令和４年度

食肉に関する
助成研究調査成果報告書

VOL. 41

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）
4	41	79	120,000	8	3名（6,000千円）	4団体（8,500千円）

© 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41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，41回（令和４年度）助成事業における79件の研究調査助成対象研究者の皆様からいただいた研究成果報告とともに，第８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５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.41 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. 2023
Koichi Ito
The chief director
The Ito Foundation

© The Ito Foundation

研究助成事業

目　　次

調味液浸透肉の電子レンジ加熱硬化特性とその食感品質に関する研究
…… 河　野　俊　夫（高知大学教育研究部自然科学系農学部門）…… 3
加圧 CO_2 環境下での酵素加水分解を利用したポークミートエキスの製造法の開発
…… 野　間　誠　司（佐賀大学農学部）…… 9
食用ブドウ球菌による ZnPP 形成と食肉製品の色調改善効果に関する研究
…… 若　松　純　一（北海道大学大学院農学研究院）…… 13
生理的に調節しうる濃度のカルノシンの添加は，鶏肉の匂いを改善するか？
…… 渡邊　源哉・石田　翔太・赤田　花林・本山　三知代・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）…… 19
工業型畜産の課題解決に向けた培養肉の生産技術開発
…… 岡　村　大　治（近畿大学農学部）…… 24
乾燥熟成牛肉より分離された真菌の生理特性およびその利用に関する研究
…… 中川　麻衣・小室　春菜・中島　誠人・猪口　由美・高鳥　浩介*
（一般社団法人食肉科学技術研究所，*NPO法人カビ相談センター）…… 29
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（Ⅱ）
…… 西村　敏英・山口　千里（女子栄養大学栄養学部）…… 35
黒毛和種牛肉の香り特性の改善に関わる脂質過酸化反応系の解析
―コールドチェーン物流の転換に向けた科学的アプローチ―
…… 上　田　修　司（神戸大学大学院農学研究科）…… 43
畜産副生物から作成された再生医療部材の引張強度の解明
…… 神　田　英　輝（名古屋大学大学院工学研究科）…… 50
食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅱ）
…… 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）…… 57
豚のオス臭を形成する臭気成分の分析とそれを記述する用語の同定
…… 河　原　　聡（宮崎大学農学部）…… 67
細菌のファージ感受性増大およびスーパーファージ作製に関する研究
…… 宮　本　敬　久（九州大学大学院農学研究院）…… 73
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（Ⅱ）
…… 山　口　堅　三（徳島大学ポストLEDフォトニクス研究所）…… 80

© The Ito Foundation

高酸素ガス置換包装が食中毒菌の生存性に与える影響の検証
…… 岡　田　彩　加（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）…… 86
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（Ⅱ）
…… 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）…… 91
早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明（Ⅱ）
…… 平野　　貴[1]・小澤　昌起[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）…… 98
近交度の高い金華豚集団の遺伝的多様性に関する評価
…… 塩谷　聡子・大竹　正剛・寺田　　圭
（静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター）…… 105
表型値間因果構造を利用した豚繁殖形質の正確な同時改良手法開発
…… 岡　村　俊　宏（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）…… 111
黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立（Ⅱ）
…… 庄司　則章[1]・上本　吉伸[2]
（[1]山形県農業総合研究センター畜産研究所，[2]東北大学大学院農学研究科）…… 116
新たに見つかった黒毛和種牛の筋ジストロフィーの病態解明と遺伝的統御法の確立
…… 保　田　昌　宏[1, 2]（[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）…… 123
鶏の暑熱耐性を担う CCKAR および HSP70 遺伝子多型に関する研究
…… 福原　絵里子・平川　達也・森　　美幸（福岡県農林業総合試験場）…… 127
黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の客観的評価手法の開発（Ⅱ）
…… 鈴　木　洋　美（（地独）北海道立総合研究機構畜産試験場）…… 132
多機能尾部センサを用いた重種馬の分娩予知
…… 滄木　孝弘[1]・吉岡　耕治[2]・檜垣　彰吾[3]
（[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，[2]麻布大学，
[3]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）…… 138
哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響
…… 髙　橋　秀　之（九州大学農学部附属農場）…… 144
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（Ⅱ）
…… 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）…… 149
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（Ⅲ）
…… 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）…… 154
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（Ⅱ）
…… 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）…… 159

© The Ito Foundation

ホルスタイン種牛の妊娠期における卵巣予備能維持機構
…… 古山　敬祐[1]・窪　　友瑛[2]
（[1]大阪公立大学大学院獣医学研究科，[2]北海道立総合研究機構酪農試験場）…… 165
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（Ⅲ）
…… 日巻　武裕[1, 2]・美濃輪　駿斗[2]
（[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）…… 172
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―（Ⅲ）
…… 西村　　亮・菱沼　　貢（鳥取大学農学部共同獣医学科獣医繁殖学）…… 178
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？（Ⅱ）
…… 金澤　朋美・木崎　景一郎（岩手大学農学部共同獣医学科）…… 182
小胞体ストレス制御によるウシ体外生産胚の耐凍性向上に関する研究
…… 山　中　賢　一（佐賀大学農学部）…… 187
乳牛のルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響
…… 大滝　忠利[1]・閏間　英之[2]
（[1]日本大学生物資源科学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室，[2]静岡県畜産技術研究所）…… 192
豚胚品質の客観的評価法の確立に関する研究
…… 平山　祐理・江川　紗智子（独立行政法人家畜改良センター）…… 199
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（Ⅱ）
…… 山口　昇一郎・藤井　英之・成瀬　講平[1]・山田　　豊[1]・太田　　剛
（福岡県農林業総合試験場，[1]油化産業株式会社）…… 205
排卵後早期の卵巣形態と性ステロイドホルモンバランスがウシ子宮の免疫機能に及ぼす影響
…… 松　井　基　純（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 211
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（Ⅱ）
…… 鍋　西　　久（北里大学獣医学部）…… 217
南西諸島地域における肉用ヤギの消化管内部寄生線虫感染症に関する実態調査
…… 波　平　知　之（琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター）…… 224
遺伝性心筋症による豚の突然死の病態解明と生前検査法の確立
…… 相原　尚之・志賀　崇徳（麻布大学獣医学部）…… 230
牛伝染性リンパ腫ウイルス由来の非翻訳性 RNA と結合する宿主たんぱく質の同定（Ⅲ）
…… 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）…… 237
豚熱ウイルス受容体候補タンパク質の網羅的探索
…… 池田　圭吾・岩丸　祥史
（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）…… 243

© The Ito Foundation

Clostridium novyi sensu lato の新しい鑑別法の開発へ向けた国内家畜由来株のゲノム解析
…… 髙松　大輔・馬田　貴史
（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）…… 249

ブタ呼吸器複合感染症の原因ウイルスを解析する新たな *in vitro* モデルの確立
…… 宮澤　光太郎・熊谷　飛鳥
（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）…… 256

牛呼吸器病症候群（BRDC）の悪化におけるバイオフィルム形成の関与
…… 帆　保　誠　二（鹿児島大学共同獣医学部）…… 263

畜産農場に生息するハツカネズミの免疫関連遺伝子の多様性と病原体媒介能力
…… 高島　康弘・ニコライ　シャマエフ（岐阜大学応用生物科学部）…… 269

牛マイコプラズマによる気管傷害と細胞内侵入過程の解明
…… 平　野　佑　気（（地独）北海道立総合研究機構畜産試験場）…… 274

黒毛和種牛における血液中のビタミン D の状況把握と牛におけるビタミン D の
免疫賦活作用および抗炎症作用の検討
…… 乙丸　孝之介[1]・津川　尚子[2]・井尻　　萌[1]
（[1]鹿児島大学共同獣医学部，[2]大阪樟蔭女子大学健康栄養学部）…… 280

牛呼吸器病ウイルスの鼻咽頭関連リンパ組織におけるウイルス増殖と病態解析
…… 平　井　卓　哉（宮崎大学農学部）…… 286

イノシシにおける豚コロナウイルスの感染実態調査（Ⅱ）
…… 中　川　敬　介（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）…… 293

ウシ RS ウイルス研究に最適な細胞株の樹立
…… 齊　藤　　暁（宮崎大学農学部）…… 299

ライフサイクルに応じたパイエル板の機能解明と制御因子の探索
…… 古川　睦実・野地　智法（東北大学大学院農学研究科）…… 304

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（Ⅱ）
…… 岡　村　雅　史（帯広畜産大学獣医学研究部門）…… 308

地方病性牛伝染リンパ腫発症牛におけるゲノムワイドな DNA メチル化解析
…… 前　澤　誠　希（東京大学大学院農学生命科学研究科）…… 315

ブタにおける医薬品の適正使用に向けた薬物代謝酵素の解析
…… 宇野　泰広[1]・山崎　浩史[2]（[1]鹿児島大学共同獣医学部，[2]昭和薬科大学薬学部）…… 320

飼料費低減に向けた低硝酸態窒素と高粗タンパク質を両立する夏季牧草の窒素管理技術
…… 林　　征幸・金子　　真
（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）…… 327

筋肉タンパク質合成・分解を制御する植物性成分による畜肉生産の向上研究
…… 佐　藤　隆一郎（東京大学大学院農学生命科学研究科）…… 335

© 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（Ⅱ）
…… 津　上　優　作（広島大学大学院統合生命科学研究科）…… 341
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（Ⅱ）
…… 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九州沖縄農業研究センター）…… 347
骨格筋の成長と炎症予防（抑制）を目的としたPGC-1αアイソフォームの発現制御に関する研究
…… 實安　隆興[1]・西本　和樹[2]（[1]神戸大学大学院農学研究科，[2]神戸大学農学部）…… 353
畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析
…… 吉　田　悠　太（茨城大学農学部食生命科学科）…… 359
衛星コンステレーション画像の時系列深層学習による低コストな飼料用トウモロコシ収量予測手法の開発
…… 小花和　宏之・根本　英子
（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）…… 364
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（Ⅲ）
…… 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）…… 370
暖地で冬期に高品質な粗飼料を生産するイタリアンライグラス夏播き栽培技術の開発
…… 加藤　直樹・望月　賢太
（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）…… 377
和牛向け稲発酵粗飼料および発酵完全混合飼料を厳冬期でも高品質調製するための新規乳酸菌の添加効果の検証
…… 遠野　雅徳[1]・西川　明宏[2]・福馬　敬紘[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]広島県立総合技術研究所畜産技術センター）…… 383
生時低体重でも生後発育回復できる子豚は何が違うのか？ー血液指標の探索ー
…… 中島　郁世・谷口　雅章・芦原　　茜・渡邊　源哉・本山　三知代・佐々木　啓介
（国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構畜産研究部門）…… 392
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（Ⅱ）
…… 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）…… 397
ニワトリヒナに備わる抗炎症能力の解明～抗酸化能に注目して～
…… 橘　　哲也・牧野　良輔（愛媛大学大学院農学研究科）…… 404
沖縄アグー豚育成豚における飼料中のタンパク質水準の違いが増体および背脂肪厚の発達に及ぼす影響
…… 普照　恭多[1]・伊村　嘉美[2]
（[1]沖縄県農林水産部畜産研究センター，[2]琉球大学農学部亜熱帯地域農学科）…… 411

© 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（Ⅱ）
…… 深澤　充・盧　尚健（東北大学大学院農学研究科）…… 418
暑熱ストレス下におけるニワトリ筋タンパク質分解に対するL-シトルリンの新規機能の解明
…… スルチョードリ　ビシュワジット（九州大学基幹教育院）…… 424
子牛における乳糖不耐症に関する研究
…… 福森　理加（酪農学園大学獣医学群）…… 430
暖地型牧草・芝草におけるゲノム編集による冬期常緑性新規育種素材の開発
…… 権　藤　崇　裕（宮崎大学フロンティア科学総合研究センター）…… 441
南九州における暖地型牧草の新規調製“霜熟”の開発
―晩夏播きパールミレット霜枯れ草の収量，サイレージ品質と選好性―
…… 石井　康之・石垣　元気・井戸田　幸子（宮崎大学農学部）…… 449
高品質な豚肉生産のためのエゴマ搾り粕の利用に関する研究
…… 田島　茂行・内倉　健造・長江　杏介・豊島　浩一（愛知県農業総合試験場）…… 455
ルーメン細菌叢制御を目指した子ウシ唾液抗体の分泌機能の解明
…… 鈴　木　裕（北海道大学大学院農学研究院）…… 461
多機能性因子の合成を介した筋衛星細胞による自律的な筋肥大誘導機構の解釈を利用した
新プラットフォームの形成
…… 鈴木　貴弘・前野　岳大・今給黎　耀・川崎　佑華・中田　后紀・
室田　大輝・中村　真子・辰巳　隆一（九州大学大学院農学研究院）…… 467
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（電気通信大学大学院情報理工学研究科）…… 475
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獣医学科）…… 482
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[1]・鎌田　洋一[2]・中曽　譲[3]・彦野　弘一[4]・峯岸　恭孝[5]
（[1]岩手大学農学部共同獣医学科，[2]千里金蘭大学，
[3]株式会社ファスマック，[4]帝京科学大学，[5]株式会社ニッポンジーン）…… 487
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[1]・川田　逸人[1]・小田　憲司[2]
（[1]北里大学医学部，[2]一般社団法人生物科学安全研究所）…… 495
反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索（Ⅲ）
…… 青山　真人[1]・蕪山　由己人[2]
（[1]宇都宮大学農学部生物資源科学科，[2]宇都宮大学農学部応用生命化学科）…… 502

© The Ito Foundation

CONTENTS

Study on the heat hardening characteristics of seasoned meat by microwave cooking and its texture

Toshio Kawano

(Natural Science Cluster, Kochi University) ····· 3

Development of preparation method for pork meat broth by enzymatic hydrolysis under pressurized CO_2 environment

Seiji Noma

(Faculty of Agriculture, Saga University) ····· 9

Studies on the formation of ZnPP by edible *Staphylococcus* and their color improving effects of meat products

Jun-ichi Wakamatsu

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) ····· 13

Does the supplementation of carnosine at concentrations that can vary in vivo improve the odor of chicken?

Genya Watanabe, Shota Ishida, Karin Akada, Michiyo Motoyama, Ikuyo Nakajima and Keisuke Sasaki

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 19

Development of cultured meat technology to solve the problems in industrial livestock production

Daiji Okamura

(Graduate School of Agriculture, Kindai University) ····· 24

Studies on physiological characteristics of fungi isolated from dry aged beef and its utilization

Mai Nakagawa, Haruna Komuro, Yoshito Nakashima, Yumi Inoguchi and Kosuke Takatori*

(Japan Meat Science & Technology Institute, *Center for Fungal Consultation Japan) ····· 29

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

Toshihide Nishimura and Chisato Yamaguchi

(Faculty of Nutrition Science, Kagawa Nutrition University) ····· 35

Analysis of the enzymatic reaction system of lipid oxidase involved in the improvements of aroma characteristics of Japanese Black cattle beef

Shuji Ueda

(Graduate School of Agricultural Science, Kobe University) ····· 43

© The Ito Foundation

Tensile strength of regenerative medicine components created from livestock by-products

Hideki Kanda

(Graduate School of Engineering, Nagoya University) ····· 50

Nutritional function of meat hydrolysates (Ⅱ)

Shinichi Takenoyama, Kumiko Kawakita and Michio Muguruma

(Faculty of Health and Nutrition, Minami Kyushu University) ····· 57

Analysis of volatile components that form the scent of male pigs and identification of terms that describe them

Satoshi Kawahara

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 67

Studies on phage sensitivity improvement and superphage construction

Takahisa Miyamoto

(Faculty of Agriculture, Kyushu University) ····· 73

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

Kenzo Yamaguchi

(Institute of Post-LED Photonics, Tokushima University) ····· 80

Evaluation of the effect of high-oxygen modified atmosphere packaging on the survival of food poisoning bacteria

Ayaka Okada

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 86

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

Tatsuya Furuichi

(Laboratory of Laboratory Animal Science and Medicine, Co-Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) ····· 91

Genetic factor associated with calf mortality with preterm birth (Ⅱ)

Takashi Hirano[1], Masaki Ozawa[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) ····· 98

Evaluation of genetic diversity in a highly inbred Jinhua pig population

Satoko Enya, Masayoshi Otake and Kei Terada

(Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry Swine & Poultry Research Center) ···· 105

© The Ito Foundation

A new method for aggregated breeding value considering causal structure
Toshihiro Okamura
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 111

Establishment of breeding improvement method for "sweet smell" in Japanese Black beef (II)
[1]Noriaki Shoji and [2]Yoshinobu Uemoto
([1]Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 116

Establishment of genetic control method and pathophysiological analysis of newly discovered muscular dystrophy in Japanese Black cattle
Masahiro Yasuda[1, 2]
([1]Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki, [2]Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 123

The study of polymorphism in the chicken CCKAR and HSP70 gene associated with thermotolerance
Eriko Fukuhara, Tatsuya Hirakawa and Miyuki Mori
(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center) ····· 127

Research for objective evaluation of fore rib conformation of Japanese Beef Cattle (Ⅱ)
Hiromi Suzuki
(Hokkaido Research Organization, Animal Research Center) ····· 132

Prediction of foaling in heavy horses using multifunctional tail sensors
Takahiro Aoki[1], Koji Yoshioka[2] and Shogo Higaki[3]
([1]Research Center for Global Agromedicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [2]Azabu University, [3]National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization) ····· 138

Effects of nutritional environment during nursing period on reproductive function
Hideyuki Takahashi
(Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University) ····· 144

Elucidation of mechanisms for silent heat from luteal regression in Japanese Black Cows (II)
Takuo Hojo and Kei Horihata
(Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO) 149

Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility (Ⅲ)
Kaiyu Kubota, Masafumi Miwa and Miki Sakatani
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 154

Developing new method of conservation of poultry genetic resources using gonadal primordial germ cells (Ⅱ)
Yuki Nakajima
(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 159

© The Ito Foundation

The mechanism for keeping the ovarian reserve level during the pregnancy period in Holstein cows

Keisuke Koyama[1] and Tomoaki Kubo[2]

([1]Graduate school of veterinary science, Osaka Metropolitan University, [2]Dairy research center, Hokkaido research organization) ····· 165

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

Takehiro Himaki[1, 2] and Hayato Minowa[2]

([1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, [2]Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu University) ····· 172

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

Ryo Nishimura and Mitsugu Hishinuma

(Laboratory of Theriogenology, Joint Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Tottori University) ····· 178

Is bovine blood flow involved in the local regulation of endometrial functions? (Ⅱ)

Tomomi Kanazawa and Keiichiro Kizaki

(Cooperative Department of Veterinary Medicine, Faculty of Agriculture, Iwate University) ····· 182

Study on improvement of cryo-tolerance by controlling endoplasmic reticulum stress in bovine embryos produced *in vitro*

Ken-ichi Yamanaka

(Faculty of Agriculture, Saga University) ····· 187

Effect of intraruminal environment in dairy cows on reproductive function through liver inflammation

Tadatoshi Ohtaki[1] and Hideyuki Uruma[2]

([1]Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Shizuoka Prefectural Research Institute) ····· 192

Research on establishment of evaluation method for porcine embryo quality

Yuri Hirayama and Sachiko Egawa

(National Livestock Breeding Center) ····· 199

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

Shoichiro Yamaguchi, Hideyuki Fujii, Kohei Naruse[1], Yutaka Yamada[1] and Takeshi Ohta

(Fukuoka Agricultural Research Center, [1]Yuka Sangyo Co., Ltd.) ····· 205

© The Ito Foundation

Effects of ovarian morphology and sex steroid hormone balance during early stage after ovulation on bovine uterine immune function

Motozumi Matsui

(Department of Veterinary Medicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) … 211

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

Hisashi Nabenishi

(Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University) …… 217

Investigation of gastrointestinal parasites infection of meat goats in south-western islands, Japan

Tomoyuki Namihira

(Subtropical Field Science Center, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus) …… 224

Pathogenesis of sudden death in pigs due to genetic cardiomyopathy and establishment of antemortem diagnostic method

Naoyuki Aihara and Takanori Shiga

(School of Veterinary Medicine, Azabu University) …… 230

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

Kiyohiko Andoh

(National Institute of Animal Health, NARO) …… 237

Comprehensive analysis of candidate receptors for Classical Swine Fever virus

Keigo Ikeda and Yoshifumi Iwamaru

(National Institute of Animal Health, NARO) …… 243

Genome analysis of *Clostridium novyi sensu lato* strains isolated from livestock in Japan for development of novel identification methods

Daisuke Takamatsu and Takashi Mada

(National Institute of Animal Health, NARO) …… 249

Establishment of a novel *in vitro* model for investigating viruses associated with the porcine respiratory disease complex (PRDC)

Kohtaro Miyazawa and Asuka Kumagai

(National Institute of Animal Health, NARO) …… 256

Involvement of biofilm formation in exacerbation of bovine respiratory disease syndrome (BRDC)

Seiji Hobo

(Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University) …… 263

© The Ito Foundation

Diversity of immune-related genes and pathogen vector capacity in wild mice inhabiting livestock farms

Yasuhiro Takashima and Nikolai Shamaev

(Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ····· 269

Tracheal injury and intracellular invasion process by bovine Mycoplasma

Yuki Hirano

(Animal Research Center, Hokkaido Research Organization) ····· 274

Understanding the status of vitamin D in blood in Japanese Black cattle, the effects of vitamin D on the immunostimulatory and anti-inflammatory in cattle

Konosuke Otomaru[1], Naoko Tsugawa[2] and Moe Ijiri[1]

([1]Kagoshima University, Joint Faculty of Veterinary Medicine, [2]Osaka Shoin Women's University, Department of Health and Nutrition) ····· 280

Pathological analysis and replication of bovine respiratory viruses in nasopharyngeal-associated lymphoid tissue

Takuya Hirai

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 286

Epidemiological survey of porcine coronavirus-infection in Japanese wild boars (Ⅱ)

Keisuke Nakagawa

(Joint Department of Veterinary Medicine Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University) ··· 293

Generation of a cell line suitable for research of bovine RS virus

Akatsuki Saito

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) ····· 299

Investigation of Peyer's patch function according to life cycle and exploration of its regular

Mutsumi Furukawa and Tomonori Nochi

(Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 304

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

Masashi Okamura

(Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine) ····· 308

Genome wide analysis of DNA methylation states in cattle with enzootic bovine luekosis

Masaki Maezawa

(Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) ····· 315

Analysis of drug-metabolizing enzymes toward appropriate use of drug in pigs

Yasuhiro Uno[1] and Hiroshi Yamazaki[2]

([1]Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University, [2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa Pharmaceutical University) ····· 320

© The Ito Foundation

Nitrogen management technology for an annual summer grass that achieves both low nitrate nitrogen and high crude protein to reduce feed costs

Masayuki Hayashi and Makoto Kaneko

(Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO) ····· 327

Studies on increased livestock production through regulation of protein synthesis and degradation by plant factors

Ryuichiro Sato

(Graduate Scholl of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo) ····· 335

Efficient fattening by improving maternal milk production (Ⅱ)

Yusaku Tsugami

(Graduate School of Integrated Sciences for Life, Hiroshima University) ····· 341

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

Kentaro Ikeda

(Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO) ····· 347

Study on regulation of PGC-1α isoforms expression for skeletal muscle growth and inflammation inhibition/prevention

Takaoki Saneyasu[1] and Kazuki Nishimoto[2]

([1]Graduate school of Agricultural Science, Kobe University,

[2]Faculty of Agriculture, Kobe University) ····· 353

A study on fatty acid taste sensing in livestock animals

Yuta Yoshida

(Department of Food and Life Sciences, College of Agriculture, Ibaraki University) ····· 359

Development of low-cost yield prediction method in corn by time-series deep learning of satellite constellation images

Hiroyuki Obanawa and Eiko Nemoto

(Hokkaido Agricultural Research Center, NARO) ····· 364

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

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

([1]Food Research Institute, [2]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 370

Establishment of Italian ryegrass summer sowing cultivation which produces high-quality forage in winter in warm regions Japan

Naoki Kato and Kenta Mochizuki

(Kyushu-Okinawa Agricultural Research Center, NARO) ····· 377

© The Ito Foundation

Validation of effects of novel lactic acid bacteria additives on winter-preparation of well-fermented rice whole crop silages and total mixed rations for Japanese beef cattle

Masanori Tohno[1], Akihiro Nishikawa[2] and Takahiro Fukuma[2]

([1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Livestock Technology Research Center, Hiroshima Prefectural Technology Research Institute) ····· 383

What makes low birth weight piglets recover their growth after birth? －Blood profiles－

Ikuyo Nakajima, Masaaki Taniguchi, Akane Ashihara, Genya Watanabe, Michiyo Motoyama and Keisuke Sasaki

(Institute of Livestock and Grassland Science, NARO) ····· 392

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

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

([1]Institute of Livestock and Grassland Science, NARO, [2]Kyusyu University) ····· 397

Studies on unique anti-inflammatory ability of chickens : role of anti-oxidant ability

Tetsuya Tachibana and Ryosuke Makino

(Graduate School of Agriculture, Ehime University) ····· 404

Effects of diets with different CP levels on body weight gain, back fat thickness in Okinawa Agu feeder pigs

Kyota Fusho[1] and Yoshimi Imura[2]

([1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center, [2]University of the Ryukyus, Faculty of Agriculture, Department of Subtropical Agro-Production Sciences) ····· 411

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

Michiru Fukasawa and Sanggun Roh

(Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University) ····· 418

Elucidation of the novel function of L-citrulline to protect muscle protein breakdown under heat stress

Sur Chowdhury Vishwajit

(Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University) ····· 424

The study on lactose intolerance in calves

Rika Fukumori

(School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University) ····· 430

Development of new breeding materials for winter evergreen by genome editing in warm-season forage and turf grasses

Takahiro Gondo

(Frontier Science Research Center, University of Miyazaki) ····· 441

© The Ito Foundation

Frost-matured silage-processing of tropical grasses in southern Kyushu -Yield, silage quality and preference of late-summer sown pearl millet foggage-

Yasuyuki Ishii, Genki Ishigaki and Sachiko Idota

(Faculty of Agriculture, University of Miyazaki) 449

The study of utilizing perilla meal (*Perilla frutescens*) for producing high quality pork

Shigeyuki Tajima, Kenzo Uchikura, Kosuke Nagae and Koichi Toyoshima

(Aichi Agricultural Research Center) 455

Capacity of salivary immunoglobulin secretion and its development associated with the growth of calves

Yutaka Suzuki

(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University) 461

The novel platform for the autonomous regulatory system of myogenic hypertrophy by multi-functional modulators synthesized in satellite cells

Takahiro Suzuki, Takahiro Maeno, Hikaru Imakyure, Yuka Kawasaki, Minori Nakada, Daiki Murota, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi

(Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Kyushu University) 467

Meat quality evaluation based on complex dielectric response

Dairoku Muramatsu

(Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications) 475

Development of plasma technology for degrading and inactivating the causative agents of foodborne disease

Akikazu Sakudo

(School of Veterinary Medicine, Okayama University of Science) 482

Development of rapid detection methods for game meat hygiene

Akiko Yamazaki[1], Yoichi Kamata[2], Yuzuru Nakaso[3], Koichi Hikono[4] and Yasutaka Minegishi[5]

([1]Cooperative Department of Veterinary Medicine, Iwate University, [2]Senri Kinran University, [3]Fasmac Co., Ltd., [4]Teikyo University of Science, [5]NIPPON GENE Co., Ltd.) 487

Construction of a protective system against poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, for the improvement and development of the poultry industry

Naotoshi Tsuji[1], Hayato Kawada[1] and Kenji Oda[2]

([1]Kitasato University School of Medicine, [2]Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology (RIAS)) 495

Investigation of the physiological markers indicating 'nausea' in domestic ruminants (Ⅲ)

Masato Aoyama[1] and Yukihito Kabuyama[2]

([1]Department of Agrobiology and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, [2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University) 502

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

目　　次

山　田　知　哉（農研機構西日本農業研究センター　上級研究員）
肥育牛におけるアディポジェネシス制御機構の解明に関する研究 …… 515

鍋　西　　久（北里大学獣医学部動物資源科学科　准教授）
家畜に及ぼす熱環境の影響評価と
対策技術の開発ならびに畜産分野への ICT 導入に関する研究 …… 516

竹之山　愼　一（南九州大学健康栄養学部　教授）
機能性に基づいた食肉の付加価値向上および持続可能な食肉生産に関する研究 …….. 517

© The Ito Foundation

学会等事業助成

目　　次

令和４年度学会等事業助成実施報告書
市民公開講座『ジビエにおける食品衛生上の問題点―寄生虫汚染を中心に―』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）…… 521

日本食肉科学会　令和４年度事業助成実施報告
日本食肉科学会　　前理事長　坂田亮一（麻布大学名誉教授・明治大学客員研究員）…… 525

令和４年度事業実施報告書
日本畜産学会第 130 回大会 公開シンポジウム「未来をになう Animal Science の発展と展開」
公益社団法人日本畜産学会　　理事長　小澤壯行（日本獣医生命科学大学）…… 529

獣医学教育シンポジウム
〈獣医学教育環境の更なる整備充実に向けて〉に関する開催報告
非営利活動法人獣医系大学間獣医学教育支援機構　　理事長　髙井伸二 …… 531

© The Ito Foundation

研究助成事業

© The Ito Foundation

調味液浸透肉の電子レンジ加熱硬化特性とその食感品質に関する研究

Study on the heat hardening characteristics of seasoned meat by microwave cooking and its texture

河　野　俊　夫
（高知大学教育研究部自然科学系農学部門）

Toshio Kawano
（Natural Science Cluster, Kochi University）

Aiming to improve the elastic quality of seasoned chicken after microwave heating, we investigated a new quality prediction model that combines optical sensing technology and a mathematical model. The thermal properties of raw chicken and seasoning-soaked chicken were measured using DSC, and their specific heats and two endothermic peak temperatures were identified. The specific heat of raw chicken was 4.351 (J/g/K) at 40℃ to 4.436 (J/g/K) at 80℃ , and that of chicken immersed in the undiluted seasoning solution ranged from 3.985 to 4.069 (J/g/K). In addition, we measured the change in elasticity of the chicken meat sample with a microwave oven at 200 W using a rheometer, and obtained the temperature dependence equation of the compression energy E. Furthermore, we measured the near-infrared reflectance spectrum of the surface of chicken heated in a microwave oven and extracted wavenumbers suitable for monitoring changes in the composition near the surface by principal component analysis. Based on these results, we investigated two models for estimating the elastic properties of chicken samples after microwave heating. One of them is a model that numerically analyzes the heat conduction equation to find the temperature distribution and uses the relational expression between compression energy and temperature. Another model is a model that estimates compression energy using a neural network instead of a heat conduction equation. As a result of comparing the two estimation models, the estimation model using a neural network obtained better accuracy at present.

1．目　　的

電子レンジによる温めで，「できたてそのまま」の食感が味わえるチキンステーキのような肉加工品は，現代の働き世代にとっては，栄養価が高く短時間に摂食できる点で評価が高い。流通する電子レンジの多くは，加熱対象に合わせた調理プログラム（加熱プログラム）が用意されており，加熱対象の質量や温度，庫内温度などをもとにその加熱時間が制御されている。しかし，加熱対象の温度変化のみで肉加工品の仕上がりを判断すると，食品自体の温度は制御可能だが，電子レンジ加熱後の食感品質までは考慮されていないため，「全体的に熱は通ったが，弾力がなくなった」と

© The Ito Foundation

いう仕上がりになる場合も多い。

そこで本研究では，ステーキ風の味付けを調味液で行った鶏肉を電子レンジで加熱調理する場合の調理後の弾力品質を高めることを目的に，光センシングや数理モデルを組み合わせた新しい調理品質予測モデルについて検討した。

2．方　法

2.1　供試材料

実験に供試した鶏肉は「高知県産すだち鶏肉」である。まず試料鶏肉３ｇ～５ｇをとり，これを135℃－２時間常圧乾燥法[1)]を用いて含水率を測定した。供試鶏肉の含水率は乾量基準で平均353.8%,d.b.（湿量基準で77.9%,w.b.），標準偏差は15.6%,d.b.（同0.7%,w.b.）であった。また，鶏肉の調味液には市販のもの（キッコーマン，「てりやきのたれ」）を利用した。生の鶏肉のほか，調味液浸漬試料として，鶏肉を調味液の原液，水による２倍希釈液，同４倍希釈液でそれぞれ１日浸漬したものを用意した。

2.2　示差熱分析装置（DSC）による鶏肉および調味液浸漬鶏肉の熱特性の測定

生の鶏肉および調味液浸漬鶏肉（原液浸漬，２倍希釈液浸漬，４倍希釈液浸漬）の試料からそれぞれ30mg～40mg程度をとり，シールセルに封入して，示差熱分析装置（島津製作所，DSC-60 Plus）で熱特性を測定した。DSCによるイカと牛肉のタンパク質の熱特性の測定事例[2)]によると，タンパク質の熱変性温度をはっきりとさせるためには，昇温速度は５℃/min. 未満であるのがよいことが示唆されていたことから，本研究では，DSC測定の際の昇温速度は３℃/min. とし，室温から80℃までの加熱過程での熱特性を測定した。参考値として，生鶏肉をフリーズドライした試料についてもDSCによる熱特性を測定した。

2.3　電子レンジ加熱による鶏肉試料の弾力変化測定

鶏肉試料（生鶏肉および調味液浸漬鶏肉）は約1.5cm角に裁断・成形した。質量後，試料は電子レンジを用いて200Wで加熱し，40℃から80℃までの各温度に到達した時点で取り出して，レオメーター（島津製作所，EZ-Test）上で，ディスク型プランジャー（押圧面直径８mm）による２回咀嚼試験を行った。電子レンジ内での鶏肉の温度測定は，供試試料の中央部に蛍光式ファイバーを挿入後，蛍光式ファイバー温度計（安立計器，FL-2000）で行った。咀嚼試験は，プランジャーの降下速度50mm/min.，深さ７mmまでの反力計測を２回の咀嚼往復運動で行った。

2.4　利用電子レンジの実質加熱W数の推定

生の鶏肉試料30個について，その質量を計測するとともに，電子レンジで常温から80℃まで200Wで加熱した場合の温度変化を，前出の蛍光式ファイバー温度計で計測し，比熱×質量×温度差で計算される熱量を所要時間で除して電子レンジの実質加熱W数を推定した。

2.5　電子レンジ加熱による表面成分変化の光モニタリング測定

電子レンジ加熱前後における表面近傍の成分変化を間接的に知る指標として，加熱前後の試料表面での近赤外反射スペクトルをNIR顕微分光計（本体：日本分光，FT/IR4100＋InGaAs型高感度検出器，顕微部：IRT-1000）で測定した。測定範囲は，波数10,000cm^{-1}～4,000cm^{-1}で，標準白板をバックグラウンドとした。

3．結果と考察

3.1　生鶏肉および調味液浸漬鶏肉の熱特性

Fig. 1 は，示差熱分析装置（DSC）を用いて，生の鶏肉，フリーズドライした鶏肉，および調味料原液，２倍希釈液，４倍希釈液に浸漬した鶏肉

© The Ito Foundation

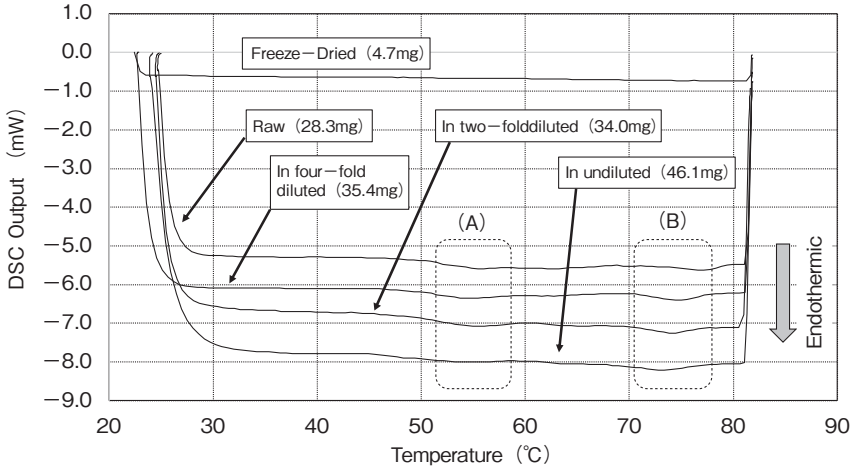

Fig. 1　Thermal properties of the samples measured with DSC

それぞれの40℃から80℃までの昇温時熱特性である。生の鶏肉，調味料に浸漬した鶏肉のいずれの試料についても，**Fig. 1** の（A）と（B）で示すとおり２点で吸熱ピークがあり，これが鶏肉タンパク質の熱変性域である。低温側の熱変性域（A）はCa.50.9℃から始まってCa.55℃でピークに達し，Ca.58.2℃で終了している。高温側の熱変性域（B）は，調味液浸漬の有無と調味液の濃度により変化があり，生の鶏肉ではタンパク質の熱変性ピーク温度がCa.77.3℃であるのに対して，調味液の濃度が濃くなるにしたがって熱変性のピーク温度は低温域へと下降し，原液ではCa.73.4℃と，生の鶏肉のそれに比較して3.9℃も低くなり，電子レンジ加熱においても，生肉よりも調味液浸漬試料のほうがより低温で肉質が白くなる観測結果と符合している。比熱を算出した結果，生鶏肉の比熱は40℃の4.351（J/g/K）から80℃の4.436（J/g/K），フリーズドライした鶏肉（乾物）が同2.217～2.269（J/g/K），調味料原液に浸漬した鶏肉は同3.985～4.069（J/g/K）であった。これは食肉比熱の測定事例[3)]の結果と同程度であった。

3.2　電子レンジ加熱による鶏肉試料の弾力変化

１回目と２回目の咀嚼圧縮エネルギー，弾力性，凝集性，咀嚼性，ガム性を示す指標が得られた。鶏肉の弾力品質を示すこれらの物理特性のうち，電子レンジ加熱による温度変化と相関性が高かったのは，咀嚼試験の第１ピーク面積から求められる圧縮エネルギー（記号Ｅとする）であった。**Fig. 2** は，生の鶏肉と原液浸漬鶏肉について，200Wで電子レンジ加熱し，各温度で取り出した試料の圧縮エネルギーＥを，そのときの温度に対してプロットしたものである。原液浸漬試料の50℃のみ，脂の多いサンプルによるイレギュラーな測定値の影響で平均値が外れているが，生の鶏肉も原液浸漬鶏肉のどちらも，圧縮エネルギーＥは，温度に比例して高くなる傾向を示した。温度測定は試料中心部であり全体平均の温度ではなく，中心と周辺とで温度が異なることから，ここで得た**Fig. 2** 中にある測定点を回帰した直線は，実際には温度の低い側へ平行移動したものになるものと推測する。

© The Ito Foundation

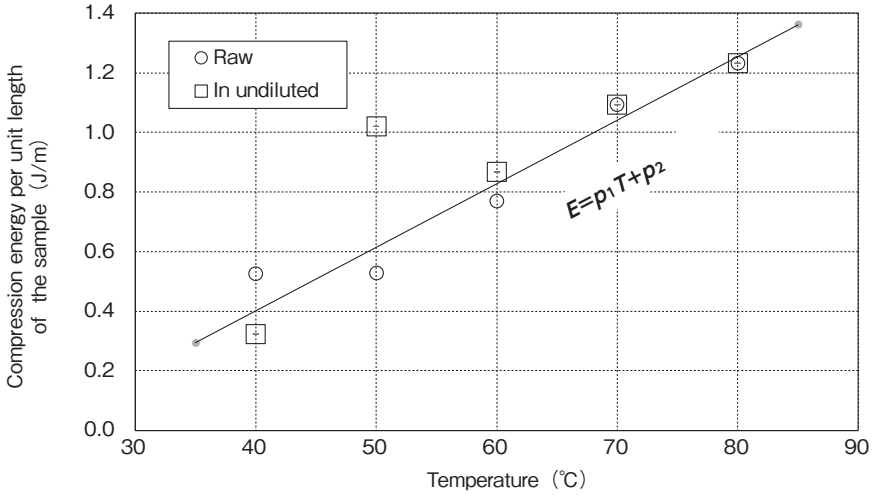

Fig. 2　Compression energy estimated from viscoelasticity test（Depth 7mm）

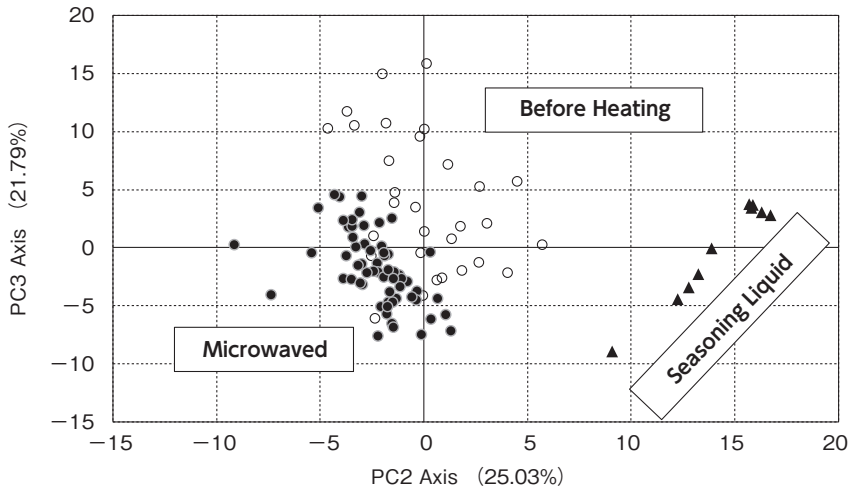

Fig. 3　PCA Scatter Plots of the samples on the PC1 vs PC3 plane

3.3　電子レンジ加熱による内成分変化の光モニタリング計測結果

Fig. 3 は，電子レンジ加熱前後の鶏肉試料表面，および調味液原液に対して測定した近赤外スペクトルを主成分分析（PCA）した結果のうち，分布傾向のはっきりした主成分第２軸と第３軸平面でのスペクトルデータの散布図である。解析にはVEKTOR DIREKTOR Ver.1.1（KAX Group, Australia）を用いた。加熱前の鶏肉試料は，調味液原液自体のスペクトルよりも鶏肉自体のスペクトルの影響が大きく，調味液の濃度によらず，どれも同じ集団（データ・クラウド）を形成した。一方，電子レンジ加熱後の試料は，タンパク質の熱変性を受けて異なる集団へと推移している。そこで，加熱前と加熱後とにスペクトルを分割し，それぞれについて改めて主成分分析して，加熱前と加熱後のスペクトルを特徴づける主成分軸を求め，それらの主成分軸を形成する波数のうち，その係数の絶対値が大きく，影響力のある波数として，加熱前の試料については6,025cm^{-1}と

© The Ito Foundation

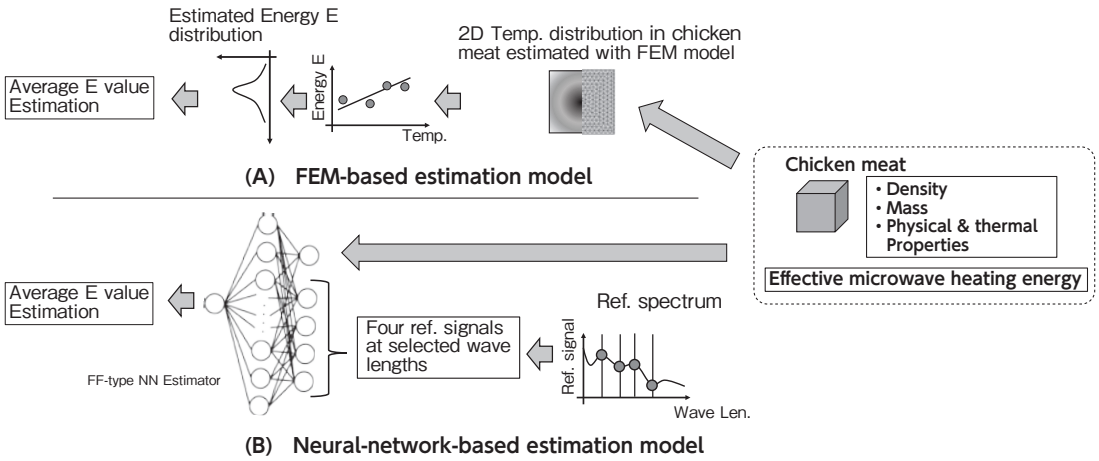

Fig. 4　Two types of trial estimation models for E values of chicken meat

7,066cm^{-1}，電子レンジ加熱後の試料については5,410cm^{-1}と7,341cm^{-1}を抽出し，次に述べる電子レンジ加熱後の鶏肉の弾力指標となる圧縮エネルギーを推定するモデルに用いることとした。

3.4　電子レンジ加熱後の弾力指標推定モデルの検討

電子レンジの実質的な投入加熱W数や鶏肉自体の物性などを条件に，加熱後の調味済み鶏肉の弾力指標としての圧縮エネルギーE（初回の咀嚼に要するエネルギー）を推定するモデルについて検討した。**Fig. 4** は，検討した二つの推定モデルの流れを示す模式図である。（A）は，鶏肉の比熱そのほかの物性をもとに，熱伝導方程式にもとづいて温度分布を有限要素法（FEM）によって推定し，その中心断面における温度分布から，圧縮エネルギーEの平均を推定するモデルである。断面２次元分布の計算には，汎用FEM計算ソフトのCOMSOL Ver.6.1を用いた。（B）は，熱伝導方程式を介せずに，前項で求めた①電子レンジ加熱の前後での表面成分の変化を特徴づける４波数での調味済み試料表面の反射スペクトルおよび鶏肉の物性と，②圧縮エネルギーとの組み合わせをフィードフォワード型ニューラルネットワークに学習させて平均の圧縮エネルギーEを推定する200 W加熱モデルである。モデル構築にはMATLABのDeep Learning Toolboxを用い，中間層のパーセプトロン数は入力端子の２倍，学習データは120組で，このうち40％を学習用，40％をモデル検証用，残り20％をモデル確認用のデータとし，組み合わせを順次変えて推定モデルの精度を確認した。

計算の結果，（A）のモデルよりも（B）のモデルのほうが良い推定精度を得た。実測に対するその相対誤差は42.7％であった。120組のデータによる巡回学習であることから，より多くの教師データを取得・学習させることで，さらに信頼性のある推定モデルになるものと考える。

4．要　　約

電子レンジ加熱後の調味済み鶏肉の弾力品質を向上させることを目的に，光センシング技術と数理モデルを組み合わせた新しい品質予測モデルについて検討した。生の鶏肉および調味液に浸漬した鶏肉の熱特性を，DSCを用いて測定し，それらの比熱と，二つの吸熱ピーク温度を同定した。生鶏肉の比熱は40℃の4.351（J/g/K）から80℃の

© The Ito Foundation

4.436（J/g/K），調味料原液に浸漬した鶏肉は3.985～4.069（J/g/K）であった。また，鶏肉試料を200Wで電子レンジ加熱した際の，試料の弾力変化をレオメーターによって測定し，圧縮エネルギーEの温度依存性を示す方程式を求めた。さらには，電子レンジで加熱した鶏肉表面の近赤外反射スペクトルを測定し，主成分分析によって，表面近傍の成分変化をモニタリングするのに適した波数を抽出した。これらの結果をもとに，電子レンジ加熱後の鶏肉試料の弾力特性を推定する二つのモデルを検討した。その一つは，熱伝導方程式を数値解析して温度分布を求め，圧縮エネルギーと温度との関係式を用いるモデル。もう一つのモデルは，熱伝導方程式ではなく，ニューラルネットワークを用いて圧縮エネルギーを推定するモデルである。二つの推定モデルを比較した結果，ニューラルネットワークを用いた推定モデルのほうが現時点では良い精度を得た。

文　献

1） 前田安彦，金子憲太郎，宇田靖：改訂　わかりやすい基礎食品分析法，アイ・ケイコーポレーション，p.39, 2006.
2） 山口達彦，赤﨑哲也，中村文雄：示差走査熱量分析計（DSC）による肉たんぱく質の熱変性の測定，関税中央分析所，第43号，p.5～p.8, 2003.
3） 宮原晃義，谷口慎，森地敏樹：食肉の比熱に及ぼす脂肪含量の影響，日本畜産学会誌，70(9)，J184-J188, 1999.

© The Ito Foundation

加圧CO_2環境下での酵素加水分解を利用したポークミートエキスの製造法の開発

Development of preparation method for pork meat broth by enzymatic hydrolysis under pressurized CO_2 environment

野　間　誠　司
（佐賀大学農学部）

Seiji Noma
(Faculty of Agriculture, Saga University)

Pork hydrolysate (PH) is frequently used to improve and enhance the flavor of processed foods including seasonings. Protease digestion of pork is one of its production methods, and it is superior method to control the flavor of PH. However, the enzymatic reaction temperature is suitable for microbial growth, resulting in spoilage if the degradation reaction takes a long time. The short reaction time gives peptides, causing bitterness. We applied a pressurized carbon dioxide (pCO_2) treatment for hydrolyzing pork meat with acid protease (AP). The pCO_2 treatment generates an acidic environment and it has bactericidal/bacteriostatic effects. Among the five commercial APs tested, Kokulase-P showed the highest activity under pCO_2, and hydrolysis of pork by Kokulase-P under pCO_2 occurred in a time-dependent manner. The total free amino acid content for pCO_2 PH was approximately 1.4 times higher than that for conventional PH. The water activity of PH prepared under conventional method, hydrolyzation under atmospheric pressure, was 0.96, while that under pCO_2 was 0.94. The number of mesophilic bacteria in the PH prepared under pCO_2 was approximately 1/10 of that prepared under atmospheric pressure. The lipids were dispersed in the meat fiber matrix as small droplets in both conventional and pCO_2 PH. However, in pCO_2 PH, a larger number of smaller lipid droplets were observed than in conventional PH. Both conventional and pCO_2 PHs had boiled pork-like odor, but a clear rancid odor (pungent odor) was observed in conventional PH. These results suggest that PH hydrolyzation by AP under pCO_2 is expected to be a new method for production of high-quality PH.

1．目　　的

豚肉エキスは，調味料をはじめとする加工食品の風味改善・増強に利用される。その製造法のひとつであるプロテアーゼ分解は，使用するプロテアーゼの作用様式や反応温度により風味を制御できる優れた方法である。しかし，酵素反応温度においては多くの微生物が増殖可能であるため，分解反応が長時間に及ぶと腐敗が生じる。一方で，短時間では分解され残ったペプチドによる苦味が生じる。したがって，腐敗なくアミノ酸濃度を向上可能なプロテアーゼ分解技術が望まれる。

© The Ito Foundation

著者は，課題の解決手段として「加圧二酸化炭素（pCO_2）下で酸性プロテアーゼ（AP）処理によって分解する技術」を考案した。豚肉を浸漬したAP溶液にCO_2を加圧溶解すると一時的に酸性（最大でpH3.2まで低下）・嫌気環境が生じるため，微生物の殺菌や増殖抑制が可能である。またAPの使用により，pCO_2下の酸性条件下で加水分解が進む。同時に，豚肉に多く含まれる不飽和脂肪酸の酸化も抑制できる。さらに，アミノ酸と相加・相乗的にうま味を担うイノシン酸（IMP）の分解抑制も期待できる。

CO_2は安全かつ安価な食品添加物であるが，現在の用途は超臨界CO_2を溶媒とした抽出や炭酸飲料の製造に限られる。これらは，CO_2の官能特性変化，超臨界流体の特徴的な物質溶解性を利用しており，いずれも一時的酸性化作用の利用を志向してはいない。また，食品以外の分野では，超臨界クロマトグラフィーや抽出，植物工場での生育促進，炭酸ガスレーザー等に使用されているが，これらもまた酸性化作用を活用したものではない。本研究では，これまでほとんど着目されていない「pCO_2の一時的な酸性化・嫌気化作用」を利用する。これらの一時的作用は，中和処理工程を要しないため，酵素反応プロセスのグリーン化に寄与するとともに，水分活性などの調整次第で，使用するAPの除去や失活処理を行わなくても十分な製品安定性を示す「熱履歴の少ない」新しい肉エキス製品の開発を期待させる。

本研究では，pCO_2下でのAP分解を基盤とする高アミノ酸濃度・高品質ポークミートエキス製造技術の開発を目指し，pCO_2下でのAP分解によるエキスの調製を行った。

2．方　法

2.1　酸性プロテアーゼ（AP）の選抜

APとしてスミチームAP（新日本化学工業株式会社），コクラーゼ－P（三菱ケミカル株式会社），プロテアーゼYP-SS（ヤクルト薬品工業株式会社），パンチダーゼNP-2（ヤクルト薬品工業株式会社），オリエンターゼAY（エイチビィアイ株式会社）を使用した。基質として，ブレンダー（ブレンダープロ，ラボネクスト）によりミンチにした市販の豚コマ切れ肉を使用した。大気圧下での反応においては，APを0.1％含むMcIlvaine緩衝液（pH3.5）と基質を１：１で混合した。pCO_2処理下での反応においては，APを0.1％含む脱イオン水と基質を１：１で混合した。これらを45℃，１時間反応させた。沸騰水中で加熱後，エタノールを添加しタンパク質を除去した上清についてホルモール態窒素量を調べることで加水分解の程度を評価した。

2.2　pCO_2処理

耐圧容器に試料を入れ，CO_2をボンベ圧を利用して加圧導入した。処理圧力は１，３，５MPaとした。

2.3　水分活性の測定

pCO_2処理（１，３，５MPa，45℃，24時間）および大気圧下（45℃，24時間）で調製した肉エキスを粗ろ過後，水分活性を測定した（MD-AW1，アズワン）。

2.4　中温細菌数評価

調製した肉エキスを粗ろ過後，0.85％ NaCl溶液で段階希釈し，Tryptic soy agarに塗布した。30℃，48時間培養後，生じたコロニー数に希釈倍率を乗じたものを中温細菌数（CFU/ml）とした。

2.5　脂質の存在状態の観察

調製した肉エキスをナイルレッドで染色し，LASX CM電動顕微鏡（Leica）で観察することで脂質の存在状態を調べた。

2.6　ATP分解物，アミン類，遊離アミノ酸分析

ATP分解物は，肉エキスから脱脂・除タンパ

© The Ito Foundation

ク質，HPLCにて分析した。カラムにはInert Sustain AQ-C18（ジーエルサイエンス，東京），溶離液として50mM K_2HPO_4（pH7.0）を用い，流速1.0ml/min，40℃でイソクラテック分離を行い，260nmで検出した。

アミン類および遊離アミノ酸分析は，既報の方法にしたがって行った[1)]。

3．結果と考察

一般に酵素はpCO_2耐性が微生物よりも高く，容易には失活しないものもある[2)]。過去の研究の多くで失活には超臨界状態のCO_2が必要であることが報告されている。したがって，pCO_2下で酵素分解を行うことが可能であると期待される。まず，使用する酸性プロテアーゼを選択するために大気圧下で各プロテアーゼによる豚コマ切れ肉の加水分解を行い，ホルモール態窒素を求めて活性を比較した。活性の高さは同じ重量％濃度において，オリエンターゼAY＞プロテアーゼYP-SS＞コクラーゼＰ＞スミチームAP＞パンチダーゼNP-2の順になった。これらの中から，活性が高かった３種類を選抜し，１，３，５MPaのpCO_2下での活性を同様に調べた。その結果，大気圧下とは異なり，活性はコクラーゼＰ＞オリエンターゼAY＞プロテアーゼYP-SSの順となった。このとき，コクラーゼＰの活性は大気圧下の半分程度に低下していたが，オリエンターゼAYやプロテアーゼYP-SSはいずれも10％程度まで低下していた。したがって，使用した酵素はいずれもpCO_2処理に対して安定性が高いとは言えなかったが，コクラーゼＰの活性が最も残存した結果，pCO_2下での活性が高い結果になったと推察される。pCO_2下でのコクラーゼＰによる加水分解は８時間から24時間まで時間の延長に伴い増加したが，８-16時間と比較して，16-24時間の加水分解率の増加の程度は小さく，24時間前後で加水分解がおおむね終了していると推察された。以上の結果より，使用酵素をコクラーゼＰとし，pCO_2下での豚コマ切れ肉の加水分解特性を，従来法（大気圧下での加水分解）と比較した。

まず，調製後の加水分解物をろ過した後（肉エキス），収量を調べた結果，pCO_2，大気圧のいずれも62-66ml程度であり，両者間に顕著な違いは認められなかった。したがって，加水分解によるタンパク質の可溶化の程度は類似していると推察された。次に肉エキスの水分活性を測定した結果，従来法肉エキスでは0.96，pCO_2肉エキスでは0.94であった。この結果は，pCO_2下ではタンパク質の低分子化が進んでいることを示唆している。pCO_2肉エキス総遊離アミノ酸量は従来法エキスの約1.4倍であった。水分活性は細菌の増殖の可否に関係する。水分活性0.96以上では代表的な食品関連細菌はほぼ増殖可能であるが，0.94ではその種類はある程度限られる[3)]。したがって，pCO_2では従来法と比較して細菌の増殖が一定程度抑制されると推察された。実際に，調製した肉エキス中の中温細菌数を調べた結果，pCO_2肉エキス中では従来法肉エキス中の1/10程度であった。過去の研究において，pCO_2下では，CO_2分子が細菌細胞内に入り，細胞内で解離してプロトンを生じ，細胞内を酸性化することで殺菌／静菌効果を発揮することが示されている[4)]。この現象もまた，pCO_2下での中温細菌数の減少に寄与していたと推察される。

ATPは豚をと殺後，速やかに分解されるが，その分解中間生成物にイノシン酸がある。イノシン酸はそれ自体でも旨味を有しているが，グルタミン酸と共存するとそれぞれ単独の場合と比較して旨味が最大７倍に増加することが明らかになっている。そこでATP分解物を定量した。しかし，いずれもヒポキサンチンまで分解されていた。イノシン酸はと殺１日後に最大値を示し，その後減

© The Ito Foundation

少すると報告されている[5)]。また，一般的に，豚がと殺されてから市場に出回るまで３－５日とされている。今後，と殺後まもない豚肉を使用してpCO_2下でイノシン酸が残存しやすいのかを判断する必要がある。

pCO_2下，従来法で肉エキス中の脂質をナイルレッドで染色し，顕微鏡で観察した。いずれのエキスにおいても，脂質は小滴となって肉繊維のマトリックス内に散開していることが明らかになった。しかし，pCO_2肉エキスでは，従来法肉エキスと比較してサイズの小さい脂質小滴がより多く観察された。理由として，pCO_2処理後の除圧時にCO_2ガスとともに脂質の一部が除かれた，pCO_2処理中に溶解せずにガスとして存在したCO_2が作り出す微小な疎水性領域に脂質が存在したなどの可能性が考えられるが，今後，分析を行う必要がある。

最後に，調製した肉エキスのにおいの印象を評価した。その結果，いずれも豚肉を茹でたにおいがしたが，大気圧では明確な酸敗臭（刺激臭）が認められた。pCO_2エキスでも弱いながら酸敗臭（刺激臭）がしたが，処理圧力の上昇に伴って弱くなった。これらの結果から，pCO_2下では脂質の酸化が低減すると考えられた。

４．要　約

本研究では，pCO_2下でのAP処理による豚コマ切れ肉エキスの調製を試みた。その結果，中温細菌数が少なく，酸敗臭が抑制され，総遊離アミノ酸量が約1.4倍に増加したエキスを調製できた。今後，使用する材料の鮮度の検討，塩酸分解により調製した肉エキスとの比較などを行い，より実用的な技術に近づけていく必要がある。

謝　辞

本研究の遂行にあたり，多大なご支援をいただきました公益財団法人伊藤記念財団様に深謝いたします。プロテアーゼのサンプルをご恵与いただきました新日本化学工業株式会社様，三菱ケミカル株式会社様，ヤクルト薬品工業株式会社様，エイチビィアイ株式会社様に心よりお礼申し上げます。顕微鏡観察は佐賀大学総合分析実験センターにて実施しました。感謝申し上げます。

文　献

1）　Noma, S., Koyanagi, L., Kawano, S., Hayashi, N.：*Food Science and Technology Research*, **26**, 195～204, 2020.
2）　Damar, S., Balaban, M. O.：*Journal of Food Science*, **71**, R1-R11, 2015.
3）　FDA, http://www.triphasepharmasolutions.com/Private/USP%201112%20APPLICATION%20OF%20WATER%20ACTIVITY%20DETERMINATION%20TO%20NONSTERILE%20PHARMACEUTICAL%20PRODUCTS.pdf　2023年４月16日
4）　Garcia-Gonzalez, L., Geeraerd, A. H., Spilimbergo, S., Elst, K., Van Ginneken, L., Debevere, J., Van Impe, J. F., Devlieghere, F.：*International Journal of Food Microbiology*, **117**, 1～28, 2007.
5）　堀内篤，知久幹夫，河原崎達雄，赤松裕久，鈴木清一，樫尾進：日本養豚学会誌，**39**, 200～208, 2002.

© The Ito Foundation

食用ブドウ球菌によるZnPP形成と食肉製品の色調改善効果に関する研究

Studies on the formation of ZnPP by edible *Staphylococcus* and their color improving effects of meat products

若　松　純　一
（北海道大学大学院農学研究院）

Jun-ichi Wakamatsu
(Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

The color-improving effect of coagulase-negative Staphylococci (CNS), which are widely used as starter cultures for fermented meat products, was thought to be the promotion of nitrosylmyoglobin (NOMb) formation due to the nitrate-reducing properties of CNS. However, when dry sausage with a commercial starter culture containing CNS was produced without the addition of nitrite/nitrate in our preliminary study, the formation and accumulation of zinc protoporphyrin IX (ZnPP) was observed instead of NOMb. Therefore, this study was designed to clarify that the color improvement of nitrite/nitrate-free meat products by the addition of CNS was due to ZnPP. In a sterile model experimental system using pork homogenate, the addition of CNS did not significantly promote ZnPP formation under anaerobic conditions, but all CNS except the MV strain showed a high promotion of ZnPP formation under aerobic conditions. In terms of growth characteristics, the growth of all CNS was suppressed as the medium pH decreased and as the temperature decreased. The surface and interior color of the CNS-added dry sausage was reddish, similar to that of the nitrite/nitrate-added dry sausage. In the acetone extract of the interior of the CNS-added dry sausages, the absorption spectra of ZnPP were observed, but those of nitrosyl heme were not observed. On the other hand, not only ZnPP but also nitrosyl heme peaks were observed in that of the peripheral part of the MV-added dry sausage. These results suggested that the color of CNS-added meat products is improved in case of most CNS by forming ZnPP instead of nitrosyl heme but in case of the MV strain by forming nitrosyl heme as well as ZnPP.

1．目　　的

亜鉛プロトプロトポルフィリンⅨ（ZnPP）はパルマハム等の発色剤無添加の乾塩漬食肉製品に特異的に豊富に存在する赤色色素である[1,2]。ZnPPの形成は，パルマハムだけでなく硝酸／亜硝酸塩を添加していないドライソーセージにおいても確認されている[3]。このため，鮮やかな赤色を示すZnPPを発色剤無添加の食肉製品中で多量に形成させることができれば，発色剤を使用しなくても食肉製品の色調を改善することができ，発色剤に代わる色調改善方法の一つになる可能性が

© The Ito Foundation

ある。

我々はZnPPを形成する微生物による発色剤無添加の食肉製品における色調改善技術に注目してきた。通常，骨格筋内部は無菌的な状態であり，パルマハムのような乾塩漬生ハムの内部においても微生物はほとんど存在しない[4]。そのため，パルマハムにおけるZnPPの形成は肉内在性の働きによるもので微生物は関与しないと考えられてきた[5]。一方，我々はこれまでに高いZnPP形成能を持つ微生物を複数種確認している[6~8]。このことからZnPP形成能の高い微生物をスターターカルチャーとして発色剤無添加の食肉製品に接種し，ZnPPを多量に形成させることができれば，発色剤無添加でも色調の好ましい製品を作れると考えられる。

食肉製品のスターターカルチャーとして用いられる細菌群の一つとして，食用のブドウ球菌を含むコアグラーゼ陰性*Staphylococcus*属細菌（Coagulase-Negative Staphylococci：CNS）があげられる。CNSは食肉製品において，特有の発酵臭や風味を付加することや，色調を改善することが報告されており[9]，ヨーロッパでは古くからスターターカルチャーとして広く利用されてきた。CNSによる食肉製品の色調改善はニトロシルミオグロビン（NOMb）の形成促進によるもので，CNSの硝酸還元性や，一酸化窒素合成酵素（NOS）によるものと考えられていた。しかし，予備実験において，CNSが配合された市販のスターターカルチャーを添加した発色剤無添加のドライソーセージを製造したところ，製品全体で鮮やかな赤色が見られ，ZnPPの自家蛍光が観察された。この他にもZnPPの存在が明らかになる以前であるが，パルマハムから分離したCNSである*S. lentus*や*S. carnosus*を添加した発色剤無添加のサラミは好ましい赤色を呈し，パルマハムと同一の赤色色素が形成されていた[10]。以上のことから，CNSを添加した食肉製品の色調改善はNOMbによるものではなく，実はZnPPである可能性が浮上した。

しかしながら，市販スターターカルチャーに配合されたCNSのうちどれがZnPP形成に影響したかは不明である。また，他のCNSに関してもパルマハムと同様のミオグロビン誘導体の形成に関与していると報告されているものの[10]，その後ZnPP形成能は確認されていない。そこで本研究の目的を，CNS添加による発色剤無添加の食肉製品の色調改善が，NOMB形成とは異なりZnPP形成によるものであることを明らかにすることとした。

2．方　法

2.1　使用細菌

市販スターターカルチャーより分離・同定（16S rRNA全長配列より）した菌株２種（MV，SC４株とする）と，独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターから購入したCNS　５株（SC2，SC3，SE，SH，SX株とする）を実験に供した。また，ZnPP形成のポジティブコントロールとして，*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* GB(A)-1株[7]を用いた。

2.2　無菌ZnPP形成モデル実験系によるZnPP形成促進能の評価

Kauserらの方法[7]を一部改変して行った。無菌的に豚最長筋の内部を切り出し，滅菌水を加えてホモジナイズして分注し，分離菌株ならびに分譲菌株を添加した（終濃度：肉20％（w/w），細菌1.0×10^6 cells/ml）。その後，25℃の暗所で嫌気的または好気的に５日間インキュベートした。終濃度75％アセトンでZnPPを抽出して蛍光光度（Ex/Em：420/590nm）を測定してZnPP形成量とみなした。無菌操作の確認として，抗生物質添加区をネガティブコントロールとした。

© The Ito Foundation

2.3　培養温度および培地のpHがCNSの生育に及ぼす影響

あらかじめ培養した各種CNSを菌数測定後，滅菌生理食塩水で希釈し，1.0×10^6/mlとなるよう各pH（4.0から7.0）に調整したTryptic Soy Broth（TSB）培地に接種し，4，10，15，20，25℃で24時間，静置培養後に濁度（OD 660）を測定した。なお，菌を添加していない各pHの培地をブランクとした。

2.4　CNS添加ドライソーセージの製造と分析

CNS添加ドライソーセージの製造では，3％NaClおよび1％グルコースを添加した豚ウデ筋のひき肉に分離菌株と分譲菌株を1.0×10^6cells/gとなるよう添加し，35日間乾燥熟成を行った。無添加区にはCNSの代わりに純水を加え，発色剤添加区には亜硝酸ナトリウム溶液を終濃度200ppmとなるように添加した。熟成後ドライソーセージの表面明視野像ならびに断面のZnPP自家蛍光像の撮影，外側3mm部分と内部の75％アセトン抽出物における吸収スペクトルを測定した。

3．結果と考察

3.1　CNSのZnPP形成能の評価

無菌ZnPP形成モデル実験系を用いて，各種CNSのZnPP形成促進能を網羅的に評価した。市販スターターカルチャーより分離，同定した2株，分譲菌株5株を最長筋ホモジネートに添加し，5日間，嫌気的または好気的にインキュベートし，ZnPP形成量を測定した。嫌気的条件下では，ポジティブコントロールのGB(A)-1株添加区は，細菌の無添加区やネガティブコントロールの抗生物質添加区と比べて有意にZnPP形成量が高かったが，CNS添加区は無添加区や抗生物質添加区と同等であり，食肉内在性のZnPP形成を促進しないことが示唆された（**Fig. 1A**）。一方，好気的条件下では，SC4，SC2，SC3，SE，SH，SX株添加区は無添加区よりZnPP形成量が有意に多く，GB(A)-1株添加区と同等であった（**Fig. 1B**）。しかし，MV株添加区では，無添加区よりZnPPがやや多く形成されたが，有意な差は見られず，他のCNS添加区と比較するとZnPP形成量は有意に少なかった。以上のことから，豚肉ホモジネートによるZnPP形成評価試験において，嫌気的条件下ではCNSによる著しいZnPP形成促進能はないが，好気的条件下ではMV株以外のCNSにおいてZnPP形成促進能があることが示された。

3.2　さまざまな培養温度および培地のpHがCNSの生育に及ぼす影響

スターターカルチャーとしてCNSを発酵食肉製品に添加するにあたり，熟成温度や製品中のpH変化がCNSの生育に影響を与える可能性がある。そこで，培養温度や培地のpHがCNSの生育に与える影響を検討した。pH4.0～7.0に調整したTSB培地（未調整pH7.3±0.2）に各種CNSを接種し，10～30℃で24時間静置培養を行い，濁度により生育を評価した。いずれのCNSにおいても培地のpHが低下するほど，また温度が低下するほど濁度が小さくなり生育が抑制された。特にpH4.5以下または培養温度10℃以下ではいずれの株においても濁度が低く，生育が著しく抑制された。大部分のCNSは20℃以上で増殖したが，MV株とSX株では15℃でも広いpHで増殖した。

3.3　CNS添加ドライソーセージにおけるZnPP形成と色調改善効果

3.3.1　表面および断面における色調

ドライソーセージ表面における色調については，乾燥熟成35日目においては，いずれのCNS添加区でも，発色剤区と同等あるいはそれ以上の赤みが観察された。次に，断面における色調については，乾燥熟成35日目において，CNS添加区の内部は発色剤区のように鮮やかな色調を呈した。

© The Ito Foundation

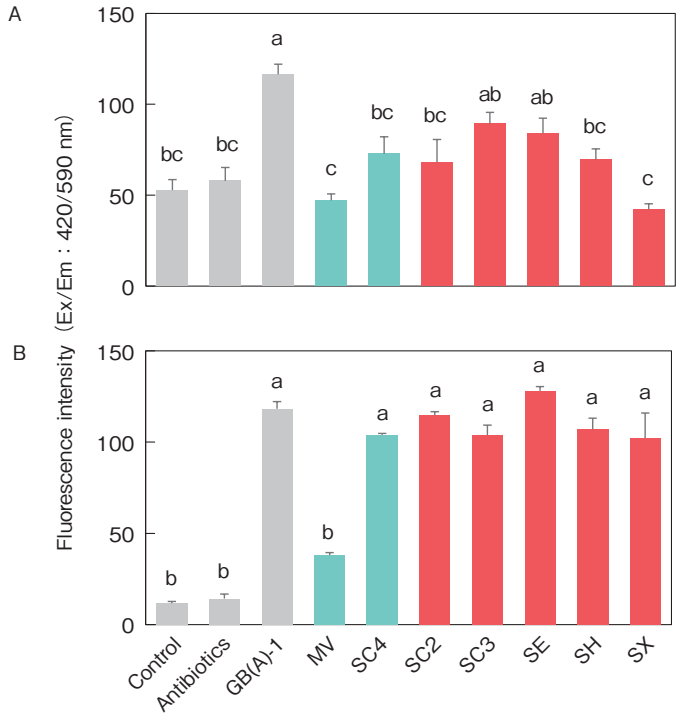

Fig. 1　Effect of CNS on the formation of ZnPP in sterile pork homogenate
Various CNSs were added into sterile pork homogenate and then they were incubated at 25℃ and for 5 days under anaerobic（A）and aerobic（B）conditions. After extraction with 75% acetone, the fluorescence intensity of these extracts were measured. Bars: SEM（n=3）. ^{abc}：$p<0.05$

3.3.2　断面におけるZnPP自家蛍光

乾燥熟成中のドライソーセージの断面におけるZnPP自家蛍光については，これまでの報告[6～8]と同様に，発色剤区ではZnPPによる自家蛍光は全期間で観察されなかった。発色剤区を除くすべての試験区では，乾燥熟成14日目以降から強いZnPP自家蛍光が見られるようになり，14日目においてはSX株添加区で最も強い蛍光が断面全体で観察された。乾燥熟成35日目では，ほとんどのCNS添加区では断面全体で無添加区よりやや強いZnPP自家蛍光が見られたが，MV株添加区では，外側部分に蛍光の弱い部分が輪状に存在した。

3.3.3　乾燥熟成35日目におけるアセトン抽出物の吸収スペクトル

CNSによって形成された色素について乾燥熟成35日目のドライソーセージを内側部分と外側部分に分け，それぞれのアセトン抽出物における吸収スペクトルを測定した（**Fig. 2**）。

内側部分について，発色剤区ではニトロシルヘム特有の395nmの吸収ピークが観察され，ZnPP特有の417nmの吸収ピークは確認されなかった（**Fig. 2A**）。一方で，無添加区およびCNS（MV，SC4，SC2，SC3，SE，SH，SX株）添加区ではZnPP特有の417nmの吸収ピークは観察されたが，ニトロシルヘムの吸収スペクトルは確認されなかった。いずれの可視部のQ帯についても，ニトロシルヘムまたはZnPP特有のスペクトルを示した。

外側部分についても，発色剤区ではニトロシルヘム特有の395nmの吸収ピークが観察され，ZnPP固有の417nmの吸収ピークは確認されなかった（**Fig. 2B**）。また，無添加区およびMV株

© The Ito Foundation

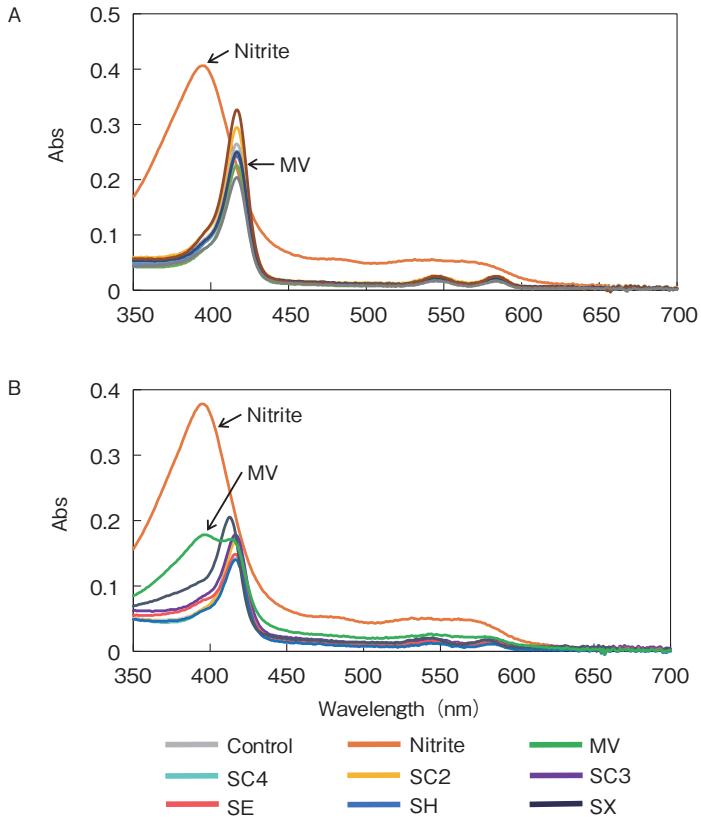

Fig. 2　Absorbance spectra of acetone extract of the interior（A）and peripheral（B）parts of dry sausages
The interior（A）and peripheral（B）parts excised from CNS-added dry sausages were extracted with 75% acetone and the absorbance spectra of the extracts were observed.

以外のCNS（SC4，SC2，SC3，SE，SH，SX株）添加区ではZnPP特有の417nmの吸収ピークが観察されたが，ニトロシルヘムの吸収スペクトルは確認されなかった。一方，MV株添加区では，ZnPPで特徴的な417nm付近と，ニトロシルヘムのスペクトルで特徴的な395nm付近の２つのピークが観察され，ZnPPおよびニトロシルヘム両方の形成が示された。いずれの可視部のQ帯についても，ニトロシルヘムおよびZnPP特有のスペクトルを示していた。

豚肉ホモジネートを用いたモデル実験系，ならびにドライソーセージの結果より，CNSはニトロシルヘムを形成するのではなく，好気的条件下でZnPPの形成を促進することにより，表層部分を含む製品全体の色調を改善することが明らかになった。一方，MV株では好気的条件下で，ZnPPだけでなくニトロシルヘムの形成することにより，製品表面の色調を改善することが明らかになった。これまでの結果[6,7]と同様に，発色剤の添加はZnPPの形成を阻害することが示され，これは硝酸塩，亜硝酸塩から発生する一酸化窒素の作用によることが知られているが，MV株ではZnPPとニトロシルヘムの両方を産生することにより色調改善効果をもたらした。この原因を明らかにすることができなかったが，ZnPPとニトロシルヘムの両面からの色調改善効果はより高い色調改善効果になる可能性があるだろう。

© The Ito Foundation

４．要　約

乾燥食肉製品のスターターカルチャーとして広く利用されるコアグラーゼ陰性*Staphylococcus*属細菌（CNS）による色調改善効果は，CNSが持つ硝酸還元性によりニトロシルミオグロビン（NOMb）が形成促進されることであるとされていた。しかし，CNSが配合されたスターターカルチャーを添加した発色剤無添加のサラミを製造したところ，NOMbではなく赤色色素である亜鉛プロトポルフィリンⅨ（ZnPP）の形成・蓄積が見られた。そこで本研究では，CNS添加による発色剤無添加の食肉製品の色調改善がZnPPによることを明らかにすることとした。豚肉ホモジネートを用いた無菌ZnPPモデル実験系では嫌気的条件下でCNSは顕著なZnPP形成促進効果は見られなかったが，好気的条件下ではMV株を除くすべてのCNSで，高いZnPP形成促進効果が見られた。生育特性では，いずれのCNSにおいても培地のpHが低下するほど，また温度が低下するほど生育が抑制された。特にpH4.5以下または培養温度10℃以上ではいずれの株においても生育が著しく抑制された。CNS添加ドライソーセージの表面の色調は発色剤添加区と同等の赤みを呈し，発色剤添加区と同等であった。CNS添加ドライソーセージの内部のアセトン抽出物ではZnPPの吸収スペクトルは認められたが，ニトロシルヘムのものは観察されなかった。一方，MV添加区の外部ではZnPPだけでなくニトロシルヘムのピークも確認された。以上より，スターターカルチャーとしてCNS添加した食肉製品において，MV株ではZnPP以外にニトロシルヘムを形成するが，多くのCNSではZnPPを形成することで製品表面の色調を改善することが明らかとなった。

文　献

1）Wakamatsu, J., Nishimura, T., Hattori, A.：*Meat Sci.*, **67**, 95～100, 2004.
2）Wakamatsu, J.：*Meat Sci.*, **192**, 108905, 2022.
3）De Maere, H., Chollet, S., De Brabanter, J., Michiels, C., Pealinck, H., Fraeye, I.：*Meat Sci.*, **135**, 46～53, 2018.
4）Toldrá, F.：*Meat Sci.*, **49**, S101-S110, 1998.
5）Wakamatsu, J., Okui, J., Ikeda, Y., Nishimura, T., Hattori, A.：*Meat Sci.*, **68**, 313～317, 2004.
6）Asaduzzaman, M., Ohya, M., Kumura, H., Hayakawa, T., Wakamatsu, J.：*Meat Sci.*, **165**, 108109, 2020.
7）Kauser-Ul-Alam, M., Toba, Y., Hioki, S., Hayakawa, T., Kumura, H., Wakamatsu, J.：*Foods*, **9**, 1583, 2020.
8）Wakamatsu, J. I., Kawazoe, H., Ohya, M., Hayakawa, T., Kumura, H.：*Meat Sci.*, **161**, 107966, 2020.
9）Leroy, F., Verluyten, J., De Vuyst, L.：*Int. J. Food Microbiol.*, **106**, 270～285, 2006.
10）Morita, H., Niu, J., Sakata, R., Nagata, Y.：*J. Food Sci.*, **61**, 1021～1023, 1996.

© The Ito Foundation

生理的に調節しうる濃度のカルノシンの添加は，鶏肉の匂いを改善するか？

Does the supplementation of carnosine at concentrations that can vary in vivo improve the odor of chicken?

渡邊　源哉・石田　翔太・赤田　花林・本山　三知代・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）

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

Odor is an important quality factor that directly affects the willingness to eat meat, and “oily odor” caused by lipid oxidation is a typical unpleasant odor of meat. Carnosine (Car) is an antioxidant peptide abundant in meat, but it is not known whether the supplementation of Car in a physiologically adjustable concentration would inhibit the 2-thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) which is indicator of lipid oxidation and the unpleasant odor derived from meat oxidation. Therefore, in this study, we demonstrated whether the supplementation of Car to chicken meat in a physiologically adjustable concentration affects meat quality-related factors such as TBARS and sensory odor after heating.

We analyzed the meat quality and odor of chicken meat containing without Car supplementation and meat with 1.0 (Car 1.0), 2.5 (Car 2.5) or 15 (Car 15) mg/g meat of Car supplementation. Of these, Car 1.0 and Car 2.5 are physiologically adjustable Car levels, and Car 15 is above physiologically adjustable level. Our results of analysis of variance showed that Car supplementation significantly affected TBARS of cooked sample, pH, L* which is indicator of lightness, and cooking loss. The results of multiple comparisons showed that the Car 15 significantly suppressed TBARS compared to chicken meat without Car supplementation. On the other hand, there was no significant difference in TBARS between chicken meat without Car supplementation and chicken meat with Car supplementation at physiologically adjustable levels. Sensory evaluation showed that the intensity of “oily odor” in Car 15 tended to lower than that of without Car supplementation group. However, there was no significant difference in sensory odor between chicken meat without Car supplementation and chicken meat with Car supplementation at physiologically adjustable levels.

In conclusion, we found that the supplementation of Car at physiologically adjustable concentrations did not improve lipid oxidation and odor of chicken meat.

1．目　　的

「匂い」は食肉の喫食意欲に直結する重要な品質評価要素であり，保存中の脂質の酸化によって生じる「酸化臭」は食肉の代表的な不快臭である。こうした背景から，食肉の酸化抑制を目的と

© The Ito Foundation

して，さまざまな抗酸化物質が利用されてきた。一方，食肉は本来，抗酸化機能を有するペプチドであるカルノシン（Car）を多く含有している。脂質酸化とCarの関係はすでにいくつか報告があり，鶏肉のパティに対してCarを添加すると，脂質過酸化の指標となるチオバルビツール酸反応性物質（TBARS）が抑制されることが知られている[1)]。よって，食肉中のCar含量の違いは，脂質酸化の抑制を介して食肉の酸化臭を抑制する可能性がある。他方，これまでの食肉へのCarの添加実験においては，添加量が動物の骨格筋中の生理的濃度以上であり，動物の飼養条件等により生理的に調節可能な濃度の範囲内でCarが変動した場合に，TBARSの生成の抑制や酸化臭等の匂いの違いが生じるか解明されていない。

そこで本研究では，脂質の酸化速度が速く，酸化臭が発生しやすいとされる鶏肉を対象とし，ニワトリの骨格筋の生理的な濃度の範囲内でCarを添加，保存し，加熱後の匂いに違いがあるか解明することを目的とした。

２．方　　法

2.1　鶏肉サンプルの調製

市販のブロイラーの丸鶏４羽分よりムネ肉およびモモ肉を採取し，それぞれをひき肉に調製した。ブロイラーのムネ肉にCarは1.5-2.5mg/g meat程度含まれ[2, 3)]，ムネ肉のCarの含量はCarの基質であるヒスチジンの飼料添加により「１mg/g meat」程度[2)]，飼料中のヒスチジン：リジン比の調節により「2.5mg/g meat」程度[3)]増加することが報告されている。そこで，生理的に調節しうる濃度の範囲でCarを添加した試験区として，前述のひき肉にCarを1.0mg/g meat（Car 1.0区）および2.5mg/g meat（Car 2.5区）添加した試料をそれぞれ調製した。また，既報[1)]において鶏肉のTBARSの抑制が報告されているCar 15mg/g meat（Car 15区）を添加した試料を調製し，生理的濃度以上にCarを添加した試験区とした。これらのサンプルを直径3.5cm×高さ1.0cmのパティに成形して食品用のドリップ吸水紙を敷いた秤量皿に乗せ，酸素透過性ラップで包装し，４℃に設定した冷蔵庫において白色蛍光灯下で１，３もしくは７日間保存した。肉質分析は各保存期間終了直後に実施した。官能評価に用いるサンプルは，保存試験を終えた後に速やかに真空包装し，官能評価の前日まで－30℃で保存した。上記の試験は２回反復して行った。

2.2　肉質分析

保存試験を終えたサンプルを180℃に設定したスチームコンベクションオーブンで５分間「焼き」調理し，加熱前と加熱後の重量の差と加熱前のサンプルの重量の比から加熱損失を算出した。続いて，加熱前サンプルと前述の加熱後サンプルのそれぞれについてMitsumotoら（1993）の方法[4)]を一部改変し，比色定量法によりTBARSを測定した。

保存試験を終えたサンプルに突き刺し測定用pHガラス電極を差し込み，pHを測定した。測定は測定箇所を変えて３回実施し，平均値を測定値とした。

保存試験を終えたサンプル表面の色を色彩色差計で測定した。測定条件は，測定径８mm，観察光源Ｄ65および10°視野とし，L*値，a*値およびb*値を測定箇所を変えて３回測定し，平均値をそれぞれの測定値とした。

2.3　匂いの官能評価

2.1において調製した凍結サンプルを評価前日に４℃に設定した冷蔵庫で一晩解凍し，180℃に設定したオーブンで５分間加熱した。加熱後のサンプルを一辺１cmの立方体に調製して共栓付三角フラスコに入れ，栓をした状態で評価開始まで40℃で保存した。評価は12名の分析型パネルを用

© The Ito Foundation

いて，気温22℃，湿度50％となるように設定した評価室の個別ブースにおいて，赤色照明下で実施した。パネリストは栓を開けて匂いを嗅ぎ，「脂臭い・酸化臭」，「腐敗臭・アミン臭」，「生臭い」および「鶏肉らしいにおい」の４項目について，150mmのラインスケールを用いて回答した。評価は40℃に設定したシリコンラバーヒーターでフラスコを温めながら実施させた。サンプルの評価順序はラテン方格法を用いて無作為化した。なお，本研究においては，サンプルが24種類と多く負荷が大きいことから，２回のセッションに分けて評価を実施した。

2.4　加熱サンプルの揮発成分分析

匂いの官能評価に用いた加熱後サンプルの一部を用いて揮発成分分析を行った。具体的には，加熱後サンプル１ｇを内蓋付きバイアルに秤量し，内部標準として2-ヘプタノンを添加した。これを60℃で５分間予備加熱した後，固相マイクロ抽出ファイバーを用いて，10分間，ヘッドスペースの揮発成分を濃縮した。濃縮した揮発成分はMariuttiら（2009）の分析条件[5]を用いて，ガスクロマトグラフ質量分析計によりScanモードで分析し，得られたピークはマススペクトルライブラリーを用いてアノテーションを行った。

2.5　統計解析

肉質分析の結果は，反復を変量効果，カルノシン添加量，保存期間，部位，カルノシン添加量と保存期間の交互作用，カルノシン添加量と部位の交互作用，保存期間と部位の交互作用，カルノシンと保存期間と部位の交互作用を固定効果とした混合モデルで分析した。匂いの官能評価の結果は，パネリストの個人差を変量効果，カルノシン添加量，保存期間，部位，サンプルの評価順序，官能評価実施セッション，カルノシン添加量と熟成の交互作用，カルノシン添加量と部位の交互作用，保存期間と部位の交互作用，カルノシンと保存期間と部位の交互作用を固定効果とした混合モデルで分析した。上記の分析はいずれもＲのlmerTestパッケージのlmer関数を用いて行った[6]。カルノシン添加量，保存期間および部位ごとの測定値の最小二乗平均値はemmeansパッケージに含まれるemmeans関数により計算し[7]，差の検定はmultcompパッケージに含まれるcld関数を用いたSidakの補正により実施した[8]。

3．結果と考察

3.1　肉質分析

肉質分析の分散分析の結果を**Table 1** に示す。Carの添加量は，加熱後サンプルのTBARSに有意に影響を及ぼした。差の検定から，Car無添加区とCar 1.0区に対してCar 15区の加熱後サンプルのTBARSが有意に低下したが，Car無添加区とCar 1.0区およびCar 2.5区の間に有意差はなかった（データ示さず）。よって，Carの添加は

Table 1　Results of analysis of variance for physicochemical analysis in chicken meat

	pH	L*	a*	b*	Cooking loss	TBARS（raw）	TBARS（cooked）
Carnosine	***	***	N.S	N.S	*	N.S	*
Storage days	***	***	***	***	**	†	**
Part	***	***	***	***	***	***	***
Carnosine×Storage days	N.S	N.S	N.S	N.S	*	N.S	N.S
Carnosine×Part	*	N.S	***	N.S	†	*	N.S
Storage days×Part	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
Carnosine×Storage days×Part	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

***p<0.001；**p<0.01；*p<0.05；†p<0.10；N.S.: p>0.10

© The Ito Foundation

生理的な濃度の範囲内においてはTBARSに影響しないと考えられた。また，pH，L*値および加熱損失に対してCarの添加量が有意に影響を及ぼした。このうち，pHはCarの添加量の増加に伴い段階的に上昇し，L*値は逆に段階的に低下した（データ示さず）。一般的に食肉のpHとL*値には負の相関があるとされることから，Carの添加によりpHの上昇が生じ，L*値の低下を引き起こしたものと考えられた。

保存期間は，加熱前サンプルのTBARS以外のすべての分析項目において有意に影響を及ぼした。一方，Car添加量と保存期間の交互作用は加熱損失以外では認められず，特定の保存期間においてCarが肉質に特異的に影響することはないと考えられた。

部位の違いはすべての分析項目に有意な違いをもたらした。また，pH，a*値および加熱前サンプルのTBARSにCar添加量と部位の有意な交互作用が認められた。差の検定の結果から，これらの項目はムネ肉においてはCarの添加による濃度依存的な増加もしくは低下が認められたのに対して，モモ肉では部分的に濃度依存的に変動していないことが理由と考えられた（データ示さず）。他方，Carの添加により各分析項目の値が増加するか減少するかはムネ肉とモモ肉で一致したことから，Car添加の肉質特性への影響はムネ肉とモモ肉の間に大きな違いはないと考えられた。

3.2　匂いの官能評価

匂いの官能評価の分散分析の結果を**Table 2** に示す。Carの添加量は，「脂臭い・酸化臭」のみに有意に影響した。差の検定においては，Car 15区の「脂臭い・酸化臭」がCar 2.5区に対して有意に低く，Carの添加により酸化臭が抑制できる可能性が示唆された（データ示さず）。他方で，Car無添加区とCar 1.0区およびCar 2.5区の間に有意な違いはなく（データ示さず），生理的な濃度の範囲内におけるCarの添加は，匂いに影響を及ぼさないと考えられた。

保存期間もまた「脂臭い・酸化臭」に有意に影響した。一方，すべての匂いにおいて，Car添加量と保存期間に有意な交互作用はなく，特定の保存期間においてCarが匂いに特異的に影響することはないと考えられた。

部位はいずれの匂いにおいても有意な影響はなく，カルノシン添加量との交互作用も認められなかった。よって，Carが匂いに及ぼす影響はムネ肉とモモ肉の間で違いはないと考えられた。

3.3　加熱サンプルの揮発成分分析

揮発成分分析の結果，エタノール，ペンタナール，ヘキサナール，ノナナール，7-オクテン-4-

Table 2　Results of analysis of variance for odor sensory evaluation in cooked chicken meat

	Descriptors			
	Oily	Amine	Fishy	Chicken like
Carnosine	*	N.S.	N.S.	N.S.
Storage days	***	N.S.	†	N.S.
Part	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Testing order	**	**	N.S.	**
Session	*	N.S.	N.S.	N.S.
Carnosine×Storage days	†	N.S.	N.S.	N.S.
Carnosine×Part	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Storage days×Part	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.
Carnosine×Storage days×Part	N.S.	N.S.	N.S.	N.S.

***：p<0.001；**：p<0.01；*：p<0.05；†p<0.10；N.S.: p>0.10

© The Ito Foundation

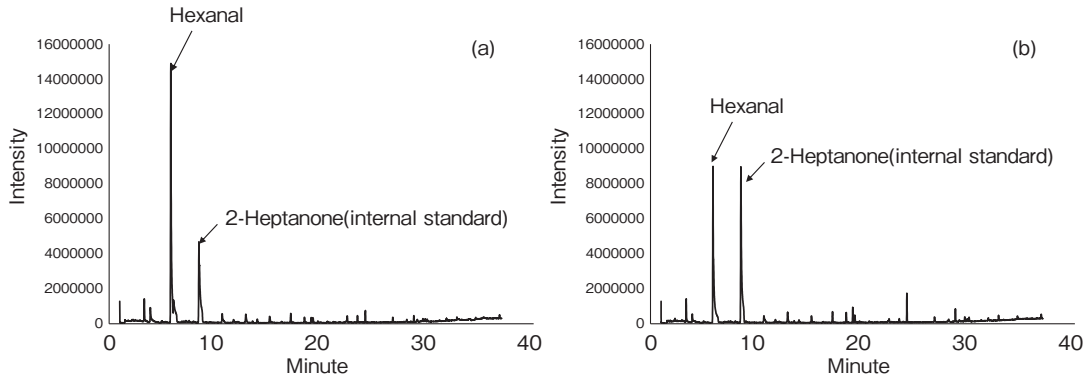

Fig. 1 Chromatograms of volatile component analysis in chicken thigh meat. (a) without Car supplementation, thigh meat, 1 day, (b) Car 15 mg/g meat supplementation, thigh meat, 1 day.

オン，1-ヘキサノール-2エチル，ベンズアルデヒド，ジヒドロ-2(3H)-フラノンおよびプロパン酸-2-メチル-3-ヒドロキシ-2, 2, 4-トリメチルペンチルエステルがサンプルに共通して検出された。**Fig. 1** にCar無添加，保存期間１日のモモ肉のクロマトグラムとCar 15区，保存期間１日のモモ肉のクロマトグラムを示す。両者の揮発成分のピーク面積を内部標準の面積で補正して比較すると，Car無添加に比較して，Car 15区でヘキサナール等の揮発成分が低下していた（データ示さず）。しかし，本研究では揮発成分の反復分析を実施できなかったことから，今後，測定を反復してCar添加による揮発成分の違いと匂いの評価結果の関係について解析する必要がある。

4．要　約

Carは食肉に多く含まれる抗酸化ペプチドであるが，生理的に調節可能な濃度の範囲におけるCarの添加がTBARSの生成や不快な匂いを抑制するかは不明であった。そこで本研究では鶏肉に対して生理的に調節可能な濃度の範囲でCarを添加して保存試験を行い，TBARS等の肉質関連因子の分析および加熱後の匂いの官能評価を実施した。結果として，生理的な濃度以上のCar添加により，無添加区に比較してTBARSが抑制されるとともに，「脂臭い・酸化臭」が抑制される傾向を示したが，Car無添加区と生理的に調節可能な濃度のCarを添加した試験区のTBARSおよび匂いの強度に有意な違いはなかった。よって，生理的に調節可能な濃度の範囲においては，Carの添加は匂いを改善しないことが明らかとなった。

文　献

1） O'Neill, L. M., Galvin, K., Morrissey, P. A., Buckley, D. J.：*Meat Sci*, **52**, 89～94, 2001.
2） Kai, S., Watanabe, G., Kubota, M., Kadowaki, M., Fujimura, S.：*Anim Sci J*, **86**, 541～546, 2015.
3） Lackner, J., Albrecht, A., Mittler, M., Marx, A., Kreyenschmidt, J., Hess, V., Sauerwein, H.：*Poult Sci*, **100**, 101393, 2021.
4） Mitsumoto, M., Arnold, R. N., Schaefer, D. M., Cassens, R. G.：*J Anim Sci*, **71**, 1812～1816, 1993.
5） Mariutti, L. R. B., Nogueira, G. C., Bragagnolo, N.：*J Braz Chem Soc*, **20**, 1849～1855, 2009.
6） Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., Christensen, R. H. B.：*J Stat Softw*, **82**, 1～26, 2017.
7） Russell, V. L., Buerkner, P., Giné-Vazquez, I., Herve, M., Jung, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H., Singmann, H.：*R package version 1.8.4-1*. 2023. https://CRAN.R-project.org/package=emmeans (accessed on 3 April 2023).
8） Hothorn, T., Bretz, F., Westfall, P.：*Biom J*, **50**, 346～363, 2008.

© The Ito Foundation

工業型畜産の課題解決に向けた培養肉の生産技術開発

Development of cultured meat technology to solve the problems in industrial livestock production

岡　村　大　治
（近畿大学農学部）

Daiji Okamura
（Graduate School of Agriculture, Kindai University）

To produce muscle fibers for cultured meat on a large scale, it is important to expand myoblasts in a serum-reduced or serum-free medium to avoid cost, ethical, and environmental issues. Myoblasts such as C2C12 cells differentiate quickly into myotubes and lose their ability to proliferate when the serum-rich medium is replaced with a serum-reduced medium. This study demonstrates that Methyl-β-cyclodextrin（MβCD), a starch-derived agent that depletes cholesterol, can inhibit further differentiation of myoblasts at the MyoD-positive stage by reducing plasma membrane cholesterol on C2C12 cells and primary cultured chick muscle cells. Furthermore, MβCD efficiently blocks cholesterol-dependent apoptotic cell death of myoblasts, which is one of the mechanisms by which it inhibits the differentiation of C2C12 myoblast cells, as dead cells of myoblast are necessary for the fusion of adjacent myoblasts during the differentiation process into myotubes. Importantly, MβCD maintains the proliferative capacity of myoblasts only under differentiation conditions with a serum-reduced medium, suggesting that its mitogenic effect is due to its inhibitory effect on myoblast differentiation into myotube. In conclusion, this study provides significant insights into ensuring the proliferative capacity of myoblasts in a future serum-free condition for cultured meat production.

1．目　　的

本研究は「培養肉」実現に向け，高価なウシ血清や成長因子と呼ばれるタンパク質の添加に依存せず，筋肉細胞を増幅する培養システムを構築することを目指すものである。また以下の研究内容は，国際科学誌「Frontiers in Cell and Developmental Biology」に掲載受理されたものである[1)]。

現在の食肉システムは工業的畜産に依存しており，持続可能な開発目標（SDGs）を達成するうえでいくつかの課題に直面している。その課題とは，水や穀物の過剰消費，飼育スペース確保のための森林伐採，家畜の排泄物による水質汚染などである。また，家畜の排泄物や牛のげっぷのメタン発酵による大量のメタンガスの放出は，地球温暖化に悪影響を及ぼすとされている。これらの課題に対し，特に今後予想される人口増加を考慮し，持続可能な食肉生産システムの確立が急務と

© The Ito Foundation

なっている。植物性タンパク質を原料とする「グリーンミート」や，家畜の筋肉細胞を培養・組織化した「培養肉」は，その解決策として期待されている。しかし，培養肉は工業的畜産が抱える問題を解決する可能性があるにもかかわらず，社会実装の面でいくつかの課題を抱えている。

筋肉細胞やがん細胞などの動物細胞を培養液中で効率よく増殖させるためには，ウシ胎児血清や組み換えタンパク質を培養液に補充する必要があり，コストがかかるという課題が残されている。培養肉生産の目的は，家畜への依存を減らし，家畜による環境破壊を軽減することであるが，その生産にウシ胎児血清を使用することは，この目的と矛盾している。筋細胞の増殖を促進するために，FGF-2，EGF，IGF-1などの成長因子を加えた無血清培地が開発されているが，培養肉を大規模に生産するには，無血清や低血清条件だけでなく，コストの主要因である成長因子に依存しない培養技術が必要である。現在までに，この目的を達成した技術報告はない。

本研究では上記課題の解決を目的として，デンプン由来の環状オリゴ糖であるメチルβシクロデキストリン（以下，MβCD）に着目し，C2C12筋芽細胞の低血清培地での分化抑制と増殖促進効果について詳細な解析を行った。

2．方　法

2.1　C2C12細胞の増殖および分化誘導

不死化マウス筋芽細胞株であるC2C12細胞を10％ウシ胎児血清およびDMEM培地からなる「DF10」培地で増殖培養をした。C2C12細胞は低血清条件下において筋管細胞へ分化誘導できる。分化誘導のために，まずはDF10培地で播種し，播種から2-3日後，細胞のコンフルエントが90-100％に達した時点で培地を2％ウマ血清含有DMEM培地の「DH2」培地に変更した。適宜MβCDを3 mMになるように加えた。

2.2　ニワトリ胚性筋芽細胞細胞の初代培養

10日齢のニワトリ胚を材料にし，大腿骨を外科的に除去し分離した大腿筋組織を2 mg/mlのコラゲナーゼⅡ型で37℃，40～60分間，細胞の剥離に応じて10～15分ごとにピペットしながら消化させた。解離した筋芽細胞を40 μmのセルストレーナーに通して単細胞懸濁し，DF10培地で播種。翌日，MβCDを添加したDH2培地に変更して分化誘導をかけた。

2.3　蛍光免疫染色

筋管細胞の分化状態を検出するため，筋管細胞特異的なタンパク質MHC（Myosin Heavy Chain）に対する抗体（R&D Systems，MAB4470）を用いて，蛍光免疫染色を行った。また，筋肉細胞の増殖やアポトーシス状態を検出するため，抗リン酸化ヒストンH3抗体（C-2）（Santa Cruz, sc-374669）と抗活性型カスパーゼ3抗体（Asp175）（5A1E）（Cell Signaling Technology, #9664）を用い，観察は蛍光顕微鏡BZ-X710（キーエンス）で行った。

3．結果と考察

筋芽細胞の分化を抑制するために，MβCDを候補成分として検証した。MβCDは食品添加物でありながら，細胞のコレステロール除去効果が非常に大きい物質として知られている。低血清条件下で培養するC2C12細胞にMβCDを添加すると，分化した筋管の特徴である伸長細胞の出現が著しく減少した。MβCDが筋管細胞への分化に与える影響を調べるため，主要な分化マーカーであるMHCタンパクの発現を評価したところ，MβCDを含む条件で培養した細胞ではMHC陽性細胞数が著しく減少し，さらにはMHC陽性細胞においてもその核数が有意に減少していた。低血清条件下でMβCDはC2C12細胞の筋管分化を効

© The Ito Foundation

果的に阻害することが示された（**Fig. 1**）。

アポトーシス細胞死は，隣接する細胞との接触依存的なシグナル伝達を通じて，分化した筋芽細胞同士の融合を促す役割を果たすことが報告されている[2)]。MβCDを用いた筋管分化の観察では，低血清培地条件下で起こる筋芽細胞の細胞死が，MβCD含有条件下では著しく減少していることを発見した。このことから，MβCDによる細胞内コレステロールの枯渇は，コレステロール依存性のアポトーシス細胞死の誘導を強力にブロックし，筋芽細胞の融合を障害し，結果として筋管分化を阻害する可能性があると考えた。我々は，アポトーシスマーカーである活性型カスパーゼ３タンパクを検出することでアポトーシス細胞死を検証した。これらの結果は，MβCDがアポトーシス細胞死を効果的に遮断し，コレステロールがそれを有意に回復させることを示唆していた。さらに，コレステロール単独では，活性型カスパーゼ３陽性細胞が有意に誘導された。このように，MβCDによるコレステロールの枯渇によって引き起こされるC2C12筋芽細胞の分化過程におけるアポトーシス細胞死の遮断は，アポトーシスによる死細胞が筋芽細胞融合を誘導することによって隣接する筋芽細胞の筋管への分化を促すため，MβCDがC2C12細胞の筋管分化を阻害するメカニズムの一つと考えられる（**Fig. 1**）。

RNAシーケンス解析により，MβCDを投与した細胞では，コントロールと比較して細胞周期関

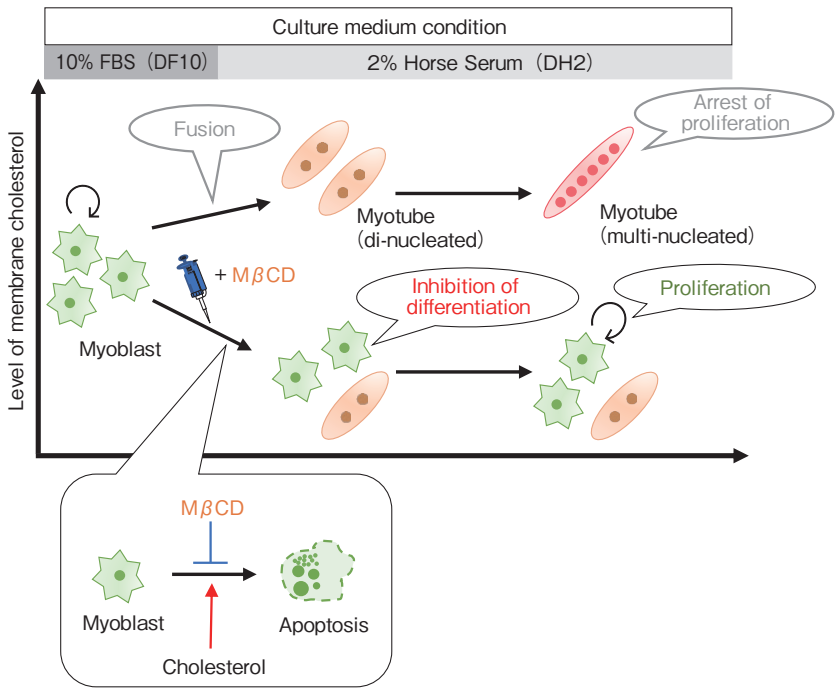

Fig. 1　Schematic illustrating summarizing that inhibition of myoblast differentiation into myotube with MβCD ensures proliferation of myogenic cells in serum-reduced culture conditions.
MβCD is a potent inhibitor of myoblast differentiation into myotubes by reducing cellular cholesterol levels in myoblasts. This enables the continuous proliferation of myoblasts even under serum-depleted conditions. By lowering cellular cholesterol levels, MβCD inhibits apoptotic cell death, which is necessary for myogenic differentiation, and this is one of the effective mechanisms by which MβCD functions as a myoblast differentiation inhibitor under serum-reduced conditions.

© The Ito Foundation

連遺伝子の発現が高いことが確認された。そこで，低血清条件下での細胞増殖能力に対するMβCDの効果を調べた。低血清条件下で３日間細胞を増殖させたところ，細胞数の相対値だけでなく，有糸分裂マーカーであるリン酸化ヒストンH3陽性細胞の頻度が，MβCD処理条件ではコントロールと比較して有意に増加することが確認された。C2C12筋芽細胞に対するMβCDの増殖促進効果は低血清条件下でのみ観察され，高血清条件下では観察されなかったことから，C2C12筋芽細胞に対するMβCDの増殖促進効果は，筋芽細胞の細胞増殖を直接促進するのではなく，筋管への分化に対する抑制効果によるものであることを強く支持している（**Fig. 1**）。

培養肉生産におけるMβCDの有効性を検証するためには，畜産動物におけるMβCDの効果を調べることが重要である。これまでの研究でニワトリ筋芽細胞の初代培養細胞をMβCDで30分間短期処理すると，筋芽細胞の増殖が促進されることが示されているが[3]，その増殖や分化抑制などの長期的な効果については確立されていない。そこで我々はニワトリ筋芽細胞の初代培養を用いて，前述のC2C12筋芽細胞で見られたようなMβCDの分化抑制効果と増殖促進を評価した。ニワトリ大腿筋細胞は，10日齢のニワトリ胚から採取し，低血清条件下で筋管の分化と細胞増殖に対するMβCDの効果を評価したところ，MβCDの添加によりMHC陽性筋管の成熟が阻害され，細胞あたりの核の数が著しく減少した。さらにリン酸化ヒストンH3陽性細胞の増加によって，筋芽細胞の増殖促進効果も実証されたことから，MβCDは動物種を越えて，筋肉細胞の分化抑制と増殖促進効果を発揮することが分かった（**Fig. 1**）。

無血清培地を用いた安全で費用対効果の高い筋肉細胞の培養法の確立は，培養肉の将来的な商業的・社会的確立に不可欠である。MβCDの使用により筋細胞の分化を抑制し，増殖能を維持できることを示した本研究の結果は，筋芽細胞が分化して増殖を停止してしまう無血清および低血清条件下での培養肉生産において重要な洞察を与える。この結果は培養肉実現への第一歩としてではあるが，食品添加物を用いて筋芽細胞の分化を抑制することが，ウシ血清に依存しない筋肉細胞の増殖技術実現への有効なアプローチとなり得るという我々の主張を強く支持するものである。

4．要　約

培養肉用の筋繊維を大規模に生産するためには，コストや倫理的，環境的な問題を回避するために，筋芽細胞を血清低減培地または無血清培地で増殖させることが重要である。C2C12細胞などの筋芽細胞は，血清の多い培地を血清の少ない培地に交換すると，筋管に速やかに分化し，増殖能力を失う。本研究では，コレステロールを奪うデンプン由来の薬剤であるメチルβシクロデキストリン（Methyl-β-cyclodextrin/MβCD）が，C2C12細胞やニワトリ初代培養筋肉細胞の細胞膜コレステロールを減少させ，筋芽細胞のさらなる分化を抑制することを実証した。さらに，MβCDは，コレステロール依存性の筋芽細胞のアポトーシス細胞死を効率的にブロックする。これは，C2C12筋芽細胞の分化を阻害するメカニズムの一つであり，筋芽細胞の死細胞は，筋管への分化過程で隣接する筋芽細胞の融合に必要であるため，MβCDは筋管への分化を阻害する。重要なことは，MβCDが筋芽細胞の増殖能を維持するのは，血清低減培地を用いた分化条件下のみであることで，その分裂促進作用は，筋芽細胞の筋管への分化を抑制する作用に起因することが示唆された。以上のことから，本研究は，将来の培養肉製造における無血清条件下での筋芽細胞の増殖能の確保について，重要な知見を与えるものである。

© The Ito Foundation

文　献

1） Katayama, T., Chigi, Y., Okamura, D.：The ensured proliferative capacity of myoblast in serum-reduced conditions with Methyl-β-cyclodextrin, *Front. Cell Dev. Biol.*, in press.

2） Hochreiter-Hufford, A. E., Lee, C. S., Kinchen, J. M., Sokolowski, J. D., Arandjelovic, S., Call, J. A., *et al.*：Phosphatidylserine receptor BAI1 and apoptotic cells as new promoters of myoblast fusion, *Nature*, 497(7448), 263～267, 2013.

3） Portilho, D. M., Soares, C. P., Morrot, A., Thiago, L. S., Butler-Browne, G., Savino, W., *et al.*：Cholesterol depletion by methyl-β-cyclodextrin enhances cell proliferation and increases the number of desmin-positive cells in myoblast cultures, *Eur J Pharmacol*, 694(1-3), 1～12, 2012.

© The Ito Foundation

乾燥熟成牛肉より分離された真菌の生理特性およびその利用に関する研究

Studies on physiological characteristics of fungi isolated from dry aged beef and its utilization

中川　麻衣・小室　春菜・中島　誠人・猪口　由美・高鳥　浩介*
（一般社団法人食肉科学技術研究所，*NPO法人カビ相談センター）

Mai Nakagawa, Haruna Komuro, Yoshito Nakashima, Yumi Inoguchi and Kosuke Takatori*
(Japan Meat Science & Technology Institute, *Center for Fungal Consultation Japan)

In this study, it was to determine how the physiological characteristics of fungi affecting the aroma of dry-aged beef affect the conditions under which the aroma develops, and how these characteristics can be used as indicators during production.

Thamnidium elegans and *Mucor strictus* were found to develop even in vacuum packaging with low oxygen content. To inhibit the growth of these fungi after shipment, temperature control at around 0℃ in combination with oxygen absorbers and packaging materials with low oxygen permeability were found to be effective for long-term storage.

In tests to confirm protein assimilation capacity, it showed higher protein assimilation capacity compared to lipids. However, the nut odor produced by *M. strictus* did not occur in the protein-assimilatory medium, but in the lipid-assimilatory medium, where growth was slower. This suggests that not only the presence of the fungus but also the substrate and nutrient source on which the fungus grows are strongly related to the generation of the aroma.

In summary, our results suggest that dry aging imparts an aging aroma to meat through the combined involvement of two species of fungi, which prevent the invasion of other microorganisms, while *M. strictus* degrades lipids. The study also found that unexpected invasion of fungi during distribution could be controlled by a combination of temperature control and packaging. If the propagation of fungi could be adjusted by fine-tuning the temperature conditions, it would be possible to shorten the ripening period and consider the intensity of the aroma.

1．目　　的

食肉の熟成による効果として，軟化，呈味の向上，独特の香りの発現などがあり，これらは食肉内在性の酵素による遊離のアミノ酸やペプチドの増加の寄与が明らかにされている[1, 2]。また，熟成の方法によって食肉の呈味や香味に多様性がもたらされることから冷蔵庫内の温度・湿度を一定に保ち，さらに庫内の空気を循環させた条件下で食肉を熟成させる乾燥熟成（ドライエイジング）と呼ばれる熟成方法が国内でも盛んとなっている。乾燥熟成環境下では真菌を利用することがあ

© The Ito Foundation

り，この手法によって生成される熟成香の分析についての報告[3]が中心であり，真菌が熟成にどのように影響を与えているかについての報告はこれまで少なかった。そこで我々は経験則的に行われてきた熟成中の真菌利用には熟成香の生成となんらかの明確な因果関係があると考え，乾燥熟成の手法を用いた熟成肉から得られるナッツ臭と称される特有の芳香と真菌の関係について調査を行った。その結果，平成31年度（2019年度）食肉に関する助成研究において，熟成肉に付着した真菌が香気を産生し熟成肉に特有の芳香を付与している可能性が高いことを確認した。この特有の芳香は一般的な真菌の発育至適環境下にない時に出現する点が大きな特徴であり，乾燥熟成肉特有の熟成香の発生機序および真菌の香気生成に関するメカニズムの一端を明らかにすることができた[4]。しかしながら，その発生機序の全容解明には至らなかった。本研究の目的は，熟成肉特有の香気生成に関与している可能性が高い真菌の生理特性を調査し，香気の発生機序を解明することにある。

また，乾燥熟成牛肉（ドライエイジングビーフ）を取り扱う場合に意図せず環境に真菌を飛散させる恐れがあるため，トリミング後の乾燥熟成牛肉や，それ以外の製品を汚染するリスクがある。そのため，これまで乾燥熟成法の前提条件とされていた温度条件の他に酸素濃度の違いによる発育条件についても検討することとした。本研究では発育環境条件の調査に加えて，発育する基質の栄養源等による香気産生の違いを確認し，真菌の香気生成条件を特定して，熟成適期の指標を提示しようとするものである。

2．方　法

2.1　供試菌株

乾燥熟成牛肉に発育していた真菌を採取しクロラムフェニコール（50ppm）添加ポテトデキストロース寒天培地（以下「PDA培地」とする）に塗抹した。得られたコロニーを新たなPDA培地に接種し培養する操作を繰り返し，*Thamnidium elegans*と*Mucor strictus*の２種を分離し試験に供した。

2.2　包装条件比較試験

脱酸素剤は冷蔵条件下で使用できるエージレスS100タイプ（三菱瓦斯化学株式会社製造），フィルム袋はエスラップAL 150mm×250mm（スタープラスチック工業株式会社製造）を用いた。

PDA培地，Cz寒天培地に$CaCl_2$・H_2Oとクロラムフェニコール（50ppm）を添加し加圧滅菌後，Tween20を添加し平板としたものを「リパーゼ産生用培地」，寒天培地にSkim Milkとクロラムフェニコール（50ppm）を添加し加圧滅菌後平板にしたものを「プロテアーゼ産生用培地」とし，それぞれの培地に2.1で得られた２種の真菌を接種した後，次の１）～４）に示す包装条件と異なる温度条件（０℃，４℃，10℃）で20日間まで培養を行った。

１）含気包装（空気）

フィルム袋にシーラーを用いて簡易的に包装した。

２）真空包装（低酸素包装）

フィルム袋に真空機を用いて80％設定で包装した。

３）脱酸素剤パック

脱酸素剤とともにフィルム袋に密閉した。

４）対照（包装なし）

2.3　資化性試験

牛脂身部分をオートクレーブ滅菌（121℃15分）し，得られた油脂溶解液を60℃のインキュベータに１時間ほど入れ水分を蒸発させたものをPDA培地に重層し脂質資化用培地，また牛赤身肉を100℃で60分加熱後の抽出液を10％濃度でPDA培地に添加したものをたんぱく質資化用培地とし

© The Ito Foundation

た。対照はPDA培地とした。それぞれの培地に2.1で得られた２種の真菌を接種した後，４℃で40日間まで培養を行い５日ごとに経過を確認した。

３．結果と考察

3.1　供試菌株の分離

乾燥熟成牛肉より得られた真菌をPDA培地に接種し培養する操作を繰り返し分離した。得られた真菌の性状確認と形態観察を行い生理学的性質より*T. elegans*と*M. strictus*と同定した。２種の真菌は多くの真菌が発育至適温度帯とする25℃では発育せず20℃以下が発育至適温度帯であった。

3.2　包装条件比較試験

結果を**Table 1**，**Fig. 1**，**Fig. 2**に示す。PDA培地における０℃，５日間の条件では，すべての包装形態で発育が見られなかったが，４℃および

Table 1　Changes in growth during incubation,

		PDA						Proteolytic activity						Lipolytic activity					
		0℃		4℃		10℃		0℃		4℃		10℃		0℃		4℃		10℃	
		5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d	5d	20d
Mucor strictus	Air packaging	−	+	±	++	+	++	−	±	−	+	−	++	−	±	−	+	−	+
	Vacuum packaging (Low oxgen concentration)	−	+	±	++	+	++	−	±	−	+	−	++	−	±	−	+	−	+
	Oxygen absorber	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Non-packaging	−	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	−	±	−	+	−	+
Thamnidium elegans	Air packaging	−	+	−	++	+	++	−	+	−	+	−	++	−	±	−	±	−	±
	Vacuum packaging (Low oxgen concentration)	−	+	−	+	−	++	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Oxygen absorber	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
	Non-packaging	−	++	+	++	+	++	+	++	+	++	+	++	−	±	−	+	−	+

−，no growth；±，slightly growth；+，growth；++，well growth

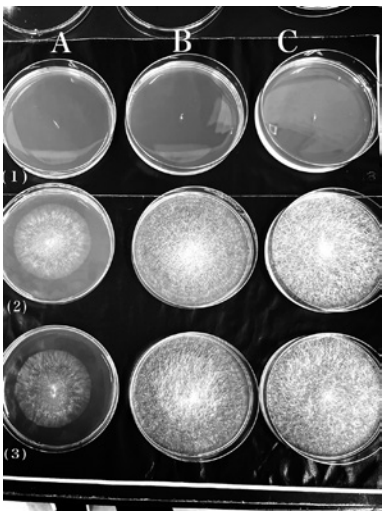

Fig. 1　PDA after 20 days of Mucor,
Incubation temperature　(A) 0 ℃ , (B) 4 ℃ and (C) 10℃
Packing　(1) Oxygen absorber, (2) Vacuum (Low oxygen) and (3) Air

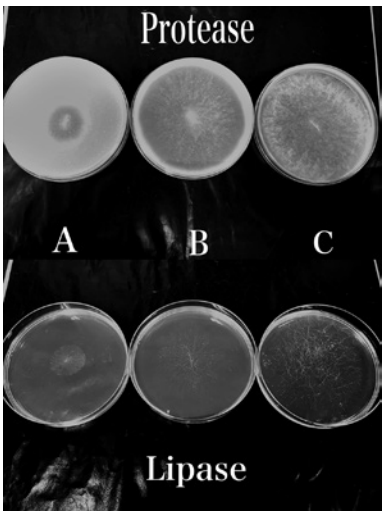

Fig. 2　Proteolytic activity and lipase activity after 20 days of Mucor,
Incubation temperature　(A) 0 ℃ , (B) 4 ℃ , (C) 10℃

© The Ito Foundation

10℃，５日間では真空包装でわずかに発育，含気包装では発育しており，対照としたPDA培地での発育速度と差がなかった。

また，脱酸素剤を用いた包装条件下では，*T. elegans*は長期間の培養で発育が確認された。しかしながら*M. strictus*では20日経過後まで発育が抑制された。この結果から，熟成肉より分離された低温性真菌は，短期間であれば低温環境下で酸素を遮断することにより発育を抑制でき，脱酸素剤を用いることでさらに長い期間発育を抑制できることが示された。今回の結果より，真菌の発育を抑制するためには酸素透過率の低い包材に加えて脱酸素剤を用いることが重要であった。加えて保管温度を可能な限り０℃付近までの低温とすることで真菌の発育をさらに制御することが可能となる。

多くの真菌は酸素要求度が高いと報告されているが[5)]，今回得られた結果からも２種の真菌は酸素環境下でよく発育することが確認された。また，今回対象とした真菌は低温環境下で発育するという特性上，一般的な真菌が発育し難いと思われる環境下でも発育が確認された。温度条件が低いほど真菌の発育には時間を要するため，熟成肉をトリミング処理後はできるだけ短期間で喫食することが意図せぬ真菌発育を防ぐためには重要であった。

食品衛生法で食肉の温度管理は10℃以下とされているため，一般的な流通条件では食肉に好低温性真菌の胞子が付着した場合，酸素が存在する包装形態では発育可能な環境にあると考えられる。乾燥熟成牛肉以外の製品であっても低温流通を必須とする食肉においては温度条件と包装条件が真菌の発育に大きく影響することが示唆された。

また「リパーゼ産生用培地」，「プロテアーゼ産生用培地」において*T. elegans*を接種したプロテアーゼ培地はPDA培地と同様の速さで発育が進んでいった。しかしながら，リパーゼ培地上では含気包装においてもコロニーの発育が悪く，酵素反応も弱かったため酸素量に加えて低温環境下も発育阻害に有効と言える。*M. strictus*においてもプロテアーゼ培地と比較するとリパーゼ培地では発育が遅い結果となった。これらのことにより低温環境下において酸素を遮断することで食肉中での真菌の発育を阻害するとともに，乾燥熟成牛肉の品質特性に影響し得る酵素反応も著しく低下することが推定された。

3.3　資化性試験

資化性とは，微生物がある物質を栄養源として利用し，発育できる性質を指す。本研究では乾燥熟成の原料肉に用いられることの多い牛肉を使用し，基質培地に栄養源として赤身部分と脂質部分をそれぞれ添加し，真菌の発育の違いを確認した。結果を**Table２**に示す。

*T. elegans*を接種したたんぱく質資化用培地は４℃，５日培養後にコロニーを形成し始め10日培養後には発育が明確に確認できた。対照のPDA培地と比較すると発育速度がかなり速いことが示された。一方，脂質資化用培地は，５日培養後にコロニーの形成は確認できたものの15～20日を経過するまで発育が弱く，PDA培地と同等の発育速度でコロニーを形成していった。*M. strictus*も，両培地において同様の発育速度で成長したことから，２種の真菌が好む基質と発育速度はかなり似ていることが示された。また，２種の真菌ともに脂質よりたんぱく質を資化する活性が非常に強い結果であった。

*T. elegans*は各条件下において熟成香特有のナッツ臭の出現は確認できなかったが，*M. strictus*は，脂質資化用培地において，15日目を経過後ナッツ臭が発現しはじめ，20日経過時には強いナッツ臭を確認することができた。この結果から，*M. strictus*は発育基質にはたんぱく質を好む

© The Ito Foundation

Table 2　Growth comparison of *Mucor* and *Thamnidium*.（incubation at 4℃）

Thamnidium elegans		preserved period（day）					
		5	10	15	20	30	40
Lipid	Colony	±	+	++	++	++	++
	Nytty flavor	−	−	−	−	−	−
Protein	Colony	+	+	++	++	++	++
	Nytty flavor	−	−	−	−	−	−
Control	Colony	+	+	++	++	++	++
	Nytty flavor	−	−	−	−	−	−

Mucor strictus		preserved period（day）					
		5	10	15	20	30	40
Lipid	Colony	±	+	+	+	+	+
	Nytty flavor	−	−	±	++	+	+
Protein	Colony	±	+	++	++	++	++
	Nytty flavor	−	−	−	−	−	−
Control	Colony	+	+	++	++	++	++
	Nytty flavor	−	−	−	+	+	+

−，no growth；±，slightly growth；+，growth；++，well growth

が，ナッツ臭の形成には脂質を利用している可能性が示唆された。さらに，脂質を基質とした場合，発育速度が遅くなることは，熟成日数が長期に必要なことと関連していると考えられた。このナッツ臭は*M. strictus*を接種したたんぱく質資化用培地では20日経過時も確認することができず，脂質資化用培地においてのみ発現したところが興味深い結果となった。また，これまでに真菌を利用せず熟成した乾燥熟成牛肉でナッツ臭が出現しなかった報告[6]と一致した結果が得られた。

通常乾燥熟成牛肉の製造には赤身肉が適していると言われているが，今回得られた結果によると，たんぱく添加培地では真菌の発育は速かったが，乾燥熟成牛肉独特の熟成香と呼ばれるナッツ臭は出現しなかった。これよりたんぱく質資化においては香り以外の肉質や呈味性などに対して強く影響し，低温環境での成長が速いという特性によって，他の真菌の発育を阻害している可能性を見出した。乾燥熟成牛肉の製造では，真菌の高いたんぱく質資化性を利用することで肉表面を真菌でカバーし微生物汚染を防ぎながら肉質や呈味性を向上させていくと同時に，真菌は脂質を利用し独特なナッツ臭を肉に付与することが，熟成肉に赤身肉が適しているとされる理由と考えられた。

一方の脂質添加培地は真菌が脂質を利用し十分に発育するまでに要する日数が乾燥熟成牛肉の熟成香出現の日数[4]と一致しており，*M. strictus*を培養した場合，あるいは熟成肉に利用した場合のナッツ臭を呈する時間とも一致していた。また，シャーレ上ではナッツ臭が20日後に強く現れて以降，40日経過までの期間徐々に香りが弱くなっていくことも確認されたが，実際の熟成肉中では食肉中の栄養源を利用して*M. strictus*が発育してナッツ臭を形成するサイクルができており，一定期間熟成香を保持しているのではないかと考えられた。乾燥熟成牛肉における独特の芳香は製品に付加価値を与える一方で，嗜好的に好まないという意見も聞かれるため，熟成期間に応じて香りの強弱のコントロールを可能にすることも期待できる結果が得られた。

© The Ito Foundation

４．要　約

本研究では，乾燥熟成牛肉の熟成香に影響を与える真菌の生理特性が熟成香の発現条件にどのように影響し生産時における指標となるかを目的として調査した。

異なる包装条件による真菌の発育特性の結果から，本研究により分離された*T. elegans*および*M. strictus*は，酸素要求性は高いが，真空包装のわずかな酸素しかない環境下でも発育をすることが確認された。これらの真菌の発育を出荷後の長期間の保管においてコントロールするためには０℃付近での温度管理と酸素除去剤や酸素透過率の低い包材を組み合わせることが有効であった。また，酵素基質培地においては低温環境下で発育が抑制されるとともに酵素反応が抑制され，特にリパーゼ反応において顕著であった。つまり，乾燥熟成牛肉より分離された真菌は，０℃前後の低温環境下でも発育は可能であるが，同時に熟成香に影響を与える酵素的作用が抑制されることが推定された。

資化性試験においては２種の真菌ともに脂質と比較するとたんぱく質を資化する活性が強い結果であった。しかしながら，*M. strictus*が産生する乾燥熟成牛肉特有のナッツ臭はたんぱく質資化性培地では発現せず，発育の遅かった脂質資化性培地で発現した。この結果は，芳香の発生要因は真菌の存在のみでなく，発育する基質や栄養源が大きく影響していることを示しており，ナッツ臭の発現には，脂質が基質となっている可能性が示唆された。また，利用する*M. strictus*の性質をコントロールすることでナッツ臭は抑えながら肉質のみを向上させるような熟成方法の検討が期待できる結果が得られた。

以上より，乾燥熟成では２種の真菌が複合的に関与し，他の微生物の侵入を結果的に防ぎながら肉質を向上させると同時に*M. strictus*が脂質を分解することにより熟成香が付与されていると推定された。また，流通時の予期せぬ真菌発生に対しても温度管理と包装形態を組み合わせることによりコントロールが可能であることが明らかになった。さらに今回の研究成果として，温度条件を設定することにより真菌の発育を調整することができれば芳香の強弱を制御することや，熟成期間の短縮も可能な結果が得られた。

文　献

1）西村敏英：日本味と匂学会誌, 8(2), 161～168, 2001.
2）市村さやか，高橋真佐郎，中村幸信，吉田由香，猪口由美，服部昭仁：平成30年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **37**, 54～63, 2019.
3）小林正人，佐々木整輝：平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **33**, 39～45, 2015.
4）中川麻衣，小室春菜，中島誠人，猪口由美，高鳥浩介：平成31年度（令和元年度）食肉に関する助成研究調査成果報告書, **38**, 20～25, 2020.
5）石谷孝佑：日本食品工業学会誌, 28(4), 53～66, 1981.
6）河原聡：平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, **36**, 68～73, 2018.

© 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（Ⅱ）

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

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 meat proteins as well as lipids in pork sausages. However, it is not clear that the mechanisms for binding aroma compounds with meat proteins.

The present research was carried out to clarify which protein in pork sausages contributed to hold 7 kinds of aroma compounds possessing different log P value. At first, sarcoplasmic proteins and myofibrillar proteins were prepared from pork meat. Then, the holding capacity of aroma compounds by each protein fraction of pork meat was evaluated by the measurement of amounts of aroma compounds released from the mixture containing each protein fraction after heating. D-limonene (log P ; 4.57), methyl propyl disulfide (log P ; 2.95), nonanal (log P ; 3.27) and caryophyllene (log P ; 6.30) were held by sarcoplasmic and myofibrillar proteins as well as casing, while guaiacol (log P ; 1.32), *m*-cresol (log P ; 1.96) and eugenol (log P ; 2.49) were not held by each protein of pork.

Tri acyl glycerol extracted by acetone from pork fat was also shown to hold D-limonene and caryophyllene tightly and also held methyl propyl disulfide and nonanal, while guaiacol, *m*-cresol, and eugenol were not held by tri acyl glycerol.

These results in this research suggested that aroma compounds possessing log P more than 3 were able to be held by meat proteins as well as lipids.

1．目　　的

著者らは，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（伊藤記念財団からの助成研究）[12～18]において，ポークソーセージのコクは，うま味物

© The Ito Foundation

質や脂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-ピネン，3-カレン，D-リモネンを含む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。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，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かったので，昨年度，食肉製品のケーシングに着目し，ケーシングに対する香気成分の結合性を調べ，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を明らかにした。

本年度は，まず，食肉製品に含まれる筋漿タンパク質と筋原線維タンパク質を調製し，これらに対する香気成分の保持効果を検討した。また，豚脂を分画し，各脂質画分への香気成分の保持効果を検討した。

2．実験方法

2.1　タンパク質による香気成分の保持効果

2.1.1　試薬

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，ジクロロメタンは関東化学(株)から，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。使用した７つの香気成分のlog Pを**Table 1** に示した。

2.1.2　筋肉タンパク質の分画と各タンパク質画分の調製[19)]

市販の豚ロース肉の脂肪や筋を取り除いた後，ミンサーでひき肉にした。

①筋肉に含まれるタンパク質の分画

10gのひき肉に60mlの超純水を加えて，ホモジナイズした。これを10000rpmで20分間遠心分離し，上清と沈殿をそれぞれ回収した。上清を筋漿タンパク質画分，沈殿を筋原線維タンパク質含有画分とした。残ったひき肉はすべて－80℃で保管した。

Table 1　Log P of volatile compounds used in this research

Name of volatile compound	Log P
①　D-Limonene	4.57
②　Methyl propyl disulfide	2.95
③　Nonanal	3.27
④　Caryophyllene	6.30
⑤　Guaiacol	1.32
⑥　*m*-Cresol	1.96
⑦　Eugenol	2.49

© The Ito Foundation

②筋漿タンパク質画分の調製

①の上清画分を用い，低分子画分を除去するため，超純水を用いて透析した。上清の溶液を分子量10000カットオフの透析膜に入れた後，このチューブを上清容量の40倍容量の超純水中に入れ，4℃で透析した。この操作を３回繰り返し，遊離アミノ酸等の低分子を除去した。これを－80℃で保管した。

③筋原線維タンパク質画分の調製

①の沈殿を超純水35mlで懸濁し，10000rpmで遠心分離した。上澄みを捨て，さらに同じ操作を２回繰り返した。２回洗浄後の沈殿を30mlの超純水で懸濁し，均一な状態にして－80℃で保管した。

④凍結乾燥

各試料を凍結乾燥するため，－80℃で保管していたひき肉，②筋漿タンパク質画分と③筋原線維タンパク質画分の凍結試料を凍結乾燥機で乾燥した。その結果，肉タンパク質2.4g，筋漿タンパク質画分0.27g，筋原線維画分1.36gが得られた。

2.1.3　各タンパク質画分による香気成分の保持特性の測定

2.1.2で得られた筋漿タンパク質，筋原線維タンパク質と，豚ひき肉乾燥物，羊腸ケーシングの４種類のタンパク質を用いて，香気成分の結合性を調べた。用いた香気成分は，メチルプロピルジスルフィド，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，オイゲノールの７種類である。内部標準物質として，ジメチルフタレートを使用した。

試験管に各タンパク質画分0.05gを精秤した。これに，氷水中で，ジクロロメタンで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。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，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1ml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。

2.1.4　GC/MSによる香気成分の比較ならびに同定

モノトラップ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60m×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ジメチルフタレートを用いた。キャリアガスの流量は，1.75ml/minで分析した。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。

2.2　豚脂に含まれる各脂質による香気成分の保持特性

2.2.1　試薬

特級メタノールは富士フイルム和光純薬(株)から，特級クロロホルムと特級アセトンは東京化成工業(株)から購入した。

2.2.2　脂質の溶媒分画[20]

豚脂10gを細切した後，100mlのアセトンを添加し，ホモジナイズした。これをろ過し，可溶画分と不溶画分に分けた。不溶画分に10倍量のジエ

© The Ito Foundation

Table 2　Amount of each lipid fraction recovered by solvent fractionation

Fraction（compound extracted by each solvent）	画分の回収量（g）
Acetone fraction（mainly tri-acyl glycerol）	6.60
Diethyl ether fraction（mainly phospholipid）	1.01
Chloroform/ether fraction（mainly sphingolipid）	trace

チルエーテルを加えて，十分に撹拌し，ジエチルエーテル可溶画分と不溶画分に分けた。次に，ジエチルエーテル不溶画分に，約10倍量のクロロホルム：メタノール（2：1）混合液を加え，可溶画分と不溶画分に分けた。このように分画した中で，アセトン可溶画分を中性脂肪画分，ジエチルエーテル画分をリン脂質画分とした。クロロホルム：メタノール（2：1）画分をリン脂質・糖脂質画分とした。

各画分の溶媒を留去した後，重量を測定した結果，**Table２**にように回収された。

2.2.3　香気成分の脂質との結合性（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0.05gの分画した脂質を精秤した後，氷水中で，ジクロロメタンで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。これ以降の作業は，2.1.3と同様に行った。

2.2.4　GC/MSによる香気成分の比較ならびに同定

モノトラップ（Mono Trap）から得られた香気成分を，2.1.4と同様の方法で分析し，香気成分を同定した。

３．結果と考察

3.1　香気成分の筋漿タンパク質画分，筋原線維タンパク質画分，肉タンパク質との結合性

各試料と香気成分の混合物を加熱した後のグアヤコール，*m*-クレゾールならびにオイゲノールの放出量は，いずれのタンパク質でも，タンパク質無添加の場合の放出量と変わらず，これらの物質はタンパク質と結合しないことが明らかとなった（**Fig. 1 , 2**）。一方，D-リモネン，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールおよびカリオフィレンの放出量は，いずれのタンパク質を添加した画分でも多く，これらの香気成分は，各タンパク質と結合性が強く，保持されていることが明らかとなった。

リモネンは，筋漿タンパク質との結合性が高く，メチルプロピルジスルフィドとノナナールは筋原線維タンパク質との結合性が高いことが判明した。カリオフィレンの結合性は，両者で違いが認められなかった。また，両方のタンパク質を含む肉タンパク質は，これら４つの香気成分に対して強い結合性を示した。

今回，実験で用いた７つの化合物と各タンパク質画分の結合性を，香気成分のlog Pから見てみると，各タンパク質と結合した４つの香気成分のlog Pは，2.95～6.30のものであった。一方，結合性の認められなかったグアヤコール，*m*-クレゾールならびにオイゲノールのlog Pは，1.32～2.49で，他の４成分より低い値であった。Log Pが2.5付近で，タンパク質との結合性に違いが生じると推定された。また，香気物質は，タンパク質と疎水結合で結合していると考えられるが，そのメカニズムは証明されているわけではないので，香気成分保持のメカニズムを解明するのは，興味深い課題である。

© The Ito Foundation

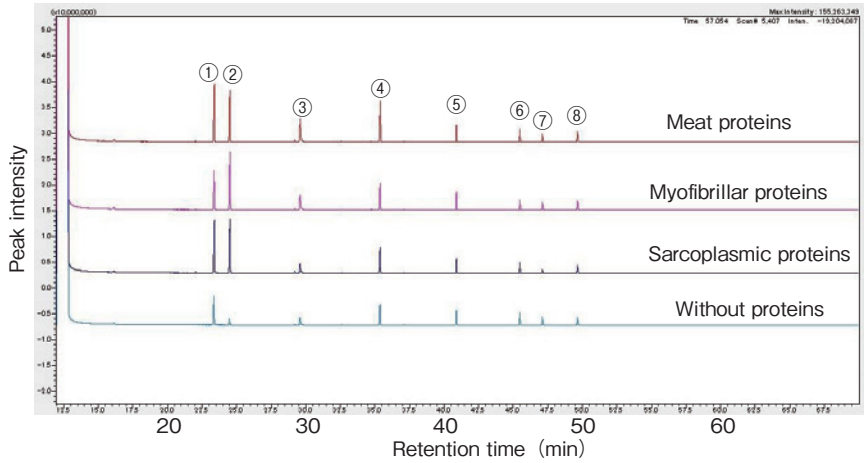

Fig. 1　Chromatogram of aroma compounds released from the mixture containing each protein after heating（① D-Limonene, ②Methyl propyl disulfide, ③Nonanal, ④Caryophyllene, ⑤Guaiacol, ⑥*m*-Cresol, ⑦Eugenol, ⑧Internal standard）

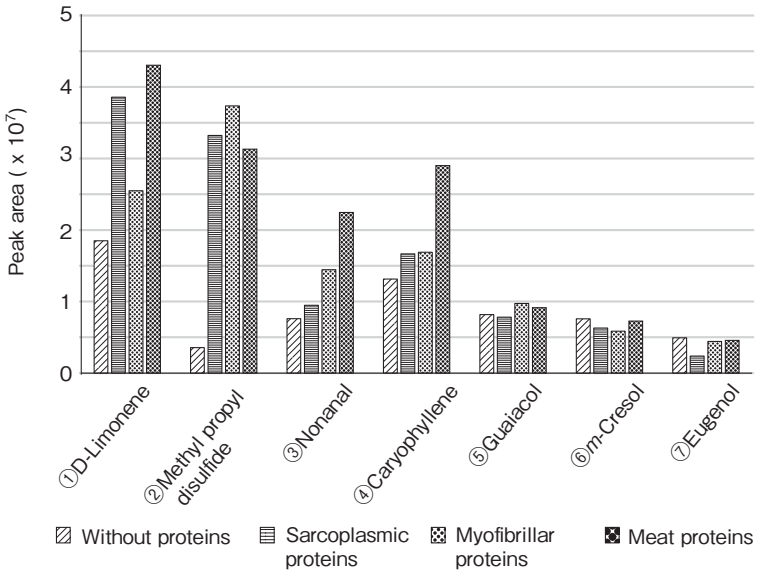

Fig. 2　Amounts of aroma compounds released from the mixture containing each protein after heating

3.2　香気成分のケーシングとの結合性

前年度は，メチルプロピルジスルフィド，ノナナール，グアヤコールを用いて，ケーシングとの結合性を調べた。今年度は，これらに加えて，D-リモネン，カリオフィレン，*m*-クレゾールならびにオイゲノールのケーシングとの結合性を調べた。その結果，**Fig. 3** に示すように，グアヤコール，*m*-クレゾールならびにオイゲノールの放出量は，ケーシング無添加の場合の放出量と変わらず，これらの物質は，他のタンパク質と同様，結合しないことが明らかとなった。一方，D-リモネン，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールおよびカリオフィレンの放出量は，ケーシングを添加した画分で多く，これらの香気成分は，各タ

© The Ito Foundation

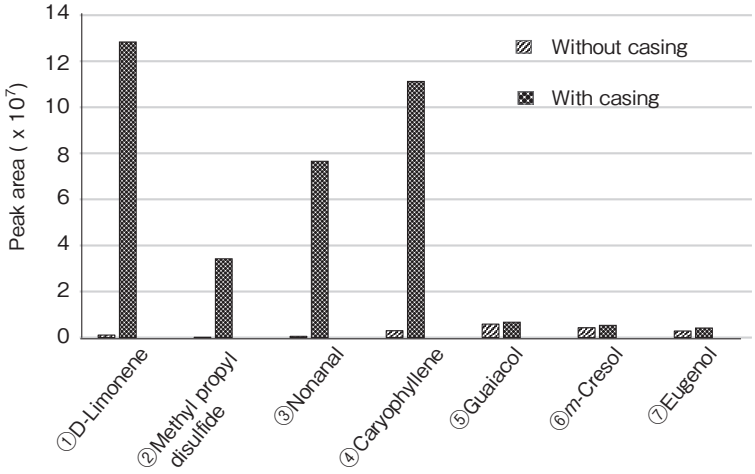

Fig. 3　Amounts of aroma compounds released from casing after heating

ンパク質と結合性が強く，保持されていることが明らかとなった。グアヤコール，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールのケーシングとの結合性は，前年度と同様の結果となった。以上の結果から，3.1で明らかとなった肉に含まれるタンパク質との結合性と同様に，log Pが2.95～6.30の香気成分が，主にコラーゲンやエラスチンからなるケーシングと結合できることが判明した。

3.3　豚脂に含まれる各脂質による香気成分の保持特性

各画分の脂質0.05g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，ノナナール，カリオフィレン，グアヤコール，*m*-クレゾール，オイゲノールならびにメチルプロピルジスルフィドの計７種類の香気成分を添加し，保持効果を調べた（**Fig. 4**）。

各香気成分の脂質への結合性は，脂質画分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，脂質画分の添加でも少量保持されることが明らかとなったが，脂質がなくても香気成分が溶液中に残存していたことから，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1.32，1.96，2.49で，３よりも小さかった。

一方，アセトン画分の中性脂肪には，D-リモネンとカリオフィレンが強く結合することが明らかとなった。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。今回分画されたアセトン画分に，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，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールもアセトン画分の中性脂肪と結合する可能性が示唆された。

さらに，エーテル画分には，リモネンとカリオフィレンが結合す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，今回のエーテル画分には，リン脂質が含まれている可能性があると考えられる。以上の結果から，D-リモネン，メチルプロピルジスルフィド，ノナナール，カリオフィレンは，アセトン画分に含まれる中性脂肪と結合することが示唆された。

© The Ito Foundation

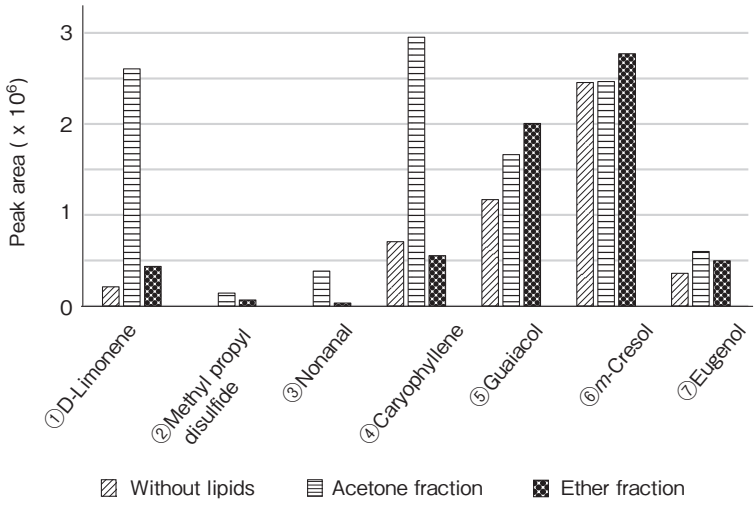

Fig. 4　Amounts of aroma compounds released from lipids in pork after heating

これら４成分のlog Pは，それぞれ4.57，2.95，3.27，6.30で，いずれも３かそれより大きい値を示した。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。これらの香気成分は，肉のタンパク質とも結合性を有することが明らかとなっていることから，log Pが３以上の香気成分は，タンパク質や脂質に結合できる可能性が推察された。今後は，log Pを考慮して，タンパク質や脂質への結合性を推定できると考えられる。

４．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。これまで，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を明らかとしてきた。

本研究では，ソーセージの原料である食肉タンパク質に着目して，香気成分の保持能力を検討した。その結果，D-リモネン，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールおよびカリオフィレンは，筋漿タンパク質，筋原線維タンパク質，肉タンパク質と結合性が強く，保持されることが明らかとなった。これらの香気成分は，ケーシングとの結合性でも，同様の結果となった。各タンパク質と結合した４つの香気成分のlog Pは，2.95～6.30であった。一方，結合性の認められなかったグアヤコール，*m*-クレゾールならびにオイゲノールのlog Pは1.32～2.49で，他の４成分より低い値であった。Log Pが３付近で，タンパク質との結合性に違いが生じると推定された。また，香気物質は，タンパク質と疎水結合で結合していると考えられるが，そのメカニズムは証明されているわけではないので，今後に解明すべき興味深い課題である。

脂質からアセトンで抽出された中性脂肪は，D-リモネンとカリオフィレンが強く結合することが明らかとなった。また，メチルプロピルジスルフィド，ノナナールもアセトン画分の中性脂肪と結合する可能性が示唆された。これら４成分のlog Pは，それぞれ4.57，2.95，3.27，6.30で，いずれも３かそれより大きい値を示した。

以上の結果から，log Pが３以上の香気成分は，

© The Ito Foundation

タンパク質や脂質に結合できる可能性が推察された。

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, 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.

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（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.

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.

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） 西村敏英, 山口千里：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, 令和３年度　食肉に関する助成研究調査成果報告書, Vol.40, 41～48, 2022.

19） Yan, R., Okitani, A., Fujimaki, M.：Effect of Trypsin Treatment on the ATPase Activity of Myofibrils from the Stored Rabbit Muscle, *Agricultural Biological Chemistry*, **36**(12), 2087～2095, 1972.

20） 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

黒毛和種牛肉の香り特性の改善に関わる脂質過酸化反応系の解析
―コールドチェーン物流の転換に向けた科学的アプローチ―

Analysis of the enzymatic reaction system of lipid oxidase involved in the improvements of aroma characteristics of Japanese Black cattle beef

上　田　修　司
（神戸大学大学院農学研究科）

Shuji Ueda
（Graduate School of Agricultural Science, Kobe University）

Meat is usually exported in vacuum-packed block pieces. However, this method has disadvantages, such as low transportation efficiency and drip losses. The cold chain from production to consumption needs to be improved to reduce food waste in meat production. Japanese Black cattle beef accounts for approximately 50% of Japan's livestock exports. The Wagyu aroma of Japanese Black cattle beef is composed of volatile compounds produced by the Maillard reaction. Lactones produced by lipid oxidation contribute notably to the sweet aroma of Wagyu beef. In this study, we propose a new film packaging that achieves both aroma and quality to enhance the value of Japanese Black cattle in the premium market. We also analyze enzymatic lipid oxidation of unsaturated fatty acids in Japanese Black cattle beef during cold storage and propose a new cold chain for fresh meat based on the results. Skin-pack packaging of Japanese Black cattle beef resulted in significant changes in meat color depending on the oxygen barrier performance of the film material. Especially in long-term storage, the oxygen barrier film was suggested to reduce flavor loss and drip loss of meat effectively. The effect of cold storage of vacuum-packed Japanese Black cattle beef on Wagyu aroma was examined by forming lactone precursors (hydroxy fatty acids). Hydroxy fatty acids were analyzed by LC-MS, and 9S-HODE, 13S-HODE, and 13-KODE derived from linoleic acid were detected in beef at 6 and 21 days after slaughter. Comparing "basic film" and "oxygen barrier film" used for vacuum packaging showed no significant differences in hydroxy fatty acids. We propose a new cold chain using oxygen barrier film packaging for fresh meat based on our results.

1．目　　的

食肉の輸出は，真空包装したブロック肉の状態で配送されている。しかし，この配送方法は，不揃いなブロック肉を箱詰めするため，梱包時に不要なスペースができやすく，輸送時の積載効率の低下につながっている。また，ブロック肉は，解凍時に大量のドリップが出るなど，デメリットが

© The Ito Foundation

指摘されている。食肉製造における食品廃棄の削減は，経済的な理由，環境への配慮から重要性が高まっている。サプライチェーン（生産，加工，輸送，消費段階）の効率的な管理への改善が求められている[1)]。

我が国の畜産物の輸出実績は，黒毛和種牛肉の輸出が520億円（2022年度実績）で，全体の約50％を占める。近年，食肉現場では，黒毛和種牛肉の香りに対する関心が高まっている。食肉産業の振興において，黒毛和種牛肉の品質を落とさず，海外輸送が可能な包装形態の検討は重要な課題である。

牛肉の香りは，何百もの揮発性化合物からなる複雑な混合臭である[2)]。香り成分は，有機酸，脂肪酸，糖類のメイラード反応とストレッカー分解によって生成する。黒毛和種牛肉の調理時に生じる甘い香りは，霜降りと並ぶ黒毛和種牛肉の特徴として珍重されている。この香り成分は，環状エステル化合物のラクトンが主体である[3)]。

我々は，黒毛和種牛肉を匂い嗅ぎガスクロマトグラフィーで分析し，甘い香りの成分の同定を行った[4)]。その結果，γ-ヘキサラクトンを同定し，FDファクターで算出される香気寄与度の高さなどを鑑み，牛肉の鼻先に感じるナッツのような香気に寄与すると推察している。

本研究課題では，近年，コールドチェーンで注目されているスキンパック包装について，使用するフィルムの違いによる黒毛和種牛肉の肉色への影響について検討を行った。さらに，黒毛和種の香り成分であるラクトンの材料に着目し，低温保存中に生じる脂質過酸化物の経時的変化を解析した。これらの結果を基に，本研究課題の成果として，生鮮食肉の加工に最適な酸素バリアフィルム包装の新たな工程を提案する。

2．方　法

2.1　牛肉のスキンパック包装食肉の調製

同一個体の黒毛和種のロース，モモ肉より，「と畜日６日目」と，さらに冷蔵保存した「と畜日28日目」を準備し，厚さ５mmに柵切り後，連続式大型包装機であるMULTIVACシステム（東京食品機械株式会社）を用いて，スキンパック包装を試作した。フィルムには，ノンバリア性フィルム（CEL-9030D），酸素ハイバリア性フィルム（CEL-9830C）を用いた。

2.2　画像解析と食味試験

食肉の画像解析では，シュナイダー・クロイツナッハ製レンズを搭載したハイパースペクトロカメラ（IMEC社製；Snapscan, VNIR　#B150U-1050）を用いて，可視光波長領域（470～900nm）を画像撮影した。食味試験は，家畜改良センター編集の「食肉の官能評価ガイドライン」に従って行った。

2.3　酸素バリアフィルム包装食肉の調製

と畜６日目の黒毛和種のロースを調達し，酸素ハイバリアフィルム（酸素透過度：6cm^3/m^2・24時間・atm，水蒸気透過度：7g/m^2・24時間），または通常フィルム（酸素透過度：49cm^3/m^2・24時間・atm，水蒸気透過度：7g/m^2・24時間）で真空包装し，と畜21日目まで冷蔵（４℃）保管後，急速凍結し，分析まで－80℃で保管した。

2.4　ヒドロキシ脂肪酸のLC-MS/MSによる分析

酸化脂肪酸は，ロース芯より回収した牛肉粉末から脂質画分をメタノール抽出し，HLBカラムで固相抽出した。ヒドロキシ脂肪酸は，XBridge C18カラム（日本ウォーターズ株式会社）を備えた高速液体クロマトグラフィーNexeraLC-30ADシステム（株式会社島津製作所）で分離し，トリプル四重極質量分析計LC-MS-8040（島津製作

© The Ito Foundation

所）で分析した。内部標準には，12,13−diHOME−d４，13S−HODE−d４，13−KODE−d３，12,13−EpOME−d４（ケイマンケミカルズ社）を使用した。データ分析は，LabSolutionsソフトウェア（島津製作所）を使用した。統計解析は，エクセル統計（ベルカーブ株式会社）を使用した。

３．結果と考察

3.1　スキンパック包装による黒毛和種牛肉の肉色への影響

コールドチェーンの適切な加工時期を検討するため，黒毛和種牛肉のロース，モモ肉を「と畜後６日目」と「と畜後28日目」でスキンパック包装した。スキンパック包装は，フタとなるフィルムと底材の台紙で構成される。本研究では，台紙はトレーパックを使用し，フィルムはノンバリアと酸素バリア性フィルムを用いて比較した。

ノンバリア包装した牛肉の肉色は，「と畜６日目」のロースとモモ肉でともに，カット直後に見られる鮮紅色を示した。一方，酸素バリア性フィルムでは，包装後に肉色の暗赤色化が観察された。この肉色変化は，牛肉内の酸素の低下によるミオグロビンの酸化型から還元型への遷移による色調変化と考えられる[5]。「と畜28日目」の牛肉は，「と畜６日目」に比べて，ロースとモモ肉でともに鮮紅色が減少した（**Fig. 1**）。

スキンパック開封後の肉色変化では，ノンバリア包装は，冷蔵保管期間が長くなるにつれて，鮮紅色から暗褐色に変わり，包装開封後の肉色の変化は軽微であった。酸素バリア性フィルムでは，包装開封後の暗赤色から鮮紅色に変化が観察された。酸素バリア性フィルムの鮮紅色への変化は，「と畜28日目」に比べて，「と畜６日目」でより顕著であった。肉色の計測には，ハイパースペクトロカメラを使用した[6]。「と畜28日目」のロースとモモ肉のスキンパック包装食肉の開封後の肉色の変化の様子を，ハイパースペクトロカメラで捉えた画像で示す（**Fig. 2**）。脂肪組織の偏在が見られる黒毛和種牛肉の場合，従来のRGBカメラでは霜降りの割合の影響を大きく受ける。ハイパースペクトロカメラは，ピクセル単位で分光データを取ることが可能なため，赤身，霜降り，皮下脂肪の組織ごとの肉色の比較が可能となった。

3.2　スキンパック包装による肉質への影響

スキンパック包装した黒毛和種牛肉を食味した結果，ノンバリア，酸素バリア性フィルム包装し

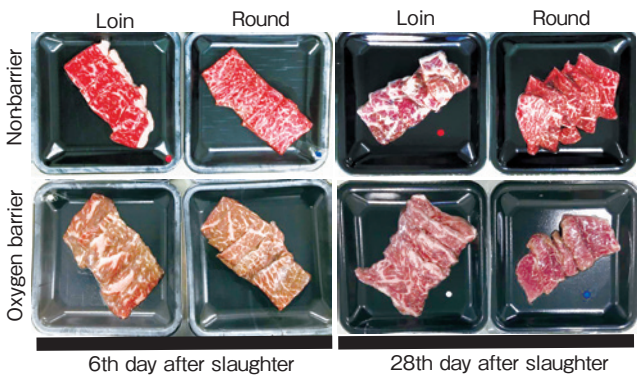

Fig. 1　Effects of different oxygen barrier performance of meat packaging films on meat quality.
Japanese Black cattle beef prepared at “6 days after slaughter” and “28 days after slaughter” were vacuum−packed in skin packs. Comparison of appearance shows that the non−barrier film exhibits a bright, fresh red color. The high−barrier film packaging shows dark red meat color due to reduction reaction by myoglobin.

© The Ito Foundation

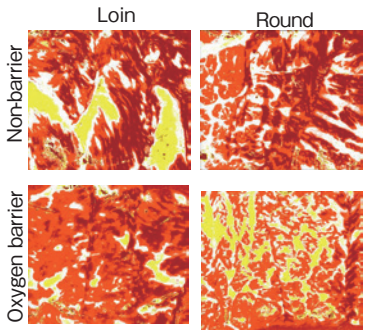

Fig. 2　Image analysis with hyperspectral camera. The picture shows a pseudo-color image of meat color after opening the "28th day after slaughter" skin pack packaging. Muscle tissue is shown in red, and is classified into dark red and light red according to differences in meat color. The oxygen high-barrier film clearly shows a brighter flesh color after opening than the non-barrier film.

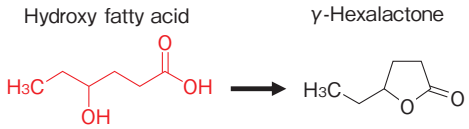

Fig. 3　Condensation reaction of dehydration by heating and cooking. Hydroxy fatty acids are degraded to 4-hydroxyhexanoic acid, followed by cyclization reactions to γ-hexalactone.

た牛肉で，食味に影響するような，色沢，外観，ドリップ，臭いの違いは観察されなかった。しかし，ノンバリアでは，解凍後２日間の冷蔵保管により，肉の旨味の低下，ドリップの流出，多汁性の低下，苦味の増加が感じられた。特に，モモ肉では，その味覚の差は顕著であった。一方，酸素バリア性フィルムでは，ノンバリアに比べ，ドリップの流出がほとんどなく，旨味の低下は感じられなかった。

肉の旨味は，低温保存中に生じるタンパク質分解物のグルタミン酸，核酸分解物のイノシン酸などが深く関係する。また，タンパク質の酸化による凝集がドリップの流出を増加させると考えられる。フィルムの酸素バリア性能の違いが，牛肉の肉色と食味性に影響することが示唆された。

3.3　スキンパック包装による黒毛和種牛肉の肉色への影響

牛肉のラクトンの生合成は，脂肪酸が材料と推定される。これまでの研究では，多価不飽和脂肪酸のリノール酸とγ-ヘキサラクトンの相関が認められた[7]。ラクトンの複素環は，ヒドロキシ脂肪酸のヒドロキシ基（-OH）とカルボキシル基（-COOH）が脱水縮合して生じる（**Fig. 3**）[8, 9]。我々は，前駆物質の探索を通して，リノール酸の酸化脂質であるヒドロキシ脂肪酸の9S-hydroxy-10E, 12Z-octadecadienoic acid（9S-HODE）と13-hydroxy-9Z, 11E-octadecadienoic acid（13S-HODE）が，ラクトンの形成過程の中間体であることを示した（**Fig. 4A**）[10]。このヒドロキシ脂肪酸の生合成は，不飽和脂肪酸のシス型二重結合の酸化反応である。

本研究課題では，ヒドロキシ脂肪酸を香りの指標と捉え，酸素バリア性の異なるフィルムで真空包装した黒毛和種牛肉の低温保存中の経時的変化を解析した。ヒドロキシ脂肪酸の測定は，トリプル四重極質量分析計を使用した。その結果，

© The Ito Foundation

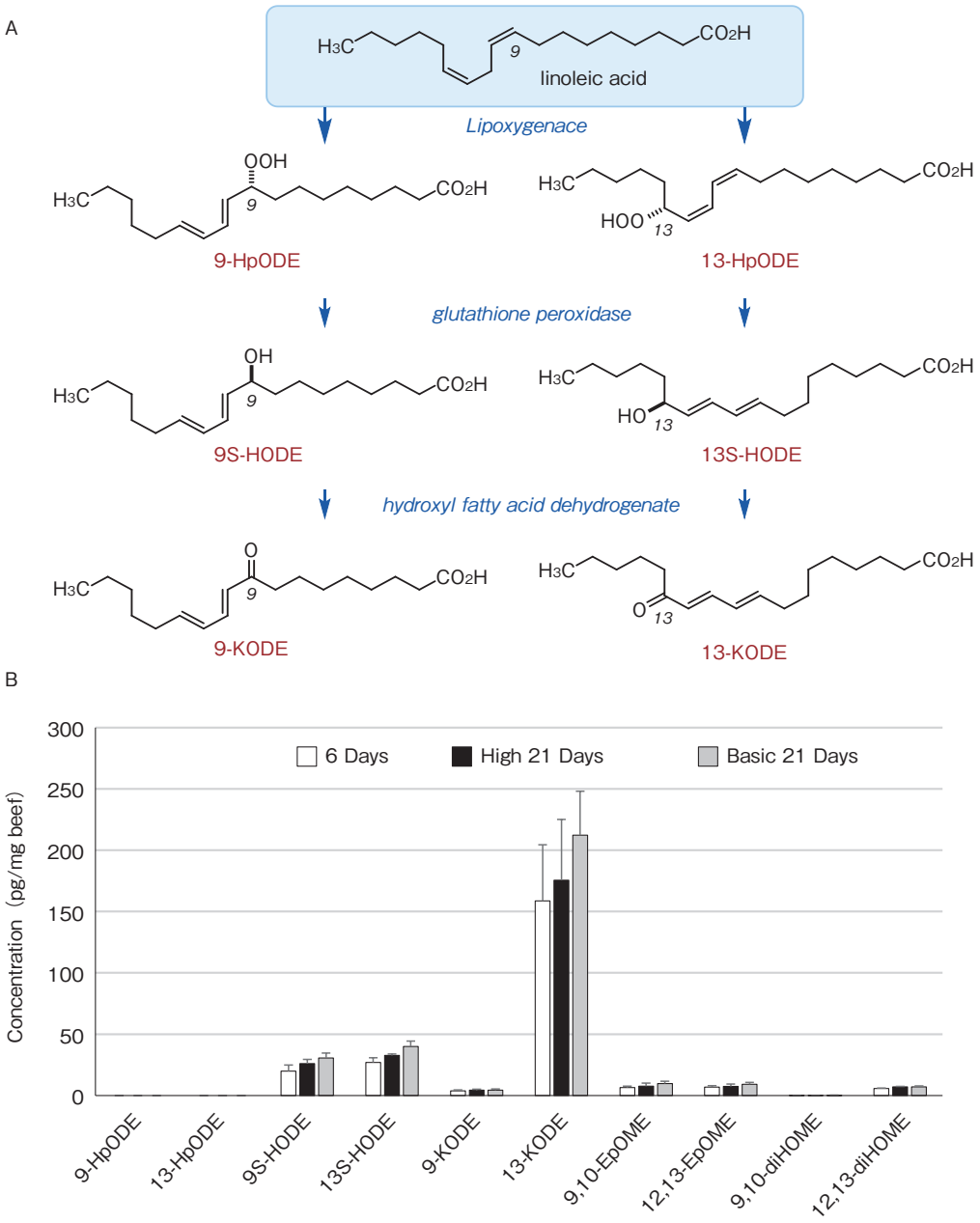

Fig. 4　Quantitation of oxidative metabolites of linoleic acid. (A) Schematic diagram of lipid oxidation of linoleic acid. (B) Composition of oxidized linoleic acid in beef tallow. The graph shows the mean values obtained from three analyses of independently prepared samples. Data represent the mean ± standard error (n = 3). Bonferroni test showed no significant differences between samples (6 Days vs High 21Days vs Basic 21Days).

9S-HODE, 13S-HODEに加え，13S-HODEがケトン化した13-oxo-9Z, 11E-octadecadienoic acid (13-KODE) が検出された（**Fig. 4B**）。「と畜6日目」と比べ，酸素ハイバリアフィルム（表記；High 21 Days），またはローバリア性の通常フィルム（表記；Basic 21 Days）で15日間低温保存した食肉間で，酸化脂肪酸の生成量に有意差は認められなかった。リノール酸の13位のヒドロペル

© The Ito Foundation

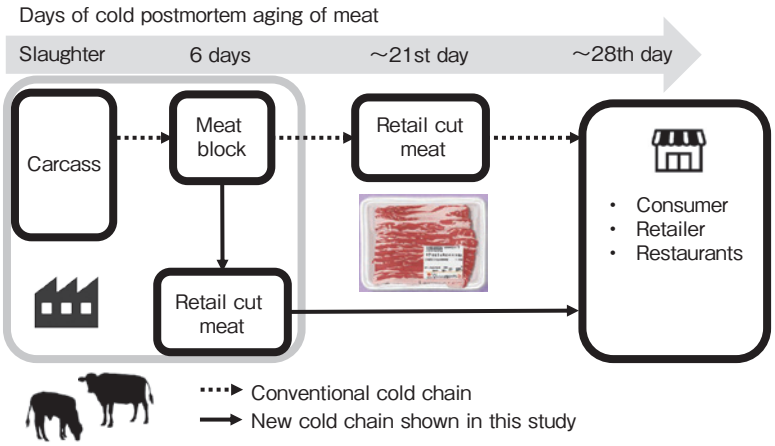

Fig. 5　A new cold chain flow for Japanese Black cattle beef.
This study proposes a cold chain in which carcasses are cut into portions, followed rapidly by retail cutting and vacuum packaging. This method promotes enzymatic lipid oxidation on the surface of beef by cutting early after slaughter. In addition, packaging with oxygen barrier film is expected to retain freshness and reduce deterioration of meat quality.

オキシド化は，酵素的にはアラキドン酸リポキシゲナーゼ15に限られた反応である[10]。今回の条件は，日本式の熟成であるウェットエイジングに相当する。黒毛和種牛肉は，他の品種に比べて脂質含量が高く，13-KODEは「と畜６日目」で約150pg/mg程度存在することが示された。本研究課題の申請時は，低温保存中の脂質酸化を期待していたが，研究により，「と畜６日目」ですでに十分な脂質酸化が進んでいることが示唆された。

これらの結果を基に，生肉の酸素バリアフィルム包装を用いた新しいコールドチェーンとして，枝肉からブロック肉を切り分けた後，速やかにリテールカットと真空包装を行う生鮮食肉の加工に最適な酸素バリアフィルム包装の新たな工程を提案する（**Fig. 5**）。この工程では，と殺後早期にカットすることで，牛肉表面の酵素による脂質の酸化を促進することで香りの向上に加え，酸素バリア性フィルムで包装することで，食肉の鮮度保持や肉質の劣化を抑制することが期待される。

４．要　　約

牛肉は，通常，真空包装されたブロック肉の状態で輸出される。しかし，この包装形態は，広く汎用されているが，輸送効率の低さ，解凍時のドリップロスなどのデメリットが存在する。食肉分野における食品廃棄を減らすには，生産から消費者に至るコールドチェーンの改善が必要である。黒毛和種牛肉は，日本の畜産物輸出の約５割を占め，我が国の畜産振興における期待は大きい。黒毛和種牛肉の特徴である甘い香りは，酸化脂質の縮合反応によって生じるラクトンが寄与する。

本研究課題では，黒毛和種牛肉のプレミアム市場での価値を，さらに高めるため，香りと品質を両立させる新しい流通形態を提案するため，以下の研究を行った。まず，現在，海外を中心に新しい包装形態として注目されているスキンパック包装を黒毛和種牛肉に導入し，肉色，味覚，ドリップに対する効果を検討した。その結果，スキンパック包装のフィルム素材によって，影響が確認された。酸素バリア性能の高いフィルムでは，ミオグロビンによる還元により，肉色の低下が認められたが，長期保存においては，酸素バリアフィルム包装食肉で，食肉の旨味ロス，ドリップロスの低減に有効であることが示唆された。

© The Ito Foundation

次に，真空包装した黒毛和種牛肉の低温保存が香りに与える影響について，ラクトン前駆体（ヒドロキシ脂肪酸）の生成により検討した。その結果，と殺後６日および21日の牛肉からリノール酸由来のヒドロキシ脂肪酸の派生物である9S-HODE, 13S-HODE, 13-KODEが検出された。真空包装素材に用いる通常フィルムと酸素バリア性フィルムを比較したところ，ヒドロキシ脂肪酸に有意差は見られなかった。

今回の結果を踏まえ，生肉の酸素バリアフィルム包装を用いた新しいコールドチェーンとして，枝肉からブロック肉を切り分けた後，速やかにリテールカットと真空包装を行う工程を提案する。

文　献

1） Karwowska, M., Łaba, S., Szczepański, K.：Food Loss and Waste in Meat Sector-Why the Consumption Stage Generates the Most Losses?, *Sustainability*, vol. 13, 2021.

2） Kaczmarska, K., Taylor, M., Piyasiri, U., Frank, D.：Flavor and Metabolite Profiles of Meat, Meat Substitutes, and Traditional Plant-Based High-Protein Food Products Available in Australia, *Foods*（*Basel, Switzerland*）, 10(4)，801，2021.

3） Matsuishi, M., Fujimori, M., Okitani, A.：Wagyu beef aroma in Wagyu（Japanese Black cattle）beef preferred by the Japanese over imported beef, *Nihon Chikusan Gakkaiho*, 72(6)，498～504，2001.

4） Ueda, S., Yamanoue, M., Sira,i Y., Iwamoto, E.：Exploring the Characteristic Aroma of Beef from Japanese Black Cattle（Japanese Wagyu）via Sensory Evaluation and Gas Chromatography-Olfactometry, *Metabolites*, vol. 11，2021.

5） Ramanathan, R., Suman, S. P., Faustman, C.：Biomolecular Interactions Governing Fresh Meat Color in Post-mortem Skeletal Muscle: A Review, *J Agric Food Chem*, 68(46)，12779～12787，2020

6） Dixit, Y., Hitchman, S., Hicks, T. M., Lim, P., Wong, C. K., Holibar, L., Gordon, K. C., Loeffen, M., Farouk, M. M., Craigie, C. R. *et al.*：Non-invasive spectroscopic and imaging systems for prediction of beef quality in a meat processing pilot plant, *Meat Science*, 181，108410，2021.

7） Ueda, S., Sasaki, R., Nakabayashi, R., Yamanoue, M., Sirai, Y., Iwamoto, E.：Exploring the Lipids Involved in the Formation of Characteristic Lactones in Japanese Black Cattle, *Metabolites*, 11(4)，203，2021.

8） Davis, K. E., Hickey, L. D., Goodpaster, J. V.：Detection of γ-hydroxybutyric acid（GHB）and γ-butyrolactone（GBL）in alcoholic beverages via total vaporization solid-phase microextraction（TV-SPME）and gas chromatography-mass spectrometry, *J Forensic Sci*, 66(3)，846～853，2021.

9） Kang, W. R., Seo, M. J., An, J. U., Shin, K. C., Oh, D. K.：Production of δ-decalactone from linoleic acid via 13-hydroxy-9（Z）-octadecenoic acid intermediate by one-pot reaction using linoleate 13-hydratase and whole Yarrowia lipolytica cells, *Biotechnol Lett*, 38(5)，817～823，2016.

10） Ueda, S., Hosoda, M., Kasamatsu, K., Horiuchi, M., Nakabayashi, R., Kang, B., Shinohara, M., Nakanishi, H., Ohto-Nakanishi, T., Yamanoue, M., *et al.*：Production of Hydroxy Fatty Acids, Precursors of γ-Hexalactone, Contributes to the Characteristic Sweet Aroma of Beef, *Metabolites*, vol. 12，2022.

© The Ito Foundation

畜産副生物から作成された再生医療部材の引張強度の解明

Tensile strength of regenerative medicine components created from livestock by-products

神　田　英　輝
（名古屋大学大学院工学研究科）

Hideki Kanda
(Graduate School of Engineering, Nagoya University)

In our previous FY2020 funded research report, we proposed a method for decellularizing porcine and ostrich arteries using liquefied dimethyl ether (DME) instead of conventional sodium dodecyl sulfate (SDS) to remove lipids, followed by DNA fragmentation with DNase. In this study, the physical properties of porcine aorta and ostrich carotid artery decellularized using the combined DME and DNase method were evaluated by tensile strength testing. Porcine aorta decellularized by the conventional SDS method was found to be three-dimensionally swollen, very easy to fracture, and lacking in strength. On the other hand, the DME-treated samples were found to have lower elasticity, but the maximum stress required for rupture was greater than that of the original aorta. This decrease in elasticity may be attributed to the appearance of transient C＝N bonds due to the Schiff base reaction that occurs during lipid removal by liquefied DME. To circumvent this problem, we used ostrich carotid tissue, in which the Schiff base reaction does not occur, in a treatment method combining DME and DNase, and found that decellularized tissue could be prepared that retained its elasticity.

1．目　　的

大動脈瘤，大動脈弁狭窄症，動脈硬化症は世界的な死因の上位にあり，そのため動脈移植は主要な分野となっている。しかし，動脈は生存に関わる重要な部位であるため，慢性的にドナーが不足しているのが現状である。そのため，人工血管を使用することが多いものの，現在使用されている人工血管にはかなりの限界がある。そこで，さまざまな組織や臓器のための新しいバイオマテリアルとして，脱細胞化組織が広く研究されている[1～12]。脱細胞化組織は，生体適合性と再生特性が他の非天然型人工組織より優れているため，広く受け入れられている。再生医療において脱細胞化組織が大きな役割を果たすためには，脱細胞化組織の基本的な特性を解明する必要がある。特に，機械的特性を理解することは，脱細胞化組織が血管の代わりとなることを可能にするために非常に重要である。本研究では，従来法と新しい方法で作製したブタ大動脈とダチョウ頸動脈の脱細胞化組織の機械的特性を比較した。従来法はドデシル硫酸ナトリウム（SDS）とDNase処理であ

© The Ito Foundation

り，新法は液化ジメチルエーテル（DME）とDNase処理である。

最も単純でよく使われている脱細胞化法は，SDSによる脂質除去とDNaseによるDNA断片化を組み合わせたものである[1~12]。SDSは強力な洗浄剤であり，組織から脂質を効果的に除去することができる。そのため，SDS処理後にDNase処理を施すと，DNAを効率的に断片化することができる。しかし，SDSは食器洗いによる肌荒れの経験のように組織に残留すると炎症を起こす物質であるため，脱細胞化組織から十分に除去する必要がある。また，フィブロネクチン，グリコサミノグリカン，プロテオグリカン，細胞外マトリックスの調節因子や分泌因子は，SDSによる脱細胞化の際に失われやすい[11]。

SDSを用いて脂質を除去することのこれらの問題点を解決するために，我々は以前の報告[13, 14]で，SDSの代わりに液化DMEを溶媒として用いて組織から脂質を除去する方法を提案した。その後のDNA分解工程にDNaseを併用することで動脈を脱細胞化できる。この方法では，液化DMEを用いた脂質除去を１時間，DNaseを用いたDNA分解を３日間行った後，以下の三点の脱細胞化の成功の条件[15, 16]を満たした。１）ヘマトキシリン・エオジン染色した脱細胞組織の顕微鏡検査で細胞核が観察されない。２）脱細胞組織中の残留DNAが50ng/mg-dry以下。３）脱細胞組織中の残留DNA断片が200bp以下。

液化DME処理は３つのステップを含む。簡単に言えば，まず加圧下で液化DMEを用いて動脈から脂質を抽出する。次に，脂質を除去した動脈にDNase溶液を用いてDNAを断片化する。最後に動脈を水とエタノールで洗浄し，DNA断片を除去する。この手順は，SDSの代わりに液化DMEを使用する以外は，従来のSDS法と同じである。DMEは無毒な弱極性エーテルで[13, 14]，沸点は－24.8℃である[17]。沸点が非常に低いため，脂質を除去した組織内にDMEが残留することはない[13, 14]。また，水溶性であるため[18, 19]，乾燥の前処理を必要とせず，湿潤組織から容易に脂質を抽出することが可能である。しかし，DMEは水と部分混合するので[18, 19]，組織から脂質を抽出する際に水も抽出される[13, 14]。

これまでの研究で，ブタ大動脈の場合には，液化DME処理後のブタ大動脈のコラーゲン線維は，液化DMEによる脂質抽出工程の際の水分の除去による脱水反応によりC＝N架橋構造が発生することが明らかになっている。液化DMEによる脂質抽出工程でのシッフ塩基反応によって生じたC＝N架橋構造はDNase溶液で処理すると消失し，フーリエ変換赤外スペクトルは液化DME処理前のオリジナルのブタ大動脈と実質的に同じになる[13]。一方で，ダチョウ頸動脈の場合には脱水反応によるC＝N架橋構造は発生しない[14]。ブタ大動脈に見られたような一時的な架橋構造の履歴が，脱細胞化組織の力学的変化をもたらすかどうかは不明である。そこで本研究では，従来のSDSとDNase処理で作製したブタ大動脈とダチョウ頸動脈の脱細胞化組織と，液化DMEとDNase処理で作製した脱細胞化組織の引張強度を測定し，脱細胞化組織の破断・変形のしやすさを検討した。

２．方　法

脱細胞化プロトコルは，１）液化DMEによる脂質抽出，２）DNase処理，および，３）洗浄の３つのステップで構成される。従来の方法との違いは，SDSの代わりにDMEを使用する最初のステップである。ステップ２と３は従来のSDS法と同じである。実験サンプルにはブタ大動脈（東京芝浦臓器，東京）とダチョウ頸動脈（小山ダチョウ園）を用いた。

© The Ito Foundation

2.1　DME法

液化DME処理は，脱細胞化に関する先行研究の手順に従って行った[13, 14]。円筒カラムにサンプルを充填し，液化DME（Spray Work Air Can 420D, Tamiya, Shizuoka, Japan）を10（± 1）ml/minの流速で１時間注入した。その後，大動脈を0.2 %　DNase 溶 液 （Roche Diagnostic, Tokyo, Japan）中で４℃で７日間振盪した。これは，先の研究で基準を満たすために必要だった３日間の条件よりもはるかに長く，脱細胞化を確実にするために行われたものである。DNase処理後，ブタ大動脈を80/20（v/v）エタノール／食塩水で３日間洗浄した。

2.2　SDS法

比較対象系として従来のSDS法では，サンプルを0.1％エチレンジアミン四酢酸（ニッポンジーン株式会社，東京，日本）および0.1％SDSを含む10mMトリス-（ヒドロキシメチル)-アミノメタン緩衝液で室温で24時間洗浄し，リン酸緩衝食塩水で３回洗浄した。その後，DME処理と同様にDNase溶液で処理し洗浄することで脱細胞化された組織を得た。

2.3　引張強度試験

テンシロン万能試験機（SL-600，今田製作所，豊橋市）を用いて，オリジナルのサンプルと脱細胞化サンプルの引張強度を調べた[20]。各サンプルは５mm/minの速度でひずみを与え７回の測定を行い，最も破断しやすいものと最も破断しにくい結果を除外した，中間の５回の試験で得られた応力曲線を平均化した。

3.　結果と考察

3.1　ブタ大動脈[21]

Fig. 1 は，DME法とSDS法から得られたブタ大動脈の脱細胞化組織の外観を示したものである。比較のため，元のブタ大動脈組織の大きさも同じ縮尺で示した。SDS由来の脱細胞化組織は３方向に15％膨潤しているのに対し，DME由来の脱細胞化組織は元のサイズから７％縮小している。このことは，DME由来のブタ大動脈の脱細胞化組織にはタンパク質繊維が密に詰まっているのに対し[13]，SDS由来の組織にはタンパク質繊維の間に

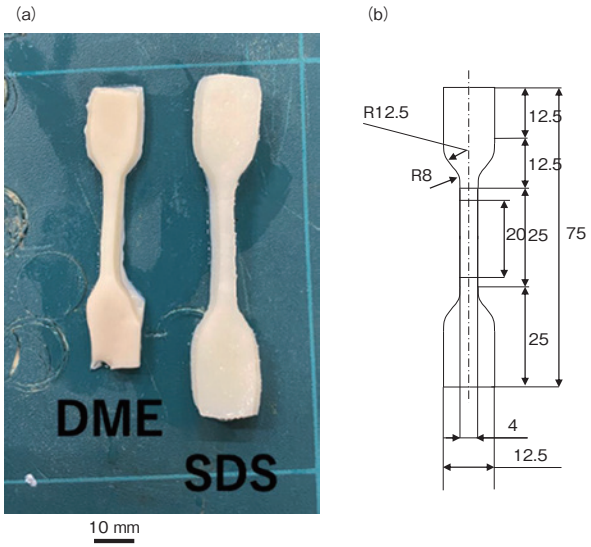

Fig. 1　(a) Appearance of porcine aortas following decellularization. (b) Dimensions of the dumbbell-shaped die-cut (reproduced by the authors from the sales company literature[21].

© The Ito Foundation

大きな隙間が見られるという先行研究の結果と一致した[6]。ここで，動脈は３層構造であることが先行研究により報告されている。最外層は，らせん状に配列したコラーゲン繊維の太い束を主成分とする緩い結合組織に囲まれている。中層は平滑筋細胞，弾性線維とコラーゲン線維のネットワーク，および中層を円周方向に等方性の繊維補強ユニットに分離する弾性ラメラからなる。内層は主に単層の内皮細胞，薄い基底膜，コラーゲン繊維の内皮下層からなる[22, 23]。また，繊維は外層では軸方向に近く，中層では円周方向に，内層ではこの二つの方向の中間にあるので[24]，つまり全体として血管を構成する繊維に大きな異方性は見られず，SDS法で三次元的に等方的に拡張したことは構造と整合する。

Fig. 2 より，縦方向では，SDSまたは液化DMEで処理した脱細胞化組織は，同じ応力下で元のブタ大動脈より硬いことが分かった。DME処理では，破断に必要な最大応力が元のブタ大動脈に比べて増加し，強度は低下していない。しかし，SDSを使用すると，非常に弱い応力でも容易に破断した。このように，SDSによる脱細胞化が組織の微細構造を変化させ，強い脂質の剥離効果と引き換えに細胞外マトリックスの生体力学的完全性を損なうことを示した既往研究の知見と一致する[25]。また，先述のようにSDS法では３次元的な膨張により，応力面の単位面積あたりの繊維数は $1/(1.15)^2 = 0.76$ 倍に減少している。ここで**Fig. 2** に示すように，SDSで脱細胞化したブタ大動脈の最大応力は元の約40％であることも考慮すると，繊維１本あたりの強度は約52.6％（＝0.4/0.76）に減少したことも分かる。

これまでの研究で，血管の引張試験は応力の強さによって３つの段階があることが知られている。**Fig. 3** のように，応力が小さい初期段階では，エラスチンに応力がかかり，コラーゲンにはほとんど応力がかからない。応力が大きい後期段階では，主にコラーゲンに応力がかかり，エラスチンに応力がかかりにくくなる。過渡期は初期と後期の中間で，まだエラスチンにかかる応力がコラーゲンよりも大きいが，応力の増分のほとんどはコラーゲンにかかる[20]。

Fig. 3 に示したような先行研究の知見に基づき **Fig. 2** を考察すると，次のようなことが考えられる。まず，液化DMEによる脱細胞化のため，コラーゲンは弾性を失い，わずかな伸長でも大きな応力がかかるようになる。この弾力性の低下は，DME処理時にシッフ塩基反応によるC＝N結合が一時的に出現し，隣接するコラーゲン線維との距離が短くなるためと考えられる。これにより，

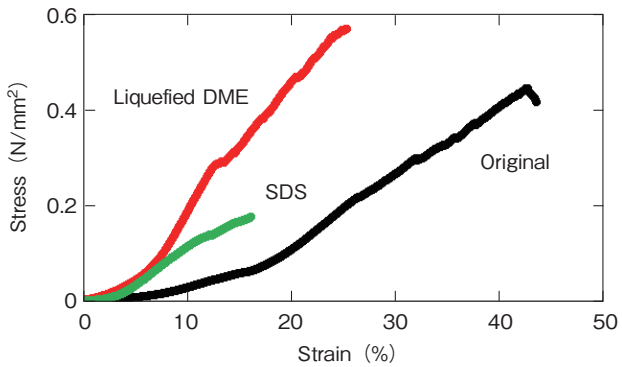

Fig. 2　Average strain–stress curves of porcine aortas in the longitudinal direction. Untreated refers to the aorta prior to decellularization treatment. DME：dimethyl ether；SDS：sodium dodecyl sulphate[21].

© The Ito Foundation

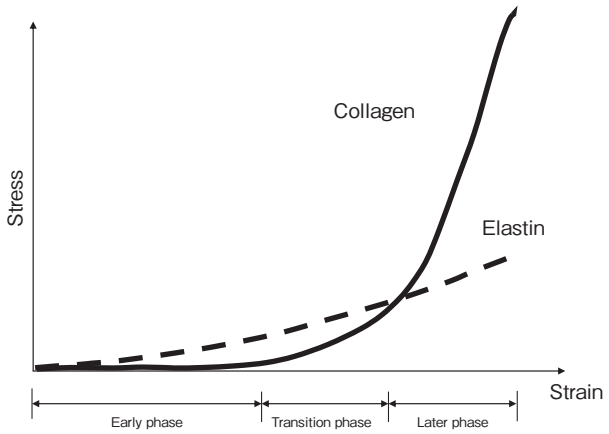

Fig. 3　Stress response properties of collagen and elastin when elongated[21].

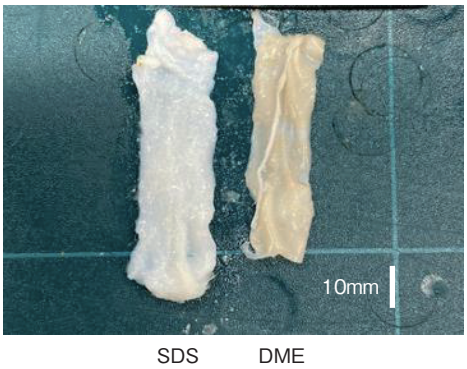

Fig. 4　Photographs of ostrich carotid artery samples after decellularization and before die-cutting[26].

コラーゲン繊維のＣ＝Ｎ結合が発生していない部位でも，隣接するコラーゲン繊維との分子間力が強くなる位置に変化する可能性もある。また，DNase溶液処理によりＣ＝Ｎ結合が解消された後も，この位置変化が残っている場合がある。これにより，コラーゲン線維を引っ張ったときの動きが小さくなり，弾力性が損なわれる。また，コラーゲン繊維間の分子間力が増大することで，破断直前の最大応力が増大する。しかし，弾力性が失われるのは，血圧が上昇する動脈硬化と同様の現象である。液状化DME処理後にシッフ塩基反応が起きないような動物由来の血管を使用すれば，柔軟性低下の問題は解決される可能性がある。

3.2　ダチョウ頸動脈[26]

Fig. 4 は，DMEとSDSを用いて得られたダチョウ頸動脈の脱細胞化組織である。SDS処理した組織は，長さ約6.5cm，幅約1.8cmで，元の組織と比較して長さ，幅ともに18～20％拡大した。一方，DME処理した組織は長さが約5.2cmとなり，元の組織から５％縮んだ。幅はほとんど変化しなかったので，有意差は測定できなかった。これは，ブタ大動脈で観察されたサイズ変化と同様である[13]。これは，既往の研究で，DMEで処置されたダチョウ頸動脈の脱細胞化組織を顕微鏡観察したところタンパク質繊維で密に詰まっていたことと一致する[14]。

© The Ito Foundation

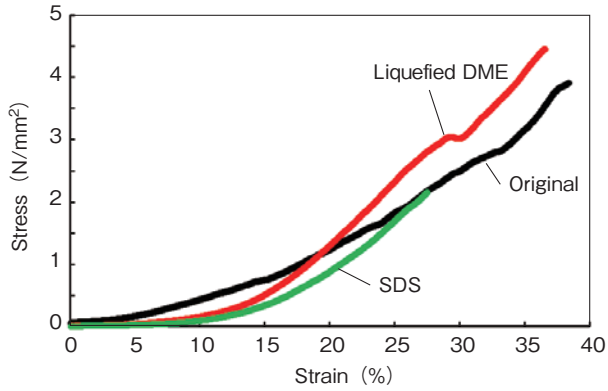

Fig. 5　Average strain–stress curves of the ostrich carotid artery samples[26].

Fig. 5 は，長軸方向に切断したダチョウ頸動脈組織の引っ張り強度試験の結果である。SDS処理した組織は，引張試験の途中までは元の組織やDMEで脱細胞化した組織と同様の応力応答を示したが，DME処理した組織が耐えた最大応力の半分で簡単に破断した。一方でDMEで処理した脱細胞化組織は，同じ応力下で元のダチョウ頸動脈とほぼ同じ伸びを示し，すなわちブタの大動脈で見られるような動脈硬化様の変化を示さなかった。このことから，先述の推論，すなわちDME処理によるシッフ塩基反応がコラーゲン繊維の柔軟性を損なうメカニズムの妥当性が補強された。

4．要　約

DMEによる脂質抽出とDNaseによるDNA断片化の組み合わせによる脱細胞化処理では，シッフ塩基反応の発生の有無が脱細胞化組織の応力応答の変化に影響を与える可能性が示唆された。特にシッフ塩基反応が生じないダチョウ頸動脈では，脱細胞化組織の柔軟性と強度の両方が元のダチョウ頸動脈とほぼ同じであり，きわめて力学特性に優れた脱細胞化組織が得られることが判明した。将来的に，ダチョウ頸動脈にシッフ塩基反応が生じない理由を解明できれば，ブタ組織においても脱細胞化組織の柔軟性と強度を，脱細胞化前の元の組織のまま維持できる可能性がある。

文　献

1）White, J. K., Agnihotri, A. K., Titus, J. S., *et al.*：A stentless trileaflet valve from a sheet of decellularized porcine small intestinal submucosa, *Ann Thorac Surg*, **80**, 704～707, 2005.
2）Korossis, S. A., Wilcox, H. E., Watterson, K. G., *et al.*：In-vitro assessment of the functional performance of the decellularized intact porcine aortic root, *J Heart Valve Dis*, **14**, 408～421, 2005.
3）Gilbert, T. W., Sellaro, T. L., Badylak, S. F.：Decellularization of tissues and organs, *Biomaterials*, **27**, 3675～3683, 2006.
4）Prasertsung, I., Kanokpanont, S., Bunaprasert, T., *et al.*：Development of acellular dermis from porcine skin using periodic pressurized technique, *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater*, 85B, 210～219, 2008.
5）Rosario, D. J., Reilly, G. C., Salah, E. A., *et al.*：Decellularization and sterilization of porcine urinary bladder matrix for tissue engineering in the lower urinary tract, *Regen Med*, **3**, 145～156, 2008.
6）Funamoto, S., Nam, K., Kimura, T., *et al.*：The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels, *Biomaterials*, **31**, 3590～3595, 2010.
7）Flynn, L. E.：The use of decellularized adipose tissue to provide an inductive microenvironment for the adipogenic differentiation of human adiposederived stem cells, *Biomaterials*, **31**, 4715～4724, 2010.
8）Kajbafzadeh, A. M., Sabetkish, S., Heidari, R., *et*

© The Ito Foundation

al.：Tissue-engineered cholecyst-derived extracellular matrix: a biomaterial for in vivo autologous bladder muscular wall regeneration, *Pediatr Surg Int*, **30**, 371～380, 2014.
9） Wolinsky, H., Glagov, S.：Structural basis for the static mechanical properties of the aortic media, *Circ Res*, **14**, 400～413, 1964.
10） Hashimoto, Y., Funamoto, S., Sasaki, S., *et al*.：Preparation and characterization of decellularized cornea using high hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering, *Biomaterials*, **31**, 3941～3948, 2010.
11） Moffat, D., Ye, K., Jin, S.：Decellularization for the retention of tissue niches, *J Tissue Eng*, doi：10.1177/20417314221101151, 2022.
12） Xing, Q., Yates, K., Tahtinen, M., *et al*.：Decellularization of fibroblast cell sheets for natural extracellular matrix scaffold preparation, *Tissue Eng Part C Methods*, **21**, 77～87, 2015.
13） Kanda, H., Ando, D., Hoshino, R., *et al*.：Surfactant-free decellularization of porcine aortic tissue by subcritical dimethyl ether, *ACS Omega*, **6**, 13417～13425, 2021.
14） Kanda, H., Ando, D., Oya, K., *et al*.：Surfactant-free preparation of an ostrich carotid artery scaffold using liquefied dimethyl ether and DNase, *Arab J Chem*, **14**, 103280, 2021.
15） Rana, D., Zreiqat, H., Benkirane-Hessel, N., *et al*.：Development of decellularized scaffolds for stem cell-driven tissue engineering, *J Tissue Eng Regen Med*, **11**, 942～965, 2017.
16） Crapo, P. M., Gilbert, T. W., Badylak, S. F.：An overview of tissue and whole organ decellularization processes, *Biomaterials*, **32**, 3233～3243, 2011.
17） Wu, J., Zhou, Y., Lemmon, E. W.：An equation of state for the thermodynamic properties of dimethyl ether, *J Phys Chem Ref Data*, **40**, 023104, 2011.
18） Holldorff, H., Knapp, H.：Binary vapor-liquid-liquid equilibrium of dimethyl ether-water and mutual solubilities of methyl chloride and water: experimental results and data reduction, *Fluid Phase Equilib*, **44**, 195～209, 1988.
19） Tallon, S., Fenton, K.：The solubility of water in mixtures of dimethyl ether and carbon dioxide, *Fluid Phase Equilib*, **298**, 60～66, 2010.
20） Wu, P., Nakamura, N., Kimura, T., *et al*.：Decellularized porcine aortic intima-media as a potential cardiovascular biomaterial, *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, **21**, 189～194, 2015.
21） Kanda, H., Oya, K., Irisawa, T., Wahyudiono, Goto, M.：Tensile strength of porcine aorta decellularized with liquefied dimethyl ether and dNase, *ACS Omega*, **7**, 34449～34453, 2022.
22） Tsamis, A., Krawiec, J. T., Vorp, D. A.：Elastin and collagen fibre microstructure of the human aorta in ageing and disease: a review, *J R Soc Interface*, **10**, 20121004, 2013.
23） Gasser, T. C., Ogden, R. W., Holzapfel, G. A.：Hyperelastic modelling of arterial layers with distributed collagen fibre orientations, *J R Soc Interface*, **3**, 15～35, 2006.
24） Schriefl, A. J., Zeindlinger, G., Pierce, D. M., *et al*.：Determination of the layer-specific distributed collagen fibre orientations in human thoracic and abdominal aortas and common iliac arteries, *J R Soc Interface*, **9**, 1275～1286, 2012.
25） Xu, H., Xu, B., Yang, Q., *et al*.：Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold, *PLoS One*, **9**, e86723, 2014.
26） Kanda, H., Oya, K., Irisawa, T., *et al*.：Tensile strength of ostrich carotid artery decellularized with liquefied dimethyl ether and DNase: An effort in addressing religious and cultural concerns, *Arab J Chem*, **16**, 104578, 2023.

© The Ito Foundation

食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅱ）

Nutritional function of meat hydrolysates（Ⅱ）

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 powders and pellets. The hydrolysate of chicken breast meat was prepared by digestion with food grade enzyme protamex. In the previous study, we found that the hydrolysate of chicken breast meat showed the high DPPH inhibition activity and high ACE inhibitory activity, and contained essential amino acids and functional peptides such as BCAA. In this study, we conducted to discover new physiological function of this hydrolysate. Dipeptidyl peptidase Ⅳ（DPP-Ⅳ）inhibitors are expected to be categorized in a new type of antidiabetic drugs. The hydrolysate of chicken meat pellet（CMP）showed the high DPP-Ⅳ inhibitory activity. Furthermore, the effects of CMP on grip strength and anti-fatigue of young adults were investigated. CMP administration significantly increased the grip strength and reduced the fatigue after exercise. Based on their remarkable antioxidant activity, ACE inhibitory activity, DPP-Ⅳ inhibitory activity, grip strength enhancing effect and anti-fatigue effect, we suggest that the CMP may have potential applications as a functional food.

Functional peptide powder and pellet derived from chicken meat with excellent digestibility and absorbability have been developed. CMP 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，

© The Ito Foundation

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，それら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や抗酸化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，しかも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を目的として，伊藤記念財団令和３年度研究助成により研究・開発を行った。その結果，食肉（鶏むね肉）由来の高い抗酸作用や血圧降下作用を有しBCAAも豊富に含有する機能性食肉加水分解物飲料，粉末や錠剤を開発することができ，得られた研究成果を報告した[15, 16]。

そこで本年度の研究では，食肉加水分解物に含まれる新たな生理機能の検索と鶏肉加水分解物錠剤（CMP）を用いたヒトによる試験を実施した。新たな生理機能検索として，各種食肉加水分解物やCMPを用いて血糖上昇抑制に関与するジペプチジルペプチダーゼⅣ（DPP-Ⅳ）阻害活性を測定し，食肉加水分解物の血糖上昇抑制効果について比較検討した。さらに若年女性を対象としたヒトによる試験では，筋肉タンパク質合成に関与するBCAAや抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドを豊富に含むCMPを摂取した時の，運動負荷時の筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果について検討した。得られた研究結果を報告する。

2．方　法

2.1　各種食肉加水分解物や鶏肉加水分解物錠剤（CMP）を用いたジペプチジルペプチダーゼⅣ（DPP-Ⅳ）阻害活性の測定

2.1.1　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，食肉専門店から購入した。

2.1.2　食肉の酵素処理

食肉タンパク質の高度加水分解のため，ノボザイム社の食品グレードのタンパク質分解酵素のプロタメックス（エンド型プロテアーゼ）を使用した。各原料のミンチ肉に加水（３倍量の蒸留水添加）し，酵素を適量添加して撹拌しながら50℃で90分間反応させた。経時的（０，10，30および90分後）に反応液を採取し100℃で２分間加熱して酵素を失活させた。それらの加水分解物を冷却後，ガーゼでろ過して得られたろ液を遠心分離（5,000g，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。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の紛末化と錠剤化は，マルナカフードにより行われた。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式会社）でろ過したろ液を実験に用いた。

2.1.3　タンパク質の定量

タンパク質の定量はBiuret法[17]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)製UV-VIS Spectrophotometer 1240型分光光度計（吸光度：540nm）にて測定し

© The Ito Foundation

た。また，分解物であるペプチドについてはUV法[18]を適用し，測定を行った。

2.1.4　ジペプチジルペプチダーゼⅣ（DPP-Ⅳ）阻害活性の測定

DPP-Ⅳ阻害活性の測定は，関ら[19]の方法に準じて，DPP-Ⅳ Inhibitor Screening Kit（Bio Vision社製，K780-100, MA, USA.）を用いて測定した。2.1.2のとおり調製した各種食肉加水分解物をDPP-Ⅳ Assay Bufferにて10倍希釈し，供試試料とした。一方，鶏肉加水分解物錠剤（CMP）は含有されるタンパク質量を勘案して，蒸留水で溶解したCMP溶液をDPP-Ⅳ Assay Bufferにて５，10，20倍に希釈し分析に供した。

まず，DPP-ⅣEnzymeをDPP-Ⅳ Assay Bufferを用いて所定の濃度に調整後，各ウエルに50 μlずつ分注し，さらに各試料25 μlを各ウエルに添加して37℃で10分間反応させた。次に，合成基質（H-Gly-Pro-7-アミノ-4-メチルクマリン）をDPP-Ⅳ Assay Bufferで所定の濃度に溶解して25 μlを添加し，反応を開始した。蛍光プレートリーダー（Thermo Scientific Multiskan Microplate Spectrophotometer，Finland）を用いて励起波長360nm，蛍光波長460nmで蛍光強度を30分間測定した。その間，検量線が認められる範囲で，任意の反応時間（T1，T2）に対応する蛍光強度（RFU1，RFU2）を選択し，その差から単位時間に対する傾きを算出し，以下の式にて，DPP-Ⅳ阻害率（％）を算出した。なお，Sitagliptinを標準物質としてpositive control（PC）とし，DPP-Ⅳ Assay Bufferをnegative control（NC）として算出した。得られたDPP-Ⅳの50％阻害活性が認められる試料濃度をIC_{50}値とした。

阻害率（％）＝（（NCの傾き－各種加水分解物またはPCの傾き）／NCの傾き）x 100

2.2　CMPのヒトに対する筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果解析

2.2.1　対象者

対象は健康な21歳女子大学生５名とした。本研究はヘルシンキ宣言の精神に則り，南九州大学倫理委員会の承認を得るとともに，対象者に対し研究の説明を行い書面による同意を得られた学生に実施した。

2.2.2　試験食

今回ヒトに対する試験に用いたCMPの栄養成分（10粒（2.8g）当たり）は，熱量10.4kcal，タンパク質が2.0g，脂質が0.1g，炭水化物が0.2ｇ，食塩相当量が0.1gであった。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。今回のヒトを対象とした場合には平均体重が約52kgであり，１日のタンパク質の摂取量が約52gとなり，約８％の量にあたる４gのタンパク質が摂取できるよう設定した。

2.2.3　試験プロトコール

コントロール期間を２週間（CMPの摂取はなく通常の生活を行う），コントロール期間終了後，摂取期間を４週間とした（CMPは１日20粒摂取し，運動負荷した生活を行う）。CMP摂取は，平日は朝食後と午後３時頃に運動負荷後に各10粒，１日合計20粒摂取した。休日は同時間の摂取のみとした。運動負荷については階段上り下り（大学内階段１～７階700歩程度２往復）と，ハンドグリップを握って手の開閉を両手それぞれ10回×３セットを行うよう指示した。また，摂取期間中は１日8,300歩を目標に歩くよう推奨した。休日は各自で同様の運動を行うよう指示した。

© The Ito Foundation

2.2.4　測定項目

１）　体組成，握力

摂取開始前，摂取２週間後，摂取４週間後の体組成はOMRON HBF-702T（オムロンヘルスケア株式会社）で計測した。握力はSMEDLEY'S HAND DYNAMO METER（YAGAMI）を使用して，文部科学省　新体力テスト実施要項（20歳～64歳対象）の握力測定方法に準じて測定した。記録はkg単位とし，kg未満は切り捨て，左右それぞれ良いほうの記録を採用した。

２）　活動量

活動量はOMRON HJA-405T（オムロンヘルスケア株式会社）で計測した。

2.2.5　アンケート調査

主観的疲労感は摂取開始前と摂取４週間後に，Chalder Fatigue Scale[20]の質問項目を参考に疲労の度合いを数値化した。質問項目は，１．疲れに関して問題がありますか？　２．もっと休養が必要ですか？　３．眠気またはだるさを感じますか？　４．何かを始めるのが困難ですか？　５．問題なく何かを始めても，それを続けているうちに体が弱ってきますか？　６．行動力に欠けていますか？　７．以前より筋力が衰えていますか？　８．身体が弱っていると感じますか？　９．集中するのに苦労しますか？　10．物事を明確に考えるのが大変ですか？　11．話しているときに言い間違いをしますか？　12．的確な言葉を探すのに以前より苦労しますか？　13．記憶力はどうですか？　14．以前は関心があったことに興味を持てなくなりましたか？　の14項目とした。回答は質問項目１を（ない，やや当てはまる，ある），13を（良い，やや悪い，悪い），それ以外の質問項目を（いいえ，やや当てはまる，はい）とし，それぞれ３段階の得点を０～２点として集計した。質問項目１～８を身体的疲労感，９～14を精神的疲労感，１～14を総合的疲労感として合計スコアで評価した。

2.3　統計解析

それぞれの値は平均値±標準偏差で表した。2.1.4の試験結果の解析については，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。

３．結果と考察

3.1　各種食肉加水分解物および鶏肉加水分解物錠剤がDPP-Ⅳ阻害活性に及ぼす影響

糖尿病は，血糖値を低下させるインスリンの作用不足により血糖値が上がる病態である。とくに２型糖尿病は，膵β細胞からのインスリン分泌障害により発症し進展する疾患であり，膵β細胞の機能低下は２型糖尿病の発症に直結すると考えられている。インスリン分泌を増強させるホルモンのインクレチン（代表的なインクレチン：グルカゴン様ペプチド-1（GLP-1））を分解するDPP-Ⅳを阻害することでインスリンのコントロールが可能となり，DPP-Ⅳ阻害薬が経口投与の可能な血糖低下薬として開発されている[21, 22]。DPP-Ⅳ阻害薬はDPP-Ⅳの基質と類似した構造を持つペプチド型と非ペプチド型があるが，食品由来のDPP-Ⅳ阻害はペプチド型と考えられる。そこで，各種食肉の加水分解に伴うDPP-Ⅳ阻害活性の発現様式を検索した。また，CMPのDPP-Ⅳ阻害活性も比較検討した。

Fig. 1 に各種食肉を０～90分間プロタメックスで処理することにより得られた加水分解物をそれぞれ，和牛肩赤身肉（BM Hydrolysate），国産豚ロース肉（PM Hydrolysate），国産鶏むね肉（CM Hydrolysate）とし，それらのDPP-Ⅳ阻害活性を示した。その結果，酵素による加水分解前のすべての生肉のコントロールではDPP-Ⅳ阻害活性は認められなかった。酵素により加水分解す

© The Ito Foundation

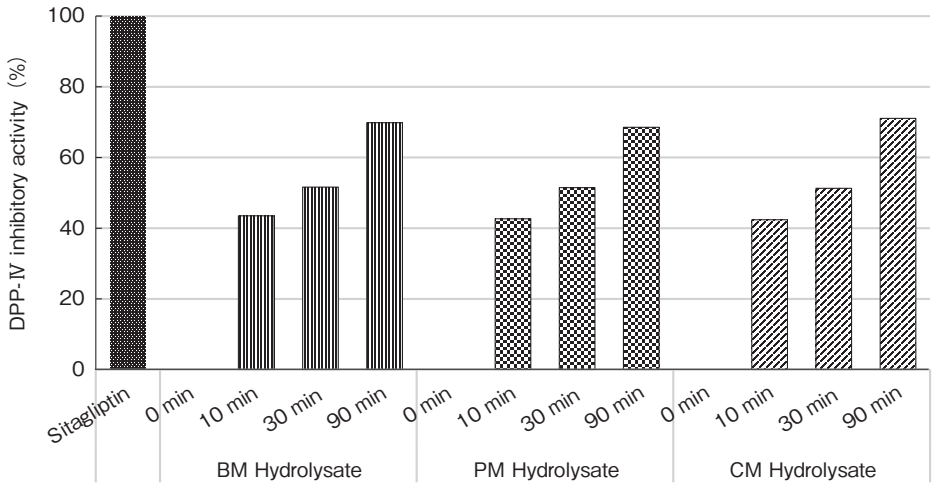

Fig. 1　DPP-Ⅳ inhibitory activity of hydrolysates of beef, pork and chicken breast meat treated with protamex for 0, 10, 30 and 90 minutes. The times in the graph mean reaction time with enzyme. Associated graph shows the values of DPP-Ⅳ inhibition percentage. Sitagliptin was used as a positive control（PC）as a standard substance, and DPP-Ⅳ assay buffer was used as a negative control（NC）. BM：beef meat, PM；pork meat, CM：chicken meat.

