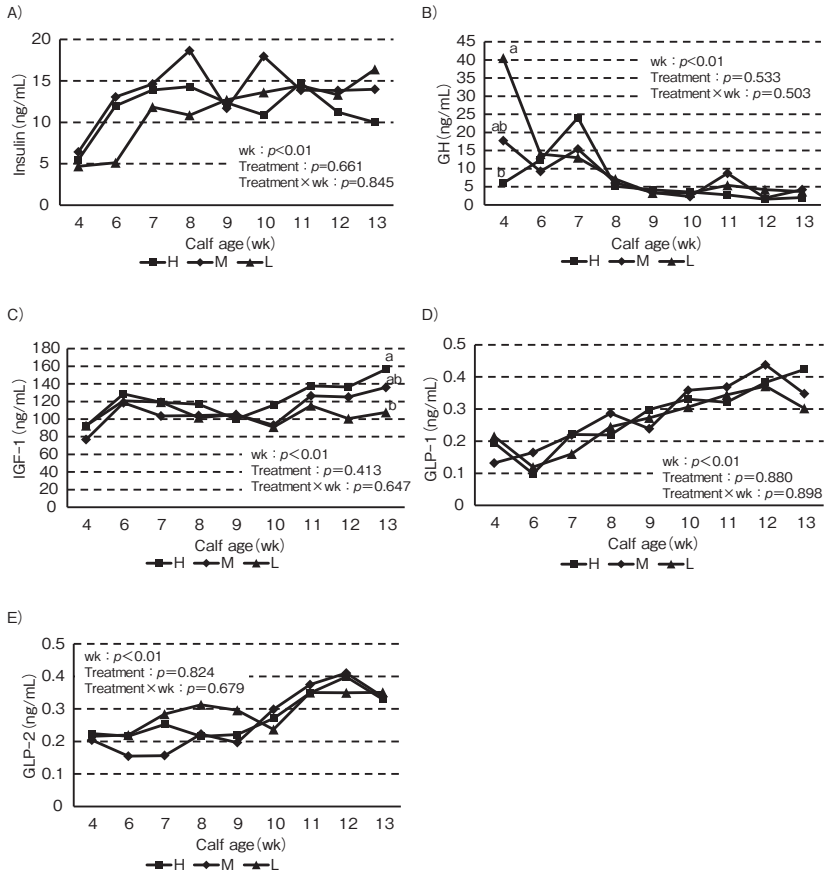


Fig. 4　Effects of dietary starch content on plasma insulin (A), growth hormone (GH : B), insulin-like growth factor-1 (IGF-1 : C), glucagon-like peptide-1 (GLP-1 : D), and GLP-2 (E)

GHには処理区間の差が認められなかった（**Fig. 4B**，**C**）。IGF-1の分泌は高タンパク質の食餌によって増加することが報告されており[7]，タンパク質を効率よく吸収できていたH区でIGF-1が上昇していたと思われる。

BHBAはルーメン発達の指標として有用であり[3]，どの処理区でも離乳に伴い増加したことから，ルーメンの発達が進んでいたことが分かる。血清BHBA濃度は離乳後にH区で低くなっていたが（**Fig. 3D**），ルーメン内のn酪酸の割合には差が認められなかった。総VFA濃度にも差が認められなかったため，n酪酸の産生量に違いはない。H区ではルーメンが発達していたと考えられることから，VFAの吸収効率がよく，L区およびM区と比較してBHBAは高くなることが予想される。さらに，BHBAは低エネルギー状態における脂肪動員により上昇するが，NEFAには処理区間の違いは認められなかったため，M区およびL区で低エネルギー状態になっていた可能性は低い。BHBAは，n酪酸がルーメン上皮で代謝されて産生されるほか，酢酸の一部もBHBAに変換されることから，M区およびL区の血中BHBA濃度の増加はルーメン内の酢酸割合が高いためであると考えられた。

これらのことから，スターターのデンプン含量を40％まで高めても，M区およびL区と同様に

© The Ito Foundation

ルーメン内や小腸で消化を十分に行うことができ，腸管に悪影響を及ぼすことなく，発育に問題ないことが示された。

４．要　約

本研究では，哺育期の飼養管理が離乳ストレス，特に腸管の健全性に及ぼす影響を検討するために，スターターのデンプン含量の違いが発育，糞性状および血液性状に及ぼす影響を評価した。ホルスタイン種子牛雌雄27頭を，デンプン含量の異なる３種のスターター区［H区（40％），M区（30％），L区（20％）］に９頭ずつ配置した。代用乳は最大1.2kg／日給与し，６週齢から漸減し８週齢で離乳した。スターター（摂取上限3.5kg／日）および乾草は５日齢より自由摂取させた。採血は４～13週齢に行った。体重は毎週記録し，４，８，10および13週齢に体測を行った。糞スコアを毎日記録し下痢を示した日数（≧スコア３）を集計した。６，８，10および13週齢にルーメンpH，糞便pHおよび糞中デンプン濃度を測定した。離乳後の日増体量はL区と比べH区で高かった。離乳前３日間の平均スターター摂取量は処理区間に差はなく，おおむね離乳時の目標摂取量に到達していた。離乳後のスターター摂取量はL区と比べH区で多かった。糞中のpHの推移および10週齢時の糞中デンプン濃度に処理区間の違いは見られず，下痢の日数にも差が認められなかった。離乳後の血清BUN濃度はLおよびM区と比べてH区で低く，血漿IGF-1濃度がL区と比べてH区で高かった。ルーメン内のプロピオン酸割合は試験期間を通してL区に比べH区で高かった。H区では，消化管への悪影響が見られず，ルーメンでの菌体タンパク合成量が多く，血中のIGF-1濃度が高まったことから離乳後の高発育につながったと推察された。

文　献

1） Soberon, F., Raffrenato, E., Everett, R. W., Van Amburgh, M. E：Preweaning milk replacer intake and effects on long-term productivity of dairy calves, *J Dairy Sci*, **95**, 783～793, 2012.
2） Guilloteau, P., Corring, T., Garnot, P., Martin, P., Toullec, R., Durand, G.：Effects of Age and Weaning on Enzyme Activities of Abomasum and Pancreas of the Lamb, *J Dairy Sci*, **66**, 2373～2385, 1983.
3） Kertz1, A. F., Chester-Jones, H.：Invited Review：Guidelines for Measuring and Reporting Calf and Heifer Experimental Data, *J Dairy Sci*, **87**, 3377～3380, 2004.
4） Sander, E. G., Warner, R. G., Harrison, H. N., Loosli, J. K.：The Stimulatory Effect of Sodium Butyrate and Sodium Propionate on the Development of Rumen Mucosa in the Young Calf, *J Dairy Sci*, **42**, 1600～1605, 1959.
5） Heinrichs, A. J., Lesmeister, K. E.：Rumen development in the dairy calf. Calf and heifer rearing：principles of rearing the modern dairy heifer from calf to calving, 60th University of Nottingham Easter School in Agricultural Science, Nottingham, UK, pp.53-65, 2004.
6） Eckert, E., Brown, H. E., Leslie, K. E., DeVries, T. J., Steele, M. A.：Weaning age affects growth, feed intake, gastrointestinal development, and behavior in Holstein calves fed an elevated plane of nutrition during the preweaning stage, *J Dairy Sci*, **98**, 6315～6326, 2015.
7） Lee, H. G., Choi, Y. J., Lee, S. R., Kuwayama, H., Hidari, H., Yo, S. K.：Effects of dietary protein and growth hormone-releasing peptide（GHRP-2）on plasma IGF-1 and IGFBPs in Holstein steers, *Domest Anim Endocrinol*, **28**, 134～146, 2004.

© The Ito Foundation

睡眠様姿勢―肉用牛の生産性およびウェルフェアの新たな行動指標の検討

Sleep-like posture : Evaluation as a new behavioural indicator of beef cattle productivity and welfare

深　澤　　充・盧　　尚　健
（東北大学大学院農学研究科）

Michiru Fukasawa and Sanggun Roh
（Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University）

In this study, we investigated (1) the relationship between the expression of a sleep-like posture (a resting posture with the neck bent and the head pulled over the abdomen when lying down) and growth during the suckling (1-3 months of age) and early fattening (12-15 months of age) period in Japanese Black cattle, and (2) the effect of floor cleanness on the expression of a sleep-like posture. (1) During the suckling period, the daily expression time of sleep-like posture was decreased with month. A positive correlation was found between the average daily expression time of sleep-like posture and daily weight gain during the suckling period. A positive correlation was also found between the average daily expression time of sleep-like posture and plasma glucose concentration, suggesting that calves with a longer expression time of sleep-like posture may have better nutritional intake and show better growth. On the other hand, a negative trend was observed between the average daily expression time of sleep-like posture and daily body weight gain in early fattening cattle. This suggests that the effect of the expression of sleep-like posture on growth differs between the suckling and early fattening period. (2) As for the effects of bedding cleanness on the sleep-like posture expression, the sleep-like posture shift from the recumbent position to the flat-out position when the bedding is changed and clean, although the total expression time of sleep-like posture remains the same. This suggests that the daily expression time of the sleep-like posture is fixed, however, the pattern of its expression may change depending on the comfort level of management.

1．目　　的

睡眠は単純な休息ではなく，動物の成長や健康に深く関わる行動である。ヒトでは睡眠時には成長ホルモンや甲状腺刺激ホルモン等の物質が分泌され，健全な心身の発達や維持に大きく寄与していることが明らかになっている[1)]。そのため，睡眠は肉用牛の成長にも深く関連することが予想され，その発現の適正化を図ることは家畜生産性の向上につながることが期待できる。また，近年では肉用牛においてもアニマルウェルフェア（以下，AW）への配慮が求められている。AWの向

© The Ito Foundation

Fig. 1　Sleep-like posture of cattle
A cow in a lying position with neck bent and head resting on its flank
（Photo by Fukasawa M）

上にはストレスや怪我，疾病のような負の状態を減らすことに加え，喜びや快，安寧などの動物にとって望ましい正の情動の評価とその促進が求められている。肉用牛生産においてもAWに配慮した飼育管理をすることで，ストレスや疾病が減り，結果として，生産性の向上や安全な畜産物の生産にもつながることが期待される。

本研究では，睡眠との関連が深い[2～4]とされるウシの睡眠様姿勢（**Fig. 1**）に着目し，本姿勢を高い生産性を示す良好なAWの飼育管理の行動指標として用いることを検討した。本申請では，（1）肉用牛の睡眠様姿勢の発現と成長との関係，（2）飼養管理による安寧性の違いが肉用牛の睡眠様姿勢の発現に与える影響，について調査，検討した。（1）については，黒毛和種の哺乳期（1－3か月齢）および肥育前期（12－15か月齢）の増体や成長に関連する血液成分の動態と睡眠様姿勢の発現の関係を調査した。また（2）については，牛床の清潔度が黒毛和種肥育牛の睡眠様姿勢の発現に与える影響について調査を行った。

2．方　法

本研究は東北大学動物実験委員会の承認を受けて行った（2019-農動-019-02）。実験はすべて東北大学農学研究科附属川渡フィールドセンターにおいて実施された。

2.1　肉用牛の睡眠様姿勢の発現と成長との関係

2.1.1　哺乳期の睡眠様姿勢の発現と成長

黒毛和種子牛10頭を供試して，出生後の1－3か月齢時に調査を行った。

子牛は出生後２週間以内に母子分離して，乾草を敷料にしたカーフハッチ（1.7 m×1.7 m）で単飼した。子牛には１日朝夕２回人工乳（オートリ―ミルク，株式会社オールインワン）およびスターター（ミルキースターターPFS，明治飼糧）を週齢ごとのメーカーの推奨量を給与した。乾草と水は自由摂取とした。

出生後１，２，３か月齢時にウシの睡眠様姿勢の発現を，Fukasawaら[5]の方法に従い，加速度計を用いて２日間連続で調べた。加速度計（Onset, UA-004-64，58×33×23mm，18 g）は頭絡を用いて後頭部付近に固定し，10秒間隔でデータを記録した。回収したデータはHOBOware（バージョン3.7.23. Onset）により睡眠様姿勢の開始と終了の時刻を目視で判定し，各バウトの持続時間を求めた。持続時間が２分以下のバウトは集計から除外した。睡眠様姿勢の発現について１日の総発現時間，バウト回数，平均バウト時間を求めた。

睡眠様姿勢の測定後に体重測定および経静脈からの採血（ヘパリン管，10 ml）を行った。遠心分離した血漿は分注し，測定まで－20℃で凍結保存した。血漿中の代謝成分（グルコース，遊離脂肪酸，コレステロール濃度等）を測定した。

統計にはSPSSを用いた。各月齢間の睡眠様姿勢のデータは繰り返しのある分散分析で比較した。また，個体ごとの１-３か月の睡眠様姿勢の総発現時間の曲線下面積を求め，その間の日数で除して睡眠様姿勢の平均日発現時間とした。各血

© The Ito Foundation

漿中代謝成分についても同様に曲線下面積をその間の日数で除して平均濃度を求めた。平均日発現時間と，期間中の各血漿中代謝成分の平均濃度および日増体量とのPeasonの相関係数を求めた。

2.1.2　肥育前期の睡眠様姿勢の発現と成長

黒毛和種肥育牛６頭を供試して，12か月齢時と15か月齢時に調査を行った。肥育牛はペン（4.6 m×4.8 m）に10か月齢時に２頭ずつ導入した。１日朝夕２回給餌した。１日当たりの給与量は12か月齢時には市販肥育前期用配合飼料６kgと自家製グラスサイレージ４kg，15か月齢時には市販肥育後期用配合飼料９kgと稲わら２kgであった。

12か月および15か月齢時に，子牛と同様の方法で，ウシの睡眠様姿勢の発現について加速度計を用いて２日間連続で調べ，１日の総発現時間，バウト回数および平均バウト時間を得た。睡眠様姿勢の測定後に体重測定および経静脈からの採血（ヘパリン管，10 ml）を行った。遠心分離した血漿は分注し，測定まで－20℃で凍結保存し，血漿中の代謝成分を測定した。

12か月齢および15か月齢の睡眠様姿勢のデータは対応あるｔ検定で比較した。子牛と同様に睡眠様姿勢の平均日発現時間，各血漿中代謝成分の平均濃度および期間中の日増体量を求め，Peasonの相関係数を求めた。

2.2　牛床の清潔度が睡眠様姿勢の発現に与える影響

黒毛和種肥育牛８頭を供試した。ウシは２頭ずつ計４つのペンで飼育され，２ペンを１つのグループとして清掃群と対照群に振り分けた。清掃群では各期間内の７日目に牛床清掃として敷料（オガクズ）の入れ替えを行い，対照群は各期間内に牛床清掃を行わなかった。清掃前２日間と清掃後２日間について以下の調査を行った。ウシの睡眠様姿勢の発現を加速度計とビデオで測定した。２つの睡眠様姿勢（伏臥位姿勢と横臥位姿勢）の１日の発現時間，バウト回数および平均バウト時間をそれぞれペンごとに算出した。伏臥位および横臥位の睡眠様姿勢の発現時間の合計を算出し，１日の総発現時間とした。牛床清潔度としてペンごとの空気中アンモニア濃度および敷料の水分含量を測定した。反転法により，実験前期と後期で清掃群と対照群に割り当てるグループを入れ替えて同じ実験を行った。睡眠様姿勢と牛床清潔度の各測定項目を従属変数として，処理（清掃，対照）と時期（清掃前，清掃後）とグループの効果および処理と時期の交互作用を固定効果，またグループ内ペンの効果を変量効果とする一般化線形混合モデルにより解析した。

3．結果と考察

3.1　肉用牛の睡眠様姿勢の発現と成長との関係

3.1.1　哺乳期の睡眠様姿勢の発現と成長

子牛の睡眠様姿勢の発現を**Fig. 2** に示した。１日の総発現時間に対して，月齢の効果は有意であった。１日の総発現時間は月齢にともない減少し，１か月齢時（262.0±20.2分／日，平均値±標準誤差）よりも２か月齢（217.2±23.1分／日）は短くなる傾向を示し，３か月齢（202.5±13.8分／日）は有意に短くなった（**Fig. 2a**）。バウト回数（**Fig. 2b**）および平均バウト時間（**Fig. 2c**）には月齢の効果は有意ではなかった。

睡眠様姿勢の平均日発現時間と日増体量および血漿中代謝成分濃度との相関を**Table 1** に示した。日増体量との間には$r = 0.65$と有意な正の相関が認められた（$p < 0.05$）。また，血漿中グルコース濃度との間に$r = 0.56$と正の相関を示す傾向があった（$p = 0.09$）。それ以外に$p = 0.1$を下回る相関はなかった。このことから，睡眠様姿勢の発現時間の長い子牛は，人工乳やスターターの摂取

© The Ito Foundation

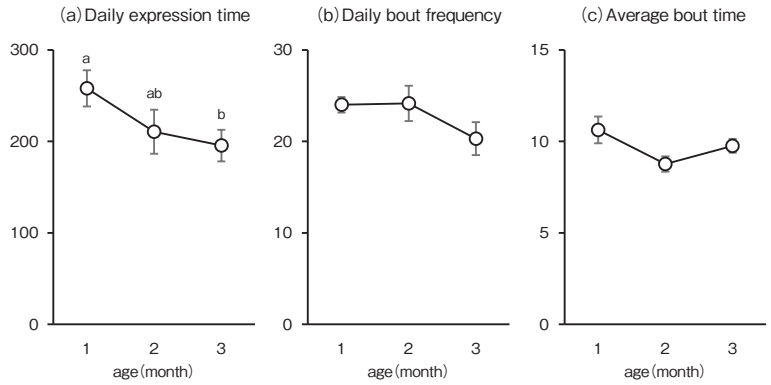


Fig. 2　Sleep-like postures of Japanese Black suckling calves at 1, 2, and 3 months of age (a) daily expression time (min/day), (b) daily bout frequency (times/day) and (c) average bout duration (min / times) Symbols and error bar represent mean and standard error.
a, b represents significant difference among months.

Table 1　Correlations between the average daily expression time of sleep-like postures and the daily weight gain and plasma metabolic component concentrations of Japanese Black suckling calves during 1 to 3 month of age

			Average daily expression time of sleep-like postures (min/day)
	Unit	Mean ± SE	220.3 ± 17.6
Daily weight gain	(kg/day)	0.73 ± 0.03	**0.65**
Plasma metabolic component			
Total protein	(g/dl)	6.05 ± 0.12	0.29
Blood urea nitrogen	(mg/dl)	11.5 ± 0.5	−0.27
Total cholesterol	(mg/dl)	133.0 ± 14.5	−0.13
Triglyseride	(mg/dl)	17.6 ± 1.5	−0.09
Free fatty acid	(mEq/l)	0.184 ± 0.023	0.12
Sodium	(mEq/l)	144.7 ± 0.3	0.11
Chlorine	(mEq/l)	102.5 ± 0.2	−0.08
ALP	(U/l)	659.1 ± 52.5	0.09
AST	(U/l)	50.41 ± 2.19	0.23
ALT	(U/l)	9.55 ± 0.43	−0.17
LDH	(U/l)	829.4 ± 22.9	−0.44
γ-GT	(U/l)	21.0 ± 1.1	−0.05
Albumin	(g/dl)	3.65 ± 0.04	0.27
HDL-cholesterol	(mg/dl)	105.3 ± 12.9	−0.11
LDL-cholesterol	(mg/dl)	45.5 ± 7.2	−0.12
Glucose	(mg/dl)	106.0 ± 4.4	0.56
BHB	(μmol/l)	167.5 ± 12.4	0.33
Total ketone	(μmol/l)	168.1 ± 12.4	0.33

Bold figure represent significant correlation with the average daily expression time of sleep-like posture ($p<0.05$)
ALP : alkaline phosphatase, AST : aspartate aminotransferase, ALT : alanine aminotransferase,
LDH : lactate dehydrogenase, γ-GT : γ-glutamyl transpeptidase, BHB : D-β-Hydroxybutyric acid

© The Ito Foundation

が多く，良好な発育を示す可能性が示唆された。

3.1.2　肥育前期の睡眠様姿勢の発現と成長

肥育牛の睡眠様姿勢について，１日の総発現時間は12か月齢（74.1±10.7分／日）より15か月齢（109.7±6.1分／日）で有意に長くなり（$p < 0.05$），バウト回数は12か月齢（9.8±1.1回／日）より15か月齢（14.8±0.6回／日）で有意に多くなった（$p < 0.05$）。平均バウト時間は月間で違いはなかった。Fukasawaら[6]は，給与飼料中の濃厚飼料の比率が上がると，睡眠様姿勢の総発現時間が長くなることを報告しており，本調査でも15か月齢時に配合飼料の割合が増加したことが月齢間の差に影響していると考えられた。

12か月齢時および15か月齢時の睡眠様姿勢の平均日総発現時間とその間の日増体量の関係を**Fig. 3**に示した。両者の相関は$r = -0.29$（$p = 0.58$）で有意ではなかった。しかし，１点離れ値があり，それを除くと負の関係（$r = -0.88$，$p < 0.05$，$n = 5$）が認められた。そのため，今後サンプル数を増やして検討する必要がある。睡眠様姿勢の平均日発現時間と血漿中代謝成分との間には有意な相関はなかった。

睡眠様姿勢の発現と増体の関係については，哺乳期と肥育前期で影響が異なる可能性が示唆された。哺乳期には両者の間に正の関係が認められた。ヒトでは深いノンレム睡眠時に成長ホルモンが放出される（井上，2006）。本姿勢時にはレム睡眠であることが多い[2~4]とされているが，哺乳類の通常の睡眠ではレム睡眠とノンレム睡眠は関連し，レム睡眠の増加はノンレム睡眠の増加も反映している[7]こと，GHの投与はレム睡眠を増加させる[8]ことから，ノンレム睡眠時の高いGH分泌がレム睡眠を誘発していることで，睡眠様姿勢の日発現時間と日増体量との間に正の関係が認められた可能性が考えられた。

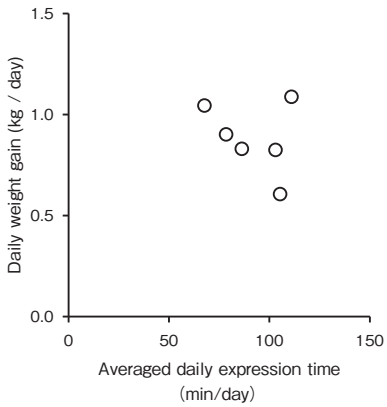


Fig. 3　Scatterplot of average daily expression time of sleep-like posture and daily weight gain of Japanese Black fattening cattle during 12 to 15 months of age

一方，肥育前期には両者の間には負の相関が示唆された。Fukasawaら[6]は配合飼料の多給によるエンドトキシンの発生や摂食・反芻時間の短縮などのAW上の負の影響が，本姿勢の発現時間が増加につながる可能性をあげている。配合飼料の多給がウシの健康性や行動充足など，生産性やAW的に負の要因が睡眠様姿勢の発現に与える影響については，今後検討する必要がある。

3.2　牛床の清潔度が睡眠様姿勢の発現に与える影響

清掃群では対照群と比べ，空気中アンモニア濃度と牛床水分含量が清掃後に有意に低下した（$p < 0.01$）。伏臥位睡眠様姿勢の１日の総発現時間およびバウト回数，また横臥位睡眠様姿勢の総発現時間とバウト回数で処理と時期の有意な交互作用がみられた（$p < 0.05$）。清掃後が清掃前と比べて対照群では伏臥位睡眠様姿勢の総発現時間（$p < 0.05$）およびバウト回数（$p < 0.01$）が増加し，清掃群では横臥位睡眠様姿勢の総発現時間（$p < 0.1$）とバウト回数（$p < 0.01$）が増加する傾向を示した。２つの睡眠様姿勢の合計発現時間には処理と時期の交互作用はみられず，清掃前後で合計発現時間は変わらないものの，伏臥位から横臥位に睡眠様姿勢がシフトした。このことから

© The Ito Foundation

睡眠様姿勢の１日の総発現時間は固定的だが，飼育環境の快適性によって発現様相が変わることを示唆している。

４．要　約

本研究では黒毛和種における睡眠様姿勢（伏臥時に頸を曲げ，頭部を腹部に寄せて休息する姿勢）の発現の（１）哺乳期（１−３か月齢）および肥育前期（12−15か月齢）の成長との関係，および（２）牛床状態の違いによる影響，について検討した。（１）哺乳期には睡眠様姿勢の平均日発現時間と日増体量との間に正の相関が認められた。また，睡眠様姿勢の平均日発現時間と血漿中グルコース濃度との間に正の相関が認められ，睡眠様姿勢の発現時間の長い子牛は，栄養摂取が良好で，良好な発育を示す可能性が示唆された。一方，肥育牛では，睡眠様姿勢の平均日発現時間と日増体量との間に負の傾向が認められた。このことから哺乳期と肥育前期では睡眠様姿勢の発現が増体に対して与える影響が異なることが示唆された。（２）牛床が清潔になることで，伏臥位から横臥位に睡眠様姿勢がシフトした。このことから睡眠様姿勢の１日の総発現時間は固定的だが，飼育環境の快適性によって発現様相が変わることを示唆している。

文　献

1）井上昌次郎：眠りを科学する，朝倉書店，東京，2006.
2）Hänninen, L., Mäkelä, J. P., Rushen, J., de Passillé, A. M., Saloniemi, H.:Assessing sleep state in calves through electrophysiological and behavioural recordings: A preliminary study, *Applied Animal Behaviour Science*, **111**, 235〜250, 2008.
3）Ternman, E., Matti Pastell, M., Agenäs, S., Strasser, C., Winckler, C., Nielsen, P. P., Hänninen, L.:Agreement between different sleep states and behaviour indicators in dairy cows, *Applied Animal Behaviour Science*, **160**, 12〜18, 2014.
4）Hunter, L. B., Haskell, M. J., Langford, F. M., O'Connor, C., Webster, J. R., Stafford, K. J.:Heart rate and heart rate variability change with sleep stage in dairy cows, *Animals*, **11**, 2095, 2021.
5）Fukasawa, M., Komatsu, T., Higashiyama, Y., Oshibe, A.:The use of accelerometer to measure sleeping posture of beef cow, *Animal Science Journal*, **89**, 488〜493, 2018.
6）Fukasawa, M., Komatsu, T., Higashiyama, Y.:The influence of concentrate-rich diet on daily sleep and lying postures of Japanese black cows, *Animal Science Journal*, **91**, e13356, 2020.
7）Ternman, E., Nilsson, E., Nielsen, P. P., Pastell, M., Hänninen, L., Agenäs, S.:Rapid eye movement sleep time in dairy cows changes during the lactation cycle, *Journal of Dairy Science*, **102**, 5458〜5465, 2021.
8）田ヶ谷浩邦：睡眠関連ホルモンの計測，生体医工学，**46**，169〜176，2008.