ると，加水分解処理時間に依存してDPP-Ⅳ阻害活性率は約40～70％へと増加した。加水分解の伸長により経時的にDPP-Ⅳ阻害活性は高くなる傾向が認められ，タンパク質の低分子化が進み低分子量のペプチドが生成され，90分間の加水分解により70％の高いDPP-Ⅳ阻害活性を示すことが明らかになった。90分間加水分解した牛肉，豚肉および鶏肉のDPP-Ⅳ阻害IC_{50}値はそれぞれ3.2mg/ml，3.4mg/ml，3.9mg/mlであった。食肉の種類による阻害活性の有意な相違は認められず３種の食肉においてほぼ同様に加水分解の時間とともにDPP-Ⅳ阻害活性が増加した。このことから，牛肉，豚肉および鶏肉の加水分解物中の低分子量ペプチドの増加に比例してDPP-Ⅳ阻害活性が発現されることが明らかになった。

CMP水溶液を調製し，前述の食肉加水分解物と同様にDPP-Ⅳ阻害活性を測定した結果を**Fig. 2**に示した。その結果，濃度の低い20倍希釈溶液がDPP-Ⅳ阻害活性が低く，濃度の高い５倍希釈溶液が80％以上のDPP-Ⅳ阻害活性率を示し，濃度依存的にDPP-Ⅳ阻害活性が増加することも明らかとなった。食品由来DPP-Ⅳ阻害ペプチドとしての効果的な濃度を検討することも今後の課題である。また，CM Hydrolysateの90min分解物とCMP×10が同等の約60％以上の阻害率を示した。CMPのタンパク質含量を勘案して溶解したことから，この両者はほぼ同様のタンパク質含量の条件下での測定結果である。CMPのDPP-Ⅳ阻害IC_{50}値は3.3mg/mlであった。これらのことは，加水分解後噴霧乾燥させ，さらに錠剤化されてもDPP-Ⅳ阻害活性は保持されることが明確になった。

われわれも，肝臓水解物がメタボリックシンドロームモデル動物であるSHR-cpラットにおいて糖負荷後の血糖上昇の亢進を抑制する効果を認め，肝臓水解物がインスリン抵抗性を改善する可能性を報告した[23]。また，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[24]。近年，DPP-Ⅳ阻害薬と同様の働きを示す低分子ペプチドが発酵食品の納豆[25]から見い

© The Ito Foundation

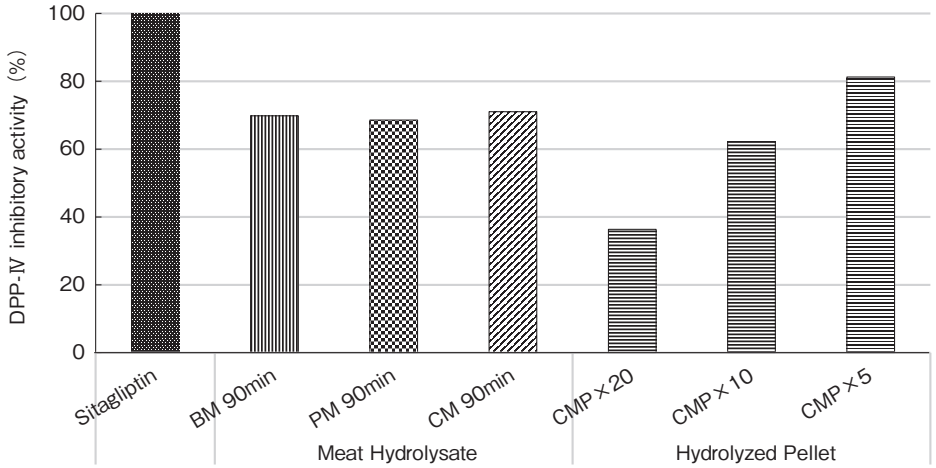

Fig. 2　DPP−Ⅳ inhibitory activity of hydrolysates of beef, pork and chicken breast meat treated with protamex for 90 minutes and hydrolyzed chicken meat pellet（CMP）. The numerical value of CMP in the graph is the dilution ratio. Associated graph shows the values of DPP−Ⅳ inhibition percentage. Sitagliptin was used as a positive control（PC）as a standard substance, and DPP−Ⅳ assay buffer was used as a negative control（NC）. BM：beef meat, PM；pork meat, CM：chicken meat.

だされ，そのIC$_{50}$値は5.35±0.27mg/mlであると報告されている。また最近，食品のソバからもDPP−Ⅳ阻害ペプチドが報告されている[26]。CMPに含有される高いDPP−Ⅳ阻害活性を有するペプチドの分画を行い，さらにはそれらのペプチドの精製や同定が今後の重要な課題である。

3.2　鶏肉加水分解物錠剤のヒトに対する筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果に及ぼす影響

若年女性を対象としたヒトによる試験では，筋肉タンパク質合成に関与するBCAAや抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドを豊富に含むCMPを摂取した時の，運動負荷時の筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果について検討した。

体組成と握力について，対象者のデータを**Table 1**，摂取開始前，摂取４週間後の握力の変化を**Fig. 3**に示す。活動量について，通常生活を行うコントロール期間（２週間）および摂取期間（４週間）の歩数はそれぞれ4677±1155歩，6996±2493歩であった。疲労度に関するアンケートについて，身体的疲労感，精神的疲労感，総合的疲労感の合計スコアは，摂取開始前が6.2±2.0，4.8±2.3，11.0±3.6，摂取４週間後が2.6±1.9，1.8±0.4，4.4±2.2であった。対象者の摂取開始前，摂取４週間後の総合的疲労感の合計スコアの変化を**Fig. 4**に示す。摂取開始前と比べて摂取４週間後に体組成や筋肉量に変化は認められなかった。一方，摂取開始前と比べて摂取４週間後に筋力（握力）の増加および疲労の軽減傾向が認められた。

本研究では，イミダゾールジペプチドやBCAAを豊富に含むCMPを１日20粒（ペプチド４g）４週間摂取し，運動負荷時の抗疲労効果や筋肉量増加効果等を明らかにすることを目的とした。運動負荷は大学内での階段の上り下りとハンドグリップを使用しての握力強化運動とし，１日8,300歩を目標に歩くことを推奨した。CMP摂取量と運動負荷量については，日頃の栄養補助食品としての活用を考慮し，日常生活で気軽に取り入れることができ，かつ継続可能な量とした。

その結果，摂取４週間後に握力の増加および疲労の軽減傾向が認められた。握力はハンドグリップを握って手の開閉を両手それぞれ10回×３セッ

© The Ito Foundation

Table 1 Changes in body composition, activity and grip strength before and after intake CMP.

		Unit	Before	2 weeks	4 weeks
Body composition	Body weight	kg	52.1 ± 3.8	52.3 ± 3.6	52.1 ± 3.8
	Body fat percentage	%	24.7 ± 3.5	25.3 ± 2.7	24.9 ± 3.1
	BMI	kg/m^2	21.3 ± 2.3	21.3 ± 2.2	21.2 ± 2.2
	Body muscle percentage	%	27.9 ± 1.8	27.7 ± 1.5	27.9 ± 1.7
	Body muscle percentage				
	Arms	%	31.7 ± 2.3	31.4 ± 1.9	31.6 ± 2.1
	Trunk	%	23.0 ± 1.8	22.7 ± 1.5	22.9 ± 1.7
	Legs	%	40.3 ± 1.5	39.9 ± 1.0	40.2 ± 1.6
Grip strength	Right hand	kg	30 ± 7	31 ± 7	34 ± 6
	Left hand	kg	30 ± 4	28 ± 5	31 ± 6

CMP：hydrolyzed chicken meat pellet, BMI：Body Mass Index , Before：before intake CMP, 2 weeks：two weeks after intake CMP, 4 weeks：four weeks after intake CMP. Values are means ± SD.

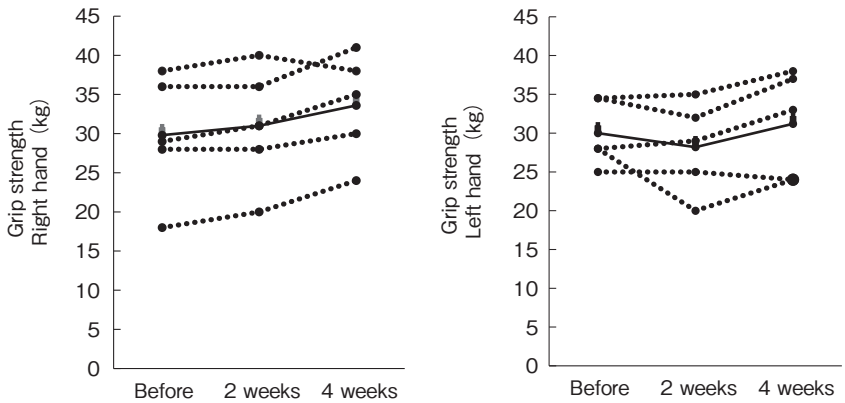

Fig. 3 Comparison of grip strength and CMP intake pre- and post-intervention. CMP：hydrolyzed chicken meat pellet, Before：before intake CMP, 2 weeks：two weeks after intake CMP, 4 weeks：four weeks after intake CMP. Individual data are indicated by dotted lines. Mean values are indicated by solid lines. Error bars indicate standard deviation（n = 5）.

トを毎日行ったため，両手ともに５名中４名に増加が認められ，とくに利き腕の右手に増加が認められた．疲労度については，主観的疲労感はChalder Fatigue Scaleを用いて検討した。Chalder Fatigue Scaleは，身体的疲労感（８項目）と精神的疲労感（６項目）および総合的疲労感（14項目）で判断される。CMP摂取４週間後には５名中全員に身体的疲労感と精神的疲労感および総合的疲労感の低下が認められた。今回摂取したCMP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を粉末化し錠剤化したものであり，先行研究において内因性抗酸化物質としての機能を有するカルノシンが35mg/100g，アンセリンが102mg/100gと高濃度に含まれることが分かっている。また加水分解物錠剤10粒当たり，約2,000mgのペプチドやアミノ酸が含まれており，うち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７mg，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

© The Ito Foundation

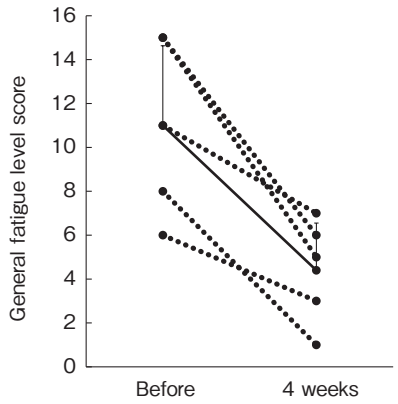

Fig. 4　Change in general fatigue level score from baseline to the post of the 4 weeks intervention period.
CMP：hydrolyzed chicken meat pellet , Before ： before intake CMP, 4 weeks ： four weeks after intake CMP. Individual data are indicated by dotted lines. Mean values are indicated by solid lines. Error bars indicate standard deviation（n = 5）.

れ，高い抗酸化活性や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ている[15, 16]。

杉山ら[27]のスポーツサプリメントとしての卵白ペプチドの抗疲労効果を検証した試験では，大学駅伝チームの強化合宿（９日間）期間中に卵白ペプチドを7.5g／日摂取したところ，厳しいトレーニングによる心筋や骨格筋あるいは内臓組織へのダメージの軽減や疲労度の軽減傾向が認められており，卵白ペプチドの強い抗酸化力との関連を示唆している。また，吸収速度においてペプチドのほうがタンパク質よりも有効であるため，激しいトレーニング後の消化吸収能が低下しているアスリートのための成分栄養食としては，タンパク質よりもペプチド態のものを用いたほうが良いとしている。

また，寺沢ら[28]の大学陸上競技部の中・長距離種目を専門とする健常な男子大学生９名に対して，サケ肉を原料として調製されたアンセリンを豊富に含むアンセリン含有エキスを１日９錠（９錠中アンセリン換算で0.12g相当）７日間摂取させた時の運動能力，視力，疲労感に及ぼす影響について検証した試験では，アンセリンとクレアチニンの相乗効果で運動機能の向上に寄与した可能性を示唆している。また，眼精疲労や運動後のだるさ感といった疲労感などの低下も認めていた。

アンセリンやカルノシンなどのイミダゾールペプチドには抗疲労効果や抗酸化作用，血糖値調節作用などさまざまな生理機能が認められている。今回使用したCMPは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ものであるため[15]，20粒（ペプチド４g）が摂取後効率よく吸収され，これらが疲労の軽減傾向に寄与した可能性が考えられた。

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]。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]。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[32]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[33]。本研究で開発したCMPは，BCAAやイミダゾールジペプチドなど吸収性に優れた良質なペプチドやアミノ酸を豊富に含有することから，上記のようなさまざまな効果も期待される。

本研究では，抗酸化作用や血圧降下作用のほか血糖調節作用を有する機能性ペプチドが豊富に含まれていることが確認された。さらに，ヒトに対

© The Ito Foundation

する試験でCMP摂取による筋力増強効果や抗疲労効果も明らかになった。今後，CMPに含まれる抗酸化ペプチド，ACE阻害ペプチドやDPP-Ⅳ阻害ペプチドの精製と同定を行う必要がある。さらにヒトによるCMP摂取試験で，血糖上昇抑制効果を明らかにすることが今後の検討課題である。

4．要　約

本年度の研究では，食肉加水分解物に含まれる新たな生理機能の検索と鶏肉加水分解物錠剤（CMP）を用いたヒトによる試験を実施した。新たな生理機能検索として，各種食肉加水分解物やCMPを用いて血糖上昇抑制に関与するジペプチジルペプチダーゼⅣ（DPP-Ⅳ）阻害活性を測定し，食肉加水分解物の血糖上昇抑制効果について比較検討した。さらに，若年女性を対象としたヒトによる試験で，筋肉タンパク質合成に関与するBCAAや抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドを豊富に含むCMPを摂取した時の，運動負荷時の筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果について検討した。

牛肉，豚肉，鶏肉を90分間食品用の酵素プロタメックスで処理することにより得られた加水分解物はいずれも約70％の高いDPP-Ⅳ阻害活性を示した。牛肉，豚肉および鶏肉のDPP-Ⅳ阻害IC_{50}値はそれぞれ3.2mg/ml，3.4mg/ml，3.9mg/mlであった。CMP水溶液も濃度依存的にDPP-Ⅳ阻害活性が増加し，５倍希釈溶液が80％以上の高いDPP-Ⅳ阻害活性を示した。CMPのDPP-Ⅳ阻害IC_{50}値は3.3mg/mlを示し，加水分解後噴霧乾燥させ，さらに錠剤化されてもDPP-Ⅳ阻害活性は保持されることが明確になった。若年女性を対象としたヒトによる試験でCMPを摂取した時の運動負荷時の筋肉量・筋力増加効果や抗疲労効果について検討した結果，摂取前と比べて摂取４週間後に体組成や筋肉量に変化は認められなかったが，摂取前と比べて摂取４週間後に筋力（握力）の増加および疲労の軽減効果が認められた。CMPには，BCAAや抗疲労効果を有するイミダゾールジペプチドが豊富に含まれており，１日20粒（ペプチド４g）の摂取で効率よく吸収され，これらが疲労の軽減傾向に寄与した可能性が示唆された。

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，さらに多くの生理機能を有する食肉由来の機能性タンパク質錠剤が開発された。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., Miake, 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.

© The Ito Foundation

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**, 85～92, 2022.
15） 竹之山愼一, 川北久美子, 六車三治男：令和３年度食肉に関する助成調査報告書, （公財）伊藤記念財団, **40**, 49～57, 2022.
16） Takenoyama, S., Yamauchi, M., Kawakita, K., Nakamura, T., Muguruma, M.：*Japanese Journal of Meat Science and Technology*, Vol.63, Special Issue, p298, 2022.
17） Gornal, A. G., Baradawill, C. J., David, M. M.：*Journal of Biological Chemistry*, **177**, 751～766, 1949.
18） Murphy, J. B., Kies, M.W.：*Biochimica et Biophysica Acta*, **45**, 382～384, 1960.
19） 関英治, 小塚美由記, 米田（和田）実央, 村尾咲音, 山根拓也, 荒川義人, 大久保岩男, 藤原佳史：日本補完代替医療学会誌, **15**, 21～28, 2018.
20） Chalder, T., Berelowitz, G., Pawlikowska, T., Watts, L., Wessely, S., Wright, D., Wallace, E. P.：*Journal of Psychosomatic Research*, 37(2), 147～153, 1993.
21） Holst, J. J., Deacon, C. F.：*Diabetes*, **47**, 1663～1670, 1998.
22） Drucker, D J.：*Current Pharmaceutical Design*, **7**, 1399～1412, 2001.
23） 井上尚典, 日高修二, 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.
24） 比良徹：化学と生物, **55**, 296～298, 2017.
25） Sato, K., Miyasaka, S., Tsuji, A., Tachi, H.：*Food Chemistry*, **261**, 51～56, 2018.
26） 星野弘二, 徳岡昌文, 小山翔大, 井上博文, 高橋公咲：日本食品化学学会誌, 29(3), 156～163, 2022.
27） 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(8), 245～256, 2020.
28） 寺沢なお子, 棟田裕一, 高橋義宣, 小尾麻菜, 椎名康彦：日本水産学会誌, 80(4), 601～609, 2014.
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 Acid*, **48**, 2145～2155, 2012.
32） 片倉善範：化学と生物, **57**, 596～600, 2019.
33） 久恒辰博：化学と生物, **54**, 892～900, 2016.

© The Ito Foundation

豚のオス臭を形成する臭気成分の分析とそれを記述する用語の同定

Analysis of volatile components that form the scent of male pigs and identification of terms that describe them

河　原　　聡
（宮崎大学農学部）

Satoshi Kawahara
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Pork obtained from uncastrated male pigs was subjected to chemical analysis of male odor-related substances, volatile component analysis, and extracting terminology related to odor by panel test. Based on these results, we aimed to clarify the characteristics of odors emitted from male pigs and their perception by humans.

As a result of the quantification of tryptophan metabolites such as indole in subcutaneous fat, male pork contained higher concentrations of tryptophan metabolites than castrated pork. However, their concentrations were below the detection threshold in meat. Esters were characteristically detected in raw male pork when analyzing volatile compounds related to meat aroma. Alcohols and alkanes caused by lipid oxidation were detected in the cooked meat. However, we could not confirm the relationship between the proportion of these substances and the sex of pigs. From the panel test results, it was suggested that the heated male pork has a weak pork-like flavor and a high frequency of sour flavor. However, it was also suggested that it is difficult to distinguish between male pork and castrated pork due to the smell of raw meat. In addition, it was confirmed that male pork is less palatable than castrated pork. From the above results, it was considered that quality control of the taste part is essential when male pork is used as a raw material for meat products.

1．目　　的

食肉・食肉製品から発生するオフフレーバーは製品の食味を著しく低下させる要因となる。なかでも「獣臭」と表現されるオフフレーバーの発生は消費者にも容易に知覚され，製品の商品価値を大きく損なう一因であると考えられる。

「獣臭」は，その用語が連想させるイメージから「オス臭」と関連付けられることが多い。オス臭はトリプトファンの代謝物であるスカトールやインドール，あるいはステロイド代謝物であるアンドロステノンが原因であると報告されている[1)]。一方，獣臭を検知された食肉・食肉製品中からは必ずしもこれらの物質が多量，すなわちヒトの知覚閾値を超える量ほどに検出されないこともあり，食肉製造における品質管理を難しくしていると推測される。

近年，とくにヨーロッパにおいて，動物福祉へ

© The Ito Foundation

の配慮から外科的去勢を避ける傾向があり，自己免疫により性成熟を阻害する免疫去勢が代替法として普及し始めている。しかし，免疫去勢法は去勢の成否に個体差があり，去勢が不十分な個体に由来する食肉にはオス肉の特徴が残ってしまうことが課題である。

そこで本研究では，無去勢のオス豚から得た豚肉についてオス臭関連物質の化学分析，揮発性成分分析および官能検査による臭気に関する用語抽出を行い，オス豚から発生する香気およびヒトによる認知の特性を明確にすることを目標として実施することとした。

２．方　法

2.1　材料

本試験は宮崎大学動物実験規則を遵守して行われた。供試動物は，宮崎大学農学部附属フィールド科学教育研究センター住吉フィールドで生産されたLWD種非去勢雄豚４頭および去勢豚４頭を用いた。供試豚は２腹から体重の近い個体を選抜し，平均体重が等しくなるように配置した。これらの供試豚は，おがこ式豚舎で自家配合飼料を飽食給与，自由飲水で群飼育し，体重約105kgで出荷した。分析および官能評価には，各と体右半丸から採取したロース肉を供し，使用まで－60℃で冷凍保存した。

2.2　トリプトファン代謝物の定量

ロース肉周囲より採取した皮下脂肪の内層部分について，インドールおよびスカトールをHansen-Møller（1994）の手法[2]に準じて測定した。細断した脂肪組織１gをテフロン・ホモジナイザー（バイオマッシャーSP，ニッピ社製）に精秤し，内部標準（2-methyindole）のメタノール溶液を３ml加え，ホモジネートを調製した。ホモジネートを250×g，４℃で５分間遠心分離し，その上清を0.45 μmフィルターで濾過したのち，HPLC分析に供した。HPLCは島津社製（LC-10A）を用いて，分析条件は以下のとおりとした。

カラム：ODS Hypersil®（Thermo 社，150 × 4.6mmID，粒径５ μm）
移動層：0.1％酢酸水溶液：テトラヒドロフラン＝65：35（v：v）
流速：１ml/min
分離温度：40℃
検出：蛍光検出器（励起波長：285nm，蛍光波長：340nm）
定量：内部標準法

2.3　揮発性物質の分析

試料からの揮発性物質はMonoTrap®（GL Sciences社製，DCC18）を用いたヘッドスペース法および solvent-assisted flavor evaporation（SAFE）法[3]により回収した。これらの方法で回収した揮発性物質はGC-MS（Agilent 7890B GC，5977Aシリーズ GC/MSD）により分析した。分析条件は以下のとおりとし，炭素数８から20の飽和炭化水素を標準物質として算出したKovats RIおよびマススペクトルのHit率に基づきピークの同定を行った。

カラム：DB-WAX®（Agilent Technology社，60m×0.25mmID，膜厚0.25mm）
キャリアガス：ヘリウム
線速度：30cm/min
カラム温度：40℃，５min→４℃/minで240℃まで昇温→240℃，20min保持
気化室温度：240℃
検出器温度：250℃
試料導入：スプリットレス

2.4　官能評価用語の抽出とCATA法による官能評価

官能評価用語の抽出は，大学生285名を対象とするアンケートにより行った。具体的には，日本工業規格に収載されている官能評価分析用語およ

© The Ito Foundation

び学術論文で使用されている官能評価用語から香りに関する形容詞を100語選び，「肉の香り」を表現する用語として相応しいと考える用語をすべて回答させた。アンケートの集計結果に基づいて15語を選定し，本研究における「香りの記述子」とした。

官能評価はCheck-All-That-Apply（CATA）法[4]により，去勢豚肉とオス豚肉の組み合わせを１セットとして同一日に実施し，これを４セット行った。事前に市販のキット（Open Essence，富士フイルム和光純薬社）を用いて嗅覚同定力を確認した大学生25名（男性12名，女性13名）により実施した。厚さ５mmに切り分け，個包装にした後に，85℃に設定した水浴中で60分加熱した後に流水で粗熱をとり，60℃の恒温器中で保温した肉試料をパネルに提示した。パネルは，包装を開封してただちに鼻先香を嗅ぎアンケートに答え，さらに肉を咀嚼・嚥下する間に感知した口中香を引き続きアンケートにて回答した。喫食順による回答のバイアスを除くため，２種類の試料はランダムに提供した。

３．結果と考察

皮下脂肪内層のインドールおよびスカトールを**Table 1** に示す。インドール，スカトールともにオス豚肉で高値を示す傾向が認められ，インドールでは統計学的な有意性（$p<0.05$）が認められた。インドールおよびスカトールの平均的な検知閾値は鼻先香で1000ng/g肉，口中香で250ng/g肉と報告されている[5]。このことを踏まえると，本研究で用いたオス豚肉は，香りや風味が劣化するレベルのインドールおよびスカトールを含有してはいなかった。

去勢豚肉およびオス豚肉で検出された揮発性成分の要約を**Table 2** から**Table 4** に示す。生肉のヘッドスペース分析において検知された主な化合

Table 1　Indole and skatole content in adipose tissue

	Male	Castrated	p value*
	(ng/g lipid)		
Indole	63.9 ± 12.5	38.0 ± 11.3	0.022
Skatole	87.1 ± 55.9	43.5 ± 14.9	0.218

Data was shown as average ± standard deviation.
* Result of Welch's t-test

Table 2　Summary of olthonasal aromatic compounds from raw meat （% of total compounds determined）

	Male	Castrated	p values*
Aromatic hydrocarbones	4.52 ± 1.10	3.73 ± 1.25	0.382
Aldehydes	2.33 ± 0.47	2.57 ± 0.44	0.492
Ketones	5.53 ± 1.97	4.02 ± 0.86	0.230
Alkanes	15.1 ± 2.6	14.7 ± 2.2	0.818
Alcohols	25.7 ± 4.6	19.0 ± 5.5	0.111
Esters	0.670 ± 0.410	1.69 ± 0.38	0.022
Others	46.1 ± 8.5	54.7 ± 8.8	0.209

Data was shown as average ± standard deviation.
* Result of Welch's t-test

© The Ito Foundation

Table 3　Summary of orthonasal aromatic compounds from cooked meat（% of total compounds determined）

	Male	Castrated	p values*
Aromatic hydrocarbones	7.52 ± 2.54	5.48 ± 2.08	0.262
Aldehydes	7.47 ± 6.36	6.75 ± 5.56	0.870
Ketones	7.66 ± 2.70	5.58 ± 1.95	0.262
Alkanes	16.7 ± 6.1	14.1 ± 5.7	0.561
Alcohols	12.0 ± 4.9	7.35 ± 4.50	0.207
Esters	1.68 ± 0.69	0.956 ± 0.559	0.187
Others	46.9 ± 14.2	60.0 ± 11.6	0.207

Data was shown as average ± standard deviation.
* Result of Welch's t-test

Table 4　Summary of retronasal aromatic compounds from cooked meat（% of total compounds determined）

	Male	Castrated	p values*
Aromatic hydrocarbones	12.7 ± 11.4	4.85 ± 1.60	0.261
Aldehydes	1.60 ± 0.66	1.65 ± 1.48	0.950
Ketones	2.07 ± 1.64	2.71 ± 1.84	0.619
Alkanes	35.8 ± 15.1	35.9 ± 20.5	0.990
Alcohols	1.07 ± 0.03	14.8 ± 21.4	0.381
Esters	0.408 ± 0.224	0.815¶	–
Others	47.1 ± 5.43	43.5 ± 20.3	0.753

Data was shown as average ± standard deviation.
* Result of Welch's t-test
¶ The standard deviation could not be calculated because it was detected in only one sample.

物はアルコール類であり，ついでアルカン類の割合が高かった。また，エステル類の割合は低かったものの，有意差が認められた（**Table２**）。検出された主要な化合物はisopropyl myristateであった。エステル類の多くは特徴的な芳香をもつ。今後，未加熱肉中のエステル類とオス豚肉の獣臭との関連性を検討する必要があると考えられた。

加熱肉のヘッドスペース分析においても，アルコール類およびアルカン類が主要な化合物と同定された（**Table３**）。これらの中では，オス豚肉において1-heptanolおよび1-nonanolなどが比較的高い割合で検出された。一方，肉試料から溶媒抽出した揮発性成分については，主にアルカン類が検出された（**Table４**）。アルカン類の中では，nonadecaneがオス豚肉に高い割合で検出された。アルコール類やアルカン類は加熱により発生する典型的な脂質酸化物である。しかしながら，溶媒抽出した試料については，試料のばらつきが大きく，性別間の際を議論するのは困難であると考えられた。この点については，溶媒抽出からSAFE法による分析試料精製のプロセスを最適化する必要がある。

オス豚肉および去勢豚肉各４検体およびCATA法による官能評価において典型的に検知された記述子はmeaty（豚肉らしい），roasty（香ばしい），sweet(甘い），sour(酸っぱい），blood-like（血液のような），gamey（野生獣のような），fatty（脂っぽい）の７項目だった（**Fig. 1**）。オ

© The Ito Foundation

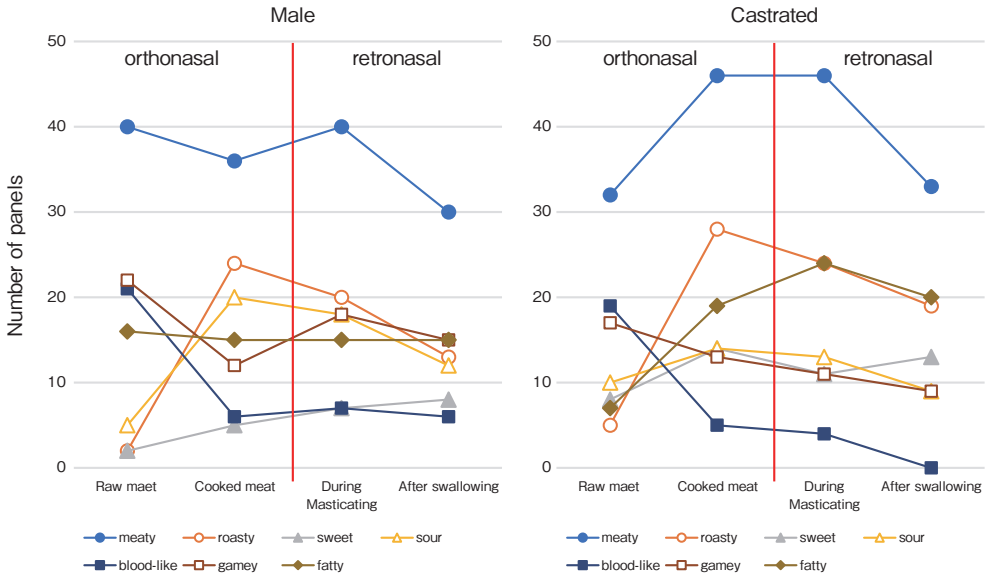

Fig. 1　Number of panels that selected each descriptor related to odors that are characteristically recognized in sensory evaluation

ス豚肉は，鼻先香と口中香のいずれについても，豚肉らしい香気が弱く，酸性の刺激臭を感じる頻度が高いようであった。また，加熱した際に野生獣のような風味を感じる頻度が高くなるなどの特徴も認められたが，いずれの記述子の選択頻度についても，オス豚と去勢豚の間で統計学的に有意な差異は認められなかった。一方で，同時に調査した嗜好性の評価に関して，口中香についてオス豚肉に比較して去勢豚肉が有意に好ましいと評価された（t 検定における有意確率は鼻先香$p = 0.449$，口中香$p = 0.003$）。このことは，パネルがオス豚肉と去勢豚肉の風味の違いを検知していることを示唆している。以上のことは，今回の検討においてオス豚肉（あるいは去勢豚肉）の香りを表現する適切な記述子を選定できなかったと考えるのが妥当であり，さらなる検討が必要である。

以上の結果から，オス豚肉と去勢豚肉から発生する揮発性化合物には差異があり，少なくとも両者を同時に喫食した場合には，消費者はそれらの異なる風味を検知できることが示唆された。食味性の観点からは，オス豚肉より去勢豚肉のほうが好まれる傾向が認められたことから，オス豚肉を食肉製品原料などに使用する場合，食味部分の品質管理が重要であると考えられた。

4．要　　約

無去勢のオス豚から得た豚肉についてオス臭関連物質の化学分析，揮発性成分分析および官能検査による臭気に関する用語抽出を行った。これらの結果から，オス豚から発生する香気およびヒトによる認知の特性を明確にすることを目標とした。

皮下脂肪のトリプトファン代謝物を定量した結果，去勢豚肉と比較してオス豚肉はインドールなどのトリプトファン代謝物を高い濃度で含有していた。しかし，それらの濃度は食肉における検知閾値より低かった。食肉の香気に関連する揮発性化合物を分析すると，生のオス豚肉からはエステル類が特徴的に検出された。加熱肉では脂質酸化に起因するアルコール類やアルカン類が検出された。しかし，それらの含有割合について去勢との関連性は確認できなかった。官能検査の結果からは，加熱したオス豚肉において豚肉らしい香りが

© The Ito Foundation

弱く，酸っぱい香りを感じる頻度が高いことが示唆された。しかし，生肉の臭いによりオス豚肉か去勢豚肉かを判別は難しいこともあわせて示唆された。また，去勢豚肉と比較して，オス豚肉は嗜好性が低いことが確認された。以上の結果から，オス豚肉を食肉製品原料などに使用する場合，食味部分の品質管理が重要であると考えられた。

文　献

1） Briyne, N. D., Berg, C., Blaha, T., Temple, D.：Pig castration: will the EU manage to ban pig castration by 2018?, *Porcine Health Management*, 2：29，1～11，2016.

2） Hansen-Møller, J.：Rapid high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of androstenone, skatole and indole in back fat from pigs, *Journal of Chromatography B*, **661**，210～230，1994.

3） Engel, W., Bahr, W., Schieberle, P.：Solvent-assisted flavour evaporation - a new and versatile technique for the careful and direct isolation of aroma compounds from complex food matrices, *European Journal Food Research and Technology*, **209**，237～241，1999.

4） 今村美穂：記述型の官能評価／製品開発におけるQDA法の活用，化学と生物，**50**，818～824，2012.

5） 宮崎大学：免疫去勢による国産豚国際競争力強化事業実績報告書，2021.
URL：https://www.miyazaki-u.ac.jp/ags/bunner/e797a8f3ca125e048d48299f9881dee93c12f005.pdf

© The Ito Foundation

細菌のファージ感受性増大およびスーパーファージ作製に関する研究

Studies on phage sensitivity improvement and superphage construction

宮　本　敬　久

（九州大学大学院農学研究院）

Takahisa Miyamoto

（Faculty of Agriculture, Kyushu University）

To investigate the involvement of *dnaK* gene product on the phage resistance of *Escherichia coli* BW25113, myricetin and quercetin which have been reported to interact to DnaK, were used. After pretreatment for 6 h with 500 μM myricetin, the viable counts of *E. coli* was 1.0 log lower than that of control after phage S127 BCL3 addition. Moreover, the regrowth of the phage resistant cells of *E. coli* was retarded only in the cells pretreated with myricetin. The viable counts were 1.18 and 2.1 log lower than that of the cells without myricetin at 9 and 12 h, respectively. Furthermore, the cells pretreated with 500 μM quercetin showed the highest susceptibility to phage, and viable counts at 9, 12 and 15 h were 1.4, 1.4 and 2.7 log lower than those of the cells without quercetin, respectively.

To investigate the involvement of *priA* gene product on the phage resistance of *E. coli* BW25113, kanamycin, and chloramphenicol, which have been reported to inhibit the function of PriA were used. The combined use of phage S127 BCL3 and chloramphenicol at 2 or 5 μM increased the phage susceptibility of *E. coli* and retarded the regrowth of the phage-resistant cells. Kanamycin showed the similar effects. The combined effect of the phage and chloramphenicol was confirmed on *E.coli* O157 : H 7 .

For the preparation of multi-tailed fiber phages, the tail fiber genes of phage ECP52 will be isolated and transformed into phage T4 genome by a genome editing system using CRISPR-Cas9. The receptors for ECP52 in *E. coli* were examined. As a result of comparing the infectivity against 11 types of outer membrane protein gene-deletion and lipopolysaccharide synthesis gene-deletion mutants, the infectivity of the phage against Δ*ompR* and Δ*waaC* and Δ*ompF* mutants was lower than that against BW25113. This suggests that OmpR, WaaC and OmpF proteins are important for infection by the phage ECP52.

1．目　　的

腸管出血性大腸菌やサルモネラ等の食中毒細菌による健康危害（食中毒）が国民に不安を与えている。これらの食中毒は，食肉を原因とすることが多く，特に腸管出血性大腸菌，サルモネラやカンピロバクターを原因とする食中毒は，飲食チェーン店の食事や焼き肉，ユッケ，焼き鳥，鳥刺しなどのような食肉や加工品を原因として発生している。さらに，Extended Spectrum Beta-

© The Ito Foundation

Lactamase（ESBL）-産生大腸菌，牛の乳房炎の原因菌である黄色ブドウ球菌の多剤耐性化など，広範な抗生物質に耐性な食中毒細菌（人畜共通感染症の細菌）の割合も増えてきており，感染者の治療において大きな問題となっている。これは家畜の飼育においても大きな問題である。この解決にバクテリオファージ（以降ファージ）の利用が期待されており，欧米ではすでに食中毒細菌を溶菌するファージが食品に使用されている。さらに利用拡大のためには，ファージに感染した細菌が耐性化する「ファージ耐性化」を克服する必要がある。

著者らは，過去の本財団助成研究において，約4000株の大腸菌の遺伝子欠損株ライブラリーについてファージ感受性を調べてファージ感受性の向上および耐性化に関与する遺伝子を10種同定している。本申請研究では，これらの遺伝子のうち，*dnaK*および*priA*遺伝子産物の機能阻害に基づいた細菌のファージ感受性増強について検討した。*dnaK*は，分子シャペロンとして機能するDnaKをコードする遺伝子である。DnaKはDnaJおよびGrpEとともにタンパク質のフォールディング，またはさまざまなストレスによって生じる変性タンパク質や凝集タンパク質のリフォールディング機能を有することが報告されている[1)]。*In vitro*において，植物ポリフェノールのミリセチンは大腸菌のDnaKの機能を阻害することが報告されている[2)]ことから，ミリセチンとファージの併用効果について調べた。また，PriAは停止した複製フォークを認識し，解離した複製装置を再構築して複製を再開させるタンパク質である。PriAは3'OH基が露出した二本鎖DNAを持つ複製フォークや，ラギング鎖がSingle-Stranded DNA Binding Protein（SSB）でコーティングされた一本鎖DNAを持つ複製フォークなどを認識し，その後必要に応じてPriAのATPase／ヘリカーゼ活性により一本鎖領域を出現させると，そこに複製装置を再動員する[3)]。カナマイシンおよびクロラムフェニコールはタンパク質合成阻害剤であり，それぞれリボソームサブユニット30S，50Sの阻害が主な作用点であるが，PriAとSSBの結合を阻害することも報告されている[4)]。さらに，本研究室ですでに単離している複数種の細菌に感染できるファージについて，細菌のファージレセプターを認識するスパイクタンパク質の遺伝子を同定し，ファージに導入する。これにより，複数のファージレセプターを認識できるスーパーファージの構築を試みる。本研究により，ファージ耐性化の抑制法が開発され，さらに広範囲の食中毒細菌種に感染して溶菌するスーパーファージ作製の可能性が示されると，将来，Ready-to-eat食品ならびに食肉製品の安全性向上に大きく貢献するだけでなく，抗生物質に依存しない人畜共通感染症の治療法開発など畜産業への貢献も期待される。

2．方　法

2.1　*dnaK*および*priA*遺伝子産物の阻害物質とファージの併用効果

ミリセチンとファージの併用効果について検討した。まず，*E. coli* BW25113懸濁液に種々の濃度のミリセチン溶液を添加して37℃で培養し，培養開始６時間目にファージS127 BCL３を接種して培養を続け，ファージ接種後，経時的に生菌数測定を行って効果を検討した。

また，*E. coli* BW25113菌液にファージS127 BCL３とPriA阻害物質を同時に添加し，０，３，６，９，24時間目に培養液中の生菌数を測定してその効果を評価した。抗生物質は最小生育阻止濃度ならびにその半量程度で添加した。

さらに，タンパク質合成阻害剤であるがPriAとの相互作用を示さないテトラサイクリンについても対照として同様に実験を行った。

© The Ito Foundation

2.2　ファージレセプターの同定(マルチレセプター認識スーパーファージ作製の基礎検討)

E. coli BW25113培養液と1.0×10^9PFU/mlとなるように調整したECP52ファージ（研究室保有ファージ）溶液を100 μlずつLB液体培地5 mlに添加して37℃で一晩振とう培養した。この培養上清をECP52ファージ溶液として試験に用いた。*E. coli* BL21 （DH3），BW25113，Δ*ompA*，Δ*ompC*，Δ*ompF*，Δ*ompG*，Δ*ompL*，Δ*ompN*，Δ*ompR*，Δ*ompT*，Δ*OmpX*，Δ*waaC*，Δ*rfaG*，Δ*rfaL*をそれぞれ含む軟寒天を重層したLB寒天培地にECP52ファージ溶液をスポットして37℃で一晩培養後，形成されたプラーク数を測定した。ファージ調製に用いた宿主に対するプラーク形成能力EOP（Efficiency of plating）を基準（EOP＝1）として，それぞれの株に対するEOPを算出した。

3．結果と考察

3.1　*dnaK*遺伝子産物の阻害物質とファージの併用効果

ミリセチンによる最適処理時間について検討した結果，**Fig. 1** に示すようにミリセチンで6時間前処理した大腸菌にファージを添加した場合の生菌数は6.9log CFU/mlと，親株と比べて生菌数は1.5log低かった。また，終濃度500 μMのミリセチンで6時間処理した菌体の生菌数は約9 log CFU/mlであった。MOIが約0.1という低い値であるが，ミリセチンとの併用により，未処理に比べてファージ接種により生菌数を2 log減少させることができた。ミリセチンによる最適処理濃度について検討した結果（**Fig. 1**），ファージ接種10，12時間後，親株の生菌数はそれぞれ8.1および5.3log CFU/mlであった。一方，ファージ接種10，12時間後，終濃度500 μMのミリセチンで6時間処理した大腸菌の生菌数はそれぞれ6.4および4.3log CFU/mlであった。ミリセチンで処理することで，ファージ接種10，12時間後の生菌数は，親株と比べてそれぞれ1.5および1.0log減少した。

終濃度500 μMのミリセチンで処理した大腸菌は*dnaK*欠損株と同様の性質を示すことが知られている[5]。*In vivo*において，*dnaK*欠損株では細菌の集合体であるバイオフィルムが形成されず，バイオフィルム形成に必要なカーリせん毛の合成

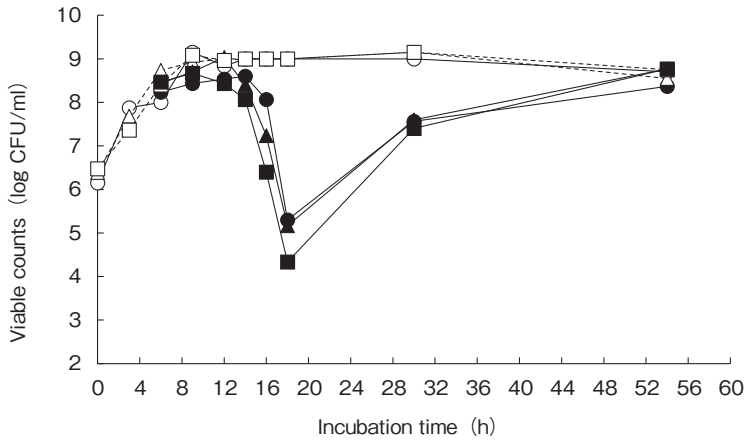

Fig. 1　Effect of pre-treatment (6 h) of myricetin on phage susceptibility of *E. coli* BW25113
E. coli BW25113 was pretreated with myricetin at 0 μM (○), 200 μM (△), and 500 μM (□) for 6 h. Phage S127 BCL3 was added to the culture containing myricetin at 0 μM (●), 200 μM (▲), and 500 μM (■) at MOI ≒ 0.5. The values are the mean ± S.D. for three separate experiments.

© The Ito Foundation

が抑制される。ミリセチンで処理した大腸菌はミリセチン濃度依存的にバイオフィルムの形成が抑制され，終濃度300 μMのミリセチンで処理するとカーリせん毛合成が抑制される。また，DnaKは熱ショックタンパク質として知られている[6]。このことから，大腸菌は44℃のような最適温度よりも高い温度に対する耐性がある。しかし，*dnaK*欠損株は44℃では生育できない。さらに，抗生物質の一種であるバンコマイシンはグラム陽性細菌に抗菌作用を示すが，グラム陰性細菌には抗菌作用を示さない。これはグラム陰性細菌の外膜がバンコマイシンの菌体内への透過を阻止するためである。しかし，*dnaK*欠損株は50 μg/ml以上の濃度のバンコマイシンで処理すると，感受性を示す。一方，終濃度500 μMのミリセチンで処理した大腸菌も同様に44℃で生育できず，バンコマイシン感受性を示す。したがって，終濃度500 μMのミリセチン処理菌体は*dnaK*欠損株と同様の性質を示していると推定される。*dnaK*欠損株においてファージ感受性が高くなった原因については，さらに*dnaK*欠損株の表現型を調べて考察する必要があると考えられる。

3.2　*priA*遺伝子産物の阻害物質とファージの併用効果

PriA阻害の可能性が報告されている物質とファージの併用によるファージの殺菌効果の増大および耐性菌集団の増殖抑制の可能性について検討した。

カナマイシンとの同時処理（**Fig. 2A**）では，ファージ＋カナマイシン添加後６時間目における生菌数がファージ単独処理に比べて，カナマイシン終濃度２ μMで0.7log，終濃度５ μMで1.4log低かった。９時間目における生菌数は終濃度２ μMで0.5log，終濃度５ μMで1.8log低かった。終濃度２ μMでは24時間後に生菌数はコントロールと同程度まで増加した（≒10^9CFU/ml）が，終濃度５ μMではファージ単独処理と比較して1.1log低かった。

クロラムフェニコールでは，同時処理（**Fig. 2B**）６時間目における生菌数が終濃度２ μMで1.6log，終濃度５ μMで1.7log低く，９時間目における生菌数は終濃度２ μMで2.3log，終濃度５ μMで3.3log低かった。しかしファージ添加24時間後には，いずれの濃度でもファージ単独処理と同程度にまで生菌数は増加した。終濃度５ μMの場合は，ファージ添加３時間目から９時間目にかけて生菌数が検出下限未満となった。またいずれの濃度でも，ファージ添加24時間後においても生菌数はファージ単独処理より低いままであった。しかし，テトラサイクリンとファージとの併用処理では，ファージの溶菌活性の増大および耐性菌の増殖抑制は認められなかった（**Fig. 2C**）。PriAはファージ耐性化機構であるCRISPR-Casシステムのadaptationフェーズ（prime型）にも関与し，Cascade-crRNA複合体とDNAの結合により生じるRループと呼ばれる構造をRecGとともに認識し，その構造を取り除く。それによりssDNA領域が露出することでCas1-Cas２複合体がDNAに近づき，複数回DNAを切断することでスペーサーを獲得する[7, 8]。これより，PriAの機能を阻害することはCRISPR-Casシステムのスペーサーの獲得を阻害することにつながり，その結果として耐性菌の出現を抑制した可能性も考えられる。

3.3　*E. coli* BW25113野生株由来のECP52によるプラーク感染効率（EOP）の評価

マルチレセプター認識スーパーファージ作製の基礎的検討として，ファージECP52が宿主に吸着する際に関連があると予想される外膜タンパク質やリポ多糖と感染効率との関係性について検討した。*E. coli* BW25113野生株を宿主としてECP52を調製し，11種類の外膜タンパク遺伝子欠損株とリポ多糖合成遺伝子欠損株に対するEOPを比較

© The Ito Foundation

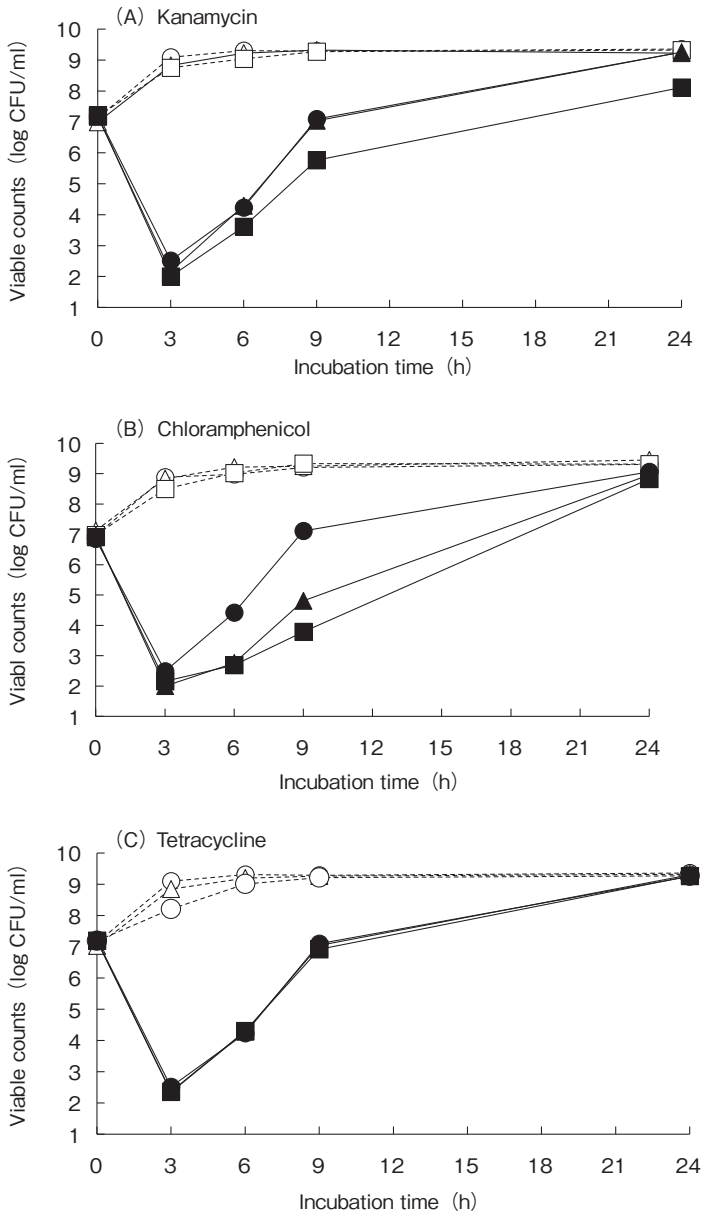

Fig. 2　Effect of PriA inhibitors on phage susceptibility of *E. coli* BW25113
E. coli BW25113 was incubated with (filled symbols) and without (open symbols) phage S127 BCL3 (MOI = 1) (A) in the presence of Kanamycin at 0 (○, ●), 2 (△, ▲) and 5 (□, ■) μM, (B) in the presence of Chloramphenicol at 0 (○, ●), 2 (△, ▲) and 5 (□, ■) μM, and (C) in the presence of Tetracycline at 0 (○, ●), 0.5 (△, ▲) and 1 (□, ■) μM. Values are means ± SD for 3 separate experiments

した。その結果，**Fig. 3** に示すように外膜タンパク遺伝子Δ*ompR*とLPS合成酵素遺伝子Δ*waaC*において，EOPは野生株と比較して４桁ほど，Δ*ompF*において２桁ほど低下した。以上から，ECP52が感染する際にOmpRとWaaCが重要であり，OmpFも関与していることが示唆された。この結果からECP52は吸着の際にLPSのinner core領域を主たる標的とし，外膜タンパクのOmpFも

© The Ito Foundation

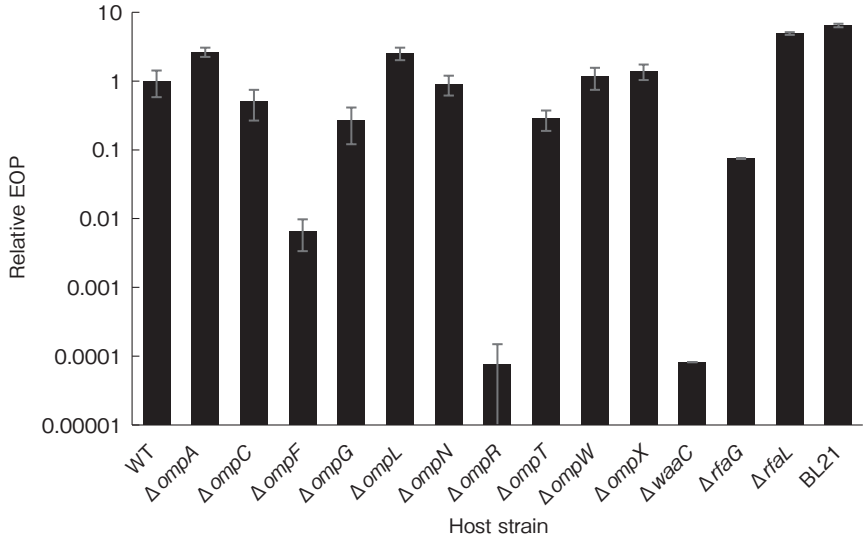

Fig. 3　Eficiency of plating for *E. coli* phage ECP52 against various *E. coli* mutants

吸着の際に利用していることが示唆された。OmpCとOmpFは膜貫通タンパクで，外膜中に親水性低分子物質に対する透過孔を形成している[9]。OmpCは高い浸透圧のときに働き，OmpFは低い浸透圧のときに働く。また，OmpRは，浸透圧制御や正の転写調節因子として環境の変化を感知するセンサータンパク質から情報を受け取って機能遺伝子の発現を調節する[10]。これよりΔ*ompR*では下流の*ompF*などの発現量が減少したことで，ECP52の吸着が阻害され，EOPの低下につながったと考えられる。

4．要　　約

溶菌ファージを用いた細菌制御法確立のためには，細菌のファージ耐性化を克服する必要がある。これまでの研究で細菌のファージ耐性化，感受性に関与する遺伝子を10種同定している。本申請研究では，これらの遺伝子のうち，*dnaK*および*priA*遺伝子産物の機能阻害に基づいた細菌のファージ感受性増強について検討した。まず，DnaKの機能を阻害することが報告されているミリセチン（500 μM）で６ｈ前処理した後，大腸菌ファージS127BCL3を添加したところ，未処理に比べてファージ添加後10，12ｈの生菌数がそれぞれ約1.5，1.0log CFU/ml低かった。PriAの機能阻害の可能性が報告されているクロラムフェニコール，カナマイシンについてファージS127BCL3とともに大腸菌BW25113株に混合して継時的に生菌数を測定した。その結果，これらの併用処理により，培養３時間後には生菌数が検出限界未満まで低下した。さらに培養９時間後の生菌数は，ファージ単独処理に比べて，２μmol/lのクロラムフェニコールの併用では1.8log，２μmol/lのカナマイシンとの併用では0.8log低かった。これらの物質とファージの併用により，医療や畜産，食品などさまざまな分野においてファージの利用拡大が期待される。さらに，テールファイバー遺伝子を複数持つ大腸菌ファージECP52について，大腸菌欠損株への感染効率を比較した。その結果，外膜タンパク遺伝子*ompR*欠損株とリポ多糖合成酵素遺伝子*waaC*欠損株において，EOPは野生株と比較して４桁ほど，*ompF*欠損株

© The Ito Foundation

において２桁ほど低下した。このことから，ECP52が感染する際にOmpRとWaaCが重要であり，OmpFも関与していることが示唆された。

文　献

1） Mayer, M. P., Bukau, B.：Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism, *Cellular and molecular life sciences*, 62(6), 670～684, 2005.

2） Chang, L., Miyata, Y., Ung, P. M., Bertelsen, E. B., McQuade, T. J., Carlson, H. A., Gestwicki J. E.：Chemical screens against a reconstituted multiprotein complex: myricetin blocks DnaJ regulation of DnaK through an allosteric mechanism, *Chemistry & biology*, 18(2), 210～221, 2011.

3） Windgassen, T. A., Wessel, S. R., Bhattacharyya, B., Keckc, J. L.：Mechanisms of bacterial DNA replication restart, *Nucleic Acids Research*. 46(2), 504～519, 2018.

4） Liu, S., Alnammi, M., Ericksen, S. S., Voter, A. F., Ananiev, G. E., Keck, J. L., Hoffmann, F. M., Wildman, S. A., Gitter, A.：Practical model selection for prospective virtual screening, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 59(1), 282～293, 2019.

5） Arita-Morioka, K. I., Yamanaka, K., Mizunoe, Y., Ogura, T., Sugimoto, S.：Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(1), 633～641, 2015.

6） Bertelsen, E. B., Chang, L., Gest, J. E., Zuiderweg, E. R.：Solution conformation of wild-type *E. coli* Hsp70 (DnaK) chaperone complexed with ADP and substrate, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(21), 8471～8476, 2009.

7） Fineran, P. C., Gerritzen, M. J. H., Suárez-Diez, M., Künne, T., Boekhorst, J., Hijum, S. A. F. T., Staals, R. H. J., Brouns, S. J.：Degenerate target sites mediate rapid primed CRISPR adaptation, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(16), e1629-e1638.

8） Ivančić-Baće, I., Cass, S. D., Wearne, S. J., Bolt, E.L.：Different genome stability proteins underpin primed and naïve adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity, *Nucleic Acids Research*, 43(22), 10821～10830, 2015.

9） Pienaar, J. A., Tobias, A. S., Barnard, G.：The viable but non-culturable state in pathogenic *Escherichia coli*: A general review, *AOSIS, African Journal of Laboratory Medicine*, 1～9, 2016.

10） Kondo, H., Nakagawa, A., Nishihira, J.：*Escherichia coli* positive regulator OmpR has a large loop structure at the putative RNA polymerase interaction site, *Nature Publishing Group*, 29～31, 1997.

© 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（Ⅱ）

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

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）

We successfully detected organic foreign objects in ham using a combination of near-infrared light and polarization-based near-infrared imaging. This method demonstrated the superiority of polarization in reducing stray light noise and accurately locating the foreign objects compared to a non-polarization-based reference sample inspection. Firstly, we evaluated a near-infrared imaging method at a wavelength of 850 nm using cartilage to accommodate the diversity of foreign objects and explored techniques to enhance the reliability of the inspection. Additionally, we addressed the issue of noise by applying filtering techniques, which improved the detection accuracy by removing unwanted noise from the images. We also investigated light imaging methods at different wavelengths to capture detailed information about the properties, light absorption, and scattering behavior of the foreign objects, leading to an increased detection rate. Furthermore, we reevaluated the polarization degree and camera installation angles, which improved the accuracy of imaging and analysis, resulting in high-quality foreign object detection images. Finally, we focused on constructing a dataset suitable for machine learning, collecting imaging data and analysis results, and using them to train machine learning algorithms, thus achieving automation and efficiency in foreign object detection.

1．目　　的

食品中に異物が混入する問題は，ソーシャルネットワーキングサービスを通じて迅速に広まり，メディアで取り上げられている。2014年度に国民生活センターへの相談内容を参考にすると，報告された1,852件の異物混入事例のうち，食品の種類別では調理食品が最も多く，穀物や菓子類へと続く[1)]。その中でも，肉に関する異物混入事例が85件（全体の５％）報告されている。異物の種類別では，ゴキブリやハエなどの昆虫が最も多く，次いでカッターや針金などの金属片，さらには毛髪や爪といった人由来のものが続く。注目すべきは，これらの異物の大半が有機物であり，なかにはプラスチックや紙，骨，小動物の死骸や羽，糞なども含まれていたことである。

現在，食品製造現場では金属検出機やＸ線検査機が導入されているが，これらは金属や石などの

© The Ito Foundation

無機物を検出することに特化しており，虫や毛髪などの有機物や小骨の検知には十分ではない。そのため，検査員の目視検査による手作業で最終確認を行っているが，異物の完全な除去には至っていない。

本研究では，食品中の有機異物を検知する光技術の開発を目的とした。独自に開発した異物検知技術として，近赤外領域の光源とその波長感度を持つカメラとの間に，２枚の偏光子を試料の前後に配置した光学系を用いて，食品中の有機異物を検知する（**Fig. 1** 参照）[2]。**Fig. 1** に異物検知画像を得るシステムを示した。ここで，２枚の偏光子の透過軸を平行（parallel以下，*P*）と直交（cross以下，*C*）ニコル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。一方，偏光*C*では，試料からの正透過光は*A*で除去され，原理上その透過光は０となる。しかし，先と同様に，異物による光散乱の影響を受けた光のみが*A*を透過する。

伊藤記念財団令和３年度研究助成において実施した近赤外光異物検知法を用いて，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）を撮像し，その後の画像解析により，目視では確認できない異物を検知することに成功した。まず，偏光*P*により，試料と異物の光吸収の差から透過光量が変化し，赤身と脂身，そして異物を確認した。また，肉厚などによる光学的不均一も鮮明に撮像された。次に，偏光*C*では，本来透過しないはずの光が試料を介して偏光を解消し，偏光子*A*を透過する偏光成分（散乱光）を撮像した。これにより，透過光量が少なくても画像*P*と異なる試料の情報を得たと考える。最後に，画像*P*と画像*C*の差分を演算処理することで，ノイズ成分を取り除き，異物のみを抽出した異物検知画像を得た（**Fig. 1** 参照）。以上の結果から，光制御と画像処理を組み合わせることで食肉中の有機異物を検知することに成功した。

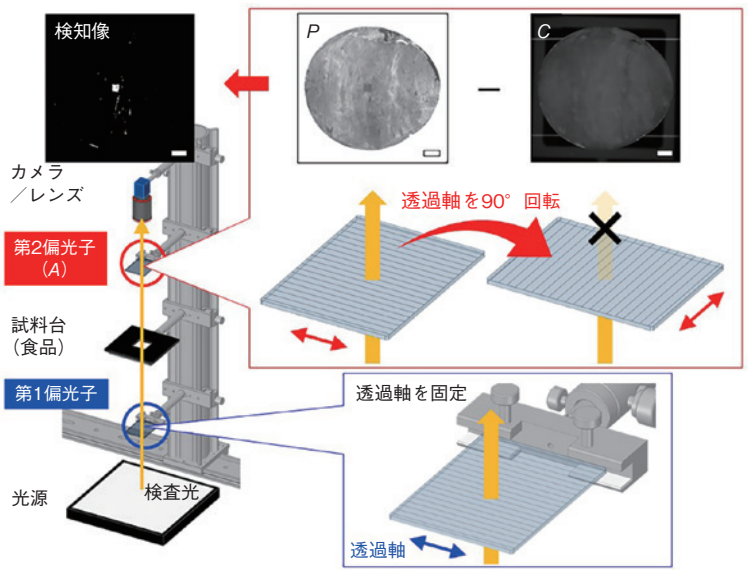

Fig. 1　独自開発した近赤外光異物検知法と，ロースハム中のゴム手袋片の検知

© The Ito Foundation

２．方　　法

先の近赤外光異物検知法では，ハムの肉厚や脂身などの要素や異物の多様性による判定条件の不確実性が課題となっていた。そこで本研究では，これらを改良し，より高精度な検査を実現した。具体的には，異物の多様性を対応するために，直径5.8mm，厚さ2.9mmの軟骨を使用し，波長850nmにおける近赤外光異物検知法を評価した。次に，ノイズの問題に対処するために，フィルタ処理の適用を検討した。また，波長940nmと波長630nmの異なる波長におけるノイズの除去も検証した。さらに，本技術の中核となる要素の偏光度やカメラの設置角度を再評価し，最適な条件を模索した。最後に，機械学習に適したデータセットを構築した。

３．結果と考察

波長850nmの近赤外光異物検知法によるロースハム中の異物（軟骨）の撮像および解析結果を**Fig. 2**に示す。目視画像より，軟骨は確認できない。偏光*P*により，試料と異物の光吸収差から透過光量の変化を観察し，赤身と脂身，異物をそれぞれ確認した。また，肉厚による光学的な不均一も明確に撮像された。偏光*C*では，通常は透過しない光が試料を介して偏光を解消し，偏光子*A*を透過する散乱光成分を撮像した。これより，少ない透過光量でも画像*P*と異なる試料情報を得ることができた。その後，画像*P*と画像*C*を差分演算処理することで，ノイズ成分を取り除き，異物のみを抽出した異物検知画像を生成した。以上の結果から，近赤外光異物検知法を用いて食肉中の軟骨を検知することに成功した。

一方，先の近赤外光異物検知法では，ハムの輪郭や内部にノイズが残ることを確認した。これらのノイズを除去するために，さまざまなフィルタ処理を検討した。具体的には，２値化をはじめ，Ｐタイル法や判別分析法，移動平均フィルタ，ガウシアンフィルタ，ディアンフィルタ，ソーベルフィルタ，Cannyエッジ検出，細線化，ガンマ補正，アンシャープマスキング，バイラテラルフィルタ，膨張，収縮，オープニング，クロージング，

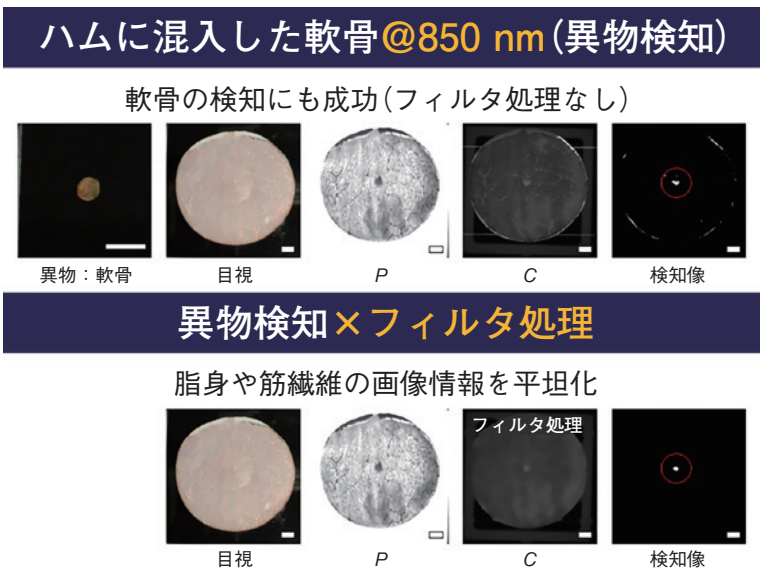

Fig. 2　ロースハム中の軟骨の検知と，フィルタ処理が与える異物検知

© The Ito Foundation

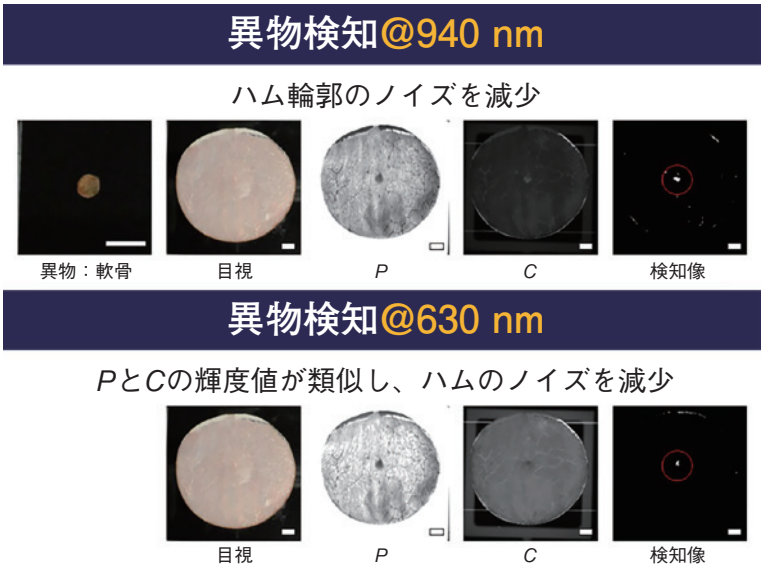

Fig. 3　波長が与える異物検知

トップハット，ブラックハット（ボトムハット），ラベリング，色変換（色相抽出），疑似カラーなどがあげられる。これらのフィルタ処理を検討した中でも，メディアン（または中央値）フィルタが，周辺画素値の大小比較を行い，中央値の画素に変換する特性から，本研究における強いノイズに対して最適なフィルタ処理であることが分かった（**Fig. 2** 参照）。

次に，波長850nm以外の波長，具体的には940nmと波長630nmによる近赤外光異物検知法を検討した（**Fig. 3** 参照）。この場合も，異物として軟骨を使用した。上段の図から分かるように，波長940nmではロースハム中の軟骨を検知することに成功した。ただし，波長850nmと同じ光パワーで入射しても，波長940nmでは露光時間が約２倍になったが，ハムの輪郭ノイズが少なくなった。これは，波長940nmにおけるハムの吸光度が小さく，偏光度が大きく現れたことにある[2)]。また，輝度値分布からも，ノイズが小さいことが確認された。下段の図では，波長630nmにおいてもロースハム中の軟骨を検知した。この場合，波長850nmと比べて，露光時間が半分になったが，偏光*P*と偏光*C*における異物の輝度値が同程度に現れた。このことから，光吸収による影響が偏光よりも支配的となり，ハム内部のノイズが大幅に減少し，異物の検知に至ったと考えられる。

さらに，今後の技術開発を進めていくうえで中心となる偏光度やカメラの設置角度を再評価し，最適な条件を模索した（**Fig. 4** 参照）。上段の図では，10° ごとに異なる偏光画像を撮影し，これらの画像を組み合わせた適切な演算処理についての検討を進めている。また，下段の図では，これまでは透過と反射に焦点を当ててきたが，散乱も考慮したカメラの適切な設置角度に関しても同時に検討している。検知画像から明らかなように，視点の角度が検査結果に大きな影響を与えることを確認した。

最後に，得られた検査画像を用い，機械学習に適した学習データの構築を進めている。学習データの構築には，異物を含むさまざまな食品の画像を収集した。例えば，ロースハムやその他の肉製品，野菜，果物などを含む。なお，これらの画像

© The Ito Foundation

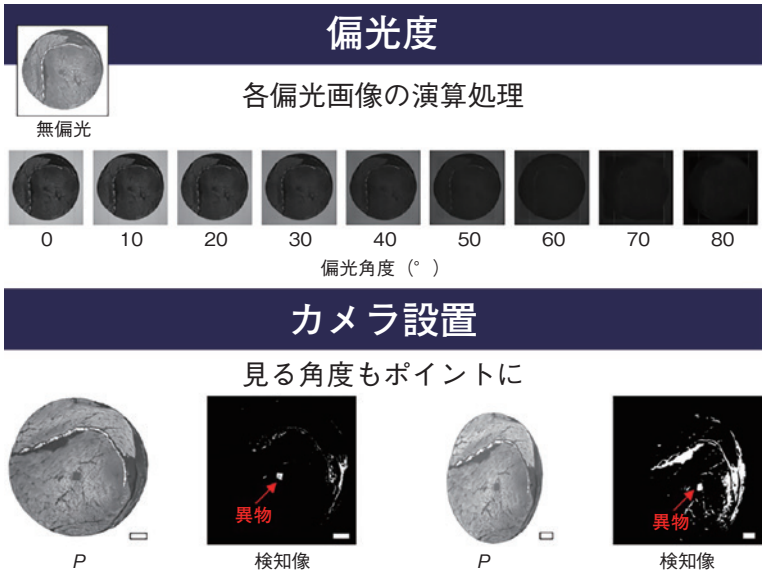

Fig. 4　その他の検査条件の検討

は，異物の存在や位置，異物と周囲の食品の光学的特性などを捉えるために撮影した。収集した画像は，事前に画像処理を行い，必要な前処理を施した。これには，リサイズ，正規化，データの水増し（オーグメンテーション）などを含む。これにより，学習データの多様性と汎化能力を向上させた。その後，VGG16である畳み込みニューラルネットワークモデルを適用した。VGG16は，異物検知のタスクにおいて優れた性能を発揮することが知られている。このモデルを事前学習済みの重みで初期化し，学習データを用い，ネットワーク学習を行った。一方で，学習済みのCNNモデルを使用し，異物検知のための予測も行っている。新しい画像を入力として与えると，モデルは異物の存在やその特徴を識別し，異常な部分を検出することができる。このような機械学習の手法により，異物の検知精度を向上し，人間の目視では見つけることが難しい微細な異物も検出できるようになってきている。今後は，検査の自動化や効率化に貢献する一方で，食品の品質と安全性の向上にも寄与していきたい。

4．要　　約

近赤外光と偏光を組み合わせた近赤外光異物検知法を使用し，ロースハム中の有機異物を成功裏に検知した。本手法は，偏光を用いない対照試料に比べて迷光ノイズを低減し，異物の位置を特定することができる一方，異物の多様性に応えるため，軟骨を使用した波長850nmの近赤外光異物検知法を評価し，その信頼性の向上を探求した。そして，フィルタ処理を適用したノイズの問題に対処し，異物の検出精度を向上させた。さらに，異なる波長による光異物検知法も検討し，異物の特性と光の吸収・散乱の挙動を詳細に捉えることで検出率を向上させることができた。この他にも，偏光度とカメラの設置角度の再評価により，異物の撮像と解析の精度を向上させ，高品質な異物検知画像を得ることができた。最後に，機械学習に適した学習データの構築に取り組み，異物の撮像データと解析結果を収集して機械学習アルゴリズムの学習に使用し，異物検知の自動化と効率化を実現した。なお，これらの研究成果は，雑誌３報

© The Ito Foundation

と発表４件（うち１件は展示を含む），受賞１件である[3～10]。

文　献

1） https://www.kokusen.go.jp/news/data/n-20150126_1.html
2） 山口堅三：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，第40巻，pp.82-86，2022.
3） 宮本遼二，大津朋也，釜野勝，獅々堀正幹，山口堅三：偏光で見る食品中の有機異物検査，ふーま，第156号，pp.24-27（2023年２月）
4） 山口堅三，大津朋也，釜野勝，獅々堀正幹：近赤外光と偏光，画像解析が織りなす食品の異物検査，明日の食品産業，第531号，pp.31-38（2022年11月）
5） 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，第32巻第６号，pp.54-58（2022年６月）
6） 山口堅三：近赤外光による食品異物検査について～見えない光で見つけだす～，食品技術士センター講演会（2023年３月）
7） 山口堅三：人の目に代わる光技術，食品機械関連技術パネルディスカッション（2023年３月）
8） 山口堅三：食品ロスゼロ社会を目指す光異物検査技術，FOOMA JAPAN2022国際食品工業展（2022年６月）
9） 山口堅三：光で変える新しい異物検査法～安全・安心・安定して提供する食を目指して～，FOOMA JAPAN2022国際食品工業展（2022年６月）
10） FOOMAアカデミックプラザ賞準グランプリ，一般社団法人日本食品機械工業会（2022年６月）

© The Ito Foundation

高酸素ガス置換包装が食中毒菌の生存性に与える影響の検証

Evaluation of the effect of high-oxygen modified atmosphere packaging on the survival of food poisoning bacteria

岡　田　彩　加
（岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科）

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

In recent years, high-oxygen modified atmosphere packaging (high O_2MAP), in which meat is packaged under high oxygen concentration (80 %　oxygen concentration and　20 % carbon dioxide concentration) to maintain meat quality, has been reported to extend the shelf life of meat. High O_2MAP was known to inhibit the growth of mesophilic bacteria and *Enterobacteriaceae*. This study focused on *Campylobacter* spp., which are the most common bacteria implicated in incidents of food poisoning reported since 2003 in Japan, and aimed to investigate the effect of high O_2MAP on *Campylobacter* spp. In this study, a simple method to create a high O_2MAP in the laboratory without the use of large equipment was established. The viability of *Campylobacter* spp. in a high O_2MAP environment was investigated using the established method. The viability of *Campylobacter* spp. was suppressed under high O_2MAP conditions more than under atmospheric conditions, indicating the usefulness of high O_2MAP. Further validation using lower concentrations of *Campylobacter* spp. is needed.

1．目　　的

近年，食肉の品質保持のために高酸素濃度（酸素濃度80%，二酸化炭素濃度20%）で包装するガス置換包装（以下，高O_2MAP）が使用され，一般細菌や腸内細菌科菌群の増殖を抑制し，食肉の消費期限を延長することが報告されている[1)]。著者は一般細菌などのいわゆる衛生指標菌ではなく，食中毒菌への効果はあるのかという疑問を持った。そこで本研究では，近年の細菌性食中毒発生件数の中で第１位の病原体であるカンピロバクターに着目し，高O_2MAPのカンピロバクターへの効果を調査することを目的とした。

カンピロバクターは他の食中毒菌とは異なり，食肉上で増殖しない性質を持つため，増殖性ではなく，生存性を確認することが必要となる。しかし，カンピロバクターは生存に不利な環境になると，生きているが培養不能な状態，Viable but non culturable（VBNC）状態となることが知られる。高O_2MAPではカンピロバクターはVBNC状態となっている可能性が高く，一般的に用いられる培養法では正確な調査が困難である。著者はすでに食肉上のVBNC状態のカンピロバクターも含めた生きたカンピロバクターを検出する手法を

© The Ito Foundation

確立しており[2]，本研究ではVBNC状態のカンピロバクターも含め，カンピロバクターの生存性における高O_2MAPの効果を検証することを目指す。

しかし，食鳥肉はすべてカンピロバクターに汚染されているわけではなく，さらに，汚染されていてもパックごとに汚染菌数が大幅に異なるため，自然に付着したカンピロバクターで実験を行うことができない。また，カンピロバクターはBSL２の病原体であるため，増菌培養したものを使用する際は安全キャビネットなどが備えられた適切な実験室で作業を行う必要があるため，実際の食肉工場で使用される高O_2MAP用の機器を使用することができない。本研究課題では，実験室内で高O_2MAP環境を作出する手法を確立するとともに，作出した環境下における鶏肉上のカンピロバクター生存性の評価を行うことを目的とした。

２．方　　法

2.1　高O_2MAP環境の作出

当初予定していたデシケーターと真空ポンプを用いた手法では難しかったため，以下の手法により，高O_2MAP環境を作出した。概要を**Fig. 1** に示す。

耐ガス透過性の高い，11サンプリングバッグ（Smart Bag PA CEK-1, GL Sciences, Tokyo, Japan）を使用した。サンプリングバッグは２口タイプであり，それぞれ，ミニバルブ付スリーブϕ6，M6コネクターを接続したものを使用した。サンプリングバッグの片側をハサミで切り開き，鶏肉を入れるための入口とした。鶏肉を設置した後，シーラー（NL-202JC-5，石崎電機製作所，Tokyo，Japan）でサンプリングバッグを接着して密閉した。ミニバルブ付スリーブにシリコンホースを接続してサクションポンプ（SP30, Air Liquide Medical Systems, Italy）によってサンプ

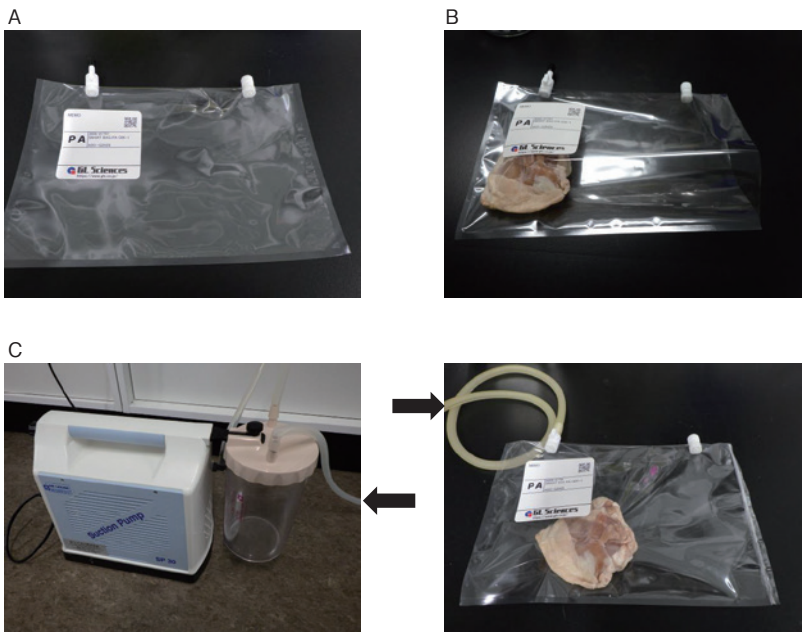

Fig. 1　Schematic of the experiments. A sampling bag (A). A piece of meat was set inside the sampling bag with one side cut (B). The sampling bag with meat was sealed and connected to a suction pump at arrows (C).

© The Ito Foundation

リングバッグ中の空気を吸引した。吸引後，混合ガス（80％酸素，20％二酸化炭素）（三光堂，Gifu，Japan）をミニバルブ付スリーブから直接サンプリングバッグに充填した。M6コネクターからガス濃度測定器（CheckPointO_2/CO_2，Dansensor, Ringsted, Denmark）により，酸素濃度および二酸化炭素濃度を測定した。また，４℃で10日間静置した後のガス濃度についても測定した。

2.2　鶏肉上のカンピロバクター生存性の検証

2.2.1　擬似汚染鶏肉の準備および高O_2MAP環境への設置

カンピロバクター陰性であることをPCR法にて確認した市販鶏肉に実験的に増菌培養したカンピロバクターを塗布することで擬似汚染鶏肉を作出した。すなわち，*C. jejuni* NCTC11168株を－80℃に保存したグリセロールストックよりmCCDA培地に塗布し，37℃で48時間，微好気培養した。コロニーの一部をミューラーヒントン寒天培地に塗抹し，37℃で18±２時間，微好気条件で培養した。寒天培地から滅菌綿棒で菌体を掻き取り，PBSに懸濁し，OD600を1.0に調整し，5.0×10^8～1×10^9CFU/mlの生菌サンプルとした。これらを階段希釈することで5.0×10^4～1×10^5CFU/mlの菌液とし，鶏肉25gあたりに100 μlずつそれぞれの菌液を塗布し5.0×10^3～1×10^4CFU/25gの擬似汚染鶏肉とした。計測する日数分の培養法，PMA-qPCR法で測定するのに必要な分をそれぞれ別のサンプリングバッグに準備した。

2.2.2　培養法（MPN法）

NIHSJ-02法に準じて実施した。すなわち，検体（市販鶏肉25ｇ）にプレストン培地（OXOID, Hampshire, UK）を225ml加えたものをストマッカー処理し試料液を作製し，MPN法により菌数を算出した。すなわち，鶏肉をストマッカー処理したプレストン培地の原液を３本の空の試験管に各10mlずつ分注し，さらに試液１mlおよび0.1mlを各々プレストン培地が10ml入った試験管３本ずつに接種した。42℃で24時間，微好気条件で培養し，プレストン培地から１白金耳分の検体をmCCDA培地に塗布し，42℃で48時間，微好気条件で培養した。コロニーが認められたものについてはコロニーPCRにより，カンピロバクター陽性であることを確認した。カンピロバクター陽性となった試験管数から最確数表[3]よりMPN値を求め，さらに得られた値を10倍して100g当たりのカンピロバクター汚染菌数を求めた。

2.2.3　PMA-qPCR法

すでに確立済みの手法を用いて実施した[1]。市販鶏肉25gをストマッカー袋に入れ，PBS 10mlを添加し，手で揉み込むように表面をリンスした。フィルターを通して懸濁液を回収し，リンス液とした。リンス液を800×*g*，４℃で10分間遠心し，不純物を除去した。上清を8,000×*g*，４℃で10分間遠心し，ペレットをPBSで懸濁し，160 μlとしたものをサンプルとした。160 μlのサンプルにPMA Enhancerを40 μl，PMAxxを終濃度が25 μMとなるように加え，37℃で10分間インキュベートし，PMAxx活性化のためLED Crosslinker 12（Takara, Shiga, Japan）を用いて15分間光照射を行った。PMA処理を繰り返し実施するため，8,000×*g*，４℃で10分間遠心操作を行い，160 μlのPBSで懸濁し，再度上記の操作を行った。DNA抽出は200 μlの懸濁液からDNeasy Blood & Tissue Kit（Qiagen, Hilden, Germany）を用いて行い，100 μlのバッファーで溶出した。鶏肉に塗布する際に作出したカンピロバクターの階段希釈液を用いて同様にPMA処理，DNA抽出を行い，検量線作製用のサンプルとした。

qPCR 法 は GoTaq Probe qPCR Master Mix（Promega, Madison, WI, USA），フォワードプラ

© The Ito Foundation

イマーcampF2（5'-CAC GTG CTA CAA TGG CAT AT-3'），リバースプライマーcampR2（5'-GGC TTC ATG CTC TCG AGT T-3'），プローブ（5'-FAM- CAG AGA ACA ATC CGA ACT GGG ACA-BHQ1-3'）を使用し，マニュアルに従い実施した。コントロールサンプルを用いて作出した検量線から，カンピロバクターのコピー数を算出した。

3．結果と考察

3.1　高O_2MAP環境の作出

デシケーターと真空ポンプを使用する手法では，一度完全な真空にする必要があるが難しく，窒素濃度を０にすることができなかったため，２.方法に示すように，サンプリングバッグを用いた手法で高O_2MAP環境の作出を実施した。ガス置換直後のガス濃度についてはO_2が78.8％，CO_2が18.8％であった。また，10日後のガス濃度はO_2が77.1％，CO_2が15.6％であり，日数が経つごとにO_2，CO_2濃度の低下が認められるものの，高い濃度を維持することが可能であった。

3.2　鶏肉上のカンピロバクターの生存性の検証

鶏肉に塗布したカンピロバクターの生存性を培養法およびPMA-qPCR法により検証した。実施前にガス濃度が維持されているかを確認し，以下の値であった。ガス置換２日目ではO_2が78.1％，CO_2が18.1％（培養法），O_2が77.7％，CO_2が18.3％（PMA-qPCR法），ガス置換３日目ではO_2が79.4％，CO_2が18.4％（培養法），O_2が77.6％，CO_2が18.1％（PMA-qPCR法），ガス置換４日目ではO_2が77.6％，CO_2が18.1％（培養法），O_2が78.6％，CO_2が18.2％（PMA-qPCR法），ガス置換５日目ではO_2が76.6％，CO_2が17.8％（培養法），O_2が78.4％，CO_2が18.2％（PMA-qPCR法）であった。

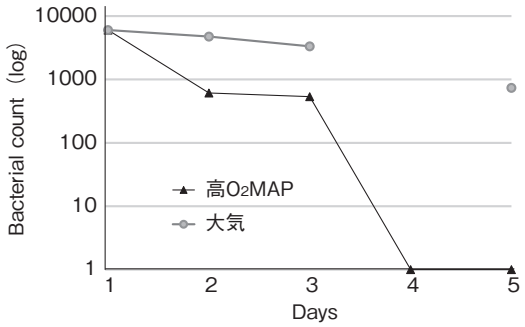

Fig.2　Quantitative change of inoculated *Campylobacter* spp. counts in packed broiler whole legs of trials 1-5 days.

培養法では菌数が少ないため，MPN法を用いたが，すべてのサンプルにおいて10ml，１ml，0.1mlの増菌培養液を塗抹したmCCDA培地でカンピロバクター陽性となり，1100MPN/100g以上と算出された。そのため，菌数の減少を確認することはできなかった。今後，より低濃度の菌数を塗布することで検証を実施する必要があると考えられる。

培養法と同時にPMA-qPCR法による検証も実施し，算出したカンピロバクターコピー数の推移をグラフに示した（**Fig.２**）。大気環境で保存した４日目の鶏肉に関して，手技のミスからDNA抽出を実施できなかったためデータから除いて示した。大気環境で保存した鶏肉に関しては４℃に設置してから５日目においても10分の１程度の生菌数を維持していた。一方，高O_2MAP環境下で保存した鶏肉においては４℃に設置した翌日には10分の１程度まで減少し，設置４日目においては検出限界以下となった。2023年に実験的にカンピロバクターを塗布した鶏肉における高O_2MAP環境の影響を検証した論文が報告された[4]が，６日後においてもカンピロバクターが検出されており，本研究報告と一致しなかった。この論文では１×10^5CFU/gというかなり高濃度の菌が塗布されていたことが要因であると考えられる。そのた

© The Ito Foundation

め，最初に鶏肉に塗布する菌量の設定はかなり重要であることが示唆された。

本研究により，高O_2MAP環境におけるカンピロバクターの生存性は大気環境よりも抑制されることが示唆された。今回は5.0×10^3～1×10^4 CFU/25 g程度の菌数を塗布したが，実際の鶏肉上の菌数はより低いと考えられるため[5]，今後，より低濃度の菌数での検証が必要であると考えられる。

４．要　約

本研究において実験室内で大型の機器を用いることなく，簡便に高O_2MAP環境を作出する方法を確立できた。確立した手法を用いて高O_2MAP環境におけるカンピロバクターの生存性を検証したところ，大気環境よりも抑制されることが示唆され，高O_2MAP包装の有用性が示された。今後，より詳細な検証を実施する必要がある。

文　献

1） 原理洋，加藤千晶，野市哲也，菊池貴子，梅津準士，富田昌俊，森田幸雄：高濃度酸素ガス置換包装された食肉の衛生指標菌の動向および官能検査結果，日本食品微生物学会雑誌，**38**，88～92，2021.

2） Okada, A., Tsuchida, M., Rahman, M. M., Inoshima, Y.：Two-round treatment with propidium monoazide completely inhibits the detection of dead *Campylobacter* spp. cells by quantitative PCR, *Frontiers in Microbiology*, **13**, 801961，2022.

3） De Man：MPN Tables: Corrected, *Europian Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, **17**, 301～305，1983.

4） Beterams, A., Tolksdorf, T., Martin, A., Stingl, K., Bandick, N., Reich, F.：Change of Campylobacter, Escherichia coli and Salmonella counts in packaged broiler breast meat stored under modified atmosphere and vacuum conditions at 4 and 10 ℃ based on cultural and molecular biological quantification, *Food Control*, **145**, 109337，2023.

5） Duqué, B., Daviaud, S., Guillou, S., Haddad, N., Membré, J. M.：Quantification of *Campylobacter jejuni* contamination on chicken carcasses in France, *Food Research International*, **106**, 1077～1085，2018.

© 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（Ⅱ）

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

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 and showed the usefulness of this mutant strain as an animal model for CVM in the last year. In this year, we showed that *Slc35a3* mRNA was expressed in the presomitic mesoderm of wild-type mouse embryos, suggesting that SLC35A3 transports the UDP-GlcNAc used for the sugar modification of Notch receptors, which is an essential step in somite formation. To understand the pathogenic basis for chondrodysplasia in *Slc35a3* KO mice, we performed detailed histological analyses of this mutant strain. In the cartilage of *Slc35a3* KO embryos, the extracellular matrix space was severely reduced, and many flat proliferative chondrocytes were reshaped. Similar histological abnormalities have been reported in the two mutants accompanied by impaired glycosaminoglycan (GAG) biosynthesis. Conversely, chondrocyte proliferation, apoptosis and differentiation were not affected in *Slc35a3* KO mice. These results and findings suggest that the chondrodysplasia phenotypes in *Slc35a3* KO mice should be caused mainly by abnormalities in extracellular matrix quality and the impaired GAG biosynthesis contributes to the chondrodysplasia phenotypes. To elucidate the pathogenic mechanisms of CVM, we are going to perform the multiple analyses of *Slc35a3* KO mice, including detailed sugar chain and comprehensive gene expression analyses.

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

© The Ito Foundation

成不全を示し，その約８割が妊娠260日までに死流産する。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である。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，十分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る。私たちは令和３年度伊藤記念財団の研究所助成を受け，*Slc35a3* knockout（KO）マウスを作製し，同マウスのCVMモデル動物としての有用性を報告した（**Fig. 1**）[4]。本研究では同マウスの詳細な形態学的，組織学的解析を行い，SLC35A3機能欠損による脊椎形成不全，軟骨形成不全のメカニズムについて検討した。

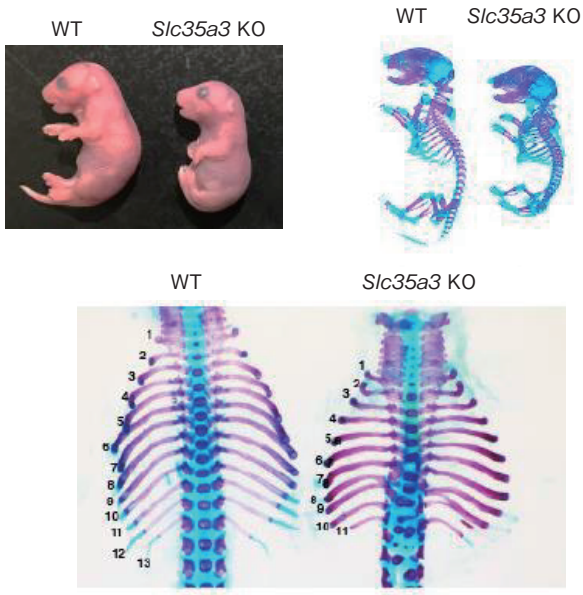

Fig. 1　*Slc35a3* KO mouse strain is a useful animal model for CVM.
（A）Gross appearance of wild-type（WT）and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5.（B）Whole skeleton stained with Alizarin red and Alcian blue of WT and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5.（C）Dorsal view of spine and ribs. *Slc35a3* KO mice exhibited vertebral malformation, including misshaped vertebrae, fusion of vertebral bodies, and fusion and bifurcation of rib.

© The Ito Foundation

2．方　法

胎生9.25日の野生型マウス胚を用いてホールマウント*in situ*ハイブリダイゼーション（WISH）を行い，体節形成時期における*Slc35a3* mRNAの発現を調べた。マウス胚を４％ PFA/PBSで４℃で一晩固定し，脱水した。0.1％ Tween 20を含むPBS（PBST）で胚を再水和し，20mg/mlのProtein Kを含むPBST中で８分間処理した。４％ PFA/0.2％グルタルアルデヒドで再固定した後，胚をDIG標識RNAプローブと66℃で一晩ハイブリダイズさせた。洗浄後，0.1％ Tween 20を含むTris緩衝生理食塩水（TBST）で１：2000に希釈したアルカリホスファターゼと結合した抗DIG抗体とともに胚を室温で３時間インキュベートした。TBST洗浄後，BM Purple（Roche Life Science）を使用して，アルカリホスファターゼ活性を可視化した。

私たちの研究室で系統維持している*Slc35a3* hetero KOマウスの雌雄を交配させ，帝王切開によって胎生18.5日の*Slc35a3* KOおよびコントロール（野生型＋*Slc35a3* hetero KO）マウス胚を摘出し，成長板軟骨の組織切片を作製した。これらの切片を用いHE染色，TUNEL染色，*in situ* ハイブリダイゼーション（ISH）を行った。TUNEL染色には，*in situ* Apoptosis Detection Kit（TaKaRa）を使用した。ISHはGenostaff社の方法に準じて行った[5]。SLC35A3欠損の軟骨細胞増殖への影響を検討するために，BrdUラベル実験を行った。妊娠18.5日目のメスマウスにBrdU溶液（２mg/ml）を100mg/kg用量で腹腔内投与し，その３時間後に安楽殺し，胎子を提出した。提出した胎子は安楽殺した後に後肢を摘出し，パラフィン切片を作製した。抗BrdU抗体染色には，eBioscience™ BrdU Kit for IHC/ICC Colorimetric（Invirtogen）を使用した。

本研究で実施した動物実験は，岩手大学動物実験等管理規則に従い，本学動物実験委員会の承認（承認番号：A202047）を得て行った。

3．結果と考察

WISHの結果，*Slc35a3*アンチセンスプローブの陽性シグナルは胚の体幹部位で検出され，未分節中胚葉が存在する尾部に近づくにつれて強くなった（**Fig. 2A**）。尾部の拡大画像では，未分節中胚葉と神経上皮に陽性シグナルが検出された（**Fig. 2B**）。コントロールのセンスプローブを用いたWISHでは陽性シグナルは観察されず（**Fig. 2C**），アンチセンスプローブを用いて認められた陽性シグナルは非特異的な反応ではなく，

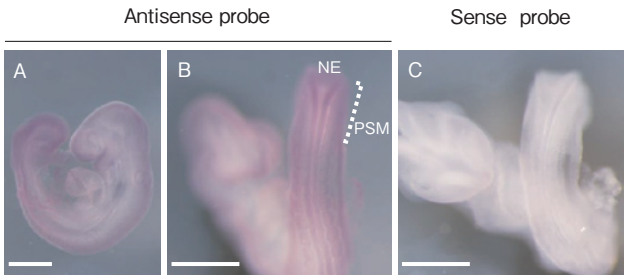

Fig. 2 *Slc35a3* mRNA was expressed in the presomitic mesoderm during somite formation. Whole-mount *in situ* hybridization images of wild-type mouse embryos at E9.25 produced using the antisense (A, B) and the sense (C) probes against *Slc35a3* mRNA. Lateral side view (A), and the magnified images of the tail region (B, C). NE： neuroepithelium, PSM： presomatic mesoderm. Scale bars：500 μm.

© The Ito Foundation

Slc35a3 mRNAを検出した結果であることが示された。脊椎は胎生期に未分節中胚葉が周期的にくびれ切れることで形成される体節に由来する。体節形成にはNotchシグナルが重要な役割を担っており，Notch受容体上の*O*-フコース残基にGlcNAcを付加する糖転移酵素をコードする*LFNG*遺伝子の変異は，ヒトとマウスで重度の脊椎形成不全を引き起こす[6]。WISHによって，*Slc35a3* mRNAは体節形成期の未分節中胚葉で発現していることが明らかとなり，SLC35A3はLFNGの基質として用いられるUDP-GlcNAcを輸送することで体節形成に関わっていることが強く示唆された。

胎生18.5日胚の組織切片のHE染色像を観察した。成長板は，端から球状増殖軟骨細胞，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る（**Fig. 3A**）。*Slc35a3* KOマウスの成長板の高さは，野生型マウスと比べ有意に短縮していたが，３層の区別は可能であった（**Fig. 3A**）。KOマウスの球状および扁平増殖軟骨細胞層では，軟骨細胞外マトリックス（ECM）領域が著明に減少しており，それに伴って細胞密度は上昇していた（**Fig. 3A，B**）。KOマウスの扁平増殖軟骨細胞の多くは，立方状に変形していた。

次に，KOマウスの軟骨細胞の増殖能をBrdU取込み実験で調べた。安楽死させたBrdUラベル胎子の後肢のパラフィン切片を作製し，抗BrdU染色を行った。コントロールおよびKOマウスの球状および扁平増殖軟骨細胞層にBrdU染色陽性細胞が認められた（**Fig. 4A**）。BrdU陽性細胞の割合を計測した結果，球状および扁平増殖軟骨細層の両方で，コントロールとKOマウスの間に有意差はなかった（**Fig. 4B**）。したがって，*Slc35a3* KOマウス軟骨細胞の増殖能に大きな異常は起きていないことが示された。次に，*Slc35a3* KOマウスの軟骨細胞のアポトーシス頻度をTUNEL染色によって調べた。コントロールおよびKOマウスの肥大軟骨細胞層の下部に，TUNEL陽性細胞が認められた（**Fig. 4C**）。TUNEL陽性細胞の割合を計測した結果，コントロールとKOマウスの

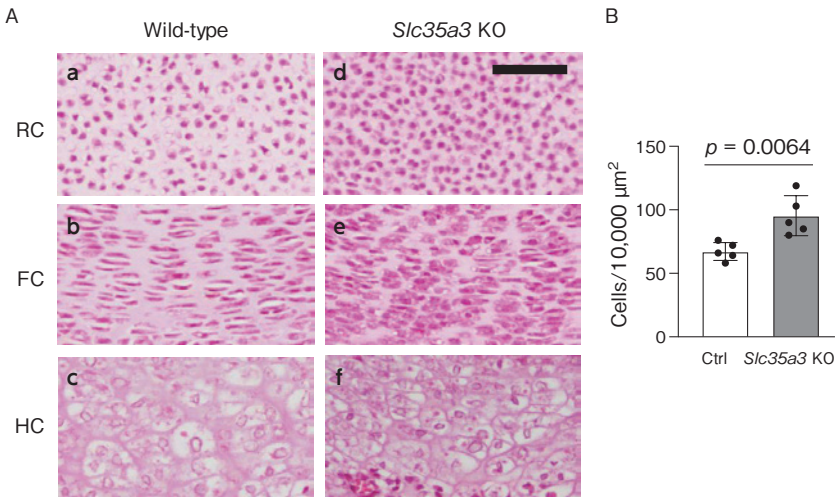

Fig. 3　Cartilaginous extracellular matrix space was severely reduced in *Slc35a3* KO mice. Humerus and lumbar vertebrae sections of Control（Ctrl, wild-type＋*Slc35a3* hetero KO）and *Slc35a3* KO littermate embryos at E18.5 were stained using hematoxylin and eosin（HE）solution.（A）High magnification images of the round chondrocyte（RC）, flat chondrocyte（FC）, and hypertrophic chondrocyte（HC）zones in the growth plates. Scale bars, 50 μm.（B）Cells were counted in the round chondrocyte zone of HE-stained sections within the squares（100×100 μm）.

© The Ito Foundation

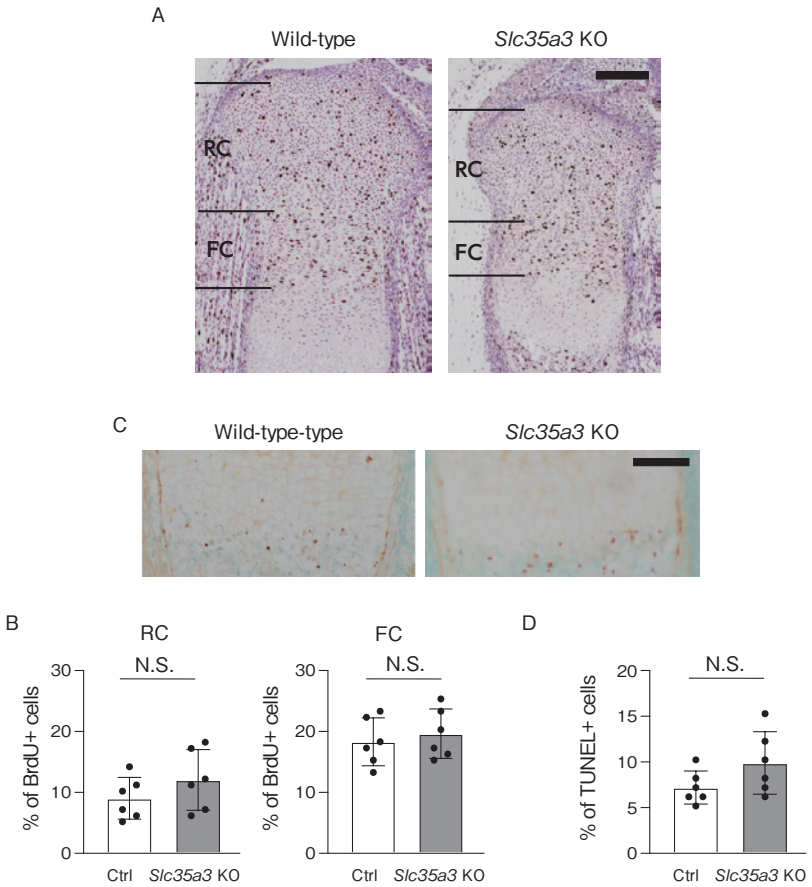

Fig. 4　Chondrocyte proliferation in *Slc35a3* KO mice.
（A）BrdU staining of the tibia sections from the BrdU-treated embryos at E18.5. RC, round chondrocyte zone; FC, flat chondrocyte zone. (B) Frequency of BrdU-positive cells in the RC and FC zones. (C) TUNEL staining of the hypertrophic chondrocyte zone in the tibia sections at E18.5. (D) Frequency of TUNEL-positive cells in the hypertrophic chondrocyte zone. Scale bars, 200 μm (A) and 100 μm (C).

間に有意差は認められなかった（**Fig. 4D**）。したがって，*Slc35a3* KOマウスの軟骨細胞におけるアポトーシス頻度に大きな異常は起きていないことが示された。

最後に*Slc35a3* KOマウスの軟骨細胞分化能を調べるために，Ⅱ型コラーゲンをコードする*Col2a1*とX型コラーゲンをコードする*Col10a1*のアンチセンスRNAプローブを用い，ISHを行った。Ⅱ型コラーゲンとX型コラーゲンはともに軟骨特異的に発現し，Ⅱ型コラーゲンは増殖軟骨細胞，X型コラーゲンは肥大軟骨細胞が産生する。*Col2a1*アンチセンスプローブを用いた染色では，コントロールおよびKOマウスの増殖軟骨細胞層に陽性シグナルが検出され，*Col10a1*アンチセンスプローブを用いた染色では，肥大軟骨細胞層に陽性シグナルが認められた（**Fig. 5A**）。KOマウスにおける*Col2a1*陽性細胞層および*Col10a1*陽性細胞層の高さは，コントロールマウスと比べて有意に短縮していた（**Fig. 5B**）。しかし，KOマウスにおける（*Col2a1*陽性細胞層の高さ）/（成長板の高さ）の比，および（*Col10a1*陽性細胞層の高さ）/（成長板の高さ）の比は，コントロールマウ

© The Ito Foundation

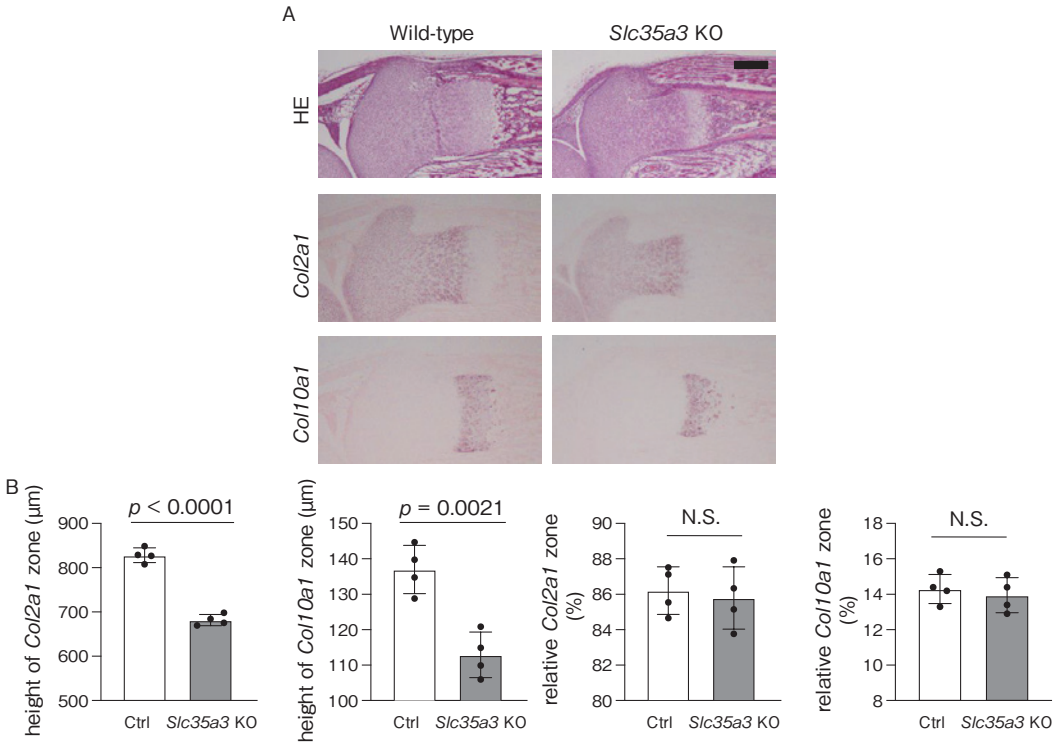

Fig. 5　Chondrocyte differentiation in *Slc35a3* KO mice.
（A）HE staining and *in situ* hybridization（ISH）images, produced using *Col2a1* and *Col10a1* probes of the tibia sections at E18.5. Scale bars，200 μm.（B）Heights of *Col2a1*- and *Col10a1*-expressing zones（upper graphs）, and the relative heights of *Col2a1*- and *Col10a1*-expressing zones normalized by the total heights of the growth plate（lower graphs）in the ISH images. Data are shown as the means ± standard deviation ; n = 4. *p* values were calculated using Student's *t*-test. Ctrl, control（wild-type + *Slc35a1* hetero KO）; N.S., not significant.

スと比べて有意差はなかった。したがって，*Slc35a3* KOマウスにおける軟骨細胞分化に大きな異常は起きていないことが示された。

Slc35a3 KOマウスの球状および扁平増殖軟骨細胞層ではECM領域が著明に減少し，それに伴って細胞密度は上昇した。一方，KOマウスの軟骨細胞における増殖能，分化能，そしてアポトーシス頻度に異常は見られなかった。軟骨基質に最も豊富に存在している糖鎖はグルコサミノグリカン（GAG）の１種であるコンドロイチン硫酸であり，*Slc35a3* KOマウスに認められた軟骨組織異常は過去に報告されているGAG産生異常を伴う変異マウスに観察されている異常と類似していた[7]。したがって，*Slc35a3* KOマウスの軟骨形成不全には，GAGの産生異常が関与していることが示唆された。これらのマウスに共通して軟骨におけるECMの減少と扁平軟骨細胞の変形が観察されることから，軟骨組織におけるGAGはECMのスペース確保と扁平軟骨細胞の形態維持に関与しているのかもしれない。

今後はSLC35A3の生体内機能，そしてCVMの病態機序の全容解明を目指し，*Slc35a3* KOマウスを用いて詳細な糖鎖解析，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

© The Ito Foundation

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[8]，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。

4．要　約

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り，糖ヌクレオチド輸送体をコードする*SLC35A3*がCVMの原因遺伝子として報告されている。私たちは令和３年度伊藤記念財団の研究助成を受け，*Slc35a3* KOマウスを作製し，同マウスのCVMモデル動物としての有用性を報告した。本研究では同マウスの詳細な形態学的，組織学的解析を行い，SLC35A3機能欠損による脊椎形成不全，軟骨形成不全のメカニズムについて検討した。

胎生9.25日の野生型マウス胚を用いてWISH解析を行い，体節形成時期における*Slc35a3* mRNAの発現を調べた。その結果，*Slc35a3* mRNAは体節形成期の未分節中胚葉で発現していることが明らかとなり，SLC35A3によって輸送されるUDP-GlcNAcは体節形成を調節している可能性が示された。成長板組織切片のHE染色により，*Slc35a3* KOマウスの球状および扁平増殖軟骨細胞層ではECM領域が著明に減少し，それに伴って細胞密度は上昇していた。抗BrdU抗体染色，TUNEL染色，軟骨細胞分化マーカーのISHの結果，*Slc35a3* KOマウスの軟骨細胞における増殖能，分化能，そしてアポトーシス頻度に異常はみられなかった。

軟骨に最も豊富に存在している糖鎖はGAGの１種であるコンドロイチン硫酸であり，*Slc35a3* KOマウスに認められた軟骨組織異常は過去に報告されているGAG産生異常を伴う変異マウスに観察されている異常と類似していた。したがって，*Slc35a3* KOマウスの軟骨形成不全にはGAGの産生異常が関与していることが示唆された。今後はSLC35A3の生体内機能，そしてCVMの病態機序の全容解明を目指し，*Slc35a3* KOマウスを用いて詳細な糖鎖解析，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。

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） 古市達哉：令和３年度　伊藤記念財団・食肉に関する助成研究調査結果報告書，VOL.40, p99～103, 2022.

5） Kodama, K., Takahashi, H., Oiji, N., Nakano, K., Okamura, T., Niimi,K, Takahashi, E., Guo, L., Ikegawa, S., Furuichi, T.：CANT1 deficiency in a mouse model of Desbuquois dysplasia impairs glycosaminoglycan synthesis and chondrocyte differentiation in growth plate cartilage, *FEBS Open Bio*, **10**, 1096～103, 2020.

6） Stanley, P., Okajima, T.：Roles of glycosylation in Notch signaling, *Curr Top Dev Biol*, **92**, 131～164, 2010.

7） Mizumoto, S., Yamada, S.：Congenital Disorders of Deficiency in Glycosaminoglycan Biosynthesis, *Front Genet*, **12**, 717535, 2021.

8） 浦本匡：科学研究費助成事業　研究成果報告（16K08003）.

© 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（Ⅱ）

Genetic factor associated with calf mortality with preterm birth（Ⅱ）

平野　貴[1]，小澤　昌起[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], Masaki Ozawa[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 thought to account for approximately 60% of all neonatal deaths in Japanese Black cattle. IARS disorder is a recessive genetic disease in Japanese Black cattle, caused by the *IARS* c.235G>C（p.Val79Leu）mutation, which was identified as one of the causative mutations of WCS. However, 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 are performing analysis. So far, we have mapped the WCS to candidate region-1 and 2, with a paternal half-sib family using WCS affected offspring of Bull A, which was not carrier for the *IARS* mutation. In these two regions, causative genes for the same human genetic renal disease were locating, and mutations of *Gene-1* located in candidate region-1 were first searched. We detected five non-synonymous SNPs, and reconstructed haplotypes including these SNPs in the Bull A family. However, it was not shown that the *Gene-1* SNPs were linked to WCS. Furthermore, we searched for mutations in related genes located in the candidate region-2, and we did not detect any mutations that might affect gene function. Therefore, we considered that these genes were not causative genes for WCS.

Gene-9 is locating in a part locating SNPs more deviated from Hardy-Weinberg equilibrium（HWE）in the candidate region-1. We searched mutations for *Gene-9* and detected 6 polymorphisms. Five of these polymorphisms, located in or around exon 5, indicated to link with WCS. Furthermore, using two of 5 polymorphisms, genotype and allele frequency were analyzed in the normal cattle population, and it was shown that these polymorphisms did not follow the HWE. These results suggested that *Gene-9* was a candidate gene, should be further analysis.

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

© The Ito Foundation

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のサンプル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。さらに，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，黒毛和種多様体データベースよりこれら候補領域に位置するSNPを抽出し[3)]，遺伝子変異を探索した。

多様体データベースに基づき検出した候補領域-1内のアレル頻度に偏りがあるSNPが集中する部位にヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子（*Gene-1*）が位置していた。さらに，候補領域-2に同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子や関連すると思われる遺伝子が存在したため，まず*Gene-1*の変異を探索したところ，タンパク機能に影響すると予測された４種を含む５種の非同義置換（c.284C>T，c.292C>A，c.1039C>T，c.1084C>Tおよびc.2848A>T）が検出された[4)]。そこで，*Gene-1*を候補遺伝子として，さらに詳細な解析を行うとともに，候補領域-2に位置する候補遺伝子の変異探索を試みた。

２．材料および方法

2.1　供試個体

検出したSNPを含むハプロタイプを再構成し，精査するために，マッピングに用いた種雄牛Aとその発症産子（５頭）および正常産子（23頭）からなる父方半きょうだい家系（マッピング用家系）のゲノムDNAを用いた。

候補原因遺伝子の変異を探索するために，マッピング用家系から，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。

検出したSNPの正常牛集団におけるアレル頻度を調べるために，2003～2008年の期間に東京都中央卸売市場食肉市場および大阪市中央卸売市場南港市場で腎周囲脂肪組織が収集されたサンプルから月齢が23～39ヶ月，枝肉重量が300～700kgである肥育去勢牛20,493頭から同一種雄牛の産子が３頭を超えないように選抜した1,235頭のうち，356頭のゲノムDNAを用いた。

2.2　SNP型判定および変異探索

*Gene-1*の5 SNPsの型判定は，これらSNPsをカバーする３種のプライマーセットを用いた（**Fig. 1a**）。また，*Gene-9*の変異探索は各エクソンをカバーするようにイントロン領域に配置したプライ

© The Ito Foundation

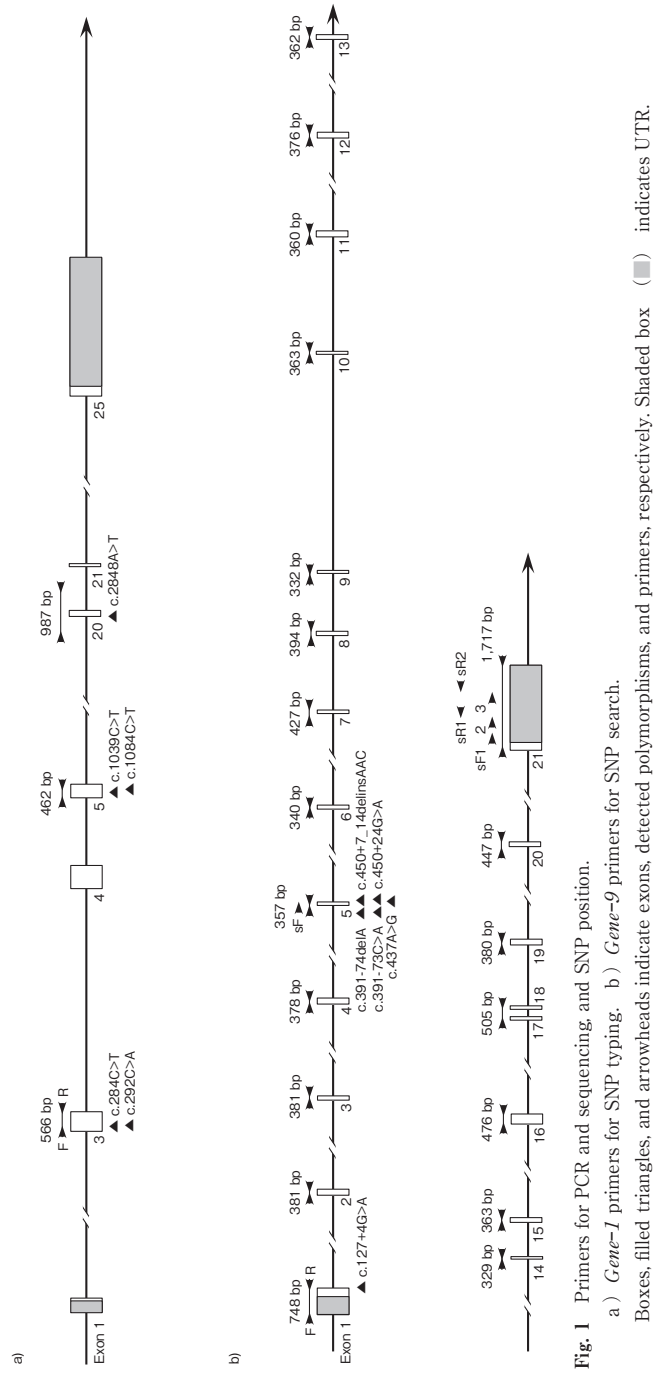

Fig. 1　Primers for PCR and sequencing, and SNP position.
a）*Gene-1* primers for SNP typing.　b）*Gene-9* primers for SNP search.
Boxes, filled triangles, and arrowheads indicate exons, detected polymorphisms, and primers, respectively. Shaded box （ ） indicates UTR.

マーセットを用いた（**Fig. 1b**）。候補領域-2に位置する候補遺伝子の変異探索も同様に各エクソンをカバーするプライマーセットをイントロン領域に配置して行った（data not shown）。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用いて，それぞれマッピング用家系，正常牛集団および変異探索用個体のゲノムDNAをテンプレートとし

© The Ito Foundation

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SNP型判定または変異探索を行った。変異探索によって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

3.1　*Gene-1* SNPのハプロタイプ解析および候補領域-2の変異探索

*Gene-1*の変異探索により検出された非同義置換の5 SNPs（c.284C>T，c.292C>A，c.1039C>T，c.1084C>TおよびC.2848A>T）について，マッピング用家系の型判定を行い，ハプロタイプを再構成した。BovineSNP50（illumina）によるマッピングで再構成したハプロタイプは，発症産子５頭すべてリスク型ハプロタイプホモであり，正常産子23頭の18頭がヘテロであり，５頭がリスク型ホモであった。しかし，*Gene-1*の5 SNPsを加えてハプロタイプを再構成したところ，この5 SNPsによるハプロタイプは正常産子の13頭がリスク型ホモであると思われた（**Fig. 2**）。

*Gene-1*はヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子であり，候補領域-2にも同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子（*Gene-2*）が存在したため候補遺伝子と考えて解析した。そこで，候補領域-2に位置する*Gene-2*を含めた当該ヒト遺伝性腎疾患のその他原因遺伝子や腎臓で発現し，関連すると考えられた７種の遺伝子について変異を探索した。しかし，種雄牛Aがヘテロを示す非同義置換などの遺伝子機能に影響すると思われる変異は検出されなかった。

これらのことから，候補領域-1に位置する*Gene-1*および候補領域-2に位置する７遺伝子は原因遺伝子ではないと考え，改めて，候補領域-1内でアレル頻度に偏りがあるSNPが集中する部位に位置する遺伝子の変異を探索した。

3.2　候補領域-1に位置する*Gene-9*の解析

*Gene-1*は，候補領域-1内でハーディ・ワインベルグ平衡（HWE）に従わないSNPが集中する部位に位置する。その部位内で*Gene-1*に隣接し，より強くHWEに従わないSNPが集中する部位に位置する*Gene-9*の変異を探索した（**Fig. 3**）。

*Gene-9*は21種のエクソンからなる遺伝子である。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，種雄牛Aがヘテロであり，発症産子がリスク型ホモを示し，正常産子がリスク型ホモを示さない多型が６種検出された（c.127＋４G>A，c.391-74delA，c.391-73C>A，c.437A>G，c.450＋7_14delinsAAC，c.450＋24G>A）。これらのうち，c.437A>Gはエクソン領域に位置する非同義置換（p.K146R）であったが，タンパク機能への影響は無害であると予測された。また，これらの５多型はexon 5内および周辺に位置していた（**Fig. 1b**）。

これら６多型についてマッピング用家系を型判定し，ハプロタイプを再構成したところ，c.127＋４G>A以外のexon 5周辺に位置する５多型は完全に連鎖していた。また，これら５多型によるハプロタイプは，発症産子５頭すべてリスク型ホモであり，BovineSNP50によるマッピングでリスク型ホモを示した正常産子５頭を含む６頭がリスク型ホモであることから，*Gene-1*のSNPsとは異なり，候補領域-1のリスクハプロタイプと連鎖し，WCSと連鎖していると思われた（**Fig. 2**）。そこで，*Gene-9*の連鎖している５多型のうちc.450＋7_14delinsAACとc.450＋24G>Aの型判定を正常牛356頭について行い，２多型による遺伝子型とアレル頻度を調べた。その結果，ノンリスク型ホモが105頭（0.295），ヘテロが194頭（0.545），リスク型ホモが57頭（0.160）であり，これらは

© The Ito Foundation

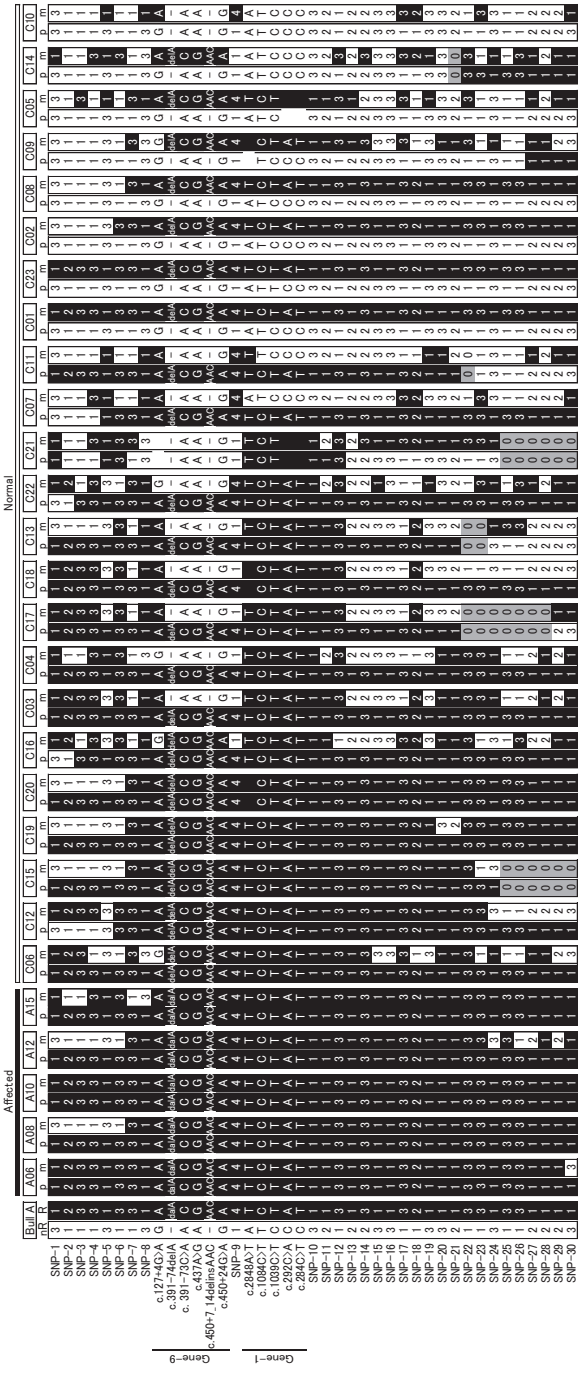

Fig. 2　Genotypes of affected and normal cattle on the candidate region–1. Top boxes indicate each individual. In Bull–A, risk–haplotype and non–risk–haplotype are indicated by "R" and "nR", respectively. In offspring, paternal and maternal haplotypes are indicated by "p" and "m", respectively. The risk allele is shown in black. Unclear haplotypes are shown in gray.

HWEに従っていなかった（p＜0.05）。

これらのことから，*Gene–9*を候補遺伝子として，exon 5周辺で検出された変異の遺伝子機能への影響を調べるとともに，さらに多くの正常牛集団における頻度調査および遺伝子上流の変異探索を行う必要があると思われた。さらに，候補領域–2から*Gene–9*と相互作用する遺伝子など関連する遺伝子の探索も行う必要があると思われた。

© The Ito Foundation

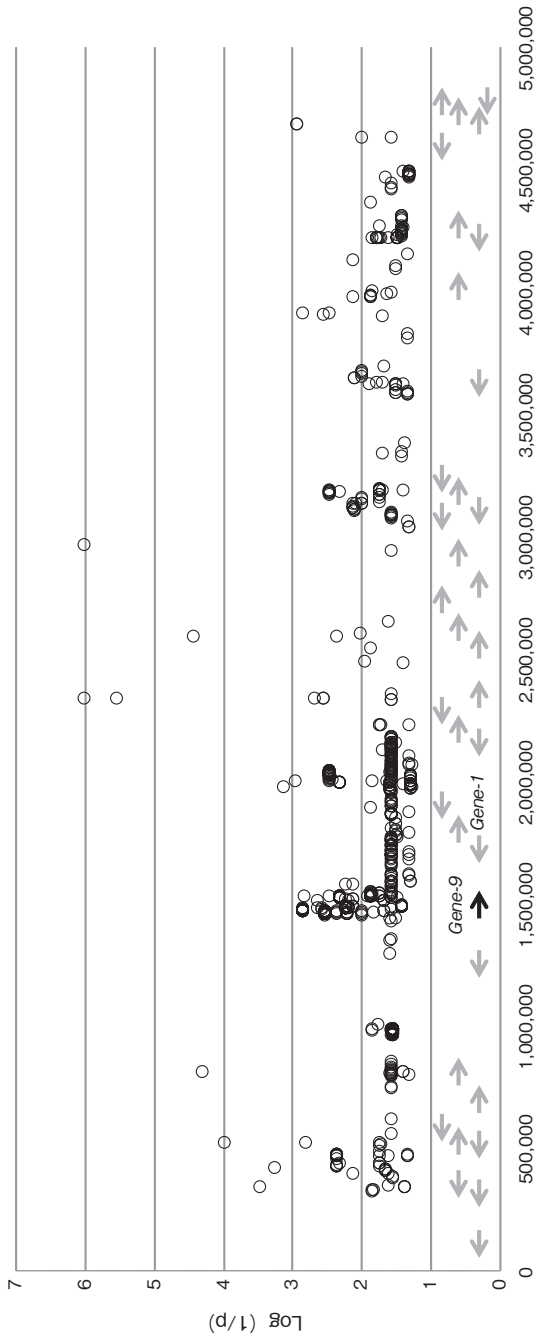

Fig. 3　Distribution of p-values for each SNP deviated from the Hardy-Weinberg equilibrium in candidate region-1.
Open circle indicate p-value detected with χ^2 test of each SNPs. Arrow indicates gene and its direction.

4．要　　約

虚弱子牛症候群（WCS）は，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

© The Ito Foundation

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を候補領域-1と2にマッピングした。これら領域には同じヒト遺伝性腎疾患の原因遺伝子が存在することから，まず候補領域-1に位置する*Gene-1*の変異を探索し，５種の非同義置換を検出した。そこで，これら5 SNPsを含むハプロタイプをマッピング用家系で再構成したところ，*Gene-1* SNPsはWCSと連鎖しないことが示された。さらに，候補領域-2に位置する関連遺伝子の変異を探索したが，遺伝子機能に影響すると思われる変異は検出されなかったことから，これら遺伝子は原因遺伝子ではないと考えた。

改めて候補領域-1内で，特にアレル頻度に偏りのある領域に位置する*Gene-9*の変異を探索したところ，６種の多型が検出された。このうちexon 5および周辺に位置する５多型はWCSと連鎖すると思われ，さらに，これらの２多型で正常牛集団における遺伝子型頻度を調べたところ，HWEに従っていないことが分かった。これらのことから，*Gene-9*を候補遺伝子として，さらに詳細な解析を行う必要があると思われた。

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.

4） 平野貴，村木英二，佐々木慎二：早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明，令和３年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**40**，93～98，2022.

© The Ito Foundation

近交度の高い金華豚集団の遺伝的多様性に関する評価

Evaluation of genetic diversity in a highly inbred Jinhua pig population

塩谷　聡子・大竹　正剛・寺田　　圭
（静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター）

Satoko Enya, Masayoshi Otake and Kei Terada
(Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry Swine & Poultry Research Center)

In this study, we evaluated inbreeding effects on the reproductive traits of Jinhua pigs and inbred minipigs maintained in the Shizuoka Prefectural Research Institute of Animal Industry Swine & Poultry Research Center. We collected pedigree information from Jinhua pigs and inbred minipigs, as well as DNA samples from 21 and 289 pigs, respectively, which were used to obtain the SNP information. DNA samples were used to obtain the SNP information. We calculated the inbreeding coefficients, and the genomic ones were calculated from runs of homozygosity (ROH) according to Sus Scrofa 11.1 genome map. Moreover, we investigated the relationships between genomic inbreeding coefficients and the number of total and live litter sizes. The average inbreeding coefficients for Jinhua pigs based on pedigree information increased from 0 in 1996–1997 to 0.27 in the current sows born during 2015–2021. The average genomic inbreeding coefficients were 0.25 and 0.34, respectively, indicating an increase in genomic inbreeding coefficients. The correlation coefficient between the inbreeding coefficients from ROH and pedigree information was 0.93. The relationship between the inbreeding coefficient and reproductive performances in the minipig lines showed that a 10% increase in the inbreeding coefficient led to a decrease of 0.53 and 0.66 in total litter and live birth sizes, respectively. These results indicated that the increase in the inbreeding coefficient could affect reproductive performance in pigs; therefore, excessive inbreeding increases should be monitored in the maintenance of the Jinhua population.

1．目　　的

一般に，ブタの集団の維持には，15％未満の近交係数が望ましいとされている。しかし，現在国内で維持しているアグーなどのアジア系の希少品種はすでに高い近交度であり，新しい血縁を導入することができないため，今後さらに近交度が高まることで集団の維持管理が難しくなることが懸念される[1)]。静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター（以下，「当センター」という）においてもアジア系希少品種である金華豚を30年以上にわたり維持しており[2)]，同様の問題に直面しつつある。これら希少品種の今後の集団の維持には，近交退化を回避するため，ゲノム上のホモ化の程度と繁殖性など形質との関連性を明らかにする必要があると考えられる。

© The Ito Foundation

また，当センターでは，ゲノムの斉一性を高めたミニブタの系統を作出すべく，計画的に兄妹交配を重ねた近交系ミニブタを研究開発している。基礎個体群の一部には，ベトナムポットベリーが使われており[3]，金華豚とミニブタは同じアジア系ブタという共通点がある[4]。近交系ミニブタをモデルとした急激な近交度上昇に伴い発生する形質の異常は，国内で血縁導入ができない金華豚やアグーなどの集団で近い将来予想される，高い近交度に伴い発生する問題の解決に応用できる可能性があり，アジア系遺伝資源豚集団の遺伝管理手法を検討するための一つのモデルにできると考えている。

そこで本研究では，近交度が高まりつつある金華豚集団と計画的に近交度を高めた近交系ミニブタ集団のSNP情報から，各個体内で連続する比較的広いホモ接合領域（Runs of Homozygosity：ROH）から推定した近交係数を算出し，金華豚の遺伝的保全をゲノム多様性の観点から検証する。

２．方　　法

本研究では，金華豚とミニブタをそれぞれ21頭および289頭を利用した。金華豚は，1996年から1997年に生まれ種豚として用いられた個体から調査可能だった個体と2015年から2021年に生まれ現在種豚として飼育されている個体を用いた。ミニブタ集団についてはＡからＤの基礎（G0）の両親が異なる４つの系統を作り出した。ミニブタ集団は離散世代として，各世代繁殖性の高い兄妹ペアなどを選抜した。それぞれの集団において記録した血統情報よりCoeFR[5]プログラムを用いて近交係数（F_{PED}）を計算した。

すべての個体よりDNAサンプルを採取し，Porciene 60k BeadChip V2とV3（Illumina）によりSNPの情報を取得した。得られたSNPからPLINK v 1.9[6,7]を用いてコール率が0.9以下，マイナーアリルの頻度が0.01以下の基準に従うSNPを削除し，さらに，豚ゲノムマップ（Sus scrofa 11.1）において常染色体にあるSNPのみを解析に利用した。基準に準じたSNPは，Beagle 5.4を使いインピュートし，ゲノム上のホモ化領域のサイズ（ROH）を計算した。個体ごとにROHの長さの合計を計算し，SNPの配置したゲノム領域の長さの商により近交係数（F_{ROH}）を計算した。ROH由来の近交係数はPLINK v 1.9[6,7]を用いて，各個体について推定した。連鎖不平衡（LD）に起因してゲノム全体に出現する短いROHや共通ROHを除くため，ROHの最小長を1Mbに設定した[8]。以下のPLINKパラメータと閾値[6]を適用してROHを定義した。１）ゲノム上の50個のSNPのスライディングウィンドウ，２）ホモ接合体の重複ウィンドウの割合が0.05，３）ROHに含まれる連続したSNPの最小数が50，４）ROHの最小長が1Mb，５）連続したホモ接合体SNP間の最大ギャップが1000kb，６）100kbあたり1SNP以上の密度，７）最大5SNPの欠損と最大１ヘテロ接合遺伝子タイプを許容した。各個体についてROH長を計算するとともに，ROHの領域数と平均ROH長を計算し，染色体長に占めるROH長の割合を算出し，ROH由来の近交係数（F_{ROH}）とした。

繁殖成績調査と解析には，当センターにおける分娩記録を用いた。調査項目は，総産子数（生存産子数＋死産頭数），生存産子数とした。

３．結果と考察

F_{PED}について，金華豚においては，1996年から1997年に生まれた４頭は平均0.00，2015年から2021年に生まれた17頭は平均0.27だった。ミニブタＡからＤの４つの系統においては，それぞれ第１世代（IB1）は平均0.06，0.25，0.13，0.13，最も進んだ世代（IB7，IB6，IB6，IB4）は平均0.75，

© The Ito Foundation

Table 1 F_{PED} and F_{ROH} in Jinhua and in minipig

			N	F_{PED}	F_{ROH}			
				Average	Average	Min	Max	SD
Jinhua	1996–1997		4	0.00	0.25	0.12	0.45	0.13
	2015–2021		17	0.27	0.34	0.24	0.42	0.05
minipig	A	G0	2	0.09	0.27	0.25	0.29	0.02
		IB1	14	0.06	0.31	0.28	0.34	0.02
		IB2	30	0.31	0.42	0.32	0.53	0.05
		IB3	35	0.39	0.47	0.35	0.57	0.05
		IB4	18	0.54	0.57	0.49	0.63	0.05
		IB5	17	0.62	0.61	0.57	0.68	0.03
		IB6	26	0.70	0.68	0.60	0.75	0.04
		IB7	7	0.75	0.73	0.70	0.79	0.03
	B	G0	2	0.16	0.34	0.31	0.38	0.04
		IB1	9	0.25	0.40	0.35	0.46	0.03
		IB2	20	0.41	0.53	0.42	0.65	0.06
		IB3	21	0.52	0.58	0.50	0.63	0.04
		IB4	19	0.56	0.59	0.54	0.66	0.03
		IB5	24	0.66	0.66	0.58	0.72	0.03
		IB6	5	0.72	0.67	0.65	0.69	0.02
	C	IB1	2	0.13	0.26	0.24	0.27	0.01
		IB2	2	0.34	0.43	0.42	0.44	0.01
		IB3	2	0.40	0.46	0.44	0.47	0.02
		IB4	4	0.56	0.56	0.52	0.60	0.03
		IB5	5	0.63	0.66	0.63	0.68	0.02
		IB6	3	0.71	0.71	0.66	0.75	0.04
	D	IB1	2	0.13	0.28	0.24	0.31	0.03
		IB2	3	0.34	0.43	0.40	0.45	0.02
		IB3	3	0.45	0.48	0.44	0.50	0.03
		IB4	4	0.51	0.59	0.55	0.63	0.03

0.72，0.71，0.51であった（**Table 1**）。

F_{ROH}について，金華豚においては，1996年から1997年に生まれた４頭は平均0.25，2015年から2021年に生まれた17頭は平均0.34だった。ミニブタＡからＤの４つの系統においては，それぞれIB1は平均0.31，0.40，0.26，0.28，最も進んだ世代（IB7，IB6，IB6，IB4）は平均0.73，0.67，0.71，0.59であった（**Table 1**）。

金華豚とミニブタ，合わせて310頭の個体について，F_{ROH}とF_{PED}の相関係数は0.93であり，高い正の相関が認められた。しかしながら，F_{PED}が0.2以下だった37頭に着目した場合，相関係数が0.13とほとんど相関は認められなかった。また，調査を行った310頭中，76.5％にあたる237頭の個体で，F_{PED}はF_{ROH}よりも小さかった。この結果は，F_{PED}はF_{ROH}の値より小さいとの既報[9]と同様であった。特に，F_{PED}が0.2以下の場合，すべての個体においてF_{PED}がF_{ROH}よりも小さかった。F_{PED}は基礎集団の近交係数を０として各個体について基礎個体の一つのアリルがホモ化している確率を表しているが，F_{ROH}では基礎集団の概念はないため，F_{ROH}が低い個体についてF_{PED}との比較は留意を要

© The Ito Foundation

Table 2　Breeding performance of Jinhua and minipig

			Average F_{ROH}	N	Litter size	Min	Max	No. of live piglet	Min	Max
Jinhua	1996–1997		0.25	34	9.7	3	17	8.7	3	14
	2015–2021		0.34	44	9.1	1	17	7.7	0	15
minipig	A	G0	0.27	4	6.8	5	8	6.3	4	8
		IB1	0.31	7	4.9	4	6	3.6	1	6
		IB2	0.42	9	4.3	2	6	3.4	0	6
		IB3	0.47	13	3.9	2	10	2.1	0	8
		IB4	0.57	8	4.2	2	7	3.4	2	7
		IB5	0.61	21	3.8	2	9	2.6	0	7
		IB6	0.68	11	3.3	1	5	2.5	0	4
	B	G0	0.34	9	4.6	3	6	4.3	2	6
		IB1	0.40	5	3.7	2	7	3.0	0	6
		IB2	0.53	10	3.0	2	4	1.8	0	3
		IB3	0.58	8	2.4	1	5	2.3	1	5
		IB4	0.59	17	2.7	1	5	2.5	0	5
		IB5	0.66	10	2.8	1	4	0.7	0	3
	C	IB1	0.26	1	4	4	4	4	4	4
		IB2	0.43	1	2	2	2	2	2	2
		IB3	0.46	2	4.0	3	5	4.0	3	5
		IB4	0.56	4	4.2	2	6	4.2	2	6
		IB5	0.66	4	3.0	3	5	1.5	0	4
		IB6	0.71	3	2.8	2	3	2.5	1	3
	D	IB1	0.28	3	5.7	4	7	5.3	4	6
		IB2	0.43	6	4.1	3	5	3.6	0	5
		IB3	0.48	4	3.2	3	4	2.5	2	4

する。また，今回の解析では，SNPチップによるデータかつ1Mb以下のROHは解析に含めなかったため，過去に起こった近交に伴う多様性の低下については，詳細には把握できないと考えられるが，本解析において導入した基礎個体においてもROHが存在しており，F_{PED}で把握できない多様性の低下については，F_{ROH}ではある程度評価できる可能性があると考えられた。

金華豚およびミニブタの各世代の雌の繁殖成績は，**Table 2** のとおりである。近交係数上昇に伴う繁殖能力の低下を予測するため，ミニブタ集団のF_{ROH}と総産子数もしくは生存産子数の回帰直線から，世代ごとの近交係数上昇に伴う繁殖能力の変化量を計算した。その結果，総産子数および生存産子数ともに１％有意水準で，F_{ROH}の上昇に伴い繁殖成績が低下し，回帰係数から親世代のF_{ROH}が10％上昇すると総産子数および生存産子数がそれぞれ0.53および0.66頭減少することが推定された（**Table 3**）。総産子数に対して，母親の近交係数上昇の影響は大きいと報告されている。當眞ら[1)]は，沖縄アグー豚において母親の近交係数が10％上昇すると総産子数が0.59頭減少することを報告している。今回推定された変化量は，0.53頭と報告値よりもわずかに低かった。

導入から30年以上が経過した金華豚集団の遺伝管理手法の検討は当センターの喫緊の課題であった。しかしながら，長期間飼育においてこれまでF_{PED}を上昇させない交配ペアを選択してきた結

© The Ito Foundation

Table 3　Trend of the effects of F_{ROH} in minipigs

	the amount of change
Litter size	−0.53*
No. of live piglet	−0.66*

The values in the table represent the amount of change as F_{ROH} increases by 10%.
*p<0.01

果，F_{PED}が平均0.27で維持できており，ゲノム情報を用いた近交係数であるF_{ROH}においても平均0.34であった。加えて，F_{PED}は上昇しているが，生まれた個体の中から繁殖性の良い個体を選抜しているため，外部からの新しい血縁の導入がない場合でも，産子数等の繁殖成績の低下は顕著ではなかったと考えられた。一方で，今後，繁殖成績の低下が起こる可能性は排除できないため，ゲノム情報等を利用した遺伝的多様性の管理を実施していく必要があると考える。

近交退化に加え，近年では豚熱・アフリカ豚熱など家畜伝染病の発生による殺処分により遺伝資源が失われる可能性がある。希少種ブタ集団を維持するには上記維持管理方法に加え，凍結精液，凍結卵子，凍結受精卵の保存技術の開発も必要であると考える。

4．要　約

本研究では，静岡県畜産研究所中小家畜研究センターで飼育している金華豚および系統維持している近交系ミニブタについて，血統情報による近交度の評価をゲノムの観点から評価し，比較を行った。記録した金華豚とミニブタの血統情報を利用するとともに，それぞれから21頭と289頭のDNAサンプルを用いた。得られたDNAサンプルからSNP情報を得るとともに，Sus Scrofa 11.1に従い，ゲノム中の連続するホモ化領域（ROH）の特定と，ROHサイズからF_{ROH}（ゲノム情報による近交係数）を計算した。加えて，総産子数と生存産子数について，得られた近交係数との関係性を調査した。F_{PED}（血統情報による近交係数）による金華豚の平均近交係数は，1996から1997年に生まれ種豚として用いられた個体のうち調査した４頭は平均0.00であったが，2015年から2021年に生まれ現在種豚として利用されている集団において0.27まで上昇していた。F_{ROH}では，それぞれ0.25および0.34であり，ゲノム情報においても上昇していることが認められた。金華豚とミニブタのF_{PED}とF_{ROH}との相関係数は0.93であった。近交系ミニブタ系統において近交係数と繁殖性との関係を調査した結果，近交係数が10％上昇すると，総産子数と生存産子数がそれぞれ0.53および0.66頭の減少することが推定された。本研究において，近交係数の上昇は繁殖能力に影響を与える可能性があることが示され，今後，金華豚集団の維持においても過度な近交度の上昇には留意を要すると考えられた。

謝　辞

本研究は，農林水産省農林水産技術会議事務局の荒川愛作氏の協力のもと行われた。

文　献

1）　當眞嗣平，親泊元治，翁長桃子，嘉数良子，野中克治：近交係数増加が沖縄アグー豚の繁殖成績に及ぼす影響，沖縄県畜産研究センター研究報告，第53号，25～28, 2015.
2）　関哲夫，堀内篤，野口博道：金華豚の特性調査について（1），静岡県中小家畜試験場研究報告，第１号，7～15, 1988.
3）　Kaneko, N., Itoh, K., Sugiyama, A., Izumi, Y.：*J Pharmacol Sci*, **115**, 112～114. 2011.
4）　當眞嗣平，島袋宏俊，親泊元治，我那覇紀子，光

© The Ito Foundation

部柳子，野中克冶，奥村直彦，荒川愛作：SNPマーカーを用いたアグーの遺伝構造解析，沖縄県畜産研究センター研究報告，第51号, 17～20, 2014.
5） 佐藤正寛：大規模血統情報から近交係数を算出するプログラムの開発，日豚会誌, **37**, 122～126, 2000.
6） Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A., Bender, D., *et al.*：PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses, *Am. J. Hum. Genet.*, **81**, 559～575, doi：10.1086/519795, 2007.
7） Chang, C. C., Chow, C. C., Tellier, L. C., Vattikuti, S., Purcell, S. M., Lee, J. J.：Second-generation PLINK: rising to the challenge of larger and richer datasets, *Gigascience*, **4**, 7, doi: 10.1186/s13742-015-0047-8, 2015.
8） Purfield, D. C., Berry, D. P., McParland, S., Bradley, D. G.：Runs of homozygosity and population history in cattle, *BMC Genet*, **13**, 70. doi：10.1186/1471-2156-13-70, 2012.
9） 佐々木慎二：沖縄県の島々の黒毛和種集団の多様性，近交度のゲノムの視点からの評価，食肉に関する助成研究調査成果報告書, **38**, 118～122, 2019.

© The Ito Foundation

表型値間因果構造を利用した豚繁殖形質の正確な同時改良手法開発

A new method for aggregated breeding value considering causal structure

岡 村 俊 宏
（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）

Toshihiro Okamura
（Institute of Livestock and Grassland Science, NARO）

Simultaneous improvement of farrowing and nursing traits is necessary to improve sows. However, conventional methods of simultaneous improvement may not be applicable depending on the statistical model used to estimate genetic parameters and breeding value because there are the causal relationships between these traits. Therefore, selection indices were derived allowing genetic parameters with the statistical model considering causal relationship, and computer simulations were conducted to estimate aggregate breeding value using those genetic parameters for simultaneous improvement using the statistical model. The conventional method of calculating the selection index using genetic parameters with a statistical model considering causal effects mathematically showed that the expected gains of phenotypes could deviate from the relative desired gain. However, it was also shown that the deviation could be eliminated, and the desired improvement could be achieved by correcting the relative desired improvement with considering causal effects. In addition, computer simulations assuming to improve simultaneously farrowing and weaning traits in a closed population showed that the gains based on the estimated aggregate breeding value using genetic parameters with the model considering causal relationships was biased toward weaning traits. However, this bias could be eliminated by using the relative desired gains corrected for causal effects. This study indicates that simultaneous improvement using genetic parameters with a model considering caulsal relationships requires a correction to account for their causal effects in setting the relative desired gain.

1．目　　的

豚の生産頭数を増やすための改良の多くは，産まれてくる子豚の数（総産子数や生存産子数）を増やすことで行われてきた[1, 2]。これは，これらの形質が離乳頭数と比較して低労力で測定でき，従来の改良方法でも着実に育種することが可能だったからである。しかし，母豚に望まれる能力は，分娩時の産子能力だけでなく，離乳時の離乳頭数・総体重に表れる哺育能力も重要である。そのため，母豚の改良は生存産子数に加え，離乳頭数や離乳総体重も改良対象とした，両者の同時改良が必要である。

一方で，豚ランドレース種および大ヨーク

© The Ito Foundation

シャー種における繁殖形質間の因果構造推定によって，生存産子数と離乳頭数および離乳総体重の表型値間の原因と結果の関係性，すなわち因果関係とその強さを含む因果構造の存在が示唆されている[3)]。これはすなわち，生存産子数増加は，離乳頭数増加と離乳総体重減少をさせ，離乳頭数増加は離乳総体重減少をさせるという関係である。また，報告者らは，この関係をもとにして，離乳頭数および離乳総体重から生存産子数の影響を取り除く統計モデルを開発した。

しかし，従来から豚の改良に用いられている同時改良のための総合育種価推定方法[4, 5)]では，この因果関係を考慮した統計モデルより得られた推定育種価には対応できない可能性がある。それは，従来法では形質間の関係性を遺伝相関と表型相関で考慮するのに対し，因果関係を考慮した統計モデルにおいては，それらの相関に加え，表型値間の因果効果にて形質間の関係性を表すからである。

そこで本研究では，１）因果関係を考慮した統計モデルに対応した同時改良のための選抜指数を数学的に導出すること，２）豚育種集団を模したコンピューターシミュレーションを実施して，１）が実際の改良に有用かを検証することを目的とした。

２．方　　法

2.1　選抜指数の数学的導出

表型値のモデルを以下のとおりとする。

$$\boldsymbol{p} = \boldsymbol{\Lambda p} + \boldsymbol{g} + \boldsymbol{e}$$

ここで，$\boldsymbol{p, g, e}$はそれぞれ各個体の，$t \times 1$の表型値，育種価，誤差のベクトル，$\boldsymbol{\Lambda}$は因果構造を表す$t \times t$の因果構造係数の行列とする。

この式は，

$$(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})\,\boldsymbol{p} = \boldsymbol{g} + \boldsymbol{e}$$

と書き換えることができるため，一般的に次の式が成り立つ。

$$\boldsymbol{p} = (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{g} + (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{e}$$

ここで，

$$\boldsymbol{g^*} = (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{g}, \boldsymbol{e^*} = (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{e}$$

と書き換えると，

$$\boldsymbol{p} = \boldsymbol{g^*} + \boldsymbol{e^*}$$

である。

このとき，表型値と育種価の共分散 $\boldsymbol{G^*}$ および表型値の分散 $\boldsymbol{p^*}$ は，それぞれ

$$\begin{aligned}
\boldsymbol{G^*} &= Cov(\boldsymbol{p}, \boldsymbol{g^{*\prime}}) \\
&= Cov(\boldsymbol{p}, (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{g'}) \\
&= Cov(\boldsymbol{p}, \boldsymbol{g'})\,(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1\prime} \\
&= \boldsymbol{G}(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1\prime}
\end{aligned}$$

ただし，$Cov(\boldsymbol{p}, \boldsymbol{g'}) = \boldsymbol{G}$,

$$\begin{aligned}
\boldsymbol{P^*} &= Var(\boldsymbol{p}) \\
&= Var(\boldsymbol{g^*} + \boldsymbol{e^*}) \\
&= Var(\boldsymbol{g^*}) + Var(\boldsymbol{e^*}) \\
&= Var((\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{g}) + Var((\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{e}) \\
&= (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1})\,\boldsymbol{G_0}\,(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{\prime-1} + \\
&\quad (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\,\boldsymbol{R_0}\,(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{\prime-1} \\
&= (\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\,\boldsymbol{P}(\boldsymbol{I}_{t\times t} - \boldsymbol{\Lambda})^{\prime-1}
\end{aligned}$$

ただし，$Var(\boldsymbol{g}) = \boldsymbol{G_0}$，$Var(\boldsymbol{e}) = \boldsymbol{R_0}$，$\boldsymbol{G_0} + \boldsymbol{R_0} = \boldsymbol{P}$

と表すことができる。

このとき，通常の多形質モデルから得られる遺伝的パラメーターは，$\boldsymbol{G^*}$ および $\boldsymbol{P^*}$ であり，因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーターは $\boldsymbol{G}$ および $\boldsymbol{P}$ である。

相対的希望改良量のベクトルを $\boldsymbol{d}$ とすると，それを達成するための選抜指数はYamadaら[3)]の相対希望改良量を達成するための選抜指数は，通常の多形質から得られる遺伝的パラメーターを用いた場合には

$$I_1 = \boldsymbol{b_1 p}$$

ただし，$\boldsymbol{b_1} = \boldsymbol{P^{*-1}G^*}(\boldsymbol{G^{*\prime}P^{*-1}G^*})^{-1}\boldsymbol{d}$

であり，因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーターを用いた場合には，

© The Ito Foundation

$$I_2 = \boldsymbol{b_2 p}$$

ただし，$\boldsymbol{b_2} = \boldsymbol{P^{-1}G(G'P^{-1}G)^{-1}d}$

である。

このとき，I_1の選抜指数によって得られる表型値の期待改良量は

$$\begin{aligned}E(\Delta \boldsymbol{p}) &= E(\Delta \boldsymbol{g^*}) \\ &= E(\Delta(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{g}) \\ &= (\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}E(\Delta \boldsymbol{g}) \\ &= (\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\frac{i}{\sqrt{Var(I_1)}}Cov(\boldsymbol{g}, \boldsymbol{p'})\boldsymbol{b_1} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_1)}}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{G'P^{*-1}G^*}(\boldsymbol{G^{*\prime}P^{*-1}G^*})^{-1}\boldsymbol{d} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_1)}}\boldsymbol{G^{*\prime}P^{*-1}G^*}(\boldsymbol{G^{*\prime}P^{*-1}G^*})^{-1}\boldsymbol{d} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_1)}}\boldsymbol{d}\end{aligned}$$

ただし，i は標準選抜差

となり，相対希望改良量のベクトルの方向と一致する。一方，I_2 の選抜指数によって得られる表型値の期待改良量は

$$\begin{aligned}E(\Delta \boldsymbol{p}) &= (\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\frac{i}{\sqrt{Var(I_2)}}Cov(\boldsymbol{g}, \boldsymbol{p'})\boldsymbol{b_2} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_2)}}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{G'P^{-1}G}(\boldsymbol{G'P^{-1}G})^{-1}\boldsymbol{d} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_2)}}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{d}\end{aligned}$$

となり，相対希望改良量のベクトルの方向と一致しない。

ここで，因果関係を考慮して補正した相対希望改良量 $\boldsymbol{d^*}$を

$$\boldsymbol{d^*} = (\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})\boldsymbol{d}$$

とすると，これと因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーターを用いた場合には，

$$I_3 = \boldsymbol{b_3 p}$$

ただし，$\boldsymbol{b_3} = \boldsymbol{P^{-1}G(G'P^{-1}G)^{-1}d^*}$

である。このとき，I_3の選抜指数によって得られる表型値の期待改良量は

$$\begin{aligned}E(\Delta \boldsymbol{p}) &= (\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\frac{i}{\sqrt{Var(I_3)}}\mathrm{Cov}(\boldsymbol{g}, \boldsymbol{p'})\boldsymbol{b_3} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_3)}}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}\boldsymbol{G'P^{-1}G}(\boldsymbol{G'P^{-1}G})^{-1}\boldsymbol{d^*} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_3)}}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})^{-1}(\boldsymbol{I_{t\times t}} - \boldsymbol{\Lambda})\boldsymbol{d} \\ &= \frac{i}{\sqrt{Var(I_3)}}\boldsymbol{d}\end{aligned}$$

となり，相対希望改良量のベクトルの方向と一致する。

2.2　コンピューターシミュレーションによる検証

Satohら[5]では，多形質のBLUP法によって得られた推定育種価とそれらに重み付けした推定総合育種価による選抜によって，相対希望改良量の達成が期待されることを示している。その重み付け値の算出方法は，総合育種価の重み付け値のベクトルを $\boldsymbol{a}$ とすると，

$$\boldsymbol{a} = (\boldsymbol{G'P^{-1}G})^{-1}\boldsymbol{d}$$

であり，それらと各形質の推定育種価を組み合わせた推定総合育種価を

$$\hat{H} = \boldsymbol{a'\hat{g}}$$

として算出できる。これは国内の系統造成事業で広く利用されているものである。

発生させる表型値は生存産子数（NBA），離乳頭数（NW）および離乳総体重（WW）とし，基本的なパラメーターはOkamuraら[3]で推定されたlandrace集団のパラメーターを用いた。集団は雄90頭，雌360頭の基礎集団から，雄１頭につき雌４頭が交配して次世代の雄90頭，雌360頭を作ると想定し，５世代を発生させた。また，６世代目には雄360頭，雌720頭の候補豚を発生させ，そこから雄90頭，雌360頭をⅠ～Ⅲの推定総合育種

© The Ito Foundation

価で選抜し，その選抜差を改良量とした。また，１～５世代目の雌1800頭が表型値を持つと想定した。

表型値と家系情報からEM-REML法によりBLUPF90+[6]を用いて遺伝的パラメーターを算出し，そのパラメーターをもとにBLUPによる推定育種価と推定総合育種価を算出した。推定総合育種価の算出に，Ⅰ）通常の多形質モデルから得られる遺伝的パラメーター$\boldsymbol{G}^*$および$\boldsymbol{P}^*$と相対的希望改良量$\boldsymbol{d}$，Ⅱ）因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーター$\boldsymbol{G}$および$\boldsymbol{P}$と相対的希望改良量$\boldsymbol{d}$，Ⅲ）因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーター$\boldsymbol{G}$および$\boldsymbol{P}$と相対的希望改良量$\boldsymbol{d}^*$を用いて改良量を算出し，それを5000回繰り返し，その平均値を比較した。

$\boldsymbol{d}$は

$$\boldsymbol{d} = \begin{pmatrix} d_{NBA} \\ d_{NW} \\ d_{WW} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0.8 \\ 10 \end{pmatrix}$$

ただし，d_{NBA}，d_{NW}およびd_{ww}はそれぞれNBA，NWおよびWWの希望改良量とした。

３．結果と考察

3.1　選抜指数の数学的導出

選抜指数I_1を用いた選抜では，表型値の期待改良量が相対希望改良量のベクトルと方向が一致した一方で，選抜指数I_2を用いた選抜では，表型値の期待改良量は相対希望改良量のベクトルの方向とは一致しなかった。このことより，因果関係を考慮した統計モデルより得られる遺伝的パラメーターを用いた選抜指数による改良は相対希望改良量から乖離することが示唆された。また，選抜指数I_3を用いた選抜では，表型値の期待改良量が相対希望改良量のベクトルと方向が一致した。以上より，因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーターを用いた，相対的希望改良量を達成するための選抜指数には，因果関係を考慮して補正相対希望改良量を用いる必要があることが示された。

3.2　コンピューターシミュレーションによる検証

シミュレーションによって得られた生存産子数，離乳頭数および離乳総体重の改良量およびその改良量比を**Table 1** に示した。シミュレーションの結果，Ⅱの推定総合育種価による改良量はⅠと比較してNWおよびWWに対して1.5～２倍程度に大きく偏っていた。これは，Ⅱで用いた因果関

Table 1　Genetic gain of each trait. NBA NW and WW were number born alive, number of weaned piglets and total weight of weaned piglets, respectively.

	Unit	Estimated aggregate breeding value		
		I	II	III
NBA	head	0.14	0.12	0.14
NW	head	0.10	0.18	0.10
WW	kg	1.23	1.68	1.23
Ratio of NW to NBA	–	0.75	1.46	0.75
Ratio of WW to NBA	kg/head	8.97	13.56	8.96

NBA, NW and WW were number born alive, number of weaning piglets and total weight of weaning piglets, respectively.

© The Ito Foundation

係を考慮した統計モデルから得られた遺伝的パラメーターの形質間の関係性には因果効果が含まれていないことから，NBAの改良量によるNWおよびWWへの因果効果，およびNWの改良量によるWWへの因果効果が考慮されないような推定総合育種価となったため，NWおよびWWへの改良量の偏りが生じたと考えられる。一方で，Ⅲの推定総合育種価による改良量はⅠとほぼ一致していた。Ⅲで用いた遺伝的パラメーターも，形質間の関係性には因果効果が含まれていないが，NBAの改良量によるNWおよびWWへの因果効果，およびNWの改良量によるWWへの因果効果を相対希望改良量の補正に用いることで，Ⅰと同様に想定した相対希望改良量の比に近くなったと考えられる。

以上の結果より，相対希望改良量を達成するための選抜指数および推定総合育種価の算出に，因果関係を考慮した統計モデルから得られる遺伝的パラメーターを用いる場合には，因果効果を考慮して補正した相対希望改良量を用いる必要があることが示された。

4．要　約

母豚の改良には分娩時形質と哺育形質の同時改良が必要である。しかし，これらの形質間には因果関係が存在することから，遺伝的パラメーターおよび育種価を推定するために用いる統計モデルによっては，従来の同時改良方法が適用できない可能性がある。そのため，因果関係を考慮した統計モデルでも同時改良が可能な選抜指数の導出および推定総合育種価の算出方法についてコンピューターシミュレーションで検証した。相対希望改良量を達成するための選抜指数の算出に，因果関係を考慮したモデルを用いる場合には，因果効果を考慮して補正した相対希望改良量を用いることで，想定した相対希望改良量が得られる選抜指数になることが示された。また，分娩時形質と離乳形質を想定したコンピューターシミュレーションでは因果関係を考慮したモデルによる遺伝的パラメーターを用いた推定総合育種価による改良量は，離乳形質に大きく偏ることが示されたが，因果効果を考慮して補正した相対希望改良を用いることで，その偏りが解消できることが示された。

文　献

1） Sorensen, D., A. Vernersen, and S. Andersen：*Genetics*, 156.1, 283～295, 2000.
2） Holl, Justin Wane, and O. W. Robison：*Journal of Animal Science*, 81.3, 624～629, 2003.
3） Okamura, T., K. Ishii, M. Nishio, G. J. Rosa, M. Satoh, O. Sasaki：*Animal Science Journal*, 91(1), e13369, 2020.
4） Yamada, Y., K. Yokouchi, and A. Nishida：*Japanese Journal of Genetics*, 50, 33～41, 1975.
5） Satoh, M., C. Hicks, K. Ishii and T. Furukawa：*Animal Science Journal*, 71, 17～25, 2000.
6） Misztal, I., S. Tsuruta, D. A. L. Lourenco, Y. Masuda, I. Aguilar, A. Legarra, Z. Vitezica. 2018. Manual for BLUPF90 family programs. University of Georgia. http://nce.ads.uga.edu/wiki/doku.php?id=documentation

© 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（Ⅱ）

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

庄　司　則　章[1]・上　本　吉　伸[2]

（[1]山形県農業総合研究センター畜産研究所，[2]東北大学大学院農学研究科）

Noriaki Shoji[1] and Yoshinobu Uemoto[2]

（[1]Livestock Research Institute, Yamagata Integrated Agricultural Research Center, [2]Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University）

For the “sweet aroma” characteristic of Japanese black beef, genetic parameters related to the precursors of aroma compounds that contribute to the “sweet aroma” evaluation value of baked meat were estimated, and aroma compounds that contribute to the “sweet aroma” evaluation value of boiled meat were investigated. Heritabilities of monosaccharides, free amino acids, dipeptides, and nucleic acid-related substances, which are precursors of baked aroma, were 0.28, 0.15, 0.15, and 0.19, respectively, and the difference in predicted breeding values among bulls was about 30% of the tabular value. The components significantly correlated with “sweet aroma” of boiled meat were 1-Tetradecanol, Pantolactone, γ-Crotonolactone, 1-Hexadecanol, Skatole, Acetoin, Isovaleric acid, and Butyric acid. The results of PLS analysis with these eight components suggested that the “sweet aroma” rating could be estimated from their content.

1．目　　的

黒毛和種牛肉（以下「和牛肉」とする）は脂肪交雑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４年枝肉格付における５等級率は10年前の３倍となる60％まで高まっている。また，BMS No.の現場後代検定成績が10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となっている。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

© The Ito Foundation

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であると考える。

前報[1]において，焼成和牛肉の「甘い香り」に関与する香気成分の含有量は，生牛肉中の粗脂肪，単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質，遊離脂肪酸の６成分により説明できることから，これらの成分は「甘い香り」の前駆物質であると考えられる。また，これらの成分は熟成前後の相関が高いことも明らかとなっている。そこで本研究では，焼成和牛肉の「甘い香り」に寄与する香気成分の前駆物質について遺伝的パラメーターを推定し，「甘い香り」前駆物質の遺伝的要因を明らかにする。

また，和牛肉の特長とされる「和牛香」は脂肪交雑度の高い和牛肉を熟成後にスライスし，含気状態で冷蔵したのち，80℃前後の煮肉調理においてより感じやすい[2]。和牛香にはラクトン，ケトン，アルデヒド類など脂肪由来の香気成分の関与が報告[3]されているものの，和牛香を構成する香気成分の全体像には不明な点が多い。そこで煮肉の「甘い香り」に注目し，分析型官能評価と香気成分分析から煮肉の「甘い香り」に寄与する香気成分についても明らかにする。

２．方　法

2.1　試験１　焼成肉における「甘い香り」前駆物質の遺伝的要因の解明

焼成和牛肉の「甘い香り」に重要な香気成分の前駆物質と考えられる単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質の遺伝的パラメーターを推定するため，山形県内の市場に上場された黒毛和種の枝肉3,684検体より切開面の僧帽筋を採取した。僧帽筋の単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質を，メタボロミクス前処理ハンドブック[4]の方法により抽出ならびに誘導体化し，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 × 1.00 μm × 0.25mmID）により測定した。定量にあたっては，標準試薬より調製したQCサンプルをサンプル７検体ごとに分析し，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を標準化した[5]。

グルコース，フルクトース，マンノース，リボース，アラビノースの総量を単糖含量，グルタミン，アラニン，ロイシン，リジン，セリン，バリン，フェニルアラニン，グリシン，チロシン，イソロイシン，メチオニン，トレオニン，アスパラギン，プロリン，オルニチン，ヒスチジン，βアラニン，γアミノ酪酸，グルタミン酸，アスパラギン酸の総量を遊離アミノ酸含量，カルノシンとアンセリンの総量をジペプチド含量，ヒポキサンチン，イノシン，イノシン酸の総量を核酸関連物質含量とした。これらの成分は水溶性物質であり，サンプル中の粗脂肪割合の影響を大きく受ける。そこで粗脂肪含量を併せて測定し，粗脂肪を除いた重量当たりで補正した単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質含量を用いた。また，異常値を除外するため，形質ごとに平均値 ± ３SDの範囲のみのデータを採用した。遺伝率の推定および育種価の予測は，単形質アニマルモデルREML法を用い，遺伝相関の推定は２形質アニマルモデルREML法を用いた。調査牛の４世代まで遡って得られた17,604頭の血縁情報を用い，母数効果として農場，と畜場，と畜年，と畜月，性を，共変量としてと畜月齢への２次までの回帰を考慮した以下のモデルにより，ASREML v4.1を用いて遺伝的パラメーターを推定した。

y ＝総平均＋農場＋と畜場＋と畜年＋と畜月＋性＋と畜月齢（２次回帰）＋育種価＋誤差

© The Ito Foundation

2.2　試験２　煮肉の「甘い香り」に寄与する香気成分の特定

牛肉販売店より，２mm厚でスライスしたサーロイン31検体（黒毛和種15，交雑種６，乳用種４，外国種６）を購入して真空パックし，官能評価ならびに理化学分析まで－80℃にて保存した。

分析型官能評価は(一社)食肉科学技術研究所に依頼した。最長筋を80℃の１％食塩水中で２分間加熱し，ただちに５名の分析型パネルに提供して，甘い香り，脂っぽい香り，肉様の香りを評価した。１回あたりの検査数は３検体とし，全10回の官能評価においてデータを比較できるよう，同一の基準肉（交雑種）を毎回食し，基準肉を０として各検体の香りの強さを＋３（非常に強い）～－３（非常に弱い）の７段階で評価した。

また，同様に調理した最長筋を細断してエタノールを添加し，ビーズ式破砕機（安井器械製マルチビーズショッカー）にて2000rpmで120秒間破砕した。これを30℃で一夜，香気成分を抽出後，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脱水し，－10℃の遠心分離により上清を得た。固相抽出（InertSep C18FF）により上清から中性脂質を除去し，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沈殿させ，上清を濃縮した。この濃縮サンプルを，標準試薬より調製した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：DB-WAX UI 30m × 0.25 μm × 0.25mmID）で測定し，試験１と同様に定量値の標準化を行った。分析型パネルによる「甘い香り」評価値を目的変数，香気分析値を説明変数とするPLS解析をThe Unscrambler X（CAMO社）により実施し，煮肉の「甘い香り」に寄与する香気成分を選定した。

３．結果と考察

3.1　試験１

試料の粗脂肪含量を除いた値で補正した，枝肉切開面の僧帽筋の単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質含量の平均値±標準偏差は，それぞれ2.86±0.75，9.37±2.24，9.39±2.35，3.55±1.03mg/g除脂肪であった（**Table 1**）。これらの形質の変動係数はそれぞれ26.3，23.9，25.0，28.9％であり，不飽和度の12.3％に比べて高いことから，より個体間差が大きい形質であると考えられた。また，**Table 1** に遺伝率 h^2 を示した。脂肪の口溶けに影響する不飽和度の遺伝率は0.65であり，これまでの報告[6, 7]と同程度であった。一方，単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質含量の遺伝率は0.28，0.15，0.15，0.19であり，不飽和度に比べて低い遺伝率であった。Sakumaら[8]は黒毛和種587頭の最長筋を用いた同様の解析を報告しており，牛肉中の水分当たりの遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質含量の遺伝率は本研究と同程度の0.12，0.18，0.22であった。また，この報告ではグルコース，フルクトース，マンノース，リボース，グリセロール，myo-イノシトールの総量の遺伝率は0.08，それぞれの単糖の遺伝率も0.04～0.14であり，本研究の遺伝率の方が高かった。本研究において種雄牛809頭の育種価を予測し，このうち2010年生まれ以降の種雄牛119頭の単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質含量の育種価の最大値―最小値間差はそれぞれ1.23，2.66，2.92，1.38mg/g除脂肪であった。これらの形質の遺伝率は高くはないものの，表型値の30％程度の育種価の種雄牛間差が認められた。

Table 2 に遺伝相関を示した。核酸関連物質と粗脂肪含量の遺伝相関は－0.69であった。この核酸関連物質含量は，粗脂肪含量を除いた原物当たりの値であるが，それでも粗脂肪含量と比較的高

© The Ito Foundation

Table 1　Basic statistics and heritability

Trait	Abbreviations	N	mean	SD	CV	h^2
Carcass weight	CW	3656	460.5	54.4	11.8	0.45
Crude fat	CF	3676	42.1	9.2	21.7	0.47
Ratio between USFA and SFA	US/S	3645	1.96	0.24	12.3	0.65
Total sugar*	TS	3658	2.86	0.75	26.2	0.28
Total free amino acids*	TFAA	3638	9.37	2.24	23.9	0.15
Total peptides*	TP	3640	9.39	2.35	25.0	0.15
Total nucleotides*	TN	3603	3.55	1.03	28.9	0.19

h^2：heritability estimates
SFA = sum of C14:0, C16：0 and C18：0
USFA = sum of C14：1, C16：1 and C18：1
Total sugar = sum of Glc, Fru, Man, Rib and Ara
Total free amino acids = sum of Gln, Ala, Leu, Lys, Ser, Val, Phe, Gly, Tyr, Ile, Met,Thr, Asn, Pro, Orn, His, β-Ala, GABA,Glu and Asp
Total peptides = Car and Ans
Total nucleotides = Hx, Ino and IMP
* Trait values in meat excluding fat（mg/g meat excluding fat）

Table 2　Genetic correlations

	TS	TFAA	TP	TN
CW	−0.26	0.25	−0.11	0.03
CF	−0.19	−0.26	−0.33	−0.69
US/S	−0.19	0.21	0.06	0.19

Abbreviations are the same as Table 1.

Table 3　Significance of non-genetic effects（p-value）

Trait	farm	slaughter			sex	ageinmonths	
		place	year	month		primary	secondary
CW	<.001	<.001	0.001	0.003	<.001	<.001	0.015
CF	<.001	<.001	0.002	<.001	<.001	0.526	0.754
US/S	<.001	0.902	0.159	<.001	<.001	<.001	0.602
TS	<.001	<.001	0.112	<.001	0.346	0.136	0.966
TFAA	<.001	<.001	0.024	<.001	0.130	0.110	0.003
TP	<.001	0.01	<.001	<.001	0.389	0.291	0.977
TN	<.001	<.001	<.001	<.001	<.001	0.154	0.885

Abbreviations are the same as Table 1.

い負の遺伝相関を示した。このことから現在の脂肪交雑を重視した黒毛和種の育種改良により，牛肉のうま味に関与する核酸関連物質は低下していくものと考えられた。

非遺伝効果である農場効果は，すべての形質において有意な効果が認められた（**Table 3**）。データ数が10以上の96農場における単糖（TS），遊離アミノ酸（TFAA），ジペプチド（TP），核酸関連物質（TN）含量の農場効果の最大値－最小値間差はそれぞれ1.31，3.27，3.45，1.36mg/g除脂

© The Ito Foundation

肪であり，農場の飼養管理の違いが大きいことが推察された。今後，農場効果と飼養管理との関連性についても調査し，飼養管理面からこれらの形質の向上方策を明らかしたい。

3.2　試験２

煮肉による分析型官能評価において，黒毛和種は交雑種，乳用種，外国種に比べて「甘い香り」と「脂っぽい香り」が有意に強かった（**Table 4**）。佐久間ら[9]も官能評価において黒毛和種牛肉は輸入牛肉に比べて「甘い香り」と「脂っぽい香り」が大きく優れることを報告しており，改めてこれらの香りは黒毛和種牛肉の特徴であることが確認された。煮肉の香気成分分析では半数以上の試料から検出された化合物数は63であり，このうち官能評価の「甘い香り」と有意な相関（$p<0.01$）が認められた化合物は 1-Tetradecanol, Pantolactone, γ-Crotonolactone, 1-Hexadecanol, Skatole, Acetoin, Isovaleric acid, Butyric acid であった（**Table 5**）。これらの化合物は「脂っぽい香り」とも同程度の相関関係にあった。この８化合物の煮肉含有量を説明変数，「甘い香り」評価値を目的変数としたPLS解析を実施したところ，因子数１，決定係数はキャリブレーション0.753，バリデーション0.725となり，８化合物により「甘い香り」を説明できるものと考えられた。分析型官能評価の実施にあたっては，試料の入手と調製，検査員の確保等で多大な労力と費用が必要となり，多検体の牛肉の「甘い香り」評価値を蓄積するのは困難であるが，本研究より「甘い香り」評価値を煮肉の香気成分分析値から推定できることが示唆された。次に，煮肉調理前の生肉を用いて同様の推定が可能かどうか検討した。生肉の香気成分を分析し，上記８化合物によるPLS解析を行ったところ，因子数１，決定係数はキャリブレーション0.612，バリデーション0.639であった。このバリデーションの決定係数0.639（相関係数

Table 4　Sensory evaluation value

Beef breeds	N	Sweet smell			Fatty smell			Meat smell		
Japanese Black	15	0.97	±0.41	A	0.76	±0.59	A	−0.12	±0.43	B
Hybrid（H×JB）	6	−0.10	±0.49	B	−0.30	±0.63	B	0.40	±0.35	B
Holstein	4	−0.90	±0.41	C	−1.15	±0.33	B	1.25	±0.22	A
Foreign species	6	−2.20	±0.12	D	−2.23	±0.24	C	−0.13	±0.60	B

Significant difference between different codes（$p<0.05$）

Table 5　Correlation between sensory evaluation values and boiled meat aroma content（N=31）

	Sweet smell	Fatty smell	Meat smell
1-Hexadecanol	0.56	0.51	−0.31
Pantolactone	0.54	0.54	−0.49
γ-Crotonolactone	0.49	0.45	−0.17
1-Tetradecanol	0.47	0.50	0.15
Skatole	0.46	0.32	−0.30
Acetoin	−0.49	−0.52	0.11
Isovalericacid	−0.50	−0.49	−0.07
Butyricacid	−0.67	−0.69	−0.20

© The Ito Foundation

Table 6　Aroma content of boiled and raw meat（N=31）

	Content（ng/g meat）		p-value	Correlation coefficient
	boiled	raw		
1-Tetradecanol	50	49	0.938	0.448
Pantolactone	29	72	0.000	0.555
γ-Crotonolactone	1756	1630	0.154	0.979
1-Hexadecanol	687	729	0.785	0.992
Skatole	6	12	0.031	0.339
Acetoin	5718	9768	0.000	0.942
Isovaleric acid	21	44	0.000	0.763
Butyricacid	1354	2488	0.000	0.801

0.80）は，近赤外測定装置による黒毛和種枝肉筋間脂肪のMUFA推定における相関係数0.80[10]と同程度であり，煮肉に比べて推定精度は低下するものの，生肉でも「甘い香り」評価値を予測できるものと考えられた。

この８化合物の含有量を煮肉と生肉で比較したところ，Pantolactone, Skatole, Acetoin, Isovaleric acid, Butyric acidは煮肉調理により有意に減少した（**Table 6**）。これらの化合物は水に溶解するが，水に不溶である1-Tetradecanol，γ-Crotonolactone, 1-Hexadecanolは煮肉調理による変化は認められなかった。煮肉と生肉の含有量の相関係数はSkatoleで低かったが，それ以外は中程度から高かった。前報[1]でγ-Crotonolactoneならびに Butyric acidの熟成前後の含有量の相関係数を0.90，0.87と報告しており，この際に調査した1-Tetradecanol, Pantolactone, 1-Hexadecanol, Skatole, Acetoin, Isovaleric acidの相関係数はそれぞれ－0.25，0.79，0.99，0.95，0.98，0.39であった。1-TetradecanolとIsovaleric acid以外は熟成前後において高い相関係数が認められたことから，熟成前の生肉中の香気成分含有量より熟成後の煮肉の「甘い香り」評価値を予測できるものと考えられる。

４．要　　約

和牛肉の特長である「甘い香り」について，焼成肉の「甘い香り」評価値に寄与する香気成分の前駆物質に関する遺伝的パラメーターを推定するとともに，煮肉の「甘い香り」評価値に寄与する香気成分を調査した。焼成香気の前駆物質である単糖，遊離アミノ酸，ジペプチド，核酸関連物質の遺伝率はそれぞれ0.28，0.15，0.15，0.19であり，予測された育種価の種雄牛間差は表型値の30％程度であった。煮肉の「甘い香り」と有意な相関が認められた成分は1-Tetradecanol, Pantolactone, γ-Crotonolactone，1-Hexadecanol，Skatole, Acetoin, Isovaleric acid, Butyric acidであった。また，この８成分によるPLS解析の結果，これらの含有量から「甘い香り」評価値を推定できることが示唆された。

文　　献

1）　中嶋宏明ら：黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立，令和３年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，VOL. 40，115～122，2022.
2）　Matsuishi, M., *et al*：Wagyu Beef Aroma in Wagyu（Japanese Black Cattle）Beef Preferred by Japanese over Imported Beef, *Anim. Sci . J.*, **72**(6), 498～504，2001.
3）　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.

© The Ito Foundation

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）　井上慶一ら：黒毛和種肥育牛の脂肪融点，脂肪酸組成および格付形質間の遺伝的関係，日本畜産学会報，**79**(1)，１～８，2008.
７）　横田祥子ら：黒毛和種牛肉における脂肪酸組成と枝肉形質および肉質形質との遺伝的関係，東北畜産学会報，**60**(3)，80～85，2011.
８）　Sakuma，H.，*et al*：Estimates of genetic parameters for chemical traits of meat quality in Japanese black cattle, *Anim. Sci. J.*, **88**，203～212，2017
９）　佐久間弘典ら：黒毛和牛の優れた風味とそれをもたらす遺伝子の解明，におい・かおり環境学会誌，**42**(4)，276～284，2011.
10）　神山洋ら：近赤外測定装置による黒毛和種枝肉筋間脂肪中の脂肪酸測定のためのサンプル数等条件の検討，東北農業研究，**66**，83～84，2013.

© The Ito Foundation

新たに見つかった黒毛和種牛の筋ジストロフィーの病態解明と遺伝的統御法の確立

Establishment of genetic control method and pathophysiological analysis of newly discovered muscular dystrophy in Japanese Black cattle

保　田　昌　宏[1,2]

（[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）

Masahiro Yasuda[1,2]

（[1]Graduate School of Medicine and Veterinary Medicine, University of Miyazaki,
[2]Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Muscular dystrophy is a genetic muscle disease that causes progressive degeneration and necrosis of muscle fibers, resulting in muscle weakness and atrophy. In this study, a newborn Japanese Black calf present astasia after birth. As a result, several mutations were found in the dystrophin gene, and a diagnosis of dystrophin deficiency muscular dystrophy was found. By tracing the gene carrier cows, the existence of three carrier cows was identified. These finding suggest that differential diagnosis of this disorder is necessary if neonatal male calf presents with astasia after birth, and a family history is suspected.

1．目　　的

筋ジストロフィーは進行性に筋線維が変性・壊死し，筋力の低下や萎縮を起こす遺伝性筋疾患である。ヒトでは筋を構成するタンパク質群の異常によって，X染色体連鎖性，常染色体優性または劣性のほか，突然変異によって起こることが知られている。その中でもジストロフィンタンパク質の異常によるDuchenne型は症状が重篤で，ヒトの出生3,500－10,000人あたり１人が発症し，ジストロフィン遺伝子座はX染色体上にあり，伴性遺伝するために主として男子に発症が認められる[1~3]。

これまでにもヒト以外の動物の筋ジストロフィーは，イヌ，ネコ，ヒツジ，ウマなどの多種で認められている。しかしながら，欠損タンパク質の性状や遺伝様式などがヒトの筋ジストロフィーと同一ではなく，不明な点も多いため遺伝性筋症として扱われる傾向にあった。ウシの遺伝性筋ジストロフィーはMeuse-Rhine-Yssel（MRY）種牛でHeat-shock 70 protein 1B遺伝子欠損による常染色体劣性遺伝性の横隔膜筋ジストロフィーが報告されており，ホルスタイン種成牛における慢性第一胃鼓張症を特徴とする疾患である[4,5]。伴性遺伝するジストロフィン欠損型筋ジストロフィーはマウス，ラット，イヌ，ネコ，ブタ，ゼブラフィッシュ，ミバエで確認されているが[6]，ウシでの報告はまだない。

今回，黒毛和種繁殖農家において，新生子雄牛が出生後起立不能を呈したため，母牛系統群の事故発生状況の解析により遺伝性疾患が疑われたので，症例の解剖および遺伝子解析を実施した。さ

© The Ito Foundation

らに関連農場を含めた遺伝子検査を行い，本疾患の遺伝的統御を試みた。

２．方　法

2.1　農場の概要

黒毛和種牛約30頭を使用する繁殖農家で，素牛は自家育成あるいは外部導入にて更新しており，牛異常産三種混合ワクチンも毎年接種していた。しかし子牛の事故が頻発し，奇形を伴う異常産と出生後起立不能を呈する事故がたびたび認められた。事故子牛の母牛系統を見直したところ，母牛Ａの産子９頭（雄４頭，雌５頭）のうち雄３頭が出生後３日から６ヵ月齢で起立不能をとなり，死亡していた（**Fig. 1**：Ａ-④，Ａ-⑧，Ａ-⑨）。また，母牛Ａの２産目および６産目の雌子牛を育成して繁殖に用いていた。２産目の母牛Ｂの４産目および５産目の雄子牛が出生後起立不能を呈し死亡していた（**Fig. 1**：Ｂ-④，Ｂ-⑤）と６産目の母牛Ｃの１産目の雄子牛が出生後起立不能を呈し死亡していた（**Fig. 1**：Ｃ-①）。２産目の産子（解剖した症例：Ｃ-②）も雄で出生後起立不能を呈したことから遺伝性疾患を疑った。

2.2　子牛の概要

新生子雄の黒毛和種子牛（Ｃ-②）は，出生時35kgで正常分娩であった。出生直後より起立不能で，後肢随意運動不能であった。意識，飼料摂取量，頭頸部の動きは正常であった（**Fig. 2**）。子牛の臨床症状は，子牛の血縁者である母牛から生まれた他の５頭の雄子牛（Ａ-④，Ａ-⑧，Ａ-⑨，Ｂ-④，Ｂ-⑤）にも確認されていた。そこで，本症例を安楽死させ，生後３日で剖検を実施した。

３．結果と考察

3.1　肉眼剖検所見

全身の骨格筋の淡色化（白化）が認められた（**Fig. 3**）。前肢および後肢の深部筋も白化していた。心臓の外景には著変はなく，心房に欠損孔約５mmの中隔欠損を認めた。また，第四胃幽門部粘膜の軽度びらんが認められ，肺は右後葉の一部が肝変化し，胸腺が矮小であった。脳，脊髄，その他の臓器には外見上の異常は認めなかった。

3.2　遺伝子解析結果

岡山大学にて遺伝子解析を実施した。候補遺伝子としてジストロフィンに注目し，発症個体の毛根と血液を用いてジストロフィン遺伝子の塩基配列を次世代シークエンサーにて解析した。データベースにある塩基配列と比較した結果，発症個体のジスロトフィン遺伝子領域には，ジストロフィンタンパクの機能に影響を及ぼすと思われるエクソンの大規模欠損を含んだ突然変異カ所が３カ所見つかった。これらの変異が本疾患と関連があると思われた。その後，生存する雌牛の遺伝子検査を実施したが，ヘテロに変異を持つキャリア個体は母牛Ｂと母牛Ｃおよび６産目の雌牛（Ｂ-⑥）

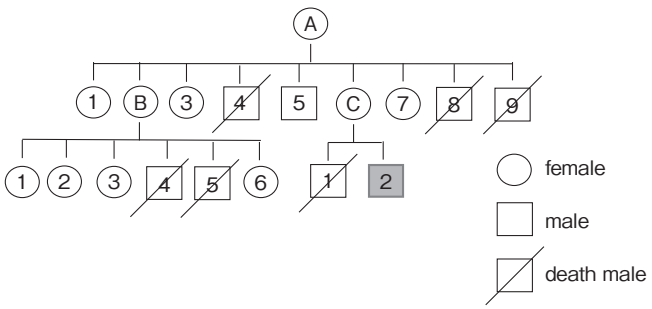

Fig. 1　A family tree of the affected calf.

© The Ito Foundation

Fig. 2　A lateral aspect of the symptom appeared calf.

Fig. 3　The muscles of fore-limb.

の３頭のみであった。

よって，本症例および母牛系統の解析，さらに遺伝子解析結果からＸ染色体連鎖性の筋ジストロフィーであると考えられた。ジストロフィン遺伝子は大きく，ヒトでは約2.5Mbにおよび79個のエクソンをコードしている[7,8]。突然変異も起こりやすく，欠失変異，重複変異，点変異，および小さな挿入や削除変異等もしばしば発生すると言われている[9]。よって，ウシにおいても突然変異によるジストロフィン欠損型筋ジストロフィーの発生は散発的に起こっている可能性があり，新生子の起立不能は遺伝性の筋ジストロフィーを鑑別診断する必要があると思われた。今回の死亡雄産子では，出生直後より起立不能を呈し，数日から数ヶ月程度で死亡していることから，ウシのジストロフィン欠損型筋ジストロフィーは，臨床症状が早期に出現し，筋力低下が重篤で致死的になると示唆された。ジストロフィン遺伝子はＸ染色体上に存在するために雄は一つ，雌は二つのジストロフィン遺伝子を持っており，雌は一方の変異遺伝子を受け継いだとしても，もう一方の遺伝子が正常であれば発症せず保因牛となる。雄では，Ｘ染色体が一つなので，変異遺伝子を受け継いだ場合，ジストロフィンタンパクを産生できず，筋ジストロフィーを発症して死亡する。本症例では，母牛Ａはすでに食肉処理されていたために遺伝子検査をできていない。しかしながら，母牛Ｂおよび母牛Ｃとその産子の状況をふまえると，母牛Ａに突然変異が起こり保因牛となった可能性がある。また，発症雄牛が生まれると数日から数ヶ月で死亡廃用となる可能性が高く農場の損失が大きい。さらに保因雌牛は外見上正常であるために，繁殖素牛として育成され，気づかないうちに疾病が拡大する危険性もある。今後は遺伝子診断法を確立し，保因雌牛の摘発と遺伝的制御を実施する必要がある。

４．要　　約

筋ジストロフィーは進行性に筋繊維が変性・壊死を起こし，筋力の低下や萎縮を起こす遺伝性筋疾患の総称である。今回，黒毛和種牛新生子牛が出生後起立不能を呈し，母牛系統群の事故状況を解析し遺伝性が疑われたことから，解剖し遺伝子検査を行った。その結果，ジストロフィン遺伝子に変異が認められたことからジストロフィン欠損型筋ジストロフィーと診断した。また，保因牛を追跡することで，３頭の保因牛の存在を突き止め，遺伝的制御が行えた。新生子牛が出生後の起

© The Ito Foundation

立不能を呈し，性別が雄であり，家族性の発症が認められた場合，ジストロフィン欠損型筋ジストロフィーを鑑別する必要がある。

謝　辞

遺伝子検査を実施いただきました，岡山大学大学院環境生命科学研究科　辻岳人先生に深謝いたします。また，保因牛の追跡調査にあたってご協力いただきました，宮崎県農業共済組合の近藤弘章先生に深謝いたします。

文　献

1） Gisela, G., Alexandra, P.：Muscular dystrophy: Experimental animal models and therapeutic approaches, *Exp Ther Med*, **21**, 610, 2021.
2） Sui, T., Lau, Y. S., Liu, D., Liu, T., Xu, L., Gao, Y., Lai, L., Li, Z., Han, R.：A novel rabbit model of Duchenne muscular dystrophy generated by CRISPR/Cas9, *Dis. Model Mech.*, **11**, dmm032201 10.1242/dmm. 032201, 2018.
3） Ryder, S., Leadley, M. R., Armstrong, N., Westwood, M., de Kock, S., Butt, T., Jain, M., Kleijnen, J.：The burden, epidemiology, costs and treatment for Duchenne muscular dystrophy: an evidence review, *Orphanet J Rare Dis*, **12**, 79, 2017.
4） Goedegebuujie, A. S., Hartman, W., Hoese, P. H.：Dystrophy of the Diaphragmatic Muscles in Adult Meuse-RhineYssel Cattle: Electromyographical and Histological Findings, *Vet Pathol*, **20**, 32～48, 1983.
5） Furuoka, H., Doi, T., Nakamura, N., Inada, I., Osame, T., Matsui, T.：Hereditary myopathy of the diaphragmatic muscles in Holstein-Friesian cattle, *Acta Neuropathol*, **90**, 339～346, 1995.
6） Miranda, D. G., Jessica, R. T., Basma, A. A., Marisa, N. D., Hannah, G. R., Peter, G. A.：Biomarkers for Duchenne muscular dystrophy: myonecrosis, inflammation and oxidative stress, *Dis Model Mech*, **1**, 13, 2020.
7） Maria, S. F., Chiara, S., Chiara, P., Alessandra, F.：Muscular Dystrophy: From diagnosis to therapy, *Molecules*, **20**, 18168～18184, 2015.
8） Wells, D. J.：Tracking progress an update on animal models for Duchenne muscular dystrophy, *Dis Model Mech*, **11**(6), dmm035774, 2018.
9） Yu, X., Bao, B., Echigoya, Y., Yokota, Y.：Dystrophin-deficient large animal models: translational research and exson skipping, *Am J Transl Res*, **7**, 1314～1331, 2015.

© The Ito Foundation

鶏の暑熱耐性を担うCCKARおよびHSP70遺伝子多型に関する研究

The study of polymorphism in the chicken CCKAR and HSP70 gene associated with thermotolerance

福原　絵里子・平川　達也・森　　美幸
（福岡県農林業総合試験場）

Eriko Fukuhara, Tatsuya Hirakawa and Miyuki Mori
(Fukuoka Agriculture and Forestry Research Center)

Summer heat stress reduces the productivity of chickens. The relationship between a single nucleotide polymorphism (SNP ; AB604331, g.420 C>A) in the cholecystokinin type A receptor (CCKAR) gene and three production traits, body weight gain, feed conversion rate, and production index, during hot weather was investigated in Hakata-jidori and Hakata-ichibandori from Fukuoka prefecture. No effect of the genetic polymorphism was observed in these traits examined. By genomic sequencing the heat shock protein 70 (HSP70) gene, which is expected to be associated with heat stress in the Shamo, Barred Plymouth Rock, Hakata-jidori, and Hakata-ichibandori, 4, 7, 3, and 4 SNPs were found, respectively.

1．目　　的

夏季の暑熱ストレスは鶏の生産性低下を引き起こし，畜産農家にとって大きな問題となっている。福岡県ではブランド肉用鶏「はかた地どり」と「はかた一番どり」を生産している。「はかた地どり」はシャモの雄と横斑プリマスロックの雌を交配したＦ１の雄と白色プリマスロックの雌を交配させた鶏である。また，「はかた一番どり」は横斑プリマスロックの雄と白色プリマスロックの雌を交配したＦ１の雄と白色プリマスロックの雌を交配させた鶏である。「はかた地どり」，「はかた一番どり」は，夏季の暑熱時に生産性が低下するため，暑熱耐性のある鶏の作出が求められている。

現在，比内地鶏等では発育に関連する遺伝子（コレシストキニンＡ受容体遺伝子：以下CCKAR）の一塩基多型（SNP；AB604331, g.420 Ｃ＞Ａ）において，ＡアリルがＣアリルより優れることが明らかとなっており[1~3]，同遺伝子の発育改善効果は暑熱時においても発現することが報告されている[3]。

一方で，暑熱耐性に関わる熱ショックタンパク質（Heat shock protein：以下HSP70）は，生命活動を担うさまざまなタンパク質を熱変性から保護・修復する役割を持ち，これまでにHSP70遺伝子の発現量と暑熱ストレスに対する生理反応の関連性が報告されている。また，HSP70遺伝子多型は鶏種により異なり[4~6]，多型によってパンティング数や飲水量が異なることが報告されている

© The Ito Foundation

が[6]，鶏種ごとの遺伝子多型と暑熱耐性との関連性は明らかではない。

そこで本研究では，福岡県産ブランド肉用鶏である「はかた地どり」，「はかた一番どり」におけるCCKARの遺伝子多型と暑熱期の増体性との関連について検討した。さらに，これらブランド肉用鶏およびその原種鶏となるシャモと横斑プリマスロックを対象に，DNAシーケンスによる解析を実施し，HSP70遺伝子多型について調査した。

２．方　　法

2.1 「はかた地どり」，「はかた一番どり」のCCKAR遺伝子多型と発育性との関連性の解明

「はかた地どり」，「はかた一番どり」が保有するCCKAR遺伝子多型の違いによる暑熱期の発育性との関連性を解明するため，「はかた地どり」雄99羽，雌97羽，「はかた一番どり」雄94羽，雌101羽の計391羽のCCKARの遺伝子型を調査した。２週齢で翼下静脈から採血した後は力丸らの方法[1]に準じた。試験期間は「はかた地どり」は令和４年６月１日～８月24日，「はかた一番どり」は令和４年６月17日～８月18日とした。平飼鶏舎に雌雄別に飼養し，遺伝子型を確認後，４週齢で雌雄ごとにA/A区，A/C区，C/C区に区分した。飼料は以下の市販飼料を給与した。「はかた地どり」は，前期飼料（CP22.5％，ME3,130kcal）を３週齢まで，後期飼料（CP18％，ME3,170kcal）を８週齢まで，仕上げ用飼料（CP18％，ME3,100kcal）を12週齢まで給与した。また，「はかた一番どり」は，前期飼料（CP22.5％，ME3,130kcal）を３週齢まで，仕上げ用飼料（CP17％，ME3,150kcal）を９週齢まで給与した。飼育期間中は水と飼料は自由摂取とした。

調査項目は，生体重，飼料要求率，生産指数とした。また，鶏舎内で30℃を超えた１日において，各区６羽（６羽に満たない区は全羽数）の直腸温とパンティング数を測定した。

統計解析については，調査項目ごとに遺伝子型と性別の２元配置の分散分析を行った。

2.2　シャモ，横斑プリマスロック，「はかた地どり」および「はかた一番どり」におけるHSP70遺伝子多型の探索

「はかた地どり」，「はかた一番どり」，シャモ，横斑プリマスロックが保有するHSP70遺伝子多型を推定するため，2.1で使用した「はかた地どり」，「はかた一番どり」の雄をそれぞれ76羽，56羽，福岡県農林業総合試験場で保有しているシャモと横斑プリマスロックの雄をそれぞれ40羽，50羽の計222羽のHSP70の遺伝子型多型を調査した。2.1と同様に採血してDNAを抽出した後，HSP70遺伝子の一部配列（GenBank：accession number J02579）を特異的プライマー（**Table 1**）で増幅した。増幅産物をExoSAP-IT Express PCR Cleanup Reagents（サーモフィッシャーサイエンティフィック）で精製した後，DNAシーケンス（ユーロフィンジェノミクス株式会社）により前から1000塩基程度までの配列情報を取得し，GenBankに登録されているリファレンス配列を参照し，遺伝子多型を検出した。

なお，本研究は「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）に則り実施した。

３．結果と考察

3.1 「はかた地どり」，「はかた一番どり」のCCKAR遺伝子多型と発育性との関連性の解明

「はかた地どり」におけるCCKARの遺伝子型は，雄ではA/A型が44羽，A/C型が43羽，C/C型が12羽，雌ではA/A型が49羽，A/C型が45羽，C/C型が３羽であった。「はかた一番どり」にお

© The Ito Foundation

Table 1 The DNA sequence of primer (forward and reverse) of HSP70 gene

HSP70-*F*	5'-CGATCTGGCTGCAATCTACG-3'
HSP70-*R*	5'-ATTTCCAGAAGCTGCACTTGG-3'

Table 2 The effect of CCKAR genotype on Hakata-jidori and Hakata-ichibandori

			Body weight (g)	Feed/gain ratio	Production Score	Rectal temperature (℃)	Panting frequency (time/minite)
Hakata-jidori	SNP	A/A	3289	2.43	155	42.3	166
		A/C	3330	2.46	147	41.8	175
		C/C	3146	2.62	140	41.8	196
			NS	NS	NS	NS	NS
	Gender	male	3792	2.47	176	42.2	154
		female	2718	2.54	119	41.7	204
			*	NS	*	*	NS
Hakata-ichibandori	SNP	A/A	2708	2.10	178	42.8	183
		A/C	2867	2.08	197	42.3	170
		C/C	2920	2.29	167	42.9	177
			NS	NS	NS	NS	NS
	Gender	male	3016	2.16	170	42.9	182
		female	2647	2.15	191	42.4	172
			*	NS	NS	*	NS

*, $p<0.05$

いては，雄ではA/A型が34羽，A/C型が57羽，C/C型が３羽，雌ではA/A型が46羽，A/C型が47羽，C/C型が８羽であった。

CCKARの遺伝子型の違いによる「はかた地どり」および「はかた一番どり」の成績を**Tabel２**に示した。体重，飼料摂取量，生産指数，直腸温度およびパンティング数はいずれも遺伝子型の違いによる差は認められなかった。

CCKAR遺伝子のA/A型は発育が優れ，比内鶏では飼料要求率が優れることが報告[1]されているが，本試験での「はかた地どり」と「はかた一番どり」において，増体や飼料要求率でCCKAR遺伝子多型の効果が認められなかった。川江らは11週齢まで飼育した肉用讃岐コーチンではCCKARの効果が認められなかったと報告している[7]。川江らは，CCKAR遺伝子多型の効果が認められている鶏種と比較すると，肉用讃岐コーチンの飼育期間が短く発育が早いため，CCKAR遺伝子多型の増体効果が認められなかった可能性を指摘しており，本試験で供試した「はかた地どり」および「はかた一番どり」も，飼育期間は12週齢および９週齢と短いことから，CCKARの増体効果が認められなかった可能性がある。

3.2 シャモ，横斑プリマスロック，「はかた地どり」および「はかた一番どり」におけるHSP70遺伝子多型の探索

シャモ，横斑プリマスロック，「はかた地どり」および「はかた一番どり」の血液から抽出したDNAの塩基配列情報から，遺伝子多型の存在箇所およびアレル頻度を調査した。

© The Ito Foundation

Table 3　Genotype of HSP70-SNPs

SNPs		Genotype frequency（%）											
		Shamo			Barred plymouth rock			Hakata-jidori			Hakata-ichibandori		
213	G/A	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA	GG	AG	AA
		54.5	45.5	0	17.2	82.8	0	53.5	46.5	0	65.6	34.4	0
220	A/G		-		AA	AG	GG		-			-	
					0	10.7	89.3						
233	T/G	TT	GT	GG		-			-			-	
		83.3	16.7	0									
323	A/G	AA	AG	GG		-			-			-	
		0	35.5	64.5									
371	G/A		-		GG	AG	AA		-		GG	AG	AA
					28.6	71.4	0				53.1	46.9	0
448	G/A		-		GG	AG	AA		-			-	
					57.1	33.3	9.5						
649	A/G		-		AA	AG	GG	AA	AG	GG	AA	AG	GG
					14.0	48.0	38.0	17.1	59.2	23.7	8.9	35.7	55.4
667	C/G		-		CC	CG	GG	CC	CG	GG	CC	CG	GG
					10.0	52.0	38.0	63.2	31.6	5.3	64.3	33.9	1.8
682	C/T		-		CC	CT	TT		-			-	
					54.0	38.0	8.0						
847	C/T	CC	CT	TT		-			-			-	
		82.5	17.5	0									

結果は**Table 3**のとおり，シャモではg.213（G/A），g.233（T/G），g.323（A/G），g.847（C/T）の計４カ所に多型が検出された。また，横斑プリマスロックではg.213（G/A），g.220（A/G），g.371（G/A），g.448（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G），g.682（C/T）の計７カ所，「はかた地どり」ではg.213（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G）の３カ所，「はかた一番どり」ではg.213（G/A），g.371（G/A），g.649（A/G），g.667（C/G）の４カ所に多型が検出された。

g.213は４鶏種に共通した遺伝子多型であり，「はかた地どり」と「はかた一番どり」で検出された遺伝子多型は横斑プリマスロックで検出された存在箇所と共通していた。「はかた地どり」の交配方法は（シャモ×横斑プリマスロック）×白色プリマスロック，「はかた一番どり」は（横斑プリマスロック×白色プリマスロック）×白色プリマスロックであり，いずれも横斑プリマスロックが交配されていることから，共通した遺伝子多型が検出されたと考えられた。

なお，本試験で取得できた塩基配列は前から1000塩基程度までであり，HSP70遺伝子の一部であるため，今後は未取得の塩基配列の遺伝子多型を調査したうえで，遺伝子多型と暑熱時の発育性との関連性を検討する必要がある。

４．要　約

「はかた地どり」および「はかた一番どり」において，コレシストキニンＡ受容体遺伝子（CCKAR）の一塩基多型（SNP；AB604331，

© The Ito Foundation

g.420　C＞A）と暑熱時における増体性との関連について調査した。体重，飼料要求率，生産指数では遺伝子多型による影響は認められなかった。また，シャモ，横斑プリマスロック，「はかた地どり」および「はかた一番どり」において，HSP70遺伝子の多型の存在箇所を調査した。シャモでは４カ所，横斑プリマスロックでは７カ所，「はかた地どり」では３カ所，「はかた一番どり」では４カ所に多型が存在することを明らかにした。

文　献

1） 力丸宗弘，武田尚人，大久保武，高橋大希，小松恵，高橋秀彰：比内鶏の発育形質関連QTL解明とその検証（第４報)―コレシストキニンA受容体遺伝子の一塩基多型は比内鶏の発育を改善する―，秋田畜試研報，**30**，21～29，2016.

2） Horinouchi, S., Nakayama, H., Takahashi, H.：Effect of a single nucleotide polymorphism in the cholecystokinin type A receptor gene on growth traits of the Miyazaki Jitokko chicken, *Journal of Poultry Science*, **56**, 96～100, 2019.

3） Ishikawa, S., Asano, M., Sakai, K., Takahashi, H.：Verification of the Effectiveness of an SNP Marker in the Cholecystokinin Type A Receptor gene for Improving Growth Traits in Okumino-kojidori Chickens, *Journal of Poultry Science*, **57**, 107～113, 2020.

4） Habib, H. N., Karomy, A. S., Gheni, Q. J., Saleh, W. M. H.：Molecular detected of heat shock protein70 gene in Layer hens (Lohmann breed), *Materials Science and Engineering*, 928, 2020.

5） Tamzil, M. H., Noor, R. R., Hardjosworo, P. S., Manalu, W., Sumantri, C.：Polymorphism of the heat shock protein gene in kampong, Arabic and commercial chickens, *Jurnal Veteriner*. **14**, 317～326, 2013.

6） Tamzil, M. H., Noor, R. R., Hardjosworo, P. S., Manalu, W., Sumantri, C.：Acute Heat Stress Responses of three lines of chickens with different heat shock protein (HSP)-70 genotypes, *Journal of poultry science*, **12**, 264～272, 2013.

7） 川江早矢香，三谷英嗣：遺伝子マーカーを利用した讃岐コーチンの改良，香川畜試報告，55，2020.

© The Ito Foundation

黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の客観的評価手法の開発（Ⅱ）

Research for objective evaluation of fororib conformation of Japanese Beef Cattle（Ⅱ）

鈴　木　洋　美

（(地独)北海道立総合研究機構畜産試験場）

Hiromi Suzuki

（Hokkaido Research Organization, Animal Research Center）

In this 2020 project, we clarified that there is a relationship between fororib angle（FA）and body condition score（BCS）, and there is genetic relationship between FA and chest width（CW）. This study investigated the correction method for the effect of BCS on FA and the genetic relationship with carcass traits of FA and CW, as well as when FA and CW early assessment is possible in calf. In Study 1, the FA was measured in 129 standard registration cows and the CW was measured in 64 cows, and the correlation with the examination results was analyzed. In addition, a model study for genetic evaluation was conducted on 1,809 animals, and the model considering BCS level was suitable. In Study 2, we estimated the genetic correlation between FA scaled at the livestock market and carcass traits on in 687 fattening cows, and found a negative relationship between carcass weight and rib thickness and marbling score. In Study 3, FA was measured over time up to 14 months of age in 9 calves and CW was measured up to 18 months of age in 21 calves, and a correlation analysis was performed for each month of age. It was suggested that 9 months of age is early possible period at FA and CW assessment. From the above results, it was suggested that FA and CW had a desirable relationship with the registry judgment score of Japanese black cattle. And that the FA and the carcass traits had a desirable relationship for genetic improvement, suggesting that selection based on the breeding value of the FA can be expected to improve both the registry judgment score and the carcass traits.

1．目　　的

黒毛和種では体型の評価の際に，牛体における肩甲骨後方部分と肋骨前方部分の部位は「肋付き」とされ，肋骨と背骨の付着の形状を推定するために観察される。肋骨がより開帳した形で背骨と結合していると体型的に望ましいとされている。また，日本食肉格付協会の「牛枝肉取引規格」における枝肉切開面も同部位であるため，肋付きは重要な部位といえる。しかしながら，同部位の評価は目視のみであるため要因の調査や分析が困難で，改良項目に加えることがこれまでできなかった。

本研究助成事業の令和２年度の調査において，

© The Ito Foundation

小型デジタル水準計を用いて肋付き角度が測定可能であることを示し，肋付き角度は栄養度の影響を含むものの，胸幅との間での遺伝的な関係が高いことを明らかにした[1)]。胸幅の測定は登録時の審査で省略されることが多いため，胸幅の遺伝評価や，胸幅との間での枝肉成績との関係等は調査されていない。そこで本研究では，肋付き角度における栄養度の影響の補正法を開発し，そのうえで育種価評価に向けて「肋付き角度と枝肉成績」および「胸幅と枝肉成績」との関係を調査した。また，肋付き角度および胸幅の早期評価が可能な時期を調査した。

2．方　法

2.1　肋付き角度の栄養度の補正方法の確立

本調査での栄養度の指標は，登録審査においては栄養度審査成績（9段階）[2)]，家畜市場調査においては簡易な栄養度の目安として栄養度指数（体重／体高比）を用いた。

調査1：前報と同様に肋付き角度を測定した。調査牛は，北海道内での基本・本原登録受審牛（127頭）とし，分散分析により肋付き角度の栄養度ごとの差を調査した。これらを栄養度審査4と5のもの（48頭）および6と7のもの（79頭）に区分し，肋付き角度と，体測値および牛体各部位の目視評価項目（均称や品位など）との関係について，相関分析を行った。解析は統計解析ソフトR version 4.0.3[3)] およびRStudio version 2022.12.0 Build 353（RStudio社）を用いて行った。

調査2：2019年9月から2022年11月にホクレン十勝地区家畜市場および南北海道家畜市場に出荷された黒毛和種子牛1,809頭（去勢：1,063頭，めす：746頭）において肋付き角度を測定し，airemlf90[4)] を用いて単形質アニマルモデルREML法により遺伝率を推定した。変量効果は個体の直接遺伝効果，繁殖農家（116水準），残差とした。母数効果は性別（2水準），出生年（5水準），測定日（41水準），日齢の肋付き角度に対する1次回帰とした。栄養度を考慮するため，栄養度指数の肋付き角度に対する1次回帰を含むモデル（モデル1）と含まないモデル（モデル2）の2通りとし，赤池情報量基準（AIC）によって比較した。

2.2　肋付き角度および胸幅における育種価評価法の確立

調査1：北海道内で2008年11月から2020年1月に基本・本原登録を受けた繁殖雌牛（1,086頭）の胸幅の記録と，この繁殖雌牛の産子である2012年から2022年にと畜された北海道産肥育牛（3,648頭）の枝肉成績6形質記録（枝肉重量，ロース芯面積，バラの厚さ，皮下脂肪の厚さ，歩留まり基準値，脂肪交雑基準値）を対象形質とした。変量効果として，個体の直接遺伝効果，繁殖農家（170水準），肥育農家（128水準），残差とした。母数効果として，胸幅に対して栄養度（5水準），登録年月日（290水準）とした。また，回帰効果として登録時月齢1次回帰，登録時月齢2次回帰，近交係数1次回帰とした。枝肉成績に対して母数効果は性別（2水準），と畜年（11水準），回帰効果はと畜時月齢2次回帰，近交係数1次回帰とした。

調査2：2019年9月から2022年11月にホクレン十勝地区家畜市場および南北海道家畜市場に出荷され，肋付き角度を測定した黒毛和種子牛のうち，と畜後の枝肉成績を持つものにおいて，肋付き角度または胸幅，および枝肉成績6形質を対象形質とした。変量効果は個体の直接遺伝効果，繁殖農家（肋付き角度），肥育農家（枝肉成績）とした。母数効果および回帰効果は肋付き角度に対して2.1のモデル1を用いた。

いずれの調査においても，パラメータの推定はPEST version 4.2.3[5)]，VCE-6 version 6.0.2[6)] を用

© The Ito Foundation

い，２形質アニマルモデルREML法により，肋付き角度または胸幅と枝肉成績との間での遺伝相関を推定した。

2.3　肋付き角度と胸幅の早期評価手法の確立

北海道立総合研究機構畜産試験場で2020年以降に出生した黒毛和種雌子牛９頭に対し，肋付き角度は出生時から14カ月齢程度に至るまで，胸幅は出生時から18カ月齢に至るまで経時的に測定し，月齢ごとにそれぞれの順位相関係数を求めるとともに，14カ月齢または18カ月齢と最も相関係数の高い月齢を調査した。

３．結果と考察

3.1　肋付き角度の栄養度の補正方法の確立

調査１：審査成績と肋付き角度および胸幅とのあいだで相関分析を行い，その結果を**Table 1** に示した。肋付き角度において，栄養度４と５では前駆との間で弱い負の関係が認められた。栄養度６と７ではどの細目においても傾向は認められなかった。全体で分析を行うと，体積，前駆，中駆，後躯，均称，総得点において弱い負の関係が認められた。このことから，肋付き角度は栄養度との関係はあるものの，登録審査では栄養度に関わらず肋付き角度の減少は審査得点の向上につながると考えられた。一方，胸幅はいずれの区分においても栄養度と比較的強い正の関係が認められた。また，体積，前駆，均称，総得点に加え，均称や品位などとも正の相関関係が認められた。胸幅は肋付き角度より強い栄養度との関係があるものの，胸幅の増加は審査成績の向上につながると考えられた。

調査２：分析に供した肋付き角度のデータの基本統計量と分析結果を**Table 2** に示した。モデル１はモデル２と比較するとAICが小さいことから，栄養度を考慮したモデル１が適していると考えられた。肋付き角度の遺伝率は0.38±0.09となり，令和２年度に推定した結果（0.32±0.10）[1)] と同様となりつつも標準誤差は低下した。

以上の結果から，登録審査においては肋付き角度の栄養度の補正は不要と考えられたが，育種価評価においては栄養度の影響を排除することで，より正確な評価が可能と考えられた。

Table 1　Correlations between forerib angle (°), chest width (cm) and records of judged body shape classified by body condition.

	Means	Month of age	BW/WH	body capacity	fore quarter	middle quarter	hind quarter	proportion	feet, hoof	impressi-vness	face	quality	dairy	final score
forerib angle at bcs 4-5 n＝48			−0.27	−0.23	−0.31 *	−0.17	−0.15	−0.27	−0.16	−0.13	0.11	−0.05	−0.1	−0.23
forerib angle at bcs 6-7 n＝79	25.0±7.5	18.6±3.7	−0.39 ***	−0.13	−0.16	−0.07	−0.05	0.00	0.07	0.02	0.06	0.09	−0.06	−0.05
forerib angle n＝127			−0.54 ***	−0.34 ***	−0.4 ***	−0.28 **	−0.28 **	−0.26 **	−0.05	−0.07	0.04	0.07	−0.08	−0.29 ***
chest width at bcs 4-5 n＝26			0.68 ***	0.64 ***	0.56 **	0.37	0.38	0.59 **	0.54	0.4 *	0.07	0.13	0.42	0.59 **
chest width at bcs 6-7 n＝36	44.5±4.4	18.8±4.2	0.91 ***	0.57 ***	0.75 ***	0.67 ***	0.66	0.55 ***	0.46	0.25	0.26	0.15	0.47	0.64 ***
chest width n＝62			0.88 ***	0.64 ***	0.75 ***	0.67 ***	0.67 **	0.6 ***	0.51 *	0.31 **	0.2	0.16	0.51 *	0.68 ***

BW/WH；The ratio of body weight / withers height as index of body condition.　　*** p＜0.001，** p＜0.01，* p＜0.05

© The Ito Foundation

Table 2 The comparison of Model 1 and Model 2.

Analytical model	n	Means, °	Day of age	Heritability	Ratio of farm variance	Residual variance	AIC	Pedigree
Model 1	1809	21.0 ± 7.4	289.7 ± 17.7	0.38 ± 0.09	0.10 ± 0.02	0.51 ± 0.08	11339	3,690
Model 2				0.27 ± 0.07	0.22 ± 0.03	0.50 ± 0.07	11631	

Table 3 Basic statistics of data set at research 1 and research 2.

Research	Cattle and traits	n	Means	Month of age	Pedigree	Carw, kg	REA, cm^2	RT,cm	SFT, cm	YE, %	BMS
2.2 research1	CW of standard registered female cattle, cm	1,086	47.5 ± 3.2	20.1 ± 2.8	8,305						
	Carcass traits of progeny	3,648		28.5 ± 1.8		500.7 ± 66.7	63.6 ± 14.9	8.2 ± 1.0	2.4 ± 0.7	73.3 ± 11.0	2.5 ± 1.0
2.2 research2	FA of calf at market, °	687	20.3 ± 7.6	288.5 ± 20.1 [1]	2,016						
	Carcass traits			28.4 ± 1.7		502.0 ± 57.8	67.7 ± 12.0	8.3 ± 0.9	2.4 ± 0.7	75.3 ± 1.8	2.5 ± 1.1

FA ; Forerib angle, CW ; Chest width, Carw ; Carcass weight, REA ; Rib eye erea, RT ; Rib thickness, SFT ; Subcutaneous fat thickness, YE ; Yielt estimate

1 Age of day

Table 4 Genetic correlation and phenotypic correlation between chest width of breeding females, forerib angle of calves and carcass traits.

	CW of Standard registerd female cattle		FA of calves at market	
	Genetic correlation	Phenotipic correlation	Genetic correlation	Phenotypic correlation
Carw	0.33 ± 0.72	0.04	− 0.46 ± 0.29	− 0.01
REA	0.94 ± 0.83	0.10	0.25 ± 0.35	− 0.04
RT	0.67 ± 0.73	0.08	− 0.57 ± 0.22	− 0.09
SFT	− 0.21 ± 0.85	− 0.02	− 0.31 ± 0.30	− 0.01
YE	0.31 ± 1.02	0.04	0.30 ± 0.35	− 0.06
BMS	0.97 ± 0.61	0.11	− 0.40 ± 0.26	− 0.08

3.2 肋付き角度および胸幅における育種価評価法の確立

本調査で分析に供したデータセットおよび基本統計量を**Table 3** にまとめた。

調査１：**Table 4** に，基本・本原登録時の繁殖雌牛の胸幅と，その産子である肥育牛の枝肉成績との間での遺伝相関を標準誤差とともに示した。いずれの形質も標準誤差が大きく示され，関係は明らかにならなかった。

調査２：**Table 4** に，家畜市場出荷時における肋付き角度および胸幅と枝肉成績との間での遺伝相関を標準誤差とともに示した。肋付き角度と枝肉重量，バラ厚および脂肪交雑基準値との間での遺伝相関係数は負の関係が認められた。このことから，肋付き角度とこれらの３形質は改良上望ましい関係にあると考えられた。しかし，ロース芯面積や皮下脂肪厚，歩留まり基準値においては標準誤差が大きく示された。さらに，市場出荷時に

© The Ito Foundation

Table 5　Correation coefficient of calf chest width between each age and 18mo, and calf forerib angle between each age and 14mo.

CW	n	0 mo	1 mo	3 mo	5 mo	9 mo	18mo
Spearman's　ρ	21	0.14	−0.08	0.01	−0.23	0.41	—
Means of cw,cm		14.8 ± 1.6	17.8 ± 2.2	22.7 ± 2.4	28.0 ± 3.0	35.0 ± 2.3	43.2 ± 2.4
FA	n	0 mo	1 mo	3 mo	5 mo	6 mo	7 mo
Spearman's　ρ	9	0.19	0.01	−0.08	0.33	0.59	0.06
Means of FA, °		20.7 ± 4.7	24.2 ± 8.0	28.5 ± 7.1	36.8 ± 5.8	38 ± 5.3	37.9 ± 4.5
FA	n	8 mo	9 mo	10mo	11mo	12mo	13mo
Spearman's　ρ	9	0.45	0.58	0.44	0.66*	0.61	0.41
Means of FA, °		33.1 ± 4.9	35.9 ± 4.9	31.4 ± 5.1	29.1 ± 4.5	28.8 ± 3.7	26.5 ± 5.7

Spearman's　ρ ; Spearman's rank correlation coefficient.　　* $p < 0.05$

mo ; Month after birth.

測定した胸幅と枝肉成績との間での遺伝相関を推定することができなかった。原因として調査頭数（528頭）の不足が考えられた。調査頭数を増加することで，標準誤差を低下させつつこれらの推定が可能となると考えられる。

3.3　牛の成長過程における肋付き角度の変動

Table 5 に，肋付き角度における各月齢と14カ月齢との間での，胸幅における各月齢と18カ月齢との間での順位相関係数を，および各測定値の平均値を月齢ごとに示した。肋付き角度の平均値は６カ月齢で最大となり，６カ月齢（$p < 0.1$）および９カ月齢（$p < 0.1$），11カ月齢（$p < 0.05$）と，14カ月齢との間で比較的高い負の関係が示唆された。胸幅は，５カ月齢と18カ月齢との間で負の関係，９カ月齢と18カ月齢との間で正の関係が示唆された。したがって，胸幅に比べ肋付き角度はやや早く，６カ月齢での評価が可能と考えられた。胸幅，肋付き角度両方において同時に評価が可能なのは９カ月齢程度と考えられた。

本調査の結果，肋付き角度および胸幅はいずれも審査成績の向上に寄与すると考えられた。肋付き角度は，審査標準において肉用種の特徴の項目である体積や前駆，中駆等に加え，いわゆる種牛性の項目である均称との間で弱い負の関係が認められた（**Table 1**）。また，胸幅は均称と品位との間で正の相関関係が認められた（**Table 1**）。これらの種牛性の項目は目視評価の影響が強く，改善や改良が困難とされてきた。肋付き角度および胸幅の両方を評価することでこれらの項目の改善につながり，登録審査や共進会での成績の向上に寄与できると考えられる。実際に，2022年８月10日に開催された第12回全国和牛能力共進会鹿児島大会に向けた北海道代表牛選抜会において，代表牛と非代表牛の肋付き角度の差を比較した（合計65頭）。審査委員は目視のみによって肋付きの良い牛を選抜した。その結果，代表牛は非代表牛に比べ肋付き角度は有意に小さい（$p < 0.05$）結果となった。このことから，審査委員の目視評価と肋付き角度の評価結果はおおむね近く，共進会において肋付き角度が評価指標として活用可能であることが明らかとなった。

肋付き角度と一部の枝肉成績との間での遺伝的な好ましい関係が示唆された（**Table 4**）。肋付き角度が小さいことは背幅の充実が見込まれることから枝肉の厚みにつながり，バラの厚さや枝肉の大きさに寄与すると推察される。背腰幅と，枝肉重量やバラの厚さとの遺伝相関は比較的高いとされている（それぞれ0.65，0.50）[7]。また，肋付き

© The Ito Foundation

角度と脂肪交雑基準値との間で遺伝的に負の関係が認められた（－0.40±0.26）。肋付き角度は栄養度との関係も強いことから，筋肉内脂肪の充実度との関係も推察される。これまで体型測定項目と脂肪交雑との遺伝相関はおおむね0.1を超えるものはなかった[7]。したがって肋付き角度は，脂肪交雑の改良を間接的に進めることが可能な，新たな評価項目としての活用が期待できる。

4．要　約

令和２年度本事業において，肋付き角度と栄養度との間で相関関係が，胸幅との間で遺伝的な関係があることを明らかにした。本研究では肋付き角度における栄養度の影響の補正法と，肋付き角度および胸幅の枝肉成績との遺伝的な関係を調査するとともに，早期評価が可能な時期を調査した。研究１では基本・本原登録受審牛129頭において肋付き角度，64頭において胸幅を測定し審査成績との関係を相関分析した結果，いずれの形質においても審査成績と望ましい関係が認められた。また，1,809頭で遺伝評価のためのモデル検討をした結果，栄養度を考慮したモデルが適していた。研究２では肥育牛687頭において家畜市場出荷時の肋付き角度と枝肉成績との遺伝相関を推定した結果，枝肉重量とバラの厚さおよび脂肪交雑基準値との間で負の関係が認められた。研究３では黒毛和種雌子牛９頭で肋付き角度を14カ月齢まで，21頭で胸幅を18カ月齢まで経時的に測定し，月齢ごとに相関分析した結果，同時に早期評価可能な時期は９カ月齢であると考えられた。以上の結果から，肋付き角度と胸幅は審査上と望ましい関係にあり，さらに肋付き角度と枝肉成績とは改良上望ましい関係が示唆されたことから，肋付き角度の育種価による選抜によって，審査成績および枝肉成績のいずれにおいても改良効果が期待できると考えられた。

文　献

1）　鈴木洋美：令和２年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**39**，133～138，2020.

2）　公益社団法人全国和牛登録協会，一般社団法人全国肉用牛振興基金協会：令和４年度地方審査委員認定講習会受講者研修会テキスト，29，公益社団法人全国和牛登録協会，2022.

3）　Douglas Bates, John Chambers, Peter Dalgaard, Robert Gentleman, Kurt Hornik, Ross Ihaka, Tomas Kalibera, Michael Lawrence, Friedrich Leisch, Uwe Ligges, Thomas Lumley, Martin Maechler, Martin Morgan, Paul Murrell, Martyn Plummer, Brian Ripley, Deepayan Sarkar, Duncan Temple Lang, Luke Tierney, Simon Urbanek：R Core Team（2020）: https://www.R-project.org/.

4）　Ignacy Misztal：Complex Models, More Data: Simpler Programming?, Interbull Bulletin 20, 33～42，1999.

5）　GROENEVELD, E：PEST User's manual. Institute of Animal Science press, Neustadt: http://docshare04. docshare. tips/files/24265/242659135, 2006.

6）　GROENEVELD, E., M. K OVAC, N. M IELENZ：VCE User's Guide and Reference Manual Version 6.0., 2010.

7）　公益社団法人全国和牛登録協会：これからの和牛の育種と改良改訂版，106，公益社団法人全国和牛登録協会，1997.

© The Ito Foundation

多機能尾部センサを用いた重種馬の分娩予知

Prediction of foaling in heavy horses using multifunctional tail sensors

滄木　孝弘[1]・吉岡　耕治[2]・檜垣　彰吾[3]

（[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，[2]麻布大学，
[3]国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構）

Takahiro Aoki[1], Koji Yoshioka[2] and Shogo Higaki[3]

（[1]Research Center for Global Agromedicine, Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, [2]Azabu University,
[3]National Institute of Animal Health, National Agriculture and Food Research Organization）

It is desirable to attend to the mare at the time of foaling in order to assist fetal delivery and prevent complications. The early detection of the onset of labor is an important issue for the equine industry. The purpose of this study was to examine the applicability of a sensor for foaling detection using the data of surface temperature (ST), activity intensity, roll angle (rotation about the y-axis) and y-axis (long axis of the tail) acceleration which were collected from a multimodal device attached to the ventral tail base of the mare. The data were collected every 3 minutes in 17 pregnant mares. Roll angle differences from the reference values and the mare's posture (standing or recumbent) confirmed by video were compared and associated. Cohen's kappa coefficient was 0.99 when the threshold was set as ± 0.3 radian in roll angle differences. This result clearly showed that the sensor data can accurately distinguish between standing and recumbent postures. The hourly sensor data with a lower ST (LST < 35.5℃), relatively higher activity, a recumbent posture determined by the roll angle, and tail-raising (TR, decline of 200 mg or more from the reference value in y-axis acceleration) was significantly higher during the last hour prepartum than 2–120 hours before parturition ($p < 0.01$). In conclusion, the sequential changes of ST and some behavioral parameters were identified using a multimodal device with a thermistor and tri-axial accelerometer attached to the ventral tail base during the last 5 days of pregnancy. In the future, by increasing the number of cases, we would like to proceed with more detailed perinatal behavioral analysis and try to develop the foaling prediction model.

1．目　　的

馬の妊娠期間は約11か月だが，個体差が大きく，320日から360日のばらつきがある[1, 2]。また，馬の分娩の80％以上が夜間に起こる[3, 4]。馬の分娩第２期（破水してから胎子が娩出されるまでの期間）は，他の家畜と比較して短く，平均15～20分で完了する。分娩第２期が40分を超えると，子馬の死亡率が上昇する[5]。さらに，馬の難産は，すべての分娩の最大10％程度で発生し，母子ともに致命的な状態に陥る危険性がある[6]。そのため，適切なタイミングで助産し，難産による合併症を

© The Ito Foundation

防ぐためには，管理者が分娩に立ち会うことが望ましい。しかし，長期にわたる夜間の分娩監視は長時間の労働を必要とし，馬の生産者にとって膨大な労働時間や経費がかかることになる。このため，分娩の予測や検知は，馬産業にとって重要な課題である。過去数十年にわたって，分娩の管理に必要な莫大な労働力を削減する目的で，分娩の時期を予測または検知するための多くの研究が行われてきたが，安全で，かつ確実な分娩予知方法は確立されていない。本研究の目的は，温度計と３軸加速度計を搭載した多機能尾部センサを妊娠馬の尾根部腹側に取り付け，分娩前後の体表温や行動の変化を明らかにし，分娩予知を目的としたセンサの有用性を検証することである。

２．方　　法

17頭の重種馬を研究の対象とした。平均年齢は7.1±2.9歳で17頭のうち14頭が経産馬，３頭が初産馬であった。センサを馬に装着してから分娩が完了するまでの間，馬の様子はウェブカメラで記録した。

本研究のすべてのプロトコルと研究方法は帯広畜産大学の動物実験委員会の承認を得ている（承認番号：20･220, 21-25）。

センサは，過去の研究[7]で開発された多機能尾部センサを使用した。馬の尾根腹側の皮膚にセンサの温度計が密着するように配置し，特注のシリコンベルトと面ファスナーを用いて装着した後，医療用伸縮テープを巻いて固定した（**Fig. 1**）。センサは出産予定日（最終交配から335日）から10.7±6.0日前に装着した。センサから取得したデータは３分間隔で自動的に受信機に送信され，３G/LTE経由でクラウドサーバーに保存された。体表温度（20～45℃，分解能0.05℃），活動量（0

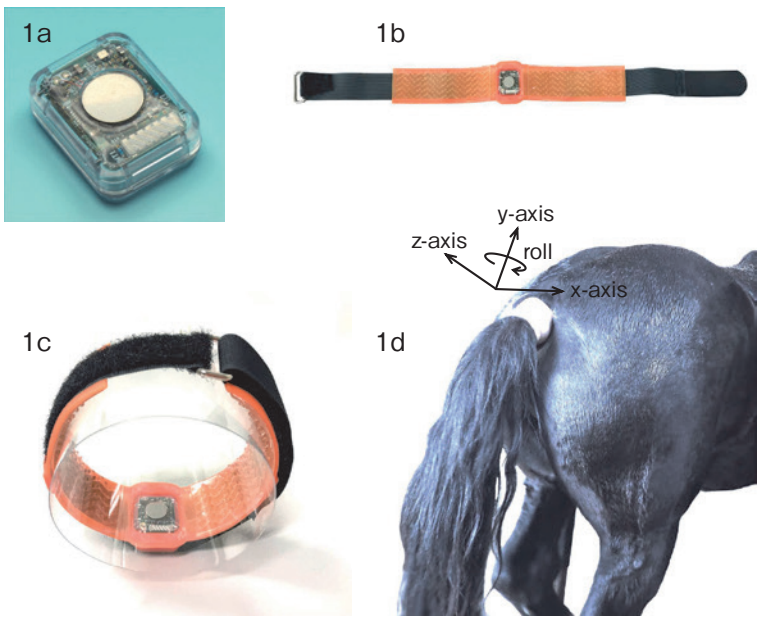

Fig. 1　The sensor (Fig. 1a) was fixed to the tail using a custom-made silicone rubber belt and a hook-and-loop fastener (Fig. 1b). Fig. 1c shows the sensor attached to a PET bottle shaped like a tail. The sensor attached to the tail was covered with an elastic medical bandage to stabilize its position (Fig. 1d).

© The Ito Foundation

～102.3，分解能0.2），Ｙ軸加速度（－1000～＋1000mg，分解能４mg），Y軸まわりのロール角（Ｙ軸に対するＸ軸とＺ軸の回転，－３～＋３radian，分解能0.05radian）を集計した。活動量およびロール角はHigakiらの方法[7]に従って算出した。活動量は３分間まったく動かない場合を０として数値が大きいほど３分間の活動量が多いことを意味する。Ｙ軸加速度は尾の上げ下げを表しており，それぞれの馬において記録開始後24時間のＹ軸加速度を基準値とし，基準値からマイナス方向への数的変化を挙尾の程度と定義した。Ｙ軸まわりのロール角は馬の体軸の傾きを表しており，記録開始後２時間の平均値を立位の基準値とした。センサ装着後に横臥を繰り返すなど，姿勢が安定しない馬では，ビデオで持続的な立位が確認された２時間の平均値を基準値とした。

ビデオで確認した馬の姿勢とロール角の変化を比較し立位と横臥位（伏臥位および側臥位）を識別するのに適した閾値を検証した。コーエンのカッパ係数を算出し，1.0に最も近い時の値を閾値とした。

１時間ごとのデータの分布をグラフ化し，分娩前１時間のデータ分布を分娩前２～120時間のデータ分布と比較した。カイ二乗検定を用い，ｐ値が0.05未満の場合に有意な差とみなした。

３．結果と考察

ビデオで確認した馬の姿勢とセンサで得られたロール角の関係を**Fig. 2**に示した。ビデオで確認した馬の姿勢を実測値，センサで得られたロール角の値を期待値として，コーエンのカッパ係数を算出した。立位と横臥位を判別するための閾値をロール角基準値±0.3radianとした場合，コーエンのカッパ係数は0.99となり，高い精度で立位と横臥位を判別できることが明らかとなった。この結果から，ロール角基準値から±0.3radian変化した場合，馬が立位から横臥位に姿勢を変化した（横臥した）と判断した。

分娩前120時間の体表温度，活動量，ロール角およびＹ軸加速度のデータ分布を**Fig. 3**に示した。体表温度を35.5℃未満，36℃未満，36.5℃未満，および36.5℃以上に分類した。35.5℃未満を示す

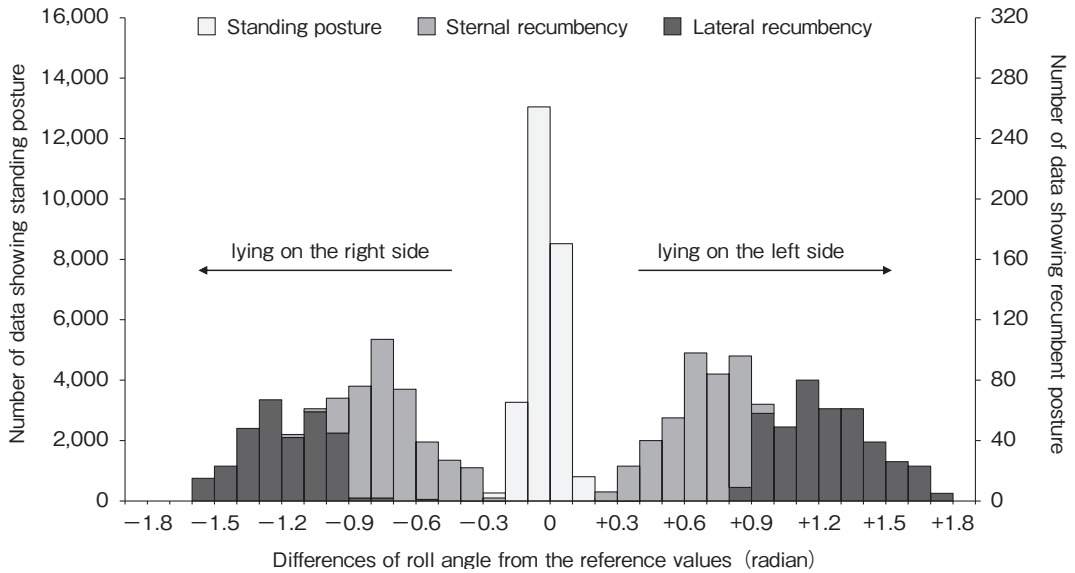

Fig. 2　The relationship between the mare's posture determined by the video and the roll angle data

© The Ito Foundation

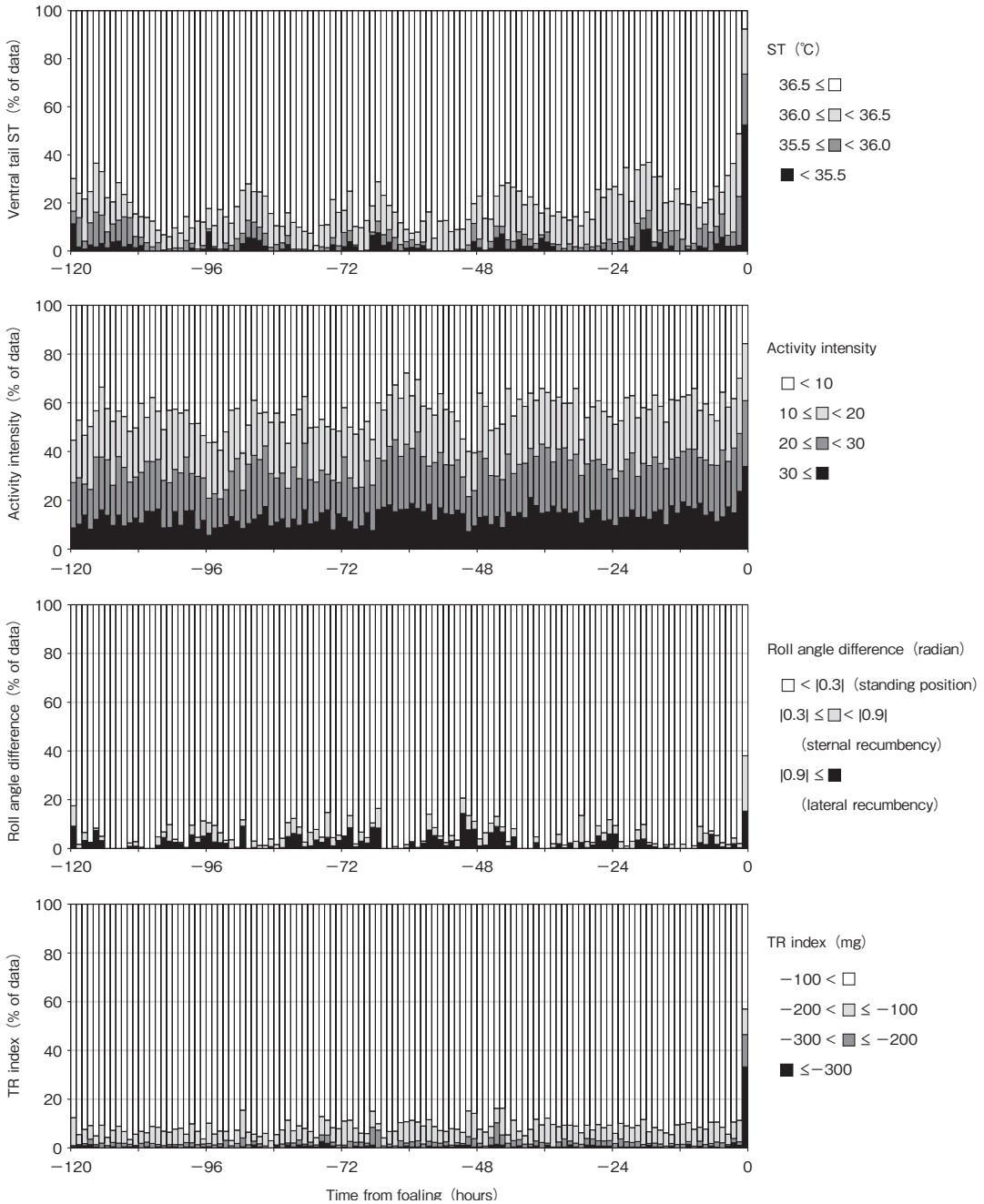

Fig. 3　Changes in ventral tail ST (surface temperature), activity intensity, lying duration, and TR (tail-raising) index for 120 hours before foaling. The data was classified by level in each parameter and shown as the occurrence rate per hour.

データの割合が，分娩前２～120時間において，毎時平均1.8％（中央値0.9％，最小値０％，最大値12.4％）であったのに対し，分娩前１時間では平均55.9％となり有意に増加した（$p < 0.05$）。馬の腹側部筋肉内に体温センサを埋め込み，分娩前後の深部体温を測定した過去の研究では分娩４時間前から深部体温の低下が始まり，分娩時に最低体温（36.6±0.2℃）を記録した[8]。本研究では，

© The Ito Foundation

分娩時の体表温度は平均33.1±1.0℃であった。体温の変化としては過去の研究と矛盾しない結果を得ることができた。しかし，体温低下の程度が大きいことから，分娩に伴う横臥行動や挙尾行動の増加に伴い，センサと皮膚の密着性が低下し，外気温によりセンサが冷却された可能性も示唆された。分娩前の体温の低下はプロジェステロン（Ｐ４）濃度の低下と関連していることが牛で報告されているが，馬では体温の低下とＰ４濃度の低下の相関関係は緩やかであり，分娩に伴う体温低下のメカニズムについてはいまだ明らかにされていない[9)]。本研究では，分娩直前でないにも関わらず35.5℃未満の体表温の低下が散見された。これらのポイントにおいて，長時間の横臥行動が確認されたことから，横臥姿勢が持続することによって尻尾が浮きあがり，センサと皮膚の密着性が低下することでセンサの冷却を招く可能性が考えられた。本研究で得られたセンサデータの変化を分娩予測や分娩検知に応用する際は，季節，地域あるいは気候などの環境条件がセンサデータに影響する可能性があることを考慮する必要があるだろう。

活動量を＞30（活動量が大きい），＞20，＞10，および10≧（ほとんど動いていない）に分類した。活動量＞30を示すデータの割合が，分娩前２～120時間において，毎時平均12.1％（中央値12.0％，最小値5.5％，最大値21.0％）であったのに対し，分娩前１時間では平均31.1％となり有意に増加した（ｐ＜0.05）。加速度計を用いて分娩前の活動量を評価した過去の研究では分娩１時間前に活動量の増加，さらに分娩前30分に急激な活動量の増加が報告されている[10)]。野生の馬やシマウマでは，分娩が近くなると群れから離れ，孤立を求める行動が観察されている[11)]。本研究で観察された分娩前１時間の活動量の増加は，分娩するために群れから離れようとするも，限られた飼養スペース（パドックや馬房）であるために群れから離れることができず，ストレスを感じた結果，落ち着きがなくなったのかもしれない。また，陣痛などの分娩に関連した身体的ストレスが活動量の増加に関与している可能性も考えられた。

ロール角の基準値からの変化を＞|0.3|radian（横臥位），および|0.3|radian≧（立位）に分類した。ロール角の変化量が＞|0.3|radian（横臥位）を示すデータの割合が，分娩前２～120時間において，毎時平均5.3％（中央値4.2％，最小値０％，最大値21.3％）であるのに対し，分娩前１時間では40.4％となり有意に増加した（ｐ＜0.05）。馬の分娩前の行動を観察した過去の研究では分娩前30分頃から横臥時間が増加することが報告されている[11)]。胎子を娩出するための娩出力を効率的に得るため，娩出時には横臥姿勢になると考えられる。実際，本研究では，すべての馬が娩出を終えた際，横臥位であった。また，陣痛による身体的な不快感から横臥を繰り返している可能性も考えられた。

Ｙ軸加速度の基準値からの変化を＜－200mg，＜－100mg，および－100mg≦に分類した。Ｙ軸加速度の変化量が－200mgよりも大きく変化した（尻尾を挙上する程度が大きい）データの割合が分娩前２～120時間において，毎時平均2.1％（中央値2.1％，最小値０％，最大値5.9％）であるのに対し，分娩前１時間では42.7％となり有意に増加した（ｐ＜0.05）。Ｙ軸加速度の基準値からの変化量は，３分間の挙尾の回数，挙尾の継続時間や挙尾の程度（角度）によって決まる。本研究の中で，＜－200mgを示すタイムポイントを映像記録で確認したところ，単純に尻尾を挙上する行動のほかに，排尿や排便，分娩時に羊膜や胎子によって尻尾が挙上されることが確認された。馬の分娩前の行動変化をビデオで解析した研究では，分娩前に挙尾の頻度が増加したことを報告してい

© The Ito Foundation

る[12]。本研究において分娩前１時間にＹ軸加速度の変化量が増加した原因は，単純な挙尾行動の増加のほかに胎子の娩出プロセスに伴う尻尾の挙上が含まれることが示唆された。

本研究では，多機能尾部センサで得られた体表温度，活動量，横臥行動および挙尾行動により，重種馬における分娩前の生理学的および行動学的な変化を明らかにした。今後は，臨床応用に向けて，症例数を増やすとともに，分娩の予測モデルの開発につなげていきたい。これにより，馬の分娩管理に費やされる膨大な労力を削減し，馬生産分野に大きく貢献できると考える。

４．要　約

馬の分娩事故を防ぐためには，出産に立ち会うことが望ましい。分娩の開始を早期に発見することは，馬産業にとって重要な課題である。この研究の目的は，妊娠馬の尾根部腹側に装着した多機能尾部センサを用いて，体表温度，活動量，ロール角（Ｙ軸周りの回転），およびＹ軸（尾の長軸）加速度のデータを収集し，分娩を検知するためのセンサの有用性を検証することである。データは17頭の妊娠牝馬から３分ごとに収集した。動画で確認した馬の姿勢（立位または伏横臥位）とロール角の変化を比較した。コーエンのカッパ係数は，閾値を±0.3radianに設定した場合，0.99となり，センサデータにより，立位と伏横臥位の姿勢を正確に区別できることが示された。低体表温（35.5℃未満），高い活動量，横臥行動，および尻尾を挙上する行動（Ｙ軸加速度で基準値から200mgよりも大きく低下）を示すセンサデータの割合を１時間ごとに集計したところ，分娩前２～120時間に比べて，分娩前の最後の１時間で有意に増加した。本研究の結果より，多機能尾部センサは分娩前の馬の生理学的および行動学的な変化の特徴を明らかにした。今後は，臨床応用に向けて，症例数を増やすとともに，分娩の予測モデルの開発につなげていきたい。これにより，馬の分娩管理に費やされる膨大な労力を削減し，馬生産分野に大きく貢献できると考える。

文　献

1） Rossdale, P. D.：*Equine Veterinary Journal*, **25**, ３～７, 1993.
2） Davies Morel, M. C., Newcombe, J. R., Holland, S. J.：*Animal Reproduction Science*, **74**, 175～185, 2002.
3） Rossdale, P. D., Short, R. V.：*Journal of reproduction and fertility*, **13**, 341～343, 1967.
4） Bain, A. M., Howey, W. P.：*Journal of reproduction and fertility*, Suppl, 545～546, 1975.
5） McCue, P. M., Ferris, R. A.：*Equine Veterinary Journal*, Suppl, 22～25, 2012.
6） Ginther, O. J., Williams, D.：*Journal of Equine Veterinary Science*, **16**, 159～164, 1996.
7） Higaki, S., Okada, H., Suzuki, C., Sakurai, R., Suda, T., Yoshioka, K.：*Computers and Electronics in Agriculture*, **191**, 106513, 2021.
8） Cross, D. T., Threlfall, W. R., Kline, R. C.：*Theriogenology*, **37**, 1041～1048, 1992.
9） Müller, A., Glüge, S., Vidondo, B., Wróbel, A., Ott, T., Sieme, H., Burger, D.：*Theriogenology*, **190**, 46～51, 2022.
10） Hartmann, C., Lidauer, L., Aurich, J., Aurich, C., Nagel, C.：*Reproduction in domestic animals*, **53**, 1279～1286, 2018.
11） Shaw, E. B., Houpt, K. A., Holmes, D. F.：*Equine Veterinary Journal*, **20**, 199～202, 1988.
12） Auclair-Ronzaud, J., Jousset, T., Dubois, C., Wimel, L., Jaffrézic, F., Chavatte-Palmer, P.：*Theriogenology*, **157**, 399～406, 2020.

© The Ito Foundation

哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響

Effects of nutritional environment during nursing period on reproductive function

髙 橋 秀 之
（九州大学農学部附属農場）

Hideyuki Takahashi
(Kuju Agricultural Research Center, Kyushu University)

The conception rate of Japanese Black cattle has been declining year by year. Follicle development and oocyte growth and maturation are essential for conception, and *in vivo* and *in vitro* research results have reported that changes in nutritional levels during the period from primordial follicle to mature follicle and ovulation can affect follicle development in the early stages. Since various nutritional metabolites and endocrine hormones are involved in follicle development, it is thought that changes in nutritional metabolites and endocrine hormone levels through nutritional management during the nursing period may improve reproductive function and contribute to improved fertility in Japanese Black cattle, but the details are unknown. Therefore, the objective of this study was to examine the effects of nutritional management during the nursing period on reproductive function by feeding octanoic acid, which increases ghrelin secretion. No differences in body weight and body size were observed between the two groups. Plasma glucose concentrations showed a significant increase in the octanoic acid group compared to the control group, while plasma insulin concentration did not differ between the two groups. There was no difference in plasma cholesterol concentration between the two groups. These results indicate that feeding octanoic acid during the nursing period may have altered nutrient allocation in the calves.

1．目　　的

黒毛和種牛の受胎率は年々低下している。受胎するためには卵胞発育や卵子成長成熟が必須である。*in vivo*や*in vitro*の研究成果から，原始卵胞が成熟卵胞となり排卵に至るまでの期間，栄養水準の変化は初期段階の卵胞発育に影響を与えることが報告されている[1)]。これらの報告から受胎率に影響する卵胞発育は哺乳期の栄養環境に影響を受けると考えられるが明らかとなっていない。卵胞発育にはさまざまな栄養代謝産物や内分泌ホルモンが関与している。

肝臓により合成されるコレステロールはウシ卵胞発育に必須の重要な栄養素であり，卵胞液中のコレステロール濃度の違いは良好胚率および妊娠率に影響を与える[2)]。加えて，卵胞発育過程ではグルコースが利用される[3)]。これらの代謝産物に加え，種々のホルモンも卵胞発育に関与し，成長

© The Ito Foundation

ホルモン（GH）は，その作用により脂肪分解が亢進され脂肪分解産物のケトン体が卵胞に供給される。また，インスリン様成長因子-1(IGF-1)やインスリンは卵胞発育・成熟・排卵に重要なホルモンであり，これらのホルモンの濃度や作用は栄養状態により変化する。したがって，哺乳期の栄養管理によりGH・IGF-1・インスリン濃度を増加させることで繁殖機能が向上し，黒毛和種牛の受胎率向上に寄与すると考えられるが詳細は不明である。脂質代謝や糖代謝ならびにGHやインスリン分泌を亢進するホルモンとしてグレリンがあげられる。グレリンはN末端から３番目のセリン残基にオクタン酸が修飾されており，このオクタン酸修飾がグレリンの生理活性発現に必須である[4)]。また，オクタン酸給与は活性型グレリンを増加させる[4)]ことから，哺乳期へのオクタン酸給与は代謝産物や内分泌ホルモンを増加させることで卵胞発育に寄与すると考えられるが明らかとなっていない。そこで本研究では，グレリン分泌を増加させるオクタン酸を哺乳期に給与し，哺乳期の栄養管理が繁殖機能に与える影響を検討することを目的とした。

2．方　法

本研究は「九州大学大学院農学研究院，大学院生物資源環境科学府および農学部における動物実験指針に関する基準」の規則に基づいて実施した。

2.1　供試動物と飼養管理

黒毛和種繁殖メス子牛８頭を供試し，生後０日齢から３日齢まで母牛の下で飼育し，自然哺乳させた。３日齢で母子分離を行い，対照区（n＝４，生時体重＝34.1±1.7kg）とオクタン酸区（n＝４，生時体重＝33.3±1.1kg）の処理区に無作為に割り当てた。子牛は，両処理区ともに市販の代用乳を最大７l給与し90日齢まで給与した。代用乳濃度は200g/lであった。オクタン酸区には，代用乳100g当たり1.5gのオクタン酸を代用乳に混合して給与した。代用乳摂取量は，毎日個体ごとに記録した。90日齢で離乳するまでは，市販のスターターおよびイタリアンライグラス主体の自家製乾草を自由摂取させた。離乳後は，市販の配合飼料を給与し，乾草を飽食とした。スターターおよび配合飼料は，１日２回９：00および16：00に給与した。飼料の残は朝の給飼前に回収し計量した。水および鉱塩®は試験期間を通して自由摂取させた。

2.2　サンプリング

体重および体格（体高，体長，胸囲および胴囲）測定は生後４，30，60，90，120，150，180日齢に実施した。０日齢では，体重測定のみ行った。

採血は21ゲージの採血針およびヘパリン入りの真空採血管を用いて，生後４，30，60，120，150，180日齢において，朝の給飼前（８：30）および給飼３時間後（12：00）に実施した。採取した血液はただちに氷上静置し，採取後１時間以内に，あらかじめヘパリンナトリウムを血液１ml当たり10IU，アプロチニンを血液１ml当たり100KIUを添加しておいた50mlチューブに血液をデカントで分注し，2,330×g，４℃，20分の条件下で遠心分離した。遠心分離により得られた血漿サンプルは，1.5mlチューブに１mlずつ1000μlピペットで分注し解析まで－80℃で保存した。IGF-1解析用サンプルは，あらかじめ１mlの酢酸バッファーを添加しておいた15mlチューブに血漿１mlを加え，ボルテックスで混合後，抽出まで－80℃で凍結保存した。また，90日齢では経時的採血を行った。経時的採血の前日の12：00から絶食させて，16：00に頸動脈カテーテルを装着した。翌日の11：00（－60分）より10分おきに採血を行い，０分の採血が終わった直後（12：00）に，代用乳を400g給与した。代用乳給与後２時間は，10分おきに10mlずつ採血を行った。採取

© The Ito Foundation

した血液は，100IUのヘパリンナトリウム1,000KIUのアプロチニンが添加された採血管に移し，氷上静置した。その後は，経日採血と同様に2,330×g，４℃，20分の条件下で遠心分離し，血漿サンプルは1.5mlチューブまたはあらかじめ１mlの酢酸バッファーを添加しておいた15mlチューブに分注し，－80℃で凍結保存した。

2.3　血漿成分解析

血漿GH・IGF-1およびインスリン濃度は，時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA）を用いて解析した。血漿コレステロール，遊離脂肪酸（NEFA）およびグルコース濃度は，それぞれコレステロールオキシダーゼ・3,5-ジメトキシ-N-エチル-N-(2-ハイドロキシ-3-スルホプロピル）-アニリンナトリウム（DAOS）法，アシルCoAシンセターゼ（ACS）・アシル-CoAオキシダーゼ（ACOD）法，ムターゼ・グルコースオキシダーゼ（GOD）法を用いた市販のキット（コレステロールE-テストワコー，NEFA C-テストワコー，グルコースCⅡ-テストワコー，富士フイルム和光純薬会社，大阪）を用いて測定を行った。

2.4　統計解析

血漿ホルモン・代謝産物濃度は，JMP®14 Pro（SAS Institute Inc., 東京）を用い，下記のモデルに当てはめて解析した。

$$Y_{ijk} = \mu + Treatment_i + Time_j + Calf(Treatment)_{k(i)} + Treatment \times Time_{ij} + e_{ijk}$$

Y_{ijk}は独立変数，μは全体平均，$Treatment_i$は処理の固定効果，$Time_j$は反復測定として用いた時間の固定効果，$Treatment \times Time_{ij}$は処理と時間の交互作用，$Calf(Treatment)_{k(i)}$は処理区で枝分かれさせた個体の変量効果，ならびに$e_{ijk}$は誤差を示している。単純主効果検定は処理と時間の交互作用が見られた場合に，同一の時間で処理区間の差異を明らかにするために行った。

3．結果と考察

オクタン酸は中鎖脂肪酸の１種であり，小腸にて速やかに吸収され子牛の栄養源として重要な脂肪酸である。したがって，オクタン酸は栄養素として利用はされていると考えられるが，体重および体格は両区の間に差は認められなかった。このことは，栄養の分配が筋肉や脂肪へは行かず，別の組織にて利用された可能性を示唆する。つまり，哺乳期のオクタン酸給与により子牛の栄養分配が変化した可能性がある。

経日的な採血において，血漿グルコース濃度は，採食前後で両区の間に差はなかった。しかしながら，変化率においては，オクタン酸区の採食後では120日齢で有意に高い値を示し（$p < 0.05$），試験期間を通して交互作用が見られた（$p < 0.01$）。末梢組織への血漿グルコース取り込みに関与する血漿インスリン濃度は両区の間に差は認められなかった。一方で，経時採血における血漿グルコース濃度では，オクタン酸区は対照区と比較し，代用乳給与後110分と120分で有意な増加が認められた（$p < 0.05$）が，血漿インスリン濃度は両区の間に差は認められなかった。代用乳には長鎖脂肪酸が含まれており，長鎖脂肪酸は肝臓によりトリアシルグリセロールに合成され，肝臓や脂肪組織において，体脂肪として蓄積される。一方で，オクタン酸は小腸にて速やかに吸収され，オクタン酸は筋たんぱく質分解を抑制し脂肪分解を促進しエネルギー産生を促す[5)]。したがって，オクタン酸区においては子牛の栄養状態が良好であったと考えられる。その結果として，ATP産生に利用されるグルコースの消費が抑えられたため，経時採血時の代用乳哺乳後に血漿グルコース濃度の増加が認められたと考えられる。

負のエネルギー状態では血漿グルコース濃度が低下し，卵胞刺激ホルモン（FSH）に対する卵胞

© The Ito Foundation

の反応性が減少する。その結果，卵胞発育が遅延する[6]。したがって，哺乳期へのオクタン酸給与は栄養状態を改善することで卵胞発育を促す可能性が示された。また，卵胞における糖取り込みは，主に非インスリン感受性糖輸送単体であるグルコーストランスポーター１（GLUT1）により行われる[7]。経日的な採血の結果と経時採血の結果から，オクタン酸給与によって代用乳給与後の血漿グルコース濃度は増加し，その増加が基礎値に戻るまでの時間はオクタン酸区で長くなる可能性がある。つまり，血漿グルコース濃度の消失速度が遅延することが推察される。このことは，GLUT1による長期的なグルコース取り込みが可能になることを意味し，卵胞へのグルコース供給が長期的に持続する可能性が示された。

経日的な血漿コレステロール濃度は採食前後で両区間の間に差は認められなかった。血漿コレステロールに関しては，変化率においても両区間に差は見られなかった。経時採血における血漿コレステロール濃度は実測値および変化率ともに両区の間に差は認められなかった。これまでの研究より，繁殖メス牛へのオクタン酸給与は血漿コレステロール濃度を増加させることを明らかにしている（未発表）が，子牛へのオクタン酸給与は，血漿コレステロール濃度に影響を与えなかった。栄養状態が良好な場合，血漿コレステロール濃度は増加する。血漿グルコースの結果から，子牛の栄養状態は良好であった可能性があるが，血漿コレステロール濃度は差がなかった。変化がなかった要因は不明だが，コレステロールは卵胞に取り込まれた場合，卵胞液中のコレステロール濃度は増加する。したがって，今後，卵胞液中のコレステロール濃度を測定することで，オクタン酸給与が卵胞発育に与える影響を詳細に検討する必要がある。

血漿NEFAおよびIGF-1濃度は両区の間に差はなかった。このことから，脂肪酸代謝やたんぱく質代謝に変化はなかったことが示唆された。

4．要　約

黒毛和種牛の受胎率は年々低下している。受胎するためには卵胞発育や卵子成長・成熟が必須である。*in vivo*や*in vitro*の研究成果から，原始卵胞が成熟卵胞となり排卵に至るまでの期間，栄養水準の変化は初期段階の卵胞発育に影響を与えることが報告されている。卵胞発育にはさまざまな栄養代謝産物や内分泌ホルモンが関与していることから，哺乳期の栄養管理により栄養代謝産物や内分泌ホルモン濃度を変化させることで繁殖機能が向上し，黒毛和種牛の受胎率向上に寄与すると考えられるが詳細は不明である。そこで本研究では，グレリン分泌を増加させるオクタン酸を哺乳期に給与し，哺乳期の栄養管理が繁殖機能に与える影響を検討することを目的とした。体重および体格は両区の間に差は認められなかった。血漿グルコース濃度では，オクタン酸区は対照区と比較し，有意な増加が認められたが，血漿インスリン濃度は両区の間に差は認められなかった。血漿コレステロール濃度は両区の間に差は認められなかった。これらの結果から，哺乳期のオクタン酸給与により子牛の栄養分配が変化した可能性が示された。

文　献

1）菅原七郎：畜産の研究，64巻，293～298，2010.
2）Petterson, A. J., Slepetis, R., Ehrhardt, A. R., Dunshea, R. F., Bell, W. A.：*The Journal of Nutrition*, **124**, 2431～2436, 1994.
3）Nishimoto, N., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Azuma, J., Kishimoto, T.：*Modern Rheumatology*, **19**, 12～19, 2009.
4）Kojima, M., Hosoda, H., Date, Y., Nakazono, M., Matsuo, H., Kangawa, K.：*Nature*, **402**, 656～660, 1999.
5）Asker, E. J.：*Annals of The New York Academy of Science*, **967**, 217～235, 2002.
6）Butler, R. W.：*livestock Production Science*, **53**, 211～218, 2003.

© The Ito Foundation

7） Ostrowska, M., Jarczak, J., Zwierzchowski, L.：*Animal Science Papers and Reports*, **33**, 191–212, 2015.

© 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（Ⅱ）

Elucidation of mechanisms for silent heat from luteal regression in Japanese Black Cows (II)

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) affects the functions of various reproductive organs, including the corpus luteum (CL). Recently, HS was suggested to inhibit apoptosis of luteal steroidogenic cells (LSCs) which contributes luteolysis in beef cattle. Although HS may inhibit apoptosis via intracellular heat shock protein (HSP) 70, the details are unclear. Therefore, in the present study, we investigated the effects of HSP70 on the mechanisms of apoptosis by using pifithrin-μ (PFT), an inhibitor of HSP70, 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℃ (representing HS conditions) in 5 % CO_2 for 6 h. Thereafter, LSCs were treated at 38.5℃ for 12 or 48 h with cytokines (tumor necrosis factor-alpha：2.3 nM, interferon gamma：2.5 nM, and Fas ligand：5.6 nM), which were known as stimulators of apoptosis and luteal regression in bovine CL, and/or PFT (20 μM). We then investigated the viability, mRNA-level expression of apoptosis-related factors (*CASP8*, *CASP3*, *BAX* and *BCL2*) in LSCs. HS downregulated cytokines-induced cell death. However, there was no significant difference between 38.5℃ and 40℃ in LSCs which were cultured with PFT + cytokines. Furthermore, although PFT decreased cell viability, PFT tended to decrease cytokines-induced *CASP3* and *CASP8* mRNA expression in LSCs. There was no significant difference in *BAX* and *BCL2* mRNA expression in any treatments. Overall, these results suggest that heat stress suppresses apoptosis via HSP70 in bovine LSCs, and that PFT may be involved in cell death via CASPs-independent pathway.

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による授精頭数の低下が，直接肉用牛における繁殖効率の低下につなが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）。夏季に多発する不明瞭な発情ではこの黄体退行が緩慢となっていることが報告されている。黄体退行には黄体を構成する黄体ステロイド合成細胞（以下，黄体細胞）のアポトーシスが重要な役割を果たすことが知られており，暑熱ストレスによって増加するタンパク質であるヒートショックプロテイン（HSP）70はある種の細胞でアポトーシスを阻害することが知られている[2)]。これまでの研究によって，ウシ黄体細胞を高温環境で培養すると細胞内のアポトーシス誘導因子の発現が抑制され，アポトーシスが阻害されることが示唆されたが[3)]，HSP70が関連しているかを含めた詳細なメカニズムは不明である。HSP70の活性阻害剤を用いて，高温環境が黄体細胞のアポトーシスに及ぼす影響について検証した。

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環流法により[4)]，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，HSP70の活性阻害剤であるpifithrin-μ（PFT：20 μM）を単独またはアポトーシスを刺激するための腫瘍壊死因子（TNF：2.3nM），インターフェロン γ（IFNG：2.5nM）ならびにFas ligand（FASL：5.6nM）と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

細胞生存率に及ぼすPFT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，Cytokines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[5)]。

2.3　遺伝子解析

高温条件で培養した細胞にPFTを単独またはCytokinesと組み合わせて添加し12時間培養後，total RNAを回収し，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

Cytokines区において38.5℃培養区と比較し，40℃培養では細胞生存率が有意に高い値を示したが，PFT μ＋Cytokines区では培養温度間で細胞生存率に有意な差はなかった（**Fig. 1**）。これまでの研究において，ウシ黄体細胞を40℃，６時間で培養することでHSP70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

© The Ito Foundation

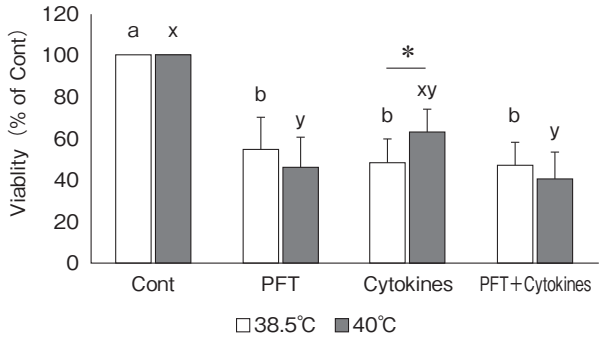

Fig. 1 Effects of heat stress and pifithrin-μ (PFT) on viability in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without TNF (2.5nM) + IFNG (2.3nM) + FASL (5.6nM) and/or PFT (20 μM) under 38.5 or 40℃ for 48h. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Tukey correction, and asterisk indicates significant difference between 38.5℃ and 40℃, as determined by a paired t-test.

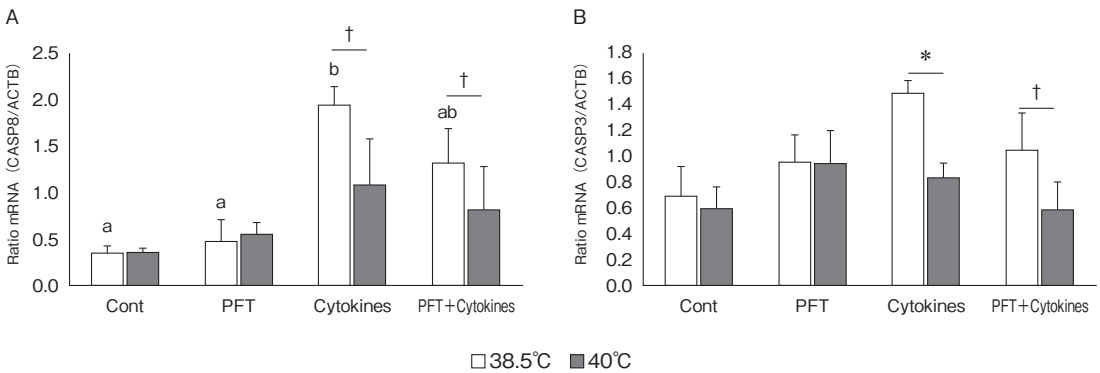

Fig. 2 Effects of heat stress and PFT on expression of *CASP8* (A), *CASP3* (B) mRNA in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without TNF + IFNG + FASL and/or PFT under 38.5 or 40 ℃ for 12h. The amount of each mRNA is expressed relative to the amount of *ACTB*. Different letters indicate significant difference ($p < 0.05$), as determined by ANOVA followed by a multiple comparison with Tukey correction. Asterisk and dagger indicate significant difference ($p < 0.05$) and significant trend ($p < 0.1$) between 38.5℃ and 40℃, respectively, as determined by a paired t-test.

いる。本研究の結果は過去に行った研究結果[3]やHSP70がラットの細胞においてアポトーシスを阻害するという報告とも一致しており[2]，ウシ黄体細胞において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強く示唆された。また，38.5℃培養区において，PFT区においてcontrol区と比較し低い値となったことから，PFTはウシ黄体細胞において単独で細胞死を誘導する可能性が示された。

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，Cytokines区およびPFT＋Cytokines区において高温環境下では*CASP8* mRNA発現を抑制する傾向を示した（$p<0.1$：**Fig. 2A**）。過去の研究によってCASPs依存的なアポトーシス誘導経路においてHSP70はCASP８よりも下流の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いるが[6]，本研究の結果はHSP70がCASP８に直接またはCASP８よりも上流に作用する可能性を示している。CASP８よりも上流へのHSP70の影響については今後さらなる検討を予定している。

Cytokines区では40℃培養において38.5℃での

© The Ito Foundation

培養と比較し*CASP3* mRNA発現が有意に低い値となったが（p＜0.05），PFT＋Cytokines区では40℃と比較し38.5℃で*CASP3* mRNA発現は低い傾向はあるものの有意な差はなかった（p＜0.1：**Fig. 2B**）。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，高温環境下の暑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おり，過去の報告とも一致している[2]。一方で，細胞生存率は，PFTによって低下したことから（**Fig. 1**），*CASP8*および*CASP3* mRNAの発現はPFT区において増加すると予想されたが，これらの遺伝子発現にcontrol区とPFT区の間で有意な差はなかった（**Fig. 2A, B**）。このことはPFTがCASP非依存的な経路を介して細胞死を誘導することを示唆している。近年，ウシ黄体細胞においてCASP非依存的な細胞死が起こることが報告されており[5, 7]，PFTによる細胞生存率の低下はこれらの細胞死によるのかもしれない。申請者らは，すでにCASP非依存的な細胞死に関わる因子の発現に及ぼすHSP70ならびにPFTの影響について検討を開始している。

CASP依存的な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[8]である*BAX*ならびに*BCL2* mRNA発現はいずれの区においても有意な差はなかった（**Fig. 3**）。これらの因子はタンパク質として細胞内で作用することから，タンパク質の発現を検証する必要があるが，現時点ではタンパク質の発現解析には至っておらず，今後検証する必要がある。

本研究の結果より，ウシ黄体細胞においてcytokinesによって刺激される*CASP3*および*CASP8* mRNA発現を高温環境下での培養が抑制し，アポトーシスを阻害する現象は，高温環境によって発現が増加したHSP70を介して起こることが示唆された。このことから，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可能性が示された。また，HSP70の活性阻害剤であるPFTはCASP非依存的な経路を介して細胞死を誘導することが示唆された。今後はPFTが単独で誘導する細胞死についてさらに検証し，黄体退行メカニズムの詳細を解明することで鈍性発情の対策・治療法の開発の一助となることが期待される。

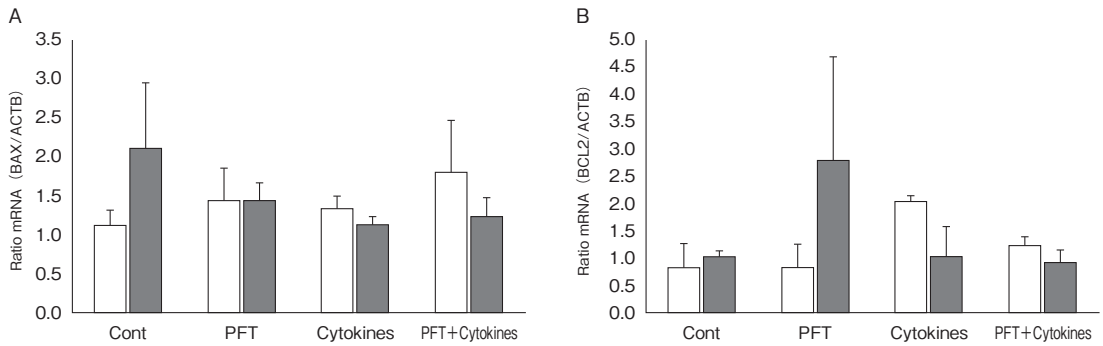

Fig. 3　Effects of heat stress and PFT on expression of *BAX*（A）and *BCL2*（B）mRNA in bovine luteal cells. The cells were cultured in the medium with or without TNF ＋ IFNG ＋ FASL and/or PFT under 38.5 or 40℃ for 12h. The amount of each mRNA is expressed relative to the amount of *ACTB*.

© The Ito Foundation

4．要　約

高温環境での暑熱ストレスが，黄体退行の主な要因である黄体ステロイド合成細胞（LSCs）のアポトーシスを阻害し，不明瞭な発情の一因となることが示唆されている。暑熱ストレスは細胞内のHeat shock protein（HSP）70を介してアポトーシスを阻害すると考えられるが詳細は不明である。本研究はHSP70の阻害剤であるpifithrin-μ（PFT）を用いて，暑熱ストレスがLSCsのアポトーシス誘導機構へ及ぼす影響について検証した。ウシ開花期黄体よりLSCsを単離し，通常（38.5℃）または高温環境（40℃）で6時間前培養した。前培養終了後，PFT（20 μM）を単独またはアポトーシスを誘導するcytokines（腫瘍壊死因子：2.3nM，インターフェロンγ：2.5nMおよびFas ligand：5.6nM）と組み合わせて添加し，38.5℃で培養した。48時間培養後の細胞生存率ならびに12時間培養後のアポトーシス関連因子遺伝子（*CASP3*，*CASP8*，*BAX*ならびに*BCL2*）発現を調べた。Cytokines区において高温環境が生存率を有意に向上させたが（$p<0.05$），PFT＋Cytokines区では温度間で生存率に差はなかった。38.5℃区においてPFTはサイトカインが刺激した*CASP8* mRNA発現を抑制する傾向を示した（$p<0.1$）。Cytokines区において高温培養によって*CASP3* mRNA発現が有意に低下したが（$p<0.05$），PFT区およびPFT＋Cytokines区では温度間で*CASP3* mRNA発現に有意な差はなかった。いずれの区においても*BAX*と*BCL2* mRNA発現に有意な差はなかった。以上の結果より，ウシLSCsにおいて暑熱ストレスはHSP70を介してアポトーシスを抑制することが示唆された。また，ウシLSCsにおいてPFTは，単独で細胞死を誘導し細胞率を低下させたが，サイトカインによって刺激されるCASPs発現も抑制する傾向が見られたことから，PFTはCASP非依存的な経路で細胞死に関与する可能性が示された。

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） 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.
3） 法上拓生，堀畑慶：令和3年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**40**，165～170，2022.
4） Okuda, K., Miyamoto, A., Sauerwein, H., Schweigert, F. J., Schams, D.：*Biol Reprod*, **46**, 1001～1006，1992.
5） Hojo, T., Siemieniuch, M. J., Lukasik, K., Piotrowska-Tomala, K. K., Jonczyk, A. W., Okuda, K., Skarzynski, D. J.：*Sci Rep*，**6**，38211，2016.
6） Cohen, G. M.：*Biochem J*，**326**，1，1997.
7） Aboelenain, M., Kawahara, M., Balboula, A. Z., Montasser, Ael-M., Zaabel, S. M., Okuda, K., Takahashi, M.：*J Reprod Dev*, **61**, 229～236，2015.
8） Antonsson, B.：*Cell Tissue Res*, **306**, 347～361，2001.

© 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（Ⅲ）

Identification of a molecular marker for the uterine involution to affirm the female fertility（Ⅲ）

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, our purpose 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*）and mucin 16（*MUC16*）. IGF1 function was evaluated by evaluating cell proliferation after treatment of endometrial epithelial cells with IGF1 protein. Concentration of IGF1 in cervicovaginal mucus（CVM）was determined by ELISA assay, for indirect evaluation of IGF1 expression reflecting a uterine involution. The results showed that the expression of *IGF1* was high at involution and decreased after recovery. IGF1 promoted the endometrial epithelial cell proliferation. IGF1 concentrations in CVM were not altered before and after involution. Those results suggest IGF1 plays a role in uterine involution. However, the methods utilizing the IGF1 concentration in CVM as a marker to evaluate uterine involution cannot work to date. On the other hands, other potential candidate, *MUC16* expression was also high after calving and decreased gradually along with uterine involution. Therefore, MUC16 might be a next target for a molecular marker for uterine involution and fertility.

1．目　　的

肉用牛・酪農経営において分娩間隔の延長は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。家畜改良事業団の牛群検定調査によると，令和元年度の乳用牛空胎日数は最頻値80日であるが平均値は160日となっており，一部の牛が平均値を間延びさせている。乳用牛の初産牛において，分娩後初回人工授精日数は最頻値70日（平均値89日）であり，経産牛や肉用種にお

© The Ito Foundation

いても同様な状況であると考えられ，初回人工授精は分娩後早期に実施されている。このことから，分娩間隔を短縮させるには一度の交配では受胎せずに複数回交配が必要な牛を検出・対処する必要がある。受胎不成立や早期胚死滅にはさまざまな原因が考えられるが，同じロットの精液を用いた人工授精や良質な受精卵の移植においても受胎牛と不受胎牛の両方が発生することから，母体側要因の特定も重要である。特に子宮は，前回分娩による損傷から回復（子宮修復）していなければ胚の発育が損なわれるため受胎不成立に陥る。現在，子宮修復の判断には超音波診断を併用した直腸検査が用いられるが，この方法では悪露の排出や子宮の形状を評価することはできても子宮内膜の機能評価ひいては受胎性までは判断できない。そこで繁殖処置の実施判断や淘汰牛の選定を行うために，子宮内膜や腟粘液の分子的性状（タンパク質の挙動）をマーカーとして活用し，受胎性を加味した子宮修復状態を評価することを本研究の目的とした。

これまでに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。その結果，細胞増殖等に働くインスリン様成長因子（IGF1）の子宮内膜上皮細胞における発現が子宮修復時にのみ高く，子宮修復完了に伴い減少することを明らかにしてきた（**Fig. 1 A**および**B**）。本年は，IGF1の子宮修復への機能を明らかにするために，培養子宮内膜上皮細胞をIGF1タンパク質で処理し，細胞増殖を解析した。また，コロナウイルス抗原検査キットのような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。IGF1は液性因子として体液や粘液中に分泌され，子宮粘液は腟内に漏出することから，子宮修復前後の腟粘液を採取しIGF1のタンパク量を測定することで子宮内膜の状態を評価可能か検討した。

また，IGF1以外の候補因子も引き続き検索する必要がある。保水や微生物に対する保護のために細胞表面を覆う糖タンパク質ムチンの一つMUC１は細胞表面の立体構造から胚の子宮内膜への着床にも関与すると考えられている。我々は，子宮内膜上皮細胞におけるMUC１の発現が長期空胎牛で高くなることを明らかにし，性ホルモンによる発現制御機構とともに発表した[1)]。同じくムチンメンバーに属するMUC16は，その低発現が妊娠早期診断の指標とされる報告があり[2)]，今回我々はMUC16について子宮修復および受胎性のマーカーとなり得るか解析を行った。

２．方　　法

2.1　供試牛

本研究は国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構が設置する動物実験委員会の承認を得て実施した。

子宮内膜炎や乳房炎等の外的要因が少ない黒毛和種牛を供試した。分娩後自然哺乳中の母牛計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。分娩予定日約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），自由飲水条件下で群飼での親子飼育を分娩後約90日目離乳まで継続した。本牛群の一部の牛（ｎ＝10）における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。

© The Ito Foundation

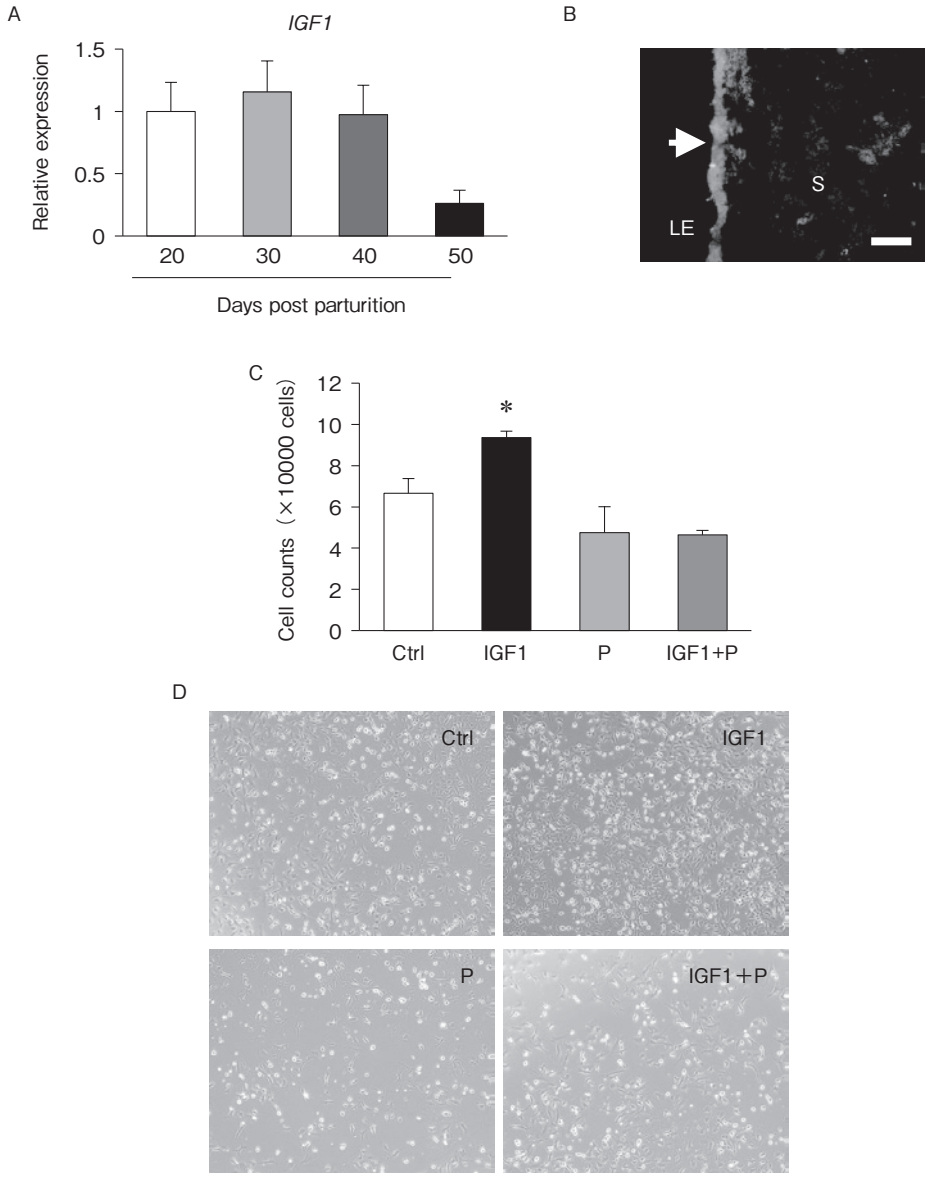

Fig. 1　IGF1 in the bovine uterine involution. **A**）Time-course change of the *IGF1* expression in the endometrial epithelial cells of Japanese Black cattle during the uterine involution, analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean ± standard error. **B**）Localization of the IGF1 expression in the endometrium at 20 days after calving, analyzed by immunohistochemistry. Arrowhead indicates IGF1 expression. Scale Bar = 50 μm. LE ; luminal endometrium. S ; stroma. **C**）Cell proliferation analyzed in the endometrial epithelial cells treated with IGF1（100 ng/ml）and/or IGF1 receptor inhibitor（Picropodophyllin, 1 μM）for 72 hours. Asterisk indicates statistical significance compared with control（$p<0.05$）. **D**）Representative pictures of cells after treatment.

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総RNAを抽出し，cDNAに逆転写後に定量的リアルタイムPCR（RT-qPCR）により*IGF1*および

© The Ito Foundation

*MUC16*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（細胞増殖評価）

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に到達後トリプシンで回収し，20,000cell/wellの濃度で12wellプレートに播種，牛血清を５％に落としIGF1（100ng/ml）およびIGF1R阻害剤（Picropodophyllin，１μM）で72時間処理後，トリプシンにて回収し血球計算盤により細胞数を計測した。

2.4　腟粘液中のIGF1タンパク質定量（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−80℃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は細胞の増殖・分化を調節することでさまざまな組織の成長や恒常性に貢献している。雌牛の産褥期には，肝臓由来の血中IGF1濃度が上昇することで排卵が起こるが，負のエネルギーバランスに陥ると血中IGF1濃度が低いため排卵しない[3)]。ウシ子宮においては，子宮が産生するIGF1が妊娠初期の胚発生に関与すると報告がある[4)]。我々はこれまでの研究において，分娩後子宮修復時には子宮内膜上皮細胞がIGF1を高く発現し，子宮修復完了後に減少することを明らかにしてきた（**Fig. 1 A**および**B**）。また，シグナルを伝達する受容体IGF1Rは修復前後で恒常的に発現していた。そこで，子宮修復時の子宮内膜上皮細胞に対するIGF1の機能を解明するために，培養細胞をIGF1タンパク質で処理し細胞増殖を評価した。その結果，IGF1処理区では対照区と比較して有意に細胞数が増加していた（**Fig. 1 C**および**D**）。また，IGF1R機能阻害剤処理によりIGF1の細胞増殖機能は抑制された。以上より，IGF1は細胞の増殖を誘導することで分娩後の子宮修復を促進することが示唆された。今後はIGF1の発現を制御する機構を明らかにする必要がある。続いて，腟粘液中のIGF1を指標として子宮修復を判定可能か評価するために，子宮修復前後の腟粘液中IGF1濃度を測定した。その結果，子宮内膜の遺伝子・タンパク質発現と相反して，腟粘液中IGF1濃度は子宮修復前後で一定であった。子宮で産生されたIGF1タンパク質が腟粘液中へ分泌されない，安定性が低く分解されてしまう，肝臓由来のものでマスクされる等の原因があり，腟粘液中IGF1は子宮修復指標として不適であった。

次に，子宮修復・受胎性指標の新候補因子としてMUC16に注目した。*MUC16*の発現は分娩後早期に高く，修復が進むにつれて徐々に減少していた（**Fig. 2**）。ムチンファミリータンパクは，バクテリアや病原菌との接着を防ぎ細胞を護る働きがあり，子宮内膜では胚の接着を抑制するとも考えられている。つまり，MUC16の発現が高いと受胎性が低く，発現が低いと受胎性が高い可能性がある。そのため，今回明らかになった子宮修復進行とともに減少するMUC16の発現挙動は，修復が進むと受胎性が上昇することを示唆していると考えられる。一方で，子宮修復完了後の発情期と黄体期における*MUC16*の発現を**Fig. 3**に示し

© The Ito Foundation

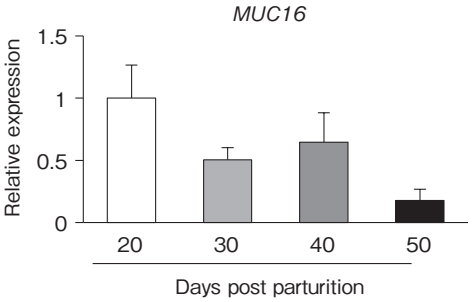

Fig. 2　Time-course change of the *MUC16* expression in the endometrial epithelial cells of Japanese Black cattle during the uterine involution, analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean±standard error.

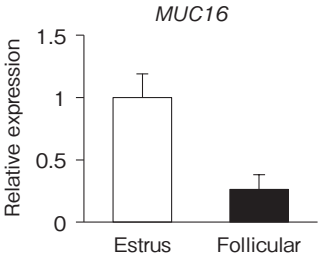

Fig. 3　Alteration of *MUC16* expression in the bovine endometrial epithelial cells during the estrous cycle, analyzed by RT-qPCR. Data are presented as the mean±standard error.

た。*MUC16*は発情期に高く，黄体期に減少しており，子宮修復完了後も性ホルモン等により変動している。よって，単純に子宮修復を反映している訳ではなく，今後詳細な解析が必要となる。また，上記IGF1のように腟粘液や血液等により簡便・迅速に計測できる方法も開発する必要がある。

4．要　約

牛の分娩間隔短縮を達成するために，子宮修復・受胎性を客観的に評価する分子指標確立を研究の目的とし，IGF1およびMUC16の子宮修復時の子宮内膜における発現および機能を解析した。疾病などの外的要因の少ない黒毛和種繁殖雌牛を初産・経産の区別なくランダムに供試した。子宮修復中の分娩後20日目から子宮修復完了後の分娩後50日目まで10日ごとに細胞診用サイトブラシを用いて子宮内膜上皮細胞を採取し，RT-qPCRにより*IGF1*および*MUC16*の発現を解析した。また，IGF1の子宮修復に対する機能を明らかにするため，培養細胞をIGF1タンパク質で処理し，細胞増殖を評価した。さらに，腟粘液中のIGF1タンパク質濃度を測定した。その結果，ウシ子宮内膜上皮細胞の*IGF1*発現は子宮修復中に高く，修復完了後に減少した。IGF1タンパク質による処理は，子宮内膜上皮細胞の細胞増殖を誘導した。残念ながら，腟粘液中のIGF1濃度は一定であった。以上から，分娩後のウシ子宮内膜ではIGF1が産生され，細胞増殖を促進することで子宮修復に貢献することが示唆された。一方，腟粘液中IGF1を指標として子宮修復を評価することは困難と考えられた。もう一つの候補因子*MUC16*については，その発現は子宮修復が進むにつれて減少した。*MUC16*の発現は子宮修復完了後も変動するためさらなる解析が必要であるが，腟粘液等を用いてMUC16を分子指標として子宮修復および受胎性を評価する道が拓かれた。

文　献

1）　Kubota, K., Miwa, M., Hayashi, K. G., Hosoe, M., Sakatani, M.：*J Reprod Dev*, **67**, 386～391, 2021.
2）　Kunii, H., Kubo, T., Asaoka, N., Balboula, A. Z., Hamaguchi, Y., Shimasaki, T., Bai, H., Kawahara, M., Kobayashi, H., Ogawa, H., Takahashi, M.：*Biochem Biophys Res Commun*, **569**, 179～186, 2021.
3）　Butler, W. R.：*Anim Reprod Sci*, 60-61, 449～57, 2000.
4）　Hansen, P. J., Tríbulo, P.：*Biol Reprod*, **101**, 526～537, 2019.

© 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（Ⅱ）

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

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. Efficient method for cryopreservation of poultry genetic resources has been developed in my previous study using gonadal PGCs (gPGC), which present in embryonic gonad by cryopreservation of embryonic gonad. In the present study, to evaluate physiological function of gPGCs cryopreserved using this method, gametogenesis of gPGCs recovered from frozen-thaw gonad were investigated. Embryonic gonads were removed from 7-day-old tdTomato induced chick embryo, then placed in cryotube containing cryoprotectant including 10% dimethyl sulfoxide (DMSO) and serum and cryopreserved by slow freezing and stored for more than a month in liquid N_2. Recovered 200 gPGCs from frozen-thaw gonads were injected in blood vessel of 2.5-day-old recipient embryos. Recipient embryos were hatched and raised to sexual maturity and progeny testing was conducted by mating with White Leghorn of the opposite sex. Embryos induced tdTomato gene were obtained from two male recipients. This result suggested that gPGCs recovered from frozen-thaw gonad maintain functional ability of gametogenesis. Furthermore, to elucidate more efficiency condition of cryopreservation of embryonic gonad, effect of cryomedia, adhesion with mesonephros and osmotic pressure in survivability and migration into recipient gonad of gPGCs were examined in each developmental stage. In 5-day-old embryos, no effects of adhesion of mesonephroi with gonad and addition of trehalose in cryomedia were not observed on viability and migratory ability into recipient gonad of gPGCs. In 9-day-old embryos, the number of recovered gPGCs from frozen-thaw gonad tended to increase with increasing osmotic pressure and osmotic time, but viability of gPGCs were significantly decreased. Further, migratory ability of gPGCs also negatively correlated with osmotic pressure and osmotic time. These results suggests that it is the most effective conditions for cryopreservation of 9-day-old embryonic gonad are immediately cryopreserved with physiological osmotic pressure. In the present study, therefore, a new effective method of conservation of poultry genetic resources using gPGCs maintaining differentiative ability into functional gamete were developed by directly cryopreservation of embryonic gonads.

© The Ito Foundation

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，現在の飼育による維持は，鳥インフルエンザ等の感染症や災害等により，一度に多数の種鶏を失うリスクがある。そのため，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な保存がきわめて重要視されている。家禽における遺伝資源の保存では，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。ニワトリでは，2.5日胚の血液中に存在するPGC（cPGC）を分離して凍結保存し，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で個体の再生が可能である[1)]。しかし，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り，それらの技術習得には時間を要する。さらに，cPGCを使用する場合，回収できる胚の発生時期は孵卵2.5日目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。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は一つの胚から確実に多数のPGCの採取が可能であり，採取可能な胚発生期間も数日以上である。さらに，gPGCはcPGCと同様に凍結保存が可能なため[2, 3)]，保存する遺伝資源の試料としての利点が多い。そこで，前年度の本助成による課題では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に取り組んだ。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し，融解後のgPGCの分離効率を評価することで新たな保存法の有効性を示した。しかし，前年度では７日胚以外では保存効率が著しく低いこと，融解後の生殖巣から分離されたgPGCの生理的機能の証明が不十分であることが課題であった。そこで本研究では，新規保存法を用いて凍結したニワトリ７日胚生殖巣から分離したgPGCの生理的機能，および凍結保存する胚の発生段階に適した凍結保存条件を明らかにすることで，本法における家禽遺伝資源保存技術への有効性を評価した。

２．方　　法

2.1　凍結生殖巣から分離したgPGCの配偶子形成能の解析

本研究における動物実験は所属機関の動物実験実施規程，畜産研究部門動物実験等実施要領に則り，部門動物実験委員会の承認を得て実施した。

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７日目の胚を供試した。雌雄のtdTomato導入胚の生殖巣を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回洗浄し，４℃に冷却した200μlの凍結保護液（CELLBANKER 1 plus（ゼノジェンファーマ（株））に浸漬し，－１℃／分の速度で－80℃まで冷却後，－196℃の液体窒素内で１か月以上保存した。融解時には，凍結チューブを37℃で急速融解し，生殖巣をただちに50μlのPBSで２回洗浄し，200μlのPBS内で37℃，２時間インキュベーションした。20μlのウシ胎児血清（FBS）を添加し，得られた懸濁液中のgPGC　200個を野生型の白色レグホーン（WL）2.5日胚の背側大動脈に移植した。移植後，孵化・育成し，性成熟に至った後にWLと交配することで後代検定を行った。得られた受精卵を５～８日間孵卵し，胚における赤色蛍光標識の検出により移植された凍結gPGCの配偶子形成能の有無を判定した。

2.2　胚の発生段階に適した生殖巣凍結条件の改良

赤色蛍光を示すtdTomato導入ニワトリの受精

© The Ito Foundation

卵を孵卵し，孵卵後５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左側生殖巣を採取し，2.1と同様の手順で凍結保存した。詳細な凍結保護液および凍結保護条件は下記2.2.1および2.2.2に記した。

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，ただちに50μlのPBSで２回洗浄し，100～200μlのPBSに浸漬して，37℃，２時間インキュベーションした。得られた細胞懸濁液10μlのトリパンブルー染色を行い，分離された生存gPGC数，死gPGC数，体細胞数をそれぞれ測定した。総gPGC数に対する生存gPGC数の百分率を生存率，分離した総細胞数に対するgPGC数の百分率を純度として算出した。

次に，分離したgPGCの宿主胚生殖巣への移住能を解析するため，分離したgPGC 50個をWL2.5日胚の血管内に移植した。移植５日後，WLの生殖巣に存在するtdTomato陽性gPGC数を測定した。

2.2.1　５日胚生殖巣の凍結保存条件の検討

前年度において，５日胚では生殖巣組織の著しい損傷が認められたことから，生殖巣を保存する際，中腎と生殖巣が接着した状態および中腎から完全に分離した状態の２通りの方法で凍結保護効果を検証した。また，凍結保護液には，①10％ウシ胎児血清（FBS），10％DMSO添加イーグル最小必須培地（DMEM）（以下，Ctrl），②３％トレハロース，10％FBS，５％DMSO添加DMEM（以下，TRE５），③３％トレハロース，10％FBS，10％DMSO添加DMEM（以下，TRE10）の計３種類を使用し，それぞれの凍結保護効果を検証した。

2.2.2　９日胚生殖巣の凍結保存条件の検討

凍結保護液は，①260mOsm/l（以下，L），②330mOsm/l（以下，Ctrl），③400mOsm/l（以下，M），④560mOsm/l（以下，H）の４種の浸透圧に調整したDMEMに10％FBSおよび10％DMSOを添加し，凍結保存に供した。生殖巣の凍結保護液への浸漬後，冷却前に０，15および30分間，４℃下に静置した後に上法により凍結保存した。これらの凍結保護液の浸透圧および浸透時間による凍結保護効果を検証した。

３．結果と考察

3.1　凍結生殖巣から分離したgPGCの配偶子形成能の解析

凍結生殖巣から取り出したgPGCを移植した６羽（雄３羽，雌３羽）の宿主が性成熟に至った。WLとの交配を行った結果，２羽の雄の宿主に由来する受精卵から得られた胚の中にtdTomato陽性胚が確認された（**Table 1**）。このことから，本法を用いることで機能的配偶子形成能を保持したgPGCを凍結保存できることが明らかになった。gPGCを分離した後に凍結保存する従来法におけ

Table 1　Progeny testing of recipient after transferring 200 gPGCs recovered from cryopreserved gonad of 7-day-old tdTomato embryo into White Leghorn

ID	Recipient sex	Incubated eggs	Fertilized egg	Detectable	tdTomato-positive
M1	male	123	101	92	1
M2	male	118	107	104	2
M3	male	127	97	97	0
F1	female	76	69	58	0
F2	female	66	64	64	0
F3	female	44	38	37	0

© The Ito Foundation

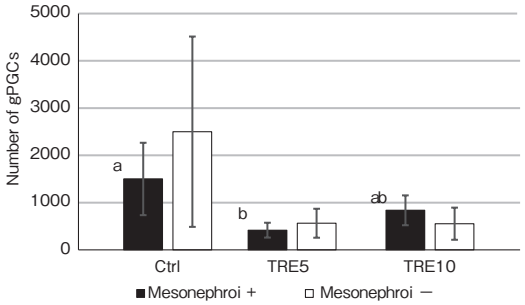

Fig. 1　Number of survival gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 5-day-old chick embryo. (means ±95% CI).

Notations ; Ctrl : control, TRE5 : 3% trehalose and 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), TRE10 : 3% trehalose and 10% DMSO
ab : number of gPGCs with different letters are significantly different at $p<0.05$ among cryoprotectant.

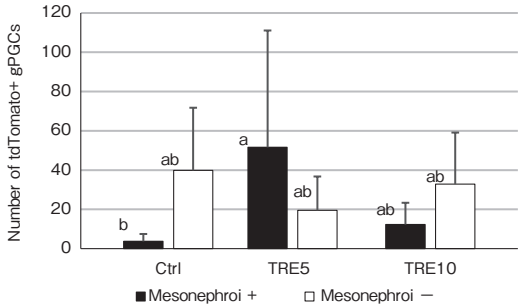

Fig. 2　The number of tdTomato-positive gPGCs in the gonad of recipient embryos at 5 days after transfer (means ± 95% CI).

Notations ; Ctrl : control, TRE5 : 3% trehalose and 5% dimethyl sulfoxide (DMSO), TRE10 : 3% trehalose and 10% DMSO
ab : number of tdTomato positive gPGCs with different letters are significantly different at $p<0.05$ among cryopreservation condition.

る，得られた後代におけるドナー由来後代の比率は１～２％であり[3]，本法を用いた場合のドナー由来後代の比率と同等であった。先行研究における凍結保存をしていない場合のドナー由来後代の比率は約７～60％であることから[3]，凍結保存操作自体がgPGCの生理的機能性に影響している可能性が考えられる。今後は，凍結保存法の改善や融解後に分離されたgPGCの回復培養等の検討が必要である。

3.2　胚の発生段階に適した生殖巣凍結条件の改良

3.2.1　５日胚生殖巣の凍結保存条件の検討

凍結時の生殖巣の中腎との接着の有無は，分離された総gPGC数，生存gPGC数，生存率および純度それぞれにおいて有意な差異は認められなかった。生殖巣から分離された生存gPGC数について，Ctrlが最も多く，Ctrlに対しTRE５では有意に少なかった（$p<0.05$，**Fig. 1**）。また，純度についてもCtrlで有意に高くなった（$p<0.05$）。これらより，生存gPGCを効率的に分離するためには，Ctrlの凍結保護溶液が最も適していることが示唆された。一方，分離したgPGCを宿主胚に移植した場合における生殖巣への移住能は，TRE５中腎ありの場合に最も高かったが，Ctrl中腎なしおよびTRE10中腎なしと同等であり，それぞれの条件の間に有意差は認められなかった（**Fig. 2**）。また，中腎の有無と凍結保護液の間に交互作用は認められなかった。以上より，５日胚の生殖巣の凍結保護液はCtrlが最も効率的であると考えられる。凍結時に生殖巣と中腎が接着している場合，凍結保存までの操作の大幅な時間短縮が可能であり，融解後に凍結チューブから生殖巣を回収する際にも操作性が高かった。しかし，gPGCの分離には生殖巣の中腎からの分離操作が必須であるため，最終的にgPGCを分離するまでに要する時間は同等であると考えられる。

3.2.2　９日胚生殖巣の凍結保存条件の検討

雌における生存率および生存gPGC数は，Ctrlでは15～30％程度および1.2×10^4個以上であったのに対し，Ｌ，ＭおよびＨでは10％程度以下および1.0×10^3～1.0×10^4個以下となり，浸透圧がgPGCの生存性に影響することが示唆された。純度は，Ctrl，Ｌでは浸透時間の経過に伴う有意差は認められなかったが，Ｍの場合は浸透時間30分の際に有意に低くなり，反対にＨでは時間とともに上昇した（$p<0.05$）。浸透時間を長くするこ

© The Ito Foundation

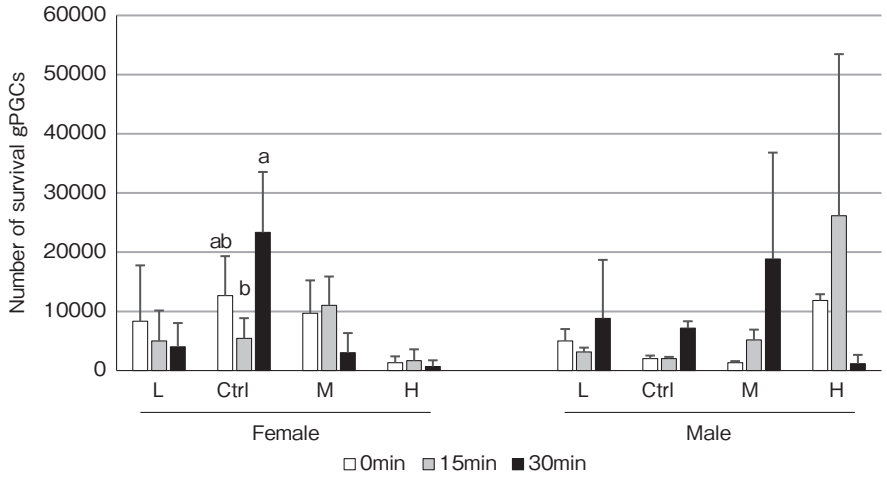

Fig. 3　Number of survival gPGCs recovered from frozen-thaw gonads of 9-day-old chick embryo.（means±95% CI）.
Notations；L：260mOsm/l, Ctrl：control（330mOsm/l）, M：400mOsm/l, H：560mOsm/l
0 min, 15min, 30min ; Penetration time before cryopreservation.
ab：number of gPGCs with different letters are significantly different at $p<0.05$ among same cryoprotectant.

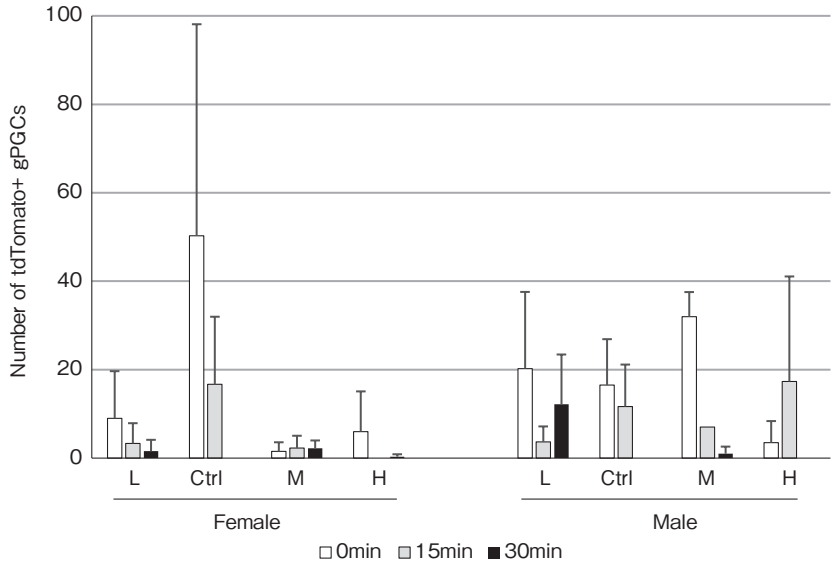

Fig. 4　The number of tdTomato-positive gPGCs in the gonad of recipient embryos at 9 days after transfer（means±95% CI）.
Notations；L：260mOsm/l, Ctrl：control（330mOsm/l）, M：400mOsm/l, H：560mOsm/l
0 min, 15min, 30min ; Penetration time before cryopreservation.

とで分離可能なgPGC数は増加する一方，移植後の移住能が著しく低下することが示された（**Fig. 3**および**4**）。これらのことから，雌においては，生理的浸透圧であるCtrlに短時間浸透する条件が適していると考えられる。

雄において，生存gPGC数は，浸透圧の上昇および浸透時間に伴い増加する傾向が認められた（**Fig. 3**）。生存率については，Ctrl，Lでは浸透

© The Ito Foundation

時間の経過に伴う有意差は認められなかったが，Mでは浸透時間の経過とともに上昇し，反対にHの場合は浸透時間の経過とともに低くなった（$p<0.05$）。しかし，宿主胚に移植した場合の生殖巣への移住能は，浸透時間および浸透圧に負の相関を示した（**Fig. 4**）。これらのことから，雄では260～400mOsm/lの浸透圧の凍結保護液でただちに凍結保存する条件が最も適していることが示唆され，雌雄では異なる傾向が認められた。

本研究では，雌雄の５および９日胚いずれにおいても，前年度の凍結保護液を用いた移住能より約1.9倍および約3.5倍の高い効率で，生理的機能性を維持したgPGCの保存が可能であることが示された。以上より，本研究では５および９日胚それぞれにおける生殖巣の凍結保存条件の改良に成功した。しかし，従来のgPGCを生殖巣から分離した後に凍結する方法に対し，５日胚の場合，融解後のgPGCの移住能は低かった。したがって，融解後の凍結による細胞のダメージを回復するための回復培養や培養によるgPGCの増殖の検討が今後，必要であると考える。

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。そこで，前年度に生殖巣に存在するPGC（gPGC）の簡便かつ短時間で効率的な家禽の遺伝資源保存法を開発した。本研究では，本法により保存したgPGCの生理的機能性を評価するため，凍結生殖巣から分離したgPGCの配偶子形成能と，より効率的な凍結保存条件を明らかにすることを目的とした。まず，tdTomato導入ニワトリ７日胚の生殖巣を10％ジメチルスルホキシド（DMSO）および血清を添加した凍結保護液内で緩慢凍結法を用いて凍結保存した。融解した生殖巣から分離したgPGCを宿主胚の血管内に移植し，孵化，育成し，性成熟に至った宿主を野生型のニワトリと交配した。その結果，２羽の雄宿主に由来する胚からtdTomatoが検出され，移植されたgPGCが機能的な配偶子形成能を維持していることが示された。次に，５および９日胚における最適な凍結保存条件を明らかにするため，５日胚では中腎との接着の有無および凍結保護液，９日胚では浸透圧および冷却前の浸透時間による保存時の細胞の生存性および宿主胚に移植後の生殖巣への移住能への効果をそれぞれ検討した。その結果，５日胚では中腎の接着およびトレハロース添加によるgPGCの生存性および移住能への影響は認められなかった。また，９日胚では浸透圧の上昇および浸透時間の増加に伴い，分離可能なgPGCは増加する傾向が認められたが，生存性が著しく低下し，移住能についても，浸透圧および浸透時間に負の相関を示した。これらより，９日胚では生理的浸透圧の凍結保護液でただちに凍結保存を行う条件が最も適していることが明らかになった。以上より，本研究で機能的配偶子への分化能を維持したgPGCによる効率的な家禽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

ホルスタイン種牛の妊娠期における卵巣予備能維持機構

The mechanism for keeping the ovarian reserve level during the pregnancy period in Holstein cows

古　山　敬　祐[1]・窪　　友　瑛[2]
（[1]大阪公立大学大学院獣医学研究科，[2]北海道立総合研究機構酪農試験場）

Keisuke Koyama[1] and Tomoaki Kubo[2]
（[1]Graduate school of veterinary science, Osaka Metropolitan University,
[2]Dairy research center, Hokkaido research organization）

Cows with high ovarian reserve have high fertility. Using the number of antral follicles as an index for ovarian reserve, a similar value is observed following one parity. During pregnancy of nine months, follicular growth and regression occur repeatedly. It is speculated that a mechanism exists to maintain ovarian reserve during pregnancy. However, this mechanism remains unclear. Anti-Müllerian hormone（AMH）functions by suppressing the mobilization of primordial follicles. During pregnancy, blood AMH concentrations of primiparous Holstein cows increase during pregnancy, suggesting a potential role of high blood concentrations of AMH in maintaining ovarian reserve during pregnancy. In this study, we analyzed the changes in the blood concentration of AMH during the pregnancy period of Holstein cows, as well as the effect of nutritional status and heat stress on AMH concentrations, in order to clarify the mechanisms involved in maintaining ovarian reserve during pregnancy. The results demonstrate that the concentration of AMH in the blood of primiparous cows was higher at the fifth and seventh months of pregnancy than before pregnancy. In contrast, in multiparous cows, the concentration was lower in the second and third months of pregnancy than before pregnancy. Furthermore, a positive correlation was observed between the rate of change in the blood concentration of AMH from before pregnancy to the ninth months of pregnancy and the rate of change from before pregnancy to the fifth and seventh months of pregnancy in primiparous cows. These findings suggest that the blood dynamics of AMH during pregnancy differ between primiparous and multiparous cows. In addition, it was suggested that the blood concentration of AMH may be involved in the mechanism of maintaining ovarian reserve during the pregnancy period in primiparous cows.

1．目　　的

卵巣内に存在する正常卵胞の総数は卵巣予備能と呼ばれ，卵巣機能の評価指標として活用されている。卵巣予備能の指標となる直径３mm以上の卵胞数（AFC）の多いウシの受胎性は高い[1)]。このAFCは，同一個体であれば，産次を１つ重ねても同様の数値を示す[2)]。一方，産次を１つ重ね

© The Ito Foundation

るとAFCの低下する個体が一定数いる[3]。しかし，この産次経過に伴うAFCの変化，すなわち卵巣予備能の変化がどのような因子の影響を受けるのかは不明である。また，産次を１つ重ねるためには，卵胞が発育と退行を繰り返す９か月間という妊娠期間を経る必要があり[4]，妊娠間中に卵巣予備能を維持する機構があると推察される。しかし，その機構については不明である。

抗ミューラー管ホルモン（AMH）には，原始卵胞からの動員を抑える働きがある[5]。１産次のホルスタイン種雌ウシの血中AMH濃度は，妊娠後に増加する[6]。このことから，妊娠中に高く維持された血中AMH濃度が卵巣予備能維持機構と関与している可能性がある。しかし，ホルスタイン種雌ウシの妊娠期における血中AMH濃度の推移を調べた報告は一報しかなく[6]，その値と卵巣予備能維持機構との関連性を調べた報告はない。

ホルスタイン種雌ウシにおいて，血中AMHと遊離脂肪酸（NEFA）濃度との間には負の相関がある[6]。エネルギー不足の際に体脂肪が分解され生成されるNFFA[7]は胞状卵胞の発育を阻害することで[8]，卵胞からのAMH分泌を阻害すると考えられる。一方，肉用牛においては，暑熱ストレスにより血中AMH濃度が低下する[9]。すなわち，栄養状態および暑熱ストレスが妊娠期間中の血中AMH濃度に影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究では，妊娠期における卵巣予備能維持機構を明らかにすることを目的として，ホルスタイン種雌ウシの妊娠期における血中AMH濃度の推移およびその値に栄養状態および暑熱ストレスが及ぼす影響の解析を行った。

２．方　法

2.1　供試動物

北海道立総合研究機構酪農試験場および大阪府内民間酪農場１戸で飼養され，2021年８月～2022年７月に分娩を迎えたホルスタイン種泌乳牛17および28頭（産次2.6±1.6および2.5±1.2，平均±標準偏差）をそれぞれ供試した。

本研究における動物実験は大阪公立大学動物実験委員会の審査承認を得て実施した（動物実験22-141号）。

2.2　血液の採取，ボディコンディションスコア（BCS）の記録および牛舎内温湿度の測定

分娩後２か月目（非妊娠期）ならびに妊娠２，３，５，７および９か月目に尾静脈から採血を行い，BCSを記録した。採取した血液から血清を分取し，－30℃で保存した。牛舎内に温湿度計（RTR-507，ティアンドデイ，長野）を設置し，１時間ごとに温湿度を測定した。

2.3　血中AMH濃度および血液生化学値の測定

凍結保存した血清を融解後，市販のAMH測定用酵素免疫測定法キット（AL-114，Ansh Labs, TX, USA）を用いて，血中AMH濃度を測定した。同様に凍結保存した血清を融解後，生化学自動分析装置（自動分析装置3100，日立ハイテク，東京）を用いて，３項目（NEFA，T-chol：総コレステロール，BHB：β-ヒドロキシ酪酸）を測定した。

2.4　胞状卵胞数の測定

妊娠２，３および５か月目に7.5MHzのリニアプローブを装着した超音波画像診断装置（HS-1600V，本多電子，愛知）で卵巣を経直腸的に検査し，胞状卵胞数として直径２mm以上の卵胞数を個体ごとにカウントした。

2.5　実験計画

実験１として，妊娠期における血中AMH濃度の推移を明らかにするために，血中AMH濃度を測定した計45頭分のデータ（計212サンプル）を解析に供した。

実験２として，妊娠期における胞状卵胞数および胞状卵胞数あたりの血中AMH濃度の推移を明

© The Ito Foundation

らかにするために，血中AMH濃度および胞状卵胞数を測定した計37頭分のデータ（計91サンプル）を解析に供した。

実験１において，１産次のウシでは妊娠５および７か月目での血中AMH濃度の上昇，２産次以上のウシでは妊娠２および３か月目での血中AMH濃度の低下がみられたため，実験３では，妊娠前から妊娠９か月目までの血中AMH濃度の変化割合と１産次のウシにおける妊娠前から妊娠５および７か月目までもしくは２産次以上のウシにおける妊娠前から妊娠２および３か月目までの血中AMH濃度の変化割合との関連性を解析した。

実験４として，栄養状態の指標となるBCSならびに血中NEFA，T-cholおよびBHB濃度と１産次のウシにおける妊娠前から妊娠５および７か月目もしくは２産次以上のウシにおける妊娠前から妊娠２および３か月目までの血中AMH濃度の変化割合との関連性を解析した。

実験５として，２産次以上のウシにおける妊娠２および３か月目での血中AMH濃度の低下と暑熱ストレスとの関連性を解析した。１時間ごとの温湿度から温湿度指数（THI）を計算した（温度$\times 1.8-(1-$湿度$\div 100)\times($温度$-14.3)+32$）[10]。１日の平均THIを算出し，その値が72以上であった日にちを暑熱日とした[11]。サンプリングを行った日にちが暑熱日であった個体を「暑熱ストレスあり」として定義した。また，１産次のウシで妊娠５および７か月目のサンプリング日が暑熱日であった個体は存在しなかった。

2.6　統計解析

すべての統計解析は，Rソフトウェア（ver.4.2.1）を使用して実施した[12]。$p<0.05$を統計的に有意であるとした。

妊娠期における血中AMH濃度および胞状卵胞数の解析を行うために，血中AMH濃度，胞状卵胞数または胞状卵胞数あたりの血中AMH濃度を目的変数とし，月数，産次（１産次もしくは２産次以上）およびそれらの交互作用を説明変数とした線形混合モデル（変量効果：ウシ個体）を用いた。分散分析後の多重比較は，産次ごとにTukeyの補正を用いて行った。目的変数の正規性を確保するために，血中AMH濃度および胞状卵胞数あたりの血中AMH濃度はBox-Cox変換後に解析に供した。

妊娠前から妊娠９か月目までの血中AMH濃度の変化割合と１産次のウシにおける妊娠前から妊娠５および７か月目（妊娠５および７か月目の血中AMH濃度のうちの最大値を抽出）もしくは２産次以上のウシにおける妊娠前から妊娠２および３か月目（妊娠２および３か月目の血中AMH濃度うちの最低値を抽出）までの血中AMH濃度の変化割合との関連性を解析するために，ピアソンの相関分析を行った。また，BCSならびに血中NEFA，T-cholおよびBHB濃度と１産次のウシにおける妊娠前から妊娠５および７か月目もしくは２産次以上のウシにおける妊娠前から妊娠２および３か月目までの血中AMH濃度の変化割合との関連性も同様に解析した。

２産次以上のウシにおける暑熱ストレスが妊娠前から妊娠２および３か月目までの血中AMH濃度の変化割合に及ぼす影響はウィルコクソンの順位和検定により解析した。

3．結果と考察

実験１の解析では，月数（$p<0.01$）および月数と産次との交互作用（$p<0.01$）が認められた。産次ごとの多重比較の結果は**Fig. 1** に示した。１産次のウシでは，妊娠前に比べて妊娠５および７か月目において血中AMH濃度は高くなった（$p<0.05$）。一方，２産次以上のウシでは，妊娠前に比べて妊娠２および３か月目において血中AMH濃度は低くなった（$p<0.05$）。１産次のウ

© The Ito Foundation

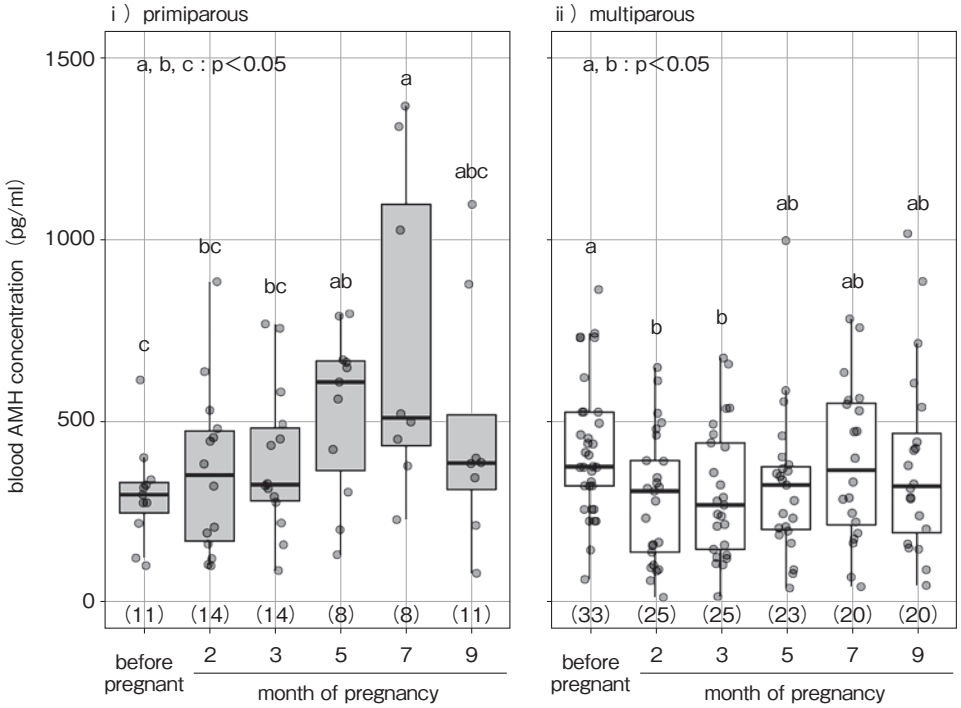

Fig. 1　Blood concentrations of anti-Müllerian hormone（AMH）in i）primiparous and ii）multiparous（second or greater parity）cows before and during pregnancy. The total number of enrolled cows at each time point is indicated in parentheses.

シにおける妊娠中の血中AMH動態は過去の報告と同様であった[6]。本研究により１と２産次以上のウシでは，妊娠中の血中AMH動態が異なることが初めて明らかとなった。

妊娠期間中の胞状卵胞数および胞状卵胞数あたりの血中AMH濃度の推移を**Fig. 2** に示した。両者において，月数および産次の影響はみられなかった。一方，胞状卵胞数あたりの血中AMH濃度は，産次による効果のある傾向がみられた（p＝0.09）。卵胞からのAMH分泌能が産次により異なる可能性を示している。

実験３の解析結果を**Fig. 3** に示した。１産次のウシにおいて，妊娠前から妊娠９か月目までの血中AMH濃度の変化割合と妊娠前から妊娠５および７か月目までの変化割合との間の正の相関がみられた（r ＝0.850，p ＜0.01）。一方，２産次以上のウシの解析では有意な相関はみられなかった。１産次における妊娠中に血中AMH濃度上昇は，妊娠末期の血中AMH濃度に関連することが示唆され，妊娠期間中の卵巣予備能維持機構に血中AMH濃度が関与している可能性が示された。本研究では，研究期間に限りがあり，個体ごとにおける産次間での卵巣予備能変化の指標として，妊娠前から妊娠９ヶ月目の血中AMH濃度の変化割合を使用せざるを得なかった。今後は，産次を１つ重ねる前後の非妊娠期での血中AMH濃度の変化割合を個体ごとにおける産次間での卵巣予備能変化の指標として用いたうえで，妊娠中の血中AMH濃度の上昇との関連性を解析する必要がある。

１産次のウシにおける実験４の解析結果を**Fig. 4** に示した。各項目と妊娠前から妊娠５および７か月目までの血中AMH濃度の変化割合との間に有意な関連はみられなかったが，血中BHB濃度

© The Ito Foundation

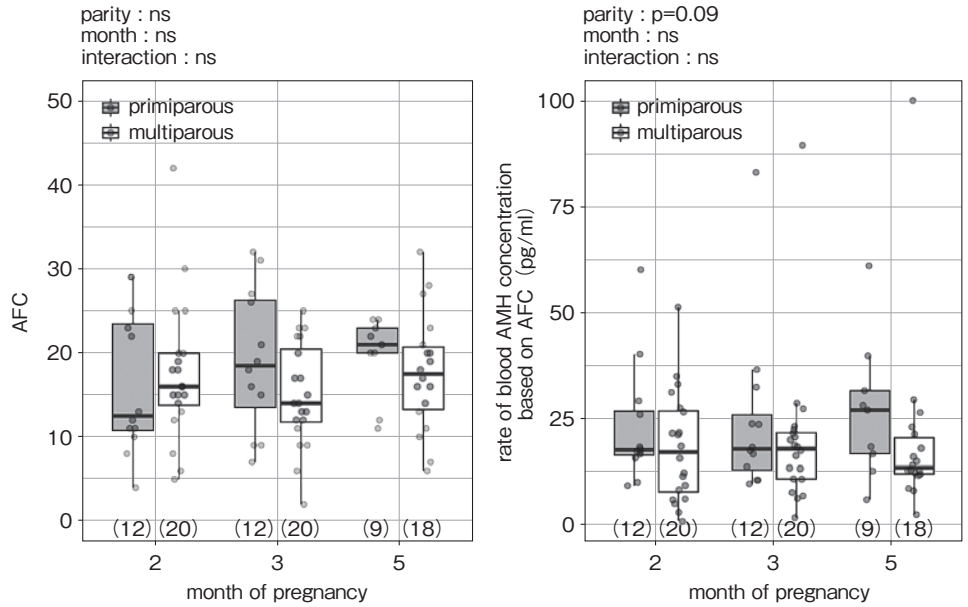

Fig. 2 Antral follicle count (AFC) and the rate of blood concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) based on AFC in primiparous and multiparous (second or greater parity) cows during pregnancy. The total number of enrolled cows at each time point is indicated in parentheses. The notation "ns" indicates that the p-value is greater than 0.1.

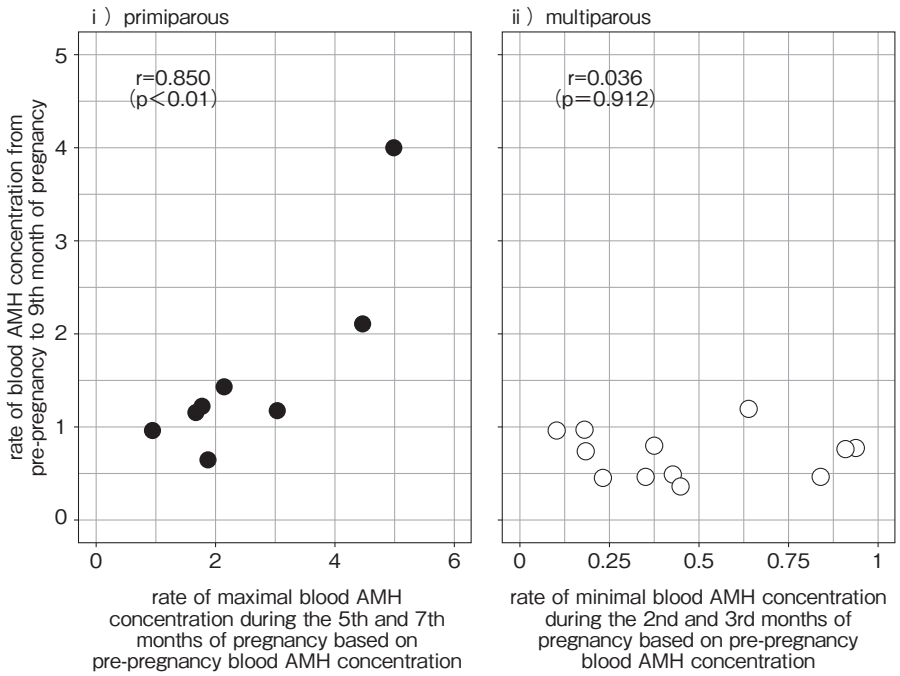

Fig. 3 Relationship between the rate of maximal blood concentration of anti-Müllerian hormone (AMH) during the fifth and seventh months of pregnancy in i) primiparous cows or the rate of minimal blood AMH concentration during the second and third months of pregnancy in ii) multiparous cows (second or greater parity), and the rate of blood AMH concentration from pre-pregnancy to the ninth month of pregnancy.

© The Ito Foundation

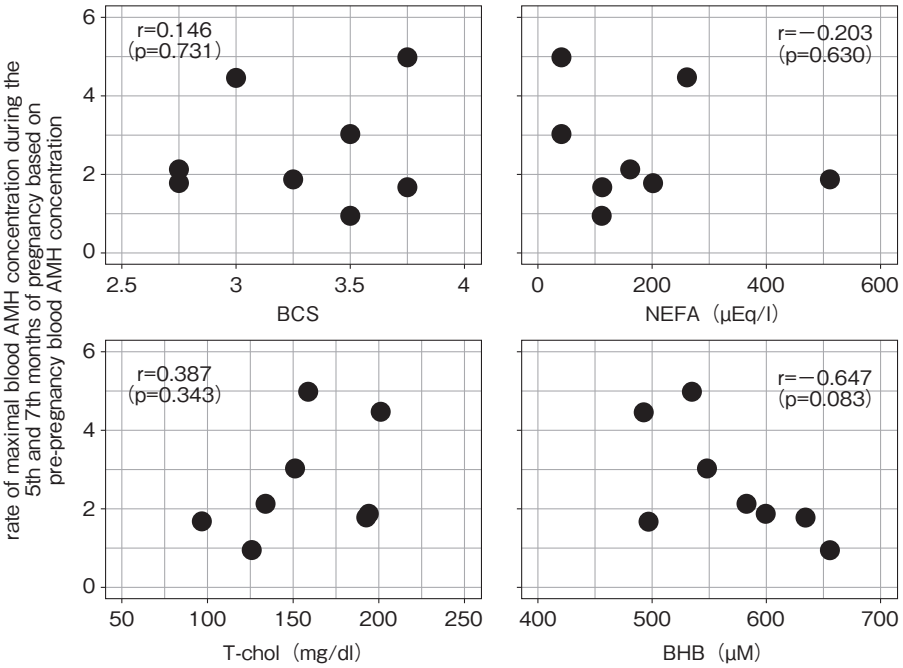

Fig. 4　Relationship between the rate of maximal blood concentration of anti-Müllerian hormone（AMH）during the fifth and seventh months of pregnancy based on pre-pregnancy blood AMH concentration in primiparous cows and body condition score（BCS）or blood concentrations of certain biochemical indicators, including non-esterified fatty acid（NEFA）, total cholesterol（T-chol）or beta-hydroxybutyrate（BHB）, at the time of AMH detection.

との間には負の相関のある傾向がみられた（ｒ＝−0.647，ｐ＝0.083）。エネルギー不足により体脂肪動員が進み，肝臓からBHBが多く産生された個体では，妊娠中の血中AMH濃度の上昇がみられにくくなる可能性を示している。２産次以上のウシにおける各項目と血中AMH濃度の変化割合との間には有意な関連はみられなかった（データ略）。また，本研究で血中BHB濃度の測定が行われたのは分娩後218日目以降であり，測定された血中BHB濃度と分娩後早期の負のエネルギーバランス（NEB）の大きさとの関連性は弱いと考えられる。分娩後早期のNEBが妊娠中の血中AMH濃度に及ぼす影響については，今後検証すべきである。

実験５の解析結果を**Fig. 5**に示した。２産次以上のウシにおける暑熱ストレスは妊娠前から妊娠２および３か月目までの変化割合に影響を及ぼさなかった。

以上のことから，１と２産次以上のウシでは，妊娠中の血中AMH動態が異なることが明らかとなった。また，１産次においては，妊娠期間中の卵巣予備能維持機構に血中AMH濃度が関与している可能性が示された。

４．要　　約

本研究では，妊娠期における卵巣予備能維持機構を明らかにすることを目的として，ホルスタイン種雌ウシの妊娠期における血中抗ミューラー管ホルモン（AMH）濃度の推移およびその値に栄養状態および暑熱ストレスが及ぼす影響の解析を行った。結果，１産次のウシでは，妊娠前に比べて妊娠５および７か月目において血中AMH濃度

© The Ito Foundation

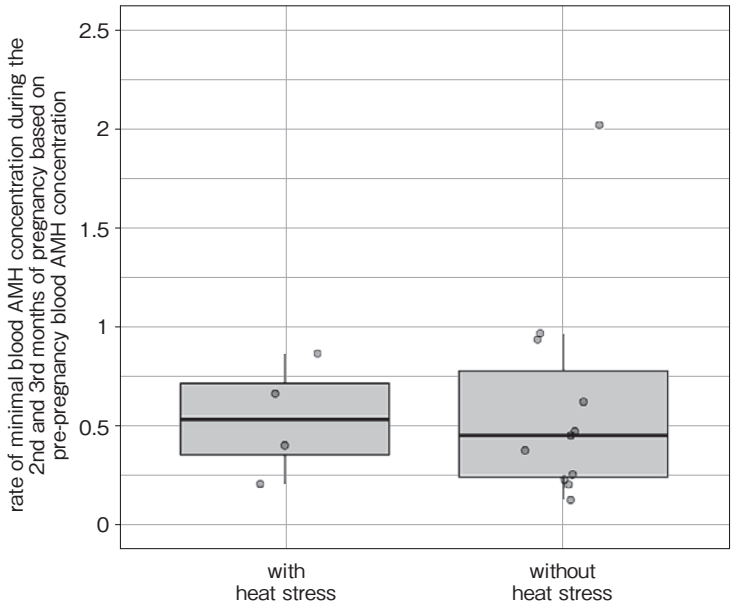

Fig. 5　Effect of heat stress on the rate of minimal blood anti-Müllerian hormone (AMH) concentration during the second and third months of pregnancy in multiparous cows (second or greater parity).

は高くなり，２産次以上のウシでは，妊娠前に比べて妊娠２および３か月目において血中AMH濃度は低くなった。また，１産次のウシにおいて妊娠前から妊娠９か月目までの血中AMH濃度の変化割合と妊娠前から妊娠５および７か月目までの変化割合との間に正の相関がみられた。この妊娠前から妊娠５および７か月目までの変化割合と血中β-ヒドロキシ酪酸濃度との間には負の相関のある傾向がみられた。以上のことから，１と２産次以上のウシでは，妊娠中の血中AMH動態が異なることが明らかとなった。また，１産次においては，妊娠期間中の卵巣予備能維持機構に血中AMH濃度が関与している可能性が示された。

文　献

1）Mossa, F., Walsh, S. W., Butler, S. T., Berry, D. P., Carter, F., Lonergan, P., Smith, G. W., Ireland, J. J., Evans, A. C. O. O.：*J Dairy Sci*, **95**, 2355～2361, 2012.

2）Burns, D. S., Jimenez-Krassel, F., Ireland, J. L. H., Knight, P. G., Ireland, J. J.：*Biol Reprod*, **73**, 54～62, 2005.

3）Koyama, K., Koyama, T., Sugimoto, M.：*J Reprod Dev*, **64**, 535～539, 2018.

4）Ginther, O. J., Kot, K., Kulick, L. J., Martin, S., Wiltbank, M. C.：*J Reprod Fertil*, **108**, 271～279, 1996.

5）Gigli, I., Cushman, R. A., Wahl, C. M., Fortune, J. E.：*Mol Reprod Dev*, **71**, 480～488, 2005.

6）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**, 1～16, 2013.

7）Herdt, T. H.：*Vet Clin North Am Food Anim Pract*, **16**, 2000.

8）Ferst, J. G., Missio, D., Bertolin, K., Gasperin, B. G., Leivas, F. G., Bordignon, V., Gonçalves, P. B., Ferreira, R.：*Anim Reprod Sci*, **219**, 106536, 2020.

9）Torres-Simental, J. F., Peña-Calderón, C., Avendaño-Reyes, L., Correa-Calderón, A., Macías-Cruz, U., Rodríguez-Borbón, A., Leyva-Corona, J. C., Rivera-Acuña, F., Thomas, M. G., Luna-Nevárez, P.：*Livest Sci*, **250**, 104590, 2021.

10）Gernand, E., König, S., Kipp, C.：*J Dairy Sci*, **102**, 6660～6671, 2019.

11）Armstrong, D. V.：*J Dairy Sci*, **77**, 2044～2050, 1994.

12）R Core Team.：R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing；2022.

© 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（Ⅲ）

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

日　巻　武　裕[1,2]・美濃輪　駿　斗[2]

（[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）

Takehiro Himaki[1,2] and Hayato Minowa[2]

（[1]Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University,
[2]Graduate School of Natural Science and Technology, Gifu University）

One of the factors that affecting *in vitro* embryo production efficiency is oxidative stress. The purpose of this study was to investigate the effect of α-lipoic acid（ALA）treatment during *in vitro* maturation culture of bovine oocytes, a strong antioxidant, on the gene expression status of blastocyst-stage embryos derived from *in vitro* fertilization（IVF）. Oocytes collected from slaughterhouse were cultured in maturation medium supplemented with 0 or 50 μM ALA for 22 h. After that, *in vitro* fertilized embryos were produced by a general method and cultured to the blastocyst stage. Then, total RNA was extracted from blastocysts and performed reverse transcription real-time quantitative PCR analysis. As a result, the anti-apoptosis-related genes *BCL2*, *BIRC5*, and *GPX1* showed significantly higher expression levels in the 50 μM ALA-treated group compared to the control group（$p < 0.05$）. On the other hand, no difference was observed in *BAX*, that of the gene promotes apoptosis and *SOD2*, which acts as an antioxidant. Regarding genes related to developmental potential, *GLUT1* showed a significantly higher expression level in the 50 μM ALA-treated group compared to the control group（$p < 0.05$）. In addition, *CDX2*, *SOX2*, and *OCT4* tended to be higher in the 50 μM ALA-treated group than in the control group. In conclusion, in this study of molecular biological analysis demonstrated that treatment with 50 μM ALA during *in vitro* maturation indicates an antioxidant effect in bovine *in vitro* fertilized embryo production and is effective in improving the developmental potential and quality of the embryos.

1．目　　的

国内における畜産業は，高齢化に伴う畜産農家戸数の減少等に伴い，特にウシにおいては，各農家が飼養頭数を増やすことで国産牛肉生産量を維持している状況にある。このような多頭飼養形態の弊害として，農家の観察が十分に行き届かず授精適期を逃してしまい，人工授精による受胎率が低下していることが問題となっている。したがって，これまでの和牛生産を一新する効率的な増産

© The Ito Foundation

体制の確立が急務である。一方で，海外に目を向けると，欧米を中心に経腟採卵（OPU）―体外受精（IVF）―受精卵移植（ET）システムによる子牛生産が21世紀に入って急増している[1]。国内においても，近年，本システムによる子牛生産は増加傾向を示しているものの海外ほど顕著な増加は認められていない。その要因には，人工授精に比べて費用が高いことやIVF卵移植による受胎率が低いこと，過大子が生まれやすく難産による母体への影響を危惧することなどがあげられる。これらの問題を解決するためには，体内発生能が良好な高品質な受精卵を効率的に生産する技術の開発が重要である。そこで著者らは，これまでに，IVF卵生産において問題視されている酸化ストレスに着目し，強力な新規抗酸化物質であるα-リポ酸（ALA）処理の有効性を明らかにした。その結果，効率的かつ高品質なIVF卵の生産法を確立した[2]。さらに，ALA処理による受精卵の発生能や品質改善効果を成熟卵子の細胞質成熟状況や品質の面から解明し，ETによる正常な子牛の生産にも初めて成功した[3]。

そこで本研究では，ALA処理が，作出したIVF卵における発生能や品質に関わる遺伝子の発現状況に及ぼす影響について，分子生物学的側面から詳細に解明することを目的とした。

2．方　法

2.1　ALA処理によって体外成熟培養した卵子に由来するIVF卵の生産

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または50μM添加した成熟培地微小滴中で，CO_2インキュベーターにて38.5℃，５％CO_2，95％air，飽和湿度条件下でそれぞれ22時間培養した。その後，豊潤化した卵丘細胞を２～３層程度に剥離し，人工授精用凍結―融解精液を用いてIVFを行った。媒精から６時間後に余分な精子および卵丘細胞を完全に剥離し，マルチガスインキュベーターにて38.5℃，５％CO_2，５％O_2，90％N_2，飽和湿度条件下でそれぞれ体外発生培養に供した。なお，媒精２日後までは0.3％BSA添加CR1aaで培養し，以降は，10％FBS添加CR1aaで培養した。各処理区において，媒精から７日後に得られた胚盤胞期胚を遺伝子発現解析に用いた。

2.2　ALA処理が胚盤胞期胚における各種遺伝子の発現状況に及ぼす影響の評価

胚盤胞期胚からの総RNA抽出はダイレクト法[4]で行った。各処理区10個の胚盤胞期胚を１群とし，RNase Inhibitorならびにジチオスレイトールを添加したRNA保存液とともにマイクロチューブに加えた。その後，速やかにマイクロチューブを液体窒素中に浸漬することで，細胞を急速凍結破壊し，総RNA抽出液を作製した。総RNA抽出液は，使用するまで－80℃バイオフリーザーで凍結保存した。逆転写（RT）反応にはQuantAccuracy®，RT-RamDA® cDNA Synthesis Kit（TOYOBO）を用いた。0.2mlの８連チューブに，１つのチューブあたりLysis Buffer　2.0μl，Lysis Enhancer　0.45μl，RNase Inhibitor　0.05μl，Nuclease free water　0.5μl，総RNA抽出液2.0μlを加え（計5.0μl），TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice™ Touch （Takara Bio）にて熱変性反応［熱変性（75℃・90秒），冷却（４℃）］を行った。熱変性反応後，１つのチューブあたりRT-RamDA® Buffer 1.2 μl，gDNA Remover 0.45 μl，RT-RamDA® Enzyme Mix 0.5 μl，RT-RamDA® Primer Mix 0.5 μl，Nuclease free water 1.35 μlを加え（計9.0 μl），RT-RamDA®反応［プライミング１（25℃・10分），プライミング２（30℃・10分），逆転写および増幅（37℃・30分および50℃・５分），不活化

© The Ito Foundation

（98℃・５分），冷却（４℃）］を行い，cDNAを合成した。RT産物は使用するまで－20℃バイオフリーザーで凍結保存した。定量PCR反応には，THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix（TOYOBO）を用いた。0.1mlの８連チューブ（NIPPON Genetics）に，１つのチューブあたり滅菌蒸留水3.0 μl，各遺伝子のプライマーミックス1.2 μl，THUNDERBIRD® Next SYBR® qPCR Mix 5.0 μl，RT産物0.8 μlを加え（計10 μl），StepOnePlus™リアルタイムPCRシステム（Applied Biosystems）にて，以下の条件でPCR反応を行った。すなわち，Pre-incubation（95℃・２分）の後，熱変性（95℃・10秒），アニーリング（55℃・15秒），伸長反応（72℃・30秒）の条件で40サイクル行った。評価対象として検討した遺伝子のオリゴヌクレオチドプライマーの配列は**Table 1** に示した。PCR終了後，データの解析はStepOne™ Software（Applied Biosystems, Ver. 2.3）を用いてΔΔCt法で行った。ハウスキーピング遺伝子である *β-actin* で正規化することでΔCt値，ΔΔCt値を求め，相対的な遺伝子発現は $2^{-\Delta\Delta Ct}$ の計算式によって算出した。なお，各遺伝子のPCR反応の特異性を評価するために，PCR産物は電気泳動して，各遺伝子の増幅産物長を確認した（**Fig. 1**）。

2.3　統計解析

得られたデータの統計解析は，４Stepエクセル統計（オーエムエス出版）を用いて，スチューデントのｔ検定を行った。

３．結果と考察

本研究では，体外成熟培養過程における50 μMのALA処理がIVFに由来する胚盤胞期胚の遺伝子発現状況に及ぼす影響を評価した。その結果，アポトーシス抑制遺伝子である *BCL2* および *BIRC5*，抗酸化関連遺伝子である *GPX1*，発生能促進遺伝子である *GLUT1* において対照区と比較して有意（$p<0.05$）に高い発現量が示された。また，細胞分化関連遺伝子である *CDX2*，*SOX2* および *OCT4* においても有意な差はみられなかっ

Table 1　Sequence of the primers for gene expression analysis by real-time RT PCR.

Gene	Primer sequence（5'-3'）	Product size（bp）	Accession No.
BAX	Forward：TCTGACGGCAACTTCAACTG	135	NM_173894
	Reverse：TCGAAGGAAGTCCAATGTCC		
BCL2	Forward：GTCAACCGGGAGATGTCG	163	NM_001166486.1
	Reverse：GACAGCCAGGAGAAATCAAACA		
BIRC5	Forward：CCTGGCAGCTCTACCTCAAG	233	AY606044
	Reverse：GAAAGCACAACCGGATGAAT		
GPX1	Forward：GGACTACACCCAGATGAATGAC	132	NM_174076.3
	Reverse：TACTTCAGGCAATTCAGGATCTC		
SOD2	Forward：GACGCTTACAGATTGCTGCTTGT	127	NM_201527.2
	Reverse：TCGGGCCTGACATTTTTATACTG		
CDX2	Forward：GCCACCATGTACGTGAGCTAC	140	NM_001206299
	Reverse：ACATGGTATCCGCCGTAGTC		
SOX2	Forward：ATGATGGAGACGGAGCTGAA	113	NM_001105463
	Reverse：GGGCTGTTCTTCTGGTTGC		
OCT4	Forward：AGGTGTTCAGCCAAACGACTAT	145	NM_174580
	Reverse：GTCTCTGCCTTGCATATCTCCT		
GLUT1	Forward：CAGGAGATGAAGGAGGAGAGC	258	M60448.1
	Reverse：CACAAAATAGCGACACGACAGT		
β-actin	Forward：CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT	178	NM_173979.3
	Reverse：GGGCAGTGATCTCTTTCTGC		

© The Ito Foundation

Fig. 1　Electrophoretic images of PCR products of various genes. *M* indicates a 100 bp DNA marker.

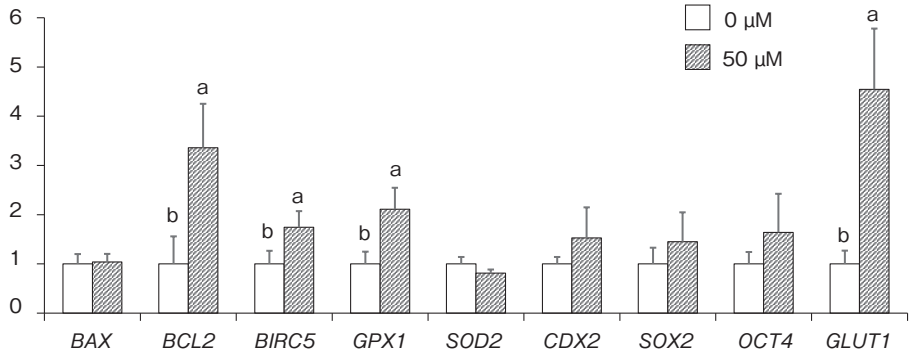

Fig. 2　Effect of *α*-lipoic acid treatment during *in vitro* maturation on the expression of various genes in blastocysts.
Data are mean ± SEM values.
[a–b]Different superscripts indicate a significant difference ($p<0.05$).

たが，50 μM ALA処理区において増加する傾向がみられた（**Fig. 2**）。

通常，抗アポトーシスタンパク質として作用するBCL2やBCL-XLなどは，アポトーシスを促進させるBAXやBAKに結合することによって活性を阻害し，アポトーシスを抑制する[5]。一方で，アポトーシス阻害タンパク質の一種であるBIRC5は，BCL2やBCL-XLとは作用機序が異なり，カスパーゼを認識して結合することで，カスパーゼの活性を阻害し[6]，アポトーシスを引き起こすカスパーゼカスケードを抑制する。同じく抗酸化剤として作用するメラトニンを添加した先行研究では，*BAX*に有意な差はみられなかったものの，*BCL2*において有意な発現量の増加が認められ，胚盤胞形成率の有意な改善が報告されている[7]。そして，本研究結果は，遺伝子発現状況や胚盤胞形成率において有意な改善が認められた先行研究の結果[7]と一致した。したがって，酸化ストレスの要因となる活性酸素種（ROS）の分解が促進され，アポトーシスの発生を抑制したことが考えられ，ALA処理においても同様の抗酸化作用が機能した可能性が示唆された。一方で，*GPX1*と

© The Ito Foundation

*SOD2*に関しては，どちらもROSを分解する酵素の発現に関与し，酸化ストレスの軽減に関連している[8]。本研究では，*GPX1*においてのみ有意な増加が認められた。したがって，成熟培養過程で生じたROSの分解に寄与し，さらには，発生培養過程で生じた酸化ストレスについても軽減した可能性が高い。我々は，成熟培養過程におけるALA処理が，胚盤胞期胚における総細胞数の増加に影響を及ぼすことやアポトーシス細胞割合が減少傾向を示すことを明らかにしている[2]。したがって，アポトーシス抑制遺伝子である*BCL2*，*BIRC5*ならびに*GPX1*の発現量が有意な増加を示したことは，これまでの定性的な蛍光観察結果と一致する結果となった。一方で，これまでに胚盤胞期胚における*SOD2*の発現量は，ミトコンドリア活性と相関があり[9]，受精卵の品質とも関連性がある[10]ことが示されている。そして，我々は，これまでに50 μMのALA処理によって，ミトコンドリア活性が有意に増加することを明らかにした[3]。しかし，本研究では，*SOD2*の発現量とミトコンドリア活性に明確な相関はみられなかった。その理由は明らかではないが，今後，改めて検討すべき課題であると考える。

哺乳動物細胞では，原形質膜を通過するグルコース輸送は２通り存在し，そのうちの一つが促進的グルコース輸送を介した受動的なエネルギー非依存性輸送である。哺乳動物の胚では，*GLUT1*遺伝子は最も広範囲に分布するGLUTアイソフォームであり，胚の収縮後は，主要なエネルギー基質となり，GLUT1～３などの促進的グルコース輸送体を介して取り込みが調節される。特に，受精卵における細胞内グルコースの取り込みはGLUT1によって媒介され，その発現は着床前の全期間にわたって確認されている[11, 12]。また，Pantaleonらは，初期胚発生に重要な調節因子としてのグルコース輸送体の重要性を明らかにしており，その下方制御は，受精卵における細胞数の減少をもたらすことを示している[13]。したがって，本研究において*GLUT1*の発現量の有意な増加は，50 μMのALA処理によって，胚盤胞形成率が有意に増加した結果[2]と一致し，胚盤胞期胚の総細胞数の増加に寄与したことが明らかとなった。

ウシ受精卵において，内部細胞塊（ICM）に分化するためには*SOX2*や*NANOG*といった細胞分化関連遺伝子が関与しており，栄養外胚葉（TE）への分化には*CDX2*が関与している[14]。また，*OCT4*に関しては，ウシIVF卵ではICMとTEのどちらからも発現する細胞分化関連遺伝子である[14]。したがって，50 μMのALA処理によって，これらの遺伝子の発現量が増加傾向を示したことは，ICMとTEの両細胞数の増加に寄与した可能性を示している。加えて，体内受精卵はIVF卵と比較して，*SOX2*と*OCT4*の発現量が多いことが報告されている[15, 16]，特に，ウシでは，形態的に品質の良い胚盤胞は品質の悪い胚盤胞と比較して*GPX1*や*BCL2*，*SOX2*などの発現量が高いことが示されており[10, 17]，本研究結果より，50 μMのALA処理によって得られた胚盤胞の品質が向上していることが示された。さらに，*SOX2*および*OCT4*の発現量が増加傾向を示したことから，培養環境がより改善され，体内受精卵により近い品質のIVF卵を作出できたと考えられる。

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を目的として，IVFに由来する胚盤胞期胚の品質改善効果を分子生物学的に解析した。

その結果，体外成熟培養過程における50 μMのALA処理によって，胚盤胞期胚における抗アポトーシス関連遺伝子である*BCL2*，*BIRC5*および

© The Ito Foundation

*GPX1*遺伝子の発現量が有意に増加した。一方で，アポトーシス促進遺伝子である*BAX*や抗酸化ストレス作用を有する*SOD2*遺伝子に差はみられなかった。また，発生能関連遺伝子である*GLUT1*は，50 μMのALA処理によって有意に増加し，*CDX2*，*SOX2*および*OCT4*遺伝子においても，差はみられなかったものの対照区と比較して増加する傾向を示した。

結論として，本研究は，ALA処理によるウシIVF卵生産効率および品質の改善効果を分子生物学的に解明でき，ウシIVF卵生産技術の高度化に向けて新たな知見を提供する。本研究で得られた新知見は，抗酸化剤としてのALAを用いたウシIVF卵生産研究の基盤となり，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） 日巻武裕，中川裕喜，多治見弘史：公益財団法人伊藤記念財団　令和３年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，**40**，217～223，2022.
4） Klebe, R. J., Grant, G. M., Grant, A. M., Garcia, M. A., Giambernardi, T. A., Taylor, G. P.：*Biotechniques*, **21**，1094～1100，1996.
5） Peña-Blanco, A., García-Sáez, A. J.：*FEBS J*, **285**，416～431，2018.
6） Kawamura, K., Sato, N., Fukuda, J., Kodama, H., Kumagi, J., Tanikawa, H., Shimizu, Y., Tanaka, T.：*Dev Biol*，**156**，331～341，2003.
7） Pang, Y., Zhao, S., Sun, Y., Jiang, X., Hao, H., Du, W., Zhu, H.：*Anim Sci J*，**89**，648～660，2018.
8） Guérin, P., El Mouatassim, S., Ménézo, Y.：*Hum Reprod Update*，**7**，175～189，2001.
9） Rizos, D., Lonergan, P., Boland, M. P., Arroyo-García, R., Pintado, B., de la Fuente, J., Gutiérrez-Adán, A.：*Biol Reprod*，**66**，589～595，2002.
10） Cebrian-Serrano, A., Salvador, I., García-Roselló, E., Pericuesta, E., Pérez-Cerezales, S., Gutierrez-Adán, A., Coy, P., Silvestre, M. A.：*Reprod Domest Anim*，**48**，331～338，2013.
11） Lequarre, A. S., Grisart, B., Moreau, B., Schuurbiers, N., Massip, A., Dessy, F.：*Mol Reprod Dev*，**48**，216～226，1997.
12） Bertolini, M., Beam, S. W., Shim, H., Bertolini, L. R., Moyer, A. L., Famula, T. R., Anderson, G. B.：*Mol Reprod Dev*，**63**，318～328，2002.
13） Pantaleon, M., Ryan, J. P., Gil, M., Kaye, P. L.：*Biol Reprod*，**64**，1247～1254，2001.
14） Ozawa, M., Sakatani, M., Yao, J., Shanker, S., Yu, F., Yamashita, R., Wakabayashi, S., Nakai, K., Dobbs, K. B., Sudano, M. J., Farmerie, W. G., Hansen, P. J.：*BMC Dev Biol*，**12**，33，2012.
15） Magnani, L., Cabot, R. A.：*Mol Reprod Dev*，**75**，1726～1735，2008.
16） Purpera, M. N., Giraldo, A. M., Ballard, C. B., Hylan, D., Godke, R. A., Bondioli, K. R.：*Mol Reprod Dev*，**76**，783～793，2009.
17） Velásquez, A. E., Veraguas, D., Cabezas, J., Manríquez, J., Castro, F. O., Rodríguez-Alvarez, L. L.：*Zygote*，**27**，398～404，2019.

© 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―（Ⅲ）

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

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)

In cattle, prostaglandin F2α (PG) is one of the most important drugs for estrous synchronization, because injection of PG induces luteal regression. However, the early-stage corpus luteum (CL) during almost five days after ovulation does not regress by PG injection (PG resistance). The precise mechanisms of PG resistance are still unclear. It is necessary to investigate the mechanisms of the formation of CL for clarify the PG resistance, because PG resistance is limited during CL formation. The present study is conducted to examine the effects of hypoxia on the mRNA expressions in the luteal cells isolated just after ovulation (Day 0 luteal cells) by RNA-Seq analysis. The effect of the stimulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor (LH/CGR) is also examined, because LH is related to luteinization. RNA-Seq analysis revealed that hypoxia induces signals for inflammation (cytokines and activation of leukocytes), assembly and movement of cells as well as angiogenesis in Day 0 luteal cells. The crosstalk between the signals from hypoxia and from LH/CGR was not found in the present study. Further studies investigating the roles of these hypoxia-induced signals in luteal formation is needed to reveal the mechanisms of PG resistance in cattle.

1．目　的

黄体は，哺乳動物の卵巣において排卵後の卵胞から形成され，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，初期黄体細胞は低酸素環境に曝されている[1)]。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いる[2)]。これまで我々はウシの初期黄体においてHIF1の機能することを明らかにし[1, 3)]，HIF1の制御下にある血管新生因子VEGF[1)]，糖輸送担体GLUT1[4)]およびアポトーシスとオートファジーの制御に関わるBNIP3[5)]が黄体の形成に関係することを示してきた。しかし，排卵後黄体細胞に分化しつつある卵胞の顆粒層細胞と卵胞内膜細胞が最も低酸素環境に晒され，細胞内で低酸素環境に

© The Ito Foundation

起因するシグナルが最も活性化すると考えられる排卵直後における状況の解析は未然であった。

本研究では，ウシ初期黄体におけるPG抵抗性を解明する一環として，ウシの黄体形成における低酸素環境の関わりをより詳細に明らかにする目的で，これまでに報告のない排卵直後の黄体細胞（Day 0黄体細胞）の単離を試みた。さらに，このDay 0黄体細胞を用いて，1）低酸素環境および，2）排卵や黄体化に関わると考えられる黄体形成ホルモン受容体（LH/CGR）刺激の影響について，相互作用も含めて網羅的に調べた。

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排卵直後の初期黄体（Day 0黄体）を有する卵巣（**Fig. 1**）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　Day 0黄体細胞の遺伝子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

Day 0黄体を有するウシ卵巣において，卵巣動脈に組織融解液（collagenase type 1，3,300 unit/ml，38℃，40 min.）を還流させることによって，Day 0黄体細胞を単離した。単離した細胞を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，我々の既報と同様に[1]，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6時間培養した。

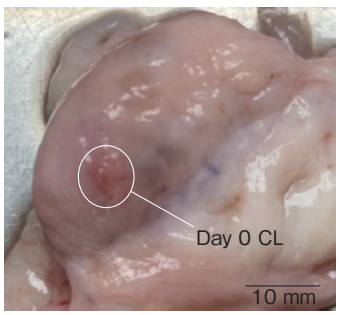

Fig. 1　Bovine ovary with ovulated follicle（Day 0 corpus luteum［CL］）

2.3　total RNAの抽出とRNA-seqライブラリーの作成

2.2において6時間培養したDay 0黄体細胞にQIAzoI Lysis Reagent（#79306，QIAGEN, Inc.）とステンレス球（Φ 5 mm；#AB68220W03，TAITEC，Inc.）を加え，ビーズ破砕機（μT-12, TAITEC, Inc.）にてホモジェネート（3,200rpm, 30 sec.）した。その後，RNeasy Plus Universal kit（#73404，QIAGEN, Inc.）を用いてtotal RNAを抽出した。total RNA（100 ng）から，NEBNext Poly（A）mRNA Magnetic Isolation Module（#E7490, New England BioLabs（NEB）, Inc.）と NEBNext Ultra Ⅱ RNA Library Prep kit for Illumina（#E7770, NEB, Inc.）を用いてpoly（A）RNAの抽出と断片化を行った。

2.4　RNA-Seq　解析

データ解析にはCLC Genomics Workbench（GWB）22.0.1を用い，発現解析にはGWBのRNA-Seq Analysis　2.6ツールを用いてリファレンス配列へのマッピングとタグカウントを行った。リファレンス配列ならびにゲノムアノテーションは，GWBの機能によりEnsemblからダウンロードしたBos taurus（Hereford）ARS-UCDI. 2.97を用いた（http://ftp.ensembl.org/pub/release-97/fasta/bos_taurus/dna/Bos_taurus. ARS-UCD1.2.dna.primary_assembly. l.fa.gz）。

3．結果と考察

本研究では，ウシ初期黄体におけるPG抵抗性を解明する一環として，ウシの黄体形成における低酸素環境の関わりをより詳細に調べることとした。そのため，これまでにいずれの動物種におい

© The Ito Foundation

ても報告のない排卵直後の黄体細胞の単離をウシの卵巣において試み，例数は少ないながら成功した。この細胞を培養し，低酸素環境およびLH/CGRシグナルの影響についてRNA-Seqを用いて網羅的に調べた。

申請者らはこれまで，ウシの黄体形成において低酸素環境が重要な役割を果たすことを示しており，VEGFを中心とした血管新生シグナル，GLUT1による糖輸送，細胞死とオートファジーを調節するBNIP3の関与することを示してきた。本研究の網羅解析において，既報のシグナル以外に，低酸素刺激によって，炎症反応，細胞の組み立て，走化性などのシグナルが増強されることが示唆された（**Fig. 2**）。本研究では，新たに単離

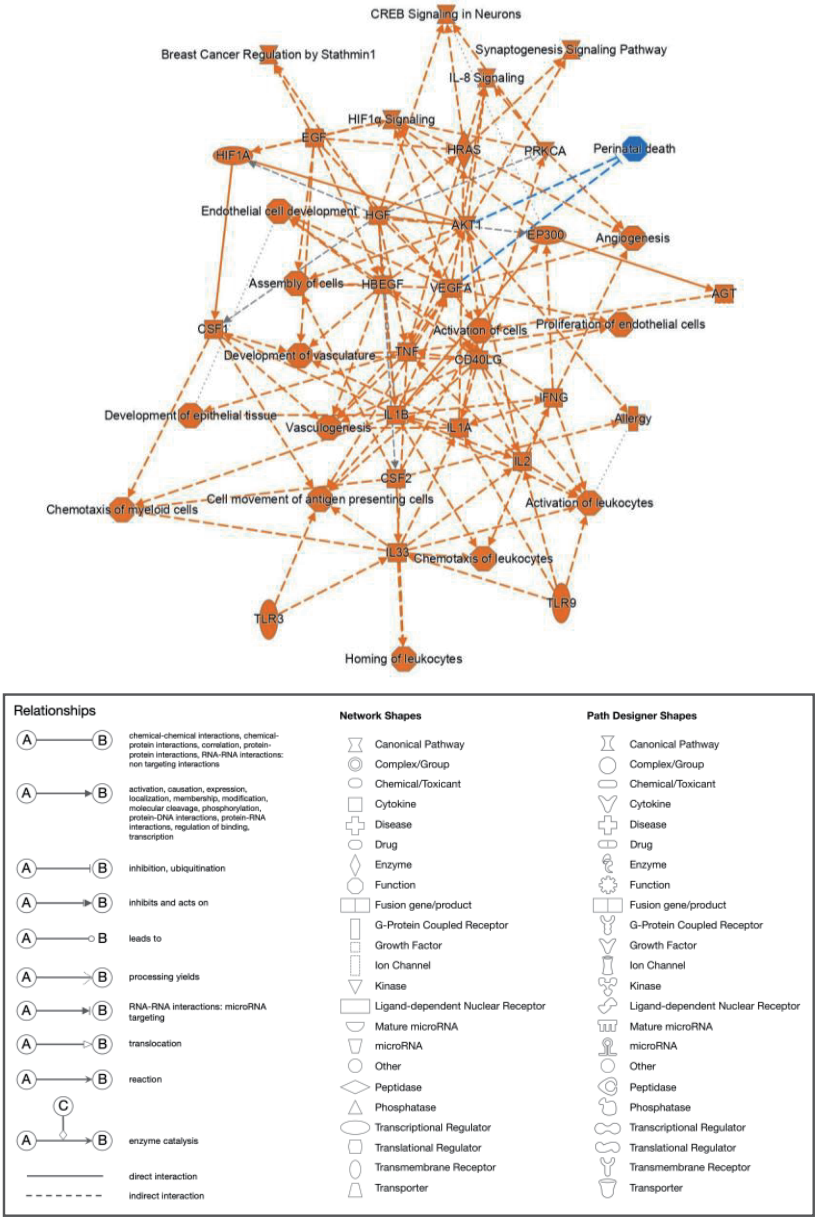

Fig. 2　Hypoxia-related signal in bovine luteal cells just after ovulation

© The Ito Foundation

に成功したDay 0黄体細胞を用いて，新たな低酸素誘導性シグナルを見出した。今後，これらのシグナルと既報のシグナルについてタンパク質レベルで解析し，さらに，成熟した黄体細胞における反応と比較することによって，排卵直後の黄体形成機構がより明確にできると考えられる。引き続き，本研究で見出されたシグナルの黄体形成における役割をさらに詳細に解析し，それぞれの生理的役割を明確にすることで，初期黄体のPG抵抗性の機構が明らかになると考えられる。

本研究においては，低酸素シグナルとLH/CGRシグナルの明確な相互作用は認められなかった。引き続きDay 0黄体細胞の解析を進め，双方のシグナルが独立して黄体形成に寄与するか，あるいは部分的な相互作用を発揮するかについて継続して検討する必要がある。

4．要　約

本研究では，ウシ初期黄体におけるPG抵抗性を解明する一環として，ウシの黄体形成における低酸素環境の関わりをより詳細に調べた。具体的には，これまでにいずれの動物種においても報告のない排卵直後の黄体細胞（Day 0黄体細胞）の単離をウシの卵巣において試み，例数は少ないながら成功した。この細胞を培養し，低酸素環境およびLH/CGRシグナルの影響についてRNA-Seqを用いて網羅的に調べた結果，著者らがこれまでにウシの黄体形成に関与することを示してきたVEGFを中心とした血管新生，GLUT1による糖輸送，細胞死とオートファジーを調節するBNIP3等のシグナル以外に，炎症反応，細胞の組み立て，走化性などのシグナルが低酸素環境により増強されることが示唆された。一方，低酸素環境シグナルとLH/CGRシグナルの相互作用は認められなかった。今後，さらにDay 0黄体細胞における検討を重ね，タンパク質レベルでの解析を進めることで，本研究で見出されたシグナルの黄体形成における生理的役割を明確にし，それらのシグナルと初期黄体のPG抵抗性との関わりを解明する。

文　献

1） Nishimura, R., Okuda, K.：*J Reprod Dev*, **56**, 110～116, 2010.
2） Wenger, R. H.：*Faseb J*, **16**, 1151～1162, 2002.
3） Nishimura, R., Okuda, K.：*J Reprod Dev*, **66**, 307～310, 2020.
4） 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 Sci*, **79**, 1878～1883, 2017.
5） Nishimura, R., Okuda, K., Gunji, Y., Khalid, A. M., Yamano, Y., Yamashita, Y., Hishinuma, M.：*J Vet Med Sci*, **80**, 368～374, 2018.

© 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？（Ⅱ）

Is bovine blood flow involved in the local regulation of endometrial functions？（Ⅱ）

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 aim of this study was to clarify influences of luteal vascularity on endometrial functions. Ultrasound examinations were performed on 8 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. We investigated the CCN1, CCN2, and CCN3 mRNA expressions in endometrial tissue. Plasma and endometrial P_4 concentrations were measured by enzyme immunoassay analysis. No differences in CL area, CL tissue area, and plasma and endometrial P_4 concentrations were observed between high (HV；n＝4) and low vascularity (LV；n＝4) groups. BFA was greater in HV group than in LV group. There was no significant difference in CCN1 mRNA expressions between the HV and LV groups. *CCN2* was not detected in these groups. In HV group, CCN3 mRNA expressions were higher than those of LV group. Collectively, these results indicate that high vascularity of the CL increase endometrial *CCN3* expressions on Day 7 without increased plasma and endometrial P_4 concentrations, and thereby may 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

© The Ito Foundation

ていない。

令和３年度の伊藤記念財団助成研究によって，発情後７日に黄体血流の多い牛群は少ない牛群に比較して子宮内膜組織において248遺伝子が高発現，138遺伝子が低発現であり，それらの遺伝子は細胞接着，細胞外マトリックス構築および白血球のアポトーシス制御に関する遺伝子群であることが明らかとなった。

本研究では，これらの発現変動遺伝子のうちCCNファミリーに着目した。CCNファミリーは，Cysteine-rich 61（CRY61：CCN1），Connective tissue growth factor（CTGF：CCN2）およびNephroblastoma overexpressed（NOV：CCN3）の頭文字から命名されたタンパク質ファミリーであり，現在６つのメンバーから構成されている[2)]。その多くは細胞外マトリックスに存在し，さまざまな受容体や成長因子と相互作用し細胞の分化，遊走，増殖および接着を制御していると考えられている[2)]。これまで，さまざまな動物種について生殖器におけるCCNファミリーの発現分布，作用ならびに疾患との関連性について検討されている[3, 4)]。特に，CCN1-３は子宮内膜の血管新生作用[5)]，胚の子宮内膜への接着[6)]や胎盤形成[5)]などへの関与が報告されており，受胎性と関連している可能性がある。昨年度の研究から黄体血流量の多寡がCCNファミリーの遺伝子発現に影響を与えることが推察されたが，これまで黄体血流量との関連性を検討した報告はない。

そこで本研究では，CCNファミリーについてリアルタイムRT-PCR法によりmRNA発現量を定量化し，黄体血流の多寡がCCNファミリーの遺伝子発現に与える影響を検討した。

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８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，同時に黄体側子宮角の子宮内膜組織および血液を採取した。

なお，本研究は岩手大学動物実験委員会の承認を受けて行った（承認番号A202044）。

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。また，BFAに基づき供試牛を血流の多い群（HV，n = ４）と少ない群（LV，n = ４）に分類した。

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/

© The Ito Foundation

Table 1　Primers used in real-time RT-PCR.

Gene	Sequence of primers（5'→3'）	
CCN1	Forward	TGTGGACAGCCGGTGTACAG
	Reverse	GGACTTCTTGGTCTTGCTGCAT
CCN2	Forward	TCCCACGGAGGGTCAAACT
	Reverse	CATCACGGGACACCCATTC
CCN3	Forward	GTAGCGATGGCCGATGCT
	Reverse	TGGAACTCCACCTGGATGGT

Table 2　Features of the corpus luteum（CL）in the high（HV）and low（LV）vascularity groups on Day ７.

Item	HV（n = 4）	LV（n = 4）	p value
CL maximum diameter（mm）	23.5 ± 1.1	24.1 ± 1.1	0.81
CL area（mm^2）	357.98 ± 24.30	378.88 ± 23.77	0.58
CL tissue area（mm^2）	336.89 ± 37.85	366.45 ± 18.42	0.80
BFA（mm^2）	88.01 ± 12.30	38.75 ± 2.73	＜0.01

Abbreviation：BFA, blood flow area. All data are represented as the mean ± SEM.

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　total RNAの抽出およびcDNA合成

子宮内膜バイオプシー試料からRNeasy mini Kit（Qiagen，74106）を使用してtotal RNAを抽出した。分光光度計で濃度を測定し，total RNA1 μgからHigh-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit（Thermo Fisher Scientific，4374967）を用いてcDNAを合成した。

2.6　リアルタイムRT-PCR

2.5において作成したcDNAを鋳型としてリアルタイムPCRを行い，子宮内膜組織中のCCN1，CCN2およびCCN3のmRNA発現量を測定した。*GAPDH*の発現量を内部標準として補正し，比較Ct値法によりmRNAの発現量を算出した。本研究で使用した特異的プライマーを**Table 1** に示した。

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（**Table２**）。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。また，BFAは，HV群（88.01 ± 12.30mm^2）とLV群（38.75 ± 2.73mm^2）で有意な差が認められた（p ＜ 0.01）。これらの結果は昨年度と同様であり，両群ともに黒毛和種牛のDay ７の黄体として適正なサイズであった。したがって，供試牛の血流量の差は黄体サイズを反映しているものではないと考えられる。また，ET時（Day ７）のBFAが43.0mm^{2}以下の牛は受胎性が低い[1)]ことから，本研究のLV群はHV群に比較して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**Table３**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

© The Ito Foundation

Table 3 Plasma and endometrial progesterone (P_4) concentrations on Day 7.

Group	P_4 concentrations	
	Plasma (ng/ml)	Endometrium (ng/g)
HV (n = 4)	2.52 ± 0.20	7.87 ± 1.22
LV (n = 4)	2.66 ± 0.31	6.85 ± 0.57

All data are represented as the mean ± SEM.

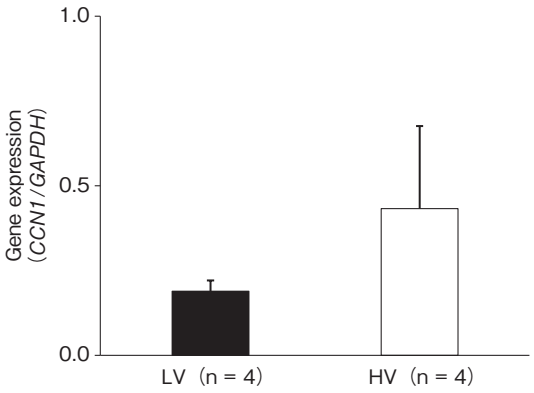

Fig. 1 CCN1 mRNA expression in the endometrium of the high (HV, open bar; n = 4) and low (LV, black bar; n = 4) vascularity groups on Day 7 (Day 0 = estrus).
Data are represented as the mean ± SEM.

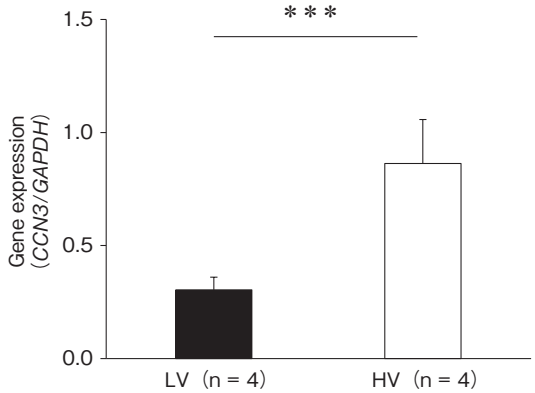

Fig. 2 CCN3 mRNA expression in the endometrium of the high (HV, open bar; n = 4) and low (LV, black bar; n = 4) vascularity groups on Day 7 (Day 0 = estrus).
Data are represented as the mean ± SEM. *** $p < 0.001$

れなかった。これらの結果も昨年度と同様であり，黄体血流量による受胎性制御機構には血漿および子宮内膜組織中P_4濃度は関与していないことが推察された。

3.3 黄体血流量の多寡が子宮内膜組織中のCCN1，CCN2およびCCN3のmRNA発現に与える影響

CCN1 mRNA発現は，両群間で差が認められなかった（**Fig. 1**）。CCN1は，子宮内膜の血管新生[5]，胚の着床，胎子の脳や軟骨形成および血管新生などの胚発生に関与し[7]，*CCN1*欠損マウスでは胎盤の血管形成異常や胚死滅を招くと報告されている[8]。これまで牛の子宮内膜組織におけるCCN1の発現動態に関する報告はないが，本研究の結果より牛の子宮内膜においても発現が認められ，その発現量は黄体血流の多寡による影響を受けないと考えられた。

CCN2 mRNAは両群ともに発現量が低く，検出されなかった。CCN2は，牛において子宮内膜のリモデリングや細胞接着に関与し，妊娠18日に増加することが報告されている[9]。また，発情後５および７日では子宮内膜組織における発現量が低いが13および16日に増加し，胚の伸長や着床を促進することが示唆されている[3]。また，発情後３日から血中P_4濃度を増加させると発情後７日のCCN2 mRNA発現量が増加することも明らかとなっている[3]。本研究では，子宮内膜での発現量が低い時期に子宮内膜組織を採取したこと，血漿中および子宮内膜組織中P_4濃度に両群間で差がなかったことから，HV群・LV群ともに発現量

© The Ito Foundation

が低く検出されなかったと考えられた。

CCN3 mRNA発現は，LV群に比較してHV群において有意に高かった（**Fig. 2** ； $p < 0.01$）。CCN3はヒトにおいて胎盤形成に関与し[10]，発現量の低下が妊娠高血圧症，過剰が癒着胎盤の原因となると考えられている[11]。また，ヒトやラットにおいて血管内皮細胞に作用し血管新生を促進することが知られている[12, 13]。したがって，受胎性の高いHV群では，*CCN3*発現量が高く子宮内膜組織での血管新生が十分に行われ，胚の生存や発育に適した子宮内環境の構築している可能性があると推察した。

以上の結果より，黄体血流量の多寡は子宮内膜組織におけるCCN3 mRNA発現に影響を与えることが明らかとなった。これまで牛の子宮内膜組織のCCN3と受胎性に関する報告はなく，今後サンプル数を増やし解析を進め，CCN3の生理的意義を明らかにする。同時に，他の遺伝子の発現解析を進め，黄体血流による受胎性制御機構を解明する。

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ことを目的として，黄体血流量，血漿・子宮内膜組織中P_4濃度および令和３年度の伊藤記念財団助成研究において発現変動遺伝子として抽出されたCCNファミリーについて解析を行った。発情後７日の血液および黄体側子宮角先端の子宮内膜組織を採取した。黄体血流の多い群（HV群）と少ない群（LV群）について，血漿・子宮内膜組織中P_4濃度およびCCNファミリー（CCN1-３）のmRNA発現量を比較した。その結果，HV群と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。また，CCN1およびCCN2のmRNA発現量には差が認められなかったが，CCN3 mRNA発現はLV群に比較してHV群において有意に高いことが明らかとなった。HV群は受胎性が高くLV群は受胎性が低い牛群であることから，黄体血流量の多寡は子宮内膜組織のCCN3 mRNA発現に重要な役割を果たし，その結果として受胎性に影響を与えている可能性がある。

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） Leask, A., Abraham, D. J.：*J Cell Sci*, **119**, 4803～4810, 2006.
3） Forde, N., Spencer, T. E., Bazer, F. W., Song, G., Roche, J. F., Lonergan, P.：*Physiol Genomics*, **41**, 53～62, 2010.
4） Abudukeyoumu, A., Li, M. Q., Xie, F.：*Am J Reprod Immunol*, 84(2), e13262, 2020.
5） Winterhager, E., Gellhaus, A.：*Cell Mol Life Sci*, **71**, 2299～2311, 2014.
6） Yu, H. N., Li, X. M., Kong, L. L., Ren, J., Wu, H., Bu, L. G., Ding, N. Z., Ni, H.：*Theriogenology*, **153**, 85～90, 2020.
7） Yang, R., Chen, Y., Chen, D.：*Mol Med Rep*, 17(1), ３～10, 2018.
8） Mo, F. E., Muntean, A. G., Chen, C. C., Stolz, D. B., Watkins, S. C., Lau, L. F.：*Mol Cell Biol*, 22(24), 8709～8720, 2002.
9） Klein, C., Bauersachs, S., Ulbrich, S. E., Einspanier, R., Meyer, H. H., Schmidt, S. E., Reichenbach, H. D., Vermehren, M., Sinowatz, F., Blum, H., Wolf, E.：*Biol Reprod*, **74**, 253～264, 2006.
10） Adu-Gyamfi, E. A., Ding, Y. B., Wang, Y. X.：*Biol Reprod*, 102(1), 18～26, 2020.
11） Duan, L., Schimmelmann, M., Wu, Y., Reisch, B., Faas, M., Kimmig, R., Winterhager, E., Köninger, A., Gellhaus, A.：*Front Endocrinol*, **11**, 597549, 2020.
12） Lin, C. G., Leu, S. J., Chen, N., Tebeau, C. M., Lin, S. X., Yeung, C. Y., Lau, L. F.：*J Biol Chem*, 278(26), 24200～24208, 2003.
13） Henort, P., Moisan, F., Laurent, P., Manicki, P., Kaulanjan-Checkmodine, P., Jolivel, V., Rezvani, H. R., Leroy, V., Picard, F., Boulon, C., Schaeverbeke, T., Seneschal, J., Lazaro, E., Taïeb, A., Truchetet, M. E., Cario, M.：*J Invest Dermatol*, 140(7), 1427～1434, 2020.

© The Ito Foundation

小胞体ストレス制御によるウシ体外生産胚の耐凍性向上に関する研究

Study on improvement of cryo-tolerance by controlling endoplasmic reticulum stress in bovine embryos produced *in vitro*

山　中　賢　一
（佐賀大学農学部）

Ken-ichi Yamanaka
(Faculty of Agriculture, Saga University)

In this study, we examined whether the use of embryos produced by endoplasmic reticulum (ER) stress-suppression during *in vitro* maturation (IVM) and *in vitro* culture (IVC) in the slow freezing method can improve their viability after thawing. Tauroursodeoxycholic acid (TUDCA), a selective inhibitor of ER stress inhibitor, was supplemented during IVM, and IVC following *in vitro* fertilization (IVF) for 24 (IVM＋24h) or 48h (IVM＋48h). The number of embryo developed to blastocyst stage was significantly higher in the IVM＋24h group than in the control group. Moreover, the number of blastocysts classified as code1 by IETS criteria was significantly higher in the IVM＋24h group than in the control group, indicating that ER stress suppression improves embryo quality as well as development to the blastocyst stage. Next, survivability and hatchability at 24 hours after thawing were examined. Survivability was significantly higher in both the IVM＋24h and IVM＋48h groups than in the control group, while hatchability was not significantly different among groups. In addition, apoptosis index of blastocysts was significantly lower in both the IVM＋24h and IVM＋48h groups than in the control group. These results indicate that suppression of ER stress can improve the productivity of high-quality embryos with high freezing tolerance, and is expected to contribute to efficient calf production using *in vitro* produced embryos.

1．目　　的

体外受精胚の移植による子牛生産は任意の雌雄個体から優良形質を受け継いだ子牛のより効率的な増産，牛群の遺伝的改良に大きく貢献できる[1)]。加えて，現在，現場レベルでの活用が広まりつつあるゲノム育種価の利用促進にも大いに貢献する。つまり，移植前に体外受精胚においてゲノミック評価を実施することで，選抜圧を高めることや世代間隔の短縮につながり，育種改良の迅速化を図ることができる[2)]。そのため，近年では体外受精胚の移植件数が体内生産胚のそれを上回り，世界で移植されたウシ胚のうち約80％を占めることが報告されている[3)]。一方，体外受精胚は体内生産胚と比較して移植後の受胎率が低いことが知られている。加えて，飼育頭数の限られた我が国の畜産現場では，移植に適した時期のレシピエント牛の選択が困難であるため，胚の凍結保存

© The Ito Foundation

が不可欠の技術として利用されている。しかしながら，体外受精胚は体内生産胚と比較して耐凍性が低く，凍結胚を移植した場合の受胎率は体内生産胚と比較すると10％程度低く，体外受精胚の凍結融解後の生存性や品質を向上させることが長年の課題として残されている[4]。

これまでの研究において，我々は小胞体ストレスの抑制・誘導実験を通じて，小胞体ストレスが体外生産胚における過剰な活性酸素種の産生を引き起こすことで，不適切なレドックス状態を生み出し，結果的にアポトーシスを誘導し，生存性低下の原因となっていることを明らかにした[5,6]。加えて，小胞体ストレスを抑制することによって，体外生産胚の体外発生率のみならず，ガラス化保存後の生存性も向上できることを報告した[6]。一方，現在，ウシ胚の保存は主に緩慢凍結法およびガラス化保存法によって行われているが，両者を比較した場合，保存後の生存性としてはガラス化保存法が優れていることが多くの研究チームによって報告されている[7]。しかしながら，畜産現場での利用を考慮すると，移植用ストローに封入した状態で胚を凍結する緩慢凍結法のほうが融解後そのまま移植を行えるため，実用性が高く，ウシ胚の凍結では主流となっている。

そこで本研究では，これまでの我々の知見を活かして，小胞体ストレス抑制処理を行った胚を緩慢凍結法に用いることにより，融解後の生存性を向上させられるのか？について検証を行った。

２．方　法

2.1　体外受精胚の作製

食肉処理場由来卵巣より，吸引採取法により卵丘卵母細胞複合体（COCs）を採取し，M199培地（Thermo Fisher Scientific）に５％ウシ胎子血清（FBS；Thermo Fisher Scientific），0.02 IU/ml FSH（アントリン；共立製薬）および10 μg/mlゲンタマイシン（ナカライテクス）を加えた培地中で38.5℃，５％CO_2，加湿条件下で22時間体外成熟培養を行った。体外成熟後，COCsはIVF100（機能性ペプチド研究所）で洗浄後，媒精まで38.5℃，５％CO_2，加湿条件下で静置した。一方，精液は人工授精用凍結精液を融解後，90％（v/v）パーコール溶液（GE Healthcare）を用いて800×*g*，10分間の遠心処理を行った。上清を除去した後，IVF100で希釈し，600×*g*，５分間の遠心処理により洗浄した。遠心洗浄後，上清を除去し精子濃度が５×10^6個／mlになるようにIVF100で調製し，38.5℃，５％CO_2，加湿条件下で４時間媒精を行った。媒精後，ピペッティングにより卵丘細胞および精子を完全に取り除くことで裸化を行った。裸化後，受精胚を５％FBSを添加したCR1aa培地で洗浄し，38.5℃，５％CO_2，５％O_2，加湿条件下で８日間体外発生培養を行った。

2.2　胚の緩慢凍結

発生培養後，７または８日に胚盤胞期まで発生した胚のうち，International Embryo Technology Societyマニュアル[8]で定められている基準に従ってCode1および２と評価した胚を実験に供した。緩慢凍結は家畜改良センターのマニュアル[9]に従い行った。胚を基礎液で洗浄後，凍結保存液へ移し，１～２分後にストローへ吸引した。凍結保存液に移してから約15分後に－７℃のプログラムフリーザー（YT Freezer 80；ヤマネテック）へ投入した。２分後に植氷を行い，その温度で13分間保持した後，－0.3℃／分の速度で－30℃まで冷却し，液体窒素中に投入し凍結した。凍結保存後の融解は，液体窒素から取り出したストローを大気中に10秒間保持し，30℃の温湯中で行い，取り出した胚を基礎液に移し10分間平衡後，20％（v/v）FBSおよび0.1mM βMEを添加したM199培地で38.5℃，５％CO_2，５％O_2，加湿条件下で

© The Ito Foundation

回復培養を行った。回復培養24時間後に胚を観察し，生存率および孵化率をそれぞれ算出した。

2.3　胚盤胞期胚の細胞数およびアポトーシス細胞の検出

回復培養24時間後の生存胚におけるアポトーシス細胞をTUNELアッセイキット（In situ Cell Death Detection Kit；Roche）を用いて検出した。4％パラホルムアルデヒド（Sigma-Aldrich）を添加したPBS（−）溶液（pH7.4）で30分間固定した。0.05％ポリビニルピロリドン（PVP；Sigma-Aldrich）を添加したPBS（−）溶液（PVP-PBS）で洗浄後，0.5％TritonX-100（Sigma-Aldrich）を加えたPVP-PBSで20分間透過処理を行った。PVP-PBSで洗浄後，断片化したDNA末端をフルオレセイン-130dUTPにて38.5℃で60分間標識した。PVP-PBSで3回洗浄後，スライドグラスにDAPIを含む蛍光褪色防止液（Vectashield with DAPI；Vector Laboratories）とともにマウントした。蛍光顕微鏡（EVOS-FL；Thermo Fisher Scientific）を用いてTUNEL陽性細胞をアポトーシス細胞として計測し，総細胞数に対する割合をアポトーシス発生率として算出した。

2.4　統計解析

体外発生率，融解後の生存率および孵化率はカイ二乗検定，胚盤胞期胚の細胞数およびアポトーシス率は一元配置分散分析の後，Tukey-Kramer法により試験区間の差の解析を行った。％データは解析の前にアークサイン変換を行った。$p<0.05$の場合を統計的に有意な差が認められると判断した。

3．結果と考察

これまでの我々の研究において，体外成熟または体外発生培養中に小胞体ストレスの抑制剤であるTUDCAを添加することにより，ウシIVF胚の体外発生能が向上することが明らかになっている[5,6]。しかしながら，体外成熟および体外発生の両期間を通じてTUDCAを添加した場合の効果については検証が行われていない。そこで本研究では，まず体外成熟から体外発生を通してTUDCAを添加し，体外発生能の評価を行った。予備実験の結果をもとに，100 μMのTUDCAを添加した培地で成熟を行った後，体外受精で得られた胚を10 μMのTUDCAを添加した培地で24（IVM＋24h区）または48時間（IVM＋48h区）発生培養を行った。その後，TUDCAを含まない培地で培養を継続し，発生培養後2および8日で分割数，胚盤胞期への発生数を計測した。その結果，分割数はいずれの区間でも差は見られなかったが，胚盤胞期への発生数はIVM＋24h区がControl区と比較して有意に高かった（$p<0.05$；**Table 1**）。また，統計的な有意な差は認められなかったが，IVM＋48h区の胚盤胞期への発生数もControl区と比較して高い傾向が見られた（$p=0.067$；**Table 1**）。さらに，胚盤胞期への発生した

Table 1　*In vitro* development of bovine embryos supplemented with and without TUDCA during IVM and IVC

Group*	No. of embryos	No. of ≥ 2-cell embryos（%）	No. of blastocysts（%）	No. of IETS code 1 blastocysts（%）
Control	211	175（85.6）	63（34.3）[a]	48（22.7）[a]
IVM＋24h	115	95（83.8）	51（45.9）[b]	39（33.9）[b]
IVM＋48h	91	79（87.3）	37（41.6）[ab]	30（33.0）[ab]

*ER inhibitor；TUDCA, was supplemented during IVM, and IVC following IVF for 24（IVM＋24h）or 48h（IVM＋48h）.

[a, b]Values with different superscripts within the same column are significantly different（$p<0.05$）.

TUDCA, Tauroursodeoxycholic acid；IVM, *in vitro* maturation；IVF, *in vitro* fertilization；IVC, *in vitro* culture.

© The Ito Foundation

胚のグレードを調べた結果，IETS基準でCode1に分類される胚盤胞期胚への発生数がIVM＋24h区がControl区と比較して有意に高かった（$p<0.05$；**Table 1**）。また，胚盤胞期胚への発生数と同様に，統計的な有意な差は認められなかったが，IVM＋48h区におけるCode1に分類される胚盤胞期胚数もControl区と比較して高い傾向が見られた（$p=0.063$；**Table 1**）。これらの結果は，小胞体ストレス抑制によって胚盤胞期への発生のみならず胚の品質も向上できることを示している。畜産現場においては，通常Code1の胚が凍結保存に用いられるため，小胞体ストレス抑制は凍結可能胚の生産効率の向上にも寄与すると考えられる。体外培養中に産生される活性酸素種は小胞体ストレスを引き起こすとともに，その小胞体ストレス自体が活性酸素種の産生を促す[10]。また，体外成熟中の卵丘細胞は小胞体ストレスへの感受性が高く，卵母細胞の発生能を低下させること[11]，体外発生培養の初期の胚で活性酸素種が増加すること[6]が報告されている。今回，体外成熟または体外発生単独でTUDCAを添加する区を設けていないため，直接的な比較はできないが，これらの知見と今回の結果をあわせると，体外成熟および体外発生初期の両方で小胞体ストレスを抑制することが体外受精胚の発生能向上により効果的である可能性が示された。

凍結融解後24時間での生存率および孵化率を調べた結果，生存率は，IVM＋24h区およびIVM＋48h区ともにControl区と比較して有意に高かった（$p<0.01$；**Table 2**）。一方で，孵化率はいずれの区間においても有意な差は見られなかった。また，凍結融解後24時間で生存していた胚の総細胞およびアポトーシス発生率を調べた結果，総細胞数に関してはいずれの区間においても有意な差は見られなかったが（**Fig. 1**），アポトーシス発生率はIVM＋24h区およびIVM＋48h区ともにControl区と比較して有意に低かった（$p<0.01$；**Fig. 2**）。

胚の凍結保存では，活性酸素の過剰産生が引き起こされ，これによりアポトーシスが誘導されることが知られており，このアポトーシスを抑制することが凍結胚の発生能向上に重要であると考えられている[12]。これらの知見とともに前述したように小胞体ストレスは活性酸素種の産生を促進することが知られているため，小胞体ストレスを抑制した胚では活性酸素種の産生も抑えられた結果，凍結胚におけるアポトーシス発生率が減少するとともに生存率も向上したと考えられた。

4．要　約

本研究では，体外成熟および体外発生培養時に小胞体ストレスを抑制することにより，胚盤胞期への発生および凍結可能胚の生産効率が向上することを示した。また，この培養条件で得られた胚

Table 2　Viability and hatchability following cryopreservation by slow-freezing of bovine blastocysts supplemented with and without TUDCA during IVM and IVC

Group	No. of blastocysts	No. of survived（%）	No. of hatching and hatched（%）
Control	76	36（47.4）[a]	15（19.7）
IVM＋24h	35	26（74.3）[b]	9（25.7）
IVM＋48h	29	24（82.8）[b]	6（20.7）

*ER inhibitor；TUDCA, was supplemented during IVM, and IVC following IVF for 24（IVM＋24h）or 48h（IVM＋48h）.
[a, b] Values with different superscripts within the same column are significantly different（$p<0.01$）.
TUDCA, Tauroursodeoxycholic acid；IVM, *in vitro* maturation；IVF, *in vitro* fertilization；IVC, *in vitro* culture.

© The Ito Foundation

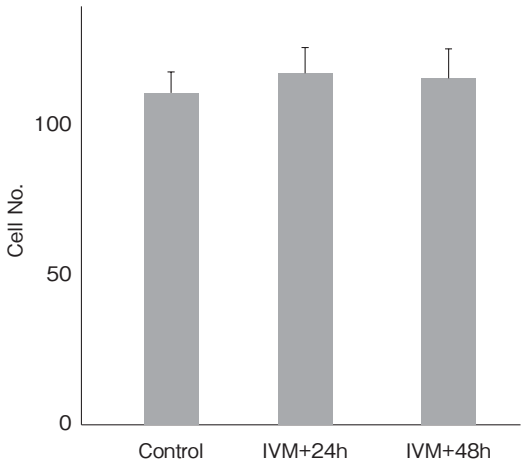

Fig. 1　Total cell numbers of bovine blastocyst after post-thaw culture
Data are shown the mean±standard error. ER inhibitor；TUDCA, was supplemented during IVM, and IVC following IVF for 24（IVM+24h）or 48h（IVM+48h）.

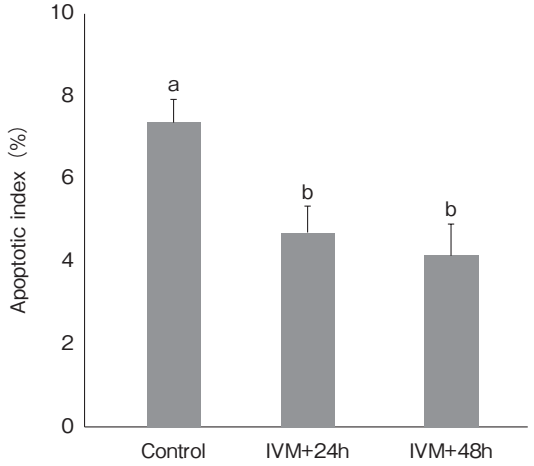

Fig. 2　Apoptotic indexes of bovine blastocyst after post-thaw culture
Data are shown the mean±standard error. ER inhibitor；TUDCA, was supplemented during IVM, and IVC following IVF for 24（IVM±24h）or 48h（IVM±48h）. ^{a,b}different letters denote significant differences（$p<0.01$）.

盤胞期胚を緩慢凍結に用いることで融解後の生存率が向上するとともに，アポトーシス発生率が低下することが示された。これらの結果から，体外培養時の小胞体ストレス抑制は高い耐凍性を有した高品質な胚の生産性を向上させることができ，体外受精胚による効率的な子牛生産に寄与することが期待される。

文　献

1）Ferre, L. B., Kjelland, M. E., Strobech, L. B., Hyttel, P., Mermillod, P., Ross, P. J.：*Animal*, **14**, 991～1004, 2020.
2）Ponsart, C., Le Bourhis, D., Knijn, H., Fritz, S., Guyader-Joly, C., Otter, T., Lacaze, S., Charreaux, F., Schibler, L., Dupassieux, D., Mullaart, E.：*Reprod Fertil Dev*, **26**, 12～21, 2013.
3）International Embryo Technology Society. Data Retrieval Report 2021 Statistics of embryo production and transfer in domestic farm animals, https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2021.pdf
4）Valente, R. S., Marsico, T. V., Sudano, M. J.：*Anim Reprod Sci*, **239**, 106970, 2022.
5）Khatun, H., Wada, Y., Konno, T., Tatemoto, H., Yamanaka, K. I.：*Reproduction*, **159**, 361～370, 2020.
6）Khatun, H., Ihara, Y., Takakura, K., Egashira, J., Wada, Y., Konno, T., Tatemoto, H., Yamanaka, K. I.：*Theriogenology*, **142**, 131～137, 2020.
7）Saragusty, J., Arav, A.：*Reproduction*, **141**, 1～19, 2011.
8）Robertson, I., Nelson, R. E.：Manual of the International Embryo Transfer Society, Fourth edition: 86-105, International Embryo Transfer Society, Savoy, IL, 2010.
9）小林修司：ウシ生体卵子吸引・体外受精マニュアル, 第２版, 19～25, 2009.
10）Yoon, S. B., Choi, S. A., Sim, B. W., Kim, J. S., Mun, S. E., Jeong, P. S., Yang, H. J., Lee, Y., Park, Y. H., Song, B. S., Kim, Y. H., Jeong, K. J., Huh, J. W., Lee, S. R., Kim, S. U., Chang, K. T.：*Biol Reprod*, **90**, 104, 2014.
11）Wu, L. L., Russell, D. L., Norman, R. J., Robker, R. L.：*Mol Endocrinol*, **26**, 562～573, 2012.
12）Vining, L. M., Zak, L. J., Harvey, S. C., Harvey, K. E.：*Theriogenology*, **173**, 93～101, 2021.

© The Ito Foundation

乳牛のルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響

Effect of intraruminal environment in dairy cows on reproductive function through liver inflammation

大滝忠利[1]・閏間英之[2]

（[1]日本大学生物資源科学部獣医学科獣医臨床繁殖学研究室，[2]静岡県畜産技術研究所）

Tadatoshi Ohtaki[1] and Hideyuki Uruma[2]

（[1]Laboratory of Theriogenology, Department of Veterinary Medicine, College of Bioresource Sciences, Nihon University, [2]Shizuoka Prefectural Research Institute）

Measurements of ruminal pH, LPS, and a comprehensive analysis of bacterial flora were carried out to investigate the effects of the rumen environment on reproductive function via liver inflammation. A high pH group with a ruminal pH of 6.4 or higher and a low pH group with a ruminal pH of less than 6.4 at 4 weeks postpartum were compared. Compared to the high pH group, the low pH group showed significantly lower ALB and T-Cho values and significantly higher GGT concentrations. In addition, Hp and SAA concentrations were significantly higher in the low pH group. The incidence of endometritis at 4 weeks postpartum was 0%（0/5）in the high pH group and 33%（1/3）in the low pH group. No clear differences were observed in the ruminal microflora. It was suggested that even under normal rearing conditions, rumen and liver inflammation and accompanying deterioration of liver function may occur in animals with decreased ruminal pH.

1．目　的

乳牛への濃厚飼料の多給はルーメン内の揮発性脂肪酸産生量の増加を引き起こし，その結果，ルーメン内pHが低下することで亜急性ルーメンアシドーシス（SARA）を引き起こす。このSARAに伴いグラム陰性菌が死滅することでエンドトキシン（リポポリサッカライド：LPS）がルーメン液に多量に放出される[1)]。ルーメンLPSは主に第一胃壁から吸収され，門脈を経由して肝臓に到達する[2~4)]。また，第一胃壁や下部消化管の粘膜バリアに損傷があるとルーメン内LPSが血中に多量に移行する[4)]。血液中のLPSは肝臓により解毒されるため[5)]，LPSによる肝機能への関与は重要である。濃厚飼料の多給によるルーメン内LPS濃度上昇は急性期たんぱく質（血清アミロイドA：SAA，ハプトグロビン：Hp）やアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）の上昇など肝機能に悪影響を及ぼす[6)]。

一方，ルーメン内には多種多様な細菌が常在し，代謝物質等の交換などで互いに影響しあうことでルーメン内細菌叢を形成し，それぞれの細菌種が特徴的な生化学性状を持つことで生態的地位を確保し，その総体としてルーメンが機能してい

© The Ito Foundation

る[7~9]。これらの細菌にはそれぞれの至適pHがあり[10]，濃厚飼料の多給によるルーメン内pH低下時には著しい細菌叢の変化が認められる[11]。また，乳量の多い牛は少ない牛に比べて特徴的なルーメン内細菌叢を保有すること[12]，ルーメン内細菌叢と飼料効率との間に相関が認められること[13~16]が報告されており，生産性向上に対するルーメン環境の重要性が注目されてきている。しかし，乳牛におけるこれらルーメン内細菌叢と繁殖機能との関連は明らかとなっていない。

そこで本研究では，ルーメン内pHおよびLPSの測定と細菌叢の網羅的解析を実施し，ルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響を解明することを目的とした。

2．方　法

2.1　供試動物と給与飼料

２産以上（2-5産）のホルスタイン種乳牛８頭を使用した。試験期間は分娩後３日から８週とした。供試牛は，フリーストールで飼養され，給餌は10時と15時にTMR（Total Mixed Ration）により行った飼料乾物中の組成および養分含量を**Table 1** に示した。すべての実験は静岡県畜産技術研究所大動物分野における動物実験実施規程に基づき実施した。

2.2　サンプリング

ルーメン液は，分娩後３日，４週，８週に，朝の給餌前10時にルーメンカテーテル（ルミナ：富士平工業（株），東京，日本）を用いて経口的に採取した。小野寺[17]の方法に従い採取瓶に吸引後，採取液を４重ガーゼで50mlの保存容器に濾過した。また，分娩後１，２，３，４および８週に血液を採取し，採血後速やかに血清を遠心分離した。各サンプルは即日検査を必要とするもの以外は処理後分析に供するまで－30℃で保存した。また，分娩後４週において子宮内膜細胞診を実施した。子宮内膜細胞診は，サイトブラシ（メトリブラシセット牛用，富士平工業（株），東京，日本）を用いて子宮内膜を採取後，スライドガラスに塗抹し，ディフクイック（シスメックス（株），兵庫，日本）染色を行った。サイトブラシによって採取された子宮内膜上皮細胞と多形核白血球数（PMN）からPMNのパーセント（PMN%）を求めた。

Table 1　Ingredients and nutrient composition of diets

Item	% of DM
Ingredient	
FSK mash（Compound feed）	11.5
Corn silage	4.0
Italian ryegrass silage	3.6
Sorghum silage	0.7
Oats hay	1.2
Timothy hay	1.2
Alfalfa hay	0.5
Biophos M[1)]	0.2
Baking soda	0.2
Nutritional composision	
TDN	60.0
CP	13.0
NDF	36.0
NFC	32.0

1) Biophos M ingredients : P, Ca, Mg

2.3　測定項目

2.3.1　ルーメンpHおよびLPS

ルーメン液はpHを測定し，ルーメン液中LPS濃度は，LAL阻害を不活化するためにサンプルを proteinase K（Limulus Amebocyte Lysate，ロンザジャパン（株），東京）による前処理を行った[18]後に，エンドスペシー®ES-50M（生化学工業，東京）を用いて測定した。

2.3.2　血液生化学性状，IGF-1，Hp，SAA，TNF-αおよびIL-6

血液生化学性状として，アルブミン（ALB），総たんぱく質（TP），血中尿素窒素（BUN），非エステル化脂肪酸（FFA），総コレステロール（T-Cho），AST，γ-グルタミントランスペプチ

© The Ito Foundation

ダーゼ（GGT）を測定した。Hp濃度は，中村ら[19]のヘモグロビン結合アッセイにより測定した。また，市販のキットを使用してインスリン様成長因子（IGF-1，IGF-1 Human ELISA kit Quantikine®，R&D systems Inc.，U.S.A），SAA（Multispecies SAA ELISA kit，Tridelta Development Ltd.，Poland）），TNF-α（ELISA Kit for Tumor Necrosis Factor Alpha，Cloud-Clone，中国）およびIL-6（IL-6 Bovine Uncoated ELISA Kit，Invitrogen，U.S.A）を測定した。

2.3.3　細菌叢解析

分娩後４および８週のルーメン液をDNA抽出キット（QIAamp DNA Stool Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany）を用いてDNAを抽出した。抽出したDNA溶液について，16S rRNAのV3-V４領域を増幅し，Miseq（Illumina, San Diego, Ca, USA）による高速シーケンシングを実施した。解析したシーケンスデータは，16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し，EzBioCloud（https://www. ezbiocloud.net/）を用いて各菌種の基準株の配列と比較した。得られたOTUに対し，細菌種の多様性の解析を行った。

３．結果と考察

分娩後４週における子宮内膜細胞診にて，子宮内膜炎牛が１頭のみであり，ルーメン内LPS濃度の各個体による差が認められなかった。このことから，分娩後４週におけるルーメンpHが6.4以上の高pH群（n＝5）と6.4未満の低pH群（n＝3）にて群分けを行い，解析した。

まず，ルーメン内pH，LPSの推移を**Fig. 1** に示した。ルーメン内LPS濃度は，低pH群で高値を示したが，有意な差は認められなかった。次に，各群の分娩後の血液生化学性状とIGF-１濃度の推移を**Fig. 2** に示した。TP濃度は低pH群で有意に高値を示し（$p<0.01$），ALB濃度は低pH群で有意に低値を示した（$p<0.05$）。BUN濃度は低pH群で有意に低値を示した（$p<0.01$）。T-Cho濃度は低pH群で有意に低値を示した（$p<0.01$）。GGT濃度は低pH群で有意に高値を示し（$p<0.05$），週と群で交互作用が認められた（$p<0.05$）。それ以外の血液生化学性状については，明らかな差は認められなかった。IGF-１濃度は低pH群で有意に高値を示し（$p<0.05$），週と群で交互作用が認められた（$p<0.05$）。

急性期たんぱく質および炎症性サイトカインの推移を**Fig. 3** に示した。Hp濃度は低pH群で有意に高値を示した（$p<0.01$）。SAA濃度は低pH群で有意に高値を示し（$p<0.01$），週と群で交互作用が認められた（$p<0.05$）。TNF-αおよびIL-６

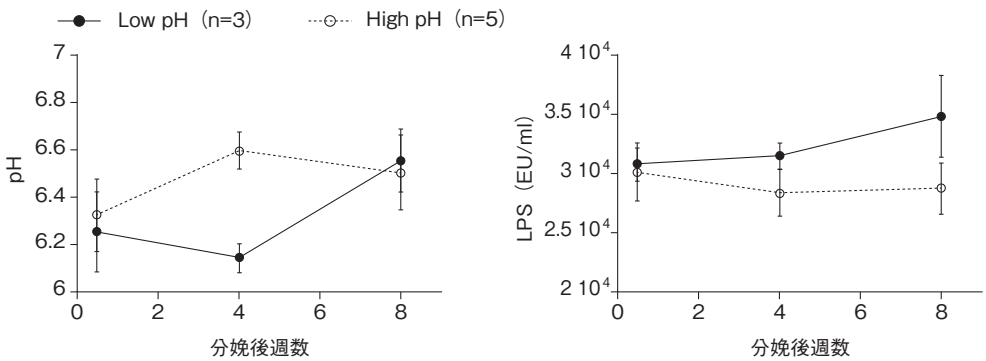

Fig. 1　Postpartum changes in ruminal pH and LPS.
Error bars indicate SEM.

© The Ito Foundation

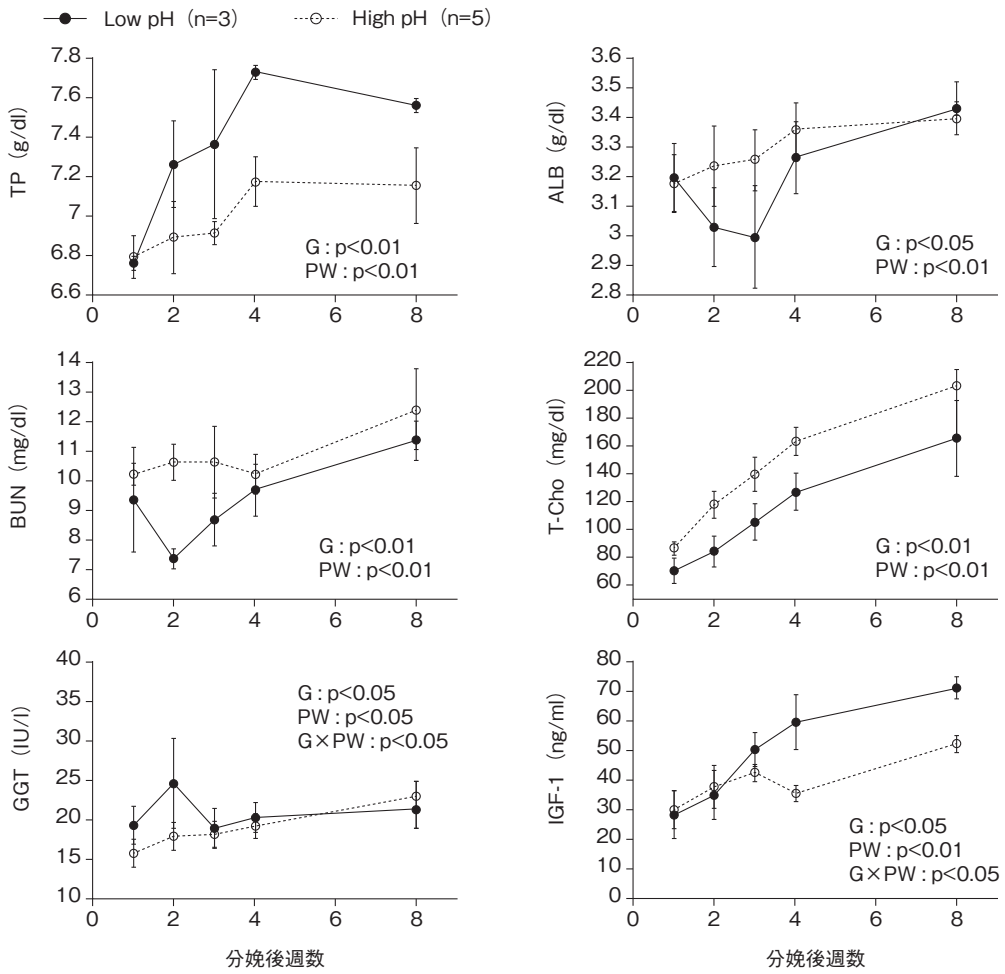

Fig. 2　Changes in postpartum blood biochemistry and IGF-1 concentration in high（n＝5；open circle）and low pH groups（n＝3；filled circle）. Error bars indicate SEM.

濃度には明らかな差は認められなかった。

Dubucら[20]の報告に従い，PMN％が６％を超えるものを子宮内膜炎と診断した時，分娩後４週における子宮内膜炎の発症は，高pH群で０％（0/5），低pH群で33％（1/3）であった。

分娩後４週および８週の細菌属構成比を**Fig. 4**に示した。属レベルでは*Prevotella*属が共通して多くを占有した。分娩後４週および８週それぞれの時期で，低pH群と高pH群との間にα多様性（OTU 数，Chao1，Shannon index，Simpson index）に有意な差は認められなかった。一方，α多様性においては，低pH群の分娩後４週と８週のSimpson indexにのみ差がある傾向が認められた（p＝0.05）。すなわち，低pH群でのみ分娩後の経過に伴い，主要な種類の細菌の均等度が低下していた。

分娩後４週および８週のルーメン性状と血液生化学性状および急性期たんぱく質，炎症性サイトカインの相関を調べたところ，分娩後４週において，ルーメン内LPS濃度とALB濃度に有意な負の相関が認められた（$\rho = -0.74$，$p<0.05$）。また，分娩後８週では，ルーメンpHとASTとの間に有

© The Ito Foundation

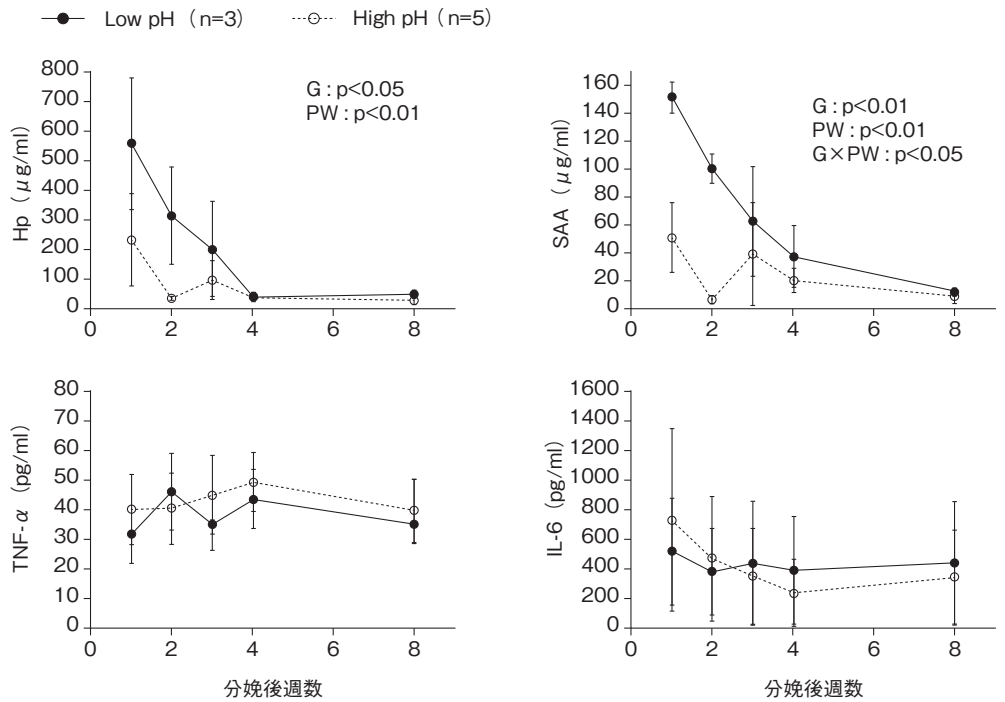

Fig. 3　Changes in postpartum acute phase protein and inflammatory cytokine concentration in high（n＝5；open circle）and low pH groups（n＝3；filled circle）. Error bars indicate SEM.