© The Ito Foundation

ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発（Ⅱ）

Development of high digestibility warm-season forage grass by genome editing（Ⅱ）

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）

In this study, we evaluated characteristics of morphology, yield, and fiber composition of genome-edited bahiagrass plants with a mutation of the *CAD* gene and investigated the genetic segregation of the *CAD* mutant locus and the inserted vector in the T1 progeny as with previous year. Among the three genome-edited lines, the E26 line, with the mutation inserted in both *CAD* alleles, showed lower plant height and reduced dry matter yield. In contrast, the lignin content of this line was significantly reduced and digestibility was increased around 10% over the wild type. These results showed that mutations in both *CAD* alleles more significantly affected morphology and fiber composition. Crossing the three genome-edited lines with seed-derived wild type as pollen parents, only the E9 line with the mutation inserted in single *CAD* allele produced the seeds. Subsequently, we investigated the presence of the *CAD* mutant locus and the *bar* gene of the vector in the T1 progeny, resulting in a genetic segregation of approximately 1:1. In addition, 7 out of 42 plants were found to be null-segregants with a *CAD* mutant locus and the *bar* gene removed. These plants were subjected to PCR at four sites of the vector, and no bands were detected at all PCR sites, which suggested that the vector was completely removed in the selected null-segregants. For the next step, we will carry open cross of the null-segregants, and aim to be the homozygous *CAD* mutant loci and genetically fix them for developing a new cultivar.

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%である。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繋がると考えられる。

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

© The Ito Foundation

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。

著者は，前年度（令和２年度）の本研究助成において，バヒアグラスについて，初めてゲノム編集に成功しており，リグニン生合成で重要となる*CAD*遺伝子に変異を挿入したゲノム編集個体を３系統得ている。また，両方の*CAD*対立遺伝子に変異が挿入された個体では，野生型に比べ，約40％のリグニン含量の減少が認められ，ゲノム編集技術により標的配列に変異を挿入し，それが形質に影響を及ぼすことを明らかとしている。本研究では，第１に，上記のゲノム編集個体３系統について，形態調査を行うとともに，その繊維成分についても評価した。一方で，これらの個体は，ゲノムにベクターが組み込まれているため，遺伝子組換え体として扱われ，今後，新品種を育成するためにはベクターの除去が必要となる。そのため，第２に，上記ゲノム編集個体と野生型を交配し，*CAD*標的配列に変異が挿入され，かつベクターが除去されたヌル分離個体を作出した。

２．方　　法

2.1　供試材料

供試材料は，バヒアグラスの*CAD*遺伝子に変異を挿入したゲノム編集個体である。この編集個体は，*CAD*標的配列の対立遺伝子の片方に変異が挿入されたE9系統（Ｔの挿入）とE13系統（20塩基の欠失），その両方に変異が挿入されたE26系統（Ｔの挿入およびGTの挿入）であり，ベクターのみ導入され変異の挿入が認められないV1系統も用いた。野生型（WT）としては，同じカルス系統由来の再分化植物体を供試した。これらの植物体は，2021年３月２日に1/5000ａポットに５株ずつ移植し，１系統につき３ポットずつ特定網室内で育成した。

2.2　形態および収量調査

形態調査は，2021年10月25日に実施し，草丈，葉身長および葉幅を調査した。その後の収量調査は，植物体を地表より１cmで刈取り，乾物重を測定することにより行った。

2.3　繊維成分の調査

上記の乾物重を測定したサンプルは，それぞれ１mm程度に粉砕し，その0.5ｇをフィルターバックに入れた後，中性デタージェント繊維（NDF）はデタージェント法により，*in vitro*消化率はペプシン・セルラーゼ法により分析した。リグニン含量は，TissueLyserⅡ（QIAGEN）でさらに細

© The Ito Foundation

かく粉状に粉砕し，蒸留水とメタノールで脱脂処理を行った後，細胞壁試料（20mg）を用いて，島田ら[6]の迅速チオグリコール酸リグニン定量法（rTGA法）により解析した。

2.4　ゲノム編集個体後代における*CAD*変異遺伝子座と*bar*遺伝子の確認

ゲノム編集個体（E9，E13，E26系統）を種子親に野生型と交配したところ，E9系統のみで種子を採種することができた。得られた種子は，滅菌処理後，寒天培地で発芽させ，植物体よりDNAを抽出した後，*CAD*変異遺伝子座と導入ベクターの一部である*bar*遺伝子の有無を確認した。*CAD*標的遺伝子座の変異の有無は，PCR/RE解析により行った。すなわち，*CAD*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（*Rsa*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。*bar*遺伝子は通常どおり，PCR後の目的バンドの有無で後代への遺伝分離を確認した。

2.5　ヌル分離個体における導入ベクターの確認

上記実験で選抜した*CAD*標的配列に変異が挿入され，かつ*bar*遺伝子のバンドが認められないヌル分離個体は，他のベクター配列についても調査され，ベクターの挿入を確認した。プライマーは，ベクターの４箇所に設計し（**Fig. 5a**），それぞれの系統についてPCRを行い，バンドの有無を確認した。

3．結果と考察

3.1　ゲノム編集個体の形態および収量

Fig. 1 は，ゲノム編集個体の形態および収量をまとめたものである。野生型とＶ１系統は，すべての形質について，一貫して有意差が認められず同等であった。草丈は，E9系統が最も高く，野生型に比べ，有意差が認められた。一方，E26系統は，草丈が最も低く，野生型に比べ，0.1％水準の有意差を示した。葉幅は，E9およびE26系統で野生型に比べ有意に広いものの，葉身長ではE26系統で有意に低かった。収量は，E26系統において野生型に比べ有意に低く，**Fig. 2** のゲノム編集個体の表現型からも，対立遺伝子の両方に変異が挿入されたE26系統は草型が小型で収量が低いことが判断できた。

3.2　ゲノム編集個体の繊維成分

リグニン含量は，E26系統において大幅に減少し，野生型との間で0.1％水準で有意差が認められた。また，本系統は，NDF含量も低く，消化率は，野生型に比べ10％程増加しており，*CAD*対立遺伝子両方の変異は，リグニンの合成を抑制し，消化性を向上することを明らかとした（**Fig. 3**）。

3.3　ゲノム編集個体後代における*CAD*変異遺伝子座と*bar*遺伝子の遺伝分離

ゲノム編集個体３系統について，種子由来野生型を花粉親として交配させたところ，E9系統でのみ種子が採種された。**Fig. 4** は，その後代における*CAD*変異遺伝子座とベクターの一部である*bar*遺伝子の有無を個体ごとにまとめたものである。標的配列の変異により制限酵素（*Rsa*Ⅰ）の消化を受けない個体（236bpのバンドが認められた個体）は，42個体のうち約半数認められ，E9系統後代では*CAD*変異遺伝子座がおよそ１：１の比で分離していた（**Fig. 4a**）。また，同様に*bar*遺伝子についても，その有無は，１：１に分離していた（**Fig. 4b**）。さらに，*CAD*変異遺伝子座を保持し，かつ，*bar*遺伝子が除去されたヌル分離個体は，７個体認められ，そのうち正常に生育した５個体を以下の解析に供試した。

3.4　ヌル分離個体における導入ベクターの確認

ヌル分離個体におけるゲノムでの導入ベクター

© The Ito Foundation

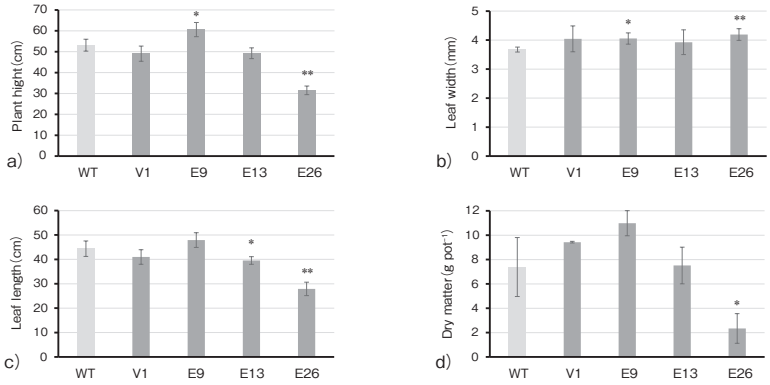


Fig. 1　Morphological characterization and dry matter of wild type (WT), non-mutated transgenic plants (V1) and mutated transgenic plants (E9, E13, E26) in bahiagrass. Each graph indicates plant height (a), Leaf width (b), Leaf length (c) and dry matter (d). * and ** represent significant difference at $p < 0.05$ and < 0.01 between the WT, respectively.

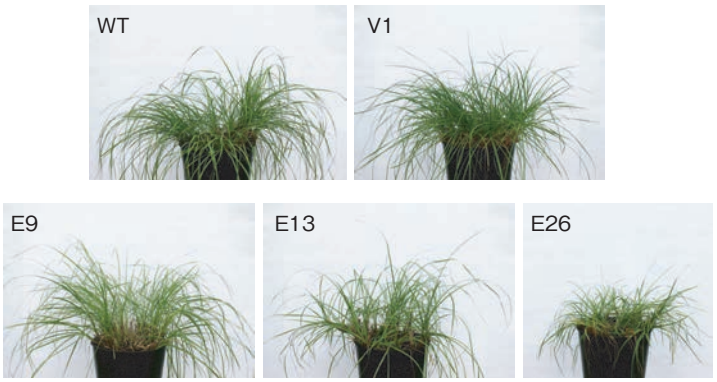


Fig. 2　Phenotypes of wild type (WT), non-mutated transgenic plants (V1) and mutated transgenic plants (E9, E13, E26) in bahiagrass. Pot size was 20 cm in diameter.

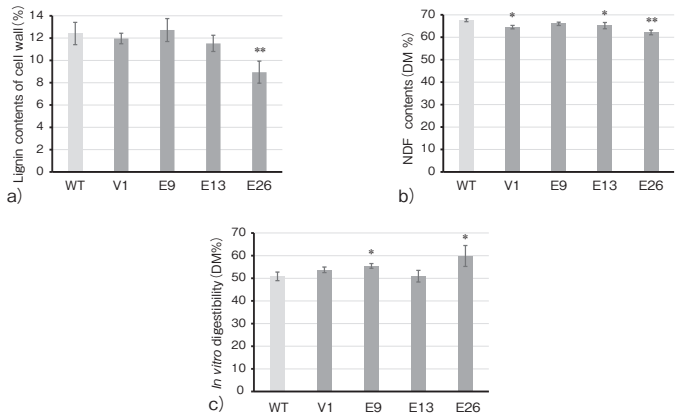


Fig. 3　Evaluation of fiber composition of wild type (WT), non-mutated transgenic plants (V1) and mutated transgenic plants (E9, E13, E26) in bahiagrass. Each graph indicates lignin contents of cell wall (a), NDF contents (b), *in vitro* digestibility (c). * and ** represent significant difference at $p < 0.05$ and < 0.01 between the WT, respectively.

© The Ito Foundation

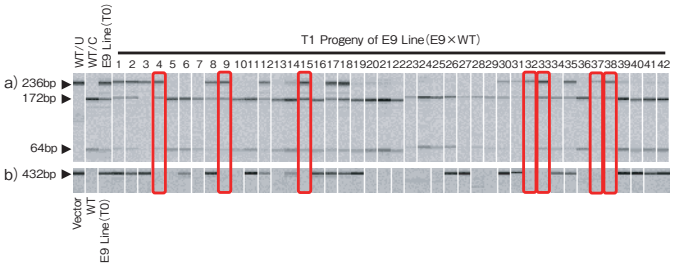


Fig. 4　Genetic segregation of the *CAD* mutant locus (a) and transgenes (*bar* gene) (b) of 42 T1 progeny of E9 mutated transgenic line (E9 × WT) in bahiagrass. a) Confirmation of mutations by PCR and restriction with *Rsa* I in T1 progeny of E9 mutated transgenic line. PCR products amplified by primers Pn_CAD_F514 and Pn_CAD_R749 were digested with *Rsa* I. Lanes labelled WT/C and U are PCR fragments amplified from wild type plants digested with and without *Rsa* I. Lanes labelled E9 line (T0) is E9 mutated transgenic line in T0 generation. Lanes 1–42 show blots of PCR fragments amplified from T1 progeny of E9 mutated transgenic line digested with *Rsa* I. The 236 bp bands are showed inherited the *CAD* mutant locus in T1 progeny. b) Detection of *bar* gene with vector in T1 progeny. PCR products amplified by primers BAR_F92 and BAR_R523. Lanes labelled vector is plasmid vector used in genetic transformation by particle bombardment. The 432 bp bands are showed inherited *bar* gene with vector. Lanes with a circle indicated null-segregants with a *CAD* mutant locus and the *bar* gene removed in T1 progeny.

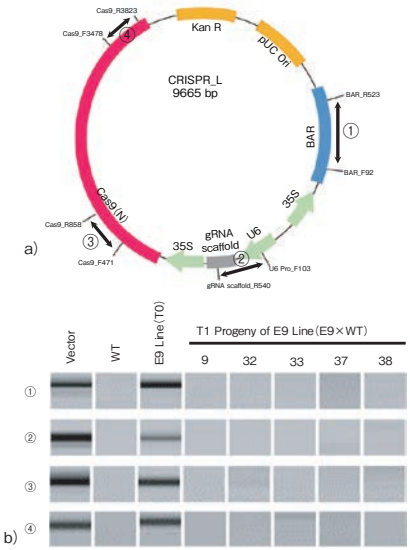


Fig. 5　Detection of vector sequence in the null-segregants of T1 progeny of E9 mutated transgenic line (E9 × WT) in bahiagrass. a) Schematic structure of the plasmid vector, CRISPR-L, and primer sets (①–④) used for transgene detection. b) Detection of transgene using primer sets (①–④). Lanes labelled WT is wild type. Lanes labelled E9 line (T0) is E9 mutated transgenic line in T0 generation. Lanes 9, 32, 33, 37 and 38 is null-segregants of T1 progeny in E9 line.

の存在は，上記の*bar*遺伝子のプライマー以外に，ベクターの３箇所で他のプライマーを設計し，PCR増幅バンドの有無で判断された（**Fig. 5a**）。得られたヌル分離個体は，導入ベクターに設計されたすべてのプライマーについて増幅バンドが認められず，これらの個体は，導入ベクターが完全に除去されたものと推察された（**Fig. 5b**）。

以上のことから，本研究において，ゲノム編集

© The Ito Foundation

による*CAD*遺伝子の変異により，バヒアグラスのリグニン含量の低下および消化率の向上を明らかとした。また，交配により導入ベクターが除去されたヌル分離個体を作出したことから，本個体を用いた今後の新規品種育成が期待される。

４．要　約

本研究は，前年度につづき，バヒアグラスの*CAD*遺伝子に変異が挿入されたゲノム編集個体について，形態，収量および繊維成分の評価と後代における*CAD*変異遺伝子座および導入ベクターの遺伝分離について調査した。ゲノム編集個体３系統のうち*CAD*対立遺伝子の両方に変異が挿入されたE26系統は，草丈が低く，乾物収量も減少した。一方で，本系統は，リグニン含量が大幅に減少し，消化率も野生型より10％程度増加しており，*CAD*対立遺伝子の両方の変異がより顕著に形態および繊維成分に影響を与えることを明らかとした。ゲノム編集個体３系統について，種子由来野生型を花粉親に交配させたところ，*CAD*対立遺伝子の片方に変異が挿入されたE9系統でのみ，種子が採種された。その後，後代における*CAD*変異遺伝子座および導入ベクターの*bar*遺伝子の有無を調査したところ，約１：１の遺伝分離が認められた。また，いくつかの個体で*CAD*変異遺伝子座を保持し，かつ*bar*遺伝子が除去されたヌル分離個体が確認され，その個数は供試42個体のうち７個体であった。これらの個体について，導入ベクターの４箇所でPCRを行った結果，すべてのPCR箇所でバンドが認められず，選抜したヌル分離個体は導入ベクターが完全に除去されたものと推察された。今後は，得られたヌル分離個体で放任授粉を行い，*CAD*変異遺伝子座をホモ化し，遺伝的に固定することで品種化を目指す。

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）島田菜津美，津山濯，亀井一郎：木材学会誌，**65**，25～32，2019.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Development of fattening method that maintain the flavor of beef and shorten the feeding period in Japanese Black cow（Ⅱ）

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 Shoji[1] and Yutaka Uyeno[2]

（[1]Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [2]Faculty 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 decreased between 21 and 27 months of age, and there was no difference in body weight between the two groups at 27 months of age. Therefore, it was considered difficult to shorten the fattening period. In the 50% SF group, blood retinol concentration decreased to deficiency at 24 months of age. In addition, the blood levels of branched-chain amino acids and restricted amino acids involved in protein metabolism decreased. It was speculated that these affected the decrease in daily gain.

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。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があげられる。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，枝肉成績も良好である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

© The Ito Foundation

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て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良好に維持したり，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。そこで本研究では前報に続き，本飼料を既存配合飼料と組み合わせて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の確立を目的として給与試験を実施した。

２．方　法

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。約10ヵ月齢の黒毛和種雌子牛を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。前報では15ヵ月齢までの肥育前期の状況について報告した。

今年度は継続調査を実施し，飼料摂取量（牛房ごと），体重（21，27カ月齢時）より牛房ごとの飼料要求率を算出した。血液を18，21，24，27ヵ月齢時，糞を18，21，24ヵ月齢時に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，糞はメタボローム解析と細菌叢解析を行った。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，前報で調製したQCサンプルを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]。糞中揮発性脂肪酸（VFA）濃度は高速液体クロマトグラフィー（日本分光 LC-2000システム）により測定した。細菌叢構成の測定では糞から微生物ゲノム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，アンプ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。

３．結果と考察

両区とも９頭ずつ配置したが，Ｃ区には採血，採糞，体重測定ができない牛が１頭いたため８頭の調査となった。発育成績を**Table 1** に示した。体重ならびに日増体量は，21ヵ月齢では50％SF区 536kg，0.77kg／日，Ｃ区 498kg，0.73kg／日，27ヵ月齢では50％SF区 633kg，0.54kg／日，Ｃ区 624kg，0.73kg／日であった。50％SF区において21から27ヵ月齢間の日増体量が低下するとと

© The Ito Foundation

Table 1　Weight gain and feed conversion ratio

Age (months)	Group	Number	body weight (kg)	Average weight gain (kg/head)	Dairy gain (kg/day)	Dry matter intake (kg)	Feed conversion ratio
21	50%SF	9	536	145	0.77	1559	11.0
	C	8	498	139	0.73	1724	12.5
						*	
27	50%SF	9	633	97	0.54	1511	15.9
	C	6	624	132	0.73	1728	13.2
					*	*	

*：$p<0.05$

もに，牛房ごとの飼料要求率は15.9とC区13.2に比べ高くなった。C区では令和３年８月に肺炎による病畜出荷が１頭（23ヵ月齢），令和３年10月に突然死が１頭（25ヵ月齢）あったため最終的な調査牛は６頭となった。

血液性状の推移を**Table 2**に示した。肝機能の指標となるGGTは50％SF区で低く推移し肝機能は良好に保たれており，膨潤酒粕発酵飼料中の酒粕の効果[2, 6]によるものと考えられた。黒毛和種牛の肥育では脂肪交雑度を高めるために肥育中後期の血中レチノール濃度を低く保つ飼養管理が行われるが，50％SF区では24ヵ月齢ならびに27ヵ月齢時においてC区よりも有意に低くなった。特に24ヵ月齢時では平均12 IU/dLと非常に低く４IU/dLの個体も認められた。本農場では21ヵ月齢となる令和３年６月より毎月７日間，レチノール補給のために肥育前期飼料を１kg／日・頭ずつ給与したが，50％SF区では令和３年９月の24ヵ月齢時において血中レチノール濃度が非常に低く欠乏状態にあり，暑熱期におけるレチノールの損耗が大きかったのではないかと考えられた。レチノールを制限している期間には増体量が低下しやすく，血中レチノール濃度が30 IU/dl以下になるとその症状は顕著となり，30 IU/dl以下となった当該月もしくは翌月には日増体量が0.5kg／日を下回る可能性が高くなる[7]ことから，50％SF区の21から27ヵ月齢間における日増体量の低下は血中レチノール濃度低下が影響していた可能性が高い。膨潤酒粕発酵飼料は，配合飼料を105℃で40分間蒸煮した後に２週間程度発酵させてから給与したが，調製した発酵飼料を給与し終えるまでには最大で２ヵ月程度を要するため，発酵期間が長くなった飼料を給与する期間が生じる。飼料中のβカロテンは腸管粘膜でレチノールに変換されて体内に吸収される。βカロテンは熱に強い[8]が発酵過程で減少する[9]ことから，24ヵ月齢前後の血中レチノール濃度の低下は暑熱期の損耗に加えて膨潤酒粕発酵飼料中のβカロテン含量の減少が影響したのかもしれない。膨潤酒粕発酵飼料を給与する際には，飼料中βカロテン含量もしくは血中レチノール濃度に十分配慮するとともに，本飼料の給与効果を評価するためにはこの点に留意した再試験の実施が必要と考えられる。また，24ヵ月齢時において，50％SF区の血中分岐鎖アミノ酸（バリン，ロイシン，イソロイシン）濃度が有意に低下していた。分岐鎖アミノ酸はタンパク質代謝やグルコース代謝を調節する生理機能を持ち，特にロイシンはタンパク質分解を抑制する[10]。ヒトでは体内の遊離分岐鎖アミノ酸濃度は厳密に制御されており，分岐鎖アミノ酸を摂取すると30分後にピークに達し，その後漸減して２時間後には元のレベルに回復する[10]。本研究にお

© The Ito Foundation

Table 2　Transition of plasma biochemical components

Age(months)				18			21			24			27		
Group[1]				50%SF	C		50%SF	C		50%SF	C		50%SF	C	
Number				9	8		9	8		9	7		9	6	
General biochemical test	GGT		(U/L)	29	49	*	40	51		35	42		30	42	*
	Urea nitrogen		(mg/dL)	11.1	11.9		13.8	15.0		12.9	11.9		15.3	15.1	
	Albmine		(g/dL)	3.5	3.6		3.7	3.7		3.8	3.8		3.6	3.5	
	Total Protein		(g/dL)	6.5	6.2		7.0	7.4		7.1	6.9		7.4	7.7	
	Total choresterol		(mg/dL)	129	146	*	128	131		129	144		171	170	
	Glucose		(mg/dL)	70	70		73	73		71	70		69	73	
	Triglyceride		(mg/dL)	21	22		21	21		20	26		31	27	
	Retinol		(IU/dL)	47	47		44	30	*	12	47	*	54	85	*
	α-Tocopherol		(μg/dL)	308	346		262	283		232	317	*	607	418	*
	β-Carotene		(μg/dL)	14	12		8	8		5	7		17	12	*
Metabolomic analysis[2]	Amino Acid	5-Oxoproline-2TMS		0.83	0.92	*	0.66	0.65		1.03	0.99		0.98	1.00	
		Alanine-2TMS		0.85	0.97		1.07	0.87		0.83	0.88		0.69	0.95	**
		Glycine-3TMS		0.90	0.93		1.02	0.90		0.87	0.91		0.87	0.92	
		Isoleucine-2TMS		0.95	1.01		0.96	1.02		0.73	0.97	*	1.03	0.90	+
		Leucine-2TMS		0.97	1.09		1.02	1.09		0.79	1.05	**	0.99	1.00	
		Lysine-4TMS		1.10	1.17		1.44	1.27		0.90	1.26	**	1.15	1.15	
		Methionine-2TMS		1.21	1.15		1.47	1.28		0.87	1.05		1.04	0.91	
		Ornithine-4TMS		1.24	1.48		1.59	1.67		1.04	1.57	*	1.44	1.42	
		Phenylalanine-2TMS		0.99	1.15	+	1.20	1.16		1.07	1.18		1.11	0.99	+
		Serine-3TMS		1.11	1.23		1.20	1.14		0.96	1.25	*	0.98	1.21	+
		Threonine-3TMS		1.00	1.02		1.07	1.03		0.72	0.99	*	1.03	0.98	
		Tyrosine-3TMS		1.22	1.16		1.20	1.29		0.89	1.06		1.07	0.94	
		Valine-2TMS		0.97	1.04		0.98	1.02		0.76	1.00	**	1.00	0.99	
	Suger	Glucose-5TMS(1)		0.86	0.87		1.20	1.24		0.26	0.41	*	0.54	0.39	
		Glucose-meto-5TMS(1)		0.89	0.96		0.79	0.77		1.05	0.72	*	0.67	0.66	
		Glucose-meto-5TMS(2)		1.01	1.16		0.88	0.90		0.97	0.93		0.92	1.02	*
		Mannose-5TMS(2)		0.83	1.03	+	0.79	1.16	+	0.54	0.76	+	1.05	0.80	
	Fatty Acid	Decanoic acid-TMS		0.69	0.68		0.99	1.05		0.69	0.77		0.73	0.69	
		Lauric acid-TMS		0.87	0.84		0.65	0.67		0.52	0.57		0.54	0.54	
		Margaric acid-TMS		0.88	0.93		0.87	0.93		0.76	0.80		0.79	0.76	
		Myristic acid-TMS		0.90	0.98		1.16	1.17		0.98	1.05	*	1.09	1.02	
		Nonanoic acid-TMS		0.90	0.83		1.04	0.98		0.56	0.67	**	0.65	0.56	
		Oleic acid-TMS		0.96	0.73	+	0.64	0.95	*	2.11	1.37		1.67	0.66	
		Palmitic acid-TMS		0.87	0.91		1.01	1.08		0.93	0.97		0.99	0.97	
		Stearic acid-TMS		0.88	0.96		0.97	1.03		0.87	0.90		0.92	0.90	
	Other	3-Hydroxybutyric acid-2TMS		0.87	0.80		0.85	0.84		0.85	0.83		1.09	0.94	
		3-Hydroxypropionic acid-2TMS		1.27	0.98	*	0.65	0.65		0.96	0.78	*	0.91	0.86	
		Benzoic acid-TMS		0.59	0.66		0.82	0.99	+	0.58	0.65		0.64	0.58	
		Citric acid-4TMS		1.39	0.94	**	1.33	1.13		0.96	1.10		1.48	1.12	*
		Creatinine-3TMS		1.83	1.50		1.84	1.84		1.15	1.23		1.32	1.22	
		Glucono-1,4-lactone-4TMS		0.85	0.90		0.88	0.93		0.96	0.82		0.93	1.04	
		Hypoxanthine-2TMS		1.05	1.12		1.09	0.97		0.91	0.91		0.89	0.83	
		Inositol-6TMS(2)		0.95	0.99		1.16	1.05		1.10	1.11		1.07	1.14	
		Lactic acid-2TMS		1.12	1.15		1.36	1.31		0.95	0.94		1.31	1.35	
		Phosphoric acid-3TMS		0.84	0.98		0.72	0.71		0.60	0.77	+	0.79	0.85	
		Pyruvic acid-meto-TMS		0.98	0.96		1.18	0.98		1.05	0.91		0.93	1.11	
		Succinic acid-2TMS		0.90	0.96		1.12	1.18		0.91	0.95		0.99	0.95	
		Taurine-3TMS		1.30	1.61	+	1.71	1.51		1.24	1.29		1.11	1.39	**
		Urea-2TMS		1.06	1.16		1.25	1.35		1.30	1.23		1.61	1.57	
		Ureidosuccinic acid-3TMS		0.89	0.95		0.94	0.98		0.91	0.92		0.94	0.96	
		Uric acid-4TMS		1.17	1.33		1.18	1.09		0.69	1.08	*	1.24	0.91	+

Group[1]：50%SF：50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed，C：Grain mixed feed

Metabolomic analysis[2]：Standardized data by Quality Control sample

Significant difference　**：$p<0.01$，*：$p<0.05$，+：$p<0.1$

© The Ito Foundation

いて血中分岐鎖アミノ酸濃度は50％SF区の24ヵ月齢時を除いてはおおむね同等のレベルであったことから，ヒトと同様に制御されていると考えられるが，24ヵ月齢時に低下した原因については不明である。さらに，24ヵ月齢時には第一制限アミノ酸でリジンに加え，制限アミノ酸の可能性が報告[11]されているスレオニンやイソロイシンも低下していた。分岐鎖アミノ酸の低下とあわせて制限アミノ酸の低下が，21から27ヵ月齢間の日増体量が低下に影響したのではないかと推察される。

糞の性状を**Table 3**に示した。メタボローム解析では前報と同じQCサンプルを用いて各成分を定量しており，前報の11，13，15ヵ月齢時に比べて18，21，24ヵ月齢時では糞中のアミノ酸，糖，核酸関連物質など，脂肪酸を除くほとんどの成分が大幅に増加していた。肥育が進行するに従い，給与飼料量が増加し飼料要求率は高くなっていたことから，腸管膜で吸収しきれないアミノ酸や糖などが糞中に残留したものと考えられた。3-Aminopropanoic acid，Thymine，Mannitolなど18，21，24ヵ月齢時において50％SF区で有意に増減した成分がいくつか認められたが，膨潤酒粕発酵飼料の消化特性との関連性を明らかにすることはできなかった。メタボローム解析の結果と同様に，糞中VFA総量についても，前報と比較して総量が大きく増加しており，消化吸収されなかった成分が大腸内で微生物発酵を受けていることが推察された。その一方で，対照区と50％SF区の間では，VFA総量，VFA組成ともに有意な増減は認められなかった。

糞中の細菌叢構成を**Table 4**に示した。対照区ではLachnospiraceae，Ruminococcaceae，Coprostanoligenesのような繊維分解能力の高い，ルーメン細菌群集を構成している菌が目立ったのに対し，50％ SF区ではOscillospiraceae，Erysipelotrichaceae，Rikenellaceaeのような単胃動物の消化管でよく検出される菌が多い傾向にあった。これは，膨潤酒粕発酵飼料給与によりルーメン細菌叢が変化したことを反映しているのか，それともルーメンをバイパスする栄養素によって生じた下部消化管の環境変化を反映しているのか，さらなる調査が必要である。

本研究では，ルーメン内消化速度の速い膨潤酒粕発酵飼料を通常の配合飼料と組み合わせて給与することにより，濃厚飼料を増給してもルーメン内環境を維持して増体速度を向上させ，通常の３ヵ月間の肥育期間短縮による29ヵ月齢での出荷を目標とした。しかし，27ヵ月齢時点での体重はＣ区と同等であり，29ヵ月齢での出荷は枝肉重量低下による収益性の大幅な悪化を招く可能性が高いため，肥育期間の３ヵ月短縮を断念することとした。一方，膨潤酒粕発酵飼料の給与による牛肉の風味向上やと畜時の内臓廃棄率の低減については効果が期待できることから，通常の肥育期間で出荷する試験牛について継続調査する予定である。

4．要　約

枝肉重量，BMS No，牛肉の風味を維持した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）の給与効果について前報に続き継続調査した。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，21から27ヵ月齢間の日増体量が低下し，27ヵ月齢時点での体重は両区で差が認められなかった。そのため，肥育期間の短縮は困難であると考えられた。50％SF区の24ヵ月齢時において，血中レチノール濃度が欠乏状態まで低下したとともに，タンパク質代謝に関与する分岐鎖アミノ酸や制限アミノ酸の血中濃度の低下が認められ，このことが日増体量の低下に影響したのではないかと推察された。

© The Ito Foundation

Table 3　Transition of fecal properties

Age (months)				18			21			24		
Group[1]				50%SF	C		50%SF	C		50%SF	C	
Number				9	7		9	8		9	7	
Volatile fatty acid			Total VFA (mmol/g)	65.1	60.1		66.3	70.1		62.9	72.0	
			Acetate (mol%)	55.8	57.8		57.8	60.0		57.5	55.6	
			Propionate (mol%)	21.2	19.7		17.7	17.1		18.0	17.7	
			Butyrate (mol%)	23.0	22.5		24.5	23.0		24.6	26.7	
Metabolomic analysis[2]	Amino Acid		3-Aminopropanoic acid-3TMS	2.13	1.03	**	1.95	1.52		1.56	1.28	
			4-Aminobutyric acid-3TMS	2.61	2.88		5.18	1.25		3.56	2.39	
			5-Oxoproline-2TMS	2.42	2.21		2.64	3.14		2.42	2.73	
			Alanine-2TMS	3.84	4.08		5.69	7.11		5.57	5.00	
			Glycine-3TMS	2.77	2.96		3.87	4.96		3.91	3.10	
			Isoleucine-2TMS	2.85	2.86		4.31	4.62		4.09	2.86	+
			Leucine-2TMS	2.70	2.66		4.01	4.90		4.58	2.60	*
			Lysine-4TMS	2.83	2.40		3.53	3.72		3.60	2.91	
			Ornithine-4TMS	3.25	3.23		4.84	4.87		4.34	4.40	
			Phenylalanine-2TMS	2.54	2.58		3.53	4.32		3.83	2.77	
			Threonine-3TMS	3.11	3.04		4.80	4.79		4.28	3.22	
			Valine-2TMS	2.72	2.70		3.90	4.40		3.84	2.74	
	Suger	Pentose	Arabinose-meto-4TMS	5.41	3.27		4.80	6.52		4.28	7.81	*
			Ribose-4TMS (1)	2.08	2.10		3.32	4.30		2.45	1.96	
			Ribose-meto-4TMS	3.89	3.30		4.27	5.13		4.01	4.22	
			Xylose-4TMS (2)	2.62	1.73		2.45	3.47		5.95	5.44	
		Hexose	Fructose-meto-5TMS (1)	4.27	4.12		4.75	7.23	+	5.44	10.08	
			Fructose-meto-5TMS (2)	5.32	3.99		5.01	6.22		4.82	8.91	
			Fucose-meto-4TMS (1)	4.08	4.06		6.20	5.15		5.82	6.53	
			Glucose-5TMS (1)	5.11	6.37		8.34	3.91	+	3.84	3.75	
			Glucose-meto-5TMS (1)	8.42	4.82		6.33	6.25		10.37	6.71	
			Glucose-meto-5TMS (2)	3.03	2.38		2.98	2.91		2.72	4.09	*
		Disaccharide	Maltose-meto-8TMS (1)	3.04	0.64	*	2.87	1.71		2.94	5.83	
			Maltose-meto-8TMS (2)	4.08	0.93		3.82	2.12		6.72	7.96	
	Fatty Acid		Lauric acid-TMS	0.35	0.38		0.43	0.47		0.55	0.55	
			Margaric acid-TMS	0.86	0.91		0.82	0.80		0.84	0.78	
			Myristic acid-TMS	1.07	0.99		1.04	1.04		1.06	0.99	
			Palmitic acid-TMS	0.98	1.03		0.95	0.94		0.96	0.86	
			Stearic acid-TMS	1.01	0.99		0.91	0.89		0.91	0.84	
	Nucleic Acid Rerated Substance		Hypoxanthine-2TMS	2.98	2.16	+	3.34	3.25		2.36	2.45	
			Inosine-4TMS	1.54	0.79		2.16	1.11		2.15	2.04	
			Thymine-2TMS	3.03	2.28		4.27	3.51		2.91	1.82	*
			Uracil-2TMS	3.18	2.58		3.90	4.08		3.19	2.69	
	Other		3-Hydroxybenzoic acid-2TMS	1.90	2.28		2.65	2.43		2.98	3.19	
			3-Hydroxypropionic acid-2TMS	1.25	1.19		1.29	1.70		1.39	1.54	
			5-Aminovaleric acid-3TMS	0.23	0.58	*	0.31	1.59		0.32	0.33	
			Azelaic acid-2TMS	1.47	1.41		2.00	2.06		2.44	2.70	
			Erythrulose-meto-3TMS (1)	1.03	1.04		1.02	1.00		1.03	0.96	
			Galacturonic acid-5TMS (1)	1.58	1.42		1.67	1.32		1.07	2.38	*
			Glucuronic acid-meto-5TMS (1)	4.97	3.94		5.09	5.79		3.40	6.46	*
			Glutaric acid-2TMS	1.89	1.55		2.57	2.33		2.74	2.04	
			Glyceric acid-3TMS	2.12	2.76		2.00	2.05		1.68	1.93	
			Glycerol-3TMS	3.32	2.74		4.08	3.95		3.87	3.47	
			Malic acid-3TMS	0.33	1.89	**	3.91	4.22		3.40	2.59	
			Mannitol-6TMS	4.33	2.26	*	5.21	4.05		6.53	2.43	**
			N-Acetylmannosamine-meto-4TMS (1)	5.22	5.03		6.87	6.35		6.13	6.64	
			N-Acetylmannosamine-meto-4TMS (2)	6.81	7.38		11.50	10.54		10.03	10.23	
			N-Acetylneuraminic acid-6TMS	4.41	1.10		3.61	2.21		8.78	7.46	
			Nicotinic acid-TMS	2.14	1.80		2.49	2.15		2.51	2.99	
			Pantothenic acid-3TMS	1.57	1.75		2.30	2.28		2.02	3.10	*

© The Ito Foundation

Metabolomic analysis[2]	Other	Phosphoric acid-3TMS	1.07	1.05		1.06	0.94	0.86	0.96		
		Propionylglycine-TMS	9.16	7.77		9.40	7.36	5.22	4.56		
		Putrescine-4TMS	2.11	1.60		2.99	2.32	2.47	3.14		
		Succinic acid-2TMS	1.10	1.06		1.09	1.17	1.06	1.18		
		Urea-2TMS	1.00	0.98		0.88	1.08	1.31	1.03	+	
		Ureidosuccinic acid-3TMS	1.44	1.06		1.36	1.36	1.35	1.72	+	
		Xanthine-3TMS	2.62	1.79	*	2.93	3.27	2.48	2.13		

Group[1]：50%SF：50% Steamed fermented feed and 50% Grain mixed feed，C：Grain mixed feed

Metabolomic analysis[2]：Standardized data by Quality Control sample

Significant difference　**：p<0.01，*：p<0.05，+：p<0.1

Table 4　Fecal bacterial flora composition

Age（months）	18		21		24	
Group	50%SF	C	50%SF	C	50%SF	C
Firmicutes	**0.450**	**0.480**	**0.493**	**0.560**	**0.497**	**0.523**
_Clostridia;o__Oscillospirales;f__Oscillospiraceae	0.116	0.103	0.126	0.118	0.118	0.083
_Clostridia;o__Lachnospirales;f__Lachnospiraceae	0.076	0.088	0.090	0.120	0.099	0.168
_Clostridia;o__Oscillospirales;f__Ruminococcaceae	0.049	0.055	0.037	0.036	0.029	0.043
_Clostridia;o__Oscillospirales;f__[Eubacterium]_coprostanoligenes	0.026	0.039	0.027	0.042	0.018	0.026
_Clostridia;o__Oscillospirales;f__UCG-010	0.029	0.032	0.022	0.020	0.025	0.017
_Clostridia;o__Peptostreptococcales-Tissierellales	0.010	0.014	0.024	0.023	0.026	0.033
_Bacilli;o__RF39;f__RF39	0.019	0.018	0.023	0.029	0.022	0.018
_Clostridia;o__Clostridiales;f__Clostridiaceae	0.016	0.015	0.020	0.029	0.025	0.020
_Bacilli;o__Erysipelotrichales;f__Erysipelotrichaceae	0.015	0.016	0.021	0.024	0.031	0.018
_Clostridia;o__Clostridia_UCG-014;f__Clostridia_UCG-014	0.016	0.020	0.020	0.026	0.017	0.019
_Clostridia;o__Monoglobales;f__Monoglobaceae	0.015	0.016	0.024	0.027	0.020	0.017
_Clostridia;o__Christensenellales;f__Christensenellaceae	0.009	0.010	0.012	0.016	0.015	0.011
_Negativicutes;o__Acidaminococcales;f__Acidaminococcaceae	0.015	0.014	0.008	0.006	0.009	0.012
_Clostridia;o__Oscillospirales;__	0.010	0.012	0.009	0.008	0.005	0.008
Bacteroidota	**0.429**	**0.421**	**0.416**	**0.389**	**0.401**	**0.415**
_Bacteroidales;f__Prevotellaceae	0.106	0.143	0.191	0.194	0.154	0.214
_Bacteroidales;f__Rikenellaceae	0.137	0.108	0.088	0.073	0.086	0.073
_Bacteroidales;f__Muribaculaceae	0.063	0.065	0.069	0.072	0.080	0.046
_Bacteroidales;f__Bacteroidaceae	0.053	0.050	0.024	0.020	0.041	0.039
_Bacteroidales;f__Bacteroidales_RF16_group	0.043	0.031	0.026	0.009	0.012	0.021
_Bacteroidales;f__Tannerellaceae	0.013	0.016	0.009	0.011	0.009	0.010
Spirochaetota	0.092	0.055	0.073	0.027	0.062	0.044
Proteobacteria	0.018	0.037	0.012	0.016	0.025	0.010
Verrucomicrobiota	0.007	0.001	0.003	0.002	0.010	0.001
Fibrobacterota	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.002
Elusimicrobiota	0.001	0.002	0.000	0.002	0.001	0.003
Actinobacteriota	0.001	0.002	0.001	0.001	0.000	0.002
Cyanobacteria	0.001	0.000	0.001	0.001	0.002	0.001
Fusobacteriota	0.000	0.000	0.000	0.000	0.001	0.000
Campilobacterota	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Unidentified	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Patescibacteria	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Planctomycetota	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Desulfobacterota	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

© The Ito Foundation

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） 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，生物工学，97(10)，595～598，2019.

7） 社団法人畜産技術協会編：ビタミンＡのコントロールを用いた効率的肥育技術Q&A Vol. 2，2005.

8） 上原剛，市田雪子，岩井健：過熱蒸気を用いた野菜蒸煮処理，宮崎県工業技術センター・宮崎県食品開発センター研究報告，46，139～141，2001.

9） 小林亮英，山崎昭夫，三上昇，鳶野保：アルファルファとオーチャードグラスのβ-カロテン含量に及ぼす貯蔵方法の影響，日畜会報，57(11)，881～886，1986.

10） 下村吉治：分岐鎖アミノ酸代謝の調節機構，日本栄養・食糧学会誌，65(3)，97～103，2012.

11） 肉用牛研究会編：肉用牛の科学，92～100，2015.

© The Ito Foundation

畜産汚水処理施設の低コスト水質監視システムの開発

Development of low-cost water quality monitoring system for livestock wastewater treatment facility

富谷　信一[1]・影山　智明[2,3]・三浦　政司[3]・宮崎　　隆[4]・堀尾　靖史[4]
（[1]鳥取県中小家畜試験場，[2]合同会社TURIPテクノロジズ，[3]鳥取大学学術研究院，[4]株式会社アクシス）

Shinichi Tomitani[1], Tomoaki Kageyama[2,3], Masashi Miura[3], Takashi Miyazaki[4] and Yasushi Horio[4]
（[1]Tottori Swine&Poultry Experiment Station, [2]GK TURIP technologies, [3]Tottori University Academic Research Institute, [4]Axis CORPORATION）

By using commercially available water quality measurement sensors, communication modules, etc., it was possible to manufacture a water quality remote monitoring device at low cost. In addition, even 10 months after the installation, there were no problems such as breakdowns, and there was no problem in acquiring water quality measurement data.

When the correlation between the ORP and the BOD concentration of the treated water was examined, the BOD concentration tended to decrease as the ORP increased, but the correlation was low. In addition, since the measurement may not be performed correctly due to the influence of the biofilm adhering to the surface of the ORP sensor, it is necessary to consider the suppression of the adhesion of the biofilm for the estimation of the BOD concentration by the ORP. On the other hand, the ammonia nitrogen concentration of the treated water was highly correlated with EC, suggesting that EC can be used for remote monitoring in real time as an alternative index for estimating the ammonia nitrogen concentration of the treated water.

In addition, EC was found to have a high correlation with the ammoniacal nitrogen concentration in raw water, and it was thought that EC could be used as a guideline for grasping the BOD concentration to some extent.

In this test, no clear correlation was obtained for the estimation of nitrate nitrogen and nitrite nitrogen concentrations, so it was not possible to create an alternative index that can estimate nitrate nitrogen and the like. In addition, although useful data could not be obtained for the estimation of the BOD concentration of the treated water this time, the results that can be expected to estimate the BOD concentration by the transparency were obtained, so we will consider creating an alternative index of the transparency in the future. However, we would like to verify whether the BOD concentration can be estimated.