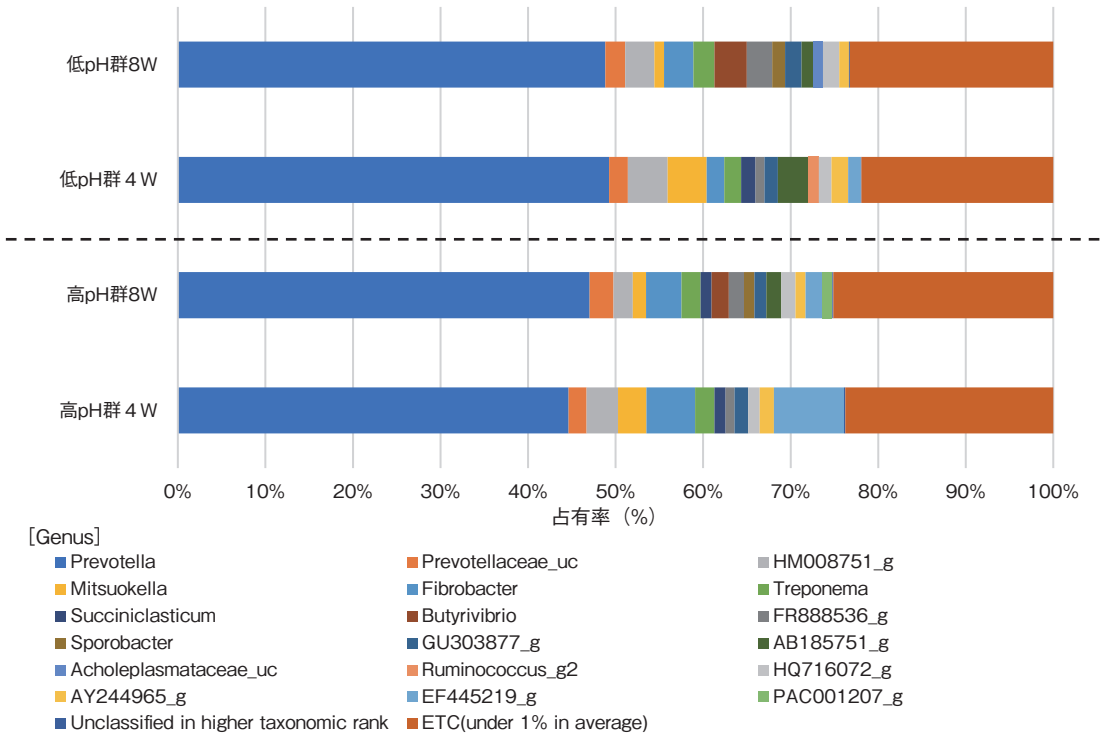

Fig. 4　Occupancy of the ruminal bacterial genus in high and low pH groups.

© The Ito Foundation

意な負の相関（$\rho = -0.72$，$p<0.05$）が認められた。

本研究では，低pH群において血中ALB濃度の低下が認められた。ALBは，肝臓で合成される血漿たんぱく質の一種であり，牛での半減期が16.5日と比較的長いことからたんぱく質代謝における慢性的な指標とされる[21]。一般に，ALBの減少は食餌性たんぱく質欠乏時に低ALB血症に先行し[21]，ALBレベルが比較的低いことは，利用可能な総たんぱく質が低いことを示している[22]。これにより，病気の発作に対する反応が悪くなり，子宮内膜炎，乳房炎，およびその他の病気が牛に発生する可能性がある。さらに，ALBは反応が遅い負の急性期たんぱく質であり，そのレベルは炎症中に減少することが知られている[23, 24]。炎症の過程では体液とたんぱく質は組織液に移行して浮腫を誘発し，これがALB減少の一因となるとされている[21]。また，低pH群では，急性期たんぱく質であるHpとSAAが高く，肝機能の生化学的指標であるT-Chol，ALBが低く，GGTが高かった。

濃厚飼料の多給は，急性期たんぱく質（SAA，Hp）の上昇などルーメン壁や肝臓の炎症を引き起こすとともに，ASTの上昇など肝機能に悪影響を及ぼすことが報告されている[6, 25]。SARAの定義はルーメン液pHがおおよそ5.6以下となる時間が少なくとも１日に３時間以上継続する状態[25]とされ，本試験では採取時のpHが5.9前後の個体が存在し，SARAとなっている可能性は否定できない。一般的な飼養環境下であっても，ルーメン内pHが低下する個体では，ルーメンおよび肝臓の炎症やこれに伴う肝機能低下が引き起こされる可能性があることが示唆された。

今回，供試頭数が少なく，子宮内膜炎を発症した牛が１頭のみであり，ルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響について，明確な関係性を示すことができなかった。今後は，供試頭数を増やすとともに，採取された肝臓および子宮内膜組織を用いて，炎症性サイトカイン発現のリアルタイムPCRを実施し，さらに精査を行う予定である。

4．要　約

ルーメン内pHおよびLPSの測定とルーメン内細菌叢の網羅的解析を実施し，ルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響を検討した。分娩後４週におけるルーメンpHが6.4以上の高pH群とそれ未満の低pH群で比較をしたところ，高pH群に比べ低pH群では，ALB，T-Choが有意に低値を示し，GGT濃度有意に高値を示した。また，HpとSAA濃度は低pH群で有意に高値を示した。分娩後４週における子宮内膜炎の発症は，高pH群で０％（0/5），低pH群で33％（1/3）であった。ルーメン内細菌叢については明らかな差は認められなかった。一般的な飼養環境下であっても，ルーメン内pHが低下する個体では，ルーメンおよび肝臓の炎症やこれに伴う肝機能低下が引き起こされる可能性があることが示唆された。

文　献

1） Nagaraja, T.G., Bartley, E. E., Fina, L. R., Anthony, H. D., Bechtle, R. M.：*J. Anim. Sci.*, **47**, 226～234, 1978.
2） Gozho, G. N., Krause, D. O., Plaizier, J. C.：*J. Dairy Sci.*, **90**, 856～866, 2007.
3） Khafipour, E., Krause, D. O., Plaizier, J. C.：*J. Dairy Sci.*, **92**, 1060～1070, 2009.
4） Khafipour, E., Krause, D. O., Plaizier, J. C. A.：*J. Dairy Sci.*, **92**, 1712～1724, 2009.
5） Battaglia, D. F., Bowen, J. M., Krasa, H. B., Thrun, L. A., Viguie, C., Karsch, F. J.：*Endocrinology*, **138**, 4273～4281, 1997.
6） Ohtaki, T., Ogata, K., Kajikawa, H., Sumiyoshi, T., Asano, S., Tsumagari, S., Horikita, T.：*J. Vet. Med. Sci.*, **82**, 971～977, 2020.
7） McSweeney, C., Mackie, R.：Microorganisms and ruminant digestion: state of knowledge, trends and

© The Ito Foundation

future prospects, Background study paper No. 61. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), 2012.
8） Nyonyo, T., Shinkai, T., Tajima, A., Mitsumori, M.：Effect of media composition, including gelling agents, on isolation of previously uncultured rumen bacteria, *Lett. Appl. Microl*., **56**, 63～70, 2013.
9） 三森眞琴, 湊一：新ルーメンの世界（板橋久雄編）. p.43～86, 農山漁村文化協会, 東京, 2004.
10） Creevey, C. J., Kelly, W. J., Henderson, G., Leahy, S. C.：*Biotechnol*., **7**, 467～479, 2014.
11） Nagata, R., Kim, Y. H., Ohkubo, A., Kushibiki, S., Ichijo, T., Sato, S.：*J. Dairy Sci*., **101**, 4424～4436, 2018.
12） Tong, J., Zhang, H., Yang, D., Zhang, Y., Xiong, B., Jiang, L.：*PLoS One*, **13**(11), e0198225, 2018.
13） Carberry, C. A., Kenny, D. A., Han, S., McCabe, M. S., Waters. S. M.：*Appl. Environ. Microbiol*., **78**, 4949～4958, 2012.
14） Guan, L. L., Nkrumah. J. D., Basarab, J. A., Moore, S. S.：*FEMS Microbiol. Lett*., **288**, 85～91, 2008.
15） Myer, P. R., Smith, T. P. L., Wells, J. E., Kuehn, L. A., Freetly, H. C.：*PLoS One*, **10**(6), e0129174, 2015.
16） Rius, A. G., Kittelmann, S., Macdonald, K. A., Waghorn, G. C., Janssen, H., Sikkema, E.：*J. Dairy Sci*., **95**, 5024～5034, 2012.
17） 小野寺良次：新編動物栄養試験法（石橋晃監修）, p.407～416, 養賢堂, 東京, 2001.
18） Petsch, D., Deckwer, W. D., Anspach, F. B.：*Anal. Biochem*., **259**, 42～47, 1998.
19） 中村正明, 小山毅, 松井義貴, 平井綱雄, 南橋昭, 中田健, 横田博, 宮本亨：日獣会誌, **65**, 628～688, 2012.
20） Dubuc, J., Duffield, T. F., Leslie, K. E., Walton, J. S., LeBlanc, S. J.：*J. Dairy Sci*., **93**, 5225～5233, 2010.
21） 久保周一郎：獣医臨床生化学　第四版（久保周一郎, 友田勇　監訳）p.153～157, 近代出版, 東京, 1991.
22） Van Sun, R. J.：*Am. Assoc. Bov. Pract*., **37**, 212～213, 2004.
23） Bertoni, G., Trevisi, E., Han, X., Bionaz, M.：*J. Dairy Sci*., **91**, 3300～3310, 2008.
24） Madoz, L. V., Giuliodori, M. J., Migliorisi, A. L., Jaureguiberry, M., de la Sota, R. L.：*J. Dairy Sci*., **97**, 195～201, 2014.
25） Gozho, G. N., Plaizier, J. C., Krause, D. O., Kennedy, A. D., Wittenberg, K. M.：*J. Dairy Sci*., **88**, 1399～1403, 2005.

© The Ito Foundation

豚胚品質の客観的評価法の確立に関する研究

Research on establishment of evaluation method for porcine embryo quality

平　山　祐　理・江　川　紗智子
（独立行政法人家畜改良センター）

Yuri Hirayama and Sachiko Egawa
（National Livestock Breeding Center）

In this study, we observed the developmental kinetics of porcine embryos at the blastocyst stage before vitrification using a time-lapse imaging device and explored the features that affect the viability of embryos after vitrification-warming. Our aim was to develop a system that automatically detects viability-indicating features in order to objectively evaluate the quality of embryos.

In-vivo-derived porcine embryos were observed at 30-minute intervals in individual culture using a time-lapse imaging device (Mil-Cell, Sumitomo Electric Industries, Ltd.). To 4ptimal imaging time, three experimental groups were compared: imaging for 22 to 24 hours (Day 5.0), 14 to 16 hours (Day 5.5), and 4 to 6 hours (Day 6.0). The highest survival rate (26.7%) was achieved in the Day 6.0 group. The group culture under the same conditions resulted in a survival rate of 46.7%, indicating that group culture is necessary even with a short in vitro culture. In Day 6.0 time-lapse images, changes in contraction frequency and strength, blastomere, and embryo volume (The area consist in blastomere and blastocoel) were observed, which did not correlate with viability or the number of viable cells. On the other hand, embryos with a viable cell count of 70 or more tended to show greater volume change ($p = 0.08$) than embryos with a viable cell count of less than 70, indicating the possibility of predicting embryo quality by measuring volume change. Therefore, we used embryo volume change as an index for embryo quality assessment.

For the automatic measurement of the embryo volume, Mask-R-CNN was used to detect the embryo volume area. A rectangle was computed from the detected area. Then, we developed an AI model that can calculate the embryo volume by calculating the diameter of the embryo from the width of the rectangle.

1．目　　的

近年の養豚業界を取り巻く状況は，国内での豚熱の猛威に加え，近隣諸国で発生しているアフリカ豚熱が国内外を脅かしている。これらの伝染性疾病の侵入による遺伝資源の消失は養豚業界にとって大きな損害であり，喫緊に対応すべき課題となっている。この対策として，希少・貴重な遺

© The Ito Foundation

伝資源を伝染性疾患への感染リスクの高い生体ではなく，子豚生産可能な状態であらかじめ超低温保存しておくことの重要性が再認識されてきた。現在，ブタ胚の超低温保存（ガラス化保存）技術や生産現場での胚移植を可能とする非外科移植法の開発が進み，こういった養豚産業の課題に胚移植で対応することが可能になりつつある。

一方，胚の流通の基盤となる胚の品質評価基準は，国際胚技術学会（IETS）により示されている胚の形態を目視により評価する方法であり，術者の熟練が求められる。ブタ胚の流通には，輸送や移植の簡便さからガラス化保存が必須であり，今後の胚移植の産業利用において，ガラス化保存胚の利用を想定した客観的な胚の品質評価法の確立は必要不可欠である。

そこで本研究では，胚の発育動態を経時的に確認可能なタイムラプス撮影装置を用いてガラス化前の胚の発育動態を観察し，ガラス化保存後の胚の生存性に影響を与える要因を探索するとともに，ブタ胚の客観的品質評価を行うための要因選定およびそのスマート化を目指すことを目的とした。

2．方　　法

本実験は，独立行政法人家畜改良センター動物実験実施規程に従って計画し，動物実験委員会の審査・了承を得て行った（承認番号：4-6）。

採取した胚を経時的に短時間観察することで，ガラス化加温後の胚の生存性評価を可能にすべく，指標の探索・選定の後に，選定した指標の自動検知を行った。撮影には，胚を２方向から撮影可能かつ安価なタイムラプス撮影装置（Mil-Cell，住友電気工業株式会社製）を用いた（**Fig. 1**）。

2.1　ブタ体内胚の採取

家畜改良センター本所で飼養している８カ月齢以上の大ヨーク種５頭およびランドレース種８頭，合計13頭の性成熟雌豚を供胚豚として用いた。交配用の精液は，８カ月齢以上の大ヨークシャー種１頭から採取し，モデナ液で希釈後，使用時まで15℃で保存した。供胚豚の排卵誘起は，エストラジオールプロピオン酸エステル（オバホルモンデポー筋注５mg，あすか製薬株式会社）または，エストラジオール安息香酸エステル（動

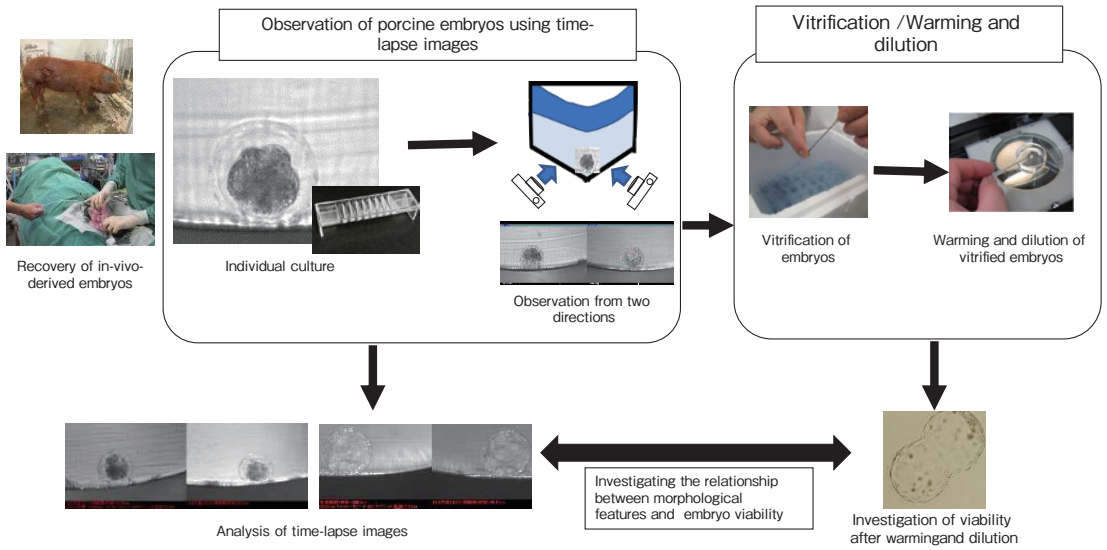

Fig. 1　Analysis of time-lapse images for embryo viability after vitrification

© The Ito Foundation

物用オバホルモン注，あすかアニマルヘルス株式会社）を用いて偽妊娠状態とした母豚を用いる方法[1,2]，もしくは，発情周期の12～14日目にプロスタグランジン製剤（プラネート，MSDアニマルヘルス株式会社）を投与する方法[3]に準じて行った。採胚方法は，豚の胚移植マニュアル[4]に準じて行った。

2.2　胚の培養およびタイムラプス撮影方法

採取した胚日齢に適した発育時期（桑実胚から拡張胚盤胞）の胚のみを供試胚とし，10%子牛血清（CS）を添加したブタ後期胚培養用培地（PBM）を培養液とした。培養容器はタイムラプス撮影装置専用容器と35mmディッシュを用いた。タイムラプス撮影装置専用容器1ウェルにつき100μlの10%CS添加PBMを培地として，1個ずつ個別培養もしくは共培養を行うことで，個別培養と共培養との生存性の比較を行った。さらに，35mmディッシュに50μlの10%CS添加PBMドロップで1個ずつ個別培養を行い，タイムラプス撮影を行わない対照区とした。胚の培養には，採取した胚日齢に応じて，4～24時間培養を行い，その期間中は30分間隔で経時的に胚を撮影した。

2.3　胚のガラス化保存および加温方法

市販のブタガラス化保存液キット（PES-1，2，およびPVS，株式会社機能性ペプチド研究所）およびガラス化デバイス（胚スティック，ミサワ医科工業株式会社）を用いて，胚のガラス化保存を行った[5,6]。胚は培養終了後，ウェルもしくは，ドロップごとに胚のガラス化保存を行い，1カ月以上液体窒素タンクで保管した。ガラス化保存胚は加温・希釈液（PWDS，株式会社機能性ペプチド研究所）で加温・希釈後，10%CS添加PBM培地に移して38.5℃，5%CO_2，5%O_2のインキュベーター内で22～24時間培養した後に胚の生存性および細胞数の確認に供した。

2.4　試験区の設定

タイムラプス撮影装置（Mil-Cell，住友電工株式会社）での体外培養時間の影響を調べるため，体外培養時間を22～24時間行うDay5.0区，14～16時間行うDay5.5区，4～6時間行うDay6.0区の3試験区を設定した。また，培養容器や培養条件の違いによる影響についても調査した。すべての胚は培養後にガラス化した後，加温・希釈して胚を実体顕微鏡下で観察し，胞胚腔の再形成が確認できた胚を生存胚と判定した。生存性を確認した後，一部の胚は細胞数をカウントするため，10μg/ml bisbenzimide（Hoechst 33342, thermofisher）および10μg/ml propidium isodide（PI，thermofisher）により生存細胞と死滅細胞に区別して二重染色した[7]。

3．結果および考察

3.1　タイムラプス撮影に適した胚日齢の検討

胚日齢および培養容器や培養条件の異なる胚のガラス化加温後の生存率の結果を**Table 1**に示した。既報では，胚日齢6日目におけるガラス化保存胚を加温・希釈後，48時間共培養した場合の生存率は88.9%と報告されているが[5]，今回，これらの報告と同胚日齢のDay6.0区において，タイムラプス撮影装置で個別培養した場合の生存率は26.7%で，Day5.5区およびDay5.0区における同培養条件の生存率はそれぞれ14.3および0%であった。また，タイムラプス撮影装置での培養において，共培養した場合の生存率はDay6.0区で46.7%と個別培養に比べて高い生存率を示した。さらに，Day5.5区を35mmディッシュで個別培養を行ったところ，55.6%の生存率であった。これらの結果から，タイムラプス撮影時間が長いほど胚の生存率が低下することが判明し，さらに，本研究で得られた既報より低い生存率は，個別培養およびタイムラプス撮影装置専用容器の影響がある

© The Ito Foundation

Table 1　Survival rates of embryos collected on different days with different culture methods

Experimental group			Survival
Day*1	Culture method	n	(%)
5.0	Individual	10	0
	group	8	12.5
5.5	Individual	35	14.3
	Individual*2	18	55.6
6.0	Individual	45	26.7
	group	15	46.7

*1　5.0：Collected 144 hours after hCG administration.
5.5：Collected 150 hours after hCG administration.
6.0：Collected 162 hours after hCG administration.

*2　Embryos were cultured in 50 μl droplets prepared on 35-mm Petri dishes.

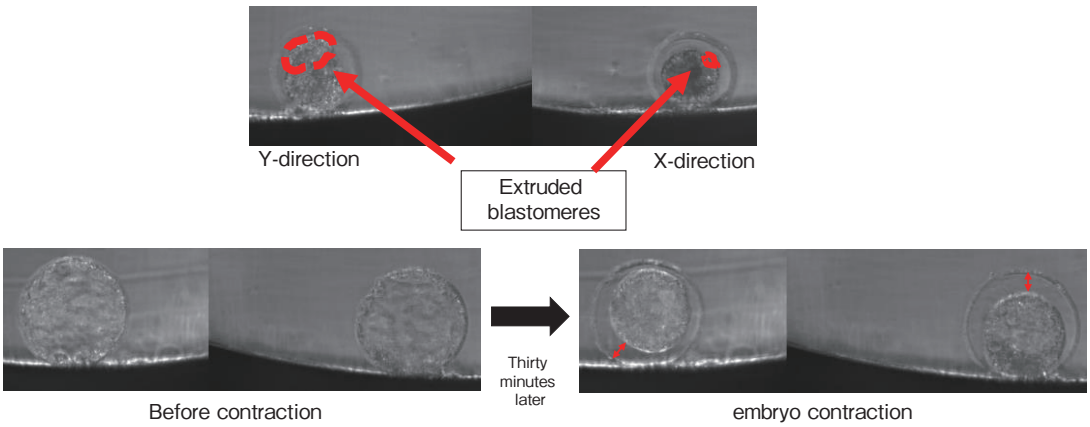

Fig. 2　Time-lapse images

と考えられた。胚は成長因子を放出することが知られているが[8]，胚日齢５および６日目まで体内で発育した胚を短時間，体外培養した場合であっても成長因子をお互いに受容できる共培養が必要である可能性が示唆された。さらに，タイムラプス撮影装置専用容器は２方向からの撮影を行うためにすり鉢状の形状をしている。そのため，胚自身から放出された老廃物が放散されず胚の周囲に残り，胚自身に影響を及ぼしている可能性が考えられる。以上のことから，胚への悪影響を最小限にしつつタイムラプス撮影装置による経時的な胚の発育を観察するため，Day6.0胚を用いて胚の品質評価の要因探索を行うこととした。

3.2　タイムラプス撮影画像による胚の品質評価を行うための要因探索と選定

胚の客観的な品質評価に向けて，胚の発育について経時的に画像取得を行った。これにより，胚の収縮回数やその度合い，分割球，さらに胚の体積として，透明帯の内側の割球と胞胚腔の部分（以下，胚体積）の経時的観察が可能であった（**Fig. 2**）。Day6.0区の胚において，これらの項目を調査したところ，45個の胚のうち，収縮回数や収縮による胚体積の変化（培養終了時胚体積／培養開始時胚体積）を確認できたのは６個，分割球については１個のみで，生存率および生存細胞数との関係はみられなかった。収縮の確認ができな

© The Ito Foundation

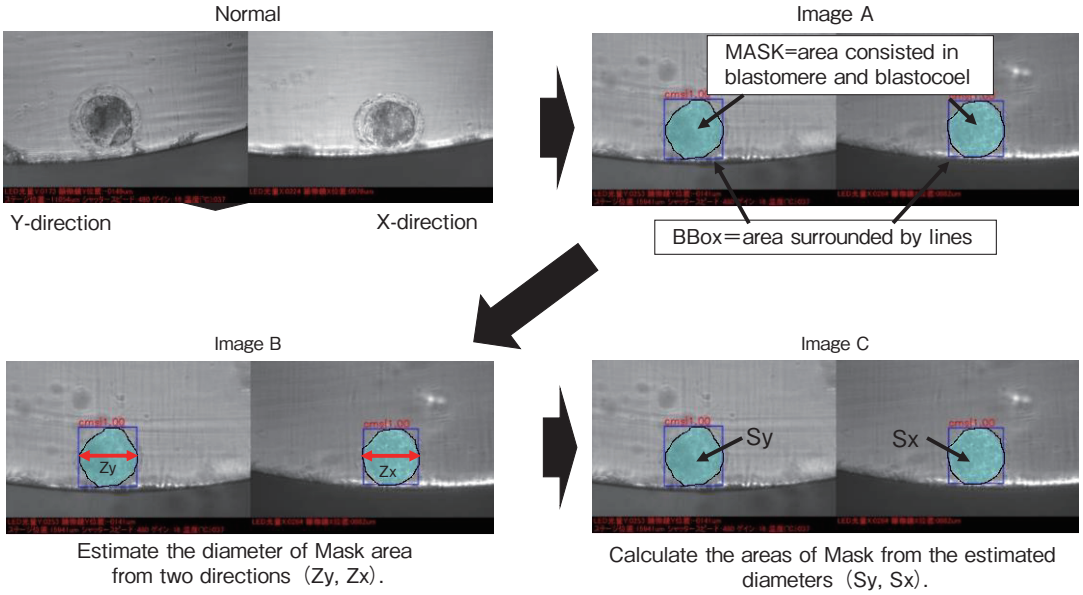

Fig. 3　Automatic detection of estimated embryo volume
Embryo volume consist in blastomere and blastocoel.

かった胚が多かった理由は，培養時間が４～６時間と非常に短いため，胚の収縮周期に当てはまらなかったためと考えられた。次に，生存率と胚体積の変化との関連を調査したところ，有意差はみられなかった。

胞胚腔の再形成が確認できた胚のうち10～24%において，内部細胞塊（ICM）の細胞の輪郭が不明瞭ですでに変性もしくは死滅しつつあると推測されると報告されている[9]。ICMは将来胎仔となる細胞であり，ICMが死滅しているということは産子につながらない可能性があり，そういった胚を生存胚と判定するリスクがある。そこで，より厳密に胚の質を判断するため，生存胚および死滅胚について23個を染色して生存細胞数を計測した。この生存細胞数と体積変化との関連を調査したところ，生存細胞数が70以上の胚は70未満の胚と比べて胚体積の変化が大きい傾向があった（$p = 0.08$）。このことから，胚体積の変化を測定することで加温・希釈後の胚の品質を予測できる可能性が示唆された。

3.3　胚体積を自動で検知するシステムの構築

胚の体積を自動検知するため，領域分割のAI手法であるMask R-CNNを用いた（**Fig. 3**）。胚体積の算出方法は，①タイムラプス撮影装置にて得られた２方向からの撮影画像から胚の領域（Mask）を検出し，Maskから矩形（BBox）を計算，②矩形（BBox）の幅を推定し（A），胚の直径（Zx，Zy）を算出（B），③直径から胚面積（Sx，Sy）を算出（C），④Zx，Zy，SxおよびSyを次の式に代入し，胚体積を算出した。

$$V = \frac{Sy \times Sx}{(Zy + Zx)/2}$$

胚体積自動検知モデルは，タイムラプス撮影画像のうち1128画像を教師データとしてAIモデルの学習を行うことにより構築した。テストデータ112画像に対してモデル精度を求めた結果，BBoxは0.884，Maskは0.907で，モデルで検出した直径とアノテーション時の直径の平均絶対値の誤差であるAvg l1 _lossの値が5.154であったことから，高い精度が得られていることが示された。

© The Ito Foundation

本研究の結果，加温・希釈後の胚の品質を予測するための指標となり得る胚体積を自動検知することが可能となった。今後，共培養条件下での胚体積の自動検知方法を検討してタイムラプス撮影時間の延長を図り，胚の収縮やその度合い，また分割球の確認を指標に加えた客観的な胚の品質評価方法の構築を目指す。

４．要　約

本研究では，胚の発育動態を経時的に確認可能なタイムラプス撮影装置を用いてガラス化前のブタ胚の発育動態を観察し，ガラス化保存後の胚の生存性に影響を与える要因を探索するとともに，ブタ胚の客観的品質評価を行うための要因選定およびそのスマート化を目指した。外科的に採取したブタ体内胚をタイムラプス撮影装置を用い，個別培養にて30分間隔で画像取得した。まず，最適な撮影時間を検討するために，撮影時間を22～24時間（Day5.0区），14～16時間（Day5.5PM区）および４～６時間（Day6.0区）の３試験区を設定した結果，最も高い生存率はDay6.0区の26.7％であった。同条件にて共培養を行った結果では46.7％の生存率であり，短い体外培養時間であっても共培養が必要であることが判明した。次に，Day6.0区におけるタイムラプス画像について胚の品質評価指標を探索したところ，胚の収縮回数やその度合い，分割球，さらに胚体積の変化を確認可能であった。胚の収縮回数や分割球の発生について生存率および生存細胞数との関係を調べたところ相関はみられなかった。一方，生存細胞数が70以上の胚は，70未満の胚に比べて胚体積変化が大きい傾向（$p = 0.08$）があったことから，胚体積変化を測定することで，胚の品質を予測できる可能性が示された。この結果から，胚の品質評価には胚体積変化を指標として用いることとした。

次に，胚体積を自動検知する方法として，領域分割のAI手法であるMask R-CNNを用いて胚の領域を検出した。検出した領域から矩形を計算し，その矩形の幅を推定した。推定した矩形の幅から胚の直径を算出することで面積を求め，さらに胚体積を算出できるAIモデルを構築した。

謝　辞

研究を遂行するにあたり，Mil-Cell容器の改良，胚体積の測定およびAIによる自動検知モデル構築にご協力いただいた住友電気工業株式会社の関係職員，供試豚の飼養管理および実験を補助して頂いた家畜改良センター企画調整部管理課の関係職員に心より感謝いたします。

文　献

1） Hirayama, Y., Yoshioka, K., Noguchi, M., Misumi, K.：*Animal Science Journal*, **90**, 1523～1529, 2019.
2） Hirayama, Y., Misumi, K., Yoshioka, K., Noguchi, M., Kikuchi, K.：*Animal science journal*, **92**, e13480, 2021.
3） 瀧下梨英，平山祐理，橋谷田豊：日本胚移植学雑誌，**41**, 25～30, 2019.
4） 独立行政法人家畜改良センター：家畜改良センター技術マニュアル11
5） Misumi, K., Hirayama, Y., Egawa, S., Yamashita, S., Hoshi, H., Imai, K.：*Journal of Reproduction and Development*, **59**, 520～524, 2013.
6） 三角浩司，江川紗智子，御澤弘靖，平山祐理：日本養豚学会誌，**58**, 28～34, 2020.
7） Saha, S., Suzuki, T.：*Reproduction, Fertility and Development*, **9**, 741～746, 1997.
8） Stokes, P. J., Abeydeera, L. R., Leese, H. J.：*Developmental Biology*, **284**, 62～71, 2005.
9） 岩崎説雄，吉田豊，渡辺誠喜，中原達夫：日本動物生殖学会誌，**36**, 60～65, 1990.

© 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（Ⅱ）

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

山口　昇一郎・藤井　英之・成瀬　講平[1]・山田　豊[1]・太田　剛

（福岡県農林業総合試験場，[1]油化産業株式会社）

Shoichiro Yamaguchi, Hideyuki Fujii, Kohei Naruse[1], Yutaka Yamada[1] and Takeshi Ohta

（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 fertility. The experimental diet consisted of total mixed rations, which was mainly Italian ryegrass silage. The α-linolenic acid group was supplied with 100g of calcium salts of α-linolenic acid by oral administration daily from 3 weeks postpartum.

As a result of examination, there was no difference in the milk yield. Blood T-cho levels were significantly higher in the α-linolenic acid group than the control group（$p<0.05$）. There was no significant difference in corpus luteum blood flow after the first postpartum artificial insemination 7 days after artificial insemination, but it was significantly higher in the α-linolenic acid group 14 days after artificial insemination（$p<0.01$）. 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 was suggested that feeding a diet containing calcium salts of α-linolenic acid to lactating dairy cows from 3 weeks postpartum significantly increased the blood T-cho level, leading to early recovery of postpartum nutritional status. In addition, it was suggested that luteal function may be improved by improving nutritional status, and the conception rate may be improved.

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。都道府県における乳牛の平均分娩間隔は，450日前後であるが，目標となる400日程度には大きく差があるのが現状であり，飼料費高騰が続くなか，生産コスト低減のためには，その短縮が喫緊の課題となっている。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

© The Ito Foundation

なることが報告された[1]。同様に同じn-3系の脂肪酸であるドコサヘキサエン酸（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系脂肪酸によ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，令和３年度の本助成研究に引き続き，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の血流量等に及ぼす影響について検討した。また，令和４年度は福岡県内酪農家２戸で現地実証試験を実施した。

２．方　法

供試牛は福岡県農林業総合試験場で飼養する２産以上のホルスタイン種経産牛24頭（α-リノレン区：11頭および対照区：13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10：00に採血後，冷却遠心分離（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，T-cho，たんぱく質，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。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，TDN71.0％，CP15.5％，EE3.0％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。添加後のα-リノレン酸区のTMRは，TDN71.4％，CP15.5％，EE3.2％となった。

卵巣および子宮回復診断は，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[3]によってスコア０で回復とした。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（PG，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（面積）は，AI７日後および14日後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。また，採血を行って血漿中のプロジェステロン濃度を酵素免疫測定法により測定した。

現地実証試験は，福岡県内酪農家２戸（つなぎ牛舎，分離給与）で行った。A農家の供試頭数は，α-リノレン酸区が５頭および対照区６頭であり，B農家では，それぞれ４頭ずつを供試し，産次および分娩月に大きく偏りがないよう配置した。α-リノレン酸区は，朝と夕にα-リノレン酸脂肪酸カルシウムを50ｇトップドレスで給与した。対照区は無給与とした。人工授精は，PGによる発情誘起または自然発情時に行い，精液は主に性選

© The Ito Foundation

別精液を用いた。また，採血はA農家のみで分娩後15週まで実施した。

統計処理は，血液データについては，α-リノレン酸給与の影響が想定される6週～15週に反復測定分散分析を実施し，その他のデータについては，正規性の解析を行った後，Studentのt検定もしくはマン・ホイットニーのU検定を実施，受胎率については，χ二乗検定で行った。

3．結果と考察

乾物摂取量は，α-リノレン酸区が27.5kg／日および対照区が28.0kg／日となり，有意差は認められなかった（**Table 1**）。平均乳量は，α-リノレン酸区が46.8kg／日および対照区が46.1kg／日となり，有意差は認められなかった。飼料効率（乳量／乾物摂取量）では，α-リノレン酸区が1.7および対照区が1.6となり飼料効率は高まる傾向にあり，高エネルギーであるα-リノレン酸の影響があったのではないかと推察された（データ省略）。乳成分（試験期間中の平均値）については，差はなく大きな影響は認められなかった。血液成分については，試験場と現地実証試験のデータを合算したものを示した（**Fig. 1**）。血中T-cho濃度は，α-リノレン酸の給与期間中（6週から15週）について，α-リノレン酸区が有意に高くなり（$p<0.05$），高エネルギー飼料であるα-リノレン酸給与によって分娩後の栄養状態が早期に回復することが明らかとなった。また，血漿中総たんぱく質については，給与期間中について，α-リノレン酸区が高い傾向にあった（$p<0.1$）。その他の血液成分については，有意差が認められなかった。血漿中総たんぱく質が高い傾向にあった理由は，α-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムにたんぱく質は含まれておらず，また，乳たんぱく質は差がなかったため，本研究では原因の特定には至らなかった。

黄体血流量（面積）については，AI7日後には有意差が認められなかったが，14日後にはα-リノレン酸区が有意に多くなった（$p<0.01$）（**Fig. 2**）。プロジェステロン（P4）濃度には，有意差は認められなかった。Sakumotoら[4]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，PGE2の産生が有意に増加したことを明らかにした。PGE2は黄体の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-リノレン酸区は給与期間を通じて血中T-cho濃度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。黄体血流量が多くなったことからP4濃度に影響が出ることも考えられたが，差は認められなかった。Kanazawaら[5]の報告でも黄体血流量と末梢血のP4濃度に関係が認められなかったことを報告しており，局所的な作用があったことが示唆された。

試験期間中の平均ボディーコンディションスコア（BCS），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**

Table 1　Effect of feeding α-linolenic acid on dry matter intake (DMI) and lactation performance.

	DMI kg/day	Milk yield kg/day	Fat %	Solids not fat %	Protein %	MUN mg/dl
α-linolenic acid (n = 11)	27.5	46.8	3.6	8.5	3.1	12.5
control (n = 13)	28.0	46.1	3.7	8.6	3.2	12.9

© The Ito Foundation

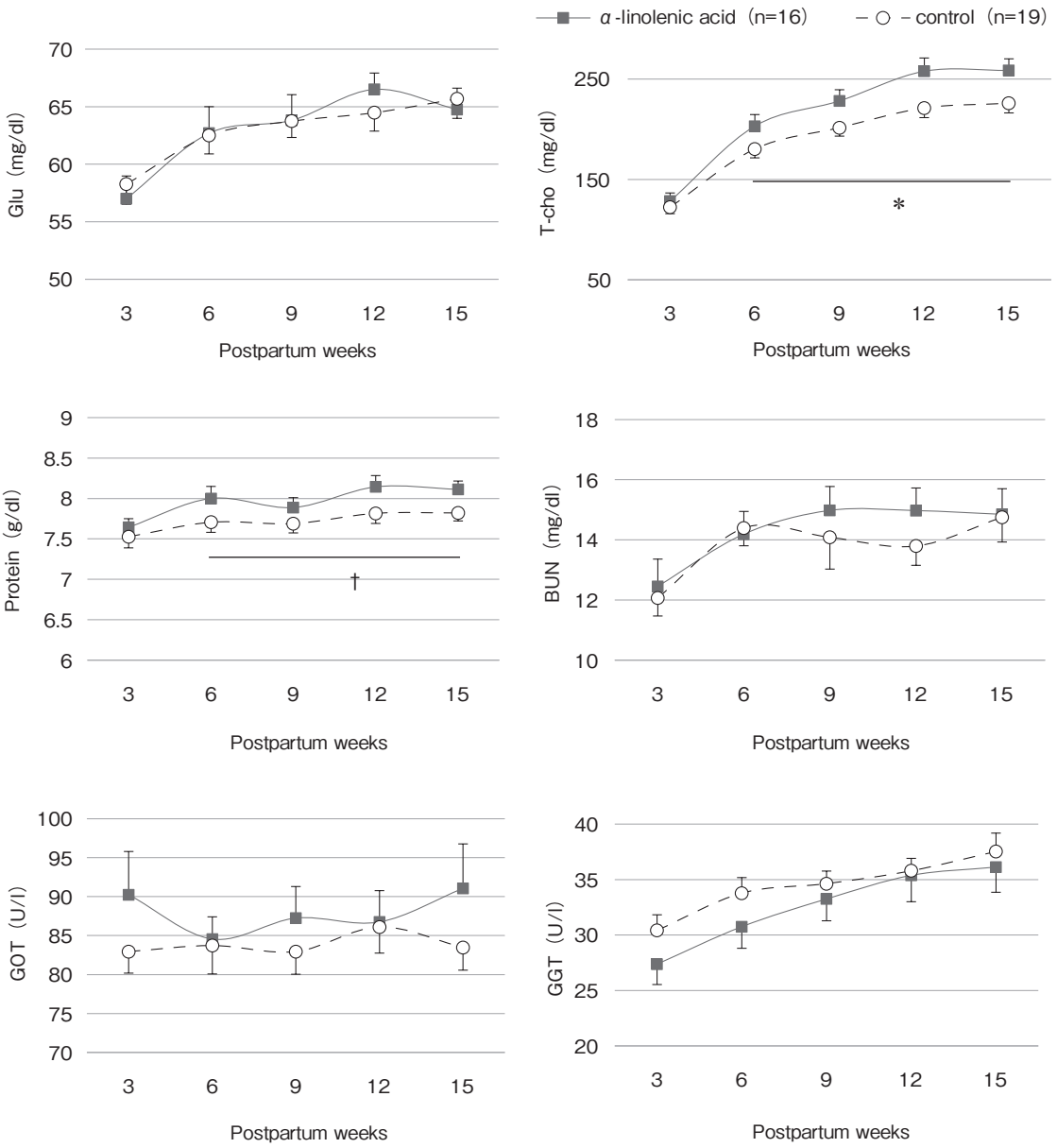

Fig. 1　Effect of feeding α-linolenic acid on the concentration of serum metabolites during 15 weeks postpartum.
Data are presented as the mean ± SEM.　*；$p < 0.05$，†；$p < 0.1$

2）。分娩後の初回授精受胎率は，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

© The Ito Foundation

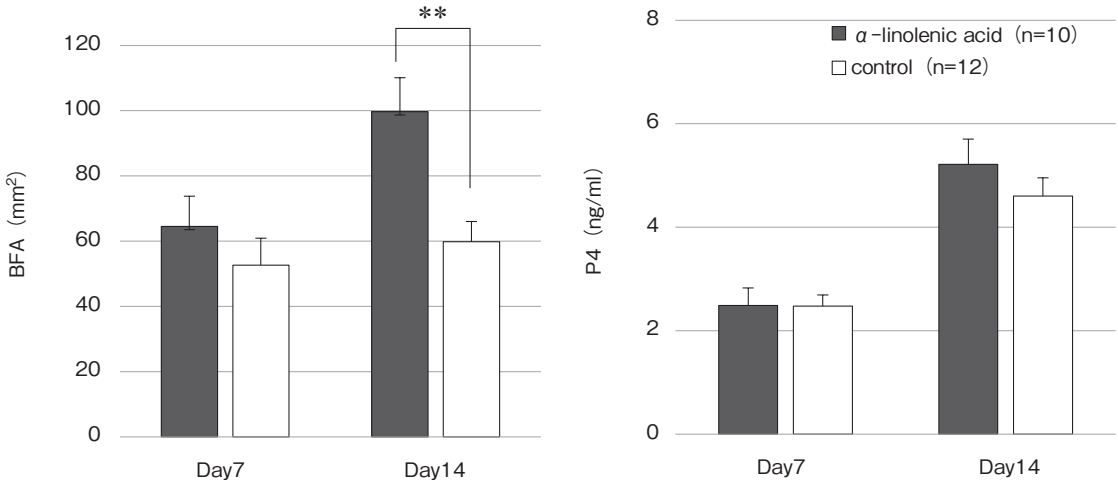

Fig. 2　Effect of feeding α-linolenic acid on changes in the blood flow area（BFA）of the CL and plasma progesterone concentration（P4）.
Data are presented as the mean±SEM.　**；$p<0.01$

Table 2　Effect of feeding α-linolenic acid on BCS and reproductive performance.

	Body Condition Score（BCS）	Postpartum uterine recovery	First postpartum insemination	Conception rate at first insemination
		day	day	%
α-linolenic acid	3.2	27	95.7	30.0
control	3.1	32	96.3	21.7

BCS and postpartum uterine recovery；α-linolenic acid（n＝11）and control（n＝13）.
First postpartum insemination and conception rate at first insemination；α-linolenic acid（n＝20）and control（n＝23）.

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３週目からの泌乳牛にα-リノレン酸含有脂肪酸カルシウムを100ｇ／日給与することで，血中T-cho濃度が高く推移し，分娩後の栄養状態が早期に回復することが明らかとなった。また，栄養状態が改善することによって，黄体機能が高まり，初回人工授精後の受胎率が向上する可能性が示唆された。

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性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，乳量には有意差が認められなかった。血中T-cho濃度は，α-リノレン酸区が対照区に比べて有意に高くなった（$p<0.05$）。分娩後初回人工授精後の黄体血流量は，人工授精７日後には差が認められなかったが，14

© The Ito Foundation

日後にはα-リノレン酸区が有意に高くなった（p＜0.01）。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週目からの泌乳牛に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血中T-cho濃度が高く推移し，分娩後の栄養状態が早期に回復することが明らかとなった。また，栄養状態が改善することによって，黄体機能が高まり，初回人工授精後の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.：*eproduction*, **153**(5), 707～723, 2017.

3） 小山毅：北海道獣医師会雑誌，**56**(1)，10～15，2012.

4） Sakumoto, R., Hayashi, K. G., Iga, K.：*J Reprod Dev*, **68**(1), 62～67, 2022.

5） Kanazawa, T., Seki, M., Ishiyama, K., Kubo, T., Kaneda, Y., Sakaguchi, M., Izaike, Y., Takahashi, T.：*Theriogenology*, **86**(6), 1436～1444, 2016.

6） 金澤朋美：臨床獣医臨時増刊号，**35**，45～48，2017.

© The Ito Foundation

排卵後早期の卵巣形態と性ステロイドホルモンバランスがウシ子宮の免疫機能に及ぼす影響

Effects of ovarian morphology and sex steroid hormone balance during early stage after ovulation on bovine uterine immune function

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）

Progesterone (P4), which is secreted from corpus luteum (CL) formed after ovulation, is widely known as important factor in bovine pregnancy. When the function of CL is insufficient, the secretion of estradiol (E2) from newly developing follicle increases. Therefore, the ratio of E2 to P4 (E/P ratio) in the early postovulation period (around 5–7 days) might be related to fertility in cattle. The positional relationship between CL and follicle has been reported to be related to fertility. In this study, relationship between the E/P ratio and ovarian morphology and the intrauterine immune function were examined. Using 24 cows, ovary observation by ultrasonography and plasma E2 and P4 measurement were performed from 4 to 7 days after ovulation. Single embryo transfer (ET) was performed on 7 days after ovulation. Uterine flushing with normal saline were performed at 12 and 24 hours after ET, and leukocyte gene expression and microRNA detection in uterine flush were analyzed. According to the timing of the E/P ratio decline, cows were divided into early-decreasing and the late-decreasing groups. There was no difference in the sizes of follicle and CL between two groups. The positional relationship between CL and follicle (coexistence or non-coexistence) was not related to the timing of the E/P ratio decline. IL-8 mRNA expression in leukocytes increased with the time after ET, but there was no significant difference between two groups. IL-10 mRNA expression did not change with the time after ET or the timing of the E/P ratio decline. In microRNA detection, miR-1246 and miR-29a, which are presumed to be involved in embryonic development and intrauterine immune function, were analyzed. No change was observed with the time after ET or the timing of the E/P ratio decline in both microRNA. This study showed that the morphology of follicle and CL was not involved in the timing of the E/P ratio decline. The relationship between the timing of the E/P ratio decline and intrauterine immune function was not clarified, but a comprehensive analysis is considered necessary in the future.

1．目　　的

ウシの妊娠成立（受胎）において，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）の重要性は広く知られている。黄体の機能が不十分な場合，排卵後に新たに発育する卵胞か

© The Ito Foundation

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，発情・排卵後５－７日頃に少量ながら血中のエストロジェン濃度の増加が観察される[1)]。これらのことから，排卵後早期（５－７日頃）の黄体と卵胞の形態および機能，内分泌動態がウシの受胎性に強く影響すると考えられる。排卵後早期（５－７日頃）の内分泌動態との関連を調べた研究では，E2濃度とP4濃度の比（E/P比）の低下のタイミングが，受胎性に関与することが示されている（未公表データ）。さらに，排卵後に発現する第一卵胞波の主席卵胞が，黄体の存在する卵巣に存在する場合（共存群），黄体の存在する卵巣と反対側の卵巣に存在する場合（非共存群）に比べて受胎率が低いことが報告されている[2)]。これらの受胎性に関与すると考えられる「E/P比の低下のタイミング」と「黄体と卵胞の位置関係」が相互に関連しているかどうかは明らかにされていない。

性ステロイドホルモンが子宮における免疫反応に作用し受胎のための子宮環境を制御していることは，長く知られていることから，受胎性に関わる要因である「E/P比の低下のタイミング」と「黄体と卵胞の位置関係」が子宮における免疫反応に作用し，受胎性に影響を及ぼしている可能性がある。

本研究では，「黄体と卵胞の位置関係」と「E/P比の低下のタイミング」との関係および「E/P比の低下のタイミング」が子宮における免疫反応に及ぼす影響を調べた。

２．方　　法

2.1　供試動物

供試牛（受胚牛）として，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，行動観察および直腸検査を行い，発情および排卵を診断した。

2.2　卵巣の観察

排卵確認日をday １として，day ５からday ７まで，超音波画像診断装置（HS-1600V，本多電子）を用いて卵巣を観察し，黄体と卵胞の最大直径およびそれらの位置関係を調べた。

2.3　内分泌動態の評価

day ５からday ７まで，血中P4およびE2濃度を調べた。ヘパリンナトリウム加真空採血管を用いて尾静脈より20ml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（市販キット，DetectX®，Serum 17β Estradiol，Enzyme Immunoassay Kit KB30 H5）により，血漿P4濃度あるいは血漿E2濃度を測定した。

2.4　受精卵の移植

受精卵は，FSH漸減投与による過剰排卵処置を行ったホルスタイン種非泌乳牛に人工授精を行い，発情後７日目に子宮灌流法により採取した。得られた受精卵のうち，胚盤胞期の胚を1.5Mエチレングリコールと0.1Mショ糖を用いた凍結によるダイレクト移植を行った。受胚牛に対し，day ７に，受精卵注入カテーテル（YTガン，株式会社ヤマネテック）を用いて，黄体側子宮角に移植した。

2.5　子宮内液の採取

受精卵の移植後12および24時間後に，移植を行った子宮角の中部へYTガンを挿入し，さらにカテーテルを延長した。注射筒を連結し，生理食塩液20mlを注入後，速やかに回収し，回収液は冷却して実験室に持ち帰った。白血球の分離は密度勾配遠心法により行い，Leuko Spin Medium（puriSelect）を用い，回収液５mlを1,000ｇにて30分間遠心を行った。エクソソームの分離には，回収液10mlからExo-Quick-TC（System Biosciences）を用いて行った。

© The Ito Foundation

Table 1　Primer list

Primer Name	Primer Sequence（5'-3'）
IL-8	F：CATTCCACACCTTTCCACCC
	R：AGGCAGACCTCGTTTCCATT
IL-10	F：CACAGGCTGAGAACCATT
	R：AGGGCAGAAAGCGATGA
GAPDH	F：GCCAAGAGGGTCATCATCTC
	R：GGTCATAAGTCCCTCCACGA
miR-1246	RT：GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACCCTGCT
	F：GCGCGAATGGATTTTTGG
	R：AGTGCAGGGTCCGAGGTATT
miR-29a	RT：GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACTAACCGA
	F：GGCTAGCACCATCTGAA
	R：GTGCAGGGTCCGAGGT
U 6	F：GCTTCGGCAGCACATATACTAAAAT
	R：CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT

2.6　子宮内液の白血球遺伝子発現およびmiRNA検出

白血球あるいはエクソソームからのtotalRNAの抽出には，それぞれTrizol試薬（Invitrogen）あるいはmiRNeasy Micro Kit（Qiagen）を使用した。抽出したtotalRNAを，M-MLV（Invitrogen）を使用してcDNAに逆転写した。miRNA検出のためには，特異的なstem-loop primerを用いて逆転写を行った。これらのcDNAをSYBR Premix Ex Taq™キット（TAKARA）を用いて，リアルタイムPCRを行った。内部標準遺伝子として，白血球における遺伝子発現解析にはGAPDH，miRNA検出にはU6を用いた。プライマーリストを**Table 1** に示した。

2.7　統計解析

データの解析には，群間の比較にはStudent-t検定を行った。これらの検定において危険率５％未満（$p<0.05$）の場合を有意性あり，５％から10％（$0.05<p<0.1$）の場合を統計的傾向があると判定した。

3．結果と考察

3.1　内分泌動態と卵巣所見の評価

【結果】

これまで，授精後のday 4からday 7までの血中P4およびE2濃度を調べた結果，E/P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（E/P比が２未満）がみられるのに対し，その低下が，不受胎牛ではday 5からday 6にみられたことから（未公表データ），本研究では，E/P比の２未満への低下が，day 5にみられた個体を早期低下群（early decrease），day 6にみられた個体を低下遅延群（late decrease）と区分した。

早期低下群のE/P比は，day 4は2.2±0.2（平均±標準偏差），day 5は1.4±0.2，day 6は0.9±0.3およびday 7は0.6±0.1であり，低下遅延群では，day 4は2.2±0.2，day 5は2.1±0.3，day 6は1.2±0.3およびday 7は0.8±0.2であった。

早期低下群と低下遅延群における卵巣観察において，day 4からday 7までの，最大卵胞および黄体の直径を調べた結果，両群間に差異は認めら

© The Ito Foundation

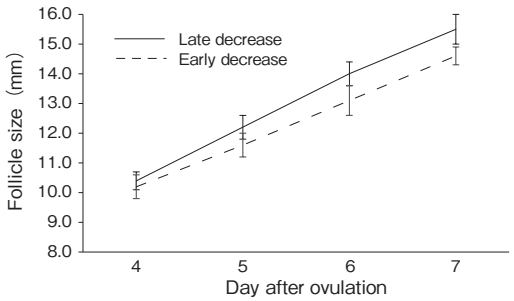

Fig. 1　Changes in size of follicle from day 4 to day 7

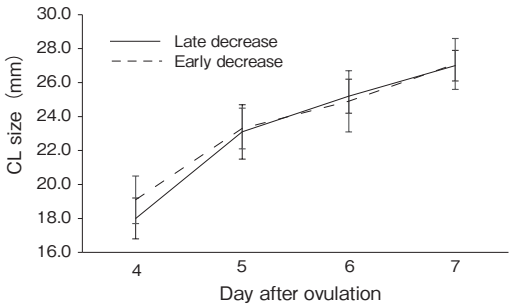

Fig. 2　Changes in size of CL from day 4 to day 7

れなかった（**Fig. 1** および**2**）。

排卵後に発現する第一卵胞波の主席卵胞が，黄体の存在する卵巣に存在する場合（共存群）と黄体の存在する卵巣と反対側の卵巣に存在する場合（非共存群）に区分し，両群におけるE/P比の早期低下群と低下遅延群の発生状況を調べた。共存群において早期低下群は５頭，低下遅延群は７頭，非共存群において早期低下群は６頭，低下遅延群は６頭であった。黄体と卵胞の共存状態とE/P比の低下のタイミングとの間に関連はみられなかった。

【考察】

本研究より，「黄体と卵胞の位置関係」は「E/P比の低下のタイミング」に影響を及ぼさないことが示された。これまでの研究において，共存群と非共存群との間で，day ７までの，第一卵胞波の主席卵胞および黄体の発育，血中E2およびP4濃度に差異がないことが示されている[3)]。すなわち，黄体と卵胞の位置関係は，排卵後早期の内分泌動態に影響を及ぼさないため，共存群と非共存群との間でE/P比の低下のタイミングに違いがなかったと考えられる。このことは，「黄体と卵胞の位置関係」が受胎性に及ぼすしくみと「E/P比の低下のタイミング」が受胎性に及ぼすしくみが異なる可能性を示していると考えられる。

3.2　子宮内液における白血球の遺伝子発現およびmiRNA検出

【結果】

白血球におけるIL-８の発現は，受精卵移植12時間後において，早期低下群と低下遅延群との間で差異は認められなかったが，24時間後において，早期低下群が高い傾向（p＝0.08）がみられた（**Fig. 3**）。また，両群とも，12時間後に比べ，24時間後で発現が有意に高くなった。IL-10の発現は，受精卵移植12時間後において，早期低下群が高い傾向（p＝0.06））がみられたが，24時間後において，両群間で差異はみられなかった（**Fig. 4**）。

miRNA検出において，miR-1246およびmiR-29aのどちらも，受精卵移植からの時間経過（12時間後 vs 24時間後）およびE/P比の低下のタイミング（早期低下群 vs 低下遅延群）との関連はみられなかった。

【考察】

IL-8mRNAの発現は，受精卵移植12時間後から24時間後にかけて上昇した。一般に，IL-８は，単球，上皮細胞，内皮細胞および活性化された好中球から分泌され，好中球の走化能や食作用を刺激することが知られている[3)]。受精卵移植後の発現上昇は，受精卵あるいは凍結保存液に反応した結果の可能性が考えられる。受胎性が高いと思われるE/P比の早期低下群において，有意ではない

© The Ito Foundation

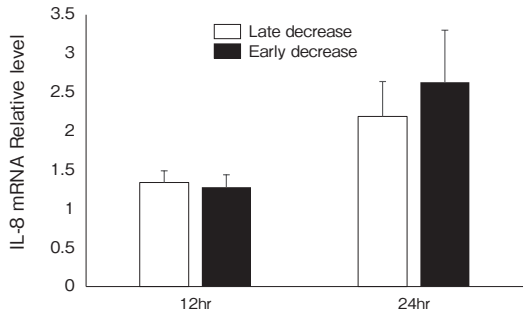

Fig. 3　The mRNA expression levels of IL-8

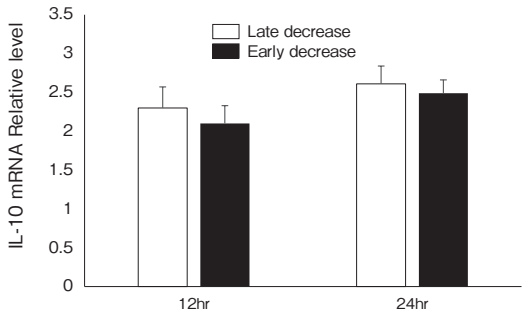

Fig. 4　The mRNA expression levels of IL-10

が発現が高い傾向がみられた。白血球が作用しやすい環境となることは，受精卵にとって不利な状況と考えられるが，その理由は不明である。ヒトの月経周期において，子宮内膜の増殖期および分泌期にIL-８が上昇すること[4]が知られており，受精卵の発育や着床のための子宮環境の制御に関わっていると考えられる。早期低下群は低下遅延群に比べ，P4が優位となる期間が長く，P4は子宮内膜や分泌腺の増殖に関与していることから，子宮内膜におけるIL-８発現が上昇し，その子宮内膜細胞がサンプルに混入していた可能性も考えられる。

近年，過剰排卵処置および人工授精を行ったウシにおける授精後７日目の子宮灌流液が，白血球において，抗炎症作用を有するIL-10mRNA発現を刺激すること[5]，また，その作用は，受精卵から分泌されるインターフェロン-τを介していること[6]が報告されている。本研究では，IL-10mRNA発現は，受精卵移植後の時間経過やE/P比の低下のタイミングによって変化はみられなかった。本研究では，１個の受精卵を移植したことや移植からの時間経過が短かったことなどから，過去の報告にみられた受精卵によるIL-10誘導が観察できなかったのかもしれない。

これまで，過剰排卵処置および人工授精を行ったウシにおける授精後７日目の子宮灌流液中において，miR-1246の増加およびmiR-29aの低下が確認され，それぞれ胚発育や子宮内の免疫機能に関与することが推測されている[7]。本研究では，miR-1246およびmiR-29aのどちらも受精卵移植からの時間経過およびE/P比の低下のタイミングとの関連はみられなかった。これについても，受精卵の個数や移植後の時間経過などによる影響も考えられるが，今後，microRNAの発現状況について，網羅的な解析が必要と考えられる。

４．要　　約

本研究では，ウシの受胎性に関連すると考えられる排卵後早期（５－７日頃）の血中E2濃度とP4濃度の比（E/P比）の低下のタイミングについて，卵胞および黄体の形態との関連，これまで受胎性との関連が報告されている黄体と卵胞の位置関係との関連および子宮内の免疫反応への影響を調べた。E/P比の低下のタイミングにより，早期低下群と低下遅延群とに区分し比較した結果，両群で卵胞および黄体のサイズに差異はみられなかった。また，黄体と卵胞の位置関係（共存あるいは非共存）は，E/P比の低下のタイミングと関連はなかった。子宮内の免疫反応を調べるために，排卵後７日目に受精卵を移植後の子宮内液を回収し，白血球の遺伝子発現およびmicroRNA検出を解析した。白血球におけるIL-8mRNA発現は受精卵移植後の時間経過に伴い上昇したが，E/P比の低下のタイミングによる有意な差異はみ

© The Ito Foundation

られなかった。IL-10mRNA発現は，受精卵移植後の時間経過やE/P比の低下のタイミングによって変化はみられなかった。microRNA検出において，胚発育や子宮内の免疫機能に関与することが推測されているmiR-1246およびmiR-29aについて解析を行ったが，受精卵移植後の時間経過やE/P比の低下のタイミングによって変化はみられなかった。本研究から，卵胞および黄体の形態はE/P比の低下のタイミングに関与していないことが示された。子宮内の免疫反応について，E/P比の低下のタイミングとの関連は明らかにされなかったが，今後，網羅的な解析が必要であると考えられた。

文　献

1） Kaneko, H., Kishi, H., Watanabe, G., Taya, K., Sasamoto, S., Hasegawa, Y.：*J. Reprod. Dev.*, **41**, 311～320, 1995.

2） Miura, R., Haneda, S., Kayano, M., Matsui, M.：*J. Dairy Sci.*, **98**, 318～321, 2015.
Mitchell, G. B., Albright, B. N., Caswell, J. L.：*Infect. Immun.*, **71**, 1643～1649, 2003.

3） Gaillard, C., Barbu, H., Sorensen, M. T., Sehested, J., Callesen, H., Vestergaard, M.：*J. Dairy Sci.*, **99**, 3134～3143, 2016.

4） Arici, A., Seli, E., Senturk, L. M., Gutierrez, L. S., Oral, E., Taylor, H. S.：*J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **83**, 1783～1787, 1998.

5） Talukder, A. K., Rashid, M. B., Takedomi, T., Moriyasu, S., Imakawa, K., Miyamoto, A.：*Am. J. Reprod. Immunol.*, **81**, e13069, 2019.

6） Rashid, M. B., Anup, K., Talukder, A. K., Kusama, K., Haneda, S., Takedomi, T., Yoshino, H., Moriyasu, S., Matsui, M., Shimada, M., Imakawa, K., Miyamoto, A.：*Biochem Biophys. Res. Commun.*, **500**, 879～884, 2018.

7） Kusama, K., Rashid, M. B., Kowsar, R., Marey, M. A., Talukder, A. K., Nagaoka, K., Shimada, M., Khatib, H., Imakawa, K., Miyamoto, A.：*Front. Genet.*, **12**, 676791, 2021.

© 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（Ⅱ）

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

鍋　西　　久
（北里大学獣医学部）

Hisashi Nabenishi
（Department of Animal Science, School of Veterinary Medicine, Kitasato University）

A total of 264 Japanese Black cows kept on commercial farms in Aomori Prefecture were tested for seven months from three months before calving to three months after calving, and their nutritional status were evaluated, and blood samples were analyzed for biochemistry to examine the relationship with reproductive performance. We also examined the relationship between plasma amino acid profiles before and after calving and reproductive performance. We found that nutritional status and nutritional transition before and after calving affected the reproductive performance in Japanese Black cows, that reproductive performance decreased when the rate of decline in nutritional status immediately after calving was high, and that first AI（−）cows showed increased body fat mobilization due to energy deficiency. Regarding the relationship between plasma amino acid profiles before and after calving and reproductive performance, first AI（−）cows had significantly lower levels of 13 amino acids, including those important for embryo survival and development in early pregnancy, compared to first AI（+）cows, while 3-Me His was higher than that of the initial AI（+）group. These results indicate that the nutritional status and nutritional transition of Japanese Black cows before and after calving affect reproductive performance, especially that body fat and body protein mobilization is enhanced due to energy deficiency before and after calving, and that changes in plasma amino acid profiles may be involved in early embryo viability. Since it was suggested that energy deficiency before and after calving triggers poor reproductive performance, it is important to control the significant decrease in nutritional status after calving.

1．目　　的

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[1)]。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

© The Ito Foundation

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。

我々は，昨年度の研究において大規模な代謝プロファイルテストを実施し，分娩前後の栄養状態と繁殖成績との関連について検討を行った。新たに得られた知見として，不受胎牛群では分娩前２ヵ月ないし１ヵ月から分娩月にかけての栄養度低下が受胎牛群よりも顕著なこと，エネルギー不足による体脂肪動員の亢進とあわせて，卵巣機能回復の遅延による空胎日数の延長を確認し，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必要性を提案した。しかしながら，妊娠末期から分娩直後にかけての栄養状態の低下（エネルギー不足）がどのように繁殖機能を抑制しているのか，そのメカニズムは不明である。また，繁殖成績を改善するための飼養管理技術の精密化については，検討の余地が残されている。

血液成分や乳成分を測定して健康状態を総合的に判断する代謝プロファイルテスト（MPT）が主に乳用牛を対象として実施されており[5]，近年では肉用牛の生産現場においても普及するようになってきている[6]。しかしながら，血液中の一般生化学性状だけでは把握しきれない栄養状態の詳細を明らかにするためにはまだ研究の余地が残されている。ヒトの医療分野では鍵となる代謝物としてアミノ酸にフォーカスしたアミノ酸メタボロミクスという評価手法が注目されている[7,8]。アミノ酸メタボロミクスは，わずかな代謝変動でさえも捉えられるというユニークな利点をもつことから，分野を問わずさまざまな研究へと応用されている。乳用牛においてアミノ酸は乳生産性を向上させる目的で多くの知見が報告されている一方で，主に妊娠初期における着床前胚の生存に重要な物質であることが示されているものの，血液中のアミノ酸濃度と繁殖成績との関連についての知見はない。

そこで本研究では，昨年度に引き続き大規模な代謝プロファイルテストにおいて分娩前後の栄養状態推移と繁殖機能との関連を検討するとともに，新たに，繁殖雌牛の血漿中遊離アミノ酸プロファイルに着目した解析を行うことによって，繁殖成績を改善するための飼養管理技術の精密化検討を試みた。

２．方　　法

2.1　分娩前後の栄養状態と繁殖成績との関連

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のうち正常に分娩した264頭を供試した。分娩予定日の３ヵ月前から分娩後３ヵ月まで１ヵ月ごとに計７ヵ月間採材（採血，栄養状態の評価）を実施した。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に基づき９段階に区分し，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），グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミラーゼ（GOT）および血中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（トレンド），繁殖成績との関連性について評価した。

2.2　アミノ酸プロファイルによる繁殖雌牛の栄養状態評価

上記農場において供試した繁殖雌牛のうち，正常に分娩した39頭を供試した。分娩予定日の１ヵ月前から分娩後２ヵ月まで，１ヵ月ごとに計４ヵ月間の採材を行った。得られた血漿を用いて血漿

© The Ito Foundation

中アミノ酸濃度39項目（タウリン：Tau，アスパラギン酸：Asp，ヒドロキシプロリン：Hypro，スレオニン：Thr，セリン：Ser，アスパラギン：Asn，グルタミン酸：Glu，グルタミン：Gln，サルコシン：Sarco，α-アミノアジピン酸：α-AAA，プロリン：Pro，グリシン：Gly，アラニン：Ala，シトルリン：Cit，α-アミノ酪酸：α-ABA，バリン：Val，シスチン：Cys，シスタチオニン：Cysthio，メチオニン：Met，イソロイシン：Ileu，ロイシン：Leu，チロシン：Tyr，フェニルアラニン：Phe，γ-アミノ-β-ヒドロキシ酪酸：γ-Aβ-HBA，β-アラニン：β-Ala，β-アミノイソ酪酸：β-AIBA，γ-アミノ酪酸：γ-ABA，エタノールアミン：MEA，ホモシステイン：Homocys，ヒスチジン：His，3-メチルヒスチジン：3-Me His，1-メチルヒスチジン：1-Me His，カルノシン：Carno，アンセリン：Ans，トリプトファン：Trp，ヒドロキシリシン：Hylys，オルニチン：Orni，リシン：Lys，アルギニン：Arg）を測定した。

さらに，血漿中アミノ酸濃度と初回AI妊否との関連について，人工知能による解析を試みた。

3．結果と考察

3.1　分娩前後の栄養状態と繁殖成績との関連

分娩後３ヵ月間の栄養度と初回交配日数との関係では，栄養度４は栄養度５，６と比較して初回交配日数が有意に延長した（p＜0.05）。分娩後３ヵ月間の栄養度と実空胎日数との関係においても栄養度の低い牛では実空胎日数の延長が認められ，栄養度５は栄養度７と比較して有意に延長した（p＜0.05）。また，分娩月の栄養度と初回AI受胎率との関係においても，栄養度４：25.0％，栄養度５：40.6％，栄養度６：51.3％，栄養度７：57.1％となり，栄養度が低いほど初回AI受胎率が低かった。さらに，分娩前３ヶ月から分娩後３ヵ月までの期間における初回AI（－）（初回AIで受胎しなかった）群のNEFA濃度は，初回AI（＋）（初回AIで受胎した）牛群よりも有意に高く推移し（p＜0.05），分娩前１ヵ月から分娩後２ヵ月の期間において栄養度４では，栄養度５～７と比較してNEFA濃度が有意に高かった（p＜0.05）。

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交配日数，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ことが示された。

3.2　アミノ酸プロファイルによる繁殖雌牛の栄養状態評価

分娩前１ヵ月から分娩後２ヵ月における初回AI成績による血漿中アミノ酸プロファイルについて，全期間を通して初回AI（－）牛群が初回AI（＋）牛群と比較して低くなる傾向が認められた。また，空胎日数ごとの分類でもアミノ酸プロファイルに差異が認められた（**Fig. 1**）。さらに，**Fig. 2** に示した13項目のアミノ酸（Thr，Ser，Asn，Pro，Val，Met，Ileu，Leu，Tyr，Phe，His，Trp，Lys）については，初回AI（＋）牛群と比較して初回AI（－）牛群が有意に低かった（p＜0.05）。これらのことは，血漿中のアミノ酸プロファイルが受胎性に関与することを示唆するものである。乳用牛の妊娠末期には産乳に向けた活発な栄養代謝が始まり，肝臓における糖新生，体脂肪からの脂肪酸動員，筋肉組織からのアミノ酸動員が増大することが報告されている[9]。反芻動物においてアミノ酸はクエン酸回路等の代謝中間体の生成に深く関与し，乳生産と生命維持に重要な栄養素である。さらにケトーシス牛，第四胃左方変位牛においてSerやTrp，Metなどの糖原生アミノ酸濃度の低下も報告されている[10, 11]。Val, Lue, Ileuは分枝鎖アミノ酸（BCAA）

© The Ito Foundation

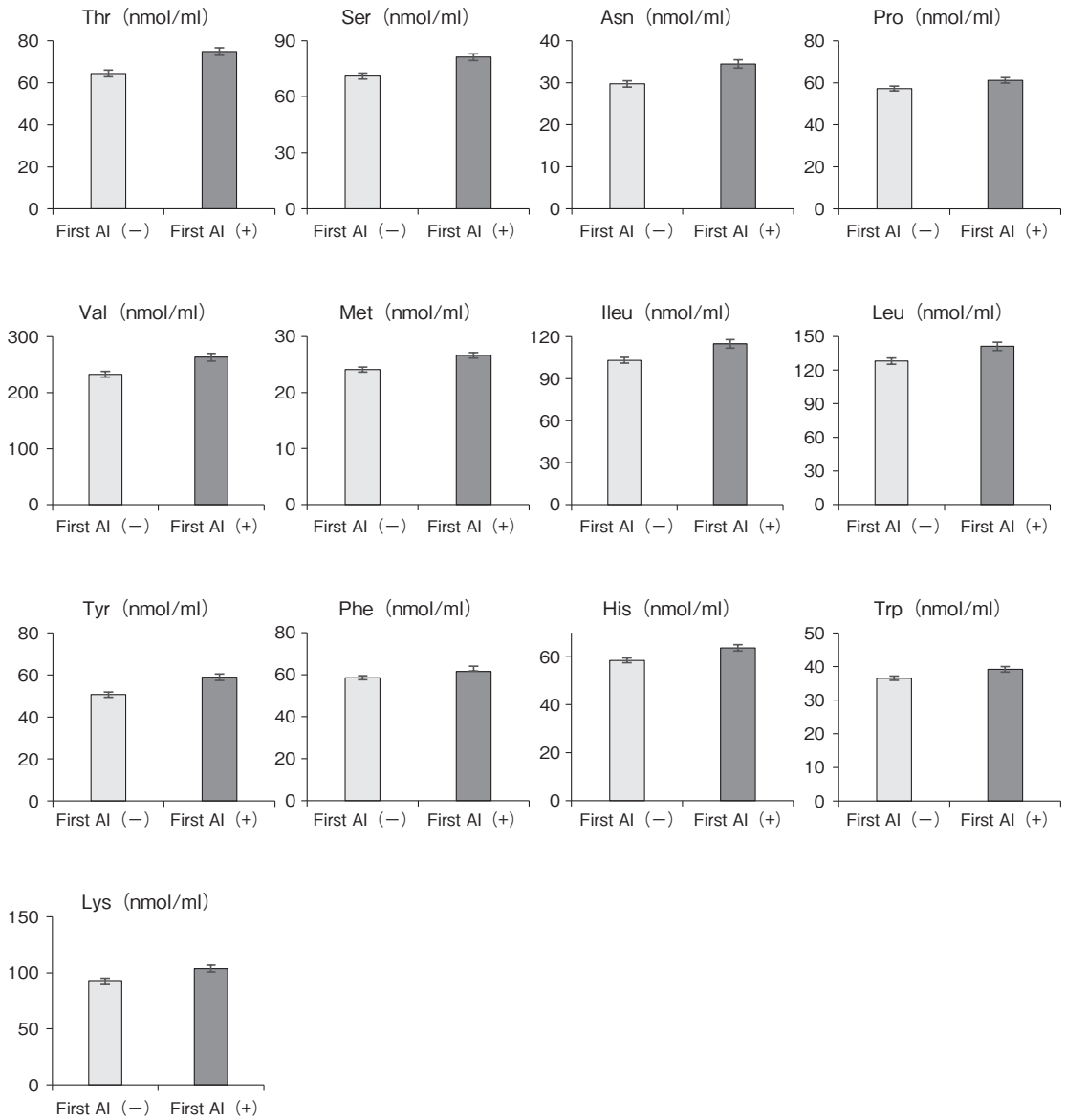

Fig. 1　Plasma amino acid profile classified by first AI performance. Significant differences were observed in all categories（$p < 0.05$）.
First AI（+）: Did conceive at first AI
First AI（−）: Did not conceive at first AI

と呼ばれ，エネルギー代謝と関連するアミノ酸である。これらはすべて初回AI（+）牛群が（−）牛群と比較して有意に高かった。これは分娩前後の乾物摂取量を反映していると考えられた。

初回AI日数が分娩後81日を超える（>81）牛群では，体たんぱく質動員の指標である3-Me Hisが高値を示し，≦80日牛群と比較して有意差が認められた（$p < 0.05$）（**Fig. 3**）。また，空胎日数<80日と比較して>161日で有意に高かった（$p < 0.05$）。乳用牛において3-Me His濃度はたんぱく質栄養レベルの変化や乾物摂取量の変化を反映していると報告されている[12]。したがって，体

© The Ito Foundation

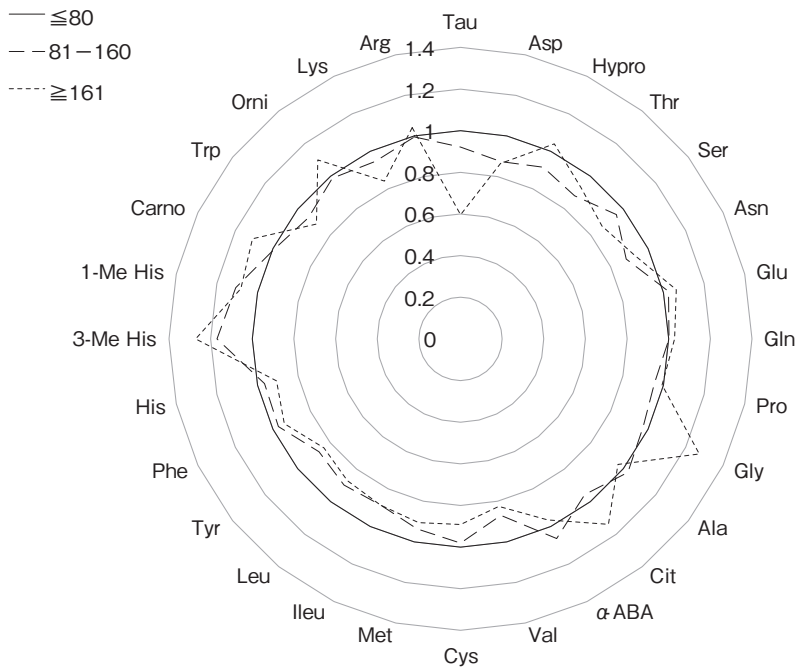

Fig. 2　Plasma amino acid profile classified by number of days open.

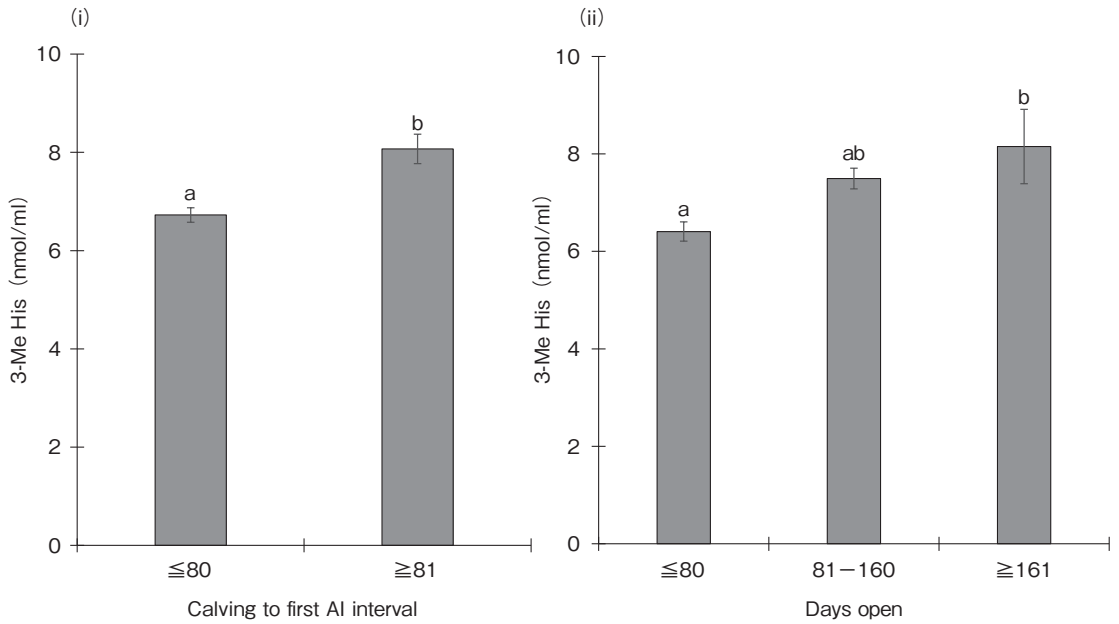

Fig. 3　Comparison of 3-Me His concentrations classified by calving to first AI interval (i), number of days open (ii). Statistically significant differences are indicated by different letters ($p<0.05$).

たんぱく質のアミノ酸分解，すなわち，エネルギー源の補足の結果であると推察された。

空胎日数とGly，Tau濃度との関係を**Fig. 4**に示した。Glyについては空胎日数＜80日，81－160日と比較して＞161日で有意に高かった（$p<0.05$）。Tauについては空胎日数＜80日，81－160

© The Ito Foundation

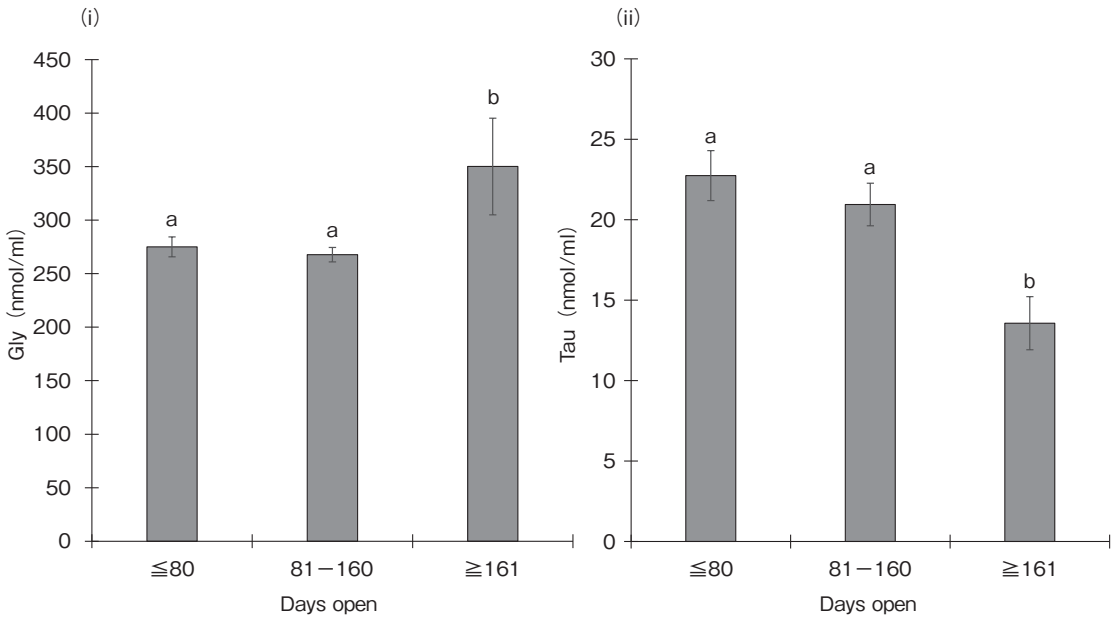

Fig. 4　Comparison of Gly（i）, Tau（ii）concentrations classified by number of days open. Statistically significant differences are indicated by different letters（p＜0.05）.

日と比較して＞161日で有意に低かった（p＜0.05）。Glyは乾物摂取量が低下する分娩前に比べ，乾物摂取量が増加する分娩後は低値になると報告している[13]。空胎日数＞161日のGly濃度の上昇は，分娩前後のエネルギー要求量の増大に伴うアミノ酸不足を筋肉組織からの動員で補う結果であると考えられた。Tauは50％以上が筋肉に存在し，カルシウムイオンの動員，浸透圧調節作用，抗酸化作用などを介して筋収縮や運動において重要な作用を担っており，筋機能維持におけるTauの重要性が示唆されている。さらに，ウシ体外受精培地へのハイポタウリン添加により，単精子侵入率の増加，精子侵入および前核融合速度の上昇，卵割速度の促進，胚盤胞への発生率の上昇が報告されている[14]。したがって，低いTau濃度が受精速度の低下や胚盤胞発生率の低下を引き起こし，空胎日数を延長させた可能性が考えられた。

血漿中アミノ酸濃度と初回AI妊否との関連について，AI（人工知能）解析を行ったところCit，Val，１-Me His，His，Tyr，３-Me His，Leu，Thr，Tauの順で初回AI妊否への寄与度が高かった。

初期のウシ胚は利用可能なすべてのアミノ酸を使用するとされている。母体由来のアミノ酸は主に妊娠初期における胚の生存と発達のために重要であり，アミノ酸代謝量はヒトの胚生存率の指標としても活用されている。本研究において，黒毛和種繁殖雌牛の分娩前後の血漿中アミノ酸プロファイルに初回AI受胎牛と不受胎牛間で有意な差異が認められたことから，黒毛和種繁殖雌牛において，分娩前後のアミノ酸プロファイルは分娩後の栄養状態および繁殖成績と深く関連すると考えられ，分娩前後の血漿中アミノ酸プロファイルを評価することは，繁殖雌牛の栄養状態を精密化するうえで，有用な情報になり得ることが示唆された。

以上のことから，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繁殖成績に影

© The Ito Foundation

響を及ぼすこと，特に分娩前後のエネルギー不足による体脂肪，体たんぱく質の動員が亢進していることが明らかとなり，さらに血漿中アミノ酸プロファイルの変化が初期胚の生存性に関与している可能性が推察された。分娩前後のエネルギー不足が繁殖成績低下の引き金になっていることが示唆されたことから，この間の栄養状態を保つ飼料設計が重要となる。

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264頭を供試し，分娩予定日の３ヵ月前から分娩後３ヵ月まで１ヵ月ごとに計７ヵ月間にわたって栄養度評価と採血による生化学分析，性ホルモン分析を実施し繁殖成績との関連を検討した。さらに，分娩前後の血漿中アミノ酸プロファイルと繁殖成績との関連についても検討した。

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交配日数，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動員の亢進が認められた。

分娩前後の血漿中アミノ酸プロファイルと繁殖成績との関連については，初回AI（－）牛群では，妊娠初期における胚の生存と発達のために重要とされるアミノ酸を含む13項目のアミノ酸で初回AI（＋）牛群と比較して有意に低かった一方で，体たんぱく質動員の指標である３-Me Hisは高値を示した。

以上のことから，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繁殖成績に影響を及ぼすこと，特に分娩前後のエネルギー不足による体脂肪，体たんぱく質の動員が亢進していることが明らかとなり，さらに血漿中アミノ酸プロファイルの変化が初期胚の生存性に関与している可能性が推察された。分娩前後のエネルギー不足が繁殖成績低下の引き金になっていることが示唆されたことから，分娩後における著しい栄養度低下を抑制する飼養管理が重要となる。

文　献

1）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.
2）平子誠，高橋ひとみ，櫛引史郎：日本家畜臨床感染症研究会誌，**6**(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）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.
5）Kida, K.：*Journal of veterinary medical science*，**65**(6)，671～677，2003.
6）Watanabe, U.：*Journal of Veterinary Science*，**15**(2)，283～288，2014.
7）Kami, K., Fujita, Y., Igarashi, S., Koike, S., Sugawara, S., Ikeda, S., Sato, N., Ito, M., Tanaka, M., Tomita, M., Soga, T.：*Mitochondrion*，**12**，644～653，2012.
8）Muroya, S., Oe, M., Nakajima, I., Ojima, K., Chikuni, K.：*Meat science*，**98**，726～735，2014.
9）Bell, A. W.：*Journal of Animal Science*，**73**，2804～2819，1995.
10）Baird G. D., Heitzman, R. J., Hibbitt, K. G.：*Biochem J*，**128**，1311～1318，1972.
11）Hamana, M., Ohtsuka, H., Oikawa, M., Kawamura, S.：*Journal of Veterinary Medical Science*，**72**，1355～1358，2010.
12）澤田久美子，長野京子，今村正昭，柴田幸児，西野直樹：家畜衛生学雑誌，**39**(4)，165～171，2014.
13）Reis, R., Figueiredo, J. B., Pacheco, M. Cowpox.：*Arquivos da Escola de Veterinaria*，**22**，213～216，1970.
14）堀登，松田達彦，石田美保，小前博文，永井卓：*Journal of Reproduction and Development*，**43**，33～40，1997.

© The Ito Foundation

南西諸島地域における肉用ヤギの消化管内部寄生線虫感染症に関する実態調査

Investigation of gastrointestinal parasites infection of meat goats in south-western islands, Japan

波　平　知　之
（琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター）

Tomoyuki Namihira
(Subtropical Field Science Center, Faculty of Agriculture, University of the Ryukyus)

The gastrointestinal parasites of *Haemonchus contrtus*, *Strongyloides papillosus* and *Cocsidia* were examined in a total of 112 meat goats raised in south-western islands, Japan (Kikai, Okinoerabu, Okinawa, Kume, Miyako, Ishigaki, Iriomote, and Yonaguni). Eggs per gram (EPG) of *Haemonchus contrtus* were higher in outdoor feeding-goat than in indoor feeding-goat, and it was also higher in group feeding-goat than in individual feeding-goat. In adthtion, EPG was higher in the fresh forage feeding-goat than in hay and concentrated feeding-goat. As the biochemical blood value, outdoor feeding-goat had low PVC and TCHO, and high GOT and GGT. Fresh forage feeding-goat had low TCHO, and high GOT and GGT. The values of Ca, IP, Na, K and Cl were not significantly different with the different feeding managements.

1．目　　的

南西諸島地域の高温多湿の気象環境は暖地型イネ科牧草の高位生産が可能なため，飼料作物の10ａあたりの生産量は全国平均の約３倍[1)]である。しかしながら，肉用ヤギの飼養環境としては寄生虫感染のリスクが高い。そのため，当地域のヤギ農家は高床式畜舎の舎飼管理が主流である。琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センターでは暖地型イネ科牧草地での肉用ヤギの周年放牧技術の開発を目的に2019年に肉用ヤギ（ボア系雑種）を導入したが，放牧による管理方式では死亡率が30％以上と放牧試験すら実施できない状況となり，これらの死因は捻転胃虫感染症によることが明らかになった[2)]。沖縄地域でのヤギの寄生虫感染による死亡事例は報告[3)]されているがその感染経路の実態は不明で，また，我が国ではヤギ用の動物医薬品も少なく，牛や豚で使用されている駆虫薬剤のヤギに対する効果を実証的に明らかにされた報告は少ない。肉用牛や乳用牛，肉豚，鶏などの主要家畜とは異なり，我が国では肉用ヤギの日本飼養標準はなく，駆虫方法についても必ずしも確立しているとは言い難い。

本研究では，肉用ヤギの飼養が盛んな南西諸島地域において，ヤギの消化管内部寄生線虫感染の実態調査を行い，その感染状況を地域別ならびに飼養管理方法の違いによる影響について検討を行う。すなわち，現在の最重要課題である寄生虫感

© The Ito Foundation

染症を克服するための，また，家畜の増頭を可能にする肉用ヤギに関する飼養管理技術の確立に向けた基盤の構築を目的とする。将来的には放牧管理を中心とする国産100％のヤギ肉生産の振興（60頭規模の生産農家の経営確立）につなげたい。

2．方　法

調査期間は2022年10月上旬から2023年３月末まで，ヤギ肉の生産が行われている南西諸島地域の鹿児島県喜界島（２農家），沖永良部島（１農家），沖縄本島（４農家），久米島（１農家），宮古島（４農家），石垣島（２農家），西表島（２農家）および与那国島の８地域で調査を実施した。調査対象農家は約20頭以上のヤギを飼養し，JA家畜セリ市場，沖縄県食肉センターならびに喜界島町営と畜場のいずれかにヤギを出荷して収入を得ている生産農家とした。調査個体は分娩歴のある雌ヤギと種雄として長期に養われている雄ヤギを調査個体とした。なお，与那国島については20頭規模のヤギを飼養している生産農家が存在していなかったため，島内の野草地で繋牧されている個体８頭を無作為に抽出し調査した。試験期間における合計調査頭数は112頭である。調査方法は農家が飼養しているヤギから約4-5頭を選抜し，約10g以上の直腸糞を採取して糞便検査に供した。糞便検査はショ糖遠心浮遊法のウイスコンシン変法[4]を用いて実施し，糞便1gあたりのEPG（Eggs per gram）とOPG（Oocysts per gram）を算出した。なお，本検査では，羊やヤギの消化管に寄生し，病原性の高い捻転胃虫（*Haemonchus contortus*），乳頭糞線虫（*Strongyloides papillosus*）ならびにコクシジウム原虫（*Coccidian*）に限定して計測した。また，寄生虫感染による健康状態への影響を確認するため，糞便採取したヤギ個体を適正に保定し，頸静脈から採血（７ml）を行い，血液成分の分析に供した。ヘマトクリット値（Ht）は遠心法で，血液学的および生化学的血液成分（ヘモグロビン［Hb］，アルブミン［Alb］，総タンパク質［TP］，総コレステロール［TCHO］，グルタミン酸オキサロ酢酸トランスフェラーゼ［GOT］，γ-グルタミルトランスペプチターゼ［GGT］，アルカリホスフォターゼ［ALP］，尿素窒素［BUN］，カルシウム［Ca］，リン［IP］，ナトリウム［Na］，カリウム［K］，塩素［Cl］）は臨床化学分析装置（富士ドライケムNX500，富士フイルム，東京）にて分析した。

なお，本研究での調査個体の血液採取は，協力農家の同意を得て，また，琉球大学動物実験規則に従い，地域の家畜保健衛生所の獣医師の協力を得て実施した。

3．結果と考察

3.1　調査地域における肉用ヤギの飼養管理方法

本調査対象農家における肉用ヤギの飼養管理方法を**Table 1** に示した。各地域における肉用ヤギの飼養方法は群飼と単飼に分けられ，その中で畜舎内の高床管理，畜舎内のコンクリート床での平飼管理，屋外での平飼管理，牧草地の放牧管理および野草地での繋留管理の５つの方法に分類された。その比率は，畜舎内の高床管理（36％）＞野草地での繋留管理（25％）＞牧草地の放牧管理（18％）＞畜舎内のコンクリート床での平飼管理（14％）＞屋外（土）での平飼管理（７％）であった。各地域におけるすべてのヤギ農家の調査は実施できなかったものの，地域別での飼養管理方法に特徴的な違いは認められず，ほぼ同じであった。群飼と単飼を比較すると，その比率（それぞれ50％）に違いはなく，飼養頭数の多い農家は主に畜舎内での高床管理で，飼養頭数の少ない農家は野草地での繋留管理が多かった。また，野草地での繁留管理では雌ヤギの分娩状況や出荷状況な

© The Ito Foundation

Table 1　The number of investigatied meat goat farmer in South-western islands, Japan

Feeding method		Group feeding-goat	Individual feeding-goat	Total	Ratio (%)
Indoor feeding-goat	Raised-floor barn	5	5	10	36
	Concreate-floor barn	2	2	4	14
Outdoor feeding-goat	Tether-grazing	—	7	7	25
	Grazing	5	—	5	18
	Soil-floor in outdoor	2	—	2	7
Total		14	14	28	100
Ratio (%)		50	50	100	—

Table 2　The gastrointestinal parasites in meat goat in South-Western islands, Japan

Region	*Haemonchus contorus* EPG (number/g)	*Strongyloides papillosus* EPG (number/g)	*Coccidia* OPG (number/g)
Kikai islands (n=7)	48.4 ± 126.3	0.6 ± 0.7	284.1 ± 338.7
Okinoerabu islands (n=6)	417.6 ± 525.9	51.2 ± 114.5	125.9 ± 238.0
Okinawa islands, Nakijin (n=16)	1362.7 ± 3671.0	2.3 ± 4.9	352.4 ± 307.4
Okinawa islands, Nishihara (n=10)	164.8 ± 259.8	97.2 ± 272.0	305.2 ± 356.2
Okinawa islands, Itoman (n=4)	670.8 ± 649.7	4.2 ± 8.4	544.7 ± 112.2
Kumejima islands (n=5)	32.0 ± 40.3	2.9 ± 6.5	360.1 ± 329.0
Miyako islands (n=24)	430.1 ± 1409.5	9.5 ± 30.7	144.6 ± 243.8
Ishigaki islands (n=11)	973.1 ± 2013.3	18.4 ± 44.7	3291.6 ± 6923.6
Iriomote islands (n=21)	139.2 ± 158.2	25.4 ± 88.0	3.8 ± 7.7
Yonaguni (n=8)	856.8 ± 1253.1	2.2 ± 5.0	24.6 ± 48.9

Mean ± standard deviation

どに応じて小規模の畜舎に移動させた飼養管理を行う農家が多かった。高温多湿の気象環境である南西諸島地域では乾燥条件を好むヤギの生理生態的特徴を考慮して飼養している農家は多く，その結果，畜舎内の高床管理が主流となっているものと考えられた。

3.2　地域別の消化管内部寄生線虫感染の実態調査

南西諸島地域における肉用ヤギの消化管内部寄生線虫感染症の感染状況について**Table 2** に示した。鹿児島県の喜界島から沖縄県の与那国島までの地域におけるヤギの糞便から病原性の高い捻転胃虫卵，乳頭糞線虫卵およびコクシジウム原虫オーシストが検出された。捻転胃虫および乳頭糞線虫のEPGやコクシジウム原虫のOPGは調査個体によるばらつきが認められ，飼養管理方法や飼養しているヤギの系統などの違いによる影響と考えられた。地域別での寄生虫感染を比較すると，肉用ヤギの飼養頭数が多い沖縄地域（沖縄本島，宮古島，石垣島および与那国島）では捻転胃虫のEPGは治療を要する感染レベル（500個/g）[5] に達していた。また，西表島と与那国島の調査個体には，捻転胃虫と乳頭糞線虫のEPGが未検出の個体も存在していたものの，コクシジウム原虫のOPGは調査したすべての個体から検出された。各地域において，ヤギの飼養管理方法は畜舎の場所や飼養頭数に応じた農家独自の工夫（高床，放牧，繋留あるいはそれらの組み合わせ）が認めら

© The Ito Foundation

れたが，管理技術に関した統一性は認められず，我が国における肉用ヤギの飼養管理技術は必ずしも確立しているとは言い難いものと推察された。本調査においては，南西諸島地域のヤギには世界的に蔓延している熱帯性の捻転胃虫の存在が確認された。

3.3　飼養管理方法の違いによる消化管内部寄生線虫感染の比較

飼養管理方法の違いによる肉用ヤギの消化管内部寄生線虫の感染状況を**Table 3** に示した。捻転胃虫のEPGが最も高く検出されたのは牧草地での放牧管理（1,914個/g）であり，ついで野草地での繋留管理（471個/g），屋外（土）での平飼管理（294個/g）であった。放牧管理における捻転胃虫のEPGは治療を要する感染レベルの約４倍程度の値となっていた。高床管理やコンクリート床での畜舎管理においては，捻転胃虫卵は検出されたものの，その感染レベルは低かった。

給与飼料の違いによる消化管内部寄生線虫の感染状況を**Table 4** に示した。乾草と濃厚飼料を給与して飼養管理されているヤギは捻転胃虫感染症の感染レベルは低かったものの，青草を給与して飼養管理されているヤギは治療を要する感染レベルに達していた。畜舎内の高床管理のEPG（48個/aと210個/g）と畜舎内のコンクリート床での平飼管理のEPG（23個/g）が他の管理方法のEPGと比較して著しく低い値を示していたことから，高温多湿の環境下にある南西諸島地域においては，放牧地あるいは野草地での繋留管理はヤギと土壌との接触が常にあり，また，青草（牧草や雑草など）を採食していることによって捻転胃虫の経口感染が広がっているものと推察された。

群飼と単飼の違いによる寄生虫感染状況を比較すると，捻転胃虫とコクシジウム原虫の感染は，単飼よりも群飼において２倍以上高いEPGとOPGの値を示していた。特にコクシジウム原虫の感染に関しては高床管理であってもOPGは2,101個/gの値を示し，治療を要するレベル（1,000個/g）[6]に達していた。群飼の場合は高床管理であっても寄生虫感染を蔓延させるリスクが高いことが推察される。これらの結果を考慮すると，南西諸島地域における肉用ヤギの飼養管理方法は，寄生虫感染リスクを回避する観点からは高床式畜舎での単飼管理が最も適し，青草のみの飼養管理よりも乾草給与が望ましいことが示唆された。

3.4　飼養管理方法の違いによる肉用ヤギの血液学的および生化学的血液成分

飼養管理方法の違いによる肉用ヤギの血液学的および生化学的血液成分を**Table 5** に示した。寄生虫の感染レベルの高かった放牧管理は舎飼管理や繋留管理などに比べてHtが低い値（24.7％）を示していた。一般的に捻転胃虫感染が重度の場合はHtが10％台の著しい貧血状態になる場合が多い[7]。本調査時において，放牧管理のEPGは1,914個/gと高くなっていたが，Htは正常値[8]の範囲内にあり，捻転胃虫感染症による悪影響は示していないものと推察された。なお，本研究では顕微鏡での形態観察によって寄生虫卵を同定したため，特に放牧個体についてはDNAを用いたPCR検査によって捻転胃虫感染を再検査する必要があるものと考えられた。

栄養状態を示すTCHOは青草のみを給与している飼養管理（放牧管理や繋留管理など）は畜舎内で乾草と濃厚飼料を給与している飼養管理よりも低く，正常値[8]を下回る値（70.5mg/dl）となっていた。青草のみでの飼養管理では乾物摂取量を満たしていない可能性が示唆された。肝機能の状態を示すGPTはいずれの管理方法ともに正常値[8]以下の値であり，また，GGTは高床式の飼養管理を除いて正常値[8]よりも高い値となっていたがその要因については不明である。その他の成分値については正常値[8]の範囲内にあった。これらの

© The Ito Foundation

Table 3　Effect of feeding method on gastrointestinal nematode infection in meat goat in South-western islands, Japan

Feeding methods		Group feeding			Individual feeding		
		Haemonchus contorus EPG（number/g）	*Strongyloides papillosus* EPG（number/g）	*Coccidia* OPG（number/g）	*Haemonchus contorus* EPG（number/g）	*Strongyloides papillosus* EPG（number/g）	*Coccidia* OPG（number/g）
Indoor feeding-goat	Raised-floor barn	48	3	2101	210	3	265
	Concreate-floor barn	23	1	248	37	1	415
Outdoor feeding-goat	Tether-grazing	—	—	—	471	35	85
	Grazing	1915	62	110	—	—	—
	Soil-floor in outdoor	294	0	571	—	—	—
Mean ± standard deviation		569.9 ± 905.0	16.3 ± 30.3	757.4 ± 916.5	239.3 ± 218.3	13.3 ± 19.2	255.2 ± 165.4

Table 4　Effect of feed on gastrointestinal nematode infection in meat goat in South-Western islands, Japan

Feed	*Haemonchus contorus* EPG（number/g）	*Strongyloides papillosus* EPG（number/g）	*Coccidia* OPG（number/g）
Hay and concentrate feeding-goat	79.5 ± 87.3	2.0 ± 1.3	757.4 ± 899.1
Fresh forage feeding-goat	893.2 ± 889.2	32.4 ± 31.0	255.2 ± 273.5

Mean ± Standard deviation

Table 5　Effect of feeding methods on hematological and biochemical blood components in meat goats in South-western islands, Japan

tem	Hay and concentrate feeding-goat			Fresh grass feeding-goat				Normal range*
	Raised-floor barn (n=17)	Concreate-floor barn (n=12)	Mean ± SD	Soil-floor barn (n=3)	Tether-grazing in native plant (n=14)	Grazing (n=13)	Mean ± SD	
PCV (%)	32.6 ± 5.9	32.9 ± 4.5	32.7 ± 0.2	31.0 ± 2.0	30.3 ± 5.0	24.7 ± 5.7	28.7 ± 3.4	22-38
Hb (g/dl)	11.4 ± 1.8	11.0 ± 0.8	11.2 ± 0.3	10.0 ± 0.7	10.1 ± 2.1	9.2 ± 1.9	9.7 ± 0.5	8-12
ALB (g/dl)	3.3 ± 0.3	3.0 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.9 ± 0.1	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.6	3.3 ± 0.5	2.7-3.9
TP (g/dl)	7.4 ± 0.8	6.9 ± 0.7	7.2 ± 0.4	8.7 ± 0.3	9.0 ± 1.1	7.4 ± 1.8	8.4 ± 0.8	5.9-7.4
TCHO (mg/dl)	88.8 ± 35.4	83.6 ± 15.3	86.2 ± 3.7	67.7 ± 14.2	72.8 ± 44.6	70.9 ± 27.8	70.5 ± 2.6	80-130
GOT (IU/l)	85.2 ± 37.0	72.8 ± 19.7	79.0 ± 8.8	89.7 ± 19.4	95.5 ± 34.0	82.7 ± 37.5	89.3 ± 6.4	67-117
GGT (IU/l)	67.9 ± 27.4	90.8 ± 31.2	79.3 ± 16.1	92.0 ± 15.7	126.9 ± 1116.3	77.5 ± 36.4	98.8 ± 25.4	43-71
ALP (I U/l)	262.8 ± 358.8	453.6 ± 360.2	358.2 ± 134.9	997.3 ± 1299.2	261.2 ± 334.9	300.3 ± 385.6	519.6 ± 414.2	42-775
BUN (mg/dl)	14.0 ± 7.8	14.0 ± 7.8	14.3 ± 0.4	20.7 ± 11.9	16.9 ± 4.2	10.1 ± 4.3	15.9 ± 5.4	15-33
Ca (mg/dl)	9.2 ± 0.6	9.2 ± 0.6	9.2 ± 0.0	8.9 ± 0.5	9.5 ± 0.9	9.0 ± 2.8	9.1 ± 0.3	8.5-10.2
IP (mg/dl)	5.6 ± 1.5	7.6 ± 2.7	6.6 ± 1.4	4.1 ± 0.5	6.7 ± 2.3	4.4 ± 1.7	5.1 ± 1.4	7.5-12.3
Na (mmol/l)	148.8 ± 1.4	146.6 ± 1.9	147.8 ± 1.3	146.3 ± 0.6	147.9 ± 1.0	147.2 ± 2.9	147.1 ± 0.8	142-155
K (mmol/l)	5.8 ± 1.7	4.7 ± 0.5	5.2 ± 0.7	7.1 ± 1.6	6.8 ± 1.5	5.9 ± 1.8	6.6 ± 0.6	3.5-6.7
Cl (mmol/l)	111.7 ± 2.6	108.3 ± 2.1	110.0 ± 2.4	108.3 ± 2.5	110.5 ± 2.4	111.1 ± 2.6	110.0 ± 1.4	99-110

Mean ± standard deviation
*The data was indicated in a text book of Livestock Physiology (In Japanese)

結果から，本調査で検査したヤギの健康状態を総合的に考察すると，いずれのヤギともに血液学的および生化学的血液成分の面からは健康状態は良好であるものと推察された。

4．要　約

南西諸島地域（鹿児島県喜界島，沖永良部島，沖縄本島，久米島，宮古島，石垣島，西表島およ

© The Ito Foundation

び与那国島）で飼養されている合計112頭の肉用ヤギの糞便検査を行い，消化管内部寄生線虫感染症の実態調査を実施した。その結果，各地域のヤギの糞便から熱帯性の捻転胃虫の他，乳頭糞線虫およびコクシジウム原虫が検出された。病原性の高い捻転胃虫のEPGを飼養管理方法の違いで比較すると，舎飼管理に比べて屋外管理（繋留管理と放牧管理）で高く，また，単飼管理より群飼管理で捻転胃虫のEPGが高くなった。給与飼料の違いでは，乾草と濃厚飼料を給与した場合よりも青草を給与した場合にEPGが著しく高かった。血液検査では，ヤギの健康状態への悪影響は認められなかったものの，舎飼管理より屋外管理でPCVとTCHOが低く，給与飼料の違いでは，乾草と濃厚飼料を給与するより青草給与でTCHOが低く，GOTやGOTが高かった。Ca，IP，Na，K，Clは管理方法の違いによる影響は認められなかった。

文　献

1） 農林水産省大臣官房統計部：農林水産統計，作物統計調査，11，2023.［2023年４月12日引用］URL：https://www.maff.go.jp/j/tokei/kouhyou/sakumotu/sakkyou_kome/attach/pdf/index-13.pdf

2） 琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター：琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター年報，18号，13，2019.

3） 奥村尚子，豊島靖：沖縄県家畜衛生試験場年報，**55**，95～97，2019.

4） 平詔享：獣医寄生虫検査マニュアル．93．文英堂出版，東京，2016.

5） Handbook for the Control of Internal Parasites of Sheep & Goats-2019: University of Guelph, Canada.（新井由里香，井上誠士，塚原洋子，元村誠（訳）：めん山羊の内部寄生虫防除ハンドブック），13～17，2019.

6） 堀井洋一郎，梅木俊樹：動薬研究，**65**，1～10，2009.

7） 柄武志，中川和克，川口めぐみ，山西富野，中谷英嗣，松本容二，國吉佐知子，村上久志：日本獣医師会雑誌，**59**，607～611，2006.

8） 津田恒之，小原嘉昭，加藤和雄：第二次改訂増補，家畜生理学．306．養賢堂，東京，2004.

© The Ito Foundation

遺伝性心筋症による豚の突然死の病態解明と生前検査法の確立

Pathogenesis of sudden death in pigs due to genetic cardiomyopathy and establishment of antemortem diagnostic method

相 原 尚 之・志 賀 崇 徳
（麻布大学獣医学部）

Naoyuki Aihara and Takanori Shiga
(School of Veterinary Medicine, Azabu University)

The high mortality rate of fattening pigs is an important issue that directly affects producers' profitability. The authors encountered a case in which a group of male pigs died as a result of anesthesia during castration and found that the cause of death was hereditary cardiomyopathy resulting from abnormal dystrophin expression. This study aimed to establish an antemortem testing method for diagnosing hereditary cardiomyopathy caused by abnormal dystrophin expression and understand the pathogenesis of genetic cardiomyopathy-driven sudden death in pigs. In this study, pigs from two families exhibiting dystrophin expression abnormalities were used for electrocardiographic measurements under isoflurane inhalation anesthesia. In the family lineage exhibiting sudden death during anesthesia, mutant carriers showed premature ventricular contraction at high isoflurane concentrations and cardiac function abnormalities. Pathological examination revealed hemorrhage in the heart and degenerative findings in the myocardium, whereas morphological examination confirmed severe cardiac injury. On the contrary, the family lineage exhibiting dystrophin expression abnormalities due to skeletal muscle degeneration during slaughter showed no abnormalities on electrocardiogram under similar anesthesia conditions. This study established a method for analyzing cardiac function under isoflurane anesthesia as an antemortem diagnostic method for hereditary cardiomyopathy. Examination of two mutation-carrying families revealed that the extent of effects on cardiac function varied with the mutation, indicating that cardiac function tests are useful for assessing the risk of sudden death. Additionally, a dystrophin gene mutation associated with swine stress syndrome like symptom, which was previously reported in the United States, was detected in Japan. This suggests that dystrophin gene mutations are widely distributed. Therefore, it is necessary to investigate the actual situation using the antemortem testing method established in this study.

© The Ito Foundation

1．目　　的

肥育豚の高い死亡事故率は生産者の収益低下に直結する重要課題である。著者らは去勢時の麻酔により雄豚が集団で死亡する事例に遭遇し，死因がジストロフィン発現異常による心不全であることを明らかにした。その同腹子からジストロフィン発現異常による遺伝性心筋症の豚家系を作出し，ジストロフィン遺伝子異常の検出法と心筋症研究に有用なブタモデルを確立した（特願2021-56429）。遺伝病は現場適用可能な検査法が確立されることにより育種選抜で排除することができ，肥育中の突然死を未然に防ぐことで事故率低減に貢献できる。本研究の目的は，ジストロフィン発現異常による遺伝性心筋症による豚の突然死の実態を明らかにし，その生前診断法を確立することである。

我が国における離乳後肥育豚の事故率は5.9％とされ（農中総研　調査と情報 2018），事故率の低減が生産者の収益性向上に直結する。肥育豚の死亡原因の特定は難しく，特に出荷直前での突然死は離乳直後の飼料の問題（セレン・ビタミンE欠乏）や感染症等の飼養失宜とは異なり，飼養管理では対応できない遺伝性素因が関与することがあり，摘発には新規の検査法が必要である。ブタにおけるジストロフィン異常症は，肥育中の突然死や肉質の悪化に関与することが明らかになった遺伝性の疾患である[1～4]。本研究は，出荷期の突然死に関与するジストロフィン発現異常による遺伝性心疾患の実態を明らかにし，生産現場・育種選抜において摘発・淘汰するために必要な技術を構築する。

この目的の達成にあたり，この遺伝性心筋症の病態解析，現場で実施可能な麻酔による生前診断法の検討を実施した。

2．方　　法

本研究に関わる動物実験は，麻布大学動物実験委員会の許可を受け（承認番号：211203-１），麻布大学動物実験指針を遵守して実施した。

2.1　動物および検査材料

ジストロフィン遺伝子異常が確認された２家系を実験に用いた。

家系１：本学で飼育するジストロフィン遺伝子異常の保因雌豚１頭を交配し産子を得た。産子11頭（３ヶ月齢，54.6～63.8kg）は，イソフルラン吸入麻酔下での心電図検査，組織学的評価，免疫組織学的検索を実施した。その内訳は変異保因豚６頭と非保因豚５頭である。

家系２：食肉検査時に骨格筋病変を認めた個体と血縁関係を持ち，ジストロフィン発現異常が明らかになった家系の雄豚５頭について，５ヶ月齢（89～112kg）においてイソフルラン吸入麻酔下での心電図検査，組織学的評価，免疫組織学的検索を実施した。その内訳は変異保因豚３頭と非保因豚２頭である。

また，食肉検査時に変性性筋病変として摘発された約６ヶ月齢の豚６頭を対象に，ジストロフィン遺伝子の変異部位の解析を行った。

2.2　心電図検査

心電図検査は，アルファキサロン：５mg/kg（アルファキサン®；Meiji Seikaファルマ株式会社）およびジアゼパム：0.5mg/kg（ジアゼパム注射液５mg「タイヨー」；武田テバファーマ株式会社）を筋肉内注射，または塩酸メデトミジン0.06mg/kg（ドミトール；日本全薬工業株式会社），ミダゾラム0.2mg/kg（ドルミカム注射液10mg；丸石製薬株式会社）および酒石酸ブトルファノール0.2mg/kg（ベトルファール５mg；明治アニマルヘルス株式会社）を筋肉内注射して鎮静後，麻酔薬気化器によりイソフルラン（マイラ

© The Ito Foundation

Fig. 1　Isoflurane inhalation anesthesia method. Electrocardiography was performed under anesthesia.

ン製薬株式会社）を吸入させた。イソフルラン濃度を１％から４％まで徐々に上昇させ，心電図を記録した（**Fig. 1**）。

2.3　病理解剖学的検査および病理組織学的検査

心電図検査後は速やかにペントバルビタールナトリウムの静脈内過剰投与を行い，病理解剖に供し，心臓および骨格筋を採材した。採材した材料を10％中性緩衝ホルマリンで固定後，常法に従いパラフィンブロックに包埋した。ミクロトームを用いて３ μmに薄切し，ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を実施した。

2.4　免疫組織学的検索

免疫組織染色により，上記解析材料中のジストロフィン発現を評価した。抗ジストロフィン抗体には，Ab15277（希釈倍率500倍，polyclonal，C末端認識抗体）およびNCL-DYS1（希釈倍率100倍，clone Dy4/6D3，Rod領域認識抗体）を用いた。二次抗体にはHRP標識ヒストファインシンプルステインMAX-PO（MULTI）を使用した。反応後，3-3'ジアミノベンチジン・4HCL（DAB）で発色し，ヘマトキシリンで核染色を施した。

2.5　遺伝学的検索

採材した骨格筋はドライアイスとともに粉砕し，RNeasy Plus Micro Kit（QIAGEN）を用いてRNAを抽出した。逆転写反応はSuperScript IV First-Strand Synthesis System（invitrogen）を用い，付属説明書に従い行った。得られたcDNAテンプレートとして，既報のプライマーを用いてPCRを実施した[1)]。PCR産物は１％アガロースゲルで電気泳動し，目的のバンドをNucleoSpin Gel and PCR Clean-up（タカラバイオ株式会社）を用いて精製し，シークエンス解析（ユーロフィンジェノミクス株式会社）を実施した。参照配列としては，National Center for Biotechnology Informationに登録されている豚のジストロフィンmRNA（NM_001012408.1）を用いた。検出された点変異は，PolyPhen-2（PolyPhen-2：prediction of the functional effects of human nsSNPs（harvard.edu））により解析し，スコア0.15以上を病原性がある変異として記録した。

3．結果と考察

3.1　心電図検査

家系１：変異保因豚６頭中５頭において，イソフルラン濃度を上昇させるにつれ，心室期外収縮がみられ，１頭では心室頻拍も認められた（**Fig. 2A**）。特に保因雄１頭では左軸偏位の心室期外収縮が認められるため，右心室由来と考えられた。

© The Ito Foundation

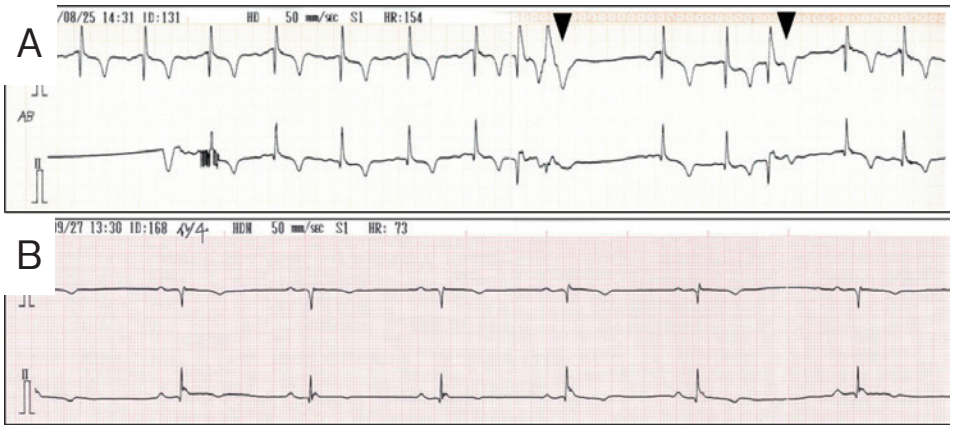

Fig. 2　Electrocardiogram findings under isoflurane anesthesia. (A) Premature ventricular contractions (arrowheads) were observed in a pig from family 1. (B) Cardiac arrhythmia was not observed in a pig from family 2.

また，１頭ではイソフルラン濃度を上昇させることにより徐脈や体表皮膚のチアノーゼが認められた。非保因個体５頭において異常所見は認められなかった。

家系２：変異保因雄豚３頭で試験を実施し，イソフルラン濃度を上昇させても異常所見は認められなかった（**Fig. 2B**）。R 波の大小や心拍数の増減が認められたものの，麻酔処置による影響の範囲内であると考えられた。変異非保因豚２頭でも異常は認められなかった。

以上より，ジストロフィン変異保因家系における心機能異常を麻酔処置により誘発することが可能であることが示された。心機能異常は，正常時または鎮静時には発現しておらず，イソフルラン吸入濃度を上昇させることで発現することが示され，段階的にイソフルラン濃度を上昇させることで評価可能であることが明らかになった。また，複数のジストロフィン異常症家系豚で試験を実施したところ，心機能異常を発現したのは１家系のみであった。ジストロフィン遺伝子の変異の多様性はヒト患者でも知られていることであり，その変異が心機能，骨格筋機能に与える程度もさまざまである[5]。豚においてもジストロフィン遺伝子の変異を保因することが明らかになったとしても，それが生体に及ぼす機能は麻酔試験や肉質への影響により評価する必要があると示唆された。

3.2　病理解剖学的検査

家系１：変異保因豚６頭中５頭において，心嚢水の増加，右心室の拡張所見が認められ，４頭では心内膜または心外膜に出血がみられた（**Fig. 3A**）。変異非保因豚５頭中１匹において右心室の拡張がみられた。骨格筋の病変は軽度であるものの，変異保因豚の２頭では薄筋または腹直筋に褪色および白色線状病変がみられた（**Fig. 3B**）。

家系２：変異保因豚３頭中２頭に心嚢水の増量，右心室拡張がみられ，うち１例では左心室乳頭筋において心内膜に出血が観察された。非保因豚では２例中１例に心嚢水の増量と右心室の拡張がみられた。保因豚の１頭では薄筋において白色筋状病変が観察された。

以上のように，心電図検査結果に一致して心臓に肉眼的な病変が観察された。

3.3　病理組織学的検査

家系１：変異保因豚において，心筋の顆粒状変性や空胞変性，好酸性の増加などの変性所見と，心筋の核に大型化がみられ，特に右心房の心内膜側

© The Ito Foundation

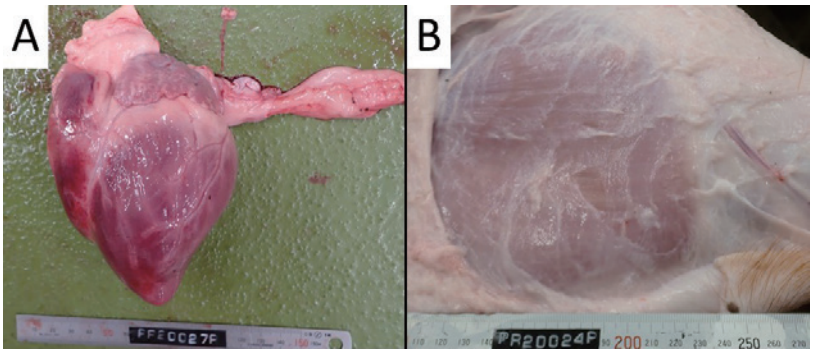

Fig. 3　Gross findings of the heart and skeletal muscles of the pig carrying the dystrophin gene mutation.

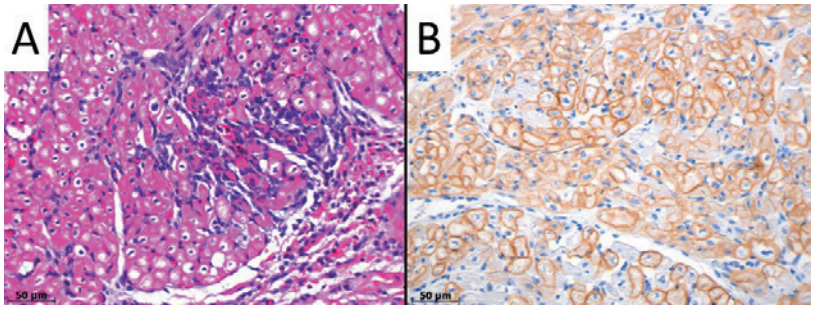

Fig. 4　Histopathology and immunohistochemical staining of the heart of pigs carrying the dystrophin gene mutation. (A) Degeneration of myocardium and macrophage infiltration. (B) Reduced dystrophin expression in the myocardium.

で高度であった。また，心筋線維の蛇行，太さの乱れや歪な分岐が確認され，一部で炎症細胞の浸潤や軽度な線維増生もみられた（**Fig. 4A**）。骨格筋には変性・再生像が軽度にみられ，筋細胞周囲の細胞数が増加していた。非保因豚においては，これら所見は認められなかった。

家系２：心臓については好酸球もしくはリンパ球浸潤が散見されたが，保因個体と非保因個体の間に明らかな程度の差は認められなかった。骨格筋病変はいずれも軽微であったが，保因豚においては薄筋ならびに横隔膜で大小不同や変性筋線維が目立ち，薄筋ではマクロファージの清掃反応が散見された。

3.4　ジストロフィン発現解析

家系１：変異保因豚は６頭すべてで，心筋および骨格筋でジストロフィン発現が減弱し，モザイク状の発現を示した（**Fig. 4B**）。一方，非保因豚は５頭すべてで，心筋および骨格筋のジストロフィンの正常な発現が認められた。

家系２：変異保因豚３頭すべてで，心筋および骨格筋でジストロフィン発現が減弱し，モザイク状の発現を示した。発現低下は肥大・円形化した線維や小径の線維といった不均一な線維径をとるものに多くみられた。いずれの領域においても発現低下領域は10％以下であり，組織変化が軽微であることに対応するものと考えた。非保因豚２例では正常なジストロフィン発現を認めた。

© The Ito Foundation

Table 1　Summary of the detected mutations

Case no.	Mutation type	cDNA mutation details*		Amino acid	PolyPhen-2 score /Prediction（Hum Div）
5	missense	1773 A>G	exon 13	Glu 527 Gly	0.191/Possibly damaging
5	missense	1851 T>C	exon 14	Ile 553 Thr	0.638/Possibly damaging
4	in-frame skipping	4834_5013del（180bp）	exon 35	60AA delition	–
5	missense	6050 C>T	exon 41	Arg1953Trp	0.984/Probably damaging
1	missense	7529 T>C	exon51	Ser 2446 Pro	0.987/Probably damaging
3	in-frame skipping	8185_8904del（729bp）	exon 56-59	243AA delition	–
6	in-frame skipping	10191_10229del（39bp） 10191_10229del, 10362_10520del（198bp）	exon 71 exon 71, 74	13AA delition 66AA delition	–
1, 2, 3	missense	11118 G>A	exon 77	Ser 3642 Asn	0.774/Possibly damaging

*Reference sequence, NM_001012408.1.

いずれの家系もジストロフィン発現減弱がみられたが，家系１では麻酔下での心機能異常ならびに心筋病変が特徴であり，家系２においては骨格筋病変，心筋病変ともに軽度であった。本疾患の病変分布や機能障害の程度といった表現型には家系により差があることが明らかとなった。

3.5　ジストロフィン遺伝子解析

家系１，２とは由来の異なるジストロフィン異常症豚６頭（症例１～６）を解析し，病原性に関与すると考えられる５つのミスセンス変異と３つのエクソンスキップを持つ転写産物が検出された（**Table 1**）。

以上のように，ブタにおけるジストロフィン遺伝子変異の多様性が明らかになった。ジストロフィン遺伝子は非常に大きい遺伝子であり，また，変異が多岐にわたることから，特定の部位のみの解析では検出できず，遺伝子全長の解析が必要となり，これは費用，時間を要する試験である。また，変異が認められたとしても，それが生体に与える影響も評価できず，機能評価の点での限界もある。これを踏まえ，ジストロフィン異常症が疑われる個体について，麻酔下での心電図測定による生前検査法は，迅速性と機能評価が可能な点で有用であると考えられる。

また，エクソン41でみられたミスセンス変異は米国にて報告されている変異[4]と同一であった。この変異は，豚ストレス症候群類似の病態を示す変異として認識され，特定の家系でのみ維持されているものと考えられていたが，突然死や肉質に影響のある変異が地域を超えて分布することが示され，ジストロフィン遺伝子変異は広範囲に豚で保持されている可能性がある。突然死事例や肉質の問題を認めた際には，その上流の種豚において，非侵襲的な麻酔による心機能評価を実施することで，問題となる素因を持つ種豚を特定し，被害を最小化することが可能になると考えられる。

4．要　　約

肥育豚の高い死亡事故率は生産者の収益低下に直結する重要課題である。著者らは去勢時の麻酔により雄豚が集団で死亡する事例に遭遇し，死因がジストロフィン発現異常による遺伝性心不全であることを明らかにした。本研究の目的は，ジストロフィン発現異常による遺伝性心筋症の生前診断法を確立し，それによる豚の突然死の実態を明らかにすることである。本研究では，ジストロフィン異常症の２家系の豚を用い，イソフルラン吸入麻酔による心電図測定を行った。麻酔時の突

© The Ito Foundation

然死から摘発された家系では，変異保因豚はイソフルラン濃度の上昇とともに心室期外性不整脈が発生し，心機能異常を検出することができた。病理検査により心臓における出血や心筋の変性所見を認め，心臓への強い傷害が形態学的にも確認された。一方，骨格筋の肉質に影響があることから検出されたジストロフィン異常症家系では，同様の麻酔条件でも心電図に異常は認められなかった。本研究により，イソフルラン麻酔による心機能検査法の手法が確立した。複数の変異保因家系の検査から，心機能への影響は変異により程度に差があることが明らかになり，突然死リスクを評価するために心機能検査が有用であることが示された。また，米国で豚ストレス症候群に類似の病態を示すジストロフィン遺伝子変異として報告された変異が国内でも検出された。ジストロフィン遺伝子変異は潜在的に広く分布している可能性があり，今回確立した生前検査法を活用し，その実態を調査していく必要性が示された。

文　献

1） Aihara, N., Kuroki, S., Inamuro, R., Kamiya, Y., Shiga, T., Kikuchihara, Y., Ohmori, E., Noguchi, M., Kamiie, J.：*Veterinary Pathology*，**59**，455～458，2022.

2） Hollinger, K., Yang, C. X., Montz, R. E., Nonneman, D., Ross, J. W., Selsby, J. T.：*FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*，**28**，1600～1609，2014.

3） Horiuchi, N., Aihara, N., Mizutani, H., Kousaka, S., Nagafuchi, T., Ochiai, M., Ochiai, K., Kobayashi, Y., Furuoka, H., Asai, T., Oishi, K.：*The Journal of Veterinary Medical Science / the Japanese Society of Veterinary Science*，**76**，243～248，2014

4） Nonneman, D. J., Brown-Brandl, T., Jones, S. A., Wiedmann, R. T., Rohrer, G. A.：*BMC genomics*，**13**，233～233，2012

5） Darras, B. T., Urion, D. K., Ghosh, P. S.：*GeneReviews*, Dystrophinopathies, University of Washington, Seattle，1993-2021.

© The Ito Foundation

牛伝染性リンパ腫ウイルス由来の非翻訳性RNAと結合する宿主たんぱく質の同定（Ⅲ）

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

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. In this study, we intended to clarify molecular machinery underlying the hnRNPM-AS1-S interaction by analyzing hnRNPM-RNA complex. The pull-down assay using recombinant hnRNPM mutants showed that RNA recognition motif 1 and 2, located in the N-terminal region of bovine hnRNPM, are responsible for binding AS1-S. Furthermore, an RNA immunoprecipitation assay showed that introduction of AS1-S increased the number of mRNA that co-immunoprecipitated with bovine hnRNPM. These results suggested that AS1-S could alter the interaction between hnRNPM and host mRNAs, potentially interfering with cellular functions. Since most of the identified mRNAs that exhibited increased binding to hnRNPM were correlated with cell proliferation, AS1-S may contribute to tumor progression of BLV-infected cells.

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[1)]。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％のみであることなど，BLVの病態

© The Ito Foundation

進行やリンパ腫発症機構の詳細にはいまだ不明な点が多い。

BLVは，感染細胞においてたんぱく質に翻訳されない非翻訳性RNAを複数発現するが，それらの転写産物の機能は解明されていない[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]。2020-2021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結合たんぱく質hnRNPMを同定するとともに（2020年度成果），AS1-S RNAを強制発現した細胞では外部からの刺激に対する応答性やシグナル伝達等の機能にかかわる遺伝子群が発現変動することを明らかにした（2021年度成果）。hnRNPMは，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ち，さまざまな細胞機能に関与する。そのため，AS1-S RNAとhnRNPMとの相互作用解析は，BLVの病態解明に大きく寄与すると考えられる。

本課題では，RNA-たんぱく質複合体解析により，BLV感染細胞内におけるAS1-S RNAとhnRNPM相互作用の分子機構を明らかにする。

2．方　法

2.1　細胞

AS1-S発現細胞の解析には，2020年度の伊藤記念財団助成において樹立したAS1-S RNAを持続発現するMDBK AS1-S細胞および対照細胞（MDBK mock）を用いた。組換えたんぱく質の発現には，293T細胞（ATCC CRL-3216）を用いた。

2.2　組換えプラスミドの作出

MDBK細胞から抽出したcDNAをテンプレートとしてウシhnRNPM遺伝子をクローニングし，そこからRNA認識モチーフ（RRM）を部分的に欠損させた配列をPCRで増幅した。得られた断片にHisタグ配列を付加して発現プラスミドpCAG neoに組み込み，組換えhnRNPM発現プラスミドを構築した（**Fig. 1a**）。AS1-S RNAプローブ発現プラスミドについては，2020年度の伊藤記念財団助成において作出した発現プラスミドpSPT19 AS1-Sを用いた。

2.3　AS1-S RNAの合成とビオチンラベル付加

RiboMAX Large Scale RNA Production Systems（Promega）を用いて，pSPT19 AS1-SのT7プロモーターからAS1-S RNAを合成した。合成したRNA断片にPierce RNA 3' End Biotinylation Kit（Thermo Fisher）を用いてビオチンラベルを付与したものをRNAプローブとして以降の解析に供した。

2.4　トランスフェクション

構築した組換えhnRNPM発現プラスミドをポリエチレンイミン（PEI）（Polysciences）を用いて293T細胞にトランスフェクションし，72-96時間後に細胞を回収して以降の解析に供した。

2.5　RNA-protein pull-down assay

組換えhnRNPM発現293T細胞をRIPAバッファー（Thermo Fisher）で処理して調製した細胞抽出液をAS1-S RNAプローブと混合し，Pierce Magnetic RNA-Protein Pull-Down Kit（Thermo Fisher）を用いてRNAプローブと結合するたんぱく質をpull-downした。

2.6　ウェスタンブロット解析

SDS-PAGEで分離したサンプルをPVDF膜に転写し，５％スキムミルクでブロッキング後，抗Hisタグマウス抗体または抗beta-tubulin抗体（MBL）で室温１時間感作した。その後，HRP標識抗マウス抗体（abcam）で室温１時間感作し，SuperSignal West Dura Extended Duration

© The Ito Foundation

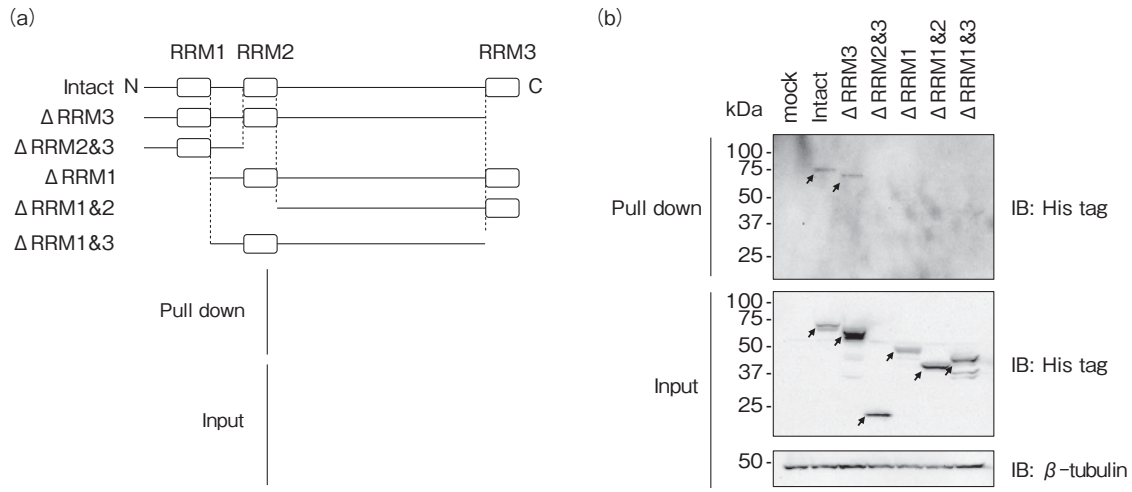

Fig. 1(**a**)　Schematic diagrams of bovine hnRNPM protein and the constructed deletion mutants. White boxes indicate RNA recognition motifs (RRM). All constructs were fused with a his-tag sequence and inserted into the expression plasmid pCAG neo.

(**b**)　Pull-down assay results using AS1-S RNA probe and recombinant hnRNPMs. Recombinant proteins were expressed in 293T cells and the obtained cell lysates were mixed with a biotinylated AS1-S RNA probe, and subsequently assessed by western blotting. Arrows indicate the predicted sizes of the recombinant proteins.

Substrate（Thermo Fisher）でたんぱく質を検出した。

2.7　RNA免疫沈降（RNA immunoprecipitation：RIP）assay

Magna RIP kit（Merck）を用いて実施した。具体的には，抗hnRNPM抗体（Santacruz）およびコントロール抗体を磁気ビーズと混合し，MDBK AS1-S細胞およびMDBK mock細胞をRIPAバッファーで処理した細胞溶解液と混合して4℃で3時間反応させた。その後，洗浄バッファーで洗浄し，各抗体で免疫沈降されたたんぱく質―RNA複合体を以降の解析に供試した。

2.8　リアルタイムRT-PCR

RIP assayで得られたたんぱく質-RNA複合体に含まれるAS1-S RNA量をOne Step PrimeScript RT-PCR Kit（Perfect Real Time）（TaKaRa）を用いて定量した。

2.9　RNA-seqおよびGene Ontology（GO）解析

RIP assayで得られたたんぱく質-RNA複合体からRNAを精製し，SMARTer Stranded RNA-Seq Kit（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，100bp paired-end）。得られたデータをウシゲノムにマッピングして遺伝子量情報を取得したのち，抗hnRNPM抗体とコントロール抗体でそれぞれRIPしたサンプルに含まれるRNA量を比較し，コントロール抗体と比較して抗hnRNPM抗体で2倍以上のリードカウントが得られた遺伝子をhnRNPM結合遺伝子と定義した。MDBK AS1-S細胞およびMDBK mock細胞のhnRNPM結合遺伝子リストを比較し，MDBK AS1-S細胞のみで検出された遺伝子を用いてGO解析を実施した。

3．結果と考察

3.1　AS1-S RNAと結合するhnRNPM領域の同定

Fig. 1aに示すとおり，ウシのhnRNPMは3つ

© The Ito Foundation

のRRMを有している。そこで，これらのRRMを欠損させた組換えhnRNPMを用いてAS1-S RNAとのpull-down assayを実施し，AS1-S RNAとの結合に必要なRRMの同定を試みた。その結果，RRM1および２を有する組換え体（Intact，ΔRRM3）のみがAS1-S RNAと結合し，これらの領域がAS1-SとhnRNPMの結合に重要であることが明らかとなった（**Fig. 1b**）。

3.2　RIP assayによるhnRNPM-RNA複合体の解析

抗hnRNPM抗体を用いてMDBK AS1-S細胞からhnRNPM-RNA複合体を回収し，含まれるAS1-S RNA量を測定した。その結果，コントロール抗体と比較して抗hnRNPM抗体によるRIPで約６倍のAS1-S RNAが検出され，MDBK AS1-S細胞内でhnRNPMとAS1-Sが複合体を形成しており，その複合体がRIP assayで抽出できることが確認された（**Fig. 2**）。

次に，RIP assayで回収した複合体から精製したRNAをRNA-seqに供試し，hnRNPMと共沈降される全RNA情報を取得した。その結果，MDBK mock細胞では1652個，MDBK AS1-S細胞においては5602個の遺伝子に由来するmRNAがhnRNPMとともに共沈降された（**Fig. 3a**）。両細胞におけるhnRNPM結合遺伝子リストを比較した結果，共通する遺伝子は995個，MDBK AS1-S細胞に特異的に認められた遺伝子は4607個であった（**Fig. 3b**）。

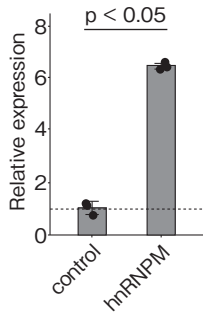

Fig. 2　Quantification of AS1-S RNA in RNA immunoprecipitated samples from MDBK AS1-S cells. RNA was purified from an RNA-protein complex obtained by RNA immunoprecipitation, followed by real-time RT-PCR. The result is shown as expression levels relative to the control sample. Data are presented as the mean ± standard deviation（n = 3）, and a t-test was performed for statistical analysis. p<0.05 was defined as statistically significant.

上記試験で見出された4607個の遺伝子について，GO解析により共通する機能を探索した結果，biological process（BP）にかかわるタームとして“cellular developmental process”，“cell differentiation”が，molecular function（MF）にかかわるタームとして“receptor ligand activity”，“signaling receptor activator activity”，“signaling receptor regulator activity”が，KEGG pathway解析では“pathways in cancer”，“MAPK signaling pathway”，“Ras signaling pathway”，“Rap1 signaling pathway”などの細胞増殖や腫瘍化にかかわるタームが有意に見出された（**Fig. 3c-e**）。

AS1-S RNAがhnRNPMのRRM1および２と結合するという結果から，AS1-S RNAの干渉によりhnRNPMと結合するmRNAのバリエーションが減少すると予想されたが，興味深いことに，AS1-S RNAとhnRNPMの相互作用はhnRNPMと複合体を形成するmRNAのバリエーションを増加させるという結果が得られた。さらに，AS1-S RNAの存在によりhnRNPMと共沈降されるようになったmRNAの多くは細胞増殖にかかわる機能を有していたことから，AS1-SがBLV感染細胞の増殖や腫瘍化に貢献している可能性が示唆された。

3.4　総括

本研究により，これまでその機能や存在意義が明らかでなかったBLV由来非翻訳性RNA AS1-Sが，宿主のRNA結合たんぱく質であるhnRNPMのRRM１および２と結合し，細胞増殖にかかわ

© The Ito Foundation

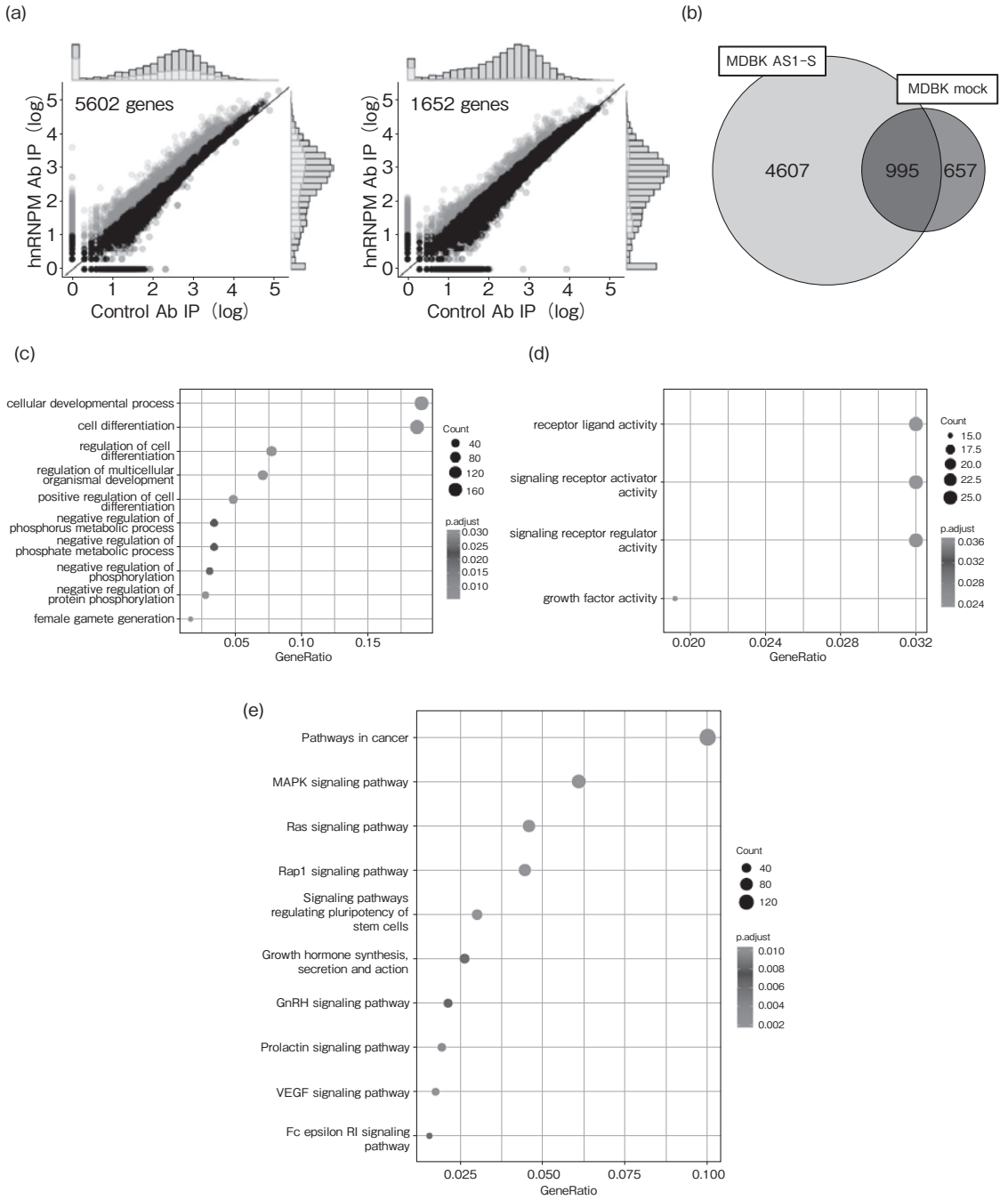

Fig. 3 (**a**) Scatter plots showing sequencing reads obtained by RNA immunoprecipitation. The X and Y axes show read counts obtained by RIP-seq from control MAb and anti-hnRNPM MAb, respectively. Genes that meet the following criteria were defined as hnRNPM-binding RNAs and are shown as grey dots：read counts>10, hnRNPM/control ratio＞2.0.

(**b**) Venn diagram showing the overlapping hnRNPM-binding genes in MDBK AS1-S and MDBK mock cells.

(**c–e**) Gene ontology (GO) analysis of the 4607 hnRNPM-binding genes only detected in MDBK AS1-S cells. Molecular function (MF) (c), biological process (BP) (d) and KEGG pathway enrichment analysis (e) are shown separately. The size of the bubbles indicates the "gene count", and the color of the bubbles indicates the "adjusted p-value". Adjusted p-value＜0.05 is defined as significant.

© The Ito Foundation

るmRNAとhnRNPMの相互作用を変化させるという分子機構が明らかになった。本知見は，たんぱく質にならないRNAによる細胞機能への干渉というBLV潜伏感染における分子機構の一端を明らかにしたことにより，将来のBLV制御に有用な基盤的知見となり得る。今後は，これまでの研究で見出したBLV由来非翻訳性RNAの分子メカニズムについて，臨床検体等を用いてBLVの病態との関係性をさらに詳細に解析していく予定である。

４．要　　約

牛伝染性リンパ腫ウイルス（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をコードす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す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重要な役割を担う可能性を示唆する。2020-2021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結合たんぱく質hnRNPMを同定した。そこで本研究では，AS1-Sを導入した細胞内におけるhnRNPM-RNA複合体の解析により，BLV感染細胞内におけるAS1-S RNAとhnRNPM相互作用の分子機構解明を試みた。組換えhnRNPMとAS1-S RNAプローブを用いたpull-down assayの結果，hnRNPMのＮ末端側に存在するRNA認識モチーフ１および２がAS1-Sとの結合に重要であることが示された。さらに，RNA免疫沈降により，AS1-SはhnRNPMと相互作用するmRNAのバリエーションを増大させることが明らかとなった。これらの結果は，AS1-S RNAがhnRNPMと宿主mRNAの相互作用を変化させることで細胞機能に干渉する可能性を示唆する。AS1-Sの導入により影響を受けた遺伝子の多くは細胞増殖にかかわる機能を有していたことから，AS1-SがBLV感染細胞の増殖や腫瘍化に貢献している可能性が示唆された。

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

豚熱ウイルス受容体候補タンパク質の網羅的探索

Comprehensive analysis of candidate receptors for Classical Swine Fever virus

池 田 圭 吾・岩 丸 祥 史
（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）

Keigo Ikeda and Yoshifumi Iwamaru
（National Institute of Animal Health, NARO）

A unique feature of the viruses belonging to the genus pestivirus including Classical swine fever virus（CSFV）is cell tropism *in vitro* for culture cells from their preferred host. However, the receptor that determines the cell tropism of the pestiviruses is yet unclear. Recently, a biochemical labeling method termed "Enzyme-Mediated Activation of Radical Sources（EMARS）" was shown to be useful for identifying candidate molecules for virus receptors. In this study, we aimed to comprehensive analysis of CSFV receptor candidate molecules using a combination of EMARS reaction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry（LC-MS/MS）analysis.

The CSFV GPE$^-$ strain and the PPK3F cells, a porcine kidney cell line, were used in this study. The recombinant E2 protein, which is crucial for CSFV entry was subjected to the EMARS reaction. After EMARS reaction, fluorescence microscopic and western blot analysis showed the presence of the fluorescein-labeled molecules which are predicted to be present in the vicinity of the E2 protein. The fluorescein-labeled molecules were enriched by immunoprecipitation using anti-fluorescein antibody-combined magnetic beads, and the obtained samples were subjected to the LC-MS/MS analysis. As a result, novel ten candidates of the CSFV receptor proteins were finally identified. Further research is needed to clarify whether the candidate receptor proteins are the functional CSFV receptors.

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に分類される。ペスチウイルス属には，牛ウイルス性下痢ウイルス（BVDV）やボーダー病ウイルス（BDV）などが分類されている。ペスチウイルスが産生するタンパク質のうち，E2，Erns，およびNS3は宿主の抗体を誘導する能力を有しており，特にE2タンパク質は，中和抗体を効率的に誘導するエンベロープタンパク質として知られている[1)]。

ペスチウイルスが有するユニークな特徴として，それぞれのウイルスに好適宿主が存在し，さらに*in vitro*において好適宿主に応じた細胞指向性を有するという点があげられる。例えば，BVDVは反芻獣（ウシ，ヒツジ），CSFVはブタ，BDVはヒツジの細胞に指向性を有する[2, 3)]。また，

© The Ito Foundation

BVDVのE2をCSFVやBDVのE2と入れ替えると，それぞれブタやヒツジの細胞に指向性を有するようになる[2,3]。このことから，ペスチウイルスのE2タンパク質が細胞指向性に重要な働きをしていると考えられている。さらに，レンチウイルスを用いてCSFVのErns，E1，およびE2を有するシュードタイプウイルスを作成すると，ブタの細胞に指向性を有することから，CSFVの細胞指向性を決定づける受容体の存在が示唆されている[4]。しかしながら，CSFVを含むペスチウイルスの細胞指向性を決定する要因は明らかにされていない。

最近，ウイルスの細胞侵入に関与する分子の同定法として，EMARS（enzyme-mediated activation of radical sources）法が利用できることが示された[5]。この手法により，生細胞の細胞膜上でウイルスの表面タンパク質と近接する分子を特異的に蛍光標識可能である。本研究では，EMARS法により，CSFVの受容体候補タンパク質を網羅的に探索することを目的とする。

２．方　　法

2.1　E2タンパク質遺伝子の発現

生ワクチンとして使用されている弱毒CSFV GPE⁻株のE2遺伝子が組み込まれたプラスミドを使用した。このE2遺伝子は，Ｎ末端側にE1-E２開裂シグナルを有しており，宿主のシグナルペプチダーゼにより開裂してE2タンパク質となる。また，アフィニティー精製とEMARS反応に用いるため，Ｃ末端側にヒスチジンタグ（His tag）を付与し，E2タンパク質の膜貫通領域を欠損させた。

上記のプラスミドを，Fugene HD transfection reagent（Promega）を用いてHEK293T細胞にトランスフェクションし，２日目に培養上清を回収後，HisTrap™ HP（Cytiva）を用いてE2タンパク質を精製し，得られたE2タンパク質の純度をポリアクリルアミドゲル電気泳動（PAGE）にて解析した。さらに，精製タンパク質について，HRP標識したマウス抗E2タンパク質モノクローナル抗体WH303，およびマウス抗His tagモノクローナル抗体を用いたウェスタンブロッティング法を実施し，還元条件下および非還元条件下におけるE2タンパク質のhomo dimer形成能の有無を解析した。

2.2　E2タンパク質によるCSFVの感染阻害試験

E2タンパク質を10倍段階希釈（10 μg/m-0.01 μg/ml）し，単層培養したPPK3F細胞（ブタの腎臓由来）に，希釈したE2タンパク質を加え，37℃で30分間静置した。その後，多重感染度（MOI）0.02となるようCSFV GPE⁻株を追加で加え，37℃，30分静置した。ウイルス液およびE2タンパク質を除去し，洗浄して１％カルボキシメチルセルロース（CMC）加培地を加え，室温で20分静置し，さらに37℃で２日間培養した。その後，WH303抗体を用いた免疫染色を実施した。

2.3　E2タンパク質を用いたEMARS反応および標識分子の分析

PPK3F細胞を，コラーゲンコートした10cmシャーレで培養後，リン酸緩衝生理食塩水（PBS）で１回洗浄し，CSFV E2タンパク質（濃度０，50 μg/ml）を加え，室温で30分反応させた。３回洗浄した後，マウス抗His tagモノクローナル抗体を室温で30分間反応させた。５回穏やかに洗浄し，EMARS反応を行ったウェルでは，過酸化水素（Wako，終濃度0.0075％），およびフルオレセインタイラマイド（BIOTIUM，終濃度0.5mM）を室温，暗所で10分間反応させた。反応後，４回洗浄し，蛍光顕微鏡下で観察した。さらに，反応後の細胞を，Radioimmunoprecipitation（RIPA）バッファーで溶解し，HRP標識した抗フルオレセイン抗体を用いたウェスタンブロッ

© The Ito Foundation

ティング法によりフルオレセイン標識分子を検出した。

2.4　抗フルオレセイン抗体結合ビーズを用いた免疫沈降およびフルオレセイン標識分子の同定

得られたサンプルをクロロホルム・メタノール沈殿により濃縮後，200 μlの１％SDS，50mM Tris-HClを加え，95℃，10分間可溶化した。次にSDS濃度が0.1％となるようNP-40溶解バッファー（20mM Tris-HCl，150 mM NaCl，５mM EDTA，１％ IGEPAL® CA-630，１％グリセロール）で希釈した（抽出タンパク質溶液）。抗フルオレセイン抗体結合ビーズを，Dynabeads™ Antibody Coupling Kit（Thermo Fisher）を用いて調整し，抽出タンパク質溶液１mlを懸濁後，４℃で１晩撹拌した。磁石上にチューブを置き，ビーズをNP40溶解バッファーで５回洗浄後，さらにビーズを0.5M NaCl-PBSで２回洗浄し，１％SDS，50mM Tris-HClを100 μl加え，95℃，５分でフルオレセイン標識分子を溶出し，液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）をアプロサイエンスに委託した。その際，検体はTCA沈殿処理後，SDS-PAGEに供して，溶出時に混入した抗フルオレセイン抗体のバンド以外の領域をゲルから切り出して解析された。得られたデータをScaffold viewer ver version：5.2.2（Proteome software）を用いて解析し，E2タンパク質を用いたEMARS反応実施検体にのみ存在するタンパク質を選抜した。さらに同定されたタンパク質を，Uniprot-KBデータベース（対象種：Human）上で検索し，Subcellular locationがmembrane，plasma membrane，cell membraneのいずれかに該当するものを，受容体候補タンパク質として選抜した。

3．結果と考察

E2タンパク質の遺伝子を含むプラスミドをHEK293T細胞にトランスフェクションし，培養上清を回収して精製後，LDS-PAGEで解析した結果，fraction 2において，E2タンパク質の単量体（約45kDa）と同等の質量を持つタンパク質が高純度で検出された（**Fig. 1**）。さらに，精製タンパク質について，抗E2タンパク質抗体，および抗His tag抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した結果，非還元条件下において両抗体によりE2 homodimers（約90kDa）と同等の質量を有するタンパク質が検出された（**Fig. 2**）。このことから，作成したE2タンパク質は，CSFVのE2タンパク質と同様，homo dimer形成能を有していたと考えられる。一方，還元条件下では抗His tag抗体でのみE2 monomers（約45kDa）と同等の質量を有するタンパク質が検出され，抗E2タンパク質抗体では検出されなかった（**Fig. 2**）。過去の報告では，抗E2タンパク質抗体は

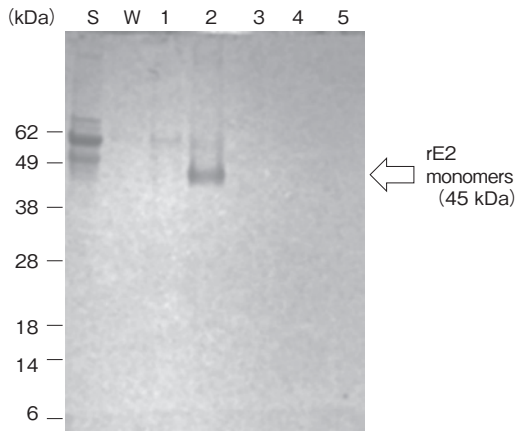

Fig. 1　Coomassie Brilliant Blue staining of the purified recombinant CSFV E2 proteins (rE2) after PAGE analysis under the reducing conditions. Lane S is the dialyzed culture medium of the HEK 293T cells before purification. Lane W is the washing fraction before protein elution. Lane 1-5 are the eluate fractions.

© The Ito Foundation

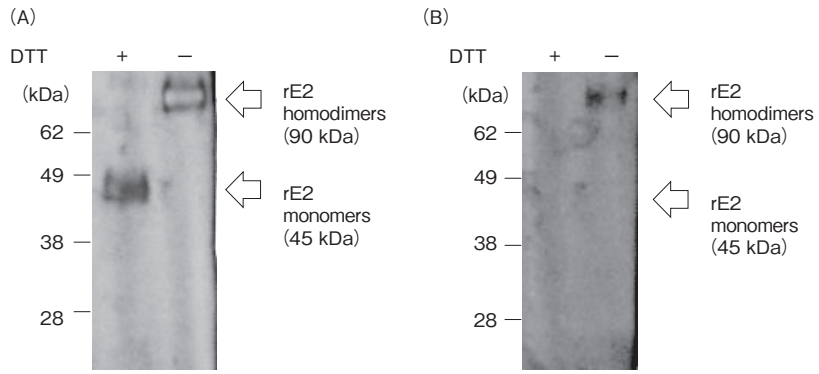

Fig. 2　Western blot analysis of rE2. Western blot analysis was performed using the mouse anti-6x His tag monoclonal antibody（A）or the mouse anti-CSFV E2 monoclonal antibody WH303（B）in the presence（+）or absence（−）of the dithiothreitol（DTT）.

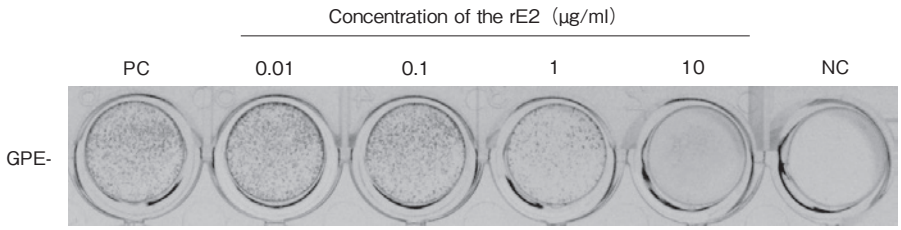

Fig. 3　Inhibition of the CSFV focus formation using rE2. Monolayer PPK3F cells were treated with 10–0.01 μg/ml of rE2 and incubated at 37℃ for 30 min. CSFV GPE⁻ strain（MOI 0.02）was added to each well without removing the protein and incubated at 37℃ for 30 min. rE2-contained carboxy methyl-cellulose overlay medium was added. Two days post infection, immunostaining was conducted using HRP-conjugated mouse anti-E2 protein monoclonal antibody WH303.

homo dimersに対する親和性が高いと考えられているため[6]，本データも以前の報告と一致した結果であると考えられる。

次に，E2タンパク質によるCSFVの感染阻害試験を実施した結果，E2タンパク質が１ μg/ml以上の濃度で，E2タンパク質の濃度依存性に高いCSFV感染阻害効果が認められた（**Fig. 3**）。このことから，E2タンパク質は正常な構造を保持しており，EMARS反応を実施する際には，少なくとも１ μg/ml以上の濃度を使用すべきであると考えられる。

続いて，得られたE2タンパク質によるEMARS反応を実施し，蛍光顕微鏡で観察した結果，E2タンパク質を加えた細胞においてのみ，細胞膜に一致した蛍光が観察された（**Fig. 4A**）。また，細胞を溶解してウェスタンブロッティングを実施した結果，E2タンパク質を用いてEMARS反応を実施した細胞において，フルオレセイン標識分子が検出された（**Fig. 4B**）。

次に，抗フルオレセイン抗体結合磁性ビーズを用いた免疫沈降反応を実施し，本検体をLC-MS/MS解析に供した結果，E2タンパク質を用いた検体および陰性対照においてタンパク質1387種が同定され，そのうちE2タンパク質を用いた検体に

© The Ito Foundation

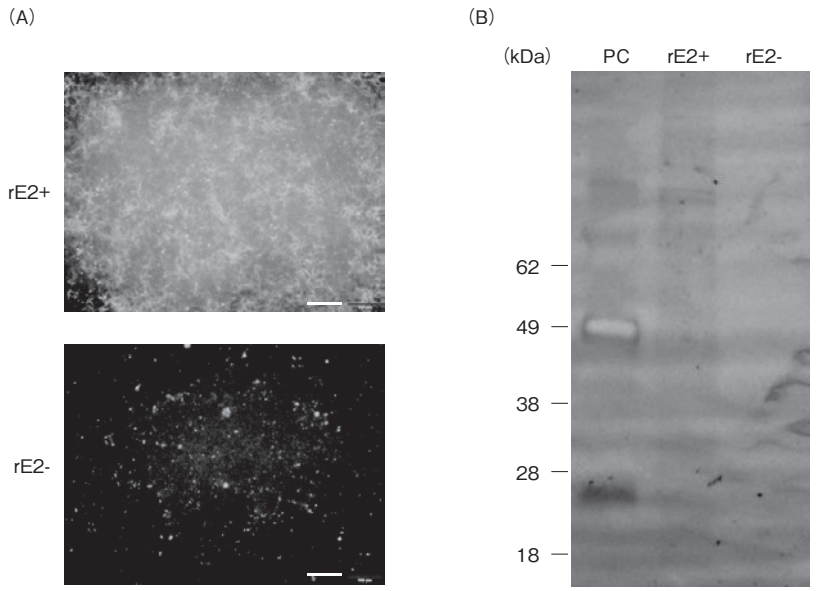

Fig. 4　Detection of the EMARS products (fluorescein-labeled proteins). The EMARS reaction was performed in combination of rE2 and mouse anti-6x His tag monoclonal antibody (rE2+). Samples of EMARS reaction without rE2 were used as the negative control (rE2−). (A) Fluorescent microscopic images of the fluorescein-labeled proteins. Scale bar indicated 100 μm. (B) Western blot analysis of the fluorescein-labeled proteins under the reducing condition. Fluorescein -labeled IgG was used as a positive control of the fluorescein labeled protein (PC).

おいてのみ観察されたタンパク質は100種類であった。さらに，Uniprot-KBデータベースで検索した結果，Subcellular locationがmembrane，plasma membrane，cell membraneのいずれかに該当する受容体候補タンパク質10種類を同定した（データ非公表）。今後は，本研究で同定された受容体候補タンパク質を，哺乳動物細胞に過発現またはノックダウンさせ，実際にCSFVの受容体として機能しているか否かを解析する予定である。

4．要　約

豚熱ウイルス（CSFV）をはじめとしたペスチウイルス属のウイルスが有するユニークな特徴として，*in vitro*において好適宿主に応じた細胞指向性を有するという点があげられる。過去の報告から，ペスチウイルスの細胞指向性を決定する受容体の存在が示唆されているが，その同定には至っていない。最近，ウイルスの細胞侵入に関与する分子の同定法として，EMARS（enzyme-mediated activation of radical sources）法が利用できることが示された。本研究では，EMARS法により，CSFVの受容体候補タンパク質を網羅的に探索することを目的とした。

CSFVとしてGPE$^-$株を用い，ブタの細胞株としてPPK3F細胞を用いた。CSFVのE2タンパク質を使用したEMARS反応を実施し，フルオレセイン標識された分子を蛍光顕微鏡およびウェスタンブロッティングで検出した。これらの分子を免疫沈降反応により精製し，得られた検体をLC-MS/MS解析に供した結果，最終的に10種類の新規受容体候補タンパク質を選定した。本研究で同定された受容体候補タンパク質が，実際にCSFVの受容体として機能しているか否かを明らかにするためには，今後さらなる研究が必要である。

© The Ito Foundation

文　献

1） Bouma, A., De Smit, A. J., De Kluijver, E. P., Terpstra, C., Moormann, R. J. M.：Efficacy and stability of a subunit vaccine based on glycoprotein E2 of classical swine fever virus, *Vet Microbiol*, **66**, 101～114, 1999.

2） Liang, D., Sainz, I. F., Ansari, I. H., Gil, L. H. V. G., Vassilev, V., Donis, R. O.：The envelope glycoprotein E2 is a determinant of cell culture tropism in ruminant pestiviruses, *J Gen Virol*, **84**, 1269～1274, 2003.

3） Reimann, I., Depner, K., Trapp, S., Beer, M.：An avirulent chimeric Pestivirus with altered cell tropism protects pigs against lethal infection with classical swine fever virus, *Virology*, **322**, 143～157, 2004.

4） Wang, Z., Nie, Y., Wang, P., Ding, M., Deng, H.：Characterization of classical swine fever virus entry by using pseudotyped viruses: E1 and E2 are sufficient to mediate viral entry, *Virology*, **330**, 332～341, 2004.

5） Kotani, N., Nakano, T., Kuwahara, R.：Host cell membrane proteins located near SARS-CoV-2 spike protein attachment sites are identified using proximity labeling and proteomic analysis, *J Biol Chem*, **298**, 102500, 2022.

6） Bai, Y., Jia, R., Wei, Q., Wang, L., Sun, Y., Li, Y., Luo, J., Zhang, G.：Development and application of a high-sensitivity immunochromatographic test strip for detecting classical swine fever virus antibodies, *Transbound Emerg Dis*, **69**, e788-e798, 2022.

© The Ito Foundation

*Clostridium novyi sensu lato*の新しい鑑別法の開発へ向けた国内家畜由来株のゲノム解析

Genome analysis of *Clostridium novyi sensu lato* strains isolated from livestock in Japan for development of novel identification methods

髙松大輔・馬田貴史
（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）

Daisuke Takamatsu and Takashi Mada
（National Institute of Animal Health, NARO）

Clostridium novyi sensu lato consists of *Clostridium novyi* types A/B/C, *Clostridium haemolyticum*, and *Clostridium botulinum* group III. Although a typing-PCR designed to identify *Clostridium* species including *C. novyi* and *C. haemolyticum* by targeting their flagellin genes is introduced in "the guidelines for pathological appraisal" compiled by the Ministry of Agriculture, Forestry, and Fisheries, Japan, we recently noticed that this PCR may not be able to distinguish *C. novyi*, a zoonotic pathogen, and *C. haemolyticum*, a livestock pathogen, precisely. Therefore, in this study, we analyzed the genomes of Japanese strains identified as *C. novyi* type B or *C. haemolyticum* by the typing-PCR and attempted to verify the reliability of the PCR results by comparing their genomes to those of previously reported overseas *C. novyi sensu lato* strains. Consequently, classification of the domestic strains by the PCR was not consistent with any of the genome analysis results including those of toxin gene search, ANI analysis, and phylogenetic analysis. Moreover, some amplicons by the typing-PCR were revealed not to be generated from the genomic regions annotated as flagellin gene by our genome analyses. Furthermore, reported information of the overseas strains including the toxin gene profiles was also not consistent with our results, and thus they were unable to be used as references for species identification of *C. novyi sensu lato* strains. This study is the first in which genomes of domestic *C. novyi sensu lato* strains were analyzed, and the results not only reaffirmed that the current typing-PCR is not reliable in identifying species within the bacterial group, but also suggested the need to redefine the classification of species and types within the group. Therefore, we will attempt to redefine the species of *C. novyi sensu lato* by analyzing the genomes of more strains and clarifying their differences. We will then develop a novel identification method for *Clostridium* species important for animal and public health.

1．目　　的

本研究は，国内で分離された広義の*Clostridium novyi*（*Clostridium novyi sensu lato*）に属する菌株についてゲノム解析を行い，その情報を基に*C. novyi sensu lato*内の菌種の新しい鑑別法の開発に資する基礎データを得ることを目的としている。

嫌気性菌である*Clostridium*属菌のうち*C. novyi*

© The Ito Foundation

*sensu lato*と呼ばれるグループには，遺伝学的に酷似する３菌種（*C. novyi*［A/B/C型］，*Clostridium haemolyticum*，*Clostridium botulinum*［グループⅢ］）が含まれる。それぞれ家畜に悪性水腫，細菌性血色素尿症，家畜ボツリヌス症を引き起こす家畜衛生上重要な菌種であるが，*C. novyi* A/B型は人獣共通感染症の原因菌でもあり，*C. botulinum*とその毒素は感染症法で二種病原体等に指定されている公衆衛生上も重要な菌である。感染症による被害を最小限に抑えるためには，正確な病気の診断がきわめて重要であるが，これらの菌はその嫌気要求度の高さゆえ，臨床検体からの分離および継代培養をすることが難しく，正確な診断の支障になっている。また，農林水産省通知の病性鑑定指針には，*Clostridium*属４菌種（*C. novyi* A/B型，*C. haemolyticum*，*Clostridium chauvoei*，*Clostridium septicum*）を識別するPCR法[1]が紹介されているが，我々は病性鑑定を実施する中で，現行のPCR法では，人獣共通感染症の原因菌である*C. novyi*とそうではない*C. haemolyticum*を正確に識別できていない可能性が高いことに気づいた。すなわち，本属菌感染症を正確に診断し，家畜のみならず生産者や消費者の安全を確保するためには，より正確な菌種同定法を開発する必要がある。そのためには，ゲノム解析による正確な種の識別と遺伝的な特性の理解が必要だが，*C. novyi*および*C. hemolyticum*は既報のゲノム情報がきわめて乏しく，NCBIデータベース（*C. novyi*：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/?taxon=1542/　*C. haemolyticum*：https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/?taxon=84025）上には，国内株由来のゲノム情報は１つもない。

そこで本研究では，我々が保有する国内家畜由来の*C. novyi sensu lato*株についてDNAを抽出し，次世代シーケンサーを用いてゲノムデータを取得した後，ゲノム解析を行った。さらに，上記の病性鑑定指針内のPCR法の結果とゲノム解析結果を比較して，PCR法の有用性と現行の菌種分類の妥当性を再検討した。

２．方　　法

2.1　*C. novyi sensu lato*株の培養およびゲノムDNAの抽出

Skarinらの報告[2]を参考にして，*C. novyi*または*C. haemolyticum*と思われる*C. novyi sensu lato*15株を培養した後，MasterPure Gram-positive DNA Purification Kit（Biosearch Technologies）によってゲノムDNAを抽出し，イソプロパノールおよびエタノール沈殿により精製した。精製後のDNAは，濃度測定（Spectrophotometer ND-1000，NanoDrop）および電気泳動によって品質確認を行った。

2.2　現行の鑑別PCR法による菌種分類

2.1で得たDNAを用いて，鞭毛のFlagellin遺伝子（*fliC*）を標的とした現行の鑑別PCR法[1]（現行PCR）を行い，15株各株が現行法でどの菌種に分類されるかを確認した。また，一部の株のPCR産物についてサンガーシークエンス解析を行い，配列を決定した。

2.3　ゲノム生データの取得とゲノム構築

2.1で得たDNAを用いて，次世代シーケンサー（NovaSeq6000，Illumina）からショートリードのゲノム生データを取得した。15株のショートリードをUnicycler v 0.5.0[3]を用いてアセンブルを行った。また，アセンブル後のゲノムデータについて，Prokka v 1.14.6[4]を用いてアノテーションを行った。

2.4　ゲノム情報を用いた菌種同定

2.3で得たアセンブル後のゲノムデータにNCBIデータベース上に存在する既報の*C. novyi*または*C. haemolyticum*株13株のゲノム配列を加えた合

© The Ito Foundation

計28株のゲノムを用いて以下２つの解析を行った。

ⅰ）Average nucleotide identity 解析［https://www.ezbiocloud.net/tools/ani］を行い，各株のゲノム間で相同性が認められた配列の平均塩基一致度（ANI）を算出した。

ⅱ）BLAST＋v 2.11.0（BLASTp）[5]を使用して，各株のゲノム内における*C. novyi*および*C. haemolyticum*の毒素遺伝子（**Table 1**）の有無について調査した。BLASTpの結果，塩基構成および配列長の一致率がともに90％以上の場合に毒素遺伝子を“保有”とした。

さらに，28株のうち，ⅰおよびⅱの解析で*C. novyi* B型または*C. haemolyticum*株と判定された株については，Roary v 3.12.0[6]を用いてコア遺伝子からSNPsを抽出し，最尤法で系統解析を行った。

３．結果と考察

3.1　現行PCRでの鑑別結果およびFlagellin遺伝子領域の構造の比較

現行PCRの結果，国内株15株のうち11株が*C. novyi* B型，４株が*C. haemolyticum*と判定された（**Table２**）。

構築したゲノムのアノテーション結果より，各株とも２つのFlagellin遺伝子を保有し，その２遺伝子の配置は**Fig. 1**に示す２パターン（パターン①および②）のいずれかを示した。現行PCRの報告文献[1]では，２コピーの*fliC*がとなり合って配置していると記載がある。本研究の結果でも２つのFlagellin遺伝子は近接して存在していたが，その配列長は，パターン①では807bpと834bp，パターン②では822bpと870bpと一定ではなかった。また，パターン②では，２つのFlagellin遺伝子間に機能を予測できない遺伝子（hypothetical gene）が１つ存在した。さらに，現行PCRの増幅産物の塩基配列を決定したところ，一部のPCR産物は**Fig. 1**に示すFlagellin遺伝子領域から増幅されたものではないことが明らかになった（Data not shown）。すなわち，現行PCRは，Flagellinをコードする*fliC*を標的として開発されたと報告されているが，少なくとも本報で用いたアノテーション手法では“Flagellin”とは標識されない配列を標的としている可能性が示唆された。

3.2　ゲノム解析データを用いた菌種同定

3.2.1　毒素遺伝子検索による菌種の分類

*C. novyi*のA/B/C型とかつて*C. novyi*のD型と呼ばれていた*C. haemolyticum*は，３つの毒素（alpha, betaおよびgamma毒素）の産生パターン（または当該毒素遺伝子の保有パターン）によって上記の各型に分類される[7~10]（**Table 1**）。供試した*C. novyi sensu lato*国内株をこの毒素遺伝子の保有状況に基づいて分類したところ，15株すべ

Table 1　Toxin production of *Clostridium novyi* and *Clostridium haemolyticum*.

Toxin	*Clostridium novyi*			*Clostridium haemolyticum*
	type A	type B	type C	
Alpha-toxin	+	+	−	−
Beta-toxin	−	+	−	+
Gamma-toxin	+	−	+	−

Clostridium novyi are now classified into types A, B, and C, and *C. haemolyticum* was also called *C. novyi*（type D）previously. *C. novyi* type A produces alpha-toxin and gamma-toxin, while *C. novyi* type C produces only gamma-toxin. *C. novyi* type B produces alpha-toxin and beta-toxin. *C. haemolyticum* produces beta-toxin, but not alpha-toxin.

© The Ito Foundation

Table 2 Summary of the results of the current PCR for *Clostridium* species identification and genome analyses performed in the present study.

Domestic strains	Species determined by the current typing-PCR method	Four genome analyses performed in the present study				Accession no.
		Species determined by the toxin gene search	ANI analysis	Phylogenetic analysis	Genetic organization of the flagellin gene region	
CNH-1	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	Not applicable
CNH-2	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-3	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-4	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-5	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-6	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-7	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-8	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	II	VI	①	
CNH-9	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	
CNH-10	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	
CNH-11	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	
CNH-12	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	
CNH-13	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-14	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	
CNH-15	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	

Reported overseas strains	Alias	Species information reported previously or on the web databases	Species determined by the toxin gene search	ANI analysis	Phylogenetic analysis	Genetic organization of the flagellin gene region	Accession no.
CN-1	4540	*C. novyi* type A	*C. novyi* type C	III	Not tested	①	GCF_000724445.2
CN-2	4570	*C. novyi* type A	*C. novyi* type C	IV		②	GCF_000768585.1
CN-3	NCTC 538	*C. novyi* type A	*C. novyi* type A	III		①	GCF_000725865.2
CN-4	GD211209	*C. novyi* type A	*C. novyi* type A	III		①	GCF_000724405.2
CN-5	BKT29909	*C. novyi* type A	*C. novyi* type A	III		②	GCF_000724425.2
CN-7	150557	*C. novyi* type B	*C. haemolyticum*	I	V	①	GCF_003614235.1
CN-8	NCTC 9691	*C. novyi* type B	*C. novyi* type B	II	VI	①	GCF_000724265.2
CN-9	ATCC 27606	*C. novyi* type B	*C. novyi* type B	II	VI	①	GCF_000724245.2
CH-1	122-15	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	①	GCF_910822285.1
CH-2	CCUG 7970	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	I	V	*	GCF_017590155.1
CH-3	KFSHRC_CH1	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	①	GCF_001994015.1
CH-4	NCTC 8350	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	GCF_000768575.1
CH-5	NCTC 9693	*C. haemolyticum*	*C. haemolyticum*	II	VI	②	GCF_000724225.2

Our toxin genes search classified all domestic strains into *C. haemolyticum* because of the presence of beta-toxin gene and the absence of the alpha-toxin gene. Furthermore, three reported overseas *C. novyi* strains （CN-1, 2, and 7）were classified into types different from those reported previously. In other genome analyses, domestic and reported overseas strains were divided into two or four groups. However, these results were not consistent with either the current typing-PCR results or the toxin gene search results. *, Genes annotated as flagellin were not found in the genome data.

てにおいてalpha毒素遺伝子は認められず，beta毒素遺伝子のみ存在したことから*C. haemolyticum*と判定された（**Table２**）。データベースまたは文献上の情報よりＡ型が５株，Ｂ型が３株とされている既報の*C. novyi*計８株についても登録ゲノム情報を用いて同様に判定したところ，*C. novyi* Ａ型３株，Ｂ型２株，Ｃ型２株，*C. haemolyticum* １株と判定された（**Table２**）。一方，データベー

© The Ito Foundation

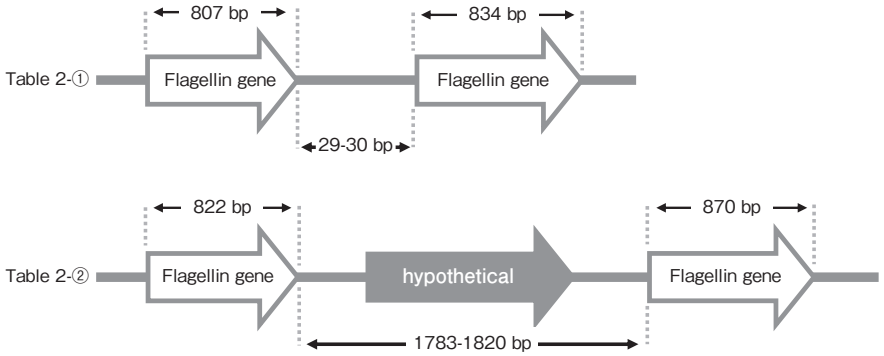

Fig. 1　Genetic maps of flagellin gene regions found in the genome of *Clostridium novyi sensu lato* strains analyzed in the present study.
All *C. novyi sensu lato* strains had two flagellin genes, and there were two patterns of genetic organization in the gene region. In pattern ①, 807-bp and 834-bp flagellin genes were located side by side with a 29-30-bp intergenic region. In pattern ②, there was a 1783-1820-bp sequence between 822-bp and 873-bp flagellin genes, and a hypothetical protein was encoded in this intergenic region.

スまたは文献上*C. haemolyticum*とされている既報の５株は，すべて*C. haemolyticum*と判定され，報告と一致した（**Table２**）。

3.2.2　ANI解析および系統解析による菌種の分類

国内株15株と既報の株13株においてANI解析を行ったところ，現行PCRおよび毒素遺伝子検索において*C. novyi* B型または*C. haemolyticum*と判定された23株のゲノムは，いずれの株同士の比較においても同解析で同一菌種と判定される基準である95％以上のANIを示した。さらに，これら23株は，互いのANIが99.00-100.00％を示す２つのグループ（**Table２**のANI analysisのⅠおよびⅡ）に分けることができ，グループⅠの株とⅡの株の間のANIは97.00-97.99％であった（**Fig. ２**）。SNPs系統解析においても，この23株は２つのクレード（**Table２**のPhylogenetic analysisのⅤおよびⅥ）に分類することができ，その分類はANI解析による分類結果と一致した。しかし，ANIおよび系統解析による分類は，現行PCRの結果，Flagellin遺伝子領域の構造，毒素遺伝子検索による分類結果のいずれとも一致しなかった（**Table２**）。

一方，現行PCRおよび毒素遺伝子検索で*C. novyi* A型またはC型と判定された５株は，いずれの株も互いに95％以上のANIを示しており同一菌種であることが示唆されたが，ANIの値によりさらに２つのグループ（**Table２**のANI analysisのⅢおよびⅣ）に分けられた（**Fig. ２**および**Table２**）。また，この５株（グループⅢおよびⅣ）と*C. novyi* B型または*C. haemolyticum*と判定された23株（グループⅠおよびⅡ）の間では，ANIが81.00-81.99％にとどまった。すなわち，ANI解析の結果からは，現在は同一菌種とされている*C. novyi* A/C型と*C. novyi* B型は別菌種であり，現在は別菌種である*C. novyi* B型と*C. haemolyticum*が同一菌種である可能性が示唆された。

3.3　総括

本研究の目的は，ゲノム解析によって正確に*C. novyi sensu lato*国内株の菌種を同定し，菌種鑑別に用いられている現行PCRの有用性を評価すること，そして，その有用性に疑問が生じた場合は

© The Ito Foundation

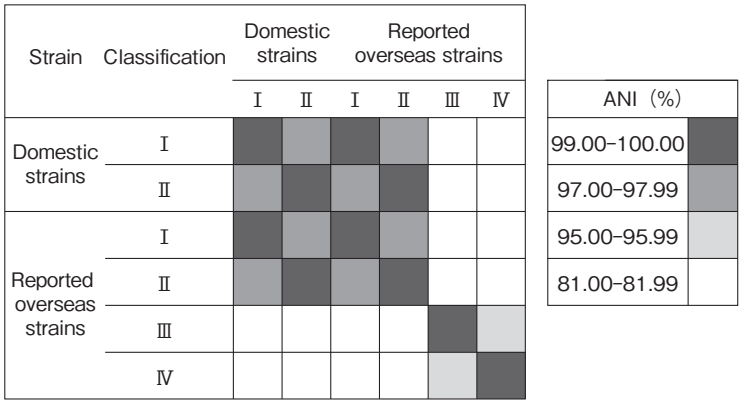

Fig. 2　Classification and average nucletotide identity（ANI）of *C. novyi sensu lato* strains analyzed in the present study
Domestic strains identified as *C. novyi* or *C. haemolyticum* by the current PCR were classified into two groups（Ⅰ and Ⅱ），and overseas strains reported as *C. novyi* or *C. haemolyticum* were classified into four groups（Ⅰ–Ⅳ）. Within each group, the ANI values between strains were more than 99.0%. Strains in the groups Ⅰ and Ⅱ were considered to be the same species because of the high（over 95.0%）ANI values between the two groups. For the same reason, strains in the group Ⅲ and Ⅳ were also considered to be the same species. On the other hand, strains in groups Ⅰ and Ⅱ and those in groups Ⅲ and Ⅳ were considered to be different species based on the low（much less than 95.0%）ANI values between the strains.

新たな菌種鑑別法の開発に利用可能な標的遺伝子を絞り込むことであった。

国内株15株における保有毒素遺伝子の検索では，現行PCRの結果と異なり，全株がalpha毒素を持たない*C. haemolyticum*と判定された。*C. novyi*のalpha毒素が脱落しやすいプラスミドやファージに存在する場合，菌分離や継代培養の間に毒素遺伝子が脱落し，その結果，*C. novyi*だった菌株が*C. haemolyticum*と判定されてしまった可能性も考えられる。しかし，現行PCRによる国内株の菌種同定結果は，ANI解析や系統解析による分類結果とも一致せず，さらに，一部のPCR産物はゲノム解析で見つかったFlagellin遺伝子とは異なる領域から増幅されていた。これらの結果から，少なくとも*C. novyi*と*C. haemolyticum*の鑑別においては，Flagellinをコードしているとされる*fliC*を標的としている現行PCRの有用性に疑問が生じた。

また，既報の*C. novyi sensu lato*海外株のゲノム解析結果は，報告上の情報（菌種や保有毒素遺伝子）と矛盾しており，国内株の菌種判定のための基準として使用できなかった。すなわち，現行PCRの有用性を判定する以前に，*C. novyi sensu lato*内の菌種および型の分類について再検討する必要性があることが明らかとなった。

今後は，*C. botulinum*グループⅢ株を含めてより多くの*C. novyi sensu lato*株のゲノムをさまざまな角度から解析することで株間の差異を明確にし，菌種や型の分類を再定義したうえで新しい菌種鑑別法の開発につなげていきたい。

4．要　　約

*Clostridium novyi sensu lato*には，*Clostridium novyi* A/B/C型，*Clostridium haemolyticum*，

© The Ito Foundation

*Clostridium botulinum*グループⅢが含まれ，このうち*C. novyi*と*C. haemolyticum*を含む*Clostridium*属菌鑑別用のFlagellin遺伝子を標的とするPCR法（現行PCR）が，農林水産省の病性鑑定指針に掲載され，全国の家畜疾病の診断現場で使用されている。しかし，我々が病性鑑定を行う中で，現行PCRでは人獣共通感染症の原因菌である*C. novyi*と家畜感染症の原因菌である*C. haemolyticum*を鑑別できない可能性が示唆された。しかし，この２菌種の国内株のゲノムは解析されておらず，ゲノム情報を利用した現行PCRの有用性評価も行えない状況であった。そこで本研究では，現行PCRで*C. novyi* B型または*C. haemolyticum*と判定された国内株のゲノム配列を決定し，既報の海外株のゲノムとの比較による菌種同定と現行PCRの有用性評価を試みた。現行PCRの菌種同定結果は，毒素遺伝子検索による菌種同定結果やANIおよび系統解析による分類結果のいずれとも一致しなかった。また，現行PCRの一部の増幅産物はゲノム解析で見つかったFlagellin遺伝子とは異なる領域から増幅されていた。さらに，海外株の報告上の情報（菌種や保有毒素遺伝子）も毒素遺伝子検索結果やANI解析等のゲノム解析による分類と一致せず，国内株の菌種判定の基準としても使用できなかった。本研究は国内由来の*C. novyi*および*C. haemolyticum*のゲノムを解析した初めての研究であり，現行PCRが*C. novyi sensu lato*内の菌種の鑑別に有用でない可能性が再認識されただけでなく，*C. novyi sensu lato*内の菌種や各菌種内での型の分類を再定義する必要性が示唆された。今後は，基準株を含む国内外のさらに多くの*C. novyi sensu lato*株のゲノム解析を行い，*C. novyi sensu lato*内の遺伝的差異を明確にして菌種分類の再定義を試みる。そのうえで，人や家畜で問題となる*Clostridium*属菌を正確に鑑別可能な新たな菌種同定法の開発を目指したい。

文　献

1） Sasaki, Y., Kojima, A., Aoki, H., Ogikubo, Y., Takikawa, N., Tamura, Y.：*Veterinary Microbiology*, **86**, 257～267, 2002.
2） Skarin, H., Segerman, B.：*PLoS ONE*, **9**, e107777, 2014.
3） Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., Holt, K. E.：*PLoS Comput. Biol.*, **13**, e1005595, 2017.
4） Seemann, T.：*Bioinfomatics*, **30**, 2068～2069, 2014.
5） Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma, N., Papadopoulos, J., Bealer, K., Madden, T. L.：*BMC Bioinformatics*, **10**, 421, 2009.
6） Page, A. J., Cummins, C. A., Hunt, M., Wong, V. K., Reuter, S., Holden, M. T., Fookes, M., Falush, D., Keane, J. A., Parkhill, J.：*Bioinformatics*, **31**, 3691～3693, 2015.
7） Eklund, M. W., Poysky, F. T., Peterson, M. E., Meyers, J. A.：*Infect Immun.*, **14**, 793～803, 1976.
8） Hunter, L. C., Poxton, I. R.：*Rev Med Microbiol.*, **13**, 75～90, 2002.
9） Nakamura, S., Kimura, I., Yamakawa, K., Nishida, S.：*J Gen Microbiol.*, **129**, 1473～1479, 1983.
10） Oakley, C. L., Warrack, G. H., Clarke, P. H.：*J Gen Microbiol.*, **1**, 91～107, 1947.

© The Ito Foundation

ブタ呼吸器複合感染症の原因ウイルスを解析する新たな*in vitro*モデルの確立

Establishment of a novel *in vitro* model for investigating viruses associated with the porcine respiratory disease complex (PRDC)

宮　澤　光太郎・熊　谷　飛　鳥
（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）

Kohtaro Miyazawa and Asuka Kumagai
(National Institute of Animal Health, NARO)

Porcine respiratory disease complex (PRDC) is highlighted due to its huge economical damage on swine producers. Swine influenza A virus (IAV-S) is thought to play an important role in PRDC in combination with other pathogens, such as porcine reproduction and respiratory syndrome virus. Moreover, pigs are known to be susceptible to both human and avian influenza viruses suggesting the potential impact of IAV-S on the pig industry and public health. Therefore, it is critical to monitor epidemic IAV-S strains in pig farms. MDCK cells have been used for the isolation of IAV-S over the years. However, passaging of human influenza viruses in MDCK cells is known to lead the selection of variants with mutations in their genome. Although IAV-S requires trypsin to be cultivated in MDCK cells, successful amplification of IAV-S was reported in Caco-2 cells from human colon adenocarcinoma without trypsin.

In this study, we focus on newly established swine intestinal epithelial cell line (SIEC1-3) for the isolation of IAV-S because pigs are the natural host. We evaluated the susceptibility of SIEC1-3 for the isolation of IAV-S and compared these properties with MDCK and MDCK-SIAT1 cells overexpressing human α-2,6-sialyltransferase. We demonstrated that SIEC1-3 cells supported efficient replication of IAV-S without trypsin and that they could more efficiently isolate IAV-S from swine nasal swabs than MDCK cells. Contrary to our expectations, MDCK-SIAT1 cells showed the highest sensitivity for the isolation of IAV-S among three cell lines. Sequence analysis revealed that 11 out of 12 isolates possessed the same amino acid sequences irrespective of the use of different cell lines for viral isolation. Only one isolate possessed a different amino acid at position 14 of HA and at position 291 of PB1, respectively. Further study is required to clarify the function of these mutations. In addition, we succeeded in obtaining eight cloned cell lines from swine lung tissue, and the characterization of these cell lines is still ongoing.

© The Ito Foundation

1．目　　的

豚インフルエンザは，A型インフルエンザウイルスによって引き起こされる豚の呼吸器疾患である。豚インフルエンザウイルス（IAV-S）は，豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）や豚サーコウイルス２型（PCV2）とともに，豚呼吸器複合感染症（PRDC）を誘発する代表的なウイルスとして知られており，諸外国では豚の生産性を悪化させる経済損失の大きい疾病として認識されている[1)]。また，豚はヒトとトリの両方のインフルエンザウイルスに感受性を示すことが知られており，由来の異なる２種類のインフルエンザウイルスに豚が同時に感染すると，遺伝子再集合により新たな性状を示すウイルスが出現し，ヒトでの世界的流行（パンデミック）を引き起こす可能性が考えられるため，公衆衛生の観点からも重要な疾病である。ゆえに，豚群で流行・循環するIAV-Sの性状を正確に把握することは非常に重要である。

我々は，慣用的に使用されているイヌ腎上皮細胞株（MDCK）では，分離材料である鼻腔スワブからウイルスゲノムが検出されるにも関わらず，ウイルスを分離できない事例を複数経験している。また，MDCKで分離したヒト季節性インフルエンザウイルスには，変異が入ることが報告されている[2)]。これらの事実から，ウイルス分離に用いる細胞株の感受性の違いや本来とは異なる宿主に由来する細胞株での増殖によるウイルスゲノムの変異により，MDCKで分離されたIAV-Sのゲノム解析の結果は，必ずしも豚で循環しているIAV-Sの遺伝的背景を反映していない可能性がある。これまでに，ヒト結腸癌由来細胞であるCaco-2を用いたIAV-Sの分離が報告されていることから[3)]，IAV-Sの本来の宿主である豚から樹立した小腸上皮細胞株（SIEC1-3）のウイルス分離効率をMDCKと比較するとともに，IAV-Sの標的細胞である豚肺由来の上皮細胞株の作出を試みた。

2．方　　法

2.1　豚小腸上皮細胞株（SIEC1-3）のIAV-Sへの感受性評価

Lenti-SV40 Lentivirus（abm）を用いて不死化後にクローニングしたSIEC1-3のIAV-Sに対する感受性を調べるため，24穴セルタイトC－１プレート（住友ベークライト）に細胞を播種し，一晩培養する。豚鼻腔スワブからMDCKを用いて分離したIAV-S（sw/Gunma/46-6975/2019）を吸着後，0.8 μg/ml，0.4 μg/mlまたは0 μg/ml のTPCK処理済みトリプシン（Thermo Scientific）を含む無血清培地に置換し，４日間培養した。培養上清中のウイルス増殖は，体積分率0.55％モルモット赤血球を用いた赤血球凝集（HA）試験により確認した。

2.2　力価測定方法の検証

96穴セルタイトC－１プレートにMDCK，α-2.6結合シアル酸を高発現するMDCK-SIAT1および我々が樹立したSIEC1-3を播種し，24時間培養して単層を形成させる。細胞を無血清培地で洗浄後，10倍階段希釈したウイルス液を加えて37℃で５日間培養する（単層形成後接種法）。一方，SIEC1-3については10倍階段希釈したウイルス液を96穴プレートに分注後に細胞浮遊液を各ウェルに加えて37℃で５日間培養する同時接種法も実施し，HA活性を指標に50％感染量（$TCID_{50}$/ml）を算出して単層形成後接種法と比較した。

2.3　MDCK，MDCK-SIAT1およびSIEC1-3を用いた鼻腔スワブからのIAV-Sの分離

本試験にはM遺伝子を標的としたリアルタイムRT-PCRにおいて遺伝子が検出された59検体の鼻腔スワブを用いた。MDCK，MDCK-SIAT1およ

© The Ito Foundation

びSIEC1-3を24穴セルタイトC－１プレートに播種し，24時間培養して単層を形成させる。細胞をHBSSで３回洗浄し，フィルター滅菌した鼻腔スワブ（100～120μl）を添加して吸着（37℃で60分間）後，鼻腔スワブを除く。SIEC1-3には１ml/wellで無血清培地を，MDCKとMDCK-SIAT1には0.5μg/ml TPCK処理済みトリプシン含有培地を加えて37℃で４日間培養する。ウイルス増殖はHA試験により判定し，HA活性が検出されなかった場合は培養上清を50倍希釈し，別途準備したMDCK，MDCK-SIAT1およびSIEC1-3に接種して４日間培養後にHA試験を実施した。培養上清からNucleoSpin RNA XS（タカラバイオ）を用いてRNAを抽出後，NEBNext Ultra II RNA Library Prep Kit（NEB）を用いてイルミナ用RNAライブラリー調製し，次世代シーケンサーMiSeqシステム（Illumina）を用いて各細胞株により分離したIAV-Sの全ウイルスゲノム配列を決定した。

2.4　豚肺由来不死化細胞株の樹立

気管および細気管支をできる限り取り除いた肺組織から調製した初代培養細胞にLenti-SV40 Lentivirusを感染させ，SV40 T-antigen遺伝子を安定発現する細胞をピューロマイシンへの薬剤耐性を指標に選択し，不死化細胞株を得る。上皮細胞マーカーであるサイトケラチンや間葉系細胞マーカーであるビメンチン等に対する抗体を用いて細胞を染色し，樹立した細胞株の性状を解析した。

３．結果と考察

3.1　SIEC1-3におけるIAV-Sの増殖

SIEC1-3では，培地へのトリプシン添加の有無に関わらずにウイルス接種24時間後には10倍希釈（10^{-1}）ウイルス液を添加した実験区で培養上清にHA活性が確認された。接種96時間後には10^{-4}ウイルス液添加実験区の培養上清においてもHA活性が確認された。一方，培地へのトリプシン添加の有無に関わらず，接種96時間を経ても10^{-5}ウイルス液添加実験区の培養上清にはHA活性は認められなかった。以上の結果から，豚小腸上皮細胞株であるSIEC1-3は，MDCKやMDCK-SIAT1とは異なり，トリプシンに依存することなくIAV-Sを増殖させることが示された。

3.2　SIEC1-3を用いたIAV-Sのウイルス力価測定系の確立

SIEC1-3のIAV-Sに対する感受性をMDCKと比較した。MDCKを用いたIAV-S の$TCID_{50}$の算出には単層形成後接種法が用いられているが，同時接種法はこれに比べて簡便かつ迅速な手法であるため，両手法から算出される$TCID_{50}$に違いが生じるかを検討した。単層形成後接種法を用いて算出した力価は$10^{6.125}$ $TCID_{50}$/ml，同時接種法を用いて算出した力価は$10^{6.375}$ $TCID_{50}$/mlであり，両者に著しい差は認められなかったため，SIEC1-3を用いた力価測定には同時接種法を採用することとした。SIEC1-3ではトリプシン非依存性にウイルスを培養できるため，血清含有培地の使用が可能である。血清含有培地は，細胞の状態を良好に維持し，効率的なウイルス増殖を促す可能性が考えられるため，次いでFBS添加の影響を検証した。**Table 1** に示すように，sw/Gunma/46-6975/2019株のウイルス力価は，培地へのFBS添加の有無に関わらず$10^{6.0}$～$10^{6.375}$ $TCID_{50}$/mlであり，FBS添加による力価の上昇は認められなかった。SIEC1-3を用いて算出したsw/Gunma/35-6815/2019株の力価は$10^{6.875}$ $TCID_{50}$/mlであり，MDCKを用いて算出した力価（$10^{6.968}$ $TCID_{50}$/ml）と近似しており，MDCK-SIAT1を用いて算出した力価（$10^{7.301}$ $TCID_{50}$/ml）よりは若干低い傾向を示した。以上の結果から，SIEC1-3はIAV-Sに対してMDCKと同程度の感受性を有することが示された。また，

© The Ito Foundation

Table 1　Comparison of $TCID_{50}$/ml of IAV-S between SIEC1-3 cells with 1% FBS and without serum

Attempt	Serum-free	1 %FBS
1 st	$10^{6.375}$	$10^{6.0}$
2 nd	$10^{6.25}$	$10^{6.125}$
3 rd	$10^{6.0}$	$10^{6.375}$
Mean $TCID_{50}$/ml	$10^{6.208}$	$10^{6.167}$

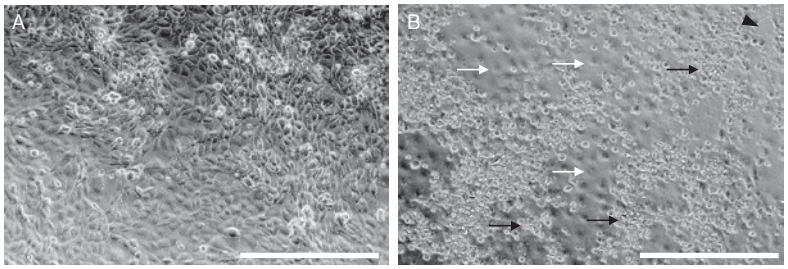

Fig. 1　IAV-S induced cytopathic effects (CPE) in SIEC1-3 cells. SIEC1-3 cells were mock-infected (A) and infected with IAV-S (B), respectively. Images of SIEC1-3 cells were taken at 72 hours post inoculation of swine nasal swab. White arrows indicate CPEs induced by IAV-S. Black arrows indicate floating cells as the result of IAV-S infection. They often form aggregates. Arrow head indicates the area where infected cells were completely detached. Scale bars：400 μm

Table 2　Virus isolation in different cell cultures from nasal swabs

	MDCK	SIEC1-3	MDCK-SIAT 1
Number of isolation	24／59	33／59	46／59
Isolation efficiency	40.7%	56.0%	78.0%

MDCK-SIAT1のIAV-Sに対する感受性は，他の２種類の細胞株に比べて高いことが示唆された。

3.3　SIEC1-3，MDCKおよびMDCK-SIAT1による鼻腔スワブからのウイルス分離の比較

鼻腔スワブを接種したSIEC1-3では細胞間隙が不明瞭かつ扁平化した細胞や剥離して凝集塊を形成する細胞変性効果（CPE）が観察された（**Fig. 1B**）。一方，MDCKでは細胞の剥離といったCPEが観察されたが，トリプシンの影響により鼻腔スワブ未接種実験区でも細胞の剥離が観察され，CPEの判定が困難であった。MDCK-SIAT1のトリプシン耐性はMDCKに比べて高く，CPEの観察はMDCKに比べて容易であった。

各細胞株を用いた鼻腔スワブからのIAV-S分離率を**Table 2**に示す。ウイルス分離効率は，α-2.6結合シアル酸高発現細胞であるMDCK-SIAT1で最も高く，ついで豚小腸上皮細胞株であるSIEC1-3，MDCKの分離効率が最も低い結果となった。MDCK-SIAT1とSIEC1-3で分離可能であり，MDCKでは分離不可能だった鼻腔スワブのCt値の範囲は26.345～37.286と広く，ウイルス分離の可否は，スワブ中のウイルス量だけに依存するのではなく，細胞側の要因も関与することが示唆された。一方，MDCK-SIAT1のみでウイルス分離ができた13検体の鼻腔スワブのCt値は，

© The Ito Foundation

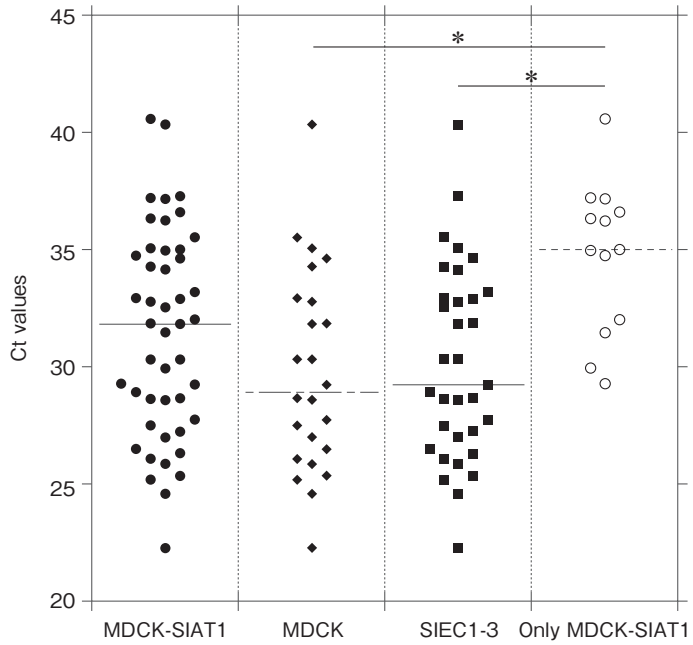

Fig. 2　Dot plot shows the distribution of Ct values of nasal swab samples. M gene RT-PCR was conducted to detect IAV-S in nasal swabs. Individual dots in the column indicate Ct values of nasal swabs from which viruses were isolated by the cell line indicated at the bottom of each column. The left column represents Ct values of nasal swabs from which viruses were isolated by only MDCK-SIAT1 cells. Mean Ct value of this column is significantly higher than those of MDCK and SIEC1-3 columns.*：The results were determined to be significant according to Bonferroni's method. Bar: Median Ct value

他の２種類の細胞株でウイルスが分離できたスワブのCt値に比べて有意に高かった（**Fig. 2**）。以上の結果から，MDCK-SIAT1はSIEC1-3やMDCKに比べてウイルス量の少ない鼻腔スワブからもウイルス分離が可能なことが示された。MDCK，MDCK-SIAT1およびSIEC1-3で共通に分離されたIAV-Sのうち12株について全ゲノム配列を明らかにし，その配列を比較したところ，11株についてはアミノ酸レベルでの違いは認められなかった。１株については，HAの40番目のアミノ酸がSIEC1-3分離株ではバリン（V）であり，MDCKおよびMDCK-SIAT1分離株ではイソロイシン（I）であった。また，PB１の872番目のアミノ酸はSIEC1-3分離株ではトレオニン（T）であるが，MDCKおよびMDCK-SIAT1分離株ではIであった。HAの変異はシグナルペプチド部位であることから，機能に影響は与えないと推測される。一方，PB１におけるアミノ酸の違いについては，今後鼻腔スワブ中のPB1遺伝子配列を決定し，どちらの細胞株から分離されたIAV-Sの配列と一致するか調べる必要がある。以上の結果から，トリプシン非依存性にIAV-Sを分離可能なSIEC1-3は，CPEの判別が容易かつロット変更に伴うトリプシン使用濃度の検討が不要であるため，利便性は高いが，MDCK-SIAT1に比較するとウイルス量の少ない検体からの分離効率

© The Ito Foundation

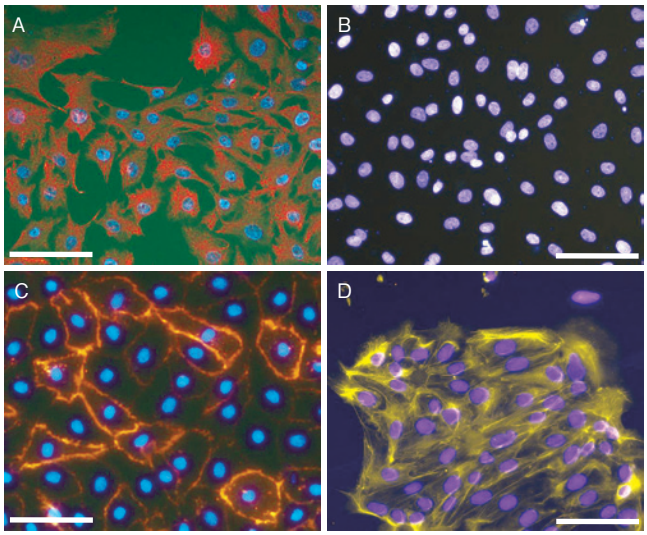

Fig. 3　Immunofluorescense staining of two different immortalized cell lines derived from proximal lung tissue. Images (A-C) indicate the same cell line and Image D indicates another cell line. Cells were fixed with cold methanol and acetone at −20℃ and then were stained with antibodies for vimentin (A), Pan-cytokeratin (B and D), and PCAM-1 (C). Positive cells were visualize by goat anti-rabbit IgG conjugated with Alexa Fluor 544 (A and B) and by goat anti-mouse IgG conjugated with Alexa Fluor 488 (B and D), respectively. Nuclei were stained with Dapi. One cell line shown in A-C is derived from mesenchymal cell lineage and the other (D) is derived from epithelial cell lineage. Bar：100 μm

が劣ることが明らかとなった。

3.4　樹立した肺由来不死化細胞株の性状解析

クローニングシリンダーを用いて最初に分離した細胞株について性状解析を行ったところ，間葉系細胞マーカーであるビメンチンが検出されたが（**Fig. 3B**），上皮細胞マーカーであるサイトケラチンは発現していなかった（**Fig. 3A**）。また，PCAM―1を発現することから血管内皮細胞株であることが示唆された（**Fig. 3C**）。現在サイトケラチンを発現するピューロマイシン耐性の細胞集団（**Fig. 3D**）から限界希釈法とクローニングシリンダーを用いて7株のクローン細胞株を得ている。今後，これらの細胞株について性状解析を進め，IAV-Sの効率的な分離培養に使用可能な豚肺由来の上皮細胞株を樹立する。

4．要　　約

近年，養豚業に大きな経済的打撃を与える要因として，豚呼吸器複合感染症（PRDC）が注目されており，豚インフルエンザウイルス（IAV-S）はPRDCの原因ウイルスの一つと考えられている。また，豚は鳥およびヒトのインフルエンザウイルス（IAV）に感受性を示すため，豚が保有するインフルエンザウイルスの調査は公衆衛生上も重要である。IAV-Sの分離には慣習的にMDCKが用いられているが，MDCKで分離されたヒトの季節性IAVには変異が入ることが報告されている。また，MDCKでIAV-Sを分離する際にはト

© The Ito Foundation

リプシン添加が必要であるが，ヒト結腸癌由来の上皮細胞株であるCaco-2ではトリプシン添加なしにIAV-Sが分離できることが知られている。本研究では，IAV-Sの自然宿主である豚から新たに樹立した小腸上皮細胞株（SIEC1-3）のIAV-S分離効率についてMDCKと比較検証する。

我々が樹立したSIEC1-3ではトリプシン非依存的にIAV-Sの増殖が可能であった。また，MDCKに比べて効率的にIAV-Sを分離できた。しかしながら，α-2.6結合シアル酸を高発現するMDCK-SIAT1が最も効率よくIAV-Sを分離可能であった。12検体の鼻腔スワブでは，SIEC1-3とMDCK-SIAT1の両細胞株でウイルスが分離された。両細胞株から分離された12株のIAV-Sのうち11株のアミノ酸配列は完全一致したが，１株ではHAとPB1で１アミノ酸の違いが認められた。今後、鼻腔スワブ中のウイルスゲノム配列を明らかにし，どちらの細胞株で分離されたウイルス株のアミノ酸配列と一致するかを検証する必要がある。また，現在までに８株の豚肺由来不死化細胞株を得ており，その性状を解析中である。

文　献

1） Li and Robertson.：The epidemiology of swine influenza, *Animal Diseases*, **1**, 21, 2021.

2） Takada, K., *et al.*：A humanized MDCK cell line for the efficient isolation and propagation of human influenza viruses, *Nat Microbiol*, **4**, 1268～1273, 2019.

3） Chiapponi, C., *et al.*：Comparison of the usefulness of the CACO-2 cell line with standard substrates for isolation of swine influenza A viruses, *J Virol Methods*, **163**, 162～165, 2010.

© The Ito Foundation

牛呼吸器病症候群（BRDC）の悪化における バイオフィルム形成の関与

Involvement of biofilm formation in exacerbation of bovine respiratory disease syndrome（BRDC）

帆保誠二
（鹿児島大学共同獣医学部）

Seiji Hobo
（Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University）

In this study, 28 strains of *Pasteurella multocida* isolated from the bronchoalveolar lavage fluid of cattle with bovine respiratory disease（BRDC）were used, and we investigated the drug susceptibilities of 7 antibiotics（amoxicillin：AMPC, ampicillin：ABPC, thiamphenicol：TP, tylosin, oxytetracycline, chlortetracycline, kanamycin）. In addition, the biofilm formation ability of *P. multocida* 28 strains were investigated, and we aimed to clarify the concentration of antibiotics that can inhibit the formation of biofilms. The minimum inhibitory concentration（MIC）for 50% or 90% inhibition of the growth of *P. multocida* of the 7 antibiotics were 0.25–16 over μg/ml, 1–16 over μg/ml, respectively. AMPC and TP were MICs that could be expected to be clinically effective against *P. multocida* infection, but it was suggested that clinical efficacy of other antibacterial agents could not be expected. The minimum bactericidal concentration（MBC）for 50% or 90% killing of *P. multocida* for the tested antibiotics were 4–16 over μg/ml and 8–16 over μg/ml, respectively. MBC was relatively high for 7 antibiotics, suggesting that a single dose is unlikely to kill *P. multocida*. From this, even antibiotics that are expected to be effective against *P. multocida* cannot be expected to cure with a single dose, so it was considered important to administration continuously for a necessary and sufficient period. On the other hand, 17 strains（60.7%）out of 28 strains of *P. multocida* tested formed biofilms. The formation time was 3 strains after 48 hours, 4 strains after 72 hours, 2 strains after 120 hours, 2 strains after 144 hours, and 6 strains after 168 hours. The concentrations of AMPC, ABPC and TP that inhibit *P. multocida* biofilm formation by 50% or 90% were all 1 μg/ml and 2 μg/ml, respectively. This suggests that these three antibiotics may inhibit biofilm formation. On the other hand, the minimum biofilm eradication concentrations that eradicate 50% or 90% of biofilms formed by *P. multocida* of the tested antibiotics were all 16 μg/ml over. From this, it was thought that none of the tested antibiotics could eradicate biofilms formed by *P. multocida*.

© The Ito Foundation

１．目　　的

牛の肺炎は，年間約1.7万頭の牛を死廃用に至らしめる重要な感染症であり，牛呼吸器病症候群（BRDC）として捉えられている[1,2]。BRDCは，輸送や集合をはじめとしたさまざまな原因による感染防御能（免疫力）の低下，ウイルス感染，細菌感染を主体とした複合的な要因が絡みあって発症することが知られている[3~7]。

これまでに我々は，牛での気管支肺胞洗浄法（BAL）を確立するとともに，BRDCの病態にあると診断された牛に対してBALを実施し，真の肺炎原因菌を特定した[6~9]。その結果，*Pasteurella multocida*および*Mycoplasma bovis*がBRDCの病態悪化や慢性化に強く関与していることが明らかとなった。これらBRDC罹患牛の一部を病理解剖に付したところ，肺患部は膿瘍を形成し，バイオフィルムの存在を示唆する所見が存在した。このことから，BRDCの病態悪化や慢性化は，病原性細菌により形成されたバイオフィルムが全身投与された抗菌薬の標的細菌への到達を阻害するため，十分な治療効果が得られないことが原因であると推察された。しかし，BRDC罹患牛のBALFから分離された細菌のバイオフィルム形成に関する報告は見当たらない。このことを解決するためには，申請者らがBRDC罹患牛の気管支肺胞領域への感染を証明した*P. multocida*や*M. bovis*がバイオフィルムを形成するのか，さらに，これら細菌がバイオフィルムを形成する場合は，その形成を阻害する方法の開発が必要であると考えられた。

本研究では，BRDCの病態悪化や慢性化が認められる牛に対してBALを実施し，その回収液である気管支肺胞洗浄液（BALF）から分離される*P. multocida*について，薬剤感受性を調査するとともにバイオフィルム形成能を調査した。さらに，*P. multocida*がバイオフィルムを形成する場合は，その形成を阻害できる抗菌薬の濃度を明らかにすることを目的とした。

２．材料と方法

2.1　供試材料

BRDCの重症化あるいは慢性化の病態にあると診断された黒毛和種牛からBALFを採取し，BALFから分離された*P. multocida* 28株を供試した。

2.2　BALFの採取

ビデオエンドスコープを供試牛の鼻孔から挿入し，気管および気管支内腔を観察した。その後，気管支鏡を滲出液が観察される気管支へと進め楔入した。楔入部位に滅菌生理食塩水を気管支鏡の鉗子孔経由で注入し，即座に回収することによりBALFを得た。

2.3　細菌分離・同定検査

BALF検体は，既報[5~9]に準じて培養した。培養後の培地から細菌を分離し，純培養後にグラム染色検査および細菌同定検査（飛行時間型質量分析法，PCR検査あるいはLoop-Mediated Isothermal Amplification）により，菌種を同定した。供試細菌株は，Brain Heart Infusion Broth（BHIB；Becton Dickinson and Company, U.S.A.）にて増菌培養後，－80℃で凍結保存した。急速解凍後の供試細菌液中の生存細菌数（CFU/ml）は，滅菌生理食塩水で10倍階段希釈し，５％ウマ血液含有寒天培地で培養することにより絶対生存菌数（CFU/ml）として計数した。

2.4　薬剤感受性試験

最小発育阻止濃度（MIC）は，動物用抗菌剤研究会が「動物用抗菌剤研究会2003年改訂標準法　動物由来細菌に対する抗菌性物質の最小発育阻止濃度（MIC）測定法」にて定めた微量液体希釈法に準じて測定した。使用抗菌薬は，牛臨床で一次選択抗菌薬として使用されている７抗菌薬（アモ

© The Ito Foundation

キシシリン：AMPC，アンピシリン：ABPC，チアンフェニコール：TP，タイロシン；TYL，オキシテトラサイクリン：OTC，クロルテトラサイクリン：CTC，カナマイシン：KM）とした。抗菌薬濃度は，0.125，0.25，0.5，1，2，4，8および16 μg/mlとし，MICを求めた。また，供試細菌株の発育を50％あるいは90％阻止するMIC（MIC_{50}，MIC_{90}）を算出した。

最小殺菌濃度（MBC）は，MIC測定後の培養液を５％ウマ血液含有寒天培地に播種し，37℃で24時間培養した後，細菌発育の有無を確認した。発育が確認されない最小の抗菌薬濃度をMBCとした。また，供試細菌株を50％あるいは90％殺菌するMBC（MBC_{50}，MBC_{90}）を算出した。

2.5　バイオフィルム形成試験

バイオフィルム形成試験には，市販のバイオフィルム形成量・形成阻害キット（Biofilm Formation Assay kit，同仁化学研究所，熊本）を使用し，既報[10]に準じて試験を実施した。なお，供試細菌株を含むBHIBは培養開始24時間ごとに交換し，24，48，72，96，120，144あるいは168時間培養することによりバイオフィルム形成試験を実施した。

2.6　バイオフィルム形成阻害濃度（MBIC）

MBICは，バイオフィルム形成量・形成阻害キット（Biofilm Formation Assay kit，同仁化学研究所）を用い，既報[10]に準じて求めた。供試細菌株のバイオフィルム形成が50％あるいは90％阻止されたMBIC（$MBIC_{50}$，$MBIC_{90}$）を算出した。

2.7　バイオフィルム撲滅濃度（MBEC）

MBECは，バイオフィルム生存試験キット（Biofilm Viability Assay Kit，同仁化学研究所）を使用し，既報[10]に準じて求めた。なお，抗菌薬濃度0.125，0.25，0.5，1，2，4，8および16 μg/mlで測定した。細菌株が形成したバイオフィルムを50％あるいは90％撲滅する最小バイオフィルム撲滅濃度（$MBEC_{50}$，$MBEC_{90}$）を算出した。

3．結果と考察

3.1　薬剤感受性

供試した牛臨床での一次選択抗菌薬７種類の*P. multocida*に対するMIC_{50}，MIC_{90}はそれぞれ0.25～16 μg/ml超，1～16 μg/ml超，MBC_{50}およびMBC_{90}はそれぞれ４～16 μg/ml超，８～16 μg/ml超であった（**Table 1**）。供試抗菌薬のうち，AMPCおよびTPは，*P. multocida*感染症に対して臨床的な効果が期待できるMICであったが，他

Table 1　The minimum inhibitory concentration（MIC）for 50% or 90% inhibition of the growth of *P. multocida*, and the minimum bactericidal concentration（MBC）for 50% or 90% killing of *P. multocida*.

Antibiotics	Antimicrobial abbreviations	MIC_{50}	MIC_{90}	MBC_{50}	MBC_{90}
Amoxicillin	AMPC	0.5	1	>16	>16
Ampicillin	ABPC	0.25	>16	>16	>16
Thiamphenicol	TP	1	1	4	>16
Tylosin	TYL	16	>16	>16	>16
Oxytetracycline	OTC	4	>16	>16	>16
Chlortetracycline	CTC	2	4	4	8
Kanamycin	KM	>16	>16	>16	>16

* μg/ml

© The Ito Foundation

の抗菌薬の臨床的な効果は期待できないことが示唆された。また，ABPCは菌株によってMICが大きく異なったことから，治療対象牛もしくは当該農場における肺炎罹患牛のBALFから分離された*P. multocida*のMICを把握することが重要であると考えられた。一方，MBCはいずれの抗菌薬も比較的高値であったことから，*P. multocida*を抗菌薬１回投与のみで殺菌的に死滅させられる可能性は低いことが示唆された。このことから，*P. multocida*に対して効果が期待される抗菌薬であっても，単回投与での治癒は期待できないことから，必要十分な期間にわたって連続投与することが重要であると考えられた。

3.2　バイオフィルム形成

供試した*P. multocida* 28株中17株（60.7％）でバイオフィルムを形成し，その形成時間は培養開始後48時間で３株，72時間で４株，120時間で２株，144時間で２株，168時間で６株であった（**Table２**）。本研究において，*P. multocida*は比較的高率にバイオフィルムを形成することが明らかとなったが，その形成には時間を要することから，*P. multocida*の感染初期から有効な抗菌薬を適切に投与すれば，その形成を阻害できる可能性が推察された。

3.3　MBIC

AMPC，ABPCおよびTPのMBIC$_{50}$，MBIC$_{90}$は，それぞれ１ μg/ml，２ μg/mlであった（**Table３**）。このことから，これら３抗菌薬はバイオフィルム形成を阻害できる可能性が示唆された。一方，他の抗菌薬のMBICは高値であったことから，*P. multocida*のバイオフィルム形成を阻害することは困難であると考えられた。

3.4　MBEC

供試抗菌薬のMBEC$_{50}$およびMBEC$_{90}$は，いずれも16 μg/ml超であった（**Table３**）。このことから，いずれの供試抗菌薬も*P. multocida*がバイオフィルムを形成した後に，バイオフィルムを撲滅することは不可能であると考えられた。

４．要　　約

本研究では，牛呼吸器病症候群（BRDC）発症牛の気管支肺胞洗浄液から分離された*Pasteurella*

Table 2　Biofilm formation and biofilm formation time in 28 strains of *Pasteurella multocida*.

Strain No.	Biofilm formation*	Biofilm formation time (hour)	Strain No.	Biofilm formation*	Biofilm formation time (hour)
1	+	72	15	−	nt
2	+	144	16	+	72
3	+	168	17	+	168
4	+	168	18	−	nt
5	+	168	19	−	nt
6	−	nt	20	−	nt
7	+	120	21	+	120
8	+	48	22	−	nt
9	+	168	23	−	nt
10	+	72	24	−	nt
11	+	72	25	−	nt
12	−	nt	26	+	144
13	−	nt	27	+	48
14	+	168	28	+	48

*＋：Positive，－：Negative

nt：Not possible to measure because it does not form a biofilm.

© The Ito Foundation

Table 3　The minimal biofilm inhibitory concentration（MBIC）for 50% or 90% inhibition of the biofilm formation of *P. multocida*, and the minimum biofilm eradication concentration（MBEC）that eradicate 50% or 90% of biofilms formed by *P. multocida*.

Antibiotics	Antimicrobial abbreviations	$MBIC_{50}$	$MBIC_{90}$	$MBEC_{50}$	$MBEC_{90}$
Amoxicillin	AMPC	1	2	>16	>16
Ampicillin	ABPC	1	2	>16	>16
Thiamphenicol	TP	1	2	>16	>16
Tylosin	TYL	>16	>16	>16	>16
Oxytetracycline	OTC	8	>16	>16	>16
Chlortetracycline	CTC	4	8	>16	>16
Kanamycin	KM	>16	>16	>16	>16

* μg/ml

multocida 28株を用いて，一次選択抗菌薬７種類（アモキシシリン：AMPC，アンピシリン：ABPC，チアンフェニコール：TP，タイロシン，オキシテトラサイクリン，クロルテトラサイクリン，カナマイシン）の薬剤感受性を調査するとともに，*P. multocida*のバイオフィルム形成能を調査した。さらに，バイオフィルムを形成する場合は，その形成を阻害できる抗菌薬濃度を明らかにすることを目的とした。供試抗菌薬の*P. multocida*の発育を50％あるいは90％阻止する最小発育阻止濃度（MIC）はそれぞれ0.25～16 μg/ml超，１～16 μg/ml超であった。供試抗菌薬が，*P. multocida*を50％あるいは90％殺菌する最小殺菌濃度（MBC）はそれぞれ４～16 μg/ml超，８～16 μg/ml超であった。供試抗菌薬のうち，AMPCおよびTPは，*P. multocida*感染症に対して臨床的な効果が期待できるMICであったが，他の抗菌薬の臨床的な効果は期待できないことが示唆された。MBCはいずれの抗菌薬も比較的高値であったことから，*P. multocida*を抗菌薬の１回投与のみで殺菌的に死滅させられる可能性は低いことが示唆された。このことから，*P. multocida*に対して効果が期待される抗菌薬であっても，単回投与での治癒は期待できないことから，必要十分な期間にわたって連続投与することが重要であると考えられた。一方，供試した*P. multocida* 28株中17株（60.7％）でバイオフィルムを形成し，その形成時間は培養開始後48時間で３株，72時間で４株，120時間で２株，144時間で２株，168時間で６株であった。供試抗菌薬のうち，AMPC，ABPC，TPの*P. multocida*のバイオフィルム形成を50％あるいは90％阻害する濃度は，いずれも１ μg/ml，２ μg/mlであった。このことから，これら３抗菌薬はバイオフィルム形成を阻害できる可能性が示唆された。一方，供試抗菌薬の*P. multocida*が形成したバイオフィルムを50％あるいは90％撲滅する最小バイオフィルム撲滅濃度はいずれも16 μg/ml超であった。このことから，供試抗菌薬はいずれも*P. multocida*が形成したバイオフィルムを撲滅することは不可能であると考えられた。

文　献

1）Snowder, G. D., Van Vleck, L. D., Cundiff, L. V., Bennett, G. L.：*J. Anim. Sci.*, **84**, 1999～2008, 2006.
2）Portis, E., Lindeman, C., Johansen, L., Stoltman, G.：*J. Vet. Diagn. Invest.*, **24**, 932～944, 2012.
3）Angen, O., Thomse, J., Larse, L. E., Larsen, J., Kokotovic, B., Heegaard, P. M., Enemark, J. M.：*Vet. Microbiol.*, **28**, 165～171, 2009.

© The Ito Foundation

4） Maunsell, F. P., Woolums, A. R., Francoz, D., Rosenbusch, R. F., Step, D. L., Wilson, D. J., Janzen, E. D.：*J. Vet. Intern. Med.*, **25**, 772～783, 2011.
5） 藏前哲郎, 石川真悟, 林淳, 津曲圭太, 乙丸孝之介, 帆保誠二：日獣会誌, **73**, 31～36, 2020.
6） 帆保誠二, 野口倫子, 安藤貴朗：公益法人伊藤記念財団平成25年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 公益財団法人伊藤記念財団, **32**, 215～221, 2014.
7） 帆保誠二, 野口倫子：公益法人伊藤記念財団平成26年度食肉に関する助成研究調査成果報告書, 公益財団法人伊藤記念財団, **33**, 189～193, 2015.
8） 帆保誠二, 石川真悟：平成31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, **38**, 260～265, 2020.
9） 帆保誠二, 石川真悟：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**, 287～292, 2021.
10） 河野亜紀, 古賀靖啓, 田原和貴, 帆保誠二：日獣会誌, **75**, e191～e198, 2022.

© The Ito Foundation

畜産農場に生息するハツカネズミの免疫関連遺伝子の多様性と病原体媒介能力

Diversity of immune-related genes and pathogen vector capacity in wild mice inhabiting livestock farms

高　島　康　弘・ニコライ　シャマエフ
（岐阜大学応用生物科学部）

Yasuhiro Takashima and Nikolai Shamaev
（Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University）

Toxoplasma gondii is an important zoonotic pathogen of meat origin. *Mus musculus*（mice）and other rodents living around livestock farms are considered to be important intermediate hosts for *T. gondii*, but almost all strains of laboratory mice（*M. musculus*）die when infected with a highly virulent strain. On the other hand, in India and Thailand, there are known to exist mice individuals that are able to retain the highly virulent strains asymptomatically, and it has been pointed out that they may be reservoirs for the highly virulent strains. Such differences in susceptibility to highly virulent *T. gondii* strains among individual mice are determined by the amino acid sequence of a protein coded by Irgb2 gene. In this study, we investigated the diversity of the Irgb2 gene in mice living on livestock farms in Japan. As a result, we found individuals with an amino acid sequence similar to that of disease-resistant individuals reported in India and Thailand in Honshu Island, Japan. We also found genes with new mutations that have not been reported before. Computer simulations of the affinity of the proteins encoded by these genes to a *T. gondii* virulence factor, ROP5B, showed that some of the sequences had very high values. Individuals with such sequences are likely to be asymptomatic after infection with a highly virulent strain of *T. gondii* and may function as a reservoir for the highly virulent strain in livestock farms in Japan.

1．目　　的

畜産農家の動物舎周辺に生息する齧歯類はさまざまな家畜感染症を媒介する。例えば農林水産省疫学調査チームは2019年には愛知県・岐阜県において発生した豚熱のウイルスを齧歯類が媒介した可能性が高いとの見解を示しているなど，畜産農家にとって齧歯類は動物の衛生管理上の重要な問題である。また近年，実験動物用マウスに持続感染しない病原体であっても，一部の野生ハツカネズミには持続感染が成立し，野生個体を介した病原体媒介がありうることが報告されている[1)]。このようなことが起こるのは，野生ハツカネズミ免疫関連遺伝子の多様性が非常に大きく，実験用マウスとは異なった感染感受性を持つ個体が存在することによる。しかし，このような研究はごく最

© The Ito Foundation

近始まったばかりであり，我が国の畜産農場に生息する野生ハツカネズミの実態についてはほとんど明らかになっていない。

そこで本研究では，国内の畜産農家周辺に生息する野生ハツカネズミの遺伝的多様性を明らかにするとともに，重要な人獣共通感染症病原体であるトキソプラズマをモデルとして，野生ハツカネズミの病原体伝播能力を免疫関連遺伝子の多様性の側面から調査する。とりわけType I強毒型とされるトキソプラズマ株への感受性に注目する。この株はハツカネズミと同種生物である実験用マウスを系統に関わらず100％殺してしまうことから，ハツカネズミへの潜伏感染あるいは潜伏感染個体による家畜への媒介は起こらないものとされてきた。ところがタイ，インドの野生マウスの一部個体に由来する系統は，Type I強毒型に感染しても死亡することなく，これを保虫できる。またこのような耐性は，これら個体が一般的な実験用マウス系統とは異なった塩基配列のImmune-related GTPase（IRG）b2遺伝子を持つことが原因であると報告されている[2)]。そこで本研究では，国内農場で同様の塩基配列のIrgb2遺伝子を持つハツカネズミ個体が生息しているかどうか調査した。

2．方　法

2.1　野生ハツカネズミの捕獲およびゲノムDNAの調整

本州に位置するA県および本州以外の島に位置するB県の家畜農場あるいはその周辺において，害獣駆除の一環として捕獲されたハツカネズミを頸椎脱臼により安楽殺し実験に供した。動物を用いるすべての実験は岐阜大学動物実験委員会の承認を得て実施した（承認番号 2021-097）。脳または尾の組織小片からGenomic DNA Purification Kit（Promega, Madison, WI, USA）を用いてゲノムDNAを精製し，得られたDNAは実験に供するまで冷凍庫で保存した。

2.2　Irg b2遺伝子領域の塩基配列の決定

得られたゲノムDNAを鋳型としてIrgb2遺伝子領域を含む配列をPCRにより増幅した。用いたプライマーおよび増幅条件は過去の文献の報告をもとに[2)]，若干の改変を加えた。得られた断片に含まれるDNAの塩基配列をダイレクトシークエンスで決定し，重複する波形が現れない場合はホモザイゴートと判断した。重複波形を含む場合はヘテロザイゴートと判断し，増幅断片をpT7Blue vector（Novagen, USA）にクローニングした。その後，得られた複数のクローンの配列を決定して２種類のアレルそれぞれの塩基配列を確定した。

2.3　Irgb2遺伝子の系統解析

塩基配列が確定したIrg b2遺伝子にコードされていると考えられるタンパク質のアミノ酸配列について，Maximum Likelihood methodに基づきJTT matrix-based modelを用いてMEGA Xを用いて系統樹を作成した。外群としてC57BL/6マウスのIrg b10遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列（NM_001135115）ならびに*Microtus ochrogaster*の相同タンパク質のアミノ酸配列（LOC101989451）を用いた。既知の野生マウスのIrg b2遺伝子の配列は過去の報告に示された配列を用いた[2)]。

2.4　IRG B2とROP5Bタンパク質の結合力の推定

IRG B2およびROP5Bのアミノ酸配列のフォーマットはhttp://avermitilis.ls.kitasato-u.ac.jp/readseq.cgiを用いて以下のソフトウェアに適用可能な形式に変換した。変換した配列をhttp://www.iitm.ac.in/bioinfo/PPA_Pred/で供されるフリーソフトで解析しK_d値およびΔG値を得た。

© The Ito Foundation

3．結果と考察

3.1　我が国の畜産農家周辺に生息する野生ハツカネズミのIRG b2遺伝子の多様性

A県およびB県で捕獲した12個体のハツカネズミのIrg b2遺伝子の塩基配列を決定し，それぞれの遺伝子がコードするタンパク質のアミノ酸配列に変換したところ10種類のアミノ酸配列が得られた。既報のアミノ酸配列と完全に一致したのはこのうち２つだけであり，残りの８つは新たな配列であった。このうち一つ目の配列はチェコ共和国，中華人民共和国内モンゴル自治区，カザフスタンから報告された個体の配列に一致した。この配列はA県の２農場から検出されたほか，B県からも検出された。日本国内のみならず世界中に広く分布している配列と考えられる。もう一つの配列はCAST/EiJマウスの配列と一致した。さらに完全一致ではないものの，きわめて類似の配列を持つ個体も見出された（**Fig. 1**）。CAST/EiJマウスはタイの野生マウス個体に由来する系統で，強毒株トキソプラズマに感染しても無症状で長期間虫体を体内に保有することが知られている。

このようなIRG b2アミノ酸配列は国内はもとよりタイ，インド以外からは世界のどこからも報告された事例がない。また，この配列を持つ個体は強毒株トキソプラズマ株を長期間保虫し，環境中でリザーバーになることが知られている。以上の結果は，環境中で強毒株トキソプラズマを温存できる個体はインドやタイに限局して生息している例外的な存在ではなく，我が国の畜産農場周辺にも広く分布していることを示唆している。このような個体で維持された強毒株が食肉家畜に感染しないよう，あるいは食肉家畜を介して人へ感染しないよう十分注意する必要がある。

3.2　我が国の畜産農家周辺に生息する野生ハツカネズミが持つIRG B2タンパク質と強毒株トキソプラズマの持つROP5Bタンパク質の結合性

寄生虫が分泌するROP5Bタンパク質と宿主側のIRG b2タンパク質の親和性が高い場合，当該細胞は強毒株トキソプラズマに耐性になることが知られている。そこで，本調査で新たに得られたIRG b2タンパク質と強毒株トキソプラズマROP5B分子の親和性をコンピューターシミュレーションにより予測した。その結果，10配列のうち３配列において，インド産野生個体に由来する強毒株耐性マウス（CIM系統）のIRG b2よりさらに高い結合性を示した（K_d値およびΔG値のいずれの面でも同様であった）。また，高い結合性が予測された配列のタンパク質を組換え大腸菌を用いて作成し，強毒株ROP5Bとの結合能力を免疫沈降法を用いて検証中である。すべての配列について検証を終えたわけではないが，これまで検討した配列は，いずれも免疫沈降法においても強い結合性を示している。一方で低い結合性が予測された配列では，免疫沈降でもタンパク質間の結合は検出できなかった。このことから今回用いたシミュレーションの結果は信頼性の高いものと考えられる。

以上のことから我が国にも強毒株トキソプラズマに無症状で感染し，これを環境中に保持できるマウス個体が野生化で広く存在しているということが再度示唆された。今後は，国内に強毒株が定着しているのか，もし定着しているとするとどの地域に分布しているのかを調査する必要がある。

4．要　　約

トキソプラズマは食肉由来の人獣共通感染症病原体として重要である。畜産農場周辺に生息するハツカネズミ等はトキソプラズマの中間宿主とし

© The Ito Foundation

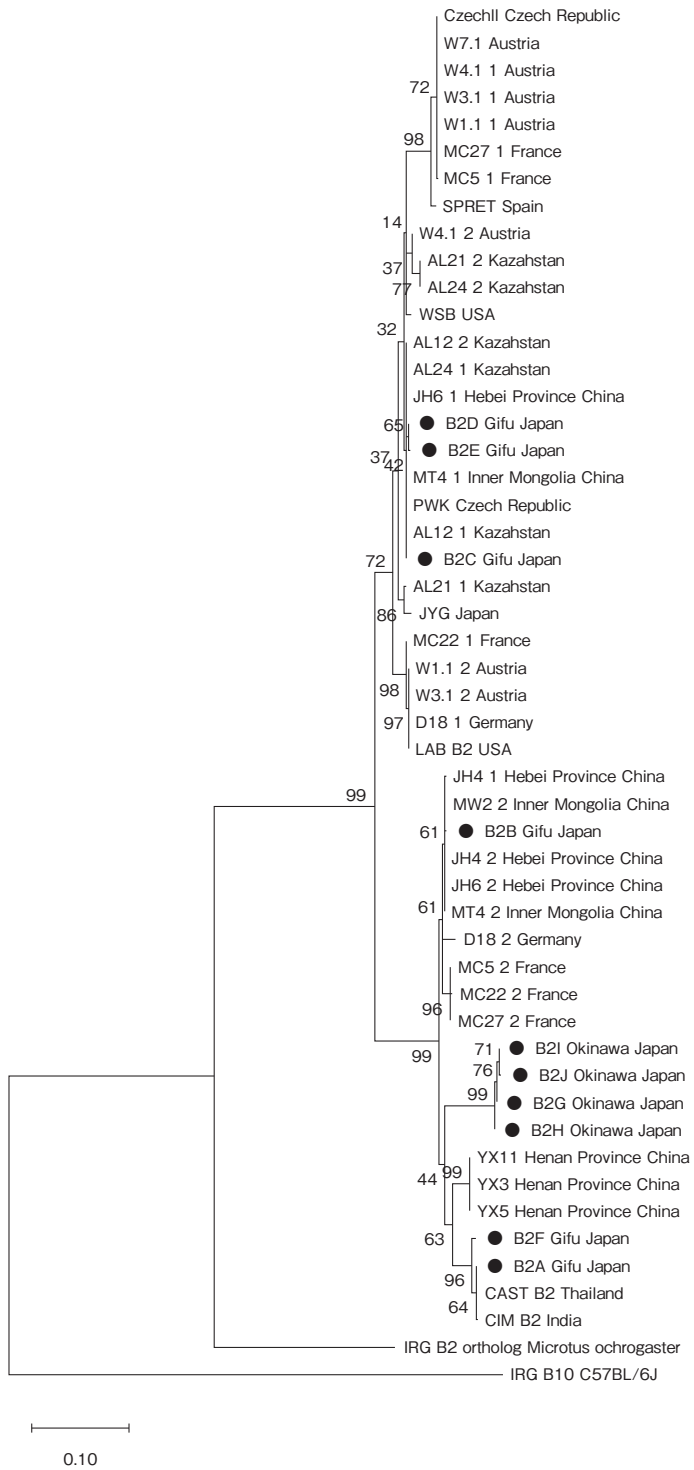

Fig. 1　Phylogenetic tree of expected IRGB2 proteins from captured M. musculus.
Wild rodents derived IRGB2 protein sequences from the local areas in Gifu and Okinawa Prefectures (black circles) in Japan and reported protein sequences from laboratory mouse or wild derived individuals are shown.

© The Ito Foundation

て重要であるが，強毒株に感染するとほとんどすべての系統の実験用マウスは死亡する。一方でインドおよびタイでは，強毒株を無症状のまま保虫できるハツカネズミ個体の存在が知られており，強毒株のリザーバーである可能性が指摘されている。このようなハツカネズミ個体ごとの感染感受性の違いはIrgb2遺伝子のアミノ酸配列によって決まる。本研究では，日本国内の畜産農場に生息するハツカネズミについてIrgb2遺伝子の多様性を調査した。その結果，インドやタイで報告された耐病性個体の配列と同様のアミノ酸配列を持つ個体が本州でも見つかった。また，これまでに報告のない新たな変異を持つ遺伝子も見つかっている。これらの遺伝子がコードするタンパク質とトキソプラズマ病原因子のひとつであるROP5Bタンパク質の結合力をコンピューターシミュレーションで予測したところ，一部の配列が非常に高い値を示した。このような配列を持つ個体は，トキソプラズマ強毒株に感染しても無症状である可能性が高く，我が国の食肉家畜農場周辺において強毒株トキソプラズマのリザーバーとして機能している可能性がある。

文　献

1） Murillo-León, M., Müller, U. B., Zimmermann, I., *et al.*：Molecular mechanism for the control of virulent *Toxoplasma gondii* infections in wild-derived mice, *Nat Commun*, **10**, 1233, 2019.
2） Lilue, J., Benedikt, U., Müller, U. B., *et al.*：Reciprocal virulence and resistance polymorphism in the relationship between Toxoplasma gondii and the house mouse, *eLife*, **2**, e01298, 2013.

© The Ito Foundation

牛マイコプラズマによる気管傷害と細胞内侵入過程の解明

Tracheal injury and intracellular invasion process by bovine Mycoplasma

平　野　佑　気

（（地独）北海道立総合研究機構畜産試験場）

Yuki Hirano

（Animal Research Center, Hokkaido Research Organization）

Mycoplasma bovis（*M. bovis*）is a major cause of bovine pneumonia, but its effect on the respiratory tract, particularly the trachea, remains poorly understood. In this study, a three-dimensional culture model of fetal bovine tracheal epithelial cells（ALI-FbTEC）was established to investigate the detrimental effects of *M. bovis* on the trachea. Transcriptome analysis was performed on ALI-FbTEC and monolayer-cultured fetal bovine tracheal epithelial cells（FbTEC）using RNA-seq. A total of 4,608 genes with more than 2-fold expression changes were identified in ALI-FbTEC. Gene ontology（GO）analysis revealed an increase in genes related to cilia structure and ciliary movement in ALI-FbTEC, indicating its usefulness in evaluating pathogenic cilia damage. *M. bovis* was then inoculated into ALI-FbTEC, and transcriptome analysis was performed using RNA-seq. A total of 197 genes with more than 2-fold expression changes were identified in *M. bovis*-infected ALI-FbTEC, with GO analysis revealing changes in genes related to the immune response. Gene set enrichment analysis showed changes in genes related to cilia structure and ciliary movement. The three-dimensional culture system of bovine fetal tracheal epithelial cells established in this study is a valuable model for investigating bovine pneumonia.

1．目　　的

ウシの肺炎は腸炎とならび病傷事故数が非常に多く，畜産農家の生産性を阻害する大きな要因の一つである。肺炎の予防にはワクチン接種等の対策が実施されているが十分に制御できていない。その理由として，肺炎は細菌やウイルスなど複数の病原体の複合感染により発症することが多く，感染から発症までのメカニズムが複雑であるため，予防や治療が困難なことがあげられる。ウシにおける肺炎の主要な原因菌である*Mycoplasma bovis*（*M. bovis*）は他の病原体との複合感染による肺炎の重篤化，慢性化の増悪因子になるとされている。複合感染の機序の一つとして*M. bovis*が気管上皮の線毛を傷害し他の細菌やウイルスの感染を容易にすることが示唆されているが，十分な報告はなされていない。気管上皮は呼吸器に侵入してきた病原体を線毛運動により体外に排出する重要な防御機能を有している。同じMycoplasma属菌であり，ヒトの肺炎の原因となる*M.*

© The Ito Foundation

*pneumoniae*は気管上皮の線毛運動の低下や線毛細胞の破壊を引き起こすことが報告されている[1)]。著者らは，子牛生体を供試した*M. bovis*感染実験により感染子牛の気管線毛の長さおよび密度が低下しており，*M. bovis*が気管上皮細胞内に侵入していることを明らかにした（投稿準備中）。*M. bovis*はウシのさまざまな細胞に侵入することで宿主免疫を回避していることが報告されており，細胞内侵入は*M. bovis*にとって重要な生存戦略だといえる。そこで，*M. bovis*の気管線毛の傷害は気管上皮細胞へ侵入するための過程の一つなのではないかという仮説を立てた。仮説を証明するためにはin vitroで生体の組織に近い機能や形態を再現した気管上皮細胞モデルが必要である。気液界面培養による三次元培養は気管上皮細胞を成長因子やホルモンなどの成分を含んだ培地を用い，多孔質膜の特殊な培養器材で培養することで気管上皮細胞の分化を促進し，生体に近い細胞構成や極性を持った擬似組織に培養する手法である。三次元培養した気管上皮細胞は多列線毛円柱上皮の形態を有し，病原体の気管線毛への傷害性を解明するために不可欠なモデルである。

牛マイコプラズマによる気管傷害と細胞内侵入過程を解明するために，本研究では気液界面培養による三次元培養系を用いてウシ気管上皮細胞モデルを構築し，有用性を評価した。また，*M. bovis*をウシ気管上皮細胞モデルに感染させRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

2．方　法

2.1　菌液の調整およびウシ胎子気管上皮細胞の分離・培養

M. bovis 菌株は基準株であるPG45株（ATCC25523）を供試した。*M. bovis*はHayflick液体培地に接種し，37℃48時間培養した。その後Hayflick寒天培地に接種し菌数を算出した。菌液は試験に供試するまで－80℃で保存した。

ウシ胎子気管上皮細胞（Fetal bovine tracheal epithelial cell：FbTEC）は食肉処理場でと殺された妊娠牛から採取したウシ胎子の気管上皮から分離し試験に供試した。分離したFbTECは6ウェルプレートに播種しPneumaCult-Ex Plus培地で培養した。培養したFbTECはRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析のためにRNA抽出した。さらに，FbTECを12ウェルプレート用セルカルチャーインサート内に播種し，PneumaCult-Ex Plus培地（STEMCELL）により培養した。インサート上で細胞をコンフルエントまで培養後，培地をPneumaCult ALI培地に変更し，気液界面（ALI：Air-liquid interface）培養による三次元培養に移行した。2，3日おきに培地を交換し，ALI培養で少なくとも21日間以上培養した。ALI培養したFbTEC（ALI-FbTEC）に2×10^6 CFU/20 μlまたは2×10^8 CFU/20 μlの*M. bovis*菌液を接種し培養した。ALI-FbTECは経上皮電気抵抗値の測定および網羅的遺伝子発現解析のためのRNA抽出に供試した。

2.2　経上皮電気抵抗値の測定

*M. bovis*による細胞間結合への影響を明らかにするために，*M. bovis*を感染させたFbTECの経上皮電気抵抗値（trans-epithelial electrical resistance；TEER）をMillicell ERS-2（Millipore）を用いて感染後72時間まで経時的に測定した。

2.3　RNA抽出

培養したFbTECからTRIzol（Thermo Fisher Scientific）を使用し総RNAを抽出した。抽出したRNAはTURBO DNase（Thermo Fisher Scientific）によりゲノムDNAを除去した。RNAの濃度および品質はBioanalyzer（Agilent）を使用して測定した。測定後，RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析に供した。

© The Ito Foundation

2.4　RNA-seq

RNA の精製は NEBNext Poly（A）mRNA Magnetic Isolation Module （NEW ENGLAND Biolabs），ライブラリーの調整はNEBNext Ultra ll Directional RNA Library Prep Kit（NEW ENGLAND Biolabs）を用いた。次世代シーケンサーはIllumina NovaSeq 6000（Illumina）を使用した。得られたシーケンスデータはRaNA-seq（https://ranaseq.eu/index.php）によりデータの前処理およびマッピングを行い，iDEP（http://bioinformatics.sdstate.edu/idep96/）によりGene ontology（GO）解析およびGene set enrichment analysis（GSEA）を実施した。

3．結果と考察

3.1　経上皮電気抵抗値の推移

ALI-FbTECに*M. bovis*菌液を接種し，*M. bovis*感染による細胞間結合への影響を明らかにするためにTEERを経時的に測定した。菌量として低菌量（２×10^6CFU）および高菌量（２×10^8CFU）の２条件で測定したが，いずれの菌量においても感染後72時間までの間にTEERの変化は認められなかった（**Fig. 1**）。ウシの肺炎の原因菌の一つである*Mannheimia haemolytica*（*M. haemolytica*）は感染後48時間程度で気管上皮細胞に対して著しいタイトジャンクションの破壊を引き起こすが[2)]，*M. bovis*の感染はALI-FbTECのタイトジャンクションを破壊するような細胞傷害を引き起こさないことが示唆された。*M. bovis*による単独感染では強い病変を示さないことも多いと報告されている。しかし，*M. haemolytica*による病原性の高い強毒株と病原性の低い弱毒株の比較試験において，弱毒株ではTEERの減少は認められなかった。*M. bovis*においても菌株の違いにより気管への傷害性が異なる可能性が考えられる。

3.2　網羅的遺伝子解析によるALI-FbTECの評価

RNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析により単層培養したFbTECとALI-FbTECのGO解析を実施した。FbTECとALI-FbTECにおいて２倍以上の発現変動を示した遺伝子は4608個あり，ALI-FbTECで発現増加している遺伝子は2440個，減少している遺伝子は2168個であった。ALI-FbTEC は Cilium organization や Cilium

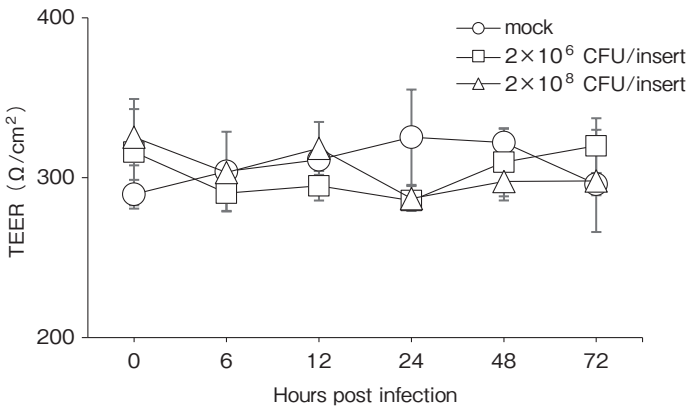

Fig. 1　Transepithelial electrical resistance（TEER）values of *M. bovis* infected and uninfected FbTEC. FbTEC were infected with *M. bovis* at ２×10^6CFU and ２×10^8CFU per insert for 72 hours. TEER values are expressed as mean±SEM（n=3）.

© The Ito Foundation

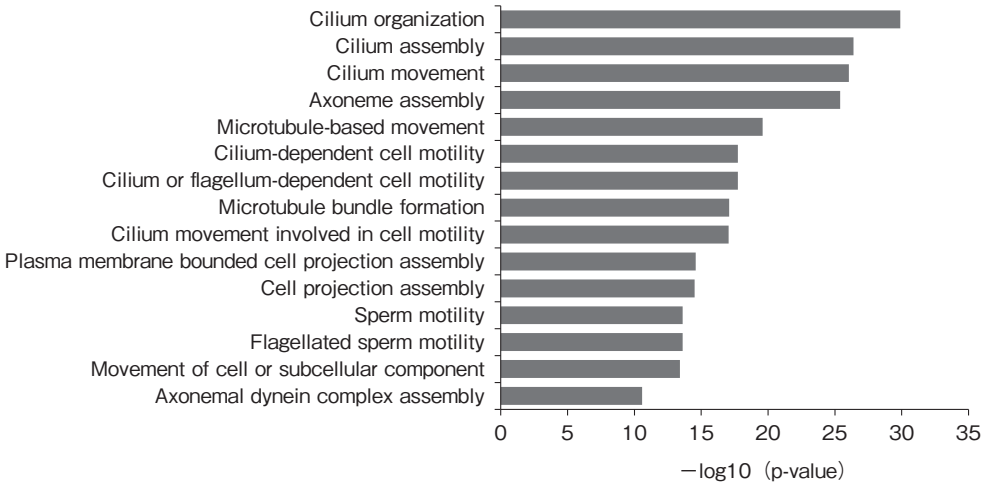

Fig. 2　Gene ontology analysis of FbTEC and ALI-FbTEC.

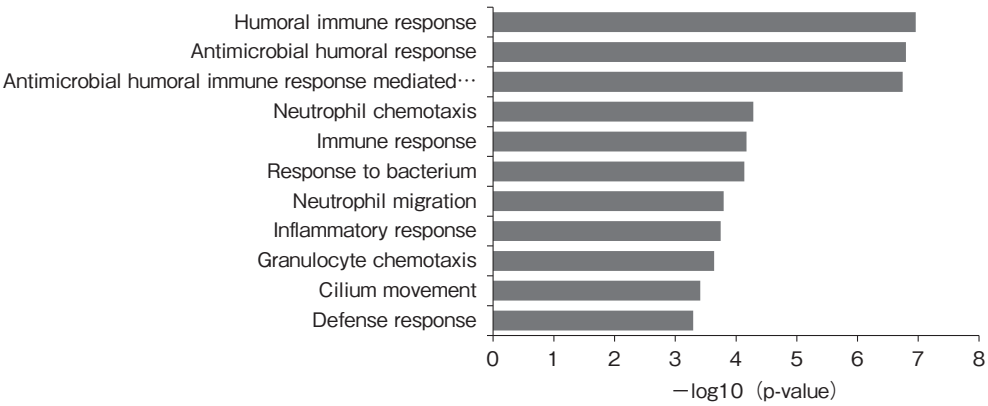

Fig. 3　Gene ontology analysis of *M. bovis* infected and uninfected ALI-FbTEC.

assembly，Cilium movementなど線毛の構造物や線毛運動に関する遺伝子群の増加が認められた（**Fig. 2**）。このことは，ALIによってFbTECの分化が誘導されたことが遺伝子発現レベルでも確認されたことを示唆しており，本研究で構築したALI-FbTECはウシの肺炎の原因となる病原体の線毛に対する影響を評価するための有用なモデルであることが分かった。

3.3　*M. bovis*感染FbTECの網羅的遺伝子発現解析

ALI-FbTECに*M. bovis*を感染させRNA-seqによる網羅的遺伝子発現解析を実施した。*M. bovis*感染FbTECと対照のALI-FbTECにおいて2倍以上の発現変動を示した遺伝子は197個あり，*M. bovis*感染ALI-FbTECで発現増加している遺伝子は173個，減少している遺伝子は24個であった。発現が変動している遺伝子に対してGO解析を実施した（**Fig. 3**）。*M. bovis*感染ALI-FbTECではHumoral immune responseやAntimicrobial humoral response，Neutrophil chemotaxisなど主に免疫応答に関する遺伝子群の変動が抽出された。遺伝子としては*GRO1*，*CXCL2*，*CXCL3*，

© The Ito Foundation

*CXCL5*などのケモカイン遺伝子や*S100A9*，*S100A12*など白血球の遊走を亢進に関連する遺伝子やLactoferrin（*LTF*）やTracheal antimicrobial peptide（*TAP*）などの抗菌ペプチド遺伝子など，病原体の排除に関わる重要な遺伝子の変動が認められた（**Table 1**）。*CXCL5*や*TAP*はウシ肺上皮細胞においても*M. bovis*の感染において遺伝子の発現が増加することが報告されており[3)]，ALI-FbTECにおいても同様の反応が起こることが示唆された。

さらに，GSEAによるパスウェイ解析ではAxoneme assemblyやMicrotubule bundle formationなど線毛を構造に関連する遺伝子群の変動が抽出されたことから，*M. bovis*の感染により線毛の傷害を起こし線毛細胞への分化に影響を与えていることが示唆された（**Table 2**）。また，線毛の構造だけでなくCilium movementやCilium or flagellum-dependent cell motilityなどの線毛運動に関連する遺伝子の変動も抽出された。*M. bovis*は直接線毛を傷害するだけでなく，*M. pneumoniae*と同様に線毛運動に対しても影響を及ぼしている可能性が考えられた。

以上より，本試験で構築したウシ気管上皮細胞の三次元培養系は*M. bovis*の気管傷害機序を解明するための有用なモデルであることが示された。ウシの肺炎は*M. bovis*以外にも多様な細菌やウイルスの感染によって引き起こされることから，*M. bovis*以外の病原体の肺炎発症機序や複合感染における病態解明についても応用が可能である。

4．要　約

Mycoplasma bovis（*M. bovis*）はウシの肺炎の原因となる主要な病原体の一つであるが呼吸器局所，特に気管にどのような影響を及ぼしているか十分に明らかとなっていない。本研究では*M. bovis*の気管に対する傷害性を解明するために，

Table 1　Gene ontology analysis to identification of differentially expressed gene and signaling pathways

Pathways	Genes	Number of Genes
Humoral immune response	*LTF, SLPI, C1S, S100A9, CXCL5, S100A12, C3, INHCA, TNF, CXCL2, GRO1, CXCL3*	12
Antimicrobial humoral response	*LTF, SLPI, S100A9, CXCL5, S100A12, INHCA, CXCL2, GRO1, CXCL3*	9
Antimicrobial humoral immune response mediated by antimicrobial peptide	*LTF, S100A9, CXCL5, S100A12, CXCL2, GRO1, CXCL3*	7
Neutrophil chemotaxis	*S100A9, CXCL5, S100A8, CXCL8, CXCL2, GRO1, CXCL3*	7
Immune response	*TNFSF13, LTF, SLPI, C1S, NFAM1, S100A9, TNFSF11, CXCL5, IL1A, NFKBIZ, PUM2, MYB, PGLYRP2 S100A12, S100A8, CD14, VNN1, BPIFB1, C3, CXCL8, PIGR, INHCA, TNF, CXCL2, TFRC, GRO1, CXCL3, TAP*	28
Response to bacterium	*LTF, SLPI, WASL, S100A9, CXCL5, PGLYRP2, CD14, C3, CXCL8, INHCA, TNF, CXCL2, GRO1, CXCL3, TAP*	15
Neutrophil migration	*S100A9, CXCL5, S100A8, CXCL8, CXCL2, GRO1, CXCL3*	7
Inflammatory response	*S100A9, TNFSF11, IL1A, NFKBIZ, PGLYRP2, S100A8, CD14, VNN1, C3, SETD4, CXCL8, TNF, CXCL2, GRO1, CXCL3*	15
Granulocyte chemotaxis	*S100A9, CXCL5, S100A8, CXCL8, CXCL2, GRO1, CXCL3*	7
Cilium movement	*SPAG17, MEIG1, TTC29, DNAI4, DNAI3, CFAP206, ATP2B4, CFAP43, SPEF2*	9
Microtubule cytoskeleton organization	*SPAG17, MEIG1, CCDC170, KIF19, DNAI4, EML1, DNAI3, CFAP206, CFAP43, FBXW11, CLASP1, CEP126 CLASP1, SPEF2, DEUP1, STMN3, TOGARAM1, TOGARAM2, TMEM67*	19
Defense response	*LTF, SLPI, S100A9, TNFSF11, CXCL5, IL1A, NFKBIZ, PUM2, PGLYRP2, S100A12, S100A8, CD14, VNN1, BPIFB1 C3, SETD4, CXCL8, INHCA, TNF, CXCL2, GRO1, CXCL3, TAP*	23

© The Ito Foundation

Table 2　Gene set enrichment analysis to identification of signaling pathways and normalized enrichment scores

Pathway	NES	Number of genes
Axoneme assembly	2.4597	58
Microtubule bundle formation	2.3909	80
Cilium movement	2.3823	86
Cilium or flagellum-dependent cell motility	2.301	60
Cilium-dependent cell motility	2.301	60
Cilium movement involved in cell motility	2.2908	57
Determination of left/right symmetry	2.254	54
Cilium organization	2.2488	251
Flagellated sperm motility	2.2389	47
Sperm motility	2.2389	47
Cilium assembly	2.2319	228
Humoral immune response	2.2236	51

NES : Normalized enrichment scores

ウシ胎子気管上皮細胞の三次元培養モデル（ALI-FbTEC）を構築し，RNA-seqによりALI-FbTECと単層培養したウシ胎子気管上皮細胞（FbTEC）の網羅的遺伝子発現解析を行った。ALI-FbTECで２倍以上の発現変動を示した遺伝子は4608個であった。Gene ontology（GO）解析ではALI-FbTECにおいて線毛の構造物や線毛運動に関する遺伝子群の増加が認められた。ALI-FbTECは病原体の線毛に対する傷害を評価するための有用なモデルであることが分かった。さらに，ALI-FbTECに*M. bovis*を感染させRNA-seqにより網羅的遺伝子発現解析を行った。*M. bovis*感染ALI-FbTECで２倍以上の発現変動を示した遺伝子は197個であった。GO解析では免疫応答に関する遺伝子群が変動していた。さらに，Gene set enrichment analysisでは線毛の構造や繊毛運動に関する遺伝子群が変動していた。本試験で構築したウシ胎子気管上皮細胞の三次元培養系はウシの肺炎研究において有用なモデルである。

文　献

1） Chaudhry, R., Ghosh, A., Chandolia, A.：*Journal of Bacteriology*, **96**, 3675～3682, 2014.

2） Daniel Cozens, Erin Sutherland, Miquel Lauder, Geraldine Taylor, Catherine C. Berry, Robert L. Davies：*Infection and Immunity*, Volume 87, No. 6, 2019.

3） Hui Zhang, Doukun Lu, Yiqiu Zhang, Gang Zhao, Abdul Raheem, Yingyu Chen, Xi Chen, Changmin Hu, Huanchun Chen, Liguo Yang, Aizhen Guo：*Frontiers in Immunology*, Volume13, 2022.

© The Ito Foundation

黒毛和種牛における血液中のビタミンDの状況把握と牛におけるビタミンDの免疫賦活作用および抗炎症作用の検討

Understanding the status of vitamin D in blood in Japanese Black cattle, the effects of vitamin D on the immunostimulatory and anti-inflammatory in cattle

乙丸　孝之介[1]・津川　尚子[2]・井尻　　萌[1]
（[1]鹿児島大学共同獣医学部，[2]大阪樟蔭女子大学健康栄養学部）

Konosuke Otomaru[1], Naoko Tsugawa[2] and Moe Ijiri[1]
([1]Kagoshima University, Joint Faculty of Veterinary Medicine,
[2]Osaka Shoin Women's University, Department of Health and Nutrition)

In this study, we investigated the vitamin D concentration in the blood of Japanese Black cows, and also investigated the peripheral blood mononuclear cells isolated from cattle. Cells were cultured in 4 categories: unstimulated without vitamin D, unstimulated with vitamin D, LPS stimulated without vitamin D and LPS stimulated with vitamin D. The gene expression and culture supernatant of the cells after culture were measured. AS the results, herds of cows on shaded farms had the lowest levels of vitamin D, and levels were lower in winter than in summer. In cell culture, the β-defensins DEFB10 and LAP were significantly higher in the vitamin D supplemented group than in the non-supplemented group, regardless of the presence or absence of LPS stimulation. Nos2 was also significantly higher in the vitamin D supplemented group than in the non-supplemented group, regardless of the presence or absence of LPS stimulation. On the other hand, IL-10 levels were significantly lower in the vitamin D supplemented group than in the non-supplemented group, regardless of the presence or absence of LPS stimulation. Regarding the culture supernatant, the antioxidant stress capacity was significantly higher in the vitamin D supplemented group than in the non-supplemented group under LPS stimulation. The cell viability was significantly higher in the vitamin D supplemented group than in the non-supplemented group, regardless of the presence or absence of LPS stimulation. In this study, for the first time, the clarified the vitamin D concentration of Japanese Black cows, and clarified the effects of vitamin D on the peripheral blood mononuclear cells from Japanese Black cattle at the cellular level. In the future, it was considered necessary to conduct further research to clarify the function and utilization of vitamin D in cattle from both *in vivo* and *in vitro*.

Keywords：Japanese Black calf, vitamin D, peripheral blood mononuclear cells.

© The Ito Foundation

1．目　　的

ビタミンDは，脂溶性ビタミンの一種に分類され必須栄養素である。ビタミンDは経口的な摂取による体内への吸収と太陽光（紫外線）によって体内で生合成されるが，太陽光（紫外線）によって体内で合成されるためには，直射日光を浴びる必要がある。ビタミンDの主な作用として，血液中のカルシウム（Ca^{2+}）濃度を調節する作用は広く知られているが，近年，ビタミンDは免疫機能の向上，抗酸化ならびに抗炎症作用など，健康状態の維持に関与する作用が注目されている[1, 2)]。ヒトにおいては，現在世界中で大流行している新型コロナウイルス（COVID-19）とビタミンDの関連について，血液中のビタミンD濃度が低値であるほど，COVID-19への罹患率，死亡率は高いことが明らかとなっており[3, 4)]，ビタミンDが，感染症の罹患率や治癒率に関連していることが明らかになっている。一方，牛の血液中のビタミンD濃度については，これまで多くは調査されておらず，黒毛和種牛については，ほとんど調査されていない。そこで我々は，黒毛和種牛の飼養管理状況に応じた繁殖雌牛の血液中のビタミンD濃度について明らかにする。また，牛の血液より分離した末梢血単核球に活性型ビタミンDを添加して培養，炎症マーカー，免疫や炎症に関するサイトカインなどを測定するとともに，細胞生存率も調査し，ビタミンDの牛の細胞レベルの効果を明らかにする。

2．方　　法

本研究は，黒毛和種繁殖牛の血液中のビタミンD濃度調査，牛の血液から分離した末梢血単核球に対するビタミンDの添加効果の２つ大別して実施した。

2.1　血液中のビタミンD濃度の調査等

飼養環境の異なる鹿児島県内の３農場（A農場；わずかに太陽光のあたる農場，B農場；常時太陽光のあたる放牧農場，C農場；太陽光のあたらない農場）より，2022年８月（夏季）および2023年２月（冬季）において，臨床的に健康な黒毛和種繁殖雌牛，計140頭より採血を行い，得られた血清を用いてビタミンD濃度を測定した。

2.2　末梢血単核球に対するビタミンDの効果

牛の末梢血単核球におけるビタミンDの添加効果について，臨床的に健康な黒毛和種牛，18頭より採血を行い，血液より末梢血単核球を分離した。単核球は４条件下に区分（①無添加・無刺激，②無添加・LPS刺激，③ビタミンD添加・無刺激，④ビタミンD添加・LPS刺激）して培養を行い，ａ）末梢血単核球を24時間培養し，末梢血単核球の炎症や免疫に関するmRNA発現量をリアルタイムPCRを用いて測定するとともに，培養上清の炎症に関するサイトカイン，抗酸化能の測定を行った。さらに，ｂ）末梢血単核球を上記の４条件下において24，48，72および120時間培養し，末梢血単核球の細胞生存率について測定した。

3．結果と考察

飼養環境の異なる３農場における黒毛和種繁殖牛の血液中のビタミンD濃度について，2022年８月の調査においては，常時太陽光のあたるB農場のビタミンD濃度が最も高く，ついでわずかに太陽光のあたるA農場であり，太陽光のあたらないC農場が最もビタミンD濃度が低かった（**Fig. 1**）。また，2023年２月の調査において，わずかに太陽光のあたるA農場のビタミンD濃度が最も高く，ついで放牧農場であるB農場であり，ほとんど太陽光のあたらないC農場が最もビタミンD濃度が低かった（**Fig. 1**）。さらに，３農場いずれにおいても，冬季のビタミンD濃度は夏季と比

© The Ito Foundation

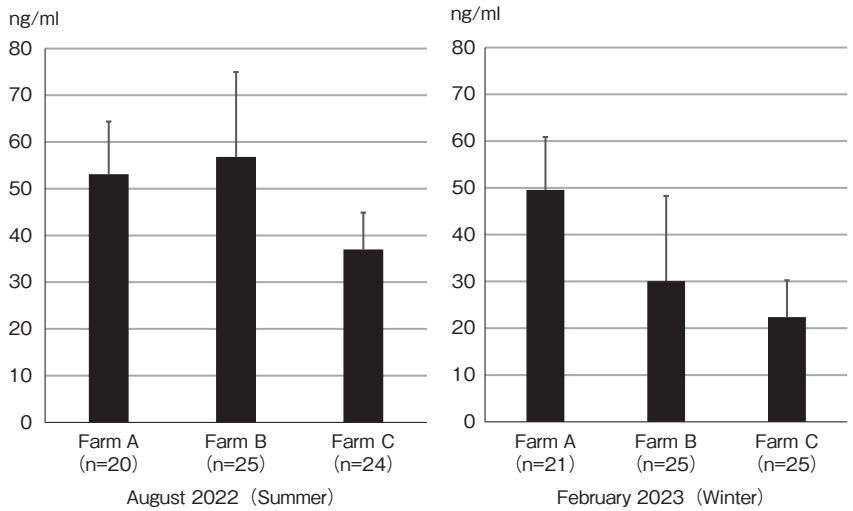

Fig. 1　Vitamin D levels in Japanese Black cattle.
Farm A with little sunlight, farm B with constant sunlight, farm C with no sunlight
※Vitamin D concentration less than 20ng/ml is a deficiency value

較し低い傾向であった。１年間の太陽光からの紫外線量は，年間を通して変動があり，夏季に多く，冬季に少ないことから，同一農場においても冬季のビタミンＤ濃度の低下の要因は，紫外線量の低下によるものと考えられた。また，日光のあたらないＣ農場のビタミンＤ濃度は，３農場中最も低い値であり，特に冬季は欠乏値の20ng/mlをわずかに上回って程度である。したがって，このような農場においては，日光浴を推奨することが望ましいが，農場構造上，野外に牛を出すことが不可能な場合は，ビタミンＤのサプリメントなどで，ビタミンＤを補給する必要がある。しかしながら，サプリメントの補給でどのように改善されるのか，日光浴と経口的なビタミンＤの摂取との関連性などが今後の課題であると考えられた。

牛の末梢血単核球におけるビタミンＤの添加効果における培養細胞のmRNA遺伝子発現について，微生物に対する抗菌ペプチドであるβ-defensinの測定では，DEFB3，DEFB10およびLAPについて測定を行ったところ，DEFB3については，ビタミンＤの添加効果について明らかな差は認められなかったが，DEFB10およびLAPについては，LPS刺激の有無に関わらず，ビタミンＤを添加した群は，無添加群と比較し，有意に高値であった（**Fig. 2**）。このことから，ビタミンＤは，末梢血単核球に対して，抗菌ペプチドであるβ-defensinの産生を促進させる可能性が示唆された。また，生体内に侵入した外敵を阻止するという防御機能を担うNos2遺伝子については，LPSの刺激の有無に関わらず，ビタミンＤを添加した群は，無添加群と比較し，有意に高値であった（**Fig. 3**）。一方，炎症を抑制するサイトカインであるIL-10については，LPSの刺激の有無に関わらず，ビタミンＤを添加した群において，無添加群と比較し有意に低値であった（**Fig. 3**）。細胞培養上清の測定においては，炎症性のサイトカインであるTNFについて，無刺激およびLPS刺激のいずれにおいても，無添加群とビタミンＤ添加群に有意な差はなかった（**Fig. 4**）。一方，抗酸化能（Total antioxidant capacity）については，LPS刺激下において，ビタミンＤを添加した群は，無添加群と比較し有意に高値であった

© The Ito Foundation

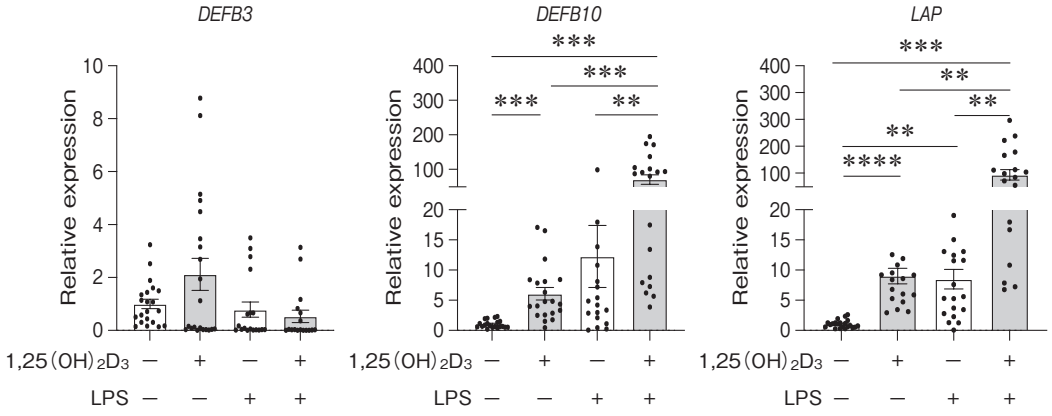

Fig. 2　1,25(OH)$_2$D$_3$ treatment enhances the expression of antibacterial peptides.
PBMC were stimulated by LPS (1 μg/ml) with or without 1,25(OH)$_2$D$_3$ (10−8ng/ml) for 24 h. Relative expression of the DEFBs (BNBD3, and BNBD10) and LAP was determined by qRT-PCR. Data are presented as means ± SEM (n=17-21) and Statistical comparison was performed using one-way ANOVA with the Dunnett's T3 post hoc test. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01

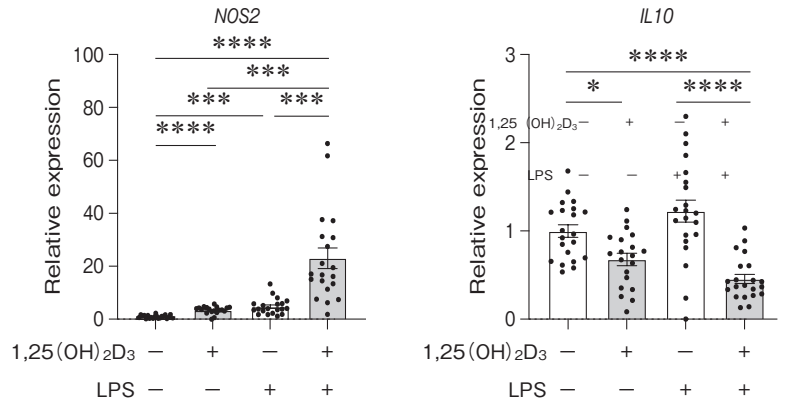

Fig. 3　1,25(OH)$_2$D$_3$ upregulates the expression of NOS2 and while downregulates that of IL10.
PBMC were stimulated by LPS (1 μg/ml) with or without 1,25(OH)$_2$D$_3$ (10−8ng/ml) for 24 h. Relative expression of CXCL8, NOS2, IL10, TNF, and IFN α A was determined by qRT-PCR. Data are presented as means ± SEM (n=18-21) and Statistical comparison was performed using one-way ANOVA with the Dunnett's T3 post hoc test. ****p<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01, *p<0.05.

(**Fig. 4**)。これらの結果から，ビタミンDの細胞レベルにおける免疫賦活作用，抗酸化，炎症に関する作用が明らかとなり，今後，ビタミンDを活用するうえでの，重要な基礎的知見になると考えられた。細胞生存率については，無刺激下では培養72および120時間後，LPS刺激下では，48，72および120時間後において，ビタミンDを添加した群において，無添加群と比較し有意に高値であった(**Fig. 5**)。このことから，ビタミンDは生命維持に強く関与するビタミンであり，細胞レベルにおいて，ビタミンDの充足は重要であることが明らかとなった。

© The Ito Foundation

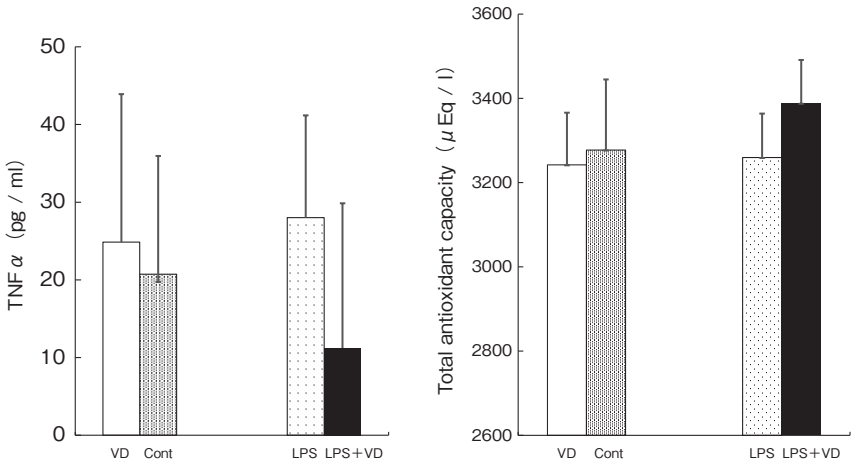

Fig. 4　Effects of vitamin D on TNF and total antioxidant capacity in the cell culture supernatant.
PBMCs were incubated for 24hr with or without LPS stimulation. a）without LPS stimulation and without vitamin D；cont, b）without LPS stimulation and with vitamin D；VD, c）with LPS stimulation and without vitamin D；LPS, d）with LPS stimulation and with vitamin D；LPS VD.
The number of samples was 18 for each（n＝18）. Data are shown as mean ± SD.
Asterisks indicate significant difference between groups（*：$p<0.05$）.

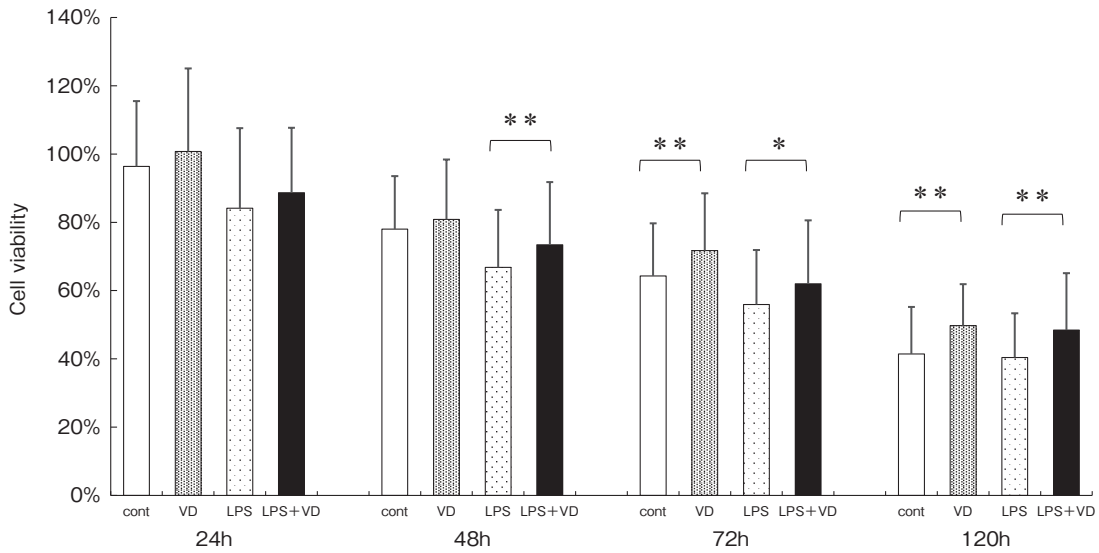

Fig. 5　Effects of vitamin D on cell viability cultured without and with LPS stimulation
a）without LPS stimulation and without vitamin D；cont, b）without LPS stimulation and with vitamin D；VD, c）with LPS stimulation and without vitamin D；LPS, d）with LPS stimulation and with vitamin D；LPS VD.
The number of samples was 18 for each（n＝18）. Data are shown as mean ± SD.
Asterisks indicate significant difference between the groups at same incubation time（*：$p<0.05$, **：$p<0.01$）.

© The Ito Foundation

本研究では，初めて黒毛和種繁殖雌牛のビタミンD濃度が，明らかになるとともに，黒毛和種牛の末梢血単核球に対する細胞レベルでもビタミンDの作用が明らかとなった。しかしながら，不明な点や解決すべき課題も多く残されていることから，今後，*in vivo*および*in vitro*の両面から，牛におけるビタミンDの機能と活用方法を明らかにするさらなる研究を行う必要があると考えられた。

4．要　約

本研究では，黒毛和種繁殖雌牛の血液中のビタミンD濃度を調査するとともに，牛の血液より分離した末梢血単核球を，無添加・無刺激，無添加・LPS刺激，ビタミンD添加・無刺激，ビタミンD添加・LPS刺激の４つに区分して培養，培養後の細胞の遺伝子発現，培養上清を測定するとともに，経時的な培養による細胞生存率について調査した。その結果，太陽光のあたらない農場で飼養された牛群のビタミンD濃度が最も低く，その濃度は夏季よりも冬季のほうが低かった。細胞培養においては，β-defensinであるDEFB10およびLAPについて，LPS刺激の有無に関わらず，ビタミンDを添加した群は，無添加群と比較し，有意に高値であった。Nos2についても，LPSの刺激の有無に関わらず，ビタミンDを添加した群では，無添加群と比較し，有意に高値であった。一方，IL-10については，LPSの刺激の有無に関わらず，ビタミンDを添加した群において，無添加群と比較し有意に低値であった。培養上清の抗酸化能については，LPS刺激下において，ビタミンDを添加した群は，無添加群と比較し有意に高値であった。細胞生存率については，LPS刺激の有無に関わらず，ビタミンDを添加した群において，無添加群と比較し有意に高値であった。本研究では，初めて黒毛和種繁殖雌牛のビタミンD濃度が明らかになるとともに，牛の末梢血単核球に対する細胞レベルでのビタミンDの作用が明らかとなった。今後，*in vivo*および*in vitro*の両面から，牛におけるビタミンDの機能と活用方法を明らかにする研究を行う必要があると考えられた。

文　献

1） Sabetta, J. R., DePetrillo, P., Cipriani, R. J., Smardin, J., Burns, L. A., Landry, M. L.：Serum 25-hydroxyvitamin d and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults, *PLoS One*, **5**(6), e11088, 2010.

2） Khoo, A. L., Chai, L. Y., Koenen, H. J., Kullberg, B. J., Joosten, I., van der Ven, A. J., Netea, M. G.：1,25-dihydroxyvitamin D3 modulates cytokine production induced by Candida albicans：impact of seasonal variation of immune responses, *J Infect Dis*, **203**, 122～130, 2011.

3） Ilie, P. C., Stefanescu, S., Smith, L.：The role of vitamin D in the prevention of coronavirus disease 2019 infection and mortality, *Aging Clin Exp Res*, **32**, 1195～1198, 2020.

4） Panagiotou, G., Tee, S. A., Ihsan, Y., Athar, W., Marchitelli, G., Kelly, D., Boot, C. S., Stock, N., Macfarlane, J., Martineau, A. R., Burns, G., Quinton, R.：Low serum 25-hydroxyvitamin D (25[OH]D) levels in patients hospitalized with COVID-19 are associated with greater disease severity, *Clin Endocrinol*, **93**, 508～511, 2020.

© The Ito Foundation

牛呼吸器病ウイルスの鼻咽頭関連リンパ組織におけるウイルス増殖と病態解析

Pathological analysis and replication of bovine respiratory viruses in nasopharyngeal-associated lymphoid tissue

平　井　卓　哉
（宮崎大学農学部）

Takuya Hirai
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Bovine Respiratory Disease Complex（BRDC）is a highly frequent disease in beef and dairy cattle in Japan. The objectives of this study were to investigate the presence of bovine respiratory viruses, mainly Bovine Viral Diarrhea Virus（BVDV）, in the Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue（NALT）of cattle, to perform histopathological search for lesions caused by *Mycoplasma bovis*, and to establish an inexpensive detection system to visualize the growth of *M. bovis* on tissue. PCR testing for bovine respiratory viruses detected the BVDV gene in the NALT in 8 of 9 cases. In addition, real-time PCR results of cases in which the BVDV gene was detected by PCR showed that BVDV was detected in the NALT tissue in the same or higher amounts than in the pulmonary lymph nodes and spleen, suggesting that the local immune system is suppressed by multiplication of BVDV in the NALT. *M. bovis* was detected in 5 of 6 cases of bacterial isolation and identification. The lungs of the *M. bovis*-positive cases showed necro-suppurative bronchopneumonia typical of *M. bovis* on HE-stained specimens, and similar lesions formations were observed in the NALT. *in situ* hybridization（ISH）using a probe derived from the domain V region of 23S rRNA, which has high sensitivity and sequence conservation, showed positive reactions in inflammatory cells and necrotic lesions in the lungs and NALT of *M. bovis*-positive bovines. *M. bovis* positive signal at the apical part of the NALT covering epithelium, suggesting that *M. bovis* invade the NALT through M cells.

1．目　　的

我が国の肉用牛および乳牛における呼吸器病の発生頻度は高く，2021年度の全病傷事故件数に対する呼吸器病の割合は21％であり，肉用牛では35％にも達する。牛の呼吸器病について，牛呼吸器病症候群または牛呼吸器複合病（Bovine Respiratory Disease Complex：BRDC）という名称は広く浸透しており，一般的に「ウイルスやマンヘミアなどの病原体の感染または長距離輸送，密飼い，気温の急変などによる強度のストレスなどの一次的要因を受けた後，二次的要因として気管内に常在している細菌やマイコプラズマなどが異常に増殖して，肺炎症状が重篤化する呼吸

© The Ito Foundation

器病」と認識されている。

BRDCを引きおこす主要なウイルスは，牛ウイルス性下痢ウイルス（Bovine Viral Diarrhea Virus：BVDV），牛RSウイルス，牛伝染性鼻気管炎ウイルス，牛パラインフルエンザウイルス３型および牛コロナウイルスなどがある。牛のマイコプラズマ肺炎において最も問題となるのは*Mycoplasma bovis*であり[1]，他の病原体の関与がなく*M. bovis*単独の感染により牛マイコプラズマ肺炎を発症し，死亡した事例も報告されている[2]。これらの病原体は経鼻的に感染するが，これまでに鼻咽頭病変の病理学的解析はほぼ実施されていない。その原因として，鼻咽頭壁を覆う鼻骨や頭蓋骨が標本作製の妨げとなり，病原体の抗原検出が困難であることがあげられる。加えて，ヒトやマウスでは鼻咽頭関連リンパ組織（Nasopharynx-Associated Lymphoid Tissue：NALT）が生体防御に重要な役割を担っているにも関わらず，家畜においては同組織の存在すら知られていないため，微生物研究者によって調べられることはない。さらに，*M. bovis*は重要な病原体でありながら，組織上で抗原を検出するための抗体が非常に高額であるため，入手は容易ではなく，普遍性のある検出系が確立されていない。

本研究の目的は，牛のNALTにおけるBVDVを中心とした牛呼吸器関連ウイルスの存在について調べるとともに，*M. bovis*による病変の病理組織学的検索を行い，鼻咽頭内におけるBRDC関連病原体の動態を明らかにすること，ならびに*M. bovis*の増殖を組織上で可視化させる低廉な検出系を確立することである。

２．方　法

2022年２月から2023年２月の期間で，宮崎県の複数の農場より呼吸器症状などを呈して淘汰された牛９頭（No.１～No.９）を剖検に供した。生材料として鼻咽頭ぬぐい液，NALT，肺，肺門リンパ節および脾臓を採取し，RNAおよびDNAを抽出した。

No.１～No.９の鼻咽頭ぬぐい液，NALTおよび肺のRNA抽出液を用いて，BVDV，牛RSウイルスおよび牛コロナウイルスのPCR検査を実施し，ウイルス遺伝子の検出を試みた。また，PCR検査においてBVDV遺伝子を検出した症例のうち，No.１～No.３のNALT，肺，肺門リンパ節および脾臓については，既報に従ってリアルタイムPCR法を実施し，BVDVのウイルス量を測定した[3]。他方，No.４～No.９については，鼻咽頭ぬぐい液および肺の細菌の分離・同定を行った。採材組織は４％パラホルムアルデヒド／リン酸緩衝溶液で固定後，パラフィン包埋を行い，HE染色標本を作製し，病組織学的検査を実施した。

さらに，*M. bovis*遺伝子を*in situ* hybridization（ISH）法を用いて組織上で可視化するため，*M. bovis*に特異性を有するプローブを開発した。ISH法に使用する*M. bovis*のプローブの検討に際しては，ヒトに対する*Mycoplasma pneumoniae*の遺伝子検査法であるマイコプラズマrRNA検出試薬の開発において，23S rRNAを検出ターゲットとすることにより高感度が期待できる[4]こと，*M. bovis*の耐性機構に関わる23S rRNAのドメインＶ領域が配列の保存性が高い部位を有する[5]ことに着想を得て，23S rRNAのドメインＶ領域より作製した。細菌検査で*M. bovis*が分離・同定された症例のNALTおよび肺の標本を用いてISH法を実施することにより，*M. bovis*感染細胞の検出とその細胞種の特定を試みた。

３．結果と考察

3.1　ウイルス遺伝子の検出

No.１～No.９の鼻咽頭ぬぐい液，NALTおよび肺について，BVDV，牛RSウイルスおよび牛コ

© The Ito Foundation

ロナウイルスのPCR検査を実施した結果，No.７を除く個体からBVDV遺伝子が検出された（**Table 1**）。No.７からは牛RSウイルスが検出された。また，No.６およびNo.９ではBVDV遺伝子と牛RSウイルス遺伝子，No.１からはBVDV遺伝子と牛コロナウイルス遺伝子がともに検出された。さらに，No.８からはBVDV遺伝子および牛RSウイルス遺伝子に加えて牛コロナウイルス遺伝子が

Table 1　PCR of BVDV, BRSV and BCV

Sample No.	Breed	Sex	Age (months)	Samples	Virus		
					BVDV	BRSV	BCV
No.1	Holstein	Male	1	Nasopharyngeal swab	+	−	±
				NALT	+	−	−
				Lung	+	−	−
No.2	Holstein	Female	3	Nasopharyngeal swab	+	−	−
				NALT	+	−	−
				Lung	+	−	−
No.3	Holstein	Female	5	Nasopharyngeal swab	+	−	−
				NALT	+	−	−
				Lung	+	−	−
No.4	Japanese black	Male	3	Nasopharyngeal swab	−	−	−
				NALT	±	−	−
				Lung	±	−	−
No.5	Japanese black	Female	2	Nasopharyngeal swab	−	−	−
				NALT	±	−	−
				Lung	±	−	−
No.6	Japanese black	Female	4	Nasopharyngeal swab	−	−	−
				NALT	±	±	−
				Lung	±	−	−
No.7	Japanese black	Male	8	Nasopharyngeal swab	−	−	−
				NALT	−	+	−
				Lung	−	−	−
No.8	Japanese black	Female	18	Nasopharyngeal swab	−	−	+
				NALT	±	+	+
				Lung	±	−	+
No.9	Japanese black	Male	6	Nasopharyngeal swab	−	+	−
				NALT	±	+	−
				Lung	+	−	−

BVDV：Bovine viral diarrhea virus, BRSV：Bovine respiratory syncytial virus, BCV：Bovine corona virus
+：Detected,　±：Weak,　−：Not detected

© The Ito Foundation

Table 2　Quantitative PCR of BVDV-1 and BVDV-2

Sample No.	BVDV-1 qPCR（copies/μl）				BVDV-2 qPCR（copies/μl）			
	NALT	Lung	Pulmonary lymph node	Spleen	NALT	Lung	Pulmonary lymph node	Spleen
No.1	−	−	$<1.0\times10^{1}$	−	2.1×10^{4}	8.5×10^{4}	1.9×10^{4}	6.6×10^{3}
No.2	8.9×10^{4}	3.4×10^{4}	1.2×10^{5}	4.2×10^{5}	−	−	−	−
No.3	1.2×10^{6}	4.0×10^{5}	8.6×10^{6}	4.8×10^{5}	−	−	−	−

− : Negative

検出された。No. 1 の牛コロナウイルスを除くすべてのウイルス検出症例において，NALTから牛呼吸器関連ウイルス遺伝子が検出されており，NALTにウイルスが存在することが示された。

3.2　リアルタイムPCR法によるBVDVのウイルス量の測定

PCR検査においてBVDVが検出された症例のうち，No. 1 ～No. 3 のNALT，肺，肺門リンパ節および脾臓のリアルタイムPCRを実施した（**Table 2**）。No. 1 ではBVDV Ⅱ 型が検出され，NALTにおけるウイルス量は2.1×10^{4}copies/μlであった。No. 2 およびNo. 3 では，いずれもBVDV Ⅰ 型が検出され，NALTにおけるウイルス量はそれぞれ8.9×10^{4}copies/μl，1.2×10^{6}copies/μlであった。NALTにおけるウイルス量は，肺，肺門リンパ節および脾臓のウイルス量とおおむね同程度である一方で，No. 1 の肺門リンパ節および脾臓，No. 2 の肺，No. 3 の肺および脾臓のウイルス量を上回る結果となった。BVDVの感受性細胞としては，リンパ球，マクロファージなどがあげられ，BVDVはリンパ組織内で増殖して免疫機構に影響し，免疫抑制に寄与すると考えられている[6]。本研究では，NALT組織内に肺門リンパ節や脾臓と同程度あるいはそれ以上の量のBVDVが検出されたことから，BVDVがNALTで増殖することにより，局所免疫機構が抑制される可能性がある。

3.3　細菌検査

No. 4 ～No. 9 の鼻咽頭ぬぐい液および肺を用いて細菌の分離・同定を行った結果，No. 7 以外のすべての個体から*M. bovis*が検出された。その他，No. 7 では*Moraxella* sp.，No. 8 では*Pseudomonas aeruginosa*，No. 9 では*Trueperella pyogenes*および*Streptococcus suis*が検出された（**Table 3**）。鼻咽頭ぬぐい液と肺で同種の細菌が検出されたことから，鼻咽腔内で増殖した細菌が吸気によって肺に移動し，細菌性肺炎を引き起こすことが推測された。

3.4　*M. bovis*陽性牛の病理組織学的検査およびISH法の確立

*M. bovis*が検出されたNo. 4 ～No. 6，No. 8 およびNo. 9 の肺の病理組織学的検査では，細気管支腔内に好中球を主とした炎症細胞浸潤が観察された（**Fig. 1A**）。また，結合組織に囲繞された好中球およびマクロファージ浸潤を伴う壊死巣が認められた（**Fig. 1B**）。NALTでは，多列繊毛上皮細胞に覆われた濾胞および陰窩構造がみられ（**Fig. 1C**），陰窩内腔には壊死細胞が観察された（**Fig. 1D**）。NALTの上皮細胞が陥入する領域においては，好中球およびマクロファージの浸潤および杯細胞の過形成が認められた（**Fig. 1E**）。また，リンパ濾胞の一部に凝固壊死がみられ，近傍に出血が観察された（**Fig. 1F**）。気管支および細気管支への好中球浸潤および特徴的な壊死巣の形成は*M. bovis*感染による肺炎の特徴所見である[1]。No. 4 ～No. 6，No. 8 およびNo. 9 の肺においても，同様の壊死性化膿性気管支肺炎がみられ，典型的な*M. bovis*感染病変を呈していた。さらに，No. 4 ～No. 6，No. 8 およびNo. 9 のNALT

© The Ito Foundation

Table 3　Bacterial isolation

Sample No.	Samples	Bacterial isolation				
		Mycoplasma bovis	*Pasteurella multocida*	*Histophilus somni*	*Mannheimia haemolytica*	Others
No.4	Nasopharyngeal swab	+	−	−	+	−
	Lung	+	−	−	+	−
No.5	Nasopharyngeal swab	+	−	−	−	−
	Lung	+	−	−	−	−
No.6	Nasopharyngeal swab	+	−	−	−	−
	Lung	+	−	−	−	−
No.7	Nasopharyngeal swab	−	−	−	−	+ a
	Lung	−	−	−	−	+ a
No.8	Nasopharyngeal swab	+	−	−	−	+ b
	Lung	+	−	−	−	+ b
No.9	Nasopharyngeal swab	+	−	−	−	+ c. d
	Lung	+	−	−	−	+ c. d

＋：Positive，－：Negative

a：*Moraxella* sp.，b：*Pseudomonas aeruginosa*，c：*Trueperella pyogenes*，d：*Streptococcus suis*

においても陰窩内腔への好中球浸潤および壊死巣の形成がみられたことから，*M. bovis*感染によって，NALTにおいても肺と同様の病変を形成することが示された。

本研究において開発した*M. bovis*プローブの特異性を確認するため，RNaseによる前処理を行った標本および*M. bovis*以外の細菌によって形成された化膿病変を有する標本に対してISHを行ったところ陰性となった。また，ジゴキシゲニン（DIG）抗体を使用してDIGプローブおよび100倍量の蛍光プローブの競合試験を行った結果，陽性シグナルが減弱した。以上の対照実験により，本プローブを用いたISH法の高い特異性が示された。

上述の*M. bovis*プローブを用いたISH法を，No. 4～No. 6，No. 8およびNo. 9の肺およびNALTの切片を用いて実施したところ，肺の細気管支上皮の頂端部および炎症細胞の細胞質，肺の壊死領域では，びまん性に*M. bovis*陽性シグナルが認められた（**Fig. 2A**，**2B**）。NALTでは，NALT被蓋上皮の頂端部および濾胞の壊死領域の境界においても*M. bovis*陽性シグナルが観察された（**Fig. 2C**，**2D**）。また，上皮細胞が陥入する領域および陰窩腔内に*M. bovis*陽性シグナルを有するマクロファージがみられた（**Fig. 2E**）。*M. bovis*はリンパ球のアポトーシス，リンパ球増殖反応の抑制，好中球の機能不全を起こすことが知られている[1)]。No. 4～No. 6，No. 8およびNo. 9の肺およびNALTにおいて，*M. bovis*陽性シグナルを有する炎症細胞がみられたことにより，*M. bovis*が炎症細胞に存在することが確認され，アポトーシスや増殖反応抑制ならびに機能不全などの免疫機構の抑制をもたらすことが推察された。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，粘膜免疫システムにおける抗原門戸細胞として機能している。NALTの

© The Ito Foundation

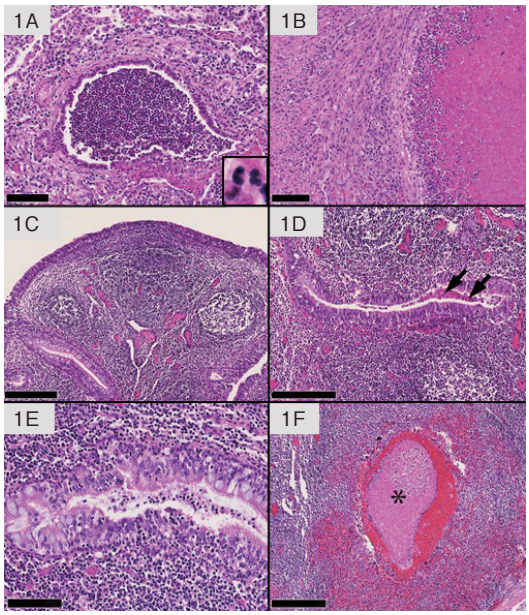

Fig. 1

1A）Lung（No.8), a bronchiole containing inflammatory cells infiltrate, mainly neutrophils, in its lumen. Inset; neutrophil cells. Hematoxylin and eosin（HE). Bar＝100 μm.

1B）Lung（No.9), an area of pulmonary necrosis surrounded by connective tissue capsule infiltrated by mononuclear inflammatory cells. HE. Bar＝100 μm.

1C）NALT（No.4), the lymphoid follicles, crypts and the covering epithelium can be seen. HE. Bar＝250 μm.

1D）NALT（No.4), the crypts showing necrotic cells in their lumen（arrows). HE. Bar＝250 μm.

1E）NALT（No.5), goblet cells hyperplasia and inflammatory cell infiltrate of neutrophils and macrophages in the epithelial invagination are observed. HE. Bar＝100 μm.

1F）NALT（No.6), a coagulative necrosis（astarisk）surrounded by haemorrhage can be seen within the lymphoid follicle. HE. Bar＝100 μm.

被蓋上皮の頂端部においても*M. bovis*陽性シグナルが認められたことから，*M. bovis*がM細胞を介して侵入する可能性が示唆された。さらに，NALTの陰窩内腔および壊死巣に*M. bovis*陽性シグナルが観察されたことから，*M. bovis*がNALTに病変を形成し，局所免疫機構の抑制に影響を与えていると考えられた。

4．要　約

我が国の肉用牛および乳牛における呼吸器病の発生頻度は高く，呼吸器病としてはBRDCが広く知られている。本研究は，牛のNALTにおけるBVDVを中心とした牛呼吸器関連ウイルスの存在について調べるとともに，*M. bovis*による病変の病理組織学的検索を行うこと，ならびに*M. bovis*の増殖を組織上で可視化させる低廉な検出系を確立することを目的とした。牛呼吸器関連ウイルスのPCR検査では，９例中８例でNALTにおいてもBVDV遺伝子が検出された。リアルタイムPCR法では，NALT組織内に肺門リンパ節や脾臓と同程度あるいはそれ以上の量のBVDVが検出されたことから，BVDVがNALTで増殖することにより，

© The Ito Foundation

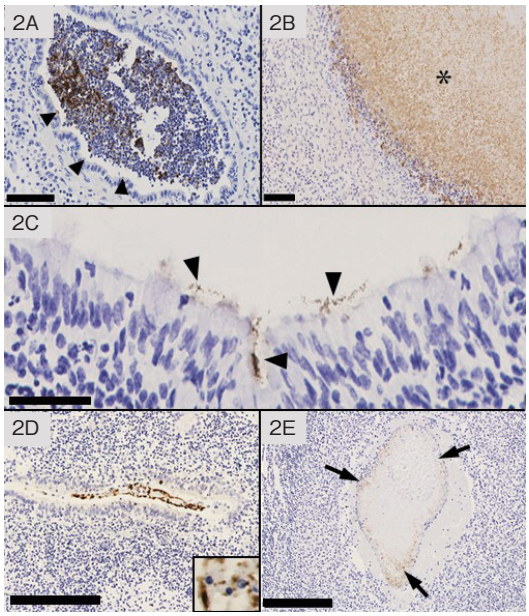

Fig. 2

2A）Lung（No.8），*M.bovis* signals can be observed on the apical border of the bronchiolar epithelium（arrow heads）and in the cytoplasm of inflammatory cells. *in situ* hybridization（ISH）. Bar＝100 μm.

2B）Lung（No.8），ISH, *M.bovis* positive reaction can be seen diffusely in the necrotic areas（astarisk）. ISH. Bar＝100 μm.

2C）NALT（No.5），ISH, *M.bovis* on the apical surface of the covering epithelium（arrow heads）. ISH. Bar＝50 μm.

2D）NALT（No.4），ISH, *M.bovis* positive cells in the epithelial crypts. ISH. Bar＝250 μm. Inset; macrophages with positive cytoplasmic reaction. ISH. Bar＝250 μm.

2E）NALT（No.6），ISH, *M.bovis* positivity in the borders of the necrotic areas（arrows）of the lymphoid follicles. ISH. Bar＝250 μm.

局所免疫機構が抑制される可能性が示唆された。細菌分離・同定を行った症例については，１例を除いて*M. bovis*が検出された。*M. bovis*陽性となった症例の肺では，HE染色標本上で*M. bovis*に典型的な壊死性化膿性気管支肺炎の所見がみられ，NALTにおいても同様の病変が観察された。高感度が期待でき，配列の保存性が高い23S rRNAのドメインＶ領域より作製したプローブを用いたISH法では*M. bovis*陽性牛の肺およびNALTの炎症細胞や壊死巣に陽性所見が得られた。NALTの被蓋上皮の頂端部に*M. bovis*陽性シグナルがみられたことから，*M. bovis*がM細胞を介してNALTへ侵入する可能性が示唆された。

文　献

１）播谷亮：家畜感染症学会誌，**2**，85～97，2013.

２）滝澤亮，首藤洋三，山田美那子，中野雅功：平成23年度 大分県家畜保健衛生所ならびに畜産関係業績発表会集録，2011.

３）Mohit Baxi, Dorothy McRae, Shailja Baxi, Irene Greiser-Wilke, Stefan Vilcek, Kingsley Amoako, Dirk Deregt：*Veterinary Microbiology*，116(1-3)，37～44，2006.

４）小池新平，宇佐美佳秀：日本獣医師会雑誌，**64**，45～49，2011.

５）塚本悠，斎藤寿一：東ソー研究・技術報告，**62**，99～102，2018.

６）Qi, Shuhui, Lijing Wo, Chao Sun, Juan Zhang, Quanhai Pang, Xin Yin：*Viruses*，**14**，10，2022.

© 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（Ⅱ）

Epidemiological survey of porcine coronavirus-infection in Japanese wild boars（Ⅱ）

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）, transmissible gastroenteritis virus（TGEV）and porcine deltacoronavirus（PDCoV）cause a big economic loss because of the high level of pathogenicity for swine. Recently, PDCoV infection in human was reported, suggesting that PDCoV could be a zoonotic pathogen. Thus, the porcine coronaviruses sporadically emerge to swine and human from unknown routes. To identify the transmission routes of them should be useful information for control of the swine coronavirus diseases in domestic pigs and zoonotic transmission of porcine coronaviruses. Here, we conducted molecular surveys for PEDV, TGEV and PDCoV among wild boars in Gifu Prefecture, Japan. Additionally, we examined the prevalence of paramyxoviruses, which cause various diseases in animals. As a result, we did not detect viral genes of porcine coronaviruses from tonsil and spleen specimens of the wild boars by RT-PCR. Interestingly, by using pan-paramyxovirus/pneumovirus primers, we detected viral genes of canine distemper virus（CDV）, but not other paramyxoviruses. These suggest that 1）wild boars in Gifu Prefecture should not play a role as major transmitters of the porcine coronaviruses, 2）they also should not maintain viruses belonging to paramyxoviridae/pneumoviridae with a high level of pathogenicity in porcine, as like Nipahvirus, 3）they may play a role as transmitters of the CDV. These knowledges will contribute to understanding of the ecology of porcine coronaviruses and CDV.

1．目　　的

昨今の豚熱の流行やアフリカ豚熱の世界的流行が示すように，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。実際に本州のイノシシに豚熱ウイルスが蔓延しており，本

© The Ito Foundation

ウイルスに感染したイノシシの報告は山口県から岩手県に及ぶ。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と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（PEDV）や豚伝染性胃腸炎ウイルス（TGEV）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，PEDVを原因とする哺乳豚の死亡は，2013-15年のみで約10億円の経済被害をもたらした[1)]。また，TGEV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)]。

また最近，ハイチにおいて豚デルタコロナウイルス（PDCoV）が小児らに感染し，インフルエンザ様症状を示した事例が報告された[3)]。本報告によりPDCoVが人に感染し得ることが示され，人獣共通感染症としてのPDCoVの感染経路，自然宿主あるいは伝播動物の特定が急がれている。

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，公衆衛生学的ならびに家畜衛生学的に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PEDV，TGEVおよびPDCoVの感染実態を調査した。また，研究開始時に計画していたPRRSウイルスに対する調査については，北村ら[4)]によるイノシシ由来の同サンプルを用いた調査報告を受け計画を変更し，豚に致死的な感染症を引き起こし，さらに人獣共通感染症を引き起こすニパウイルスなどが含まれるパラミクソウイルス科ウイルスとニューモウイルス科ウイルスの保有状況をpan-paramyxovirus検出用プライマーを用いて調査することとした。これらウイルス性感染症媒介

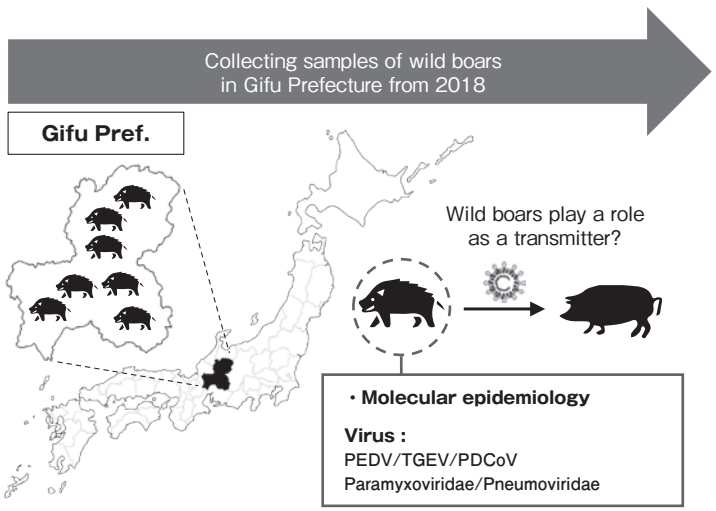

Fig. 1　Overview of the current study
PEDV, porcine epidemic diarrhea virus ; TGEV, transmissible gastroenteritis virus ; PDCoV, porcine deltacoronavirus

© The Ito Foundation

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およびパラミクソウイルス・ニューモ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[2,5]，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（報告書作成時点　血清1281サンプル，扁桃乳剤551サンプル，脾臓401サンプル），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　イノシシ由来検体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PEDVおよびTGEV 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。なお，PDCoVに対する分子疫学調査には，上述したようなリアルタイムPCRキットが本学の設備では応用できない。そこで，昨年度の申請課題であるPEDVとTGEVに対する分子疫学調査のために抽出したイノシシ由来RNAを用いて，PDCoVに対するRT-PCRを網羅的に実施した。なお，検出を試みる豚コロナウイルス遺伝子はＳ遺伝子とした。

2.3　イノシシ由来検体を用いたパラミクソウイルス・ニューモ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に由来するcDNAおよび血清から作製したcDNAを鋳型にTongらの報告に従い，パラミクソウイルス科ウイルス（*Respirovirus*，*Morbillivirus*，*Henipavirus*，*Avulavirus*，*Rubulavirus*）およびニューモウイルス科ウイルスを検出可能なプライマーを用いてsemi-nested RT-PCRを実施した[6]。本semi-nested RT-PCRは保存性の高いＬ遺伝子を標的としており，パラミクソウイルス科およびニューモウイルス科のウイルス遺伝子の存在をスクリーニングする目的で実施した。Ｌ遺伝子の存在が認められたサンプルについては，増幅されたＬ遺伝子断片の遺伝子配列を決定し，BLAST解析を実施した。本BLAST解析の結果，最も相同率の高い既知のウイルス配列より，ＦおよびＨ遺伝子を増幅するためのプライマーを設計し，両ウイルス遺伝子の全長をnested RT-PCRにより検出する

© The Ito Foundation

ことを試みた。

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

昨年度に引き続き，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を実施した。上述した方法にて処理した血清1281サンプル，扁桃乳剤551サンプル，脾臓401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　イノシシ由来検体からの豚コロナウイルス遺伝子の検出

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。これらの結果より，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された。

次に，VetMAX PEDV/TGEV KitよりPEDV遺伝子の存在が示唆されたcDNAより，PEDV N遺伝子およびS遺伝子の検出を試みたものの，両遺伝子の増幅には至らなかった。なお，作製したすべてのcDNAよりPEDV，TGEV，PDCoVのN遺伝子およびS遺伝子の検出を試みたものの遺伝子検出には至らなかった。

残念ながら本研究では，イノシシ由来cDNAから豚コロナウイルス遺伝子を増幅することはできなかった。したがって，VetMAX PEDV/TGEV Kitが豚コロナウイルス遺伝子を非特異的に検出した可能性については否定できない。一方，豚コロナウイルスのいずれの遺伝子にプローブが結合しているのか明らかにされていない。したがって，プローブが結合するウイルス遺伝子は存在する一方，RT-PCR用のプライマーがウイルス遺伝子に結合していないため，ウイルス遺伝子が増幅されなかったことが考えられた。また，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[5]，TGEVとPDCoVについては豚での体内動態の詳細が報告されていない。したがって，TGEVとPDCoVは感染個体内におけるウイルス動態がPEDVと異なる可能性が考えられた。現在，豚熱の蔓延によりサンプリングが困難であるものの，イノシシの糞便サンプルより豚コロナウイルスの検出を試みることで，イノシシが保有する豚コロナウイルスの存在を明らかにできる可能性が考えられた。

3.3　イノシシ由来検体からのパラミクソウイルス・ニューモウイルス遺伝子の検出

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サンプル中のパラミクソウイルス科ウイルス（*Respirovirus*，*Morbillivirus*，*Henipavirus*，*Avulavirus*，*Rubulavirus*）およびニューモウイルス科ウイルスの検出を試みた。その結果，*Morbillivirus*遺伝子が脾臓乳剤10サンプルおよび扁桃乳剤13サンプルにおいて陽性を示した。一方，他のパラミクソウイルス科ウイルスおよびニューモウイルス科ウイルスの遺伝子は検出されなかった。増幅されたL遺伝子の塩基配列情報をBLAST解析した結果，検出された*Morbillivirus*はすべて犬ジステンパーウイルス（CDV）であることが明らかとなった。CDVのL遺伝子が検出された全23サンプルより，F遺伝子およびH遺伝子の検出を試みた結果，２サンプルより両遺伝子全長の増幅が確認された。現在，F遺伝子およ

© The Ito Foundation

びH遺伝子の全長配列を決定中である。

CDVを含めたパラミクソウイルスは樹状細胞などの免疫担当細胞に感染することが知られている[7]。今回の調査検体であるイノシシの脾臓と扁桃といった二次リンパ組織には豊富な免疫担当細胞が存在していたと考えられ，CDV感染免疫担当細胞よりウイルス遺伝子が検出されたことが考えられた。また，これまでに日本の野生イノシシ血清からCDVの感染を支持する結果が報告されている[8]。その一方，日本と海外を含めたイノシシから実際にCDVウイルス遺伝子の検出がなされた報告は我々の知る限り存在しない。よって本知見は，CDVの宿主域を考察するうえできわめて重要な遺伝子情報となる可能性を秘めている。

3.4　今後の展望

イノシシの脾臓と扁桃を用いた本調査ではPEDV，TGEVおよびPDCoVの遺伝子を増幅し遺伝子解析することは叶わなかった。一方で本調査結果は，日本のイノシシにこれら豚コロナウイルスが蔓延していないことを示唆している。すなわち，イノシシはこれら豚コロナウイルスの伝播者として積極的な役割を果たしていない可能性が考えられた。また，ジビエとしてもヒトの口に運ばれる食材としてのイノシシの安全性を支持する結果でもあると考えられた。

現在，VetMAX PEDV/TGEV KitよりPEDVの遺伝子の存在が示されたサンプルより，さまざまなプライマーを使ってPEDVのS遺伝子配列の検出を試みている。また，サンプル数も増やして調査を継続中である。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。

豚やヒトに重篤な感染症を引き起こすウイルスを含むパラミクソウイルス科ウイルスおよびニューモウイルス科ウイルスの分子疫学調査をイノシシ由来検体より実施した結果，CDVを検出することに成功した。また，ニパウイルスなどの豚とヒトに重篤な感染症を引き起こす病原体は検出されなかった。CDV遺伝子をイノシシから実際に検出した報告はなく，今回の調査により同定されるCDVの遺伝子情報は，本ウイルスの宿主域を考察するうえで重要な基盤情報になる。

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，日本のイノシシは豚コロナウイルスの伝播者として積極的な役割を果たしていない可能性が示唆された。一方，昨年度実施したPEDVおよびTGEVに対する血清疫学調査では，高い両ウイルスの抗体陽性率を示している。分子疫学と血清疫学の調査結果の違いについては今後の検討課題となったものの，イノシシが積極的に豚コロナウイルスを豚へ伝播する可能性は低いことが考察された。また，日本のイノシシはニパウイルスなどの豚やヒトへ重篤な症状を示すパラミクソウイルスを保有していない一方，CDVに一定の割合で感染していることが明らかになった。CDVは豚に対して重篤な病態を示すことは報告されていないものの，本ウイルスの宿主域を考察するうえできわめて重要な知見を得ることができた。

© The Ito Foundation

以上，養豚家に対し「イノシシが豚コロナウイルスを積極的に伝播する存在とは考えにくい」「日本のイノシシがニパウイルスなど豚に重篤な感染症を引き起こすパラミクソウイルスを保有している可能性は低い」「低率ながらイノシシがCDVを保持している」ということを示すことができた。本調査結果が，ウイルスの生態理解および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ことを期待したい。

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**, e313492-e313499, 2020.

2） 中川敬介：豚のコロナウイルス感染症，All about SWINE　**59**, 29～37, 2021.

3） Lednicky, J. A., Tagliamonte, M. S., White, S. K., Elbadry, M. A., Alam, M. M., Stephenson, C. J., Bonny, T. S., Loeb, J. C., Telisma, T., Chavannes, S., Ostrov, D. A., Mavian, C., Beau De Rochars, V. M., Salemi, M., Morris, J. G. Jr.：Independent infections of porcine deltacoronavirus among Haitian children, *Nature*, **600**, 133～137, 2021.

4） Kitamura, Y., Saito, T., Tanaka, E., Takashima, Y.：A serological survey of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in wild boar in Gifu Prefecture, Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, **84**, 1406～1409, 2022.

5） Park, J. E., Shin, H. J.：Porcine epidemic diarrhea virus infects and replicates in porcine alveolar macrophages, *Virus Res*, **191**, 143～152, 2014.

6） Tong, S., Chern, S. W., Li, Y., Pallansch, M. A., Anderson, L. J.：Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses, *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 2652～2658, 2008.

7） Parks, G. D., Alexander-Miller, M. A.：Paramyxovirus activation and inhibition of innate immune responses, *J Mol Biol*, **425**, 4872～4892, 2013.

8） Suzuki, J., Nishio, Y., Kameo, Y., Terada, Y., Kuwata, R., Shimoda, H., Suzuki, K., Maeda, K.：Canien distemper virus infection among wildlife before and after the epidemic, *J Vet Med Sci*, **77**, 1457～1463, 2015.

© The Ito Foundation

ウシRSウイルス研究に最適な細胞株の樹立

Generation of a cell line suitable for research of bovine RS virus

齊　藤　　暁
（宮崎大学農学部）

Akatsuki Saito
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Infection with bovine respiratory syncytial virus (BRSV), a member of *Pneumoviridae*, is a major cause of pneumonia in calves, and it can induce secondary bacterial infections, leading to severer symptoms. Despite its importance, isolation of BRSV from clinical samples is sometimes difficult, hampering the advance of BRSV research.

While cell-surface heparan sulfate is the primary receptor for human RSV, human CX3CR1 was identified as an important surface molecule for human RSV infection in airway epithelial cells. Since the role of bovine CX3CR1 on the infection by BRSV remains unknown, we aimed to test whether a bovine-derived cell line expressing bovine CX3CR1 shows increased susceptibility to BRSV infection. To this end, we generated a cell line expressing the CX3CR1 molecule using an HIV-1-derived lentiviral vector in *Trim5* knockout MDBK cells. We succeeded in generating a stable cell line expressing CX3CR1 and found that stable expression of CX3CR1 enhanced susceptibility to BRSV infection. This finding suggests that stable expression of CX3CR1 is a promising way to generate a cell line with higher susceptibility to BRSV infection.

1．目　　的

本研究では，特に子牛生産現場で大きな問題となっているウシRSウイルスの分離に最適な細胞株を樹立することを目的とした。ウシRSウイルスはニューモウイルス科に属するRNAウイルスで，特に子牛の呼吸器感染症の原因の主要なウイルスである。ウシRSウイルスそのものによる感染のみならず，ウイルス感染後に細菌感染症への感受性が亢進することで，細菌による二次感染で子牛の健康状態が悪化し，成長率の低下，経済性の低下，場合によっては死亡につながるケースも多い。ウシRSウイルスの感染制御は畜産現場できわめて重要な課題であるが，ウシRSウイルスの分離が容易ではないケースがあるという課題がある。

ヒトRSウイルスにおいては，主要レセプターはヘパラン硫酸であると考えられているが[1,2]，呼吸器上皮細胞におけるレセプターとしてCX3CR1が同定されている[3,4]。一方で，ウシRSウイルスが同様にCX3CR1を用いるかについては明らかとなっていない。そこで本研究では，ウシ

© The Ito Foundation

由来MDBK細胞にウシCX3CR1を持続発現させることで，ウシRSウイルスの基礎研究の推進，臨床現場でのウイルス分離効率向上を目的とした。手法としてCX3CR1をウシ細胞に発現させる方法として長期安定発現のためHIV由来レンチウイルスベクターを用いることとした。ところが，ウシ細胞ではTRIM5という抗HIV宿主因子が発現されており，HIV由来レンチウイルスベクターの感染効率が著しく低下する。私たちはこれまでに，CRISPR/Cas9法で*Trim5*遺伝子を欠損させたウシ由来MDBK細胞を作成している[5]。本研究では，*Trim5*欠損MDBK細胞を用いることで，ウシCX3CR1発現細胞の作成とその評価に取り組んだ。

２．方　法

2.1　プラスミド

psPAX2（カタログ番号12260；http：//n2t.net/addgene:12260；RRID：Addgene_12260）およびpMD2.G（カタログ番号12259；http://n2t.net/addgene：12259；RRID：Addgene_12259）は，Didier Trono博士（ローザンヌ大学）から分与を受けた。

2.2　細胞培養

Lenti-X 293 T（TaKaRa，カタログ番号Z2180N），MDBK（Japanese Collection of Research Bioresources Cell Bank（JCRB），カタログ番号IFO50014）は10％ウシ胎児血清および１×ペニシリン-ストレプトマイシン（ナカライテスク，カタログ番号09367-34）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（ナカライテスク，カタログ番号08458-16）で培養した。

2.3　ウシCX3CR1発現用ウイルスベクターの作成

Opti-MEMに，bCX3CR1をコードするpLVSIN-CMVプラスミド（pLVSIN-CMV-bCX3CR1），psPAX2-IN/HiBiTプラスミド，pMD2.Gプラスミド，TransIT-293トランスフェクション試薬を混和し，Lenti-X 293T細胞にトランスフェクトした。トランスフェクションの２日後に上清を濾過し，ウイルスベクターを回収した。

2.4　CX3CR1持続発現細胞の作成

2.3で作成したbCX3CR1発現ベクターを*Trim5*ノックアウトMDBK細胞に感染させた。細胞をハイグロマイシン含有培地で６日間培養した後，限界希釈法を使用して単一細胞クローン化した。各クローンは，リアタイムRT-PCRにより*Cx3cr1* mRNA発現量を測定することによってその特性を確認した。

2.5　CX3CR1持続発現細胞におけるウシRSウイルス感受性の評価

CX3CR1持続発現細胞を96ウェルプレートに播種した。一晩培養した後，細胞を２倍段階希釈したウシRSウイルス（京都微研，牛RSウイルス感染症生ワクチン（シード））に感染させた。翌日培地を取り除き，培地で洗浄した後，新しい培地を加えた。感染から４日後，上清中のウイルス量をリアルタイムRT-PCRで測定した。PCRプロトコルは，95℃で５秒間，60℃で34秒間を40サイクルで設定した。

３．結果と考察

まず，ヒトCX3CR1配列とウシCX3CR1配列の相同性を調べた。Expasy（https://web.expasy.org/sim/）における計算では，ヒトCX3CR1とウシCX3CR1のidentityは81.0％であった（**Fig. 1**）。人工合成したウシCX3CR1のcDNAをレンチウイルスベクターに挿入し，シークエンスを確認した。同プラスミドを用いてレンチウイルスベクターを調整し，MDBK細胞に感染させた。２日後に細胞を回収し，ハイグロマイシンにより遺伝子導入細胞の選択を行った。その後，限界希釈法

© The Ito Foundation

による単細胞クローニングを行った。得られた30クローン以上のうち，12クローンを性状評価に用いた。

ヒトCX3CR1に対する抗体ではウシCX3CR1を検出できなかったため，ウシCX3CR1のmRNA発現量をリアルタイムRT-PCRで測定することにより評価することにした。複数クローンの評価の結果，クローン#１，クローン#６，クローン#９，クローン#10で有意に発現量の上昇が認められた（**Fig. 2**）。

そこで，クローン#１，クローン#６，クローン#９を用いて，ウシRSウイルス感染感受性を調べることとした。実験にはウシRSウイルスのワクチン株を用い，ウイルス液の原液を２倍，４倍，８倍と２倍段階希釈した上で細胞に感染させた。その結果，コントロール細胞では２倍希釈のウイルスまでしか増幅できなかったことに対して，クローン#１，クローン#６，クローン#９ではさらに高い倍率で希釈したウイルスについても増幅することができた（**Fig. 3**）。このことは，CX3CR1の恒常発現がウシRSウイルス感染感受性の向上につながることを示唆している。

```
Domain: Data
hsCX3CR1  - M D Q F P E S V T E N F E Y D D L A E A C Y I G D I V V F G T V F L S I F Y S V I F A I G L V G N [ 50]
bCx3CR1   M H T T L . . . T S . . . . . Y . . . . . D M . . . . A L . . . . V V . L . . L V . . F . . . . . [ 50]

hsCX3CR1  L L V V F A L T N S K K P K S V T D I Y L L N L A L S D L L F V A T L P F W T H Y L I N E K G L H N [100]
bCx3CR1   . . . . . I . . Q R S . . I . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . V . . . Q . . . H [100]

hsCX3CR1  A M C K F T T A F F F I G F F G S I F F I T V I S I D R Y L A I V L A A N S M N N R T V Q H G V T I [150]
bCx3CR1   . T . . L I . . . . . G . . . . . V . . F . . . . . . . . S . . . . . T [150]

hsCX3CR1  S L G V W A A A I L V A A P Q F M F T K Q K E N E C L G D Y P E V L Q E I W P V L R N V E T N F L G [200]
bCx3CR1   . . . . . T . . . . . R E . . . . . F . . . . . I . . . . . I L . T . I . . . . [200]

hsCX3CR1  F L L P L L I M S Y C Y F R I I Q T L F S C K N H K K A K A I K L I L L V V I V F F L F W T P Y N V [250]
bCx3CR1   . . . . . M . . . . . R . . F . . . V . . . . . . . . . . . . [250]

hsCX3CR1  M I F L E T L K L Y D F F P S C D M R K D L R L A L S V T E T V A F S H C C L N P L I Y A F A G E K [300]
bCx3CR1   . . . . Q . . N . . . . . . K . . V K R . . K . . I . . . . . I . . . . . . . . . . . . . . . . [300]

hsCX3CR1  F R R Y L Y H L Y G K C L A V L C G R S V H V D F S S - - S E S Q R S R H G S V L S S N F T Y H T S [350]
bCx3CR1   . . . . . R . . R . . . . . C H P D . L S . . . S L . . . . . R E . . . . . H Y . . [350]

hsCX3CR1  D G D A L L L L * [359]
bCx3CR1   . . . . S I . . . [359]
```

Fig. 1　Alignment between human CX3CR1（hsCX3CR1）and bovine CX3CR1（bCX3CR1）

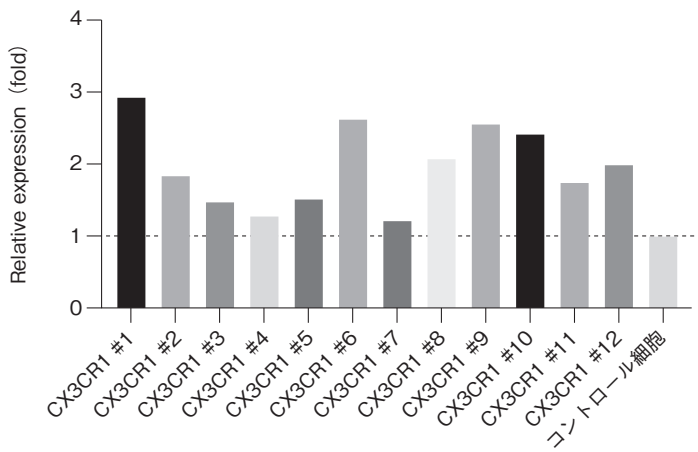

Fig. 2　Expression level of Cx3cr1 mRNA in MDBK clones

© The Ito Foundation

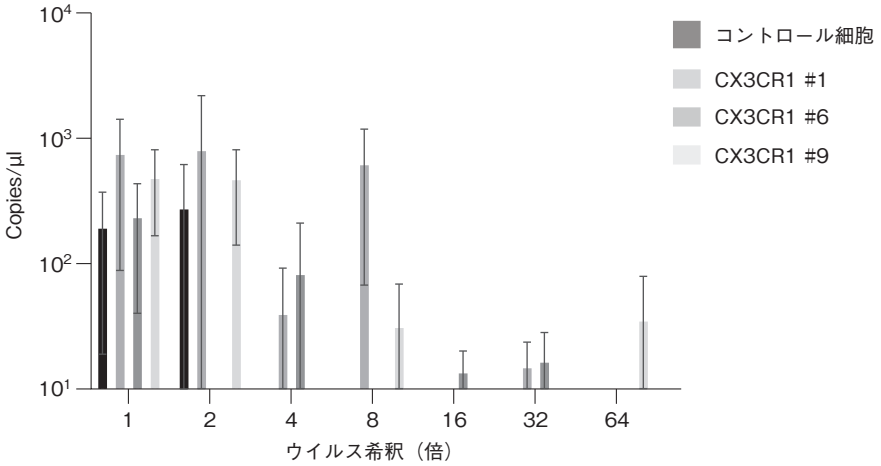

Fig. 3　Stable expression of CX3CR1 enhanced susceptibility to BRSV infection

以上の結果から，ウシCX3CR1を発現させることで，ウシRSウイルスの分離効率向上が期待できる結果が得られた。現在，ヒトRSウイルスとウシRSウイルスのシュードタイプウイルス（ウシRSウイルスのＦタンパク質，Ｇタンパク質で被覆されたレンチウイルスベクター）の作成を進めており，これらを用いることでより詳細にウシRSウイルス感染におけるCX3CR1分子の役割を明らかにしたいと考えている。今後も実験系の最適化を進め，ウシRSウイルス感染症の制御に貢献していきたい。

４．要　　約

ウシRSウイルスはニューモウイルス科に属するRNAウイルスで，子牛の呼吸器感染症の原因の主要なウイルスである。特に細菌による二次感染が子牛に大きな健康被害をもたらす。そのため，ウシRSウイルスの分離や研究は重要な課題であるが，臨床検体からのウシRSウイルスの分離は時に容易でない。ヒトRSウイルスにおいては，主要レセプターであるヘパラン硫酸に加えて，呼吸器上皮細胞におけるレセプターとしてCX3CRlが同定されている一方，ウシRSウイルスが同様にCX3CR1を用いるかについては明らかとなっていない。そこで本研究では，ウシRSウイルス感染におけるCX3CRlの機能的意義の解明を目的とした。本研究では，これまで私たちが作成した*Trim5*ノックアウト細胞を用いることで、効率よくウシCX3CRlを恒常発現する細胞の樹立に成功した。また，ウシCX3CRl恒常発現細胞においてはウシRSウイルスへの感受性が向上する結果を得た。これらの結果から，ウシRSウイルス制御に向け，ウシCX3CR1を持続発現させた細胞の有用性が示唆された。

文　　献

1）　Krusat, T., Streckert, H. J.：Heparin-dependent attachment of respiratory syncytial virus（RSV）to host cells, *Arch Virol*, 142(6), 1247～54, 1997.
2）　Hallak, L. K., Collins, P. L., Knudson, W., Peeples, M. E.：Iduronic acid-containing glycosaminoglycans on target cells are required for efficient respiratory syncytial virus infection, *Virology*, 271(2), 264～275, 2000.
3）　Chirkova, T., Lin, S., Oomens, A. G. P., Gaston, K. A., Boyoglu-Barnum, S., Meng, J., Stobart, C. C., Cotton, C. U., Hartert, T. V., Moore, M. L., Ziady, A. G., Anderson, L. J.：CX3CR1 is an important surface molecule for respiratory syncytial virus infection in human airway epithelial cells, *J Gen Virol*, 96(9), 2543～2556, 2015.

© The Ito Foundation

4） Johnson, S. M., McNally, B. A., Ioannidis, I., Flano, E., Teng, M. N., Oomens, A. G., Walsh, E. E., Peeples, M. E.：Respiratory Syncytial Virus Uses CX3CR1 as a Receptor on Primary Human Airway Epithelial Cultures, *PLoS Pathog*, 11；11(12), e1005318, 2015.

5） Morizako, N., Butlertanaka, E. P., Tanaka, Y. L., Shibata, H., Okabayashi, T., Mekata, H., Saito, A.：Generation of a bovine cell line for gene engineering using an HIV-1-based lentiviral vector, *Sci Rep*, 12, 16952, 2022.

© The Ito Foundation

ライフサイクルに応じたパイエル板の機能解明と制御因子の探索

Investigation of Peyer's patch function according to life cycle and exploration of its regular

古 川 睦 実・野 地 智 法
（東北大学大学院農学研究科）

Mutsumi Furukawa and Tomonori Nochi
(Graduate school of Agricultural Science, Tohoku University)

Health management is very important in livestock production. Given that the requirement of reducing the use of antimicrobial agents due to the high risk of producing drug-resistant bacteria in the world, it is essential to improve husbandry management techniques of livestock management that do not depend on antimicrobial agents. However, there are still many unexplored aspects of livestock immunity, one of which is the function and maturation mechanisms of Peyer's patches, which play an important intestinal immunity. Peyer's patches are the secondary lymphoid tissues in which immune cells, such as B and T cells, accumulate. Although two differently shaped Peyer's patches exist in the jejunum and ileum of domestic animals, the function of the ileal Peyer's patches is still unclear. In this study, to investigate how the cells constituting the Peyer's patches change with age, we performed histological analysis to investigate the localization of immune cells and milk antibodies to determine characteristics at each week of age. We found that the localization of immune cells and milk antibodies changed during the early, middle, and late stages of suckling, and that weaning also had a significant effect on immune cells. To characterize immune cells and cells constituting the ileal Peyer's patches, cells were isolated from the ileal Peyer's patches at each week of age and generated a cDNA library for each single cell. This study successfully established a technique to analyze at the single-cell level how the cells constituting the ileal Peyer's patches change with the growth of piglet.

1．目　　的

家畜生産において健康管理は非常に重要であり，また，薬剤耐性菌の問題により抗菌剤の使用量の低減が求められていることから，抗菌剤に依存しない家畜の健全育成を目的とした飼養管理技術の向上が畜産現場において必須である。しかしながら，家畜の免疫に関しては未解明な点が多く残されており，その一つとして，腸管免疫の中枢であるパイエル板の機能および成熟機序があげられる。パイエル板はＢ細胞やＴ細胞などの免疫細胞が集積した免疫臓器であり，家畜の腸管には空腸と回腸に形状が異なる２つのパイエル板が存在するが，特に回腸パイエル板の機能については不

© The Ito Foundation

明確である。申請者はこれまでに胎生期から出荷月齢のブタを経時的に解析することにより，ライフサイクルによってパイエル板の形態学的特徴が大きく変化することを見出してきた。そこで本研究では，週齢に伴ってパイエル板を構成する細胞がどのように変化するかを調べるために，各時期のパイエル板の組織学的解析，および細胞単離からシングルセル解析までに必要な条件を検討した。

2．方　法

2.1　組織染色

１週齢，２週齢，３週齢，および５週齢のブタからそれぞれ採材した回腸パイエル板を４％パラフォルムアルデヒドで一晩，固定した。固定した組織はエタノールで脱水し，トルエンに浸漬することで透徹を行った後，パラフィンで浸漬し，包埋した。また，パラフィンブロックをミクロトームで５μmに薄切し，組織切片を作製した。作製した組織切片は脱パラフィンをし，免疫組織化学染色に供した。一次抗体として，抗CD20抗体，抗IgM抗体，抗IgA抗体，抗Ki67抗体，抗MHC class Ⅱ抗体，抗S100A9抗体を用いた。染色した組織切片を蛍光顕微鏡BZ-9000（Keyence），BZ-X800（Keyence）およびデジタルカメラ付きの光学顕微鏡BX-63-DP72システム（Olympus）を用いて撮影した。

2.2　細胞単離とシングルセル解析

１週齢，２週齢，３週齢，および５週齢のブタからそれぞれ回腸パイエル板を採材し，細胞単離を行った。具体的な手順として，採材した組織は，１cm程度に切断し１mMのEDTAで攪拌しながら25分間，37℃で処理した。その後，１－２mm程度まで細かく切り，0.5mg/mlコラゲナーゼ（sigma），５U/mlのDNase（sigma）および50μMのβメルカプトエタノール（ナカライ）で攪拌しながら80分間，37℃で処理することで回腸パイエル板から細胞を単離した。さらに，40μmのセルストレイナー（FALCON）によってゴミを除去した。

回腸パイエル板から単離した細胞をVia-Probe（BD Biosciences）で染色することで，死細胞が５％以下であることを確認した。その後，細胞数を測定し，10000cell/μlになるように調整し，Chromium Controller（10x Genomics社）に供することで，調整した細胞懸濁液が単一細胞に分かれた状態で，一つ一つの細胞を識別するゲルビーズとPCR酵素が入ったエマルジョンを調整した。その後，調整したエマルジョンをインキュベーションし，反応後，精製した。さらに，cDNAを増幅し，得られたcDNAのサイズおよび濃度をバイオアナライザで確認した。加えて，得られたcDNAを最適なサイズに断片化し，A-tailingや各サンプルを識別するIndex配列を付加させ，反応後のcDNA libraryのサイズおよび濃度をバイオアナライザで測定した。

なお，本実験は東北大学実験委員会の実験承認を得て行った。

3．結果と考察

3.1　各免疫細胞および抗体の局在

まず，パイエル板に最も多く存在するＢ細胞について，CD20（B細胞マーカー）とIgM（B細胞受容体）の局在を免疫組織化学染色で確認した。その結果，Ｂ細胞が集積している濾胞のサイズは，週齢に伴って拡大していた。また，IgMについては，すべての週齢において濾胞の中心部では発現が強く，一方で辺縁部では発現が弱いといったように，濾胞内でのIgM発現の強弱による局在が生じていた。

哺乳期間には，乳汁内に含まれる抗体が腸管管腔内に流入する。次に，それらの抗体が腸管組織内に取り込まれているのかを明らかにするため

© The Ito Foundation

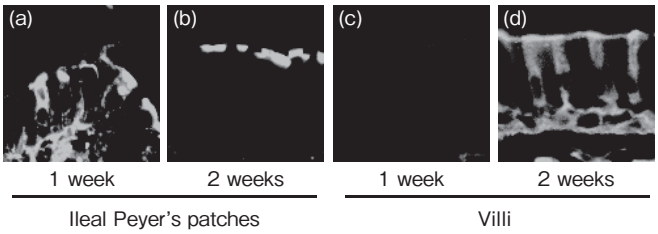

Fig. 1　The spots of IgA uptake changed with age in weeks.
IgA was taken up from FAEs, the epithelial cells of the ileal Peyer's patches at 1 week (a), but not at 2 weeks (b). On the other hand, epithelial cells in the villi didn't take in IgA at 1 week (c), but did at 2 weeks (d).

に，IgAの局在を調べた。その結果，乳汁IgAは１週齢では回腸パイエル板の濾胞随伴上皮細胞（FAE）から，２週齢では絨毛の上皮細胞から組織内に取り込まれている様子が確認された（**Fig. 1**）。一方，離乳前（３週齢）ではほとんど乳汁IgAは取り込まれておらず，子の腸管免疫発達に伴い乳汁IgAの取り込みは変化しているといえた。このことから，乳汁IgAは週齢によって異なる部位に働きかけることにより，免疫を発達させていることが考えられ，常乳に含まれる乳汁IgAには，通説である病原体の直接的な排除[1]に加えて，子の免疫発達機序を制御していることが類推された。

さらに，回腸パイエル板における細胞増殖について，Ki67をマーカーとして確認したところ，すべての週齢でKi67陽性の増殖細胞の集積が濾胞領域でみられ，特に濾胞辺縁部でそれらの発現が強かった。また１週齢から５週齢のすべてにおいて，MHC class Ⅱを強発現する細胞は，抗原提示細胞が多く存在するとされるSED領域において高頻度で確認されたが，濾胞内の細胞もMHC class Ⅱを発現していた。しかしながら，濾胞内のMHC class Ⅱの発現の局在は週齢が進むにつれて変化しており，３週齢以降の濾胞辺縁部ではほとんど存在が確認されなかった。これらのことから，濾胞辺縁部の増殖細胞に刺激を与える細胞または，増殖しているＢ細胞自体が，哺乳期間中に変化していることが考えられた。

S100A9は好中球や単球などの自然免疫細胞が発現しており，TLR4を介した内在的な自然免疫応答を引き起こすことが知られている[2]。そこで，次に，哺乳期間から離乳後にかけて自然免疫細胞の局在変化を調べた。その結果，S100A9陽性細胞は哺乳期間中である１～３週齢においては，濾胞間やSED領域およびその上皮に多数存在が確認された。一方で，離乳後である５週齢では，S100A9陽性細胞が激減しており，これらの細胞が乳汁中の因子によって制御されていることが示唆された。

3.2　シングルセル解析

子ブタの下痢症は離乳開始２週間以内に多発するとされていることや，離乳の遅延により増体が向上する[3]ことを鑑みると，腸管免疫発達にはある程度の時間が必要であるといえる。また，3.1より哺乳期間の前期・中期・後期および離乳後で，回腸パイエル板を構成している免疫細胞が大きく変化していることが明らかとなった。これらの時期において，免疫細胞を含むパイエル板を構成する細胞の変化を精査することが，腸管免疫の立ち上げにおいて非常に重要であると考えられた

© The Ito Foundation

ため，哺乳期から離乳後にかけての，パイエル板における単一細胞レベルでの変化を調べることを試みた。

1週齢，2週齢，3週齢，5週齢のそれぞれの回腸パイエル板を採材し，2.2の手順で単一細胞ごとのcDNAを作製し，バイオアナライザでDNAのクオリティチェックを行った。cDNA作製後のDNA濃度は1週齢，2週齢，3週齢，5週齢でそれぞれ，79.00ng/μl，40.26ng/μl，30.89ng/μl，10.40ng/μlであり，cDNA Library作製後の濃度は25.05ng/μl，29.57ng/μl，30.31ng/μl，42.36ng/μlであった，また，得られたcDNAのサイズも問題なく，質・濃度ともに，シングルセル解析に十分なDNAライブラリーを得ることができた。

4．要　約

家畜生産において健康管理は非常に重要である。また，薬剤耐性菌の問題からも，飼養管理技術の向上が求められている。しかしながら，家畜の免疫については明らかになっていない点が多く存在し，その1つにパイエル板の機能成熟機序がある。

そこで本研究では，ブタの腸管に存在する中で最大とされる免疫臓器である回腸パイエル板の発達における変化を明確にすることを目的とした。まず免疫組織学染色により，免疫細胞および乳汁抗体の局在を解析することで，各週齢における特徴を捉えた。その結果，哺乳期間であっても前期，中期，後期では免疫細胞および乳汁抗体の局在は変化し，さらに離乳も免疫細胞に大きく影響することを明らかにした。また，免疫細胞および回腸パイエル板を構成する細胞のキャラクタライゼーションを行うために，各週齢の回腸パイエル板から細胞を単離し，単一細胞ごとのcDNA libraryを作製した。本研究により，回腸パイエル板を構成する細胞が子の成長とともにどのように変化していくのかをシングルセルレベルで解析するための手技の確立に成功した。

文　献

1） Demers, V., Mathijssen, G., Dapra, C., Do, D., Medo, E.：*Pediatr Res*,. 89(4)，795～802，2021.
2） Austermann, J., Spiekermann, C., Roth, J.：*Nat Rev Rheumatol*，14(9)，528～541，2018.
3） Ming, D., Wang, W., Huang, C., Wang, Z., Shi, C., Ding, J., Liu, H., Wang, F.：*Animals* (*Basel*)，11(8)，2169，2021.

© 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（Ⅱ）

Elucidation of the interaction between *Salmonell*a and host cells in avian ovary that underlies egg contamination and transovarian infection（Ⅱ）

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 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 membrane protein. In this study, we generated an *ompA*-deficient strain（Δ*ompA*）and examined the involvement of OmpA in the pathogenesis of SP systemic infection. It was found that Δ*ompA* has reduced adhesion and invasiveness to LMH/2A, a cultured chicken hepatocyte-derived cell line, *in vitro*. When day-old chicks were then infected with wild type（WT）and Δ*ompA*, the number of bacteria in the organs decreased in the Δ*ompA*-infected group compared to the WT-infected group at 3 days post infection. This indicates that *ompA* is also involved in systemic infection. On the other hand, egg-laying hens were vaccinated with recombinant（r）OmpA and subsequently infected with WT and monitored for egg-laying rate and egg contamination, which was almost the same as in the non-vaccinated group. This suggests that rOmpA may be a major contributor to systemic infection rather than vertical transmission.

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分かる。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中でもEnteritidisが鶏の卵

© The Ito Foundation

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性疾患を引き起こす。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は，グラム陰性菌の間で高度に保存された菌体構造の安定維持に関わる重要な外膜タンパク質である[9~11]だけでなく，*Cronobacter sakazakii*，*Acinetobacter baumannii*および腸管出血性大腸菌（EHEC）では細胞への接着・侵入に関与することが報告されてきた[12~14]。我々は，前年度の貴財団研究助成により，サルモネラのOmpAが鶏顆粒膜細胞への接着・侵入や介卵感染に関与していることを国内外で初めて明らかにした。また，OmpAと相互作用するcGC膜側のレセプターとして，複数の候補タンパク質を見出し，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を示し，これらがサルモネラの鶏卵汚染あるいは鶏胚への介卵感染のメカニズムに関わっているものと結論づけた（未発表）。

そこで本研究では，この介卵感染に先立って起こるSPの全身感染がいかに起こるかを明らかにすることを目的とした。

2．方　法

2.1　遺伝子欠損変異株の作製

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*，Δ*spiB*およびΔ*invA*を作製した。*spiB*と*invA*はそれぞれ*Salmonella* Pathogenicity Island（SPI）-２および-１に含まれ，サルモネラの細胞内増殖および細胞侵入に寄与することが知られている。

2.2　*in vitro*培養細胞株におけるΔ*ompA*の細胞接着・侵入性評価

鶏肝細胞由来培養細胞株であるLMH/2A細胞をモデルとして使用した。細胞数を調整してWaymouth MB752/1培地で37℃，５％　CO_2で

© The Ito Foundation

24時間培養した。並行して，血清型PullorumのWTおよびΔ*ompA*を培養しておき，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，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。

2.3　初生ひなにおける*in vivo*でのΔ*ompA*の病原性評価

採卵鶏（ボリスブラウン）初生ひな各10羽にWT，Δ*ompA*，Δ*spiB*およびΔ*invA*を経口接種（10^9CFU／羽）し，３および７日後に各５羽を安楽殺後，盲腸扁桃，盲腸内容，肝臓および脾臓を採取した。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。

なお，本実験は帯広畜産大学動物実験委員会による審査と承認を受けて実施された。

2.4　組換えOmpA（rOmpA）ワクチンの作製と接種

タンパク質発現用プラスミドpET29bに*ompA*を組み込んだpET29b-*ompA*Hisでタンパク質発現用大腸菌BL21（DE３）を形質転換し，IPTG存在下で培養してタンパク質を発現させた。当該菌液を氷上で30秒，３回超音波破砕後，11,100× gで20分間遠心し，ペレット再浮遊液をHisPurTM Ni-NTA Resin（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA，USA，88221）に通して溶出してrOmpAを得た。これを約５-10mg/10 mlに調整し，等量の完全フロイントアジュバント（CFA, Sigma-Aldrich，F5881-10ML）を５mlガラスシリンジと連結針を用いてよく混和して乳化した。これをrOmpAワクチンとして，鶏（ボリスブラウン）７羽の胸筋へ筋肉内注射（各１ml，最終抗原量375 μg／羽）して免疫した。

2.5　rOmpAワクチンの有効性評価

ワクチン接種鶏７羽および非接種鶏７羽から経時的に血清を採取し，ELISAにより抗体レベルを測定した。なお，予備実験において非ワクチン接種かつ非サルモネラ感染鶏から採取した血清をネガティブコントロール，サルモネラ感染鶏から採取した血清をポジティブコントロールとして用いた。抗体レベルの上昇を確認後，SPを経口接種した（10^9CFU／羽）。接種後18日間にわたり卵を回収し，産卵率を算出した。また，回収した卵を無菌下で割り，卵殻，卵黄および卵白を分けてプラスチックバッグへ入れた。卵殻および卵白にHI Brothを５ml添加し，ホモジナイズした後37℃で48hrs培養した。各サンプルの１白金耳量をDHL寒天培地に画線塗抹し37℃で培養した。コロニーが見られたサンプルをサルモネラ陽性として記録し，陰性サンプルについては，各0.5mlの卵培養液に4.5mlのHI Brothを添加後さらに37℃で24hrs培養した。培養後再びDHL寒天培地に画線塗抹しコロニーの有無を確認した。これらの結果をプールして最終的な汚染率を算出し，産卵率とともにワクチン接種鶏および非接種鶏の間で比較した。

なお，本実験は帯広畜産大学動物実験委員会による審査と承認を受けて実施された。

３．結果と考察

3.1　*in vitro*培養細胞株におけるΔ*ompA*の細胞接着・侵入性評価

Δ*ompA*感染LMH/2Aにおける細胞内生菌数は，3.7 ± 0.67 $\log_{10}$ CFU/mlであり，WT感染LMH/2Aにおける4.42 ± 0.53 $\log_{10}$ CFU/mlよりも有意に低かった（$p<0.01$）（**Fig. 1**）。

© The Ito Foundation

3.2　初生ひなにおける*in vivo*でのΔ*ompA*の病原性評価

感染3日後（**Fig. 2a–d**）では，盲腸内容物における菌数は各群で違いはなかったが，Δ*ompA*接種群およびΔ*spiB*接種群では盲腸扁桃，肝臓および脾臓いずれにおいてもWT接種群と比較して検出菌数が低く，Δ*invA*接種群では盲腸扁桃，肝臓でWT接種群と比較して低い菌数であった（$p<0.01$～0.05）。

感染7日後（**Fig. 2e–h**）には，盲腸内容物でΔ*ompA*接種群およびΔ*spiB*接種群でWT接種群と比較して検出菌数が低くなった（$p<0.01$～0.05）が，盲腸扁桃，肝臓および脾臓いずれにおいてもΔ*ompA*接種群ではWT接種群との間で検出菌数に違いは見られなくなった。

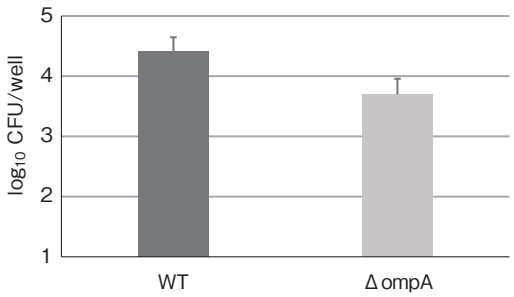

Fig. 1　in vitro invasion of LMH/2A cell line by WT and ΔompA. Data represent the mean numbers of intracellular bacteria and standard errors of means (n=6；**$p<0.01$).

3.3　rOmpAワクチンの有効性評価

測定した抗体レベルは，ネガティブコントロールで0.265±0.003，ポジティブコントロールで1.069±0.016（$p<0.05$）であった。rOmpAワクチン接種3日後の抗体レベルは，ワクチン非接種群で0.217±0.086，ワクチン接種群で0.282±0.209で

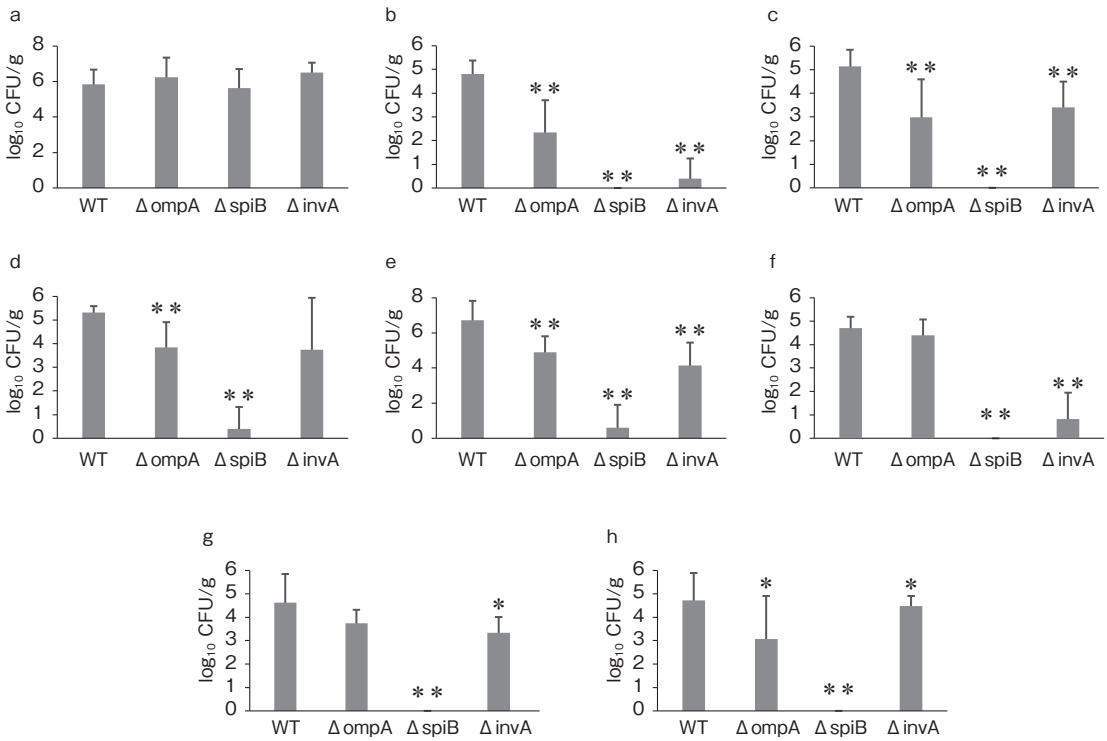

Fig. 2　Viable counts recovered from cecal contents (a, e), cecal tonsils (b, f), liver (c, g), and spleen (d, h) of chicks infected with wild type or mutant strains at 3 (a–d) and 7 days (e–h) post infection. n=5. Infected dose = 10^8 CFU/bird. *$p<0.05$, **$p<0.01$ vs WT.

© The Ito Foundation

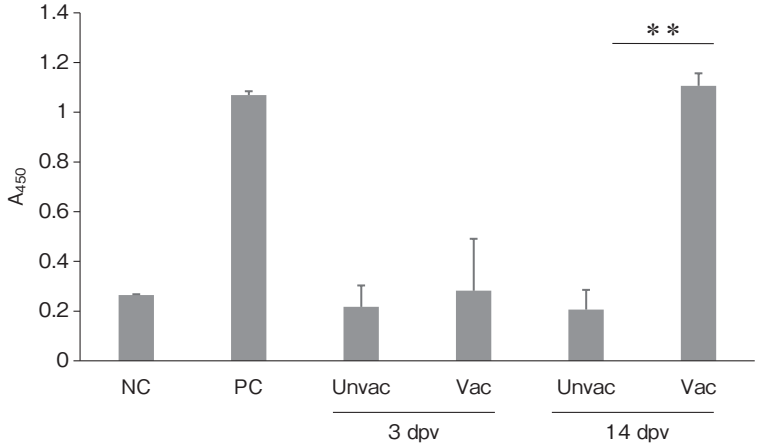

Fig. 3　Titer of anti-OmpA antibody in antisera from chickens vaccinated and unvaccinaated chickens. NC（negative controls, n＝2）and PC（positive controls, n＝2）were obtained from uninfected chickens and chickens that survived after SP infection, respectively, in a preliminary experiment. Serum samples were obtained from chickens at 3 and 14 days post vaccination（dpv）（n＝7 each, ＊＊$p<0.01$）.

Table 1　Egg production and egg infection after immunization with rOmpA and challenge with SP WT

Groups	Mean egg-laying rates（%）		Egg infection rates（%）[No. contaminated samples/total no. samples]			
	Pre-infection	Post-infection	Yolk	Albumen	Shell	Whole
Unvac	98.6±3.8	92.1±7.8	7.76 [9/116]	0.86 [1/116][a]	0.86 [1/116][a]	8.62 [10/116]
Vac	97.1±4.9	71.4±21.1＊	5.56 [5/90]	0 [0/90]	1.1 [1/90]	6.67 [6/90]

a One egg was infected in both albumen and shell.
＊$p<0.05$ compared to pre-infection.

あり，統計学的に顕著な違いはなかった（$p>0.05$）。一方，ワクチン接種14日後の抗体レベルは，ワクチン非接種群で0.206±0.079，ワクチン接種群で1.106±0.05であり，ワクチン接種群において抗体レベルの有意な（$p<0.01$）上昇を確認した（**Fig. 3**）。

感染後の産卵率と卵の汚染率の推移を**Table 1**にまとめた。感染後18日間における産卵率はワクチン非接種群で92.1±7.8％，ワクチン接種群で71.4±21.1％で，ワクチン接種群では産卵率低下の抑制は見られず，ワクチン非接種群と比較して有意に産卵率が低下（$p=0.011$）した。また，卵の汚染率は，ワクチン非接種群で8.62％であったのに対し，ワクチン接種群で6.67％（$p=0.399$）であった。また，卵の部位別の汚染率は，ワクチン非接種群の卵白で0.86％，卵黄で7.76％，卵殻で0.86％，ワクチン群の卵白で０％，卵黄で5.56％，卵殻で1.11％であった。卵の部位別汚染率においては卵殻，卵白の０％～1.11％という汚染率に対し，卵黄の汚染率は3.64％～7.76％と高かった。

© The Ito Foundation

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と比較して介卵感染に直接関与しない細胞においても細胞接着・侵入能が低下した。初生ひなを用いた感染実験では，感染３日後に盲腸扁桃，肝臓および脾臓においてΔ*ompA*の菌数がWTのそれと比較して低かったことから，*ompA*は成鶏における卵巣への組織トロピズムのみならず，ひなにおける全身感染にも寄与していると考えられる。一方で，採卵鶏へrOmpAをワクチンとして接種したところ，ワクチン接種によって産卵率の低下が見られた。また，その後WTで攻撃して卵の汚染率を比較したが，大きな違いはなかった。このことから，rOmpAは介卵感染防止を目的としたワクチンとしての利用には適さないのかもしれない。しかしながら，介卵感染に先立って全身感染が起こることを考慮すると，今後は全身感染防止に向けたワクチンとして評価することが必要と考えられる。OmpAは菌体構造の維持[9～11]のみならず，病原性にも関与している[15]。なかでも宿主細胞への接着・侵入に関する報告[12～14]が多く，これは本研究でも証明することができた。ひな白痢は経口感染後，腸管上皮から組織内への侵入が全身感染への最初のステップとなることから，これを防御後きるクチンの価値は非常に高く，今後の進展が期待される。

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に着目し，その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全身感染におけるOmpAの病原性への関与を検証した。Δ*ompA*は*in vitro*において，鶏肝細胞由来培養細胞株であるLMH/2Aへの接着侵入性が低下することが明らかになった。そこで，実際に初生ひなにWTとΔ*ompA*で感染させると，感染３日後にはWT感染群と比較してΔ*ompA*感染群において臓器内菌数が低下した。このことから，ompAは全身感染にも関与していることが明らかになった。一方で，採卵鶏にrOmpAをワクチンとして接種し，その後WTで感染させ，産卵率や卵の汚染をモニタリングしたが，ワクチン非接種群とほとんど変わらなかった。このことから，*ompA*は介卵感染よりもむしろ全身感染に大きく寄与している可能性がある。

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**, 61～69, 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**, 962～971, 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**, 4837～4844, 2007.

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**, 2986～2990,

© The Ito Foundation

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**, 565～576, 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**, 5015～5021, 1996.
9） Krishnan, S., Prasadarao, N. V.：Outer membrane protein A and OprF: versatile roles in Gram-negative bacterial infections, *FEBS J.*, **279**, 919～931, 2012.
10） 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.
11） 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.
12） 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.
13） 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.
14） Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Weiser, J. N., Stins, M. F., Huang, S. H., Kim and K. S.：Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells, *Infect. Immun.*, **64**, 146～153, 1996.
15） 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**, 664～669, 2007.

© The Ito Foundation

地方病性牛伝染リンパ腫発症牛における ゲノムワイドなDNAメチル化解析

Genome wide analysis of DNA methylation states in cattle with enzootic bovine luekosis

前　澤　誠　希
（東京大学大学院農学生命科学研究科）

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

Enzootic bovine leukosis (EBL) is B-cell lymphoma caused by bovine leukemia virus. DNA methylation status can influence gene expression, and hypermethylation in bone morphogenetic protein (BMP) 6 promoter region is a factor relating to the progression of EBL from an asymptomatic state have been reported. However, genome wide methylation status in EBL cattle is not clear. We investigated the genome wide methylation status of the BMP-6 promoter region in 4 EBL cattle and compared to those of 4 healthy cattle. Methylation levels of cellular developmental process genes and response to BMP in EBL cattle were significantly higher than those in healthy cattle. These results suggested that suppression of these genes expression by DNA methylation might contribute to represent a factor contributing to EBL onset.

1．目　　的

牛伝染性リンパ腫（enzootic bovine leukosis：EBL）は牛伝染性リンパ腫ウイルス（bovine leukemia virus：BLV）感染に起因するＢ細胞性リンパ腫である[1)]。EBLの発生件数は増加しており，リンパ球は全身を循環していることから，EBL発症牛由来の生産物はすべて廃棄となるため，経済的損失は深刻なものとなっている。EBLに対する治療法やワクチンは実用化されておらず，BLV感染牛と非感染牛の分離飼育といった，BLV感染を防ぐことが主なEBL発症予防法である。しかしながら，分離飼育する敷地不足や牛群のBLV陽性率が非常に高いなどの理由により新たな感染を防ぐことが難しい場合も少なくない。そのため，BLV感染牛におけるEBL発症予防法が求められている。

エピジェネティクスとはDNA塩基配列の変化を伴わず，細胞分裂後も娘細胞に引き継がれる遺伝子発現制御機構の総称である。DNAメチル化はエピジェネティクスの１つであり，DNAの５’側からシトシン（C），グアニン（G）の順に並んだ２塩基配列（CpG）におけるシトシンの５位炭素原子にメチル基が付加される反応である。プロモーター領域に位置し，CpGが高頻度で存在するCpG islandsにおいてDNAメチル化が亢進した場合，多くの転写因子が結合することができなくなるため，遺伝子発現は抑制される[2)]。DNAメ

© The Ito Foundation

チル化状態は年齢や栄養状態などの後天的な要因により変化することが報告されており[3]，ヒト，イヌ，ネコにおいて高メチル化によるがん抑制遺伝子またはアポトーシス関連遺伝子の発現抑制がリンパ腫発症に関与していることが報告されている[4～6]。これまでの研究において，EBL発症牛ではその他の牛に比べ骨形成タンパク質６（bone morphogenetic protein 6：BMP6）遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化が亢進していることを明らかにした。しかしながら，EBL発症牛においてもBMP6遺伝子プロモーター領域のDNAメチル化が亢進していない症例も多く，EBL発症牛におけるDNAメチル化状態の全体像は不明のままである。そこで本研究では，EBL発症牛におけるDNAメチル化状態を明らかにすることを目的に，EBL発症牛のDNAメチル化状態をゲノムワイドに解析し，健常牛と比較した。

２．方　法

EBL発症牛４頭を供した。EBL発症牛はいずれもホルスタイン種乳用牛の雌であり，31，47，55および89ヵ月齢であった。病理解剖にてリンパ節の腫大が認められ，病理組織学的検索によりＢ細胞性リンパ腫であると診断された。加えて，BLVプロウイルス量は1,000copies/10ng DNA以上であった。対照として，食肉検査にて異常が認められなかった健常牛４頭を用いた。健常牛は38，56，67および80ヵ月齢であり，BLVプロウイルス量は24～86copies/10ng DNAであった。EBL発症牛では腫瘍化リンパ節，健常牛では腸管膜リンパ節からQIAamp®DNAミニキット（Qiagen）を用いてDNAを抽出し，分析まで－30℃で保管した。

ゲノムワイドなDNAメチル化解析には，NEBNext Enzymatic Methyl-seq Kit（New England Biolabs）を用いたReduced Representation Enzymatic Sequencing：RREM法を実施した。すなわち，DNA 200 ngを制限酵素Msp Ⅰ（New England Biolabs）により断片化し，ギャップの修復およびアダプターを付加した。次に，50～1,000bpのDNA断片を回収し，変換酵素（TET2およびAPOBEC）を用い非メチル化シトシンをウラシルに変換した。DNA断片にインデックスを付加し，Miseq（Illumina）にて次世代シークエンスを行った。得られたシークエンスデータはBismarkによりウシゲノムをリファレンスにマッピングを行い，各CpGのメチル化率を算出し，EBL発症牛および健常牛で比較した。メチル化率に有意差（p値＜0.05）が認められ，遺伝子をコードしている領域から１kb以内に位置していたCpGを抽出した。加えて，抽出したCpGの近傍にコードされている遺伝子について遺伝子オントロジー解析（GO解析）を実施した。

本研究は東京大学大学院農学生命科学研究科が定める動物実験に関するガイドラインに従い実施された。

３．結果と考察

EBL発症牛および健常牛におけるDNAメチル化率の中央値はそれぞれ51.05％および63.95％であり，EBL発症牛ではゲノム全体のDNAメチル化率は有意に低下していた（**Fig. 1**）。ゲノム全体のDNAメチル化が低下するとゲノムの不安定性が誘発され，発がんを引き起こすことが報告されている[7]。EBLにおいてもゲノムワイドなDNAメチル化の低下は発症要因となっている可能性が考えられた。

EBL発症牛および健常牛における各CpGのメチル化率を比較したところ，EBLにおいて健常牛よりメチル化率が低値であったCpGは9,211個特定された。しかしながら，遺伝子をコードしている領域から１kb以内に位置しているCpGは，

© The Ito Foundation

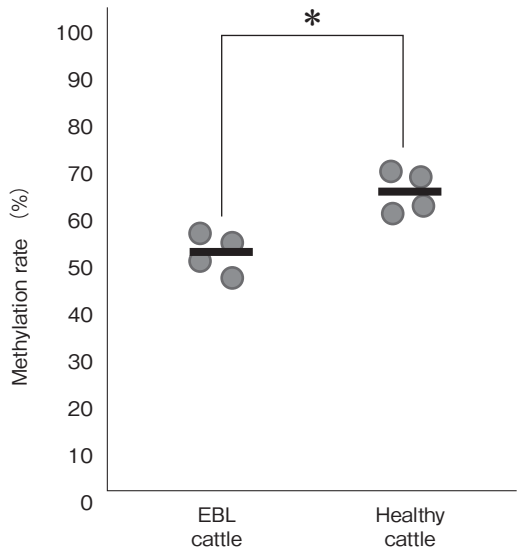

Fig. 1　Genome wide methylation rate in EBL cattle and Healthy cattle. *indicates a significant difference ($p<0.05$), Bars represent the median.

*ATP5ME*近傍に位置する１つのみであった。遺伝子がコードされている領域外の脱DNAメチル化により，一部の染色体増加が促進され，間接的に発がん遺伝子の発現を誘発することが報告されている[7]。以上より，プロモーター領域の脱メチル化による直接的な発がん遺伝の活性化はEBL発生に関与している可能性は低く，遺伝子コード領域以外の脱メチル化による染色体異常が関与している可能性が示唆された。また，EBLにおいて健常牛よりメチル化率が高値であったCpGは4,572個特定された。そのうち，遺伝子をコードしている領域から１kb以内に位置しているCpGは201個であった。これらのメチル化CpG近傍にコードされている遺伝子のGO解析した結果，発がん抑制遺伝子に関与する遺伝子群および細胞の分化・活性化に関与する遺伝子群が多く認められた（**Fig. 2**）。したがって，DNAメチル化による発がん抑制遺伝子および細胞分化・活性化遺伝子発現が抑制され，EBL発症へと至る可能性が示唆された。

本研究により，EBL発症牛は健常牛に比べ，ゲノムワイドなDNAメチル化は低下することが明らかとなった。加えて，発がん抑制遺伝子および細胞分化・活性化遺伝子のDNAメチル化亢進が認められた。したがって，EBL発症にはこれらのDNAメチル化異常が関与している可能性が示唆された。DNAメチル化は栄養状態などの後天的な要因により変化することが知られている。今回の研究ではEBL発症に関与するDNAメチル化異常を引き起こす要因については検討できていない。DNAメチル化異常を引き起こす要因を明らかにすることは，EBL発症を予防する飼養管理法の開発につながる可能性があり，今後の研究課題である。

４．要　　約

牛伝染性リンパ腫（EBL）は牛伝染性リンパ腫ウイルス（BLV）感染によって引き起こされるB細胞性リンパ腫であり，骨形成タンパク質６

© The Ito Foundation

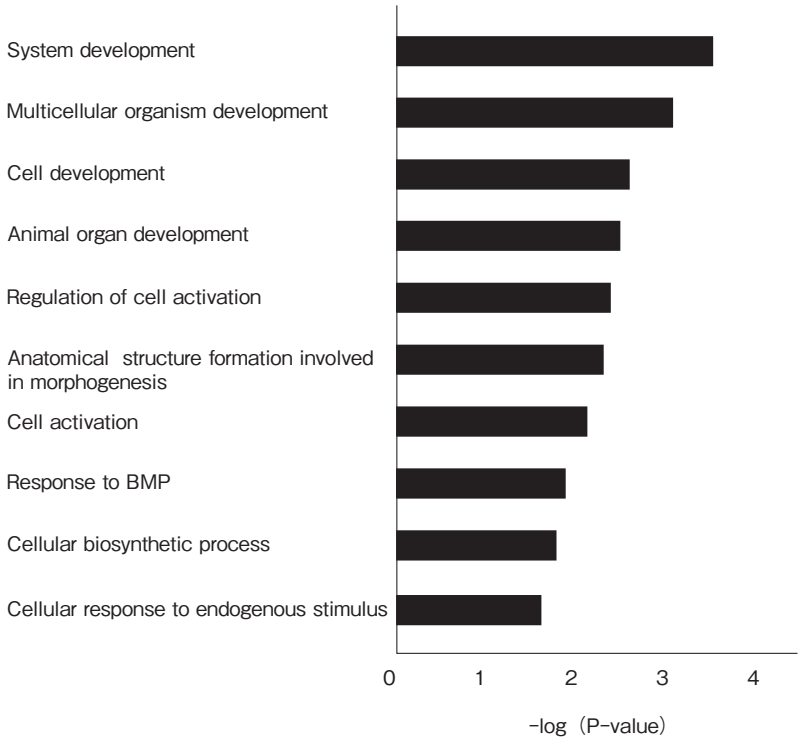

Fig. 2　Top 10 Gene Ontology term of genes with higher methylation rates in EBL cattle than in healthy cattle.

（BMP-6）プロモーター領域の高メチル化が病態進行に関与すると報告されている。しかしながら，ゲノムワイドなメチル化状態は明らかにされていない。そこで，EBL発症牛におけるゲノムワイドなメチル化状態を明らかにすることを目的に，EBL発症牛と健常牛のゲノムワイドなDNAメチル化状態を比較した。EBL発症牛４頭の腫瘍化リンパ節および健常牛４頭の正常リンパ節から抽出したDNAを用い，RREM法による解析を実施したところ，EBL発症牛ではゲノムワイドなDNAメチル化の低下が認められた。加えて，EBL発症牛では発がん抑制遺伝子および細胞分化・活性化に関与する遺伝子群近傍のDNAメチル化亢進が認められた。以上の結果より，EBL発症にはゲノムワイドなDNAメチル化の低下による染色体不安定性およびDNAメチル化による発がん抑制遺伝子および細胞分化・活性化遺伝子の発現抑制が関与している可能性が示唆された。

文　献

1）　Schwartz, I., Levy, D.：Pathobiology of bovine leukemia virus, *Vet. Res*., **25**, 521～536, 1994.
2）　Baylin, S. B.：DNA methylation and gene silencing in cancer, *Nat. Clin. Pract*., Oncol. **2** (Suppl. 1), S4-11, 2005.
3）　Ahuja, N., Li, Q., Mohan, A. L., Baylin, S. B., Issa, J. P.：Aging and DNA methylation in colorectal mucosa and cancer, *Cancer Res*., **58**, 5489～5494, 2005.
4）　Daibata, M., Nemoto, Y., Bandobashi, K., Kotani, N., Kuroda, M., Tsuchiya, M., Okuda, H., Takakuwa, T., Imai, S., Shuin, T., Taguchi, H.：Promoter hypermethylation of the bone morphogenetic protein-6 gene in malignant lymphoma, *Clin. Cancer Res*., **13**, 3528～3535, 2007.
5）　Ferraresso, S., Arico, A., Sanavia, T., Da Ros, S., Milan, M., Cascione, L., Comazzi, S., Martini, V., Giantin, M., Di Camillo, B., Mazzariol, S., Giannuzzi,

© The Ito Foundation

D., Marconato, L., Aresu, L.：DNA methylation profiling reveals common signatures of tumorigenesis and defines epigenetic prognostic subtypes of canine diffuse large B-cell lymphoma, *Sci. Rep.*, **7**, 11591, 2017.

6） Mochizuki, H., Fujiwara-Igarashi, A., Sato, M., Goto-Koshino, Y., Ohno, K., Tsujimoto, H.：Genetic and epigenetic aberrations of p16 in feline primary neoplastic diseases and tumor cell lines of lymphoid and non-lymphoid origins, *Vet. J.*, **219**, 27～33, 2017.

7） Gaudet, F., Hodgson J. G., Eden, A., Jackson-Grusby, L., Dausman, J., Gray J. W., Leonhardt, H., Jaenisch, R.：Induction of tumors in mice by genomic hypomethylation, *Science*, **300**, 489～492, 2003.

© The Ito Foundation

ブタにおける医薬品の適正使用に向けた薬物代謝酵素の解析

Analysis of drug-metabolizing enzymes toward appropriate use of drug in pigs

宇 野 泰 広[1]・山 崎 浩 史[2]

([1]鹿児島大学共同獣医学部, [2]昭和薬科大学薬学部)

Yasuhiro Uno[1] and Hiroshi Yamazaki[2]

([1]Joint Faculty of Veterinary Medicine, Kagoshima University,
[2]Faculty of Pharmaceutical Sciences, Showa Pharmaceutical University)

The pig is an important species in livestock and drug metabolism studies for drug development; however, the cytochrome P450 (CYP), one of the important drug-metabolizing enzymes, have not been fully investigated in this species. Therefore, pig CYP2C enzymes were identified and characterized, including CYP2C32, CYP2C33, CYP2C34, CYP2C36, CYP2C42, and CYP2C49. For these CYP2Cs, cDNAs were isolated and found to contain open reading frames of 490–494 amino acids that shared relatively high sequence identities with human CYP2Cs. Pig CYP2C genes formed two gene clusters, one of which was located in the genomic region corresponding to that of human CYP2C cluster, and an additional gene cluster formed by pig CYP2C33a and CYP2C33b was located distant from the first cluster. Among the tissues analyzed, these pig CYP2C mRNAs were preferentially expressed in liver, small intestine, and/or kidney, the drug-metabolizing organs; pig CYP2C49, CYP2C32, and CYP2C33 mRNAs were the most abundant in liver, jejunum, and kidney, respectively. Metabolic assays showed that pig CYP2C proteins metabolized typical human CYP2C substrates including diclofenac, warfarin, and omeprazole. The results suggest that these pig CYP2Cs are functional enzymes able to metabolize human CYP2C substrates in liver and small intestine, similar to human CYP2Cs. Moreover, analysis of 14 pig CYPs including these CYP2Cs, found that CYP1A2, CYP2A19, CYP2C36, CYP2E1, and CYP3A22 were involved in metabolism of skatole, a contributor to boar taint resulting in an unfavorable odor and taste of the pork product. Among these CYPs, CYP1A2 and CYP3A22 were expected to contribute more to boar taint in male pigs, considering sex-biased expression of CYPs in liver where skatole is metabolized by CYPs. In conclusion, this study suggested the importance of pig CYPs including CYP2Cs for drug metabolism and boar taint. Further investigation of genetic variants of pig CYPs would help to understand the variability among individuals and strains in drug metabolism and skatole metabolism (boar taint).

© The Ito Foundation

1．目　　的

動物用医薬品の安全確保のためには，ヒト用の医薬品医療機器等法での情報も適用するが，動物特有の諸問題や，ヒトと産業動物の種差の課題がある。この問題を解決するためには産業動物における薬物代謝を理解する必要があるが，ヒトと異なり産業動物における薬物代謝の研究は進んでおらず，まだ薬物代謝酵素の同定すら十分でないのが実状である。また，食肉産業では，ブタの雄臭（boar taint）が重要な問題であり，その原因物質の一つであるスカトールの代謝を解明することが必要である。スカトールは薬物代謝酵素によって代謝されるが，そのメカニズムは十分に解明されていない。

薬物代謝酵素は薬物の生体内変換反応に関わる酵素群で，チトクロムP450（CYP）等が知られている。ヒトではさまざまなCYP分子種が存在し，多くの医薬品等の化学物質の生体内変換に関与しており，医薬品等の薬効・毒性における性差や年齢差，個体差，人種差をもたらす要因となっている。薬物代謝酵素の個体差や人種差の大きな原因の一つは遺伝子多型であり，ヒトでは個別化医療の中で薬物代謝酵素が代謝する医薬品の一部については投与時に遺伝子多型が調べられるまでになっている。なかでもヒトCYP2Cはジクロフェナク，ワルファリン，オメプラゾール等の代謝に関与し，薬物代謝に重要な肝臓と小腸で高く発現する重要な酵素である。また，ヒトCYP2Cの遺伝子多型が薬物代謝の個体差や人種差の重要な原因であることが知られている。

ヒトと同様，系統や個体によって遺伝的背景が異なるブタについても系統や個体の間で薬物代謝が異なることが報告され始めている。しかし，ブタでは薬物代謝の理解が進んでおらず，CYPをはじめとする薬物代謝酵素の同定すら不十分なのが現状である。そこで本研究では，肝臓で発現するすべてのCYP2Cを同定し，その発現や酵素機能を解析し，ブタ薬物代謝での重要性を評価した。また，これらのCYP2Cを含め，薬物代謝の主要なブタCYP（計14種）についてスカトール代謝への関与を調べた。

2．方　　法

2.1　cDNAの同定・解析

CYP2CのcDNAをクローニングするため，ブタ肝臓RNAを用いて，既報[1]に従いRT-PCRを行った。まずRT反応により1本鎖cDNAを合成し，続いて遺伝子特異的なプライマーを用いてPCRを行い，PCR Cloning Kit（New England BioLabs）を用いて増幅産物をベクターにクローニングしたのちインサートの配列を決定し，配列の解析を行った[2]。

2.2　CYP2Cの組織発現解析

CYP2Cの組織発現を解析するため，既報[1]に従い倫理委員会の承認を得て採取したブタの副腎，脳，心臓，回腸，空腸，腎臓，肝臓，肺，卵巣，子宮から別々にRNAを抽出し，リアルタイムPCRを行った。まずReverTra Ace qPCR RT kit（TOYOBO）を用いてRT反応を行い，続いて遺伝子特異的なプライマーとTHUNDERBIRD SYBR qPCR Mix Kit（TOYOBO）を用いてリアルタイムPCRを行った[2]。相対的発現レベルは，TaqMan Gene Expression Assays （Applied Biosystems）およびTHUNDERBIRD Probe qPCR Mix（TOYOBO）を用いて定量した18S rRNAレベルで補正することにより算出した。

2.3　CYP2Cタンパクの活性測定

ブタCYP2Cタンパクの酵素活性を調べるために，既報[1, 3]に従い発現プラスミドの作製，大腸菌でのタンパク発現，膜画分の調製を行った。まずタンパク発現を高めるために，PCR増幅により

© The Ito Foundation

N末の改変，ついでpCWプラスミドへのサブクローニングを行った[2]。酵素活性の測定はジクロフェナク，ワルファリン，オメプラゾール，スカトールを基質として既報[4～7]に従って行った。組換えタンパク質（5.0 pmol）または肝臓ミクロゾーム（ヒトまたはブタ，0.50 mgタンパク質／ml），NADPH生成システム，基質（10または100 μM），50 mMリン酸カリウム緩衝液（pH7.4）を含む反応物を37℃で15または30分間インキュベートしたのち反応を停止し，900 gで５分間遠心分離した後，上清を高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した[2]。HPLC分析は，基質に応じて蛍光またはUV検出器を使用した。最大速度（Vmax）とミカエリス定数（Km）はミカエリス－メンテン式を使用して算出した。

３．結果と考察

肝臓RNAを用いたRT-PCRによりブタCYP2C32，CYP2C33，CYP2C34，CYP2C36，CYP2C42およびCYP2C49のcDNAを同定し，その配列を解析した。これらのCYP2Cは490または494アミノ酸残基をコードしヒトCYP2Cと高い相同性（64-82％）を示し，CYPに特徴的なヘム結合領域や基質認識部位を有していた[2]。また，ヒトがゲノム上に１つのCYP2C遺伝子クラスターを形成しているのに対し，ブタは大小２つのCYP2C遺伝子クラスターを形成しており，ゲノム上，大きな遺伝子クラスターはヒトCYP2C遺伝子クラスターに対応する位置に存在していた（**Fig. 1**）。また，すべてのブタCYP2CがヒトCYP2Cに類似した遺伝子構造を持ち，コード領域のエクソンを９つ有し，ほとんどのエクソンが対応するヒトCYP2Cと同じ大きさであった[2]。以上のことから，ブタCYP2CがヒトCYP2Cとよく似た塩基およびアミノ酸配列を有していることが明らかとなった。

リアルタイムPCRにてブタCYP2C mRNA発現を副腎，脳，心臓，回腸，空腸，腎臓，肝臓，肺，卵巣，子宮で調べたところ，ブタCYP2C34およびCYP2C49 mRNAは肝臓，CYP2C32およびCYP2C42 mRNAは小腸，CYP2C36 mRNAは腎臓，CYP2C33 mRNAは肝臓と腎臓で特に高く発現していた（**Fig. 2**）。また，これらのブタCYP2Cの中で，肝臓ではCYP2C49ついでCYP2C33

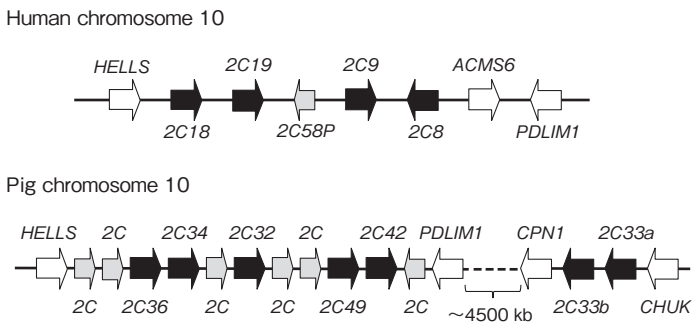

Fig. 1　Genomic structure of pig CYP2C genes. The human and pig genomes were analyzed using BLAT and Sequence Viewer. Pig CYP2C33 cDNA was mapped to both CYP2C33a and CYP2C33b genes most likely due to duplication of single gene. Gray arrows show pseudogenes, and black arrows indicate CYP2Cs with a complete coding region. The sizes of the genes and the distances between them are not drawn to scale.

© The Ito Foundation

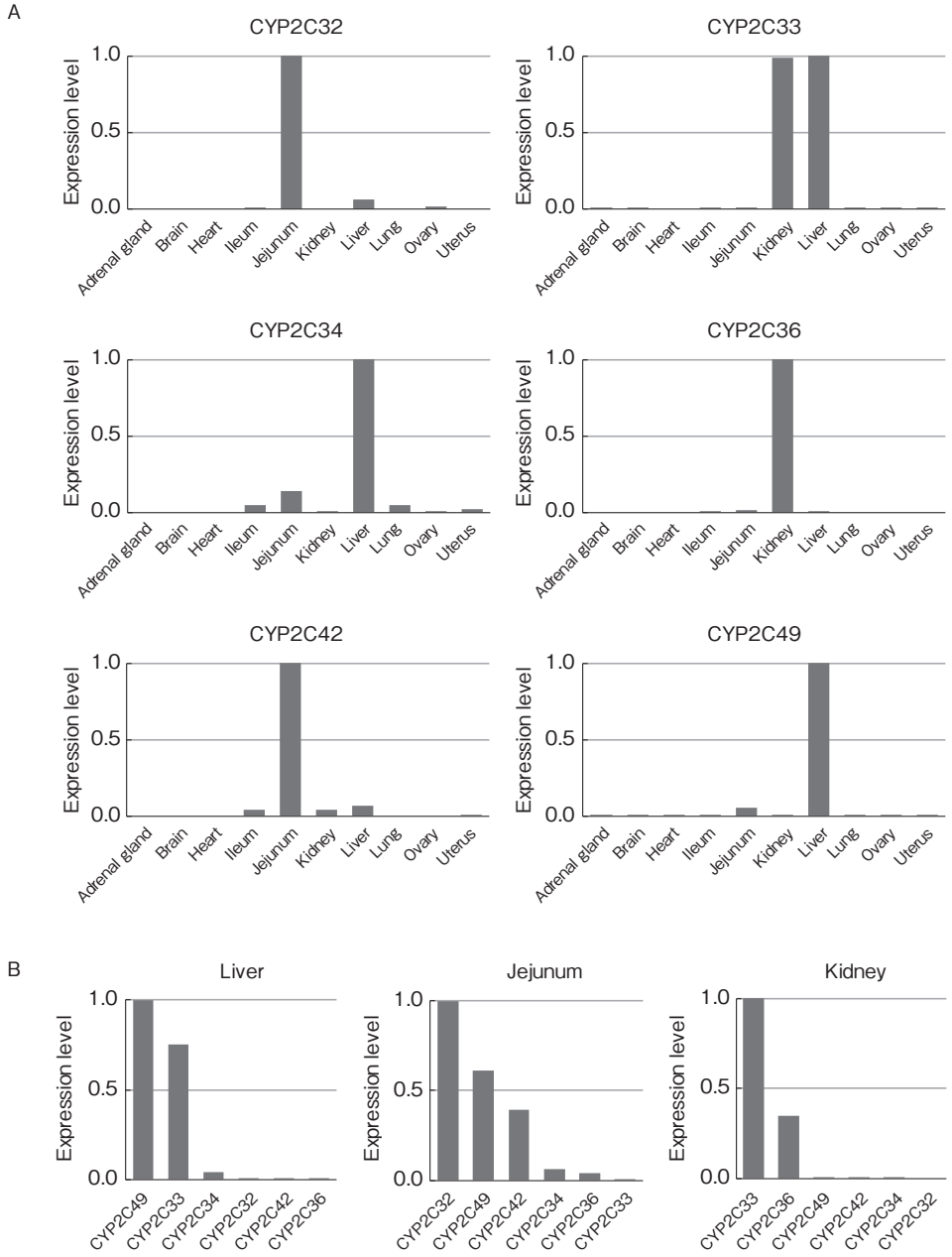

Fig. 2 Tissue expression of pig CYP2C mRNAs. Expressions of pig CYP2C mRNAs were quantified by real-time RT-PCR in adrenal gland, brain, heart, ileum, jejunum, kidney, liver, lung, ovary, and uterus (A). Relative abundances of pig CYP2C mRNAs were also determined in liver, jejunum, and kidney (B). The expression level of each mRNA was normalized to the 18S rRNA level, and values represent the average ± SD from three independent amplifications. The most abundant expression level was arbitrarily set to 1, and all other expression levels were adjusted accordingly.

© The Ito Foundation

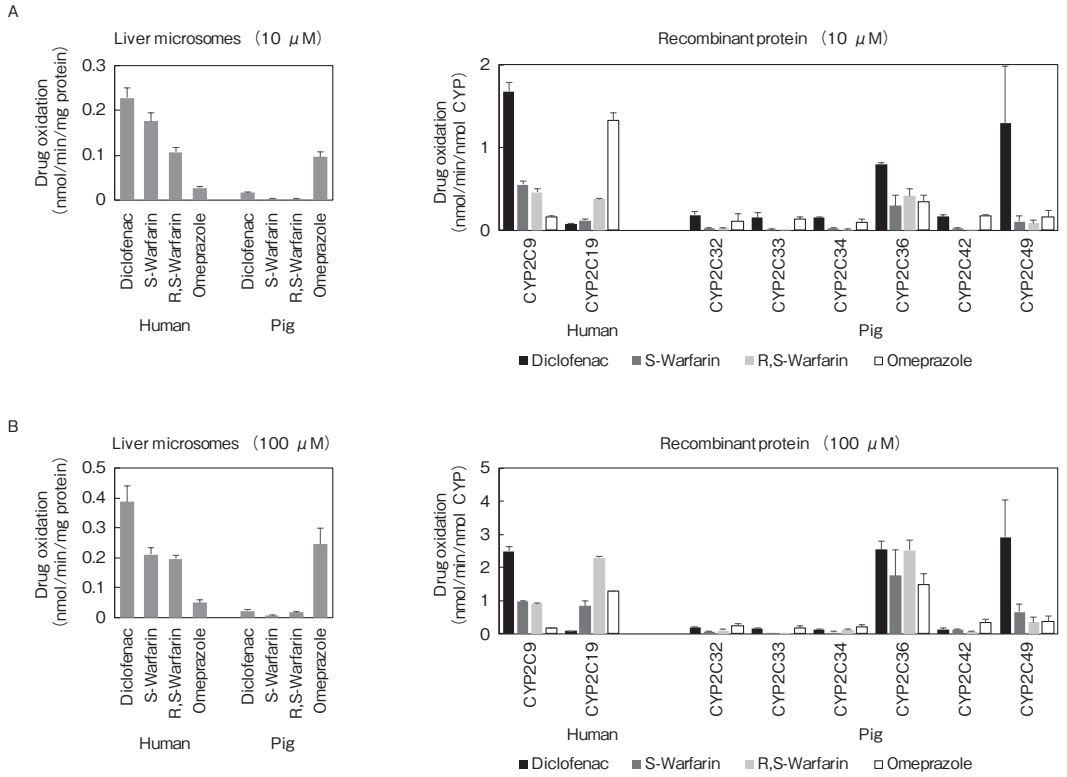

Fig. 3　Oxidation activities by liver microsomes and recombinant CYP2C proteins from humans and pigs. Diclofenac 4′-hydroxylation (normal bars), S-(light grey bars) and R, S-warfarin (grey bars) 7-hydroxylation, and omeprazole 5-hydroxylation (pink bars) activities were determined in liver microsomes (A, C) and recombinant proteins (B, D) at substrate concentrations of 10 mM (A, B) and 100 mM (C, D) in triplicate reactions.

mRNAが，空腸ではCYP2C32ついでCYP2C49およびCYP2C42 mRNAが，腎臓ではCYP2C33ついでCYP2C36 mRNAが高く発現していた（**Fig. 2**）。以上のことから，ブタCYP2CがヒトCYP2Cと同様，薬物代謝に重要な肝臓，小腸，腎臓で高く発現していることが明らかとなった。

ヒトCYP2C基質を用いて組換えタンパク質と肝臓ミクロゾームで酵素活性を測定したところ，ブタ肝臓ミクロゾームで４つの基質すべてに活性がみられたが，活性レベルは基質によって大きく異なり，同じ基質でもヒトと異なっていた（**Fig. 3**）。とくに，ヒトと比べてブタではジクロフェナクとワルファリンに対する活性が低く，オメプラゾールに対する活性が高かった（**Fig. 3**）。同様に，いずれのブタCYP2C組換えタンパク質もすべての基質に対して活性を示したが，活性レベルは基質ごとに異なり，CYP2C49ついでCYP2C36がジクロフェナクに，CYP2C36ついでCYP2C49がワルファリンとオメプラゾールに対して高い活性を示した（**Fig. 3**）。以上のことから，ブタCYP2Cが酵素機能を有し，ヒトCYP2C基質を代謝することが明らかとなった。

ブタ肝臓ミクロゾームでスカトールからの一次酸化生成物（3-メチルオキシインドール，インドール-3-カルビノールおよび6-ヒドロキシスカトール）の生成を測定したところ，スカトールに対する酸化活性がオスでメスより低く，とくにインドール-3-カルビノールおよび6-ヒドロキシス

© The Ito Foundation

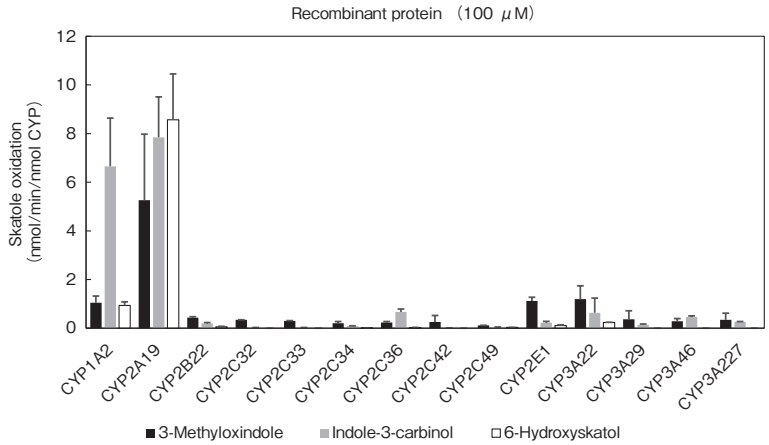

Fig. 4　Recombinant pig P450 enzymes mediated skatole oxidations. The rates of formation of 3-methyloxindole (open bars), indole-3-carbinol (light grey bars), and 6-hydroxyskatole (dark grey bars) were determined at a substrate concentration of 100 μM. Bars and whiskers represent the mean and standard deviation values for skatole primary metabolite formation in triplicate determinations.

カトールの生成がオスでメスより低かった。次にスカトール代謝へのCYPの関与を調べるために，14種のブタCYP組換えタンパク質で調べたところ，CYP1A2，CYP2A19，CYP2C36，CYP2E1，CYP3A22がスカトールからの代謝物生成に関与していた（**Fig. 4**）。これら５種のCYPのスカトール代謝への関与を詳細に調べるために組換えタンパク質を用いて速度論的解析を行ったところ，3-メチルオキシインドール生成におけるCYP1A2，CYP2A19およびCYP3A22のVmax値は，それぞれ3.5，25および4.5 min^{-1}，見かけのKm値はすべて＞100 μMであった。インドール-3-カルビノール形成におけるCYP1A2，CYP2A19およびCYP3A22のKm値はそれぞれ37 μM，60 μMおよび94 μM，Vmax値はそれぞれ13 min^{-1}，14 min^{-1}および0.4 min^{-1}であった。そして，6-ヒドロキシスカトール形成におけるCYP2A19のKmおよびVmax値は，それぞれ70 μMおよび16 min^{-1}であり，CYP2C36，CYP2E1およびCYP3A22のKm値はいずれも100 μM未満であった。以上のことから，CYP1A2，CYP2A19，CYP2C36，CYP2E1，CYP3A22がスカトール代謝に関与することが明らかとなった。なかでもCYP2A19の関与が大きかったが，雌と異なり雄の肝臓ではCYP2A19の発現がかなり低く，このことが雄で雄臭が生じる一因である可能性が考えられる。雄の肝臓ではCYP1A2とCYP3A22が比較的高く発現しており，雄のスカトール代謝に重要であると推測される。

4．要　　約

CYPは重要な薬物代謝酵素であるが，ブタでは解析がまだ不十分であり，ブタ薬物代謝の理解が困難になっている。本研究では，CYPのうちCYP2Cについて薬物代謝酵素としての重要性を評価するために，CYP2C32，CYP2C33，CYP2C34，CYP2C36，CYP2C42，CYP2C49のcDNAを同定し解析を行った。いずれのブタCYP2CもヒトCYP2Cと高い配列相同性を示し，ヒトCYP2Cと類似したゲノム構造を有していた。また，いずれのブタCYP2Cも薬物代謝に重要な肝臓，小腸ま

© The Ito Foundation

たは腎臓で高く発現し，ヒトCYP2C基質に酵素活性を示した。以上の結果から，ヒトCYP2Cと同様，これらのブタCYP2Cが肝臓や小腸で薬物代謝機能を発揮することが示唆された。また，食肉産業で重要な問題であるブタの雄臭については，原因物質の１つであるスカトールの代謝にCYP1A2，CYP2A19，CYP2C36，CYP2E1，CYP3A22が関与していた。このうち雄の肝臓で発現するCYP1A2とCYP3A22が雄臭に重要であると考えられ，雄臭の個体差はこれらのCYPの遺伝子多型が大きな原因の一つであると推察される。雄臭の原因となる遺伝子多型が見つかれば，それをマーカーにして個体を選別する，さらには雄臭のない集団を構築することができるかもしれない。

文　献

1） Uno, Y., Fujino, H., Kito, G., Kamataki, T., Nagata, R.：*Mol Pharmacol*, **70**, 477～486, 2006.

2） Uno, Y., Morikuni, S., Shiraishi, M., Asano, A., Kawaguchi, H., Murayama, N., Yamazaki, H.：*Xenobiotica*, **52**, 963～972, 2022.

3） Iwata, H., Fujita, K., Kushida, H., Suzuki, A., Konno, Y., Nakamura, K., Fujino, A., Kamataki, T.：*Biochem Pharmacol*, **55**, 1315～1325, 1998.

4） Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Kawano, M., Shimizu, M., Toda, A., Utoh, M., Sasaki, E., Yamazaki, H.：*Drug Metab Dispos*, **43**, 1408～1416, 2015.

5） Uehara, S., Uno, Y., Inoue, T., Kawano, M., Shimizu, M., Toda, A., Utoh, M., Sasaki, E., Yamazaki, H.：*Drug Metab Dispos*, **44**, 911～915, 2016.

6） Nakanishi, K., Uehara, S., Kusama, T., Inoue, T., Shimura, K., Kamiya, Y., Murayama, N., Shimizu, M., Uno, Y., Sasaki, E., Yamazaki, H.：*Biochem Pharmacol*, **152**, 272～278, 2018.

7） Wiercinska, P., Lou, Y., Squires, E. J.：*Animal*, **6**, 834～845, 2012.

© The Ito Foundation

飼料費低減に向けた低硝酸態窒素と高粗タンパク質を両立する夏季牧草の窒素管理技術

Nitrogen management technology for an annual summer grass that achieves both low nitrate nitrogen and high crude protein to reduce feed costs

林　　征幸・金子　　真
（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）

Masayuki Hayashi and Makoto Kaneko
（Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO）

For warm-season grasses, it is difficult to achieve both low nitrate nitrogen and high crude protein. To improve the balance of inorganic nitrogen supply from soil and manure and its absorption by grass, a cultivation test was conducted with manure application based on the estimation by the “estimate for inorganic nitrogen supply from upland soil” and the “estimate for inorganic nitrogen supply from organic materials (manure)”. And then the effectiveness of these estimates was considered. From the results, it was suggested a necessity to consider the residue from the previous crop and to improve the equation for estimating the inorganic nitrogen supply from soil so that the difference in available nitrogen could be accurately reflected.

1．目　　的

輸入飼料価格は近年，中国や中東諸国との競合や，海上運賃の高騰により高止まりし，コロナ禍での海上輸送混乱やウクライナ情勢の悪化により輸入飼料の高騰や品薄のリスクがさらに高まっており，畜産経営における飼料コスト高による利益減少対策として，輸入飼料から国産飼料への切替えは喫緊の課題となっている。現在国産が可能な粗飼料に着目すると，国産への切替えが進まない原因として，国産粗飼料の品質の問題点があげられる。輸入粗飼料は，品質のバラツキが小さく，商品としてグレードごとに品質も明示されており，育成牛や肥育牛など利用範囲が広い。一方，都府県での国産自給粗飼料，特に牧草生産は，小さな圃場での生産が多く，圃場内や圃場間での品質のバラツキが大きく，肉用牛では繁殖雌牛以外での利用が広がっていない。牛肉生産のために国産自給粗飼料を輸入粗飼料の代替として広く流通するには，輸入粗飼料と同等の品質安定性と高品質が必要である。

暖地の夏季に栽培されている暖地型牧草は，地力窒素および施用窒素の過剰吸収により，硝酸態窒素濃度が高くなりやすく，家畜が硝酸態窒素中毒を起こす危険性がある。一方，粗タンパク質含量は冬季の寒地型牧草よりも低いとされ，粗タンパク質を高めるためには窒素施用が不可欠であり，低硝酸態窒素と高粗タンパク質窒素の両立が

© The Ito Foundation

難しい。本研究では，近年園芸作など畑作向けに開発された「畑土壌可給態窒素（地力窒素）の見える化技術[1)]」と「有機質資材（堆肥）窒素肥効見える化技術[2)]」を牧草生産に利用し，牧草への窒素供給パターンを推定し，牧草の窒素吸収モデルと組み合わせることで，窒素の供給と吸収のバランスを改善する。この暖地型牧草の堆肥を主体とした窒素施用管理技術を開発することにより，有機質資材の利用促進による化学肥料の使用量とコストの削減ならびに低硝酸態窒素・高粗タンパク質の安全・高品質自給粗飼料を供給可能にすることによる自給率向上を目的とする。

２．方　　法

2.1　土壌（地力）と堆肥からの窒素供給パターンの推定による施用量の決定

近年開発された「畑土壌可給態窒素（地力窒素）の見える化技術」と「有機質資材（堆肥）窒素肥効見える化技術」を利用して牧草への窒素供給パターンを推定し，牧草による窒素吸収に見合った施用量を決定した。

１：2022年６月10日に，栽培試験を実施する畑圃場において，対角線上の５地点で，深さ15cmまでの土壌を，採土管を用いて採取した。

２：採取した土壌を２mmのふるいでふるったのち，上薗らの方法[3)]に基づきパックテストを用いてCOD（化学的酸素要求量）を測定し，可給態窒素含量を計算により求めた。

３：可給態窒素含量から地力窒素供給パターンを計算（「畑土壌可給態窒素（地力窒素）の見える化技術」の計算式[1)]を利用）により求めた。

４：一般的な牛糞堆肥からの堆肥窒素供給パターンを計算（「有機質資材（堆肥）窒素肥効見える化技術」の計算式[2)]を利用）により求めた。

５：上記３と４で計算された窒素供給パターンが昨年度の暖地型牧草栽培試験における牧草窒素吸収パターンに見合った窒素供給量になるように，牧草の播種日・収穫日，堆肥の施用日・施用量を決定した。

2.2　栽培試験

上記2.1で決定した牧草播種日・収穫日，堆肥の施用日・施用量で下記のギニアグラス品種「うーまく」の栽培試験と収穫物の分析を実施し，地力窒素および堆肥施用が牧草収穫物の硝酸態窒素濃度および粗タンパク質濃度に及ぼす影響を明らかにした。

圃場：九州沖縄農業研究センター内の飼料畑圃場

処理：地力窒素（少ない圃場：Ｌ圃場，多い圃場：Ｈ圃場），堆肥施用日（播種直前：Ｊ処理，播種２週間前：Ｔ処理），堆肥施用量（なし：Ｎ処理，標準：１処理，２倍量：２処理）。

反復：４反復の乱塊法で配置。計40プロット。各区画５ｍ×５ｍ。

調査：播種（2022年７月22日）から４週間後，６週間後，８週間後に刈取り調査（各区画１ｍ×１ｍ）を行い，70℃で72時間以上乾燥し，乾物収量を求めた。また乾燥した牧草は２mm以下に粉砕し，牧草収穫物中の硝酸態窒素および粗タンパク質を分析した。各刈取り後に刈り取った部分から深さ15cmの土を採土管で採取し，風乾し，２mmのふるいでふるったのち，可給態窒素を分析した。

2.3　モデルの改良

上記2.2の結果から推定される，地力窒素および堆肥窒素の供給量と実測した窒素吸収量の違いを明らかにし，より確実に硝酸態窒素の低減を図れる窒素管理モデルについて考察した。

１：栽培圃場の堆肥施用前の土壌中可給態窒素（アンモニア態窒素および硝酸態窒素）を分析し

© The Ito Foundation

た。

２：栽培試験で施用した堆肥の可給態窒素およびADSON（酸性デタージェント可溶有機態窒素）を分析した。

３：地力窒素および堆肥からの窒素供給パターンを再計算した。

４：牧草の乾物収量と窒素濃度から窒素吸収量を計算した。

５：計算された窒素供給量と窒素吸収量の差を求めた。

６：地力窒素供給パターンおよび堆肥窒素供給パターンの推定式について考察した。

３．結果と考察

3.1　土壌（地力）と堆肥からの窒素供給パターンの推定による施用量の決定

試験に利用予定の圃場の土壌中可給態窒素含量は，地力窒素の少ない圃場（Ｌ圃場）では4.3mg/100gDS（乾土），窒素の多い圃場（Ｈ圃場）では7.3mg/100gDSであった。

上記の土壌中可給態窒素含量から「畑土壌可給態窒素（地力窒素）の見える化技術」の計算式を用いて地力窒素供給パターンを，「有機質資材（堆肥）窒素肥効見える化技術」の計算式を用いて一般的な牛糞堆肥からの堆肥窒素供給パターンをそれぞれ求めた（**Fig. 1**，**Fig. 2**）。

上記で求めた地力窒素供給パターンおよび堆肥窒素供給パターンが，昨年度の暖地型牧草栽培試験における牧草窒素吸収パターン（**Fig. 1**，**Fig. 2**）に見合った窒素供給量になるように，牧草の播種日を７月下旬，収穫日を播種２か月後，堆肥の施用日を播種２週間前および播種当日，堆肥施用量を０，１，２トン／10ａに決定した。

3.2　栽培試験

「うーまく」の乾物収量は，４週目と６週目は，Ｌ圃場よりもＨ圃場のほうが多い傾向を示した。Ｌ圃場では，いずれの刈取りでもＮ処理で乾物収量が少ない傾向を示した。８週目には，J2処理で多い傾向を示した。Ｈ圃場では，８週目にT2処理で少ない傾向を示した。Ｈ圃場のT2処理を除き，生育期間が長くなるにつれ，乾物収量も増加した。

「うーまく」の粗タンパク質含有率は，Ｌ圃場，Ｈ圃場ともに，４週目に22%以上と高く，６週目は15%程度，８週目は13%程度に減少した。圃場間，処理区間で明確な違いは見られなかった。

「うーまく」の硝酸態窒素含有率は，いずれの刈取りでも，Ｌ圃場よりもＨ圃場のほうが高かった。Ｌ圃場では，Ｎ処理では４週目が最も低く，その後高くなったが，T1およびT2処理では，６週目が高くなった。T2，J1およびJ2処理では，８週目が最も低い値を示した。Ｈ圃場では，いずれの処理も８週目が最も低い値を示した。

「うーまく」の窒素収量は，Ｌ圃場では処理による差は認められなかったが，Ｈ圃場では，８週目にT2処理が少なかった。Ｈ圃場のT2処理を除き，生育期間が長くなるにつれ，窒素収量も増加した。

土壌可給態窒素のうち，硝酸態窒素は，Ｌ圃場では，４週目にＮ処理，T2処理，J2処理が，T1処理とJ1処理よりも高い傾向を示した。いずれの処理でも４週目が最も多く，その後減少した。T1処理およびJ1処理では６週目のほうが８週目よりも高い値を示した。Ｈ圃場では，４週目はJ1およびJ2処理が高い値を示した。いずれの処理も４週目が最も高い値を示し，８週目が最も低い値を示した。

土壌可給態窒素のうち，アンモニア態窒素は，Ｌ圃場では，６週目にＮ処理で高い値を示した。J2処理では４週目（0.84mg/100gDS）と６週目（0.83mg/100gDS）が同程度であったが，他の処理では，６週目が最も高い値（0.85–1.09mg/100gDS）

© The Ito Foundation

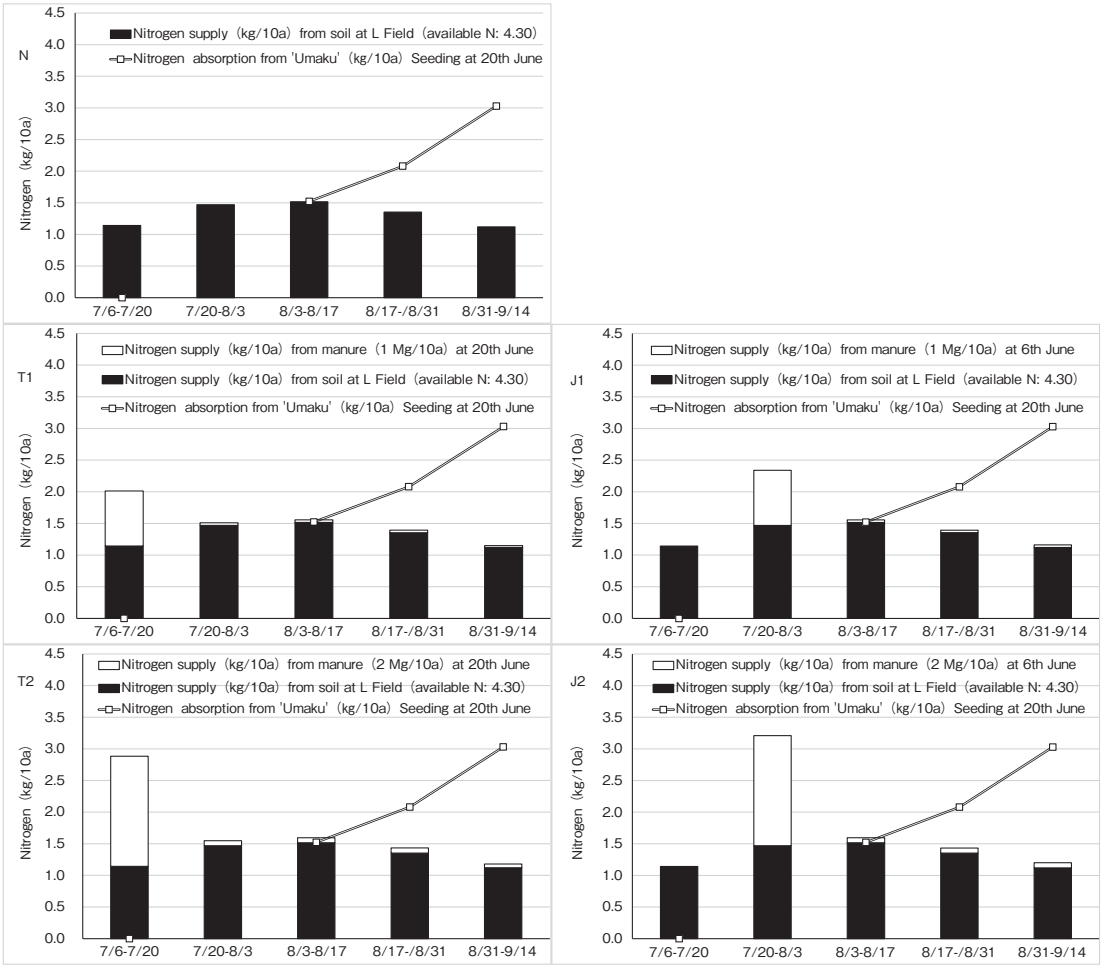

Fig. 1　Estimated inorganic nitrogen supply and absorption in low soil fertility field（L field）. N：No manure. T1：1 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. T2：2 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. J1：1Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day. J2：1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day.

を示した。H圃場では，４週目のT2処理（1.01mg/100gDS）およびJ2処理（0.96mg/100gDS）において高い値を示した。いずれの処理でも４週目が最も高い値を示し，８週目が最も低い値を示した。

3.3　モデルの改良

栽培圃場の堆肥施用前（６月22日採取）の土壌中可給態窒素は，L圃場では硝酸態窒素が0.87mg/100gDS，アンモニア態窒素が6.26mg/100gDSだった。H圃場では硝酸態窒素が1.26mg/100gDS，アンモニア態窒素が6.36mg/100gDSだった。栽培試験で施用した堆肥の可給態窒素は，硝酸態窒素が0.10％DM，アンモニア態窒素が0.03％DMだった。ADSONは9.8mgN/gDMだった。これらの分析結果を元に，地力窒素および堆肥からの窒素供給パターンを再計算した結果を**Fig. 3**と**Fig. 4**に示した。さらに，牧草の乾物収量と窒素濃度から窒素吸収量を計算し，再計算し

© The Ito Foundation

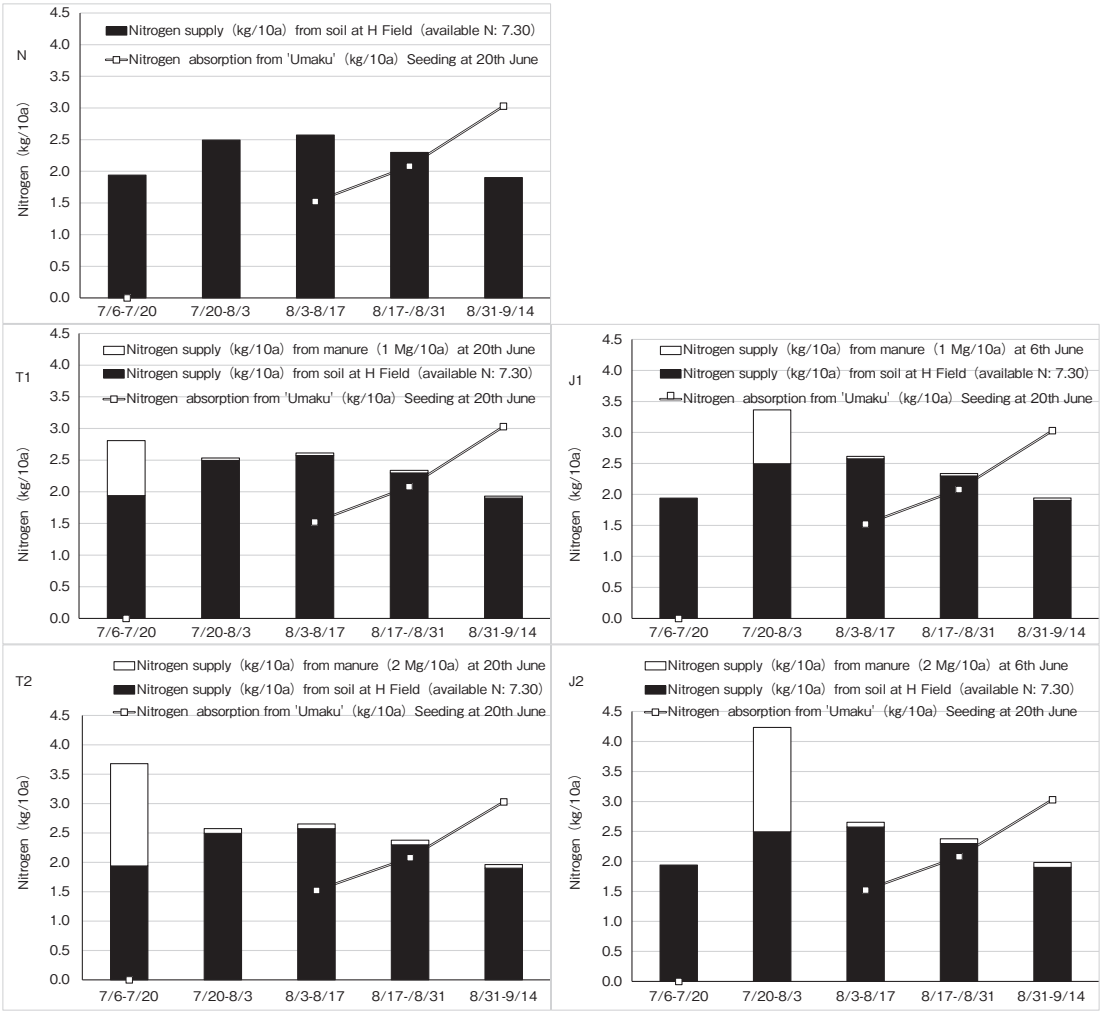

Fig. 2　Estimated inorganic nitrogen supply and absorption in high soil fertility field (H field). N: No manure. T1: 1 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. T2: 2 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. J1: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day. J2: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day.