1．目　　的

畜産施設から出る汚水は水質汚濁防止法に定める排水基準値が適用されており，この基準に適合しなければ公共水域へ放流できない。平成13年に「硝酸性窒素等」の一般排水基準が100mg/Lに設

© The Ito Foundation

定されたが，畜産施設から出る汚水の窒素濃度はきわめて高く，畜産農家等についてはただちに一般排水基準を達成することが困難であることから，500mg/Lの暫定基準値が設定されている。近い将来，畜産業においても一般基準である100mg/Lが適用される可能性がある一方[1]，畜産施設の汚水処理施設から出る処理水の硝酸性窒素等の濃度は季節変動が大きく，常に100mg/L以下を維持するのは困難なのが実態である。

常に一般基準値100mg/L以下を維持するには，より規模の大きい汚水処理施設の新設が考えられるが，多くの農家にとって汚水処理施設への新規投資は経済負担が大きいため，新たな投資を伴わず既存の汚水処理施設の浄化機能を最大限発揮させ，常に安定した水質を維持できる方法が求められている。

そのためには，汚水処理施設の浄化処理状況を常に把握して水質悪化等のトラブルに対し迅速に対応することが重要であることから，リアルタイムで水質を遠隔監視でき，かつ低コストなシステムの開発を試みる。

具体的には，市販の水質測定用センサーをベースとした低コストなハードウェアとクラウドサーバーおよび端末で構成される水質遠隔監視システムを製作し[2]，このシステムによって取得した測定データを基に実際の水質（窒素濃度，BOD濃度）を推定できるか検証する。これにより水温等の環境変化や汚水処理施設への流入汚水濃度等の変化による水質悪化の危険予測にも対応可能で，機能・コストともに実用性の高いシステムの構築を目指すことを目的としている。

2．方　　法

2.1　水質遠隔監視システム試作機の設置

市販の水質測定用センサーと通信モジュールおよび液晶モニターで構成される試作機をインターネット回線（無線）に接続し，測定データをサーバーに蓄積させてwebブラウザーでパソコンまたはスマートフォンから測定値を閲覧できるよう設定した。試作機は鳥取県中小家畜試験場汚水処理施設最終処理槽横に設置し（**Fig. 1**），通信モジュールおよび液晶モニターからなる測定・通信装置に，汚水処理施設の最終処理槽および原水槽に設置した水質測定用センサーを接続して水質測定データを取得した（**Fig. 1**）。

また，水質測定項目は，最終処理槽では水温・

Fig. 1　Water quality remote monitoring system prototype and data browsing

© The Ito Foundation

pH・酸化還元電位（ORP）・電気伝導率（EC）・色度とし，原水槽については水温・pH・ORP・ECとした。

※鳥取県中小家畜試験場汚水処理施設の概要

処理方式：回分式活性汚泥法

＜諸元＞

処理対象汚水量：15m^3／日

処理前BOD濃度：3,334mg/L

処理前SS濃度：5,334mg/L

処理後BOD濃度：60mg/L

処理後SS濃度：90mg/L

2.2　最終処理槽（処理水）の水質推定

最終処理槽の処理水を２～３日に１回の頻度でサンプリングして水質分析を行い，試作機の測定データと水質分析値との相関分析を行った。水質分析項目は，BOD・SS・透視度・アンモニア性窒素・硝酸性窒素・亜硝酸性窒素とし，BODはBODセンサーによる５日間培養，SSはガラス濾紙法，透視度は透視度計による測定，アンモニア性窒素，硝酸性窒素，亜硝酸性窒素はイオンクロマトグラフ法により行った。

2.3　原水槽（原水）の水質推定

曝気槽流入前の原水は水質の日変動が大きいことから１日に３～４回の頻度でサンプリングして水質分析を行い，処理水と同様の方法で相関分析を行った。水質分析項目はBOD・pH・アンモニア性窒素・硝酸性窒素・亜硝酸性窒素とした。

3．結果と考察

3.1　水質遠隔監視システム試作機の設置

処理水の測定は初夏から冬期にかけて，原水の測定は冬期に実施した。その結果を**Table 1** に示す。

処理水における測定期間を通しての平均値は水温22.2℃（n：85），pH値7.12（n：85），ORP−263.0mV（n：85），EC873 μS（n：36），色度はRed値38.8（n：25），Blue値28.4（n：25），Green値18.6（n：25）であった。なお色度比は，R・B・Gの色度値合計に対する各色度値の割合を示したもので，R値の割合が最も高くなった。処理水に浸漬させたセンサーは２か月程度経過すると表面に汚泥などのいわゆるバイオフィルムの付着が見られるようになったため，定期的に水洗浄を実施した。水温およびpHの測定値についてはバイオフィルム付着による影響は見られなかったが，ORPは水洗浄後に測定値が急上昇する傾向が見られたことから，バイオフィルムはORP測定に影響することが考えられた。一方，原水の平均値は水温9.1℃（n：46），pH値8.68（n：46），ORP−412.8mV（n：45），EC3,285 μS（n：46）であったが，原水の測定は冬期に実施したため，処理水の水温よりかなり低い状態となった。また，ECの標準偏差は処理水と比較して大きい結果となった。これは，原水槽に流入する畜舎排水の濃度変動が大きいことが要因と考えられた。

Table 1　Average value of measurement data（±standard deviation）

	temperature (℃)	pH	ORP (mV)	EC (μS)	chromaticity (value)			chromaticity (ratio)		
					R value	B value	G value	R ratio	G ratio	B ratio
treated water	22.2	7.12	−263.0	873	38.8	28.4	18.6	45.2%	33.1%	21.7%
	(±4.6)	(±0.4)	(±207.8)	(±265)	(±53.5)	(±41.7)	(±27.3)	(±9.4)	(±2.5)	(±7.5)
	(n : 85)	(n : 85)	(n : 85)	(n : 36)	(n : 25)	(n : 25)	(n : 25)			
raw water	9.1	8.68	−412.8	3,285	−	−	−	−	−	−
	(±0.8)	(±0.3)	(±138.3)	(±1,436)						
	(n : 46)	(n : 46)	(n : 45)	(n : 46)						

© The Ito Foundation

3.2　最終処理槽（処理水）の水質推定

ORPは汚水の生物学的処理において重要な要因の一つとされていることから，水質評価の指標となるBOD濃度との相関について検証した。その結果，処理水のORPが上昇するに従いBOD濃度は減少していく傾向が見られたものの，相関係数は0.1730と低い結果となった（**Fig.２左**）。また，ORPセンサー表面に付着したバイオフィルムの影響により正しく計測されないことがあったため，今後はこのバイオフィルムの付着抑制について検討する必要がある。また，本試験でBOD濃度は透視度による推定が期待できる結果が得られたので，今後は透視度の代替指標の作出についても検討し，BOD濃度の推定が可能かどうか検証を行うこととしたい。一方，ECとアンモニア性窒素濃度との関係について検証したところ，相関係数は0.9930となり，両者には高い相関が認められた（**Fig.２右**）。このことから，アンモニア性窒素についてはECにより高い精度で推定可能であることが示唆され，ECはアンモニア性窒素濃度推定の代替指標としてリアルタイムで遠隔監視に活用できるのではないかと考えられた。なお，硝酸性窒素濃度および亜硝酸性窒素濃度に対する相関係数はすべて低く，有用なデータは得られなかった（**Table２**）。しかし，水質汚濁防止法の一般排水基準値に定められている「硝酸性窒素等」をモニタリングするためにはアンモニア性窒素濃度に加え，硝酸性窒素濃度および亜硝酸性窒素濃度も把握する必要があるため，これらの推定方法については今後も引き続き検討する必要がある。

3.3　原水槽（原水）の水質推定

曝気槽流入前の原水は，処理水の水質に大きく影響するため，原水の水質をモニタリングすることによって曝気時間の調整や処理水悪化などの危険予測に役立つことが期待できる。そこで，原水の窒素やBOD濃度との相関について検証した。その結果，原水のアンモニア性窒素濃度とECとの相関係数は0.9908と高い相関が認められ（**Fig.３左**），処理水と同様にECはアンモニア性窒素濃度推定の代替指標としてリアルタイムで遠隔監視に活用できるのではないかと考えられた。また，原水のBOD濃度についてもECが上昇するに従い高くなる傾向が見られ，相関係数は0.9177であった（**Fig.３右**）。これは曝気槽流入前であるため生物学的処理の影響を受けておらず，BODを指標とする汚濁物質濃度とアンモニア性窒素とは関連しているためではないかと推察される。

今回の結果から，ECの測定により原水のアンモニア性窒素濃度の推定およびBOD濃度の把握が可能であることが示唆された。これにより窒素

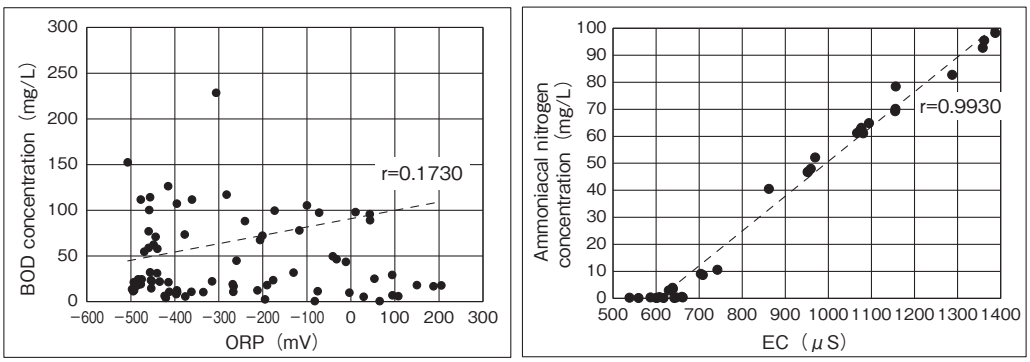


Fig. 2　Correlation in treated water（left：Relationship between BOD and ORP, right：Relationship between ammoniacal nitrogen and EC）

© The Ito Foundation

Table 2　Correlation coefficient between measured data and water quality analysis value

		BOD	SS	transparency	ammonical nitrogen	nitric acid + nitrite nitrogen
treated water						
temperature		0.0883	−0.0298	0.1638	−0.0136	−0.1264
pH		−0.0590	0.0422	0.2780	−0.2530	−0.0657
ORP		0.1730	−0.5761	−0.1424	−0.0620	0.1757
EC		0.5080	0.1409	−0.5668	**0.9930**	0.1143
chromaticity	R ratio	0.2549	0.0591	−0.6486	0.3558	−0.1832
	G ratio	−0.1775	−0.0077	0.4256	−0.3462	−0.0100
	B ratio	−0.2645	−0.0720	0.6782	−0.3325	0.2336
raw water						
temperature		−0.0833	−	−	0.1198	0.1554
pH		0.0908	−	−	0.2381	0.0720
ORP		−0.3898	−	−	−0.4973	0.3404
EC		**0.9177**	−	−	**0.9908**	−0.4460

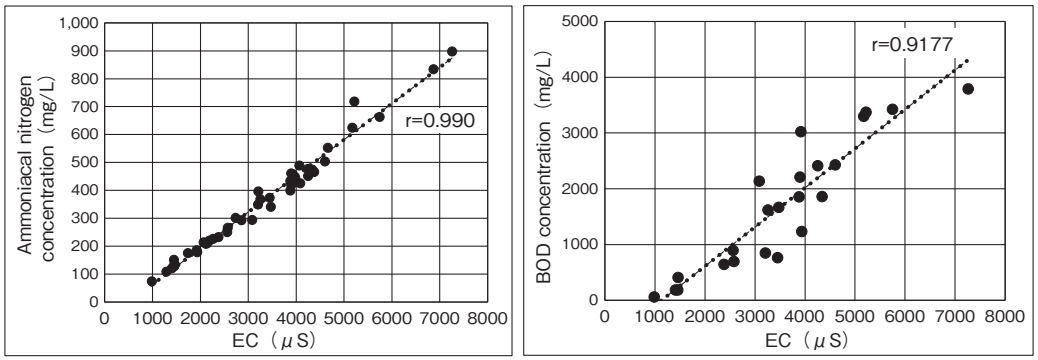


Fig. 3　Correlation in Raw water（left：Relationship between ammoniacal nitrogen and EC, right：Relationship between BOD and EC）

除去に対応した適切な曝気調整や処理水質悪化の危険予測と迅速対応への活用が可能ではないかと考えられた。

4．要　約

市販品の水質測定用センサーおよび通信モジュール等を使用することにより，低コストで水質遠隔監視装置を製作することができた。また，設置後10か月経過しても故障等の不具合はなく，水質測定データの取得に支障をきたすことはなかった。

ばっ気槽のORPと処理水のBODとの間には関係があることが分かっているが[3]，本研究において処理水のORPとBOD濃度との相関を検証したところ，ORPの上昇に伴いBOD濃度が減少していく傾向が見られたものの相関は低い結果となった。また，ORPセンサー表面に付着したバイオフィルムの影響により正しく計測されないことが

© The Ito Foundation

あったため，ORPによるBOD濃度の推定についてはバイオフィルムの付着抑制について検討する必要がある。一方，処理水のアンモニア性窒素濃度についてはECと高い相関が認められ，ECは処理水のアンモニア性窒素濃度推定の代替指標としてリアルタイムで遠隔監視に活用できることが示唆された。

また，原水についてもECはアンモニア性窒素濃度と高い相関が認められ，さらに，ECはBOD濃度に対してもある程度把握できる目安とすることが可能であると思われた。

今回の試験では硝酸性窒素および亜硝酸性窒素濃度の推定については明確な相関は得られなかったため，硝酸性窒素等を推定できる代替指標の作出までには至らなかった。また，処理水のBOD濃度の推定についても今回有用なデータは得られなかったが，BOD濃度は透視度による推定が期待できる結果が得られたので，今後は透視度の代替指標の作出について検討し，BOD濃度の推定が可能かどうか検証を行うこととしたい。

文　献

1）横山浩，山下恭広：BOD監視システムを利用した新しい養豚廃水処理，養豚の友４月号，20～24，2020.
2）Kageyama, T., Miura, M., Maeda, A., Mori., A., Lee, S.：A Wireless Sensor Network Platform For Water Quality Monitoring, 2018 13TH ANNUAL IEEE INTERNATIONAL CONFERENCE ON NANO/MICRO ENGINEERED AND MOLECULAR SYSTEMS., 553-556, 2018.
3）藤井正博，近藤三雄：都市下水活性汚泥処理の酸化還元電位の研究，日本水処理技術研究会，水処理技術，23(7)，617～625，1982.

© The Ito Foundation

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（Ⅱ）

Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on development and meat quality of Tushima-Jidori crossbred chicken for meat（Ⅱ）

松永　将伍[1]・深川　　聡[1]・井尻　大地[2]
（[1]長崎県農林技術開発センター，[2]鹿児島大学農学部）

Shogo Matsunaga[1], Satoru Fukagawa[1] and Daichi Ijiri[2]
（[1]Nagasaki Agricultural and Forestry Technical Development Center, [2]Department of Agricultural Sciences and Natural Resources, Kagoshima University）

The residue from the manufacturing process of fermented tea containing loquat leaves is a high-capacity scavenger of reactive oxygen species. For this study, the residue was given as an antioxidant to meat-type Tsushima-jidori crossbred chickens in a hot environment with the aim of producing jidori-chicken meat stably in the hot environment. The residue effects on growth, meat quality, and stress indices were investigated.

Body weight at the end of treatment and body weight gain decreased by the treatment with the residue from the manufacturing process of fermented tea containing loquat leaves compared to untreated animals, although the treatment did not affect yield. Lipid peroxidation in the plasma was decreased by the treatment. The ratio of the thymus, which is an organ involved in immunity, to the live body weight tended to be higher. Moreover, the expression of IFN-β in cytokine mRNAs in the spleen tended to be suppressed in treated animals. These results indicate the possibility that the residue can improve stress in the hot environment.

1．目　　的

鶏は汗腺を持たず，体温が高いため他の家畜に比べて暑熱ストレスの感受性が高い。暑熱環境下では各組織で活性酸素が増加し，その結果，発育成績の低下や鶏肉中の脂質酸化分解の増加，ドリップロスの増加等の肉質の低下を引き起こすだけでなく，最悪の場合，熱射病による事故を引き起こし，生産者の経営に大きな打撃を与える。このため，比較的安価に取り組むことができる抗酸化物質等の給与による鶏体内の抗酸化能を上げる研究が広く行われている。

令和２年度の本財団研究助成により，長崎県で排出され抗酸化活性が高いビワ葉混合発酵茶製造加工残査を1.0％添加した飼料を，適温環境下の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査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，ムネ肉中

© The Ito Foundation

の鮮度指標であるＫ値の上昇を抑制し，保水性に関わる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を示した[1)]。

そこで本研究では，暑熱環境下においても安定した地鶏肉生産を目指し，まず，抗酸化資材として活性酸素除去能が高いビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を暑熱環境下の対馬地鶏肉用交雑鶏に給与し，発育や肉質への効果を解明する。あわせて，ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣およびピリミジン塩基の前駆体であるオロト酸を併用した組み合わせによる地鶏の暑熱ストレス低減の可能性を調査した。

２．方　法

2.1　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。

2021年７月28日餌付けの対馬地鶏肉用交雑鶏の雄74羽を用い，餌付けから27日齢まではバタリーブルーダーで育成し，28日齢以降から試験終了までは長崎県農林技術開発センター内の開放鶏舎で平飼いとした。試験期間は2021年９月29日～10月26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査を配合飼料（CP 16.5%，ME 2,990 kcal）に１％を給与するビワ葉混合発酵茶区（ビワ茶区），ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣１％に加え，さらにオロト酸を0.7％添加した区（ビワ茶＋オロト酸区）および配合飼料のみを給与する区（対照区）との３区を設け，１区７羽の各区４反復とした。なお，鶏舎内は保温ビニールシートで覆い，いずれの区においても各部屋にコルツヒーターを設置し，24時間の暑熱感化を行った。

2.2　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，増体量，飼料摂取量，飼料要求率）を調査した。解体調査は12週齢の体重が部屋ごとに平均値に比較的近い２羽をそれぞれ選び，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ムネ筋の肉色を測定した。左ムネ肉重量を測定後（皮付き），真空パックしてから５℃の冷蔵庫で24時間静置した後に左ムネ肉重量を測定し，ドリップロスを算出した。ドリップロスの測定後，４cm×２cm×1.5cmを２片切り出して70℃のウォーターバスに１時間浸漬させ，加熱損失率を測定した。残った部位はプロセッサーを用いてミンチ状にし，遊離アミノ酸組成，イノシン酸含量を分析した。加熱損失率およびイノシン酸含量は食肉の理化学分析および官能評価マニュアル（Ⅰ理化学分析）[2)]，遊離アミノ酸組成はAzuma *et al.*[3)] に各々準じて分析を行った。

2.3　血漿中の遊離アミノ酸およびTBARS

絶食処理前の個体の翼下静脈から採血し，遠心分離（22,000×ｇ，５分間）を行った後，血漿を遊離アミノ酸およびTBARSの分析に供した。遊離アミノ酸組成はAzuma *et al.*[3)]，TBARSはYagi *et al.*[4)] に各々準じて分析を行った。

2.4　免疫関連組織の生体重量比および脾臓中のサイトカインmRNA発現量

解体後のと体から胸腺およびファブリキウス（Ｆ）嚢を採材してからそれぞれ重量を測定し，生体重（解体直前時）との比率を算出した。次に，脾臓を５mm以下の厚さに切開し，各サンプルについて４片ずつRNAlater（Ambion, Waltham, MA, USA）を入れたチューブに入れ，分析まで－20℃で保存した。分析項目は脾臓細胞中のサイトカイン遺伝子（IFN-β遺伝子）のmRNA発現強度とした。なお，mRNA発現強度

© The Ito Foundation

は内部標準物質を18s ribosomal RNAとし，El-Deep *et al.*[5] に準じて分析を行った。

2.5　統計処理

発育成績，解体成績，肉質分析およびストレス指標の調査項目は平均値±標準誤差で示し，一元配置分散分析を実施後，有意差が認められたものはTukeyの多重比較検定を実施した。

3．結果と考察

3.1　発育成績，解体成績および肉質成績（加熱損失率およびドリップロス）

発育成績，解体成績および肉質成績を**Table 1** に示した。試験終了時体重および増体量はビワ茶区およびビワ茶＋オロト酸区で対照区よりも有意に低下した。先行研究では，ウインドレス鶏舎で適温下に制御された対馬地鶏肉用交雑鶏にビワ茶

Table 1　Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leat tea on growth performance parameters, weight and meat quality of Tsushima-Jidori crossbred chickens under high ambient temperatures.

Measuements	Control	Biwa tea	Biwa tea + Orotic acid
Growth performance parameters			
Initial body weight (g)	1961.43 ± 89.10	1962.50 ± 101.65	1962.50 ± 110.44
Final body weight (g)	3282.68 ± 155.88^{a}	3158.93 ± 163.02^{b}	3163.04 ± 180.33^{b}
Body weight gain (g)	1321.25 ± 107.57^{a}	1196.43 ± 114.79^{b}	1200.54 ± 147.41^{b}
Feed intake (g/d)	148.61 ± 11.78	131.68 ± 18.91	128.04 ± 7.89
Feed conversion ratio	3.04 ± 0.16	2.96 ± 0.24	2.88 ± 0.18
Body temperature (℃)	41.68 ± 0.46	41.71 ± 0.38	41.47 ± 0.41
Weight of tissue (g)			
Breast muscle (g)	406.83 ± 8.47^{a}	395.31 ± 9.37^{ab}	377.82 ± 5.74^{b}
Breast tender muscle (g)	102.90 ± 3.43	102.29 ± 2.53	97.91 ± 1.59
Leg muscle (g)	717.42 ± 13.95^{a}	699.47 ± 10.96^{a}	655.19 ± 11.19^{b}
Liver (g)	40.79 ± 1.89	38.66 ± 1.08	40.29 ± 1.17
Heart (g)	15.22 ± 0.55	14.69 ± 0.38	14.76 ± 0.70
Muscular stomach (g)	33.50 ± 1.67	35.65 ± 1.36	37.22 ± 1.24
Abdiminal fat tissue (g)	83.34 ± 11.88	67.09 ± 7.32	75.21 ± 6.08
Meat quality			
Color of breast muscles			
L*	50.19 ± 0.30	48.55 ± 1.38	51.63 ± 1.12
a*	0.15 ± 0.09	0.39 ± 0.35	0.04 ± 0.39
b*	11.62 ± 0.74	12.12 ± 1.05	12.35 ± 0.83
Cooking loss (%)	18.99 ± 0.17	18.77 ± 0.34	19.15 ± 0.30
Drip loss (%)	1.75 ± 0.31	1.59 ± 0.22	2.10 ± 0.11

1) Value with small letters (a, b) within the same row differ significantly at the 5% levels.
2) Means ± SE.

© The Ito Foundation

を１％給与しても発育成績および解体成績に悪影響がないことを報告している[1]。本研究では有意差はないものの，飼料摂取量がビワ茶区およびビワ茶＋オロト酸区が対照区よりも低い値を示したことが鶏の増体の低下に影響したと考えられる。

次に，正肉重量は対照区およびビワ茶区では有意差は認められず，ビワ茶＋オロト酸区ではムネ肉重量が対照区よりも小さく，モモ肉重量が対照区およびビワ茶区よりも小さくなった。内臓重量，腹腔内脂肪含量，肉色，加熱損失率およびドリップロスには試験区間で有意差が認められなかった。Shimamoto *et al.*[6] は暑熱環境下のブロイラーにオロト酸を0.7％添加して給与しても，発育成績および解体成績に悪影響がないことを報告しているが，本研究ではビワ葉混合発酵茶およびオロト酸の併用給与によって発育成績および解体成績の低下が見られた。このことから，対馬地鶏肉用交雑鶏においてビワ葉混合発酵茶製造加工残渣およびオロト酸を給与する際のそれぞれの添加割合について，再度検討すべき事項と考えられた。

3.2　肉質成績（遊離アミノ酸およびイノシン酸）

ムネ肉中の遊離アミノ酸含量を**Table 2** に示した。21種類の遊離アミノ酸が検出され，うち18種類の遊離アミノ酸含量はビワ茶区およびビワ茶＋オロト酸区が対照区よりも有意に低下した。鶏の必須アミノ酸であるアルギニン，ヒスチジン，イソロイシン，ロイシン，リジン，メチオニン，フェニルアラニン，トレオニン，バリンの低下が見られたムネ肉中の遊離アミノ酸について，暑熱環境下のブロイラーにオロト酸を0.7％給与したShimamoto *et al.*[6] の実験では影響が認められなかったが，先行研究ではビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与によるヒスチジン，アルギニンおよびアラニンが低下する傾向が見られており[1]，ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣給与による飼料摂取量の低下がアミノ酸の代謝に影響したことが考えられる。また，イノシン酸は試験区間で有意な差は見られなかった。

3.3　血漿中の遊離アミノ酸

血漿中の遊離アミノ酸組成を**Table 3** に示した。対照区およびビワ茶区では有意差は見られなかったが，ビワ茶＋オロト酸区では他の試験区よりもチロシンが低く，シスチンおよびタウリンが有意に多かった。Simamoto *et al.*[6] はブロイラーにオロト酸を給与することで，無添加よりも血漿中のアスパラギン酸およびグルタミン酸含量を増加させ，チロシン濃度が低くなることを報告しており，本研究でもチロシンにおいては同様の結果が得られた。しかし，アスパラギン酸およびグルタミン酸含量は本研究で増加しなかったことから，オロト酸のみの給与と比べて，ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣との併用給与により代謝物やアミノ酸含量の変化があったと推測される。

3.4　免疫関連組織の生体重量比，血漿中脂質過酸化度（TABRS）および脾臓中のサイトカインmRNA発現量

免疫関連組織であるＦ嚢および胸腺の生体重比を**Table 4** に示した。Ｆ嚢の生体重比は試験区間で有意差がなかったが，胸腺の生体重比ではビワ茶区が対照区よりも増加する傾向が見られた。岩澤ら[7] は緑茶抽出物を駿河若シャモに給与することで鶏のストレスを抑制し，免疫増強効果があることを報告しており，立川ら[8] は肉用奥美濃古地鶏において，緑茶抽出物と同様に免疫増強効果があるサトウキビ抽出物を給与すると，胸腺の生体重比を無添加よりも高める傾向があるとしている。このことから，ビワ葉混合発酵茶においても免疫増強効果があることから，胸腺の生体重比を高めたと考えられる。

血漿中の脂質過酸化度（TBARS）および脾臓

© The Ito Foundation

Table 2　Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on free amino acids and nucleic acid – related substances in the breast muscle of Tsushima – Jidori crossbred chickens under high ambient temperatures.