た窒素供給量と計算した窒素吸収量からその差を求め，**Fig. 5**に示した。窒素供給量と窒素吸収量の差は，播種から播種４週目までの間（７月23日～８月18日）にはＬ圃場のほうが正の値が大きい傾向を示し，播種４週目から６週目までの間にはＬ圃場がＨ圃場よりも負の値が小さい傾向を示した。その一因として，Ｌ圃場のほうがＨ圃場よりも牧草による吸収量が少なかったことがあげられる。土壌中アンモニア態窒素は，Ｌ圃場，Ｈ圃場ともに堆肥施用前は６mg/100gDS以上と非常に高かったものの，播種４週目にはいずれの圃場，処理でも１mg/100gDS以下まで下がっていた。一方，土壌中硝酸態窒素は，Ｌ圃場，Ｈ圃場ともに堆肥施用前よりも播種４週目のほうが高くなっていた。これは，すき込んだ前作イタリアンライグラスの分解に伴いアンモニア態窒素が放出され，その後土壌中の硝化作用によって硝酸態窒素が増えたためと考えられる。また，Ｌ圃場では，

© The Ito Foundation

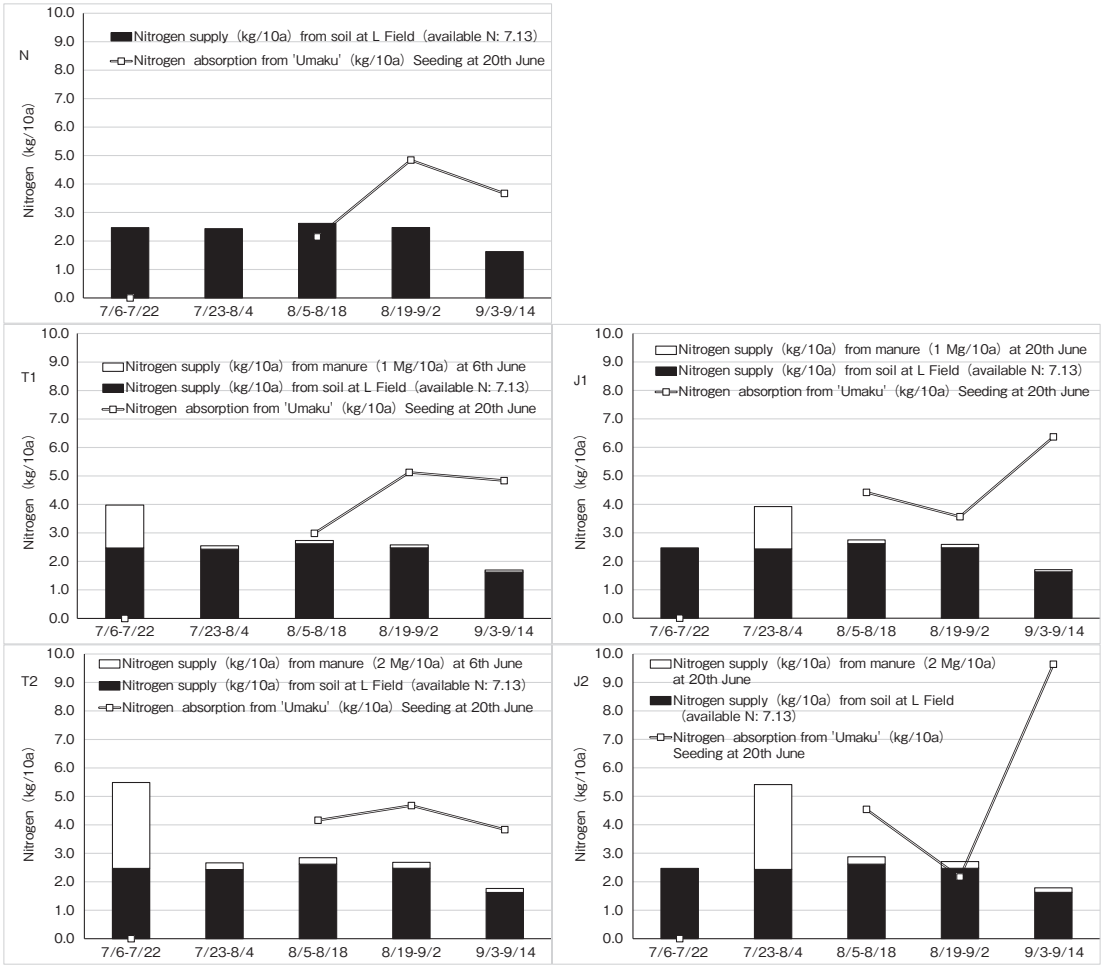

Fig. 3　Improved inorganic nitrogen supply estimation and measured absorption in low soil fertility field (L field). N: No manure. T1: 1 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. T2: 2 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. J1: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day. J2: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day.

播種４週目から６週目にかけてアンモニア態窒素が増加する傾向を示しており，牧草中硝酸態窒素も同様の推移を示していた。したがって，前作イタリアンライグラスが播種後も分解に伴って主にアンモニア態窒素を放出し，窒素供給源として大きな役割を果たしていた可能性が考えられ，窒素の供給について，前作の残渣を考慮する必要があると考えられた。

牧草中硝酸態窒素濃度は高く，４週目以降も低下しているものの，その減少幅は，収量の増加に伴う希釈効果よりも小さい。したがって，播種４週目から８週目の期間においても，十分な窒素供給により，牧草の生育に必要な窒素は不足していなかったと考えられた。また，H圃場のほうが播種４週目には牧草の乾物収量は多かったにもかかわらず牧草中硝酸態窒素濃度は高かったことから，播種４週目までの窒素収支は，L圃場よりもH圃場で供給過多だったと考えられるが，計算により求めた窒素収支は，L圃場のほうが供給過多であった。これは，供給量を予測する推定式が可

© The Ito Foundation

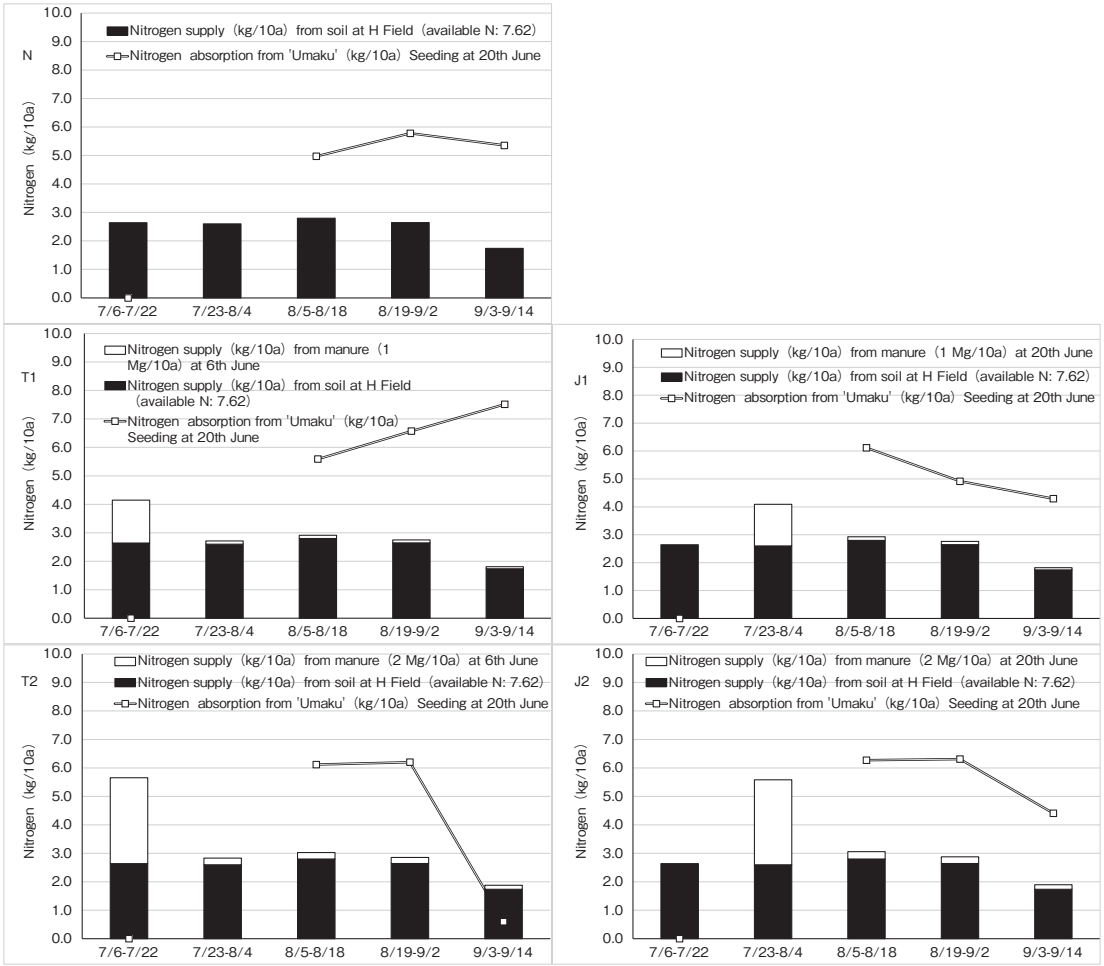

Fig. 4　Improved inorganic nitrogen supply estimation and measured absorption in high soil fertility field (H field). N: No manure. T1: 1 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. T2: 2 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. J1: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day. J2: 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day.

給態窒素の違いを正確に反映できていなかったためと考えられた。

4．要　　約

低硝酸態窒素と高粗タンパク質窒素の両立が難しい暖地型牧草について，地力窒素および施用堆肥からの窒素供給が過剰にならないよう，近年畑作向けに開発された「畑土壌可給態窒素（地力窒素）の見える化技術」と「有機質資材（堆肥）窒素肥効見える化技術」を利用して供給量の推定とそれに基づく堆肥施用をした栽培試験を実施した。実測した窒素吸収量および収穫物の硝酸態窒素濃度から，見える化技術の有効性について考察した。窒素の供給について，前作の残渣を考慮する必要があること，地力窒素供給パターン推定式については可給態窒素の違いを正確に反映できるように改良が必要だと考えられた。

© The Ito Foundation

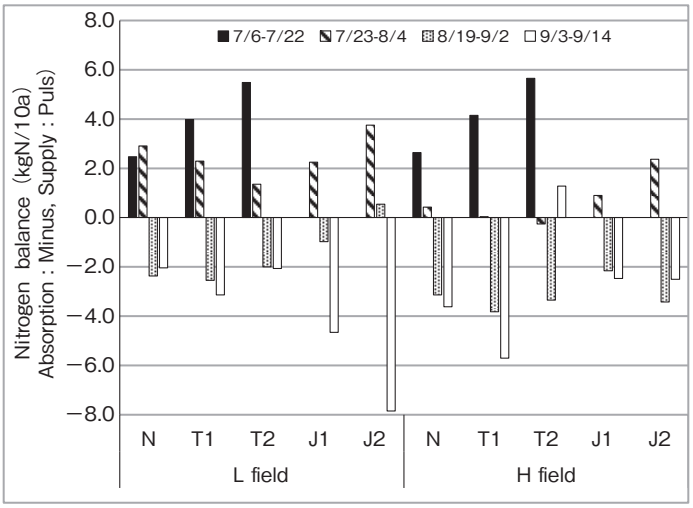

Fig. 5　Inorganic nitrogen balance calculated from improved supply estimation (Plus) and measured absorption (Minus) in low and high soil fertility field (L and H field). N : No manure. T1 : 1 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. T2 : 2 Mg/10 a manure application at two weeks before seeding. J1 : 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day. J2 : 1 Mg/10 a manure application, just before seeding at the seeding day.

文　献

1）　上薗一郎，餅田利之，有村恭平，古江広治：可給態窒素簡易判定法を活用した施肥窒素量の算定ツール，日本土壌肥料学会講演要旨集，**58**，306，2012.

2）　古賀伸久，仁科一哉，小林創平，望月賢太，新美洋，井原啓貴，山口典子，山根剛，草場敬：酸性デタージェント可溶有機態窒素含量を導入した有機質資材窒素無機化予測モデルの構築，日本土壌肥料学雑誌，**74**(2)，106～114.

3）　上薗一郎，加藤直人，森泉美穂子：80℃16時間水抽出液のCOD簡易測定による畑土壌可給態窒素含量の迅速評価，日本土壌肥料学雑誌，**81**，252～255，2010.

© The Ito Foundation

筋肉タンパク質合成・分解を制御する植物性成分による畜肉生産の向上研究

Studies on increased livestock production through regulation of protein synthesis and degradation by plant factors

佐　藤　隆一郎
（東京大学大学院農学生命科学研究科）

Ryuichiro Sato
(Graduate Scholl of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo)

We have discovered a novel function of the bile acid receptor TGR5 as a molecule that regulates skeletal muscle mass, and have searched for food ingredients that enhance muscle mass. We have also found that several plant components have TGR5 agonistic activity, resulting in increased protein synthesis. Effective use of these ingredients is expected to increase feed efficiency and increase muscle mass in livestock meat production. In particular, we searched for new fragrance ingredients with TGR5 agonist activity and evaluated their activity.

HEK293 cells were transfected with a human TGR5 expression vector and a reporter gene and then cultured for 24 hours. Various fragrance components (dissolved in DMSO) were added to the culture medium. After 5 hours, the cells were harvested and activity was quantitatively evaluated using luciferase assay. Among 163 fragrance components, α-ionone and nootkatone were found to have good agonist activity. Furthermore, when each derivative compound was prepared and the agonist activity was evaluated, almost the same level of agonist activity was found in the derivatives. GPCR agonists are usually limited compounds, and TGR5, which binds compounds with a wide variety of structures, can be said to be a rare GPCR. The fact that the present study also showed agonistic activity in small-molecule fragrance compounds suggests that TGR5 has pockets that bind compounds of a wide range of structures.

In this study, human TGR5 agonist activity was found in multiple fragrance ingredients, but further analysis is required to determine whether these have agonistic activity towards bovine or porcine TGR5. Human and bovine TGR5 retain 87% amino acid homology, and these fragrance compounds may also have agonist activity.

1．目　　的

世界的な人口増加により，十分な食料タンパク質の供給が危ぶまれる“Global protein crisis”が叫ばれている。畜肉生産による畜肉タンパク質供給は，穀物生産による植物性タンパク質供給よりエネルギー効率の低いことから，植物性食料の有用性が指摘されている。しかし，国民が豊かな食

© The Ito Foundation

生活を享受するには畜肉の安定的な供給を実現することは不可欠であり，その生産効率を上昇させることが必要である。我々は骨格筋量を制御する分子として胆汁酸受容体TGR5の新規機能を発見し[1,2]，基礎研究を基盤に筋量を増強させる食品成分の探索を行ってきた。複数の植物性成分にTGR5アゴニスト活性を認め，その結果タンパク質合成が亢進する事実を明らかにしてきた[3,4]。これらの成分を有効に用いることにより，畜肉生産において飼料効率を上昇させ，筋量増加をもたらす基盤研究を行った。本研究では，新たなTGR5アゴニスト活性を有する香料成分の探索を行い，その成分の活性評価を行った。

2．方　法

HEK293細胞にヒトTGR5発現ベクター，レポーター遺伝子を導入した後に24時間培養し，各種香料成分（DMSOに溶解）を培地に添加し，５時間後に細胞を回収し，ルシフェラーゼアッセイ法にて活性を定量評価した。具体的には，HEK293は胆汁酸受容体を発現していないことより，ヒトTGR5発現ベクターを遺伝子導入し，さらにcAMP response element（CRE）配列を４回繰り返した人工応答配列をluciferase遺伝子上流に組み込んだレポーター遺伝子を同時に細胞に導入した。培地に添加した化合物がヒトTGR5に結合し，アゴニストとして作用すると細胞内のcAMPが上昇し，cAMP依存性タンパク質キナーゼを活性化し，細胞内のCRE-binding protein（CREB）をリン酸化・活性化し，luciferase遺伝子発現を上昇させる。この評価系により，アゴニスト活性を定量した（**Fig. 1**）。

3．結果と考察

163種類の香料成分についてTGR5アゴニスト活性を評価した。その結果，α イオノン，ヌートカトンに良好なアゴニスト活性を見出した（**Fig. 2A**）。TGR5の内因性リガンドである胆汁酸の中でもアゴニスト活性の高いケノデオキシコール酸CDCAと活性の比較を行った[5]。培地にそれぞれ10，30，100 μMの化合物を添加した際に，濃度依存的にルシフェラーゼ活性が上昇した（**Fig. 2B**）。α イオノン，ヌートカトンともにアゴニスト活性はCDCAと同等か，それ以上のレベルであった。また，本アッセイ系において，ヒトTGR5を発現させないとルシフェラーゼ活性は検出されず，この活性が受容体を介したものであることを示している（**Fig. 2C**）。

α イオノンについてはその誘導体３種類（α メチルイオノン，α アリルイオノン，α イロン）についてもTGR5アゴニスト活性を評価した（**Fig. 3A**）。その結果，α メチルイオノンはα イオノンに比較して活性がやや低かったものの，いずれの誘導体もアゴニスト活性を有することが分かった

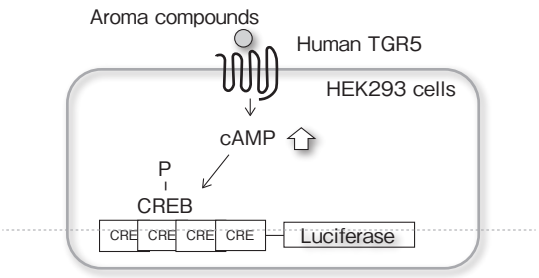

Fig. 1　Scheme of TGR5 agonist assay

© The Ito Foundation

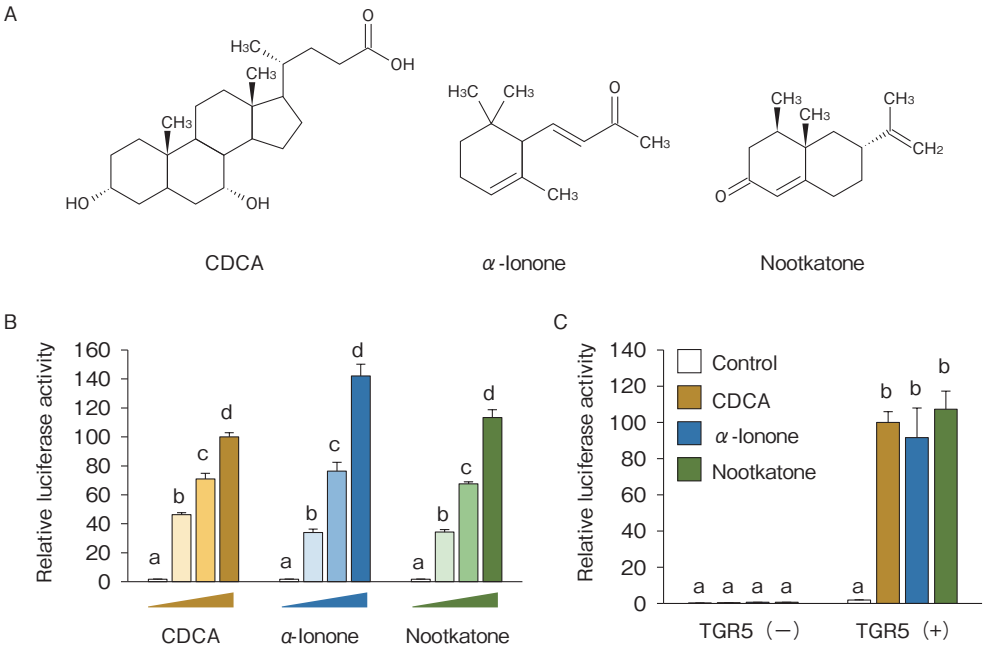

Fig. 2　α-Ionone and nootkatone activate TGR5. (A) Structure of CDCA, α-ionone, and nootkatone. (B) TGR5 agonist activity was measured by using HEK293 cells transfected with the CRE-driven luciferase reporter plasmid and hTGR5 expression plasmid. The concentration of each compound is 0, 10, 30, and 100 μM (n=3). (C) CRE-driven luciferase activity was measured by using HEK293 cells with or without hTGR5. All compounds were treated at 100 μM (n=3)). The values are presented as mean ± SD. The luciferase activity of the CDCA (100 μM) treatment group was set at 100. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA (Tukey-Kramer post hoc test). Different letters denote statistical significance in each treatment group ($p<0.05$).

(**Fig. 3B**)。

同様にヌートカトンの２種類の誘導体（ジヒドロヌートカトン，ジデヒドロヌートカトン）についても評価を行った（**Fig. 3C**)。ジヒドロヌートカトンはやや高活性を示し，２種類の誘導体はいずれもTGR5アゴニスト活性を有することが明らかになった（**Fig. 3D**)。

また，αイオノンの異性体であるβイオノンについてもTGR5アゴニスト活性を評価したが，その活性はαイオノンに比べて低かった（**Fig. 4A，B**)。しかし，濃度依存的にルシフェラーゼ活性を上昇させることより，低活性アゴニストであることを確認した。

上記のいずれの香料成分も内因性アゴニストのCDCAと比較して小分子であり，これら化合物が強いアゴニスト活性を有することは予想していなかった。また，ヌートカトンについてはAMPキナーゼ活性化剤として機能し，マウス投与実験では持久力を上昇させることが報告されている。骨格筋に対して複数の機能を有する化合物として興味深い。

TGR5は７回膜貫通型Ｇタンパク質共役受容体（GPCR）の一つであり，これまでの報告から，小腸・大腸のＬ細胞において胆汁酸を結合するとインクレチンGLP-1分泌を促し，糖代謝改善効果を発揮することが報告されている[6]。同時に，脂肪細胞においては熱産生を促し，抗肥満効果を発揮することも報告されている。我々は，骨格筋に

© The Ito Foundation

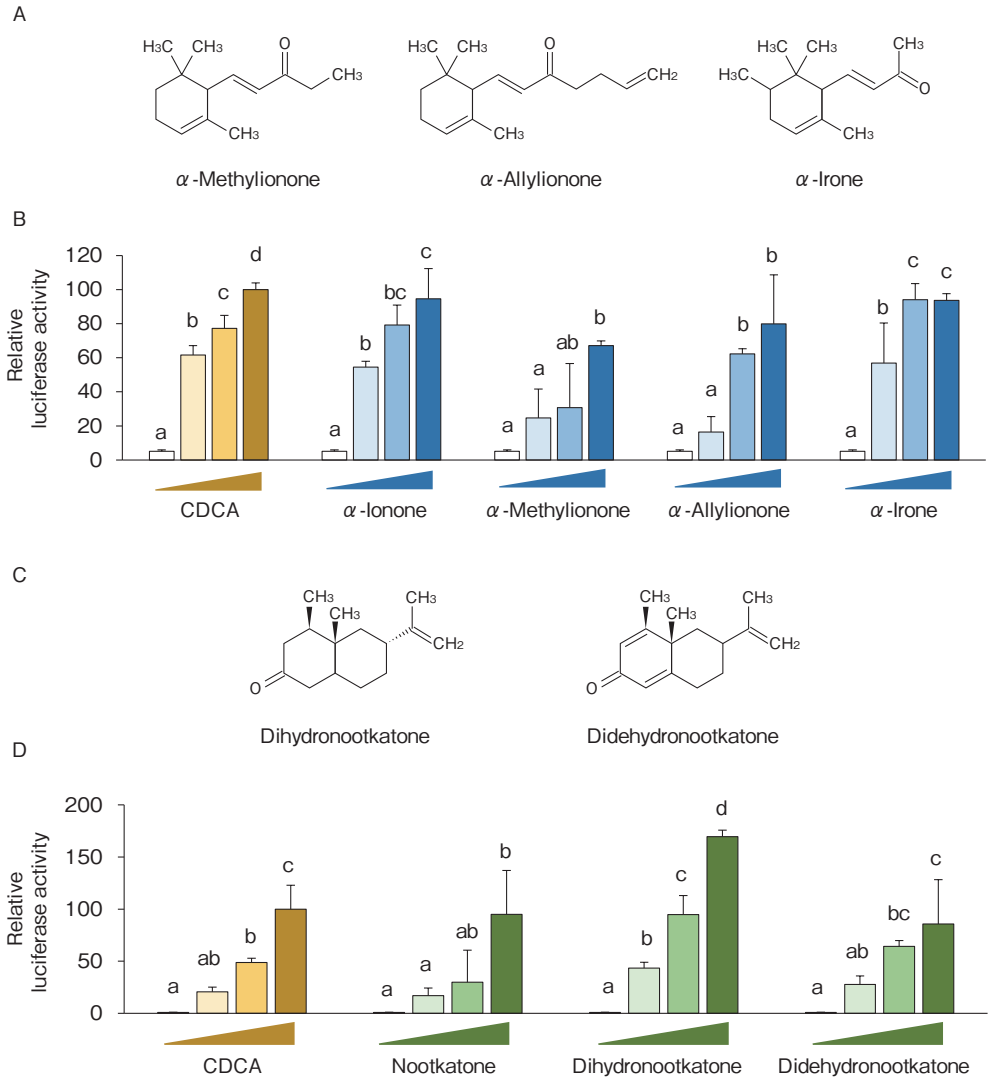

Fig. 3　Derivatives of α-ionone and nootkatone activate TGR5. (A) Structure of α-ionone derivatives. (B) TGR5 activation was evaluated using HEK293 cells transfected with the CRE-driven luciferase reporter plasmid and hTGR5 expression plasmid. The concentration of CDCA, α-ionone, and their derivatives is 0, 10, 30, and 100 μM (n=3). (C) Structure of nootkatone derivatives. (D) TGR5 activation was evaluated using HEK293 cells transfected with the CRE-driven luciferase reporter plasmid and hTGR5 expression plasmid. The concentration of CDCA, nootkatone, and their derivatives is 0, 10, 30, and 100 μM (n=3). The values are presented as mean ± SD. The luciferase activity of the CDCA (100 μM) treatment group was set at 100. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA (Tukey-Kramer post hoc test). Different letters denote statistical significance in each treatment group ($p<0.05$).

おいてTGR5が筋量増強を促す作用を有することを報告してきた。

さらに，TGR5に結合してアゴニスト活性を示す食品成分の探索も行ってきた。柑橘成分のノミリンを見出し[3]，マスリン酸をはじめとする複数のトリテルペン類[4,7]にもアゴニスト活性がある。通常GPCRのアゴニストは限られた化合物であり，多岐な構造を有する化合物を結合する

© The Ito Foundation

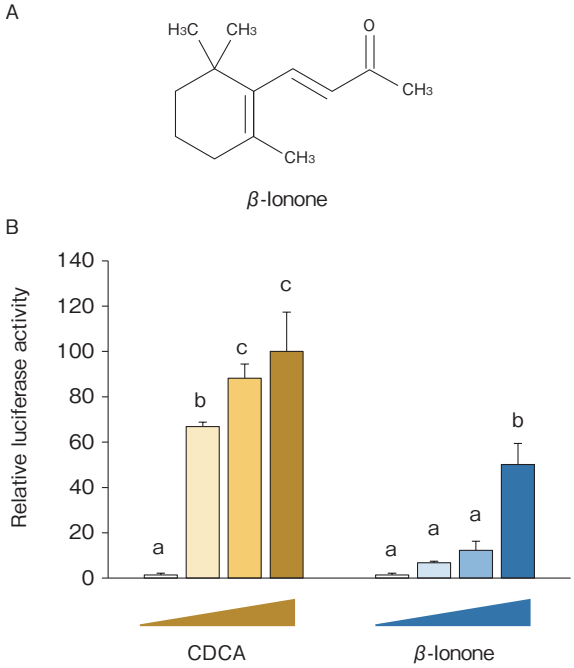

Fig. 4　Effect of β-ionone on TGR5 activity. (A) Structure of β-ionone. (B) TGR5 agonist activity was measured by using HEK293 cells transfected with the CRE-driven luciferase reporter plasmid and hTGR5 expression plasmid. The concentrations of CDCA and β-ionone are 0, 10, 30, and100 μM (n=3). The values are presented as mean±SD. The luciferase activity of the CDCA (100 μM) treatment group was set at 100. Statistical analyses were conducted using one-way ANOVA (Tukey-Kramer post hoc test). Different letters denote statistical significance in each treatment group ($p<0.05$).

TGR5は稀有なGPCRといえる。本研究により，小分子である香料化合物にもアゴニスト活性が見出されたのは，TGR5が広範な構造の化合物を結合するポケットを有することを示唆している。

これまでの解析から，TGR5アゴニスト活性を有する化合物はタンパク質合成を促進し，動物実験では筋量が増強することを確認している[4,8]。本研究で見出した香料化合物についても，細胞培養実験，動物実験で筋量増強効果を検証する必要がある。本研究ではヒトTGR5をHEK293細胞に発現させ，アゴニスト活性を有する化合物の探索を行った。畜肉生産の向上を考えたときに，牛，豚等のTGR5を用いたアッセイ系で活性を再評価することは必要と考えられる。ヒトと牛のTGR5は87%アミノ酸相同性を保持している。またこれまでの研究から，柑橘成分ノミリンのヒトTGR5への結合には，77番目のGln，80番目のArg，89番目のTyrが必須であることを確認している[9]。牛TGR5はこの３アミノ酸をそれぞれ保持しており，ヒトTGR5同様に香料成分を結合する可能性がある。ただし，香料成分は他のアミノ酸を結合に必要としていることも想定されることから，今後は直接的な結合実験を実施する必要がある。

© The Ito Foundation

４．要　約

骨格筋を構成する筋管細胞表面には複数のGPCRが発現している。なかでもアドレナリン類を結合するβ２アドレナリン受容体は，リガンドを結合すると細胞内cAMPを上昇させ，下流のシグナル伝達を介して筋量を増加させる。胆汁酸受容体TGR5は全身の各組織に発現しており，骨格筋での機能は不明であったことより我々は骨格筋にヒトTGR5を過剰発現させたトランスジェンニックマウスを開発した。TGR5はβ２アドレナリン受容体同様，細胞内cAMPを上昇させることより，筋量増強効果が期待されたが，トランスジェニックマウスで筋量増加が確認された。以上の知見より，TGR5リガンド活性を有する化合物には筋量上昇効果が期待できることから解析を進めた。これまでに柑橘成分ノミリン，マスリン酸をはじめとするトリテルペン類にアゴニスト活性が見出されており，本研究では香料成分にアゴニスト成分の探索を行った。

HEK293細胞にヒトTGR5発現ベクター，レポーター遺伝子を導入した後に24時間培養し，各種香料成分（DMSOに溶解）を培地に添加し，５時間後に細胞を回収し，ルシフェラーゼアッセイ法にて活性を定量評価した。163種類の香料成分から，αイオノン，ヌートカトンに良好なアゴニスト活性を見出した。さらにそれぞれの誘導体化合物を用意し，アゴニスト活性を評価したところ，誘導体にもほぼ同程度のアゴニスト活性を見出した。通常GPCRのアゴニストは限られた化合物であり，多岐な構造を有する化合物を結合するTGR5は稀有なGPCRといえる。本研究により，小分子である香料化合物にもアゴニスト活性が見出されたのは，TGR5が広範な構造の化合物を結合するポケットを有することを示唆している。

本研究により複数の香料成分にヒトTGR5アゴニスト活性が見出されたが，これらが牛，豚等のTGR5のアゴニスト活性を有するかについてはさらなる解析が必要である。ヒトと牛のTGR5は87％アミノ酸相同性を保持しており，香料成分がアゴニスト活性を有することが期待される。

文　献

1）Sasaki, T., *et al.*：The exercise-inducible bile acid receptor Tgr5 improves skeletal muscle function in mice, *J. Biol. Chem.*, **293**, 10322～10332, 2018.
2）Sasaki, T., *et al.*：Muscle-specific TGR5 overexpression improves glucose clearance in glucose intolerant mice, *J. Biol. Chem.*, **296**, 100131, 2021.
3）Ono, E., *et al.*：Anti-obesity and anti-hyperglycemic effects of the dietary citrus limonoid nomilin in mice fed a high-fat diet, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **410**, 677～681, 2011
4）Murata, S, *et al.*：Maslinic acid activates mTORC1 and human TGR5 and induces skeletal muscle hypertrophy, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **85**, 311～2321, 2021.
5）Sasaki, T., *et al.*：Identification of α-ionone, nootkatone, and their derivatives as TGR5 agonists, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **653**, 147～152, 2023.
6）Thomas, C., *et al.*：TGR5-mediated bile acid sensing controls glucose homeostasis, *Cell Metab.*, **10**, 167～177, 2009.
7）Sato, R.：Nomilin as an anti-obesity and anti-hyperglycemic agent, *Vitam. Horm.*, **91**, 425～439, 2013.
8）Horiba, T., *et al.*：Dietary obacunone supplementation stimulates muscle hypertrophy, and suppresses hyperglycemia and obesity through the TGR5 and PPARγ pathway, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **463**, 846～852, 2015.
9）Sasaki, T., *et al.*：Identification of key amino acid residues in the hTGR5-nomilin interaction and construction of its binding model, *PLoS ONE*, **12**, e0179226, 2017.

© 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（Ⅱ）

Efficient fattening by improving maternal milk production（Ⅱ）

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 previous study, equol enhanced milk production ability of bovine mammary epithelial cells（MECs）in vitro. Equol is a metabolite of daidzein, a soy isoflavone, which is produced by intestinal bacteria. The metabolic conversion ability of equol from daidzein depends on intestinal bacteria, thus there are individual differences. In addition, equol is easy to be conjugated with glucuronic or sulfuric acid in the body and its bioactivity in terminal tissue is decreased. In this study, to avoid the conjugation and decreased bioactivity, we focused on percutaneous absorption and directly applicated equol onto lactating udders. For in vitro experiments, MECs were cultured and treated with equol depending on concentrations. For in vivo experiments, 1 ml of 200 μM equol in 70% ethanol was topical applicated to goat udders for 5 days. The results showed that MECs treated with equol at 5–50 μM for 3 days increased the amount of claudin-3, which is a main component of less-permeable tight junctions during lactation, while equol treatment decreased the amount of claudin-4, which is increasing during inflammation and causes leakage at tight junctions. The topical application of resveratrol to udders decreased somatic cell counts in milk after days 3–5, which means equol enhanced in vivo tight junction barrier. In addition, equol treatment enhanced STAT5 activity, which is a transcriptional factor for milk production, in cultured MECs and milk yield of in vivo mammary glands. To investigate whether improving maternal milk production contributes to the growth of suckling offspring, maternal udders were sprayed by equol for 3 weeks. However, there were no differences between groups. In conclusion, it revealed that topical application of equol to udders enhances milk production in lactating mammary glands.

1．目　　的

肉牛や豚は，分娩直後から離乳前までの成長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)]。先行研究ではウシ乳腺上皮細胞を用いたin vitro乳分泌モデルにおいてイソフラボンの１つであるエクオールが乳産生促進する転写因子であるSTAT5を活性し，乳産生能力を向上させることが明らかになった[2)]。エク

© The Ito Foundation

オールは大豆に含まれるダイズインの代謝産物であり，摂取後，腸内細菌による分解などを経て産生される。そのため，エクオールの産生能力は個体差が非常に大きい。また，産生されたエクオールはグルクロン酸抱合体や硫酸抱合体の形成により標的組織での生理活性が低減する。前年の研究において，ブドウに含まれるポリフェノールであるレスベラトロールを乳腺組織へ直接的に作用させるため，塗布による経皮吸収経路に着目した。分子量228であるレスベラトロールは培養モデルにおいてヤギ乳腺上皮細胞の抗菌因子産生やタイトジャンクション（TJ）バリア機能を向上させ，ヤギ乳房への塗布により，生体レベルでもその効果が確認された。エクオールの分子量は242であり，経皮吸収の分子量限界は500である[3)]。そこで本研究では，乳腺上皮細胞の乳産生能力を向上しうるエクオールを乳房へ塗布し，子の増体および免疫機能への影響を検証した。

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.C22-25）。

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，１mg/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ウェルプレート上に播種し，増殖培地（５％ウシ胎児血清，５μg/ml ITS-X，10ng/ml上皮成長因子，５mM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％ウシ胎児血清，５μg/ml ITS-X，１ng/ml上皮成長因子，５mM酢酸ナトリウム，１μg/mlプロラクチン，１μM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，エクオール（Toronto Research Chemicals）を添加し，その影響を調べた。なお，溶媒コントロールとして0.05％　DMSOを使用した。

2.2　カラヤギ乳房への塗布試験

離乳後のトカラヤギ乳房へ200μMエクオールを含む70％エタノールを１ml搾乳後に５日間塗布した。前処理として溶媒である0.2％DMSOを含む70％エタノールを３日間塗布した。また，分娩後７日目以降の母トカラヤギ乳房へ200μMエクオールを含む70％エタノールをスプレーにより噴霧した（約1.1ml／乳房）。噴霧処理は３週間行い，分娩後２ヶ月で離乳した。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ELISAに供試した。

2.3　ウェスタンブロッティング

エクオ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，Cell Signaling Technologyから購入した抗pSTAT5，抗STAT5抗体，Thermo Fisher Scientific社から購入した抗claudin-3，抗claudin-4抗体およびGeneTex社から購入した抗α-tubulin抗体を使用した。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IL-1β，TNF-α，INF-γ濃度を測定した。各抗体は合成ペプチドをウサギへ免疫して作製し，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）を用いた。また，サンドウィッチELISAによってIgA，IgG濃度を測定した。抗goat-IgA，抗goat-IgG抗体およびHorseradish peroxidase標識した抗goat-IgA，抗goat-IgG抗体はBethyl Laboratoriesから購入した。発色にはTMBを用いた。

2.5　統計解析

数値データはn＝5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，in vitro実験は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を3回以上行った。

3．結果と考察

各濃度のエクオールを3日間処理したところ，5-50 μM処理群においてクローディン-3量がコントロール群の1.3倍以上に増加していた（**Fig. 1**）。また，50 μM処理群ではクローディン-4量が有意に減少していた。さらに，10，50 μM処理群ではpSTAT5量がそれぞれコントロール群の2倍，2.5倍に増加していた。以上より，エクオールはヤギ乳腺上皮細胞においてもクローディン量を調節し，STAT5を活性化することが判明した。続いて離乳後ヤギ乳房へのエクオール塗布が及ぼす影響を調べた（**Fig. 2**）。乳量はエクオール塗布3日後と5日後において，塗布前より1.2倍に増加していた。また，SCCとIgG濃度は塗布3日後と5日後において有意に低下していた。

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し，一方で，乳房炎や離乳時にはクローディン-4の増加とともにバリア機能が低下する[4,5]。また，SCCには主に好中球やマクロファージなどの白血球が含まれており，乳腺上皮細胞の細胞間隙を通過して乳腺内腔へ遊走する。さらに，乳中IgGは大半が血液由来であり，これも主に細胞間隙を介して乳中へ移行する[6]。培養モデルにおいてエクオール処理によるクローディン-3の増加とクローディン-4の減少が確認され，in vivo実験におい

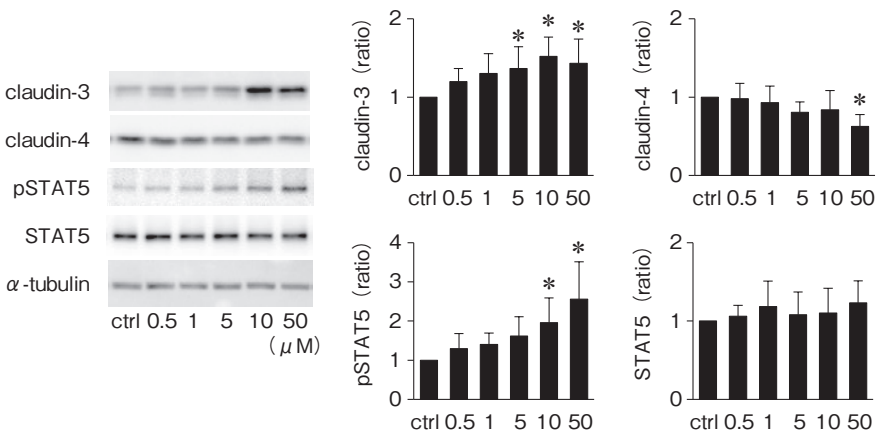

Fig. 1　Influence of equol on claudins and STAT5 in goat mammary epithelial cells (GMECs). GMECs were treated with equol at each concentration for 3 days. The bands show claudin-3, claudin-4, pSTAT5, STAT5, and α-tubulin by western blot. The graph shows the result for the densitometry analysis of the bands. Alpha-tubulin was used as an internal control. The data are presented as the mean ± SD (n = 8). Asterisks show a significant difference ($p<0.05$ versus control).

© The Ito Foundation

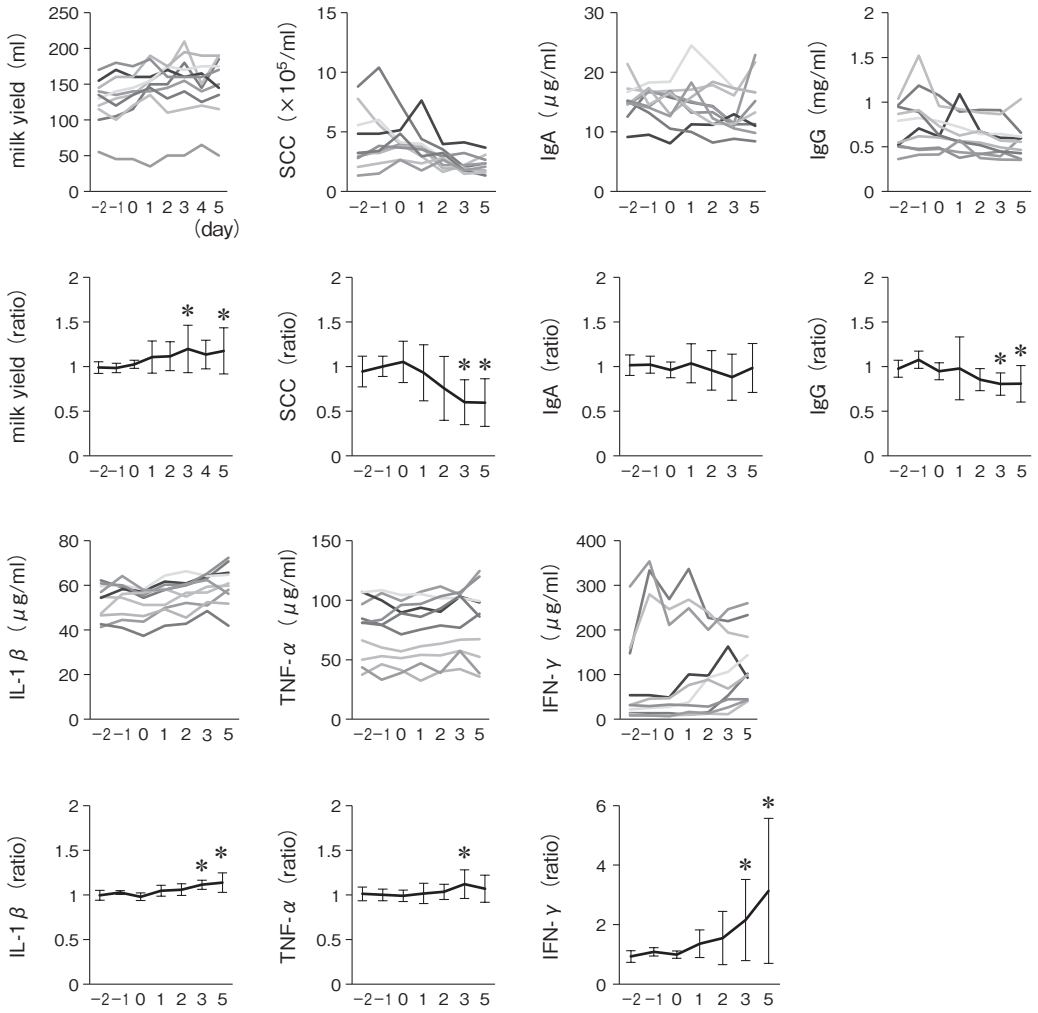

Fig. 2　Influence of topical application of equol to lactating goat udders.
One ml of 200 μM equol in 70% ethanol containing 0.2% dimethyl sulfoxide was applicated to the udder of lactating goats on days 0–4 after milking. The upper graphs show changes in individual udders and the lower graphs show changes in the relative values compared with the average of the pre-treated (days −2 and 0) controls. The data are presented as the mean ± SD (n = 10). Asterisks show a significant difference ($p < 0.05$ versus pre-treatment).

てSCCとIgG濃度が低下していた。そのため，エクオール塗布は乳腺TJバリア機能を強化することが判明した。IgAは乳腺上皮細胞のエンドサイトーシスを介して乳中へ分泌されるため，塗布による変化が観察されなかったと考えられる。さらに，エクオールは乳成分産生を促進する転写因子であるSTAT5の活性化とともに，塗布による乳量の増加も認められたため，酪農生産として乳質・乳量の向上に寄与することが期待される。

最後に，食肉産業への発展として母体の乳産生調節による子の増体および免疫機能への影響を調べた。分娩直後の初乳は常乳と大きく成分が異なる。そのため，分娩後７日目以降から処理を開始した。また，乳房への塗布作業を簡便にするためスプレーを用いた噴霧処理に変更した。噴霧処理３週間後（分娩後１ヶ月：１M）および分娩後

© The Ito Foundation

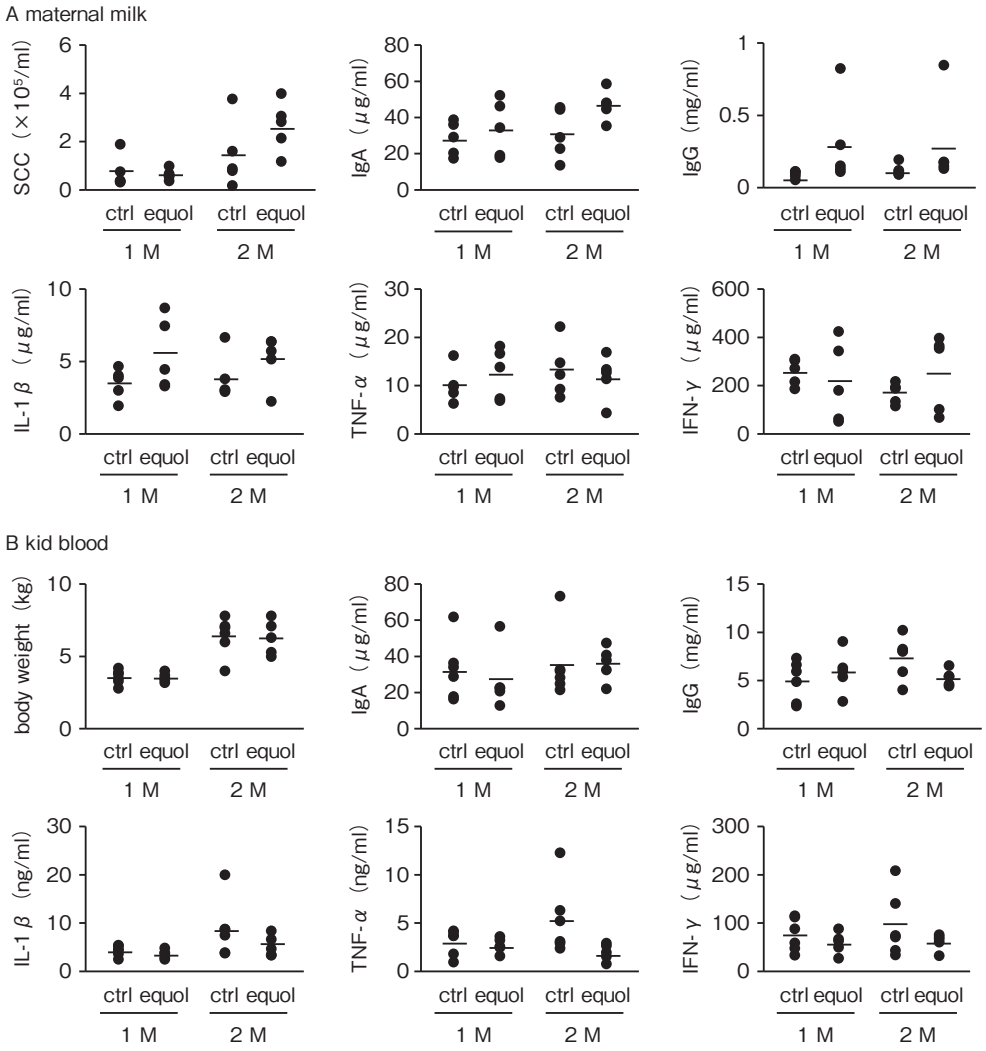

Fig. 3　Influence of equol spraying to lactating goat udders on growth of suckling offspring.
One ml of 200 μM equol in 70% ethanol containing 0.2% dimethyl sulfoxide was applicated to the udder of maternal goats 1 week after parturition for 3 weeks. Graphs showed each value at a month (1M) and 2 months (2M) after birth (n=5 or 6). Cnotrol group (ctrl) was applicated only vehicle (70% ethanol containing 0.2% dimethyl sulfoxide).

２ヶ月（２M）における母ヤギ乳汁と子ヤギ血液を採取し，免疫グロブリン濃度やサイトカイン濃度を測定した（**Fig. 3**）。離乳後ヤギ乳房へのエクオール塗布では乳中サイトカイン濃度への変化が認められたが，３週間の噴霧処理では乳中のSCCや子の体重および各濃度に有意差は認められなかった。今後，サンプル数を増やすとともに疾病発症率などを追跡し，エクオールによる効果を見極めていく必要がある。

4．要　約

本研究では，母体の乳生産向上による肥育効率の改善を目指し，乳腺上皮細胞の乳産生能力を向上しうるエクオールを乳房へ塗布し，子の増体および免疫機能への影響を検証した。まず，ヤギ乳腺上皮細胞の培養モデルを用いてエクオールがタ

© The Ito Foundation

イトジャンクション（TJ）と乳生産を促進する転写因子に及ぼす影響を調べた。その結果，エクオール処理によって，泌乳期乳腺TJの主要タンパク質であるクローディン-3量の増加と炎症時のバリア機能の低下に関与するクローディン-4量の減少が判明した。また，STAT5の活性化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，200 μMエクオールを含む70%エタノール１mlを泌乳期ヤギ乳房へ５日間塗布した。その結果，塗布３日後には乳中体細胞数の低下や乳量の増加も認められ，エクオ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。最後に，分娩７日後から３週間乳房へのスプレーによる噴霧処理を行い，子の増体や免疫機能への影響を調べたが，統計的な有意差は認められなかった。以上より，乳房へのエクオール塗布は乳腺における乳産生やTJバリア機能を向上させることが分かった。

文　献

1） Kaiguo Gao, Xiaolu Wen, Chunyan Guo, Li Wang, Wenjie Ban, Xuefen Yang, Zhijun Wu, Zongyong Jiang：*Journal of Animal Science*, **98**, skaa261, 2020.

2） Yusaku Tsugami, Haruka Wakasa, Manabu Kawahara, Takanori Nishimura, Ken Kobayashi：*Animal Science Journal*, **93**, e13720, 2022.

3） Jan D. Bos, Marcus M. H. M. Meinardi：*Experimental Dermatology*, **9**, 165～169, 2000.

4） Heidi K Baumgartner, Michael C Rudolph, Palaniappian Ramanathan, Valerie Burns, Patricia Webb, Benjamin G Bitler, Torsten Stein, Ken Kobayashi, Margaret C Neville：*Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, **22**, 141～157, 2017.

5） Ken Kobayashi, Shoko Oyama, Atsushi Numata, Md Morshedur Rahman, Haruto Kumura：*PLoS One*, **8**, e62187, 2013.

6） Samantha K Wall, Lorenzo E Hernandez-Castellano, Amir Ahmadpour, Rupert M Bruckmaier, Olga Wellnitz：*Journal of Dairy Science*, **99**, 7544～7553, 2016.

© 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（Ⅱ）

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

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九州沖縄農業研究センター）

Kentaro Ikeda
（Kyushu Okinawa Agricultural Research Center, NARO）

In Japan, temperate perennial grasses such as timothy (*Phleum pratense*), orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.), and tall fescue (*Festuca arundinacea*) were introduced into Japanese grasslands1). However, recently, global warming has caused severe depression of temperate perennial grasses. Since then, unseeded Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam) (native Italian ryegrass) became dominant every year. In some cases, tropical annual grass species goldenrod (*Echinochloa crus-galli* (L.)) and crabgrass (*Digitaria adscendens* (H.B.K.) Henr)) are dominant in summer and fall (annual grass alternate vegetation). In this study, we surveyed areas where diploid, tetraploid, and native Italian ryegrass-dominated forage areas and areas where annual grass alternate vegetation may be distributed. The results showed that areas of ryegrass ecotype year-round vegetation were located at mean annual temperatures from 7.4℃ to 8.7℃, while annual grass alternate vegetation were located at mean annual temperatures from 8.4℃ to 12.4℃. These results indicate that temperate perennial grassland may be replacing native Italian ryegrass dominant vegetation in areas with mean annual temperatures between 7.4℃ and 12.4℃ .

１．目　　的

わが国の採草地には，これまで，栄養価が高く，毎年播種する必要がない寒地型多年生牧草であるチモシー（*Phleum pratense*），オーチャードグラス（*Dactylis glomerata* L.），トールフェスク（*Festuca arundinacea*）が導入されてきた[1)]。しかし近年の温暖化により，寒地型多年生牧草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）が毎年優占する植生に変化している。また，地域によっては自生イタリアンライグラスの夏期の衰退に伴い，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

© The Ito Foundation

る二毛作の植生（以下，１年生イネ科草種二毛作交代植生）となっている場合も多発している。牧草として広く栽培されているイタリアンライグラスは収量と栄養価に優れる草種である。また，１年生イネ科草種二毛作交代植生を構成するイヌビエとメヒシバは牛の嗜好性が良好なため，繁殖雌牛や乾乳牛等維持期の粗飼料に適している。これらの草種は年間の気温較差が大きいモンスーン気候帯に位置するわが国の気候条件に適応した，省力的かつ持続的に生産可能な粗飼料源として期待できる。

そこで本研究では，自生イタリアンライグラスが優占している採草地が分布している地域の気象条件を明らかにするために，二倍体と四倍体，自生イタリアンライグラスが周年で優占する採草地と１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地の分布する可能性がある地域を調査した。

２．方　　法

二倍体集団植生と四倍体集団植生，自生イタリアンライグラス単作植生と１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地が分布する可能性のある地域を地図上で明らかにするために，北海道南部～北関東と九州において，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年生イネ科草種二毛作交代植生とした。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作植生とした。また，フローサイトメトリーにより自生イタリアンライグラスを二倍体集団と四倍体集団に分類した。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。年平均気温（℃）と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（国土数値情報ダウンロードサービス）をGIS（QGIS）により１m×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情報を重ねることで，二倍体集団植生と四倍体集団植生，自生イタリアンライグラス単作植生と１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地が分布する可能性のある地域を地図化した。

３．結果と考察

Fig. 1には，寒地型多年生牧草を播種したが自生イタリアンライグラス優占植生に替わってしまった採草地を示した。九州では比較的標高の高い阿蘇・くじゅう・飯田高原地域に位置する寒地型多年生牧草（オーチャードグラスとトールフェスク）の採草地で多く確認し，最も高標高に位置する寒地型多年生牧草の採草地（標高991m）でも自生イタリアンライグラス優占植生になっていた。北関東から東北にかけては低標高地域の採草地と水田転換畑を草地造成した採草地で多く見られた。北海道南部では，低標高で海岸に近い地域の採草地で多数確認された。

Fig. 2には，自生イタリアンライグラス二倍体集団と四倍体集団で構成される採草地の分布を示した。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，四倍体自生集団は30～100cmの地域に，二倍体自生集団は30cm未満の地域に分布していた。また，九州に分布する自生イタリアンライグラス優占採草地はすべて二倍体集団であった。

Fig. 3には，１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地の位置と，位置情報から得た分布の最低

© The Ito Foundation

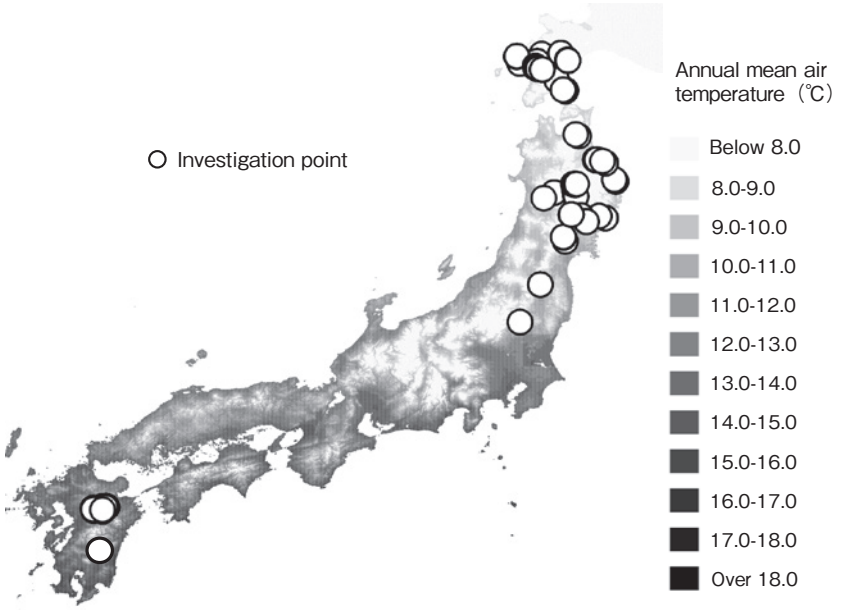

Fig. 1 Distribution of ecotypes Italian ryegrass populations.

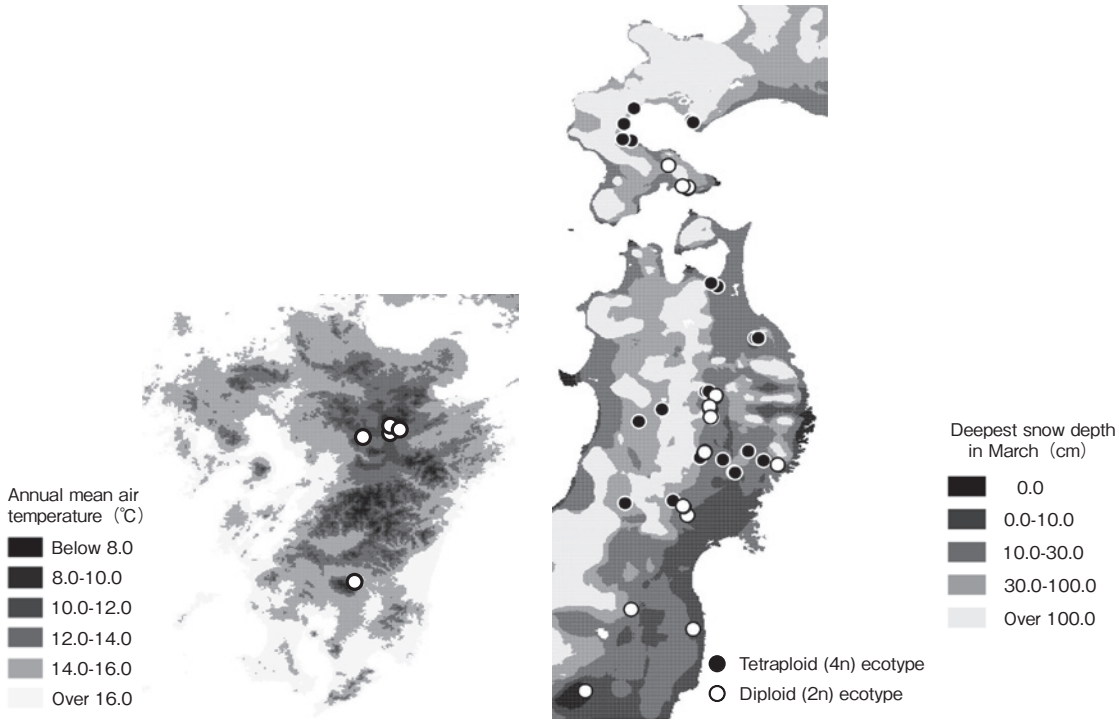

Fig. 2 Distribution of diploid and tetraploid ecotypes Italian ryegrass populations.

© The Ito Foundation

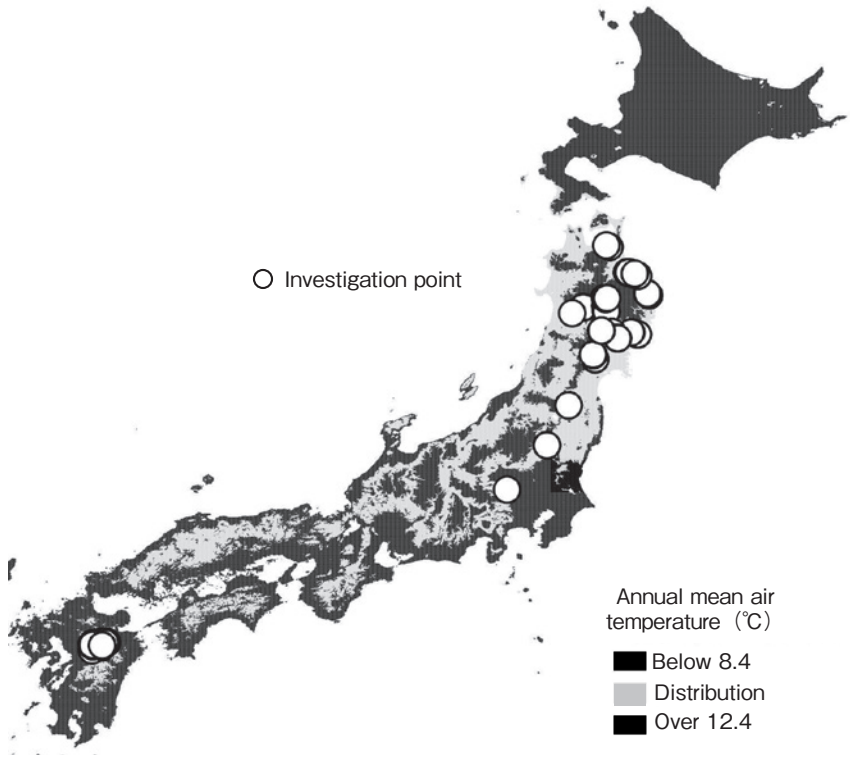

Fig. 3　Distribution of Annual grass alternate vegetation.

平均気温と最高平均気温から算出した分布の可能性がある地域を示した。１年生イネ科草種二毛作交代植生に変化している寒地型多年生牧草の採草地は，年平均気温（平年値）が8.4℃～12.4℃の位置に分布していた。地図上で見ると，西日本では高標高地域の寒地型多年生牧草の採草地でも，１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地に替わる可能性がある。また，北関東以北から青森にかけては高標高地域以外の地域では１年生イネ科草種二毛作交代植生に替わる可能性がある。

Fig. 4 には，自生イタリアンライグラス単作植生の採草地の位置と，位置情報から得た分布の最低平均気温と最高平均気温から算出した分布の可能性がある地域を示した。自生イタリアンライグラス単作植生の採草地は，年平均気温（平年値）が7.4℃～8.7℃の位置に分布していた。地図上で見ると，北海道から自生イタリアンライグラス単作植生の採草地が分布していた。東北北部から北海道南部の間に急激な気候変化の区分は見られない。本州の寒地型多年生牧草の採草地では，オーチャードグラスを年３回収穫する体系が定着している。一方，北海道南部は北海道の他の地域と同様にチモシーを年２回収穫する体系が一般的に行われている。津軽海峡の南北で自生イタリアンライグラス単作植生と１年生イネ科草種二毛作交代植生の違いが急激に生じるのは，気候条件だけでなく，基幹草種と収穫体系の違いも要因の１つだと考えられる。

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

© The Ito Foundation

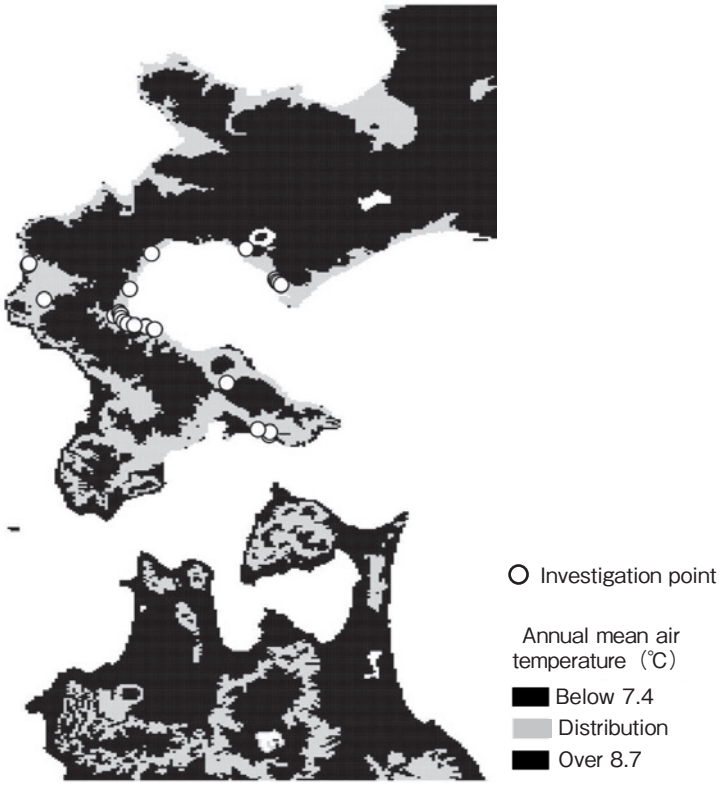

Fig. 4　Distribution of Italian ryegrass ecotype year-round vegetation.

スの生育分布は根雪期間の長さにより，拡大を制限されていると考えられる。自生イタリアンライグラスの中で，四倍体集団は３月最深積雪深30～100cmの地域に分布している。自生イタリアンライグラスの二倍体集団と四倍体集団では，四倍体集団のほうが雪腐病の抵抗性が高いため，より長い根雪期間の地域に四倍体集団が分布したと考える。北関東～東北の太平洋側の低標高地域に位置する採草地は１年生イネ科草種二毛作交代植生へと替わっており，九州における分布では，阿蘇・くじゅう・飯田高原といった，高標高に位置する採草地で確認できたことから，九州における寒地型多年生牧草による粗飼料生産は温暖化が進むにつれて，今後さらに難しくなると考えられる。

今回調査できた地域は九州，東北，北海道に偏っているが，気象メッシュ地図から，関東，東海，西日本においても二毛作交代植生の採草地が分布している可能性は高い。今回，明らかにした自生イタリアンライグラス優占採草地の分布予想メッシュ地図から，未確認の地域の採草地の植生情報の収集が必要である。

4．要　　約

わが国の採草地では寒地型多年生牧草であるチモシー（*Phleum pratense*），オーチャードグラス（*Dactylis glomerata* L.），トールフェスク（*Festuca arundinacea*）が導入されてきた[1)]。しかし近年の温暖化により，寒地型多年生牧草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）が毎年優占する植生に替わっている。また，暖地型１年生イ

© The Ito Foundation

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（以下，１年生イネ科草種二毛作交代植生）となっている場合も確認されている。本研究では，自生イタリアンライグラスの優占する採草地が分布している地域の気象条件を明らかにするために，二倍体と四倍体，自生イタリアンライグラスが周年で優占する採草地と１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地の分布する可能性がある地域を調査した。その結果，自生イタリアンライグラス単作植生の採草地は年平均気温7.4℃～8.7℃の位置に，１年生イネ科草種二毛作交代植生の採草地は，年平均気温8.4℃～12.4℃の位置に分布していた。これらの結果から，年平均気温7.4℃～12.4℃の地域の寒地型多年生牧草の採草地は自生イタリアンライグラス優占植生に替わっている可能性があることか示された。

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

骨格筋の成長と炎症予防（抑制）を目的とした PGC-1α アイソフォームの発現制御に関する研究

Study on regulation of PGC-1α isoforms expression for skeletal muscle growth and inflammation inhibition/prevention

實安隆興[1]・西本和樹[2]
（[1]神戸大学大学院農学研究科，[2]神戸大学農学部）

Takaoki Saneyasu[1] and Kazuki Nishimoto[2]
（[1]Graduate school of Agricultural Science, Kobe University, [2]Faculty of Agriculture, Kobe University）

Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-α（PGC-1α）contains several isoforms. One of the isoforms, PGC-1α4, promotes muscle growth via an increase of IGF-1 expression（Cell, 151, 1319-1331, 2012）. A previous study in hepatocytes shows that PGC-1α1 inhibits inflammation, whereas PGC-1α4 inhibits apoptosis（Molecular Metabolism, 34, 72-84, 2020）. Therefore, if gene expression of PGC-1α isoforms can be controlled and PGC-1α isoforms have the same functions in the skeletal muscle as it does in hepatocytes, these findings contribute to develop the method to promote muscle growth without causing inflammation. One of the objectives of this study was to overexpress of PGC-1α1 and α4 using adeno-associated virus vector in C2C12 myotubes to investigate whether PGC-1α isoforms prevent inflammation and apoptosis in the myotubes. Another objective is to explore culture conditions which promote gene expression of both PGC-1α1 and α4, and only PGC-1α4, to clarify mechanisms of gene expression of PGC-1α isoforms. As a results, almost all myotubes were infected when AAV vector was exposed to the cells at $1x10^4$ vg/cell. The number of myoblasts at confluency just prior to induction of differentiation into myotubes could be used to calculate multiplicity of infection. However, no overexpression of PGC-1α isoforms was observed. Unlike the previous study（Cell, 151, 1319-1331, 2012.）, no significant increase of PGC-1α4 mRNA levels was not observed in the cells treated with clenbuterol and forskolin. Further studies are required to find suitable culture conditions.

1．目　的

近年，鶏肉生産において問題となっている異常むね肉は，むね肉の急速な肥大に伴う酸素や栄養の不足，および酸化・小胞体ストレスの増加を起因として炎症が生じ，損傷した筋線維が再生されずに脂肪組織や結合組織に置き換わることによって生じる。それゆえ，根本的な原因であるむね肉の急速な肥大を抑制すれば異常むね肉の発生は防げる。しかしながら，生産性の観点からは別の方法が望ましい。また，ニワトリに限らず，ウシやブタにおいても筋肉の炎症は食肉としての価値を低下させ得る。それゆえ，骨格筋の炎症の予防や抑制は畜種によらず必要である。

© The Ito Foundation

ペルオキシソーム増殖因子活性化レセプターγ共役因子-1α（PGC-1α）はミトコンドリアの生合成やエネルギー代謝に関わる遺伝子の発現を制御することが知られている。PGC-1αには複数のアイソフォームが存在し，PGC-1α4は従来から知られていたアイソフォーム（PGC-1α1，一般的にPGC-1αと言われているもの）とは異なり，IGF-1の遺伝子発現を介して筋肥大を促進することがマウスで明らかにされている[1)]。また，最近，マウスの肝細胞においてPGC-1α1は炎症を，PGC-1α4はアポトーシスをそれぞれ抑制することが示唆されている[2)]。したがって，PGC-1α1とα4が骨格筋でも肝細胞と同様に働くこと，およびPGC-1αアイソフォームの遺伝子発現を制御することができれば，筋肥大を抑制することなく，炎症やアポトーシスを予防・抑制できる可能性が考えられる。

骨格筋におけるPGC-1αアイソフォームの遺伝子発現はcAMP応答配列結合タンパク質やAMP活性化プロテインキナーゼなどが関与していることが知られている[3)]。先行研究において，β２アドレナリン受容体作動薬であるクレンブテロールによってPGC-1α4のみの遺伝子発現が，アデニル酸シクラーゼ活性化剤であるフォルスコリンによって両アイソフォームの遺伝子発現がそれぞれ促進すること[1)]，およびクレンブテロールはPGC-1α1の遺伝子発現を抑制し，逆にPGC-1α4の遺伝子発現を促進すること[4)]が示されている。しかしながら，それらの先行研究では，両アイソフォームの発現調節機構の違いについては触れられておらず，アイソフォーム選択的遺伝子発現調節機構はいまだ明らかにされていない。

本研究では，骨格筋研究で汎用されているC2C12筋管細胞を用いて，骨格筋においてPGC-1α1とα4がそれぞれ炎症とアポトーシスを抑制し得るか調べることを目的に，本年度はアデノ随伴ウィルス（AAV）ベクターを用いた過剰発現系の構築を行った。また，PGC-1αアイソフォームの遺伝子発現調節機構を明らかにするための一環で，先行研究[1)]を参考に，PGC-1αとα4の両方，およびPGC-1α4のみの遺伝子発現が促進される条件を探索した。

２．方　法

2.1　1 AAVベクターの作成

PGC-1α1（Accession No. NM_008904）とα4（JX866948）のCDS領域をKAPA HiFi HotStart PCR Kit（KAPA BIOSYSTEMS社）を用いて増幅後にアガロースゲル電気泳動に供し，推定される増幅サイズのバンドを切り出し，FastGene™ゲル／PCR抽出キット（日本ジェネティクス株式会社）を用いて増幅産物を回収した。回収した増幅産物をAAVpro® Helper Free System（AAV1，タカラバイオ株式会社）付属のpAAV-CMV VectorにIn-Fusion® HD Cloning Kit（タカラバイオ株式会社）とStellar™ Competent Cells（タカラバイオ株式会社）を用いてクローニングした。NucleoBond Xtra Midi（タカラバイオ株式会社）を用いてプラスミド（pAAV Vector）を精製し，PCRとシーケンス解析（株式会社ファスマック）にてインサートを確認した。精製したpAAV Vector，上記キット付属のpRC VectorとpHelper Vector を，*Trans*IT-293 Transfection Reagent（Mirus社）を用いてAAVpro® 293T Cell Line（タカラバイオ株式会社）にトランスフェクションし，一晩培養した。新しい培地（ベクター不含）に交換してさらに２日間培養後，AAVベクターをキット付属の試薬で抽出した。ウィルス力価は，AAVpro® Titration Kit（for Real Time PCR）Ver. 2（タカラバイオ株式会社）を用いて測定した。また，コントロールベクターとしてAAV1-LacZ（タカラバイオ株式会社）を用いた。

© The Ito Foundation

なお，AAVには種々のセロタイプが存在するが，C2C12細胞への感染力はAAV1以外のセロタイプでは低いことから[5]，本研究ではAAV1を選択した。

2.2　C2C12筋管細胞におけるmultiplicity of infectionの検討

10％　FetalClone III（Cytiva），100 U/mlペニシリン／100 μg/mlストレプトマイシン（ナカライテスク株式会社）を含むDMEM培地（ナカライテスク株式会社）に浮遊させた市販のC2C12（DSファーマバイオメディカル株式会社）を12ウェルプレート（VIOLAMO，アズワン株式会社）に播種（4×10⁴ cells/ml/ウェル）し，37℃，5％ CO_2で100％コンフルエントに達するまで培養した。培地を除去し，PBS（−）でウェルを洗浄後，トリプシン／EDTAを加えて細胞を剥離した。そこに10％　FetalClone IIIを含む培地を加え，血球計算盤で細胞数を計測した（n＝4）。

上記と同様に12ウェルプレートで100％コンフルエントに達するまでC2C12を培養後，2％ウマ血清（サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社）を含むDMEM培地に交換し，筋管が形成されるまで培養した。筋管形成後，2.1で作製したAAV-LacZを，multiplicity of infection（MOI）が0，0.25×10⁴，0.5×10⁴，あるいは1×10⁴ vg/cellとなるように感染させた。MOIの計算には，上記で計測した100％コンフルエント時の平均細胞数を用いた。翌日，新しい培地（AAVを不含）に交換し，さらに1日培養後，細胞をX-gal染色に供した。

2.3　AAVによるC2C12筋管細胞へのPGC-1α1とα4の過剰発現

2.2と同様の方法で筋管細胞を形成させた後，2.1で作製したAAV-LacZ，AAV-PGC-1α1，あるいはAAV-PGC-1α4を感染させた。翌日，新しい培地（AAVを不含）に交換し，さらに2日培養後，筋管細胞のタンパク質を抽出した。

2.4　クレンブテロール，およびフォルスコリンがC2C12筋管細胞へのPGC-1α1とα4の遺伝子発現に及ぼす影響

2.2と同様の方法で筋管細胞を形成させた後，1 μMクレンブテロール，あるいは10 μMフォルスコリンを培地に添加し，6時間培養後にRNAを抽出してリアルタイムPCRに供した（n＝4）。

2.5　ウェスタンブロット分析

以前の報告と同様に行った[6]。Anti-PGC-1alpha（ST1202）はCalbiochem社より，anti-α-tubulin（#2125），およびHRP-linked anti-mouse IgG（#7076）はCSTジャパン株式会社よりそれぞれ購入した。ローディングコントロールとしてα-tubulinを用いた。

2.6　リアルタイムPCR

以前の報告と同様に行った[6]。使用したプライマーの塩基配列は**Table 1** に示した。

Table 1　Primer sequences used for real-time PCR analysis

	Sense	Antisense
PGC-1α1	5'-ggacatgtgcagccaagactct-3'	5'-cacttcaatccacccagaaagct-3'
PGC-1α4	5'-tcacaccaaacccacagaaa-3'	5'-ctggaagatatggcacat-3'
β-actin	5'-ccgggtcatcatcgagaagt-3'	5'-gcgcttgttggtgtggaagt-3'

The primer sequences of PGC-1α1 and α4 are the same as in previous studies. 1），4），10）

© The Ito Foundation

３．結果と考察

AAVベクターは分裂／非分裂細胞のいずれにも遺伝子導入が可能であり，特に非分裂細胞において長期間の目的遺伝子の発現が可能とされている[7]。また，AAVベクターはＰ１レベルの施設でも取り扱いが可能であり，アデノウィルスベクターやレトロウィルスベクターに比べて安全で取り扱いが容易である[7]。しかしながら，AAVベクターを用いたC2C12筋管細胞における過剰発現系の先行研究は少ない。また，筋管細胞は筋芽細胞が融合して形成されること，特徴的な細長い形態をしていること，および筋管細胞の状態では継代できないことなどから，MOIの計算に用いる細胞数をどのように決めるか課題がある。そこで本研究では，先行研究[8]を参考に，筋管細胞に分化誘導する前の筋芽細胞数を計測し，MOIの計算に用いた。その結果，ウィルス粒子数依存的にX-gal染色される筋管細胞は増え，１×10^4 vg/cellでほとんどの筋管細胞がX-gal染色された（**Fig. 1**）。したがって，C2C12筋管細胞へのAAVベクターの導入においては，MOIの計算に筋管細胞への分化前の筋芽細胞数を用いることができ，他の細胞への導入と同等のMOIが必要であることが示された。

しかしながら，AAV-PGC-1α1によるPGC-1α1の過剰発現は確認できなかった（**Fig. 2**）。また，AAV-PGC-1α4では想定サイズ付近にバンド様のものが観察されたが，明確な過剰発現は確認できなかった（**Fig. 2**）。この原因は不明であ

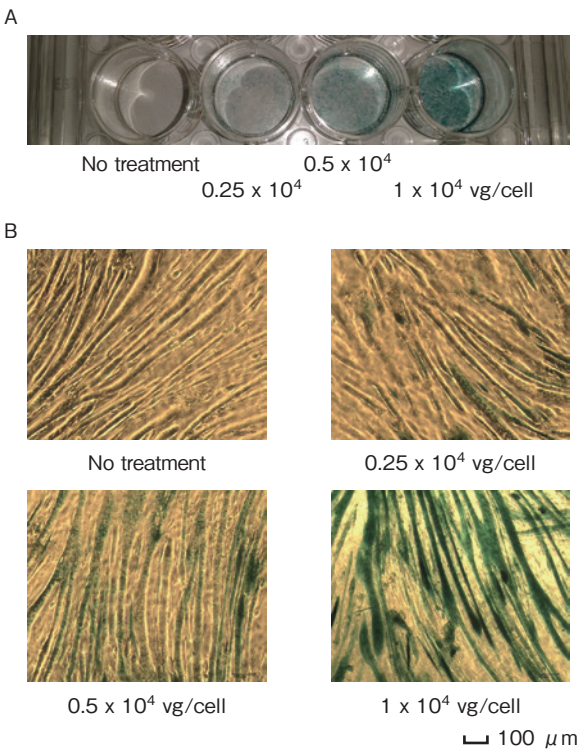

Fig. 1　Images of X-gal staining of C2C12 myotubes infected with AAV-LacZ.（A）Overview of each well.（B）Representative microscope images. Scale bar, 100 μm.

© The Ito Foundation

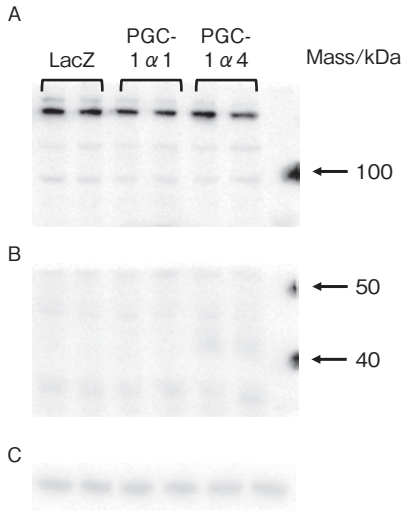

Fig. 2　Representative images of Western blot analysis of PGC-1α1(A), PGC-1α4(B), and α-tubulin(C).

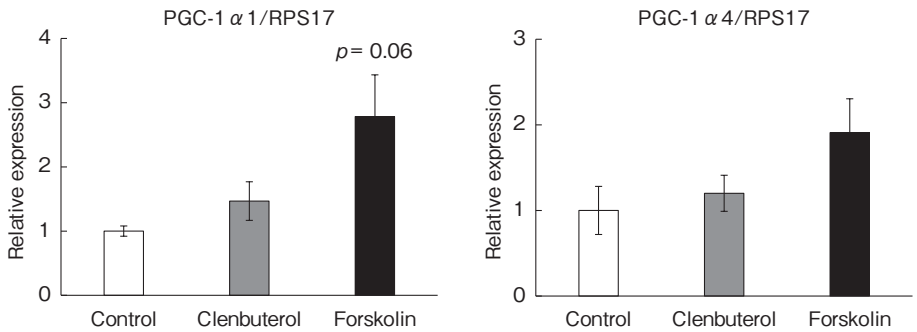

Fig. 3　Relative expression of PGC-1α isoforms in C2C12 myotubes treated with clenbuterol and forskolin

るが，本研究では先行文献[8, 9]を参考にAAVベクターをC2C12筋管細胞に暴露する時間を１日にしたが，PGC-1α アイソフォームの過剰発現を誘導するには短かったのかもしれない。今後，暴露時間を２日以上に延長してその過剰発現を確認する必要がある。

先行研究[1]と同様に，C2C12筋管細胞におけるPGC-1α1の遺伝子発現量はフォルスコリンによって増加傾向を示し，クレンブテロールでは有意な変化は見られなかった（**Fig. 3**）。しかしながら，先行研究[1]と異なり，PGC-1α4の遺伝子発現量クレンブテロール，およびフォルスコリンによる有意な差は認められなかった（**Fig. 3**）。先行研究の再現性が本研究で見られなかった原因は不明であるが，リアルタイムPCR分析の増幅曲線の立ち上がりサイクル数から判断すると，C2C12筋管細胞におけるPGC-1α4の遺伝子発現量はPGC-1α1のそれと比べてきわめて少ないと考えられることから，培養時間や薬剤濃度が最適でなかった可能性がある。また，培地中の血清の有無なども影響しているかもしれない。今後，培養条件を変更して検討する必要がある。

© The Ito Foundation

４．要　約

本研究では，C2C12筋管細胞を用いて，AAVベクターによるPGC-1αアイソフォームの過剰発現系の構築と，PGC-1αとα4の両方，およびPGC-1α4のみの遺伝子発現が促進される培養条件の探索を行った。その結果，筋管細胞に分化誘導する前のコンフルエント状態の筋芽細胞数をMOIの計算に用いて，1×10^4 vg/cellでAAVベクターを暴露することでほとんどの筋管細胞に感染することが確認できたが，AAVベクターによるPGC-1αアイソフォームの過剰発現は確認できなかった。また，先行研究で報告されているクレンブテロールとフォルスコリンによるPGC-1α4の発現促進を確認することはできなかった。

文　献

1） Ruas, *et al.*：*Cell*，**151**，1319～1331，2012.
2） Léveillé, *et al.*：*Molecular Metabolism*，**34**，72～84，2020.
3） Popov, *et al.*：*Acta Maturae*，**7**，48～59，2015.
4） Martínez-Redondo, *et al.*：*The Journal of Biological Chemistry*，**291**，15169～15184，2016.
5） Ellis, *et al.*：*Virology Journal*，**10**，74，2013.
6） Saneyasu, *et al.*：*Growth Hormone & IGF Research*，**65**，101478，2022.
7） Website of Takara Bio Inc. Accessed on April 17, 2023. Available from URL：https://catalog.takara-bio.co.jp/product/basic_info.php?unitid=U100007828
8） Hagstrom, *et al.*：*Blood*，**95**，2536～2542，2000.
9） Baek, *et al.*：*Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*，**13**，1277～1288，2022.
10） Honda, *et al.*：*Journal of Nutritional Science and Vitaminology*，**67**，217～224，2021.

© The Ito Foundation

畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析

A study on fatty acid taste sensing in livestock animals

吉 田 悠 太
（茨城大学農学部食生命科学科）

Yuta Yoshida
（Department of Food and Life Sciences, College of Agriculture, Ibaraki University）

Taste guides animals to ingest more nutritious foods and avoid toxic substances. Since taste is related to feeding behaviors of animals, understanding of taste sense of livestock animals will be an important step to improve feeding strategy in livestock production. Taste substances in feeds directly interact with taste receptors expressed in the taste cells. Therefore, analyses of taste receptors of livestock animals could visualize their taste sense. In the present study, we focused on their fatty acid taste receptor, G protein-coupled receptor (GPR120). We inserted the open reading frames (ORF) of *GPR120* genes of omnivorous pigs, herbivorous cows, and carnivorous cats into the mammalian expression vector. The vectors were transiently transfected with human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells. Then, the cells were loaded with a fluorescent calcium indicator, Fluo4 and measured their intracellular calcium responses to fatty acid stimulations. Here, we found that pigGPR120 and cowGPR120 were activated by various concentrations to long-chain fatty acids (linoleic acid and oleic acid). On the other hand, catGPR120 had lower responses to the fatty acids, suggesting that feeding behaviors could affect fatty acid taste sense in animals. The present study provided a possibility that long-chain fatty acids could play an important role in palatability of feeds in pigs and cows. Further analyses using the other fatty acid receptors will add our understanding of taste sense in livestock animals.

1．目　　的

味覚は，動物が生命維持に必要な栄養素を選択的に摂取するために進化してきた化学感覚であることから，動物の食性と味覚には密接な関係があると考えられる。これまでにヒトやげっ歯類といった雑食性の動物の味覚に関する知見が蓄積されてきたが，畜産動物として重要な草食動物かつ反芻動物であるウシの味覚特性については十分に理解されていない。さらに味覚は，動物の摂食行動を制御する化学感覚であり，ウシの味覚受容特性を明らかにすることで，反芻動物の味覚特性を生かした嗜好性の高い飼料を設計するうえでの基礎的知見となることが期待できる。本研究では，畜産動物として重要な草食性・反芻動物であるウシ（*Bos taurus*）に加えて，雑食動物であるブタ（*Sus scrofa*），ならびに肉食動物であるネコ（*Felis catus*）における味覚受容特性を比較解析

© The Ito Foundation

することにした。

味物質は，口腔の舌表面に存在する味蕾に含まれる味細胞膜に発現するセンサータンパク質である味覚受容体によって受容される[1)]。複数の味覚受容体が，６種類の基本味（甘味，うま味，苦味，酸味，塩味，ならびに脂肪）のそれぞれに対応していることで，我々は６種類の味覚を感じ分けることができる[2)]。本研究では，三大栄養素の一つである脂肪の味に着目した。脂肪酸の味は，近年基本味の１つであると認識されており[3)]，マウスにおいては長鎖脂肪酸をリガンドに持つ２種類のGタンパク質共役受容体であるG protein-coupled receptor 40 and 120（GPR40，およびGPR120），ならびに脂肪酸トランスポーターであるcluster of differentiation 36（CD36）が脂肪酸に対する味覚反応で重要であることが示されている[4, 5)]。本研究では，長鎖脂肪酸に対する味覚受容体候補の一つであるGPR120の機能に着目した。本研究では，動物の味覚受容体タンパク質をヒトの腎臓由来の培養細胞に発現させた味覚バイオセンサーを利用して，長鎖脂肪酸に対する，食性の異なる動物種のGPR120の応答性をカルシウムイメージング法により解析した。

２．方　法

2.1　細胞培養

ヒト胎児腎臓由来培養細胞であるhuman embryonic kidney 293T細胞（HEK293T細胞）を，直径60mm dishに播種し，10％ウシ胎児由来血清であるfetal bovine serum（FBS）および１％ penicillin-streptmycin（PS）を含むDulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM培地）を用いて，37℃，５％　CO_2の条件で培養した。継代は２日に１回行った。

2.2　コンストラクト

哺乳類発現ベクターであるpcDNA3.1（+）に，*ssGPR120*（NM_001204766.2），*btGPR120*（XM_005890636.2），または*fcGPR120*（NM_001317359.1）のopen reading frame（ORF）を挿入したコンストラクトを使用した。インサート配列を含まない空ベクター（mock）をコントロールとして用いた。

2.3　トランスフェクション

リポフェクション法により，ssGPR120/pcDNA3.1（+），btGPR120/pcDNA3.1（+），fcGPR120/pcDNA3.1（+），ならびにmockをHEK293T細胞に一過的にトランスフェクションした。Poly-D-lysineでコーティングした96 well plateにHEK293T細胞を播種し，48時間培養した後にカルシウムイメージング法による解析を行った。

2.4　カルシウムイメージング

蛍光カルシウム指示薬であるFluo4を，トランスフェクションから48時間後のHEK293T細胞に１時間インキュベータ内で負荷した後，カルシウムイメージングに供した。カルシウムイメージング測定には，マルチモードマイクロプレートリーダーであるFlexStation3（Molecular devices）を用いた。味刺激として，10，20，40，80，120，および120 μMのリノール酸，ならびに20，40，80，120，および160 μMのオレイン酸を用いた。96 well plateの各ウェルに味刺激のための脂肪酸溶液を測定開始後17秒の時点で自動添加し，全体として90秒間蛍光強度の変化を測定した。蛍光強度は，２秒間隔で取得した。蛍光強度の変化は，$\Delta F/F$（蛍光強度の変化量／ベースラインの蛍光量）で示した。

３．結果と考察

ブタ，ウシ，およびネコのGPR120をトランスフェクションしたHEK293T細胞の蛍光カルシウムイメージング解析の結果，ブタおよびウシの

© The Ito Foundation

GPR120は，120 μMリノール酸の添加により，蛍光強度が増大した（**Fig. 1**）。一方，ネコのGPR120は，ブタおよびウシのGPR120と比較してリノール酸添加による蛍光強度の変化が少なかった（**Fig. 1**）。また，空ベクターをトランスフェクションしたコントロールのHEK293T細胞はリノール酸添加に対して蛍光強度が変化しなかった（**Fig. 1**）。120 μ μMリノール酸添加に対する蛍光強度の変化量の最大値を比較すると，ブタとウシのGPR120の応答性に有意な差はなかったものの，ネコのGPR120の応答性と比較して有意に高い活性が認められた（**Fig. 2**）。またコントロールの細胞と比較して，ブタ，ウシ，およびネコのGPR120はいずれも有意に高い活性を示した（**Fig. 2**）。

次に，ブタ，ウシ，およびネコのGPR120の長

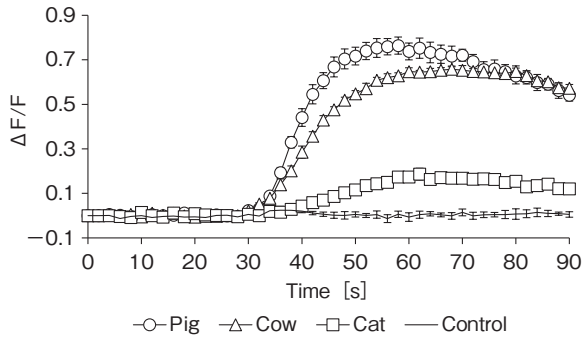

Fig. 1　Time-dependent activation of pig, cow, and catGPR120 by a 120 μM linoleic acid stimulation
Time-dependent fluorescence changes of human embryonic kidney 293T (HEK293T) cells, which were transfected with omnivorous pigGPR120, herbivorous cowGPR120, carnivorous catGPR120, and control empty vector, by a 120 μM linoleic acid stimulation were shown. Horizontal line shows a timeline [s] after beginning of a measurement (0 s). Fluorescence was detected every 2 s for 90 s, and taste stimulation by 120 μM linoleic acid was automatically added at 17 s after beginning of a measurement. Values are the means of Δ F/F (change of fluorescence intensity/fluorescence intensity at a baseline (0 s)) ± standard errors ($n=4$).

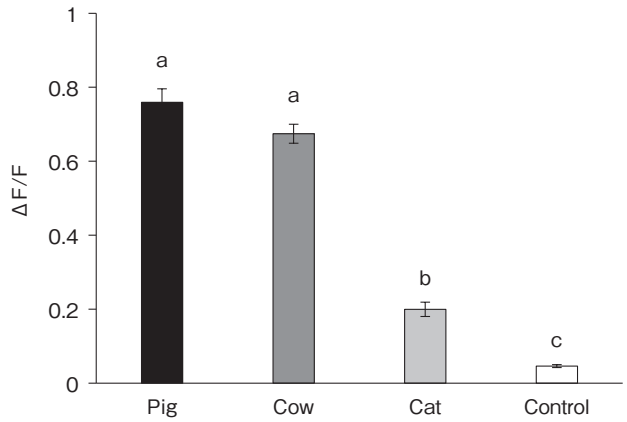

Fig. 2　Activation intensities of pig, cow, and catGPR120 by a 120 μM linoleic acid stimulation
Intensities of fluorescence changes of HEK293T cells, which were transfected with omnivorous pigGPR120, herbivorous cowGPR120, carnivorous catGPR120, and control empty vector, by a 120 μM linoleic acid stimulation were shown. Values are the means of Δ F/F (maximum amount of fluorescence intensity change/fluorescence intensity at a baseline (0 s)) ± standard errors ($n=4$). Statistical analysis was performed by Welch's t-test with Bonferroni correction. Bars without a common letter differ significantly ($p<0.05$).

© The Ito Foundation

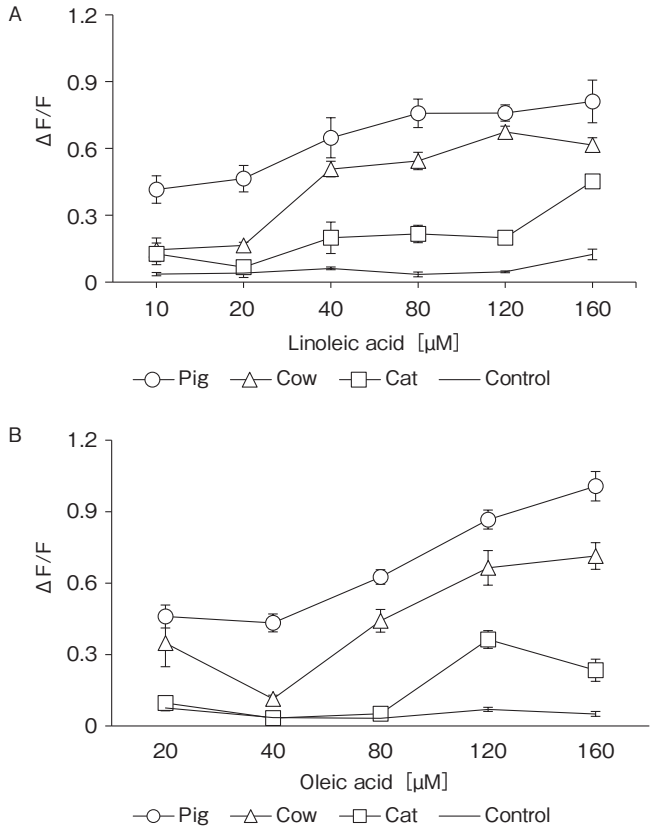

Fig. 3　Dose-dependent activations of pig, cow, and catGPR120 by different concentrations of linoleic acid and oleic acid stimulations

Dose-dependent fluorescence changes of HEK293T cells, which were transfected with omnivorous pigGPR120, herbivorous cowGPR120, carnivorous catGPR120, and control empty vector, by different concentrations of linoleic acid（A）and oleic acid（B）were shown. Values are the means of ΔF/F（maximum amount of fluorescence intensity change/fluorescence intensity at a baseline（0 s））± standard errors（$n=4$）.

鎖脂肪酸に対する濃度依存的な応答を解析した。ブタおよびウシのGPR120は，さまざまな濃度のリノール酸，およびオレイン酸の添加により，蛍光強度が増大した（**Fig. 3A**，**B**）。またブタのGPR120は，ウシでは応答が見られない低濃度のリノール酸，およびオレイン酸に対しても応答を示した（**Fig. 3A**，**B**）。一方，ネコのGPR120は，ブタおよびウシと比較し，これらの長鎖脂肪酸に対する応答性が低かったものの，またネコのGPR120は，高濃度の160 μMリノール酸，ならびに120および160 μMのオレイン酸に対してわずかに応答を示した（**Fig. 3A**，**B**）。

本研究により，食性の異なる動物種において長鎖脂肪酸受容体の機能が異なっていることが明らかとなった。雑食性のブタと草食性のウシの脂肪酸味覚受容体は機能的であり，２種類の長鎖脂肪酸に対して応答を示した。したがって，畜産動物であるウシやブタの飼料の嗜好性においては，長鎖脂肪酸が重要な役割を果たす可能性が考えられた。一方，肉食性のネコの脂肪酸味覚受容体は脂肪酸刺激に対して応答性が低いことが明らかになったことから，ネコのペットフードにおいては，長鎖脂肪酸はあまり嗜好性に寄与しない可能性が考えられた。ただし，ネコのGPR120は160 μ

© The Ito Foundation

Mリノール酸および120 μMと160 μMのオレイン酸刺激によって蛍光強度の増大が見られたことから，ネコのGPR120は，脂肪酸に対する応答性は低いものの，機能していることが示唆された。

先行研究において，ヒトGPR120は，10 μMのさまざまな長鎖脂肪酸に対して応答を示すことが報告されている[6]。本研究において，ブタのGPR120は10 μMのリノール酸溶液に応答を示したが，ウシのGPR120は応答を示さなかった。また，20 μMのリノール酸および40 μMのオレイン酸に対する応答性は，ブタGPR120に比べてウシGPR120で低かった。これらのことから，ブタと比較してウシのGPR120の脂肪酸に対する応答性は低い可能性が考えられた。先行研究において，ヒトGPR120のリガンドとの結合に寄与するアミノ酸残基が報告されている[7]。その中で，197番目のアミノ酸が，ヒトやブタではIleであるが，ウシではValであった。このIle197Valの置換がウシのGPR120の応答性に寄与する可能性について，今後点変異を加えた受容体を用いて解析していく必要がある。今後の研究により，食性の異なる動物の味覚を理解していくことで，それぞれの畜産動物の食性に応じた嗜好性の高い飼料の開発や食品残渣などを利用して生産されるエコフィードの嗜好性の向上に貢献できると考えられる。

4．要　約

味覚は，食物中の栄養素を検出するための化学感覚であり，動物の摂食行動を制御している。これまでに雑食性のヒトや齧歯類の味覚研究が進められてきたが，食性が異なる動物の味覚特性は不明な点が多い。特に本研究では，草食性かつ反芻動物であるウシの味覚受容機構に着目し，雑食性のブタ，肉食性のネコを加えて，長鎖脂肪酸の味覚受容体であるG protein-coupled receptor 120（GPR120）の機能解析を実施した。哺乳類発現ベクターpcDNA3.1（+）に，ウシ，ブタ，およびネコの*GPR120*のORFをそれぞれ挿入し，ヒト胎児由来腎臓培養細胞に一過性にトランスフェクションし，96ウェルプレートに播種した。2日後，蛍光カルシウム指示薬Fluo4を負荷し，マイクロプレートリーダーFlexStation3を用いたCa^{2+}イメージングに供した。蛍光強度は2秒ごとに取得し，90秒間測定した。測定開始後17秒時点で長鎖脂肪酸溶液を培地に自動添加した。ブタ，およびウシのGPR120は，さまざまな長鎖脂肪酸に応答したが，ネコのGPR120は，長鎖脂肪酸に対する応答性が低いことが明らかとなった。これらの結果から，長鎖脂肪酸は，畜産動物の飼料の嗜好性に重要な役割を果たす可能性が考えられた。また，ブタとウシのGPR120の長鎖脂肪酸に対する応答性に差が見られたことから，今後はアミノ酸点変異体を用いた解析により，ブタとウシの脂肪酸受容の差異に関与するアミノ酸残機を探索する。また，GPR120以外の脂肪酸受容体を用いた解析により，畜産動物であるブタやウシの脂肪酸受容機構の全容を明らかにしていくことで，嗜好性の高い飼料設計のためのそれぞれの畜産動物種の脂肪酸に対する味覚受容特性の解明が期待できる。

文　献

1） Chandrashekar, *et al.*：*Nature*，**444**，288～294, 2006.
2） Chaudhari and Roper：*Nat. Rev. Neurosci.*, **18**, 485～497，2017.
3） Running, *et al.*：*Chem. Senses*，**40**，507～516, 2015.
4） Cartoni, *et al.*：*J. Neurosci.*, **30**, 8376～8382，2010.
5） Laugerette, *et al.*：*J. Clin. Invest.*, **115**, 3177～3184, 2005.
6） Hudson, *et al.*：*J. Biol. Chem.*, **289**, 20345～20358, 2014.
7） Hudson, *et al.*：*Mol. Pharmacol.*, **84**，710～725, 2013.

© The Ito Foundation

衛星コンステレーション画像の時系列深層学習による低コストな飼料用トウモロコシ収量予測手法の開発

Development of low-cost yield prediction method in corn by time-series deep learning of satellite constellation images

小花和　宏　之・根　本　英　子
（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）

Hiroyuki Obanawa and Eiko Nemoto
(Hokkaido Agricultural Research Center, NARO)

We developed a new high-precision and low-cost yield prediction method of maize, which is one of the important domestic feed crops in a meat production, using satellite constellations. First, yield survey and drone aerial survey at two times, after sowing and before harvesting, were conducted at maize fields in three regions in Hokkaido. Three-dimensional models were created from the aerial images taken at two times, and a detailed plant height map was created by calculating the vertical differences. We developed a drone-based yield prediction method by the multi regression analysis of the variety of maize (relative maturity), the effective accumulated temperature, the plant heights estimated by the drone images, and the actual yields. Next, a satellite-based yield prediction method was developed. We used the Planet images, one of the constellation satellites with higher resolution (3 m) and shooting frequency (daily) compared to the conventional satellites. The maize yield data were generated by the drone-based method. A large amount of the satellite imagery associated with the yield data was generated by dividing the drone-based yield map into each pixel of the satellite imagery. We developed a yield prediction method using satellites by the deep learning analysis of the big datasets exceeding 58,000. The accuracy of the satellite-based yield prediction method showed high prediction performance with an average relative error of 3.7%. The yield prediction model will be further improved by increasing the amount of learning data (survey year, field, and area) and quality (crop variety (RM) and weather conditions) and optimizing the network structure and internal parameters of the deep learning model using additional data. Satellite observation is a technology that can be deployed rapidly over a wide area at low cost and, therefore, has strong potential to promote the realization of smart agriculture.

1．目　　的

トウモロコシは，食肉生産における重要な飼料作物の一つである。しかし，土壌，地形，天候，病虫害，鳥獣害等の影響により，栽培計画と実際の生育・収量が圃場ごとに大きく異なることがある。トウモロコシの収穫はコントラクターなどにより地域単位で行われることが一般的であるため，収穫・調製作業にかかる人員・機械・施設の過不足が発生し，作業ロスにつながる。適切な収

© The Ito Foundation

穫・調製作業計画を策定し，人員・機械を効率的に配置するためには，収穫作業前に地域内の収量を正確に予測できる技術が求められている。従来は，広い圃場のごく一部の坪刈り調査結果をもとに圃場全体の収量を予測していたが，圃場ごとの坪刈り作業は労力が大きく，またサンプリングデータの代表性の低さのために誤差が大きく，さらに調査位置選定の妥当性および生育状況診断結果の正確性は調査者の熟練度に依存していたため，データのばらつきや技術継承の難しさが課題であった。また，近年ではドローン空撮画像を用いた収量予測手法も研究・開発が進んでいるが[1)]，ドローン空撮にかかるコストの高さ（撮影可能範囲は10～50ha／日程度）のために，広大な地域への社会実装には至っていない。一方，安価（あるいは無料）な衛星画像を用いた広域の収量予測も以前から検討されているが[2)]，撮影間隔の長さ（＝撮影頻度の低さ）および解像度の低さのため，圃場レベルでの適期かつ正確な予測ができなかった。近年，高頻度・高解像度・広域撮影が可能な衛星コンステレーション（複数衛星の協調運用システム）画像が比較的安価で利用可能となった。これらの膨大な時系列画像情報を深層学習することにより，労力の大きい現地調査に頼ることなく，広範囲な地域の収量を高精度かつ安価に予測できる可能性がある[3)]。そこで本研究では，衛星コンステレーションを活用した高精度・運用容易（熟練技術不要）・低コストな新たな収量予測手法を開発する。

2．方　法

2.1　開発手順

時系列衛星画像群の機械学習によりトウモロコシ収量を予測する場合，実収量データが大量（一般的には数1,000以上）に必要となる。しかし，坪刈り調査あるいはトラックスケール計測により，衛星画像のスケール（今回は３m×３m）で大量のデータを取得することは実質不可能である。そこで本研究では，まず①実収量とドローン画像の解析（重回帰分析）によりドローン収量予測手法を開発し，次に②ドローン予測収量と衛星画像の解析（深層学習）により衛星収量予測手法を開発した。以上の２段階の開発により，ドローン画像を衛星画像スケールに分割することで，ドローン空撮範囲全体から大量の機械学習用データを生成することが可能となる。

2.2　使用データ

2.2.1　収量

実収量データは，農業・食品産業技術総合研究機構（農研機構）北海道農業研究センター内（札幌市）の３圃場（2021年１圃場，2022年２圃場），北海道立総合研究機構（道総研）畜産試験場内（新得町）の５圃場（2022年），帯広市川西地区生産者の３圃場（2022年）で計測した。農研機構圃場ではトウモロコシ２列ごとにトラックスケールで収量を計測し，道総研および川西の圃場では圃場ごとに収量を計測した。

2.2.2　ドローン画像

従来に比べて位置精度が高く安定した飛行が可能なDJI Phantom4 RTKを用いて，収量を計測した上記11圃場および追加で川西地区７圃場を空撮した。圃場およびトウモロコシの３次元モデルを作成するために，オーバーラップ60％（進行方向）および80％（横方向）で飛行し，重複画像を取得した。撮影高度は30–100mであり，空撮画像の解像度は約１–３cmである。トウモロコシの植物高を推定するために，播種後（地表面の高さ計測用）と収穫前（トウモロコシ群表層の高さ計測用）の２時期に空撮を実施した。

2.2.3　衛星画像

従来に比べて解像度および撮影頻度が高いコンステレーション衛星の一つであるPlanet衛星の画

© The Ito Foundation

像を使用した。同衛星は2016年の打ち上げ開始から順次衛星数・観測バンドの増加およびデータ品質・配信の安定性向上を進め，近年コンステレーション衛星の中で唯一実用レベルに到達した新たなセンシングデータである。Planet衛星の撮影頻度は１日１回以上，画像の解像度は３m×３mである。

2.2.4　栽培情報

調査対象圃場ごとの位置，面積，トウモロコシの品種（相対熟度：北海道統一RM），播種日，収穫日，有効積算気温（播種日～収穫日）の情報を収集した。

３．結果と考察

3.1　植物高推定

播種後と収穫前の２時期の空撮画像のSfM処理により３次元モデルを作成し，両データの鉛直差分を計算することで，トウモロコシの植物高分布図を作成した。一例を**Fig. 1** に示す。各圃場の平均植物高はそれぞれ，農研機構３圃場：1.96m，1.79m，1.41m，道総研５圃場：1.84m，2.17m，2.22m，2.02m，1.78m，川西３圃場：2.64m，2.74m，2.31mであった。

3.2　ドローン収量予測手法開発

収量を実測した11圃場に関して，ドローン推定植物高から計算した空隙を含む植物体容積（m^3/10 a），10-30℃有効積算気温（℃），RM（日）の３データを説明変数，地上実測による単収（生重，kg/10a）を説明変数として重回帰分析を行った。その結果，補正Ｒ２＝0.98，有意Ｆ＝0.0000016の高い精度を持つ以下の回帰式が得られた（**Fig. 2**）。なお，積算降水量（播種日～収穫日，mm）も含めて解析したが，Ｐ-値が0.80と非常に大きかった（＝目的変数と関係性がない）ため，説明変数から除外した。

［ドローン推定単収］＝1.37×［ドローン推定植物体容積］
－4.77×［10-30℃有効積算気温］
＋211.45×［RM］
－12259　　（式１）

今回の解析ではデータ数が11ときわめて少なく，高い補正Ｒ２は過剰適合の可能性が高い。今後，より多くのデータを追加して再解析すること

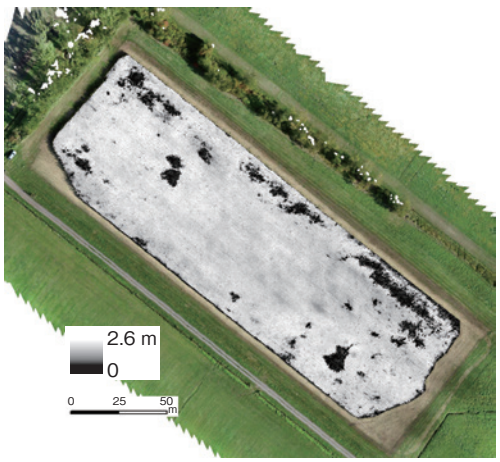

Fig. 1　Crop height map created by the drone images.

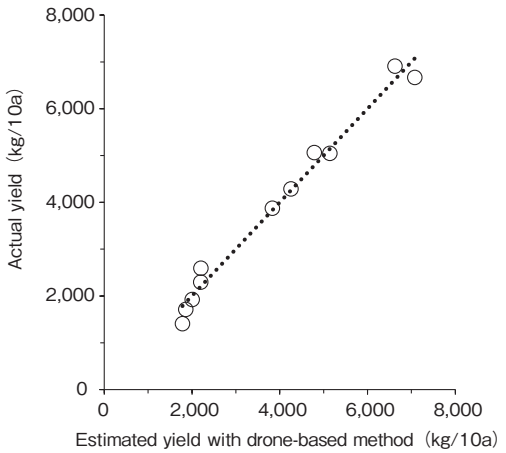

Fig. 2　Estimated yield with the drone-based method.

© The Ito Foundation

で，本予測手法の信頼性および汎用性が向上すると考えられる。

3.3　衛星収量予測手法

ドローンで空撮した上記18圃場を対象として，前項で開発したドローン収量予測手法を用いて，Planet衛星画像の各ピクセルごと（3 m × 3 m）に予測収量を算出した。ピクセル数は合計86,192であった。さらに，5/1–9/30の5カ月間を対象として雲がない時系列Planet衛星画像群を取得し，正規化植生指数（NDVI）を計算した。各圃場における雲なしPlanet衛星画像群の枚数は異なり，農研機構圃場では2021年は53枚，2022年は45枚，道総研圃場では25枚，川西地区圃場では26–27枚（圃場により異なる）であった。次に，各ピクセルにPlanet_NDVI時系列データを記録した。なお，雲により欠測となった日のNDVIは前後の雲

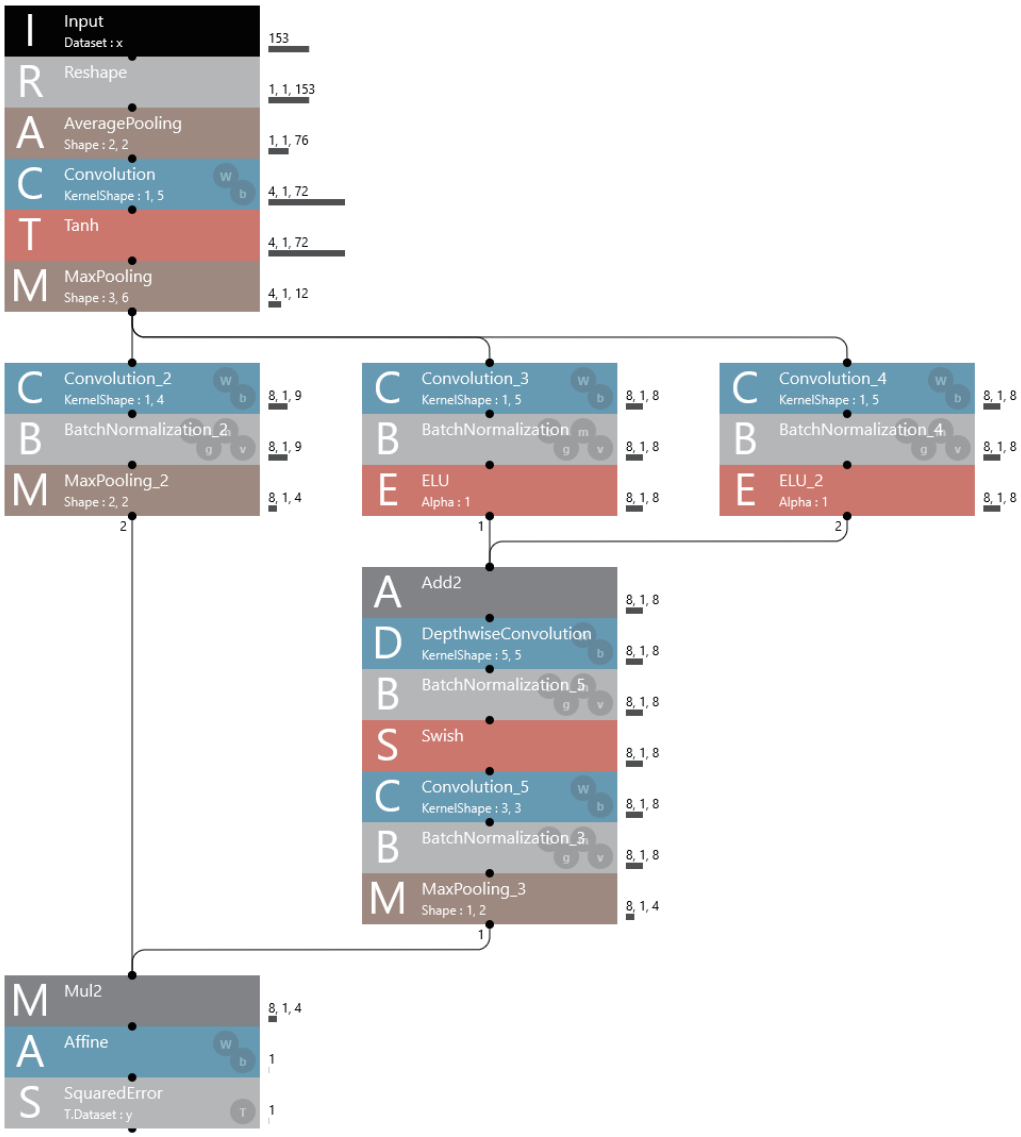

Fig. 3　Neural network architecture of the satellite-based method.

© The Ito Foundation

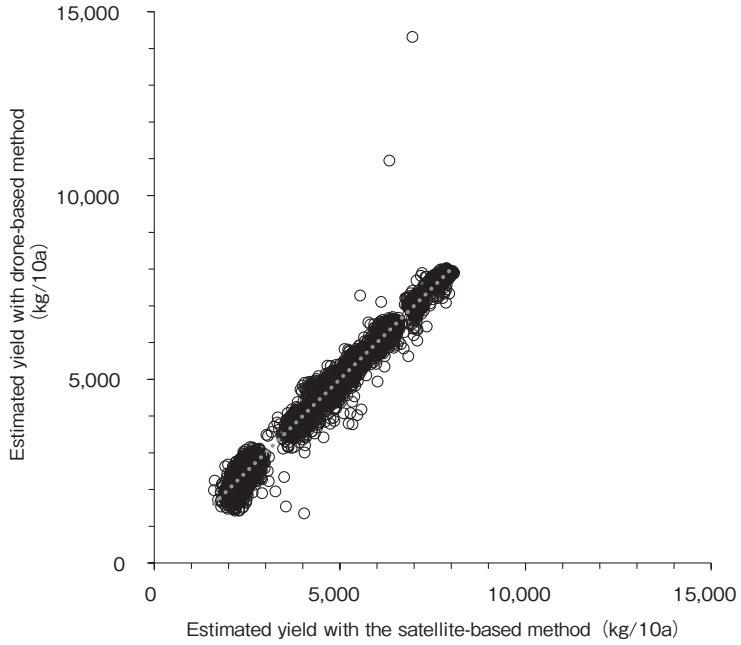

Fig. 4　Estimated yield with the satellite-based method.

なしPlanet_NDVI値から線形補間した。全データのうち７割（47,806ピクセル）を深層学習の学習データ，１割（6,827ピクセル）を検証データ，２割（13,652ピクセル）をテストデータとして，時系列Planet_NDVIデータを説明変数，ドローン予測収量を目的変数とする深層学習処理を行った。深層学習処理はSONY Neural Network Consoleを使用し，最初に単純な３層の畳み込みニューラルネットワーク構造で学習を開始し，同ソフトウェアの構造自動探索機能を用いてネットワーク構造の最適化を行った。その結果，複数分岐構造を含む４層の並列畳み込みニューラルネットワークで構成される収量予測モデルが構築された（**Fig. 3**）。同モデルの予測精度をテストデータで評価したところ，平均相対誤差は3.7％と高い性能が示された（**Fig. 4**）。

3.4　今後の課題・展望

今後，学習データの量（調査年・圃場・面積）および質（品種（RM），気象条件）を増加させ，深層学習モデルのネットワーク構造および内部パラメータをより最適化することで，収量予測結果の精度・信頼性・汎用性の向上が期待される。また，GRUS衛星（日本，Axelspace社，解像度2.5m）やPleiades Neo衛星（フランス，Airbus社，解像度1.2m）など，コンステレーション衛星は今後引き続き種類と数が増えるため，それらの衛星データを用いた予測精度のさらなる向上，目的や予算に応じた柔軟な選択・運用が可能になると考えられる。さらに，高頻度時系列植生指数の深層学習による収量予測手法のアイデアは，飼料用トウモロコシ以外のさまざまな作物への展開，また収量以外の生育・環境（生育不良，病害虫被害，収穫適期，土壌排水・栄養価）の予測および評価にも展開可能だと考えられる。

衛星観測はデータ購入費（画像の種類と枚数により大きく異なるが，０～数百万円程度）が必要だが，広域・複数作物・複数目的で共同利用することでコスト分散が可能であり，また従来の現地

© The Ito Foundation

調査やドローン空撮と異なり現地調査にかかる労力がほぼゼロに低減され，さらに手法が確立すれば途上国を含む全世界への広域展開が容易な技術である。日本のみならず全世界のスマート農業の実現を推進する強力なポテンシャルを持っている。

4．要　約

北海道内の３地域（札幌市，帯広市，新得町）を対象として，コンステレーション衛星Planetの時系列画像（植生指数）の深層学習による飼料用トウモロコシの収量予測手法を開発し，平均相対誤差3.7％と高い予測性能が得られた。今後，学習データの量と質を増加させることで，予測手法の信頼性と汎用性のさらなる向上が期待される。

文　献

1）　青木康浩：畜産技術，**792**，13〜17，2021.
2）　GEOGLAM：Crop Monitor a geoglam initiative. https://cropmonitor.org/.
3）　河野達也，長澤良太：システム農学，**35**(2)，25〜32，2019.

© 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（Ⅲ）

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

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 previous years, we had shown that ryegrass seed composition increased the body weight of chicks. In order to confirm the reproducibility of this effect and to verify the amount of ryegrass seed composition and its active ingredients necessary to achieve the same effect, we conducted a feeding test using ROSS, a representative meat product, by reducing the amount of ryegrass seed composition by half and preparing an extract concentrate of that. The results showed no significant difference on chick weight gain effect, but there was a significant increase in organic acid production in the digestive tract contents. Since there was no significant difference in the increase in body mass effect in the positive control, the 25% ryegrass seed composition, it is necessary to conduct a follow-up study that takes into account the effects of other factors such as study design. However, the results of organic acid content suggested the effect of improving the intestinal microflora. In addition, microflora analysis of gastrointestinal contents collected in the fourth feeding trial in the previous year was conducted to confirm the effect of ryegrass seed composition on the intestinal microflora. It revealed several microorganisms whose occupancy increased or decreased characteristically in the ryegrass seed composition area. Further research is needed to determine the relationship between these microorganisms and the effect of the increase in body weight.

1．目　　的

これまで畜産業界においては，家畜の成長促進や感染症予防のため，抗菌性物質の投与が日常的に行われてきた。しかしながら，そのような健康維持のための抗菌性物質の多用による弊害として，薬剤耐性菌の頻出が公衆衛生上の問題となった。そのため，2017年に世界保健機関は，成長促進や感染症予防を目的とした健康な家畜への抗菌性物質の使用を中止するよう勧告した。これを受け欧米の先進国で抗菌性物質使用が禁止されたことにより，生産現場では罹患率の上昇・飼料効率低下に伴う成長遅延等による生産性の低下が懸念されており，畜産業においては生産性向上が重要な課題となっている。日本国内における現状ではそれほど厳しい規制はまだないが，近い将来，規制強化が予想されている。そのような課題の解決に向け，成長促進効果を有する代替資材の開発が

© The Ito Foundation

期待されており，本研究ではその一助として，牧草であるライグラスの種子を活用した飼料資材の開発に向けた実証試験を行っている。近年，家畜においてもヒトと同様に腸内細菌叢の改善が健康増進に役立つことが明らかになりつつあり[1]，そのような効果を期待した飼料用プレバイオティクスやプロバイオティクスが市販されている。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・海外を問わず販売されており，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いと言える。ただし，優れた機能性を有する素材であったとしても，調達コストが見合っていなければ実用化にはたどり着けないことから，すべての機能性素材が上市されるとは限らない。

昨年度，一昨年度に実施したニワトリヒナへの給与試験において，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てきた[2, 3]。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。なお，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。ただし，ライグラス種子組成物における有効成分がいまだ同定されていないことから，本研究では，この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」を抽出・濃縮した試料を調製する。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[4]，その後の研究例は糖の構造解析[5]や耐乾燥性とは無関係[6]，等の数報しかなく，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が少ないだけではなく，そのオリゴ糖の機能性に関する研究例も皆無である。そのため，ロリオース抽出濃縮液を飼料に添加した給与試験を実施することで，有効成分の絞り込みを行うとともに，ロリオースのプレバイオティクスとしての可能性を評価する。

2．方　法

2.1　飼料の調製

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は既報[3]に従って調製した。飼料は，前年までと同様にトウモロコシ，大豆粕を主体とした，粗タンパク質含量19%，代謝エネルギー2.9Mcal/kgを対照飼料とし，試験飼料も同様に粗タンパク質含量19％，代謝エネルギー2.9Mcal/kgのライグラス種子組成物12.5%，25%配合した飼料および，ロリオース抽出濃縮液添加飼料を調製し試験に供した。

2.2　ロリオース抽出濃縮物の調製

上記のとおり調製したライグラス種子組成物を原料としてロリオース抽出濃縮液を調製した。具体的には，500 g のライグラス種子組成物に対し，３ l の蒸留水を加え室温で45分撹拌後，550 g の活性白土SA-1（日本活性白土社）を加えさらに45分撹拌し，ろ過することで一部の色素成分を除去した抽出液を得た。本抽出液をロータリーエバポレータで約135mlまで濃縮したものを抽出濃縮液とし，本工程を繰り返し行うことで給与試験に必要な試料を調製した。本抽出液の飼料への添加は以下のとおり行った。18kgのトウモロコシ粉を70℃12時間乾燥させ，そこに5.4 l の抽出濃縮液を加えて乳鉢で均等になじませた。その後再び18kgになるよう70℃で12時間乾燥させることで，トウモロコシ粉の水分を抽出濃縮物に置換した。抽出濃縮物の粉末化への試みとして，凍結乾燥機（FDU-810，東京理化器械株式会社）およびスプレードライヤー（GB210-A，ヤマト科学株式会社）を使用した。なお，抽出濃縮液中のロリオー

© The Ito Foundation

ス濃度はパルスドアンペロメトリー検出型液体クロマトグラフィーに試料を供試し，そのピーク面積を求め，以前調製したロリオース標品[7]を用いて作成した検量線から試料中のロリオース濃度を算出した。

2.3　第五次給与試験

本研究は前々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，前々年度の第一次・第二次給与試験，前年度の第三次・第四次給与試験に続き第五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。

ブロイラー（ROSS）初生雛128羽を供試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12.5％区，③ライグラス25％区においては第四次給与試験と同様の飼料を調製し，さらに，対照飼料に抽出濃縮液を添加した④抽出濃縮区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含）。それぞれの試験区に，１群８羽４反復の計32羽ヒナを配置し，20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体量，飼料効率を算出した。また，各区１反復あたり４羽（平均的な体重３羽＋最高体重１羽）から消化管内容物として盲腸内容物を採材した。

2.4　pH値および有機酸分析

第五次給与試験終了後の採材時に回収した盲腸内容物は蒸留水で５倍に希釈した後にただちに凍結し，分析するまで－20℃で保存した。解凍後の試料を攪拌後に20,000×gで５分間遠心分離し，上澄みを孔径0.22 μmのフィルターでろ過した後，等量の蒸留水で希釈した。希釈液をイオン交換樹脂（Amberlite IR120H$^+$，東京有機化学工業株式会社）により処理し，20,000×gで５分間遠心分離を行い，その上澄み液を分析試料とし，高速液体クロマトグラフィー（有機酸分析システムNexera，島津製作所）を用いて，カラムはイオン排除クロマトグラフィーカラム（Shim-pack Fast-OA，島津製作所），移動相は５mmol/l p-トルエンスルホン酸水溶液，流量は0.8ml/min，温度は40℃に設定し，各種有機酸を定量した。盲腸内容物のpH値はガラス電極（9618S-10D，HORIBA）を用いて計測した。

2.5　腸内細菌叢解析

前年度に実施した第四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。

3．結果と考察

3.1　ロリオース抽出濃縮物の調製

22kgのライグラス種子組成物から，方法に記載したとおりに5.9 l の抽出濃縮液を調製した。抽出液のロリオース濃度は90mMであり，243 g のロリオースが含まれていることになる。22kgのライグラス種子組成物には308 g のロリオースが含まれており，その回収率は79％だった。なお，本抽出濃縮液をトウモロコシ粉にしみ込ませることで調製した抽出濃縮液配合飼料には0.49％のロ

© The Ito Foundation

リオースが含まれていると見積もられ，ライグラス種子組成物12.5％配合飼料（0.18％），25％配合飼料（0.35％）と比較しても遜色ない配合割合である。さらに，本抽出濃縮液の操作性改善に向け，凍結乾燥機およびスプレードライヤーを用いた粉末化を検討したが，凍結乾燥で得られた粉末は吸湿性が高く，操作性が悪いことから実用化には不向きであることが分かった。また，スプレードライでは今年度の試験期間中に有効な乾燥条件を見出すには至らなかった。そのため，今回の給与試験では抽出濃縮液をトウモロコシ粉にしみ込ませることで飼料への配合を行った。今後，スプレードライ条件を検証し，粉末化に向けて取り組む必要がある。

3.2　第五次給与試験

第五次給与試験においては，増体量，飼料摂取量および飼料効率に対するライグラス種子組成物12.5％配合飼料，25％配合飼料給与の効果は観察されず，対照飼料給与とほぼ同様の値を示した（**Table 1**）。ただし，消化管内容物中の有機酸含量については，ライグラス種子組成物12.5％配合飼料，25％配合飼料給与により，対照飼料給与と比べリンゴ酸および酢酸含量に有意な差が見られた。一方，ロリオース抽出濃縮液添加飼料給与区と対照飼料給与区では有機酸含量に差は認められなかった（**Fig. 1**）。ライグラス種子組成物12.5％配合飼料給与は，これまで行ってきた給与試験に比べて，ライグラス種子組成物の配合割合が低く，ロリオース等の機能性成分量が成長促進を亢進するために不十分であった可能性が考えられる。しかしながら，ライグラス種子組成物25％配合飼料は第四次給与試験においては成長促進効果が見られていたにもかかわらず，今年度実施した第五次給与試験においては，増体に関してはその効果が見られなかった。この理由は不明であるが，ライグラス種子のロット間による機能性成分含量の差により，配合割合が十分でなく効果が見られなかった可能性も考えられる。一方，消化管内容物中の有機酸含量から腸内細菌叢が変化していることが示唆されており，今回の飼養期間（20日間）は増体効果を現すには少し短かった可能性も考えられる。今後，ロット間差を検証したライグラス種子を試験に供する，飼養期間を延長する等，本効果の再現性を確認する必要がある。また，ロリオース抽出濃縮液添加飼料給与の増体量，飼料摂取量および飼料効率への効果を第五次給与試験において初めて検討し，飼料効率は最も優れていたものの，有意な作用は観察されなかった（**Table 1**）。また，消化管内容物中の有機酸含量についても有意な差は認められなかった。これは，ライグラス種子組成物に含まれる成長促進物質はロリオースのみでは十分でなく，本試験で調製した抽出液に含まれない成分も必要である，あるいは本効果を阻害する成分も濃縮されてしまった等の可能性が考えられる。ただし，pHについては対照区と比較して有意に低下していることか

Table 1　Effect of feeding ryegrass seeds on growth performance in chicks

	Control	Ryegrass（12.5）	Ryegrass（25）	Extract
Body weight gain（g/20 days）	549 ± 20	536 ± 15	544 ± 16	534 ± 18
Feed intake（g/20 days）	877 ± 31	872 ± 9	863 ± 12	829 ± 26
Feed efficiency	0.626 ± 0.006	0.615 ± 0.012	0.625 ± 0.011	0.644 ± 0.002

Mean ± S.E. n=4, Extracts：water-extracted ryegrass seed powder concentrates.

© The Ito Foundation

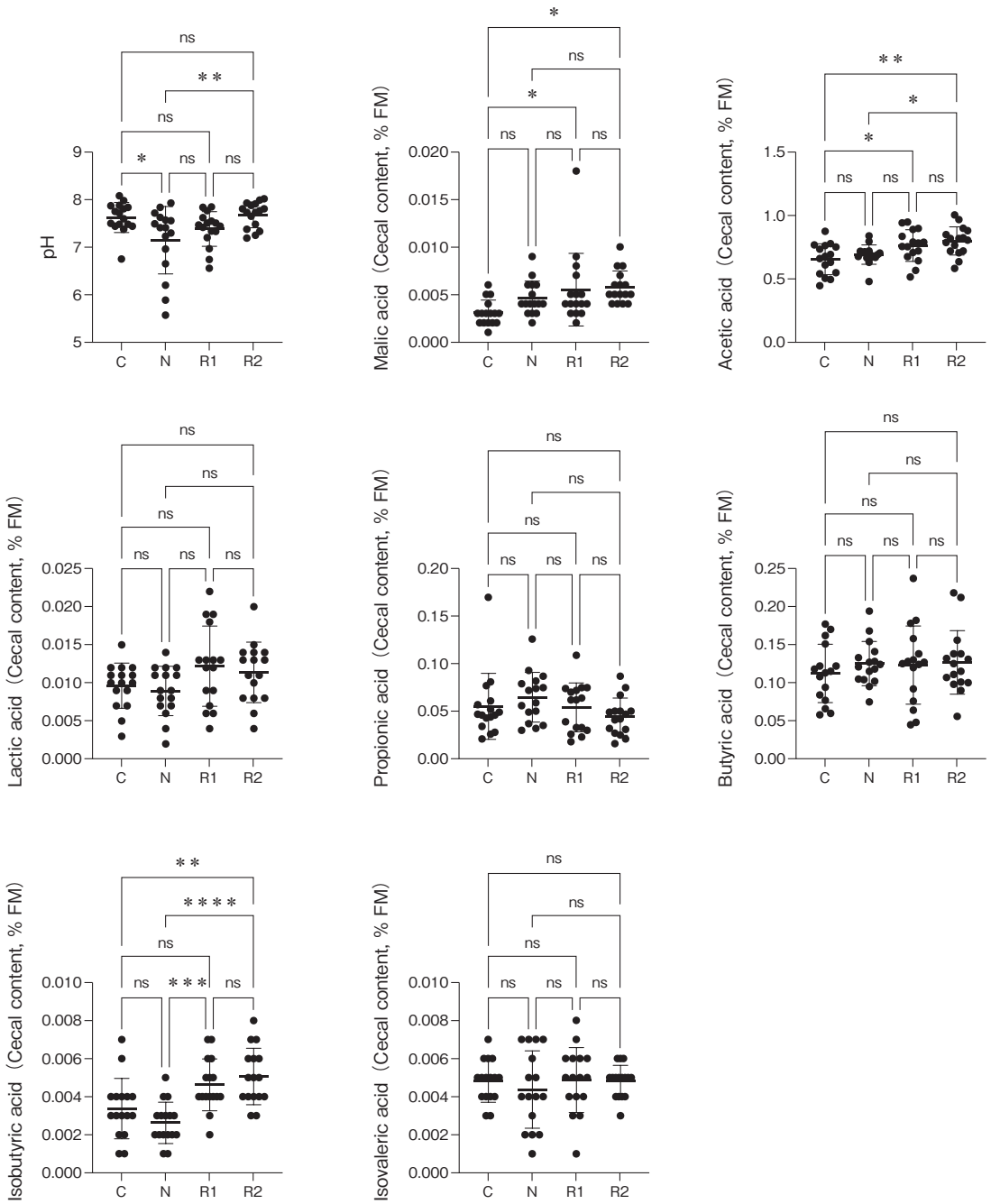

Fig. 1　pH and organic acid content in cecum contents.
C：Control, N：Extract Concentrates（Nousyukubutu）, R1：Ryegrass（12.5）, R2：Ryegrass（25）.
ns：no significant difference, *：$p<0.05$, **：$p<0.01$, ***：$p<0.001$, ****：$p<0.0001$.

© The Ito Foundation

Table 2　Microbial occupancy in gastrointestinal tract contents

Order	Occupancy（%）			
	Control	Ryegrass（25）	Ryegrass（50）	FOS
Coriobacteriales	0.13	0.28	0.26	0.11
Enterobacteriales	3.88	3.27	0.92	2.79
Xanthomonadales	0.11	0.17	0.15	0.12
Bacillales	2.32	0.16	0.01	1.50
Lactobacillales	6.07	5.33	6.90	7.29
Clostridiales	79.79	84.28	84.94	81.25
Erysipelotrichales	6.84	6.34	6.72	6.11
Other	0.86	0.17	0.09	0.83

Mean, n=16, FOS：fructooligosaccharides
Samples were taken from last year's test.

ら，なんらかの腸内細菌叢改善効果がある可能性が示唆された。今後，ライグラス種子からの機能性成分抽出法をさらに検討し，ブロイラーの成長を亢進するライグラス種子の適切な飼料原料としての利用法を検討する必要がある。

3.3　消化管内容物中の菌叢解析

前年度の第四次給与試験では，対照区，ライグラス種子組成物25％配合区，50％配合区，フラクトオリゴ糖（FOS）配合区の計４試験区を設定した。このうち，ライグラス種子組成物25％配合区，50％配合区において，有意な増体効果，飼料効率改善効果が認められた。そこで，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。微生物目レベルでの菌叢割合を**Table 2**に示す。いずれの試験区も約８割は*Clostridiales*であり，フラクトオリゴ糖配合区はすべてにおいて対照区との違いは認められなかった。前回の菌叢解析において特徴的であった*Lactobacillales*については，対照区において試験区と同程度の占有割合であったことから，大きな違いは見られなかった。一方，ライグラス種子組成物50％配合区では，*Enterobacteriales*，50％配合区および25％配合区では*Bacillales*の割合が大幅に減少していた。このような腸内細菌叢の変化が増体効果に影響を及ぼしているのかもしれない。また，菌種レベルではライグラス種子組成物配合区において*Lactobacillus*等７菌株の増加，*Faecalibacterium*等５菌株の特徴的な減少が見られたものの，いずれもuncultured bacterium，いわゆる難培養微生物として分類されており，菌種の特定までには至らなかった。今年度実施した第五次給与試験において採材した消化管内容物についても，今後，解析を行うことで，ライグラス種子組成物が与える菌叢への影響をより詳細に評価できるようになると期待している。

以上，本研究の成果を基礎的知見とし，今後実証試験を重ね，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，ならびに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

前年度までの研究で，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てきた。今回，その効果の再現性を確認するとともに，本効果を得るために必要なライグラス種子組成物の量，およびその中の有効成分について検証する

© The Ito Foundation

ための給与試験を実施した。その結果，ニワトリヒナ増体効果に有意な差は認められなかったものの，消化管内容物中の有機酸生成量には有意な増加が認められた。増体効果に関しては，ポジティブコントロールであるライグラス種子組成物25%配合区においても有意差がつかなかったことから，試験設計等，他の要因による影響も考慮した追試験を実施する必要があるが，有機酸含量の結果から，腸内細菌叢の改善効果を確認することができた。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結果，ライグラス種子組成物区において特徴的に占有割合が増減した数種の微生物を見出すことができた。

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） 西本完，大津晴彦，小林寿美：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３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.，**40**，391～397，2022.

4） Macleod，A. M.，Mccorquodale，H.：Trisaccharides of *Lolium* and *Festuca*, *Nature*，**182**（4638），815～816，1958.

5） Chatterton, N. J.：Loliose-a novel trisaccharide in leaves of *Lolium* and *Festuca* species, *Plant Physiology*（*Life Science Advance*），**12**，113～116，1993.

6） 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.

7） 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

暖地で冬期に高品質な粗飼料を生産するイタリアンライグラス夏播き栽培技術の開発

Establishment of Italian ryegrass summer sowing cultivation which produces high-quality forage in winter in warm regions Japan

加 藤 直 樹・望 月 賢 太
（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）

Naoki Kato and Kenta Mochizuki
（Kyushu-Okinawa Agricultural Research Center, NARO）

The present study aimed to establish appropriate nitrogen fertilizer management techniques for a new Italian ryegrass cropping type that is sown in September and harvested in December or January, using “Kyushu 1”, a new blast-resistant variety. We investigated yield, crude protein (CP) content, and nitrate content under 12 test conditions, which included two levels of cattle manure application, three levels of nitrogen fertilizer application, and two levels of harvest time. Furthermore, we used a prediction model for nitrogen mineralization of organic materials to predict and validate the fertilizer efficacy of cattle manure compost. The results showed that the nitrogen mineralization amount of cattle manure compost could be estimated using the organic material mineralization model. The predicted and the measured values were almost the same, indicating that the prediction can be made with sufficient accuracy for practical use. Based on the result, the nitrogen fertilizer rate suitable for the new cropping type of Italian ryegrass was found to be from 5–11 kg/10 a. In this nitrogen fertilizer rate range, dry matter yields in this crop type were expected to exceed about 800 kg/10 a, and harvests with a CP content of about 16% could be produced consistently. Due to the tendency of nitrate content to increase in this cropping type, it is advisable to set the harvest time in January and limit nitrogen fertilizer application.

1．目　　的

暖地の基幹飼料作物であるイタリアンライグラス（以下IR）は，秋に播種し，春に収穫される冬作物として栽培されており，肉用牛の繁殖雌牛の粗飼料として広く利用されている。本草種は粗タンパク質（以下CP）含有率の変動が大きいことが報告されており[1)]，特にCP含有率が低い場合には補助飼料を添加する必要があり，飼料費の増加を招いている。

この原因に，①IRを含むイネ科牧草は出穂期以降，生育の進展とともにCP含有率が低下するため，収穫時期により異なるCP含有率の収穫物が生産されやすいこと[1, 2)]，また，②CP含有率は窒素施肥量の増加により高まるが，堆肥の利用が前提となる飼料生産においては，倒伏や家畜に有害な硝酸態窒素（以下，NO3-N）の蓄積を避けるため，十分な窒素施肥が行われていないことが

© The Ito Foundation

あげられる。

これらの課題に対し，本研究では暖地を対象に，①いもち病抵抗性IR極早生新品種「Kyushu１」を利用し[3]，いもち病の発生により，これまで困難とされていた９月にIRを播種し，生育の進展が緩慢になる冬季に収穫する新たな作型（夏播き栽培）を確立し，収穫時期によるCP含有率の変動を生じにくくすること，②有機質資材の窒素無機化予測モデルを活用した堆肥の肥効予測とその検証を行い[4, 5]，IRの生育に合わせた適切な施肥管理技術を開発することで，解決を試みたので報告する。

２．方　法

2.1　イタリアンライグラスの栽培概要と試験区設定

供試品種にIR「Kyushu１」を用い，2022年９月22日に播種量4.0 kg/10 a，条間30 cmで播種機により条播した。試験区として，牛ふん堆肥の施用量２水準（３t/10 aまたは無施用）×窒素肥料の施肥処理３水準（０，５，10 kg/10 a，すべて基肥として施用）×収穫時期２水準（12月および１月）の計12水準を設けた。１区あたりの栽培面積は24m^2，各区２反復とした。なお，施肥処理の呼び方として，窒素のみを施用する場合にはＮ０区，Ｎ５区，Ｎ10区，さらに堆肥を施用した場合にはＮ０＋M区，Ｎ５＋M区，Ｎ10＋M区と示すこととした。また，窒素以外の肥料については，すべての区に基肥としてリン酸20 kg/10 a，カリ10 kg/10 aを施用した。

収量調査は播種後78日目（2022年12月９日）および123日目（2023年１月23日）に実施した。なお，収量調査時の生育ステージはいずれも出穂始期であった。

調査項目は乾物収量，倒伏程度（１−９の評点。無：１−甚大：９），CP含有率およびNO3-N含量とした。また，統計処理として，各水準を要因とした３元配置分散分析を実施し，有意水準を10%として処理の影響を評価した。

2.2　堆肥の肥効予測とその検証

試験に供試した牛ふん堆肥の含水率，全窒素含量，全炭素含量，無機態窒素含量，リン酸含量およびカリ含量を測定した（**Table 1**）。また，牛ふん堆肥を現物で３t/10 aとなるように土壌とよく混合して，底に不織布を張り付けたPET円筒容器（直径５cm×高さ16 cm）に充填し，圃場に埋設してIRの収穫まで経時的に円筒内土壌の無機態窒素含量を測定した。試験区は牛ふん堆肥混和区と資材無混和区の２処理を３反復設置した。また，充填時に20 g/lの臭化カリウム溶液を５ml添加してよく混合した。円筒内の臭化物イオン含量の減少率からNO3-Nの溶脱量を推定し，補正した無機態窒素含量と有機質資材窒素無機化予測モデルによって計算した無機化予測値を比較した。

３．結果と考察

3.1　栽培期間中の気象条件

栽培期間中の気象条件を**Fig. 1**に示した。降水量は平年よりもやや少なめに推移した。気温は９月，10月は平年並みであったものの，11月は平年

Table 1　Properties of cattle manure compost in the experiment.

	Moisture	Total N	Total C	Inorganic N[1]	P_2O_5	K_2O
	%					
Cattle manure compost	48.6	2.4	38.4	0.04	4.2	4.5

[1] Inorganic nitrogen is the sum of NH4-N and NO3-N.

© The Ito Foundation

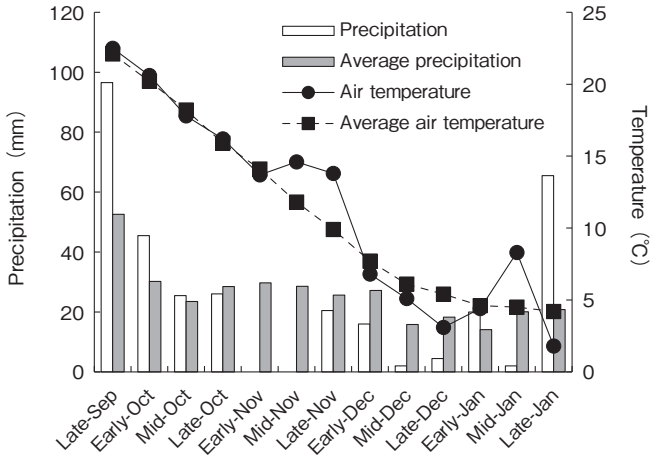

Fig. 1　Air temperature and precipitation during the growing season, Kikuchi City, Kumamoto Prefecture
Cited from the website of the Japan Meteorological Agency.

値よりも高く，12月は平年値よりも低く推移した。本試験では出穂始期となった12月９日に１回目の収量調査を行い，その45日後の１月23日に２回目の収量調査を行ったが，生育ステージは出穂始期のままであった。一般にIRの生育下限温度は５℃と報告されているが[6]，12月から１月にかけては５℃を下回る時期が多く，IRの生育が進みにくかったためと考えられた。

3.2　乾物収量および倒伏程度

IRの乾物収量は12月では517 kg/10 aから672 kg/10 a，１月では697 kg/10 aから890 kg/10 aであり，収穫時期を１月にすると，収量は高くなる傾向にあった（$p < 0.1$，**Fig. 2A**）。

また，堆肥施用の効果と収穫時期の間には交互作用が認められており，堆肥施用の効果は収穫時期により異なったと考えられた（$p < 0.1$，**Fig. 2A**）。具体的には12月に収穫する場合には，堆肥の施用により，乾物収量が増加する傾向にあったものの，１月ではそのような効果は認められなかった。

この原因として，１月に収穫した場合には倒伏が発生した試験区があったことが影響したと考えられた（**Fig. 2B**）。特に堆肥を施用した区では，窒素施肥量の増加とともに倒伏程度も増加しており，N10＋M区では顕著な倒伏が見られ，12月から１月にかけての乾物収量の増加程度が他の区よりも著しく低かった（**Fig. 2A**）。そのため，乾物収量に与える堆肥施用の効果が，収穫時期により異なる原因になったと考えられた。

3.3　粗タンパク質含有率

CP含有率は12月に収穫した場合には，いずれの試験区においても約20%，45日経過後の１月に収穫した場合でも約16%であった（**Fig. 2C**）。また，12月から１月に収穫時期が遅れることで，CP含有率は有意に低下するものの（$p < 0.01$），収穫時期が同じであれば他の処理間に有意な差はなかった。

日本標準飼料成分表[2]によれば，IR生草の年内刈り（出穂前）のCP含有率が26.9%，１番草（出穂期）のCP含有率は13.7%，および１番草（開花期）のCP含有率は8.3%とされている。本試験で得られたIRのCP含有率は，年内刈り（出穂前）の値よりは低かったが，いずれの収穫時期も，１番草の出穂期および開花期のCP含有率を

© The Ito Foundation

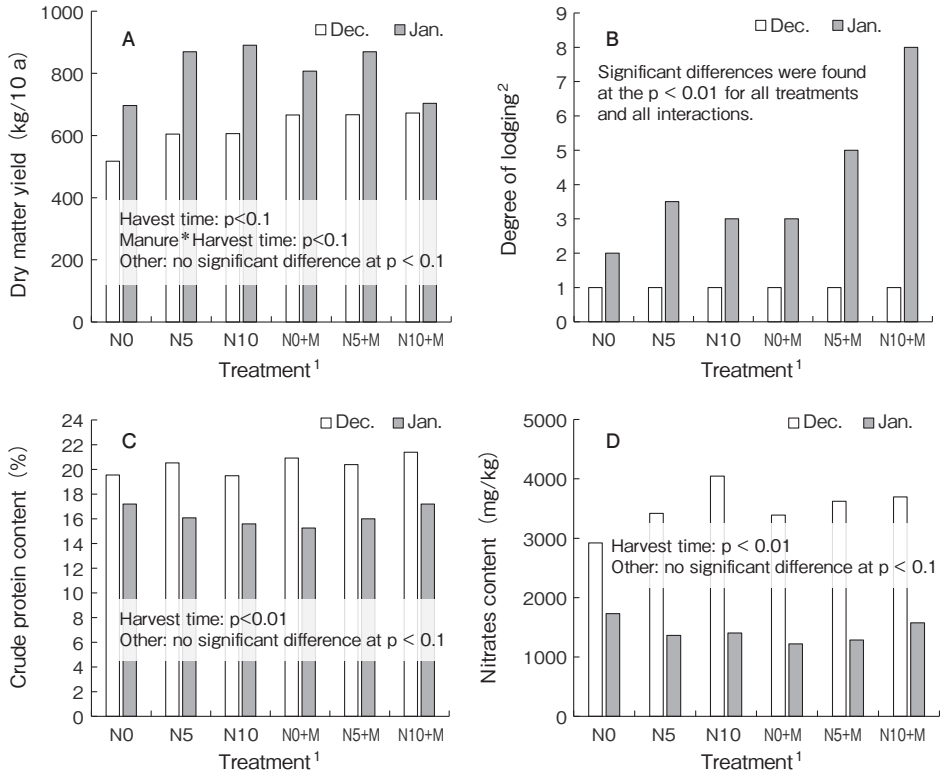

Fig. 2　Dry matter yield (A), Degree of lodging[2] (B), Crude protein content (C) and Nitrates content (D) of Italian ryegrass

A three-way Anova was conducted with nitrogen application, manure application, and harvest time as factors.

[1]Number means amount of nitrogen fertilizer application and +M means manure application.

[2]Degree of lodging is indicated by a score of 1 to 9, with 1 indicating no lodging and 9 indicating terrible lodging.

上回っていた。特に12月から１月の収量調査時までの間には45日経過しているが，そのような場合でもCP含有率は16％程度を維持していた。冬季に収穫する本作型では，収穫期のIRの生育の進展が緩やかであり，栄養価の安定した粗飼料を生産しやすいと考えられた。

3.4　硝酸態窒素含量

12月に収穫した場合，NO3-N含量は最も高いＮ10区では4048 mg/kg，最も低いＮ０区でも2920 mg/kgと高かった(**Fig. 2D**)。一方，１月に収穫した場合，NO3-N含量は最も高いＮ０区でも1728 mg/kg，最も低いＮ０＋M区では1220 mg/kgと有意に低下した（p＜0.01)。なお，収穫時期以外の他の処理の影響は認められなかった。

一般に家畜に給与可能なNO3-N含量の基準として，1000 mg/kgが用いられるが，本試験ではいずれの処理もこの値を超えていた[7)]。ただし，Ｎ５区，Ｎ10区，Ｎ０＋M区およびＮ５＋M区では，１月に収穫する場合には1500 mg/kgを下回っており，妊娠牛への給与にあたっては乾物総量の50％まで，また，妊娠牛以外には給与制限がない値となっていた[7)]。

3.5　堆肥の肥効予測とその検証

牛ふん堆肥由来の無機態窒素量は施用124日後で溶脱補正後の実測値が6.15 kg/10 a，予測値が6.96 kg/10 aであった（**Fig. 3**）。試験期間全体の予測誤差については，平均絶対誤差が0.49，平均平方二乗誤差が0.55およびIndex of Agreement

© The Ito Foundation

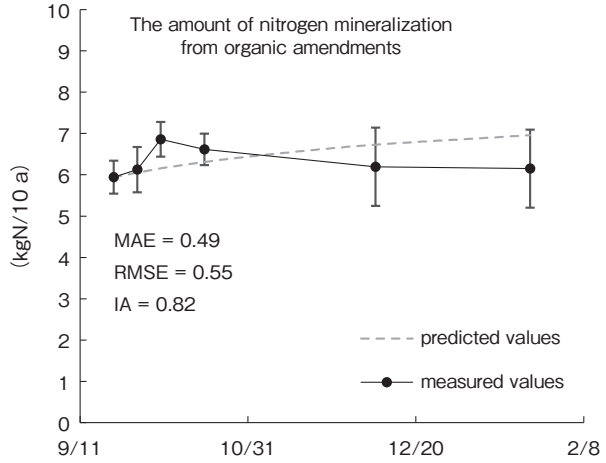

Fig. 3　The amount of nitrogen mineralization from cattle manure compost
Measured values are corrected for nitrogen leaching caused by rainfall. The initial value indicates the amount of inorganic nitrogen originally contained in the cattle manure compost. Bars show standard deviation of measured values（n＝3）. MAE is mean absolute error. RMSE is root mean square error. IA is Willmott's Index of Agreement. It varies between 0.0 and 1.0 where a computed value of 1.0 indicates perfect agreement between the observed and predicted observations, and 0.0 connotes one of a variety of complete disagreements. IA is sensitive to systematic model bias, and values > 0.6 indicate satisfactory model performance[8].

（IA）が0.82であった。IAは実測値と予測値の平均値の一致度を示す指標で，［0，1］の値を取り1で観測値と予測値が完全一致，0で完全に不一致を意味しており，0.6以上の値は満足のいくモデル性能であることを示している。これらのことから，有機質資材無機化モデルは牛ふん堆肥の窒素無機化量を実用上十分な精度で予測できることが示された。

3.6　イタリアンライグラスの夏播き栽培に適した栽培管理技術

本試験ではIRの夏播き栽培に適した栽培管理技術を開発するため，施肥管理および収穫時期に水準を設けた試験を実施した。また，本作型に適した堆肥の施用技術を開発するため，窒素無機化予測モデルを活用した堆肥の肥効予測とその検証を行った。

IRの夏播き栽培に適した栽培管理技術について考察すると，本作型では収穫時期を1月にすることで，乾物収量が高まり，NO3-N含量が大きく低下することが明らかになった（**Fig. 2A，D**）。特にN５区，N10区，N０＋M区およびN５＋M区では，いずれも乾物収量が800kg/10 aを超えていた。これはIR夏播き栽培と同じ作型で栽培される飼料用麦類の乾物収量0.6から0.8t/10 aと同等以上であり[9]，IR夏播き栽培の収量としては多収であると考えられた。また，CP含有率は1月においても，いずれも16％前後と高く，栄養価の高い粗飼料を生産できると考えられた（**Fig. 2C**）。

NO3-N含量については，1月に収穫する場合，乾物収量が800 kg/10 aを超えたN５区，N10区，N０＋M区およびN５＋M区では1500 mg/kgを下回っており，妊娠牛には乾物総量の50％まで，また，妊娠牛以外には給与制限がない値となった[7]（**Fig. 2D**）。そのため，飼料設計の際に配慮が必要になるものの，IRの夏播き栽培では1月に収穫することを前提に，N５区，N10区，N０＋M区およびN５＋M区の施肥管理を行うことで，多収と収穫物の栄養価の確保ができると考えられた。

また，堆肥の肥効予測とその検証結果から，

© The Ito Foundation

IR「Kyushu１」の夏播きに適した窒素施肥量を考察すると，本試験で用いた牛ふん堆肥からは，約６kg/10 aの窒素が供給されることが示された（**Fig. 3**）。そのため，上述したＮ５区，Ｎ10区，Ｎ０＋M区およびＮ５＋M区の窒素供給量は５～11kg/10 aと考えられ，IR「Kyushu１」の夏播き栽培では，おおむね５～11 kg/10a程度の範囲となるよう，化学肥料または堆肥による窒素施肥を行うことが望ましいと考えられた。

なお，残された課題として，一般に窒素施肥は乾物収量やCP含有率を高めると考えられるが，本試験ではその影響は明瞭ではなかった（**Fig. 2**）。この原因として窒素肥料および堆肥ともに施用していないＮ０区の乾物収量やCP含有率が高かったこと，堆肥を施用した区では倒伏が発生し，収量に影響したため，窒素施肥の影響が出にくかったことが考えられた。また本試験ではNO3-N含量が高く，最も低い区でも1000㎎／kgを超えていた。そのため，本作型ではNO3-N含量が高まりやすい可能性があると懸念された。

これらの課題を解決し，IRの夏播き栽培に適した栽培管理技術を開発するためには，複数年度で試験を実施し，土壌からの窒素吸収量を考慮したうえで，結果を検討する必要があると考えられた。

４．要　約

本試験では暖地を対象に，いもち病抵抗性IR極早生新品種「Kyushu１」を利用し，いもち病の発生により，これまで困難とされていた９月にIRを播種し，生育の進展が緩慢になる冬季に収穫する新たな作型（夏播き栽培）を確立し，収穫時期によるCP含有率の変動を生じにくくすること，また，有機質資材の窒素無機化予測モデルを活用した堆肥の肥効予測とその検証を行い，IRの生育に合わせた適切な施肥管理技術を開発することを目的に試験を実施した。

その結果，本作型では収穫時期が気温の低い冬季にあたり，IRの生育の進展が緩やかになるため，収穫時期の生育ステージは12月から１月にかけて，ほとんど変わらないことが示された。また，収穫時期を１月にすること，窒素施肥量を５～11 kg/10 aの範囲とすることで，乾物収量は800 kg/10 a以上となること，また，CP含有率16％程度の収穫物が得られることを明らかにした。ただし，NO3-N含量は1000 mg/kgを超えていたことから，過剰な窒素施肥を避けるよう注意が必要なことが示された。また，有機質資材無機化モデルを利用した牛ふん堆肥の窒素無機化量の推測においては，推定値と実測値がほぼ同じであり，実用上十分な精度で予測できることが示された。

文　献

1）　髙橋奈津美，東政則，甲斐敬康，森徹，小畑壽，立山松男，須﨑哲也：宮崎県畜産試験場研究報告，**29**，29～31，2018.
2）　農研機構：日本標準飼料成分表，2009年版，25～50，中央畜産会，東京，2009.
3）　荒川明：イタリアンライグラス「Kyushu１」の特性と九州・沖縄地域での乾物生産性，日本草地学会誌，**67**，35～40，2021.
4）　小林創平，古賀伸久，望月賢太：有機質資材の肥効予測標準作業手順書―窒素編―，農研機構，茨城県つくば市，2023．https://www.naro.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/naro/sop/155020.html
5）　古賀伸久，仁科一哉，小林創平，望月賢太，新美洋，井原啓貴，山口典子，山根剛，草場敬：酸性デタージェント可溶有機態窒素含量を導入した有機質資材窒素無機化予測モデルの構築，日本土壌肥料科学雑誌，印刷中.
6）　池田弘，高橋保夫：水田裏作のイタリアンライグラスに対する豆科牧草混播に関する研究　第３報イタリアンライグラスとコモンベッチ混播の収量性と有効積算温度との関係について，日本作物学会紀事，**36**，55～62，1967.
7）　農研機構：日本飼養標準肉用牛，2008年版，131～138，中央畜産会，東京，2008.
8）　Willmott, C. J.：On the validation of models, *Physical Geography*，**2**，184～194，1981.
9）　近藤聡：夏・秋播き飼料用ムギ類の優良品種と上手な利用法について，牧草と園芸，53(5)，13～16，2005.

© The Ito Foundation

和牛向け稲発酵粗飼料および発酵完全混合飼料を厳冬期でも高品質調製するための新規乳酸菌の添加効果の検証

Validation of effects of novel lactic acid bacteria additives on winter-preparation of well-fermented rice whole crop silages and total mixed rations for Japanese beef cattle

遠野　雅徳[1]・西川　明宏[2]・福馬　敬紘[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]広島県立総合技術研究所畜産技術センター)

Masanori Tohno[1], Akihiro Nishikawa[2] and Takahiro Fukuma[2]

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

This study aimed to develop silage additives for further improving the fermentative qualities of whole-crop rice silage (rice WCS) and fermented total mixed ration (TMR) through the isolation of new lactic acid bacterial strains with excellent low-temperature growth properties. Through bacterial culture tests under low-temperature environment, we succeeded in isolating lactic acid bacterial strains, namely *Pediococcus inopinatus* IWT669, IWT685, and IWT687, which were isolated from TMR prepared in a cold region. Because there were no reports in which *P. inopinatus* was isolated from (fermented) feeds, this is a new finding regarding the diversity of the growth environment of *P. inopinatus*. The novelty of each novel isolate was recognized by the fact that each isolate differed from the type strain of *P. inopinatus* in terms of sugar utilization. These novel isolates were found to have superior low-temperature growth ability compared to the conventional *Lentilactobacillus buchneri* subsp. *buchneri* IWT192. During the fermentation process of rice WCS at low-temperature, novel isolates significantly accelerated silage fermentation in promoting lactic acid production, suggesting that they had excellent growth and viability in rice WCS. Using strain IWT685 as an inoculant for preparation of fermented TMR, the fermentation qualities were significantly improved, as shown by lower pH, higher lactic acid content, and reduction of the loss of the fresh matter. In the future, by clarifying the mechanisms of improving fermentation qualities of rice WCS and fermented TMR by *P. inopinatus* -based silage inoculants, it is expected that these novel isolates will be put to practical use as new silage additives.

© The Ito Foundation

１．目　　的

高品質な「和牛肉」の価値が世界中で認められている。「農林水産物・食品の輸出拡大実行戦略（2022年12月，農水省）」において，牛肉は「和牛として世界中で認められ，人気が高く，引き続き輸出の伸びに期待」とされている。和牛の輸出拡大については，2019年の輸出実績額の297億円に対して，2025年の輸出目標額は約5.4倍の1,600億円に設定されている。本目標の達成には，和牛の生産基盤の拡大が必要不可欠であり，出荷頭数の大幅な増加が求められることは論を俟たない。

しかし，和牛の生産現場の弱体化は深刻である。生産拡大が急務であるにもかかわらず，総飼養頭数は約1,600千頭の横ばいで推移しており，過去10年間に飼養戸数が約３割も減少している。生産者１人当たりの飼養頭数が急速に増加していることは明白である。担い手不足，高齢化，生産者１人で管理できるキャパシティの限界，設備投資の負担増といったさまざまな困難に直面し，飼養現場の急激な拡大は容易ではない。これらの問題解決のため，出荷頭数を増やすだけではなく，基本の飼養管理技術をより向上させ，生産費の大半を占める飼料代の低減や，飼料生産・給与に関わる作業負担の軽減策が求められる。まさに，生産コストを抑え省力的かつ効率的な生産技術の創成が必要不可欠である。

現在の肥育牛管理の主流は分離給与方式である。穀類を中心とする濃厚飼料とβカロテン含量の少ない稲わら等の粗飼料を別々に給与する本方式は，濃厚飼料の選び食いに起因するルーメンアシドーシス等の障害により，牛の体調不良等による生産性の低下が見られることがある。分離給与方式には「どんな飼料を，どの程度，どのタイミングで給与したら良いか」を見定める熟練技術が求められる。だからこそ，和牛には価値があるとの見立てもできることから，“匠の技”に基づく肥育管理技術の発展や継承は，今後も重要であろう。一方で，上記の生産拡大に関する目標と課題との間のギャップを埋めるためには，和牛肉の価値を損なわずに，新たな飼料生産・給与方法の“標準化”につながる技術開発も同時に進める必要がある。

そこで我々は，工場生産型の飼料製造が可能であり，省力的給与も実現できる発酵TMR（混合飼料，Total Mixed Ration）と発酵TMR製造にも活用される稲発酵粗飼料（イネホールクロップサイレージ，イネWCS）に着目している。これまでに，高品質かつ低コストでイネWCSを調製する技術開発を進め（2016年度農研機構重点普及成果：高品質・低コストのイネWCS生産体系）[1)]，広島県内において晩秋期に調製されたイネWCSを活用して和牛用TMR調製技術の開発にも取り組んできた[2)]。これまでの知見を踏まえ，和牛の生産基盤の拡大を推進するためには，①飼料用稲の収穫作業の分散技術や，②稲わらの代替となるβカロテン低減イネWCS調製技術のさらなるバージョンアップが必要であると着想した。そこで本研究では，低温増殖性にさらに優れる乳酸菌株の探索を通じて，イネWCSや発酵TMRのさらなる高品質化に資するサイレージ添加用乳酸菌の開発に取り組む。これにより，①飼料用稲の収穫作業を晩秋期（本州で11月中旬を想定）から厳冬期の初め（本州で12月中旬までを想定）まで１ヶ月程度拡大し，収穫作業期間の“ゆとり”を生み出しながら，②飼料用稲の立毛乾燥期間の延長によって，イネWCS中のβカロテン含量をさらに低減させるという新たな価値の創造を目指す。さらに，発酵TMR製造時に発酵遅延や品質のバラツキが発生する課題に対して，発酵TMRに特化したサイレージ添加用乳酸菌の開発事例がない状況下で研究着手するにあたり，常温発酵TMRモ

© The Ito Foundation

デルを用いた乳酸菌の発酵品質改善効果に関する一次検証を行うこととした。

2．方　法

2.1　低温増殖性に優れる新規乳酸菌の分離

低温増殖性に優れる乳酸菌の探索のため，以下に詳述するとおり，新規乳酸菌株の分離を試みた。寒冷地である岩手県内で調製されたTMRサンプル10ｇを滅菌蒸留水100mlに懸濁後，ホモジナイザ（ProMedia SH-II，株式会社エルメックス）で１分間処理し，TMRサンプルの抽出液を調製した。本抽出液をMRS（de Man, Rogosa, Sharpe）寒天培地（Difco）に塗布後，アネロパック・ケンキ（三菱ガス化学株式会社）による嫌気条件下において４℃で10日間培養し，形成された単一コロニーを分離した。得られた各コロニー（IWT669株，IWT685株およびIWT687株）を３回培養純化し，使用時まで10％ジメチルスルホキシドを含む保存液中にて超低温（−80℃）保管した。

2.2　新規乳酸菌株の系統分類学的評価

既報[3]に従って，新規乳酸菌株の16S rRNA遺伝子配列を解読することにより，新規乳酸菌株の系統分類学的評価を実施した。具体的には，ユニバーサルプライマー（27FおよびR1492）を用いたPCR反応により16S rRNA遺伝子を増幅し，BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（ThermoFisher Scientific）によるダイレクトシークエンス法にて当該遺伝子を解読した。得られた16S rRNA遺伝子配列をBasic Local Alignment Search Tool（BLAST）（http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi）とEzBioCloudデータベース[4]にて検索し，新規乳酸菌株の最近縁種を推定した。新規乳酸菌株および近縁種基準株の16S rRNA遺伝子配列をClustal W[5]を用いてアライメント処理し，MEGA software package v. 11[6]上で近隣結合法による系統樹解析を実施した。

2.3　新規乳酸菌株の表現型の解析

新規乳酸菌株の表現型として，発酵飼料中のスターター発酵能を推定する目的から，①糖資化性試験および，②低温条件下における増殖性試験を実施した。糖資化性試験については，市販のAPI 50CH（シスメックス・ビオメリュー株式会社製）の取扱説明書に準じた培養試験により，各種糖源に対する新規乳酸菌株の資化能を判定した（30℃，48時間培養）。供試菌株として，新規乳酸菌３株（IWT669株, IWT685株およびIWT687株）とJCM 12518^{T}株を用いた。低温条件下における増殖性試験については，MRS液体培地（Difco）で新規乳酸菌株を前培養後，新たな同液体培地に初発菌数5.0×10^{6} colony forming unit（CFU）/mlで接種し，４℃で21日間静置培養した。菌体の増殖については，培養終了後の培養懸濁液のOD600値を測定することにより評価した。供試乳酸菌株として，既報の*Lactobacillus buchneri*（現*Lentilactobacillus buchneri* subsp. *buchneri*）IWT192株（畜草２号株[7,8]）および新規乳酸菌３株（IWT669株，IWT685株およびIWT687株）を用いた。

2.4　新規乳酸菌を用いたイネWCSへの添加試験

広島県内で栽培された飼料用稲「たちすずか」を収穫後，原料草１ｇに対して各供試乳酸菌株を1×10^{5} CFU個添加し，小規模サイレージ発酵試験法[9]により５℃の温度条件下で８ヶ月間貯蔵した。具体的には，パウチ袋（飛竜N-9, 旭化成パックス株式会社）に原料草を100ｇ入れ，業務用卓上密封包装機（SQ-202，シャープ株式会社）を用いて脱気密封することでイネWCSを作製した。供試乳酸菌株として，IWT192株（畜草２号株[7,8]）および新規乳酸菌３株（IWT669株，IWT685株およびIWT687株）を用いた。

© The Ito Foundation

イネWCS開封後の発酵品質を評価するため，イネWCSサンプル10ｇに滅菌蒸留水100mlを加えて十分に混合した。ホモジナイザ（ProMedia SH-II，株式会社エルメックス）で５分間処理し懸濁液を得た。滅菌蒸留水を用いて本懸濁液の段階希釈系列を作成し，乳酸菌数（CFU/g FM新鮮物）とクロストリジア菌数（CFU/g FM）を測定した。乳酸菌数については，MRS寒天培地（Difco）を利用し，30℃の嫌気条件下（アネロパック・ケンキ，三菱ガス化学株式会社）で１週間培養後，培地上のコロニー数を計測した。クロストリジア菌数の測定については，上記の段階希釈系列を75℃で15分間加熱処理した後，クロストリジア測定用培地「ニッスイ」（日水製薬株式会社）を利用し，30℃の同嫌気条件下で１週間培養後，培地上のコロニー数を計測した。

サンプルのpH測定と有機酸分析は以下のとおり実施した。上述の懸濁液をろ紙（定量濾紙No. 5A，アドバンテック東洋株式会社）を用いてろ過処理し抽出液を得た。pHメーター（SevenExcellence S400，メトラー・トレド株式会社）により抽出液のpHを測定した。有機酸分析については，抽出液をイオン交換樹脂（Amberlite IR120H＋，東京有機化学工業株式会社）を用いて処理し，0.45μmフィルター（DISIC-13HP，アドバンテック東洋株式会社）を用いてろ過処理したサンプルを用いた。HPLC有機酸分析システム（日本分光株式会社）により，乳酸含量（％FM）と酢酸含量（％FM）を測定した[9]。試験区の反復は３とし，統計解析は一元配置分散分析後にTukey法による多重比較検定を行った。

2.5　新規乳酸菌を用いた発酵TMRへの添加試験

TMR原料として，トウモロコシフレーク，フスマ，大豆粕，チモシー乾草，塩化ナトリウムおよび炭酸カルシウムを用いた（粗濃比＝３：７，水分40％）（**Table 1**）。これらの原料を十分に混合後に各供試乳酸菌株をそれぞれ添加（原料１ｇ当たり１×10^5 CFU個）し，25℃の温度条件下で30日間貯蔵した。具体的には，パウチ袋（味噌用ガス抜きバルブ付規格袋，有限会社ムラマツ合成）に混合したTMR原料を260ｇ入れ，卓上型ノズル式脱気シーラー（V-301，富士インパルス株式会社）で密封することで発酵TMRを作製した。供試乳酸菌株として，IWT192株およびIWT685株を用いた。サンプルのpH測定と有機酸分析は以下のとおり実施した。100ｇの発酵TMRを蒸留水500mlに24時間冷蔵浸漬し抽出液を得た。pHメーター（D-71，株式会社堀場製作所）を用いて抽出液のpHを測定し，高速液体クロマトグラフィー（LC-2030C，株式会社島津製作所）を用いて乳酸含量（％FM），酢酸含量（％FM）およびエタノール含量（％FM）を測定した。高速液体クロマトグラフィーの分析条件は以下のとおりである。

カラム：HPX-87H（BIO-RAD社）
カラム温度：40℃
検出器：示差屈折検出器（RID-20A，株式会社島津製作所）
移動相：0.01規定硫酸
送液速度：0.6ml／分

原物ロス測定は以下のとおり実施した。発酵前

Table 1　Ingredients of experimental TMR

Item	%DM
Corn flake	35.1
Wheat bran	28.1
Soybean meal	5.9
Timothy hay	30
Salt	0.6
Calcium carbonate	0.3

DM, dry matter.

© The Ito Foundation

後のパウチを含めた全重量を測定し，発酵前重量（g）から発酵後重量（g）を減法することにより算出した。試験区の反復は3とした。統計解析は一元配置分散分析後にTukey法による多重比較検定を行った。

3．結果と考察

3.1　低温環境下より*Pediococcus inopinatus*に属する新規乳酸菌株の分離に成功

寒冷地で調製されたTMR抽出液より，低温増殖性乳酸菌株の分離を試みた結果，市販MRS培地上から複数の乳酸菌様形態をしたコロニーの形成が認められた。得られたIWT669，IWT685およびIWT687各分離株の16S rRNA遺伝子配列解析により，これらの菌株は，*Pediococcus inopinatus*の基準株JCM 12518^{T}の16S rRNA遺伝子とそれぞれ99.9％，100％，99.8％の類似度を示した。*Pediococcus*属全菌種を用いた近隣結合法による系統樹解析により（**Fig. 1**），新規乳酸菌3株は*P. inopinatus*の基準株DSM 20285^{T}と同一の系統樹クラスターを形成した。以上の結果から，新規乳酸菌IWT669株, IWT685株およびIWT687株は，

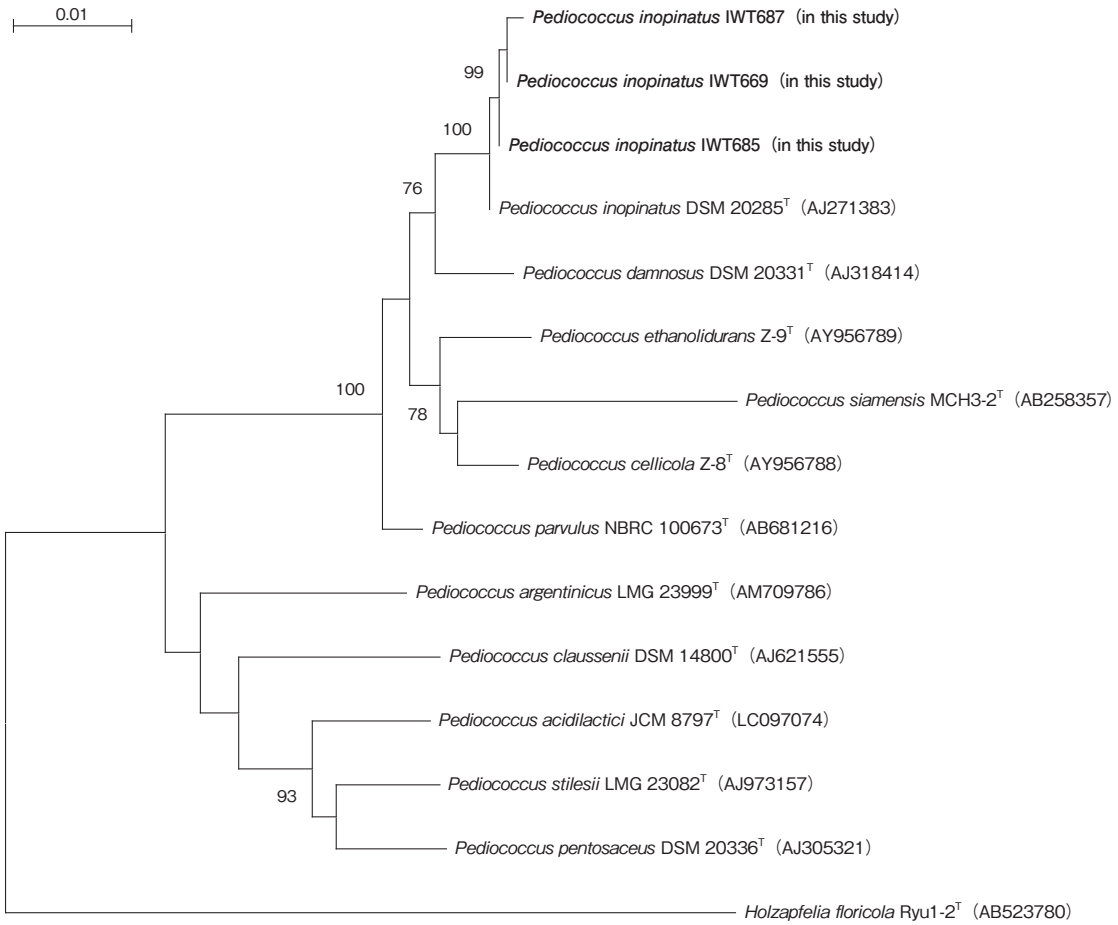

Fig. 1　Neighbor-joining tree based on 16S rRNA gene sequences, showing the phylogenetic relationships of strains IWT669, IWT685 and IWT687 (boldface type) with their related taxa. Bootstrap percentages of > 70% (based on 1,000 replications) are shown at the branch points. Bar, 0.01 substitutions per nucleotide position. The sequence of *Holzapfelia floricola* Ryu1-2^{T} was used as an outgroup.

© The Ito Foundation

Table 2　Differential characteristics among *Pediococcus inopinatus* IWT669, IWT685, IWT687 and JCM 12518^{T}.

Characteristic	IWT669	IWT685	IWT687	JCM 12518^{T}
Methyl-α-D-mannopyranoside		■		■
Amygdalin	■	■		■
Arbutin	■	■		■
D-Maltose	■	■		■
D-Lactose	■	■		
D-Sucrose		■		■
D-Turanose	■	■	■	

Grey shading, acid production from sugar indicated; white, no acid production from sugar indicated.

すべて*P. inopinatus*に属することが明らかになった。*P. inopinatus*は1978年にBackによって見出された*Pediococcus*属の菌種であり，基準株の分離源はビール酵母である[10]。我々の研究チームの見識内とはなるが，*P. inopinatus*がTMR等の（発酵）飼料から分離された事例はなく，*P. inopinatus*の生育環境の多様性に関する新知見と考えられる。また，*P. inopinatus*の至適生育可能温度は30-32℃とされており，４℃等の低温環境下の生育に関する報告例がないことから，新規乳酸菌株の低温増殖能はきわめてユニークであると考えられる。

新規乳酸菌３株の糖資化性試験の結果を**Table 2**に示した。IWT669株は基準株JCM 12518^{T}株と，メチル-α-D-マンノピラノサイド，D-ラクトース，D-スクロース，D-ツラノースの資化性が異なっており，IWT669株に顕著にD-ラクトースとD-ツラノースの利用性が認められた。IWT685株は，基準株JCM 12518^{T}株とD-ラクトースとD-ツラノースの資化性が異なっており，IWT685株に顕著にこれらの２糖の利用性が認められた。IWT687株は，基準株JCM 12518^{T}株と，メチル-α-D-マンノピラノサイド，アミグダリン，アルブチン，D-マルトース，D-スクロース，D-ツラノースの資化性が異なっており，IWT687株に顕著にD-ツラノースの利用性が認められた。以上のように，各新規乳酸菌株と既存の基準株とでは，糖資化性プロファイルが異なっており，各新規乳酸菌株の新規性を裏付ける知見であると考えられる。

我々の研究チームでは，低温増殖性に優れる乳酸菌として，IWT192株を既報において報告している[7, 8]。新規乳酸菌３株と従来株であるIWT192株の低温増殖能を比較した結果，本研究で新たに分離した乳酸菌３株の低温増殖能力は，IWT192株よりも優れることが明らかとなった（**Fig. 2**）。このことから，新規乳酸菌３株は従来技術であるIWT192株よりも，低温環境下でも速やかに増殖し，サイレージの発酵初期から乳酸発酵を効率的に促進できる可能性が示唆された。

3.2　新規乳酸菌添加によるイネWCSの発酵促進効果

新規乳酸菌株によるイネWCSの発酵促進効果を検証するため，飼料用稲「たちすずか」にサイレージ添加用乳酸菌としてこれらの菌株を添加後，寒冷地貯蔵のモデル試験として５℃一定の温度条件下で貯蔵し，開封後のイネWCSの発酵品質を評価した。**Table 3**に示すように，従来技術のIWT192株だけでなく，新規乳酸菌３株を添加処理した区においても，無添加区と比べて有意なpH低下が認められた。興味深いことに，新規乳酸菌IWT669株，IWT685株およびIWT687株は，

© The Ito Foundation

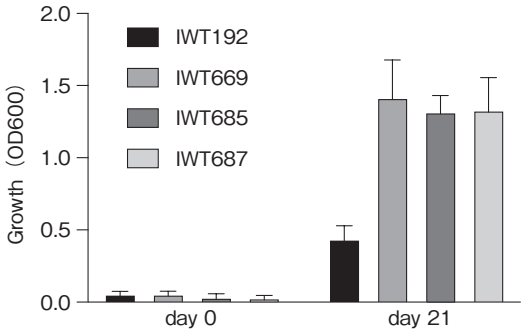

Fig. 2　Evaluation of low temperature growth of strains IWT192, IWT669, IWT685 and IWT687 in MRS broth at 4 ℃　by measuring absorbance at 600 nm after 21 days culture. Error bars are representative of the three independent experiments.

Table 3　Fermentation products and microorganism composition of whole crop rice silage stored for 8 months at 5℃ in small-fermentation system inoculated without and with strains IWT192, IWT669, IWT685 or IWT687.

Item	None	IWT192	IWT669	IWT685	IWT687
pH	4.39 ^{d}	4.32 ^{c}	4.02 ^{a}	4.11 ^{b}	4.12 ^{b}
Lactic acid（% FM）	1.0 ^{a}	1.1 ^{a}	1.6 ^{c}	1.5 $^{b\,c}$	1.5 ^{b}
Acetic acid（% FM）	0.23 ^{b}	0.26 ^{c}	0.20 ^{a}	0.24 $^{b\,c}$	0.25 $^{b\,c}$
Lactic acid bacteria（log CFU/g FM）	8.69 ^{a}	8.75 ^{a}	9.49 ^{b}	9.59 ^{b}	9.46 ^{b}
Clostridia（log CFU/g FM）	6.25 ^{a}	5.84 ^{a}	5.73 ^{b}	5.37 ^{a}	5.60 ^{a}

Means of triplicate silages. Values with different letters are significantly different (p<0.05). FM, fresh matter; cfu, colony forming unit.

IWT192株よりもpHの低下が顕著であり，低温での発酵能については，新規乳酸菌３株のほうがさらに優れることが認められた。有機酸含量を分析した結果，新規乳酸菌IWT669株，IWT685株およびIWT687株区では，無添加区およびIWT192株区と比較して，乳酸含量の有意な増加が認められた。各新規乳酸菌株添加区では，酢酸産生は無添加区と同程度であったことから，低温での乳酸発酵能力に優れるものの，酢酸産生には影響しないと考えられた。

さらに，各新規乳酸菌添加区において，イネWCS貯蔵後の乳酸菌数の有意な増加が認められた。以上の結果は，新規乳酸菌IWT669株，IWT685株およびIWT687株は，低温での増殖・生存・乳酸発酵能力において，IWT192株よりもさらに優れることを示すものである。発酵飼料中のタンパク質などの栄養成分の分解に関与するクロストリジア菌数の抑制効果については，無添加区と比較した場合に新規乳酸菌IWT669株，IWT685株およびIWT687株区で菌数の低減が見られ，特にIWT685株添加区において有意な菌数抑制効果が認められた。

3.3　発酵TMRへの新規乳酸菌株の添加による有益効果

各種原料を混合することにより，発酵環境としては複雑系となる発酵TMRの調製において，*P. inopinatus*乳酸菌の添加効果を検証した。添加乳酸菌モデルとしてIWT685株を選定し，従来技術

© The Ito Foundation

Table 4　Fermentative qualities of fermented TMR stored for 30 days at 25℃ in small-fermentation system inoculated without and with strains IWT192 or IWT685.

Item	None	IWT192	IWT685
pH	4.42[c]	4.28[b]	4.02[a]
Lactic acid（% FM）	3.0[a]	2.9[a]	3.8[b]
Acetic acid % FM）	0.3[b]	1.3[b]	0.1[a]
Ethanol（% FM）	0.1	0.5	nd
FM loss（g）	5.63[b]	9.70[c]	3.47[a]

Means of triplicate silages. Values with different letters are significantly different （p<0.05）. FM, fresh matter; nd, not detected.

のIWT192株も比較対照区として供試した。**Table 4**に示すとおり，IWT685株およびIWT192株の各添加区では，無添加区と比べて有意なpH低下が認められた。また，従来技術のIWT192株よりもIWT685株のほうが有意なpH低下効果を示した。IWT685株区は，無添加区およびIWT192株区と比較して，有意な乳酸含量の増加が確認された。IWT192株区では，無添加区と比較して有意な乳酸含量の増加は認められなかったが，酢酸含量の増加が認められた。IWT685株区の酢酸産生は，無添加区およびIWT192株区と比較して，顕著な増加は認められなかった。本結果より，発酵TMRにおけるIWT685株の優れた乳酸発酵能力が認められたものの，IWT685株添加による酢酸産生への影響はないものと考えられた。発酵飼料中に存在する酵母がエタノールの産生に主に関与するが，エタノール含量を測定した結果，IWT685株区では未検出であった。さらに興味深いことに，IWT685株区では，原物ロス量が最も低く，発酵による原物ロスの抑制効果が高いことが認められた。以上のことから，IWT685株は，発酵TMRにおける乳酸発酵を促進して速やかにpHを低下させることにより，原物ロス量を低く抑えることが明らかとなった。IWT192株はイネWCSの発酵促進と好気的変敗防止の観点で選抜されてきた乳酸菌株であり[7, 8]，発酵TMRモデルにおける評価はこれまで実施されていない。イネWCSや発酵TMR等の多様なサイレージ製造において，それぞれの飼料に最適な乳酸菌スターターを選定し，有効活用することの重要性が示唆された。

以上，本研究の成果を基礎的知見とし，今後，*P. inopinatus*乳酸菌によるイネWCSや発酵TMRの発酵品質改善効果の詳細を明らかにし，*P. inopinatus*乳酸菌の温度感受性や発酵促進作用の機序を解明することにより，新規サイレージ添加用乳酸菌としての実用化に取り組んでいきたい。

4．要　約

本研究では，低温増殖性に優れる新規乳酸菌株の分離を通じて，イネWCSや発酵TMRのさらなる高品質化に向けたサイレージ添加用乳酸菌製剤の開発に取り組むことを目的とした。低温環境下における培養試験を通じて，寒冷地で調製されたTMRを分離源とする乳酸菌*Pediococcus inopinatus* IWT669株，IWT685株およびIWT687株の分離に成功した。*P. inopinatus*が発酵飼料から分離された事例はなく，*P. inopinatus*の生育環境の多様性に関する新たな知見となった。各新規乳酸菌株と*P. inopinatus*基準株とでは，糖資化性が異なっていたことから，各新規乳酸菌株の新規性が認められた。これらの新規乳酸菌株は，従来

© The Ito Foundation

技術である*Lentilactobacillus buchneri* subsp. *buchneri* IWT192株よりも，優れた低温増殖能力を有することが明らかとなった。イネWCSの低温発酵条件下において，新規乳酸菌株による有意な乳酸発酵促進効果が認められ，イネWCS中において新規乳酸菌株が優れた増殖および生存能力を有することが示唆された。さらに，新規乳酸菌IWT685株を発酵TMR製造時に添加して貯蔵することにより，有意な乳酸産生の増加とpHの低下が認められ，発酵TMRの原物ロス量を低減できることが明らかとなった。今後，*P. inopinatus*乳酸菌によるイネWCSや発酵TMRの発酵品質改善効果のメカニズムを明らかにすることにより，新規サイレージ添加用乳酸菌としての実用化が期待できる。

文　献

1）遠野雅徳：動画で実感！標準作業書で納得！農研機構重点普及成果イネホールクロップサイレージ技術，牧草と園芸，**70**(1)，7～11，2022.

2）河野幸雄：極短穂イネホールクロップサイレージを用いた和牛用TMRの開発，日本草地学会誌，**66**(1)，50～53，2020.

3）Tohno, M., Tanizawa, Y., Sawada, H., Sakamoto, M., Ohkuma, M., Kobayashi, H.：A novel species of lactic acid bacteria, *Ligilactobacillus pabuli* sp. nov., isolated from alfalfa silage, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **72**, 005587, 2022.

4）Yoon, S. H., Ha, S. M., Kwon, S., Lim, J., Kim, Y., Seo, H., Chun, J.：Introducing EzBioCloud: a taxonomically united database of 16S rRNA gene sequences and whole-genome assemblies, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **67**(5)，1613～1617，2017.

5）Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., Higgins, D. G.：Clustal W and Clustal X version 2.0, *Bioinfomatics*, **23**(21)，2947～2948，2007.

6）Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K.：MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms, *Mol. Biol. Evol.*, **35**(6)，1547～1549，2018.

7）遠野雅徳：高糖分・高消化性イネホールクロップサイレージ調製に対応する乳酸菌「畜草２号」の紹介，牧草と園芸，**65**(4)，６～11，2017.

8）Tanizawa, Y., Kobayashi, H., Nomura, M., Sakamoto, M., Arita, M., Nakamura, Y., Ohkuma, M., Tohno, M.：*Lactobacillus buchneri* subsp. *silagei* subsp. nov., isolated from rice grain silage, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **70**(5)，3111～3116，2020.

9）Tohno, M., Kobayashi, H., Tajima, K., Uegaki, R.：Strain-dependent effects of inoculation of *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* on fermentation quality of paddy rice (*Oryza sativa* L. subsp. *japonica*) silage, *FEMS Microbiol. Lett.*, **337**(2)，112～119，2012.

10）Back, W.：Zur Taxonomie der Gattung *Pediococcus*, *Brauwissenschaft*, **31**，237～250，1978.

© The Ito Foundation

生時低体重でも生後発育回復できる子豚は何が違うのか？―血液指標の探索―

What makes low birth weight piglets recover their growth after birth?
―Blood profiles―

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

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

It is widely accepted that low birth weight in piglets (≤ 1.0kg) correlates with decreased survival and lower postnatal growth rates than those born with normal body weights. When comparing their growth after birth, some of the low birth weight piglets were grown as large as their normal birth weight littermates. To examine what makes the difference of low birth weight piglets to recover their growth postnatally, various components of the blood were measured in this study. Firstly, three-way crossbred female piglets originated from 16 litters were chosen by their birth weights; one low birth weight pig and one heaviest weight pig in the same litter ("normal pig"). In addition, low birth weight pigs were classified into two groups based on their body weight at 10 wk-old; body weight of 28 kg or more as "growth recovered", and weighing less than 28 kg as "growth retarded". Growth recovered pigs exhibited higher growth performance soon after birth compared to growth retarded pigs. Average daily food intake at 7-8 weeks of age was higher in growth recovered pigs than in growth retarded pigs, but there was no difference in feed efficiency between the two groups. At 6, 8 and 10 wk-old of age, blood samples were collected. The difference in circulating levels of blood proteins, IGF-I, cholesterols, fatty acids, several enzyme activities, amino acids, and their relatives seen between normal and growth retarded pigs, were eliminated in growth recovered pigs. GC-MS analysis showed that there were significant differences in some specific metabolites between growth recovered and retarded pigs at 6 wk-old. However, blood IGF-I concentration of growth recovered pigs became similar to those of normal pigs at 10 wk-old, but it remained low at 6 and 8 wk-old which resembled growth retarded pigs, indicating that both nutritional status of growth recovered and retarded pigs at 6 and 8 wk-old were insufficient compared to normal pigs. Overall, our data strongly suggest that postnatally growth recovered low birth weight pigs can be characterized as pigs which improved under nutritional condition.

© The Ito Foundation

1．目　　的

近年の種豚は驚異的な繁殖成績を示す多産系ハイブリッド種が主流を占め，一腹あたりの総産子数が著しく増加している。しかしながら，産子数の増加とともに未熟産子の数も増えたことから損耗する子豚も多く，結果的には総産子数の大幅な増加ほど離乳頭数は増加していない[1)]。未熟産子とされる生時体重１kg以下の子豚は，離乳までの死亡率が40～60％にもなる[2, 3)]。また，生時低体重で生まれた子豚は，たとえ死亡しなくても飼料効率や疾病対策等の観点から効率的経営を妨げる要因となるため，淘汰すべきか否かと養豚現場では対処に苦慮している。多胎動物である豚の多産化を推進する以上頻出する未熟産子は，解決が望まれる養豚業界特有の課題である。

我々は，H30年度およびH31年度研究助成課題で同腹きょうだいのうち生時体重１kg以下の未熟産子と生時体重最大の産子（正常豚）のペアを用いて，10週齢までの両者の成長を詳細に比較してきた。その中で，低体重で生まれても10週齢時には正常豚と遜色ない発育を示す個体（発育改善豚）と，小さいままでいる個体（発育不良豚）の存在が明らかになった（**Fig. 1**）。この現象から，未熟産子であっても生後に発育改善することが十分可能であると考えられた。

この発育改善豚の生理学的特徴を捉えることが生時低体重子豚解消の技術開発に向けた基盤的知見につながることから，本研究課題では供試材料を血液に特化し，発育改善豚の血液成分・代謝物の中に発育が改善していることの指標となりうる血液マーカーの探索を試みた。また，いつ頃から発育改善の兆候が血液中に認められるのか６週，８週および10週で採血し，血液成分の経時的な変化も明らかにする。

2．方　　法

2.1　供試豚および材料

農研機構畜産研究部門にて生産された三元交雑豚（LWD種）16腹から同腹の雌子豚のうち生時体重が１kg以下の未熟産子と最大の産子（正常豚）のペアを選出した。子豚は４週齢で離乳後，同腹ペアを同じ豚房で10週齢まで不断給餌にて飼養した。毎週齢時に体重測定を行うとともに未熟産子の生後の発育の違いを評価するため，未熟産子のうち10週齢時体重が28kgに到達した子豚を「発育改善豚（改善豚）」と未達の子豚を「発育不良豚（不良豚）」との２群に分類した。採血は，血清用真空採血管を用いて頸静脈より６，８および10週齢時のそれぞれ同時刻に実施した。血液は遠心分離後，上清を回収し各分析に供試するまで－80℃にて保管した。

2.2　飼料摂取量の測定

飼料摂取量を測定するため７～８週齢時に同腹

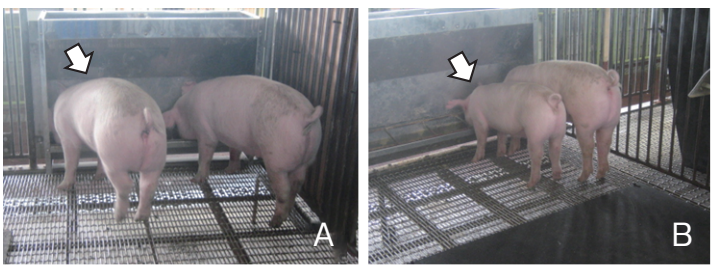

Fig. 1　Appearance of selected female littermates at 10 wk of age. Arrows indicate piglets born at low birth weight with (A) growth recovered postnatally and (B) growth retarded.

© The Ito Foundation

ペアをそれぞれ単飼豚房で飼養し，一週間の給餌量と残飼量の記録により摂食量および飼料効率を算出した。ストレス低減のため，飼養試験開始の一週間前から同腹ペアのまま単飼豚房に馴致させるとともに飼料を徐々に切り換え，相互が視認できる豚房で単飼した。

2.3　血液生化学検査

血清（６，８および10週齢）を用いて，オリエンタル酵母工業株式会社が実施する肝・胆疾患スクリーニングセットに含まれる22項目に尿素窒素，遊離脂肪酸およびグルコースを加えた計25検査項目について依頼分析を行った。

2.4　血清中遊離アミノ酸濃度の測定

血清（６，８および10週齢）と同量の６％スルホサリチル酸水溶液を加えて除タンパクし，上清を限外濾過膜（倉敷紡績）でろ過した後，高速アミノ酸自動分析計（日立Ｌ-8900）により41種類のアミノ酸を解析した。

2.5　血清メタボローム解析

血清に内部標準物質の2-isopropyl malic acidを添加し，Bligh-Dyar法により水溶性画分を抽出した後，その上清を乾固処理した。その後，メトキシアミン塩酸塩とN-Trimethylsilyl-N-methyl trifluoroacetamideによる誘導体化を経て，ガスクロマトグラフィー質量分析機（GCMS-QP2020, 島津製作所）のSCANモードを用いたノンターゲットメタボローム解析を実施した。代謝物データはSmart Metabolite DatabaseおよびMS-DIAL２を用いて同定した後，MetaboAnalyst5.0（https://www.metaboanalyst.ca/）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。

2.6　血清中インスリンおよびインスリン様成長因子濃度の測定

ELISA（enzyme-linked immunosorbent assay）法により，インスリン（R&D Systems）およびインスリン様成長因子（IGF-I, R&D Systems）の血清中濃度（６，８および10週齢）を測定した。

2.7　統計解析

統計解析は，統計パッケージSAS（ver9.12）のMIXEDプロシジャもしくはＲのlmerTestパッケージを用い，生時体重および10週齢体重による分類を主効果，きょうだいの腹を変量効果とした一般線型混合モデルで解析した。最小二乗平均値間の多重比較はTuckey-Kramerの方法で行い，$p<0.05$の場合に差が有意であると判定した。週齢ごとの体重および増体量については統計パッケージＲのt.test関数による対応のないｔ検定にて２群比較を行い，$p<0.05$の場合に差が有意であると判定した。

３．結果と考察

本研究で用いた同腹ペア16組の生時体重の平均値が正常豚で1.6kgであったのに対して，未熟産子は0.8kgであった。未熟産子のうち生後10週齢時に体重28kgに達した改善豚は７頭，未達の不良豚は８頭（１頭死亡のため）であり，10週齢時の平均体重は正常豚38.7kg，改善豚31.7kgおよび不良豚20.7kgとなった。生時から10週齢までの改善豚と不良豚における週別体重および一日平均増体量（ADG）の変化を**Fig. 2** に示した。改善豚と不良豚の体重は生後１週齢から差が生じた（**Fig. 2A**）。他方，ADGも生後１週齢からが改善豚の方で高くなったものの３週，４週および10週齢では両者に差は認められなかった（**Fig. 2B**）。生後７～８週齢時の一日平均飼料摂取量はそれぞれの体格相応に改善豚が不良豚を２倍近く上回ったが，飼料効率に有意な差は認められなかった。

生後の発育が異なる改善豚と不良豚では生理的な違いがあるかどうかを明らかにするため６，８および10週齢時に採血し，正常豚を含む３群の血液成分を比較した。正常豚に比べ不良豚で低下していた総タンパク質，アルブミン，総コレステ

© The Ito Foundation

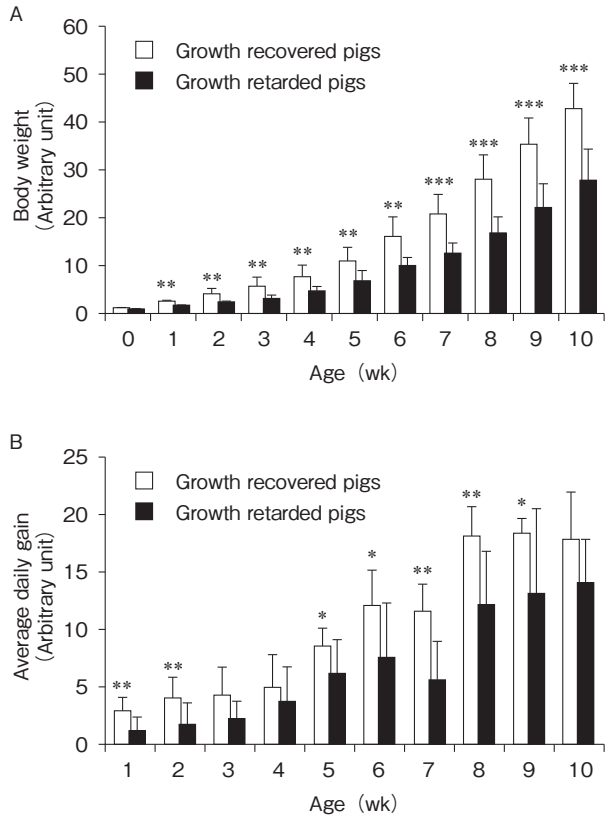

Fig. 2　Increase of body weight（A）and average daily gain（B）from birth to 10 wk of piglets born at low birth weight. All data were expressed relative to the initial value of growth retarded pigs（= 1）. There was n = 7 for growth recovered pigs and n = 9 for growth retarded pigs except the data from 10 wk of age were n = 8 for growth retarded pigs since one piglets died at 10 wk-old. Values are means ± SD. Asterisks indicate statistically significant differences between two groups（*p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001）.

ロール，遊離コレステロール，エステル型コレステロール，LDLコレステロール，HDLコレステロール，ヒスチジンおよびIGF-I濃度が，改善豚では正常豚との間に差が認められなくなった。また，正常豚に比べ不良豚で増加していたアラニンアミノトランスフェラーゼ，アルカリフォスファターゼ，遊離脂肪酸，アラニン，2-アミノ酪酸，ヒドロキシプロリンおよび1-メチルヒスチジン濃度が，改善豚では正常豚との差がなくなっていた（データ示さず）。

上述の主要成分に加え，血液中のより微細な代謝物を捉えるため同じ血清試料を用いてGC-MSによるメタボローム解析を行った。検出されたピーク数は最大2,084ピークであり，そのうち計231物質を同定した。正常豚，改善豚および不良豚の3群による比較解析の結果，それぞれ6週齢で30物質，8週齢で8物質および10週齢で16物質に有意差が認められた（**Table 1**）。また，p < 0.1で差があるとされた物質についてMetaboAnalyst5.0を用いた機能解析の結果，Citrate cycle等のKEGG（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes）パスウェイが複数浮上した。

血液成分によっては10週齢時よりも6週齢時のほうが改善豚と不良豚の差が明確なものもあり，

© The Ito Foundation

Table 1　Summary of differential blood metabolite profiles

	Age		
Measurements	6wk	8wk	10wk
Total number of peaks	1,018	2,084	1,174
Total number of metabolites identified	185	223	209
Number of differential metabolites（$p<0.05$）	30	8	16
Number of differential metabolites（$0.05<p<0.1$）	15	6	18
Number of KEGG pathway（$p<0.1$）	9	2	3

10週齢よりも早い段階で発育改善の見極めができる可能性も示唆された。しかしながら，血中タンパク質の栄養状態指標であるIGF-I濃度は，改善豚の６，８週齢時は不良豚と同様に正常豚に比べて低かった。

以上の結果から，同じ未熟産子でも生後の発育の違いにより血液成分が異なることが明らかになった。不良豚が低タンパク質の状況下にあるのに対し[4]，改善豚はその状態がほぼ解消されて10週齢時には栄養状態が好転していることが血液成分からうかがわれた。一方ADGの結果（**Fig. 2B**）からは，栄養状態が改善される時期は出生直後と離乳後の２段階あるものと推察された。今後，本研究成果である改善豚と不良豚に差が認められた血液成分を指標とするような未熟産子の発育改善技術を開発するためには，これらの物質が発育改善の原因と結果のいずれであるかを明らかにしていく必要がある。

４．要　　約

生時体重１kg以下で生まれる未熟産子は，死亡率が高くまた生存したとしても発育が遅いことから，これまで我々は未熟産子と正常産子を比較してきた。その中で，低体重で生まれても10週齢時には正常豚と遜色ない発育を示す個体（改善豚）と，小さいままでいる個体（不良豚）が存在することから，発育の違いにより血液性状が異なるかどうかを明らかにするため本研究では正常豚，改善豚および不良豚における血液成分を比較した。改善群と不良群の体重および平均日増大量の差は生後から現れた。生後７～８週齢時の一日平均摂食量は改善豚の方が不良豚よりも高かったものの飼料効率に両者の差は認められなかった。生後10週齢時の血液成分は，正常豚に比べ不良豚で低い総タンパク質，アルブミン，一部の必須アミノ酸やコレステロール類が改善豚では解消されていた。また，正常豚に比べて不良豚で高い一部の酵素類，非必須アミノ酸が改善豚では解消されていた。血中IGF-I濃度の結果から，不良豚で観察される低栄養状態が10週齢時の改善豚では脱却していることが明らかになった。GCMSメタボローム解析結果では，６週齢時にすでに両者で差のある代謝物が多く認められたことから，10週齢よりも早い段階で発育改善の兆候が血液中に生じている可能性が示唆された。

文　　献

１）　Oliviero, C.：*Molecular Reproduction and Development*, https://doi.org/10.1002mrd. 23572, 2020.
２）　Quiniou, N., Dagorn, J., Gaudré D.：*Livestock Production Science*, **78**, 63～70, 2002.
３）　武田浩輝：*Pig Journal*, **11**, 14～17, 2008.
４）　Xu, W., Bai, K., He, J., Su, W., Dong, L., Zhang, L., Wang, T.：*Nutrition*, **32**, 114～121, 2016.

© 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（Ⅱ）

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

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]Kyusyu 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.

Collar-type wireless 3-axis accelerometer terminals were attached to five heifers, and an accelerometer was also incorporated into the grooming device to collect device operation time. In addition, we are working on incorporating individual identification, posture, and distance information from the brush by AI cameras into the judgment system. With this system, it became possible to accurately measure the brush usage time in seconds, and it became possible to exclude the misjudgments when the brush was not in operation. We are working to improve the accuracy of individual identification while the brush is in operation, and by adding the image analysis results of the video camera's "individual identification, distance and posture", we have improved the accuracy of individual identification (identification rate of 90% or more).

As for the relationship between device usage frequency and health deterioration, no signs of illness such as anorexia, diarrhea and cough were observed from birth to weaning in 7 Holstein cows. However, the average daily weight gain per week, calculated from the weights measured every week, varied greatly depending on the individual. A significant positive correlation was found between daily weight gain and mean frequency of device use during the same period ($r = 0.43$, $p < 0.05$). In other words, there was a tendency for the daily weight gain to be large during the week when the device was frequently used. By monitoring fluctuations in the frequency of device use for each individual, it was possible to predict stagnation in body growth and to take some countermeasures. A positive correlation trend was observed between the frequency of device use every 24 hours and the percentage of time spent ruminating while lying ($r = 0.183$, $p < 0.05$). The increase in rumination while lying during the period when the frequency of equipment use increased may have affected the daily weight gain.

In the future, we would like to proceed our patent of the device usage time sensor in group rearing into practical use. And then our surveys should be targeting during 1 to 2 weeks

© The Ito Foundation

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.