(mg / 100 g)	Control	Biwa tea	Biwa tea + Orotic acid
Free amino acids			
Aspartic Acid	37.84 ± 9.55[a]	14.89 ± 2.56[b]	13.79 ± 1.49[b]
Glutamic Acid	129.17 ± 32.42[a]	57.61 ± 8.83[b]	59.48 ± 6.11[b]
Asparagine	8.64 ± 2.38[a]	3.24 ± 0.58[b]	3.51 ± 0.63[b]
Serine	56.89 ± 14.14[a]	26.9 ± 4.47[b]	26.37 ± 2.95[b]
Glutamine	52.19 ± 11.64[a]	21.76 ± 3.57[b]	21.3 ± 2.90[b]
Histidine	14.43 ± 3.36[a]	5.42 ± 1.00[b]	4.96 ± 0.63[b]
Glycine	25.17 ± 5.38[a]	13.14 ± 2.12[b]	12.18 ± 1.16[b]
Threonine	41.82 ± 10.40[a]	18.03 ± 3.00[b]	18.31 ± 1.92[b]
Arginine	32.32 ± 7.17[a]	13.94 ± 2.33[b]	14.15 ± 1.90[b]
Tyrosine	26.52 ± 5.81[a]	11.71 ± 2.29[b]	11.24 ± 0.98[b]
Valine	38.19 ± 8.60[a]	16.28 ± 2.71[b]	16.35 ± 1.65[b]
Methionine	31.99 ± 6.61[a]	13.69 ± 2.43[b]	13.6 ± 1.28[b]
Norvaline	96.97 ± 18.46[a]	48.09 ± 8.64[b]	51.71 ± 4.52[b]
Cystine	281.59 ± 58.29[a]	144.17 ± 26.83[b]	149.6 ± 20.11[b]
Tryptophane	1.15 ± 0.3	0.52 ± 0.15	0.51 ± 0.14
Phenylalanine	21.42 ± 5.32[a]	8.48 ± 1.37[b]	8.75 ± 1.15[b]
Isoleucine	26.88 ± 5.63[a]	11.48 ± 1.78[b]	11.55 ± 1.26[b]
Leucine	52.67 ± 11.01[a]	22.67 ± 3.56[b]	23.14 ± 2.12[b]
Lysine	28.42 ± 7.40[a]	11.76 ± 2.10[b]	11.4 ± 2.14[b]
Proline	3.84 ± 0.84	2.26 ± 0.49	2.28 ± 0.36
Beta-Alanine	1.10 ± 0.20[b]	2.07 ± 0.21[a]	1.79 ± 0.22[b]
Nucleic acid – related substances			
IMP	233.4 ± 25.36	207.05 ± 25.50	203.46 ± 25.37

1) Value with small letters (a, b) within the same row differ significantly at the 5% levels.
2) Means ± SE.

中のサイトカインmRNA発現量（IFN5-β）を**Fig. 1** に示した。ビワ葉区は対照区よりも血漿中TBARSの上昇を抑制できる傾向が見られた。Lin *et al.*[9] は暑熱環境下で飼育したブロイラーは適温環境下よりも血漿中TBARSが上昇することを報告しており，山根ら[10] は産卵鶏に直茶温湯抽出物を給与することで血清中のTBARSを低減できると報告している。本研究により，抗酸化作用が高いビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与は地鶏の暑熱ストレスを低減できる可能性を示唆するものと考えられる。

ビワ茶区のIFN-β発現量は対照区よりも高くなる傾向が見られた。Wanqiu *et al.*[11] は抗酸化作用があるアガリクス・ブラゼイ・ムリル多糖類（ABP）をブロイラーに給与することで，カドミウム給与による酸化ストレスおよび炎症性障害に

© The Ito Foundation

Table 3　Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on plasma – free amino acids of Tsushima – Jidori crossbred chickens under high ambient temperatures.

（μmol / L）	Control	Biwa tea	Biwa tea + Orotic acid
Aspartic Acid	125.50 ± 12.20	107.83 ± 11.23	90.95 ± 6.90
Glutamic Acid	290.25 ± 17.55	294.65 ± 25.10	295.92 ± 17.41
Asparagine	52.93 ± 8.28	45.34 ± 6.98	53.67 ± 4.13
Serine	543.38 ± 25.39	612.50 ± 31.17	613.79 ± 50.46
Glutamine	770.69 ± 31.99	658.01 ± 36.22	733.81 ± 42.89
Histidine	115.36 ± 10.80	97.49 ± 8.42	97.98 ± 8.49
Glycine	451.04 ± 30.37	464.96 ± 20.69	467.91 ± 25.65
Threonine	405.31 ± 24.57	397.80 ± 33.04	390.94 ± 14.46
Arginine	493.77 ± 34.48	411.62 ± 22.85	545.07 ± 87.90
Tyrosine	179.61 ± 16.17^{a}	189.76 ± 16.75^{a}	131.60 ± 7.06^{b}
Valine	269.02 ± 19.97	240.44 ± 16.21	245.63 ± 12.97
Methionine	137.03 ± 16.64	123.03 ± 6.12	126.77 ± 5.16
Cystine	62.38 ± 7.45^{b}	61.99 ± 3.63^{b}	103.58 ± 15.53^{a}
Tryptophan	51.79 ± 4.18	52.12 ± 2.66	51.20 ± 3.54
Phenylalanine	130.00 ± 6.04	126.50 ± 4.94	133.78 ± 5.14
Isoleucine	143.06 ± 13.51	135.53 ± 9.23	138.95 ± 6.49
Leucine	265.86 ± 17.58	239.47 ± 16.24	254.45 ± 11.16
Lysine	356.22 ± 48.92	409.40 ± 72.63	316.53 ± 26.94
Proline	534.12 ± 78.91	420.14 ± 54.44	469.97 ± 72.17
Taurine	270.08 ± 35.30^{b}	303.76 ± 33.30^{b}	495.73 ± 49.58^{a}
Beta-Alanine	19.1 ± 3.21	21.24 ± 3.76	32.36 ± 4.42

1）Value with small letters（a, b）within the same row differ significantly at the 5% levels.
2）Means ± SE.

Table 4　Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on the ratio of the bursa of fabricius and the thymus to the body weight in Tsushima – Jidori crossbred chickens under high ambient temperatures.

	Control	Biwa tea	Biwa tea + Orotic acid
The ratio of the bursa of fabricius to the body weight	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03
The ratio of the thymus to the body weight	0.32 ± 0.04$^{\beta}$	0.48 ± 0.04$^{\alpha}$	0.36 ± 0.05$^{\alpha\beta}$

1）Value with Greek alphabets（α, β）within the same row differ significantly at the 10% levels.
2）Means ± SE.

よるIFN-βのmRNA発現量の増加を抑制できることを報告している。本研究で用いたビワ葉混合発酵茶においても，抗酸化作用が鶏体内に働き，同様に暑熱ストレスによるIFN-βmRNA発現量の増加を抑制できたと考えられる。

4．要　約

本研究では，暑熱環境下において安定した地鶏肉の生産を目指し，抗酸化資材として活性酸素除去能が高いビワ葉混合発酵茶製造加工残渣を暑熱

© The Ito Foundation

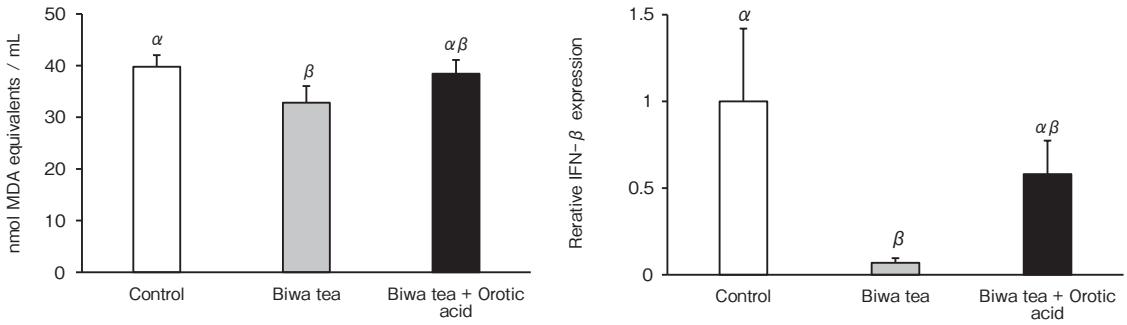


Fig. 1　Effect of feeding manufacturing processed residues of mixed fermented loquat leaf tea on the plasma malondialdehyde concentraitions and mRNA expression of IFN-β of Tsushima – Jidori crossbred chickens under high ambient temperatures (means ± SE). Value with Greek alphabets (α, β) within the same row differ significantly at the 10% levels.

環境下の対馬地鶏肉用交雑鶏に給与し，発育，肉質およびストレス指標への効果を調査した。

ビワ葉混合発酵茶製造加工残渣の給与は，無添加と比べて終了時体重および増体量を低下させたが，解体成績に影響を及ぼさず，血漿中TBARSの上昇を低減させ，免疫に関係する臓器である胸腺の生体重比は高い傾向があり，脾臓中のサイトカインmRNAにおけるIFN-βの発現量を抑制する傾向が見られたことから，暑熱環境下におけるストレスを改善できる可能性が示された。しかし，ピリミジン塩基の前駆体であるオロト酸をビワ葉混合発酵茶製造加工残渣と併用給与すると発育成績および解体成績が低下し，ストレス指標を改善することができなかったことから，今後，それぞれの添加割合をさらに検討する必要がある。

謝　辞

本研究の実施にあたり，ビワ葉発酵茶製造加工残査は株式会社サンダイから，オロト酸は株式会社古川リサーチオフィスから各々提供頂いた。ここに厚く御礼申し上げます。

文　献

1）　深川聡，松永将伍：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，令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**39**，453～459，2021.
2）　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.
3）　Azuma, K., Hirao, Y., Hayakawa, Y., Murahata, Y., Osaki, T., Tsuka, T., Imagawa, T., Okamoto, Y., Ito, N.：*Metabolites*., **6**(1), 3, 2016.
4）　Yagi, K.：*Biochem. Med*., **15**, 212～216, 1976.
5）　El-Deep., Ijiri, D., Ebeid, T. A., Ohtsuka, A.：*J. Poult. Sci*., **53**, 274～283, 2016.
6）　Shimamoto, S., Nakamura, K., Tomonaga, S., Furukawa, S., Ohtuka, A., Ijiri, D.：*Metabolites*, **10**(5), 189, 2020.
7）　岩澤敏幸，池谷守司：静岡県中小家畜試験場研究報告，**15**，19～23，2004.
8）　立川昌子，石川寿美子，田中巌，小川正幸：岐阜県畜産研究所研究報告，**5**，89～94，2005.
9）　Lin, H., Decuypere, E., Buyse, J.：*Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol*., **144**(1), 11～17, 2006.
10）　山根哲夫，後藤尚也，高橋大三，武田英嗣，乙脇研仁，土田孝雄：日本家禽学会誌，**36**(1)，31～37，1999.
11）　Wanqiu, X., Ai, L., Ruyue, L., Zequn, T., Dexing, M., Xiaodan, H., Ruili, Z.：*Biological Trace Element Research*., **184**, 247～258, 2018.

© The Ito Foundation

ウシ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

Microbiome analysis of bovine uterine, aiming to creation of novel technology improving low fertility

内山　淳平[1]・八木沢　拓也[2]・片桐　成二[3]

（[1]岡山大学大学院医歯薬学総合研究科病原細菌学分野，[2]北海道中央農業共済組合，[3]北海道大学大学院獣医学研究院）

Jumpei Uchiyama[1], Takuya Yagisawa[2] and Seiji Katagiri[3]

（[1]Department of Bacteriology, Graduate School of Medicine Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University, [2]Hokkaido Chuo Agricultural Mutual Aid Association, [3]Graduate School of Veterinary Medicine, Hokkaido University）

Repeat breeding is an infertility status that a cow with functional ovaries and uterus and with normal estrous cycle has difficulty in implantation even after repeated artificial insemination. Since the repeat breeding causes great economic losses, the issue should be overcome urgently. In the recent years, investigation of the microbial flora of human uterus by next-generation sequencing shows that the infertility is associated with a decrease in implantation and fertility rates. Since the uterine microflora is shown to be possibly present in the cows, the repeat breading can modulate the uterus microflora. Thus, we investigated the uterine microbiome associated with repeat breading in cows by 16S rRNA amplicon sequencing.

We collected the uterus tissues aseptically from the cows. We performed the measurements of polymorphonuclear leukocyte rate for diagnosis of endometritis and the bacterial test for infections in uterus, using the collected tissues. After extracting the DNAs from tissues, the V3-V4 regions of 16S rRNA gene were amplified and analyzed.

We sampled the uterus tissues of 59 cows and uterus microbiome were analyzed. The major bacteria taxa were *Firmicutes* (46%), *Bacteroidota* (11%), *Proteobacteria* (6%), and *Actinobacteriota* (5%). Moreover, we selected 20 cows from them and analyzed the uterus microbiome to eliminate confounding factors of endometritis and bacterial infections. Microbiome diversity in various metrics was initially compared between non-repeat-breading and repeat-breading cows. Although microbiome diversities in most of the metrics was not different, that in Pielou's evenness metric showed significant difference. Moreover, analyzing the differential abundance of microbiome between non-repeat-breading and repeat-breading cows, the non-repeat-breading cows tended to have higher rates of butyrate-producing bacteria, Lachnospiraceae, than the repeat-breading cows. The further study is required to understand the causal relationship between uterus microbiome and repeat breeding.

© The Ito Foundation

1．目　　的

リピートブリーダーとは，卵巣・子宮に異常がなく，発情周期も正常であるにも関わらず，人工授精を３回以上繰り返しても着床しない低受胎なウシのことをいう。リピートブリーダーでは，分娩間隔が延長する。国内のリピートブリーダーの占める割合は５～24％であり，この分娩間隔の延長により１日700円／頭もの経済的損失が生じている[1)]。これまで，リピートブリーダーを発生する原因の一つとして，子宮内膜炎が考えられてきた。しかしながら，子宮内膜炎を発症していないウシでも，低受胎となる場合がある[1~3)]。その原因は詳しく分かっていない。そのため，詳しい原因を究明することが急務である。

動物の子宮は，無菌状態であると考えられてきた。しかしながら，近年，高速シークエンサーを利用し，ヒトの子宮内膜の細菌叢（以下，マイクロバイオーム）解析が行われた。その結果，子宮にもマイクロバイオームが存在し，マイクロバイオームの失調と着床率や出生率の低下が関連していることが示唆されており[4, 5)]，ヒトにおいて子宮マイクロバイオーム解析は着床不全の新たな検査として認知され始めている。また，ウシにおいても子宮に多様な細菌群が存在する可能性が示唆されているものの[6)]，リピートブリーダーに関連した子宮マイクロバイオームの研究はほとんど行われていない。そのため，ウシにおいても子宮マイクロバイオーム解析が新たな検査法の１つとして確立できる可能性がある。

近年，さまざまな疾患とマイクロバイオームの関連解析が行われ，医療ではマイクロバイオームを利用した治療法が創出されている。子宮マイクロバイオームのデータの蓄積により，リピートブリーダー発生を減少させる新たな技術の創出が期待されている。以上から，本研究では，リピートブリーダー発生減少のための新規技術の創出を目指して，ウシの着床に関連した子宮マイクロバイオームの解析を行った。

2．方　　法

2.1　採材と臨床データの収集

北海道美瑛町の酪農場で飼養される，分娩後日数が60～85日の初回人工授精前のホルスタイン種雌牛を使用した。サイトブラシ（オネストメディカル　オネストブラッシュ）を利用し，子宮体部の粘膜細胞を採材した（採材期間は2020年４月～12月まで）。また，子宮内膜採取器具（富士平工業）を使用し，子宮体部から子宮角先端へ３cm挿入した部位の左右の子宮角を採材した。採材した組織の一部は，細菌検査で使用した。残りの組織は－80℃で保存した。本研究は麻布大学動物倫理員会の承認を得て，研究を遂行した。

2.2　子宮内膜炎の診断

粘膜細胞組織を採材直後に，スライドグラスに塗抹し，その日のうちにメイギムザ染色にて染色した。顕微鏡で観察し，視野における多形核好中球の占有率を算出した。占有率が２％以上を子宮内膜炎と診断した。

2.3　細菌検査

子宮内膜組織をリン酸バッファーに懸濁し，懸濁液を血液寒天培地に塗布し，好気的および嫌気的に培養する細菌の同定試験を行った。また，組織をビーズ破砕法によりDNAを調製した後，16S rRNA遺伝子を標的としたPCRをユニバーサルプライマー（Pro341F，5’-CCTACGGGNBGCASCAG-3’；Pro805R，5’-GACTACNVGGGTATCTAATCC-3’）を使用し行った[7)]。PCR酵素には，KAPA2G Fast HotStart ReadyMix（Roche, Basel, Swiss）を使用した。

© The Ito Foundation

2.4　16S rRNAアンプリコン解析

PCR産物をキット（FastGenetm Gel/PCR Extraction Kit）を使用し，精製した。精製したPCR産物から，ライブラリー調製を行った。Illumina社のキットを利用した。高速シークエンサーIllumina社MiSeqにより解読した。MiSeqで取得したデータの処理やマイクロバイオーム多様性の比較には，メタゲノム解析パイプラインQiiME2を使用した[8]。16S rRNAデータベースにはSilva138を使用した[9]。また，リピートブリーダーと正常牛のマイクロバイオームの細菌種の存在比を統計学的に比較し，それぞれに特徴的な細菌種を検討した。DAtestと言われる多変量解析ソフトを統計解析ソフトRへ実装し，解析を行った[10]。

3．結果と考察

3.1　解析したウシの群

本研究では，２−６産次の59頭のウシの群を解析した。このうち，非リピートブリーダーは47頭（No. 1〜47のウシ），リピートブリーダーは12頭（No. 48〜59のウシ）であった（**Table 1**）。はじめに，子宮内膜の細胞診を行ったところ，49頭からデータが得られた。この細胞診のデータ（多形核白血球の占有率）に関して非リピートブリーダー群（38頭）とリピートブリーダー群（11頭）で比較を行ったところ，有意な差は認められなかった（p>0.05；Mann−Whitney's U test）。また，59頭に対して培養法による細菌検査を行ったところ，細菌検出率は非リピートブリーダー群では25.5％（12/47）であり，リピートブリーダー群では０％（0/12）であった。細菌検出率に関して，非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群で比較検討した結果，非リピートブリーダー群で高い細菌の検出率が認められた（p<0.05；Fisher's exact test）。検出された細菌には，*Escherichia coli*, *Trueperella* sp., α−*Streptococcus*, *Corynebacterium* sp., *Actinobacillus* sp., *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*があった。子宮内膜炎は分娩後の子宮内での細菌感染が原因とされ，その原因菌として*E. coli*，*T. pyogenes*が主に分離される[11〜13]。非リピートブリーダー群では，細胞診のデータと細菌検出が関連しているウシが存在した。

3.2　ウシの子宮マイクロバイオーム

59頭のすべてのウシに対して細菌検出用のPCRの結果，非リピートブリーダー群では93.6％（44/47），リピートブリーダー群では100％（12/12）でPCRが陽性であった。これらの検体のうち，ウシの子宮マイクロバイオームの構成を知るために，リピートブリーダー群を含む48検体で16S rRNAアンプリコン解析を行った。PCRで陽性であった検体に関して，16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を標的としてPCRで再増幅後，高速シークエンサー解読した。計1,585,801read（mean ± standard deviation，33,037.5 ± 5,710.1／sample）のシークエンスを解析した。メタゲノムパイプラインQIIME2中のDADA2を利用しシークエンスのトリミングおよびキメラ配列の除去を行った。その結果，計719,554read（719,554 ± 3,332.6／sample）のシークエンスを取得した。この校正した配列を使用し，細菌の平均構成比を取得した（**Fig. 1**）。子宮マイクロバイオームの主要細菌群は，*Firmicutes*門（46％），*Bacteroidota*門（11％），*Proteobacteria* 門（６％），*Actinobacteriota* 門（５％）であった。また，解析でどの配列にも分類できないUnassignedが25％存在した。加えて，分類ができない細菌群が３％存在した。

3.3　非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群の子宮マイクロバイオームの比較

非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群の子宮マイクロバイオームの比較をするために

© The Ito Foundation

Table 1　解析に使用したウシの情報

No.	採材時までに出産した回数	細菌検査の結果[a]	細菌検出PCR	採材時の人工授精の回数	多形核白血球の占有率（%）[b]	受胎に要した人工授精の回数	空胎日数
1	4	ND	+	0	NT	3	130
2	2	ND	+	0	NT	3	154
3	2	*Escherichia coli*	+	0	NT	2	105
4	4	ND	+	0	NT	1	66
5	2	*α -Streptococcus*	+	0	NT	2	90
6	2	ND	+	0	5.67	2	101
7	3	*Trueperella* sp.	+	0	50	1	86
8	2	*Trueperella* sp.	+	0	0	3	157
9	3	*Trueperella* sp., *α -Streptococcus*	+	0	0	3	147
10	2	ND	-	0	0.33	3回以上（5回）	243
11	3	*α -Streptococcus*	+	0	0	2	95
12	2	ND	+	0	0	3	108
13	2	ND	+	0	0	10	676
14	3	ND	+	0	0	3回以上（4回）	215
15	2	ND	+	0	0	3	140
16	2	*Escherichia coli*	+	0	2.33	3回以上（4回）	196
17	2	ND	+	0	0	3回以上（5回）	190
18	3	ND	+	0	1.67	3回以上（4回）	139
19	2	ND	+	0	0	2	107
20	3	ND	+	0	0	3	113
21	2	*Escherichia coli*	+	0	0	1	68
22	4	ND	+	0	0	2	115
23	3	ND	+	0	0.67	1	82
24	3	ND	+	0	0	3回以上（5回）	224
25	3	*Corynebacterium* sp.	+	0	0	2	93
26	2	*α -Streptococcus*	+	0	3	1	86
27	2	ND	+	0	3.67	2	107
28	2	ND	+	0	NT	除外	-
29	3	ND	+	0	2	3回以上（17回）	485
30	3	*α -Streptococcus*, *Actinobacillus* sp.	+	0	0	3回以上（5回）	192
31	4	*Corynebacterium* sp.	+	0	NT	3回以上（5回）	-
32	4	ND	+	0	0.67	3回以上（7回）	261
33	3	ND	+	0	1.67	3	131
34	2	ND	+	0	0	2	95
35	2	ND	+	0	0.33	3回以上（5回）	271
36	3	ND	+	0	0	3回以上（5回）	231
37	2	ND	+	0	0	1	77
38	3	ND	+	0	0.33	3回以上（4回）	203
39	3	*Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*	+	0	0	1	78
40	2	ND	-	0	NT	2	91
41	3	ND	+	0	NT	3回以上（4回）	192
42	2	ND	+	0	2.67	3	172
43	2	ND	-	0	0	3回以上（4回）	186
44	4	ND	+	0	0	3回以上（5回）	251
45	2	*α -Streptococcus*	+	0	1.33	2	140
46	4	ND	+	0	1.67	1	83
47	4	ND	+	0	5.67	2	118
48	6	ND	+	6	0	繁殖障害で廃用	-
49	3	ND	+	10	0.33	繁殖障害で廃用	-
50	4	ND	+	4	2	繁殖障害で廃用	-
51	2	ND	+	15	0.67	繁殖障害で廃用	-
52	2	ND	+	9	0	繁殖障害で廃用	-
53	3	ND	+	5	0	14	557
54	2	ND	+	5	0	繁殖障害で廃用	-
55	2	ND	+	4	0	6	267
56	3	ND	+	5	0.33	繁殖障害で廃用	-
57	3	ND	+	4	NT	6	288
58	3	ND	+	4	1.33	7	228
59	4	ND	+	5	0	7	386

[a], not detected, ND；[b], not tested, NT.

© The Ito Foundation

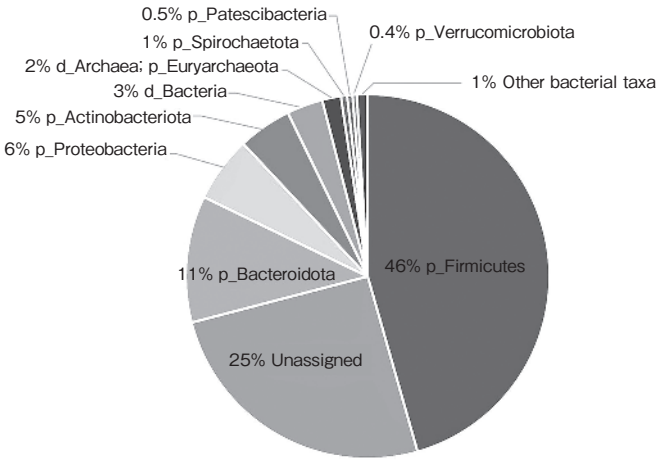


Fig. 1　ウシの子宮マイクロバイオームの主要細菌の存在比

は，解析に影響する交絡因子を除去する必要があると考えた。そのため，細菌培養検査で細菌が検出されたウシ，子宮内膜炎と診断されたウシ（細胞診で２％以上の値）の検体を除いて解析を行った。非リピートブリーダー群は９頭，リピートブリーダー群は11頭を解析した。計695,985read（34,799.3±6,910.5／sample）のシークエンスを解析した。メタゲノムパイプラインQIIME2中のDADA2によるデータ処理により，計314,749read（15,737.5±4,239.0／sample）のシークエンスを取得した。この配列を使用し，解析を進めた。

はじめに，マイクロバイオーム多様性比較を行った（**Table 2**）。α多様性の指標には，Chao1，Shannon，Pielou's evenness，Faith's phylogenetic diversityを使用した。β多様性の指標には，Unweighted UniFrac distance，Weighted UniFrac distance，Bray-Curtis distance，Jaccard distanceを使用した。非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群を比較したところ，ほとんどすべての多様性の指標において，統計学的な差は見られなかった（$p>0.05$；α多様性の指標の検討はKruskal-Wallis test，α多様性の指標の検討にはPERMANOVA testを使用した）。一方，α多様性の指標であるPielou's evennessでのみ統計学的な有意差が認められた（$p<0.05$）。そのため，大きくマイクロバイオームの構成比の変動は認められないが，細菌種は変動している可能性が考えられた。

Table 2　非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群とのマイクロバイオーム多様性比較

	*p*値
α多様性指標	
Chao1	0.24
Shannon	0.34
Pielou's evenness	0.04
Faith's phylogenetic diversity	0.12
β多様性指標	
Unweighted UniFrac distance	0.44
Weighted UniFrac distance	0.24
Bray-Curtis distance	0.10
Jaccard distance	0.43

次に，どの細菌が非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群で有意に存在するかの検討を行った（Differential abundance解析）。得られたマイクロバイオームを属レベルまで分類したデータを取得した，存在比が１％以下のものをすべて

© The Ito Foundation

Other bacterial taxaとした。はじめに，DAtestを使用し，得られたマイクロバイオームデータに使用する統計手法を決定する解析を行った。その結果，LIMMAという統計法が選択された。次に，LIMMAを使用し，非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群の比較解析を行った（**Table 3**）。その結果，統計学的に有意な細菌群の検出はされなかったものの，属レベルの分類がされない*Lachnospiraceae*科の細菌が非リピートブリーダー群で高い傾向にあることが示唆された（補正*p*値 = 0.09）。この属が分類されない*Lachnospiraceae*科の細菌は，*Lachnospiraceae*科の中で最も存在比が高く，非リピートブリーダー群で平均約４％，リピートブリーダー群で平均約２％存在した。

3.4　ウシにおける子宮内マイクロバイオームを起因とする繁殖障害の可能性

ウシの子宮には，細菌量はきわめて少ないものの，子宮マイクロバイオームが存在することが知られている[6]。本研究では，非リピートブリーダー

Table 3　非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群とのDifferential abundance解析

Bacterial taxonomy	logFC	AveExpr	t	*p*値	補正*p*値	B	Ordering[a]
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Lachnospirales; f_Lachnospiraceae	−0.020	0.030	−3.12	0.01	0.09	−3.37	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Peptostreptococcales−Tissierellales; f_Peptostreptococcaceae; g_Romboutsia	−0.019	0.052	−1.78	0.09	0.60	−5.96	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Peptostreptococcales−Tissierellales; f_Peptostreptococcaceae; g_Paeniclostridium	−0.013	0.029	−1.60	0.13	0.60	−6.23	非RB > RB
d_Bacteria	0.012	0.049	1.37	0.19	0.60	−6.56	RB > 非RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Oscillospirales; f_Oscillospiraceae; g_UCG−005	−0.012	0.037	−1.33	0.20	0.60	−6.61	非RB > RB
Unassigned	0.048	0.262	1.21	0.24	0.60	−6.76	RB > 非RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Clostridiales; f_Clostridiaceae; g_Clostridium_sensu_stricto_1	−0.009	0.022	−1.20	0.25	0.60	−6.77	非RB > RB
d_Bacteria; p_Bacteroidota; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Bacteroidaceae; g_Bacteroides	−0.007	0.020	−1.06	0.30	0.61	−6.92	非RB > RB
Other bacterial taxa (< 1%)	−0.034	0.267	−1.00	0.33	0.61	−6.98	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Mycoplasmatales; f_Mycoplasmataceae; g_Ureaplasma	0.051	0.030	0.92	0.37	0.61	−7.06	RB > 非RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Oscillospirales; f_UCG−010; g_UCG−010	−0.003	0.013	−0.81	0.43	0.61	−7.16	非RB > RB
d_Bacteria; p_Bacteroidota; c_Bacteroidia; o_Bacteroidales; f_Rikenellaceae; g_Rikenellaceae_RC9_gut_group	−0.003	0.012	−0.78	0.44	0.61	−7.18	非RB > RB
d_Bacteria; p_Actinobacteriota; c_Actinobacteria; o_Corynebacteriales; f_Corynebacteriaceae; g_Corynebacterium	−0.004	0.013	−0.74	0.47	0.61	−7.22	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Oscillospirales; f_Ruminococcaceae; g_Ruminococcus	−0.002	0.013	−0.62	0.54	0.63	−7.30	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Mycoplasmatales; f_Mycoplasmataceae; g_Mycoplasma	−0.007	0.011	−0.58	0.57	0.63	−7.32	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Clostridia; o_Lachnospirales; f_Lachnospiraceae; g_Lachnospiraceae_NK3A20_group	−0.002	0.011	−0.54	0.60	0.63	−7.35	非RB > RB
d_Bacteria; p_Firmicutes; c_Bacilli; o_Erysipelotrichales; f_Erysipelotrichaceae; g_Turicibacter	−0.002	0.027	−0.29	0.77	0.77	−7.45	非RB > RB

[a], RB, リピートブリーダー.

© The Ito Foundation

群とリピートブリーダー群で子宮マイクロバイオーム解析を行った。その結果，統計学的な有意差はないものの非リピートブリーダー群で*Lachnospiraceae*科の細菌が高い存在比を示した。*Lachnospiraceae*科の細菌は酪酸を産生することで知られている。一方，ヒトにおいて*Lactobacillus*属の細菌の優勢が着床に関連していることが示唆された[14]。*Lactobacillus*属の細菌は乳酸を産生することが知られている。

これらの細菌で共通することは，両細菌とも短鎖脂肪酸（酪酸や乳酸）を産生することである。マイクロバイオーム研究では，「ニワトリが先か卵が先か」という因果関係に関する問題が議論になる。本研究でも，「子宮の細菌群の変動がリピートブリーダーを生み出しているのか？」あるいは「リピートブリーダーになることで子宮の細菌群の変動が起きるのか？」は不明のままである。もし，前者の議論が正しいと仮定した場合，子宮内のpHの変動が着床になんらかの影響を与えている可能性や，産生する短鎖脂肪酸（酪酸や乳酸）は免疫に影響するなど機能分子であることが知られており，子宮内の上皮細胞あるいは卵子に影響を与えている可能性が考えられる。

現在，解析するウシの頭数を増やし，解析を進めている。飼育方法やエサで子宮マイクロバイオームが変動することが明らかとなり始めている。今後，ネットワーク分析などの細かい統計解析を行い，ウシにおける子宮マイクロバイオームに関して赴任となる細菌因子や着床に関与する細菌因子が探索できればと考えている。今後，さらなる研究の進展が期待される。本研究は，ウシの着床と子宮マイクロバイオームを解析した初めての研究である。今後，このような研究が活性化し，リピートブリーダー発生減少のための新規技術の創出が達成できることが期待される。

４．要　　約

リピートブリーダーとは，卵巣・子宮に異常がなく，発情周期も正常であるにも関わらず，人工授精を繰り返しても着床しない低受胎なウシである。リピートブリーダーは，畜産業に多大な経済的損失を生じており，早急に解決すべき課題である。近年，高速シークエンサーを利用し，ヒトの子宮のマイクロバイオーム解析が行われ，マイクロバイオームの失調と着床率や出生率の低下が関連していることが示唆された。また，ウシにおいても子宮マイクロバイオームが存在する可能性が示唆されており，マイクロバイオームを利用した治療法や検査法の確立が期待される。そのため本研究では，リピートブリーダー発生減少のための新規技術の創出を目指して，ウシの着床に関連した子宮マイクロバイオームの解析を行った。

59頭のウシから無菌的に子宮組織を採取した。子宮内膜の多形核白血球率の測定（子宮内膜炎の診断）および子宮内感染症の細菌検査を行った。組織からDNAを抽出した後，16S rRNA遺伝子のV3-V4領域を増幅して高速シークエンサーで解読した。データ解析はQIIME2およびＲを使用して行った。

採材した試料のうち48頭のウシに対して，子宮マイクロバイオームの解析を行った。その結果，主要な細菌分類群は，*Firmicutes*門（46％），*Bacteroidota*門（11％），*Proteobacteria*門（６％），および*Actinobacteriota*門（５％）であった。次に，子宮内膜炎および子宮感染が疑われた検体を除外した計20頭の牛を選択し，子宮マイクロバイオーム解析を行った。マイクロバイオーム多様性をさまざまな評価基準を利用し，非リピートブリーダー群とリピートブリーダー群で比較したところ，ほとんどの評価指標に関して違いは見られなかったが，Pielou's evennessに関して統計学的

© The Ito Foundation

に有意な差が認められた。加えて，微生物叢の存在量の違いを分析すると，非リピートブリーダーは，リピートブリーダーよりも酪酸産生細菌であるLachnospiraceae科の細菌の存在割合が高い傾向にあった。子宮マイクロバイオームとリピートブリーダーとの因果関係を理解するには，さらなる研究が必要と考えられる。

文　献

1） Yusuf, M., Nakao, T., Ranasinghe, R. B., Gautam, G., Long, S. T., Yoshida, C., Koike, K., Hayashi, A.：Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds, *Theriogenology*, **73**, 1220～9, 2010.

2） Pothmann, H., Prunner, I., Wagener, K., Jaureguiberry, M., de la Sota, R. L., Erber, R., Aurich, C., Ehling-Schulz, M., Drillich, M.：The prevalence of subclinical endometritis and intrauterine infections in repeat breeder cows, *Theriogenology*, **83**, 1249～53, 2015.

3） Katagiri, S., Moriyoshi, M.：Alteration of the endometrial EGF profile as a potential mechanism connecting the alterations in the ovarian steroid hormone profile to embryonic loss in repeat breeders and high-producing cows, *J Reprod Dev*, **59**, 415～20, 2013.

4） Moreno, I., Codoner, F. M., Vilella, F., Valbuena, D., Martinez-Blanch, J. F., Jimenez-Almazan, J., Alonso, R., Alama, P., Remohi, J., Pellicer, A., Ramon, D., Simon, C.：Evidence that the endometrial microbiota has an effect on implantation success or failure, *Am J Obstet Gynecol*, **215**, 684～703, 2016.

5） Franasiak, J. M., Werner, M. D., Juneau, C. R., Tao, X., Landis, J., Zhan, Y., Treff, N. R., Scott, R. T.：Endometrial microbiome at the time of embryo transfer：next-generation sequencing of the 16S ribosomal subunit, *J Assist Reprod Genet*, **33**, 129～36, 2016.

6） Lietaer, L., Bogado Pascottini, O., Hernandez-Sanabria, E., Kerckhof, F. M., Lacoere, T., Boon, N., Vlaminck, L., Opsomer, G., Van de Wiele, T.：Low microbial biomass within the reproductive tract of mid-lactation dairy cows：A study approach, *J Dairy Sci*, doi：10.3168/jds.2020-19554, 2021.

7） Takahashi, S., Tomita, J., Nishioka, K., Hisada, T., Nishijima, M.：Development of a prokaryotic universal primer for simultaneous analysis of Bacteria and Archaea using next-generation sequencing, *PLoS One*, **9**, e105592, 2014.

8） Bolyen, E., Rideout, J. R., Dillon, M. R., Bokulich, N. A., Abnet, C. C., Al-Ghalith, G. A., Alexander, H., Alm, E. J., Arumugam, M., Asnicar, F., Bai, Y., Bisanz, J. E., Bittinger, K., Brejnrod, A., Brislawn, C. J., Brown, C. T., Callahan, B. J., Caraballo-Rodriguez, A. M., Chase, J., Cope, E. K., Da Silva, R., Diener, C., Dorrestein, P. C., Douglas, G. M., Durall, D. M., Duvallet, C., Edwardson, C. F., Ernst, M., Estaki, M., Fouquier, J., Gauglitz, J. M., Gibbons, S. M., Gibson, D. L., Gonzalez, A., Gorlick, K., Guo, J., Hillmann, B., Holmes, S., Holste, H., Huttenhower, C., Huttley, G. A., Janssen, S., Jarmusch, A. K., Jiang, L., Kaehler, B. D., Kang, K. B., Keefe, C. R., Keim, P., Kelley, S. T., Knights, D., *et al.*：Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2, *Nat Biotechnol*, **37**, 852～857, 2019.

9） Quast, C., Pruesse, E., Yilmaz, P., Gerken, J., Schweer, T., Yarza, P., Peplies, J., Glockner, F. O.：The SILVA ribosomal RNA gene database project：improved data processing and web-based tools, *Nucleic Acids Res*, **41**, D590-6, 2013.

10） Schmitt, F. C. F., Lipinski, A., Hofer, S., Uhle, F., Nusshag, C., Hackert, T., Dalpke, A. H., Weigand, M. A., Brenner, T., Boutin, S.：Pulmonary microbiome patterns correlate with the course of the disease in patients with sepsis-induced ARDS following major abdominal surgery, *J Hosp Infect*, doi：10.1016/j.jhin.2020.04.028, 2020.

11） Sheldon, I. M., Cronin, J., Goetze, L., Donofrio, G., Schuberth, H.J.：Defining postpartum uterine disease and the mechanisms of infection and immunity in the female reproductive tract in cattle, *Biol Reprod*, **81**, 1025～32, 2009.

12） Mido, S., Murata, N., Rawy, M. S., Kitahara, G., Osawa, T.：Effects of intrauterine infusion of povidone-iodine on endometrial cytology and bacteriology in dairy cows with clinical endometritis, *J Vet Med Sci*, **78**, 551～6, 2016.

13） Prunner, I., Wagener, K., Pothmann, H., Ehling-Schulz, M., Drillich, M.：Risk factors for uterine diseases on small- and medium-sized dairy farms determined by clinical, bacteriological, and cytological examinations, *Theriogenology*, **82**, 857～65, 2014.

14） Kyono, K., Hashimoto, T., Kikuchi, S., Nagai, Y., Sakuraba, Y.：A pilot study and case reports on endometrial microbiota and pregnancy outcome：An analysis using 16S rRNA gene sequencing among IVF patients, and trial therapeutic intervention for dysbiotic endometrium, *Reprod Med Biol*, **18**, 72～82, 2019.

© The Ito Foundation

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−

Can END⁻, a quasispecies of bovine viral diarrhea virus, be a live-attenuated vaccine?（II）−Pursing the possibility of inducing immunity more effectively−

塩　川　　舞
（日本獣医生命科学大学獣医学部獣医保健看護学科）

Mai Shiokawa
（School of Veterinary Nursing and Technology, Faculty of Veterinary Science, Nippon Veterinary and Life Science University）

Bovine viral diarrhea virus（BVDV）is an RNA virus classified in the genus *Pestivirus* of the family *Flaviviridae* and is in the same genus as classical swine fever virus（CSFV）. BVDV and CSFV form quasispecies and contain at least two quasispecies. There are at least two quasispecies, an END⁺ virus that suppresses the host's innate immune response and an END⁻ virus that induces it; the ability of the END⁻ virus to induce an innate immune response is seen as a valuable property for attenuated live vaccine even though it harms viral propagation. Japan's attenuated live vaccines for CSFV are produced with END⁻ virus as the seed virus. In 2020, with the support of this research grant, we succeeded in generating BVDV adapted to rabbit-derived cultured cells（aRb/END⁺ and aRb/END⁻）. We examined whether this year, the adapted BVDVs are capable of infecting rabbits and whether differences in immunological properties of the quasispecies will affect antibody induction. Neutralization antibodies were detected in the sera of aRb/END⁺ and aRb/END⁻ inoculation groups, with higher antibody titers in the aRb/END⁺ group than those in the aRb/END⁻ group. BVDV-RNA was detected in some stools and tissues collected, but no infectious particles were detected. This study showed that BVDV adapted to cultured cells derived from rabbits can infect rabbits across the host range. The aRb/END⁻ immunization group had a lower antibody titer than the aRb/END⁺ immunization group; however, whether END⁻ virus can be attenuated live vaccine for BVDV depends on its pathogenicity against cattle. Further studies are also needed to examine factors other than antibody titers.

1．目　　的

牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）の持続感染牛（PI牛）は，自身の分泌液からウイルスを排出し続けるため農場内の慢性的な汚染源となる[1)]。PI牛の存在は乳量の低下や繁殖障害を誘発し，生産性の低下および経済的損失に直結する。そのため，PI牛を産ませないこと，または，PI牛をいかに早期摘発できるかが生産の安定性やBVDV感染症を制御するうえで重要である。しか

© The Ito Foundation

し，国内外においてBVDV用ワクチンがあるにもかかわらず発生が後を絶たない。これを改善するために，より効果的に免疫を付与できるBVDV用弱毒生ワクチンを作出することを最終目標として研究を行ってきた。

BVDVや同属の豚熱ウイルスは免疫学的性状が異なる２つのウイルス準種を包含する。感染すると宿主の自然免疫応答を抑制するEND⁺ウイルスと，それを強く誘導するEND⁻ウイルスという２つの準種が混ざりあってウイルス集団内に存在している[2, 3]。申請者は，培養が容易で実験室株として汎用されるEND⁺ウイルスではなく，END⁻ウイルスをBVDVの弱毒生ワクチン株に応用することができれば，既存のものよりも効果的に免疫を付与できるのではないかと考えた。

令和元年度は，BVDV/END⁻の弱毒化を図るために，自然宿主（牛）ではない異種動物由来細胞を用いてウイルスの馴化作業を行った[4, 5]。その結果，BVDV/END⁻をウサギ由来細胞で維持・培養することに成功し，得られた馴化ウイルス（adapted Rabbit/END⁻；aRb/END⁻）が宿主の免疫を誘導するEND⁻の性状を保持していることが*in vitro*の実験から明らかになっている。そこで本年度は，令和元年度に得られたaRb/END⁻の馴化の程度や，aRb/END⁻に対する免疫応答（抗体誘導能を含む）を，ウサギを用いた*in vivo*で評価し，牛における免疫原性の評価に繋げるデータを収集することを目的として研究を行う。また，令和元年度に本助成による支援を受けて，BVDV/END⁻だけでなく，BVDV/END⁺もウサギ由来細胞に馴化させることに成功し，aRb/END⁺も獲得することができた。これら馴化ウイルスの*in vivo*におけるウイルスの増殖動態，免疫誘導能を比較検討することで，aRb/END⁻がより有効な弱毒生ワクチン株になり得るかどうかを評価できると考えている。

BVDVのワクチンはさまざまあるが，準種であるEND⁻をもとに製造されたBVDV用弱毒生ワクチンは国内外を問わず存在していない。BVDV/END⁻がより効果的に免疫を誘導し，感染を確実に防御できる弱毒生ワクチン株として利用できれば，今後のBVDVの防疫対策に大きく貢献できるだけでなく，感染が散発している国内の現状を変えることができると考えている。

２．方　法

2.1　ウサギを用いたaRb/END⁻およびaRb/END⁺の感染実験

各馴化ウイルス（aRb/END⁻およびaRb/END⁺のP.40；ウサギ由来培養細胞で40回継代されたもの）をウサギ（約1.5−1.99kg，２または３羽/群）に対して筋肉内接種（約$10^{4.0}$$TCID_{50}$/羽）した。コントロール群（２羽）も設定し，ウイルス液と同量の培養液を接種した。試験期間は中和抗体価の上昇を捉えるために約３週間設定し，そのスケジュールを**Fig. 1** に示した。試験期間中は，体温の測定，下痢や嘔吐の有無，食欲・飲水量の確認を定期的に行った。また，ウイルス血症が生じるかどうか確認するために，ウイルス接種から１週間は毎日採血を行った。その後は14日目と最終日の21日目に採血を行った。接種した馴化ウイルスが体外に排出されるか確認するために１週間ごとに糞便を回収した。試験終了時には，血液に加えてウイルスが増殖する可能性がある組織（扁桃，脾臓，腎臓，肝臓，腸間膜リンパ節）の一部を採取し，ウイルス増殖の確認に使用した。本実験は，日本獣医生命科学大学動物実験規定（承認番号2021S-49）および病原体等安全管理規定に沿って適切に実施された。

2.2　RT-PCR法によるウイルスの遺伝子検出

回収した組織，糞便，血液試料からBVDV-RNAの検出を試みた。組織と糞便は，10％乳剤

© The Ito Foundation

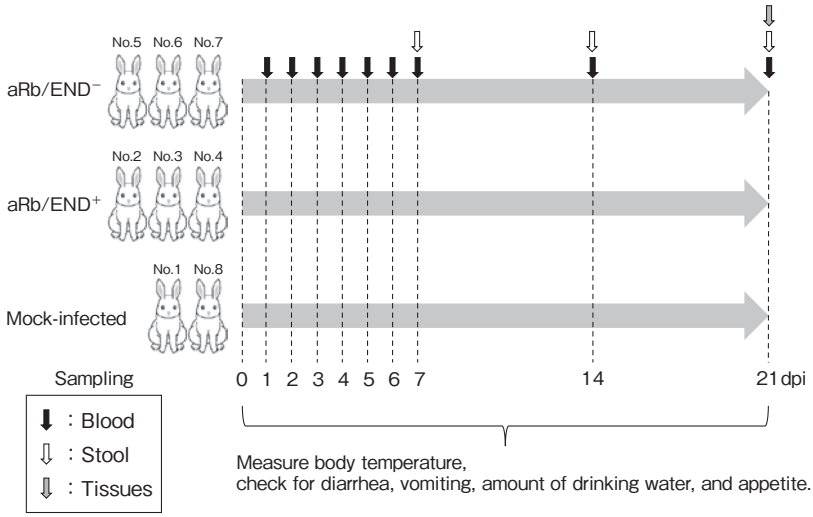


Fig. 1　Infection experiments using rabbits
The schedule of the infection experiments is shown. Three rabbits were used for each viral inoculation group, and two rabbits were used for the mock-infected group. Mock-infected rabbits were nos. 1 and 8；aRb/END$^+$ inoculation rabbits were nos. 2, 3, and 4; and aRb/END$^-$ inoculation rabbits were nos. 5, 6, and 7. The virus was intramuscularly inoculated into $10^{4.0}$TCID$_{50}$/rabbit, and the mock-infected group was inoculated with the same volume of culture medium as the viral solution. Blood, stool, and tissue sampling was performed on the date indicated by arrows.