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出生時体重が小さいことなどが原因で抗病性が低いことが多く，下痢，肺炎等による成長遅延，死廃の問題は特に増頭のための早期母子分離や乳牛への和牛受精卵移植において大きく，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量の向上や，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　個体識別の高精度化および首輪型センサ端末の省電力化

2021年度の実験では，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ている。この測定信号の特徴を抽出し，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[3)]。このシステムでは，ブラシが使用されているときには，ブラシを使用している個体の判定は可能となってい

© The Ito Foundation

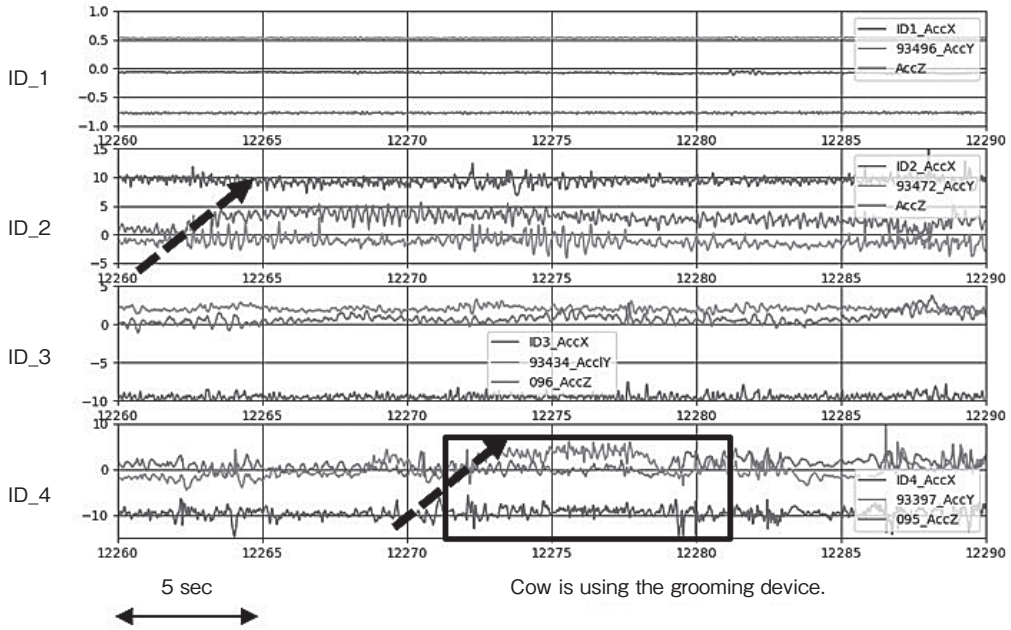

Fig. 1　Measurement result of the 3 axis accelerometers attached to 4 calves (ID_1～4).
Arrows indicate the time point when at least one axis acceleration changed. Box indicates when ID_4 calf used the grooming device.

る。しかしながら，ブラシ使用時間を過大に，あるいは過少に判定してしまうことが分かってきた。加えて，ブラシが使用されていないときでも，ブラシ使用個体・使用時間を判定する場合が発生した。

Fig. 1 に，４頭のウシに無線式加速度センサ端末を取り付けたときの加速度変化の結果を示した。ID_４のある時間帯においてブラシを使用している。ブラシの使用開始前に加速度が急上昇する特徴的な変化が計測されており，ブラシの使い始めは明確である。一方で，使い終わりには，加速度の変化がほとんどなく，使い終わりが分からない。ブラシ使用時間を過大にあるいは過少に判定してしまう原因となっている。またID_２において，ブラシ使用時と似た加速度変化が計測されており，誤判定の原因となった。

これら課題を解決し，個体識別の高精度化を実現するため，ブラシ使用個体・使用時間判定システムに，以下の情報を導入した。

・グルーミング装置への加速度センサの組み込み
・AIカメラによる個体識別・姿勢・ブラシとの距離情報の組み込み

実験では，首輪型無線式３軸加速度センサ端末を５頭の子牛，グルーミング装置に３軸加速度センサを使用した。また牛舎にビデオカメラを設置し，「個体識別・姿勢・ブラシとの距離」を判定するデータ取得を行った。本条件にて，24時間の実験を３回行い，解析を行った。

上記は，首輪型センサ端末の省電力化にもつながる。「個体識別・姿勢・ブラシとの距離情報」を活用することで，ブラシとの一定区間に入った場合のみセンサを稼働させる，立位状態のみセンサを稼働させることが可能となる。首輪型センサ端末の稼働時間を大幅に削減することができ，省電力化が可能となる。

2.2　センサの精度と健康状態低下検知能力の評価

ホルスタイン種子牛７頭を生後から離乳まで，

© The Ito Foundation

装置を設置した個別飼育ペンにおいて飼養し，調査した。装置利用頻度については毎朝９時に回転数カウンターを確認し，前日24時間の総回転数を記録し，装置利用頻度とした。個体ごとに利用頻度のレベルが異なったため，調査全期間の平均回転数を100％とした割合（装置利用頻度割合）として以降の統計解析に用いた。牛の行動はビデオで連続記録し，５分間隔のスキャンサンプリングにより，立位，伏臥位，立位反芻，伏臥位反芻，採食について１日あたりの行動時間割合を求めた。また，約１週間間隔で体重を測定し，日増体量を求めた。記録牛の健康状態については，下痢，咳などの疾病兆候，採食量の極端な低下などについて，野帳に記録した。

日増体量を求めた期間について，装置利用頻度割合の平均値を計算し，日増体量とのピアソン積率相関係数を求め，母相関係数の無相関の検定を行った（エクセル統計 バージョン4.04）。24時間ごとの装置利用頻度割合と，各行動の時間割合についても同様に相関の検定を行った。

３．結果と考察

3.1　ブラシ利用時間センサの開発

首輪型加速度センサ端末のデータ取得率の最も高い１日において解析を行った。ビデオカメラより，５頭のウシについて以下の行動観察を行い，ブラシ使用個体・使用時間判定システムとの比較を行った。

・ウシの位置（グルーミング装置からの距離），姿勢（立位，座位）
・グルーミング装置の使用の有無

行動観察より，ブラシの使用回数は39回であった。グルーミング装置に取り付けた加速度変化から，行動観察と同様の結果を得ることができた。また，これまでのブラシ使用個体・使用時間判定システムでは，ブラシ使用時間が過大にあるいは過少に判定してしまっていたが，グルーミング装置に取り付けた加速度変化を用いることで，ブラシ使用時間については秒単位で正確に計測できるようになった。加えて，ブラシが稼働していないときにブラシ使用個体・使用時間を判定した場合は除外されるため，ブラシが稼働していないときの誤検出は発生していない。

ブラシが稼働中の個体識別の高精度化に取り組んでおり，「個体識別・グルーミング装置からの距離・姿勢」の画像解析を行った。個体識別は子牛の模様情報から判定を行っており，姿勢情報については立位と座位の判定を行っている（**Fig. 2**）。これまでの行動解析結果より，座位の状態でグルーミング装置を使用していることはない。グルーミング装置からの距離は，個体識別したときのマーカの最短距離を指定した（**Fig. 3**）。ウシが重なり合っているときは，グルーミング装置との距離が０ｍと示すこともある。画像だけのグルーミング装置の判定率は現状５割程度であるが，グルーミング装置の稼働時刻を加えたブラシ使用個体・使用時間判定システムと組み合わせることで，個体識別の高精度化（識別率90％以上）の可能性を見出せている。この手法については国内優先権主張出願を行う。

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７個体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。しかし，１週間ごとに測定した体重から求めた週あたりの平均日増体量には，個体によって大きな変動が認められた（0.017–1.257，0.254–0.930，0.464–1.767，0.280–0.971，0.463–1.214，0.257–0.786，0.271–0.80kg/day）。目視の症状としては判別不可能であったが，日増体量が大きく低下した週にはなんらかの体調の不調があったことが推察された。

© The Ito Foundation

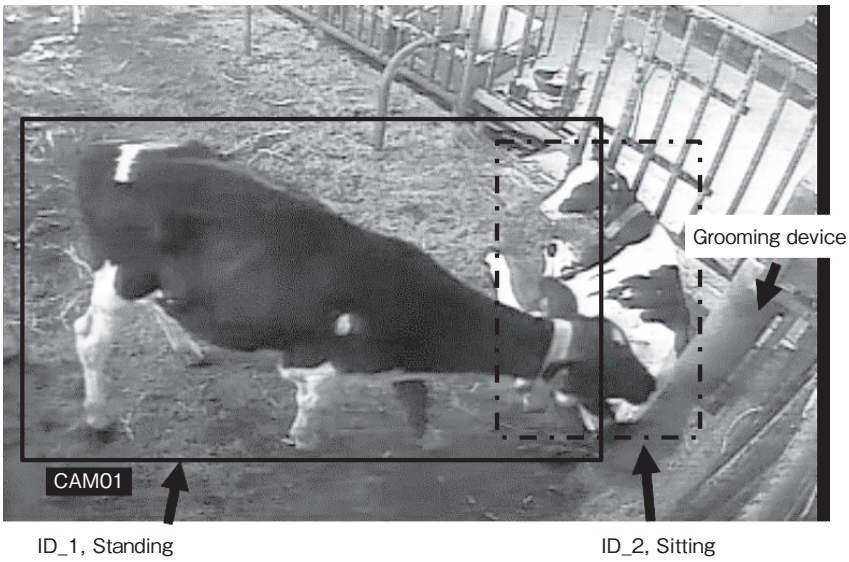

Fig. 2　An example of image analysis of individual identification and posture determination.

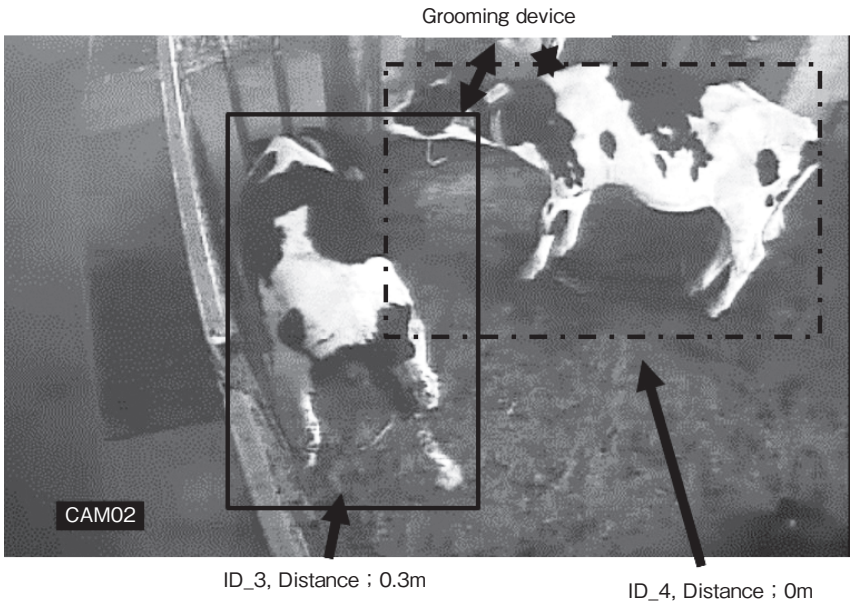

Fig. 3　An example of image analysis of distance measurement from the grooming device to calf's tip of the nose.

日増体量を求めた期間について，装置利用頻度割合の平均値を計算し，日増体量とのピアソン積率相関係数を求めたところ，両者の間には有意な正の相関が認められた（**Fig. 4**，$r = 0.43$，$p < 0.05$）。つまり，装置の利用が多い週には日増体量も大きい傾向が認められた。装置の利用そのものが増体に直接的な影響を及ぼすわけではないと考えられるが，個体ごとの装置利用頻度の変動をモニタリングすることで，増体の停滞を予測することが可能となり，なんらかの対策を講じることができるようになることが考えられた。

24時間ごとの装置利用頻度割合と，各行動の時

© The Ito Foundation

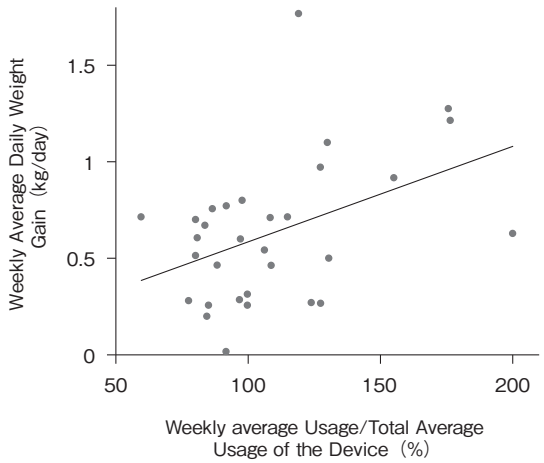

Fig. 4　The relationship between device usage and weekly daily weight gain of calves. There was a significant correlation between the parameters（r ＝0.43，p＜0.05）.

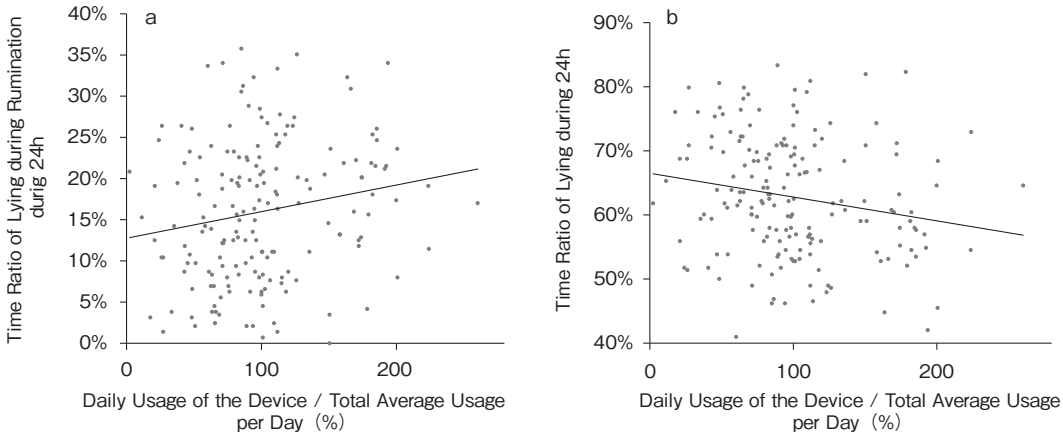

Fig. 5　The relationships between daily device usage corrected by average daily usage during total experimental period and the time ratios of lying during rumination（a）and lying（b）. Daily device usage significantly and positively correlated with the time ratio of lying during rumination（r＝0.183，p＜0.05），and significantly and negatively correlated with the time ratio of lying（r＝－0.192，p＜0.05）.

間割合についてのピアソン積率相関係数では，伏臥位反芻時間割合との間に正の相関傾向（**Fig. 5a**，r＝0.183，p＜0.05），伏臥位時間割合との間に負の相関傾向が認められた（**Fig. 5b**，r＝－0.192，p＜0.05）。装置の利用は立位で行われるため，装置の利用頻度は活動性を反映すると考えられる立位の時間割合との間に正の相関があると予測していたが，ほとんどなく（r＝－0.042，p＝0.579），非常に弱い相関傾向とはいえ，伏臥位反芻時間割合との間に正の相関が認められたことは予想外であった。伏臥位反芻時間割合と伏臥位時間割合との間には強い相関傾向が認められたことから（r＝－0.91，p＜0.01），おそらくは伏臥位姿勢における反芻とそれ以外の状態の割合の変化が原因で，装置利用頻度割合と伏臥位時間割合との間に負の相関傾向が認められたものと考え

© The Ito Foundation

られた。装置利用頻度割合と採食時間割合との間には相関が認められなかったことから（r＝−0.042，p＝0.579），採食頻度の増加が装置利用頻度と日増体量の正相関に影響したとは考えにくいが，装置利用頻度割合が増加する期間に伏臥位反芻が多くなることが日増体量に影響を及ぼした可能性が考えられた。

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。

５頭の育成牛に首輪型無線式３軸加速度センサ端末を取り付け，また装置稼働時刻を収集するためグルーミング装置にも加速度センサを組み込んだ。また，AIカメラによる個体識別・姿勢・ブラシとの距離情報も，ブラシ使用時間・判定システムに組み込むことに取り組んでいる。本システムにより，ブラシ使用時間については秒単位で正確に計測できるようになり，ブラシが稼働していないときにブラシ使用個体・使用時間を判定した場合は除外できるようになった。ブラシが稼働中の個体識別の高精度化に取り組んでおり，ビデオカメラの「個体識別・グルーミング装置からの距離・姿勢」の画像解析結果を加えることで，個体識別の高精度化（識別率90％以上）を目指す。

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７頭の出生直後から離乳までの間，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。しかし，１週間ごとに測定した体重から求めた週あたりの平均日増体量には，個体によって大きな変動が認められ，日増体量が大きく低下した週にはなんらかの体調の不調があったことが推察された。日増体量と同期間の平均装置利用頻度との間には有意な正の相関が認められた（r＝0.43，p＜0.05）。つまり，装置の利用が多い週には日増体量も大きい傾向が認められた。個体ごとの装置利用頻度の変動をモニタリングすることで，増体の停滞を予測することが可能となり，なんらかの対策を講じることができるようになることが考えられた。24時間ごとの装置利用頻度と，伏臥位反芻時間割合との間に正の相関傾向が認められた（r＝0.183，p＜0.05）。装置利用頻度割合が増加する期間に伏臥位反芻が多くなることが日増体量に影響を及ぼした可能性が考えられた。

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について特許出願した群飼におけるブラシ利用時間センサを実用化につなげたうえで行っていきたい。

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.
3）　矢用健一，野上大史：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2022-079382，2022.

© The Ito Foundation

ニワトリヒナに備わる抗炎症能力の解明
～抗酸化能に注目して～

Studies on unique anti-inflammatory ability of chickens：role of anti-oxidant ability

橘　　哲　也・牧　野　良　輔
（愛媛大学大学院農学研究科）

Tetsuya Tachibana and Ryosuke Makino
(Graduate School of Agriculture, Ehime University)

We previously found that chicks possess anti-inflammatory ability against pathogen-associated molecules (PAMPs). This study was performed to clarify the anti-inflammatory ability of chickens in the light of anti-oxidant ability using PAMPs and D-galactosamine (D-GalN). Lipopolysaccharide (LPS) and zymosan were selected as the PAMPs for the present study. Intraperitoneal injection of either LPS, zymosan or D-GalN did not induce hepatic injury in chicks. The combination of LPS and D-GalN induced hepatic injury while the combination of zymosan and D-GalN had no effect. LPS and D-GalN synergistically increased mRNA expressions of interleukin-6 (IL6), a pro-inflammatory cytokine and inducible nitric oxide synthase (iNOS) at 6 h post-injection while only iNOS was synergistically increased by zymosan and D-GalN. All these treatments did not induce lipid peroxidation in the liver. Although LPS and zymosan alone had less effect on mRNA expressions of pro-inflammatory cytokines including IL-6 at 6 h, these PAMPs increased them at 3 h in our preliminary experiments. This suggests that specific bioactive molecules would suppress gene expression of pro-inflammatory cytokiens and thereby suppress oxidative stress in chicks. Since LPS and zymosan stimulate corticosterone (CORT) release, we hypothesized that CORT suppresses the gene expression of pro-inflammatory cytokines and induces anti-oxidant effect in chicks. Indeed, subcutaneous injection of CORT suppressed mRNA expression of pro-inflammatory cytokines in the liver and spleen. In addition, CORT increased plasma uric acid level and anti-oxidant capacity. However, we were not able to confirm that endogenous CORT actually induce anti-oxidant effect during LPS challenge because we could not find available antagonists for chicken CORT receptor. Finally, we performed RNA-seq analysis to find anti-oxidants in the liver. As the result, genes associated with the synthesis of uric acid and imidazole dipeptides were upregulated with LPS and zymosan in the liver of chicks. These anti-oxidants might be associated with anti-oxidant ability of chicks, in addition to CORT. In summary, we suggested that chicks possess anti-oxidant ability by CORT, uric acid and imidazole dipeptides under pathogenic challenge.

© The Ito Foundation

1．目　的

ニワトリは世界で最も多く飼育されている家畜である。しかし，多頭羽飼育が一般的な現代の養鶏業では，高病原性鳥インフルエンザをはじめとする感染症が発生すると被害も甚大化しやすい。動物の体内に病原性微生物が侵入すると，微生物特有の分子構造（PAMPs）が免疫細胞などに発現しているパターン認識受容体に認識されることで自然免疫が活性化し，炎症性サイトカインが分泌される[1)]。一方で，炎症性サイトカインが過剰に放出されると，肝臓などさまざまな臓器の損傷が起きて敗血症を引き起こす。

しかし，著者は細菌由来のPAMPsであるリポポリサッカライド（LPS）をヒナに投与しても肝臓の損傷マーカーが変化せず，小腸に損傷が生じないことを見出した（日本畜産学会第128回大会，2021年）。これは，ヒナが感染による炎症反応に対する抵抗性を有していることを示唆している。炎症による損傷には炎症性サイトカインと酸化ストレスが関与しているため，ヒナにはこれらに対する耐性がある可能性がある。

そこで本研究では，ヒナに備わる炎症に対する抵抗性のメカニズムを明らかにすることを目的とした。本研究では，LPSに加え，真菌由来のPAMPsであるザイモサン，および哺乳類ではLPSやザイモサンによる組織損傷を促すD-ガラクトサミン（D-GalN）をヒナに腹腔内投与した後の肝臓の損傷を調べるとともに，炎症性サイトカイン，酸化ストレスおよび抗炎症性物質の変化を調べた。また，抗炎症性物質の一つであるコルチコステロン（CORT）の作用を調べるとともに，RNA-seq法によりヒナにおける抗酸化能に関わる因子を探索した。

2．方　法

実験には白色レグホンオスヒナを用いた。なお，本実験は愛媛大学動物実験委員会の承認を受けたものである。

実験１　肝臓の損傷に基づいたPAMPsに対する抗炎症能の確認

まず，ヒナにD-GalN（40mg）を腹腔内投与し，その６および24時間後に採血して血漿を得た。肝臓の損傷マーカーであるアスパラギン酸アミノ基転移酵素（AST），アラニンアミノ基転移酵素（ALT）および乳酸脱水素酵素（LDH）の血漿中活性を調べた。

次に，ヒナを４群に分け，それぞれ生理食塩水（対照），LPS（100 μg），D-GalN（40mg），またはLPSとD-GalNを腹腔内投与し，投与６時間後の血漿中AST，ALTおよびLDH活性を調べた。

最後に，ヒナを４群に分け，それぞれ生理食塩水（対照），ザイモサン（2.5mg），D-GalN（40mg），またはザイモサンとD-GalNを腹腔内投与した。投与６時間後の血漿中AST，ALTおよびLDH活性を調べた。また，投与24時間後の血漿中活性を測定する実験も実施した。

実験２　PAMPsに対する抗炎症能のメカニズムの解明

ヒナを４群に分け，それぞれ生理食塩水（対照），LPS（100 μg），D-GalN（40mg），またはLPSとD-GalNを腹腔内投与し，投与６時間後に肝臓を採取し，肝臓の炎症性サイトカイン（インターロイキン-１ β（IL-１ β），IL-６，インターフェロン-γ（IFN-γ）および腫瘍壊死因子様サイトカイン１A（TL1A））と誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の遺伝子発現量をリアルタイムPCRで調べた。また，肝臓中の抗酸化酵素であるスーパーオキシドジスムターゼ（SOD）の活性および脂質過酸化の指標であるTBARS濃度を調べた。

© The Ito Foundation

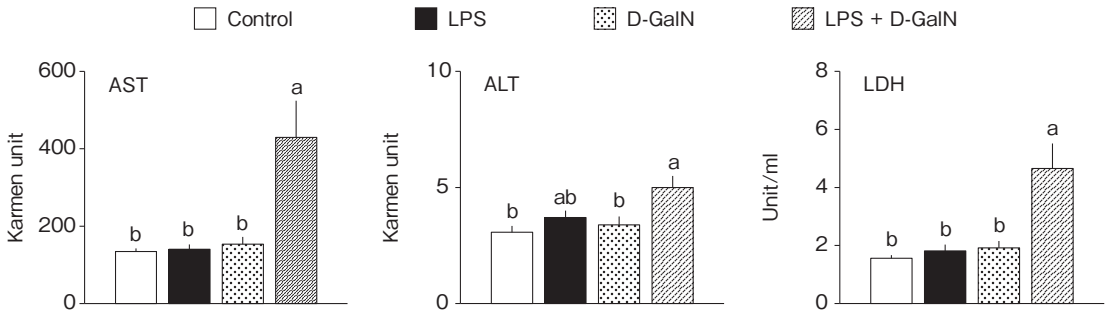

Fig. 1　Effect of simultaneous intraperitoneal injection of 0.1 mg LPS and D-GalN on plasma AST, ALT and LDH activities. Blood was collected at 6 h after the injection. The number of chicks in the control, LPS alone, D-GalN alone, and LPS + D-GalN groups were 8, 9, 7, and 9, respectively. Values are the mean ± SEM. Groups with different letters are significantly different（$p<0.05$）.

次に，ヒナを４群に分け，それぞれ生理食塩水（対照），ザイモサン（2.5mg），D-GalN（40mg），またはザイモサンとD-GalNを腹腔内投与し，LPSの実験と同様の項目を調査した。

実験３　CORTの作用の解明

ヒナにCORTを皮下投与（1.2mg）し，その１および３時間後に採血し，血糖値，血漿中尿酸濃度および総抗酸化能を測定した。同様にCORT皮下投与１および３時間後の肝臓および脾臓内炎症性サイトカインおよびiNOSの遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて調査した。

次に，ヒナを２群に分け，一つの群にはRU486を皮下投与（2.4mg）した直後にLPSを腹腔内投与（100μg）し，もう片方の群には皮下投与用溶媒液のみ皮下投与した直後にLPS（100μg）を腹腔内投与した。投与６時間後に採血し，血漿中AST，ALTおよびLDH活性を調べた。

実験４　PAMPsによって変動する肝臓中遺伝子の網羅的探索

ヒナにLPSを腹腔内投与（100μg）し，その３時間後に肝臓を採取して全RNAを抽出した。逆転写の後にライブラリを作製し，RNAseq法によりシーケンスデータを取得した。得られたデータのマッピングを行い，正規化の後に遺伝子発現差解析を実施した。パスウェイ解析によってLPSの影響を受けた化学反応経路を特定した。

また，ヒナにザイモサンを腹腔内投与（2.5mg）した実験もLPSと同様に実施した。

３．結果と考察

実験１　肝臓の損傷に基づいたPAMPsに対する抗炎症能の確認

D-GalNはいずれの時間においてもすべての肝臓損傷マーカーの活性に有意な影響を与えなかった。本研究で用いたD-GalNの投与量は哺乳類において肝臓の損傷を引き起こすのに十分な量であるため[2]，ヒナはD-GalNに対して耐性を有していると考えられた。

LPSの単独投与はどの肝臓損傷マーカーにも有意な影響を与えなかったことから，ヒナではLPSによる肝臓の損傷が生じないことが明らかとなった（**Fig. 1**）。一方，LPSとD-GalNの同時投与によってすべての肝臓損傷マーカーが有意に増加した（**Fig. 1**）。D-GalNによるLPSの増強作用は哺乳類においても報告されているため[3]，両者の関係性は動物種を超えて保存されていると考えられる。

ザイモサンはいずれの肝臓損傷マーカーに影響を与えず，ザイモサンとD-GalNを同時投与しても肝臓損傷マーカーの変化が見られなかった。哺乳類ではザイモサンは肝臓をはじめとするさまざ

© The Ito Foundation

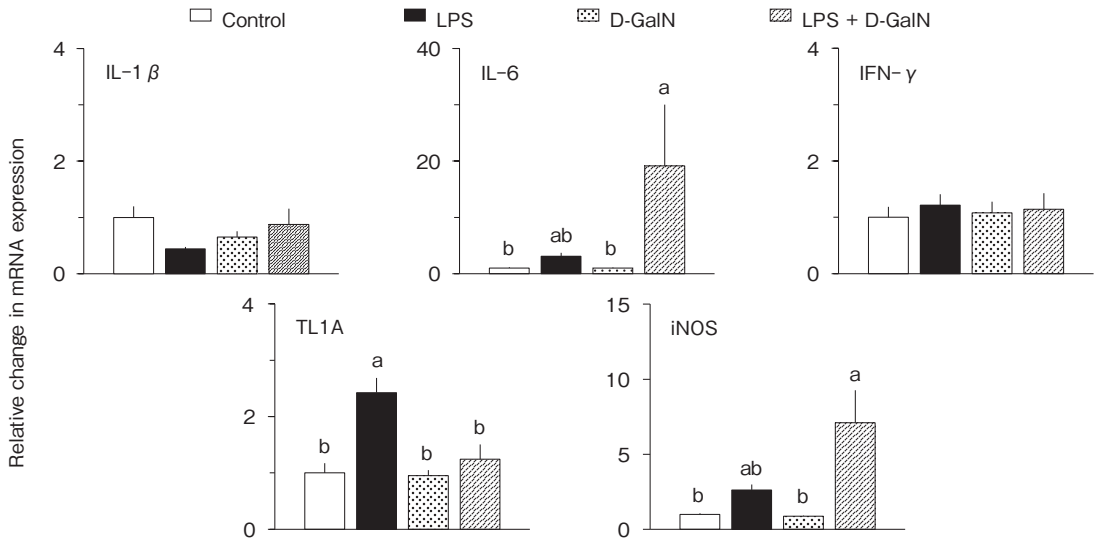

Fig. 2 Effect of simultaneous intraperitoneal injection of LPS and D-GalN on the expression of inflammatory-associated genes in the liver. The liver was collected at 6 h after the injection. The number of chicks in the control, LPS alone, D-GalN alone, and LPS + D-GalN groups was 8, 8, 8, and 6, respectively. Values are the mean ± SEM. Groups with different letters are significantly different ($p<0.05$).

まな臓器の損傷をもたらすが[4]，ヒナではザイモサンに対する耐性を有していることが明らかとなった。

実験２　PAMPsに対する抗炎症能のメカニズムの解明

LPSの単独投与によって肝臓のTL1Aの遺伝子発現量が有意に増加したものの，それ以外では有意な変化が見られなかった（**Fig. 2**）。D-GalNの単独投与はいずれの遺伝子の発現量にも影響を与えなかった。LPSとD-GalNの同時投与によりIL-６およびiNOS遺伝子発現量が有意に増加したが，LPSによるTL1A遺伝子発現量の増加はD-GalNによって低下した。これらのことから，LPSとD-GalNの同時投与によってのみ見られる肝臓の損傷にはIL-６と一酸化窒素（NO）が関与していることが示唆された。

なお，LPSとD-GalNの同時投与によって肝臓SOD活性が有意に増加したのに対し，TBARS濃度には変化が見られなかった（**Fig. 3**）。これはSODによって活性酸素が除去された結果，脂質の過酸化が生じなかったことを示唆している。また，LPSとD-GalNの同時投与はヒナの肝臓損傷を引き起こしたため（**Fig. 1**），この肝臓損傷には酸化ストレスが関与していない可能性がある。

ザイモサンを用いた実験では，ザイモサンの単独投与ではいずれの遺伝子発現量においても有意な変化が見られなかったが，ザイモサンとD-GalNの同時投与によりiNOS遺伝子発現量が有意に増加した。ザイモサンおよびザイモサンとD-GalNの同時投与は肝臓中SOD活性およびTBARS濃度に影響を与えなかった。

なお，予備実験として，LPSおよびザイモサンをそれぞれ単独投与しその３時間後の肝臓内遺伝子発現量を調べたところ，IL-６，IFN-γ，TL1AおよびiNOSの遺伝子発現量が有意に増加した。投与６時間後にはこれらの作用が見られなくなったため（**Fig. 1**），なんらかの因子がこれらの遺伝子発現を抑えたと考えられる。

実験３　CORTによる抗酸化作用の解明

過去の報告と同様に[5]，CORTは投与１時間後

© The Ito Foundation

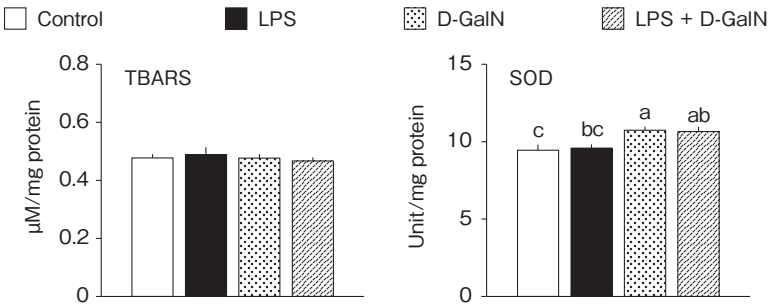

Fig. 3　Effect of simultaneous intraperitoneal injection of LPS and D-GalN on TBARS and SOD activity in the liver. The liver was collected at 6 h after the injection. The number of chicks in the control, LPS alone, D-GalN alone, and LPS + D-GalN groups was 8, 8, 8, and 6, respectively. Values are the mean ± SEM. Groups with different letters are significantly different ($p<0.05$).

から血糖値および血漿中尿酸濃度を増加させた。血漿総抗酸化能も有意に増加したが，これは抗酸化能をもつ尿酸の血漿中濃度が増加したことが原因であると考えられる[6]。

また，CORTの投与によって肝臓および脾臓における炎症性サイトカインおよびiNOS遺伝子発現量が有意に低下したことから（**Fig. 4**），CORTはヒナにおいても抗炎症作用を有することが明らかとなった。しかし，グルココルチコイド受容体アンタゴニストであるRU486とLPSを同時投与しても血漿中肝臓損傷マーカーの値が悪化しなかった。これは内因性CORTがLPSに対する耐性に関与していないことを示唆している。しかし，その後の予備実験により，RU486がニワトリのCORT受容体にアンタゴニストとして機能していない可能性が示されたため，別のアンタゴニストで再度検証する必要がある。

実験４　PAMPsによって変動する肝臓中遺伝子の網羅的探索

LPSおよびザイモサンによって発現量が変動した遺伝子をそれぞれ2098個および1775個特定した。そのうち978個が同様の変化（増減）をしたものであった。パスウェイ解析によりステロイド生合成やアミノ酸代謝などに関わる遺伝子が変動していることが明らかとなった（**Table 1**）。両PAMPsによってSODおよびカタラーゼの遺伝子発現量が減少または減少傾向を示したが，LPSではアンセリン合成酵素が，ザイモサンでは尿酸合成酵素およびヘムオキシゲナーゼ１が増加していた。したがって，これらの抗酸化物質がPAMPsによる酸化ストレスを改善するために寄与していると考えられた。アンセリンがイミダゾールジペプチドであることと，尿酸合成にはグルタミン，アスパラギン酸、およびグリシンに由来する窒素が使われていることから，アミノ酸由来の抗酸化物質がPAMPsに対する抗酸化に関わっていることも示唆された。

本研究により，ヒナはLPS，ザイモサンおよびD-GalNによって引き起こされる肝損傷に対して抵抗性を有していることが示唆された。また，D-GalNはLPSと相乗的に肝損傷を引き起こすが，この作用にはIL-６やNOが関わっている可能性を示した。さらに，CORTがヒナにおいて抗酸化作用と抗炎症作用を引き起こすことを明らかにした。最後に，アンセリンや尿酸などアミノ酸由来の抗酸化物質がPAMPsに対して抗酸化作用を発揮する可能性を見出した。以上のことから，LPSやザイモサンがヒナにおいて肝損傷を引きこさな

© The Ito Foundation

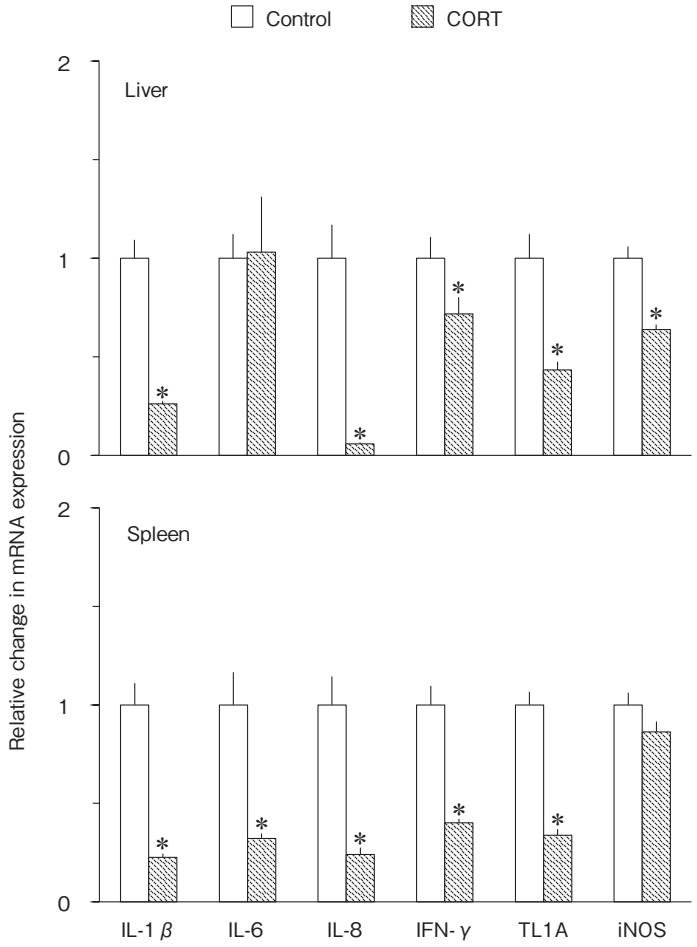

Fig. 4 Effect of subcutaneous injection of CORT on mRNA expression of cytokines and other inflammation-related bioactive molecules in the liver and spleen of chicks at 1 h post-injection. The number of chicks was 8 in each group at each time. Data are expressed as means ± SEM. Asterisks indicate significant difference from the control group ($p<0.05$).

い原因として，①両PAMPsによって引き起こされるIL-６やiNOSの発現がなんらかの因子で抑えられる，②その因子の候補の一つとしてCORTがある，および③アミノ酸由来の抗酸化物質によって酸化ストレスの発生が防止される，の三点があることを明らかにした。

４．要　約

本研究は，抗酸化能に着目してニワトリが有する抗炎症能を解明することを目的とした。まず，リポポリサッカライド（LPS），ザイモサン，およびD-ガラクトサミン（D-GalN）の単独腹腔内投与がヒナにおいて肝損傷を引き起こさないことを明らかにした。また，LPSはD-GalNと同時投与した場合には肝損傷が生じたのに対し，ザイモサンとD-GalNの同時投与では肝損傷が生じなかった。LPSとD-GalNの同時投与は肝臓におけるインターロイキン-６（IL-６）と誘導型一酸化窒素合成酵素（iNOS）の遺伝子発現量を有意に増加させたのに対し，LPS単独ではこれらの遺伝

© The Ito Foundation

Table 1　Metabolic pathway affected by intraperitoneal injection of LPS and zymosan in chicks

LPS	Zymosan
Carbon metabolism	Drug metabolism – cytochrome P450
Fatty acid degradation	Steroid biosynthesis
Drug metabolism – cytochrome P450	Biosynthesis of cofactors
Tryptophan metabolism	Arginine and proline metabolism
Peroxisome	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450
Fatty acid metabolism	PPAR signaling pathway
Valine, leucine and isoleucine degradation	Glycine, serine and threonine metabolism
Pyruvate metabolism	Carbon metabolism
Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	Peroxisome
Drug metabolism – other enzymes	Biosynthesis of amino acids
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	Tryptophan metabolism
Glycolysis/ Gluconeogenesis	Drug metabolism – other enzymes
Arginine and proline metabolism	Glyoxylate and dicarboxylate metabolism
Butanoate metabolism	Apoptosis
Propanoate metabolism	Ferroptosis
PPAR signaling pathway	FoxO signaling pathway
Citrate cycle（TCA cycle）	Influenza A
2-Oxocarboxylic acid metabolism	One carbon pool by folate
Biosynthesis of amino acids	Cysteine and methionine metabolism
Histidine metabolism	DNA replication
Steroid biosynthesis	Glutathione metabolism
Tyrosine metabolism	
Glycine, serine and threonine metabolism	
Terpenoid backbone biosynthesis	
beta-Alanine metabolism	
Biosynthesis of cofactors	
Apoptosis	
Lysine degradation	

子発現量の増加が見られなかったため，IL-６とiNOSの発現が抑えられたことでLPSによる肝損傷が抑えられたと考えられた。これらの遺伝子発現量を抑えた因子の一つとして，コルチコステロン（CORT）の作用について調べた。その結果，CORTに抗酸化作用があること，そしてCORTが炎症性サイトカインやiNOSの遺伝子発現を抑えることが明らかとなった。しかし，ヒナで有用なグルココルチコイド受容体アンタゴニストを見出すことができなかったため，LPSに対する耐性に内因性CORTが関与している証拠を得ることはできなかった。最後に，LPSおよびザイモサンによって発現量が変わる肝臓内の遺伝子を網羅的に探索し，それらの中から抗酸化能に関わるものを調べたところ，それぞれアンセリン合成酵素および尿酸合成酵素を見出した。これらのアミノ酸由来の抗酸化物質によってPAMPsによる酸化ストレスを未然に防いでいることが示唆された。

文　献

1）林隆也，中村亨，高岡晃教：日本臨床免疫学会会誌，**34**，329～348，2011.

2）Yamada, J.,Sugimoto, Y.,Horisaka, K.：*Journal of Pharmacobio-Dynamics*，**8**，780～784，1985.

3）Li, L.,Duan, C.,Zhao, Y.,Zhang, X.,Yin, H.,Wang, T.,Huang, C.,Liu, S.,Yang, S.,Lim X.：*International Immunopharmacology*，**51**，99～106，2017.

4）Ivanovska, N.,Kalfin, R.,Lazarova, M.,Dimitrova, P.：*Immunology Letters*，**110**，126～132，2007.

5）Simon, J.：*Diabetes & Metabolism*，**10**，211～217，1984.

6）Machín, M.,Simoyi, M. F.,Blemings, K. P.,Klandorf, H.：*Comparative Biochemistry and Physiology. Part B, Biochemistry & Molecular biology*，**137**，383～390，2004.

© The Ito Foundation

沖縄アグー豚育成豚における飼料中のタンパク質水準の違いが増体および背脂肪厚の発達に及ぼす影響

Effects of diets with different CP levels on body weight gain, back fat thickness in Okinawa Agu feeder pigs

普照恭多[1]・伊村嘉美[2]
([1]沖縄県農林水産部畜産研究センター, [2]琉球大学農学部亜熱帯地域農学科)

Kyota Fusho[1] and Yoshimi Imura[2]
([1]Okinawa Prefectural Livestock and Grassland Research Center,
[2]University of the Ryukyus, Faculty of Agriculture, Department of Subtropical Agro-Production Sciences)

This study clarified the effects of diets with different CP levels on body weight gain (BWD), back fat thickness (BF), and digestibility in Okinawa Agu feeder pigs. We prepared three test diets of which were Control feed, High CP feed, and Low CP feed, respectively and fed these diets to 13-14week old Agu feeder pigs for 7 weeks. As a result, regarding body gains, the high CP group tended to have significantly higher daily body weight gain and significantly lower feed conversion ratio. Regarding digestibility, the apparent digestibility was lower in the high CP group than in the low CP group, and the DCP intake in the high CP group was equivalent to that of the low CP group, but the BF and its increase tended to be lower in the high CP group. These results suggest that feeding feed with higher CP levels than normal feed may suppress the increase in BF without affecting the BWD of Agu feeder pigs.

1．目　的

沖縄アグー豚（以下アグー）は日本唯一の在来豚で，現在沖縄県内に約700頭が飼養されている[1)]。その優れた肉質[2)]から全国的にも高く評価されており，沖縄県が誇るアグーブランド豚の生産に大きく貢献している。一方，アグーの産肉能力，繁殖性等の経済性は西洋品種に劣り[3)]，小型で発育が遅く，脂肪を蓄積しやすい特徴をあわせ持っている[4)]。

このようなことから，アグーの飼養管理は日本飼養標準・豚（2013年版）[5)]に準拠した飼料給与ではなく，沖縄県アグーブランド豚推進協議会より発行された飼養管理マニュアルを基に飼養管理が行われている[6)]。給与飼料には，通常，一般流通飼料が用いられ，その飼料設計には日本飼養標準が用いられるが，これは産肉能力が中位の豚を対象とした適温域での養分要求量を示したものである。しかし，アグーの産肉能力は一般豚と比べて低く，亜熱帯環境で飼育されているため，一般豚とは飼料要求率が異なると予想される。また，脂肪がつきやすいアグーは過肥の個体が散見され，過肥による繁殖性への悪影響が懸念されており，生産現場からも新たな飼養標準や繁殖生産性を安定させるための栄養度の評価指標の検討が望まれている。一方，アグーに関する研究において

© The Ito Foundation

飼料給与水準についての報告は少ない。そのため近交退化などの遺伝的要因による繁殖性の低下[7]が報告されているアグーにおいて，適切な栄養バランスを明らかにし，増体の改善や過肥を抑える可能性を検討することは，アグーの発育や繁殖能力等の生産性向上につながると考えられる。

丸山と相馬[8]は，肥育前期（体重30～70kg）および後期（70～110kg）の高発育能力豚に対しさまざまな可消化養分総量（以下TDN）・粗タンパク質（以下CP）水準の飼料を給与した。その結果，低TDN・高CPの給与によって高発育能力豚の発育性を阻害することなく，背脂肪厚増加量の抑制が可能であることを報告している。市川ら[9]は，LWD種60頭に対してTDN77～79%，CPが14～18%のさまざまな飼料を給与した。その結果，増体日量（以下DG）は育成期ではCP18%が最も優れていたが，仕上げ期ではCP水準の上昇につれてDGが低下する傾向がみられた。また，と畜成績においてCP水準が高いほど背脂肪厚が薄くなり，脂肪融点が下がる傾向にあったと報告している。

これらの結果から，豚の増体と背脂肪厚について，飼料中のエネルギーおよびCP水準が影響しており，アグーについても同様の影響を与えると考えられる。また，CPの増減により増体や脂肪の蓄積をコントロールできると考えられる。そこで本試験では，アグーに適する栄養バランスを明らかにするために，CP水準の異なる３つの飼料を育成期のアグーに給与し，増体，背脂肪厚および消化率に及ぼす影響について検討した。

２．方　　法

本研究は沖縄県畜産研究センター実験等委員会により審査され，承認を受けて沖縄県畜産研究センター内の豚舎にて行った。

試験は2022年10月13日～12月７日の期間で行った。供試豚は2022年７月に生まれた13～14週齢のアグー育成豚雄６頭，雌６頭の計12頭（３腹）を用いた。試験開始前の１週間は一般流通飼料を給与して予備飼育期間とした。その後，一般流通飼料を給与する対照区，CP含有率を増加させた飼料を給与する高CP区，およびCP含有率を低下させた飼料を給与する低CP区を設け，各処理区にそれぞれ４頭（雄２頭，雌２頭）ずつ配置し７週間飼育した。試験飼料は一般流通飼料をベースに琉球飼料株式会社に配合を依頼した。**Table 1** に供試飼料の原料割合と成分測定値を示した。飼養管理は，単房（１豚房：1.1 m × 2.5 m = 2.75 m^2）に１頭ずつ配置し，給与飼料は朝，夕の２回に分けて給餌し，自由飲水とした。

体重測定を試験開始から試験終了まで１週間隔で測定した。飼料摂取量は，給与した飼料を完食したので給与量を摂取量として用いた。背脂肪厚をエニースキャンBF（SongKang GLC Co., Ltd, 韓国）を用いて測定した。測定部位は左右のＰ２点（最終肋骨部の正中線から左右に約6.5cm下部）とした。測定部位の被毛を剃毛し，エコー塗布剤（プロゼリー，ジェクス株式会社，日本）を塗布し，体表面と直角になるようにプローブをあて測定した。測定した数値を読み取り，左右の値の平均値を背脂肪厚とした。

糞は，試験期間の最後の３日間豚房に落ちていたものを朝夕２回に分けて採取した。供試飼料および糞の生重を測定した後，60℃で１～２日間通風乾燥した。乾燥後，重量を測定したのち１mmのふるいを通るように粉砕し，その後の成分分析に供した。飼料および糞の成分を，常法に基づき，CP，粗脂肪（以下EE），可溶無窒素物（以下NFE），粗繊維（以下CF）および粗灰分（以下CA）を定量した。酸不溶性灰分（以下AIA）を2N HCL・AIA法[10]によって定量し，見かけの成分消化率を次式により算出した。見かけの成分消

© The Ito Foundation

Table 1　Ingredients and chemical composition of experimental diets

Type of diet	LowCP	Control	HighCP
Ingredient（%）			
Grains	76.1	70.0	68.0
Oilseed meal	16.5	21.0	24.2
Brans and food processing by products	0.3	1.0	0.3
Animal origin feeds	0.9	1.0	0.9
Others	6.2	7.0	6.6
Analyzed composition（%）			
Dry Matter（%）	92.1	91.7	92.5
Crude Protein（% in DM）	15.1	16.7	17.6
Ether Extract（% in DM）	8.0	7.0	8.0
Nitorgen free extract（% in DM）	63.2	61.2	60.3
Crude fiber（% in DM）	1.7	2.0	2.1
Crude ash（% in DM）	4.1	4.8	4.5
Gross energy（Mcal/kg in DM）	4.1	4.0	4.2

化率（%）＝100－100（飼料中のAIA含有率／糞中のAIA含有率）×（糞中の成分含有率／飼料中の成分含有率）糞および飼料のエネルギー含有率は，燃研式自動ボンベ熱量計を用いて総エネルギー（以下GE）を定量した。見かけのGE消化率を次式により算出した。見かけのGE消化率（%）＝100－100（飼料中のAIA含有率／糞中のAIA含有率）×（糞中のエネルギー含有率／飼料中のエネルギー含有率)。以上の分析結果をもとに可消化エネルギー（以下DE）を次式により算出した。DE＝飼料エネルギー含有率×GE消化率。

2.1　統計処理

得られた結果について，オープンソースプログラムJASPを用いて低CP区，対照区および高CP区間の有意差検定を行った（Tukey多重範囲検定)。

3．結果と考察

Table 2 に増体成績および飼料要求率を示す。試験開始時の体重は低CP区が26.6kg，対照区が27.2kg，高CP区が26.4kgであった。試験終了時の体重は低CP区が46.0kg，対照区が45.5kg，高CP区が46.9kgであり，高CP区が高い値を示したが有意差は認められなかった。増体日量は低CP区が0.46kg，対照区が0.44kg，高CP区が0.49kgであり，高CP区が高い値を示し，対照区と有意差が認められた（$p < 0.05$)。飼料摂取量はすべての処理区で1.25kgであった。増体に対する飼料要求率は低CP区で2.71，対照区で2.87，高CP区で2.56であり，高CP区が低い値を示し，対照区と有意差が認められた（$p < 0.05$)。試験開始時の背脂肪厚は低CP区が13.1mm，対照区が14.6mm，高CP区が14.9mmであった。試験終了時の背脂肪厚は低CP区で18.5mm，対照区で20mm，高CP区で18.1mmであった。背脂肪厚の増加量は低CP区で5.4mm，対照区で5.0mm，高CP区で3.3mmであった。しかし，これらの間に有意差は認められなかった。CP摂取量は低CP区が0.19kg，対照区が0.21kg，高CP区が0.22kgであり，高CP区で高い値を示したが有意差は認められなかった。増体に対するCP要求率は低CP区が0.41，対照区が0.48，高CP区が0.45であり，低CP区で低い値を示し，

© The Ito Foundation

Table 2　Effect of experimental diets on growth parameters,back fat and diet requirements

Measurements	LowCP	Control	HighCP
Growth performance parameters			
Initial body weight（kg）	26.6 ± 1.8	27.2 ± 1.3	26.4 ± 1.0
Final body weight（kg）	46.0 ± 2.4	45.5 ± 0.9	46.9 ± 0.3
Daily body weight gain（kg/d）	0.46 ± 0.02^{ab}	0.44 ± 0.03^{a}	0.49 ± 0.02^{b}
Daily Feed intake（kg/d）	1.25	1.25	1.25
Feed conversion ratio	2.71 ± 0.1^{ab}	2.87 ± 0.18^{a}	2.56 ± 0.11^{b}
Back fat growth performance parameters			
Initial back fat（mm）	13.1 ± 1.3	14.6 ± 2.5	14.9 ± 0.9
Final back fat（mm）	18.5 ± 3.1	20.0 ± 3.2	18.1 ± 1.5
Back fat gain（mm）	5.4 ± 1.9	5.0 ± 1.4	3.3 ± 1.3
Diet requirements			
Daily crude protein intake（kg/d）	0.19	0.21	0.22
Crude protein conversion ratio	0.41 ± 0.02^{a}	0.48 ± 0.03^{b}	0.45 ± 0.02^{ab}
Gross energy intake（Mcal/d）	5.14	5.03	5.20
Gross energy conversion ratio	11.16 ± 0.44	11.55 ± 0.74	10.67 ± 0.48
Digestible energy intake（Mcal/d）	4.68 ± 0.04^{a}	4.30 ± 0.11^{b}	4.39 ± 0.39^{ab}
Digestible energy conversion ratio	10.17 ± 0.42	9.87 ± 0.67	9.02 ± 0.84

a, b ; $p<0.05$

対照区と有意差が認められた（$p<0.05$）。GE摂取量は低CP区が5.14Mcal，対照区が5.03Mcal，高CP区が5.20Mcalであり，高CP区で高い値を示したが，有意差は認められなかった。GE要求率は低CP区が11.16，対照区が11.55，高CP区が10.67であり，高CP区で低い値を示したが，有意差は認められなかった。DE摂取量は低CP区が4.68Mcal，対照区が4.30Mcal，高CP区が4.39Mcalであり，低CP区で高い値を示し，対照区と有意差が認められた（$p<0.05$）。DE要求率は低CP区が10.17，対照区が9.87，高CP区が9.02であり，高CP区で低い値を示したが，有意差は認められなかった。

Table 3 に供試飼料の見かけの成分消化率を示した。DM消化率は低CP区が91.5％，対照区が87.6％，高CP区が86.4％であり，低CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。CP消化率は低CP区が83.8％，対照区が80.4％，高CP区が73.4％であり，低CP区で高い値を示したが有意差は認められなかった。EE消化率は低CP区が92.4％，対照区が86.4％，高CP区で85.1％であり，低CP区で高い値を示したが有意差は認められなかった。CF消化率は低CP区が37.6％，対照区が17.6％，高CP区が28.1％であり，低CP区で高い値を示し，対照区と有意差が認められた（$p<0.05$）。NFE消化率は低CP区が94.6％，対照区が90.8％，高CP区が91.9％であり，低CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。GE消化率は低CP区が91.1％，対照区が85.4％，高CP区が84.4％であり，低CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。

Table 4 に供試飼料の可消化成分含有量を示した。可消化CPは低CP区が12.7％，対照区が13.4％，高CP区が12.9％であり，対照区で高い値

© The Ito Foundation

Table 3　Apparent digestibility of experimental diets

	LowCP	Control	HighCP
Dry Matter（%）	91.5[a]	87.6[b]	86.4[b]
Crude Protein（%）	83.8	80.4	73.4
Ether Extract（%）	92.4	86.4	85.1
Crude fiber（%）	37.6[a]	17.6[b]	28.1[ab]
Nitorgen free extract（%）	94.6[a]	90.8[b]	91.9[b]
Gross energy（Mcal/kg）	91.1[a]	85.4[ab]	84.4[b]

a, b ; $p<0.05$

Table 4　Digestible nutrients content of experimental diets

	LowCP	Control	HighCP
Crude protein（%DM）	12.7	13.4	12.9
Ether Extract（%DM）	7.4	6.1	6.8
Crude fiber（%DM）	0.6[a]	0.2[b]	0.6[a]
Nitorgen free extract（%DM）	59.8	56.9	56.7
Digestible energy（Mcal/kg DM）	3.74[a]	3.44[b]	3.51[a]

a, b ; $p<0.05$

を示したが，有意差は認められなかった。可消化EEは低CP区が7.4％，対照区が6.1％，高CP区が6.8％であり，低CP区が高い値を示したが，有意差は認められなかった。可消化CFは低CP区が0.6％，対照区が0.4％，高CP区が0.6％であり，低CP区および高CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。可消化NFEは低CP区が59.8％，対照区が56.9％，高CP区が56.7％であり，低CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。DEは低CP区が3.74Mcal/kg DM，対照区が3.44Mcal/kg DM，高CP区が3.51Mcal/kg DMであり，低CP区で高い値を示し，有意差が認められた（$p<0.05$）。

給与飼料のGE含有量はいずれの処理区でも同等の値であったのに対し，DE摂取量は低CP区で最も高い値を示した（**Table 2**）。**Table 1** に示したように，低CP区のCF含量は他の処理区よりも少なくなっている。高橋ら[11]によると，豚における粗繊維の消化率は反芻家畜に比べて著しく低いことが知られているが，粗繊維含量の少ない濃厚飼料の場合，豚の消化率は他の家畜に劣るものではないとされている。今回の試験では低CP区の給与飼料に含まれるCF含量が少なかったことから，消化率が低下することなく，見かけのGE消化率が高くなったため，低CP区においてDE摂取量が有意に高くなったと考えられる。

高CP区の見かけの消化率は他の処理区より低い傾向にあったが（**Table 3**），これは高CP区における糞中AIA含有率の変動が大きかったことが影響した可能性がある。AIAを用いた消化率測定方法は，全糞採取法や酸化クロム法と比較して，労力が少なく，定量法が簡便で，測定の信頼性が高いとされるが[12, 13]，AIAの主体である飼料中のケイ酸含量や飼料の種類によっては，AIAの回収率が変動する場合もあると報告されている[12, 14]。高CP区の飼料原料は他の処理区と比較して，ト

© The Ito Foundation

ウモロコシや飼料米の割合が低く，大豆粕の割合が多くなっている（**Table 1**）。また，豚の飼料原料中のケイ酸含有量は低く[13]，含有量の少なさが通常の分析誤差でも消化率の精度に大きく影響する[14]とされ，高CP区の飼料の質的内容が異なることが消化率に影響したと考えられる。

CP要求率について低CP区で有意に低い値を示した（**Table２**）。これはCP摂取量が低CP区では他の処理区より低いのに対し（**Table２**），見かけのCP消化率が他の処理区よりも高かったためと考えられる（**Table３**）。一方，可消化CP摂取量は高CP区と低CP区で同等の値を示したが（**Table４**），実際に体内に吸収されたタンパク質量は高CP区で低CP区より多くなり，タンパク質の蓄積量は高CP区のほうが高くなった可能性がある。**Table 1** に示したように，低CP区の飼料中CP含量は高CP区より2.5％低いものであり，リジンやメチオニンは日本飼養標準を参考に調整してあるが，不足しがちなトレオニンやトリプトファンは添加しておらず低CP区飼料では欠乏していた場合も考えられる。古谷ら[15]は低タンパク質飼料の給与によって，いずれかの必須アミノ酸不足が生じ，供試豚の背脂肪厚が厚くなったことを報告しており，梶[16]はエネルギー水準に対しタンパク質給与量が不足する場合，エネルギーが節約されて脂肪の蓄積に向けられることを報告している。本試験においても，高CP区はアグーにおけるアミノ酸要求量を満たしていたが，低CP区はいずれかの必須アミノ酸が欠乏したことが影響し，試験終了時の背脂肪厚は低CP区で高い値を，高CP区で低い値を示し，背脂肪厚増加量は高CP区で最も低い値となったと考えられる（**Table２**）。また，**Table 4** に示したように，低CP区において可消化EEやDE含有量が最も高くなっており，これも低CP区で背脂肪厚が厚くなった要因の一つとして考えられる。

以上のことから，通常の飼料よりCP水準を増加させた飼料の給与によって，アグー育成豚の増体に影響を及ぼさずに，背脂肪厚増加を抑制できる可能性が示唆された。今後の検討事項として，本試験結果を基に飼料原料の質的内容の変動を抑えた飼料設計を行い，飼料へのセライト添加[13]や全糞採取法といったより精度の高い消化率測定法を検討し，引き続きタンパク質およびエネルギーの水準が，アグー育成豚の増体，背脂肪厚および消化率に及ぼす影響を検証していく必要がある。

４．要　　約

本研究では，アグーに適する栄養バランスを明らかにするために，飼料中のCP水準がアグー育成豚の増体，背脂肪厚および消化率に及ぼす影響を検証した。CP水準は一般流通飼料を給与する対照区，CP含有率を増加させた飼料を給与する高CP区，およびCP含有率を低下させた飼料を給与する低CP区の３水準を設けた。CP水準の異なる３つの飼料を13～14週齢のアグー育成豚に７週間給与した。その結果，増体について，高CP区はDGが有意に高く，飼料要求率が有意に低くなる傾向にあった。また，消化率について高CP区の見かけの消化率は低CP区より低く，DCP摂取量は低CP区と同等の値を示したが，高CP区は背脂肪厚およびその増加量が低くなる傾向にあった。以上のことから，通常の飼料よりCP水準を増加させた飼料を給与することで，アグー育成豚の増体に影響を及ぼさずに，背脂肪厚増加を抑制できる可能性が示唆された。

文　　献

１）　沖縄県アグーブランド豚推進協議会ホームページ（http://okinawa-agu.com/data.html）
２）　當眞嗣平，翁長桃子，桃原紀子，及川卓郎：日本養豚学会誌，**54**，121～129，2017.
３）　Shihei Touma, Motoharu Oyadomari：*Anim Sci J*, 91(1), e13362. doi：10.1111/asj．13362.，2020.

© The Ito Foundation

4） 當眞嗣平，及川卓郎：日本畜産学会報，88(2)，103～113，2017.
5） 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），4～11，中央畜産会，2013.
6） アグーブランド豚推進協議会：琉球在来豚アグー飼養マニュアル，沖縄県，2008.
7） 當眞嗣平，親泊元治，翁長桃子，嘉数良子，野中克冶：沖縄県畜産研究センター試験研究報告，**53**，25～28，2016.
8） 丸山健，相馬由和：茨城県畜産センター研究報告，**31**，153～158，2001.
9） 市川明，水野眞樹，深津倍三：愛知県農業総合試験場研究報告，**18**，319～324，1986.
10） 小牧弘，鈴木健，森本宏：日本大學農獣医學部學術研究報告，**38**，248～255，1981.
11） 高橋正也，森淳，長野錬太郎，実川義人，姫野健太郎，森本宏：畜産試験場研究報告，**18**，29～36，1968.
12） 杉本亘之：日本畜産学会報，55(12)，924～929，1984.
13） 古谷修，山本朱美，伊藤稔，青木幸尚：日本養豚学会誌，**38**，171～176，2001.
14） 寺田文典，岩﨑和雄，田野良衛，針生程吉：畜産試験場研究報告，**36**，75～79，1979.
15） 古谷修，渡邉正樹，阿部博行，清水俊郎，大門博之，佐藤圭子，今田哲雄，佐藤金一：日本養豚会誌，**34**，15～21，1997.
16） 梶雄次：栄養生理研究会報，**45**，31～38，2001.

© 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（Ⅱ）

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

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）

The aims of this study were (1) to clarify the relationship among the sleep-like posture (SLP) expression, growth, carcass traits, and meat quality traits in fattening cattle, and (2) to investigate the effects of nutritional and non-nutritional factors on the increased SLP expression due to high concentrate feed and whether the increased expression indicates a negative welfare aspect in fattening cattle. (1) The SLP expression was stable during the fattening period. The SLP expression showed no correlation between daily gain and carcass traits, respectively. However, the SLP expression showed negative correlations with daily gain and carcass weight, respectively. While the SLP expression showed a positive correlation with yield estimation value. (2) To examine the negative effect of endotoxin production on SLP expression, we investigated the SLP expression when endotoxin production was suppressed by sodium bicarbonate supplement under high concentrate feed. Sodium bicarbonate supplement could suppress the ruminal endotoxin production. However, SLP expression was not different from that in the control condition, it was suggested that there was no effect of endotoxin production on SLP expression. To examine the effects of behavioral unsatisfaction on SLP expression, we investigated the reduction of eating and ruminating time when the length of roughage was changed. Although eating time was increased when longer roughage was fed, there was no difference in SLP expression between roughage lengths. These results suggest that the prolonged SLP time under high concentrate feed condition would not relate with a negative animal welfare issue.

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。ウシの睡

© The Ito Foundation

眠はエンリッチメント環境下で長くなることが示されており[2]，睡眠はAWの指標となる可能性が考えられる。

本研究では，ウシが伏臥状態で首を曲げ，頭部を脇腹に乗せた状態を睡眠様姿勢として，睡眠の指標とした。昨年度の結果では，肥育牛において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，睡眠様姿勢の発現はウシに対するネガティブな状況を示している可能性も考えられた[3]。また，と畜まで至らなかったことから，枝肉や肉質形質との関係も評価することはできなかった。そこで本年度は，①肥育牛の睡眠様姿勢の発現と成長および枝肉・肉質形質との関係を明らかにする，とともに，②肥育期の睡眠様姿勢の発現について，睡眠姿勢の発現が，AW上問題とされる配合飼料多給に関連しているか検討することを目的とした。①については，昨年度供試したウシを出荷まで追加調査し，枝肉や肉質形質との相関を調べた。②については，栄養的要因として配合飼料多給により発生するエンドトキシンの影響を検討するため，重曹給与によってエンドトキシン産生抑制した時の睡眠様姿勢の発現を調査した。また，非栄養的要因として粗飼料不足により行動が充足されないことによる影響を検討するため，粗飼料長を変えた時の摂食・反芻時間の短縮と睡眠様姿勢の発現を調査した。

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）。実験は東北大学農学研究科附属川渡フィールドセンターで実施した。

2.1　肥育期間の睡眠様姿勢の発現と枝肉・肉質形質との関連

黒毛和種肥育牛６頭を供試して，12，15，21および27か月齢時に睡眠様姿勢の発現を調査した。肥育牛はペン（4.6m×4.8m）に10か月齢時に２頭ずつ導入した。それぞれの成長に合わせて稲ワラおよび配合飼料を給与した。ウシの睡眠様姿勢発現の測定は頭部に装着した加速度計を用いて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。４回の測定値の平均と肥育期間の日増体量およびと畜後の枝肉形質との相関を求めた。

2.2　配合飼料多給による睡眠様姿勢発現の増加に対する栄養的および非栄養的要因の影響

2.2.1　配合飼料多給によるエンドトキシンの発生が睡眠様姿勢の発現に与える影響

黒毛和種肥育牛４頭（２頭×２群）供試し，重曹（東洋電化工業株式会社製）給与と対照給与の反転試験を行った。供試牛には１頭当たり稲ワラ３kg／日，配合飼料10kg／日を朝夕に分けて給与した。重曹は100ｇ／頭／日を朝夕の給与時に配合飼料に混和して給与した。８日間の予備飼育後，加速度計を用いて２日間連続で睡眠様姿勢の発現を調査し，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。睡眠様姿勢発現の調査後にルーメン液および静脈血を採取し，ルーメン液中のエンドトキシン濃度およびVFA濃度，血清中のエンドトキシン濃度および栄養代謝成分濃度を測定した。分散分析により給与処理間の比較を行った。

2.2.2　配合飼料多給による摂食・反芻時間の短縮が睡眠様姿勢の発現に与える影響

黒毛和種肥育牛８頭（４頭×２群）供試し，長ワラ給与と短ワラ給与による睡眠様姿勢発現の比較を行った。短ワラ給与では配合飼料多給時と同様に長ワラ給与に比べて摂食や反芻など咀嚼に要する時間（摂食＋立位反芻＋横臥位反芻時間）が短くなることから，行動充足が不十分なことに対

© The Ito Foundation

する転位行動として睡眠様姿勢の発現が増加すると仮説を立てた。稲ワラは同一圃場から収穫されたものを用い，飼料長は長ワラ区で89.5±4.9cm，短ワラ区で3.2±0.5cmだった。両区とも１頭当たり稲ワラを飽食，配合飼料を10kg／日を朝晩に分けて給与した。８日間の予備飼育後，加速度計を用いて２日間の睡眠様姿勢の発現を調査し，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。赤外線カメラで撮影した動画から24時間の維持行動時間を調査した。睡眠様姿勢発現の調査後にルーメン液および静脈血を採取し，ルーメン液中のVFA濃度，血清中の栄養代謝成分濃度を測定した。分散分析により給与処理間の比較を行った。睡眠様姿勢の発現の分析には，睡眠様姿勢発現の個体差を排除するために，事前に全頭に飼料長20cmの稲わらを給与した条件で測定した睡眠様姿勢の発現のデータを共変量としてモデルに加えた。

３．結果と考察

3.1　肥育期間の睡眠様姿勢の発現と枝肉・肉質形質との関連

肥育期間中の睡眠様姿勢の発現を**Fig. 1** に示した。総発現時間は74.1–109.7分／日，バウト回数9.75–14.75回／日，平均バウト時間は6.18–7.45分／回に分布した。繰り返しのある分散分析の結果，いずれの形質についても月齢間に有意差はなかった。Fukasawa[4] は，ホルスタイン種雌牛では12か月齢以降の睡眠様姿勢の発現が安定することを示していて，今回の肥育期間（12～27か月齢）の睡眠様姿勢の発現も安定していたと考えられた。肥育期間中の睡眠様姿勢の発現データの平均と日増体量および枝肉形質との相関を**Table 1** に示した。サンプル数が少ないことから，いずれの形質とも有意な相関は認められなかったが，日増体量および枝肉重量との間には負の相関が認められ，歩留基準値との間に正の相関が認められた。今後サンプル数を増やすことで相関係数の精度を高める必要はあるが，前年度の結果と同様に肥育期に睡眠様姿勢の発現が多いと日増体量や体重が低下する傾向は同じであった。肉質形質は個体間のばらつきが少なく，相関を算出できなかった。

3.2　配合飼料多給による睡眠様姿勢発現の増加に対する栄養的および非栄養的要因の影響

3.2.1　配合飼料多給によるエンドトキシンの発生が睡眠様姿勢の発現に与える影響

ルーメン液中および血清中のエンドトキシン濃

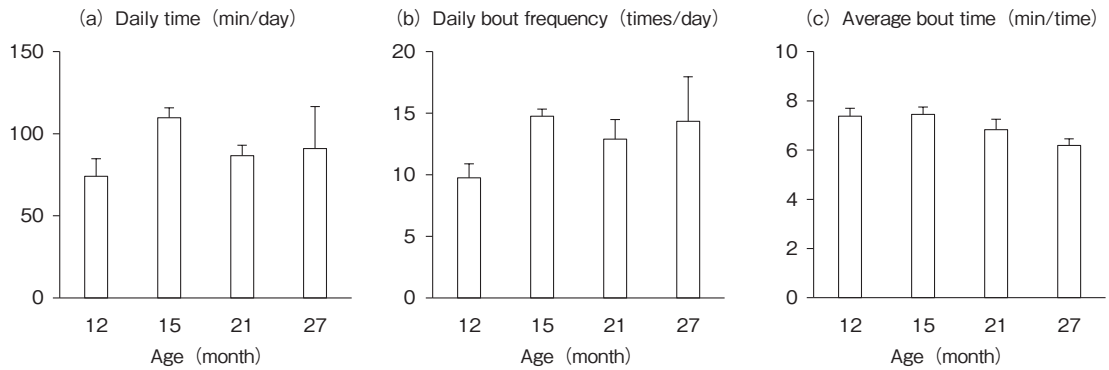

Fig. 1　Sleep-like postures expression of Japanese Black fattening cattle at 12, 15, 21, and 27 months of age (a) daily time (min/day), (b) daily bout frequency (times/day) and (c) average bout duration (min/times)
Bar and error bar represent mean and standard error.

© The Ito Foundation

Table 1 Correlations between the daily sleep-like posture expression and carcass traits

	Unit	Mean ± SE	Daily time	Bout frequency	Bout time
Daily weight gain	kg/day	0.82 ± 0.12	−0.26	−0.14	−0.46
Carcass traits					
Carcass weight	kg	456.8 ± 62.6	−0.49	−0.33	−0.73
Rib eye area	cm^2	67.8 ± 7.5	0.07	−0.02	0.39
Rib thickness	cm	7.4 ± 0.7	−0.07	0.09	−0.60
Subcutaneous fat thickness	cm	2.1 ± 0.6	−0.28	−0.28	−0.36
Dressing percentage	%	75.6 ± 1.5	0.35	0.27	0.57

All correlation coefficients are not significant（p>0.05）

Table 2 The comparison of ruminal and serume endotoxin concentration, ruminal total VFA, serum metabolite, serum hepatic enzymes, amd sleep-like posture expression in control and soda supprimented diet

	Unit	Control	Soda
Endotoxin			
Ruminal	mg/ml	2.34 ± 0.58	1.42 ± 0.16*
Serum	pg/ml	29.0 ± 9.0	17.0 ± 9.3
Ruminal total VFA	mg/l	4682 ± 235	4412 ± 500
Serum metabolite			
BUN	mg/ml	11.1 ± 1.3	12.7 ± 0.9
TC	mg/ml	146.3 ± 11.5	145.3 ± 4.1
NEFA	mEq/ml	0.143 ± 0.018	0.148 ± 0.032
Glucose	mg/ml	66.8 ± 1.3	65.3 ± 2.9
Serum hepatic enzyme			
ALP	U/l	96.0 ± 18.7	95.8 ± 17.7
AST	U/l	71.5 ± 7.3	73.0 ± 5.8
LDH	U/l	1338 ± 131	1348 ± 118
Sleep-like posture			
daily time	min/day	91.1 ± 17.8	97.8 ± 5.3
Bout frequency	times/day	15.1 ± 2.4	15.1 ± 0.9
Bout time	min/time	6.16 ± 0.62	6.60 ± 0.49

Average ± Standard error

Abbreviation
VFA：Volatile fatty acid, BUN: Blood urea nitrogen, TC：Total cholesterol, NEF：Non-esterified fatty acid, ALP：Alkalinephospatase, AST：Aspartate aminotransferase, LDH：Lactose dehydrogenase
*：p<0.05

度，ルーメン液中の総VFA濃度，血清中代謝成分濃度および肝機能関連成分，睡眠様姿勢の発現を**Table 2**に示した。ルーメン液中のエンドトキシン濃度は，重曹給与で対照給与よりも有意に低くなった。血清中エンドトキシン濃度は，有意差はなかったものの，重曹給与で低くなった。ルーメン液中のVFA濃度，血清中栄養代謝成分および肝機能関連成分には給与間に差はなかった。このことから重曹給与によりウシの栄養状態に影響を与えずエンドトキシンの発生を抑制できたと考

© The Ito Foundation

えられる。新井[5]は配合飼料多給牛でルーメン液中LPSの増加と肝障害を認めているが，今回の試験と同様に血清中肝機能成分濃度は粗飼料多給牛との間に差がなかったことを報告している。睡眠様姿勢の発現は総発現時間，バウト回数およびバウト時間のいずれにも重曹給与と対照給与に違いはなかった。籾田ら[6]は極低用量LPS投与時には，行動から推定したノンレム様睡眠のみが増加することを示した。本研究の睡眠様姿勢は脳波計からはレム睡眠の状態であることが示されており[7]，エンドトキシンは睡眠様姿勢の発現増加に影響しないことが考えられる。

3.2.2　摂食・反芻時間の短縮による行動欲求不満が睡眠様姿勢の発現に与える影響

両区の１日の行動時間配分を**Table 3**に示した。摂食時間は短ワラ区で長ワラ区よりも短い傾向を示した（p＝0.06）が，立位反芻時間，横臥反芻時間，および咀嚼時間には切断長による有意な差はなかった。本研究の短ワラ給与では，Fukasawaら[3]の配合飼料多給で見られた咀嚼時間の短縮は認められなかった。短ワラ区では横伏臥位休息が短くなる傾向（p＝0.06）を示したが，立位休息は有意に長くなった（p＜0.01）。横伏臥時間は短ワラ区で有意に短くなった（p＜0.001）。ルーメン液中のVFA濃度および血清中栄養代謝成分濃度には切断長による違いは認められず，行動の変化に栄養的な影響はなかったと考えられた。切断長の違う粗飼料の給与により，咀嚼時間は変わらなかったものの，行動時間配分の変化が引き起こされた。両区の１日の睡眠様姿勢発現を**Fig. 2**に示した。すべての形質について両区には有意な差はなかった。想定した咀嚼時間の変化は得られなかったが，粗飼料切断長の違いによる維持行動時間配分の変化は睡眠様姿勢発現への影響はないことが明らかになった。

以上の２つの試験では，肥育時の配合飼料多給でAW上の問題とされるエンドトキシンの発生や維持行動時間配分の変化という条件では睡眠様姿勢発現の延長は認めらなかった。このことから配合飼料多給による睡眠様姿勢の延長はAW上の問題と関連するものではないことが示唆された。

4．要　約

本研究では，①肥育牛の睡眠様姿勢の発現と成長および枝肉・肉質形質との関係を明らかにする，とともに，②配合飼料多給による睡眠様姿勢

Table 3　The comparison of daily maintenance behavior time（min/day）between cattle fed short and long roughrage

		Short	Long	p-value
Standing	Eating	181.3 ± 27.9	248.8 ± 9.2	0.06
	Rumination	55.0 ± 9.8	36.3 ± 14.9	N.S.
	Idling	372.5 ± 26.7	232.5 ± 13.8	<0.01
Lying	Rumination	248.8 39.1	231.3 36.3	N.S.
	Idling	541.3 ± 32.2	647.5 ± 31.5	0.06
Others		41.3 ± 9.0	43.8 ± 9.0	N.S.
Mastificaton[1)]		485.0 ± 54.2	516.3 ± 34.7	N.S.
Lying		790.0 ± 10.6	878.8 ± 10.1	<0.001

Average ± Standard error

[1)]Mastification is the sum of eating time, standing rumination time, and lying rumination time.

© The Ito Foundation

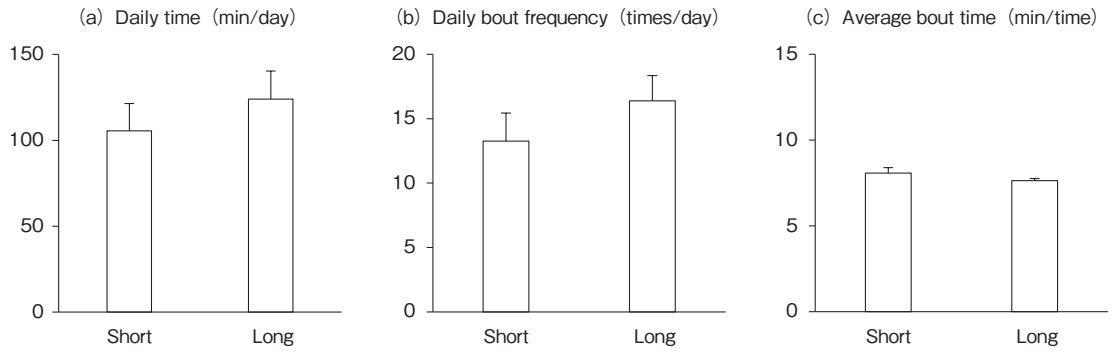

Fig. 2　The comparison of Sleep-like postures expression of Japanese Black fattening cattle fed short and long roughage (a) daily time (min/day), (b) daily bout frequency (times/day) and (c) average bout duration (min/times) Bar and error bar represent mean and standard error.

の発現の増加について，栄養的要因および非栄養的要因の影響を調査し，発現増加がウシのネガティブな状況を示しているのかを検討することを目的とした。①肥育期間中の睡眠様姿勢の発現は安定していた。睡眠様姿勢の発現平均と日増体量および枝肉形質との相関は，有意な関係は認められなかったが，日増体量および枝肉重量との間には負の相関が示され，歩留基準値との間に正の相関が示された。②配合給与によるエンドトキシン産生の影響を検討するため，重曹給与によってエンドトキシン産生抑制した時の睡眠様姿勢の発現を調査した。重曹給与により配合飼料多給条件下においてエンドトキシンの発生を抑制することができた。しかし，睡眠様姿勢の発現には対照区と変わらなかったことから，エンドトキシンの発生による影響はないものと考えられた。また，粗飼料不足により行動が充足されないことによる影響を検討するため，粗飼料長を変えた時の摂食・反芻時間の短縮と睡眠様姿勢の発現を調査した。粗飼料長を変えることで摂食時間は変わったものの，睡眠様姿勢の発現には粗飼料長の長さで違いがなかった。このことから配合飼料多給による睡眠様姿勢の延長はAW上の問題と関連するものではないことが示唆された。

文　献

1）井上昌次郎：眠りを科学する，朝倉書店，東京，2006.
2）Ninomiya, S., Sato, S.：Effects of 'Five freedoms' environmental enrichment on the welfare of calves reared indoors, *Animal Science Journal*, **80**, 347～351, 2009.
3）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.
4）Fukasawa, M.：The development of sleep-like posture expression with age in female Holstein calves, *Animal Science Journal*, **94**, e13816, 2023.
5）新井鍾蔵：牛のエンドトキシン血症における第一胃運動，第四胃運動および肝臓への影響，産業動物臨床医誌，**10**，1～16，2019.
6）籾田康介，吉田茉純，宗田吉広，石崎宏，桑原正貴，小針大助，矢用健一：極低用量のリポ多糖（LPS）投与による休息行動様態の変化，*Animal Behaviour and Management*，**58**，1～9，2022.
7）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.

© The Ito Foundation

暑熱ストレス下におけるニワトリ筋タンパク質分解に対するL-シトルリンの新規機能の解明

Elucidation of the novel function of L-citrulline to protect muscle protein breakdown under heat stress

スルチョードリ　ビシュワジット
（九州大学基幹教育院）

Sur Chowdhury Vishwajit
(Graduate School of Bioresource and Bioenvironmental Science, Kyushu University)

It has been reported that citrulline contributes to the improvement of heat tolerance by suppressing the increase in body temperature of chicks under heat environments. However, since heat stress also affects the meat quality and other products, it is necessary to examine the prevention of deterioration of product quality as well as heat tolerance. In this study, we investigated the blood composition and cecum microbiota related to protein metabolism in chicks. In Experiment 1, broiler chicks fed citrulline were exposed to a high-temperature environment for 1 hour, and then their blood parameters and cecum microbiota were analyzed. The results showed that citrulline induced low levels of plasma calcium. In the cecum microbiota, Bifidobacterium tended to increase, although no significant effect of citrulline feeding was observed. In Experiment 2, chicks were fed citrulline from 2 days to 3 weeks of age in a hot summer heat henhouse, and daily changes in rectal temperature and body weight were recorded, and analysis of plasma amino acids and cecum microflora was investigated. The results showed that plasma arginine, ornithine, carnosine, and lysine were higher in the citrulline-fed group, but no difference was observed for 3-methyl-histidine. As for the cecum microflora, Salmonella and Bifidobacterium showed lower levels in the citrulline-fed areas. These results suggest that citrulline feeding affects muscle protein metabolism by altering the balance of plasma amino acids and intestinal flora.

1．目　　的

地球温暖化の進行に伴い，暑熱ストレスによる家畜への被害はますます深刻化している。その対策の一つとして，飼料添加物が利用されており，過度な体温上昇や斃死に対してある程度の効果があることが報告されている。一方，暑熱ストレスは，肉質など生産物としても影響を受けるため個体の熱耐性とともに生産物の品質低下防止についても検討する必要がある。これまでのところ，暑熱ストレスの緩和を目的とした飼料添加物の開発については，数多く取り組まれてきたが，暑熱に対する品質保持対策における有効な飼料添加物は提示されていない。我々は，これまでニワトリヒナを用いた実験でシトルリンが体温を低下させることを報告した[1)]。この作用は暑熱環境下におい

© The Ito Foundation

ても有効でニワトリの熱耐性を向上させること[2]，さらに最近では中枢神経系におけるモノアミン代謝にもシトルリンが影響することを報告してきた[3]。また，この効果はシトルリンを多く含むスイカ果皮（農業系副産物）を飼料に添加した場合でも同様の効果があることを見出した[4]。一方，筋タンパク質に及ぼすシトルリンの効果については，齧歯類の実験において，シトルリンがストレス条件下での筋肉の機能を増進させることが報告されているが[5]，鳥類，とりわけ家禽における影響については不明である。そこで本研究では，シトルリン給与が暑熱環境下で飼育されたブロイラーのタンパク質代謝に及ぼす影響について，血液成分と盲腸内細菌叢の解析から検討することとした。

2．方　法

2.1　急性暑熱ストレスによる筋タンパク質代謝に関わる血液成分および細菌叢に及ぼすシトルリン給与の影響

供試動物は７日齢ブロイラーヒナ（Chunky）で，１区10羽で合計４区に設定した。試験区ヒナにはゾンデを用いてシトルリン（15mmol/10 ml/kg体重）を２回（合計30mmol/head）経口投与した。対照区は，シトルリンの溶剤として用いた0.25％メチルセルロース溶液を同様に２回投与した。その後両区ヒナを，熱的中性圏28-30℃，あるいは暑熱温度35±１℃に１時間暴露した。試験終了後，ヒナはイソフルランにより過麻酔し，血液と盲腸内容物を採取した。血液は遠心分離後，血漿成分の解析に使用した。盲腸内容物は，採取後ただちに－80℃で保存して解析に使用した。内容物は精製処理後，濃度を20 μg/ μlに調整し，FastStart Essential DNA Green Master （Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）およびLight Cycle nano（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）を用いてreal-time PCRを行った。得られた結果をLight Cycler Software（Roche Diagnostics, Mannheim, Germany）の Second Derivative Maximum法を用いて，2^{2}（ユニバーサル―目的遺伝子）×100により相対的定量を行った[6]。また，統計解析を行う際は得られた数値の対数をとって使用した。なお，対象（目的遺伝子）としたのは，Lactobacillus，Escherichia coli，Clostridium，Bifidobacterium，Salmonellaの５つであった。

2.2　慢性暑熱ストレスによる筋タンパク質代謝に関わる血漿アミノ酸および細菌叢に及ぼすシトルリン給与の影響

供試動物は，２日齢ブロイラーヒナ（Chunky）で，１区10羽で合計２区（対照区および試験区）に設定した。試験区ヒナにはシトルリン添加飼料（１％），対照群には幼雛用飼料（豊橋飼料株式会社，愛知，日本；代謝エネルギー，＞12.55MJ/kg以上，タンパク質23％以上）を給与した。試験期間中は，夏期の開放鶏舎と同様の暑熱環境に３週間曝露するとともに，摂食量，直腸温および体重を測定した。実験終了後，実験１と同様に血液を採取し，血漿アミノ酸濃度を測定した。また，盲腸内細菌叢についても実験１と同様に解析した。

3．結果と考察

実験１の結果，いずれの温度環境でもシトルリンを経口投与することにより，体温が低下した。また，食物摂取量もシトルリンの経口投与により減少した。血液成分については，血漿グルコース，総タンパク，総コレステロール，トリアシルグリセロール，カルシウム，ナトリウム，カリウム，塩素を分析したところ，血漿グルコース，総タンパク，総コレステロール，トリアシルグリセロールには群間で有意差はなかったが，血漿カルシウムとコルチコリンが有意に減少した。一方，血漿

© The Ito Foundation

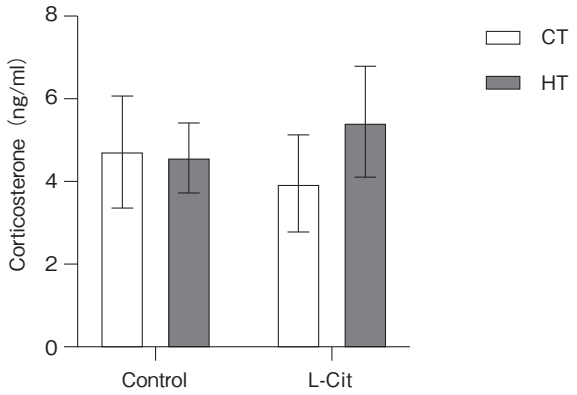

Fig. 1　Effects of citrulline feeding on the level of plasma corticosterone in heat stressed chicks

コルチコステロン濃度は環境温度およびシトルリンのいずれの影響も受けなかった（**Fig. 1**）。近年，腸内細菌が宿主に及ぼす影響についてさまざまな報告がある[7)]。本実験においては，暑熱暴露によってクロストリジウム属が有意に増加し，暑熱ストレスが盲腸内細菌叢に影響を及ぼすことが示唆された。一方，シトルリン給与の影響については，有意な差は認められなかったがビフィズス菌類が増加傾向にあった（**Fig. 2**）。

実験２の結果，直腸温はシトルリンの影響を受けなかったが，シトルリンと投与日数の間に相関関係が認められ，15日目と18日目の直腸温は対照群より低いことが示された（**Fig. 3**）。体重は日数の経過とともに有意に増加したが，シトルリンの飼料投与による影響は認められなかった。血漿中の遊離アミノ酸については，血漿中のシトルリン，アルギニン，オルニチン，カルノシンおよびリジンの濃度がシトルリン添加飼料によって有意に増加した。一方，血漿中のグルタミン酸およびグルタミンは，シトルリン添加飼料により減少した（**Fig. 4**）。筋肉タンパク質分解の指標となる３-メチル-ヒスチジンの濃度は，変化しなかった。これらの結果から，シトルリンの食事投与は直腸温の低下のみならず血漿中の遊離アミノ酸に影響を及ぼすことが示唆された。暑熱ストレスによる肉質への悪影響は熱性多呼吸が一因と考えられ，pHの低下，PSE肉の増加，保水性の低下などといった問題が生じた可能性がある[8)]。ブタにおいてシトルリン添加飼料が夏季暑熱期の呼吸数増加を緩和することが報告されているが[9)]，本実験ではタンパク質分解にシトルリンが有効であることの結果を示すことはできなかった。盲腸内細菌叢については，いずれの属も減少傾向にあり，特にサルモネラ属およびビフィズス菌類についてはシトルリン添加区のものが対照区よりも有意に低い値となった（**Fig. 5**）。このことは，実験１と異なり長期でのシトルリン給与は細菌叢のバランスに大きく影響すること，今回測定していない細菌類，例えばバクテロイデス属などの増加が推測され，これらがヒナのアミノ酸プールに影響した可能性が考えられた。

以上の結果から，シトルリン給与が暑熱環境下ニワトリヒナの筋タンパク質代謝に有益な効果をもたらす明確な結果は得られなかったが，血漿アミノ酸や腸内細菌叢のバランスに影響することが認められた。

４．要　　約

シトルリンは，その給与によって暑熱環境下ニワトリヒナの体温上昇の抑制など熱耐性向上に寄

© The Ito Foundation

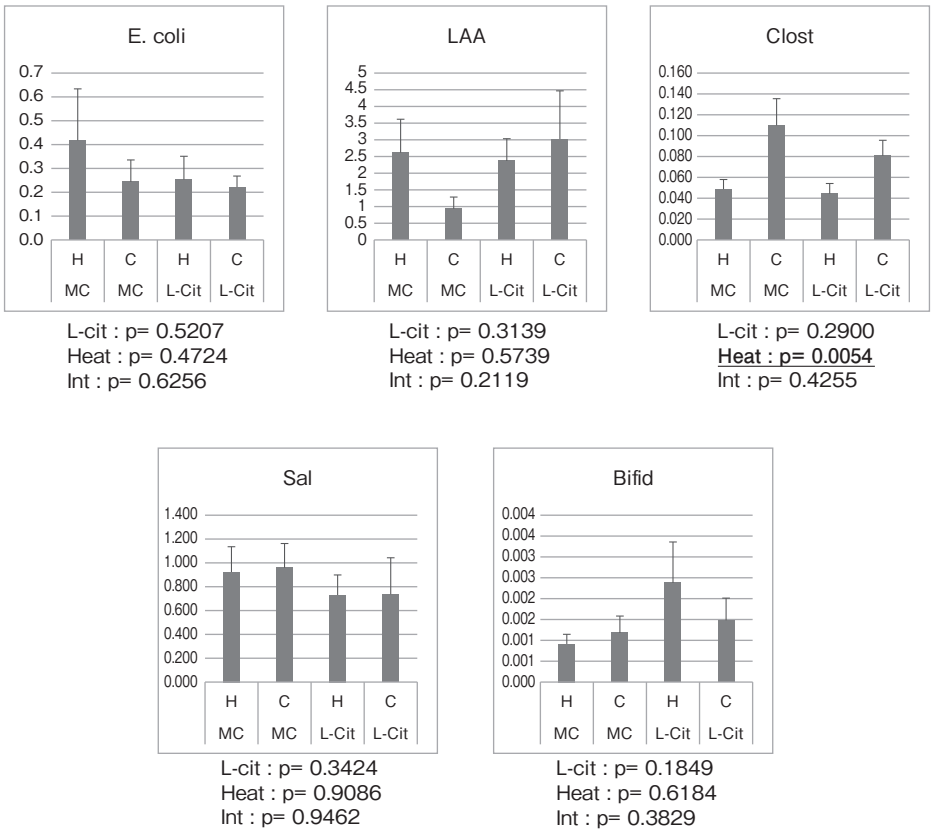

Fig. 2　Effects of citrulline feeding on the cecum microbiota in heat stressed chicks

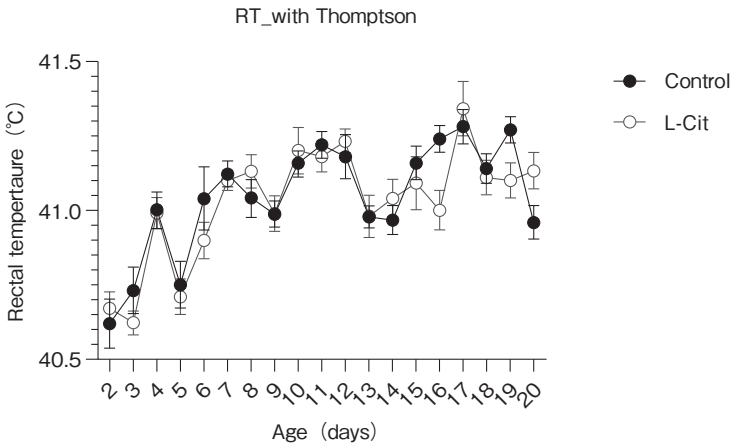

Fig. 3　Effects of citrulline feeding on the rectal temperature in chicks

与することが報告されてきた。しかし，暑熱ストレスは，肉質など生産物にも影響するため熱耐性とともに生産物の品質低下防止についても検討する必要がある。そこで本研究では，タンパク質代謝に関連する血液成分と盲腸内細菌叢の解析から調査した。実験1では，シトルリンを給与したブ

© The Ito Foundation

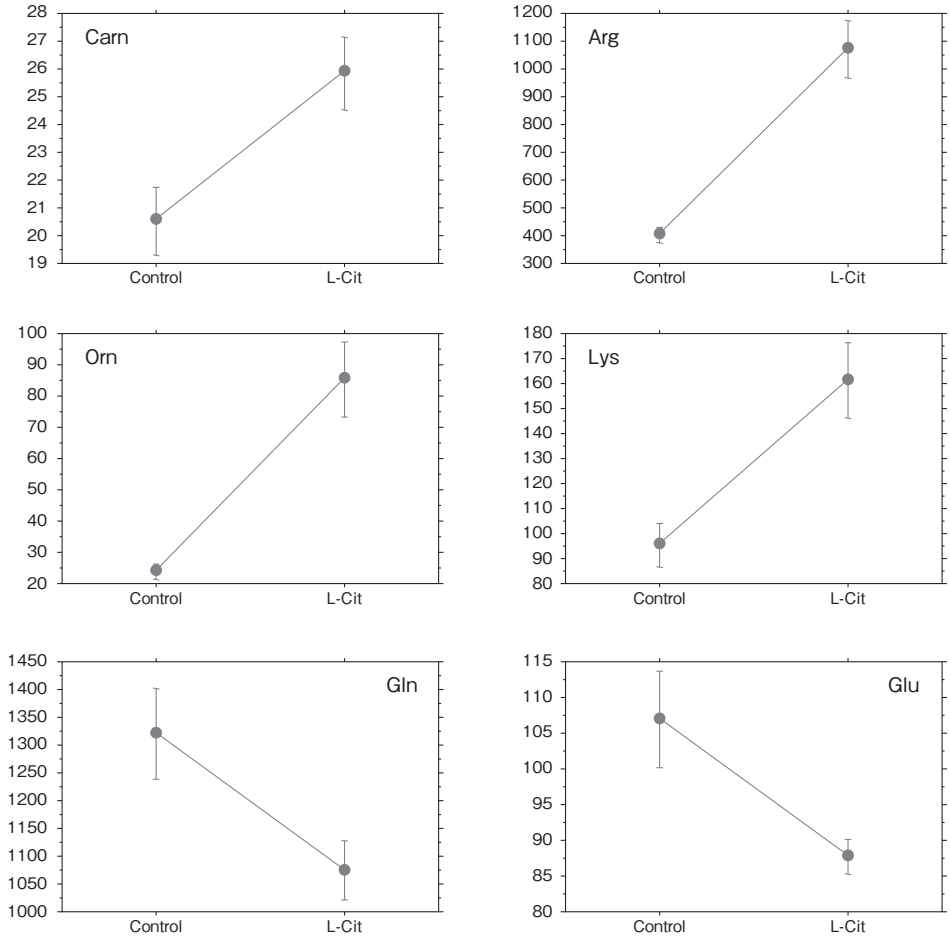

Fig. 4　Effects of citrulline feeding on the levels of plasma amino acids in 3 wk old chicks

ロイラーヒナを高温環境下に１時間曝露して，その血液成分を解析した。その結果，シトルリンによって血漿カルシウムとコルチコリンが低値を示した。盲腸内細菌叢では，シトルリン給与の有意な影響は認められなかったものの，ビフィズス菌類が増加傾向にあった。実験２では，２日齢から３週齢まで夏季暑熱鶏舎でニワトリヒナにシトルリンを給与し，直腸温と体重の変化を毎日記録するとともに，血漿アミノ酸と盲腸内細菌叢の解析を行った。その結果，血漿中アルギニン，オルニチン，カルノシンおよびリジンがシトルリン給与区で高い値を示したが，３-メチル-ヒスチジンは変化しなかった。盲腸内細菌叢については，サルモネラ属およびビフィズス菌類がシトルリン添加区で低い値を示した。以上の結果から，シトルリン給与は血漿アミノ酸や腸内細菌叢のバランスを変化させ，筋タンパク代謝に影響することが示唆された。

文　献

1）　Chowdhury, V. S., Shigemura, A., Erwa, E., Ito, K., Mohammad, A. B., Tran, P. V., Furuse, M.：Oral admission of L-citruline, but not Larginine or L-ornithine, acts as a hypothermic agent in chicks, *Journal of Poultry Science*, **52**, 331～335, 2015.

2）　Chowdhury, V. S., Han, G., Bahry, M. A., Tran, P. V., Do, P. H., Yang, H., Furuse, M.：L-Citrulline acts as potential hypothermic agent to afford thermotolerance in chicks, *Journal of Thermal*

© The Ito Foundation

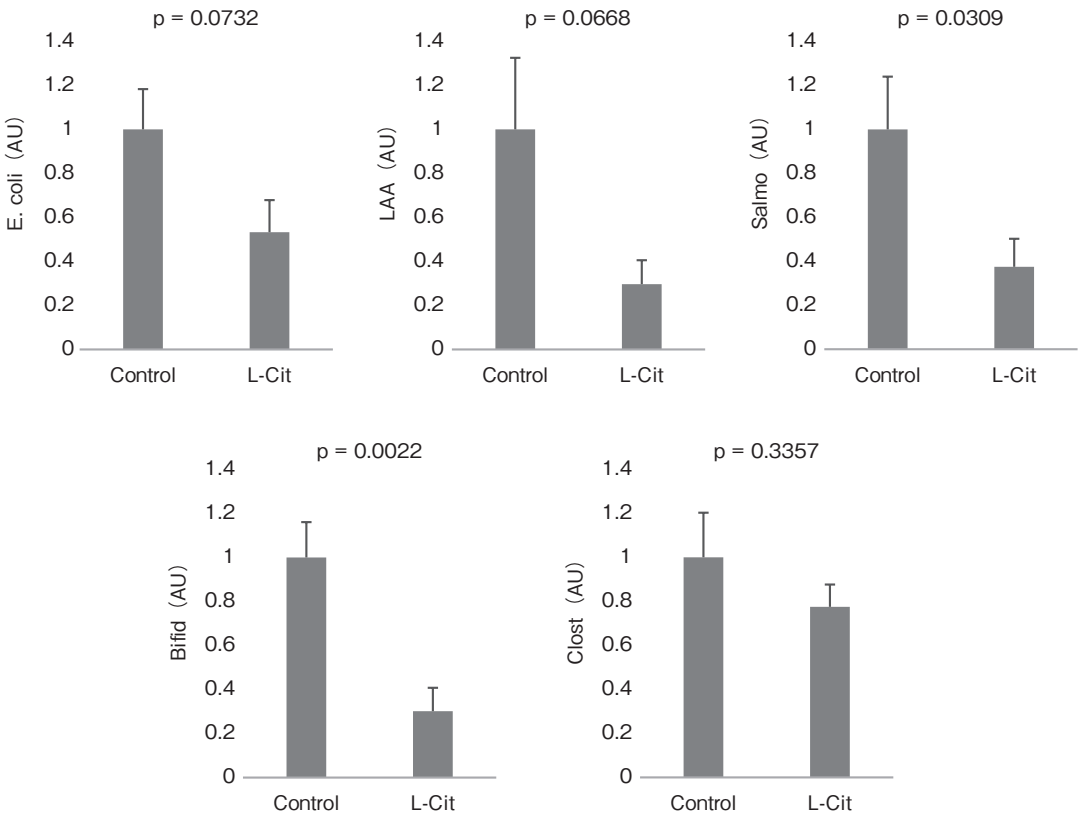

Fig. 5　Effects of citrulline feeding on the cecum microbiota in 3 wk old chicks

Biology, **69**, 163～170, 2017.

3）　Chowdhury, V. S., Ouchi, Y., Han, G., Eltahan, H. M., Haraguchi, S., Miyazaki, T., Shiraishi, J., Sugino, T., Bungo, T.：Oral administration of L-citrulline changes the concentrations of plasma hormones and biochemical profile in heat-exposed broilers, *Animal Science Journal*, **92**, e13578, 2021.

4）　Nguyen, T. N. L., Han, G., Yang, H., Ikeda, H., Eltahan, H. M., Chowdhury, V. S., Furuse, M.：Dried watermelon rind mash diet increases plasma L-Citrulline level in chicks, *Journal of Poultry Science*, **56**, 65～70, 2019.

5）　Faure, C., Raynaud-Simon, A., Ferry, A., Daugé, V., Cynober, L., Aussel, C., Moinard, C.：Leucine and citrulline modulate muscle function in malnourished aged rats, *Amino Acids*, **42**, 1425～1433, 2012.

6）　Suzuki, N., Yoshida, A., Nakano, Y.：Quantitative analysis of multi species oral biofilms by TaqMan real time PCR, *Clinical Medicine & Research*, **3**, 176～185, 2005.

7）　Dayou, S., Lin, B., Qian Q., Shanshan, Z., Meimei, Y., Shining, G., Qiuhong, L., Cui, L.：Impact of gut microbiota structure in heat-stressed broilers, *Poultry Science*, **98**, 2405～2413, 2019.

8）　Zaboli, G., Huang, X., Feng, X., Ahn, D. U.：How can heat stress affect chicken meat quality? - a review, *Poultry Science*, **98**, 1551～1556, 2019.

9）　Liu, F., de Ruyter, E. M., Athorn, R. Z., Brewster, C. J., Henman, D. J., Morrison, R. S., Smits, R. J., Cottrell, J. J., Dunshea, F. R.：Effects of L-citrulline supplementation on heat stress physiology, lactation performance and subsequent reproductive performance of sows in summer, *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, **103**, 251～257, 2019.

© The Ito Foundation

子牛における乳糖不耐症に関する研究

The study on lactose intolerance in calves

福　森　理　加
（酪農学園大学獣医学群）

Rika Fukumori
（School of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University）

Milk replacer contains lower fat and higher concentrations of lactose content than whole milk. Fat has a high energy density, but excessive intake may lead to body fat accumulation. On the other hand, lactose is less likely to be stored as body fat, but its low energy density requires large amounts to be fed, and high concentrations of lactose may increase the risk of increased intestinal permeability and diarrhea due to increased osmotic pressure. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effects of different lactose content in milk replacer on intestinal permeability and mRNA expression of growth- and inflammation-related factors in the liver. Fifteen Holstein bull calves were placed in one of three treatments feeding milk replacer with different lactose contents [L（38％）, M（41％）, and H（46％） n = 5]. Milk replacer was fed three times a day and metabolizable energy and metabolizable protein intake were equal in the treatments. The calves were kept until 30 to 36 days of age, then euthanized and their intestinal tracts and livers were collected. After that Lucifer yellow（LY）permeability and electrical resistance（TEER）of the intestinal tract were then measured using a Ussing chamber. In addition, mRNA expression levels of IGF-1, GHR, and GHR1A as growth-related factors and IL-6, IL-1 β, TNF-α, TLR-2, and TLR-4 as inflammation-related factors in the liver were analyzed. LY permeability was higher in L compared to M and H in the duodenum and ileum, and in L compared to H in the jejunum. Decrease rate of TEER was higher in L compared to M and H in the duodenum and ileum. No significant differences in both LY permeability and TEER were observed in the colon between treatments. Regarding mRNA expression in the liver, GHR was lower in the M and H compared to the L. IL-1 β, TNF- α, and TLR-2 expression was lower in the M and H compared to the L, and TLR-4 expression was lower in the H compared to the M. In this study, increasing lactose content up to 46% did not increase intestinal permeability, but rather decreased it in the small intestine. The decrease in permeability inhibited the amount of toxic substances transferred from the intestinal tract to the liver via the portal vein, suggesting that gene expression of inflammation-related factors in the liver was reduced. Furthermore, increased lactose content had less effect on growth-related factors in the liver.

© The Ito Foundation

1．目　　的

近年，子牛の飼育現場では，離乳後の健康状態や飼料効率および初産分娩後の生産成績向上を目的として離乳前の成長を促すためのさまざまな栄養戦略が実施されている。その栄養戦略の一つに代用乳組成があげられる[10]。代用乳中には全乳と比較して高濃度の乳糖と低濃度の脂肪が含まれる。この組成構成は，チーズやバターを生産した際に副産物として脱脂粉乳やホエイが入手できることや[18, 3]，幼獣期の過度な脂肪の蓄積は将来の産乳成績を低下させるため脂質を多量に給与すべきではないという考え方に基づいている[3]。このように，飼料の低コスト化と無駄のない健全な成長を期待して，代用乳中に高濃度の脂肪を含めることが敬遠されている[10]。

乳糖は乳中の糖分画の８割以上を占めており[29]，腸管内では単糖に比べ半分の浸透圧で同量の栄養素が摂取できるため浸透圧上昇による下痢や腸管障害のリスクを軽減できる。また，多くの細菌に利用されづらく口内や腸管内に細菌が増殖するのを防ぐことができることや[29]，乳糖の分解産物であるガラクトースはヒトでは新生児期や幼少期の脳の発達に寄与することなどが報告されていることから[6]，子牛の健康や成長に対してもさまざまな利点が期待される。また，反芻動物の場合，ATP−クエン酸リアーゼおよびNADP−リンゴ酸脱水素酵素の活性がきわめて低く，余分なグルコースは体脂肪として蓄積されにくいことが知られている[2]。

一般的に離乳前の体重増加量が大きく離乳後の乾物摂取量が多いと，健康状態や飼料効率および初産産乳成績が向上するなど，短期的および長期的なメリットがあると言われている[10]。子牛の成長に深く関わる因子の１つとして成長ホルモン（GH）−インスリン様成長因子（IGF−1）軸があり，これは体の成長および乳腺の発達に重要な役割を担っている[26]。IGF−1は肝臓から分泌され，総エネルギー摂取量と相関することや，IGF−1の血漿中濃度は日平均増体量と相関することが示されている[15]。また，肝臓におけるIGF−1と成長ホルモン受容体1A（GHR1A）のmRNA発現量は正の相関があり[5]，両者の発現量はタンパク質制限飼料により減少することが示されている[11]。しかし，代用乳中の乳糖含量割合の違いによるIGF−1およびGHR1AのmRNA発現への影響は明らかにされていない。さらに，乳糖は脂肪と比べてエネルギー密度が低いため高い増体を目指すためには多量に与える必要があり，高濃度の乳糖は浸透圧上昇に伴う腸管透過性の亢進による下痢のリスクが懸念される[31]。また，同等の浸透圧でも消化許容量を超えた乳糖は大腸での異常発酵により下痢を引き起こす可能性がある。腸管透過性はTight junction（TJ）に依存しており，TJは腸管上皮を介したイオン，溶質および水の傍細胞移動を制御することにより物理的な腸管バリアの機能に寄与している[19]。腸管内の浸透圧上昇によりTJが崩壊すると毒素などの有害物質が腸管から門脈を介して肝臓に移行し，炎症を誘発させることが懸念される[27]。

過去の研究において高浸透圧代用乳による腸管透過性の亢進は報告されているが，代用乳の組成自体に違いがあっても浸透圧を同等に調整した場合の腸管への影響は明らかにされていない。また，タンパク質含量の違いによる肝臓の成長関連因子への影響は報告されているが，乳糖含量の違いによる影響は明らかではない。そこで本研究では，代用乳中の乳糖含量の違いが，腸管の透過性と肝臓における成長関連因子および炎症関連因子のmRNA発現量に及ぼす影響を評価した。

© The Ito Foundation

２．材料および方法

供試動物として本学酪農生産ステーションおよび大学近郊の１農場（江別市）で出生したホルスタイン種雄子牛（15頭）を使用した。供試牛は，出生当日またはその翌日に本学動物実験ステーションに移動し，試験処理として乳糖含量割合の異なる３種の代用乳給与区［Ｌ区（38％），Ｍ区（41％），Ｈ区（46％）］に５頭ずつ配置し，その後30～36日齢まで飼養した。子牛は導入時（出生後24～48時間以内）に頸静脈から採血し，血清総タンパク質濃度を屈折計（ATAGO）を用いて測定し，5.2g/dl以上であった個体を実験に供試した。血清IgG濃度はELISA法[25]により測定し，処理区間で差がないことを確認した（Ｌ区：24.5mg/dl，Ｍ区：24.0mg/dl，Ｈ区：21.5mg/dl）。体重および体尺（体高，十字部高，体長および胸囲）は出生後０，１，２，３および４週に測定した。

出生から臍帯が乾くまで敷料を敷いたが，それ以降は敷料の採食を防止するためマットのみを敷いて飼育した。気温13℃以下の時にはペンの上にカーボンヒーターを吊り下げ，カーフジャケットとネックウォーマーを個体ごとに装着して保温した。

１日齢から代用乳を１日３回（0700ｈ，1300ｈ，1900ｈ）給与し，水はバケツから自由摂取させた。代用乳は48℃前後のお湯に溶解し，哺乳バケツで給与した。試験用代用乳は，カーフトップEX，カーフトップET，カーフトップZero（全酪連，東京，日本）およびラクトース粉末（Leprino Foods，米国）を調合して作製した。Ｌ区では，EXを１回の哺乳あたり，９日齢まで粉体で200ｇ，10～19日齢まで300ｇおよび20日齢以降は400ｇ与えた。Ｍ区では，ETを51.6％，Zeroを41.0％およびラクトース粉末を7.4％の割合で調合した代用乳を，１回の哺乳あたり９日齢まで粉体で208.3ｇ，10～19日齢まで312.5ｇおよび20日齢以降は416.7ｇ与えた。Ｈ区では，ETを43.8％，Zeroを41.5％およびラクトース粉末を14.6％の割合で調合した代用乳を，１回の哺乳あたり９日齢まで粉体で216.7ｇ，10～19日齢まで325.0ｇおよび20日齢以降は433.3ｇ与えた。代用乳はＬ区で16.6％（w/w），Ｍ区で15.5％（w/w）およびＨ区で15.0％（w/w）となるようにお湯で溶解した。また，腸管における浸透圧の影響を避けるため全処理区において浸透圧を451mOsm/lにした。各試験用代用乳の浸透圧は，IDF STANDARD 108A（1986）の方法[17]に従って氷点降下度から換算された。氷点降下度はCryoscope Model 4250（Advanced Instrument，米国）を用いて測定した。飼料分析はAOACに基づいて実施し[1]，成分表を**Table 1** に示した。

２および４週齢において，哺乳15分前から180分後まで５分おきに呼気の水素濃度を水素ガス測定計（ユーピー，神奈川，日本）で測定した。

また，腸管透過性および肝臓組織を採取するために，約36日齢に安楽殺を行い，安楽殺後30分以内に腸管の切り出しを行った。十二指腸は第四胃幽門部から尾側方向に20cmの位置，空腸は第四胃幽門部から尾側方向に150cmの位置，回腸は回盲部から尾側方向に30cmの位置，盲腸は盲腸の先端部，結腸近位は円盤結腸の中心部および結腸遠位は肛門から頭側方向に100cmの位置からそれぞれ５cmほど切り出した。切り出し後はただちに生理食塩水で腸管の内容物を洗い流し，氷冷したHEPES緩衝液[21]に入れた。十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸近位および結腸遠位はUssing chamberに装着し，HEPES緩衝液10mlで15分間安定化し常に100％酸素で連続曝露した。その後，粘膜側に傍細胞透過性マーカーであるLucifer Yellow CH Dilithium Salt（富士フィルム和光純

© The Ito Foundation

Table 1 Chemical composition of experimental feed

Chemical composition	[1] Treatment milk replaser		
	L	M	H
Dry matter（%）[2]	92.9	93.4	93.2
Lactose（%）[2]	37.8	41.1	46.0
Crude protein（% DM）[2]	25.2	25.4	24.4
Fat（% DM）[3]	17.8	15.8	13.6
Crude ash（% DM）[3]	6.18	5.62	5.21
Daily supply（At maximum feeding）			
As fed（kg/day）	1.20	1.25	1.30
Dry matter（kg/day）[2]	1.16	1.21	1.26
Metabolizable protein supply（g）[3]	334.92	337.84	334.81
Metabolizable energy allowable growth（kg/day）[3]	0.81	0.82	0.81
Metabolizable protein allowable growth（kg/day）[3]	1.15	1.16	1.15

[1] L：Low lactose，M：Medium lactose，H：High lactose
[2] Measured by wet chemistry
[3] Estimated by AMTS ver4.1 lot16.9.1

薬株式会社，以下LYとする）を21.8 μmol/lの濃度で添加した新鮮なHEPES緩衝液を，漿膜側に新鮮なHEPES緩衝液をそれぞれ10mlずつ同時に添加した。添加した時点を０分とし，０分，10分後，20分後および30分後に粘膜側および漿膜側から添加溶液を300 μl採取し，マイクロウェルプレートに各採取溶液を70 μlずつ分注し，ARVOTM SX DELFIA® 1420 MULTILABEL COUNTER（PerkinElmer Japan，神奈川，日本）によって485nmの励起波長および535nmの蛍光波長で測定した。傍細胞透過性の測定と並行してTrans-epithelial electrical resistance（TEER）の測定を短絡電流測定装置CEZ-9100（日本光電，東京，日本）を用いて行った。

肝臓サンプルからは，mRNA発現量の解析を行った。肝臓の成長関連因子としてInsulin-like growth factor 1（IGF-1），Growth hormone receptor（GHR）およびGrowth hormone receptor 1A（GHR1A），炎症関連因子としてInterleukin6（IL-6），IL-1 β，Tumour Necrosis Factor alpha（TNF-α），Toll-like receotor2（TLR-2）およびTLR-4のmRNA発現量の解析を行った。また，GAPDH，β-actinおよびywhazの３種類の候補から，統計ソフトEZR（自治医科大学）にて解析し，内在性コントロール因子としてGAPDHを選定した。それぞれのプライマー配列を**Table 2**に示す。PCRプレート（イナ・オプティカ，大阪，日本）にSYBR，各種プライマー，超純水およびcDNAを加え20 μlとしたサンプルを用い，初期熱変性95℃，５分，熱変性95℃，15秒，アニーリング60℃，30秒および伸長反応72℃，30秒の３つを１サイクルとし，40サイクル行った。プライマー対は融解曲線分析を行い，１つの産物だけが増幅されていることを確認した。mRNA発現量の成績はＬ区５頭の２－ΔΔCt値の平均値を１とした各サンプルの相対値を算出した。

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，米国）を用いて分析された。LY透過性およびTEERの結果につい

© The Ito Foundation

Table 2　Primer sequence

Gene	Primer sequence (5'→3'；F＝forward，R＝reverse)	Amplicon size（bp）	Reference
GAPDH	F:GGCGTGAACCACGAGAAGTATAA R:CCCTCCACGATGCCAAAGT	118	[23]
β-Actin	F:AGCAAGCAGGACTACGATGAG R:ATCCAACCGACTGCTGTCA	241	[14]
ywhaz	F:GCATCCCACAGACTATTTCC R:GCAAAGACAATGACAGACCA	120	[14]
IGF-1	F:ATGCCCAAGGCTCAGAAG R:GGTGGCATGTCATTCTTCACT	115	[32]
GHR	F:ATGGCGGTATTGTGGATCAT R:AGGATGTCGGCATGAATCTC	121	[32]
GHR1A	F:CCAGCCTCTGTTTCAGGAGTGT R:TGCCACTGCCAAGGTCAAC	86	[32]
IL-1b	F:AGTGCCTACGCACATGTCTTC R:TGCGTCACACAGAAACTCGTC	114	[14]
TNF-α	F:TCTTCTCAAGCCTCAAGTAACAAGC R:CCATGAGGGCATTGGCATAC	418	[14]
TLR-2	F:CATTCCCTGGCAAGTGGATTATC R:GGAATGGCCTTCTTGTCAATGG	195	[14]
TLR-4	F:CTTCCCGGGGGATGTTTCAA R:CCTGAGGGGGTTTCTACTGG	169	[14]

て，モデルには処理区，時間および処理区×時間が固定効果，牛番号がランダム効果として含まれた。qRT-PCRの結果について，モデルには処理区が固定効果，牛がランダム効果として含まれた。また，すべての統計的推定は，$p<0.05$を有意差あり，$p<0.10$を傾向ありとした。

本研究は，酪農学園大学動物実験規定に基づき実施され，動物実験委員会で承認されたものである。

３．結果と考察

呼気水素濃度はいずれの処理からも検出されなかった（データなし）。

十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸近位および結腸遠位における漿膜側溶液の相対蛍光強度を**Fig. 1** に示した。なお，相対蛍光強度は値が強いほど，透過性が高いことを示している。十二指腸および回腸においてM区およびH区と比較してL区で相対強度が高く（$p<0.05$，**Fig. 1A**および**1C**），空腸においてはH区と比較してL区で高かった（$p<0.05$，**Fig. 1B**）。盲腸，結腸近位および結腸遠位では処理区間における有意な差は認められなかった。なお，実験開始前の新鮮なHEPES溶液の平均相対蛍光強度は179であった。十二指腸，空腸，回腸，盲腸，結腸近位および結腸遠位におけるTEERの０分時点を100％とした場合の減少率を**Fig. 2** に示した。TEERは値が小さいほど，透過性が高いことを示している。十二指腸および回腸においてM区およびH区と比較してL区で減少率が高かった（$p<0.05$，**Fig. 2A**および**2C**）。空腸，盲腸，結腸近位および結腸遠位では処理区間における有意な差は認められなかった。LYの相対蛍光強度は十二指腸および回腸において，M区およびH区と比較してL区で高く，空腸ではH区と比較してL区で高かった。また，TEERの減少率は十二指腸および回腸において，M区およびH区と比較してL区で高かった。LY透過性は相対蛍光強度が高くなるほど，TEERは減少率が高いほど腸管透過性の亢進を反映する[21]。本試験の結果より，代用乳中の乳糖含量を

© The Ito Foundation

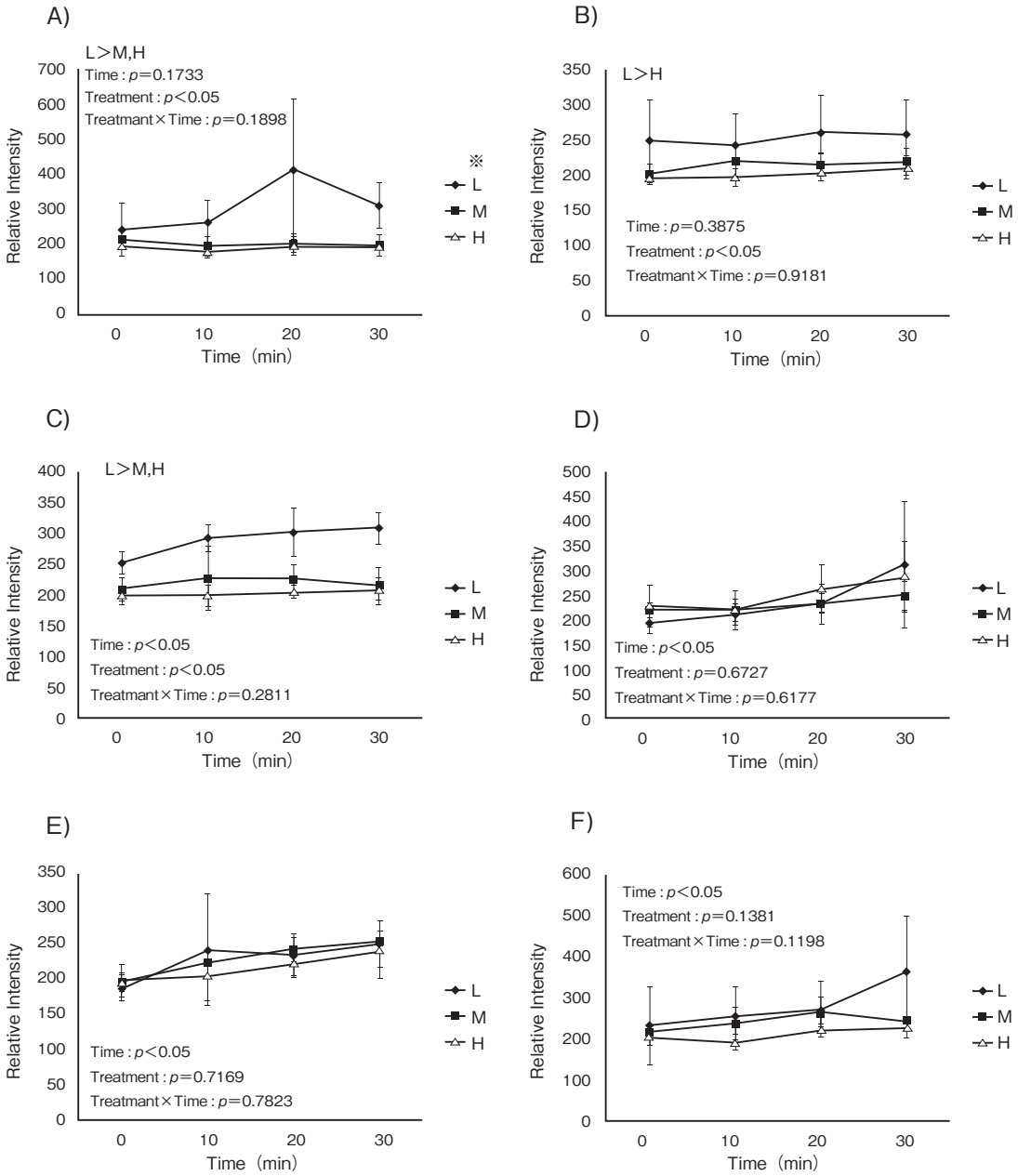

Fig. 1　The effect of lactose content in milk replacer on the relative intensity of fluorescence in the gastrointestinal tracts.
（A）Duodenum,（B）Jejunum,（C）Ileum,（D）Caecum,（E）Proximal colon,（F）Distal colon
Values are expressed as LSMEANS ± SEM（n = 5）.
Error bars indicate SEM for the Treatment × Time interaction.
※　L : Low lactose, M : Middle lactose, H : High lactose content in milk replacer.

増加させると小腸の透過性は減少することが示唆された。

腸管の傍細胞透過性はTight junction（TJ）に依存し，TJは腸管上皮を介したイオン，溶質および水の傍細胞移動を制御することにより物理的な腸管バリアの機能に寄与している[19]。本試験に

© The Ito Foundation

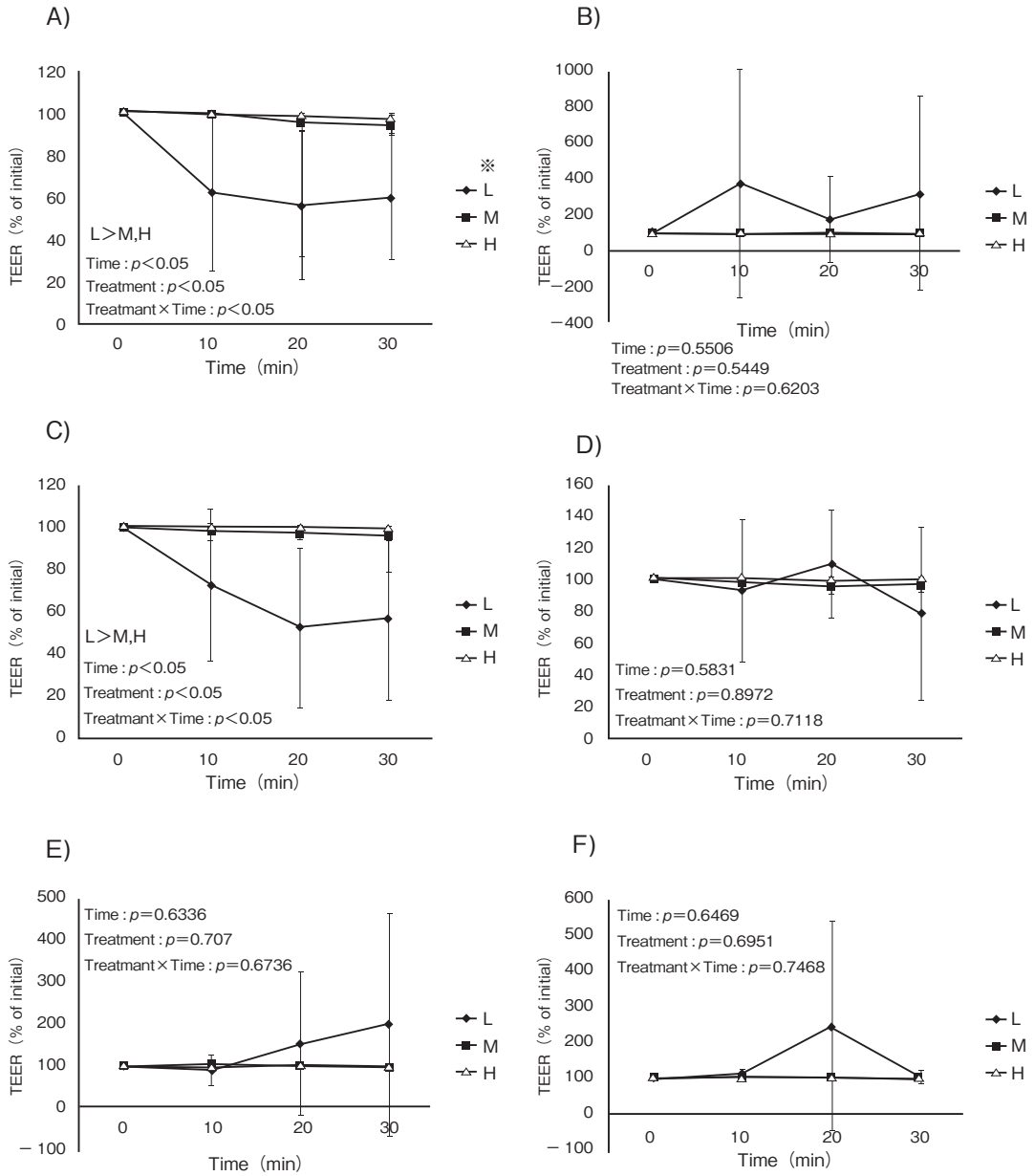

Fig. 2　The effect of lactose content in milk replacer on TEER in the gastrointestinal tracts.
（A）Duodenum,（B）Jejunum,（C）Ileum,（D）Caecum,（E）Proximal colon,（F）Distal colon
The values are expressed as relative values with the 0 min point as 100%.
Values are expressed as LSMEANS ± SEM（n = 5）.
Error bars indicate SEM for the Treatment × Time interaction.
※ L：Low lactose, M：Middle lactose, H：High lactose content in milk replacer.

おいて，乳糖含量割合の高いM区およびH区でLY透過性およびTEERの減少率が低かったことから，TJが強化された可能性が考えられる。腸管のTJを強化する因子の１つとして，腸管から分泌されるGLP-2がある。GLP-2は33のアミノ酸を持つプログルカゴン由来のペプチドで，主に回

© The Ito Foundation

腸末端と結腸近位部の腸管上皮に存在するL細胞により産生される[7]。GLP-2は，クリプト細胞の増殖や粘膜治癒の促進，腸管血流の増加，腸管バリア機能の改善および抗炎症作用を示すことが，いくつかの研究により示されている[7]。TJはクローディン，オクルディン，ZO-1，ZO-2およびF-アクチンなどのTJ関連タンパク質が集合して形成され[19]，GLP-2はクローディンおよびオクルディンの発現を増加させることが示されている[7,8]。腸管内腔から腸管細胞へのグルコースの吸収は，ナトリウム－グルコース共輸送体1（SGLT1）により行われ，SGLT1はGLP-2により発現が促進されることが知られている[22]。ヒツジ小腸を用いた過去の研究では，GLP-2を産生するL細胞には甘味受容体であるT1R2およびT1R3が発現しており，これら受容体が内腔単糖や人工甘味料に応答してGLP-2の分泌を促進すると言われている[22]。乳糖は小腸でラクターゼによりグルコースおよびガラクトースに分解されるため，M区およびH区では乳糖含量割合の増加により相対的にグルコース量が増加し，GLP-2の分泌量が増加したと考えられる。一方，大腸においては乳糖含量増加による透過性の減少は見られなかった。GLP-2の作用は単一のGLP-2受容体（GLP-2R）により媒介される。過去の研究でGLP-2RmRNAの発現はマウスでは胃から直腸まで検出され，特に空腸で多く[34]，ウシでは十二指腸，空腸，回腸および結腸で検出され，回腸において最大で，結腸において最小となることが示されている[28]。このことより，小腸におけるGLP-2Rの発現が多かったことから，小腸でのみ透過性の減少が見られたと考えられる。

TJを強化するもう一つの因子として乳酸菌量の増加が考えられる。乳酸菌はプロバイオティクスの一つであり，プロバイオティクス株が存在すると，細胞境界のタイトジャンクションタンパク質が増加することが示されている[9]。また，腸管粘膜表面に付着した乳酸菌は，病原菌の付着を抑制しムチンの分泌を促進するため，粘膜バリア機能を向上させ高分子の物質や毒素の透過性を低下させる[9]。過去の研究では，スキムミルク培地中の乳糖含量を高めると乳酸菌の成長と増殖が促進されることが示されており[35]，本実験でもM区およびH区で乳酸菌量が増加した可能性が考えられる。また，乳酸菌は代謝機能の特徴から，宿主の食事から得られる炭水化物を容易に利用できる

Table 3　Effect of lactose content in milk replacer on the hepatic mRNA expression related to growth and inflammation

	Treatment			
Items	L	M	H	*p*-value
IGF-1	1.10 ± 0.19	1.08 ± 0.19	0.95 ± 0.19	0.837
GHR	1.06 ± 0.11^{A}	0.60 ± 0.11^{B}	0.51 ± 0.11^{B}	0.007
GHR1A	1.51 ± 0.32	1.67 ± 0.32	1.12 ± 0.32	0.485
IL-1b	1.10 ± 0.14^{A}	0.26 ± 0.14^{B}	0.29 ± 0.14^{B}	0.002
TNF-α	1.18 ± 0.21^{A}	0.43 ± 0.21^{B}	0.47 ± 0.21^{B}	0.047
TLR-2	1.05 ± 0.11^{A}	0.26 ± 0.11^{B}	0.23 ± 0.11^{B}	0.0002
TLR-4	1.01 ± 0.1^{ab}	1.17 ± 0.1^{a}	0.83 ± 0.1^{b}	0.087

Values are expressed as LSMEANS ± SEM（n = 0.5）
AB : Means within a row with different letters differ（$p < 0.05$）
ab : Means within a row with different letters differ（$p < 0.1$）

© The Ito Foundation

十二指腸や空腸といった小腸近位部において優勢な細菌の一つであるため[30]，小腸でのみ透過性の減少が見られたと考えられる。

Ｌ区５頭の２－ΔΔCt値の平均値を１として，M区およびH区における相対的mRNA発現量を**Table 3** に示した。成長関連因子に関しては，GHRでＬ区と比較してM区およびH区で発現量が低かった（$p<0.05$，**Table 3**）。炎症関連因子に関しては，IL-1β，TNF-αおよびTLR-2においてＬ区と比較してM区およびH区で有意に低かった（$p<0.05$，**Table 3**）。TLR-4では，M区と比較してH区で有意に低かった（$p<0.1$，**Table 3**）。なお，IL-6は検出限界以下であった。

肝臓のmRNA発現に関して，炎症関連因子では，IL-1β，TNF-αおよびTLR-2においてＬ区と比較してM区およびH区で有意に低かった。これは，腸管透過性が抑制されたことで腸管から門脈を介して細菌や毒素などが肝臓に移行する量が減少し，肝臓での炎症関連因子の遺伝子発現が抑制されたと考えられる。生理的条件下でも，肝臓は門脈を通じて腸管由来の抗原に絶えず曝露され，自然免疫反応および適応免疫反応に影響を及ぼしている[27]。また，腸の炎症などによりリーキーガットが引き起こされ腸管バリアが崩壊すると，生きた細菌や細菌産物が消化管から門脈や全身循環に移行し，肝臓の免疫細胞を活性化することがある[27]。本試験では，M区およびH区においてTJが強化されたことで門脈を通って肝臓に到達する細菌などが減少したと考えられる。

TLRは，バクテリア，ウイルス，真菌および寄生虫を含む複数の病原体の認識分子である[24]。TLR-2は，グラム陽性菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸や結核菌の細胞壁成分であるリポアラビノマンナンなどさまざまな病原体を認識し，IL-6，IL-1βおよびTNF-αなどの炎症性サイトカインの転写を促進する[20]。また，過去の研究によりIL-1βで処理したラット肝細胞はTNF-αを分泌し，TNF-α mRNAがIL-1βにより特異的に誘導されることが示されている[33]。本試験では，M区およびH区において腸管のTJが強化されたことで，肝臓のTLR-2で認識される病原体が減少し，その結果IL-1βおよびTNF-αの転写量も減少したと考えられる。

一方，TLR-4はグラム陰性菌の細胞壁成分であるリポ多糖（LPS）を特異的に認識してTLR-2と同様にIL-6，IL-1βおよびTNF-αなどの炎症性サイトカインの転写を促進する[20]。本試験では，M区と比較してH区で有意に低かった。しかし，TLR-4以外の炎症関連因子はM区において発現が減少していたことから，腸管透過性亢進によって肝臓に到達したLPS量が増加したとは考えにくい。過去の研究では，胃や小腸の運動機能の低下により通過時間が長くなると，腸内細菌の過剰増殖が起こり，大腸の細菌が小腸に移動する状態になることが示されている[12]。M区ではなんらかの原因で代用乳の胃腸での滞留時間が長くなり，過剰増殖した腸内細菌由来のLPSにより肝臓でのTLR-4の発現が増加した可能性が考えられる。

成長関連因子ではGHRでＬ区と比較してM区およびH区で発現量が有意に低かった。４週齢に行った採血では，代用乳給与後30分，45分，60分および75分の血液中のグルコース濃度がM区およびH区と比較してＬ区で有意に高く[16]，また，LY透過性とTEERの結果より小腸ではＬ区で透過性が亢進していることから，Ｌ区において血流を介して肝臓に運搬されるグルコース量が増加した可能性が考えられる。豚の肝臓培養細胞を用いた過去の研究では，培養液中のグルコース濃度を上昇させると，肝臓におけるGHRのmRNA発現量が増加することが示されている[4]。IGF-1およびGHR1Aでは処理区間で有意な差は認められなかった。IGF-1およびGHR1AのmRNA発現量に

© The Ito Foundation

は正の相関が示されており[5]，若齢山羊を用いた過去の研究では，タンパク質制限飼料を与えるとIGF−1およびGHR1AのmRNA発現量が減少した[11]。また，ラットを用いた過去の研究では，血漿中IGF−1濃度は主に飼料中のタンパク質含有量に依存し，炭水化物含有量の影響は少なかったことが示されている[13]。このことより，代用乳中の乳糖含量の増加による肝臓における成長関連因子への影響は少ないことが示唆された。

以上の結果より，代用乳中の乳糖含量を増やすと小腸のTJが強化され腸管から門脈を介して毒素などの有害物質が肝臓に移行する量が抑制されたことが分かった。また，乳糖含量の増加は肝臓における成長関連因子への影響は少ないことが示唆された。

4．要　約

本研究では，代用乳中の乳糖含量の違い（H（高乳糖），M（中乳糖），L（低乳糖））が，腸管の透過性と肝臓における成長関連因子および炎症関連因子のmRNA発現量に及ぼす影響を評価した。その結果，乳糖含量を46％まで増加させても腸管透過性は上昇せず，むしろ小腸では減少した。また，透過性の減少により腸管から門脈を介して毒素などの有害物質が肝臓に移行する量が抑制されることで，肝臓での炎症関連因子の遺伝子発現が低下したことが示唆された。したがって，46％程度までの乳糖含量の増加は乳糖不耐症を引き起こす可能性が低いことが示された。

文　献

1） AOAC international，2000.
2） 安保佳一：反芻家畜の栄養の特異性，化学と生物，**17**，149〜158，1979.
3） Berends, H., van Laar, H., Leal, L. N., Gerrits, W. J. J., Martín-Tereso, J.：Effects of exchanging lactose for fat in milk replacer on ad libitum feed intake and growth performance in dairy calves, *J Dairy Sci*, 103(5)，4275〜4287，2020　May.
4） Brameld, J. M., Gilmour, R. S., Buttery, P. J.：Glucose and amino acids interact with hormones to control expression of insulin-like growth factor-I and growth hormone receptor mRNA in cultured pig hepatocytes, *J Nutr*, 129(7)，1298〜306，1999 Jul.
5） Butler, S. T., Marr, A. L., Pelton, S. H., Radcliff, R. P., Lucy, M. C., Butler, W. R.：Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A, *J Endocrinol*, 176(2)，205〜217，2003　Feb.
6） Cederlund, A., Kai-Larsen, Y., Printz, G., Yoshio, H., Alvelius, G., Lagercrantz, H., Strömberg, R., Jörnvall, H., Gudmundsson, G. H., Agerberth, B.：Lactose in human breast milk an inducer of innate immunity with implications for a role in intestinal homeostasis, *PLoS One*, 8(1)，e53876，2013.
7） Deng, G., Lei, Q., Gao, X., Zhang, Y., Zheng, H., Bi, J., Wang, X.：Glucagon-Like Peptide-2 Modulates Enteric Paneth Cells Immune Response and Alleviates Gut Inflammation During Intravenous Fluid Infusion in Mice With a Central Catheter, *Front Nutr*, 3；8, 688715, 2021 Sep.
8） Dong, C. X., Zhao, W., Solomon, C., Rowland, K. J., Ackerley, C., Robine, S., Holzenberger, M., Gonska, T., Brubaker, P. L.：The intestinal epithelial insulin-like growth factor-1 receptor links glucagon-like peptide-2 action to gut barrier function, *Endocrinology*,；155(2)，370〜9，2014　Feb.
9） Drozdowski, L., Thomson, A. B.：Intestinal hormones and growth factors: effects on the small intestine, *World J Gastroenterol*，28；15(4)，385〜406，2009　Jan.
10） Echeverry-Munera, J., Leal, L. N., Wilms, J. N., Berends, H., Costa, J. H. C., Steele, M., Martín-Tereso, J.：Effect of partial exchange of lactose with fat in milk replacer on ad libitum feed intake and performance in dairy calves, *J Dairy Sc*, 104(5)，5432〜5444，2021　May.
11） Firmenich, C. S., Schnepel, N., Hansen, K., Schmicke, M., Muscher-Banse, A. S.：Modulation of growth hormone receptor-insulin-like growth factor 1 axis by dietary protein in young ruminants, *Br J Nutr*, 28；123(6)，652〜663，2020 Mar.
12） Fukui, H.：Leaky Gut and Gut-Liver Axis in Liver Cirrhosis: Clinical Studies Update, *Gut Liver*，15；15（5），666〜676，2021　Sep.
13） Gehring, J., Azzout-Marniche, D., Chaumontet, C., Piedcoq, J., Gaudichon, C., Even, P. C.：Protein-carbohydrate interaction effects on energy balance, FGF21, IGF-1, and hypothalamic gene expression

© The Ito Foundation

in rats, *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 1；321(5), E621-E635, 2021 Nov.
14) Gondaira, S., Higuchi, H., Iwano, H., Nishi, K., Nebu, T., Nakajima, K., Nagahata, H.：Innate immune response of bovine mammary epithelial cells to Mycoplasma bovis, *J Vet Sci*, 1；19(1), 79～87, 2018 Jan.
15) Haisan, J., Oba, M., Ambrose, D. J., Steele, M. A.：Short communication: The effects of offering a high or low plane of milk preweaning on insulin-like growth factor and insulin-like growth factor binding proteins in dairy heifer calves, *J Dairy Sci*, 101(12), 11441～11446, 2018 Dec.
16) 廣瀬美紀：代用乳中の乳糖含量の違いが乳用子牛の発育，消化管および血液性状に及ぼす影響，酪農学園大学2022年度卒業論文.
17) IDF STANDARD 108A, 1986.
18) 家畜感染症学会：新しい子牛の科学，緑書房，p. 128, 2021.
19) Lee, B., Moon, K. M., Kim, C. Y.：Tight Junction in the Intestinal Epithelium: Its Association with Diseases and Regulation by Phytochemicals, *J Immunol Res*, 16；2018, 2645465, 2018 Dec.
20) Li, J., Lee, D. S., Madrenas, J.：Evolving Bacterial Envelopes and Plasticity of TLR2-Dependent Responses: Basic Research and Translational Opportunities, *Front Immunol*, 28；4, 347, 2013 Oct.
21) Mineo, H., Hara, H., Shigematsu, N., Okuhara, Y., Tomita, F.：Melibiose, difructose anhydride III and difructose anhydride IV enhance net calcium absorption in rat small and large intestinal epithelium by increasing the passage of tight junctions in vitro, *J Nutr*, 132(11), 3394～3399, 2002 Nov.
22) Moran, A. W., Al-Rammahi, M., Zhang, C., Bravo, D., Calsamiglia, S., Shirazi-Beechey, S. P.：Sweet taste receptor expression in ruminant intestine and its activation by artificial sweeteners to regulate glucose absorption, *J Dairy Sci*, 97(8), 4955～72, 2014.
23) Nishi K., Gondaira, S., Okamoto, M., Watanabe, R., Hirano, Y., Fujiki, J., Iwano, H., Higuchi, H.：Mycoplasma bovis induces matrix metalloproteinase-3 expression in bovine synovial cells via up-regulation of interleukin-1 β expression in mononuclear cells, *Vet Immunol Immunopathol*, 227, 110057, 2020 Sep.
24) Oliveira-Nascimento, L., Massari, P., Wetzler, L. M.：The Role of TLR2 in Infection and Immunity, *Front Immunol*, 18；3 79, 2012 Apr.
25) 佐藤瞳：カーフスターターのデンプン含量の違いによる乳用子牛の発育の評価，酪農学園大学2021年度卒業論文.
26) Schäff, C. T., Gruse, J., Maciej, J., Mielenz, M., Wirthgen, E., Hoeflich, A., Schmicke, M., Pfuhl, R., Jawor, P., Stefaniak, T., Hammon, H. M.：Effects of Feeding Milk Replacer Ad Libitum or in Restricted Amounts for the First Five Weeks of Life on the Growth, Metabolic Adaptation, and Immune Status of Newborn Calves, *PLoS One*, 30；11(12), e0168974, 2016 Dec.
27) Taniki, N., Nakamoto, N., Chu, P. S., Mikami, Y., Amiya, T., Teratani, T., Suzuki, T., Tsukimi, T., Fukuda, S., Yamaguchi, A., Shiba, S., Miyake, R., Katayama, T., Ebinuma, H., Kanai, T.：Intestinal barrier regulates immune responses in the liver via IL-10-producing macrophages, *JCI Insight*, 21；3(12), e91980, 2018 Jun.
28) Taylor-Edwards, C. C., Burrin, D. G., Holst, J. J., McLeod, K.R., Harmon, D. L.：Glucagon-like peptide-2 (GLP-2) increases small intestinal blood flow and mucosal growth in ruminating calves, *J Dairy Sci*, 94(2), 888～898, 2011 Feb.
29) Urashima, T., Saito, T.：Why is Lactose a Dominant Saccharide in Milk?, *Journal of Applied Glycoscience*, Volume 52 Issue 1 Pages 65-70, 2005.
30) Vélez, M. P., De Keersmaecker, S. C., Vanderleyden, J.：Adherence factors of Lactobacillus in the human gastrointestinal tract, *FEMS Microbiol Lett*, 276(2), 140～148, 2007 Nov.
31) Wilms, J., Berends, H., Martín-Tereso, J.：Hypertonic milk replacers increase gastrointestinal permeability in healthy dairy calves, *J Dairy Sci*, 102(2), 1237-1246, 2019 Feb.
32) Witte, S., Brockelmann, Y., Haeger, J. D., Schmicke, M.：Establishing a model of primary bovine hepatocytes with responsive growth hormone receptor expression, *J Dairy Sci*, 102(8), 7522～7535, 2019 Aug.
33) Won, S. M., Park, E., Jeong, J. J., Ganesan, R., Gupta, H., Gebru, Y. A., Sharma, S., Kim, D. J., Suk, K. T.：The Gut Microbiota-Derived Immune Response in Chronic Liver Disease, *Int J Mol Sci*, 2；22(15), 8309, 2021 Aug.
34) Yusta, B., Matthews, D., Koehler, J. A., Pujadas, G., Kaur, K. D., Drucker, D. J.：Localization of Glucagon-Like Peptide-2 Receptor Expression in the Mouse, *Endocrinology*, 1；160(8), 1950～1963, 2019 Aug.
35) Zang, J., Wang, T., Piotr, D., Zhao, H., Zhang, B.：Increasing lactose concentration is a strategy to improve the proliferation of Lactobacillushelveticus in milk, *Food Sci Nutr*, 19；9(2), 1050～1060, 2020 Dec.

© The Ito Foundation

暖地型牧草・芝草におけるゲノム編集による冬期常緑性新規育種素材の開発

Development of new breeding materials for winter evergreen by genome editing in warm-season forage and turf grasses

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)

The objective of this study is to develop highly nutritious evergreen breeding materials through genome editing by targeting chlorophyll-degrading genes in bahiagrass (*Paspalum notatum*) for forage grasses and *Zoysia matrella* for turf grasses. We conducted genome editing of the *NYC1* gene in *Zoysia matrella* prior to pasture research, and succeeded in producing genome-edited plants in which all target loci of the A and B alleles were mutated. The *NYC1* knockout plants showed suppressed chlorophyll degradation, and this result was expected to lead to research for application to forage grasses. In pasture bahiagrass, the *SGR* gene was isolated and its expression increased with leaf senescence, and chlorophyll content decreased as its degradation progressed. Therefore, the *SGR* gene isolated in this study is deeply involved in leaf senescence and chlorophyll degradation in bahiagrass plants. In the next step, genome editing of the bahiagrass *SGR* gene will be conducted, and new breeding material can be developed for *Zoysia* grasses through evaluation of the trait under actual winter conditions and removal of the transgenes.

1．目　　的

暖地型イネ科牧草・芝草は，夏期の飼料生産が主で，その生産性は高いものの，冬期は葉が枯れ休眠するため，生産が望めないことが一般的である。通常，暖地型イネ科牧草は，６月から９月に生産のピークを迎え，その後，一気に栄養価が低下するが，冬期においても長期間緑度を維持することができれば，高品質の粗飼料を家畜に給与することが可能となり，家畜の効率的な生産向上につながる。

植物の老化は，葉のクロロフィル分解と大きく関係しており，日長，低温および乾燥などの環境ストレスによりクロロフィル分解遺伝子が発現し，それにより葉が黄化し枯れていく。クロロフィル分解遺伝子は，イネやシロイヌナズナなどのモデル植物を中心にその機能性が解析されている[1)]。イネ科では，*SGR*および*NYC1*遺伝子が知られており，これらの遺伝子をノックアウトした変異体は，登熟期においてもクロロフィルの分解が進まないため葉の老化が認められず，緑度を維持するステイグリーンの形質を示すことが実証さ

© The Ito Foundation

れている[2, 3]。また，これらの遺伝子発現の制御は，植物の乾燥ストレス耐性を向上することも報告されており[4]，飼料成分についてもペレニアルライグラスでは，刈取り後の植物のクロロフィル分解を抑えることでタンパク質含量が減少せず，結果的に乾草においても高い栄養価を維持していた[5]。このようにクロロフィル分解遺伝子の制御は，牧草の生産性を増加するだけでなく，その品質も向上するため，家畜生産性の飛躍的な増進につながるものと期待される。

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，本技術により実用化を見据えた牧草の品種開発が現実のものとなっている。

著者は，本研究助成（R02-03）において，バヒアグラス（*Paspalum notatum*）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獲得している。本ゲノム編集個体は，消化性も向上しており，現在，導入ベクターの除去および*CAD*変異遺伝子座のホモ化を行い，品種育成を進めている。本研究では，クロロフィル分解遺伝子に着目し，芝草では，牧草研究に先立ち，ゲノム情報が整備されたコウシュンシバ（*Zoysia matrella*）を用い[6]，*NYC1*遺伝子のゲノム編集とクロロフィル分解の検証を行った。牧草では，バヒアグラスより*SGR*遺伝子を単離し，その塩基配列を決定するとともに，牧草の葉の老化に伴う*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル分解との関係について明らかとした。

２．方　　法

＜コウシュンシバ*NYC1*遺伝子のゲノム編集＞

2.1　ゲノム編集ベクターの構築

コウシュンシバ*NYC1*遺伝子の塩基配列は，かずさDNA研究所が公開するZoysia Genome Database（http://zoysia.kazusa.or.jp/blast.html）より検索した。ゲノム編集で標的となるガイドRNAは，入手した*NYC1*遺伝子の塩基配列より設計し，PAM配列（NGG）の手前に制限酵素サイトを有する配列を公開ソフトウェアCRISPRDB（https://crisprdb.org/index.html）およびRNAfold WebServer（http://rna.tbi.univie.ac.at//cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi）より選定した。なお，コウシュンシバのゲノム構成は，異質４倍体（$2n=4x=40$）であり，２対の対立遺伝子（Ａアリルおよびｂアリル）を持っているため，共通の配列部位でガイドRNAを設計した。設定したガイドRNAは，*Hha*Ⅰ制限酵素サイトを含む5’-TCGCGCACCTCTCCGTCCAC-3’の20bpであり，この配列をゲノム編集ベクター（pZH_gYSA_PubiMMCas9，農研機構生物機能利用研究部門より譲渡）に挿入し，導入ベクターとして用いた。

2.2　形質転換およびゲノム編集個体の選抜

形質転換に用いるコウシュンシバ品種「わかば」のエンブリオジェニックカルスは，腋芽成長点より誘導され，２mgL^{-1} 2,4-Ｄ，0.1mgL^{-1} BAP，５μM $CuSO_4$および0.3％ゲランガムを添加したMS固形培地（DBCL培地）で継代培養して

© The Ito Foundation

いるものである。また，形質転換は，本研究室で確立したアグロバクテリウム法を用いて行い[7]，ハイグロマイシン（Hm）により形質転換体を選抜した。

形質転換カルスにおける標的配列の変異は，PCR/RE解析により評価した。すなわち，カルスよりDNAを抽出した後，標的配列を含むDNA領域でPCRを行い，変異が挿入される配列に位置する制限酵素（*Hha* I）で処理した後，バンドパターンの違いにより，変異の有無を確認した。変異が認められたカルス系統より再分化させた植物体は，土に順化した後，同じくPCR/RE解析を行い，PCR産物をExoSAP-IT処理後，ダイレクトシークエンスを行い，ICE CRISPR Analysis Tool（https://www.synthego.com/products/bioinformatics/crispr-analysis）を用いて，波形データより変異インデルを解析した。

2.3　クロロフィル含量の分析

ゲノム編集個体は，28℃，明所（16時間）／暗所（８時間）の条件下でインキュベーター内で栽培し，クロロフィル含量の分析にはその第２葉の展開葉を用いた。サンプリングは，葉身２cmを切取り，蒸留水を含むキッチンペーパで挟み，ジッパー付きビニール袋に入れて，28℃，暗所に静置し，クロロフィルの分解を促した。クロロフィル含量の分析は，暗処理０日目と８日目の葉より，アセトン抽出法によりクロロフィルを抽出し，葉の新鮮重当たりの含量を換算した。

＜バヒアグラス*SGR*遺伝子の単離とその発現解析＞

2.4　*SGR*遺伝子の単離

供試材料は，バヒアグラス品種「ペンサコラ」を用い，播種後14日目の葉より，全RNAを抽出した。全RNAは，SMARTer®RACE 5’ /3’ Kit（Takara）に従い，cDNAを合成し，同じC4植物のソルガム，トウモロコシ，スイッチグラス，シバ，シーショアパスパラムの*SGR*遺伝子で保存されている塩基配列をもとにプライマーを設計し，３’側配列をもとに５’側配列を獲得した。

2.5　葉の老化に伴う*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル含量の分析

葉の老化は，温室で育成中のバヒアグラスの葉身を刈取り，蒸留水を含むキッチンペーパで挟み，ジッパー付きビニール袋に入れて，28℃，明所および暗所に静置し，０，３および６日目の葉の黄化部位の長さを測定した。*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル含量は，上記と同様に０，３および６日目の葉をサンプリングし，*SGR*遺伝子の発現では，全RNAを抽出し，cDNAを合成した後，リアムタイムPCRを行った。クロロフィル含量は，アセトン抽出法により行った。

３．結果と考察

＜コウシュンシバ*NYC1*遺伝子のゲノム編集＞

3.1　ゲノム編集個体の獲得および標的配列の変異

コウシュンシバの形質転換は，アグロバクテリウム法により行い，合計441個のカルスを供試したところ，22個の形質転換カルスが得られた（形質転換効率は5.0％）。また，これらのカルス系統についてPCR/RE解析を行った結果，18系統で変異の挿入を示すバンドが認められ，そのうち10系統でシーケンス解析においても標的配列の変異が確認された。最終的なゲノム編集効率は，45％（10/22）と高いものの，このことはコウシュンシバが４倍体のため４つの標的遺伝子座が存在するためであり，２つの遺伝子座に換算すると，他の２倍体のイネやトマト等の植物に比べ[8]，同等の効率であった。これらの形質転換カルスは，植物体を再生させ，土へと順化した。

Table 1 は，順化した個体について，標的配列のダイレクトシークエンスを行い，ICE CRISPR

© The Ito Foundation

Table 1　Summary of mutations at target *NYC1* loci in genome-editied plants.

Line	Plant	A allele		B allele	
		Mutation type[1]	Indel（%）[2]	Mutation type[1]	Indel（%）[2]
1	1	B	−1（78）/1（13）	H	−1（99）
	2	C	−4（22）/−4（24）/−1（45）	M	0（61）/1（33）
	3	B	−2（14）/−1（85）	B	−1（89）/2（10）
3	1	M	−1（10）/0（89）	M	0（56）/1（39）
	2	M	−1（42）/0（55）	M	−1（16）/0（73）
	3	WT	0（99）	H	−2（87）
5	1	H	−7（92）	H	1（99）
	2	C	−2（53）/−1（17）/0（21）	H	1（96）
	3	H	−1（99）	H	2（80）
6	1	WT	0（99）	H	1（99）
	2	M	−2（16）/0（82）	H	1（98）
	3	M	−2（40）/0（49）	H	1（98）
8	1	M	−1（35）/0（62）	M	−1（10）/0（79）
	2	C	−2（48）/−1（14）/0（16）/1（17）	C	−2（22）/−1（33）/1（34）
	3	M	0（59）/1（19）	C	−1（40）/0（38）/1（13）
10	1	M	−2（29）/0（59）	H	1（98）
	2	H	−2（99）	B	−1（49）/1（45）
	3	M	−1（32）/0（65）	H	1（98）
11	1	M	−2（25）/0（70）	B	1（86）/3（11）
	2	WT	0（92）	H	1（99）
	3	WT	0（91）	H	1（98）
16	1	B	−3（67）/−2（11）	H	1（95）
	2	C	−3（19）/−3（29）/0（42）	H	1（96）
	3	H	−1（97）	H	1（99）
19	1	H	−1（99）	H	−1（94）
	2	C	−3（10）/−3（12）/−1（74）	H	−8（100）
	3	H	−3（90）	H	−8（100）
20	1	M	−2（30）/0（53）	H	1（99）
	2	M	−1（24）/0（74）	H	1（98）
	3	M	−2（24）/0（63）	H	1（98）

[1] The mutation type of each allele is shown as follows. WT : Wild Type ; B : Biallelic mutation ; M : Monoallelic mutation ; C : Chimeric mutation ; H : Homoallelic mutation.

[2] Indels indicate − ; deletion, + ; insertion and the number of nucleotides.

Analysis Toolにより変異インデルを個体ごとにまとめたものである。Aアレル，Bアレルそれぞれ別々のプライマーを用いて解析を行い，変異インデルを確認したところ，順化個体すべてに標的配列の変異が認められ，そのほとんどが１または２塩基の挿入・欠失であった。また，それぞれのアリルで３または４種類のインデルが認められるキメラ変異も認められた。両アリルにバイアレリック（表中の変異タイプB）もしくはホモプラスミック（表中の変異タイプH）な変異が認められ，すべての遺伝子座で変異が挿入された個体（遺伝子型aabb）は，合計10個体得られた。

© The Ito Foundation

3.2　ゲノム編集個体における*NYC1*遺伝子のノックアウトとクロロフィル分解

Fig. 1 は，ゲノム編集個体の葉における暗処理０日後と８日後のクロロフィル含量をまとめたものである。ゲノム編集個体は，それぞれのアリルの標的遺伝子座の遺伝子型別にまとめ，それぞれの平均値を野生型と比較し，有意差を判定した。野生型では，暗処理８日後のクロロフィル含量は０日後に比べ，著しく低下し，葉が黄変した。暗処理８日後のゲノム編集個体のクロロフィル含量は，すべての変異遺伝子型タイプにおいて，野生型に比べ有意に高い値であった。特に，すべての遺伝子座が変異した遺伝子型aabbタイプは，暗処理８日後においても葉の黄化が認められず，クロロフィル含量は暗処理０日後の2/3程度も保持していた。この結果は，これまでのイネやシロイヌナズナの*NYC1*変異体の報告と同様であり[2,3,9]，コウシュンシバの*NYC1*遺伝子をノックアウトすることでクロロフィル分解が抑制され，緑度を保持できることが明らかとなった。

＜バヒアグラス*SGR*遺伝子の単離とその発現解析＞

3.3　*SGR*遺伝子の塩基配列の決定

単離したバヒアグラスの*SGR*遺伝子の塩基配列は，全長が858bpで286のアミノ酸をコードしており，そのアミノ酸配列は他のC4植物と高い相同性を示していた（**Fig. 2**）.

3.4　葉の老化に伴う*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル分解

Fig. 3 は，刈取り後の葉の老化と*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル含量についてまとめたものである。老化により黄変した葉の長さは，刈取り後日数が経過するにつれて高くなり，暗所条件でより顕著にその効果が認められた。葉の老化に伴い，*SGR*遺伝子の発現量も増加し，クロロフィルの分解が進んだことでその含量は減少した。このことから，本実験で単離した*SGR*遺伝子は，葉の老化とクロロフィル分解に深く関与しており，栽培後期や冬期の葉の老化や刈取りに伴うクロロフィル分解を抑制することで，栄養価の高い飼料を開発することが期待される。

以上のことから，コウシュンシバにおいて*NYC1*遺伝子のゲノム編集を行い，標的遺伝子をノックアウトした個体ではクロロフィルの分解が抑制されたことを検証した。さらに，牧草のバヒアグラスより*SGR*遺伝子を単離し，牧草の葉の老化に伴う*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル分解との関係について明らかとした。今後は，バヒアグラス*SGR*遺伝子のゲノム編集を進めるとともに，シバについてもゲノム編集個体の冬期の緑度維持やクロロフィル分解および栄養価についても牧草研究に先行して実施していきたい。

4．要　　約

本研究は，クロロフィル分解遺伝子を標的として，牧草ではバヒアグラスを，芝草ではコウシュンシバを用いて，ゲノム編集を行い，冬期においても長期間緑度を維持することができ，栄養価の高い常緑性育種素材を開発することを目的とする。今年度，コウシュンシバでは，牧草研究に先立ち*NYC1*遺伝子のゲノム編集を行い，Ａ，Ｂアレルのすべての標的遺伝子座が変異したゲノム編集個体の作出に成功した。この*NYC1*遺伝子がノックアウトされた個体ではクロロフィルの分解が抑制されており，この結果は牧草への応用研究につながるものと期待された。牧草のバヒアグラスでは，*SGR*遺伝子を単離し，牧草の葉の老化に伴う*SGR*遺伝子の発現およびクロロフィル分解との関係について明らかとした。今後は，バヒアグラス*SGR*遺伝子のゲノム編集を進めるとともに，シバについても実際の冬期条件下での形質評価や導入ベクターを除去することで，新しい育

© The Ito Foundation

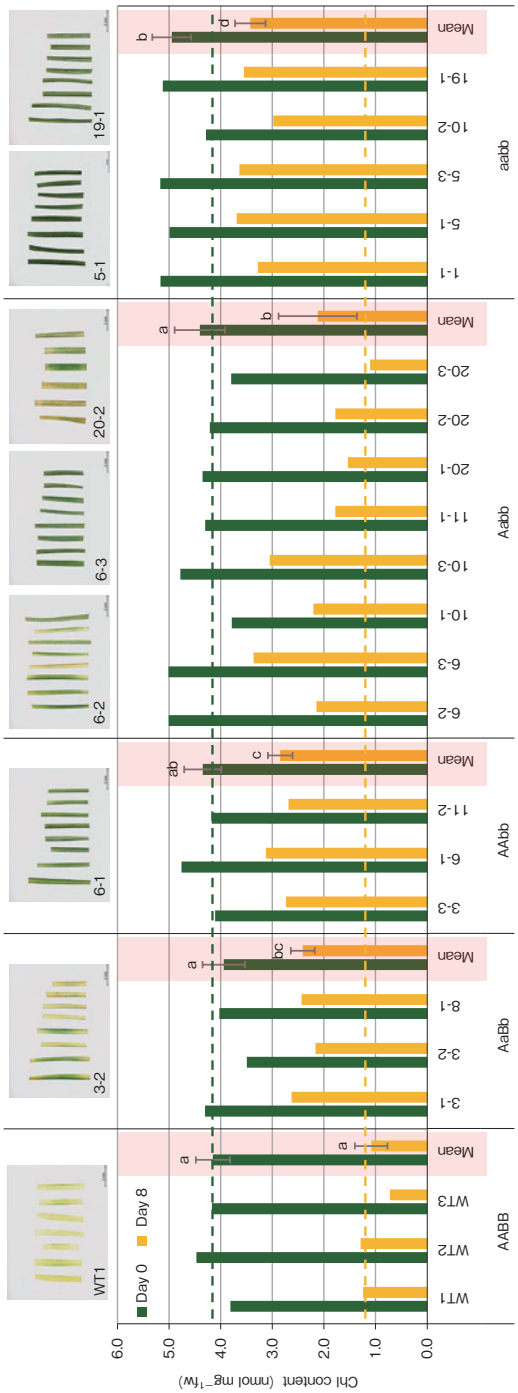

Fig. 1　Chlorophyll content at 0 and 8 days of dark treatment and leaves collar at 8 days of dark treatment for each genotype of target *NYC1* loci in genome-edited plants.
The chlorophyll content is shown for each genotype of genome-edited plants at day 0 and day 8 of dark treatment. The dotted lines indicate the average chlorophyll content of the wild type on dark treatment day 0 and day 8, respectively. Photo is representative of genome-edited plants of each genotype on day 8 of dark treatment. Means shows the averages for each genotype type, letters represent a significant difference on each dark treatment days by Tukey's test.

© The Ito Foundation

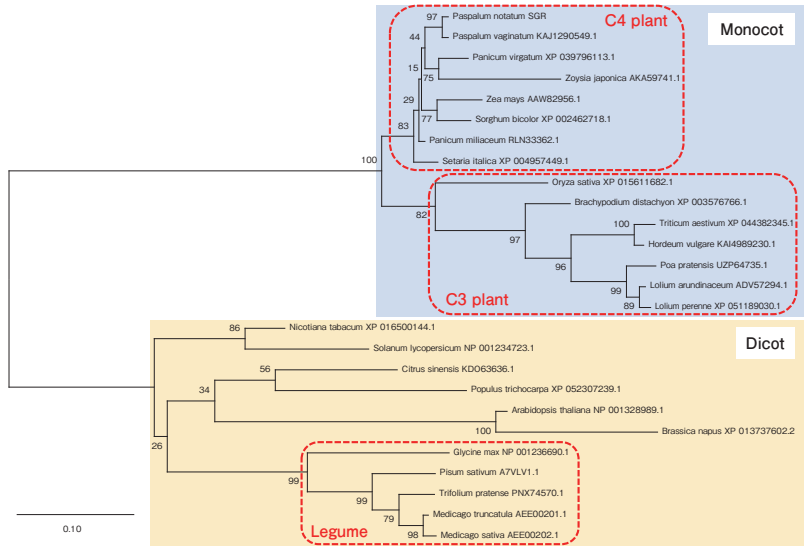

Fig. 2　Phylogenetic tree of SGR proteins in higher plants.
A phylogenetic tree of the deduced amino acid sequences was created by the neighbor-joining method. Numbers at nodes correspond to 1,000 bootstrap replications. The top of the tree list is indicated bahiagrass (*Paspalum notatum*) *SGR* proteins isolated in this study.

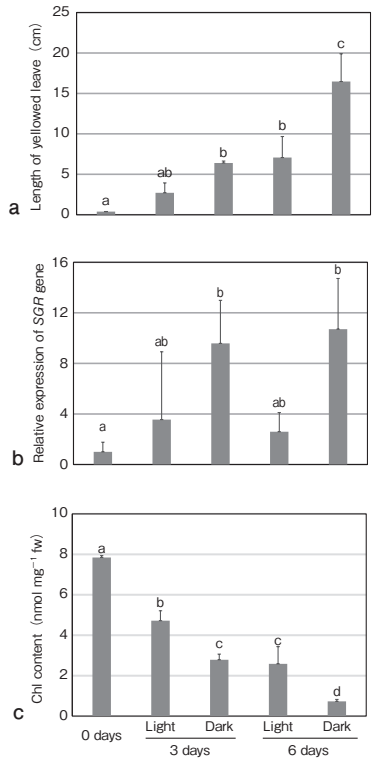

Fig. 3　Relationship between *SGR* gene expression and chlorophyll degradation during leaf senescence.
Leaf yellowing (a), *SGR* gene expression (b) and chlorophyll content (c) at 3 and 6 days after harvest in light/dark conditions.

© The Ito Foundation

種素材が開発できる。

文　献

1） Jiao, B., Meng, Q., Lv, W.：*Botanical Studies*, **61**, Article No.25, 2020.

2） Jiang, H., Li, M., Liang, N., Yan, H., Wei, Y., Xu, X., Liu, J., Xu, Z., Chen, F., Wu, G.：*The Plant Journal*, **52**, 197～209, 2007.

3） Sato, Y., Morita, R., Katsuma, S., Nishimura, M., Tanaka, A., Kusaba, M.：*The Plant Journal*, **57**, 120～131, 2009.

4） Ramkumar, M. K., Kumar, S. S., Gaikwad, K., Pandey, R., Chinnusamy, V., Singh, N. K., Singh, A. K., Mohapatra, T., Sevanthi, A. M.：*Plants*, **8**, Article No.375, 2019.

5） Xu, B., Yu, G., Li, H., Xie, Z., Wen, W., Zhang, J., Huang, B.：*Plant and Cell Physiology*, **60**, 202～212, 2019.

6） Tanaka, H., Hirakawa, H., Kosugi, S., Nakayama, S., Gondo, T., *et al.*：*DNA Research*, **23**, 171～180, 2016.

7） Ng, H. M., Gondo, T., Ushiyama, M., Cho, S., Maemura, S., Hashiguchi, M., Tanaka, H., Akashi, R：*Grassland Science*, **69**, 152～161, 2023.

8） Scott M. Schaeffer, Paul A. N.：*Plant Science*, **240**, 130～142, 2015.

9） Sato, T., Shimoda, Y., Matsuda, K., Tanaka, A., Ito, H.：*Journal of Plant Physiology*, **222**, 94～102, 2018.

© The Ito Foundation

南九州における暖地型牧草の新規調製“霜熟”の開発 ―晩夏播きパールミレット霜枯れ草の収量，サイレージ品質と選好性―

Frost-matured silage-processing of tropical grasses in southern Kyushu ―Yield, silage quality and preference of late-summer sown pearl millet foggage―

石井　康之・石垣　元気・井戸田　幸子
（宮崎大学農学部）

Yasuyuki Ishii, Genki Ishigaki and Sachiko Idota
（Faculty of Agriculture, University of Miyazaki）

Pearl millet（*Pennisetum typhoides*）is the high dry matter（DM）yielder with high moisture, which prohibits the silage processing and reduce cultivation areas of the genotype. Late-heading cultivar “Natsu-Italian” heads two months after sowing, even when the grass is sown in late-summer September. We examined the growth, DM yields in early December and decline in DM percentage with frosts in two years, and processed round-bale silages to determine silage quality and preference of the silage by breeding beef cows. Pearl millet was sown at 1.5 and 1.75 g/m^2 with non-till seeder in Miyazaki University on 1 September, 2021 and on 14 September, 2022, respectively. Plant height reached 200 cm and 160 cm, and heading tiller percentage, 70% and 60% in 2021 and 2022, respectively at the first frost which fell on 2 and 7 December, 2021 and 2022, respectively. The DM percentage increased rapidly in leaves and heads, followed by stems with frosts to reach over than 40% one month after the first frost in two years. Plant DM percentage was positively correlated at 1 % level with cumulative frosting temperature（critical base temperature ＜ 2.2 ℃）. With frosts, *in vitro* DM digestibility（IVDMD）declined, and acid detergent fiber（ADF）content increased, which showed negative correlation between these two characters. Animal preference tended to reduce the difference between pearl millet silage and Italian ryegrass hay under the repeated cafeteria feeding experiment. Silage quality of pearl millet foggage was examined to show moderately weak acidity at pH 5.0, lactic acid content at 1.1-2.8 % Fresh matter（FM）, acetic acid content at 0.06-0.18% FM and no butyric acid content, estimating as “excellent” and “good” with Flieg’s score and V-Score, respectively. Therefore, late-summer sown pearl millet can be processed to low-moisture round bale silage one month after the first frost in January, the following year.

Keywords：Dry matter yield, Foggage, Late-summer sowing, Pearl millet, Preference, Silage quality.

© The Ito Foundation

１．目　　的

世界的な食料供給の逼迫，飼料穀物価格の高騰および円安の進行に伴い濃厚飼料価格の高騰を招いており，地域にあった良質自給粗飼料生産[1)]に対する需要が急速に高まっている。全球レベルで進行する気象変動・地球温暖化に対抗し，飼料作物を安定的に栽培するには，南九州等の暖地では台風害に遭いにくい暖地型牧草の活用が必須である[2)]。南九州では晩夏播きのイモチ病耐性イタリアンライグラス（*Lolium multiflorum*）品種も育成されているが，年内草の収量性は限定的である[1)]。そこで盛夏期間の台風・豪雨による気象災害によるトウモロコシの倒伏あるいは虫害の発生による収量減[3)]があった場合，晩夏播きでその収量を補いうる良質でサイレージ調製可能な粗飼料の栽培・調製体系の確立が求められている。青刈作物パールミレット（*Pennisetum typhoides*）は台風で倒伏せず３か月間で乾物収量１t/10 a以上をあげる多収草種であるが，多汁質で含水率が高く，サイレージ調製には不適であるため，その栽培は青刈給与の少数頭飼育の繁殖牛生産者に限定されている。一方，極晩生パールミレット品種「夏イタリアン」は，季節生産性を受けにくいため，先行研究により，南九州で９月上旬に播種しても出穂開始が11月になり，十分な栄養成長期間と収量性を確保できることが明らかとなった[4)]。かつてロールベールサイレージ調製が導入される以前の1980年代までは，霜枯れ草の利用としては，九州地域でソルガムの２－３番草を降霜に遭わせて圃場に立毛貯蔵し，越冬期間に徐々に刈り取って繁殖母牛への自給粗飼料として給与する体系が採られていたが，パールミレットへの適用はまだ試みられていない。そこで本研究では，大規模圃場試験により晩夏播きパールミレットを栽培し，降霜後のロールベールサイレージ調製，貯蔵約３か月後以降に開封したサイレージの発酵品質および給与した黒毛和種繁殖牛に対する選好性を明らかにすることを目的とした。

２．方　　法

2.1　晩夏播きパールミレット飼料畑における定着，生育状況，降霜に伴う含水率低下および収量性の調査

宮崎大学農学部附属住吉フィールド飼料畑（１筆５ha，１片450m）において，パールミレット「夏イタリアン（カネコ種苗）」を供試し，2021年では９月１日に不耕起播種機により畦間26cmで1800m^{2}に1.75g/m^{2}にて播種した。2022年では９月６日にロータリ耕し，９月10日に１区270m^{2}で３区を設け，畦間50cm，1.5g/m^{2}にて条播し，９月14日に2880m^{2}に不耕起播種機で1.5g/m^{2}にて播種した。定着後に化成肥料（N，P_2O_5，K_2Oの成分量で）５g/m^{2}を施用した。播種後１か月ごとに草丈，茎数，出穂茎数と乾物重を測定し，2021年では12月２日，2022年では12月７日の初霜後，１週間ごとに部位別の生体重と乾物重の測定と乾物率の変化を求め，１か月後の2022年１月４日，2023年１月５日にディスクモアで刈取り，乾物収量を調査した。2022年では，初霜後の日最低気温の変化をおんどとり（株式会社ティアンドデイ）で測定した。

2.2　霜枯れ草パールミレットの植物体器官別の飼料品質および発酵品質の調査

収穫時の霜枯れ草をロールベールサイレージ調製するとともに，霜枯れ期間に１週間ごとに採取した植物体試料から，30 l プラスチックサイロにより実験室規模サイレージを調製し，ともに発酵品質を調査した。霜枯れ過程の飼料品質として，*in vitro* 乾物消化率（IVDMD）および酸性デタージェント繊維（ADF）含量を測定した。ロールベールサイレージ開封時では，明るい色調で酢

© The Ito Foundation

酸型の発酵臭を示した。

2.3 霜枯れ草パールミレットサイレージの繁殖母牛に対する選好性の調査

3か月間貯蔵後の霜枯れパールミレットロールベールサイレージの選好性を，2022年4月20日および4月26日に，繁殖黒毛和種雌成牛3頭を3連で3回にわたり，イタリアンライグラス乾草およびアマランサス（*Amaranthus caudatus*）サイレージと比較した。

3．結果と考察

2021年，2022年ともに出穂開始は11月上旬以降であったため，草高は2021年では約200cm，2022年では約160cmとなり，初霜時の出穂茎比率は，それぞれ約70%，約60%に達した。降霜後の乾物率の上昇は，葉身，穂で急速に進み（**Fig. 1**），2022年では降霜温度積算値との間に正の相関が成り立った（**Fig. 2**）。乾物収量は2022年では580～680g/m^{2}で，両年ともにロールベールにより，2021年では生重600kg（ロール2個），2022年で

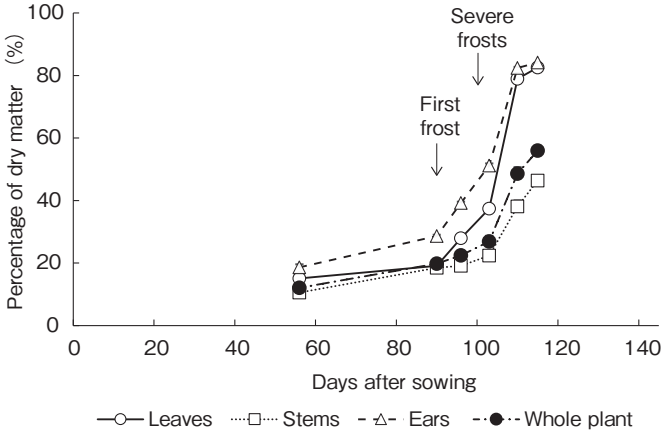

Fig. 1 Changes in dry matter percentage in each of plant fraction of late-summer sown pearl millet with time after sowing.

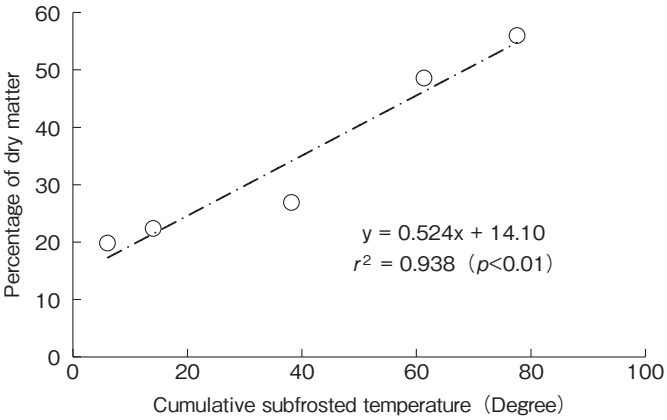

Fig. 2 Changes in cumulative subfrosted temperature after the first frost and percentage of dry matter of whole plants in late-summer sown pearl millet. Subfrosted temperature：<2.2 ℃.

© The Ito Foundation

は1695kg（ロール５個）が調製できた。調製・開封された霜枯れパールミレットサイレージは，酢酸発酵型で明るい色調のサイレージが調製できた。イタリアンライグラス乾草と比較したカフェテリア方式によるロールベールサイレージ（pH5.0）の選好性は，給与試験を繰り返すと草種間差異が縮小した（**Fig. 3**）。2021年では，葉身，茎，穂の粗タンパク質（CP）含量は，降霜に伴う変化は明瞭でなく（**Fig. 4A**），一方，IVDMDは降霜の進みに伴い低下し，ADF含量は増加したため，両者の間には負の相関が成り立った（**Fig. 4B**）。また，パールミレット霜枯れ草サイレージの発酵品質としては，pHは5.0であったが，乳酸含量は新鮮重当たり1.1－2.8％で，酢酸含量は0.06－0.18％と低く，酪酸の発生は認められなかった。そこで，フリーク評点およびV-SCOREによる評価値は，それぞれ「秀」および「優」と評価された（**Table 1**）。

本研究の結果から，晩夏播きパールミレットは，初霜後１か月で含水率が60％未満となったことから，低水分ロールベールサイレージとして冬季に調製可能であることが明らかとなった。収穫・サイレージ調製期間が厳冬期の12月下旬～１月上旬であるため，この期間は圃場作業の閑散期であること，低温・乾燥の季節であるため，集草・梱包の作業日程が組み入れやすいことも特長である。また，収穫・サイレージ調製後の飼料畑は，極早生イタリアンライグラスの播種により，年間３毛作（普通期トウモロコシ―晩夏播・霜枯れパールミレット―極早生イタリアンライグラス）の導入が可能であり，普通期トウモロコシ以外の播種期は，夏作／冬作の繁茂期から外れるため，作業日程の策定が容易になるものと考えられる。サイレージ貯蔵期間も低温で降雨の少ない季節であるため，サイレージの変敗が起こりにくいと考えられる。さらに，サイレージの開封が早春の３―４月には可能となるが，この時期は夏季に収穫・調製した貯蔵粗飼料が枯渇する時期に相当し，イタリアンライグラスの青刈給与以外に給与可能な粗飼料が不足するため，本サイレージの有効活用が期待できる。

４．要　　約

パールミレット（*Pennisetum typhoides*）は多汁質青刈作物であるためサイレージ調製が困難であるが，晩夏（９月）播種でも極晩生品種では播種後２か月後に出穂可能である。降霜に伴う地上部の枯れ上がり，含水率の低下後にロールベール調製し，飼料品質を検討した。パールミレット「夏イタリアン（カネコ種苗）」を供試し，2021年では９月１日に不耕起播種機により畦間26cmで1800m^{2}に1.75g/m^{2}にて播種した。2022年では９月６日にロータリ耕し，９月10日に１区270m^{2}で３区を設け，畦間50cm，1.5g/m^{2}にて条播し，９月14日に2880m^{2}に不耕起播種機で1.5g/m^{2}にて播種した。2021年では12月２日，2022年では12月７日の初霜後，１週間ごとに部位別の生体重と乾物重の測定と乾物率の変化を求め，約１か月後の2022年１月４日，2023年１月５日にディスクモアで刈取り，ロールベールサイレージ調製した。2021年，2022年ともに出穂開始は11月上旬以降であったため，草高は2021年では約200cm，2022年では約160cmとなり，初霜時の出穂茎比率は，それぞれ約70％，約60％に達した。降霜後の乾物率の上昇は，葉身，穂で急速に進み，2022年では降霜温度積算値との間に正の相関が成り立った。乾物収量は2022年では580～680g/m^{2}で，両年ともにロールベールにより，2021年では生重600kg（ロール２個），2022年では1695kg（ロール５個）が調製できた。2021年では，葉身，茎，穂のIVDMDは降霜の進みに伴い低下した。イタリアンライグラス乾草と比較したカフェテリア方式に

© The Ito Foundation

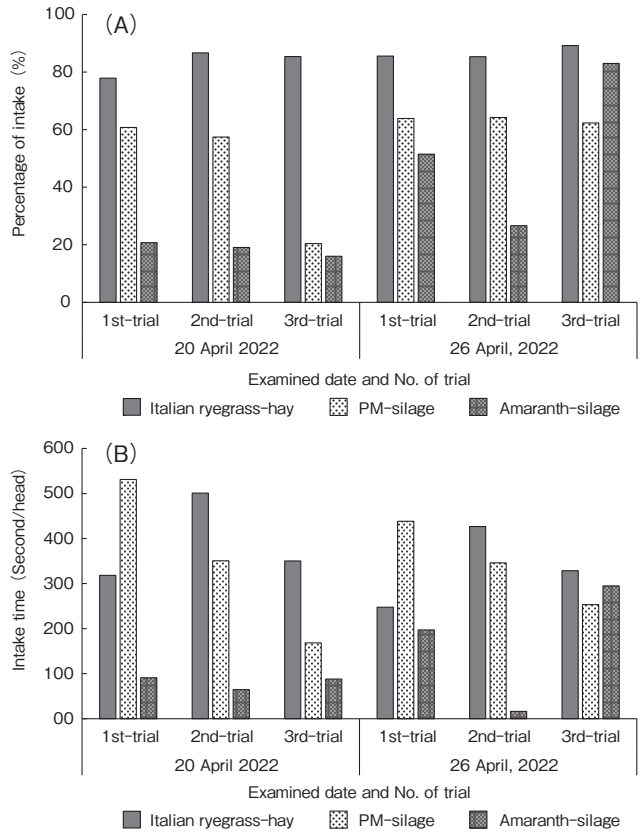

Fig. 3 Preference test of Italian ryegrass-hay, pearl millet (PM) silage and amaranth silage in intake percentage (A) and intake time (B) by breeding Japanese-Black beef cows.

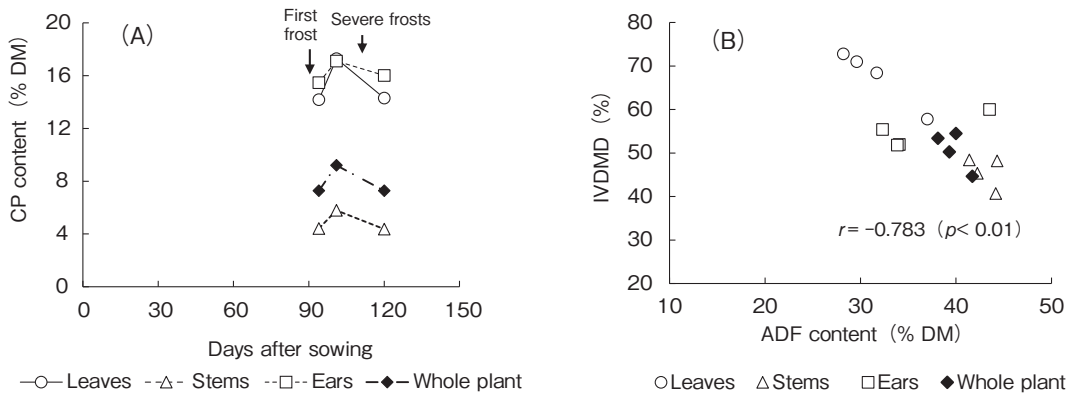

Fig. 4 Changes in crude protein (CP) content of late-summer sown pearl millet (A) and relationship between acid detergent fiber (ADF) content and *in vitro* dry matter digestibility (IVDMD, B) in the late-summer sown pearl millet.

© The Ito Foundation

よるロールベールサイレージ（pH5.0）の選好性は，給与試験を繰り返すと草種間差異が縮小した。パールミレット霜枯れ草サイレージの発酵品質としては，pHは5.0であったが，乳酸含量は新鮮重当たり1.1―2.8％で，酢酸含量は0.06―0.18％と低く，酪酸の発生は認められなかった。そこで，フリーク評点およびV-SCOREによる評価値は，それぞれ「秀」および「優」と評価された。したがって，晩夏播きパールミレットは，初霜後１か月で含水率が60％未満となったことから，低水分ロールベールサイレージとして冬季に調製可能であることが明らかとなった[5)]。

Table 1　Silage fermentation quality of late−summer sown pearl millet in the 2021 experiment.

Date of processing	Processing method	pH	Moisture (% FM)	Lactic acid (% DM)	Acetic acid (% DM)	Butyric acid (% DM)	VBN† (%TN)	Flieg's Score		V-Score	
								Point	Evaluation	Point	Evaluation
23 December, 2021	Plastic 30-L silo	4.9	79.7	1.1	0.09	0.0	9.5	100	Excellent	91	Good
29 December, 2021	Plastic 30-L silo	4.7	69.8	1.5	0.08	0.0	10.1	100	Excellent	89	Good
4 January, 2022	Plastic 30-L silo	5.4	59.7	1.6	0.10	0.0	8.8	100	Excellent	92	Good
4 January, 2022	Round-bale silage-1	5.1	52.8	2.1	0.12	0.0	7.6	100	Excellent	95	Good
4 January, 2022	Round-bale silage-2	5.0	41.9	2.8	0.18	0.0	9.3	100	Excellent	91	Good
4 January, 2022	Round-bale silage-3	5.0	61.3	1.7	0.06	0.0	8.2	100	Excellent	94	Good

† Percentage of volatile basic nitrogen to total nitrogen.

文　献

1）Li, B., Ishii, Y., Idota, S., Tobisa, M., Niimi, M., Yang, Y., Nishimura, K.：Yield and quality of forages in a triple cropping system in Southern Kyushu, Japan, *Agronomy*, 9, 277. Doi:10.3390/agronomy9060277, 2019.

2）Idota, S., Ohara, M., Kodani, R., Hongou, Y., Tobisa, M., Ishii, Y., Nishimura, K., Arima, N.：Agronomic traits of high-yielding sorghum (*Sorghum bicolor* Moench 'Tarzan') in Miyazaki Prefecture, Proceedings of the 7th Japan-China-Korea Grassland Conference, 210-211, 2018.

3）石垣元気，井戸田幸子，石井康之：異なる生育段階の飼料用トウモロコシへの水溶性殺虫剤散布度模擬調査，日本草地学会報，67(4), 183～188, 2022.

4）Li, B., Ishii, Y., Idota, S., Yang, Y., Niimi, M.：Growth and yield potentials of pearl millet (*Pennisetum typhoides*) under different sowing dates in southern Kyushu, Japan, *Wulfenia J*, 27(3), 67～80, 2020.

5）石井康之，重富ひかる，石垣元気，新美光弘，井戸田幸子：晩夏播きパールミレットの生育，収量と霜枯れ草の飼料品質，日本草地学会報，69（別号）11, 2023.

© The Ito Foundation

高品質な豚肉生産のためのエゴマ搾り粕の利用に関する研究

The study of utilizing perilla meal (*Perilla frutescens*) for producing high quality pork

田島　茂行・内倉　健造・長江　杏介・豊島　浩一
（愛知県農業総合試験場）

Shigeyuki Tajima, Kenzo Uchikura, Kosuke Nagae and Koichi Toyoshima
(Aichi Agricultural Research Center)

In this study, we investigated the digestibility of perilla meal, and the effects of feeding diet containing perilla meal on growth performance, carcass characteristics, and fatty acid composition of the subcutaneous inner fat. Four WLD gilts were used for the digestion test and 32 WLD (16 females and 16 gilts) were used for the feeding test. The digestion test was conducted by the total feces collection method. For the feeding test, two females and two gilts were assigned to each experimental group; a control group or a perilla meal group. Based on the digestibility of the perilla meal from the result of the digestion test, each diet was formulated to meet the nutrient requirements suggested by the Japanese Feeding Standard for Swine. The diet of the perilla meal group contained 10% of the perilla meal. Each diet was fed from 70 to 110 kg body weight. In the result, the digestibility of the perilla meal was 63%, 56%, 0 %, and 20% for crude protein, crude fat, crude fiber, and nitrogen free extract, respectively. In the feeding test, there were no significant differences in growth performance between the groups, while the daily gain and feed intake in the perilla meal group tended to be higher than that in control group. For carcass characteristics, back loin length II and shoulder fat thickness in the perilla meal group were significantly larger than that in control group. Fatty acid composition in the perilla meal group showed a significant increase in α-linolenic acid content compared to the control group. The n-6/n-3 in the subcutaneous inner fat was 7.0 in the perilla meal group. These results clarified that the perilla meal can be used as feed ingredients by using the digestibility of perilla meal calculated in this study, and the diet containig perilla meal can improve the n-6/n-3 ratio without affecting product performance.

1．目　　的

欧米化の進んだ今日の食生活では摂取しにくいω３系脂肪酸（n-3）を補う食品としてエゴマ油があげられる。n-3は心血管系の疾病に効果があることが報告されており[1)]，エゴマ油はn-3であるα-リノレン酸を豊富に含む。また，α-リノレン酸は体内で合成できない必須脂肪酸の一つで食事中から摂取しなければならない。

エゴマ油を搾油した後に排出される食品製造副産物であるエゴマ搾り粕は，エゴマ油と同様にα-リノレン酸を豊富に含んでいる。食事中のω６

© The Ito Foundation

系脂肪酸とω３系脂肪酸の比（n−6/n−3比）は4.0程度が適正とされている[2]が，豚肉では14.5であると報告されている[3]。豚脂肪中の脂肪酸組成は給与飼料中の脂肪酸組成に影響されることが報告されており[4]，特に，不飽和脂肪酸は飽和脂肪酸よりも優先的に体内に取り込まれる。そのため，エゴマ搾り粕を豚に飼料原料として給与できれば豚脂肪中のn−3割合を高めることが可能である。また，エゴマ搾り粕は粗タンパク質含量が約37%であり，大豆粕等の植物性タンパク質原料の代替としての利用も期待できる。実際に，当場でエゴマ搾り粕配合飼料の給与試験を行ったところ，背脂肪内層中のn−3割合が増加し，n−6/n−3比が約4.8になることが明らかになった。

一方で，エゴマ搾り粕は豚用飼料として活用されておらず，消化率も明らかにされていない。そのため，以前当場で行った試験では植物性油粕類であるナタネ粕の消化率[5]を用いてエゴマ搾り粕配合飼料を設計し，肥育後期の33日間給与した。その結果，対照区と比較してエゴマ搾り粕配合区で飼料摂取量が増加し，飼料要求率が悪化した。これは，エゴマ搾り粕の消化率がナタネ粕の消化率よりも低く，飼料中のエネルギー含量が不足したことよるものと考えられた。

そこで本研究では，エゴマ搾り粕の消化率を調査し，飼料設計を見直すことで，飼料摂取量と飼料要求率を改善し，エゴマ搾り粕の飼料としての利用価値を高め，豚用飼料原料としての普及および推進に寄与することを目的とした。

２．方　　法

本研究は，愛知県農業総合試験場動物実験等実施規定の承認を受けて実施した（承認番号22−12）。

2.1　消化試験

供試豚は2022年３月20日，21日に生産された去勢豚４頭（三元交雑種WLD）を用いた。

供試飼料は，基礎飼料として豚産肉能力検定飼料（total digestible nutrients（TDN）76.0 %，crude protein（CP）15.5％）を用い，これにエゴマ搾り粕を８：２の割合になるように配合した。飼料給与量は一日当たり2.5kgとし，午前（9：00）と午後（16：00）に等量給与した。飲水は自由とした。

消化試験は全糞採取法により行った。予備期間，採糞期間はそれぞれ５日間とした。糞は飼料給与時に採取し，60℃で１−２日間，通風乾燥機で乾燥させた後，１−２日間室内に放置し，風乾後重量を測定した。重量測定後，個体ごとに粉砕した糞をすべてポリエチレン製の袋に集め，よく混合し，これをサンプルとした。給餌器に残っている飼料と食べこぼした飼料は，１日一回バットに集め糞と同様の工程で風乾後重量を測定した。飼料給与量から残飼量，こぼし量を差し引いて飼料摂取量とした。

供試飼料および採取した糞はAOAC[6]に基づき，水分，粗タンパク質，粗脂肪，粗繊維および粗灰分を測定し，100からこれらの百分率の合計を引くことで可溶無窒素物とした。エゴマ搾り粕の消化率は，エゴマ搾り粕配合飼料の糞中成分量から基礎飼料の糞中成分量を引いたものをエゴマ搾り粕による摂取成分量から引き，それをエゴマ搾り粕による摂取成分量で割ることで求めた。

2.2　肥育試験

供試豚は，2022年７月に生産された三元交雑種WLD32頭（雌16頭，去勢16頭）を用いた。１群は雌２頭，去勢２頭の計４頭とし，平均体重が均等となるように，豚房に配置した。

試験区分は，飼料の10％にエゴマ搾り粕を配合したエゴマ区および対照区の２区４反復を設けた。試験は各豚房の平均体重が70kgとなった時点から開始し，110kgに到達した時点で試験終了

© The Ito Foundation

Table 1　Chemical composition and digestibility of basal diet and perilla meal（%）.

	Basal diet		Perilla meal	
	Chemical composition	Digestibility	Chemical composition	Digestibility
Moisture	12.12		6.89	
Crude Protein	14.55	83.12 ± 0.99	38.37	64.15 ± 1.38
Crude Fat	2.57	55.60 ± 3.89	7.53	59.37 ± 2.80
Crude Fibre	3.83	57.79 ± 3.94	17.65	− 32.64 ± 7.09
Nitrogen Free Extracts	62.26	94.00 ± 0.25	22.89	20.15 ± 14.38
Crude Ash	4.68		6.66	
TDN		76.04		39.29

Data were shown as the mean ± SEM（n = 4）.

とした。試験は2022年11月中旬から2023年１月上旬まで実施し，不断給餌で，ピックによる自由飲水により行った。供試飼料については，対照区，エゴマ区ともに日本飼養標準・豚（2013年版）[7]の養分要求量を満たし，飼料中の栄養成分が同等（TDN76.0%，CP15.5%）となるように設計した。また，飼料の調製は山田ら[8]の報告を参考に，保存期間が約10日間となるように行った。

発育成績として，飼料摂取量および１日平均増体量，飼料要求率を調査した。飼料摂取量については，週に一度，残飼量を測り，飼料給与量から差し引くことで測定した。また，試験終了日に体重測定を行い，試験日数で除することにより１日平均増体量を算出した。さらに，飼料摂取量を１日平均増体量で除することにより，飼料要求率を算出した。枝肉成績として，ロース断面積，枝肉重量，と体長，背腰長Ⅱ，肉色，背脂肪厚を調査した。ロース断面積は，体重約110kg到達時に超音波画像診断装置（HS-2000V, Honda electronics Co., LTD, Aichi, Japan）のリニアプローブを用いて左側胸最長筋上の体長の中間地点で測定し，フリー画像解析ソフト（Image J）を用いて面積を分析した。供試豚は試験終了後にと畜を行い，１日放冷後に，枝肉重量，と体長，背腰長Ⅱ，肉色，背脂肪厚を測定した。肉色とＬ*値，ａ*値およびｂ*値は第４−５胸椎間の左側胸最長筋断面上で測定した。肉色は，pork color standardsに基づいて調査した。Ｌ*値，ａ*値およびｂ*値は色差計（CR-21, Konica Minolta, Tokyo, Japan）を用いて測定した。

脂肪酸組成は，一般財団法人日本食品分析センターに分析を依頼し，測定した。

３．結果と考察

3.1　消化試験

本試験に用いた基礎飼料およびエゴマ搾り粕の栄養成分組成および消化率は**Table 1** のとおりである。基礎飼料の栄養成分および消化率を用いて算出したTDNは計算値とほぼ一致する76.04となった。エゴマ搾り粕の消化率において，粗繊維の数値がマイナスとなったため，粗繊維の消化率は０とした。この消化率を用いて算出したエゴマ搾り粕のTDNは39.29となった。

3.2　肥育試験

消化試験の結果に基づいて設計した供試飼料の配合割合および成分の試算値は**Table 2** のとおりである。両区とも，飼料中の栄養成分が同等（TDN 76.0%，CP 15.5%）となるように設計した。

発育成績は**Table 3** のとおりである。すべての項目で有意な差は見られなかったが，１日平均増体量，飼料摂取量はエゴマ区で高くなる傾向が見られた（それぞれｐ＝0.058，ｐ＝0.094）。飼料摂

© The Ito Foundation

Table 2　Ingredients and calculated chemical composition of the experiment diet（%）.

	Control diet	Perilla meal diet
Corn	73.96	74.17
Soybean meal	15.91	9.41
Wheat bran	5.47	0.00
Perilla meal	0.00	10.00
Fish meal（60% CP）	1.51	1.51
Palm oil	0.00	1.74
L-lysin・hydrochloride	0.50	0.50
Calcium carbonate	0.65	0.50
Tricalcium phosphate	1.31	1.46
Salt	0.30	0.30
Vitamins and minerals	0.40	0.40
Crude protein	15.5	15.5
Ether extract	3.4	5.6
TDN	76.0	76.0

Table 3　Growth performance of pigs between conrol and perilla meal groups.

	Control group	Perilla meal group
Starting weight（kg）	70.6 ± 0.6	71.3 ± 0.7
Finishing weight（kg）	108.0 ± 0.4	108.6 ± 0.7
Number of days for 70-110kg weight（d）	42.3 ± 1.1	38.8 ± 1.4
Daily gain（g/d）	886 ± 19	965 ± 23
Feed intake（kg/head/d）	3.61 ± 0.04	3.83 ± 0.09
Feed conversion ratio	4.08 ± 0.1	3.97 ± 0.02

Data were shown as the mean ± SEM（n = 4）.

取量の増加は，飼料要求率には影響を及ぼしていないことから，エゴマ搾り粕配合により飼料の嗜好性が高まったと考えられる。一方，１日平均増体量の増加については二つの要因が考えられる。一つ目は，飼料摂取量の増加により摂取する総エネルギー量が増加したと考えられる。二つ目は，飼料中のω３系脂肪酸含量の増加による影響が考えられる。McAfeeらは飼料中のω３系脂肪酸含量を増加させることで，対照区と比較して同一期間中の増体量が有意に増加した[9]ことを報告している。本研究でも，飼料中のω３系脂肪酸含量を増加させたことで，１日平均増体重が増加したと考えられる。

枝肉成績は**Table 4** のとおりである。背腰長Ⅱ，肩脂肪厚で有意な差が見られた（それぞれ $p < 0.05$，$p < 0.01$）。一方で，その他の産肉性に関わる項目では有意な差は見られなかった。

エゴマ搾り粕および各試験区の飼料における脂肪酸組成は**Table 5** のとおりである。エゴマ搾り粕における脂肪酸組成はC18：３，C18：１，C18：２，C16：０，C18：０，C16：１の順に割合が大きかった（それぞれ39.9％，28.6％，18.8％，8.1％，2.3％，0.3％）。対照区飼料中の脂肪酸組成はC18：２，C18：１，C16：０，C18：０，C18：３，C16：１，C14：０の順に割合が大きかった（それぞれ51.4％，24.4％，16.3％，2.4％，2.2％，0.4％，0.2％）。一方，エゴマ区ではC16：０，C18：２，C18：１，C18：

© The Ito Foundation

Table 4　Carcass characteristics of pigs between conrol and perilla meal groups.

	Control group	Perilla meal group
Carcass weight (kg)	77.2 ± 1.2	77.4 ± 1.0
Carcass length (cm)	93.0 ± 0.5	93.2 ± 0.4
Back loin length Ⅱ (cm)	66.6 ± 0.4	68.1 ± 0.3*
Pork color standard	3.6 ± 0.1	3.5 ± 0.1
Muscle color, L*	49.1 ± 0.5	48.5 ± 0.6
a*	20.2 ± 0.3	20.6 ± 0.3
b*	5.3 ± 0.2	5.3 ± 0.2
Thickness of backfat		
Shoulder (mm)	37.3 ± 1.0	41.2 ± 0.7**
Back (mm)	22.7 ± 0.9	23.2 ± 1.0
Loin (mm)	34.5 ± 1.0	33.9 ± 1.0
Loin area (cm^2)	40.1 ± 1.0	40.5 ± 0.8

Data were shown as the mean ± SEM (perilla meal and diet n = 1, fat n = 4). Significant difference was identified between control and perilla meal groups (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$). Loin area was measured on left *longissimus dorsi* muscle at tne site of half the body length.

Table 5　Fatty acid composition (%) and n-6/n-3 of perilla meal, diet and subcutaneous inner fat of pigs between conrol and perilla meal groups.

	Perilla meal	Control group		Perilla meal group	
		Diet	Fat	Diet	Fat
C14 : 0	0.0	0.2	1.3 ± 0.1	0.4	1.3 ± 0.0
C16 : 0	8.1	16.3	25.7 ± 0.4	46.7	25.5 ± 0.2
C16 : 1	0.3	0.4	1.8 ± 0.1	0.3	1.9 ± 0.1
C18 : 0	2.3	2.4	17.1 ± 0.5	1.7	16.3 ± 0.6
C18 : 1	28.6	24.4	42.8 ± 0.4	18.8	42.9 ± 0.7
C18 : 2	18.8	51.4	7.3 ± 0.1	27.4	7.7 ± 0.2
C18 : 3	39.9	2.2	0.5 ± 0.0	2.7	0.9 ± 0.0**
SFA	11	19.9	45.1 ± 0.5	49.6	44.0 ± 0.8
n-6	18.9	51.4	7.8 ± 0.1	27.4	8.3 ± 0.2
n-3	39.9	3.1	0.6 ± 0.0	3.1	1.2 ± 0.1**
n-6/n-3	0.47	16.6	12.7 ± 0.7	8.84	7.0 ± 0.6**

Data were shown as the mean ± SEM (perilla meal and diet n = 1, fat n = 4). Significant difference was identified between control and perilla meal groups (** $p < 0.01$).

3，C18：0，C14：0，C16：1の順に割合が大きかった（それぞれ46.7％，27.4％，18.8％，2.7％，1.7％，0.4％，0.3％）。また，各試験区の飼料におけるω6系脂肪酸とω3系脂肪酸の比（n-6/n-3比）は対照区，エゴマ区でそれぞれ16.6，8.8であった。

背脂肪内層における脂肪酸組成は**Table 5**のとおりである。C14：0，C16：0，C16：1，C18：0，C18：1，C18：2では有意な差は見られなかった。一方，C18：3では対照区およびエゴマ区との間に有意な差が見られた（それぞれ0.5％および0.9％）。また，n-6/n-3も対照区およびエゴマ区との間で有意な差が見られた（それぞれ12.7および7.0）。

これらの結果から，本研究で算出したエゴマ搾り粕の消化率を用いることで，適正な飼料設計が可能になり，エゴマ搾り粕配合飼料は生産性に影響を与えず，脂肪酸組成のn-6/n-3比を改善可能

© The Ito Foundation

であることが明らかとなった。今後は，エゴマ搾り粕配合飼料給与豚の肉質および食味に関する調査が必要である。

４．要　約

エゴマ搾り粕の消化率およびエゴマ搾り粕配合飼料給与による発育成績，産肉成績および背脂肪内層の脂肪酸組成への影響を調査した。供試豚は消化試験ではWLD去勢４頭，肥育試験ではWLD32頭（雌16頭と去勢16頭）を用いた。消化試験は，予備期間，採糞期間はそれぞれ５日間の全糞採取法で行った。肥育試験は，１群に雌，去勢各２頭を配置し，エゴマ区，対照区の２試験区４反復を設けた。消化試験で得られたエゴマ搾り粕の消化率をもとに，各飼料とも粗タンパク質15.5%，TDN76.0%を充足するように設計した。エゴマ区にはエゴマ搾り粕を10%配合した。各飼料を体重70−110kgの間給与し，発育，産肉成績および背脂肪内層の脂肪酸組成を調査した。発育成績では，すべての項目で有意な差は見られなかったが，１日平均増体量と飼料摂取量がエゴマ区で高い傾向が見られた。産肉成績では，背腰長Ⅱ，肩脂肪厚がエゴマ区で有意に大きかった。脂肪酸組成では，α−リノレン酸含量が対照区と比較して，有意に増加した。また，背脂肪内層中のn−6/n−3はエゴマ区で7.0となった。これらの結果から，本研究で算出したエゴマ搾り粕の消化率を用いることで，適正な飼料設計が可能になり，エゴマ搾り粕配合飼料は生産性に影響を与えず，脂肪酸組成のn−6/n−3比を改善可能であることが明らかとなった。

文　献

1） Ninomiya, T., Nagata, M., Hata, J., Hirakawa, Y., Ozawa, M., Yoshida, D., Ohara, T., Kishimoto, H., Mukai, N., Fukuhara, M., Kitazono, T., Kiyohara Y.：*Atherosclerosis*, **231**, 261～267, 2013.
2） Ma, X., Jiang, Z., Lai, C.：*Crit. Rev. Food. Sci. Nutr.*, **56**, 1 ～13, 2016.
3） Ishida, S., Hayasawa, H., Shimizu, R., Tamaki, M., Aii, T.：*J. Anim. Sci. Tech.*, **66**(10), 889～897, 1995.
4） Irie, M., Nishimura, K.：*Jpn. J. Zootech. Sci.*, **57**(8), 642～648, 1986.
5） 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構：日本標準飼料成分表（2009年版），106～133，中央畜産会，東京, 2009.
6） Association of official analytical chemists, Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 13th ed., 125～142, AOAC, Washington, DC, 1980.
7） 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），16～19, 中央畜産会，東京, 2013.
8） 山田未知，中村フチ子、西牧由佳、宮本拓平，山田幸二，大槻健治，佐藤茂次，松井滋：日豚会誌，**47**(2), 47～54, 2010.
9） McAfee, J. M., Kattesh, H. G., Lindemann, M. D., Voy, B. H., Kojima, C. J., Burdick Sanchez, N. G., Carroll, J. A., Gillespie, B. E., Saxton, A. M.：*J. Anim. Sci.*, **97**(11), 4453～4463, 2019.