を作製してからその遠心上清を核酸抽出に使用した。核酸抽出はHigh Pure Viral Nucleic Acid Kit（日本ジェネティクス）を用いて実施し，抽出した核酸をRT-PCRの鋳型に使用した。プライマーはペスチウイルスの５'非翻訳領域を検出する324/326プライマーペアを使用し[6]，RT-PCRにはPrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2（タカラバイオ）を使用した。RT-PCR反応後は，２％アガロースゲルを用いた電気泳動によって目的遺伝子の増幅（約290bp）を確認した。

2.3　糞便および組織試料からのウイルス分離

上記2.2「RT-PCR法によるウイルスの遺伝子検出」でBVDV-RNAが検出された試料から感染性粒子が分離できるかどうか確認した。ウイルス遺伝子の検出が確認された試料の10％乳剤を遠心し，その上清を使用した。フィルター（0.45 μm ポアサイズ）処理した上清200 μ l をMDBK細胞に接種し，４−５日間培養した。培養後に上清を回収し，再度MDBK細胞に感染させた。この上清継代を３回実施し，最終的に得られた培養上清中にウイルス遺伝子および感染性粒子が存在しているかどうかをRT-PCRまたは免疫染色法で確認した。

2.4　ウイルス中和試験による抗体価の測定

血清中の中和抗体価をウイルス中和試験で測定した。試料は，ウイルス接種から7，14，21日目に回収した各血清を用いた。指示ウイルスは，RK/END$^+$（P.1，馴化前のもの）を$10^{3.3}$TCID$_{50}$/mlに調整したものを使用した。細胞は，牛腎由来株化MDBK細胞を使用した。血清試料を２〜2048倍まで２倍階段希釈し，希釈した血清50 μ l と指示ウイルス50 μ l を混合して，37℃で１時間反応させた。中和反応済み混合液をMDBK細胞に接種し，５日間培養した。培養後に免疫染色を実施し，抗体価を算出した。また，バックタイトレーションを試験ごとに設定し，指示ウイルスが

© The Ito Foundation

適切な接種量で添加されていることを毎回確認しながら試験を行った。

3．結果と考察

3.1　ウサギを用いたaRb/END⁻およびaRb/END⁺の感染実験（**Fig. 1**）

試験期間中，ウイルス接種に伴う体温の大きな変化は認められなかった。体温は全個体で38.5〜41.2℃の間で推移したが，Mock群の体温と比べてもウイルス感染によって体温が上昇しているとは言えない結果であった（データ未掲載）。食欲・飲水量の低下，下痢や嘔吐は試験期間を通していずれの個体でも認められなかった。以上より，aRb/END⁻およびaRb/END⁺の接種に伴う臨床所見の変化は認められなかった。

3.2　採材した試料（血液，糞便，組織）からのウイルス遺伝子の検出

まず，試験期間中にウイルス血症が生じていたかどうかを確認するために，血液試料からのBVDV-RNAの検出を行った。その結果，aRb/END⁻接種群の個体No. 5の感染後6および7日目の血液から微量のウイルス遺伝子が検出されたが，その他の個体からウイルス遺伝子が検出されることはなかった（データ未掲載）。aRb/END⁻接種群のウサギNo. 5だけ一時的にウイルス血症になっていた可能性が考えられるが，血中のウイルス量はごく微量であると推察された。

続いて，ウイルスが体外に排出されていたかどうか確認するために，糞便試料からのBVDV-RNAの検出も実施した。その結果，aRb/END⁺接種群のNo. 2，3，4およびaRb/END⁻接種群の

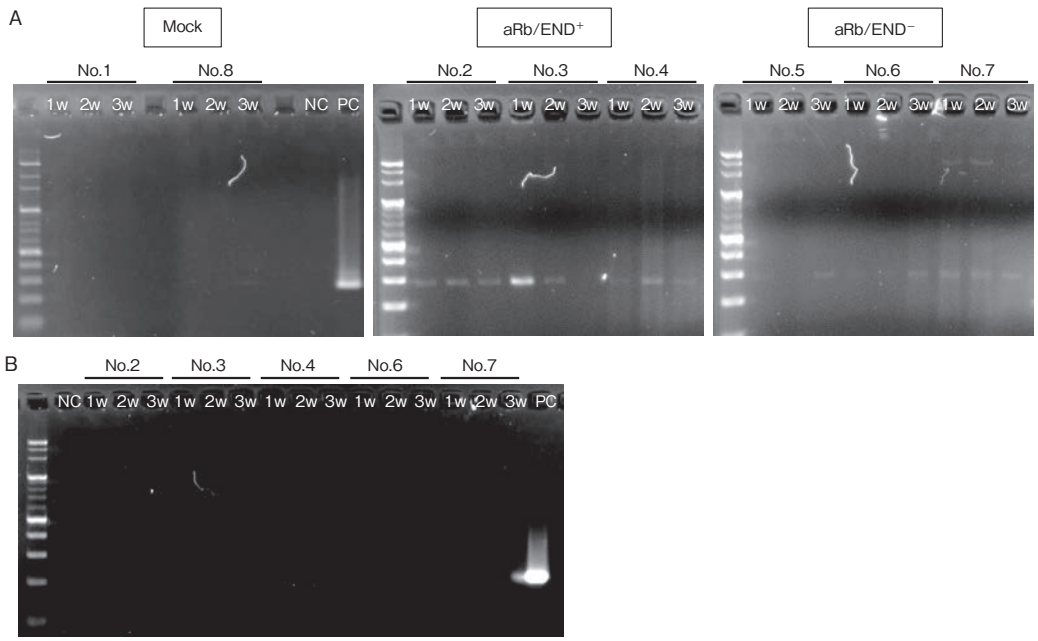


Fig. 2　Detection of BVDV-RNA from stool samples using RT-PCR
(A) BVDV-RNA was found in feces collected each week after viral injection. A 10 % emulsion was prepared from the stools, and nucleic acid extraction was performed from the centrifugal supernatant. RT-PCR was performed using the extracted nucleic acids as a template. BVDV-RNA was detected in the stool samples of rabbits no. 2, 3, 4, 6, and 7. (B) The infectious particles from stool samples in stools were detected, and the isolation of detected viral RNA was attempted. No BVDV-RNA was seen in the supernatant after three blind passages.

© The Ito Foundation

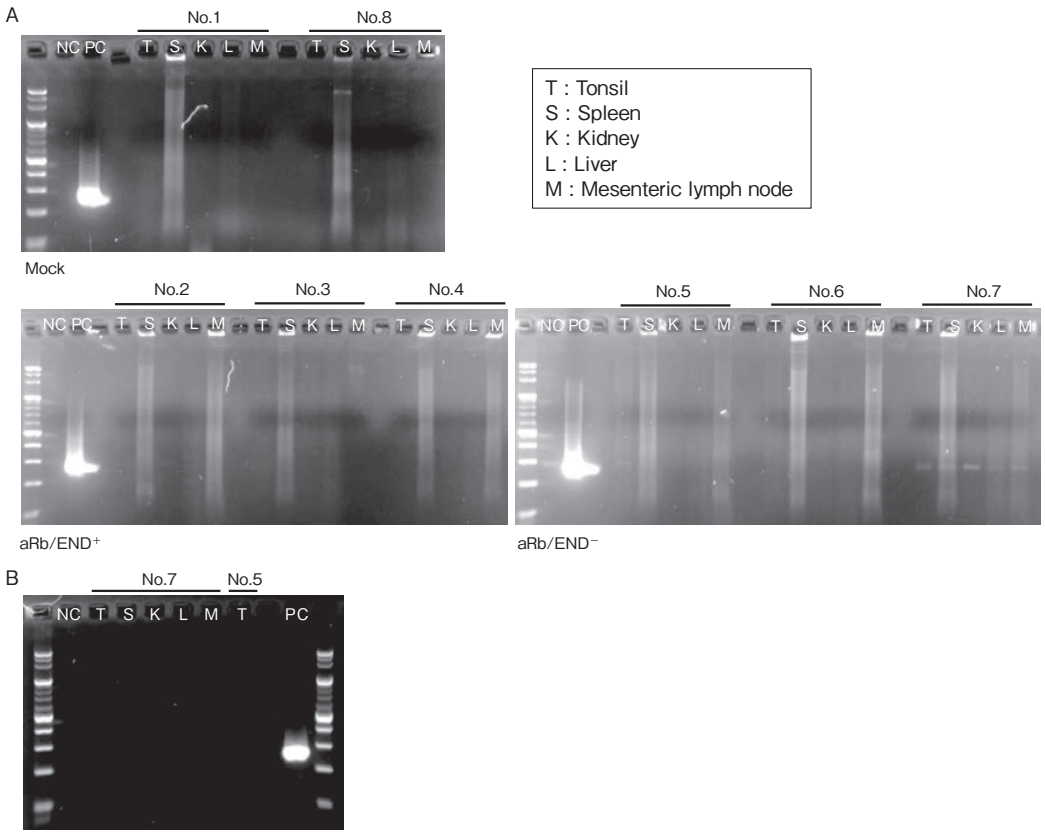


Fig. 3　Detection of BVDV-RNA from tissue samples using RT-PCR
（A）Viral RNA was detected in tissues（tonsils, spleen, kidney, liver, and mesenteric lymph nodes）collected on the last day of the infection experiment（day 21）. The tissues were processed into a 10% emulsion, and the nucleic acid was extracted from the centrifugal supernatant. RT-PCR was performed using the extracted nucleic acids as a template, and BVDV-RNA was detected in rabbit no. 5 tonsils but found in the tonsils, spleen, kidney, liver, and mesenteric lymph node of rabbit no. 7.（B）Isolation of infectious particles from tissue samples where viral RNA was detected was attempted. No BVDV-RNA was seen in the supernatant after three blind passages.

No.６，７の糞便からウイルス遺伝子が検出された（**Fig. 2A**）。感染性粒子が排出されていた可能性が考えられたため，これらの試料をウイルス分離に供した。上清の盲継代を３回実施したあとに得られたP.3培養上清中からウイルス遺伝子は検出されず（**Fig. 2B**），P.3上清を接種したMDBK細胞から抗原陽性細胞が検出されなかったことから（データ未掲載），感染性粒子の排出は起きていないことが確認できた。

採取した組織からのウイルス遺伝子の検出も行った。その結果，aRb/END⁻接種群No.５の扁桃，No.７の扁桃，脾臓，腎臓，肝臓，腸間膜リンパ節からBVDV-RNAが検出された（**Fig. 3A**）。ウイルス分離に供し，得られたP.3上清を解析したところ，ウイルス遺伝子および感染性粒子ともに検出されず，組織でウイルスRNAの複製が生じていたものの，感染性粒子の産生にまでは至らなかった可能性が考えられた（**Fig. 3B**）。

以上の結果から，ウサギ由来培養細胞に馴化したaRb/END⁺およびaRb/END⁻がウサギ個体に感染可能であるが，体外への排出は生じていないことが確認された。

© The Ito Foundation

Table 1　Measurement of antibody titer using viral neutralization test

infection with	Rabbit No.	7 dpi	14 dpi	21 dpi
mock	No.1	< 2	< 2	< 2
	No.8	< 2	< 2	< 2
aRb/END⁺	No.2	< 2	16 – 32	32 – 64
	No.3	< 2	8 – 16	8 – 16
	No.4	< 2	8	128 – 256
aRb/END⁻	No.5	< 2	2	2 – 4
	No.6	< 2	2	8
	No.7	< 2	< 2	< 2

3.3　中和抗体価の測定

ウイルス接種から１週間ごとに採取した血清試料を用いて，中和抗体価を測定した（**Table 1**）。Mock群のウサギから抗体は検出されず，いずれの個体でも抗体価は２倍以下であった。aRb/END⁺接種群では，３羽すべてで抗体の存在が確認され，８−256倍の抗体価を示した。一方で，aRb/END⁻接種群では，ウサギNo.７で抗体の産生が認められなかった。**Fig. 3B**の結果より，ウサギNo.７の組織でウイルスRNAが検出されたのは，ウイルスが感染していたにもかかわらず抗体が産生されていないことが原因であると考えられた。しかしながら，No.７で抗体が産生されなかった理由が個体差なのか，END⁻ウイルスの性状によるものなのかは明らかにできなかった。aRb/END⁻接種群のウサギNo.５およびNo.６では，抗体の存在が確認できたものの，その値はRb/END⁺接種群と比較すると低く，ウイルスの増殖効率が影響している可能性が考えられた。aRb/END⁻接種群における抗体価は２−８倍であった。

以上より，抗体価に差はあるものの，aRb/END⁺およびaRb/END⁻接種によって抗体産生が誘導されること，加えて，ウサギ由来培養細胞に馴化したBVDVが，自然宿主ではないウサギに感染できるようになったことが示された。

４．要　　約

本申請課題によって作出されたウサギ由来細胞馴化BVDV；aRb/END⁺およびaRb/END⁻が，実際にウサギ個体に感染できることが分かった。特に，aRb/END⁺接種群では，個体によっては比較的高い抗体価が検出されており，ウサギ体内で効率よくウイルスが増殖した可能性も考えられる。

本申請課題の目的は，aRb/END⁻の免疫学的性状を活かして，より効果的に免疫を付与できる弱毒生ワクチンを産生することである。本研究の結果から，aRb/END⁻接種群で産生される抗体価がaRb/END⁺接種群よりも低かったが，牛に対する病原性の強さや抗体の持続期間なども比較したうえで，END⁻ウイルスがBVDVの弱毒生ワクチンとして応用可能かどうか判断する必要があるだろう。予想以上にウサギへの感染効率がよい傾向が認められたことからも，培養細胞を用いた繰り返し継代によってウサギへの馴化の精度を高められている可能性が高い。このウイルスが牛に感染した時にどのような病原性・免疫誘導能を示すのか非常に興味深く，今後の研究展開の基盤となる成果が得られた。

文　　献

1）　Fourichon, C., Beaudeau, F., Bareille, N., Seegers, H.：*Prev Vet Med*, **72**, 177〜181, 2005.
2）　Shiokawa, M., Omatsu, T., Katayama, Y., Nishine, K., Fujimoto, Y., Uchiyama, S., Kameyama, K., Nagai, M., Mizutani, T., Sakoda, Y., Fukusho, A., Aoki, H.：*Virology*, **538**, 97〜110, 2019.
3）　Kozasa, T., Abe, Y., Mitsuhashi, K., Tamura, T., Aoki, H., Ishimaru, M., Nakamura, S., Okamatsu, M., Kida, H., Sakoda, Y.：*J Vet Med Sci*, **77**, 511〜518, 2015.
4）　Muhsen, M., Aoki, H., Ikeda, H., Fukusho, A.：*Arch Virol*, **158**, 753〜763, 2013.
5）　Suzuki, S.：*Ann Rep Natl Assay Lab*, **38**, 1〜10, 2001.
6）　Vilcek, S., Herring, A. J., Herring, J. A., Nettleton, P. F., Lowings, J. P., Paton, D. J.：*Arch Virol*, **136**, 309〜323, 1994.

© The Ito Foundation

令和３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，食品的価値，食品安全，遺伝育種，繁殖，動物衛生，家畜飼養・飼料など）

単位：千円

研　究　課　題	継続年数	代表研究者		助成金額
		代表者名	所属機関	
Ⅰａ　食肉の品質、製造加工技術　（９件）				
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（Ⅲ）	R1～	若松　純一	北海道大学大学院農学研究院	1,600
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（Ⅲ）	R1～	竹中　慎治	神戸大学大学院農学研究科	900
食肉加工品の塩漬熟成に認められる「塩なれ」に関する研究―食肉加工品の塩味に対する遊離脂肪酸の影響―		中村　幸信	一般社団法人食肉科学技術研究所	1,600
食肉の品質を制御する遺伝的要因に関する多因子複雑系の解析：細胞骨格との関連からのアプローチ		灘野　大太	名古屋大学大学院生命農学研究科	1,300
国内標準化を目的とした食肉の可食期間延長技術の検証		中村　好徳	農研機構九州沖縄農業研究センター	1,800
枝肉の３Ｄグラフィック化システムの製作（Ⅲ）	R1～	本山三知代	農研機構畜産研究部門	1,900
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（Ⅱ）	R2～	早川　　徹	北海道大学大学院農学研究院	1,600
食肉の複素誘電応答に基づく肉質評価技術の開発		村松　大陸	東京理科大学研究推進機構総合研究院	900
ポークソーセージにおけるタンパク質の香り保持効果とそのメカニズムの解明		西村　敏英	女子栄養大学栄養学部	1,300
Ⅰｂ　食肉の食品的価値　（２件）				
食肉加水分解物の栄養機能について		竹之山愼一	南九州大学健康栄養学部	1,600
プレバイオティクスによる食肉の効果的な栄養利用の研究		大島　健司	名古屋大学大学院生命農学研究科	1,800
Ⅰｃ　食品安全（５件）				
プラズマを用いた食中毒誘発因子の分解・不活化技術の開発		作道　章一	岡山理科大学獣医学部	900
国産ジビエの衛生管理に資する迅速簡便検査法の開発		山﨑　朗子	岩手大学農学部共同獣医学科	1,300
鶏肉の低温調理におけるカンピロバクターの消長		下島優香子	相模女子大学栄養科学部	1,600
ハム・ソーセージの食品添加物に関するスマート・リスクコミュニケーションの改良研究ならびに効果検証		山﨑　　毅	(特非)食の安全と安心を科学する会	1,500

© The Ito Foundation

近赤外光と偏光、AIを組み合わせた食肉中の虫および異物検知技術の開発		山口　堅三	徳島大学 ポスト LED フォトニクス研究所	1,800
Ⅱａ　遺伝育種（６件）				
ニワトリ骨格筋成長に遺伝子変異が及ぼす影響の全ゲノム解析に基づく解明		石原　慎矢	日本獣医生命科学大学 応用生命科学部	1,400
早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明		平野　　貴	東京農業大学 農学部	1,400
ウシ複合脊椎形成不全症の病態解析とウシの骨格成長に重要な糖鎖の同定		古市　達哉	岩手大学 農学部共同獣医学科	1,300
肥育豚の霜降り割合の指標となるバイオマーカーの特定		谷口　雅章	農研機構 畜産研究部門	1,600
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（Ⅱ）	R2～	横井　伯英	京都大学大学院 農学研究科	1,400
黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立		中嶋　宏明	山形県農業総合研究センター 畜産研究所	2,000
Ⅱｂ　繁殖（19件）				
黒毛和種における経腟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（Ⅱ）	R2～	及川　俊徳	宮城県畜産試験場	1,300
ウシ二次卵胞の発育制御におけるTNF α 受容体の役割		平山　博樹	東京農業大学 生物産業学部	1,300
体外受精由来ウシ胚盤胞の可逆的発生停止を誘導する体外培養法の開発ならびにその誘導による胚盤胞の胚質改善の可能性		石井　利通	三重県畜産研究所	900
受精卵の未凍結保存における植物由来成分の有効性検証と配合の最適化		星野　由美	日本女子大学 理学部	1,200
内腔の有無に着目したウシ形成期黄体の機能解析		窪　　友瑛	北海道立総合研究機構酪農試験場	1,400
牛黄体血流の多寡は子宮内膜機能の局所調節に関与するのか？		金澤　朋美	岩手大学 農学部共同獣医学科	1,800
ウシ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（Ⅱ）	R2～	森田　康広	名古屋大学大学院 生命農学研究科	1,400
黒毛和種における不明瞭な発情発生メカニズムの黄体退行の観点からの解明		法上　拓生	農研機構九州沖縄 農業研究センター	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（Ⅱ）	R2～	久保田海雄	農研機構 畜産研究部門	1,300
生殖巣始原生殖細胞を用いた新規家禽遺伝資源保存法の開発		中島　友紀	農研機構 畜産研究部門	1,600
機能性脂肪酸を活用した黄体機能強化による乳牛繁殖成績改善技術の確立		山口昇一郎	福岡県農林業総合試験場	1,100
卵胞刺激ホルモンを用いた夏季における繁殖母豚の発情回帰遅延対策技術の開発		内倉　健造	愛知県農業総合試験場	1,300
ウシ初期黄体におけるPG抵抗性の解明―低酸素環境による抗アポトーシス機構―（Ⅱ）	R2～	西村　　亮	鳥取大学 農学部共同獣医学科	1,400
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（Ⅱ）	R2～	杉浦　智親	酪農学園大学 獣医学群 動物生殖学ユニット	800
ウシにおける排卵後の血中エストラジオール増加の検知による受胎性評価		松井　基純	帯広畜産大学 獣医学研究部門	1,100

© The Ito Foundation

黒毛和種雌牛の繁殖成績を改善するための栄養状態の最適化検討		鍋西　久	北里大学獣医学部	1,400
抗酸化物資を利用したウシ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（Ⅱ）	R2～	日巻　武裕	岐阜大学応用生物科学部	1,200
分娩前の複合型アミノ酸ペレット給与が乳牛の繁殖成績に及ぼす影響		住吉　俊亮	日本大学生物資源科学部	1,400
卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅱ）	R2～	小山　毅	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,300
Ⅲ　動物衛生　（19件）				
アフリカ豚熱の侵入リスク評価に関する疫学研究（Ⅳ）	H30～	杉浦　勝明	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,600
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（Ⅱ）	R2～	佐々木羊介	宮崎大学農学部	800
イノシシにおける豚コロナウイルスの感染実態調査		中川　敬介	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	1,700
PRRSウイルス感染初期における鼻腔内ウイルス動態の解析		平井　卓哉	宮崎大学農学部	1,200
家畜に下痢を引き起こすロタウイルスの遺伝子改変技術		金井　祐太	大阪大学微生物病研究所	1,300
地方病性牛伝染性リンパ腫発症機序の解明と予後診断法の確立		森　宏	北海道医療大学薬学部	1,600
鶏肉・鶏卵の生産性向上を目指した安全なワクモ防除法の開発		辻　尚利	北里大学医学部	1,600
牛伝染性リンパ腫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（Ⅱ）	R2～	安藤　清彦	農研機構動物衛生研究部門	1,700
牛のストレス応答における肝臓機能の解明		グルゲ キールティ シリ	農研機構動物衛生研究部門	1,100
補体制御性タンパク質CD46の豚熱ウイルス受容体としての機能解析		岩丸　祥史	農研機構動物衛生研究部門	1,300
家畜用ワクチンのための新規ワクチンプラットフォームの構築		新地　浩之	鹿児島大学学術研究院理工学域工学系	1,650
炎症マーカーの代わりに安価で簡単に測定できる血清Fe濃度で牛複合性呼吸器疾患の炎症評価が可能か？		鈴木　一由	酪農学園大学獣医学群	1,400
映像解析技術を用いたアブの吸血行動の定量的解析による病原体媒介リスクの可視化		菅沼　啓輔	帯広畜産大学原虫病研究センター	1,300
サルモネラ鶏卵汚染・介卵感染に寄与する鶏卵巣での菌・宿主細胞間相互作用の解明		岡村　雅史	帯広畜産大学獣医学研究部門	1,650
ジビエおよび家畜動物におけるトキソプラズマ感染の頻度と新規検査方法の開発		保科　斉生	東京慈恵会医科大学感染制御科	1,600
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索（Ⅲ）	H30～	青山　真人	宇都宮大学農学部	1,400
網羅的ジェノタイピングによる新規牛伝染性リンパ腫抵抗性遺伝子の同定（Ⅲ）	R1～	目堅　博久	宮崎大学産業動物防疫リサーチセンター	800
牛の腸アミロイド症の根絶を目的としたAAアミロイド症原因遺伝子の同定		上家　潤一	麻布大学獣医学部	1,600
牛伝染性リンパ腫ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発		岡川　朋弘	北海道大学大学院獣医学研究院	1,300

© The Ito Foundation

Ⅳ　家畜飼養、飼料など　（20件）				
ルーメンアシドーシスに伴うエンドトキシン体内流入と肝機能障害を防除する技術の開発		米倉　真一	信州大学農学部	1,500
母体の乳生産性向上による効率的な肥育を目指す基礎的研究		津上　優作	広島大学大学院統合生命科学研究科	500
日本短角種去勢牛の２シーズン放牧肥育における放牧管理改善による肉質向上		上田宏一郎	北海道大学大学院農学研究院	1,400
夏季に調製した発酵混合飼料の泌乳牛における利用適正―窒素利用効率に基づく検証―		近藤　誠	三重大学大学院生物資源学研究科	1,400
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（Ⅱ）	R2～	保田　昌宏	宮崎大学大学院医学獣医学総合研究科	1,300
離乳育成豚のリジン要求量に関する研究（Ⅲ）―Diet Selection能力の活用によるアミノ酸給与の精密化―	R1～	勝俣　昌也	麻布大学獣医学部	800
国産子実用トウモロコシ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（Ⅱ）	R2～	篠遠　善哉	農研機構東北農業研究センター	1,300
多頭飼養の牛群において反芻を含む行動型判別を可能とする映像モニタリング技術の開発		多田　慎吾	農研機構北海道農業研究センター	1,800
寒地型多年生牧草採草地が1年生イネ科草種（自生イタリアンライグラス―イヌビエ・メヒシバ）交代植生に遷移する気候・土壌要因の解明と飼料価値の評価		池田堅太郎	農研機構東北農業研究センター	800
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（Ⅱ）	R2～	西本　完	農研機構食品研究部門	1,800
子牛用疑似グルーミング装置利用モニタリングによる健康状態評価手法の開発		矢用　健一	農研機構畜産研究部門	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（Ⅲ）	R1～	松﨑　正敏	弘前大学農学生命科学部	1,200
木材クラフトパルプとカンショ焼酎粕を原料としたサイレージの給与が黒毛和種肥育牛の第一胃内発酵に及ぼす影響		前田　友香	宮崎県畜産試験場	1,700
採卵日齢に起因するヒナ品質がブロイラー異常硬化胸肉の発現に及ぼす影響の解明		岩崎　智仁	酪農学園大学農食環境学群	1,200
乳用子牛における消化管機能強化および消化管由来の炎症予防に関する研究		福森　理加	酪農学園大学獣医学群	1,700
睡眠様姿勢―肉用牛の生産性およびウェルフェアの新たな行動指標の検討		深澤　充	東北大学大学院農学研究科	1,500
ゲノム編集による高消化性暖地型イネ科牧草の開発（Ⅱ）	R2～	権藤　崇裕	宮崎大学フロンティア科学総合研究センター	1,000
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（Ⅱ）	R2～	庄司　則章	山形県農業総合研究センター畜産研究所	1,600
畜産汚水処理施設の低コスト水質監視システムの開発		富谷　信一	鳥取県中小家畜試験場	1,000
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（Ⅱ）	R2～	松永　将伍	長崎県農林技術開発センター	1,600
合　　計　　80件				110,000

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

© The Ito Foundation

加藤　健太郎

東北大学大学院農学研究科　教授

〔業績の課題名〕

食肉に関わる原虫感染症の病態発現メカニズムの解明と対策技術の確立

〔業績の概要（受賞理由）〕

畜産業は，原虫病を含めた感染症によって大きな経済的打撃を被ってきた。原虫病は，感染による畜産動物の生産性の低下，泌乳量の減少等の直接的な影響だけでなく，食の安全性に対する国民の危機感とそれに伴った風評被害の蔓延につながる。