© The Ito Foundation

ルーメン細菌叢制御を目指した子ウシ唾液抗体の分泌機能の解明

Capacity of salivary immunoglobulin secretion and its development associated with the growth of calves

鈴　木　　裕
（北海道大学大学院農学研究院）

Yutaka Suzuki
（Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University）

The developmental process of antibody secretory capacity in bovine salivary glands was examined, which will provide the basic information for the future application of vaccine control of bovine ruminal microbial activity. First, we investigated the changes in the concentration of each class of antibodies, and found that only the concentration of IgA increased gradually along with calves' growth. The concentration IgA was also higher compared to those of IgG and IgM after 2 weeks of age. These indicates that the salivary glands may start to develop a function to secrete IgA at the early stage of calves' life. Next, we examined the IgA production of each salivary gland and the developmental mechanism of its secretion by gene expression analysis. The results showed that *IGA* was highly expressed in the mandibular and sublingual glands. In addition, the expression levels of *PIGR* and *CCL28* in the mandibular gland increased with calf growth. Therefore, the mandibular gland is the major secretory tissue for IgA, indicating that IgA production and secretory capacity may develop as the calves grow. This study revealed that the major antibody class in calf saliva is IgA, and that its secretory level increases from the age of 1 week onward. It was also suggested that increased expression of chemokines and transporters contribute to the development of its secretory capacity. In order to apply the information obtained in this study to the development of vaccines against rumen bacteria, it will be important to examine what rumen bacteria salivary IgA binds to and how it modifies their activity in the future study.

1．目　　的

近年の肉牛・乳牛の生産では，アシドーシスやメタン排出のように，第一胃（ルーメン）内の微生物相のアンバランスや機能不全に起因する問題が顕在化している。これらの問題に対して，抗生物質や飼料添加物によってルーメン細菌叢を制御するアプローチが試みられているが，耐性菌出現の懸念や使用コストなどの課題が多い。

ルーメンには反芻により大量の唾液が流入しており，唾液に多量に含まれる重炭酸や尿素がルーメン微生物の活性や増殖を制御している。一方で，抗体は唾液中に比較的多く含まれる成分であり，細菌の活性を抑制する働きを持つ。一般に抗

© The Ito Foundation

体の反応性はワクチンにより制御できることから，アシドーシスやメタン産生を抑制するワクチンが提唱されている。ルーメン液バッチ培養などの*in vitro*系を用いた先行研究[1, 2]では，抗体は高いメタン抑制効果を持つことが確認された一方で，*in vivo*でのワクチン投与試験では顕著な効果は見られていない[3, 4]。

ウシでは，唾液中の主要抗体クラスはどれなのか，また唾液中への抗体分泌能力はいつ成熟するのかといった基盤情報が不足しており，効率的なワクチネーションのために必要な投与経路や抗原投与の時期を検討するうえでの妨げとなっている。本研究では，成長中の子牛における各抗体クラス（IgA，IgG，IgM）の唾液中濃度の比較や，その分泌機序を検討することにより，ウシ唾液腺における主要抗体クラス，および抗体分泌機能の発達時期を明らかにすることを目的とした。

２．材料・方法

2.1　供試動物およびサンプル採取

本研究は，北海道大学動物実験委員会の承認の下に行った（No.19-0020）。

唾液の採取には，北海道内の預託牧場で飼育されたホルスタイン種メス子牛（１～６週齢：計87頭）を供試した。子牛は10日齢まで導入舎（単飼）にて飼育し，１日あたり代用乳８ｌを給与した。10日齢を過ぎた個体は順次，哺育舎へと移行し，哺乳ロボットにより１日あたり代用乳８ｌを給与し，粗飼料は自由採食させた。また，スターターは２～６週齢の個体には１日あたり0.1～２kg給与し，８週齢以降の個体には２kg給与した。唾液の採取には口腔スワブ（Salimetrics, Carlsbad, CA, USA）を用いた。採取後のスワブは5.0mlチューブに入れ，－80℃で保存した。

唾液腺組織サンプルの採取には，ホルスタイン種オス子牛（約３週齢の離乳前子牛：５頭，約13週齢の離乳後子牛：５頭）を供試した。子牛には分娩から半日以内に初乳リプレーサー0.75ｌを，次の哺乳で自家産凍結初乳２ｌを給与し，その後は代用乳を１日あたり３～６ｌ与えた。３週齢で組織採取を行った個体には，解剖日まで固形飼料は給与せずに飼育した。13週齢の個体には，１週齢の時点からスターターの給与を開始し，５～６週齢頃から細断した乾草を自由摂取させ７週齢頃に離乳させた。採取した唾液腺（下顎腺，舌下腺，および耳下腺）はただちに液体窒素で凍結し，その後は－80℃で保存した。

2.2　Enzyme-Linked Immunosorbent Assay（ELISA）による抗体濃度の測定

唾液中抗体濃度の測定は，市販のAnti-IgG抗体，Anti-IgA抗体，およびAnti-IgM抗体（いずれもFortis life sciences, Walthum, MA, USA）を使用して確立したSandwich-ELISAにより行った。ELISAプレート（住友ベークライト株式会社，東京）に，捕捉抗体を固相化した後，ブロッキングバッファー（0.5% collagen solution）を分注し，１時間インキュベーションした。洗浄バッファー（TBST）による洗浄を行った後，段階希釈した検量線用スタンダードと唾液サンプルを分注し，室温にて一晩振盪しながらインキュベートした。スタンダードとサンプルの反応終了後，TBSTによりプレートを洗浄した後，希釈した検出抗体を分注し，室温で１時間インキュベーションした。TBSTにより洗浄した後，OPD発色試薬（富士フイルム和光純薬，大阪）を分注し，一定時間発色させた。その後，プレートリーダーで490nmにおける吸光度を測定した。R（ver.4.2.2）のnplrパッケージを用いてスタンダードの吸光度から４係数ロジスティック曲線を描き，サンプル中の抗体濃度を算出した。なお，ELISAの希釈直線性，添加回収性は誤差±20％以内となることを事前に確認した。

© The Ito Foundation

2.3　RNA抽出およびqRT-PCR

唾液腺組織をRNA抽出試薬（タカラバイオ，滋賀）とともにホモジナイズし，total RNAを抽出した。抽出したtotal RNAはNanodrop（Thermo Scientific, Walthum, MA, USA）およびアガロースゲル電気泳動により濃度と品質の確認を行った。500ng/sampleのtotal RNAを逆転写（Revertra-ase RT-kit；東洋紡，大阪）に供し，cDNAを作製して，real-time PCRに供した。Real-time PCRにはLightCycler 480（Roche Applied Science, Penzberg, Germany）を用いた。標的遺伝子は*IGA*，*PIGR*，*CCL28*，*CCR10*，および内部標準遺伝子である*ACTB*，*UXT*，*RSPQ*とした。Real-time PCRの結果から，*ACTB*，*UXT*，*RPSQ*のCt値の幾何平均を内部標準として，ddCt法により各標的遺伝子の相対的発現量を求めた。

2.4　統計手法

統計解析はR（ver.4.2.2）のmultcompパッケージを用いた。二群間の比較にはStudent's *t*-testを行い，三群間の比較にはone-way ANOVAおよびTukey法による多重比較検定を行った。$p<0.05$の場合に群間に有意な差があるとした。

3．結果と考察

3.1　各抗体クラスの唾液中濃度の比較と成長による変化

子牛の唾液中抗体濃度の測定結果を**Fig. 1**に示す。IgG濃度は1週齢から6週齢において有意な変化はなかったが，2週齢にて最高値（40.1±5.1 μg/ml）を示し，3週齢にて最低値（27.3±2.6 μg/ml）に低下した。IgM濃度についても有意な変化はなかったが，1週齢にて最低値（17.5±4.8

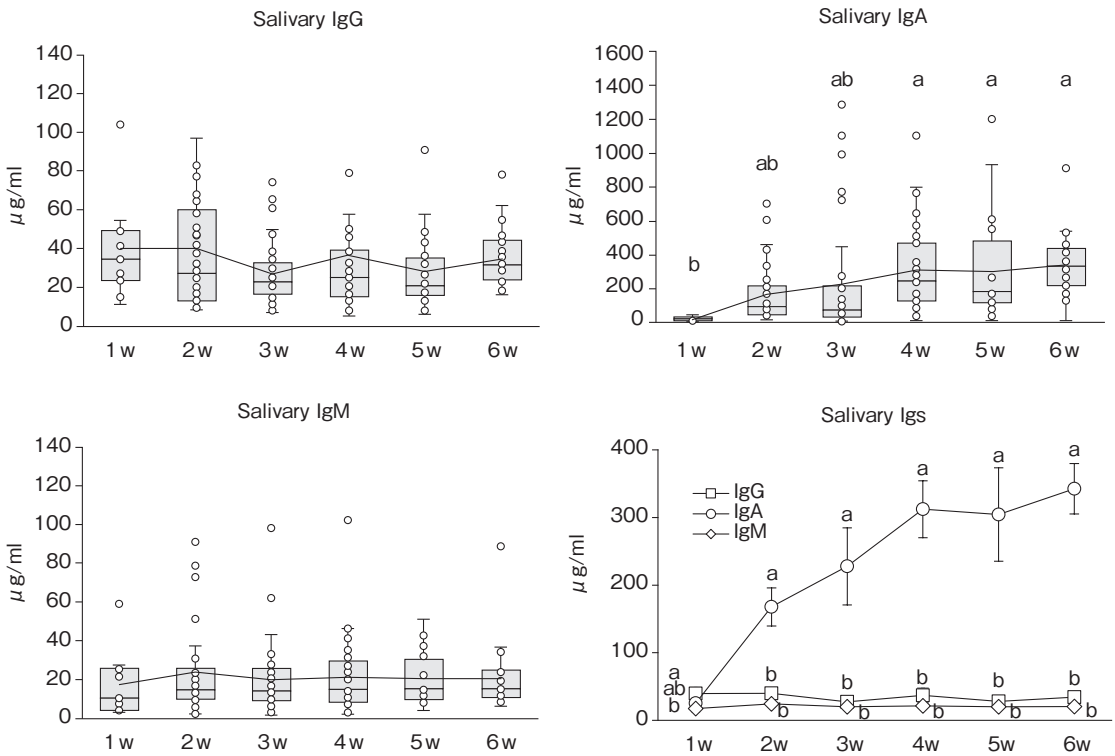

Fig. 1　Concentrations of immunoglobulins in saliva of calves.（$^{ab}p<0.05$）

© The Ito Foundation

μg/ml）を示し，２週齢にて最高値（24.3 ± 3.9 μg/ml）であった。一方で，IgA濃度は１～４週齢にかけて上昇し（25.5 ± 3.3 μg/ml–312.3 ± 42.1 μg/ml），５および６週齢においても高い値を維持した。また，IgAは２週齢以降ではIgGおよびIgMと比較して有意に高い濃度であり，IgGに対する濃度比は最大で約11倍，IgMに対しては最大で約17倍であった。ウシの母乳中にはIgGが全抗体の約90％と多く含まれておりIgAの濃度は低いことから[5]，唾液中で検出されたIgAは子牛自身が産生したものであると考えられる。また，久馬らの報告[6]では，４週齢から52週齢にかけて唾液中IgA濃度が上昇していたが，本研究の結果はより早い時期から唾液IgA分泌能の発達が始まることを示している。以上のことから，子牛の唾液中における主要な抗体クラスはIgAであり，唾液腺における分泌能は１週齢以降という比較的早い時期から発達が始まることが明らかになった。

3.2　唾液腺におけるIgAの発現量と成長による変化

哺乳期の子牛の唾液中においてもIgA濃度が高いことが明らかになったため，以降の解析はIgAに絞った。子牛（13週齢）の下顎腺，舌下腺および耳下腺における*IGA* mRNAとIgAタンパク質の発現量を，組織間で比較した結果を**Fig. 2**に示す。*IGA* mRNAについては有意な差ではなかったが，耳下腺（相対発現レベル；1.00 ± 0.21）と比較して，下顎腺（1031 ± 201）および舌下腺（3150 ± 1970）において非常に高い発現量を示した。また，IgAタンパク質については，舌下腺（相対値；0.26 ± 0.11）および耳下腺（0.35 ± 0.08）と比較して，下顎腺（1.12 ± 0.18）において高い発現量を示した。次に，各唾液腺における*IGA* mRNAおよびIgAタンパク質の発現量を，３週齢および13週齢の間で比較した結果を**Fig. 3**に示す。*IGA* mRNA発現量については，下顎腺において13週齢（３週齢；1.00 ± 0.52，13週齢；2.76 ± 0.54）で発現量の上昇が見られた。舌下腺においても，有意な変化ではないが大きく発現量が上昇した（３週齢；1.00 ± 0.49，13週齢；12.26 ± 7.67）。IgAタンパク質については，下顎腺においてのみ13週齢で発現量の上昇が見られた（３週齢；1.00 ± 0.25，13週齢；7.28 ± 1.73）。Sakaguchiらは，成牛の下顎腺および舌下腺にはIgA産生細胞が多数存在し，特に舌下腺において分泌能が高いと報告しており[7]，本研究の結果はこれと矛盾しない。一方で，タンパク質レベルでは下顎腺における発現量が他の唾液腺に比べて有意に高かっ

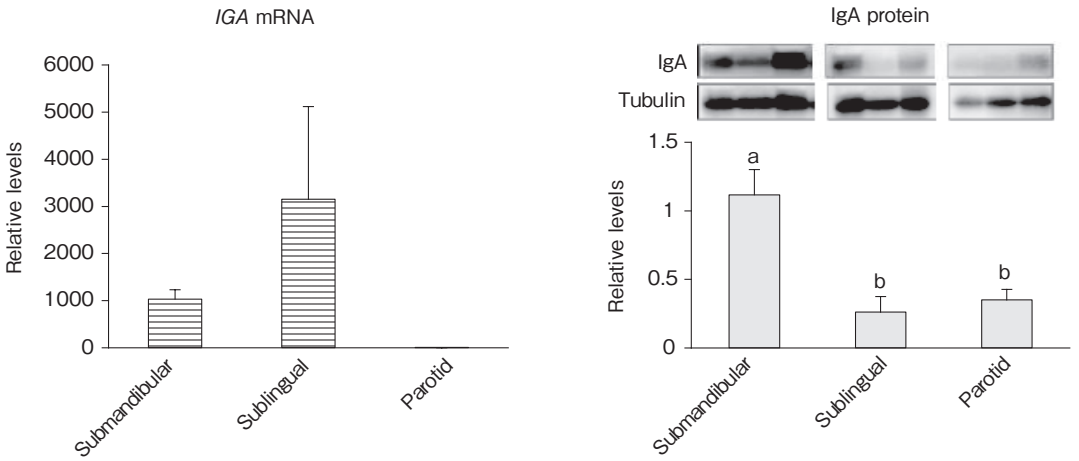

Fig. 2　Comparison of expressional levels of mRNA and protein of IgA between salivary glands of calves.（$^{ab}p < 0.05$）

© The Ito Foundation

た。これは，耳下腺においては血中から腺房に取り込んだIgAを検出した可能性が考えられる。今後はIgAの産性能と分泌能を分けて評価する必要があると考えられる。まとめると，子牛においては下顎腺のIgA分泌能が高い可能性を示された。

3.3　IgA産生・分泌関連因子発現量の成長による変化

本研究ではさらに，各唾液腺におけるIgAの産生および分泌に関連する因子について，子牛の成長に伴う発現変化を検討した。唾液腺におけるIgAの産生および分泌に関与する因子として*PIGR*，*CCL28*および*CCR10*のmRNA発現を測定した結果を**Fig. 4** に示す。下顎腺においては，*PIGR*（3週齢；1.00±0.11，13週齢；1.87±0.34）および*CCL28*（3週齢；1.00±0.08，13週齢；1.44±0.10）のmRNA発現量が13週齢で上昇した。舌下腺においては有意な発現量差は見られなかった。耳下腺においては，*PIGR*のmRNA発現量が13週齢で低下した（3週齢；1.00±0.13，13週齢；0.41±0.17）。下顎腺のみにおいて遺伝子発現の上昇が見られたことから，下顎腺ではケモカインであるCCL28によるIgA産生細胞の誘引作用が強ま

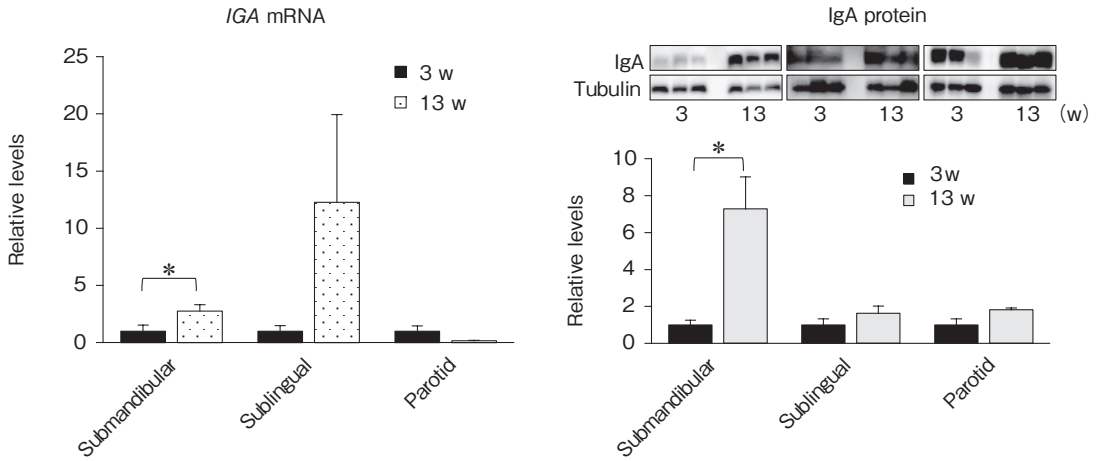

Fig. 3　Comparison of expressional levels of mRNA and protein of IgA in salivary glands of calves with different ages.
(*$p<0.05$)

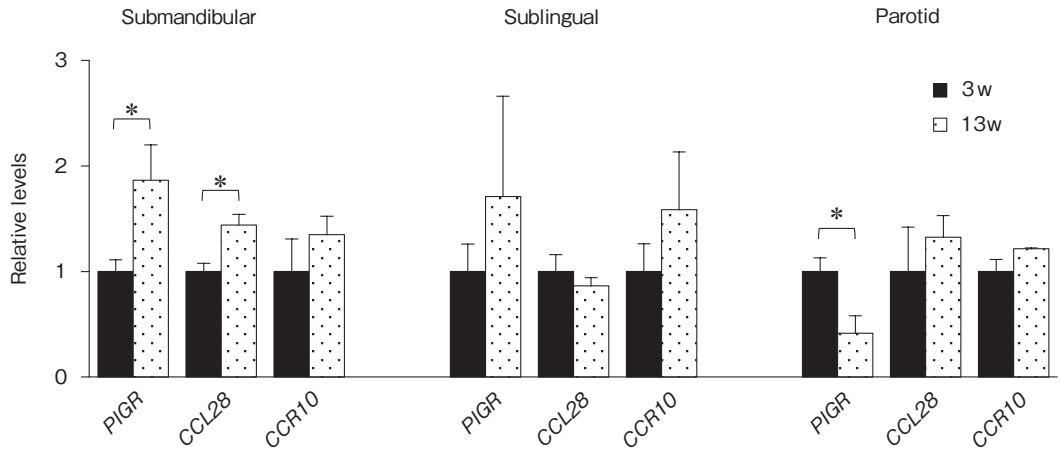

Fig. 4　Comparison of expressional levels of IgA-associated genes in salivary glands of calves with different ages.
(*$p<0.05$)

© The Ito Foundation

ると同時に，腺房細胞におけるpIgRを介したIgA分泌能も発達したと考えられる。下顎腺におけるIgA分泌能が発達した要因の一つとしては，成長に伴う腸内細菌の増加や多様化が考えられる。腸管共生細菌による抗原刺激は，腸管上皮組織のIgA産生細胞を増加させることが知られている。反芻動物においても生後約３週間にかけて腸管共生細菌の数・種類が増加することや，回腸パイエル板から全身へとＢ細胞が移行することが知られている[8)]。口腔を含む全身の粘膜組織は共通粘膜免疫機構（CMIS）により関連性をもつことから，小腸において増殖・成熟したIgA産生細胞がCMISを介して唾液腺に移行した可能性が示唆される。一方で，IGA発現量の高い舌下腺において分泌関連因子の発現量が上昇しなかった要因は不明であり，今後さらなる研究が必要である。

４．要　約

将来的なワクチンによる唾液抗体の制御を念頭に，その基盤情報となるウシの唾液腺における抗体分泌能の発達過程を検討した。はじめに子牛唾液中の各クラスの抗体濃度を比較したところ，２週齢以降ではIgAがIgGとIgMと比較して高濃度で検出された。IgAの成長に伴う濃度変化を検討すると，１－６週齢にかけて唾液中濃度は徐々に増加しており，唾液腺のIgA分泌機能が発達する可能性が示された。次に，遺伝子発現解析により各唾液腺のIgA産性能と，唾液IgA分泌の発達機序について検討した。その結果，下顎腺および舌下腺においてIgAが高発現していた。また，下顎線では*PIGR*と*CCL28*の発現量が子牛の成長に伴い上昇した。したがって，IgAの主要な分泌組織は下顎腺であり，子牛の成長に伴いIgA産生や分泌能が発達する可能性が示された。本研究より，子牛唾液中の主要な抗体クラスはIgAであり，１週齢以降から分泌量が上昇することが明らかになった。また，その分泌能の発達にはケモカインや輸送体の発現上昇が寄与することが示唆された。本研究で得られた情報をルーメン細菌のワクチン開発に発展させるにためは，唾液中IgAがどのようなルーメン内細菌に結合するのか，またその活性をどのように変化させるのかを検討することが今後の課題となると考えられる。

文　献

１）Cook, S. R., Maiti P. K., Chaves, A. V., Benchaar, C., Beauchemin, K. A., McAllister, T. A.：Avian（IgY）anti-methanogen antibodies for reducing ruminal methane production: In vitro assessment of their effects, *Aust. J. Exp. Agric*., **48**, 260～264, 2008.

２）Wedlock, D. N., Pedersen, G., Denis, M., Buddle, B. M., Dey, D., Janssen, P. H.：Development of a vaccine to mitigate greenhouse gas emissions in agriculture: vaccination of sheep with methanogen fractions induces antibodies that block methane production in vitro, *N. Z. Vet. J*., **58**, 29～36, 2010.

３）Williams, Y. J., Popovski, S., Rea, S. M., Skillman, L. C., Toovey, A. F., Northwood, K. S., Wright, A. D. G.：A vaccine against rumen methanogens can alter the composition of archaeal populations, *Appl. Environ. Microbiol*., **75**, 1860～1866, 2009.

４）Zhang, L., Huang, X., Xue, B., Peng, Q., Wang, Z., Yan, T., Wang, L.：Immunization against rumen methanogenesis by vaccination with a new recombinant protein, *PLoS ONE*, **10**, e0140086, 2015.

５）Ahmann, J., Steinhoff-Wagner, J., Büscher, W.：Determining Immunoglobulin Content of Bovine Colostrum and Factors Affecting the Outcome: A Review, *Animals*, **11**, 3587, 2021.

６）久馬忠，田中彰治，高橋政義，米内美晴：子牛の唾液腺におけるIgA産生能の発達，日本畜産学会報，**57**, 568～574, 1986.

７）Sakaguchi, K., Yokota, H., Miyasho, T., Nakamura, K., Onaga, T., Koiwa, M., Matsuda, K., Okamoto, M., Hirayama, K., Taniyama, H.：Polymeric immunoglobulin receptor expression and local immunoglobulin A production in bovine sublingual, submandibular and parotid salivary glands, *Vet. J*., **197**, 291～296, 2013.

８）Meale, S. J., Li, S., Azevedo, P., Derakhshani, H., Plaizier, J. C., Khafipour, E., Steele, M. A.：Development of ruminal and fecal microbiomes are affected by weaning but not weaning strategy in dairy calves, *Front. Microbiol*., **7**, 582, 2016.

© The Ito Foundation

多機能性因子の合成を介した筋衛星細胞による自律的な筋肥大誘導機構の解釈を利用した新プラットフォームの形成

The novel platform for the autonomous regulatory system of myogenic hypertrophy by multi-functional modulators synthesized in satellite cells

鈴木　貴弘・前野　岳大・今給黎　耀・川崎　佑華・中田　后紀・
室田　大輝・中村　真子・辰巳　隆一
（九州大学大学院農学研究院）

Takahiro Suzuki, Takahiro Maeno, Hikaru Imakyure, Yuka Kawasaki, Minori Nakada, Daiki Murota, Mako Nakamura and Ryuichi Tatsumi
(Research Faculty of Agriculture, Graduate School of Agriculture, Kyushu University)

Myogenic stem cells (satellite cells) are indispensable for skeletal muscle hypertrophy by forming nascent myofibers (myotubes) and fusing to existed myofibers. As they have the functional heterogeneities, one group of satellite cells may have a high capability to form myotubes contributing to the meat production and the health sciences. While the mechanisms of myotubes formation are complicated with cell-cell communications in skeletal muscle, we focus on the strong autonomous regulation systems by satellite cells. Satellite cells can synthesize multi-potent modulators like semaphorins (Sema3A, 3D, and 3E) and netrins (netrin-1, -3, and -4), originally found as classical neural axon guidance molecules, during the myogenic differentiation phase. We have found that semaphorin 3A and netrin-1 synthesized in satellite cells would have key roles to regulate myofiber types of myotubes. However, the myogenic significances of other semaphorins and netrins subtypes are still unclear.

This study examined whether Sema3E may regulate myotube formation in satellite cells. Initially, the Sema3E expression profiles were analyzed in satellite cells isolated from the soleus muscle (slow-twitch myofiber-abundant) and the extensor digitorum longus muscle (EDL; fast-type abundant). Both satellite cells were synthesized Sema3E during the initiation stage of myogenic differentiation. Sema3E knockdown in EDL-derived satellite cells reduced the expression levels of the myotube markers, while myogenic regulatory factors were not affected. Furthermore, Sema3E knockdown also inhibited myotube formation. These data suggest that satellite cells synthesize Sema3E would promote their own fusion, stimulating the expression levels of the muscle-specific myoblast fusion associated proteins.

1．目　　的

動物（家畜や家禽）の骨格筋は食肉の主原料となるため，１個体あたりの骨格筋量の増加によって，効率的な食肉生産技術の開発へ寄与できると期待される。しかし，骨格筋細胞（細長い構造のために“筋線維”と示される）は最終分化しており，自身で増殖することができないため，その数

© The Ito Foundation

や容積を増加させることは困難である[1)]。一方で，骨格筋には筋再生に重要な役割を担う筋衛星細胞（衛星細胞）が局在している。衛星細胞は，筋線維の基底膜と細胞膜の間隙に位置し[2)]，普段は休止状態にある。筋線維の損傷，筋疾患や老化などに伴う筋萎縮が引き起こされた際には，活性化状態に入り[3~5)]，増殖して筋芽細胞へと分化，細胞同士で互いに融合して新生筋線維（筋管）を形成したり，ダメージを受けた筋線維に融合することで損傷部を修復する[6)]。よって，衛星細胞は筋線維数や容積を増加させるポテンシャルを持っているため，この能力を最大限に発揮することで効率的な筋肥大に貢献できると考えている。そのためには，衛星細胞の分化や筋芽細胞の融合といった動態を制御するシステムの理解が必須である。これまでも，筋再生過程における細胞の分化・融合能の制御に関する研究は展開されてきたが，その多くが筋損傷を受けた際に筋内外の細胞や組織から産生される「増殖因子」や「サイトカイン」をメインに捉えたアプローチであった[6)]。本研究では，衛星細胞自身が合成する多機能性因子（semaphorinおよびnetrinのサブタイプ）に着目して，各因子がオートクライン，パラクライン様式で作用する「自律的な筋肥大システム」の構築と理解を目的としている。

これまでに著者らの研究グループでは，semaphorinのサブタイプの１つsemaphorin 3Aが遅筋であるヒラメ筋の衛星細胞で多量に合成・分泌され[7)]，遅筋型の筋管形成に寄与することを報告した[8)]。さらに最近では，速筋型筋線維優勢の長趾伸筋を由来とする衛星細胞ではnetrinファミリーのサブタイプnetrin-1が多量に合成されて，速筋型の筋管形成を促進することを明らかとした[9)]。なお我々は，衛星細胞の分化過程においてSema3Aだけでなく Sema3D，Sema3E，およびnetrin-1に加えてnetrin-4といった他のサブタイプの発現も確認しているが，それらの分化・融合能に対する生理機能については不明である。これらの因子が，Sema3Aやnetrin-1と協調して遅筋型または速筋型といったいわゆる“筋タイプ”の制御に関与する可能性も考えられるが，同時に細胞の分化・融合能を促進することも期待される。そこで，我々はSema3D，Sema3E，およびnetrin-4が衛星細胞による自律的な筋肥大を促すキーファクターとなるか検証している。本稿では，特にSema3Eに着目したアプローチについて報告をする。Sema3EはSema3Aとは異なる細胞膜受容体を要求するため[10)]，ユニークな生理機能を示す可能性が高いと考えたためである。まず，衛星細胞の培養系において分化誘導条件下でのSema3Eの合成パターンを詳細に調べ，続いて発現抑制実験系における分化・融合能への影響を解析した。

２．方　　法

2.1　実験動物

本研究では，８週齢のC57BL/6JJclマウス（ジャクソンラボラトリーズジャパン社）雄個体の骨格筋から単離した衛星細胞の培養系を使用した。本研究における動物実験（動物実験承認番号：A21-039）は，関係法令や九州大学動物実験規則ならびに九州大学動物実験規則実施細則に従った。

2.2　単一筋線維法を用いた衛星細胞の単離，培養

本研究では，各文献を参考にして，骨格筋から摘出した単一筋線維の培養中に，ディッシュ上に衛星細胞が遊走する性質を利用した「単一筋線維法」による単離，培養方法を採用した[11~14)]。

まず，マウス後肢骨格筋（ヒラメ筋；soleus，長趾伸筋；extensor digitorum longus muscle［EDL］）を摘出し，37℃に温めたリン酸緩衝生

© The Ito Foundation

理食塩水（PBS）を用いて洗浄後，collagenase type I（Worthington）を濃度0.5％となるようDMEM基礎培養液（Gibco）で希釈した酵素処理液に浸し，CO_2インキュベータ内（５％ CO_2，95％大気，37℃）で反応させた。なお，soleusは2.5時間，EDLは2.0時間で酵素反応を行った。同時に，筋線維の付着を防ぐためにウマ血清（HS）でコートしたディッシュを準備し，DMEMを加えてCO_2インキュベータ内で静置した。酵素反応後，各骨格筋はheat polishした細口パスツールピペットを用いて，HSコート済みディッシュに移して単一筋線維に分離されるまでトリチュレートに供試し，分離後１日CO_2インキュベータ内で培養した。

翌日，浮遊している間質細胞，神経，血管および過収縮を起こした筋線維を含むデブリなどを取り除くため，単一筋線維をピックアップして，37℃に温めたDMEMを入れたディッシュに移動させた。また，poly-L-lysineがプレコートされた６well培養プレート（IWAKI）に１mg/ml Matrigel（CORNING）をダブルコートし，2.5ng/mlリコンビナント線維芽細胞増殖因子FGF-2（R&D systems）溶液を添加した30％ウシ胎児血清（FBS）含有DMEMを，衛星細胞の増殖培養液（30 % FBS-DMEM with bFGF）としてプレートに加えてCO_2インキュベータ内で静置した。移動させた単一筋線維約50-60本を改めてピックアップし，増殖培養液中に播種して３日間CO_2インキュベータ内で培養した。３日後，ピペットマンに装着したチップを用いて筋線維をプレートから除去し，プレートに残った衛星細胞を約80％以上のコンフルエントになるまで増殖させた。

増殖させた衛星細胞を0.05％トリプシン－EDTA溶液（Gibco）を用いて剥離し，遠心分離にて回収してから増殖培養液を加えた。１mg/ml Matrigelをダブルコートした24well poly-L-lysine coatedマルチプレート（IWAKI）に，１wellあたり2.5×10^4cellsずつ播種し，24時間培養した。その後，分化誘導培養液（５％ HS-DMEM）に切り換えて，分化24時間または筋管形成が認められた分化120時間目まで培養した。

なお，本法を用いて単離した細胞は，増殖誘導培養液で24時間培養した際，衛星細胞マーカーPax７およびMyoDがそれぞれ95％以上陽性であることを確認した（Maeno *et al*., 2023, *Exp. Cell Res.*）。

2.3　RNA干渉法を用いたSema3Eノックダウン処理

Suzukiら（2021年）の方法に基づいて，上項2.2における単離した衛星細胞を５％ HS-DMEMに切り換えて分化誘導を開始するタイミングと同時に，濃度40nMに調製したSema3E特異的なsiRNA（stealth siRNAシリーズ［Stealth_964はSema3E siRNA①，Stealth_2657はSema3E siRNA②として使用］，Invitrogen）をsiRNA transfection reagent（Screen Fect™，WAKO）を用いて，トランスフェクションし，Sema3E発現抑制のためのノックダウン処理を行った[9]。なお，対照として濃度40nMのControl siRNA（AllStars Negative Control siRNA, QIAGEN）を同様にトランスフェクションした。

2.4　タンパク質の抽出およびWestern Blotting

培養細胞をPBSで洗浄後，Laemmli sample bufferでタンパク質を抽出した。サンプルは10％ポリアクリルアミドゲルによるSDS-PAGEに供試し，泳動後のゲルよりPVDFメンブレンにタンパク質を転写した。転写後のメンブレンは，５％（w/v）のスキムミルクを添加したtween 20含有トリス緩衝液により30分間ブロッキングし，免疫反応促進試薬（Can Get Signal, TOYOBO）で希釈した１次抗体溶液中で一晩インキュベーション

© The Ito Foundation

した。メンブレンを洗浄後，同様に希釈したHRP標識２次抗体溶液で１時間インキュベーションした。その後，ECL Western Blotting Reagents（GE Helth care）とメンブレンを反応させ，ケミルミイメージングシステムFUSION（Vilber-Lourmat）を用いて化学発光検出を行った。

2.5　RNA抽出およびreal-time qRT-PCR

培養細胞をPBSで洗浄後，RNA抽出試薬（ISOGEN II，ニッポンジーン）により溶解し，メーカー推奨のプロトコルに従ってtotal RNAを抽出した。total RNAの濃度を50-100ng/μlに希釈してから，逆転写に供試して（ReverTra Ace qPCR RT Kit，TOYOBO），cDNAを作成した。作製したcDNAを含む逆転写反応液を鋳型とし，SYBER Green assayを用いたreal-time qRT-PCR（Light Cycler 96 system, Roche）によって定量的解析を行った。データの分析は，添付のソフトウェアを用いて行った。

2.6　培養細胞の蛍光免疫染色

培養細胞をPBSで洗浄後，４％パラホルムアルデヒドで固定した。固定した細胞は，0.2％Triton X-100（Shigma-Aldrich）で15分間処理後，３％（w/v）の牛血清アルブミンを添加したtween 20含有PBSにより40分間ブロッキングし，同ブロッキング液で希釈した１次抗体溶液中で一晩インキュベーションした。細胞を洗浄後，同様に希釈した蛍光標識２次抗体溶液で１時間インキュベーションした。その後，ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI（Invitrogen）で封入し，蛍光フィルターキューブを搭載した倒立顕微鏡DMI6000 B（Leica）を用いて観察した。

2.7　統計解析

測定値は平均値±標準誤差で示した。フリー統計ソフトEZR（Easy R）を用いて，各測定値から得られたデータをTukeyの多重比較により有意差検定を行い，$p < 0.05$をもって統計学的に有意であるとした。EZRはRおよびRコマンダーの機能を拡張した統計ソフトウェアであり，自治医科大学付属さいたま医療センターのホームページで無償配布されている。

3．結果と考察

3.1　衛星細胞の分化誘導過程におけるSema3E合成パターン

Sema3Eが衛星細胞（筋芽細胞）の分化・融合能に与える影響を検証するため，はじめにその詳細な合成パターンをWestern Blottingを用いて調べた（**Fig. 1**）。soleusより単離した衛星細胞では，分化誘導24時間後にピークを迎え，48から120時間目にかけて分化誘導開始時と同レベルのSema3E合成量を示した。EDL由来の衛星細胞で

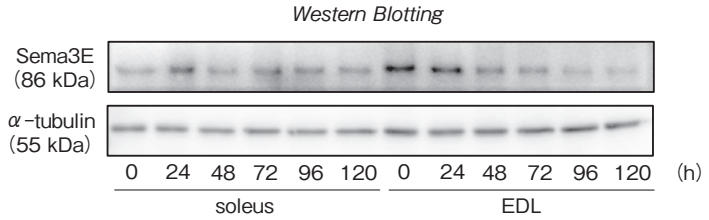

Fig. 1　Sema3E synthesis patterns in satellite cells during myogenic differentiation.
The proliferated soleus- and extensor digitorum longus (EDL)-derived satellite cell single-subcultures were maintained in differentiation medium (DMEM supplemented with 5% horse serum, 0.5% gentamicin reagent, 1% antibiotic-antimycotic solution) until 120 h. Sema3E protein expression level in the satellite cells during the myogenic differentiation phase was detected with Western Blotting, standardized to α-tubulin expression level.

© The Ito Foundation

は，分化誘導開始時から24時間目にかけてSema3Eの合成量が最大であり，その後徐々に減少することが確認された。なお，マウス由来筋芽細胞株C2C12を分化誘導した際のSema3Eの発現パターンについては過去に別の研究グループより報告があり，細胞での合成量は分化開始時にピークを迎えること，ならびに細胞からの分泌量は分化誘導48時間目にピークを迎えて，その後減少することが分かっている[15]。細胞種や培養条件の違いから，本研究で得られた結果と過去の知見は完全に一致はしないが，Sema3Eは衛星細胞の分化誘導初期に多量に合成されるという共通点が明らかとなった。よって，衛星細胞で合成されるSema3Eが分化誘導過程で生理機能を有する可能性が高まった。

3.2　Sema3Eノックダウン処理による衛星細胞の筋分化および筋管形成能の変化

分化誘導過程にある衛星細胞（筋芽細胞）でのSema3Eの機能を解析するため，特異的siRNAトランスフェクションによるノックダウン処理を行い，Sema3E発現抑制実験系における分化・融合能の変化を調べた。本項では，EDLより単離した衛星細胞を用いて検証作業を進めた。

Sema3Eの発現レベルがピークを迎える分化24時間目において，Sema3Eならびに筋管形成の制御に深く関わる転写因子群myogenic regulatory factors（MyoD，myogenin）の発現量を調べた（**Fig. 2**）。2種の特異的siRNAトランスフェクションによって，効率的なSema3Eノックダウンが確認された。MyoDならびにmyogeninの発現量は，Sema3E siRNA①のトランスフェクションによる変化は認められなかったが，siRNA②ではmyogeninの有意な増加が認められた。つまり，Sema3Eは筋管の形成にはネガティブな作用を有することが示唆された。

続いて，衛星細胞（筋芽細胞）同士が融合する

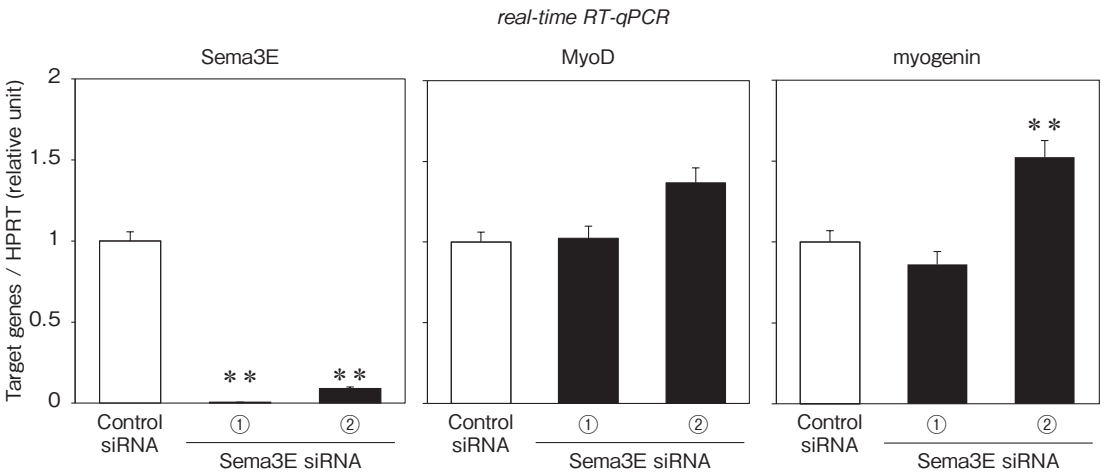

Fig. 2　Myogenic Regulatory Factors（MRFs）expression profiles following Sema3E knockdown treatment in satellite cells at the early myogenic differentiation phase.
The single-subcultures of each satellite cell isolated from EDL muscle were proliferated for 24 h, transfected with Sema3E-speific small-interfering RNAs（siRNAs）, and maintained in differentiation medium for 24 h. The mRNA expression level of Sema3E, MyoD, and myogenin was evaluated by real-time RT-qPCR normalized to hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase（HPRT）level. The bars depict the mean ± standard error of mean（SEM）of three independent cultures by relative units, compared to control-siRNA-treated culture. Significant differences from the mean of control-siRNA-treated cultures（the left-most open bar）at $p<0.01$ are indicated by double asterisks, respectively.

© The Ito Foundation

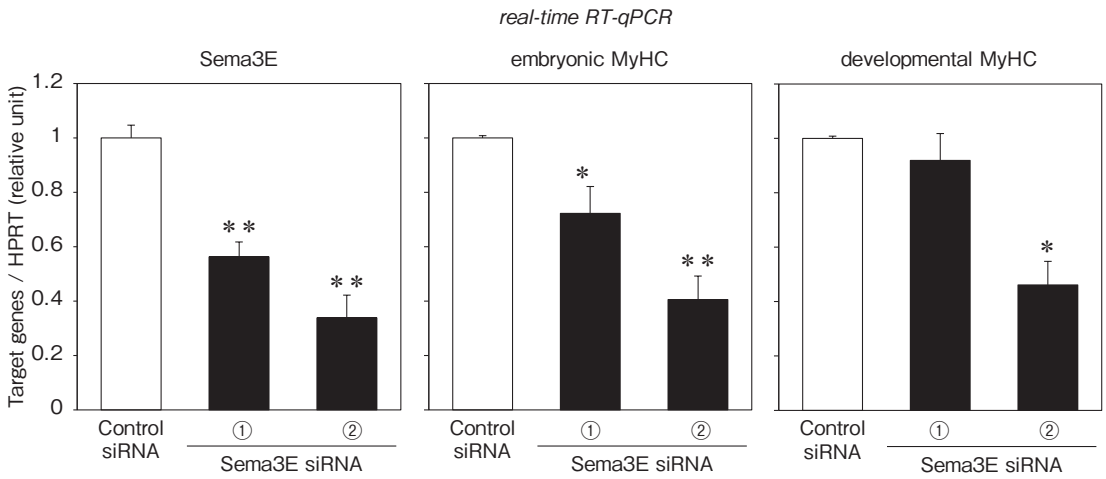

Fig. 3　Myosin heavy chain（MyHC）isoforms expression levels following Sema3E expression knockdown in satellite cells at the early myogenic differentiation phase.
As well as Figure 2, proliferated the single-subcultures of each satellite cell isolated from EDL muscle were cultured in differentiation medium transfected with Sema3E-specific siRNAs for 120 h. The mRNA expression level of Sema3E, embryonic MyHC, and developmental MyHC was evaluated by real-time RT-qPCR normalized to HPRT level. The bars depict the mean ± SEM of three independent cultures by relative units, compared to control-siRNA-treated culture. Significant differences from the mean of control culture（the left-most open bar）at $p<0.05$ or $p<0.01$ is indicated by single or double asterisks, respectively.

ことで筋管の形成が進んだ状態にある分化120時間目まで，Sema3Eノックダウン処理を維持したサンプルを用いて，筋管マーカーとなるミオシン重鎖（myosin heavy chain；MyHC）アイソフォームのembryonic MyHCならびにdevelopmental MyHCの発現量を調べた（**Fig. 3**）。本タイミングにおいても，Sema3Eのノックダウンが確認された。Sema3E siRNAトランスフェクションによってControl siRNAよりもembryonic MyHCの発現量は有意に減少し，siRNA②ではdevelopmental MyHCの発現量も有意に減少した。本タイミングでの結果は，先の結果に基づく予想に反してSema3Eは筋管形成に必須であることが示唆された。

そこで，総ミオシン重鎖（total MyHC）陽性な筋管を，蛍光免疫染色法を用いて検出した（**Fig. 4**）。本免疫染色像において，Sema3Eノックダウン処理によりtotal MyHC陽性の細胞がほとんど確認できなかったため，明らかな筋管形成能の低下が認められた。よって，Sema3Eは筋管形成誘導，すなわち衛星細胞（筋芽細胞）同士の融合を促進する機能を有することが認められた。

本見解は，Sema3Eノックダウン処理を行った分化24時間目でのMRFs，特にmyogeninの発現増加とは矛盾する可能性があるが，Sema3Eの制御下にある因子はMRFsではなく，筋管形成に必須とされる筋融合促進タンパク質のMyomakerやMyomixerなどをターゲットとしているのではないかと予想している[16, 17]。今後は，Sema3Eの特異的受容体であるplexin D１や，他の多機能性因子Sema3Dおよびnetrin-4といった因子にも着目したアプローチを展開する。各研究成果を通して，衛星細胞が産生する多機能性因子を介した自律的筋肥大システムのプラットフォームを形成し，食肉生産現場への応用を目指したい。

© The Ito Foundation

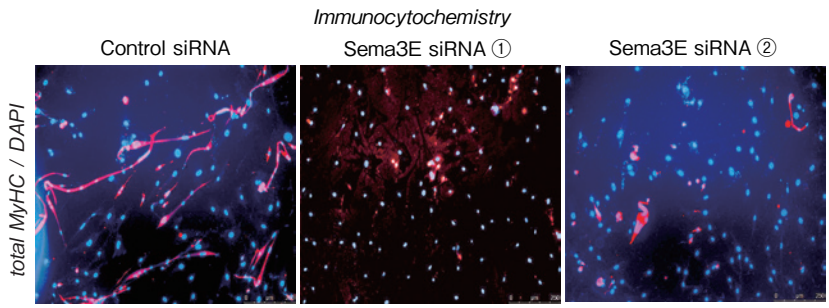

Fig. 4　Myotubes fusion would be regulated after Sema3E knockdown treatment.
As well as Figure 2 and 3, the single-subcultures of each satellite cell isolated from EDL muscle were grown in proliferation medium for 24 h, transfected with Sema3E-specific siRNAs in differentiation medium, and incubated for 120 h. Immunofluorescence microscopy for total myosin heavy chain (MyHC) (red) and DAPI (blue) at 120 h after Sema3E knockdown shows myotubes containing all myofiber types and nuclei, respectively. The scale bar represents 250 μ m.

4．要　　約

効率的な食肉生産技術開発のためには，家畜や家禽といった動物１個体あたりの骨格筋量を増加させる必要がある。骨格筋細胞（筋線維）の数や容積の増加は困難であるが，組織特異的な幹細胞である筋衛星細胞（衛星細胞）の分化や筋芽細胞の融合能が高まることで，飼育時から出荷時まで効率的に筋量が増加し，生産量の増大が可能となることを期待している。我々は，衛星細胞自身が産生する多機能性因子を介して，分化・融合能のポテンシャルを最大限に発揮する自律的筋肥大システムの解明を目指している。本研究では，多機能性因子の１つであるsemaphorin 3E（Sema3E）に着目して，分化誘導過程における衛星細胞での合成量プロファイル，ならびに発現抑制実験系にて衛星細胞（筋芽細胞）の分化・融合能の変化を調べた。Sema3Eは，分化誘導のごく初期段階で多量に合成され，その後低下する合成パターンであることを確認した。Sema3Eの発現抑制処理は，筋分化の制御に関わる転写因子myogeninの発現量を増加させる傾向を示したが，筋管の形成すなわち融合能の低下を起こした。よって，Sema3Eは衛星細胞が筋管を形成するために必須であると推測できる。今後は，Sema3E特異的受容体にも着目して，筋管形成に関わる分子メカニズムについての検証を進める必要がある。同時に，他の多機能性因子の生理機能も明らかとして，衛星細胞による自律的な筋肥大システムのプラットフォーム形成を目指す。

文　　献

1）　水野谷航：食肉の科学, **57**, 7～17, 2016.
2）　Mauro, A.：*J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 493～495, 1961.
3）　Tatsumi, R., Allen, R. E.：*Anim. Sci. J.*, **79**, 279～290, 2008.
4）　Tatsumi, R.：*Anim. Sci. J.*, **81**, 11～20, 2010.
5）　Hara, M., Tabata, K., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Mizunoya, W., Nakamura, M., Nishimura, S., Tabata, S., Ikeuchi, Y., Sunagawa, K., Anderson, J. E., Allen, R. E., Tatsumi, R.：*Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, **302**, C1741-C1750, 2012.
6）　Yin, H., Price, F., Rudnicki, M. A.：*Physiol. Rev.*, **93**, 23～67, 2013.
7）　Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Sato, Y., Ojima, K., Hara, M., Mizunoya, W., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Anderson, J. E., Tatsumi, R.：*Int. J. Bichem. Cell Biol.*, **45**, 476～482, 2013.
8）　Tatsumi, R., Suzuki, T., Do, M.-K. Q., Ohya, Y., Anderson, J. E., Shibata, A., Kawaguchi, M., Ohya, S., Ohtsubo, H., Mizunoya, W., Sawano, S., Komiya, Y., Ichitsubo, R., Ojima, K., Nishimatsu, S-I., Nohno,

© The Ito Foundation

T., Ohsawa, Y., Sunada, Y., Nakamura, M., Furuse, M., Ikeuchi, Y., Nishimura, T., Yagi, T., Allen, R. E.：*STEM CELLS*, **35**, 1815～1834, 2017.
9） Suzuki, T., Mori, A., Maeno, T., Arimatsu, R., Ichimura, E., Nishi, Y., Hisaeda, K., Yamaya, Y., Kobayashi, K., Nakamura, M., Tatsumi, R., Ojima, K., Nishimura, T.：*Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 4499, 2021.
10） Alto, L. T., Terman J. R.：*Methods Mol. Biol.*, **1493**, 1～25, 2017.
11） Rosenblatt, J. D., Parry, D. J., Partridge T. A.：*Differentiation*, **60**, 39～45, 1996.
12） Collins, C. A., Zammit, P. S.：*J. Audet, W.L. Stanford*（*Eds.*）*, Stem Cells Regen. Med., Humana Press*, 319～330, 2009.
13） Kitajima, Y., Ogawa, S., Ono, Y.：*Methods Mol. Biol.*, **1516**, 183～193, 2016.
14） Oe, M., Ojima, K., Muroya, S.：*Physiol. Genomics*, **53**, 69～83, 2021.
15） Henningsen, J., Rigbolt, K. T. G., Blagoev, B., Pedersen, B. K., Kratchmarova, I.：*Mol. Cell. Proteomics*., **9**, 2482～2496, 2010.
16） Millay, D. P., O'Rourke, J. R., Sutherland, L. B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J. M., Bassel-Duby, R., Olson, E. N.：*Nature*, **499**, 301～305, 2013.
17） Bi, P., Ranirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J. R., Shelton, J. M., Sanchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., Olson, E. N.：*Science*, **356**, 323～327, 2017.

© The Ito Foundation

食肉の複素誘電応答に基づく肉質評価技術の開発

Meat quality evaluation based on complex dielectric response

村　松　大　陸
（電気通信大学大学院情報理工学研究科）

Dairoku Muramatsu
（Graduate School of Informatics and Engineering, The University of Electro-Communications）

Commercial meats are labeled with information such as place of origin, species, and part of the meat, and this information is used as a criterion for consumers when making purchases. However, detailed information on meat “palatability” such as fat content, texture, and flavor is generally not indicated. To analyze such information on meat quality, sensory and physical/chemical tests by evaluators with special identification abilities are required, which are costly and time-consuming. Furthermore, these analytical methods require sample preparation and solution extraction, making it difficult to analyze all of the various meat qualities obtained from a single animal. It is also important to analyze meat quality in its final commercial state, since texture and flavor are greatly affected by enzymatic self-digestion, or aging, that occurs after rigor mortis. In this study, we focused on the fact that the electrical constants of meat depend on the meat quality, and conducted a basic study to develop a simple, rapid, and nondestructive meat quality evaluation technique based on the electromagnetic response to electromagnetic waves in the intermediate frequency range. In this study, we focused on the fact that the electrical constants of meat depend on meat quality, and aimed to develop a meat quality evaluation technique based on the electromagnetic response to electromagnetic waves in the intermediate frequency band. As a basic study, a method for controlling/measuring meat samples and a probe structure effective for evaluating meat quality based on electromagnetic response were investigated. As a result, it was confirmed that the developed multi-channel measurement system for the meat aging process can measure the electromagnetic response of meat during the aging process. In addition, the system was used to measure the electromagnetic response of beef rounds. The characteristics of the proposed probe structure were discussed by measuring changes in bioimpedance over time using two types of samples.

1．目　　的

市販の食肉には，原産地，畜種，部位，消費期限などが表示されており，消費者が購入する際の重要な基準となっている。しかし，脂肪交雑，食感，風味といった食肉の「おいしさ」に関係する詳細な情報は表示されていないのが一般的である。これらの肉質に関する情報を分析するためには，特殊な識別能力を持った評価者による官能検査や，大規模な装置を用いた理化学検査が必要で

© The Ito Foundation

あり，多大なコストと時間を要する。さらに，これらの分析手法はサンプルの調理や溶液抽出が必要な破壊検査であり，１頭の個体から得られるさまざまな肉質の食肉をすべて分析することはきわめて困難である。また，食感や風味は死後硬直後に生じる肉内部の酵素による自己消化，すなわち熟成により大きく変化するため，熟成を経て最終的に市販される状態で肉質を分析することも重要となる。本研究では，食肉の電気定数が脂肪交雑や熟成の進行状況といった肉質に依存することに着目し，中間周波数（kHz～MHz）帯の電磁波に対する電磁応答を評価基準とした簡便・迅速・非破壊的な肉質評価技術の開発を目指す。具体的には**Fig. 1** に示すように，食肉表面に接触や刺突したプローブから電磁波を肉内部に入力する。脂肪含有量や熟成の進行に伴う保水量の変化に応じて食肉の電気定数も変化するため，肉質状態は電磁応答（例えばバイオインピーダンスの変化）として現れると予想される。この応答をプローブで検出し肉質を推定・評価する。

食肉の品質や鮮度を工学的手法で評価する試みは国内外に多数存在する[1, 2]。特に本研究と関連の深いインピーダンスに基づく方法では，牛肉の品種と部位を特定する試み[3]，カット肉の脂肪量推定[4]，肉牛の脂肪交雑値推定[5]，筋線維の方向を考慮したテクスチャ（食感）推定[6]，電気定数測定による食肉の鮮度評価[7]，などが行われている。このように食肉の品質や鮮度を電気的に評価する試みは一定の注目を集めているが，用いられているのはインピーダンスの「大きさ」という一次元量であり，脂肪量や水分量といった限定されたパラメータの評価にとどまっているのが現状である。一方，食肉ではなく人体組織の複素誘電特性を再現する電磁ファントムの検討は，医療機器や通信システム開発の分野で多数の例があり，著者らも長年取り組んでいる[8]。ただし，従来ファントムが再現するのは生体，すなわち生きている組織の複素誘電特性であり，と殺後に時間が経過して細胞構造の破壊が進んだ食肉とは異なる特性を持つと予想される。また，従来ファントム，特に寒天主材の高含水ゲルファントムなどは，測定直前に試薬を混合・成形して作製し，保水量の変化などに起因する電気定数の変化を嫌って実験後には速やかに廃棄する場合が多い。このため，食肉の熟成過程を評価する際に必要となる適正な管理方法や経時的な特性変化の測定方法も確立されていない。このように，食肉と電磁波の相互作用の品質評価への応用は一定の期待と基盤が存在する一方，研究分野や産業手法としては未開拓といえる。このため本研究では，（1）対象となる食肉サンプルの管理／測定方法，（2）電磁応答に基づく食肉品質評価に有効なプローブ構造，の基礎的な項目に特に注目して検討を行った。

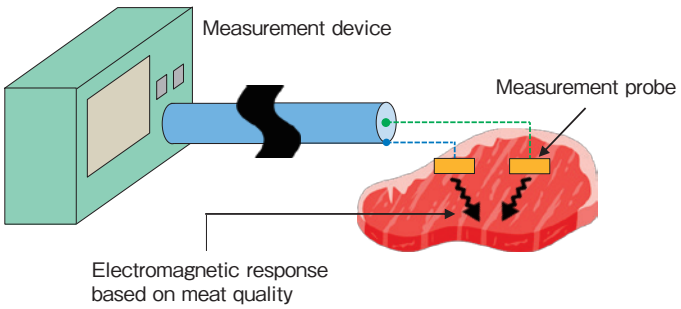

Fig. 1　Meat quality evaluation based on electromagnetic response

© The Ito Foundation

2．方　法

本研究では，熟成に適した温度や湿度，腐敗を防ぐ適切な衛生状態などが保たれた管理環境と，熟成の進行に伴う電磁応答特性を長期間かつ安定的に評価できる環境を両立することが必須である。まず食肉の熟成には，骨つき枝肉や塊肉のまま温湿度を管理した庫内で熟成を進めるドライエイジングと，細かく分割した食肉を真空パックや脱水シートに包み外気から遮断して熟成を進めるウェットエイジングの方法がある。２つの方法をそれぞれ試し，熟成の進行が速いこと，プローブの装着が容易なこと，そして産業的な食肉熟成に多く用いられることなどを考慮し，専用の熟成庫（Landig＋Lava GmbH&Co.KG，DRY AGER DX500P）を用いたドライエイジングを本研究では採用した。本熟成庫は熟成に適した温度１～３℃，湿度60～80％程度を維持可能で，活性炭フィルターUVC滅菌システムにより庫内の有害な細菌を滅菌して衛生状態を保つことが可能である。また，庫内のトレイ位置や配置方法（トレイに置く，ハンガーで吊す）は柔軟に変更可能であり，後述する測定機器やプローブを容易に食肉に接続できる。

次に電磁応答の測定システムについて述べる。本研究では，電磁波の透過／反射の度合いを表すSパラメータや複素誘電率といったさまざまな電磁応答のうち，規模の小さな装置でも比較的容易に測定できるバイオインピーダンスを評価パラメータとして採用した。バイオインピーダンスの測定にはインピーダンスアナライザ（Keysight，E4990A）を用いる。本研究では，より多角的かつ詳細に提案手法の評価を行えるように，「複数の異なる種類の食肉を」「複数の異なる構造のプローブで」「同時に」「長期間安定して」評価可能なシステムを構築した。前述した熟成庫と測定機材を統合した食肉熟成過程の多チャンネル測定システムを**Fig. 2**に示す。本測定システムは，熟成庫，無線温湿度計，プローブ，同軸切替装置，インピーダンスアナライザで構成されている。熟成庫内に配置された食肉には複数の異なるプローブ（詳細は後述）が取り付けられており，各プローブは同軸切替装置を介してインピーダンスアナライザに接続されている。同軸切替装置はプローブ側が８チャネルあり，いずれのチャネルをインピーダンスアナライザに接続するかをスイッチで容易に切り替えることができる。これにより，測定対象の食肉やプローブの種類を変更するたびに熟成庫内から食肉サンプルを取り出しプローブの脱着を行う必要がなくなり，電気的に安定した測定が可能となる。また，本同軸切替装置の内部回路は単純なスイッチやリレーで接続有無を切り替えているわけではなく，接続チャネルに対してはインピーダンス整合を維持して伝送路における不

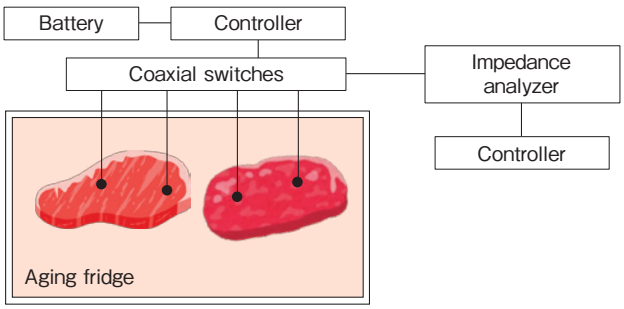

Fig. 2　Multi-channel measurement system for aging process

© The Ito Foundation

要な反射を防いでいる。接続時の入出力VSWRは1.3以下であり，本同軸切替装置がインピーダンス測定に与える影響はきわめて微小と考えられる。さらに，非接続チャネルはすべて内部終端回路に接続される仕様としており，非測定チャネルからの外乱を抑制する効果がある。加えて，熟成庫の扉開閉も不要となるため，開閉時のケーブルの位置ズレや庫内温湿度の変動も極限まで抑制することができる。測定期間中の温湿度を１分ごとに測定し2.4GHz帯無線でサーバに送信し記録した結果，きわめて安定した庫内環境を実現していることを確認している。

３．結果と考察

本研究では，提案法におけるバイオインピーダンス測定に有効なプローブとして，**Fig. 3**（**a**）に示す表面貼付型フレキシブル電極と，（**b**）に示す穿刺型セミリジッド同軸電極の，２種類の構造について検討した。表面貼付型フレキシブル電極はポリイミド素材を基板とし，基板上に圧延Cuを基材として表面をAuメッキ処理することで電極を構成した。電極は各８×24mm^{2}の矩形形状で，８mmの間隔で配置した。両電極は同軸コネクタの内外導体にそれぞれ接続されている。本電極は容易に屈曲させることができ，食肉のさまざまな部位に密着して配置可能である。また，使用後は表面を洗浄することで繰り返し使用も可能である。穿刺型セミリジッド同軸電極は，食肉に突き刺すことで内部品質を安定して計測することを目的に開発した。内導体は２mm，外導体は10mmの長さで，内外導体間には２mmの誘電体を残してある。

開発した２種類のプローブ構造を評価するため，実際の食肉サンプルおよび先に述べた食肉熟成過程の多チャンネル測定システムを用いて食肉のバイオインピーダンス測定を行った。食肉サンプルを**Fig. 4**（**a**）に，実験の様子を（**b**）に示す。食肉部位としては容易に入手が可能な牛もも肉ブロックを選択し，赤身が多い豪州産牛もも肉と適度な脂肪交雑がある和牛もも肉の２種類を用い

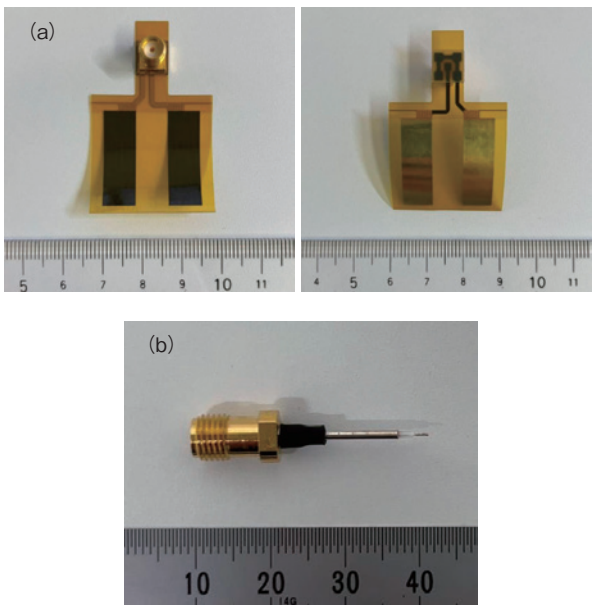

Fig. 3　(a) Surface-applied type flexible electrode　(b) Puncture-type semi-rigid coaxial electrode

© The Ito Foundation

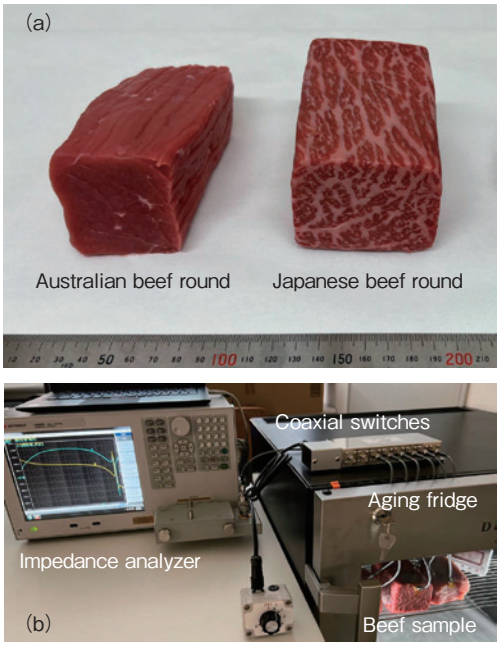

Fig. 4　(a) Meat samples (Australian beef round and Japanese beef round)
(b) Experiments using the developed measurement system and probes

た。面貼付型フレキシブル電極は初期配置からずれないように，表面をパラフィルムで覆い固定した。いずれのサンプルも$60\times60\times100\text{mm}^3$のブロックとなるように測定開始前にトリミングを行った。食肉サンプルのバイオインピーダンスの10MHzにおける測定結果を**Fig. 5** に示す。上段はバイオインピーダンス測定値そのままの値として，下段はバイオインピーダンスを各プローブおよび食肉の測定開始時点のインピーダンスで規格化した値として示した。**Fig. 5** から分かるように，いずれの食肉サンプルおよびプローブ使用の場合でも，測定開始直後はバイオインピーダンスの実部と虚部はともに増加することが分かった。このインピーダンスの変動は数時間という短時間の間に生じているため，肉内部の酵素による自己消化，すなわち熟成の影響とは考えにくく，プローブと食肉の境界面状態の変化による影響と考えられる。このような変化は一般に接触面積の大きな電極で観測されるが，今回の測定では表面貼付型フレキシブル電極および穿刺型セミリジッド同軸電極の両方で同様の短期的なインピーダンス増加が観測された。食肉品質の評価を正確に行うためには，電極装着後に電極―境界面状態が安定するまで一定時間待つ，あるいは境界面状態の変動を予測して電磁応答特性を評価する必要があると考えられる。次に，食肉サンプルごとのインピーダンス変化について考察する。まず，豪州産牛もも肉のインピーダンスは和牛もも肉に比較してバイオインピーダンスは小さな値となった。これは両畜種の脂肪交雑の違いに影響されており，脂肪交雑が小さい赤身の肉ほど導電率が大きく，インピーダンスが小さくなったと考えられる。次にプローブごとのインピーダンス変化について考察する。同一の食肉サンプルを用いた場合は，穿刺型セミリジッド同軸電極に比較して表面貼付型フレキシブル電極のほうが小さなインピーダンスを示

© The Ito Foundation

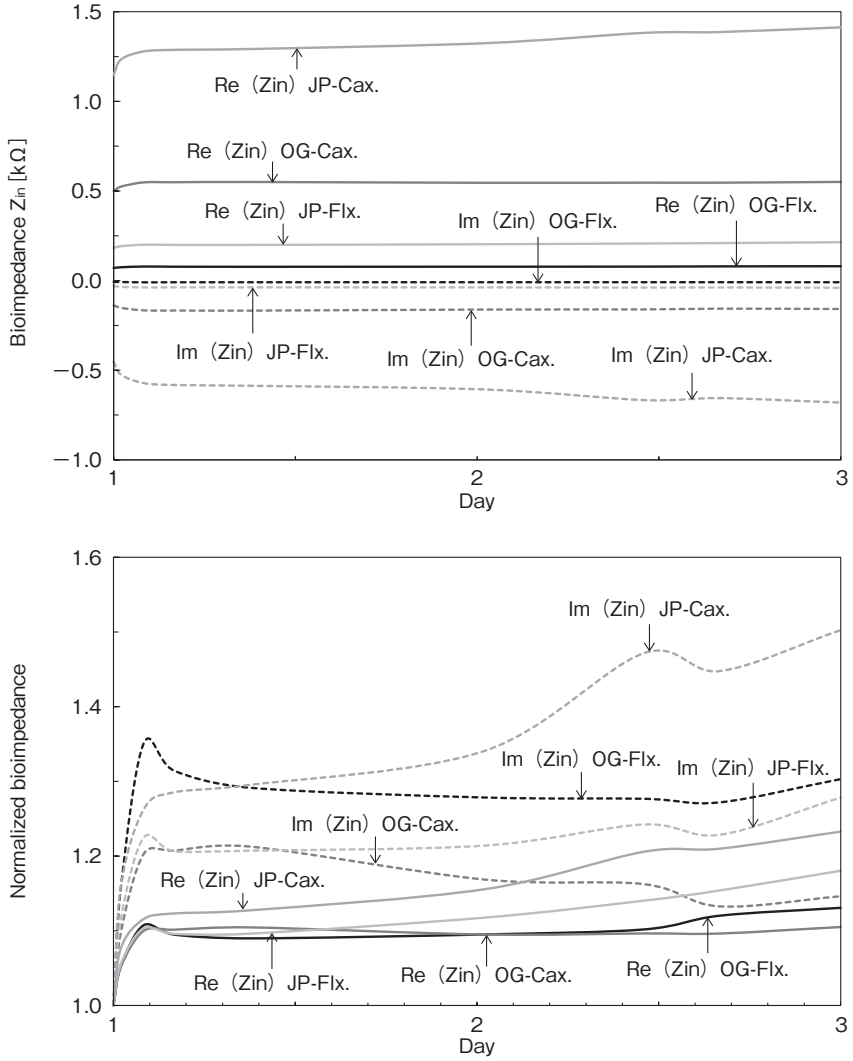

Fig. 5　Measure bioimpedance of meat samples（top：raw value, bottom：normalized value）

している。これは表面貼付型フレキシブル電極が各８×24mm^{2}の矩形形状で比較的接触面積が大きいのに対し，穿刺型セミリジッド同軸電極は内導体の接触部分が２mmしかないことが理由と考えられる。数値電磁界解析により表面貼付型フレキシブル電極および赤身肉をモデル化し電極入力インピーダンスを計算した結果，実験で得られた値50Ω程度とほぼ一致することを確認している。現状ではいずれのプローブ構造がより食肉の品質を正確に評価できるかは検討段階であり，必要に応じて詳細な構造寸法を調整する予定である。また，熟成開始から１週間程度を過ぎると食肉の保水量が低下し，プローブ電極と食肉サンプルの間に空隙が生じる場合があることを確認している。このような空隙が生じると食肉品質の評価に影響を与えることから，プローブの固定法についてもより詳細な検討が必要であると考えられる。

４．要　　約

本研究では，食肉の電気定数が肉質に依存する

© The Ito Foundation

ことに着目し，中間周波数帯の電磁波に対する電磁応答を評価基準とした肉質評価技術の開発を目指した。基礎的な検討として，食肉サンプルの管理／測定方法および電磁応答に基づく食肉品質評価に有効なプローブ構造について検討を行った。その結果，開発した食肉熟成過程の多チャンネル測定システムで食肉の熟成過程の電磁応答を測定可能なことを確認した。さらに。豪州産牛もも肉と和牛もも肉の２種類のサンプルを用いてバイオインピーダンスの経時変化を測定し，提案プローブ構造の特徴について考察した。

文　献

1） Liyun, Z., *et al.*：Quality Evaluation of Meat Cuts, *Computer Vision Technology for Food Quality Evaluation*, 111～138, 2008.

2） Ashim, B., *et al.*：Current perspectives of meat quality evaluation: techniques, technologies, & challenges, *Meat Qual. Anal.*, 3～17, 2020.

3） 谷原礼論他：生体電気インピーダンス解析による牛肉の品種及び部位特定技術，先端技術等地域実用化研究促進事業，2003.

4） 豊田淨彦他：牛肉の電気インピーダンスモデルの構築―筋肉，脂肪から構成されるカット肉の電気特性―，農業機械学会関西支部報，**106**，73，2009.

5） 橋元大介他：生体インピーダンス法による肉牛の脂肪交雑値推定，計測自動制御学会論文集，**52**(3)，188～194，2016.

6） 村元隆行他：接触型電極を用いたインピーダンス測定による牛肉テクスチャの非破壊推定，日本畜産学会報，**88**，2017.

7） 高坂千明他：電気定数測定による食肉の鮮度評価に関する基礎検討，電子情報通信学会総合大会，C-2-81，2019.

8） Muramatsu, D., *et al.*：Development and Study of Electrical Property on Phantom for Human Body Communication Considering Tissue Structure of Human Arm, *Trans. JIEP*, **17**(1), 63～68, 2014.

© The Ito Foundation

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

Development of plasma technology for degrading and inactivating the causative agents of foodborne disease

作　道　章　一
（岡山理科大学獣医学部獣医学科）

Akikazu Sakudo
(School of Veterinary Medicine, Okayama University of Science)

We previously demonstrated that an atmospheric pressure dielectric barrier discharge (APDBD) plasma generated by a roller conveyer plasma instrument is effective for killing bacteria and fungi in foods. In the present study, we have further investigated whether the roller conveyer plasma instrument can be used to degrade toxins of foodborne bacterial pathogens, including *Staphylococcus aureus* enterotoxin B and *Bacillus cereus* cereulide. Each toxin was spotted on an aluminum plate, allowed to dry, and then treated with APDBD plasma applied by a roller conveyer plasma instrument for 0, 15, and 30 min. Enzyme-linked immunosorbent assay showed that the amount of enterotoxin B was reduced in a time-dependent manner. In addition, a latex agglutination test using anti-enterotoxin B antibody-coated latex beads supported the degradation of enterotoxin B by APDBD plasma. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis further showed that the amount of cereulide decreased after treatment with APDBD plasma. Taken together, these findings suggest that the foodborne toxins can be degraded by APDBD plasma treatment using a roller conveyer plasma instrument. Therefore, this plasma method may be potentially useful for eliminating toxins from foods or contaminated materials.

1．目　　的

食中毒は多くの場合，ウイルスや細菌などに汚染した食品を摂取することにより生じるが，微生物が産生する毒素を介して食中毒を引き起こすこともある[1)]。例えば，穀類やその加工品（焼飯類，米飯類，麺類）が汚染することの多いセレウス菌（*Bacillus cereus*）はセレウリドを産生して嘔吐を伴う食中毒を引き起こす。一方，デンプン質の多い食品で増殖しやすい黄色ブドウ球菌（*Staphylococcus aureus*）はエンテロトキシンを産生し，食中毒を引き起こす。これらセレウリドやエンテロトキシンは，加熱や酸，アルカリ，消化酵素で分解されず加熱調理しても分解しない。このことから，食中毒を防ぐには，菌だけでなく，これらの食中毒誘発物質も無害化させることが必要である。

最近，申請者らは，物理的処理技術の一つであるプラズマを用いて，さまざまな細菌やカビの殺菌に成功した[2～5)]。さらに，ローラーコンベア型

© The Ito Foundation

プラズマ装置と名付けた果実の殺菌に適した独自のプラズマ装置を用いて細菌やカビの不活化が可能であることを明らかにした[6,7]。

そこで本研究では，ローラーコンベア型プラズマ装置を用いてプラズマ処理によりセレウリドやエンテロトキシンの分解が可能かについて解析を行った。

2．方　法

2.1　ローラーコンベア型プラズマ装置を用いたプラズマ処理

本研究では，以前に報告したローラーコンベア型プラズマ装置を用いてプラズマ処理を行った[6]。30mmの直径のプラスチック製の棒のまわりをアルミで包み，さらに，その上を0.5mmの厚さのシリコンシートで覆った構造を持つローラーを電極として50mm間隔で高電圧電極と接地電極として交互に配置した（**Fig. 1**）。この電極の間にはVpp（ピークピーク値）10kV，周波数10kHz（LHV-10AC，ロジー電子）の高電圧電源を接続し，大気圧誘電体バリア放電（APDBD：Atmospheric Pressure Dielectric barrier discharge）による空気由来のプラズマを発生させた。毒素サンプルは0.3mmの厚さのアルミニウム板上に20 μl 滴下乾燥した。そして，アルミニウム板を高電圧電極と接地電極の間に設置してプラズマ処理を行った。

2.2　毒素

黄色ブドウ球菌S 6株よりSchantzらの方法[8]でイオン交換クロマトグラフィーを用いて精製された0.5mg/mlエンテロトキシンB（LIST BIOLOGICAL LABORATORIES INC, Product #122）を用いた。また，和光純薬より入手したセレウリド標準液（50 μg/ml）も用いた。

2.3　Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）による黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの定量

RIDASCREEN® SET Total（CAT No. R4105, r-Biopharm）を用いて，インストラクションに従いエンテロトキシンの定量を行った。吸光度はマイクロプレートリーダー（Model680，Bio-Rad）を用いて450nm（参照波長630nm）を測定し，希釈したエンテロトキシンを用いて作成した検量線から吸光度を指標に濃度を算出した。なお，本ELISAキットはエンテロトキシンA，B，C，D，Eのいずれも検出できる。

2.4　ラテックス凝集アッセイによる黄色ブドウ球菌エンテロトキシンの解析

SET-RPLA「生研」（デンカ生研）を用いて，インストラクションに従いV底マイクロプレートでの凝集反応を指標にエンテロトキシンの検出を行った。検出には抗ブドウ球菌エンテロトキシンB抗体感作ラテックスを用い，コントロールとして対照ラテックスを用いた。

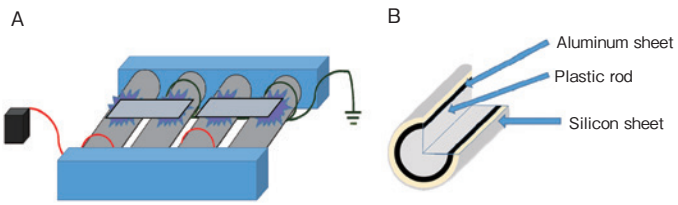

Fig. 1　Schematic showing atmospheric pressure dielectric barrier discharge（APDBD）plasma treatment of bacterial toxins.（A）Toxins are applied to an aluminum plate and subjected to APDBD treatment using a roller conveyer plasma instrument consisting of high-voltage electrodes and earth electrodes.（B）Both electrodes comprise a plastic rod（30 mm diameter）covered with an aluminum sheet（0.02 mm thickness）and a silicon sheet（0.5 mm thickness）. A high-voltage-power supply［10 kHz, 10 kV（$V_{peak\ to\ peak}$）］is used to generate the APDBD plasma[7].

© The Ito Foundation

2.5　液体クロマトグラフ―タンデム型質量分析計（LC-MS/MS）によるセレウリドの測定

希釈した検量線用標準溶液２μlをLC-MS/MSに注入し，得られたセレウリドのピーク面積から検量線を作成した。そして，同様に試料溶液２μlをLC-MS/MSへ注入し，検量線との面積の比較から，試料溶液中のセレウリドの濃度を算出した。なお，LC-MS/MSの測定条件は下記のとおりである。

LC部：LC-30AD（島津製作所）

MS部：Triple Quad 6500＋（AB SCIEX Pte. Ltd.）

カラム：Mightysil RP-18 GP，φ2mmX50mm（関東化学）

カラム温度：40℃

移動相：A液（２mmol/lギ酸アンモニウム溶液およびギ酸の混合溶液（1000：１）

B液（メタノールおよび0.2mol/lギ酸アンモニウム溶液の混合溶液（990：10）

グラジエント：A液およびB液の混合溶液（20：80）０min

A液およびB液の混合溶液（10：90）０min→10min

A液およびB液の混合溶液（10：90）10min→16min

流量：0.2ml/min

注入量：２μl

イオン化法：ESI（正イオン検出モード）

イオン化温度：450℃

イオン化電圧：5500V

DP電圧：166V

コリジョンガス：窒素

セレウリド測定のための設定質量（*m/z*）およびコリジョンエネルギー（CE）：1171→357（定量イオン）および91eV；1171→314（確認イオン）および97eV

2.6　統計解析

GraphPad Prism 7（GraphPad Software）を用いてNon-repeated ANOVA followed by Bonferroni correctionにより有意差検定を行った。なお，数値は平均 ± SEM（standard error of the mean）で表示した。

3．結果と考察

まず，プラズマ処理が黄色ブドウ球菌のエンテロトキシンに与える影響を明らかにするために，黄色ブドウ球菌Ｓ６株より精製して得られたエンテロトキシンＢに対してローラーコンベア型プラズマ装置を用いてAPDBDプラズマ処理を行った。そうして得られたエンテロトキシンＢの量をELISAにより定量した結果，プラズマ処理前（０min）のエンテロトキシン量は62.67±3.46μg/ml（0min）であったのに対し，15minのプラズマ処理により19.17±1.74μg/ml，30minのプラズマ処理では1.43±0.11μg/mlへと有意にエンテロトキシン量が減少した（**Fig. 2**）。

さらに，ラテックス凝集アッセイで凝集価を測定したところ，０minでは2^{11}以上であったものが30min処理では2^{0}以下であり，０minと比較して顕著な減少が観察された。

次に，プラズマ処理がセレウリドに与える影響を調べた。ローラーコンベア型プラズマ装置によるAPDBD処理後のセレウリドをLC-MS/MSで解析した。セレウリド標準液で見られたピーク位置と質量分析（m/z 1171→357）でセレウリドのピークを同定した。そのピーク強度をクロマトグラムで比較したところ，APDBDプラズマ処理により，顕著にセレウリドのピークが低下することが明らかとなった（**Fig. 3**）。また，ピークの面積を指標に半定量した結果，０minでは0.14μg/mlであったものが，15min処理および30minでは検出限界以下であった。

© The Ito Foundation

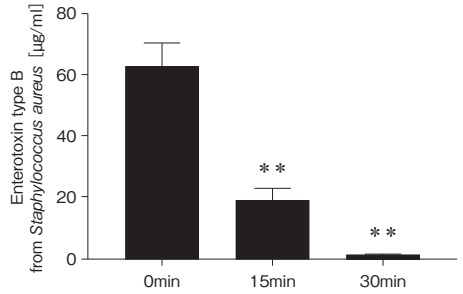

Fig. 2　Enterotoxin type B derived from *Staphylococcus aureus* was subjected to APDBD treatment for 0, 15, and 30 min using a roller conveyer plasma instrument. The amount of enterotoxin type B in the recovered samples was subsequently measured by enzyme-linked immunosorbent assay.　** $p < 0.01$ (vs 0 min).

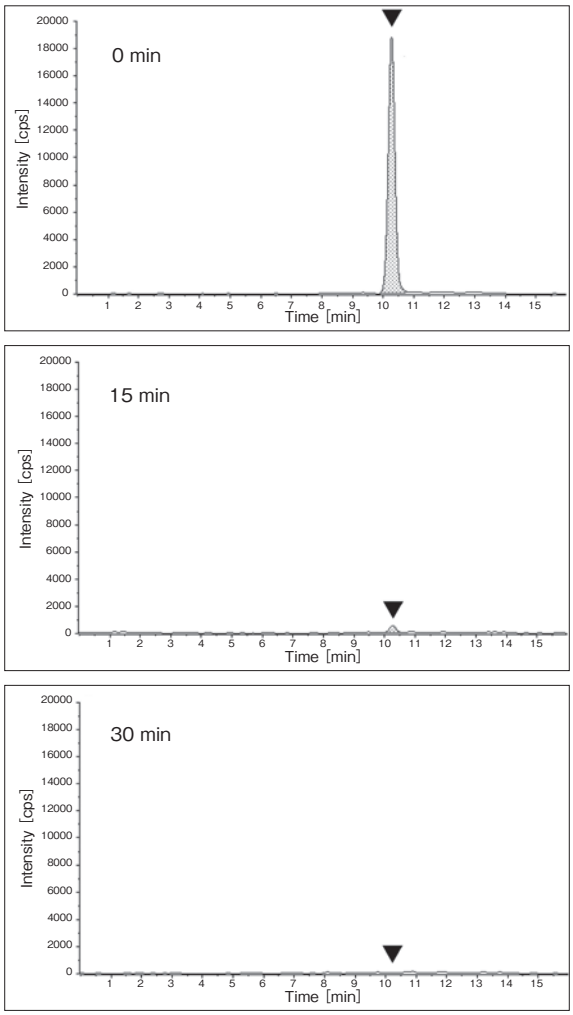

Fig. 3　Cereulide derived from *Bacillus cereus* was subjected to treatment with APDBD plasma for 0, 15, and 30 min using a roller conveyer plasma instrument. The recovered samples were analyzed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and the chromatograms are shown. Peaks due to cereulide (assigned to m/z 1171→357) are indicated (▼).　X-axis, retention time ; Y-axis, signal intensity ; Cps, counts per second.

© The Ito Foundation

本研究により，APDBDプラズマ処理後のエンテロトキシンおよびセレウリドを測定した結果，プラズマにより経時的に分解できることが示唆される。以前の著者らの研究で窒素ガスプラズマ処理によりカビ毒のアフラトキシン[9]や細菌毒素の志賀毒素[10]が分解できることが明らかになっており，これらの結果を総合すると，プラズマ処理は広範な毒素に対して分解効果を持つものと考えられる。これまでの研究でプラズマ発生時にラジカル等の活性種が発生することが明らかとなっていることから，活性種が酸化ストレス作用をもたらして毒素を分解したものと推測される。今後詳細に解析を進め，毒素の分解メカニズムが明確化することで，さらなる分解効果の効率化も可能になり，プラズマ殺菌の実用化が促進されるものと期待される。

４．要　約

これまでに，著者らはローラーコンベア型プラズマ装置を用いて，大気圧誘電体バリア放電プラズマ処理による細菌やカビの殺菌効果を確認している。本研究では，それらの研究を発展させ，プラズマ処理に毒素の分解効果があるのかについて解析した。その結果，黄色ブドウ球菌エンテロトキシンやセレウス菌が産生するセレウリドがプラズマ処理により減少することが分かった。以前の研究で窒素ガスプラズマ処理によりカビ毒のアフラトキシンが分解できることを著者らは明らかにしており，今回の結果はこれに加え，プラズマ処理がエンテロトキシンやセレウリドも分解できることを示唆している。以上の結果より，プラズマ殺菌は広範な毒素の分解に効果的な高度消毒技術であることが明らかとなった。

謝　辞

本研究を進めるにあたり，ご協力いただきました独立行政法人国立高等専門学校機構佐世保工業高等専門学校の柳生義人先生に深く感謝いたします。

文　献

1） 小塚諭：イラスト食品の安全性（第４版），東京教学社，2021.
2） Shintani, H., Sakudo, A.：Gas Plasma Sterilization in Microbiology: Theory, Applications, Pitfalls and New Perspectives, Caister Academic Press, Poole, UK, 2016.
3） Sakudo, A., Shintani, H.：Sterilization and disinfection by plasma: Sterilization mechanisms, biological and medical applications, NOVA Science Publishers, Hauppauge, New York, 2011.
4） 作道章一，山城梨沙，三沢達也：薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌効果とメカニズム解析，平成29年度食肉に関する助成研究調査成果報告書，公益財団法人伊藤記念財団，**36**，3～7，2018.
5） 作道章一，三沢達也：薬剤耐性菌のガスプラズマ殺菌機構解明に向けた分子論的アプローチ，平成30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，**37**，118～122，2019.
6） Sakudo, A., Yagyu, Y.：Application of a roller conveyor type plasma disinfection device with fungus-contaminated citrus fruits, *AMB Express*, **11**(1), 16, 2021.
7） Toyokawa, Y., Yagyu, Y., Misawa, T., Sakudo, A.：A new roller conveyer system of non-thermal gas plasma as a potential control measure of plant pathogenic bacteria in primary food production, *Food Control*, **72**, 62～72, 2017.
8） Schantz, E. J., Roessler, W. G., Wagman, J., Spero, L., Dunnery, D. A., Bergdoll, M. S.：Purification of Staphylococcal Enterotoxin B, *Biochemistry*, **4**(6), 1011～1016, 1965.
9） Sakudo, A., Toyokawa, Y., Misawa, T., Imanishi, Y.：Degradation and detoxification of aflatoxin B_1 using nitrogen gas plasma generated by a static induction thyristor as a pulsed power supply, *Food Control*, **73**, 619～626, 2017.
10） Sakudo, A., Imanishi, Y.：Degradation and inactivation of Shiga toxins by nitrogen gas plasma, *AMB Express*, **7**(1), 77, 2017.

© The Ito Foundation

国産ジビエの衛生管理に資する迅速簡便検査法の開発

Development of rapid detection methods for game meat hygiene

山﨑　朗子[1]・鎌田　洋一[2]・中曽　　譲[3]・彦野　弘一[4]・峯岸　恭孝[5]

（[1]岩手大学農学部共同獣医学科，[2]千里金蘭大学，[3]株式会社ファスマック，[4]帝京科学大学，[5]株式会社ニッポンジーン）

Akiko Yamazaki[1]，Yoichi Kamata[2]，Yuzuru Nakaso[3]，Koichi Hikono[4]and Yasutaka Minegishi[5]

（[1]Cooperative Department of Veterinary Medicine, Iwate University，[2]Senri Kinran University，[3]Fasmac Co., Ltd.，
[4]Teikyo University of Science，[5]NIPPON GENE Co., Ltd.）

In this study, we conducted a field test using a simple rapid test method for game meat. This test method is a fluorescent gene amplification method that can be performed in the field and uses a portable detector based on the LAMP method. *E. coli*, *Salmonella*, and *Campylobacter jejuni* were targeted in this study. Homogenized meat samples of Sika deer from Hokkaido, Mie, and Nagasaki prefectures, which were processed for personal consumtion by disassembly methods that did not follow the guidelines, were used as samples, mixed with gene amplification reagents, and then detected under reaction conditions at 65℃ for 25 minutes. The results showed that all three bacteria were detected to the same extent in all three prefectures. Although background disturbance was observed in some tests and reconfirmation was necessary to determine the detection of the target pathogen, compared to conventional genetic testing methods, such as PCR, the detection time was as short as 25 minutes, a thermal cycler was not necessary because genes could be amplified by maintaining a single temperature. The results also showed that confirmation by electrophoresis was not necessary. Based on these findings, NiGii8 is considered to be a testing method and equipment that can be well used at game meat dismantling sites.

1．目　　的

昨今，我が国では野生動物による農林被害対策として捕獲したシカやイノシシの肉を，ジビエとして有効活用する地域振興事業が行われている[1)]。食肉生産においては衛生管理基準が定められており，施設や生産物に対する定期的な衛生検査や衛生指導などが実施されているが，イノシシやニホンジカ等の解体処理施設において同様のシステムが導入されることは多くない。また，これらの検査については，専門機関等に外注されているため，受検に対するコストの発生と検査結果が出るまでに数日間の日数を要する。そこで本研究では，食肉利用を目的とする捕獲野生動物（シカ・イノシシ）が保有する危害性微生物のうち，国内での感染事例があり，かつ重篤な症状を引き起こす感染症および食中毒症を標的として，それらを簡易に検査できる衛生検査システムを提案する。

© The Ito Foundation

２．方　法

2.1　野外試料採取

これまでの研究で協力を頂いていた三重県，長崎県と，本研究から新たに北海道の協力を得て，令和３年５月から令和５年３月までサンプリングを行った。新型コロナウイルス蔓延の状況下により，日本政府から行動制限がかかったため，当初計画していた数の現地への渡航はかなわず，数を減じた。そのため，猟友会を通じて試料のサンプリングと郵送をお願いした。当初計画していた試料には，血液や唾液，鼻汁，糞を含む拭い液を想定していたが，新型コロナウイルス感染回避のため，血液や臓器内容物，唾液，鼻汁等との接触を避けたいとのサンプリング協力者の希望により，骨格筋を試料とした。捕獲動物の危害性菌の保有状況を把握するため，本研究の試料は捕獲者の自家消費用に解体ガイドラインに沿わず，捕獲現場で内臓を除いた開腹状態で解体施設に運搬し，解体されたものを使用した。日本政府による行動制限のため，頻繁に捕獲に出られないことから，試料はある程度の数を冷凍保存にて確保してから－20℃の冷凍で岩手大学に郵送された。

2.2　検証試験

上記野外試料を用いて検証試験を行った。夾雑物の阻害の検証として，各試料を解凍後10ｇはかり取り，30mlのリン酸緩衝液（PBS）とホモジネーションし，その上清を実験試料として用いた。検査法は株式会社ニッポンジーン社の小型遺伝子蛍光検出器NiGii８を用い，検出作業の煩雑さ，検出時間を確認した。検出対象は，*E.coli*，*Salmonella*，*Campylobacter jejuni*の三種である。12.5 μlの×２ Master Mix（ニッポンジーン），2.5 μlのprimer mix（ニッポンジーン），９ μlのH_2O，１ μlの試料を混合して８連マイクロチューブに注入し，NiGii８にセットした。増幅温度65℃，増幅時間25分に設定した。

2.3　実証試験

本検査機器，試薬および核酸クロマト検査キットをジビエ解体施設に持参し，捕獲従事者，解体従事者自身に検査を体験して頂いた。使用した感想および要望を伺い，ニーズに基づいた改善を行った。対象施設として実際に訪問したのは，三重県名張市の名張市猟友会保有の解体施設である。

2.4　普及活動

本研究の検査システムをより多くの事業者への周知を目指すため，2022年度アグリビジネス創出フェアに参加して，アウトリーチ活動を行った。また，食肉衛生関係者に対し，現場で使用できる簡易的検査法の要望についてアンケート調査を行った。

３．結果と考察

試料採取協力を依頼していた自治体のうち，北海道，三重県，長崎県から野生ニホンジカの骨格筋75頭分（25頭／県）が郵送された。（株）ニッポンジーン社の小型蛍光遺伝子検出器NiGii８を用いた検査の結果，３道県のニホンジカ骨格筋から検査時間25分以内に*E.coli*，*Salmonella*，*Campylobacter jejuni*のそれぞれが検出された。対象病原体の遺伝子増幅が確認された反応時間を表に示す（**Table 1**）。検査機器の駆動アプリにはリアルタイムで遺伝子増幅のグラフが表示され，１試験８サンプルのうち，陽性であった試料中のターゲット遺伝子が増幅されている様子が認められた（**Fig. 1**）。しかし，陽性と判断された試料のいくつかは，遺伝子増幅グラフを確認したところ，バックグラウンドの乱れや，標的遺伝子増幅によるグラフの立ち上がりでなく，なんらかの原因による増幅反応の乱れ等が認められた（**Fig. 2**）。これらのような偽陽性検出は，検出時間が10分以内の早い反応時間で起こっていたため，本

© The Ito Foundation

Table 1 Detection of pathogenic bacteria in venison by using the NiGii8 compact fluorescent gene detector (Reaction time of detection)

Area	No.	*E. coli* (vt1)	*Salmonella*	*Campylobacter jejuni*
Mie	1	−	−	−
	2	−	−	−
	3	10:40	−	16:14
	4	−	−	−
	5	−	−	−
	6	−	−	−
	7	−	−	−
	8	−	−	−
	9	20:36	−	−
	10	−	14:34	−
	11	−	−	−
	12	27:09	5:32	−
	13	−	−	−
	14	20:56	−	−
	15	−	−	−
	16	−	−	−
	17	21:55	−	17:00
	18	27:50	−	22:07
	19	−	−	−
	20	−	18:39	−
	21	−	16:46	−
	22	−	23:49	−
	23	21:30	−	22:47
	24	−	24:20	16:47
	25	−	−	20:27
Hokkaido	1	−	15:39	−
	2	4:49	−	−
	3	8:50	−	−
	4	6:20	11:26	−
	5	7:01	22:00	−
	6	5:22	22:21	−
	7	−	−	19:06
	8	23:12	−	20:25
	9	−	−	−
	10	−	−	−
	11	−	−	−
	12	−	−	−
	13	−	−	−
	14	−	−	−
	15	17:19	−	−
	16	−	−	19:25
	17	−	−	−
	18	−	21:44	−
	19	−	−	−
	20	14:36	12:48	19:25
	21	−	16:14	−
	22	−	−	−
	23	18:57	21:34	−
	24	−	−	−
	25	−	−	−
Nagasaki	1	15:37	−	1:01
	2	−	−	−

© The Ito Foundation

3	–	–	–
4	–	–	–
5	15:37	–	–
6	8:28	–	–
7	–	22:09	13:02
8	8:41	24:28	23:20
9	11:52	16:00	–
10	22:02	8:47	–
11	8:41	8:08	–
12	18:48	17:55	9:48
13	14:55	22:09	–
14	8:40	–	–
15	–	–	–
16	17:50	–	–
17	16:22	–	–
18	14:15	–	–
19	22:50	15:49	–
20	22:41	–	21:12
21	22:50	–	–
22	–	–	–
23	–	–	14:47
24	–	–	0:39
25	–	–	14:40

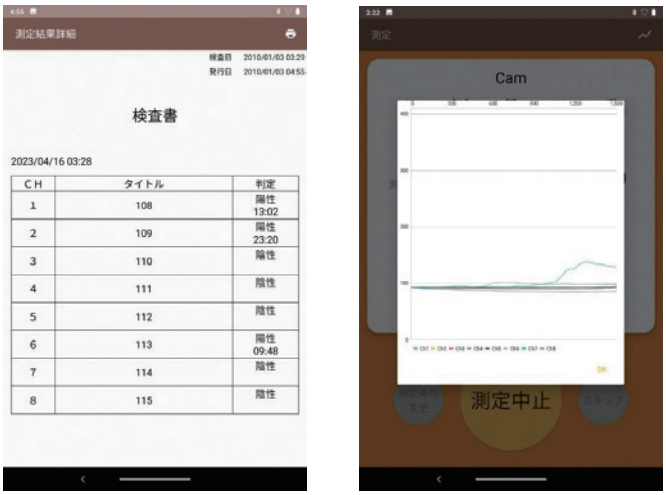

Fig. 1　Detection results using the NiGii8 compact fluorescent gene detector.
A test report summarizing the detection results and a gene amplification graph that can be checked in real time, displayed after the test.

検査にて10分以内の早い段階で陽性が検出された場合は，リアルタイムの遺伝子増幅のグラフを確認する必要があると考えられた。本検査機器NiGii８の感度は，0.01～0.1fgと確認されている[2)]。今回の試料は，危害性菌検出のため，本来のジビエ解体ガイドラインにあえて従わずに解体をお願いしているため，動物体内や環境に存在する各種微生物が付着した状態である。さらに大量のシカ由来ゲノムも混入しているため，そのような混合ゲノムに対しても標的遺伝子の増幅が可能であることは，本検査システムの高い感度と特異性の証明である。現在日本に分布しているニホンジカ

© The Ito Foundation

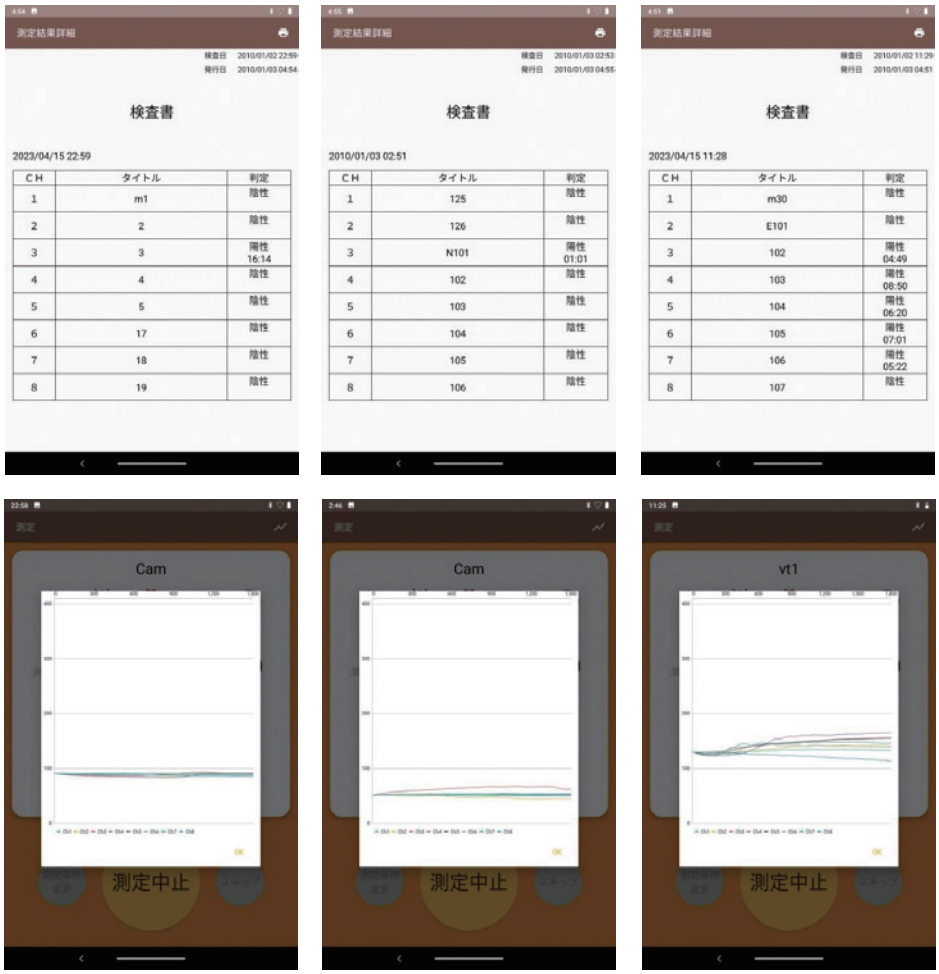

Fig. 2　False positive example of a test using the NiGii8 compact fluorescent gene detector.
Depending on the condition of the sample, the gene amplification may be disturbed. In such cases, it is necessary to check not only the result on the test report form but also the graph of gene amplification.

は，異なる地域に異なる亜種が存在している[3, 4]。亜種の相違によるゲノムの違いが検出結果に影響を及ぼす可能性を鑑み，本研究では北海道のエゾシカ，三重県のホンシュウジカ，長崎県のキュウシュウジカの試料を用いたが，道県別に大きな違いが認められなかったため，本検査法は日本で多く流通する鹿肉に対しては産地の区別なく使用できると考えられる。しかし，純粋培養菌液や抽出ゲノムを試料として用いた際には認められなかったグラフの乱れは，試料中の夾雑物の影響が考えられるため，増幅の安定性を改善する必要がある。しかし，本来はクリーンルームの検査室でしか行えないリアルタイムの遺伝子増幅を検出までハンディで行えることは非常に有意義であり，反応時間も25分という遺伝増幅・検出試験としては非常に短い時間である程度のスクリーニングと菌数の把握が可能であることは，今後のジビエ産業への大きな貢献が期待できる。

本機器の実証試験として，三重県名張市の名張市猟友会に本検査を実施して頂いた。結果は，免疫クロマト，小型遺伝子蛍光検出器（NiGii 8），核酸クロマトの順にニーズが高かった。NiGii 8

© The Ito Foundation

は遺伝子増幅・検出を行う本体と駆動アプリが分かれている部分について，一体型であるほうが使いやすい等の意見があった。免疫クロマトの手軽さが現場での検査において求められるポイントであるが，開発に時間と手間を要し，また，感度については遺伝子検査と同等まで向上させることが難しいため結果的に高額になる可能性が高い。ジビエ産業において，現場で気軽に検査を行うためにはコストも重要であり，持続的に検査を行うにあたって経済的負担の少ない検査法という面もさらに考慮すべきニーズである。

普及活動として，2022年度アグリビジネス創出フェアに出展した（https://agribiz.maff.go.jp/）。

このフェアでは，ジビエの生産，流通・消費に関わる企業，行政等の幅広い事業関係者に紹介できた。最も多かった質問事項は検査にかかる金額であったが，これまでに行っていた，検査機関に依頼する場合の検査料と比較してかなり低額であること，検査に要する時間が大幅に短縮されることから，非常に有用であるとの意見が多かった。衛生状態が不安視されるジビエについて，衛生の担保という付加価値を付けることができる点も評価された。さらに，本検査システムは人獣共通感染症の検査も可能であり，本研究で示したとおり，夾雑物が存在する状態の試料でも標的遺伝子の検出ができるため，解体前の感染リスクが少ない状態で検査を行い，陽性の場合は解体施設まで運ばず捕獲現場で廃棄処分することで，捕獲者・解体者の感染防御の一助となる。

また，41都道府県の食肉衛生に関わる現場の声として，簡易検査法についてさまざまな意見が得られた（**Table２**）。都道府県によっては微生物の培養，病理検査といった生物学的検査，遺伝子検査のすべてを行える者がいない，また，検査設備が一つもない施設があったり，遺伝子検査は試料をまとめて月に一度郵送するという状況の施設もあった。衛生検査を行う場についても状況は都道府県によってばらつきがあったため，ジビエ解体施設で施行できる検査法については，やはり“どんな人でもできる検査法”を目指す必要がある。現場から求められる検査法の重要な点は，簡便であることと安価であることであった。

本研究期間に得られた検査機器NiGii８の改善要求点について，株式会社ニッポンジーン社により，駆動アプリと機器本体を一体化しタッチパネル式に改変した新版機器を試作したことを加えて記載する（**Fig.３**）。

４．要　　約

本研究では，ジビエの簡易迅速検査法を用いた実地試験を行った。本検査法は野外で行える蛍光遺伝子増幅法であり，LAMP法を基礎としたポータブル型の検出器を用いて行うものである。本研究では，*E. coli*，*Salmonella*，*Campylobacter jejuni*を対象とした。北海道，三重県，長崎県から自家消費用にガイドラインに沿わない解体法で処理したニホンジカ肉をホモジネーションしたものを試料とし，試薬と混合の後，65℃25分間の反応条件で検出した。その結果，すべての道県から同じ程度に３つの菌が検出された。試験によってはバックグラウンドの乱れを認め，標的病原体の検出の判定に再確認を要するものもあるが，従来の遺伝子検査法と比較して，25分と短時間で済むこと，１温度固定のため，サーマルサイクラーが不要であること，結果の確認に電気泳動が不要であること等を考慮すると，十分にジビエの解体現場で活用できる検査法および検査機器である。

© The Ito Foundation

Table 2 Current inspection methods in the municipality and opinions/needs for novel inspection systems that will be useful in the field.

	現在行っている検査法										希望する検査法
自治体	PCR	RT-PCR	real time PCR	拭取り検査	ELISA	電気泳動	遺伝子抽出	病理組織検査	LAMP法	微生物培養	
1	○	○	○								
2				○							操作が簡便かつ検査結果が迅速に出るほうが望ましい。
3	○										常時検査において人を当てられないので、簡便で時間のかからないものマニュアル等があれば簡単な遺伝子検査ができる。
4	○										
5											
6	○				○						
7	○										
8											簡便で低価格、短時間でできる
9	○			○							
10			○								迅速に結果が出せる検査法
11	○										
12	○					○					導入する場合、価格が安価であるといい。
13	○		○				○	○			
14	○										
15					○				○		簡単なキットで短時間でできること。 結果が、ひと目でわかること。 室温で判定できること。 検体の処理が不要なこと。
16											
17		○									手順が簡便なもの
18	○								○		
19											
20	○										簡便な検査で時間のかからないもの ・ペトリフィルムで培養しカウントする ・圧ペイ標本によるトリヒナ検査やディフクイック染色による直接顕微など
21	○			○							
22	○					○			○		
23	○										
24	○										時間のかからない簡便な検査法
25	○										
26	○								○		
27			○								前処理を含めて2-3時間で結果が出る検査
28	○		○								
29											体制が整ってマニュアルが作成されている
30	○										
31	○		○								検査を実施する人の物理的・微生物的に安全を第一に考えた検査法ディスポーザブルな器具を用いた検査。
32	○										
33	○										
34	○								○		
35	○										
36	○				○			○		○	簡単で安価
37	○		○								
38	○										簡単（高齢の非常勤職員でもできる） 安価 早く結果が出ること
39	○										安価で特殊な機器を利用しない検査簡便であること
40			○								簡便な方法
41	○								○		前処理から測定にかけるまで短時間であること。 普段の管理が簡単なもので一度にある程度の検体数が検査できること。 コントロールの扱いが簡易であること。

© The Ito Foundation

Fig. 3　Prototype NiGii8 improved version based on field opinions and needs.
An improved version was prototyped based on the opinions and needs obtained through field research and outreach activities, including this study. The main device for gene amplification and the driving application were integrated into one unit, and the operation system was changed to a touch panel format.

文　献

1）　Kojima, M.：*J. Vet. Epidemiol.*, **24**, 55～59, 2020.

2）　山﨑朗子，原口浩幸，中曽譲，峯岸恭孝，藻寄茜，鎌田洋一：ジビエ利用の推進に資する鳥獣対策技術の開発，スマート捕獲・スマートジビエ技術の確立「生産性革命に向けた革新的技術開発事業」終了時評価用構成員別研究成果報告書（生物系特定産業技術研究支援センター（BRAIN）），pp. 50–56, 2021.

3）　McCullough, D. R., Takatsuki, S., Kaji, K.：*Sika deer: biology and management of native and introduced populations*, Springer Science & Business Media, 2008.

4）　Ohtaishi, N.：*Mammalian Sci*, **53**, 13～17，1986.

© The Ito Foundation

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

Construction of a protective system against poultry red mite, *Dermanyssus gallinae*, for the improvement and development of the poultry industry

辻　　尚利[1]・川田　逸人[1]・小田　憲司[2]
（[1]北里大学医学部，[2]一般社団法人生物科学安全研究所）

Naotoshi Tsuji[1], Hayato Kawada[1] and Kenji Oda[2]
([1]Kitasato University School of Medicine, [2]Research Institute for Animal Science in Biochemistry and Toxicology (RIAS))

Dermanyssus gallinae is causing serious damage to the poultry industry worldwide, reducing egg productivity and causing major social problems such as discomfort to poultry farmers. More than 80% of farms infested with the mite in Japan are estimated to be more than 6.6 billion yen in damage annually. In addition, although it is difficult to directly assess the impact of *D. gallinae* on the global economy, production losses, and treatment and prevention costs for approximately 600 million laying hens in the EU are estimated to be about 250 million Euros per year. Therefore, the establishment of control measures for *D. gallinae* is now an international challenge. In this study, we established an experimental system to evaluate the growth of *D. gallinae* on a laboratory scale. The growth boxes constructed in this study provided an ideal environment for *D. gallinae* and successfully produced sufficient amounts of mites on time. Pathological analysis of the skin of chickens bitten by *D. gallinae* showed subcutaneous inflammation and hemorrhage, which is expected to help elucidate the blood-sucking mechanism of *D. gallinae*. The box also made it possible to evaluate the efficacy of commercially available miticides, and transcriptome analysis provided hints for vaccine development targeting biologically important protein for the mites such as histamine release factor. In the future, we would like to evaluate the mite vaccine candidate molecules obtained by transcriptome analysis and elucidate the mites' blood-sucking mechanism.

1．目　　的

国内外の養鶏産業に深刻な打撃を与えているワクモは，鶏肉などの生産性低下を招くだけでなく，人が不快感を覚え，離職につながるなど大きな社会問題を起こしている。本邦での農場ワクモ汚染率は80％以上，被害額は年間66億円以上にのぼる[1)]。また，ワクモに直接起因する世界的な経済的影響を特定することは困難だが，EUの約６億羽の産卵鶏の生産損失と治療および予防費用は，年間約２億5000万ユーロと推定されている[2)]。このように，ワクモ防除対策の確立は現在，国際的な課題となっている。

ワクモ（*Dermanyssus gallinae*）は，ダニ目ワクモ科に属する吸血ダニで，家禽や鳥類の外部寄生虫である。ワクモの生活環は８～９日と短く，

© The Ito Foundation

夜間に宿主鳥類を吸血することにより短期間で大量発生する。近年，ワクモが殺ダニ剤抵抗性を獲得し始めているにもかかわらず，鶏舎での薬剤使用規制が強化され，殺ダニ剤の使用自体が難しくなってきたことなどの複合的な理由から，ワクモ防除はきわめて難しい局面を迎えている。さらに，一度鶏舎がワクモで汚染されると，その駆除は非常に困難であることもワクモの汚染問題を複雑にしている。

家畜体表に寄生・吸血するダニ類の予防法として近年注目を集めているのが「ダニワクチン」である[3)]。ダニが生存するために必須のダニ由来のタンパク質成分で宿主（ワクモの場合は鶏）を免疫すると，その宿主は投与されたダニ成分に対し，特異的な抗体を産生する。この抗ダニ抗体は，ダニがその宿主から吸血する際，宿主の血液と一緒にダニの体内に取り込まれる。このように，ダニに取り込まれた抗ダニ抗体は，ダニの生存に必須の標的タンパク質の機能を阻害する。この機能阻害が原因となってダニの代謝系は撹乱され，発育異常やダニ産下卵率が低下するなどが引き起こされ，ダニ生活環の遮断からダニ個体が消滅する。

本研究では，著者らが培ってきた牛寄生性ダニの繁殖技術をワクモに応用し，本邦で初のワクモ繁殖コロニーを構築する。実験室内評価系が国内に存在しないところで，野外試験に至っている現状を変え，真にワクモに対して有効とされ，科学的リテラシーを備えたワクチン等の防除技術の開発に資することを目的とした。

2．方　法

2.1　ワクモ増殖箱

発泡スチロール（外寸46.5cm × 35.7cm × 32.3cm，内寸42.0cm × 31.3cm × 27.0cm：笠原工業株式会社）に鶏飼育ケージ（13cm × 15cm × 19.5cm）を二つ並べ，データロガー（GSP-6：Eri tech）を入れた。給水器，給餌器を飼育ケージに設置し，フタにはメッシュをかけて照明と通気性を確保し，これをワクモ増殖箱とした。ワクモ増殖箱を界面活性剤入りのトレーにセットした。１週齢の雛（品種：もみじ，株式会社後藤孵卵場）を鶏飼育ケージに導入し，毎日給餌（SDL幼雛用飼料：フィードワン株式会社）および給水を実施した。雛を導入してから２週間飼育し，３週齢で新しい雛に交換した（**Fig. 1**）。

動物実験は，一般財団法人生物科学安全研究所動物実験委員会（承認番号210708-1，210721-1，210930-1）および北里大学動物実験委員会の承認（承認番号2023-149，2023-150，2023-151）を得て実施された。

2.2　ワクモの継代維持

ワクモは，2021年６月に神奈川県相模原市の養鶏場から入手した。この農場では，ワクモの防除のためプロポクスルとトリクロルフォンが使用されていた。採集にあたり，10cm×15cmの段ボール片をいくつかの鶏ケージの上に１週間置き，その後，絵筆で段ボールの表面から虫体を採取した。実体顕微鏡下で形態学的にワクモであることを同定した後，約50mgのワクモ（発育期は分けていない）を増殖箱に放虫した。増殖したワクモは段ボールにて採集し，ジップロックに入れてから使用時まで冷蔵庫にて保存した。

2.3　ワクモ増殖判定試験

ワクモ増殖箱を12箱作成し，１週齢の雛を導入してワクモを20～55mgで放虫した。ワクモ放虫から７日，14日，21日，28日目に３箱ずつワクモの回収を行い，回収した増殖箱は取り潰した。回収はi-Trap Ⅱ（近藤電子株式会社）を用いて，回収日の24時間前に飼育ケージ上部にセットした。回収したi-Trap Ⅱを48時間以上冷凍し，計測時は常温に30分以上置き，トラップを破壊してワクモを取り出した。パスツールピペットに綿栓

© The Ito Foundation

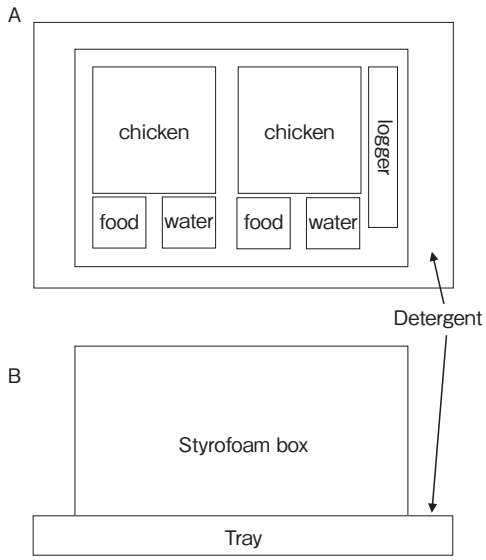

Fig. 1　Overview of the proliferation box for *D. gallinae*. A data logger (temperature and humidity) and two chicken cages with a water dispenser and feeder box were placed inside the Styrofoam box. The lid of the Styrofoam box was meshed to ensure lighting and ventilation. (A) View from the above. (B) View from the side.

をしてあらかじめ重量を計測し，ポンプ（リニコンLV-125A）に装着し，ワクモをピペット内に吸引して，定量を行った。

2.4　雛におけるワクモ吸血部位皮膚の病理組織学的解析

ワクモフリーの環境で飼育した雛（3週齢）と，ワクモ増殖箱内で20～55mgのワクモに2週間暴露させた雛（3週齢）およびワクモ継代用に400mg以上のワクモに2週間暴露させた雛（3週齢）を二酸化炭素で安楽殺し，総排泄口周辺を切除した，切除後のサンプルは4％パラホルムアルデヒド（富士フイルム和光）に24時間浸漬し，70％エタノールに置換し，24時間後に再度70％エタノールを交換した。パラフィンに包埋後，3 μmに薄切し，HE染色を行った。

2.5　市販殺ダニ剤試験

ワクモ増殖箱を，対照群，蔓延防止群，駆除群の3群に3箱ずつ計9箱準備した。暴露するワクモは20～55mgとし，放虫から2週間ごとにi-Trap Ⅱでワクモを回収した。殺ダニ剤はエグゾルト®（MSDアニマルヘルス株式会社）を用いた。対照群はワクモ放虫から2週ごとに雛を交換し，6週間飼育した。蔓延防止群はワクモ放虫1日前と6日後に殺ダニ剤を雛に飲用させ，2週ごとに雛を交換しながら6週間飼育した。駆除群はワクモ放虫後，2週ごとに雛を交換し，4週目のワクモ回収が終わった直後と5週目に殺ダニ剤を飲用させ，6週目まで飼育した。

2.6　ワクモ遺伝子のトランスクリプトーム解析

次世代シーケンスによる転写産物解析に供するために必要なRNAを抽出するため，吸血個体を含むワクモ（各ステージ混合）約160mgよりRNA抽出を行った。－80℃にて凍結保存状態のワクモを，液体窒素にて冷却した乳鉢，乳棒を用いて粉末状になるまでホモゲナイズし，TaKaRaのNucleoSpin RNA Plus Kitを用いてプロトコールに従いRNAを抽出し，Kit付属の溶出バッファー（RNase free water）30 μ lにて溶出し，約21 μ gのTotal RNAを得た（in house NanoDrop assay）。次世代シークエンス解析は，上記RNA

© The Ito Foundation

サンプルをAzenta Japan Lab．において，ライブラリ調製，Illumina NovaSeqにてシーケンスRUN（Paired End，２×150bp）を行った。得られた配列データのQC解析（Fast QC v0.11.4を使用）により，取得したリードの99％以上について，150bp全塩基において99.9％以上の正確な塩基情報を取得することができた。Cutadapt（v 1.9.1）にて，アダプター配列，低品質塩基情報，トリミング後75bp長以下の配列を除外し，データ解析（Trinity（v 2.2.0）によるde novoアセンブル，TransDecoder（v 3.0.0）によるORF予測，アノテーション付加）を実施した。

３．結果と考察

3.1　幼雛を用いたワクモ吸血実験系の確立

発泡スチロールに鶏飼育ケージと温湿度ロガーを入れ，孵化後１週齢の幼雛を２羽導入した。換気と照明確保のため，発泡スチロールのフタにワクモ逃走防止措置を施した。これをワクモ増殖箱として合計12箱作成し，その中にワクモを20～55mg放虫した。その後毎週３箱ずつワクモ回収のため取り潰し，４週間繰り返した。ワクモの回収は，回収日24時間前にi-Trap Ⅱ（近藤電子株式会社）を鶏飼育ケージ上に設置し，トラップ内に集まったワクモを吸虫管により回収し定量した。その結果，１週目は4.3±1.2mg，２週目は10.4±8.3mg，３週目は80.4±26.2mg，４週目は201.4±56.5mgであった（**Fig. 2A**）。また，飼育期間中の温度は22.3±1.5℃，湿度は78.7±9.2％であった（**Fig. 2B**）。１週目に比べ，２週目までは有意差が得られず，３週目（p＝0.0156），４週目（p＝0.0078）に有意差が得られた。また，３週目以降，放虫したワクモ量よりも多くトラップされているため，増殖が確認できた。これはワク

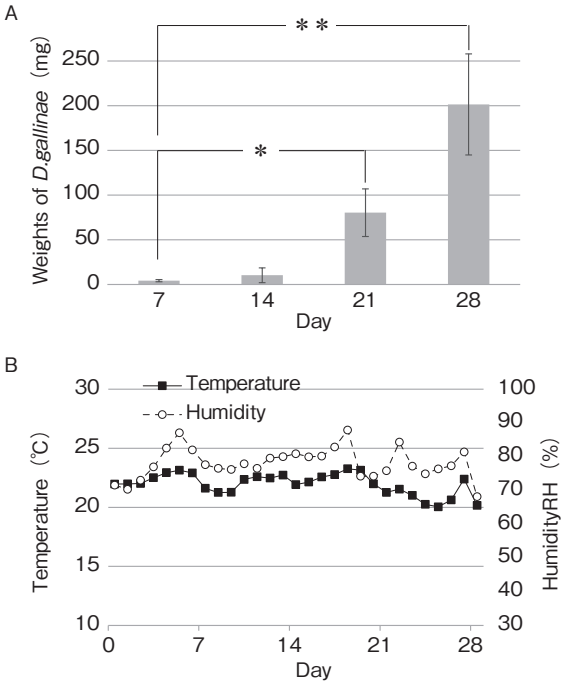

Fig. 2　Performance of the proliferation box.（A）Kinetics of the number of *D. gallinae* in the proliferation box. The weight of the mites on day 21（p = 0.0156）and 28（p = 0.0078）was significantly higher than the that on day 7.（B）Kinetics of relative humidity and temperature during the study period. Stable condition was observed.

© The Ito Foundation

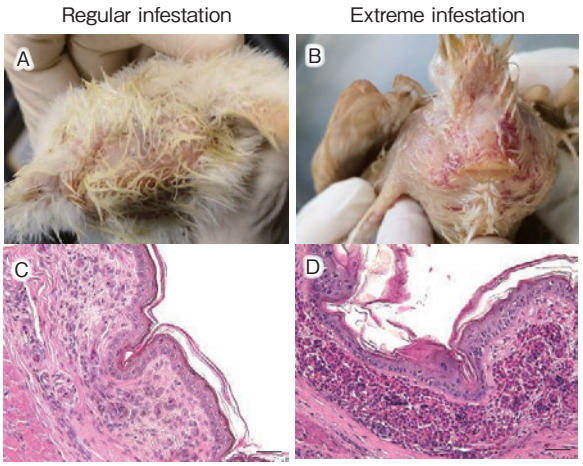

Fig. 3　Histopathological analysis of the biting site of *D. gallinae*. (A, C) Overview and histological section of the cloaca from the chick infested by regular number of mites. (B, D) Overview and histological section from the cloaca of the chick infested by extreme number of mites. Sections were stained by H & E. Scale bar = 25 μ m.

モの生活環が８～９日間であることに起因するものと示唆され，本増殖箱を用いた試験系が再現性に優れており，殺ワクモ剤やワクチン効果の判定試験の実施を簡便なものとする利便性にも優れていることを示唆する。温湿度についても，増殖箱では雛がいることと給水器の影響で，ワクモにとって理想的な環境が構築できていると考えられる。

3.2　ワクモ吸血刺咬部位における皮下出血

ワクモを400mg以上，２週間暴露した鶏の雛の総排泄口周囲にのみ紅斑が確認され，皮下病理像を確認すると，アレルギー反応ではなく，内出血であることが確認できた（**Fig. 3**）。増殖箱を使用することでワクモの暴露有無による比較が容易となり，ワクモの吸血メカニズム解明につながることが期待できる。

3.3　殺ダニ剤効果判定試験結果

3.1で確立に成功したワクモ増殖箱を用いて，市販のダニワクチンであるエグゾルト®（MSDアニマルヘルス株式会社）の評価を実施した。その結果，２週目は対照群5.57 ± 0.55mg，蔓延防止群は０ ± ０mg，駆除群は7.53 ± 1.86mg，４週目は対照群22.59 ± 10.15mg，蔓延防止群は０ ± ０mg，駆除群は58.69 ± 37.93mg，６週目は対照群34.08 ± 1.29mg，蔓延防止群は0.51 ± 0.89mg，駆除群は0.98 ± 0.45mgであった。対照群と蔓延防止群の比較では，２週目（p ＝0.037），４週目（p ＝0.037），６週目（p ＝0.046）いずれも，有意に蔓延防止群のワクモ重量が少なく，対照群と駆除群の比較では，ダニ剤を投与した後の６週目（p ＝0.0495）のみ有意に駆除群のワクモ重量が少なかった（**Fig. 4**）。これは，今回使用したエグゾルトがワクモの蔓延防止，駆除に効果的であるというMSD社臨床試験の結果を反映できていることから，我々が構築したワクモ増殖箱が薬剤アッセイにも適していることを示している。

3.4　次世代シーケンスによるワクモの転写産物解析

継代維持に成功したワクモ-RIAS系統を用いて実施したRNA-seq解析では，シーケンシング後，Raw data（87,928,572 reads）からアダプター，インデックス，および低品質のデータを除いた，Filtered data（86,961,960 reads，11,976,934,274nt）を得た。Filtered dataから，ニワトリ宿主由来配

© The Ito Foundation

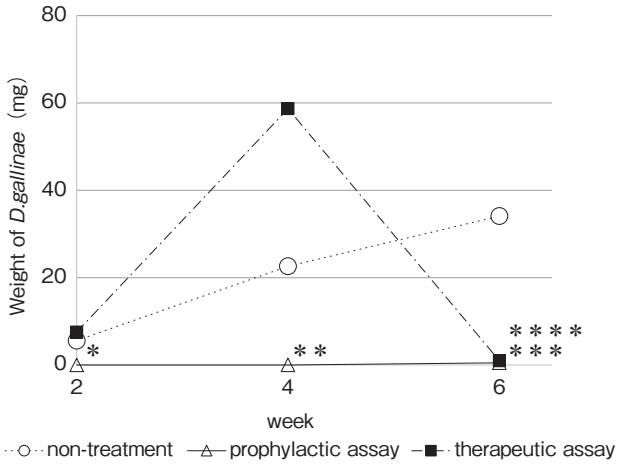

Fig. 4　Acaricidal effect of Exzolt® on *D. gallinae* in the proliferation box. The mean recovery weight of *D. gallinae* in the non-treatment group（NT, open circle）was steadily increased during the experiment. In the prophylactic assay（PA, open triangle), the growth of mites was suppressed effectively during the experimental period. In the therapeutic assay（TA, closed square）of treatment at 4 week after the start, the population growth was drastically suppressed. Each point was averaged from three independent experiments. *p＝0.037（PA vs NT), **p＝0.037（PA vs NT), ***p＝0.046（PA vs NT), ****p＝0.0495（TA vs NT).

列および重複配列を除いた後，contigにアセンブリーした。アセンブリーされたcontigは4,454,698個であり，それらの平均の塩基配列長は，54.56ntできわめて低値であった。次に，それらのcontigより冗長配列を除外しコンセンサス配列としたunigeneは116,144個であり，それらの平均の塩基配列鎖長は，contigとは異なり637.44ntと成績が向上した。unigeneの過半数が200～500bpで構成されており，2000bp以上の長鎖となったトランスクリプトは約６％見出された。それぞれの配列をクエリとしたBlast解析により，NrまたはSwissprotのタンパク質データベース上に，e-valueが0.00001以下の相同性が高いと判断されたunigeneは，それぞれ27652と13808個得られた。次に分子機能データベースであるKEGGおよびCOGデータベース上に，近似する機能が予測されたunigeneが，それぞれ1558と14187個得られた。Bowtie2（ｖ2.2.6）を用いて，Filtered dataをunigeneにマッピングしたところ，約87％のリードがマッピングされ，各リードカウントから発現レベルを順位づけることができた高発現遺伝子は，そのほとんどがribosome proteinなど恒常発現遺伝子であった。比較的高発現している遺伝子群には，既報のHistamine Release Factor（FM179713）を見出すことができた。本分子に特異的な抗体を経口投与されたワクモ集団は，その数を減じることが知られており，ワクチン抗原として有望視されている[4]。

また，ワクモは，前述したように夜間吸血性の行動様式をとる。すなわち，ワクモ体内には厳密に制御された体内時計を有している可能性が示唆される。そこで，本実験にて取得したトランスクリプトーム情報を精査したところ，ショウジョウバエではPER-TIM複合体を形成し概日時計制御のコア振動体の一員[5]である主要な転写因子であるtimeless様ホモログを見出すことができた。本解析ではその他の時計遺伝子を見出していないが，今後さらに精査する必要がある。

以上のように，本研究において整備された遺伝子情報は，本研究が目指す「鶏体ワクチンによる

© The Ito Foundation

ワクモ防除法」を開発するための研究基盤として重要な遺伝子情報プラットフォームであることを意味している。

4．要　約

ワクモは世界の養鶏業に深刻な被害をもたらし，鶏卵の生産性を低下させ，従業員に不快感を与えるなどの大きな社会問題を引き起こしている。日本では８割以上の農場にて発生しており，年間の被害額は約66億円以上と推定されている。EUでは約６億羽の産卵鶏の生産損失と予防コストが年間約２億５千万ユーロと見積もられており，国際的な課題となっている。本研究では，ワクモの増殖を評価する実験系を確立した。増殖箱はワクモにとって理想的な環境であり，十分な量のワクモを定期的に生産することに成功した。ワクモ感染鶏の皮膚病理学的解析より皮下炎症と出血が確認されたため，今後ワクモの吸血メカニズムの解明が期待できる。また，市販の飲水型殺ダニ剤の有効性評価が行えることや，トランスクリプトーム解析からワクモにとって重要な遺伝子（ヒスタミン放出因子など）の発現を確認することができたことから，新規殺ダニ剤やワクモワクチン開発に必要な予備データを得ることができたと考えている。今後は，トランスクリプトーム解析で得られたワクモワクチン候補分子の評価や，吸血メカニズムの解明に注力したい。

文　献

1） 村野多可子：鶏外部寄生虫（ワクモ・トリサシダニ）の防除技術の確立，千葉畜草研，成果情報，2004～2011年度.

2） Waap, H., Nunes, T., Mul, M. F., Gomes, J., Bartley, K.：Survey on the prevalence of *Dermanyssus gallinae* in commercial laying farms in Portugal, *Avian Pathol.*, 48(sup1), S2–S9, 2019.

3） Bartley, K., Wright, H. W., Huntley, J. F., Manson, E. D. T., Inglis, N. F., McLean, K., Nath, M., Bartley, Y., Nisbet, A. J.：Identification and evaluation of vaccine candidate antigens from the poultry red mite（*Dermanyssus gallinae*）, *Int. J. Parasitol.*, 45(13), 819～830, 2015.

4） Bartley, K., Nisbet, A. J., Offer, J. E., Sparks, N. H. C., Wright, H. W., Huntley, J. F.：Histamine release factor from *Dermanyssus gallinae*（De Geer）：Characterization and in vitro assessment as a protective antigen, *Int. J. Parasitol.*, 39(4), 447～456, 2009.

5） Myers, M. P., Wager-Smith, K., Wesley, C. S., Young, M. W., Sehgal, A.：Positional cloning and sequence analysis of the Drosophila clock gene, timeless, *Science*, 270(5237), 805～808, 1995.

© The Ito Foundation

反芻家畜の「悪心」を示す生理学的マーカーの探索（Ⅲ）

Investigation of the physiological markers indicating 'nausea' in domestic ruminants（Ⅲ）

青　山　真　人[1]・蕪　山　由己人[2]

（[1]宇都宮大学農学部生物資源科学科，[2]宇都宮大学農学部応用生命化学科）

Masato Aoyama[1] and Yukihito Kabuyama[2]

（[1]Department of Agrobiology and Bioresources, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University,
[2]Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Utsunomiya University）

Introduction : Farm ruminants, such as cattle, sheep and goats, don't possess the emetic reflex, thus there have been no reports investigating the nausea in them. The aim of this study is to find the physiological marker(s) for nausea in goats. In this research, we investigated the effects of administration of cisplatin (CDDP), a common emetic agent, on the behavior and blood concentrations of some hormones in goats. In addition, the effects of CDDP on the activation in the medulla oblongata, especially in the nucleus of the solitary tract (NTS), that is involved in nausea, is examined.

Methods: Six adult Shiba goats received intravenous administration of CDDP (or saline as the control). The behavior of animals was observed for four hours. The blood samples were collected for the assays of plasma levels of cortisol (Cor), arginine vasopressin (AVP) and oxytocin (OXT). Two goats were selected from the six, and the number of the c-Fos protein positive cells in the medulla oblongata were counted.

Results: All of the CDDP administrated goats lay down, meanwhile no control goats lay down. The plasma Cor levels in CDDP administrated goats was significantly higher than those in controls or pre-administration. CDDP did not influenced plasma AVP level. Although it was not statistically significant, the plasma OXT level in the CDDP administrated goats was tended to be lower than that in the controls. The number of c-Fos positive cells in CDDP administrated goat was remarkably higher than that in control goat.

Conclusion: CDDP induced the remarkable behavioral changes in goats, and these behavioral responses seemed to be induced by the severe stress because the plasma Cor levels were increased. CDDP activated some neurons in the NTS. These results indicate that CDDP might induce nausea or some similar aversion in goats. Further works are required to find the physiological marker（s）for nausea in goats.

© The Ito Foundation

1．目　　的

「悪心」（おしん）（「気分が悪い」という感覚）は，「痛み」や「暑さ・寒さ」と同じく代表的な不快感の一つである。人を含めたいくつかの動物種において，悪心によって起こる最も明確な反応は「嘔吐」である。一方，齧歯目，兎，馬など，嘔吐反射を持たず，嘔吐をしない動物種も少なくない[1)]。しかし，齧歯目であるラットやマウスにおいては，嘔吐はしないが悪心は感じると考えられている[2, 3)]。

牛や羊，山羊などの反芻動物も嘔吐をしない。そのため，反芻動物における悪心の研究はこれまでにない。一方，本報告書の著者の青山は，山羊を反芻家畜のモデルとして家畜の輸送ストレスを研究してきた[4)]過程から，山羊は嘔吐をしないが，輸送中の様子から乗り物酔いをしている，つまり，悪心を感じているのではないかと考えてきた。著者はこのような観点から，催吐剤であるシスプラチン（cis-diamminedichloro-platinum（Ⅱ）：CDDP）（抗癌剤であるが，副作用として強い悪心・嘔吐を引き起こす[5)]）の投与が，山羊において悪心を引き起こす可能性について検討し，結果を近年報告した[6)]。

一方，悪心経験時に特異的に起こる生理学的反応，特に血液中に現れる成分についてはまだ明確な知見が得られていない。悪心経験時に特異的に起こる，嘔吐に代わる指標があれば，反芻家畜を含めた嘔吐をしない動物における悪心の研究に非常に役立つ。本研究の目的は，反芻動物において悪心の生理学的指標を見つけ出すことである。伊藤記念財団からの三回目の助成となる今回（令和３～４年度）の研究では，やはりCDDP投与による血中成分の反応について検討した。また，CDDP投与による延髄（悪心や嘔吐にかかわるいくつかの神経核が分布している）における反応についても検討した。

2．方　　法

2.1　実験動物

実験にはシバ山羊（*Capra hircus*）６（オス２頭，メス４頭，２～４歳）を使用した。実験は，宇都宮大学動物実験委員会の承認（承認No. A21-0011）を得て，同大学動物実験等管理規程に従って行った。餌と水は不断給餌とし，毎日10：00に新しいものに交換した。

2.2　実験１：シスプラチン投与による血中成分の反応

2.2.1　シスプラチンの投与

６頭の山羊について，同じ性のペア３組に分けた。９：00に，各ペアのうち一方にはCDDPを投与した。投与法については，CDDPを2.0mg/1.0 mlとなるように生理食塩水に溶解し，これを山羊の体重１kgあたりCDDPとして1.0mgとなる量を静脈内に注入した。もう一方の山羊には，対照として同じ量の生理食塩水を投与した。１～２週間の間隔を空け，各個体の処置を入れ替えて再び実験を行った。

2.2.2　行動観察

山羊の行動を，８：30（投与30分前）から13：00（投与４時間後）まで，ビデオカメラで撮影した。10：00の飼料の交換後に，伏臥位姿勢を取るまでの時間（投与からの時間），伏臥位姿勢であった時間について実験区間で比較した。観察時間中に起こらなかった行動については，それが起こるまでの時間は便宜的に240分（投与から観察時間終了までの時間）とした。

2.2.3　血中成分の分析

９：00（投与直前）と13：00（投与４時間後）に頚静脈より血液を採取し，ストレスの生理的マーカーとして一般に用いられているコルチゾル（Cor），嘔吐動物において悪心との関連が報告さ

© The Ito Foundation

れているアルギニンバソプレッシン（AVP），およびラットにおいて悪心との関連が指摘されているオキシトシン（OXT）の血中濃度を測定した。Corについては得たそれぞれの実験区の投与直前，240分後の２回分のサンプルを測定し，AVPおよびOXTについて投与240分後のサンプルのみを測定し，対照区とCDDP区間で比較した。

2.3　実験２：シスプラチン投与による延髄における反応

2.3.1　シスプラチン投与および血中成分の分析

実験１を実施して数か月後に，用いた６頭のうちメス２頭を使用した。上述と同じ方法で，１頭は生理食塩水を，残る１頭にはCDDPを投与した。投与直前と180分後に血液を採取し，そのCor濃度を測定した。

2.3.2　延髄における反応の解析

投与180分後，深麻酔下で山羊を安楽殺後，心臓より灌流固定し，延髄を採取し，厚さ50μmの前額断凍結切片を作成した。その後，免疫組織化学法により，延髄におけるc-Fosタンパク質（神経細胞活動のマーカーとなる）（以下，Fos）陽性細胞の数を，神経核ごとに計測した。神経核の特定は，以前に本研究室で作成したシバ山羊の脳幹アトラスに従った。本研究では，悪心の発生にかかわるとされる孤束核（NTS），嘔吐にかかわるとされる迷走神経運動背側核（DMV），疑核（NA）について比較した。

2.3.3　統計解析

実験１において，生理食塩水を投与した対照区をSal区，CDDPを投与した区をCDDP区として，両実験区を比較した。行動については，Wilcoxonの符号化順位検定によって比較した。血中Cor濃度については二元配置（処置×時間）反復測定分散分析によって比較した。また，血中AVPおよびOXT濃度については，Sal区とCDDP区を対応のあるｔ検定によって比較した。実験２においては，頭数が各実験区で１頭ずつであり，統計解析は行わなかった。

3．結果と考察

3.1　実験１

3.1.1　行動

Sal区において，飼料交換後は，６頭中すべての個体が一度も伏臥位姿勢を取らなかったが，CDDP区においては６頭すべてが遅くとも投与から157分後に伏臥位姿勢を取った（**Table 1**）。伏臥位姿勢を取るまでの時間は，CDDP区ではSal区と比較して有意に早く（$p<0.05$），伏臥位姿勢を取っていた時間は有意に長かった（$p<0.05$）。今回，写真は示さないが，CDDP区において伏臥位を取っている個体は瞼を閉じ，顔を下に向けてじっとしている様子が確認できた。CDDP投与によるこれらの行動学的反応は犬においても報告さ

Table 1　The effects of cisplatin administration on lying behavior in goats

	Treatment	
	Saline（control）	Cisplatin
Latency to lying（min）	240.0 ± 0.0 （240 − 240）	121.5 ± 9.5* （98 − 157）
Total time spent in lying（min）	0.0 ± 0.0 （0.0 − 0.0）	56.2 ± 7.7* （33 − 85）

Each data represents the averaged ± SE and（minimum value − maximum value）of six goats.
＊：Significant difference from the results in the saline administrated control test（$p< 0.05$, Wilcoxon signed rank test）.

© The Ito Foundation

れており[7]，また，山羊において起こることを著者らも報告している[6]。

3.1.2　血中コルチゾル濃度

Sal区においては，血中Cor濃度は投与の前後で変化がなかった（**Fig. 1A**）。一方，CDDP区においては，投与240分後は投与前よりも（$p<0.01$），また，Sal区の同じ時刻のそれよりも（$p<0.01$）有意に増加していた。悪心を引き起こす処置によってCorの血中濃度が増加することは犬[8]，山羊[6]やラット（ただしラットではコルチコステロン）[9]でも報告されている。血中Cor濃度の増加はなんらかのストレスを感じていることを示しており，CDDP投与によって山羊はやはり悪心（少なくともそれに類似した嫌悪感）を感じていると考えられた。

3.1.3　血中アルギニンバソプレッシン濃度

血中AVPについては，Sal区とCDDP区の間に差は見られなかった（**Fig. 1B**）。AVPは嘔吐に伴って血中濃度が増加することが報告されており，悪心の生理学的指標となり得るという説も存在する[1]。一方，嘔吐をしないラットにおいては血中AVP濃度は増加しなかった[10]。ラットと同様，山羊においてもCDDPによって血中AVP濃度の変化は伴わなかった。嘔吐は脱水症状を引き起こすことがあり，嘔吐する動物で悪心に伴って血中AVP濃度が変化するのは嘔吐した結果起こる反応であり，嘔吐をしない動物には起こらないのかも知れない。

3.1.4　血中オキシトシン濃度

血中OXT濃度については，有意ではなかったがCDDP区のほうがSal区と比較して低い傾向にあった（$p=0.051$）（**Fig. 1C**）。ラットにおいては悪心を引き起こす処置によってOXTの血中濃度が増加することが報告されている[10]。今回，山羊ではなぜラットとは逆に血中OXT濃度が低い傾向にあったのかは不明であるが，このことが山羊において悪心の指標となり得るかも知れない。

3.2　実験2

3.2.1　行動および血中コルチゾル濃度

生理食塩水を投与した個体（Sal個体）は180分間伏臥位姿勢を取らなかったが，CDDPを投与した個体（CDDP個体）は113分後に伏臥位姿勢を取り，累積伏臥位時間は14分であった。血中のコルチゾル濃度は，Sal個体では投与前は15.0，180分後は10.7であり，CDDP個体では投与前6.1，180分後69.6（いずれも単位はng/ml）であった。今回は各処置1頭ずつであったので統計解析は実施していないが，やはりCDDP投与によりストレスを感じ，伏臥位姿勢になった。

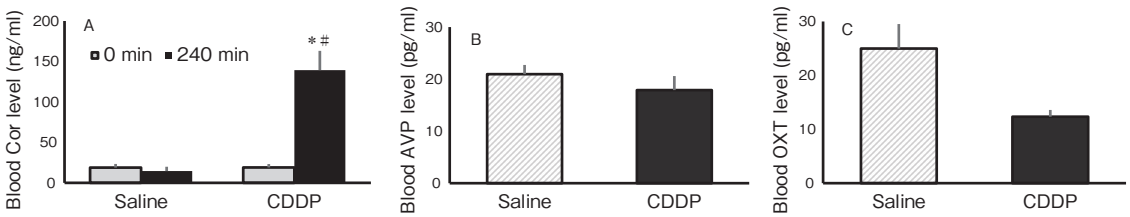

Fig. 1　The effects of cisplatin (CDDP) administration on blood levels of cortisol (Cor) (A), arginine vasopressin (AVP) (B) or oxytocin (OXT) (C). The same volume of saline was administrated as the control. The blood levels at 240 min after the administration were presented, while the levels at 0 min (just before the administration) were also presented only for Cor.

'＊'：significant differed from the results at 0 min within each treatment ($p<0.05$), '＃'：significant differed from the results in the saline administrated control at the same period ($p<0.05$), (repeated measures two way ANOVA).

© The Ito Foundation

3.2.2　延髄におけるc-Fosタンパク質陽性細胞数

Fosを検出する免疫組織化学法により得られた組織像を，NTSの領域を例として**Fig. 2**に示した。**Fig. 2**において矢印で示したFos陽性細胞の数を，神経核ごとに数え，**Table 2**に示した。今回は１頭ずつの検討であったので統計解析はしていないが，CDDP個体のNTSにおけるFos陽性細胞数は，Sal個体のそれの３倍以上であった。一方，DMVおよびNAにおけるそれは両個体間で顕著な違いはなかった。NTSは悪心にかかわる部位とされており，嘔吐をする動物であるフェレット[11]やトガリネズミ（ネズミとついているが齧歯目ではなく食虫目）[12]，嘔吐をしないラットにおいてもCDDP投与によりNTSのFos陽性細胞数は増加する[13]。このことからも山羊，そしておそらく他の反芻家畜も嘔吐はしないが悪心は経験するものと考えられた。一方，DMNにおいては嘔吐する動物ではCDDP投与によりFosは増加するが[12] ラットでは顕著な反応はなかった[13]。DMNは迷走神経を介して消化管の運動にかかわる部位であり，悪心そのものよりも嘔吐を引き起こす役割があるので，嘔吐動物では反応し，嘔吐をしない動物では反応しないのだと考えられた。

4．要　　約

牛や山羊などの反芻動物は嘔吐反射を持たないため，これまで「悪心」（気分が悪いこと）を経験するとは考えられておらず，その研究も皆無である。本研究は，反芻動物である山羊において悪心を示す生理学的マーカーを探索することを目的とした。特に今回は，悪心を引き起こす副作用のある抗癌剤「シスプラチン」（CDDP）を山羊に投与し，その行動学的変化および血中の各種ホル

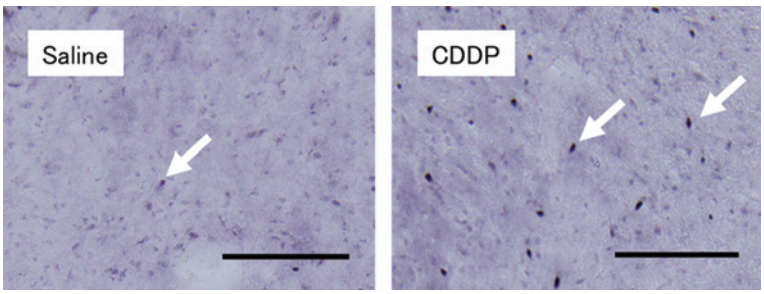

Fig. 2　The c-Fos protein positive cells in the nucleus of the solitary tract of the saline (left panel) or cisplatin (right panel) administrated goat. The c-Fos protein positive cells are indicated with the white arrows. Scale bar = 200 μm. CDDP： cisplatin.

Table 2　The number of the c-Fos protein positive cells in each region of the medulla oblongata in each goat

	Treatment	
	Saline (control)	Cisplatin
Nucleus of the Solitary Tract	296	1105
Dorsal Motor Nucleus of the Vagus	575	622
Nucleus Ambiguus	40	34

Each data represents the data from one female goat, respectively.

© The Ito Foundation

モン濃度の変化を検討した。さらに，CDDP投与による延髄，特に悪心の発生にかかわるとされている孤束核（NTS）における反応を検討した。投与後４時間の行動を記録し，また，血中のコルチゾル（Cor），アルギニンバソプレッシン（AVP），オキシトシン（OXT）の濃度を測定した。その後，２頭の山羊を選び，１頭にはCDDP，もう１頭には生理食塩水を投与し，延髄におけるc-Fosタンパク質陽性細胞を計測した。

CDDP投与により，６頭すべての山羊が約120分後に伏臥位姿勢を取った。また，CDDP投与によりストレスマーカーとなる血中Cor濃度が有意に増加した。血中AVP濃度はCDDP投与の影響を受けなかった。一方，統計的に有意ではないがCDDP投与により血中OXT濃度が減少する傾向があった。延髄におけるc-Fosタンパク質陽性細胞数は，悪心の発生にかかわると考えられている部位である孤束核において，CDDP投与をした個体は生理食塩水投与の個体に比べ顕著に多かった。

これらのことから山羊は嘔吐しないが，CDDP投与によって確かに悪心を経験するものと思われた。一方，悪心に特異的な生理学的マーカーについては，今回オキシトシンが一つの候補としてあげられたが，今後も探求を続けることが必要である。

文　献

1） Andrews, P. L. R., Horn, C. C.：Signals for nausea and emesis: implications for models of upper gastrointestinal diseases, *Auton Neurosci*, **125**, 100～115, 2006.

2） Takeda, N., Hasegawa, S., *et al.*：Pica in rats is analogous to emesis: an animal model in emesis research, *Pharmacol Biochem Behav*, **45**, 817～821, 1993.

3） De Jonghe, B. C., Lawler, M.P., *et al.*：Pica as an adaptive response: Kaolin consumption helps rats recover from chemotherapy-induced illness, *Physiol Behav*, **97**, 87～90, 2009.

4） Aoyama, M., Negishi, A., *et al.*：Short-term transportation in a small vehicle affects the physiological state and subsequent water consumption in goats, *Anim Sci J*, **79**, 526～-533, 2008.

5） Hesketh, P. J.：Chemotherapy-induced nausea and vomiting, *N. Engl. J. Med.*, **358**, 2482～2494, 2008.

6） Aoyama, M., Shioya, M., Tsukamoto, Y., Sugita, S.：The effects of cisplatin, an emetic agent, on behavior and plasma cortisol levels in goats, *Anim Sci J*, doi/10.1111/asj. 13607. 2021.

7） Kenward, H., Pelligand, L., Elliott, J.：Assessment of low-dose cisplatin as a model of nausea and emesis in beagle dogs, potential for repeated administration, *Exp. Brain Res.*, **232**, 2685～2697, 2014.

8） Kenward, H., Pelligand, L., Savary-Bataille, K., Elliott, J.：Nausea：Current knowledge of mechanisms, measurement and clinical impact, *The Vet. J.*, **203**, 36～43, 2015.

9） Tohei, A., Kojima, S., Ikeda, M., Hokao, R., Shinoda, M.：Effects of cyclophosphamide on the kaolin consumption（pica behavior）in five strains of adult male rats, *J. Vet. Med. Sci.*, **73**, 901～906, 2011.

10） Verbalis, J. G., McHale, C. M., *et al.*：Oxytocin and vasopressin secretion in response to stimuli producing learned taste aversions in rats, *Behav Neurosci*, **100**, 466～475, 1986.

11） Reynolds, D. J. M., Barber, N. A., Grahame-Smith, D. G., Leslie, R. A.：Cisplatin-evoked induction of c-*fos* protein in the brainstem of the ferret：the effect of cervical vagotomy and the anti-emetic 5-HT$_3$ receptor antagonist granisetron（BRL 43694）, *Brain Research*, **565**, 231～236. 1991.

12） Ray, A. P., Seetha Chebolu, S., Darmani, N. A.：Receptor-selective agonists induce emesis and Fos expression in the brain and enteric nervous system of the least shrew（*Cryptotis parva*）, *Pharmacol Biochem Behav*, **94**, 211～218, 2009.

13） Horn, C. C.：Brain Fos expression induced by the chemotherapy agent cisplatin in the rat is partially dependent on an intact abdominal vagus, *Autonom Neurosci*：*Basic and Clinical*, **148**, 76～82. 2009.

© The Ito Foundation

令和４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　品質・製造加工技術　（調理加工技術含む）（８件）				
調味液浸透肉の電子レンジ加熱硬化特性とその食感品質に関する研究		河野　俊夫	高知大学教育研究部自然科学系農学部門	1,750
加圧CO_2環境下での酵素加水分解を利用したポークミートエキスの製造法の開発		野間　誠司	佐賀大学農学部	1,800
食用ブドウ球菌によるZnPP形成と食肉製品の色調改善効果に関する研究		若松　純一	北海道大学大学院農学研究院	1,800
生理的に調節しうる濃度のカルノシンの添加は，鶏肉の匂いを改善するか？		渡邊　源哉	農研機構畜産研究部門	900
工業型畜産の課題解決に向けた培養肉の生産技術開発		岡村　大治	近畿大学農学部	1,950
乾燥熟成牛肉より分離された真菌の生理特性およびその利用に関する研究		中川　麻衣	一般社団法人食肉科学技術研究所	1,050
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（Ⅱ）	R3～	西村　敏英	女子栄養大学栄養学部	1,400
黒毛和種牛肉の香り特性の改善に関わる脂質過酸化反応系の解析―コールドチェーン物流の転換に向けた科学的アプローチ―		上田　修司	神戸大学大学院農学研究科	1,800
Ⅰｂ　食肉の食品的価値　（３件）				
畜産副生物から作成された再生医療部材の引張強度の解明		神田　英輝	名古屋大学大学院工学研究科	1,750
食肉加水分解物の栄養機能について（Ⅱ）	R3～	竹之山　慎一	南九州大学健康栄養学部	1,800
豚のオス臭を形成する臭気成分の分析とそれを記述する用語の同定		河原　聡	宮崎大学農学部	1,200
Ⅰｃ　食品安全　（３件）				
細菌のファージ感受性増大およびスーパーファージ作製に関する研究		宮本　敬久	九州大学大学院農学研究院	1,650
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（Ⅱ）	R3～	山口　堅三	徳島大学ポストLEDフォトニクス研究所	1,800
高酸素ガス置換包装が食中毒菌の生存性に与える影響の検証		岡田　彩加	岐阜大学応用生物科学部共同獣医学科	1,650

© The Ito Foundation

Ⅱａ　遺伝育種　（８件）				
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（Ⅱ）	R3～	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	1,850
早産を伴う子牛死亡に関連する遺伝的要因の解明（Ⅱ）	R3～	平野　貴	東京農業大学 農学部	1,200
近交度の高い金華豚集団の遺伝的多様性に関する評価		塩谷　聡子	静岡県畜産技術研究所中小家畜研究センター	1,600
表型値間因果構造を利用した豚繁殖形質の正確な同時改良手法開発		岡村　俊宏	農研機構 畜産研究部門	850
黒毛和種牛肉における「甘い香り」の育種改良手法の確立（Ⅱ）	R3～	庄司　則章	山形県農業総合研究センター 畜産研究所	2,000
新たに見つかった黒毛和種牛の筋ジストロフィーの病態解明と遺伝的統御法の確立		保田　昌宏	宮崎大学農学部	1,300
鶏の暑熱耐性を担うCCKARおよびHSP70遺伝子多型に関する研究		福原　絵里子	福岡県農林業総合試験場	1,600
黒毛和種における体型評価部位「肋付き」の客観的評価手法の開発（Ⅱ）	R2～	鈴木　洋美	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,000
Ⅱｂ　繁殖　（17件）				
多機能尾部センサを用いた重種馬の分娩予知		滄木　孝弘	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	2,000
哺乳期の栄養環境が繁殖機能に与える影響		髙橋　秀之	九州大学農学部 附属農場	1,300
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（Ⅱ）	R3～	法上　拓生	農研機構九州沖縄農業研究センター	950
卵巣予備能に基づく新規受卵牛選定技術の検討（Ⅲ）	R2～	小山　毅	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,700
ロボット搾乳システム牛群での発情検知情報と乳汁中プロジェステロン濃度の推移による鈍正発情牛の検出と授精適期の評価		吉田　智佳子	新潟大学農学部	650
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（Ⅲ）	R2～	久保田　海雄	農研機構 畜産研究部門	1,700
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（Ⅱ）	R3～	中島　友紀	農研機構 畜産研究部門	2,000
ホルスタイン種牛の妊娠期における卵巣予備能維持機構		古山　敬祐	大阪公立大学大学院獣医学研究科	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（Ⅲ）	R2～	日巻　武裕	岐阜大学 応用生物科学部	750
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―（Ⅲ）	R2～	西村　亮	鳥取大学農学部 共同獣医学科 獣医繁殖学	1,700
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？（Ⅱ）	R3～	金澤　朋美	岩手大学農学部 共同獣医学科	2,000
小胞体ストレス制御によるウシ体外生産胚の耐凍性向上に関する研究		山中　賢一	佐賀大学農学部	1,100
乳牛のルーメン内環境が肝臓の炎症を介して繁殖機能に及ぼす影響		大滝　忠利	日本大学 生物資源科学部 獣医学科獣医臨床繁殖学研究室	1,200

© The Ito Foundation

豚胚品質の客観的評価法の確立に関する研究		平山　祐理	独立行政法人家畜改良センター	1,700
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（Ⅱ）	R3～	山口　昇一郎	福岡県農林業総合試験場	1,600
排卵後早期の卵巣形態と性ステロイドホルモンバランスがウシ子宮の免疫機能に及ぼす影響		松井　基純	帯広畜産大学獣医学研究部門	1,100
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（Ⅱ）	R3～	鍋西　久	北里大学獣医学部	1,850
Ⅲ　動物衛生　（17件）				
南西諸島地域における肉用ヤギの消化管内部寄生線虫感染症に関する実態調査		波平　知之	琉球大学農学部附属亜熱帯フィールド科学教育研究センター	1,400
遺伝性心筋症による豚の突然死の病態解明と生前検査法の確立		相原　尚之	麻布大学獣医学部	1,400
牛伝染性リンパ腫ウイルス由来の非翻訳性RNAと結合する宿主たんぱく質の同定（Ⅲ）	R2～	安藤　清彦	農研機構動物衛生研究部門	1,500
豚熱ウイルス受容体候補タンパク質の網羅的探索		池田　圭吾	農研機構動物衛生研究部門	1,400
Clostridium novyi sensu lato の新しい鑑別法の開発へ向けた国内家畜由来株のゲノム解析		高松　大輔	農研機構動物衛生研究部門	2,000
ブタ呼吸器複合感染症の原因ウイルスを解析する新たな *in vitro*モデルの確立		宮澤　光太郎	農研機構動物衛生研究部門	1,500
牛呼吸器病症候群（BRDC）の悪化におけるバイオフィルム形成の関与		帆保　誠二	鹿児島大学共同獣医学部	1,500
畜産農場に生息するハツカネズミの免疫関連遺伝子の多様性と病原体媒介能力		高島　康弘	岐阜大学応用生物科学部	1,400
牛マイコプラズマによる気管傷害と細胞内侵入過程の解明		平野　佑気	北海道立総合研究機構畜産試験場	1,800
黒毛和種牛における血液中のビタミンDの状況把握と牛におけるビタミンDの免疫賦活作用および抗炎症作用の検討		乙丸　孝之介	鹿児島大学共同獣医学部	800
牛呼吸器病ウイルスの鼻咽頭関連リンパ組織におけるウイルス増殖と病態解析		平井　卓哉	宮崎大学農学部	2,000
イノシシにおける豚コロナウイルスの感染実態調査（Ⅱ）	R3～	中川　敬介	岐阜大学応用生物科学部 共同獣医学科	2,000
ウシRSウイルス研究に最適な細胞株の樹立		齊藤　暁	宮崎大学農学部	1,300
ライフサイクルに応じたパイエル板の機能解明と制御因子の探索		古川　睦実	東北大学大学院農学研究科	2,000
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（Ⅱ）	R3～	岡村　雅史	帯広畜産大学獣医学研究部門	1,900
地方病性牛伝染リンパ腫発症牛におけるゲノムワイドなDNAメチル化解析		前澤　誠希	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,400
ブタにおける医薬品の適正使用に向けた薬物代謝酵素の解析		宇野　泰広	鹿児島大学共同獣医学部	1,500
Ⅳ　家畜飼養，飼料など　（23件）				
飼料費低減に向けた低硝酸態窒素と高粗タンパク質を両立する夏季牧草の窒素管理技術		林　征幸	農研機構九州沖縄農業研究センター	700
筋肉タンパク質合成・分解を制御する植物性成分による畜肉生産の向上研究		佐藤　隆一郎	東京大学大学院農学生命科学研究科	1,700

© 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（Ⅱ）	R3～	津上　優作	広島大学大学院統合生命科学研究科	950
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（Ⅱ）	R3～	池田　堅太郎	農研機構九州沖縄農業研究センター	1,000
骨格筋の成長と炎症予防（抑制）を目的としたPGC-1αアイソフォームの発現制御に関する研究		實安　隆興	神戸大学大学院農学研究科	1,100
畜産動物の脂肪酸味覚受容体の機能解析		吉田　悠太	茨城大学農学部食生命科学科	1,600
衛星コンステレーション画像の時系列深層学習による低コストな飼料用トウモロコシ収量予測手法の開発		小花和　宏之	農研機構北海道農業研究センター	1,850
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（Ⅲ）	R2～	西本　完	農研機構食品研究部門	1,850
暖地で冬期に高品質な粗飼料を生産するイタリアンライグラス夏播き栽培技術の開発		加藤　直樹	農研機構九州沖縄農業研究センター	800
和牛向け稲発酵粗飼料および発酵完全混合飼料を厳冬期でも高品質調製するための新規乳酸菌の添加効果の検証		遠野　雅徳	農研機構畜産研究部門	2,000
生時低体重でも生後発育回復できる子豚は何が違うのか？―血液指標の探索―		中島　郁世	農研機構畜産研究部門	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（Ⅱ）	R3～	矢用　健一	農研機構畜産研究部門	1,700
ニワトリヒナに備わる抗炎症能力の解明～抗酸化能に注目して～		橘　哲也	愛媛大学大学院農学研究科	1,800
沖縄アグー豚育成豚における飼料中のタンパク質水準の違いが増体および背脂肪厚の発達に及ぼす影響		普照　恭多	沖縄県農林水産部畜産研究センター	1,350
睡眠様姿勢一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（Ⅱ）	R3～	深澤　充	東北大学大学院農学研究科	1,850
暑熱ストレス下におけるニワトリ筋タンパク質分解に対するL-シトルリンの新規機能の解明		スルチョードリ・ビジュワジット	九州大学基幹教育院	1,450
子牛における乳糖不耐性に関する研究		福森　理加	酪農学園大学獣医学群	1,900
暖地型牧草・芝草におけるゲノム編集による冬期常緑性新規育種素材の開発		権藤　崇裕	宮崎大学フロンティア科学総合研究センター	1,700
南九州における暖地型牧草の新規調製“霜熟”の開発―晩夏播きパールミレット霜枯れ草の収量，サイレージ品質と選好性―		石井　康之	宮崎大学農学部	1,000
高品質な豚肉生産のためのエゴマ搾り粕の利用に関する研究		田島　茂行	愛知県農業総合試験場	1,600
ルーメン細菌叢制御を目指した子ウシ唾液抗体の分泌機能の解明		鈴木　裕	北海道大学大学院農学研究院	1,700
多機能性因子の合成を介した筋衛星細胞による自律的な筋肥大誘導機構の解釈を利用した新プラットフォームの形成		鈴木　貴弘	九州大学大学院農学研究院	1,700
食肉処理場から排出される牛ルーメン液の潜在的資源価値の具現化 ～メタン発酵技術を用いた肥料化の検討～		阿部　憲一	新潟食料農業大学食料産業学部	1,700
合　　計　　79件				120,000

© The Ito Foundation

伊藤記念財団賞

© The Ito Foundation

山　田　知　哉

農研機構西日本農業研究センター　上級研究員

〔業績の課題名〕

肥育牛におけるアディポジェネシス制御機構の解明に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

脂肪組織が成長する一連の過程は，「アディポジェネシス」と総称される。肉牛では蓄積部位によって脂肪の経済価値が大きく異なることから，ウシ品種や給与飼料の特性に応じた牛肉生産を考える場合において，蓄積部位別に脂肪組織成長能力を的確に把握することが重要となってくる。しかし，脂肪部位別のアディポジェネシス制御機構の詳細に関しては，ヒトや実験動物を含めこれまで不明であった。受賞者は研究代表者として６件の伊藤記念財団研究助成金採択を受けて，肥育牛におけるアディポジェネシス制御機構の解明に関する一連の研究を実施し，以下の成果をあげた。

（１）　脂肪細胞分化制御因子が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響

脂肪細胞分化制御因子が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響を検討した結果，肥育の進行に伴い脂肪細胞における分化促進因子C/EBPファミリーの発現が増加することを見いだした。また脂肪蓄積能力の高い黒毛和種は，C/EBPファミリーの発現がホルスタイン種より高いことを明らかにした。給与飼料の影響を検討した結果，粗飼料多給区と比較し，濃厚飼料多給区ではC/EBPファミリーの発現が増加していることを見いだした。さらに，脂肪蓄積部位によって分化制御因子の発現量が異なっており，発現量と脂肪細胞の肥大化間に相関があることを明らかにした。

（２）　免疫細胞が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響

免疫細胞が肥育牛のアディポジェネシスに及ぼす影響を検討した結果，内臓脂肪では皮下脂肪より免疫細胞浸潤が増加しており，組織の炎症や老化が進行していること，細胞老化促進因子であるｐ53遺伝子が脂肪組織の炎症や老化を制御していることを明らかにした。さらに，ウシ品種差の影響を検討した結果，黒毛和種では内臓脂肪における組織の炎症ならびに組織老化がホルスタイン種より亢進しており，内臓脂肪への免疫細胞浸潤亢進に伴って内臓脂肪での脂肪蓄積能力が低下し，余剰エネルギー蓄積部位が筋肉内脂肪部位に遷移する新たな筋肉内脂肪の蓄積制御機構を見いだした。

（３）　メタボロミクス解析を活用した肥育牛のアディポジェネシス制御機構の研究

メタボロミクス解析は，これまで主に医学分野において，疾病特異的なバイオマーカーの同定を目的として用いられてきた。そこで，肥育牛の筋肉内脂肪蓄積能力に関連するバイオマーカーを同定するため，筋肉内脂肪蓄積能力の大きく異なる黒毛和種とホルスタイン種肥育牛を用いて，血漿および筋肉内脂肪細胞のメタボロミクス解析を実施した。その結果，脂質合成や脂肪酸代謝およびグルコース代謝等に影響している代謝産物を，肥育牛の筋肉内脂肪蓄積能力に関連する血中および脂肪細胞中のバイオマーカーとして同定することに初めて成功した。

© The Ito Foundation

鍋　西　　久

北里大学獣医学部動物資源科学科　准教授

〔業績の課題名〕

家畜に及ぼす熱環境の影響評価と対策技術の開発ならびに畜産分野へのICT導入に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

（１）　肉牛生産における熱環境の影響評価と対策技術に関する研究

気候変動に伴う熱環境変化による生産性低下が大きな問題となるなか，肉牛生産現場において温暖化適応策を実践するための技術情報は著しく不足していた。そこで，熱環境指標として温湿度指数（THI）に着目し，大規模な野外調査データをもとに解析することで，生産現場における子牛の生産性，雌牛の繁殖性に及ぼす熱環境の影響を明らかにした。子牛の生産性に対する熱環境要因として，THIと疾病発生件数，発症疾病との関係性を見出し，発育については，出生後３ケ月と４～６ケ月間で寒冷・暑熱に対する反応性に違いがあることを示した。これらの知見は，発育ステージに応じた適切な飼養管理対策（寒冷・暑熱）に寄与するものである。肉用繁殖雌牛における人工授精のTHIと受胎率との間に明瞭な関係性があることを明らかにし，THIが低い場合に受胎率が有意に低下することを示し，同様の現象を胚移植成績でも確認した。この要因として，寒冷時におけるエネルギー充足率の不足に起因する卵子の品質低下の可能性を示唆し，その後の経腟採卵による研究で寒冷時の卵子品質の低下を確認した。寒冷時の受胎率低下を報告した初めての論文であり，冬期における飼養管理の重要性が広く認識されることとなった。また，重要な肉牛生産基盤である乳牛の繁殖性に対する熱環境の影響評価についても研究を進め，夏季受胎率低下の現状と要因解明に取り組んだ。暑熱期の体温日リズムを再現した培養系で，暑熱負荷が卵母細胞の成熟に及ぼす影響を検証し，暑熱負荷によって核成熟とその後の胚発生を阻害することを証明し，酸化ストレスの関与を明らかにした。

（２）　畜産分野への情報通信技術（ICT）の導入に関する研究

我が国の肉牛生産においては，生産基盤強化を図るうえで繁殖成績改善，子牛の事故率低減および労働負担の軽減が重要な課題である。これらの課題を解決するため，早くから畜産分野へのICT導入に関する研究に取り組み，飼養管理の効率化を目的とした研究を展開してきた。大規模な繁殖履歴データを詳細に解析した研究において，分娩間隔が延長している繁殖経営では，発情発見効率を改善することが，分娩間隔短縮の近道になることとあわせて繁殖管理の重要性を示した。そこで，中小規模経営でも導入しやすい安価で普及性が高い発情発見装置を開発するとともに，当時では初となる繁殖管理用スマートフォンアプリを開発した。肉牛生産における分娩事故は，収益面だけではなく飼養者の精神面にも影響を及ぼす。さらに，昼夜を問わない監視作業が大きな労働負担となっている。そこで，遠赤外線カメラと画像認識技術の活用による分娩前兆候検出について検討を行い，非接触手法で肉用牛の分娩前兆候を検出できることを明らかにした。これは現在大いに注目されている畜産におけるICT導入の基本技術の一つとなっている。

© The Ito Foundation

竹之山　愼　一

南九州大学健康栄養学部　教授

〔業績の課題名〕

機能性に基づいた食肉の付加価値向上および持続可能な食肉生産に関する研究

〔業績の概要（受賞理由）〕

食肉・食肉製品は我々の食生活では必要な脂質，タンパク質，ビタミン，ミネラル等の重要な供給源であり，これらの栄養特性，機能性に関する研究は最重要課題である。生活習慣病等との関連から健康に対して消費者に負の影響を与えがちな食肉・食肉製品において，機能性脂肪酸である共役リノール酸，食肉加水分解物における機能性向上に関する研究を行ってきた。さらに，食肉生産における食品副産物の有効利用を目的として，食肉の栄養特性の研究について継続的に行っている。その研究は以下の（1）～（3）に大別される。

（1）　食肉・食肉製品の共役リノール酸に関する研究

食肉・食肉製品の摂取は，生活習慣病や肥満等との関連から，健康に対して負の影響を与えると考えられている。一方で，反芻動物の乳・肉中に見出された共役リノール酸（conjugated linoleic acid：CLA）が抗ガン作用等を有することが明らかとなった。いち早くCLAに注目し，その簡便な定量法を確立するとともに，食肉・食肉製品や乳製品中のCLA含量を報告した。それらの報文において，反芻家畜由来の食肉製品，乳製品にCLAは多く含有され，発酵や給与飼料の相違により含量が増減することを示した。

（2）　食肉タンパク質の機能性に関する研究

近年，タンパク質摂取が高齢者の運動機能低下の予防や，スポーツ選手の筋力維持，向上につながることから食肉由来タンパク質への期待が高まっている。直接タンパク質を摂取するのではなくタンパク質を酵素分解した食肉酵素加水分解物由来の機能性について研究し，DPPHラジカル消去活性，ACE阻害活性が上昇することを示し，食肉製品摂取が健康の維持増進に重要であることを示した。

（3）　食品副産物の給与により生産された食肉の品質に関する研究

食肉生産性や飼料自給率の向上，飼料コスト削減，さらに付加価値向上は，日本の畜産業が抱える恒久的な課題である。食品製造残渣等の有効利用による課題解決を目的として，南九州地域とくに宮崎県で多量に排出されるカンショ茎葉，ワイン搾汁残渣，ヘベス搾汁残渣，焼酎粕残渣の家畜飼料（エコフィード）化に勢力的に取り組んでいる。とくに，エコフィードの給与が肉質や肉の栄養特性に及ぼす影響について数多く検討し，それぞれの素材が飼料として利用可能であること，そして肉質・栄養特性等向上させる可能性があることを示した。

© The Ito Foundation

学会等事業助成

© The Ito Foundation

令和４年度学会等事業助成実施報告書
市民公開講座『ジビエにおける食品衛生上の問題点―寄生虫汚染を中心に―』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〕

我が国の高齢化や産業構造の変化，特に農業就業者の減少の結果，野生動物が増え，さらに農産物被害が深刻化している。政府は野生動物の駆除とともに，駆除した野生動物の利活用を推進した。その利活用のひとつとして，ジビエ（野生動物の肉）としての利用があげられる。最近では，ジビエが市場に出回ることが多くなり，スーパーマーケット等でも牛肉や豚肉のとなりに，イノシシ肉やシカ肉も見かけるようになった。しかし，「と畜場法」という法律の下で１頭ごとに獣医師による検査（と畜検査）が行われる家畜とは対照的に，野生動物を対象とした検査は実施されていない。さらに，衛生的な飼育管理が行われる家畜とは異なり，野生動物は自然界でさまざまな病原体に感染している可能性が高い。したがって，ジビエは，一般的な牛肉や豚肉よりも消費者に健康被害をもたらすリスクが高いと言える。実際，ジビエを原因とした食中毒の事例は，日本でも数多く報告されている。一方で，ジビエの喫食がもたらすリスクを正確に理解し，正しく調理をすることで食中毒を効果的に予防することが可能である。そこで今回の市民公開講座では，ジビエの食品衛生，特にジビエの寄生虫汚染とその対策について理解を深める目的で，４名の専門家を招き，イノシシ・シカの肺吸虫症，シカにおける住肉胞子虫寄生，イノシシ・シカの病原細菌保有状況に関して講演いただいた。

今回の公開講座が一般市民の方々に獣医学に関心を持っていただき，獣医学の社会貢献についてご理解いただける契機となること，さらにジビエに携わる関係各位，消費者が食品衛生についてご理解を深めるための一助となることを祈念する。

〔開催概要〕

令和５年２月４日（土曜日）13：00－17：00に現地講演およびZOOMライブ配信を併用した「ハイブリッド方式」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327名の申込があり，当日の参加者は265名（現地参加29名，オンライン参加236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，現地参加者に配布するとともに，本講座開催の記録とした。

〔市民公開講座プログラム〕

「ジビエにおける食品衛生上の問題点―寄生虫汚染を中心に―」

© The Ito Foundation

座長：森田幸雄（麻布大学獣医学部 教授）
伊藤直人（岐阜大学応用生物科学部 教授）

1．開会挨拶　猪熊　壽（公益社団法人日本獣医学会 理事長）
2．講演１　イノシシの肺吸虫症
講師：入江隆夫（宮崎大学農学部 准教授）
3．講演２　シカの肺吸虫症
講師：松尾加代子（熊本県阿蘇保健所衛生環境課，岐阜大学応用生物科学部 客員獣医系教授）
4．講演３　シカにおける住肉胞子虫の保有状況
講師：山崎朗子（岩手大学農学部 助教）
5．講演４　野生鳥獣における病原細菌保有状況
講師：壁谷英則（日本大学生物資源科学部 教授）
6．総合討論

〔講演概要〕

講演１「イノシシの肺吸虫症」

講師　入江隆夫（宮崎大学農学部 准教授）

肺吸虫症は，かつては「肺ジストマ症」と呼ばれ，国内で30－50万人が感染していたと推定される国民病であった。その後，集団検診・集団駆虫により患者数は激減したが，近年でも，年間50例ほどの肺吸虫の症例がかつての流行地域を中心に散見されている。ヒトが肺吸虫に感染すると，感染後３～４週間ほどで胸膜炎による胸水貯留や気胸による胸痛などが出現する。その後，発咳や血痰などといった呼吸器症状が認められる。これらの症状だけでは診断が困難な場合も多いため，「食歴」の情報が診断において非常に重要となる。

ヒトやイヌなど終宿主への感染は，第二中間宿主（淡水産カニ）体内のメタセルカリア，もしくは待機宿主であるイノシシ体内の幼若虫の経口摂取により起こる。特にイノシシについては，狩猟および有害捕獲による捕獲頭数が年々増加しており，令和３年度は，イノシシの感染症（豚熱）の影響もありやや減少したものの，年間53万頭ものイノシシが捕獲され，このうち一部は食用流通している。食用として販売されていた九州産イノシシ肉の33％からウエステルマン肺吸虫の幼虫が検出された報告があることから，イノシシ肉を介した肺吸虫感染のリスクに注意が必要である。イノシシ肉の摂食に際しては，冷凍処理または加熱調理を徹底することが肺吸虫症の予防対策として有効である。

講演２「シカの肺吸虫症」

講師　松尾加代子（熊本県阿蘇保健所衛生環境課，岐阜大学応用生物科学部 客員獣医系教授）

肺吸虫はその名のとおり，肺に寄生する丸い豆のような形をした吸虫である。肺に寄生した場合，症状として胸の痛み，息苦しさ，血液まじりの痰などの呼吸器症状が認められる。脳に寄生した場合は，痙攣，嘔吐，麻痺，視覚障害などの神経症状が出現する場合もある。人は，メタセルカリアと呼ばれる幼虫が寄生したサワガニやモクズガニなどの生食や，感染カニを捕食したイノシシなどの筋肉に潜んだ幼虫を食べることで感染する。一方，シカ肉を食べて肺吸虫に感染した患者が約20年前から多数報告さ

© The Ito Foundation

れている。当時，草食のシカがサワガニを捕食するとは信じられていなかったが，講師は岐阜県で捕獲された肺吸虫抗体陽性のシカの胃内容物にサワガニが含まれることを証明した。シカ肉も肺吸虫の感染源となることが判明した今日，十分な加熱調理による予防がきわめて重要となっている。特に，重症化しやすい子供，妊婦，高齢者などはシカの生肉や加熱不十分な肉を摂食しないよう十分に注意する必要がある。

講演３「シカにおける住肉胞子虫の保有状況」

講師　山崎朗子（岩手大学農学部 助教）

最近，2011年に報告された馬刺の食中毒事例で新規食中毒起因微生物として発見された住肉胞子虫 *Sarcocystis* sp. が野生ニホンジカにも寄生していることが分かり，2014年に馬刺同様シカ肉の生食で食中毒事例を起こした。野生動物であるニホンジカは，広範囲を行き来しながら複数の家畜生息域と接触することが考えられ，すでにウシとも接触していると考えられる。このように，野生ニホンジカに寄生している住肉胞子虫はジビエ喫食時のリスクに加え，家畜への感染源となる可能性も想定される。しかし，これまでに報告された疫学研究は，調査地域の偏りや，検体数の数などの点からも十分でないうえに，寄生量についての調査は詳細に行われていなかった。そこで本研究では，全国規模での野生ニホンジカにおける住肉胞子虫の寄生量に重点を置いた疫学調査を行った。その結果，住肉胞子虫の寄生数は性別や加齢でなく，生息地域に依存することが示唆された。ただし，生息地間で認められた寄生量の相違は，宿主であるニホンジカの種類に依存するものか，シカの生息地に分布している住肉胞子虫の種類によるものか，複数の可能性がある。

ウマに寄生する住肉胞子虫とシカに寄生する住肉胞子虫は種が異なるため，毒性についても異なることが予想される。毒性の差異は，強度，性質，作用機序など，多数の点での違いが想定されるため，毒性解明を目的とした比較毒性研究が期待される。毒性解明の結果を基にした，効果的な無毒および減弱化の処理法を構築することは，安全なジビエの流通に大きく貢献できる。

講演４「野生鳥獣における病原細菌保有状況」

講師　壁谷英則（日本大学生物資源科学部 教授）

現在，野生のシカやイノシシと人が接触する機会は以前に比べ格段に増加しており，実際にジビエを原因とするさまざまな人獣共通感染症の事例も散発的に報告されている。しかしながら，シカ，イノシシなどのジビエは，と畜場法によると畜検査の対象外であり，わが国のシカ，イノシシ由来の各種人獣共通感染症に関するリスク評価ならびにリスク管理は，必ずしも十分行われていない。

野生鳥獣を食用として利活用する際の人への危害要因を整理するには，①経口感染（食肉の喫食による感染），②創傷感染，③ベクターによる感染，の３つの感染経路を想定する必要がある。今回の講演では，特に講師らが研究を進めているシカやイノシシを原因とする人獣共通感染症について，上記感染経路別に，疫学情報および感染事例を中心に概説した。具体的には，経口感染する細菌として，*Campylobacter*属菌，*Salmonella*属菌，志賀毒素産生大腸菌を例として，国内外のシカやイノシシにおける保有状況について説明した。また，ベクター媒介性感染，創傷・接触感染する細菌として，豚丹毒菌，*Bartonella*属菌を例としてシカやイノシシにおける流行状況に関して解説した。

捕獲された野生鳥獣を有効に活用するため，食肉に利用する試みが進められている。厚生労働省は

© The Ito Foundation

「野生鳥獣肉の衛生管理に関するガイドライン」を策定，令和２年５月には一部改正し，野生鳥獣肉の衛生管理の徹底を推進している。一連の食肉処理工程における糞便や土壌からの細菌汚染防止のため，衛生的な処理方法を啓蒙していく必要がある。しかしながら，野生鳥獣の場合，糞便，土壌汚染を完全に排除しても安全とは言えない。野生鳥獣肉は十分な加熱が必須であることを改めて強調したい。

© The Ito Foundation

日本食肉科学会　令和４年度事業助成実施報告

日本食肉科学会　前理事長　坂田亮一（麻布大学名誉教授・明治大学客員研究員）

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）第68回国際食肉科学技術会議（ICoMST2022，令和４年８月神戸開催，日本食肉科学会主催）の運営助成，（２）国内における学会大会での特別セミナーの助成（外国人研究者の招聘講演，大会の補助など）である。

昨年８月に実施された（１），それに伴うICoMST2022組織委員会の活動，および今年３月に行った（２）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

本学会（以下，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きた。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・改組した。その理由は，2022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，また関係諸方面に主催団体の理念と活動内容をアピールするためにも，学会化は必須であるとの会員の総意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。

本会の会員数は，本年２月28日現在で，正会員182名（前年181名），学生会員４名（前年８名）賛助会員３社（前年５社），特別会員29社（前年29社），法人６団体（新設），名誉会員７名（前年８名），功労会員６名（新設）である（令和５年度の総会資料より）。

３．今回の助成結果

（１）　第68回国際食肉科学技術会議（ICoMST2022，令和４年８月神戸開催）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，日本食肉研究会の時代より会員から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68回会議（ICoMST2022）に向けてその

© The Ito Foundation

４年前に本格的に組織委員会を立ち上げ，本事業助成の始まった2019年の第65回会議（ドイツ，ポツダムで開催）には本会から会員４名が参加した[1]。

その後，世界中で新型コロナウイルスの感染拡大という想定外の事態が生じ，2020年８月米国フロリダ州オーランドでの国際会議（第66回大会）では，急遽オンラインの開催となったが，我々組織委員会として，この海外派遣事業の補助を活用し，ICoMST2020に大いに参加を呼びかけた。その結果，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]。

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。2021年の第67回大会はポーランドのクラクフで開催され（ハイブリッド形式），第68回大会委員長として坂田が実参加し現地で各国代表会議にも出席し，日本開催の広報活動を行った。アジア地域から唯一の実参加でもあった。また我が国から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]。

ICoMST2022組織委員会は2020年からピッチを上げてほぼ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きた。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た。そのためにNews Letterも発行し，組織委員会活動の広報に努めた。図は会議終了時に会場で配布したもので，ここまで合計10回作成している（図１，２）。

会議の開催内容は，「食肉の科学」第63巻２号[4]を参照いただきたい。コロナウイルス感染が収まらない中で，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，種々難航しながらも無事終了した。参加国は32か国，参加者は300名強あり，伝統あるこの国際

ICoMST2022 News Letter No.10(Kobe Special)

ICoMST2022, Kobe, Japan

■ ありがとう神戸・よろしく Padova, Italy

Closing ceremony

ICoMST2022 は 8 月 25 日（木）に最終日を迎え、３つのセッションで研究発表と活発な質疑応答が行われ、すべての発表は終了しました。18:10 ほぼ on time で閉会式が宮崎大学の河原先生の進行で始まりました。

河原先生(宮崎大学)　坂田組織委員長　Troy Declan 事務局長　有原先生(北里大学)

★優秀発表賞の表彰：本来であれば、受賞者は壇上に呼ばれ、受賞式を行う予定でありましたが、今回は有原先生が各受賞者氏名を呼ぶだけの内容となりました。なお、ICoMST 組織委員会から 3 名、出版社の Elsevier から 1 名が表彰され、記念品とともに贈呈(後日、託送)されます。

Excellent Presentation Award at ICoMST2022

< ICoMST2022 proudly presents>

ORabiaa Ben Mbarek

"Effect of rearing practices and pre-slaughter handling on the Longissimus thoracis and the Semitendinosus muscle proteomes of young bulls"

OCeline Schiell

"Investigation of the physicochemical and textural properties of an iron-rich 3D-printed hybrid food"

OIssei Yokoyama

"Effect of grazing on the odors, tastes, and metabolites of Japanese Shorthorn beef"

< Elsevier proudly presents >

OSara Alvarez (Teagasc Food Research Centre Ashtown, Ireland) as the winner for the best.

"Moisture content, water activity, and water populations across different locations within beef (M. longissimus thoracis et lumborum) sections during dry-aging"

OLauren Lee (Texas A&M University, USA) as the winner for the second best.

"Consumer acceptance and shear force values of top sirloin steaks prepared using sous vide and flat-top grill cookery methods"

OXinyi Wei (University of Guelph, Canada) as the winner for the third best.

"Automated pork belly firmness evaluation as affected by temperature and multiple bends"

図１　ICoMST2022会議の最後に配布したNews Letter No. 10の表頁

From Kobe, Japan to Padova, Italy

★次期大会イタリア代表の紹介：こちらも本来であれば会場で次期大会の招致および歓迎挨拶を伺うべきでありますが、Antonella 先生は Zoom での開出しとなりました。

画面越しの Cow Bell の引継ぎ

Dr. Antonella Dile Zotte

坂田委員長

Padova

大会終了後、参会者一同での記念写真

左から、有原、Declan、坂田、松石、河原の各位

会場の様子(Closing ceramony)

★Special thanks

今回の No.10 もそうですが、会期中の多くの写真は帯広畜産大学の口田先生によるものが多くありましたので、ここに記して謝意を表します。また、多くの写真を今後の報告集などに借用させて戴きたく、お願いを込めて・・・

図２　ICoMST2022会議News Letter No. 10の２頁目

© The Ito Foundation

会議の名を汚すことなく遂行できたことに組織委員会一同安堵し，次の会議を開催国のイタリアに引き継いだ。

なお，この国際会議の開催運営の記録を残し，後世に伝えるために記念誌の作成を会議終了後に開始し，令和５年に発行予定で編纂作業を進めている。

（２） 国内における学会大会での特別セミナー（外国人研究者の招聘講演など）の助成

日本食肉科学会の第64回学会大会を，2023年３月25日に日本獣医生命科学大学で開催した。この大会ではオンラインに頼らず，すべて対面で行った。このような大会様式は４年ぶりのことであったが，参加者で会場の大講義室はほぼ埋まり，まず若手優秀発表（７演題）と一般発表（５演題）で，活発に質疑応答が行われた。

特別講演として，令和３年度伊藤記念財団賞の受賞講演を上田修司会員（神戸大学）が行った（図３）。本講演は『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』と題され，前回の本財団賞受賞者の酪農学園大学の岩崎智仁会員を座長として，進められた。

その受賞講演では，生体内に含まれる代謝物（糖質，アミノ酸，有機酸，脂肪酸）の網羅的解析（メタボロミクス）が目まぐるしく進歩していくなか，畜産分野において畜産物の品質評価や付加価値の向上に向けたこれまでの上田会員の取り組みについて紹介された。メタボロミクス技術により食肉品質の特徴となる代謝物を見つけ出し，その点を深く追求する一連の研究過程が説明された。畜産物加工や食肉流通に貢献していきたいとの今後の研究展望も述べられ，さらなる研究の発展が期待される。

図３ 令和３年度伊藤記念財団賞受賞の上田修司会員による特別講演

続いて海外からの特別講演で，ICoMST2023イタリア代表のDr. Antonella Dalle Zotte（Padova University 教授）を招き（図４），Traditional Italian meats and cold cuts ： a valuable support for economic sustainability and/or animal biodiversity（伝統的なイタリアの食肉と冷製食肉加工品：経済的持続可能性と動物の多様性）と題した講演が行われた。講演冒頭に，今年８月20～25日にイタリアPadovaで開催されるICoMST2023について熱のこもった紹介があった。会議の開催方式は，コロナ禍以前の対面形式に戻って行い，ICoMST国際事務局長のDr. Troy Declan（アイルランド，昨年神戸での会議にも現地参加）を司会としたパネルディスカッションなどを特徴としたプログラムが予定され，テクニカルツアー内容も充実していることが伝えられた。

図４ ICoMST2023開催のイタリア代表 Prof. Antonella Dalle Zotteを招聘し特別講演実施

© The Ito Foundation

本講演では，まずイタリアの食肉生産・消費に関して日本と比較しながら紹介があり，鶏肉・豚肉・牛肉・馬肉の生産・消費の規模は日本と大きく変わらないが，ウサギ，ウズラが異なる点であることが紹介された。２つ目として，イタリアの特徴的な食肉消費である，white veal，馬，ウサギ，ウズラ，冷製食肉加工品について説明があった。最後にまとめとして，伝統的なイタリアの食肉と冷製食肉加工品は経済的重要性が高く（300億ユーロ／年），伝統的な製造では小規模農家が必要で持続可能な農業にも貢献していることに加え，地中海食ピラミッド（赤肉を２回未満／週，冷製食肉加工品１回未満／週を摂取）が紹介され，イタリアのバランスの良い食構成の中の食肉の位置づけについても確認された。

コロナ禍の中，昨年までライブ配信で海外からの講演を行ってきたが[5]，今回のように海外の研究者を招聘し実際に接することで，講演者との距離が大いに縮まり，交流の輪が拡がり，本学会の国際化を大いに振興している。お互いに前もって顔合わせすることで，今年のICoMSTにも日本の研究者が参加しやすくなり，今後もこのようにトップの外国人研究者の招聘を本助成事業で継続する所存である。

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８回目となった。平成30年度まで順調に学会大会を開催し，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流行・蔓延により，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，リモート方式を駆使し，神戸での国際会議を実施できたことは歴史的な出来事で，本会を運営する上でも大きな進歩と言える。本学会での助成事業で培ってきた英語でのコミュニケーションが，神戸での国際会議で実証できたことは，この助成による大きな成果であると感謝する。

本会は，研究会から学会となってまだ間もなく，学術団体として種々見直しをはかる課題を有している。例えば，学術会議協力団体加盟を目指すことや，従来春に学会大会を開催してきたものを今後どう行うか（関連学会として畜産学会大会の実施変更に伴い）など，現在ワーキンググループを立ち上げ，検討を諮っている。SDGs，動物福祉など食肉を取り囲む情勢は刻々と変化しており，学会として新しい課題を目指す必要があり，常に活性化が求められる。そのためにも本会の事業への御理解と御支援を願う次第である。

ここに，多大なる助成をいただいている（公財）伊藤記念財団に深謝し，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，**60**(**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，**62**(**2**)，145～177，2021.
4） 坂田亮一，松石昌典，佐々木啓介，琴浦 聡，他参加者44名：第68回国際食肉科学技術会議（ICoMST2022）を開催して，食肉の科学，**63**(**2**)，141～165，2021.
5） 坂田亮一：日本食肉科学会　令和３年度事業助成実施報告，令和３年度食肉に関する助成研究成果報告書，Vol. 40，494～497，2022.

© The Ito Foundation

令和４年度事業実施報告書
日本畜産学会第 130 回大会 公開シンポジウム
「未来をになう Animal Science の発展と展開」

公益社団法人日本畜産学会　理事長　小澤壯行（日本獣医生命科学大学）

〔**日時**〕2022年９月17日（土）13：30～18：30

〔**会場**〕東京農業大学農学部トリニティホールおよびZoom中継教室（学内関係者）
Zoomによるライブ配信（大会参加者）
YouTubeによるライブ配信（一般）

〔**主催**〕公益社団法人日本畜産学会

〔**企画**〕日本畜産学会第130回大会実行委員会（大会長：半澤　恵）

〔**プログラム**〕

冒頭挨拶「開催にあたって」
半澤　恵（東京農業大学農学部）

第１部「世界の家畜を視野に入れた多様な家畜の可能性」

招待講演１.「世界で主要な家畜，ヤギ」
林　義明（名城大学農学部）

招待講演２.「新規動物資源エゾシカとエミューの産業化と研究支援」
相馬幸作（東京農業大学生物産業学部）

招待講演３.「６次産業化を目指したホロホロチョウ生産」
小川　博（(公財）山階鳥類研究所）

第２部「野生動物から生命科学まで」

招待講演４.「野生ウシ・ボルネオバンテンは実在するのか？」
松林尚志（東京農業大学農学部）

招待講演５.「畜産の発展と牛伝染性リンパ腫ウイルスの過去・現在・未来」
小林朋子（東京農業大学農学部）

招待講演６.「生命をつなぐ生殖細胞～受精卵ができるまで～」
尾畑やよい（東京農業大学生命科学部）

第３部「SDGsへの取り組み」

招待講演７.「陸の豊かさを守る手段としての放牧」
八代田真人（岐阜大学応用生物科学部）

招待講演８.「“ウシの妊娠”は私たちの生活に重要でしょうか？」

© The Ito Foundation

白砂孔明（東京農業大学農学部）

招待講演９.「培養肉：おいしいお肉を食べ続けるための新しい選択肢」

島　亜衣（東京大学大学院情報理工学系研究科）

（それぞれ約20分の講演）

総合司会者：半澤　惠（東京農業大学農学部）

〔開催概要〕

動物性タンパク質の安定的な生産を継続するために解決すべき課題は，資源（野生）動物の保全，動物福祉，環境負荷（温室効果ガス，廃棄物，エネルギー出納），感染症対策（不顕性感染，獣畜共通感染），担い手不足とスマート化など多岐にわたる。これに対し家畜生産を支える畜産学は，科学と社会の発展に伴い深化と拡大をとげ，広大な領域をカバーするようになった。一方，本来は緊密に連関している基礎研究を産業から乖離したものとして排除したり，動物福祉，環境保全，代替畜産物などの視点をアンチ畜産と捉える見方も存在するが，これらの視点は対立軸ではなく，むしろ本来の畜産のあるべき姿と捉えることができる。現に畜産学分野からは，医学・分子生命科学，生態学・行動学・管理学，野生動物学，環境共生科学，栄養学等の研究者が多数輩出され，それぞれの立場から人と関わりを持つあらゆる動物との共生を追求している。そこで本申請事業，日本畜産学会第130回大会公開シンポジウムは，「未来をになうAnimal Scienceの発展と展開」と題し，未来を担う若人および一般消費者に，畜産業，畜産学の深化と拡大が，持続可能な豊かな社会を構築するための重要な鍵であることを認識し，その一翼を担う動機づけとすることを目指した。

本シンポジウムは，大会開催校である東京農業大学のトリニティホールを使用した対面形式と，ZoomおよびYouTubeによるライブ配信によるハイブリッド開催とした。開催趣旨に沿って，ポスターを作成し，東京農業大学からポスターを配布することで，学内関係者だけではなく，広く高校生にも参加を呼びかけた。学生を含む学内関係者は対面で，日本畜産学会第130回大会参加者はZoomによるオンラインで，参加を呼びかけた高校生を含む一般消費者はYouTubeによる配信での参加とした。講演時間は20分を予定し，各シンポジストからそれぞれの専門分野について，ご講演いただいた。熱のこもったご講演が開催時間終了間際まで続き，最後にシンポジスト全員から総合討論に代わって，まとめのご挨拶をいただき，公開シンポジウムを終了した。今回，シンポジスト９名のうち８名が会場に来ていただくことでき，対面での参加がかなった学生はほとんどの講演を生の声で聴くことができた。参加人数は，シンポジスト９名，対面参加200名，Zoom視聴者50名，YouTube視聴者50名であり，大会最終日の土曜で関連学会以外，他のプログラムがすべて終了したなか，長時間にわたる開催であったにも関わらず最後まで多数のご参加をいただいた。最後に，開催を無事成功に終えることができ，貴財団のご理解と助成に心より感謝の意を表する。

© The Ito Foundation

獣医学教育シンポジウム〈獣医学教育環境の更なる整備充実に向けて〉に関する開催報告

非営利活動法人獣医系大学間獣医学教育支援機構　理事長　髙井伸二

〔**日時**〕2022年11月13日　13：00～15：10

〔**会場**〕ホテル福岡シーホーク ナビスA（第21回アジア獣医師会連合（FAVA）大会会場）および動画配信

本シンポジウムは，日本獣医師会の提案により，日本獣医師会獣医学術学会年次大会において開催されることになり，獣医系全17大学が会員となって運営されている全国大学獣医学関係代表者協議会が主催した。今回は，アジア獣医師会連合（FAVA）およびアジア獣医大学協会（AAVS）との共催として，アジア諸国および国内の獣医学関係者が参加することに合わせて，その招待講演として開催した。上記国際会議参加者100名以上が聴講するとともに，動画配信も行った。以下に，本シンポジウムのプログラムと各講演の概要を報告する。

座長：久和　茂（東京大学）

〔**内容**〕

1．講演

（1）「FAVAストラテジックプラン（獣医学教育）の紹介」：バンバン・ポンジョ・プリオセリャント（FAVA事務局長／ボゴール農科大学）

FAVAの2021-2025戦略プランは，FAVA理事会ですでに承認されている。このプランは，「アジアオセアニア地域の環境のみならず，人類および動物の要望や福祉にも役立つ卓越した専門的獣医師の集まりとして一般市民および政府機関に認知される」というFAVAのビジョンを実現するための手段の一つであり，内部および外部との協働，ワンヘルス，獣医学教育，動物福祉，薬剤管理，および食の安心・安全の６本柱からなる。このうち，アジアオセアニア地域の特性に合う獣医学教育の確立が強く望まれている。FAVAは，獣医学教育の質保証と自己点検を促進することにより，継続的にこの地域に求められる獣医学教育を考え，獣医学教育の改善を援助する必要がある。この獣医学教育における戦略プランの目標は，アジア獣医大学協会（AAVS）または他の組織との共同により，１）加盟国の獣医学教育の質と地位を向上させ，２）獣医学教育規準を強化し，および３）標準的な自己点検方法を開発することである。これら３つの目標は，FAVA-Websiteのプラットフォーム開発，FAVA内の獣医学教育委員会の設立，獣医学教育に関するWOAH，EAEVE，AVMAおよびAVBCとの協議，加盟国間の調和，ASEAN関係国ネットワークとの協議，加盟国におけるコアカリキュラムおよびDay-1能力に関する調査実施，FAVAおよびAAVS共同獣医学教育委員会の設置等の活動に分けられる。戦略プランに含まれ

© The Ito Foundation

る上記すべての活動は，人類，動物，および環境の調和に基づくより良いQOLを支える良質で高質な獣医学教育を実現するために重要な役割を果たす。

（2）「日本の獣医学教育の歩みと改善への取組み」：佐藤晃一（山口大学）

日本における獣医学教育は，1984年に4年制から6年制へ移行した。その後，社会的ニーズの変化や国際的な通用性の確保，獣医師の活動分野等の偏在など我が国における獣医学教育をめぐる状況を踏まえ，文部科学省が2008年に設置した調査研究協力者会議が大学における獣医学教育の在り方について検討を行い，2011年に「今後の獣医学教育の改善・充実方策に関する報告書」の中で，以下の改革5本柱を公表した。①大学間連携の促進などによる教育研究体制の充実，②獣医学モデル・コア・カリキュラムの策定，③分野別第三者評価の実施による獣医学教育の質の保証，④共用試験の導入（CBTおよびOSCE），⑤実習室等の教育環境および附属動物病院の充実や，外部機関等との連携による臨床教育等の充実。さらに，獣医学教育改革のゴールとして，包括的な獣医学教育実践を促進し，国際標準の獣医学教育を提供する質の保証システムを構築することが推奨された。

現在，日本の獣医学教育システムは上記5本柱に集中し，各大学は教育の質保証に注力している。加えて，4大学は獣医学教育に関する欧州のEAEVE認証を取得し，2大学が認証取得の準備中である。

（3）「獣医学教育改善に向けた北海道大学獣医学部 - 帯広畜産大学畜産学部共同獣医学課程の取組み」：滝口満喜（北海道大学）

我が国の獣医学教育体制は，欧米と比べて獣医科大学の規模が小さく，このままの状態が続けば，欧米水準の国際通用性を有する獣医学教育が実施できず，やがて，日本の獣医学および獣医師の国際的信頼が失墜しかねないという問題を抱えていた。この問題を解消するために，2012年に北海道大学獣医学部と帯広畜産大学畜産学部は，お互いの大学の特徴・強みを併せ持つ，共同獣医学課程（VNJ：VetNorth Japan）を開設した。北海道大学は，伴侶動物臨床，感染症，ライフサイエンスの教育研究に強みがあり，帯広畜産大学は，生産動物臨床，食品衛生の教育研究に強みを持つ。得意分野を両大学が相互に提供して共同で獣医学教育を実施することで，教員数が100名規模のスケールで獣医学教育を実施する，我が国随一の獣医学教育体制が誕生した。

共同獣医学課程を開設したもう一つの目的は，我々が実施する獣医学教育が欧米と同等の水準にあることを国際的な獣医学教育の評価機関に評価してもらうことであった。結果として，2019年に欧州獣医学教育機関協会（EAEVE）の完全認証を取得した。この認証は，実施する獣医学教育が欧米水準の国際通用性を有することを国際的評価機関に認められたことを意味する。我々はこの間，特に臨床教育の充実に取り組むとともに，学生および外部有識者が参加する教育の質保証を導入し，自律的に継続的な教育改善が実施できる教育体制を整えた。EAEVEの認証校を卒業したからといって，すぐに欧米で獣医師として働けるわけではないが，EAEVEの認証取得とその継続により，間違いなく，これまでよりも充実した獣医学教育・獣医師養成教育を学生に提供できると自負している。

（4）「AVMA認証後のソウル大学獣医学部における獣医学教育の最新動向」：リ・インヒョン（ソウル大学）

ソウル大学獣医学部における教育改革の出発点は，アメリカ獣医師会（AVMA）への認証申請であった。2018年のAVMAによる包括的site visitにおいて，克服すべき多くの障壁や多くの弱点が見つかり，

© The Ito Foundation

なかでも，外科手技に関する技術レベルの低さおよび学生の解剖経験のないことが二大弱点として報告された。獣医学教育においては，生きた動物にアクセスすることは重要であり，学生や獣医師は必要な技術を習得することができる。しかしながら，実際の教育現場では限界があり，予期せぬ害から動物を守るためにも，シミュレーションに基づく学習が重要になってきている。ソウル大学では，2021年に獣医学生のために最新のシミュレーションラボを作った。このラボは，注射，縫合法，麻酔，内視鏡，超音波，および卵巣子宮摘出術を含む多くの臨床技術に関する14のステーションからなっている。2022年度の終了から，このラボは卒業のためのOSCE試験に使用する予定である。学生は，このシミュレーションラボでの経験を踏まえ，ボランティアの一員として保護施設におけるワクチン接種，去勢，卵巣子宮摘出に参加している。

（５）「アジア獣医大学協会（AAVS）：これまでの取組みと課題，そして今後の方向性」：芳賀　猛（東京大学）

アジア獣医大学協会（AAVS）は，獣医学教育，研究および公共サービスを促進し，改善する目的で2001年に設立されたアジアの獣医学教育機関の国際組織であり，20年以上にわたって加盟機関間の友好関係および情報交換の促進に貢献してきた。現在，東アジア，東南アジアおよび南アジアの40以上の教育機関が参加している。2016年には，第４回OIE/WOAH国際会議が開催され，アジアにおける獣医学教育の認証機関としてAAVSが活動することが確認された。2017年には，東京大学を事務局として法的に登録された。COVID-19の影響で2020年以降，対面会議は実施されていないが，オンライン技術の進歩により，オンライン会議で「コロナ禍における獣医学教育」,「アジアにおける獣医学教育機関の認証」などのオンラインセミナーを開催し，教育に関する技術プラットフォームを確立した。

国，言語，教育環境等の多様性により，獣医学教育に関する共通概念を構築することは容易ではないが，アジア特有の環境や，アジアが直面する国境を越えた動物疾患の流行等もあり，アジアの国々における獣医学教育に関する調和や質の改善は重要な事項である。AAVSでは，１）獣医学教育の推進，２）訓練および開発プログラムの促進，３）ワンヘルス概念の強化，４）操作およびパートナーシップの促進の４つの戦略ゴールからなる2022-2026の５年間の戦略プランを構築した。獣医学教育に関する二つのワーキンググループ（VEEおよびVER）を設置するとともに，FAVAとの共同委員会を設置した。

ワンヘルスの概念のもと，AAVSの戦略プランは，時代の要求に応える獣医師の養成に貢献することが期待されている。

２．パネルディスカッションとまとめ

各発表者を中心に，「アジアの獣医学教育に関するAAVSとFAVAとの連携」についてパネルディスカッションを行い，今後の協力体制を確認し，シンポジウムを終了した。

© 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４年度（Vol. 41）

2023年11月　発行

編集・発行――**公益財団法人伊藤記念財団**
THE ITO FOUNDATION
東京都目黒区下目黒一丁目８番１号　アルコタワー12階
〒 153-0064
ArcoTower12F, 1-8-1 Shimomeguro, Meguro-ku, TOKYO
153-0064 JAPAN
TEL：03（5747）9721
FAX：03（5747）9722
印刷・製本――株式会社友楽社

＜非売品・無断禁転載＞

© The Ito Foundation