受賞者は畜産業を脅かす原虫感染症の中でも，人獣共通感染症であるトキソプラズマ症を主な研究対象とし，特にこれらの感染対策技術の研究開発に焦点を当ててきた。トキソプラズマ症は，家畜伝染病予防法において，めん羊，山羊，豚，いのししを対象とした届出伝染病に指定されている。加熱調理等が不十分な肉の食用や近年の食習慣の変化の影響もあり，妊婦の初感染が原因である先天性トキソプラズマ症の症例数が増加しており，流産や胎児の脳症，痙攣，水頭症，頭蓋内石灰化等を起こしている。2012年９月には患者会が設立され社会的な問題となっている。

ところが食肉用家畜，鶏卵，乳産業における原虫感染症による被害は甚大であるという状況にありながら，その対策はサルファ剤等の古典的な化学薬剤に頼ったものであり，耐性原虫の出現も多く根本的な駆虫には至っておらず，原虫病に対するワクチンに至ってはいまだ開発されていないのが現状である。このような現状の中，受賞者は以下のような研究を行ってきた。

（１）原虫の感染レセプター同定系を独自に開発し，レセプターとして糖鎖分子を同定した。同定したヘパラン硫酸，コンドロイチン硫酸が糖鎖の一種であったことから，また，タイレリア，クリプトスポリジウム，マラリア原虫でも同様にヘパラン硫酸が宿主細胞への侵入に関わっているという知見を得たため，糖鎖を抗原虫薬のシーズとして用いるという実用化を目指し着想を得た。

（２）原虫プロテインキナーゼ（PK）の機能解析を行った結果，トキソプラズマの宿主細胞侵入，増殖，潜伏感染への移行，宿主細胞からの脱出といった複雑なライフサイクルの各ステージにおいて原虫PKが重要な役割を果たし，これらをターゲットとした薬剤が宿主細胞への侵入を実際に阻害することを見出した。また，急性感染期と潜伏感染期の虫体をともに抑制することができる薬剤のスクリーニング系の開発に成功した。

（３）金属ナノ粒子が原虫の増殖阻止に働くメカニズムを解明し，アミノ酸被覆を行うことでその効果が増強されることを明らかにした。本技術を基として，今後，原虫特異的に増殖阻止効果のある動物用医療品の開発，あるいは原虫特異的に薬剤を運ぶトラックデリバリーシステムに活用できる担体の開発というまったく新しい技術の創出につながる。受賞者が開発した以上の抗原虫薬のシーズが動物薬として市場に出ることで，将来的に畜産業および食品産業の振興と国民食生活の安定に寄与することが期待できる。

© The Ito Foundation

東 山　由 美

農研機構東北農業研究センター研究推進部　事業化推進室事業化推進チーム　チーム長

〔業績の課題名〕

肉用家畜生産における栄養素配分調節機構ならびにストレス評価に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

経済のグローバル化により畜産物の輸入量は今後ますます増加すると見られ，国際競争力の強化に向け家畜を最大限効率的に飼養する技術が必要である。一方，畜産物の輸出量は，近年拡大傾向にあり，さらなる飛躍に向けて，国際基準のアニマルウェルフェアを意識した取り組みも必須である。受賞者は，肉用家畜における飼料中の栄養素の家畜体内での配分調節機構の解明に取り組み，栄養素の効率的な畜産物への配分制御技術開発を目指すとともに，アニマルウェルフェアの視点から家畜のストレスについて独創的な研究を行い，それぞれ成果をあげてきた。

（1）肉用家畜における栄養素の配分調節機構

脂肪細胞から分泌され，食欲の調節やエネルギー代謝に関連するホルモンであるレプチンについて，ウシでの測定法を確立し，肉用牛におけるレプチン分泌の日内変動は反芻動物特有であること，黒毛和種去勢牛では肥育に伴い血中レプチンは上昇するが，採食量との相関は認められないこと，さらに，黒毛和種去勢牛はホルスタイン種去勢牛より血中レプチン濃度および脂肪組織におけるレプチンmRNA発現量が高いことを明らかにし，筋肉内に著しく脂肪を貯める黒毛和種の特性との関連を示した。また，骨格筋や脂肪組織に存在し末梢組織へ糖を取り込むグルコース輸送担体（GLUT）のうち，インスリン依存症のGLUT４タンパク質発現は，ウシでは出生から成長に伴い低下し反芻動物におけるインスリン抵抗性と関連があること，ブタでは飼料中の脂肪酸により発現量は変化することを明らかにした。

（2）ウシにおける種々の飼養環境下でのストレス評価

ウシにおいて，非侵襲的に採取できるスポット尿を用いた尿中コルチゾールレベル（対クレアチニン比，以下UC）は，一般的なストレス指標である血液中コルチゾール濃度に代わるストレス指標として有効で，除角・去勢，社会的隔離といった身体的，精神的負荷で上昇すること，舎飼いや放牧といった飼養環境によるUCの反応は品種により異なることを明らかにし，家畜の快適な飼養環境の実現のためには品種特有の背景を考慮する必要があることを示した。また子牛について，離乳ストレス軽減のため離乳時期を慣行より遅らせると，粗飼料多給下でも子牛の発育成績は優れ，ルーメンの機能的発達を見極めた離乳時期の判断の重要性を示した。

© The Ito Foundation

上 田　修 司

神戸大学大学院農学研究科　助教

〔業績の課題名〕

畜産物の品質評価，付加価値の向上に向けた メタボロミクス技術の応用に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

メタボロミクス解析は技術的な進歩が目覚ましく，さまざまな分野に活用範囲が拡がっている。黒毛和種牛肉は，筋内脂肪が多く，脂肪交雑の割合によって肉質が大きく変化する。受賞者は，質量分析計を最適化することで脂肪交雑のバラツキによる機器分析の精度への影響を抑え，牛肉の「代謝物」，「脂質」，「香気成分」の網羅的解析を可能にし，黒毛和種牛の肉質評価に繋がる成果を収めた。

（1）ガスクロマトグラフィー質量分析を用いた黒毛和種牛肉の栄養成分の比較解析

ガスクロマトグラフィー質量分析法（GC/MS）を用いたメタボロミクス解析により，畜肉に含まれる80種以上の代謝物を同定し，黒毛和種牛肉の脂肪交雑の割合と相関する指標として，筋内脂肪組織に由来する中鎖脂肪酸など複数の化合物を同定した。また，黒毛和種牛肉の脂っぽい風味，和牛香と高い相関を示す複数の化合物を見出し，GC/MS分析が牛肉の品種，肉質，生産地の判別に活かせることを示した。

（2）黒毛和種の香気成分と代謝物に関する研究

黒毛和種牛肉の甘い香りに寄与する代謝物の指標を明らかにするため，真空蒸留によって得られた加熱調理後の牛肉の揮発性画分をGC-olfactometry分析を行い，匂い物質を探索した。黒毛和種，乳用種の比較により，γ−ヘキサラクトン，γ−デカラクトン，γ−ウンデカラクトンが黒毛和種牛肉の特徴的な香りに寄与することを示した。次に，メタボロミクス研究のデータと比較することで，グルタミン，デカン酸，リン酸，乳酸，クレアチニン，ヒポキサンチンなどの成分が黒毛和種牛肉の甘い香りの指標となることを示した。

（3）黒毛和種の脂質組成とラクトン香の形成に関する研究

黒毛和種牛肉の香りの形成メカニズムを探るため，黒毛和種牛肉に含まれる脂質を検討した。液体クロマトグラフ質量分析計で８種類の脂質クラスを網羅的に分析し，さらに高速液体クロマトグラフィーによって14種のトリアシルグリセリドを明らかにした。牛肉の加熱調理で生じるラクトンのうち，黒毛和種牛肉の霜降りと関連するγ−ヘキサラクトンは，多価不飽和脂肪酸のリノール酸と相関することを見出し，脂肪酸組成が黒毛和種牛肉から生じるラクトン酸のプロファイルに影響を与えることを示した。

© The Ito Foundation

学会等事業助成

© The Ito Foundation

令和３年度学会等事業助成実施報告書
市民公開講座『牛伝染性リンパ腫の新規制御法の可能性を探る』に関する開催報告

公益社団法人日本獣医学会　代表理事　猪熊　壽（東京大学）

〔開催主旨〕

現在，全世界的に新型コロナウイルス感染症COVID-19が蔓延し，私たちの生活に多くの影響を与えているが，新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は，もともと野生動物のウイルスであったと予想されている。我々の生活や健康に関係の深い動物の感染症についての研究も含め，幅広く動物と人間の健康と福祉に貢献するのが獣医学の責務である。今回の市民公開講座では，そのような動物の感染症のひとつである「牛伝染性リンパ腫」をテーマとして取り上げた。

本疾患は，牛の血液のがんの一種であるリンパ腫の発症を特徴とするが，ウイルス感染症としての側面も持つ。本疾患の基本的な特徴については基調講演で概述する。本疾患は現在の我が国の畜産生産に大きな影響を与えており，この病気の制圧は，畜産・獣医業界の非常に大きな重要課題となっている。このため牛伝染性リンパ腫の新しい制御法について，本疾患の専門家である日本獣医学会の２名の会員より，その研究成果を紹介いただいた。北海道大学・感染症学研究室の今内 覚会員には，免疫制御因子をコントロールするという観点から，また，東京大学・地球規模感染症制御学講座の間 陽子会員には牛伝染性リンパ腫に対する牛の抵抗性の側面から，あるいは新規ワクチン開発の可能性などを講演いただいた。

今回の公開講座の内容が，一般市民の方々に獣医学に関心を持っていただき，獣医学をご理解いただける契機になり，さらに家畜衛生に携わる関係各位の日常業務や牛伝染性リンパ腫の理解の一助となることを祈念する。なお，本企画計画当初は，対面での市民公開講座開催を目指していたが，COVID-19の全国的な蔓延現状を考慮して，昨年度に引き続きZOOMを利用したオンラインセミナー方式での開催とした。

〔開催概要〕

令和４年２月５日（土曜日）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248名の申込があり，当日の参加者は168名であった。

また，市民公開講座の講演内容は動画に編集し，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（獣医系大学等）へ無償配布した。

© The Ito Foundation

〔市民公開講座プログラム〕

『牛伝染性リンパ腫の新規制御法の可能性を探る』

1．開会挨拶　猪熊 壽（公益社団法人日本獣医学会 理事長）

2．基調講演　猪熊 壽（東京大学大学院農学生命科学研究科 教授）

3．講演１　牛伝染性リンパ腫における免疫学的解析を基盤とした新制御法の試み

講師：今内 覚（北海道大学大学院獣医学研究院 准教授）

座長：猪熊 壽（東京大学大学院農学生命科学研究科 教授）

4．講演２　感受性・抵抗性牛を利用した新しい牛伝染性リンパ腫制圧戦略

講師：間 陽子（東京大学大学院農学国際専攻 特任教授）

座長：堀本泰介（東京大学大学院農学生命科学研究科 教授）

5．総合討論

司会：内田和幸（日本獣医学会 理事）

〔講演概要〕

基調講演「牛伝染性リンパ腫―現状と問題点」

猪熊 壽（東京大学大学院産業動物臨床学研究室 教授）

講演１「牛伝染性リンパ腫における免疫学的解析を基盤とした新制御法の試み」

今内 覚（北海道大学大学院獣医学研究院 准教授）

牛伝染性リンパ腫（旧名：牛白血病）は，増加の一途をたどり，日本の畜産業に甚大な被害をもたらす家畜衛生上の重大な課題となった。北海道大学大学院獣医学研究院では，古くから迅速診断に基づく農場での感染防疫対策を生産者個人から各団体・機関までを対象に幅広く長年行ってきた。一方，提供された臨床検体を用いて，本病の病態発生機序の研究も行ってきた。感染免疫・腫瘍免疫において病原体や腫瘍を排除する活性化リンパ球は，『免疫チェックポイント因子』によって制御され過剰な免疫応答が抑えられている。しかし一方で，牛伝染性リンパ腫を含む難治性疾病では，種々の免疫制御因子の暴走が，病態の進行および維持に関連することが示唆され，感染細胞や腫瘍細胞が排除されない免疫回避機序の一因であることを明らかにした。また，これらに対する抗体により，疲弊化した免疫が再活性化され，抗ウイルス効果を示すことを確認した。本病に対する新規制御法の可能性について各機関と共同研究を進めており，本講座ではその一部を紹介したい。

講演２「感受性・抵抗性牛を利用した新しい牛伝染性リンパ腫制圧戦略」

間 陽子（東京大学大学院生命科学研究科 教授）

牛伝染性リンパ種ウイルス（BLV）は牛の悪性Ｂリンパ腫である地方病性牛伝染性リンパ種（EBL）を誘発する。我々は最近，プロウイルス量が低値を示し発症し難い“抵抗性”牛と，反対の“感受性”牛の存在を発見した。そこで，BLVが蔓延している我が国において，経済的損失を最小限に抑えながらBLVの清浄化を進めていくためには，これまでのEBL対策に“疾患感受性の個体差”という新たな視点を加えて，“抵抗性牛”を生物学的防壁として活用する陽転阻止と感受性牛の特定によるBLV伝播高リスク牛の排除を同時に進めることで，感染牛と非感染牛を混合飼育しながらでもBLV陽転率を最

© The Ito Foundation

大限に抑制可能なより広範な農家で実施できる「BLV清浄化対策」を提案したい。加えて，抵抗性牛を指標として発症し難い，さらにプロウイルス量が上昇しない牛集団を作出するという「育種戦略」，あるいは感受性牛を標的とした「ワクチン開発」によるプロウイルス量の低下による，伝播の抑制や感染率の低下，といったEBLの新しい制圧戦略について紹介したい。

© The Ito Foundation

日本食肉科学会 令和３年度事業助成実施報告

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の助成を受けたのは，（１）海外派遣事業の補助（国際食肉科学技術会議派遣），（２）国内における学会大会，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）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），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「日本食肉科学会」の概要について以下に記す。

２．日本食肉科学会の概要

本会は昭和34年（1959年）４月に「日本食肉研究会」として発足し，食肉に関する分野について広く学界，業界，団体関係者がお互いの研鑽の場として，学術と産業の発展を目指し，活動を行ってきた。

本会では毎年，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。大会は通常，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」に満載されている。

本会は，2021年度から「日本食肉科学会」に改称した。その理由は，今年８月に神戸で開催される第68回国際食肉科学技術会議を成功させるために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，学会化は必須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，会員は全巻をオンラインで閲覧が可能となった。

本学会の会員数は，本年２月28日現在で，正会員182名（前年172名），学生会員10名（前年６名），賛助会員５社（前年５社），特別会員29社（前年32社），名誉会員８名（前年８名）である（令和４年度の総会資料より）。

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，通称ICoMSTは毎年８月中旬に世界各地で開催され，日本食肉研究会時代から役員の中より１名を派遣してきた。また，その際に行われる各国代表者会議にも出席し，すべての会議出席報告を本学会機関誌の「食肉の科学」に掲載し，会員に周知してきた。伊藤記念財団からこの海外派遣事業の補助も受けるようになり，2022年に神戸で開催される第68回会議（ICoMST2022）に向けて組織委員会を立ち上げ，2019年の第65回会議（ドイツ，ポツダムで開催）には本学会から多くの会員

© The Ito Foundation

が参加した[1)]。

2020年８月USAフロリダ州オーランドでの第66回会議では，ICoMST2022組織委員会から多数参加すべく準備を行っていたが，その年になって新型コロナウイルスの感染拡大という思いもしない事態が生じ，会議がオンラインで行われるようになった。この会議に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[2)]。

図１　ICoMST2022の紹介，委員長がクラクフの会議に参加，Closing ceremonyでスピーチを行った。

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。前回，2021年の第67回大会はポーランドのクラクフで開催され，対面式が復活かと思われたが，参加登録の時期になってハイブリッド形式に変更された。ICoMST2022組織委員会からは坂田委員長が実参加し，現地で各国代表会議に出席し，第68回日本開催の広報活動を行った（図１）。また，組織委員会委員の大半がこの会議にリモート参加し，次の会議を主管する立場として情報収集に努めた[3)]。

（２）　国内における学会大会の補助

学会大会をオンラインで行うことが一般的になり，2021年３月の定例大会（第62回日本食肉研究会大会）もその形式で開催されたことを，前回の事業報告書に記載した[4)]。その際に，令和２年度伊藤記念財団賞の受賞講演を佐々木啓介会員（農研機構）が行い，特別講演で，Dr. Wangang Zhang（南京農業大学教授）ならびにDr. Peter McGilchrist（University of New England上級講師）がその内容をビデオ配信し，質疑応答をライブで行い，海外とも問題なくつながることが確信できた大会であった。

2022年の第63回大会は本年３月26日に開催され，本年８月に迫った国際会議開催のシミュレーションとして，神戸国際会議場をキーステーションに当学会メンバーが運営に携わった。今回もリモート開催となったが，口頭発表の演者で希望があれば現地において配信を行うように設定した。今大会では，兵庫県の畜産行政側から神戸ビーフなど地元畜産をまず紹介し，これもICoMST2022において，世界に向けて日本の食肉生産のPRを想定したプログラムであった。

一般研究発表で昨年を上回る演題数（ポスター17題，口頭４題）があり，本学会の趣旨とする若手研究者の奨励推進が図られている。また，特別講演（国内）で第６回伊藤記念財団賞受賞講演『食肉加工への超高圧利用，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』を岩崎智仁会員（酪農学園大学）が行った。海外からは２題の講演があり，Dr. Troy Declan（ICoMST Executive director, Director of Teagasc Food Research Centre, Ashtown, Dublin 15, Ireland）により『The International Congress of Meat Science and Technology（ICoMST）-A global science-based forum for meat scientists in a time of need』（図２），ならびにDr. Irina Chernukha（Professor, V.M.

© The Ito Foundation

Gorbatov Federal Research Center for Food Systems of Russian Academy of Sciences, Moscow）により『In pig we trust-Meat consumption in Russian Federation and introduction of some local pig breeds』が配信され，英語での討論が時間いっぱいに行われた。

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，今年８月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

ICoMST2022神戸開催を目指し，組織委員会を４年前に立ち上げ，鋭意準備を進めている。昨年８月は，上記の通りポーランドでの67th ICoMSTがハイブリッド形式になったが，実際の渡航は入国隔離期間があって組織委員会からの派遣は委員長の坂田のみとなった。その状況下でも，大勢の組織委員会メンバーがon-lineで参加し，主催側からも感謝された。

一昨年から組織委員会はほぼ２か月ごとに会議を開き，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を発行し，組織委員会活動の広報に努めている（図３）。

いまだコロナウイルス感染拡大の中で，会議の様式について，ICoMST国際本部（アイルランド）と連携し，神戸国際会議場を基点に現地およびWeb開催とし，国際情勢も見ながら鋭意準備を行っている。

図２ ICoMST国際事務局長のDr.Troy Declanによる講演，アイルランドから配信。

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」の参加報告などで、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・接遇、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。

立ち上げ時期の要点

1. 組織作り
2. 予算作成
3. 全体の計画づくり

ICoMST2022 組織委員会を立ち上げる時の要点、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

組織委員会の構成や大まかな進め方は、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きましたが、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。

上から2つは準備委員会時の会議模様、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

ICoMST2022

第2ロゴマーク、霧降りをイメージ

図３ 第68回国際食肉科学技術会議組織委員会のNews Letter No.1

４．おわりに

（公財）伊藤記念財団からの学会等学術団体への活動助成は今年で７回目となった。平成30年度まで順調に大会を開催し，外国人研究者の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ウイルスの発生により，大会の中止に至るなど混乱を極めた。このパンデミックの中で，リモー

© The Ito Foundation

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，今年神戸での国際会議開催を見据えて諸外国のキーパーソンとの交流など，この海外派遣とセミナーの事業助成効果は確実に上がってきたと判断する。実際，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。

今年８月の神戸開催が予定通りできるよう，コロナ禍社会の中でもできる限りの準備を，組織委員会をフルに稼働させ進める方針である。

ここに，助成をいただいた（公財）伊藤記念財団の皆様に深謝し，引き続き本助成の増強を日本食肉科学会として衷心よりお願い申し上げます。

参考資料

1） 坂田亮一，山之上 稔，若松純一，本山三知代，林 利哉，他参加者12名：第65回国際食肉科学技術会議（ICoMST2019）に出席して，食肉の科学，Vol.60, No.2, 203～217, 2019.
2） 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.
3） 坂田亮一，松石昌典，有原圭三，水野谷 航，早川 徹，他参加者30名：第67回国際食肉科学技術会議（ICoMST2021）に参加して，食肉の科学，Vol.62, No.2, 145～177, 2021.
4） 坂田亮一：日本食肉研究会 令和２年度事業助成の実施報告，令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，Vol.39, 495～500, 2021.

© The Ito Foundation

令和３年度事業実施報告書
日本畜産学会第129回大会オンラインシンポジウム
「畜産学のレジリエンスと進化」

公益社団法人日本畜産学会　理事長　佐藤正寛（東北大学）

〔**日時**〕2021年９月14日（日）14：30～18：00

〔**主催**〕公益社団法人　日本畜産学会

〔**共催**〕東北大学大学院農学研究科

〔**企画**〕日本畜産学会第129回大会実行委員会（大会長：北澤春樹）

〔**プログラム**〕

講演１．大会長特別提言「健全畜産シナジー強化の創出」14：30－15：00

北澤春樹（東北大学大学院農学研究科）

講演２．基調講演「畜産学に裏打ちされた畜産業の展望」15：00－15：40

眞鍋 昇（大阪国際大学，（独）家畜改良センター）

講演３．招待講演「異分野融合によるアニマルウェルフェア配慮型の家畜管理技術研究」

15：50－16：10

竹田謙一（信州大学農学部）

講演４．招待講演「マウスを用いた基礎研究からブタの産子数向上技術へのトランスレーション」

16：10－16：30

島田昌之（広島大学大学院統合生命科学研究科）

講演５．招待講演「豚熱の現状および今後の防疫対策」16：40－17：00

亀山健一郎（（国研）農業・食品産業技術総合研究機構・動物衛生研究部門）

講演６．招待講演「環境が求める乳牛飼養研究のこれから」17：00－17：20

真貝拓三（（国研）農業・食品産業技術総合研究機構・畜産研究部門）

総合討論　17：20－17：50

総合司会者（座長）

大会長　北澤春樹（東北大学大学院農学研究科）

実行委員長　米山 裕（東北大学大学院農学研究科）

講演，総合討論

Zoomの挙手機能より質問を受け付けた。講演・討論はいずれもライブ形式で開催した。

© The Ito Foundation

〔開催概要〕

現在の世界人口は70億人を超え，2050年には約97億人に達する見込みである。動物性タンパク質の生産量も1.6倍（2018年比）に増えると予測されており，畜産業の重要性はますます高まるばかりである。しかし，現在の畜産には多数の解決すべき問題を抱えており，この解決なくして，未来における安心安全な畜産物の持続的生産は成し得ない。近年，畜産領域を取り巻く問題として，家畜（動物）福祉，温室効果ガス（主にメタンガス）の発生，グローバル化にともなう国境を越えた新興・再興感染症の拡大や，気候変動にともなう環境ストレスがあげられる。これらのような問題に対し，我々研究者は高度な科学力・研究力をもって，動物にも地球にもやさしく，かつ高効率，省力的な生産体系の実現に貢献しなければならない。これに向けては，繁殖，育種，生理，栄養，行動，微生物　畜産物，環境といった多様な畜産研究領域の融合からなる「しなやかな強さ（レジリエンス）」による畜産学の“進化”が必要である。本事業では，上記各領域におけるトップレベルの専門家を６名招聘し，畜産業における“今とこれから”ならびに“畜産学による貢献と将来”を講演いただき，講演後には参加者と総合討論を行った。

本シンポジウムにより，研究者および一般参加者において，現在の畜産が抱える問題に加え，これからの畜産学の方向性・目標が広く共有できた。また，参加者からも意義深いシンポジウムであったとの声が多数寄せられた。シンポジウムでは研究・教育機関，民間企業より約260名の方に参加いただき，参加者数は第128回大会の約70％増になった。数社の報道機関も参加し，講演内容の積極的な取材が行われたと考えられた。

本シンポジウムを含む第129回大会は，開催直前まで一部対面式で実施する予定であったが，新型コロナウイルスの感染拡大によりオンライン式への変更を余儀なくされた。このため，当初予定していた予算通りに執行することが困難となったが，助成金は本シンポジウムの運営に適切に支出したことを申し添えたい。最後に，貴財団のご理解と助成に深い感謝の意を表する。

© The Ito Foundation

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３年度（Vol. 40）

2022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＞

© The Ito Foundation